



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



**Université Larbi Ben M'Hidi Oum El-Bouaghi**

Faculté des Sciences Exactes et Sciences de la Nature Et de la Vie

**Département des Sciences de la Nature et de la Vie**

**Thèse en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat en Sciences**

**Option : Microbiologie appliquée**

**Intitulée :**

**Caractérisation et Identification des algues microscopiques  
isolées des sources hydrothermales de l'Est Algérien et  
recherche d'une activité antimicrobienne de leur extrait**

Présentée par :

**BOUTARFA Soumia**

**Devant le jury :**

Président : **M. ZELLAGUI A.** (Prof.) Univ. Larbi Ben M'Hidi, Oum El-Bouaghi

Encadreur : **M. SENOUSSE M<sup>ed</sup> M.** (Prof.) Univ. Larbi Ben M'Hidi, Oum El-Bouaghi

Examineurs : **M<sup>me</sup>. BENDJEMANA K.** (Prof.) Univ. Abbes Laghrour, Khenchela

**M. FERCHA A.** (MCA) Univ. Abbes Laghrour, Khenchela

**2021-2022**

## Remerciements

Je tiens à remercier monsieur ZELLAGUI A., Professeur à l'université Larbi Ben M'Hidi Oum El-Bouaghi, pour l'honneur qu'il me fait en présidant ce jury.

Mes reconnaissances vont aussi à M<sup>me</sup>. BENDJEMANA K., Professeur à l'université Abbes Laghrour, Khenchela, pour avoir accepté d'examiner ce travail. Je suis particulièrement reconnaissante et honorée par sa participation au jury de cette thèse.

Je souhaite également remercier Monsieur FARCHA A., maitre de conférence –A- à l'Université Abbes Laghrour, Khenchela, pour avoir pris le temps de lire et d'évaluer ce travail, il m'a fait l'honneur de participer au jury. Qu'il veuille bien trouver ici, l'expression de mon profond respect et de mes vifs remerciements.

Je tiens à remercier particulièrement mon directeur de thèse le Professeur SENOUSSE M<sup>ed</sup> M., pour sa haute compétence, ses qualités humaines et pour les orientations et les conseils qu'il n'a pas manqué de me prodiguer durant la réalisation de ce travail. Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde gratitude.

Ma gratitude va aussi au professeur ABOAL Marina., pour tous ses conseils et remarques pertinents et surtout pour m'avoir facilité la réalisation des manipulations et ainsi toute l'équipe du département de Botanique, Université de Murcie, de m'avoir accueilli au sein du laboratoire et de m'avoir donné la possibilité de réaliser une grande partie de ma thèse dans les meilleures conditions. Merci surtout pour votre grande hospitalité, disponibilité et soutien.

Je tiens à remercier vivement María del Mar Santiago, María Ángeles Caravaca, José Luis Cánovas, Alejandro et Yeraí Gomez Leyva de l'université de Murcie pour leur aide et leurs encouragements.

Je suis également reconnaissante pour Messieurs CANTONATI A. et ANGELI N., MUSEO de Trento, Italie pour leur aide, et leur assistance. Qu'ils trouvent ici l'expression de ma profonde gratitude et respect.

J'exprimer ma gratitude et mes remerciements à ma mère, ma sœur et mes frères pour leur soutien permanent tout au long de cette thèse et tout au long de ma vie universitaire.

## **Dédicaces**

Je dédie cette thèse de Doctorat

A la mémoire de mon cher père

A ma très chère mère

A ma très chère sœur Darine

A mes chers frères

## Résumé :

La caractérisation des algues microscopiques des environnements extrêmes, y compris les sources thermales, est un sujet de recherche important qui a récemment émergé. Les microalgues thermophiles sont considérées comme un vivier pour plusieurs applications économiques et scientifiques. L'Algérie possède plus de 240 sources hydrothermales, néanmoins, ces sources vierges ont été peu étudiées d'un point de vue biotechnologique.

Pour cela, des échantillons de microalgues thermophiles ont été collectés des sources hydrothermales de l'Est Algérien présentant des températures de 37 à 63 °C. Les espèces ont été isolées et cultivées dans des milieux BBM et BG11 à 35 °C dans des chambres de culture (Panasonic MLR-352-PE) et la lumière a été fournie par des tubes fluorescents (Panasonic FL 40SS ENW/37 de lumière du jour froide) 16:8h lumière/obscurité avec une intensité lumineuse de 75  $\mu\text{M photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Les espèces de microalgues isolées ont été identifiées morphologiquement par microscopie. De plus, quatre espèces de microalgues thermophiles purifiées ont été sélectionnées pour produire de la biomasse afin de caractériser leur profil en acides gras AG. Ces espèces ont été cultivées dans des milieux BBM et BG11 liquides à 35 °C. Les études morphologiques combinées à des analyses phylogénétiques ont révélé que les isolats étaient *Coelastrella thermophila* var. globulina Q. Wang, H. Song, X. Liu, G. Liu et Z. Hu et trois variétés de *Mastigocladus laminosus* Cohn ex Kitchener.

Les sources hydrothermales étudiées présentaient une biodiversité algale relativement importante avec 29 espèces. Ainsi, l'espèce *Coelastrella thermophila* var. globulina présentait un profil d'AG intéressant avec des valeurs importantes d'AG polyinsaturé oméga-6 (15,80 %) et oméga-3 (05,76 %) et constitue donc une source potentielle pour la biotechnologie nutritionnelle en tant que complément alimentaire. Tandis que, les trois variétés de *M. laminosus* ont montré un profil d'AG approprié avec une proportion élevée d'AG saturé et d'AG monoinsaturé représentant une excellente matière première pour la production de biodiesel. En conclusion, les espèces caractérisées des sources thermales étudiées montrent un intérêt commercial. Les sources thermales en Algérie devraient être étudiées plus en profondeur pour explorer leur biodiversité et leurs utilisations biotechnologiques potentielles.

**Mots-clés :** acides gras ; Algérie ; algues microscopiques ; caractérisation ; biotechnologie ; sources hydrothermale.

**Abstract:**

The characterization of microscopic algae from extreme environments, including hot springs, is an important subject of research that has recently emerged. Thermophilic microalgae are a source of scientific and economic applications. Algeria has over 240 hydrothermal sources, but these sources have received little biotechnological attention.

Thermophilic microscopic algae samples were collected from hydrothermal sources in eastern Algeria at temperatures ranging from 37 to 63 degrees Celsius. The species were isolated and grown in BBM and BG11 media at temperatures ranging from 20 to 35 degrees Celsius in culture chambers (Panasonic MLR-352-PE), with light provided by fluorescent tubes (Panasonic FL 40SS ENW/37 of cold day light) 16 : 8 h light/dark with a light intensity of 75 million photons per square meter. Microscopy was used to identify isolated microalgae species based on their morphology. In addition, four isolated and cultivated Thermophilic microalgae were chosen to generate biomass to characterize their fatty acid (FA) profiles. These species were grown in liquid BBM and BG11 medium at 35 degrees Celsius. Morphological studies combined with phylogenetic analyses revealed that the isolates were *Coelastrrella thermophila* var. *globulina*. Q. Wang, H. Song, X. Liu, G. Liu, and Z. Hu, as well as three specimens of *Mastigocladus laminosus* Cohn ex Kitchener.

The hydrothermal springs studied presented a relatively high algal biodiversity with 29 species. Thus, the species *Coelastrrella thermophila* var. *globulina* presented an interesting FA profile with significant values of omega-6 (15.80%) and omega-3 (05.76%) polyunsaturated FA and is a potential source for nutritional biotechnology as a dietary supplement. While, the three varieties of *M. laminosus* showed a suitable FA profile with a high proportion of saturated FA and monounsaturated FA representing an excellent feedstock for biodiesel production. In conclusion, the characterized species of the thermal springs studied showed commercial interest. Thermal springs in Algeria should be studied further to explore their biodiversity and potential biotechnological uses.

**Keywords:** biotechnology; Algeria; characterization; fatty acids; hydrothermal sources; microscopic algae.

## ملخص :

يعتبر توصيف الطحالب الدقيقة من البيئات القاسية، بما في ذلك الينابيع الحارة، موضوعًا مهمًا للبحث ظهر مؤخرًا. تعد الطحالب الدقيقة المحبة للحرارة مصدرًا للتطبيقات العلمية والاقتصادية الجديدة، كونها تستخدم بشكل شائع في تطبيقات التكنولوجيا الحيوية. يوجد في الجزائر أكثر من 240 ينبوعًا، لكن هذه المصادر لم تحظ باهتمام كبير في مجال التكنولوجيا الحيوية .

تم جمع عينات من الطحالب الدقيقة من ينابيع حرارية بشرق الجزائر في درجات حرارة تتراوح من 37 إلى 63 درجة مئوية. تم عزل الأنواع وزراعتها في وسائط BBM و BG11 في درجات حرارة تتراوح من 20 إلى 35 درجة مئوية في غرف الاستزراع (Panasonic MLR-352-PE) ، مع إضاءة توفرها أنابيب الفلورسنت (Panasonic FL 40SS) ENW / 37 من ضوء النهار البارد 16:8 ساعة إضاءة/ظلام بكثافة ضوئية 75 ميكروفوتون لكل متر مربع. تم استخدام الفحص المجهرى لتحديد أنواع الطحالب الدقيقة المعزولة بناءً على شكلها. بالإضافة إلى ذلك ، تم اختيار أربعة طحالب دقيقة معزولة ومزروعة للحصول على الكتلة الحيوية لتحليل تركيبة الأحماض الدهنية. تم انماء الأربعة أنواع السابقة من الطحالب الدقيقة في الاوساط BBM و BG11 عند 35 درجة مئوية. أظهرت الدراسات المورفولوجية المقترنة بتحليلات جزيئية أن العزلات كانت *Coelastrella thermophila* var. *globulina*. Q. Wang, H. Song, X. Liu, G. Liu, and Z. Hu, بالإضافة إلى ثلاث أنواع *Mastigocladus laminosus* Cohn ex Kitchener. أظهرت الينابيع الحارة المدروسة تنوعًا بيولوجيًا مرتفعًا نسبيًا مع 29 نوعًا من الطحالب. *Coelastrella thermophila* var. *globulina* أظهرت بنية احماض دهنية مثيرة للاهتمام مع قيم مهمة من أوميغا 6 (15.80%) وأوميغا 3 (05.76%) مما يجعلها مصدر محتمل للتكنولوجيا الحيوية الغذائية كمكمل غذائي. بينما أظهرت الأنواع الثلاثة من *M. laminosus* تركيبة احماض دهنية مناسبة مع نسبة عالية من الدهون المشبعة و الدهون غير المشبعة الاحادية والتي تمثل مادة اولية ممتازة لإنتاج الديزل الحيوي. في الختام، أظهرت الأنواع المعزولة من الينابيع الحارة التي تمت دراستها أهمية تجارية. ينبغي دراسة الينابيع الحرارية في الجزائر بشكل أكبر لاستكشاف تنوعها البيولوجي واستخداماتها التكنولوجية الحيوية المحتملة.

**الكلمات المفتاحية:** التكنولوجيا الحيوية؛ الجزائر؛ الأحماض الدهنية ؛ المنابع الحار؛ توصيف؛ طحالب مجهرية.

# Table Des Matières

Résumés	
Liste des acronymes	I
Liste des figures	II
Liste des tableaux	III
<b>Introduction</b>	<b>1</b>

## Revue Bibliographique

### Chapitre I : Les algues microscopiques

I. Généralités sur les algues microscopiques	4
I.1. Définition des algues	4
I.2. Définition des algues microscopiques	4
II. Principaux caractéristiques des algues microscopiques	5
III. Besoins en nutriments	6
IV. Métabolisme des algues microscopiques	6
V. Classification des grandes lignées d'algues	7
V.1. Les bases de la classification des grandes lignées d'algues	7
V.1. 1. Pigments photosynthétiques	7
V.1. 2. Les polysaccharides	9
V. 2. Classification des grandes lignées d'algues	10
V. 2.1. les Chlorophycées	11
V.2.2. Cyanobactéries	12
V.2.2.1. Les cellules végétatives	13
V.2.2. 2. Les hétérocystes	13
V.2. 2.3. Les akinètes	13
V.2.3. Les algues rouges ou les Rhodophycées	14
V.2. 4. Les algues brunes ou les Ochrophyta	14
V.2.4.1. Bacillariophycées	14
V.2.4.2. Les Phéophycées	15
V.2. 5. Les Glaucophyta	15
V.2. 6. Les Haptophyta	16
V.2. 7. Les Euglenophyta	16
VI. Habitat et écologie	16

VIII. Importance et application des algues microscopiques	16
VIII.2. Métabolites des algues microscopiques	17
IX. Les domaines d'applications des Microalgues	17

## **Chapitre II : Les sources thermales et les algues microscopiques thermophiles**

1. Les environnements extrêmes	24
2. Microorganisme extrémophile	24
3. Les sites hydrothermaux	24
4. Les thermophiles	25
4.1. Microorganismes thermophiles	26
4.2. Classification des microorganismes thermophiles	27
4.3. Écologie des microalgues thermophiles	27
5. Applications des algues microscopiques thermophiles	28
6. Sources thermales en Algérie	28
6.1. Définition des eaux thermales,	28
6.2. Sources thermales en Algérie	29
7. Utilisation des eaux thermales	29

### **Matériel et Méthodes**

1. Sites d'échantillonnage et caractérisation physico-chimique des eaux	31
1.1. Présentation de la zone d'étude	31
1.2. Échantillonnage et caractérisation physico-chimique des eaux des sources thermales	32
2. Échantillonnage de tapis algaux	33
3. Échantillonnage des bacillariophycées	33
3.1. Collections d'échantillons	33
3.2. Nettoyage des échantillons	33
4. Cultures des microalgues isolées	34
5. Étude morphologique et identification taxonomique	35
6. Sélection des espèces de microalgues	35
7. Identification phylogénétique	36
7.1. Protocole de biologie moléculaire et génomique	36
a. Extraction d'ADN	36
b. Amplification des séquences d'ADNr 16S et d'ADNr 18S	36
c. Programme de PCR	37
d. Électrophorèse sur gel d'agarose, purification et séquençage	37



e. Analyses phylogénétiques	38
8. Production de Biomasse	38
8.1. Cultures des algues microscopiques	38
8.2. Récolte de la biomasse algale	39
8.3. Estimation du rendement	39
9. Extraction des lipides et quantification des acides gras	39
10. Prédiction des propriétés du biodiesel en fonction du profil des acides gras de trois variétés de <i>Mastigocladus</i>	40
11. Évaluation de l'activité antimicrobienne	40
a. Préparation des souches pathogènes	41
b. Méthodes d'extraction	41
c. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne des extraits de <i>Coelastrella thermophila</i> et des variétés de <i>Mastigocladus laminosus</i>	42
<b>Résultats et Discussion</b>	
1. Caractéristiques physicochimiques des sources thermales algériennes étudiées	43
2. La diversité des espèces algale	47
3. Études morphologiques et phylogénétique des espèces sélectionnées	52
3. 1. Variation morphologique de <i>Coelastrella</i> sp S3A	52
3.2. Étude morphologique de <i>Mastigocladus laminosus</i>	55
3.3. Étude phylogénétique de <i>Coelastrella</i> sp S3A et de <i>Mastigocladus laminosus</i>	60
4. Rendement de culture et croissance	62
5. Profil d'acides gras	64
5.1. Composition en acides gras <i>Coelastrella thermophila</i> var. globulina	64
5.2. Composition en acides gras <i>Mastigocladus laminosus</i>	69
6. Propriétés du biodiesel des acides gras de variétés <i>Mastigocladus laminosus</i>	72
7. Évaluation de l'activité antimicrobienne des extraits de <i>Coelastrella thermophila</i> et des variétés de <i>Mastigocladus laminosus</i>	74
<b>Conclusion et perspectives</b>	76
<b>Références bibliographiques</b>	79
<b>Annexes</b>	

## Liste des acronymes

AG	Acides gras
AGMI	Acides Gras monoinsaturés
AGPI	Acides Gras Polyinsaturés
AGS	Acides Gras saturés
ARA	Acide arachidonique
DHA	Acide hexanoïque
EPA	Acide Ecosapentanoïque
BBM	Bold Basale Medium
BG11	Bold Basale 11
Bp	Base pair
BLAST:	Basic Search Tool Alignment
CTAB	Cationic N-Cetyl-N-N-N trimethyl ammonium bromide
dNTPs:	Déoxyribo Nucléotides Tri Phosphates
Dwt	Dry weight
EMAG	esters méthyliques d'acides gras
MEGA 5:	Molecular Evolutionary Genetics Analysis
ML :	Maximum likelihood
NCBI:	National Center for Biotechnology Information
PCR:	Polymerase Chain Reaction
PSI :	Photosystème I
PSIIP :	Photosystème II
TAG :	triacylglycérol
USA :	United States of America
Wt:	Weight

## Liste des figures

<b>Figure 1.</b>	Arbre phylogénétique et taxonomie des algues microscopiques.	11
<b>Figure 2.</b>	Carte de l'Algérie montrant la zone d'étude dans la partie nord-est de l'Algérie.	32
<b>Figure 3.</b>	Espèces sélectionnées désignées dans les matériaux analysés.	49
<b>Figure 4.</b>	Espèces sélectionnées désignées dans les matériaux analysés (SEM-Microphotographies).	51
<b>Figure 5.</b>	Caractéristiques des cellules végétatives avec un seul pyrenoïde de <i>C. thermophila</i> var. <i>globulina</i> .	53
<b>Figure 6.</b>	caractéristiques des cellules matures de <i>C. thermophila</i> var. <i>globulina</i> .	53
<b>Figure 7.</b>	caractéristiques des sporangium de <i>C. thermophila</i> var. <i>globulina</i> .	54
<b>Figure 8.</b>	caractéristiques des cellules âgées de <i>C. thermophila</i> var. <i>globulina</i> .	54
<b>Figure 9.</b>	caractéristiques morphologiques principales de <i>Mastigochladus laminosus</i> S4BB.	57
<b>Figure 10.</b>	Caractéristiques morphologiques principales de <i>Mastigochladus laminosus</i> S4B11.	58
<b>Figure 11.</b>	caractéristiques morphologiques principales de <i>Mastigochladus laminosus</i> S9BB.	58
<b>Figure 12.</b>	Arbre phylogénétique de la souche <i>Coelastrella</i> sp S3A.	62
<b>Figure 13.</b>	Espèces de microalgues sélectionnées désignées dans les matériaux analysés.	Annexe 2

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1.</b>	Amorces de PCR utilisées pour l'amplification du gène ARNr 16S pour les cyanobactéries et 18 ARNr pour les chlorophytes.	37
<b>Tableau 2.</b>	Caractéristiques générales des sources thermales algériennes analysées dans l'étude.	45
<b>Tableau 3.</b>	Principaux composants chimiques (mg/l) des échantillons d'eaux des sources thermales algériennes.	46
<b>Tableau 4.</b>	Composition spécifique des microalgues dans les sources thermales étudiées.	48
<b>Tableau 5.</b>	Principales caractéristiques morphologiques des espèces de <i>Mastigocladus laminosus</i> Cohn ex Kitchener.	56
<b>Tableau 6.</b>	Composition des acides gras de <i>C. thermophila</i> var. globulina.	68
<b>Tableau 7.</b>	Composition des acides gras de <i>Mastigocladus laminosus</i> .	71
<b>Tableau 8.</b>	Propriétés prédites du biodiesel à partir des profils d'AG de <i>Mastigocladus laminosus</i> .	75

# **INTRODUCTION**

## Introduction

Les algues microscopiques sont un groupe extrêmement diversifié et hautement spécialisé de micro-organismes photosynthétiques, allant des organismes unicellulaires aux organismes multicellulaires, avec une grande diversité des caractéristiques morphologique, physiologiques et biochimiques, adaptés à divers habitats écologiques (Abou-Shanab *et al.*, 2011 ; Kumara *et al.*, 2019; Alshareef, 2021). Le terme "algues" n'a pas une définition taxonomique standard mais ce terme est couramment utilisé pour unifier un groupe hétérogène d'origine polyphylétique, qui, en raison de leur organisation cellulaire procaryote et eucaryote, appartient à deux domaines de l'arbre de la vie, Eubacteria et Eukarya. Ces organismes utilisent l'énergie solaire pour unir l'eau au dioxyde de carbone afin de générer de la biomasse, qui peut être utilisée à de multiples fins biotechnologique (Kumara *et al.*, 2019 ; Xu *et al.*, 2020).

Les algues microscopiques sont résistantes et se trouvent également dans de nombreux autres endroits de notre planète. Il s'agit notamment des sols et les substrats solides subaériens (écorces, racines et feuilles d'arbres, rochers, murs de bâtiments urbains (Gartner *et al.*, 2021)...ect et d'autres encore, préfèrent la neige, la glace et les sources thermales (Aguilera *et al.*, 2012 ; Jonker *et al.*, 2013), qui dépassent les limites normales de croissance et ont longtemps été considérées comme inhospitalières pour les organismes vivants (Gartner *et al.*, 2021).

Récemment, les microalgues ont reçu une attention croissante dans la recherche biotechnologique, notamment en ce qui concerne la production de biocarburants à base de lipides, et aussi l'utilisation d'acides gras polyinsaturés (AGPI) en tant que compléments pour la nutrition humaine et animale (Liu *et al.*, 2016). Une large gamme de composés précieux peut également être extraite, tels que les graisses, les acides gras polyinsaturés, l'huile, les colorants naturels, les sucres, les pigments, des toxines, les antioxydants ; des agents antimicrobiens, composés bioactifs de grande valeur, et autres produits chimiques fins, avec de nombreux domaines d'applications commerciales possibles, notamment les domaines des biocarburants, les cosmétiques, les produits pharmaceutiques, la nutrition et les additifs alimentaires, l'aquaculture et la bioremédiation (Mata *et al.*, 2010 ; De Morais *et al.*, 2015).

Les sources thermales constituent un habitat très intéressant pour l'étude microbiologique. Ces habitats sont des biotopes bien isolés se produisant en grappes dans des régions globalement éloignées, et les micro-organismes qui les habitent sont des extrémophiles

adaptés à des conditions assez différentes de celles de l'environnement habituelle (Aguilera and Amils, 2012 ; McGregor and Rasmussen, 2008). Les températures élevées, avec leurs gradients prononcés, la composition chimique diversifiée de l'eau et l'isolement géographique des sources thermales, qui sont tous considérés comme inhibant l'échange d'espèces, conduisent à l'établissement de communautés microbiennes spécifiques et distinctes (Strunecký et al., 2019).

Pour les micro-organismes eucaryotes, la température la plus élevée signalée est de 62 °C (Aguilera and Amils, 2012). En général, les eaux thermales coulent à une température égale ou supérieure à 36,71 °C (Pentecôte et al., 2003). La température est l'un des facteurs les plus importants qui influencent la distribution et l'abondance des espèces en raison de ses effets sur les activités enzymatiques (Aguilera and Amils, 2012).

De plus, les sources thermales sont des environnements écologiques très prometteurs pour l'étude des communautés d'algues, y compris les membres des Cyanophyta (bleu-vert), Chlorophyta (algues vertes) et Bacillariophyta (diatomées) habitant ces sources thermales et en raison de leurs remarquables adaptations aux conditions difficiles, ces micro-organismes attirent depuis longtemps l'attention des chercheurs (Onker et al., 2013; Lai et al., 2019).

Les sources thermo-minérales sont considérées comme des habitats très intéressants pour l'étude de la microflore algale (Lai et al., 2019). Ces dernières années, les micro-organismes thermophiles ont été largement utilisés pour leur potentiel biotechnologique, notamment dans les procédés industriels. La biotechnologie industrielle permet la production de grandes quantités de produits chimiques, de substances polymériques et de biocarburants (Chen et Jiang, 2018). Les microalgues thermophiles qui habitent les sources thermales sont particulièrement intéressantes pour les biologistes car l'origine génétique de la thermophilie n'est pas entièrement comprise (Bauman et Simmonds, 1969). De même, isoler les souches de microalgues indigènes de ces habitats extrêmes est essentiel, et plusieurs de ces espèces pourraient être plus précieuses que les souches disponibles dans le domaine biotechnologique (Covarrubias et al., 2016; Goecke et al., 2020).

L'Algérie compte plus de 240 sources thermales à travers le pays (température comprise entre de 31 et 98 °C), dont plus de 76 sources thermales situées principalement dans sa zone nord-est, avec des paramètres physiques et chimiques variables (Bouaicha et al., 2019). Ces écosystèmes extrêmes peuvent contenir des microorganismes comme les microalgues qui peut

avoir des caractéristiques métaboliques intéressantes. Néanmoins, les études sur la biodiversité des microalgues thermophiles de ces sources thermales algériennes sont très rares et leur potentiel en biotechnologie reste encore totalement inexploré. Malgré le large éventail de sources thermales en Algérie, ni la composition taxonomique ni les caractéristiques morphologiques des diatomées n'ont encore été étudiées. C'est dans ce contexte que cette recherche a été réalisée.

Les principaux objectifs de cette étude étaient : (1) de décrire la composition spécifique et la biodiversité de microalgues eucaryotes et procaryotes (cyanobactéries) des sources hydrothermales de l'Algérie ; (2) Isolement, purification et maintien des cultures de microalgues isolées des eaux thermales de l'Algérie ; (3) analyser les extraits des espèces purifiées et cultivées ; et déterminer leurs éventuelles utilisations biotechnologiques.

Cette présente thèse est subdivisée en trois parties : une synthèse bibliographique, l'étude expérimentale et enfin les résultats et discussion.

La partie bibliographique comporte deux grands chapitres : le premier chapitre traite des généralités sur les algues microscopiques, leurs classifications, ainsi que leurs principales caractéristiques ; en plus ce premier chapitre est consacré à l'étude des Métabolites des algues microscopiques, leurs propriétés biologiques. Le deuxième chapitre présente les algues microscopiques et les cyanobactéries thermophiles.

La partie expérimentale présente la description des matériels et méthodes utilisés pour répondre aux besoins expérimentaux de cette thèse. Cette partie se déroule aussi en deux axes, la première porte sur l'isolement, culture et l'identification des algues microscopiques collectées des différentes sources hydrothermales algériennes. Ainsi, nous avons identifié morphologiquement et phylogénétiquement des espèces de microalgues natives sélectionnées. Dans le deuxième axe, nous nous sommes intéressés à caractériser le profil des acides gras des espèces purifiées et cultivées et aussi à valoriser leur intérêt biotechnologique et recherche d'une activité antimicrobienne de leur extrait.

Enfin, dans la troisième partie, nous avons présenté et discuté les résultats obtenus, en les comparant à ceux publiés dans la littérature scientifique.



# **Revue Bibliographique**

## Chapitre I : Les algues microscopiques

### I. Généralités sur les algues microscopiques

#### I.1. Définition des algues

. Le mot algue est dérivé de mot "alga" (latin) et (grec) "phykos". Les algues sont un groupe très diversifié d'organismes photosynthétiques possédant la chlorophylle a adaptés à un large éventail d'habitats écologiques ; allant de l'eau douce aux habitats extrêmes tels que la neige, et les sources chaudes (Abou-Shanab et al., 2011 Patel et al., 2019). Ces organismes sont dépourvues de tige, de racine, de feuille ou de fleur, leur appareil végétatif relativement simple est nommé « thalle » (Guillaume et al., 2010; Prescott et al., 2011).

Le terme « algues » n'a pas de statut taxonomique mais est couramment utilisé pour unifier les phototrophes thaliques, qui catalisent l'énergie solaire par photosynthèse et produisent de l'oxygène et génère de la biomasse. Les algues sont un groupe hétérogène d'origine polyphylétique, qui par leur organisation cellulaire procaryote et eucaryote appartiennent à deux domaines de l'Arbre de vie, Eubacteria et Eukarya (Mohammed et al., 2022). Les algues eucaryotes sont regroupées sous le royaume Protista tandis que les algues procaryotes cyanobactéries ou algues bleu-vert sont classé comme bactérie (Kingdom Monera) (Chu, 2012).

Les algues comprennent les formes microscopiques (microalgues) et macroscopiques (macroalgues). Ces organismes se trouvent libres ou attachées à un support, avec un taille allant de moins d'un micromètre pour l'algue Prochlorococcus (0.5  $\mu\text{m}$ ) à une dizaines de mètres comme les macrocystis (60 m) (Floc'h et al., 2010, Chu, 2012). Le nombre d'espèces d'algues a été estimé entre un et dix millions (Chu, 2012; Guiry et al., 2014).

#### I.2. Définition des algues microscopiques

Les algues microscopique ou appelés aussi les microalgues sont des micro-organismes unicellulaires ou pluricellulaire photoautotrophes qui habitent dans les biotopes aquatiques et dans les écosystèmes terrestres, et ont des formes variées avec un diamètre ou une longueur d'environ 3–10  $\mu\text{m}$ . Le terme microalgues comprend des organismes procaryotes et eucaryotes (de Morais et al., 2015; Mohammed et al., 2022). Il existe un large éventail d'espèces estimé entre 50 000 et 1 million, ce qui représente un grand potentiel et une grande diversité par rapport aux 10 000 espèces étudiées (Dejoye, 2013). Nonobstant l'intérêt

grandissant des industriels, uniquement quelques dizaines des espèces d'algues microscopiques sont cultivées à l'échelle industrielle. La plupart des algues microscopiques se développent à une température de 25-30°C (Spolaore et al., 2006; Lucchtti, 2014).

Les microalgues sont des ressources biologiques importantes qui ont un large éventail d'applications biotechnologiques et économiques (Chu, 2012). Il y a longtemps, le criblage des microalgues a attiré l'attention en raison de leur potentiel utilisation dans divers domaines scientifiques et biotechnologiques ; comme des compléments alimentaires pour prévenir de nombreuses maladies ou comme matière première pour la production de biodiesel (Chu, 2012; Mohammed et al., 2022). En raison de leur haute valeur nutritionnelle, les microalgues telles que la spiruline et la chlorelle sont cultivées en masse pour des aliments diététiques (Chu, 2012).

## **II. Principaux caractéristiques des algues microscopiques**

La plupart des algues microscopiques sont des organismes photo-autotrophes ou autotrophes. Elles utilisent la photosynthèse pour extraire de l'énergie de la lumière et le CO<sub>2</sub> constitue la source essentielle de leur nutrition. Leur structure cellulaire simplifiée et leur taille minuscule leur confère la possibilité de réaliser une photosynthèse très opérante (Dejoye, 2013). Elles transforment l'énergie solaire en hydrates de carbone et lipides, des molécules avec une énergie plus stable. Plusieurs espèces de microalgues possèdent la capacité d'assembler, dans des conditions particulières, le carbone capté, en lipides désignés triglycérides. Les lipides stockés forment un réservoir. En conditions régulières, ces proportions demeurent faibles, et les lipides sont particulièrement composés de phospholipides et de glycolipides (constituants des membranes). Néanmoins, certaines espèces ont la capacité d'assembler jusqu'à 80 % de leur poids sec en lipides (Chisti, 2007 ; Dejoye, 2013).

Plusieurs espèces d'algues microscopiques ont la capacité de se accroître en absence de lumière ; elles sont appelées hétérotrophes. Pour cela, elles se développent en mode clos dans des bioréacteurs similaires à des fermenteurs et s'alimentent de carbone organique (Perez-Garcia et al., 2011; Dejoye, 2013).

**III. Besoins en nutriments**

Tous les organismes ont besoin de nutriments de base pour leur croissance et leur multiplication, et la plupart des microalgues peuvent répondre à tous leurs besoins cellulaires pour leur croissance avec quelques composés clés ; macronutriments, micronutriments (oligo-éléments) et vitamines (Andersen, 2005 ; Mohamed Abdelaziz, 2014).

Deux macronutriments, l'azote (N) et phosphore (P), sont les plus importants pour la croissance des microalgues et sont nécessaires avec des grandes quantités. De plus, la silice (Si) est nécessaire à la production de parois cellulaires par les diatomées, et quelques chrysophytes et silicoflagellés. Bien qu'il soit requis en moindre quantité, le sodium (Na), le potassium (K), le soufre (S) et le magnésium (Mg) sont également considérés comme des macronutriments. Les micronutriments (oligo-éléments) ne sont nécessaires qu'en quantités intermédiaires ou faibles, et ces comprennent le fer (Fe), le cuivre (Cu), le calcium (Ca), le chlorure (Cl), le manganèse (Mn), le zinc (Zn), le bore (Bo), cobalt (Co) et molybdène (Mo). Certaines microalgues ont également besoin de vitamines comme la B1 (thiamine), B12 (cyanocobalamine) et H (biotine) pour la croissance. Ce sont les composés de base que les microalgues doivent provenir de tout milieu utilisé pour la culture (Mohamed Abdelaziz, 2014)

**IV. Métabolisme des algues microscopiques**

Les microalgues sont des organismes photosynthétiques qui jouent un rôle clé dans les écosystèmes aquatiques. Environ 40 % de la photosynthèse mondiale est due à ces micro-organismes. Le métabolisme des microalgues réagit aux changements de l'environnement extérieur avec des modifications de son environnement intracellulaire. Ainsi, la manipulation des conditions de culture, ou la présence ou absence de certains nutriments, stimule la biosynthèse de composés spécifiques (de Morais et al., 2015). Les algues représentent un groupe important d'organismes pour l'exploitation biotechnologique, en particulier pour produits, processus et services, avec d'importants impacts dans les industries alimentaires et pharmaceutiques ainsi comme en santé publique (Chu, 2012).

Plusieurs études ont été menées pour étudier la produits du métabolisme des microalgues non seulement pour comprendre nature mais aussi de rechercher des substances ayant des applications possibles chez l'homme dans différents domaines d'intérêt. Le criblage d'extraits ou l'isolement de métabolites de différentes microalgues est une méthode courante pour

déterminer l'activité biologique de ces composants. Les microalgues ont été décrites comme de sources riches de divers biocomposés d'intérêt commercial (de Morais et al., 2015).

Dans termes de biotechnologie environnementale, les microalgues sont utiles pour la bioremédiation des eaux usées agro-industrielles, et comme outil biologique pour l'évaluation et la surveillance des toxiques environnementaux tels que les métaux lourds, et les pesticides (Chu, 2012). Outre, l'utilisation des microalgues a attiré beaucoup d'attention dans divers secteurs industriels telles que l'alimentation humaine, animale et l'aquaculture, aussi dans les domaines pharmaceutiques et cosmétiques (Alshareef, 2021).

## **V. Classification des grandes lignées d'algues**

### **V.1. Les bases de la classification des grandes lignées d'algues**

Plusieurs caractères environnementaux, biochimiques, ou physiologiques contribuent dans la classification des algues y inclus leurs biotopes, les structures cellulaires, le mode nutritionnel, aussi le type et la localisation des pigments et les molécules de réserve. Bien que une extrême distinction et complexité structurale, tant d'un point de vue macroscopique que microscopique, les algues sont néanmoins classifiées en plusieurs embranchements selon des critères établis suivant leurs polysaccharides de stock, ainsi leurs arrangements pigmentaires, ou leurs caractéristiques cellulaires (Reviere, 2002).

#### **V.1. 1. Pigments photosynthétiques**

Les microalgues sont des microorganismes producteurs de pigments. Selon leurs arrangements pigmentaires se sont classifiées dans des embranchements, avec une énorme variété d'espèces dans chaque catégorie, à savoir les algues brunes, algues rouges et algues vertes (Belghit et al., 2017). Ces pigments algales ont attiré l'attention pour leur utilisation dans les industries alimentaires humaines et animale, ainsi que dans les domaines cosmétiques, aussi ces pigments sont utilisés comme des molécules bioactives avec un potentiel antioxydant, antidiabétique, immunomodulateur, antiangiogénique, anti-inflammatoire, etc... (Manivasagan et al., 2017).

La croissance de nombre de colorants alimentaires naturels (et en particulier ceux qui présentent des bienfaits pour la santé) a été motivée par l'intérêt des consommateurs pour les additifs alimentaires non synthétiques (Heldt et Piechulla, 2011). Les pigments d'algues

comprennent la chlorophylle, Phycobiliprotéines et les caroténoïdes tels que les carotènes ( $\beta$ -carotène) et xanthophylles (fucoxanthine, violaxanthine, antheraxanthine, zéaxanthine, lutéine, néoxanthine) (Manivasagan et al., 2017).

### ➤ **Chlorophylle**

La chlorophylle est un pigment omniprésent dans la plupart des plantes, des algues et des bactéries photosynthétiques. Il joue un rôle clé dans la photosynthèse et dans plusieurs fonctions biologiques (Heldt et Piechulla, 2011).

La chlorophylle est un chromophore cyclisé avec 4 anneaux de pyrrole, un tétrapyrrole (anneau de porphyrine), un centre d'ion magnésium et une long hydrophobe queue. Les électrons qui entourent l'anneau sont libres, ce qui augmente le potentiel de la chlorophylle à gagner ou à perdre des électrons. Cela explique aussi son instabilité dans la présence d'enzymes, d'acides, d'oxygène, de lumière et de la chaleur. Plusieurs formes de chlorophylle existent dans nature. Ceux-ci incluent la chlorophylle a, b, c, d, e et f. Les différentes formes de chlorophylle conduisant structurellement à une différence dans les caractéristiques d'absorption (Farineau et Morot-Gaudry, 2005 ; Heldt et Piechulla, 2011). Dans la chlorophylle a (chl-a), anneau b contient un groupe méthyle, tandis qu'un groupe formyle est présent dans la chlorophylle b (chl-b) (Nobel, 2009).

### ➤ **Phycobiliprotéines**

Les phycobiliprotéines sont une famille de complexes protéiques pigmentaires solubles dans l'eau, que l'on trouve principalement dans les Rhodophycées et les Cyanophycées. Ils se présentent sous forme de protéines (30 à 35 kDa) liées de manière covalente via des acides aminés ; la cystéine (Cys) aux phycobilines pigmentées (586 kDa) (Nobel, 2009). La famille des phycobiliprotéines est composée de la phycoérythrine (pigment rouge), de la phycocyanine (pigment bleu pigment) et l'allophycocyanine (pigment bleu clair) (Watanabe et Ikeuchi, 2013).

Les phycobilines sont des tétrapyrroles comme les chlorophylles, mais se présentent sous forme de chaîne ouverte comme le phytochrome (contrairement aux chlorophylles dans lesquelles les tétrapyrroles sont comme des porphyrines a cycle fermé) (Kitade et al., 2018 ; Zhang et al., 2017). Les multiples groupes prothétiques chromophores (4 -34) dans les

phycobiliprotéines les rendent hautement fluorescents avec des coefficients d'absorption élevés (Hermanson, 2013 ; Viskari et Colyer, 2002).

### ➤ **Caroténoïdes**

Les caroténoïdes sont une classe de pigments naturels jaunes, verts et orange largement répandus. Distribués dans la nature et synthétisés par les plantes, certaines bactérie (cyanobactéries et bactéries non- photosynthétique), champignons et algues (Avalos et Carmen, 2015 ; Yahia, et al., 2017). Plus de 600 caroténoïdes ont été identifiés à ce jour (Yahia et al., 2017).

Les caroténoïdes sont classés en deux groupes principaux : les hydrocarbures purs (carotènes, par exemple ;  $\alpha$ - carotène,  $\beta$ -carotène et lycopène) et les dérivés oxygénés (alcooliques) (xanthophylles telles que la lutéine et zéaxanthine). Les caractéristiques structurelles des caroténoïdes telles que la longueur, la taille, les groupes fonctionnels, l'isomérisation, la polarité jouent un rôle important dans la détermination de l'absorption, et la coloration (Cooperstone et al., 2015).

Comme les phycobiliprotéines, les caroténoïdes servent comme de pigments accessoires ; qui absorbent et transmettent l'énergie lumineuse à la chlorophylle, ainsi participent à la photoprotection. Lorsqu'ils sont consommés par les humains et les animaux, certains caroténoïdes sont impliqués aux activités antioxydants, ainsi ces pigments jouent d'autres fonctions physiologiques telles que la protection contre diverses maladies (Miyashita, Hosokawa, 2014). Les caroténoïdes sont utilisés comme colorants naturels et comme additif pour l'alimentation animale, ainsi que dans les cosmétiques. En termes de pertinence nutritionnelle, certains caroténoïdes, en particulier le b-carotène agit comme la provitamine A. Les caroténoïdes sont également connus pour avoir une valeur thérapeutique, y compris activités anti-inflammatoires et anticancéreuses, qui sont largement attribués à leurs propriétés antioxydantes (Chu, 2012).

### **V.1. 2. Les polysaccharides**

Les polysaccharides appelé également glucanes sont des polymères glucidiques constitués par la photosynthèse. Ils sont divisés en deux catégories : les polysaccharides de réserve et les polysaccharides pariétaux (Ruiz, 2005).

➤ **Les polysaccharides de réserve**

Des glucanes de réserve dissolubles existent dans les vacuoles, alors que d'autres glucanes insolubles constituent des granules identifiables au microscope sont installés dans les vacuoles (Ruiz, 2005).

➤ **Les polysaccharides pariétaux**

La taxinomie des familles d'algues se base sur les caractéristiques chimiques des colloïdes qu'elles synthétisent autour de la cellule (Candless, 1978). Les parois des algues sont distinctes des autres organismes végétaux par leur disposition et leur composants. Ils peuvent généralement être interprétés comme une composition biphasique composée d'un cycle fibrillaire cristalline squelettique et d'un cycle matricielle, dont la structure change suivant les espèces (Neil et al., 1984).

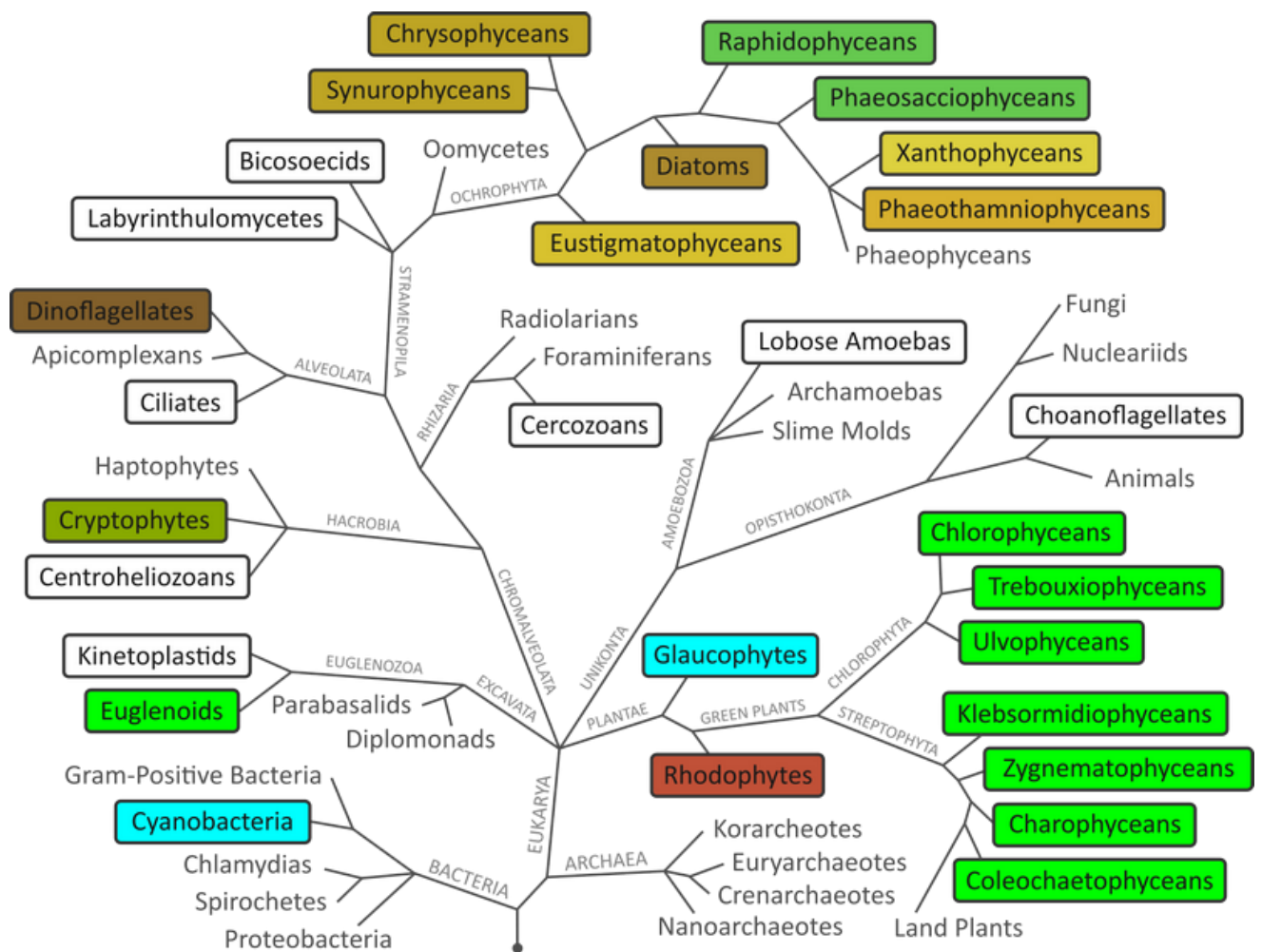
## **V. 2. Classification des grandes lignées d'algues**

Généralement, les algues sont un groupe extrêmement diversifié d'eucaryotes et organismes photosynthétiques procaryotes, qui possèdent divers traits physiologiques, morphologiques et génétiques pour conférer la capacité de produire divers composés bioactifs. Chlorophyta est l'un des plus grands phylums avec différentes espèces et une large répartition géographique. Ces organismes microscopiques présentent différentes morphologies avec environ 3 à 10 µm (longueur ou diamètre) et supportent environ 40 % de la photosynthèse globale (Kumar et al., 2019)

Cet organisme, ancêtre commun du clade des cyanobactéries, est également à l'origine des algues eucaryotes. On pense qu'un événement endosymbiotique est responsable à la fois des algues rouges et vertes, où ces dernières se sont différenciées en Chlorophyta et Charophyta, l'ancêtre vivant le plus proche des plantes terrestres (Mohamed Abdelaziz, 2014)

Les principaux groupes de microalgues diffèrent principalement en termes de composition pigmentaire, constituants biochimiques, ultrastructure et cycle de vie. Les groupes principaux des algues comprennent les diatomées (classe Bacillariophyceae), Chlorophyceae (algues vert), brun doré (Classe Chrysophyceae), et bleu-vert ou cyanobactéries (classe des cyanophycées) (Figure 1) (Sheehan et al., 1998 ; Moreno, R. 2012.)





**Figure 1.** Arbre phylogénétique et taxonomie des algues microscopiques. <http://www.keweenawalgae.mtu.edu/> (consulté le 20/05/2022)

### V. 2. 1. les Chlorophycées

Les Chlorophycées est un groupe d'algues vertes qui appartient à une lignée au sein du super groupe Archeaeplastida (Archibald et coll. 2017). Cette algue verte est un eucaryote photosynthétique caractérisé en ce qu' il a les pigments de chlorophylle a et chlorophylle b; chloroplastes sans endoplasme externe réticulum; véritables parois cellulaires en amidon et cellulose; et thylakoïdes sont généralement en piles de deux à six (Silva et al., 2021)

Les chlorophytes sont une lignée ancienne et taxonomiquement diversifiée d'algues vertes avec environ 8 000 espèces décrites et environ 5 000 espèces encore non décrites. Pendant longtemps, la classification de ces organismes a été entièrement basée sur les caractéristiques morphologiques et cytologiques des stades végétatifs de leur cycle de vie (Goecke et al.,

2020). Les membres de ce groupe font partie des microalgues les plus courantes, en particulier en eau douce. Ce groupe contient de la chlorophylle a et de la chlorophylle b et plusieurs caroténoïdes qui peuvent être synthétisés dans des conditions de stress et faire changer de couleur l'algue. L'amidon est leur principal composant de stockage. Chez certaines espèces, cependant, il a été constaté que la carence en N stimule l'accumulation de lipides. Les plantes supérieures sont considérées comme des descendants des algues vertes, et pour cette raison, ont reçu plus d'attention que d'autres groupes d'algues avec *Chlorella* et *Chlamydomonas* étant deux genres couramment étudiés (Sheehan et al., 1998 ; Moreno, 2012).

Récemment, diverses études ont rapporté l'intérêt biotechnologique de ce genre en raison de sa teneur élevée en pigments et en acides gras, ainsi que pour une utilisation potentielle en bioremédiation (Goecke et al., 2020).

## **V.2. 2. Cyanobactéries**

Les cyanobactéries sont des micro-organismes autotrophes qui ont une longue histoire évolutive et de nombreuses caractéristiques métaboliques intéressantes. Les cyanobactéries produisent de l'oxygène, photosynthèse de type végétal. L'atmosphère riche en oxygène de la Terre et l'origine cyanobactérienne des plastes chez les plantes sont les deux principales contributions évolutives apportées par cyanobactéries (Sivonen, 2009 ; Komarek et al., 2003).

Les cyanobactéries sont des procaryotes photosynthétiques gram-négatifs qui sont des habitants communs des écosystèmes terrestres et aquatiques, tels que les lacs, les eaux thermales et les eaux saumâtres. Certaines cyanobactéries sont capables de transporter sur la fixation de l'azote. Les cyanobactéries sont présentes dans divers milieux aquatiques (eau douce et saumâtre, océans et sources chaudes), milieux terrestres (sol, déserts et glaciers) et des symbioses (avec des plantes, des lichens, et animaux primitifs). Dans les milieux aquatiques, les cyanobactéries sont d'importants producteurs primaires et font partie du phytoplancton (Sivonen, 2009).

Cyanobactéries se distinguent des autres bactéries par la photosynthèse oxygénée. Les cyanobactéries ont été les premiers colonisateurs de la Terre et, grâce à la photosynthèse, elles ont libéré de l'oxygène qui a permis à d'autres formes de vie de vivre sur cette planète. Les

algues sont en outre divisées en plusieurs grands groupes, à savoir vert, algues brunes et rouges en fonction de leur pigmentation (Chu, 2012).

Les cyanobactéries peuvent également former des biofilmes et tapis (cyanobactéries benthiques). Dans les eaux eutrophes, les cyanobactéries forment fréquemment des occurrences massives, appelées l'eau fleurit. Les cyanobactéries étaient autrefois appelées algues bleues. Les occurrences massives de cyanobactéries peuvent être toxiques. Ils ont causé un certain nombre d'empoisonnements d'animaux et constituent également une menace pour la santé humaine (Sivonen, 2009).

Les cyanobactéries possèdent des plusieurs formes ; elles peuvent être unicellulaires de forme arrondi ou bâtonnet, soit pluricellulaires constituant donc des colonies filamenteuses ou trichomes. Leur dimension varie de 1 à 10  $\mu\text{m}$  (Delarras, 2010). Elles possèdent trois formes structurales :

#### **V.2.2.1. Les cellules végétatives**

De forme variées rondes, ovoïdes, oblongues, quadratiques et avec un contenu cellulaire homogène ou non, avec ou sans vacuoles à gaz. Les cellules végétatives, cellules photosynthétiques, sont formées dans des conditions de croissances favorables. Cellule mère dont les fonctions métaboliques sont actives ou se fait la formation d'une endospore ; le phénomène de sporulation (Tortora et al., 2003 ; Komarek et al ., 2003).

#### **V.2.2.2. Les hétérocystes**

Les hétérocystes ont un certain nombre de traits caractéristiques facilement visibles par microscopie optique. Ils sont généralement plus gros que les cellules végétatives, avec un cytoplasme moins granulaire, des parois cellulaires épaissies et des corps polaires rétractiles au point de contact avec les cellules adjacentes (David et Paula, 1999).

#### **V.2.2.3. Les akinètes**

Les akinètes sont des cellules caractérisées par une grande taille par rapport aux cellules végétatives, leur paroi cellulaire épaisse et leurs couches tégumentaires supplémentaires, et leur teneur élevée en réserves d'azote sous forme de granules de cyanophycine (fig. 04). Ces dernières germent pour former de nouveaux filaments (Pichel, 2009).

### V.2.3. Les algues rouges ou les Rhodophycées

Les algues rouges sont un groupe très diversifié. Ce sont des photoautotrophes ; qui contiennent les pigments suivants : la chlorophylle a, des caroténoïdes et des phycobiliprotéines : l'allophycocyanine (bleu), la phycocyanine (bleu) et la phycoérythrine qui lui donne sa couleur rouge. Ces algues se trouvent dans les eaux salées (ex. *Porphyridium*) et les eaux saumâtres, mais rarement dans les eaux douces (Hamedi, 2019).

Cette classe contient près de 400 espèces présentant dans la plupart des cas un métabolisme photo-autotrophes ou photo-organotrophes. Elles se distinguent généralement par un cycle de reproduction complexe (Garon-Lardiere, 2004).

### V.2. 4. Les algues brunes ou les Ochrophyta

Ochrophyta sont des microalgues brun doré appelées microalgues brunes. Cette Charophyta se caractérise par la présence de plastes à 04 membranes (endosymbiotique secondaires) et possèdent les chlorophylles a et c avec d'autres pigments (Amirouche et al., 2009 ; Fazlutdinova et al., 2021).

#### V.2.4.1. Bacillariophycées

Les Bacillariophycées sont un groupe d'organismes eucaryotes qui pourraient occuper un large éventail d'habitats, de nombreuses espèces de Bacillariophycées sont connues pour se produire dans des habitats écologiques extrêmes tels que dans la glace (Nikulina et Kociolek, 2011), ainsi que dans des sources chaudes et des études récentes. ont montré que des Bacillariophycées ont été enregistrées dans des sources chaudes à des températures de 48 °C et jusqu'à 70 °C (Owen et al., 2008 ; Ghazzi et al., 2013; Nikulina et Kociolek, 2011; Fazlutdinova et al., 2021). Dans les sources thermales, la diversité des espèces de Bacillariophycées est influencée par la composition minérale et la température de l'eau (Cantonati et Lange-Bertalot, 2010, Abdelwahab et Amin, 2017).

De plus, l'étude des diatomées de ces habitats pourrait éventuellement conduire à la découverte de Bacillariophycées très intéressantes pouvant être utilisées dans un large éventail de domaines thermo-tolérants (Pumas et al., 2018). De même, les Bacillariophycées qui prospèrent dans des environnements thermiques sont considérées comme une matière première prometteuse pour le biodiesel en raison de leur stabilité thermique (Pruetiworanan et

al., 2017). La recherche sur les Bacillariophycées thermotolérantes a révélé que Rhopalodia, Denticula, Mastogloia, Navicula, Nitzschia, Pinnularia, Caloneis, Amphora Achnanthes : Achnanthidium exiguum, Halamphora, Anomoeoneis et Diploneis sont des genres trouvés dans les habitats thermiques (Ghozzi et al ., 2013 ; Lopez-Sandoval et al., 2016). Malgré une importance considérable dans la biodiversité des sources chaudes, les Bacillariophycées prospérant dans ces environnements restent peu étudiées (Pumas et al., 2018 ; Fazlutdinova et al., 2020).

#### **V.2.4.2. Les Phéophycées**

Les phéophytes, ou algues brunes, possèdent de la chlorophylle a et c, avec d'autres pigments et des réserves cytoplasmiques et vacuolaires variables. La couleur brune de ces algues est causée par la prédominance des pigments xanthophylle, et la fucoxanthine, qui cachent la chlorophylle a et c, ainsi que le bêta-carotène. Elles sont riches en phlorotanins et en alginates aux propriétés antioxydants (Garon-Lardiere, 2004 ; Zehlila, 2017).

Généralement, elles sont marines, ce vaste groupe contient des dizaines de lignées, dont des diatomées, des chrysanthèmes et des xanthophycètes. Toutes ont une structure pluricellulaire mais leurs dimensions varient d'éléments microscopiques à de très gros spécimens (Garon-Lardiere, 2004).

#### **V.2. 5. Les Glaucophyta**

Glaucophyta forme une petite population d'algue unicellulaire, autotrophe, Parfois colonnaire. Elles possèdent deux flagelles inégaux, ces microalgues sont rares et strictement réservées à l'eau douce, et leurs plastes sont bleu-vert due à la présence de Polychrome et Chlorophylle A. Glaucophyta contient également du  $\beta$ ,  $\beta$ -carotène et caroténoïdes (Faller, 2011). On dénombre trois ordres, contenant chacun une famille et un seule genre (Reviere, 2003)

#### **V.2. 6. Les Haptophyta**

Haptophyta sont un groupe de microalgue flagellée unicellulaire. Ce sont des organismes de nature Planctonique et marine, il existe donc à la fois en eau douce et sur terre. Ce groupe contient de la chlorophylle a, c1 et c2, avec des caroténoïdes qui donnent aux des

plastides une couleur brun-doré (Barsanti, Iualtieri, 2014). Cet embranchement compte deux classes et environ 80 genres, 300 espèces (Reviere, 2003).

Cet embranchement contient 04 classes et 14 ordres et 4000 espèces réparties dans 550 genres selon (Reviere, 2003).

### **V.2. 7. Les Euglenophyta**

Euglenophyta, ces microalgues sont unicellulaires, flagellées et rarement grégaires, trouvées typiquement en eau saumâtre, douce et marine (Cantin, 2010). Les plastides contiennent la chlorophylle a et b, liées au  $\beta$ ,  $\beta$ -carotène et aux xanthophylles (Barsanti et Gualtieri, 2006). Cet embranchement composant une seule classe, 3 ordres et environ 40-50 genres, avec 650 à 1050 espèces (Delgado et al., 2007)

## **VI. Habitat et écologie**

Les algues microscopiques possèdent des formes structurales avec des mesures cellulaires très changeantes. Elles occupent la plupart des habitats particulièrement les environnements aquatiques comme les sources d'eau douces, les mers, et de nombreuses espèces ont la capacité de vivre dans des habitats extrêmes y compris la neige ou la glace des régions polaires et des grandes montagnes. Plusieurs autres algues microscopiques favorisent les habitats chauds comme les sources hydrothermales ; appelées algues thermophiles (Ramade, 2009).

## **VIII. Importance et application des algues microscopiques**

Les microalgues sont des ressources biologiques importantes qui ont un large éventail d'applications biotechnologiques. En raison de leur haute valeur nutritionnelle, les microalgues telles que la spiruline et la chlorelle sont cultivées en masse pour des aliments diététiques (Chu, 2012).

En raison de la croissance des algues dans des habitats divers et extrêmes, elles produisent un groupe de composés bioactifs uniques. Les acides gras polyinsaturés (AGPI) sont des produits bioactifs hautement bénéfiques pour la santé humaine. Les algues ont un effet utile sur la nutrition et la santé humaine, en raison de leur teneur élevée en acides gras polyinsaturés (De Morais et al., 2015). De plus, les microalgues sont considérées comme des matières premières alternatives prometteuses pour les biocarburants en raison de leur

croissance rapide, de leur productivité élevée en biomasse et de leur capacité à se développer dans diverses conditions (Alshareef, 2021).

### **VIII.2. Métabolites des algues microscopiques**

Les algues représentent un groupe important d'organismes pour l'exploitation biotechnologique, en particulier pour produits, processus et services, avec d'importants impacts dans les industries alimentaires et pharmaceutiques ainsi comme en santé publique (Chu, 2012).

Les microalgues représentent des possibilités passionnantes aussi prometteuses sources d'une gamme variée de métabolites d'une immense importance médicale et industrielle (Spolaore et al. 2006). Une variété de molécules de haute valeur biotechnologiques, y compris les acides gras polyinsaturés (AGPI), les pigments tels que les caroténoïdes et les phycobiliprotéines, et les composés bioactifs sont utiles comme nutraceutiques et pharmaceutiques, ainsi que pour des applications industrielles. Dans termes de biotechnologie environnementale, les microalgues sont utiles pour la bioremédiation des eaux usées agro-industrielles, et comme outil biologique pour l'évaluation et la surveillance des toxiques environnementaux tels que les métaux lourds, les pesticides et pharmaceutiques (Chu, 2012).

Leur capacité à croître rapidement et à s'adapter à des conditions extrêmes d'environnement et des écologies en fait des modèles appropriés pour non seulement comprendre les processus métaboliques et évolutifs processus, mais aussi comme usines miniatures pour la production d'utiles produits à valeur ajoutée. Bioprospection de différentes espèces aquatiques et milieux terrestres et habitats extrêmes, est considérée être d'une importance capitale pour l'obtention de et de nouveaux isolats avec des applications potentielles (Ratha et al., 2012).

### **IX. Les domaines d'applications des Microalgues**

Les algues sont de sources importantes de composés biologiquement actifs et de molécules de haute valeurs, y compris des métabolites primaires et secondaires, qui pourraient être utilisés comme candidats potentiels d'intérêt biotechnologiques (Rania et Hala, 2008).

Les microalgues ont été explorées en raison des applications diverses et utiles de leurs métabolites (à haute valeur ajoutée) dans la production de cosmétiques, de produits

pharmaceutiques, d'additifs alimentaires, d'aliments pour animaux (y compris l'aquaculture), de vitamines, de pigments, et les biocarburants ; ils sont en effet considérés comme des contributions innovantes à une nutrition adéquate. Les microalgues contiennent une quantité précieuse de composés organiques, tels que des protéines (40–70%), des lipides (8–70%), des glucides (11–56%) et des pigments (3–5%) responsables non seulement de leur valeur nutritionnelle, mais servant également de sources (ou de pistes) de composés bioactifs (Pôjo, et al., 2021). Sur 30 000 espèces connues de microalgues, seule quelques-uns sont exploités pour une production de composés de haute valeur tels que des pigments ou des protéines. Actuellement les microalgues se présentent comme une source cachée de divers nouveaux composés bioactifs (Priyadarshani and Biswajit, 2012; Sharma and Sharma, 2017).

Les applications biotechnologiques des algues microscopiques y les cyanobactéries dans divers domaines, tels que l'agriculture, le contrôle de la pollution (biorestauration), la bioénergie et les biocarburants et les nutraceutiques ont été bien documentées. De plus, ils sont connus pour produire une large gamme de composés bioactifs pharmaco-logiquement importants (par exemple : antibactériens, antifongiques, antiviraux, anticancéreux, relaxants musculaires) et des produits de grande thermophiles valeur commercialement importants, tels que les acides gras polyinsaturés (AGPI) et les phycobiliprotéine (Kumar et al., 2019).

#### ➤ **Les microalgues et alimentation humaine**

Les microalgues sont une source majeure de nourriture, en particulier en Asie ; sont une source riche de glucides, de protéines, enzymes et fibres. En plus, de nombreuses vitamines et minéraux comme la vitamine A, C, B1, B2, B6, la niacine, l'iode, le potassium, le fer, le magnésium et le calcium se trouvent en abondance dans les microalgues (Priyadarshani and Biswajit, 2012).

De plus, ils sont cultivés comme source de molécules de grande valeur. Par exemple, les d'acides gras polyinsaturés sont ajoutées aux préparations pour nourrissons et aux compléments nutritionnels (Priyadarshani and Biswajit, 2012). En raison de leur haute valeur nutritive, des microalgues telles que la spiruline et la chlorelle sont cultivé en masse pour l'alimentation diététique. Plusieurs espèces de microalgues sont une source potentielle d'acides gras polyinsaturés à longue chaîne (LC-AGPI), en particulier l'acide eicosapentaénoïque (EPA) et l'acide docosahexaénoïque (DHA), qui ont été impliqué pour être bénéfique dans la



prévention des maladies cardiovasculaires. L'application majeure de DHA était comme un supplément dans les préparations infantiles (Chu, 2012)

➤ **Produits pharmaceutiques**

Les microalgues sont une source de composés bioactifs massifs qui peuvent être utilisés pour des applications commerciales (Olaizola, 2003), y compris primaires et secondaires métabolites, qui pourraient être utilisés comme un potentiel candidat d'intérêt pour le secteur pharmaceutique (Sharma and Sharma, 2017). En outre, les cyanobactéries représentent une riche source de divers métabolites secondaires qui peuvent agir comme antibiotiques, enzymes, anticancéreux et anti-inflammatoires. Les cyanobactéries sont connues pour la biosynthèse de plusieurs métabolites ayant des activités ; antimicrobiennes, immunosuppressives, anticancéreuses et antivirales. Ces microorganismes sont donc industriellement importants pour la production de produits pharmaceutiques importants (Rajneesh et al., 2017).

Les microalgues sont une source d'immenses composés bioactifs exploitables à des fins commerciales. Les algues fournissent une large gamme de produits pharmaceutiques, telles que protéines, vaccins, nutriments qui autrement ne sont pas disponibles ou sont très coûteux à produire à partir d'animaux et sources végétales (Olaizola, 2003; Sharma and Sharma, 2017).

Les algues ont également été examinées en tant que sources de vitamines et de précurseurs de vitamines telles que l'acide ascorbique, la riboflavine et le tocophérol. Pourtant, seulement quelques espèces de micro-algues ont été exploitées pour la production de divers produits pharmaceutiques et nutraceutiques (Olaizola, 2003).

➤ **Composés antimicrobiens**

En raison de l'émergence croissante de souches bactériennes multi-résistantes (MDR), de sérieuses tentatives sont faites pour découvrir/développer de nouveaux médicaments à partir de différents organismes. Plusieurs microalgues et cyanobactéries sont maintenant connues pour produire des composés bioactifs intracellulaires et extracellulaires avec de puissantes activités antibactériennes et antifongiques (Schlegel et al., 1999 ; Rajneesh et al., 2017).

Des composés cyanobactériens ont montré une activité contre *Micrococcus flavus*, *Bacillus subtilis*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Mycobacterium smegmatis*, *Streptococcus pyogenes* et quelques autres bactéries Gram-positives et Gram-négatives (Østensvik et al., 1998 ; Ananya et Ahmad, 2014).

➤ **Activité antivirale et antifongique des composés microalgaux**

Les microalgues sont des sources potentielles de composés antiviraux qui n'ont pas encore été entièrement explorés (Chu, 2012). Il est également nécessaire d'étudier les composés antiviraux qui peuvent être provenus des microalgues (Dey et al., 2000). Certaines microalgues et cyanobactéries produisent des protéines présentant des propriétés antivirales. Il s'agit principalement de glycoprotéines prouvant être apparentées aux lectines. C'est le cas notamment de la cyanovirine -N produite par les cyanobactéries *Nostoc ellipsorum* qui présente une forte activité antivirale à l'encontre notamment du virus l'immunodéficience humaine (VIH) et de celui de l'herpès (Fleurence, 2003).

Un nouveau composé de cyanobactéries dénommé cyanovirine-N, a été prouvé comme un puissant agent virucide contre le VIH, en bloquant l'adhérence de la glycoprotéine virale gp120 avec le CD4 (Dey et al., 2000). *Spirulina platensis* a présenté une activité antivirale contre divers virus comme les virus cytomégalo humains, l'herpès simplex et le virus de la rougeole en bloquant leur entrée en raison de la présence de polysaccharide contenant du soufre (Hayashi et al., 1994 ; Ayehunie et al., 1998; Sharma and Sharma, 2017). Des extraits de l'algue rouge *Porphyridium* a bloqué l'adsorption des virions de HSV-1, HSV- 2 (Huleihel et al., 2001; Sharma and Sharma, 2017).

Le criblage des microalgues pour les composés antifongiques a commencé bien au-delà de l'activité antibactérienne. L'activité antifongique varie considérablement selon les espèces de microalgues. Les microalgues marines (par exemple, *Chaetoceros sp.*) montrent capacité à développer nouveaux composés antifongiques (Borowitzka et Borowitzka 1987).

Plusieurs composés antifongiques tels que les polysaccharides, et les fractions lipidiques isolées des microalgues vertes (*H. pluvialis*, *Chlorella vulgaris* et *Scenedesmus sp.*) et rouges (*Porphyridium sp.* et *R. reticulata*), des bacillariophytes et des dinoflagellés montrent une activité contre des micro-organismes tels que *A. fumigatus*, *A. niger*, *Penicillium*

*sp.*, *Saccharomyces sp.*, *Candida sp.*, *Microsporium sp.* et *E. floccosum* (Malik et al., 2001 ; Priyadarshani et Biswajit, 2012).

Les pigments produits par *H. karadagensis* ont montré une activité antifongique contre *C. maritima*, *D. salina* et *Lulworthia sp.* Responsable de l'encrassement biologique (Chen, 2003).

#### ➤ **Produits Cosmétiques**

Les extraits de microalgues font part de divers cosmétiques tels que les crèmes anti-âge, les produits de soins rajeunissants, les protecteurs solaires et les produits de soins capillaires. Les espèces de microalgues comme *Arthrospira* et *Chlorella* sont des acteurs bien établis sur le marché des soins de la peau (Spolaore et al., 2006). Les extraits de microalgues se trouvent principalement dans les produits de soin visage et la peau (Priyadarshani and Biswajit, 2012). De nombreuses microalgues produisent des métabolites tels que les acides aminés sporopollénine, scytonémine et mycosporine pour les protéger des rayonnements UV, mais permettant le passage aux rayonnements visibles impliqués dans la photosynthèse (Cardozo et al., 2007).

#### ➤ **Activité antioxydants**

Les microalgues ont montré la capacité à synthétiser des antioxydants exogènes. Les antioxydants produits ex-situ sont également appelés oxydants nutritifs en raison de leur nature. Ils sont constitués de caroténoïdes, de flavonoïdes, d'oligo-métaux (zinc et sélénium), de vitamines C et E et d'acides gras (Pham-Huy et al., 2008). L'activité antioxydante des caroténoïdes extraits des algues est de grande importance pour l'usage humain (Sharma and Sharma, 2017)

Les microalgues sont regardées comme une source importante d'antioxydants nutritionnels ; une seule espèce algale est également capable de produire plusieurs substances avec des activités biologiques à la fois. Les études sur la composition de *Chlorella Sorokiniana* a révélé que la teneur totale en caroténoïdes était de 0,69 % de matière sèche. Les teneurs en  $\alpha$ -tocophérol,  $\beta$ -carotène et lutéine sont respectivement de 112, 600 et 4300  $\mu\text{g/g}$  de matière sèche. Ces composés possèdent des propriétés de piégeage radicalaire élevées (Matsukawa et al., 2000) .

Il est également rapporté que les antioxydants tels que l'astaxanthine extraite de microalgues ont une plus grande activité antioxydante que l' $\alpha$ -carotène, le  $\beta$ -carotène, le lycopène, la lutéine et la vitamine E. La biodisponibilité des antioxydants extraits des microalgues est plus élevée à celle venant des voies synthétiques et offre une meilleure efficacité (Gouveia et al., 2008 ; Spolaore et al., 2006).

➤ **Agriculture et Biofertilisant**

Les macro- et microalgues contiennent de nombreux composés qui stimulent la germination, la croissance des feuilles ou des tiges, et la floraison et peuvent être utilisées comme agent de protection biologique contre les maladies des plantes (Bhattacharjee, 2016). La majorité des cyanobactéries sont capables de fixer l'azote atmosphérique et peuvent être usées comme biofertilisants. Ils jouent un rôle primordial dans la maintien et la construction de la fertilité des sols pour élever la croissance et le productivité du riz en tant que biofertilisant naturel (Song et al., 2007).

➤ **Nourriture - Animaux et aquaculture**

L'utilisation de la biomasse de microalgues dans l'alimentation animale remonte aux années 1950 et est considérée comme un moyen efficace d'inclure des nutriments et des vitamines précieux, des acide gras polyinsaturés, des polysaccharides, minéraux et des pigments dans les aliments pour augmenter leur valeur nutritionnelle (Madeira et al., 2017) . L'incorporation de microalgues dans l'alimentation est bénéfique à la physiologie de l'animal en améliorant son immunité et sa résistance aux maladies, aussi pour la stimulation de bactéries probiotiques dans l'intestin (Madeira et al., 2017). Actuellement, environ 30 % de la biomasse totale de microalgues produite dans le monde est utilisée en tant que aliment (Becker, 2003).

➤ **Biocarburants**

Les sources d'énergie renouvelables ont bénéficié d'importants l'intérêt des gouvernements, des institutions académiques, des entreprises, des chercheurs etc., ces dernières années. Depuis le début, l'huile végétale a toujours été l'aliment stock pour produire du biodiesel dans le monde dont les matières premières étant le soja, le maïs, le colza, le palmier et tournesol (Murphy, D. J. 2012 ; Malpani et al., 2016). Cependant, l'augmentation continue de la consommation de cultures vivrières due à la croissance de la population ; des

sources/stocks alimentaires non comestibles sont exploités pour la production. Parmi les diverses matières premières comestibles et non comestibles comme le soja, le palmier, le colza, les graines de caoutchouc, le ricin et les algues, en particulier les micro-algues, deviennent de plus en plus prometteuses, ces microorganismes photosynthétiques se caractérisent par forte teneur en acides gras et ils se reproduisent très vite avec un haut rendement de biomasse (Zhu et al., 2015; Malpani et al., 2016).

Le développement de technologies de biocarburants renouvelables plus propres est du plus grand intérêt face au réchauffement climatique et à la rareté des ressources énergétiques naturelles (Mondal et al., 2019). Le biodiesel a récemment reçu plus d'attention car il est écologique, renouvelable, non toxique et émet moins de polluants gazeux que les carburants conventionnels (Mostafa et El-Gendy, 2017 ; Ogunkunle et Ahmed, 2021).

Les microalgues sont une source alternative importante pour les matières premières conventionnelles grâce à leur neutralité carbone, leurs faibles émissions d'hydrocarbures et de soufre et la durée de vie plus longue des moteurs (Mondal et al., 2019 ; Nagappan et al., 2020).

Les microalgues à haute teneur en lipides, à taux de croissance rapide et de nature extrêmophile peuvent être d'excellents candidats pour la production de biocarburants (Nagappan et al., 2020).

**Chapitre II : Les sources thermales et les algues microscopiques thermophiles****1. Les environnements extrêmes**

Ces biotopes sont considérés comme extrêmes vis à vis de l'être humain vu que la vie humaine y est impraticable. Les environnements extrêmes montrent des caractéristiques physico-chimiques près des limites de la vie, comme des températures très modérées (-20 °C) ou très élevées (122 °C), de irradiations puissantes, la présence ou l'absence d'oxygène, des valeurs de pH extrêmes ou aussi des concentrations élevées en sels (Thiroux, 2019). Les micro-organismes qui les habitent sont des extrémophiles adaptés à des conditions assez différentes de celles de l'environnement (Aguilera and Amils, 2012; McGregor and Rasmussen, 2008).

Ces habitats distinctifs sont colonisés par un vaste éventail d'organismes, qui ne supportent pas uniquement ces conditions spécifiques mais en ont exigence pour vivre. Ces organismes sont désignés d'extrémophiles, qui peuvent être classifiés selon les exigences requises à leurs croissances telles que les acidophiles (forte acidité), halophiles (salinité élevée), psychrophiles (températures faible) et les thermophiles (températures élevées) (Thiroux, 2019).

**2. Microorganisme extrémophiles**

Le terme extrémophile a été suggéré il y a plus de 30 ans et représente des micro-organismes capables de développer et vivre dans des conditions extrêmes, ces conditions étant particulièrement non hostiles aux autres types de micro-organismes. Les procaryotes et les eucaryotes ont des adaptations morphologiques et physiques qui leur permettent de coloniser des environnements extrêmes (Aguilera and Amils, 2012; Silva et al., 2021).

**3. Les sites hydrothermaux**

Constituent un habitat très important pour les organismes extrémophiles et offrent des possibilités d'étudier les écosystèmes extrêmes. Ici, les facteurs comme une température élevée et un pH bas ou élevé affectent les types d'organismes décrits dans certaines zones, ainsi que la croissance des micro-organismes. Concernant les procaryotes, thermophiles, acidophiles et alcalinophiles sont les groupes communs que l'on trouve le plus souvent sur ces sites. Les procaryotes peuvent être trouvés poussant dans des zones avec des températures

allant jusqu'à 122 °C et un pH proche de 0. Alors que dans les lignées eucaryotes de quatre super groupes Archaeplastida, Chromalveolates, Excavata et Unikonta - se trouvent dans le monde entier dans les sites hydrothermaux (Silva et al., 2021).

Les Eucaryotes peuvent être trouvés en croissance dans les zones avec des températures allant jusqu'à 68 ° C et montrent la capacité de prospérer la dessiccation et la salinité extrêmes comme les procaryotes (Silva et al., 2021) Les sources thermales constituent un habitat très intéressant pour l'étude microbiologique. Ces habitats sont des biotopes bien isolés se produisant en grappes dans des régions globalement éloignées, et les micro-organismes qui les habitent sont des extrémophiles (Aguilera and Amils, 2012; McGregor and Rasmussen, 2008).

Les eucaryotes sont moins fréquents dans sites hydrothermaux terrestres que les procaryotes, mais cela ne signifie pas qu'ils sont moins importants. Pour survivre les conditions extrêmes, ils ont tendance à avoir plusieurs adaptations comme altérées physiologie interne et plusieurs différences dans les processus métaboliques. Les procaryotes et les eucaryotes ont tendance à former des associations avec d'autres micro-organismes dans des tapis microbiens, l'aidant coloniser divers sites géothermiques, puisque ces structures permettent la formation de micro-habitats (Silva et al., 2021).

Dernièrement avec toutes les recherches effectuées, l'importance écologique des tapis microbiens a augmenté. En conclusion, les procaryotes et les eucaryotes fournir des fonctions essentielles aux environnements extrêmes et comprendre l'évolution et le développement des microorganismes dans des environnements extrêmes augmentera nos connaissances bord des processus évolutifs (Aguilera and Amils, 2012; Silva et al., 2021)

Dans les sites hydrothermaux terrestres, comme les sources thermales, les « mares de boue », les solfatares et les geysers, les conditions extrêmes dominant sont une température élevée, un pH bas ou élevé et des niveaux élevés de salinité (Silva et al., 2021).

#### **4. Les thermophiles**

Du point de vue biotechnologique, les thermophiles sont très intéressants. Ils sont une source d'enzymes thermostables - telles que les amylases, les cellulases, les chitinases, les pectinases, les xylanases, les protéases, les lipases et les ADN polymérases (Silva et al., 2021)

#### 4.1. Microorganismes thermophiles

Plusieurs organismes extrêmophiles occupent des habitats dont la température est extrêmes (Thiroux, 2019). Les thermophiles sont des microorganismes de type extrêmophiles unicellulaires (bactéries, protistes) et rarement, pluricellulaires (algues, champignons) ayant besoin d'une température élevée pour se développer (Alain et al., 2002 ; Sechbach, 2007).

Les eucaryotes y compris les algues se reproduisent activement dans tous les types d'environnement, mais leur distribution et leur abondance sont limitées par des facteurs physiques et chimiques tels que la température et pH (Rothschild et Mancinelli 2001; Thiroux, 2019). La température la plus élevée pour les algues se situe dans les 50 °C et près de 70 °C pour les cyanobactéries (Alain et al., 2002 ; Sechbach, 2007).

Néanmoins, la façon dont ils s'adaptent et se diversifient est encore un domaine sous-exploré. Les eucaryotes se développent d'une façon limitée à des petits intervalles de températures parce qu'ils ne sont pas en mesure de former des membranes organites fonctionnellement et thermiquement stables. La température la plus élevée de tous les temps rapporté pour les organismes eucaryotes était de 62 °C (Rothschild et Mancinelli, 2001).

Les cyanobactéries peuvent tolérer des températures élevées, un pH acides et des conditions variables de lumières toujours changeantes (Summerfield et al., 2008). Les sources thermales de plusieurs milieux à travers le monde sont colonisées par les cyanobactéries filamenteuses thermophiles appartenant aux genres : *Calothrix*, *Oscillatoria*, *Phormidium*, *Pseudanabaena*, *Synechococcus*, *Synechocystis* et *Spirulina*. Les membres de deux genres *Phormidium* et *Synechococcus* sont fréquents dans ces habitats thermiques (Ballot, 2004).

Les thermophiles ont une température de croissance optimale de >55 °C et en général, beaucoup d'entre eux sont des polyextrêmophiles, ce qui signifie qu'ils sont capables de vivre dans d'autres conditions environnementales extrêmes, telles que celles liées au pH, au potentiel redox, à la concentration en sel ou à la présence de un large spectre de composés toxiques (Fütterer et al., 2004 ; Urbietta et al., 2014)

Les thermophiles sont capables de survivre dans divers habitats avec différents extrêmes de pH, de salinité et de température comme les sources thermales et les geysers. Ces organismes vivants sont classifiés suivant leur température optimale de



développement en: psychrophiles, mésophiles, thermophiles ou hyperthermophiles (Thiroux, 2019; Silva et al., 2021).

#### **4.2. Classification des microorganismes thermophiles**

La corrélation des organismes vivants à la température a été regardée en biologie comme une base importante de classification. Trois catégories primordiales sont déterminées suivant les températures optimales de développement : les psychrophiles qui ont des Températures optimale inférieures à 20°C, les mésophiles qui se développent d'une manière optimale entre 20 et 45°C et les thermophiles qui se développent à des températures supérieures à 45°C (Alain et al., 2002). Le groupe des thermophiles se divise en trois sous catégories :

- Les thermophiles modérés, dont les exigences optimales de développement s'installent entre 55 et 65°C ;
- Les thermophiles extrêmes, dont la température optimale de croissance se situe entre 65 et 80°C ;
- Les hyperthermophiles sont une catégorie des thermophiles qui se développent à des températures qui excèdent les 80°C (Madigan et al., 2003).

#### **4.3. Ecologie des microalgues thermophiles**

Les plus importants biotopes thermophiles naturels, le plus souvent associés à une activité volcanique, sont les sources thermales terrestres ainsi que les environnements hydrothermaux marins côtiers et abyssaux (Castenholz, 1969). D'autres habitats chauds non géothermiques sont très rares dans la nature. Par exemple, les étangs chauffés par l'énergie solaire et les composts chauffés biologiquement peuvent provoquer des températures élevées, mais ces derniers présentent des écosystèmes très transitoires qui seront principalement colonisés par une croissance rapide des spores (Hobel, 2004). Les thermophiles se trouvent principalement dans les sources thermales, les sources thermales adjacentes aux environnements volcaniques, les couches supérieures du sol et même dans les environnements thermiques artificiels, tels que les installations de compostage (Ovando-Chacon et al., 2020)

## 5. Importance des algues microscopiques thermophiles

Ces dernières années, les micro-organismes thermophiles ont été largement utilisés pour leur potentiel biotechnologique, notamment dans les procédés industriels (Chen et Jiang, 2018). D'autre part, les thermophiles ont de nombreuses applications biotechnologiques thermiques, soit en utilisant des cellules entières ou leurs macromolécules ou métabolites, parmi lesquelles la bioremédiation, la bioénergie, le biomining, et le biosurfactant. Fabrication. De plus, il existe un grand intérêt pour l'étude des bactéries thermophiles en raison de leur utilisation comme source d'enzymes thermostables (thermozymes), comme les cellulases, les xylanases, les pectinases, les chitinases, les amylases, les pullulanases, les protéases, les estérases et les lipases (Ovando-Chacon et al., 2020)

En particulier, les micro-organismes thermophiles ont gagné importance dans la « biotechnologie blanche », définie comme l'utilisation d'organismes et d'enzymes pour la transformation industrielle et la production de matériaux, de produits chimiques et d'énergie (Ovando-Chacon et al., 2020). La biotechnologie industrielle permet la production de grandes quantités de produits chimiques, de substances polymériques et de biocarburants. Il est basé sur le bio-traitement traditionnel des matières premières et nécessite des bioréacteurs en acier inoxydable bien équipés, des procédures de stérilisation compliquées et un traitement en aval coûteux (Chen et Jiang, 2018).

Les thermozymes sont très importants dans les procédés industriels en raison du fait que des températures plus élevées améliorent la solubilité de nombreux composants de réaction (principalement des substrats polymères) et réduisent le risque de contamination (Van den, 2003).

## 6. Sources thermales en Algérie

### 6.1. Définition des eaux thermales,

Les eaux thermales, également appelées eaux géothermiques, sont définies comme des eaux souterraines dont la température à l'exutoire est d'au moins 20 °C. L'isotherme de 20 ° C se situe à des profondeurs d'environ 1 500 à 2 000 m dans la croûte terrestre dans les régions de pergélisol, s'élevant à environ 100 m ou plus dans les régions subtropicales; à la frontière avec les tropiques, il émerge à la surface de la Terre (Porowski, 2018).

**6.2. Sources thermales en Algérie**

Les stations thermales en Algérie reviennent à l'ère romaine. Les romains donnaient une importance très remarquable aux sources thermales, généralement ils construisirent leurs sites tout autour de ces sources thermales (Saibi, 2009 ; Chenaker, 2018).

Les sources thermales sont toujours très sollicitées par les algériens à des fins thérapeutiques d'ordre rhumatologique et dermatologique (Boughlali, 2003 ; Ouali, 2008). L'Algérie possède plus de 240 sources thermales, ce nombre augmente constamment quand on se déplace vers l'Est. Les températures mesurées à l'émergence varient de 19 à 98°C. La température la plus élevée enregistrée pour la zone ouest est : 68°C (Hammam Abou Hanifia), 80°C pour la zone centrale (Hammam El Biban) et 98°C pour la zone de l'Est (Hammam Dbegh). Dans la zone sud, il existe des sources thermales avec une température moyenne de 50°C. Ceux sont surtout les régions du nord-est et celle du nord-ouest qui comptent le plus grand nombres de sources thermales (Ouali, 2008 ; Saibi, 2009).

**7. Utilisation des eaux thermales**

L'utilisation des eaux minérales et thermales s'est développée et a évolué au fil du temps : de la baignade ou de la consommation curative et curative sur le lieu de leur apparition et de leur origine à l'émergence de deux secteurs très importants de l'économie, à savoir (i) l'industrie de l'embouteillage de l'eau et (ii) géothermie – science/industrie se rapportant à l'exploration et utilisation de la chaleur géothermique pour une utilisation directe et la production d'électricité (Porowski, 2018)

L'utilisation directe consiste en divers formes de chauffage et de refroidissement. Les grands domaines de utilisation directe des eaux thermales [56] sont : a) Natation, baignade et thermalisme (usage thérapeutique) (b) Chauffage et refroidissement des locaux (c) Applications agricoles (principalement chauffage et quelques élevages) (d) Applications aquacoles (principalement étangs piscicoles) et chauffage du chemin de câbles) (e) Procédés industriels (f) Pompes à chaleur (pour le chauffage et le refroidissement) (Lund, 2004).



# **Matériel et Méthodes**

### 1. Sites d'échantillonnage et caractérisation physico-chimique des eaux

#### 1.1. Présentation de la zone d'étude

Dans notre recherche, nous nous sommes intéressés aux algues microscopiques des sources hydrothermales de l'Est algérien, où la biodiversité de microalgues reste quasi non examinée et leur potentiel biotechnologique reste entièrement inexploré.

Un ensemble de onze sources thermales (Hammam Debagh1"St1", Hammam Debagh2"St2", Hammam Meskhoutine"St3", Hammam Ouled Ali"St4", Hammam Tassa"St5", Hammam Ouled Ziad"St6", Hammam Djaarir"St7", Hammam Bouhmama "StA", Hammam Essalihine1"St9", Hammam Essalihine2"St9.1", Hammam El Knif "St10") situés dans la partie Nord-Est de l'Algérie présentant différentes caractéristiques géologiques et valeurs de températures ont été sélectionnées pour cette étude (Figures 2). La région d'étude se situe dans les régions externes au sein des zones telliennes et est principalement caractérisée par des plis et nappes miocènes projetés sur l'avant-pays atlasique vers le sud (Belhai et al., 2017) ; couvrant 15 000 km<sup>2</sup> et constitue la région géothermique la plus intéressante du pays (Saibi, 2009 ; Benamara et al., 2017).

Les températures de décharge des eaux thermales algériennes variaient entre 22 et 98 °C. La source du phénomène géothermique dans le Nord-Est algérien pourrait être liée aux événements magmatiques du Mio-Plio-Quaternaire et au gradient géothermique relativement élevé (environ 45 C/km) ; associés aux conditions stratigraphiques et structurelles de son émergence (Saibi, 2009 ; Bouaicha et al., 2019 ; Benamara et al., 2017). La zone étudiée a un climat semi-aride avec une influence méditerranéenne avec un été sec et des précipitations fréquentes en hiver (Chenaker et al., 2018).



**Figure 2.** Carte de l'Algérie montrant la zone d'étude dans la partie nord-est de l'Algérie. Les flèches pointent vers la zone d'étude. Les repères bleus et rouges représentent les sources thermales étudiées.

## 2.2. Échantillonnage et caractérisation physico-chimique des eaux des sources thermales

Les mesures in situ de la température de l'eau (T), de l'oxygène dissous (DO), du pH et de la conductivité (Con) ont été réalisées à l'aide d'une sonde multiparamètre portable HORIBA W-23 XD calibrée sur le terrain à différents points de chaque source, au plus près que possible vers les sites de prélèvement de microalgues.

Des échantillons d'eau pour l'analyse physico-chimique ont été prélevés à l'aide de bouteilles en polyéthylène de 250 ml pour permettre l'analyse en laboratoire des ions majeurs, des nutriments et des éléments traces. Les teneurs en magnésium, potassium, sodium, calcium, aluminium, lithium, fluorure, nitrate, sulfate, chlorure, fluor et brome ont été mesurées à l'aide d'un spectromètre d'absorption atomique Perkin Elmer Analyst 600. Les groupes de métaux ont été déterminés à l'aide d'un chromatographe ionique équipé d'un échantillonneur automatique Dionex As40 avec une précision meilleure que  $\pm 5\%$ .

### 2. Échantillonnage de tapis algale

Des échantillons ont été prélevés dans chaque localité entre février et mars 2019. Des échantillons de biofilm de microalgues ont été collectés dans un petit récipient ou des petits sachets en plastique stérile étiqueté avec le nom du site, le code de localisation, la date et le numéro de réplikat. Les échantillons ont été transportés au laboratoire dans des conditions froides (4 °C) et sombres.

### 3. Échantillonnage des bacillariophycées

#### 3.1. Collections d'échantillons

Des échantillons ont été prélevés dans chaque localité; les biofilms de bacillariophycées ont été grattés à l'aide d'une brosse à dents à poils durs (une seule brosse a été utilisée pour chaque ressort pour éviter la contamination croisée) de 5 à 7 substrats naturels roche/galets (selon la disponibilité du substrat) et des sédiments fins, l'échantillon a été prélevé dans un petit récipient en plastique stérile et flacons stériles, étiquetés avec le nom du site, le code d'emplacement, la date et le numéro de répétition. Les échantillons ont été fixés au formaldéhyde et transférés au laboratoire dans des conditions froides (4 ° C) et sombres (Leira et al., 2017)

#### 3.2. Nettoyage des échantillons

Les échantillons ont été nettoyés de la matière organique selon les méthodes standards. L'échantillon de bacillariophycées à nettoyer a été placé dans de petits tubes. Les échantillons conservés ont été rincés une fois avec de l'eau distillée, pendant le processus de lavage, les cellules de bacillariophycées ont été déposées par sédimentation et la majorité de l'eau a été soigneusement décantée. Par la suite, les échantillons ont été traités avec du peroxyde d'oxygène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 %) pour éliminer les matières organiques et les sels ; De l'acide chlorhydrique (35% Hcl) a été ajouté aux échantillons dans lesquels des quantités considérables de matière organique étaient présentes (Leira et al., 2017)

Les échantillons ont été entourés d'un ruban de parafilm pour éviter que des contaminants ne pénètrent dans les échantillons. L'échantillon a été mis à bouillir pendant 30 min-1 h dans le laboratoire Thermo, et a été agité périodiquement pendant ce temps. Les échantillons ont été laissés reposer pendant la nuit. Ensuite, de l'eau distillée a été ajoutée aux tubes et les



échantillons ont été laissés à se déposer après avoir été recouverts de ruban de parafilm. Par la suite, l'échantillon de diatomée a été décanté et rincé plusieurs fois avec de l'eau distillée jusqu'à ce que l'eau surnageant soit claire ; et laisser reposer entre les lavages.

Après cela, les échantillons ont été centrifugés (1500 rpm) et rincés trois fois avec de l'eau distillée pour éliminer les résidus d'oxydation. Ensuite, les suspensions des bacillariophycées nettoyées ont été séchées et montées sur des lames permanentes avec du Naphrax selon les méthodes standard (Comité européen de normalisation 2003). Les échantillons traités ont été montés avec du Naphrax pour permettre l'étude des bacillariophycées. Au moins trois lames permanentes de chaque échantillon ont été examinées sous un microscope optique Olympus (BX50) (400–1000) équipé d'un appareil photo numérique Olympus U-CMAD-2 à un grossissement de  $1000 \times$  (Leira et al., 2017).

Les espèces de bacillariophycées ont été identifiées à l'aide de références pertinentes : Prescott's (1978) ; Van Heurck (1880); Hofman et al. (2013); Lange-Bertalot et al. (2011, 2017); Évêque et al. (2017).

#### 4. Cultures des microalgues isolées

Des échantillons de tapis ont été prélevés à la main. L'isolement des souches a été réalisé dans des milieux de culture solides (BG-11 et BBM enrichis en extraits de sol). Après 4 à 8 semaines, les micro-colonies cultivées sur le milieu solide ont été striées sur des boîtes de pétri neuves avec le milieu correspondant. Ce processus a été répété plusieurs fois jusqu'à l'obtention de colonies de microalgues pures. Les cultures ont été maintenues dans une chambre de culture (Panasonic MLR-352-PE) à 20, 25, 30, 35 °C, et la lumière a été fournie par des tubes fluorescents (Panasonic FL 40SS ENW/37 de lumière du jour froide) 16 : 8 h lumière/obscurité et une intensité lumineuse de  $75 \mu\text{M photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Les espèces ont été déposées dans la collection de cultures MAESE à l'Université de Murcie (Espagne) sous le nom de MAESE 20.61.

### 5. Étude morphologique et identification taxonomique

L'identification taxonomique des algues microscopiques à partir des échantillons naturelles et des espèces cultivées était basée sur les caractères morphologiques observables au microscope optique Olympus (BX50) et photographiés avec un appareil photo Olympus U-CMAD-2-.

Les espèces de microalgues ont été identifiées selon les caractéristiques morphologiques des espèces en utilisant des approches botaniques standard. La taxonomie morphologique classique comprend l'utilisation de traits observable au microscope optique comme la disposition des cellules, forme et taille des cellules, modèle de cellules, mode de division, la longueur des filaments, la taille, la couleur, la forme des chloroplastes et des cellules végétatives ont été observées et pour les cyanobactéries en plus des critères précédentes la présence la position des hétérocystes, l'apparence de la gaine, la présence d'akinetes et d'hormogonies ont été examinées.

Les mesures ont été prises à des grossissements de 40x et 100x. Environ 50 mesures ont été effectuées pour chacun des caractères morphologiques étudiés. Les morphotypes ont été identifiés jusqu'au niveau de genre voir l'espèce sur la base des systèmes d'identification proposés par Wehr et al. (2002, 2003, 2015), (Lurling, 2003), (Morgan, 2005), Kastovsky et Johansen (2008), Komarek (2013), Wang et al. (2019) and Goecke et al. (2020).

### 6. Sélection des espèces de microalgues

Quatre espèces isolées des microalgues ont été sélectionnées pour l'identification par les outils de biologie moléculaire et production de la biomasse pour des études plus approfondies. Leur sélection était basée sur la croissance rapide, la diversité morphologique et l'homogénéité de la culture. Sur la base des différences morphologiques observées par analyse microscopique, ils ont été provisoirement identifiés comme trois espèces d'algues bleu vert; désignées comme S4BB (cultivé en milieu BBM) et S4B11 (cultivé en milieu BG11) isolées d'Ouled Ali- Guelma-, S9BB (cultivé en milieu BBM) isolées de Hammam Essalihine – Khenchela- et une algue verte désignées comme S3A (cultivé en milieu BBM) isolée de hammam Meskhoutine -Guelma-.

### 7. Identification phylogénétique

#### 1. Protocole de biologie moléculaire et génomique

##### a. Extraction d'ADN

L'ADN des quatre microalgues sélectionnés été extrait du matériel de culture des culots cellulaires par la méthode d'extraction au bromure de cétyle-triméthylammonium (CTAB) (Doyle et Doyle, 1987). Centrifuger 50 ml de la culture des microalgues et puis la remettre en suspension dans 2 ml de tampon d'extraction (CTAB) préchauffé à 60°C. Incuber la suspension dans un bain-marie à 60 ° C durant 30 min. Ajouter 2 mL du chloroforme, ensuite centrifugé, puis verser la phase aqueuse dans un autre tube contenant 2 mL d'isopropanol. Après la terminaison de la précipitation, une centrifugation est effectuée pour recouvrer le culot d'ADN.

##### b. Amplification des séquences d'ADNr 16S et d'ADNr 18S

L'amplification PCR a été réalisée dans un volume de 12,5 µL, qui contenait environ 0,5 µL d'ADN matrice, 2 µM de chaque amorce, 0,2 mM de dNTP, deux unités d'ADN polymérase Taq, le tampon du fabricant et ddH<sub>2</sub>O jusqu'au volume final, amplifié à l'aide de l'amorce paires SSU1004/ITS1DR ; SSU301/SSU1147 et SSU1+SSU568 (Alverson et al., 2007) et CIANO27F/CIANO23S et CIANO322F/CIANO340R (Tableau 1).

**Tableau 1.** Amorces de PCR utilisées pour l'amplification du gène ARNr 16S pour les cyanobactéries et le gène 18 ARNr pour les chlorophytes.

Espèces de microalgues	Amorces de PCR	
	Nom	Séquence (5' à 3')
Chlorophycées (S.3.A)	SSU1004	CGA AGA TGA TTA GAT ACC ATC G
	ITS1DR	CCT TGT TAC GAC TTC ACC TTC C
	SSU301	ATC ATT CAA GTT TCT GCC C
	SSU1147	TGT GAT GCC CTT AGA TGT CCT GG
	SSU1	AAC CTG GTT GAT CCT GCC AGT
	SSU568	CAG ACT TGC CCT CCA ATT GA
<i>Mastigocladus</i>	CIANO27F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
	CIANO23S	CTTCGCCTCTGTGTGCCTAGGT
	CIANO322F	TGTACACACCGCCCGTC
	CIANO340R	CTCTGTGTGCCTAGGTATCC

### c. Programme de PCR:

Les réactions de PCR ont été réalisées dans les paramètres suivants:

4 min à 94 °C, 35 cycles de 60 s à 94 °C, 60 s à 50 °C et 90-120 s à 72 °C, et une dernière étape d'extension de 10 minutes à 72 °C (Muhammad et al., 2020). La réaction PCR a été effectuée sur un thermocycleur (Eppendorf mMastercycler gGradient, Hambourg, Allemagne). La PCR de contrôle négatif a également été réalisée en utilisant les mêmes amorces, mais sans échantillon d'ADN.

### d. Électrophorèse sur gel d'agarose, purification et séquençage

Les séquences d'ADN résultantes ont été séparées par électrophorèse sur gel d'agarose à 1 % en tampon *TBE* (Tris, Borate, EDTA) ajouté de 50µl, de bromure d'éthidium (BET) et en présence d'un marqueur de taille ou Ladder 1kb (Promega). Après migration d'une heure, le gel est immergé dans une solution de bromure d'éthidium (0,5%) pendant 10 à 15 min puis le gel est trempé dans de l'eau pendant 20-25 min. La visualisation de l'ADN se réalise grâce à la présence du BET sous les rayons UV à 300 nm pour visualiser et photographier les bandes d'ADN, puis conservés à -20°C/-80°C pour être envoyés au séquençage après purification (Muhammad et al., 2020)..

Suivant le protocole du fabricant, les produits résultants ont été purifiés et excisés du gel d'agarose avant d'être nettoyés à l'aide d'un kit de purification PCR : GenElute PCR clean-up (Sigma-Aldrich). Enfin, les produits d'amplification purifiés ont été séquencés au Service de génomique de l'Université de Murcie avec la réaction de séquençage du cycle de terminaison BigDye (Applied Biosystems, Foster City, Californie, États-Unis) en utilisant les mêmes amorces PCR que celles mentionnées précédemment.

### e. Analyses phylogénétiques

Les séquences de nos échantillons ont été vérifiées par rapport aux séquences de la base de données GenBank via une recherche BlastN en ligne et ensuite ont été alignées avec les séquences associées à l'aide de MUSCLE. L'arbre phylogénétique a été construit avec MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (11.0.10) par la méthode Neighbor-joining (NJ) basée sur les distances évolutives (Edgar, 2004; Hall, 2013). Les séquences générées (1755pb) par cette recherche ont été soumises à la base de données de nucléotides GenBank du National Center for Biotechnology Information (NCBI) avec le numéro d'accèsion OM831388.

## 8. Production de Biomasse

### 8.1. Cultures des algues microscopiques

Quatre cultures pures des espèces de microalgues déjà sélectionnées (trois espèces d'algues bleu vert : S4BB, S4B11et S9BB et une algue verte (S3A) ont été cultivée pour produire suffisamment de biomasse pour les extractions de lipides.

Les souches sélectionnées pour produire suffisamment de biomasse pour les extractions lipidiques ont été cultivées dans des flacons de 500 ml avec un milieu liquide correspondant et aéré à l'aide d'une pompe d'aquarium qui pompait 1,5 l d'air par minute à travers un ensemble goutte à goutte et ont été incubées dans les conditions indiquées précédemment pendant des périodes allant jusqu'à 3 semaines. Trois réplicats ont été incubés pour chaque souche. Les espèces sélectionnées des microalgues ont été régulièrement contrôlées pour la contamination et la pureté des cultures liquides a été fréquemment testée par observation microscopique pour l'absence de croissance bactérienne ou eucaryote.

### 8.2. Récolte de la biomasse algale

La biomasse d'algue verte S3A axénique a été récoltée par centrifugation à 5000 rpm pendant 20 min pendant sa phase de croissance stationnaire (Muhammad et al., 2020). Le culot cellulaire a été séparé afin d'être séché à 60 °C pendant 24 h au four pour obtenir de la matière sèche (%). La biomasse cyanobactérienne des souches S4BB, S4B11 et S9BB a été récoltée par tamisage par microfiltration à l'aide d'un tamis cellulaire de 40 µm (Verma et al. 2010). La biomasse obtenue a été congelée et maintenue à -80 °C jusqu'à l'analyse.

### 8.3. Estimation du rendement

Le poids des cellules algales sèches a été déterminé par gravimétrie à l'aide d'une quantité connue de culture d'algues par centrifugation à 5000 rpm pour 10 minutes. Le culot d'algues a été lavé deux fois avec de l'eau distillée, puis la biomasse récoltée a été séchée à 85 °C dans un four jusqu'à ce qu'il atteigne un poids constant.

## 9. Extraction des lipides et quantification des acides gras

Toutes les espèces testées ont montré une bonne croissance cellulaire et ont généré une quantité satisfaisante de biomasse. Les lipides ont été extraits selon Folch et al., (1957). Brièvement, les échantillons ont été homogénéisés dans 20 mL de Chloroforme/méthanol (2:1 v/v) dans un perturbateur tissulaire (IKA ULTRA-TURRAX T 25 digital ; IKA-WERKE, Staufen, Allemagne). Les impuretés non lipidiques ont été éliminées par lavage avec 0,88 % de KCl. Le poids des lipides a été déterminé par gravimétrie après évaporation du solvant sous courant d'azote.

Les esters méthyliques d'acides gras (EMAG) ont été préparés par transestérification catalysée par un acide des lipides totaux selon la méthode de Christie (2003). Les échantillons de lipides totaux ont été transméthylés pendant une nuit dans 2 ml d'acide sulfurique à 1 % dans du méthanol (plus 1 ml de toluène pour dissoudre les lipides neutres) à 50 °C. Les esters méthyliques ont été extraits deux fois dans 5 ml d'hexane-éther diéthylique (1:1, v/v) après neutralisation avec 2 ml de KHCO<sub>3</sub> à 2 %, séchés sous azote et redissous dans 1 ml d'iso-hexane.

Les EMAG ont été séparés et quantifiés par chromatographie gaz-liquide à l'aide d'une colonne capillaire flexible en silice fondue SP<sup>™</sup> 2560 (longueur 100 m, diamètre interne

0,25 mm, épaisseur de film de 0,20 mm SUPELCO) dans un chromatographe en phase gazeuse Hewlett-Packard 5890. La température du four de 140 °C a été augmentée initialement à une vitesse de 3 °C min<sup>-1</sup> à 230 °C, suivie de 2 °C min<sup>-1</sup> et ensuite à 240 °C qui a été maintenue pendant 12 min. L'injecteur et le détecteur à ionisation de flamme ont été réglés à 260 °C. L'hélium a été utilisé comme gaz vecteur à une pression de 300 kPa et les pics ont été identifiés en comparant leurs temps de rétention avec les normes EMAG appropriées de Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA). Les données pour les composants individuels sont exprimées en pourcentage du contenu total.

### **10. Prédiction des propriétés du biodiesel en fonction du profil des acides gras de trois variétés de *Mastigocladus* S4BB, S4B11 et S9BB**

Le profil d'AG influence significativement les propriétés physiques et chimiques des biocarburants. Ainsi, le biodiesel microalgal nécessite de répondre à certaines spécifications physiques et chimiques fixées par différentes normes (Uma et al., 2020). Aux États-Unis, la norme applicable est la norme US ASTM D 6751 (American Society for Testing and Materials), et la norme EN 14214 en Europe (Normes européennes) (ASTM 6751, 2012 ; EN 14214, 2012 ; Hoekman et al., 2012.)

Les propriétés du biodiesel, y compris le degré de saturation (DU), l'indice de cétane (CN), l'indice de saponification (SV), l'indice d'iode (IV), la densité ( $\rho$ ), la viscosité cinématique ( $\nu$ ), la stabilité à l'oxydation (OS), le point de trouble (CP), point d'écoulement (PP), pouvoir calorifique supérieur (HHV), taux d'acides gras saturés (AGS), taux d'acides gras monoinsaturés (AGMI), taux d'acides gras polyinsaturés (AGPI), les équivalents en position allylique et bis-allylique (APE) et BAPE, respectivement), le facteur de saturation à chaîne longue (LCSF) et le point de colmatage du filtre froid (CFPP) ont été estimés par Biodiesel Analyzer® Ver. Logiciel 2.2 (disponible sur « <http://www.brteam.ir/biodieselanalyzer> ») basé sur les acides gras mesurés dans chaque souche (Talebi et al., 2014).

Le CN est l'indicateur crucial de la qualité de la combustion du carburant (Canakci et Sanli, 2008). L'OS est un paramètre important du biocarburant représentant les performances du moteur et la résistance à l'oxydation du carburant lors d'un stockage prolongé (Canakci et Sanli, 2008 ; Uma et al., 2020). Le  $\nu$  est l'un des principaux critères décisifs pour le carburant et joue un rôle primordial dans le schéma de pulvérisation du carburant, la formation du

mélange et les processus d'allumage (Canakci et Sanli, 2008). De même, le CFPP indique les performances d'écoulement du biodiesel à basse température et est en corrélation avec les valeurs d'acides gras insaturés dans le biodiesel (Gayathri et al., 2018). Le HHV est une caractéristique essentielle qui indique le niveau d'énergie d'un carburant, tandis que l'IV montre l'insaturation totale dans une combinaison d'acides gras. De plus,  $\rho$  est une spécification de carburant cruciale qui influence les performances du moteur (Arguelles et al., 2018)

### 11. Évaluation de l'activité antimicrobienne

#### a. Préparation des souches pathogènes

Les extraits de quatre espèces de microalgues dont une algue verte (*Coelastrella thermophila*) et trois souches de cyanobactéries (*Mastigocladus laminosus*) sont testés pour la mise en évidence de l'activité antimicrobienne vis-à-vis de trois espèces bactériennes proviennent du laboratoire de microbiologie université de Murcia, Espagne: deux bacilles à Gram négatif : *Escherichia coli* (ATCC 25922), et *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 25378) et une cocci à Gram positif *Staphylococcus aureus* (ATCC 25925) et sur la levure ; *Candida albicans* ATCC (40208). *Candida albicans* ATCC (40208) est ensemencé dans le bouillon de Sabouraud, incubée à 30°C pendant 72 heures, Des inocula sont enlevés, semés sur le milieu de culture gélosé de Sabouraud. Les colonies des espèces bactériennes sont inoculées dans un bouillon nutritif et incubées à une température de 37 °C pendant 24 heures. La préparation de l'inoculum est effectuée en prélevant une à deux colonies et les suspendre dans 9 ml d'eau physiologique stérile. La densité de l'inoculum est ajustée afin d'obtenir une turbidité voisine à celle de 0,5 Mc Farland qui est équivalente à 108 UFC/ml (Shaima et al., 2022)

#### b. Méthodes d'extraction

Les solvants utilisés comprenaient de chloroforme, méthanol, éthanol, diméthylsulfoxyde (DMSO). Deux méthodes sont utilisées pour l'extraction. Méthode 1 : 1.5 ml de chaque solvant a été ajouté à 10 mg de la biomasse (poids sec) de chaque espèces microalgue sélectionnées dans un mortier de porcelaine et le mélange était broyé. Les extraits ont ensuite été transférés dans des tubes de 2 ml et agité pendant 20 min à température ambiante. Les tubes étaient centrifugés à 5000 rpm/15 minutes, et les surnageants ont été collectés et transférés dans des tubes de 2 ml (Alsenani et al., 2020). 10 ml de chaque solvant ont été ajoutés à 1 g de la biomasse algale (poids sec) et vortexé pendant 30 s avant d'être incubé dans l'obscurité pendant 24 heures pour éviter la dégradation des composés sensible. Après



centrifugation, les extraits ont été transférés dans de nouveaux tubes et les solvants ont été complètement évaporés par évaporation rotative. Ensuite, les extraits bruts ont été re-dissous dans 200 µl des solvants sélectionnés (Alsenani et al., 2020).

### **c. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne des extraits de *Coelastrella thermophila* et des variétés de *Mastigocladus laminosus*.**

La méthode de diffusion par disque a été utilisée pour évaluer l'activité antimicrobienne des extraits. Tout d'abord, à l'aide d'un écouvillon stérile un inoculum est prélevé à partir de la suspension bactérienne ajustée et étalé sur la surface du milieu de culture Muller-Hinton. Ensuite, les disques ont été chargés avec 20 µl des différents extraits de microalgues préparés par les différents solvants, laissés sécher, puis placés sur le milieu de culture Muller-Hinton et les boîtes qui contiennent le milieu Sabouraud inoculées à l'aide de pinces stériles puis une nuit d'incubation à 37 °C 30°C pendant 24 heures et 72 heures pour les bactéries et les levures respectivement. Les expériences ont été menées en trois répétitions. L'activité antibactérienne est considérée comme positive à partir d'un diamètre supérieur à 6 mm (Bauer et al., 1966).

# **Résultats et Discussion**

## 1. Caractéristiques physicochimiques des sources thermales algériennes étudiées

Les paramètres in situ et les analyses chimiques des eaux thermales pour chaque source sont fournis dans le tableau 2. La température des échantillons d'eau variait de 37°C à 63°C et les valeurs de PH variaient de 6,70 à 7,72 (neutre à légèrement alcalin). Les valeurs de conductivités électriques variaient de 0,220 à 3,84 mS/m. Les échantillons d'eau montrent une hétérogénéité dans leurs composants chimiques, alors que les valeurs des principaux anions ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$  et  $\text{NO}_3^-$ ) et des cations ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  et  $\text{K}^+$ ) dans les eaux étaient variables. L'abondance des principaux cations est la suivante :  $\text{Na}^+ > \text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{K}^+$ . Les chlorures sont les anions les plus abondants, suivis des bicarbonates, et enfin des sulfates, par ordre de concentration moyenne.

La proportion des anions et cations majeurs était liée à la nature lithologique des sites de collecte, correspondant à divers systèmes géologiques complexes (Chenaker et al., 2018). Les sources chaudes étudiées peuvent être considérées comme hyperthermales et fortement minéralisées (Saibi, 2009).

Les principaux anions étaient  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$  et  $\text{HCO}_3^-$ , tandis que  $\text{Na}^+$  et  $\text{Ca}^+$  étaient les cations dominants (tableau 1). Les eaux des sources (H. Tassa, H. Ouled Ziad, H. Djaarir, H. Bouhmama, H. Essalihine1, H. Essalihine 2, H. El Knif) correspondent à des eaux de type chlorure de sodium issues des évaporations triasiques (Berkani et Houha, 2017), tandis que les sources d'Ouled Ali, H. Debagh 1, H. Debagh 2, et H. Meskhoutine, présentent un faciès chlorure calcique (Chenaker et al., 2018).

La source St7 montre le niveau le plus élevé parmi toutes les sources pour les éléments minéraux :  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  et  $\text{Na}^+$ , avec des valeurs de 1735,52 ; 251,55 ; 541,23 ; 42,47 et 900,58 (mg/l) respectivement. De plus, les sources St10 et St A présentent les deuxième et troisième concentrations les plus élevées de  $\text{Na}^+$  (respectivement 675,63 et 601,23 mg/l). Les analyses ont montré que la concentration en Magnésium  $\text{Mg}^{2+}$  atteignait son maximum au printemps St2 et St3 avec une valeur de 25 mg/l et la valeur minimale enregistrée au printemps St7 (6,64 mg/l). Pour les ions  $\text{SiO}_2^4$  le maximum est observé dans la source St1 avec une valeur de 71,99 mg/l et le minimum est observé dans la source St5 avec une valeur de (21,2 mg/l). Toutes les sources étudiées présentent des concentrations de  $\text{HCO}_3^-$  relativement dans la même fourchette (198,23 à 422 mg/l), à l'exception de la source St5 qui a le niveau le plus élevé observé au cours de cette étude (840 mg/l). Pour les

microéléments; Les niveaux de  $\text{Li}^+$ ,  $\text{F}^-$ ,  $\text{Br}^-$  et  $\text{Fe}^+$  se situaient dans la même fourchette basse moyenne pour toutes les sources (Tableau 3).

Dans la partie nord-est de l'Algérie, une gamme variée de sources thermales sont situées dans des régions largement séparées (Figure 2). Dans la présente étude, les eaux présentent une large gamme de températures (Tableau 2). La température d'une source dépend à la fois de la profondeur et de la vitesse d'écoulement (Bahri et al., 2011). Les eaux thermales proviennent de diverses sources géothermiques et sont influencées par les eaux souterraines, ce qui entraîne un refroidissement des eaux thermales avec une salinité et une température variables (Giorgio et al., 2018).

De plus, les valeurs élevées de conductivité enregistrées (Tableau 2) pour la plupart des sources thermales étudiées sont dues à la présence de grandes quantités de minéraux dans l'eau et de nombreux sels sont plus solubles à des températures plus élevées, ces sels et minéraux pénètrent dans l'eau en touchant roches et sédiments, les eaux des sources chaudes affichent des valeurs de conductivité relativement élevées (Chenaker et al., 2018).

Les valeurs d'anions et de cations étaient relativement hétérogènes (Tableau 3); cette hétérogénéité est due à la nature lithologique des sites de collecte, qui se situent sur divers systèmes géologiques et complexes différentes structures géologiques et complexes (Polveche, 1960). De plus, les fortes concentrations de Na, K, Ca, Cl,  $\text{SO}_4$  et  $\text{SiO}_2$  (Tableau 3) dans ces sources thermales sont dues au contact prolongé entre l'eau et sa paroi rocheuse lors de longues circulations souterraines et d'échanges de citations dans les roches hôtes carbonatées et évaporées (Chenaker et al., 2018).

**Tableau 2.** Caractéristiques générales des sources thermales algériennes analysées dans l'étude.

Sites d'échantillonnage	Nom des sources	Région	température (C)	pH	Conductivité (uS/cm)	oxygène Dissous mg/l	TDS g/l
St.1	H. Debagh 1	Guelma	47-50	7.29	1.08	4.46	12.5
St.2	H. Debagh 2		55-57	7.20	2.81	3.72	1.8
St.3	H. Meskhoutine		63	7.08	0.232	063	1.51
St.4	H. Ouled Ali		55	7.09	0.220	3.09	1.94
St.5	H. Tassa	Souk Ahras	42.3	6.70	3.09	0.26	1.60
St.6	H. Ouled Ziad		41.7	7.30	4	0.56	1.17
St.7	H. Djaarir	Khenchela	38-39	7.65	0.725	0.47	5.52
St. A	H. Bouhmama	Batna	35-37	7.72	0.265	17.49	1.72
St.9	H. Essalihine 1	Khenchela	50-54	6.70	3.50	5	1.80
St.9.1	H. Essalihine 2		55-57	6.89	3.84	5.25	
St.10	H. El Knif		48-50	7.55	3.65	3.60	1.85

**Tableau 3.** Principaux composants chimiques (mg/l) des échantillons d'eaux des sources thermales algériennes.

source Thermale	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	F <sup>-</sup>	Cl <sup>-</sup>	Br <sup>-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	SiO <sub>2</sub>	Li <sup>+</sup>	Fe
St.1	232.53	28.19	205.48	23.51	342	3.28	343.77	0.55	358.86	0.47	71.99	0.19	0.12
St.2	212	34	205	25	336	3.24	327	0.49	382	0.39	69.26	0.18	0.1
St.3	220	33.56	219	25	366	2.7	318	2.17	367	0.36	54.9	1.165	0.135
St.4	224.18	41.00	32.5	7.02	255	2.29	191.22	1.20	301.00	0.21	50.4	0.10	0.21
St.5	286	35	417	24	840	2.6	725	1.9	17	0.64	21.2	0.9	Traces
St.6	169	34	165	12	422	4.2	330	1.54	45	/	22	0.21	0.1
St.7	251.55	42.47	900.58	6.46	198.23	0.34	1735.52	0.45	541.23	0.27	26.7	0.053	/
St. A	133	34	622	12	656	0.41	165	0.47	18	/	22	0.057	/
St.9	129.40	22.78	601.23	18	281.36	0.42	692.54	0.47	287.14	3.9	43.45	0.562	0.01
St.9.1	132	23	631	22	314.76	0.79	880	0.57	215	5.04	49.2	0.341	0.012
St.10	159.08	16.73	675.63	15.75	325.25	1.05	795.36	1.26	456.32	6.04	45.3	0.456	0.003

### 2. La diversité des espèces algale

Dans la présente étude, nous avons exploré les sources thermales de l'Algérie. Un total de 29 taxons a été enregistré, avec une dominance des espèces des bacillariophycées. La richesse spécifique variait de 5 à 20. Le nombre maximum de taxons identifiés (20) a été trouvé à la source St2 (55-57 °C) et le nombre minimum en St6, St5, St 7, St A, avec 5-7 espèces. Les diatomées montrent une diversité importante avec 13 espèces, et avec une dominance entière des formes pennées.

Dans cette étude, la biodiversité des microalgues thermophiles dans onze sources thermale algériennes avec des températures de l'eau et une composition minérale variables a été étudiée. Ce travail constitue le premier bilan de la diversité algale dans les sources thermales algériennes. Ainsi, 29 espèces semblent s'être adaptées à ces milieux thermaux. Une richesse spécifique similaire a été trouvée dans d'autres sources thermales (Ghozzi et al., 2013).

Sur la base des résultats, la diversité maximale des taxons de microalgues a été obtenue à la source thermale St2 à 55-57 °C avec 20 espèces ; suivi de St1 (47-50°C), St3 (63°C), St9 (50-54°C) et St10 (48-50°C) et St4 (55 °C) avec respectivement 19, 14, 14, 13 et 13 espèces respectivement (Tableau 4). Dans cette étude, nous avons constaté que les sources dont la température varie de 47 à 63 °C présentent une diversité algale plus élevée qu'à une température moyenne de 37 à 45 °C. Nikulina et Kociolek (2011) ont signalé que les sources thermale des îles Kouriles et Sakhaline, en Russie, avec des températures allant jusqu'à 60 °C, ont le plus grand nombre d'espèces que celles avec des températures plus basses. Outre, la forte abondance des espèces de diatomées dans ces sources pourrait être liée à leur adaptation physiologique à la forte concentration de micronutriments dans l'eau. De même, les niveaux élevés de silice et de potassium dans ces sites sont, en fait, des facteurs déterminants pour la riche variété de diatomées (Abdelwahab et Amin, 2017).

### 3. Études morphologiques et phylogénétique des espèces sélectionnées

#### 3.1. Variation morphologique de *Coelastrella* sp S3A

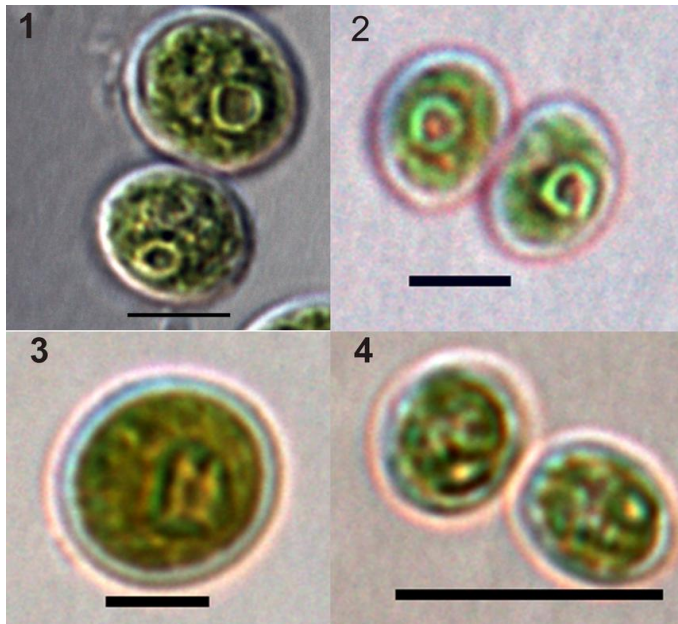
Sur la base des caractéristiques morphologiques, l'isolat S3A a été identifié de manière préliminaire comme étant l'espèce *Coelastrella* sp, caractérisée comme unicellulaire et formant occasionnellement des agrégats avec des cellules végétatives sphériques à subsphériques, de 5,4 à 9 µm de diamètre, comprenant un seul chloroplaste pariétal en forme de cloche, dont sa forme souvent se change rapidement, en se fragmentant en plaques à mesure que les cellules vieillissent.

Avant la division cellulaire, les cellules matures sont presque sphériques et mesurent (8,5) 9,7-14 (18,5) µm de diamètre avec des épaissements bien visibles sur les parois cellulaires. Un pyrénoïde distinct a été clairement observé dans les cellules végétatives et les autospores. Les nervures longitudinales de la paroi cellulaire des cellules vivantes sont presque invisibles en microscopie optique. La reproduction a été effectuée exclusivement par des autospores (4 à 16 autospores allongées dans la cellule du sporange). Les cellules âgées changent fréquemment de couleur pour devenir rouge brique/orange (Figures 5, 6, 7, 8).

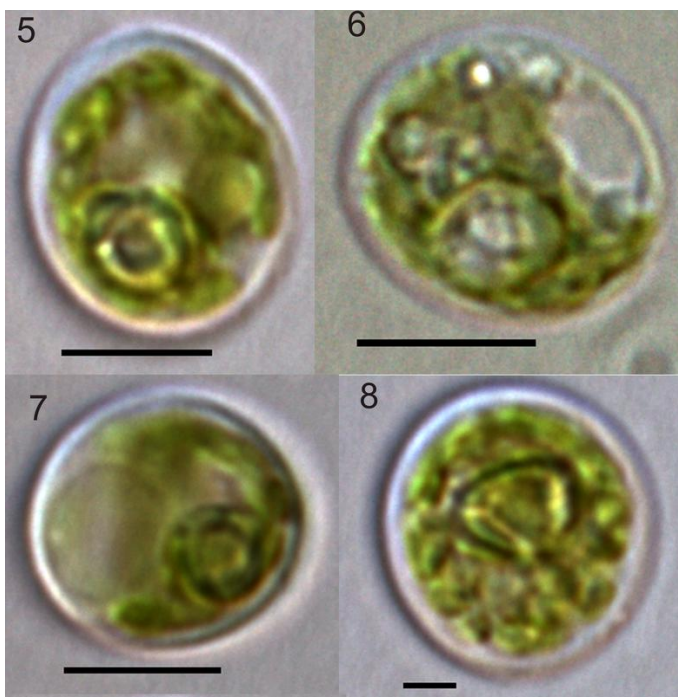
Outre la nature thermophile, la propriété de production de pigments de *Coelastrella* S3A a également été trouvée pendant la culture. La couleur verte ferme de *Coelastrella* S3A a été changée en vert pâle ou jaunâtre, lorsqu'elles ont atteint la phase stationnaire de croissance, puis elles sont finalement devenues rougeâtres. Diverses espèces de *Coelastrella* ont déjà été signalées (Abe et al., 2007; Hu et al., 2013 ; Minhas et al., 2016) pour leur nature d'accumulation de caroténoïdes dans des conditions de stress. La formation de caroténoïdes en phase stationnaire de croissance donne l'aspect rougeâtre de la culture (Figures 8) (Narayanan et al., 2018).

Le genre *Coelastrella* est connu depuis près de 100 ans et il contient relativement un petit nombre d'espèces déjà identifiées (Goecke et al., 2020). La plupart des espèces de ce genre *Coelastrella* sont principalement des espèces terrestres que l'on trouve également dans les plans d'eau temporaires et dans des habitats aériens, tels que le sol, les surfaces rocheuses, les murs de briques, les sols en béton et l'écorce des arbres (Wang et al., 2019 ; Maltsev et al., 2021).

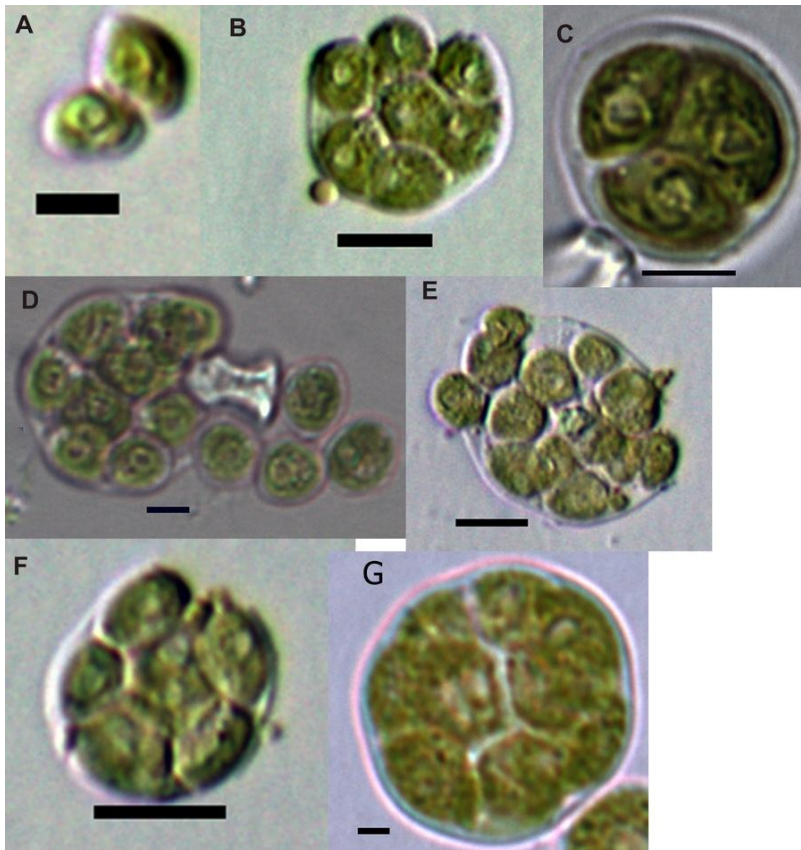




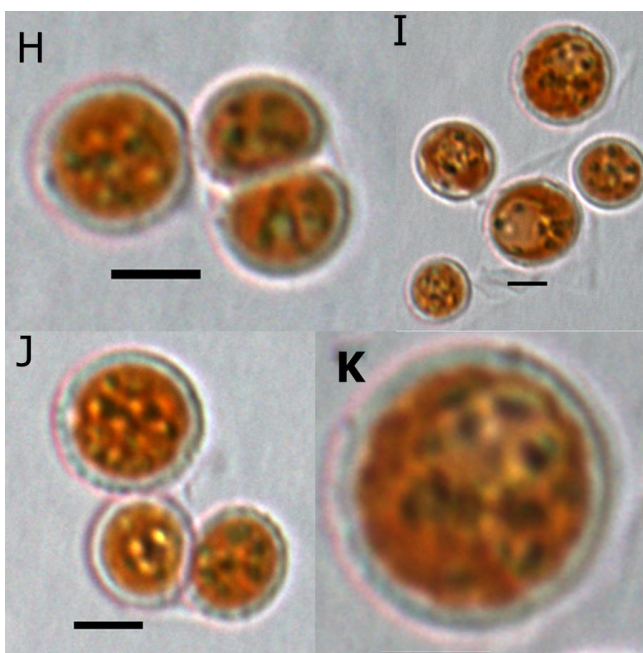
**Figure 5.** Caractéristiques des cellules végétatives avec un seul pyrenoïde de *C. thermophila* var. *globulina*. Barre d'échelle 5µm



**Figure 6.** Caractéristiques des cellules matures de *C. thermophila* var. *globulina*. 5.6.7. Cellules mature avec un chloroplaste en forme de cloche. 8. Chloroplaste se divise en plusieurs fragments. 5. Cellule mature avec deux petites vacuoles. 7. Cellules mature avec une large vacuole. Barre d'échelle= 5 µm.



**Figure 7.** Caractéristiques des sporangium de *C. thermophila* var. *globulina*. A. autospores. B.F.G. sporangium avec des spores C. sporangium avec trois spores D.E. Sporangium entrain de secréter des spores. Barre d'échelle= 5um



**Figure 8.** Caractéristiques des cellules âgées de *C. thermophila* var. *globulina*. Barre d'échelle= 5 µm.

Les espèces de ce genre sont répandues dans les écosystèmes européens telle que *C. rubescen*, *C. terrestris* et *C. oocystiformes*. Les espèces de *Coelastrella* trouvées hors d'Europe comprennent des espèces terrestres décrites du Japon et de Nouvelle-Zélande, et des espèces planctoniques d'eau douce, de Chine (Maltsev et al., 2021). A notre connaissance, *Coelastrella* n'a pas été enregistré en Algérie avant. Il est fort possible que de nombreuses espèces de microalgues coccoïdes (y compris *Coelastrella* spp.) ont été négligés dans les études environnementales locales (en Algérie et ailleurs). Également, l'espèce que nous avons isolée dans ce travail d'une source thermique algérienne représente le premier signalement de ce genre à partir des zones extrêmes dans le monde.

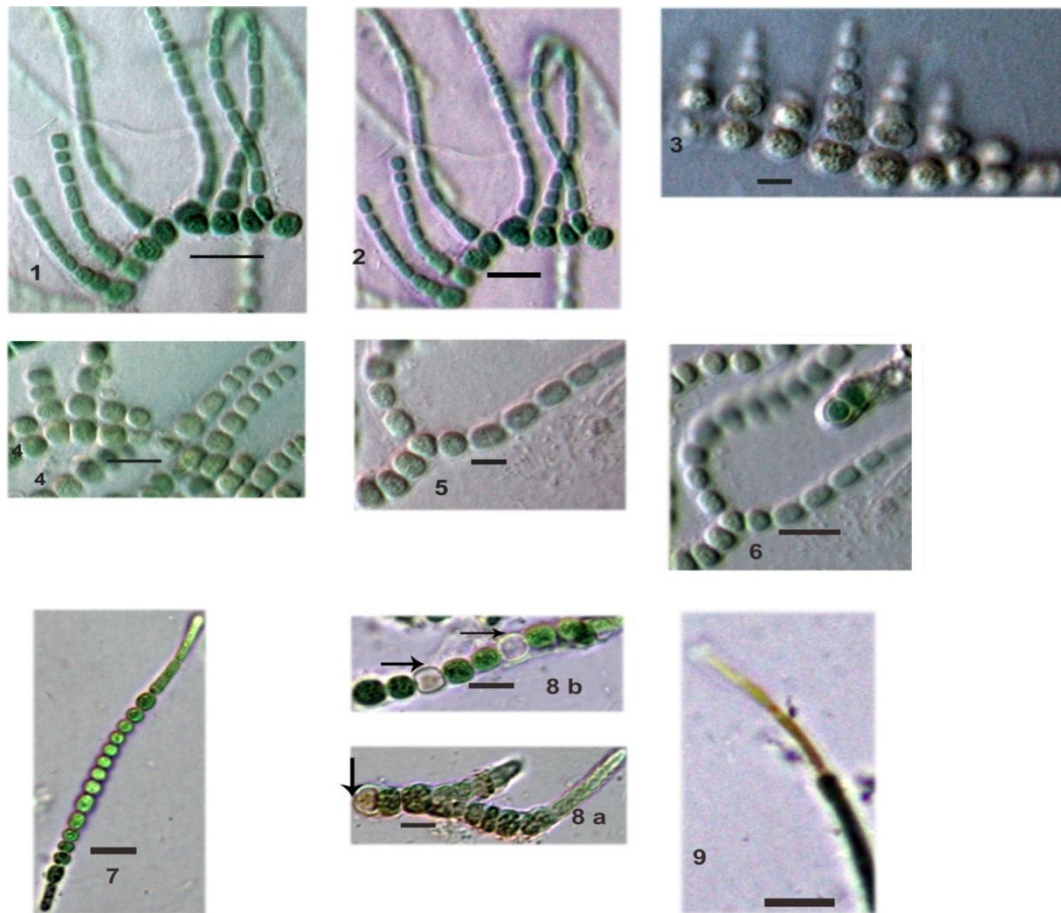
### 3. 2. Étude morphologique de *Mastigocladus laminosus* S4BB, S4B11 et S9BB

Trois souches de *M. laminosus* ont été isolées et cultivées : désignées S4BB et S4B11 de la source Ouled Ali et S9BB de la source Essalihine. Les trois souches correspondent parfaitement à la description de *M. laminosus* Cohn ex Kitchener de Komarek (2013) (Figure 9, 10, 11; Tableau 5).

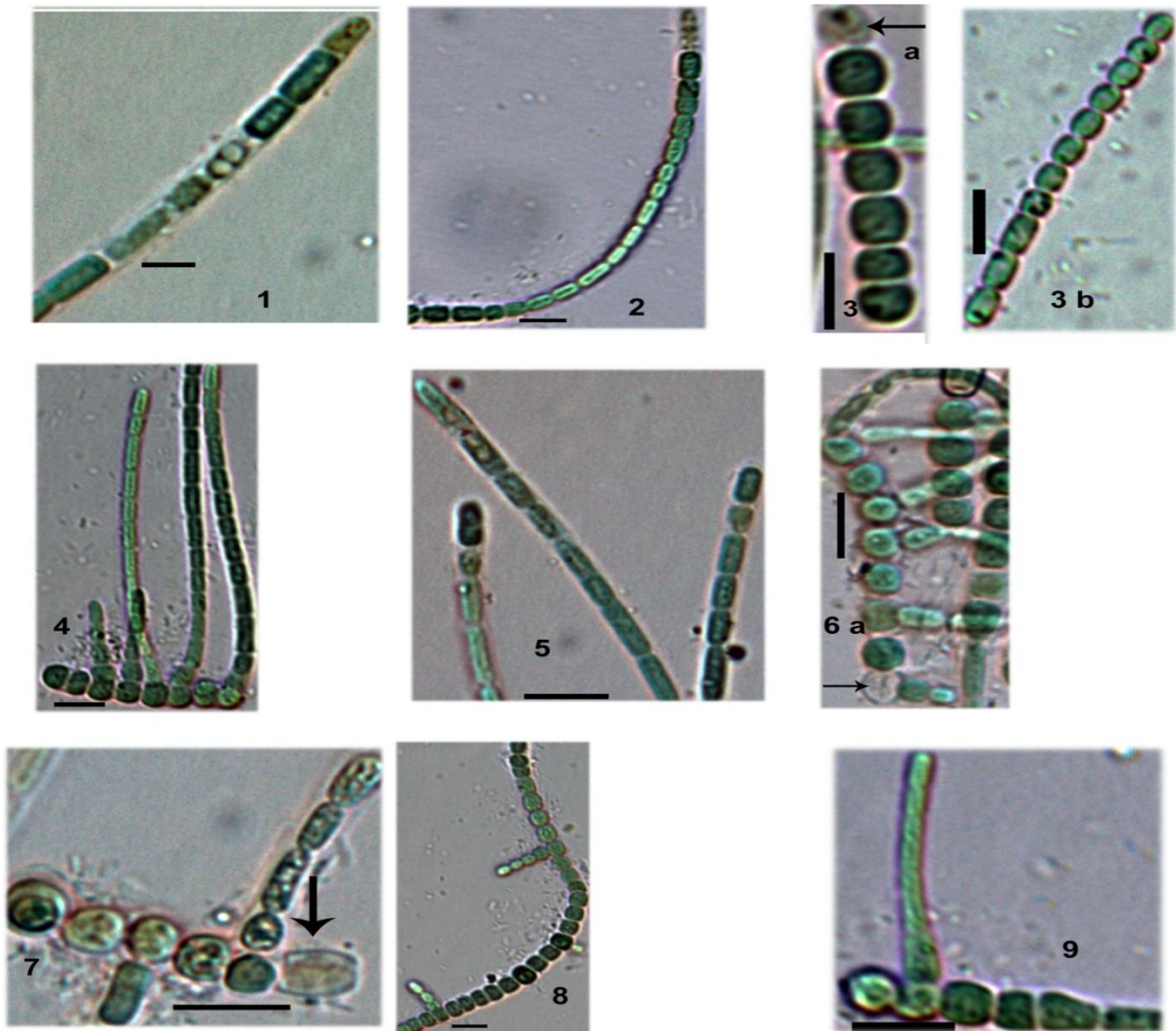
Sur la base d'une combinaison de morphologie (vrai ramification) et d'écologie (origine thermique), les trois souches ont été identifiées comme étant la souche thermophile *M. laminosus* (Komarek, 2013 ; Kastovsky et Johansen, 2008). Les différences morphologiques observées entre les trois souches isolées étaient probablement liées à des différences dans les caractéristiques chimiques des sources chaudes et la composition des milieux de culture (Castenholz, 1976). *M. laminosus* a été isolé dans cette étude à des températures de 55 °C et 57 °C, comme indiqué dans les enregistrements précédents de Miller et al. (2006), Finsinger et al. (2008), Komárek (2013) et Alcamán et al. (2015).

**Tableau 5.** Principales caractéristiques morphologiques des espèces de *Mastigochladus laminosus* Cohn ex Kitchener.

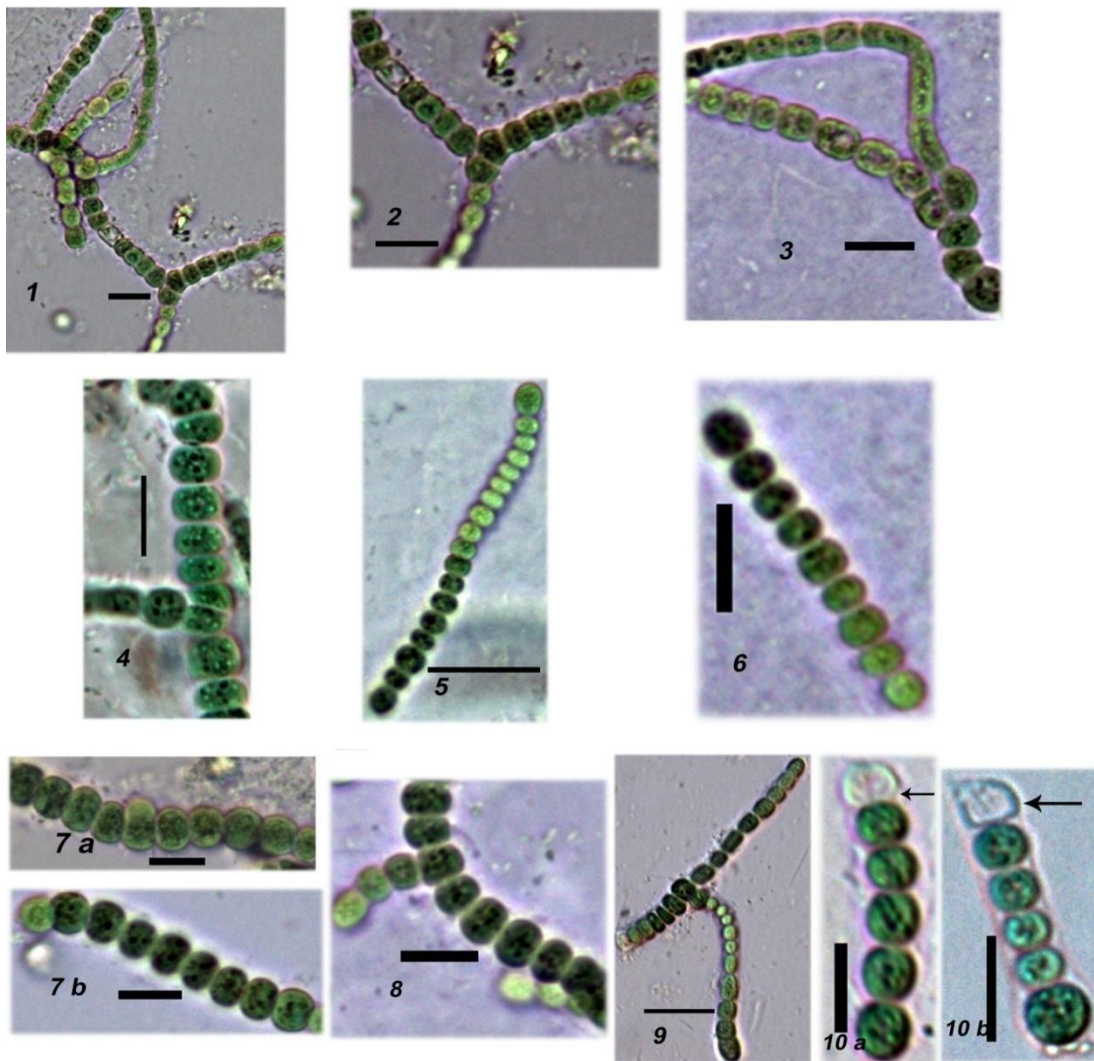
espèces		S4BB	S4B11	S9BB
Source d'origine		Ouled ali	Ouled ali	Essalihine
Milieu de Culture		BBM	BG11	BBM
Mesure de la largeur des cellules (µm)	Filaments principaux	3.95-6.68	4.64-6.63	4.44-5.60
	Branches	2.71- 2.98	2.25-3.19	2.50-3.03
Mesure de la largeur des cellules (µm)	Filaments principaux	4.41-7.59	4.07-6.19	4.02-8.40
	Branches	5.28-7.59	4.18-9.91	4.28-6.72
Type de Ramification	T V Y	Présent Présent Rare	Présent Présent Rare	Présent Présent Abondant
Hormogonies		Présent 20 cellules	Présent 20 cellules	Présent 7 to 14 cellules
Hétérocystes		Présent incolore, cylindrique	Présent incolore, cylindrique	Présent incolore, cylindrique
Gaine		Mince, distinct	Mince, distinct	Mince, distinct
Akinetes		Absent	Absent	Présence d'akinetes non maturés



**Figure 9.** Caractéristiques morphologiques principales de *Mastigochladus laminosus* S4BB. 1.2. Filaments principaux multi branches.3.4. Filaments principaux avec deux lignes de cellules. 5.6. Y- branche type. 7. Hormogonum. 8. a. Filaments principaux avec des branches et avec une heterocytes terminale. 8. b. Hormogonum avec deux heterocytes. 9. extension terminal. Les flèches désignent les heterocytes. Barre d'échelle= 10um à l'exception de 1 Barre d'échelle= 25µm.



**Figure 10.** Caractéristiques morphologiques principales de *Mastigochladus laminosus* S4B11. 1.5. Partie terminale de branche. 4. Filaments principaux multi branches. 6.7. Filaments principaux avec une heterocytes. 3.4. Filaments principaux avec nouvelle branche. 3. a. Hormogonum avec terminal heterocytes. 3. b. Hormogonum. Les flèches désignent les heterocytes. Barre d'échelle= 10  $\mu$ m.



**Figure 11.** Caractéristiques morphologiques principales de *Mastigocladus laminosus* S9BB. 1. Filaments principaux multi branches. 2.3.9. Y- branche type. 4.8. Filaments principaux avec nouvelle branche 5.6. Hormogonum. 10. a. b.Hormogonum avec heterocytes. Les flèches désignent les heterocytes. Barre d'échelle= 10 $\mu$ m.

### 3.3. Études phylogénétique de *Coelastrella* sp S3A et de *Mastigocladus laminosus* S4BB, S4B11 et S9BB

L'analyse phylogénétique basée sur l'alignement de la séquence de l'ADNr 18S obtenues par le blast et une comparaison avec des souches similaires dans la base de données GenBank ont indiqué que l'espèce S3A présentait une forte similitude avec d'autres séquences de genre *Coelastrella* (Scenedesmaceae, Chlorophyceae) ce qui confirme les résultats de la caractérisation morphologique. Une homologie de 100% a été obtenue entre la séquence de la souche S3A et l'espèce *Coelastrella thermophila* var. *Globulina*, récemment décrit par Wang et al. (2020).

L'étude moléculaire est complétée par la construction d'un arbre phylogénétique, regroupant de l'espèce étudiée ainsi que 24 séquences des espèces similaires obtenues par le BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). L'arbre construite a montré que l'espèce *Coelastrella* S3A forme clade phylogénétique bien soutenu avec les genres *Coelastrella* et *Asterarcys* (Figure 12). *Coelastrella* S3A a formé une ligne phylogénétique (groupe sœur) avec *Coelastrella thermophila* var. *Globulina*, récemment décrit par Wang et al. (2020).

Les caractéristiques morphologiques de l'espèce étudiée correspondent à celles du genre *Coelastrella* défini par Chodat en 1922. La microalgue verte isolée à 63 °C de pierres submergées morphologiquement adaptées *Coelastrella thermophila* var. *globulina*, qui a été récemment décrite par Wang et al. (2020). Le séquençage de l'ARNr 18S et l'analyse BLAST ont confirmé son identification. *Coelastrella* S3A a été regroupée avec *Coelastrella thermophila* var. *globulina*, avec un bon support, et ce clade était cohérent avec les données morphologiques et la souche a établi un groupe sœur avec le *C. thermophila* var. *globulina* Q. Wang, H. Song, X. Liu, G. Liu et Z. Hu.

Il y avait une similarité de 100 % entre la séquence de *Coelastrella* S3A et les séquences du matériel typus de *Coelastrella thermophila* var. *Globulina* téléchargée sur GeneBank par Wang et al (2020). Cependant, ce genre a une histoire taxonomique compliquée, qui a été révisée à plusieurs reprises sur les bases de données morphologiques ou moléculaires (Wang et al., 2020).

Le taxon a déjà été signalé sur des sols en béton humides ou des pierres immergées dans des rivières. Les cellules d'algues sont initialement vert foncé, mais deviennent rouge brique ou orange en vieillissant, ce qui indique une synthèse accrue de caroténoïdes (Abe

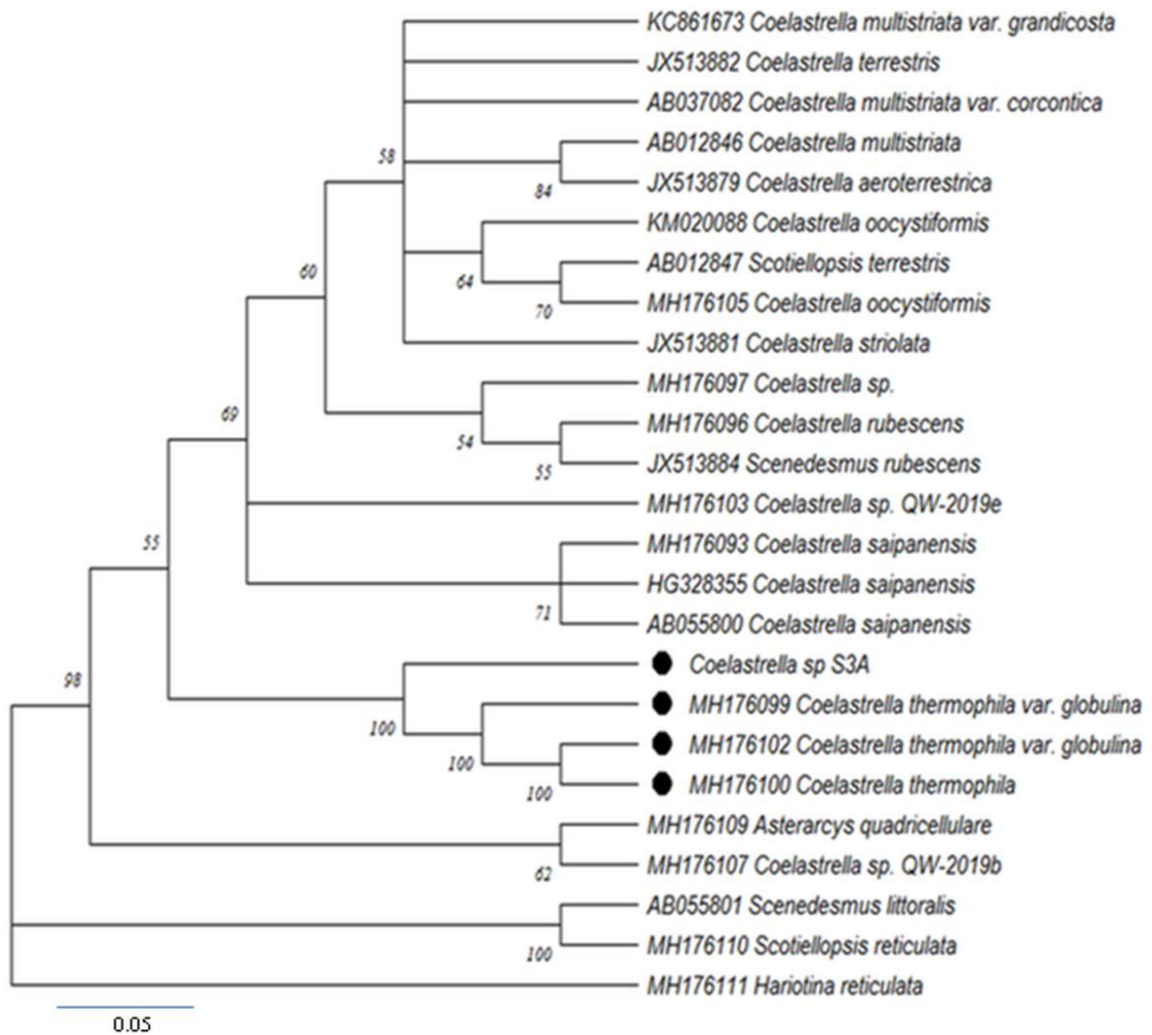


et al., 2007 ; Goecke et al., 2020 ; Alshareef et al., 2021). Des changements dans la forme des chloroplastes à mesure que les cellules vieillissent ont également été signalés dans d'autres souches de *Coelastrella* (Maltsev et al., 2021 ; Wang et al., 2020). A notre connaissance, aucune espèce appartenant au genre *Coelastrella* n'a été signalée auparavant dans des sources thermales en Algérie ou ailleurs.

L'alignement des séquences complètes de l'ADNr 16S des espèces étudiées contre des séquences correspondantes des bases de données GenBank a indiqué que les espèces S4BB, SB11, S9BB présentaient une forte similitude avec d'autres séquences de genre *Fischerella*. Une forte similitude de 90% a été obtenue entre les séquences étudiées et l'espèce *Fischerella thermalis*.

Après comparaison des séquences par BlastN avec la banque de données NCBI, L'arbre phylogénétique a été généré par NJ, fait apparaître les isolats S4BB, SB11, S9BB dans le même clade que *Fischerella thermalis*.

La préférence pour les biotopes thermaux est unique dans les espèces appartenant au vrai ordre Stigonematales (hors Chlorogloeopsis) au genre *Mastigocladus*. Les espèces appartenant au genre *Mastigocladus* isolées des habitats non thermiques sont, selon Kastovsky et Johansen (2008) plus proche de genre *Fischerella*. Pour cela le biotope d'origine doit être considéré comme un caractère taxonomique critique dans l'attribution des espèces (Kastovsky et Johansen, 2008). *Mastigocladus laminosus* Cohn ex Kirchner, cyanobactérium filamenteux à ramification vraie, capable de fixer l'azote, représente un bon exemple d'organisme thermophile car il a été décrit à l'origine à partir de sources thermales (Kastovsky et Johansen, 2008 ; Alcorta et al., 2019), et domine les tapis microbiens thermales (Alcorta et al., 2019) avec une distribution mondiale (Castenholz, 1996 ; McGregor et Rasmussen, 2008). *M. laminosus* montre une excellente tolérance à la dessiccation (Miller et al., 2007) et synthétise généralement des AG monoéniques 14:0, 14:1, 16:0, 16:1, 16:2, 18:0 et 18:1 ( Murata et al., 1992 ; Los et Mironov, 2015).



**Figure 12.** Arbre phylogénétique de la souche *Coelastrella* sp S3A étudiée reconstruite à l'aide d'un ensemble de données de 25 18S ADNr dérivant du genre *Coelastrella* et de ses espèces relatives des Chlorophyceae. Les valeurs au niveau des nœuds indiquent les probabilités calculées par Bootstrap; les noms d'espèces et de souches, ainsi que les numéros d'accèsion GenBank, sont indiqués pour chaque taxon.

#### 4. Rendement de culture et croissance

Une production de biomasse sèche de 9,39, 18,36 et 12,68 g/l a été obtenue pour les souches S4BB, S4B11 et S9BB, respectivement. Les trois souches de *M. laminosus* ont montré des rendements de biomasse beaucoup plus élevés que d'autres souches de *Mastigocladus* rapportées dans des études précédentes, telles que *M. laminosus* (CCAP 1447/3) (0,8 g/l) (Smith-Bädorf et al., 2013), *M. laminosus* Sofia (0,53 g/l), *M. laminosus* Carlsbad (0,48 g/l) (Rezanka et al., 2012), *Mastigocladus* HS-46 (2,09 g/l) (Prihantini et

al., 2021), et dans autres espèces de cyanobactéries comme *Synechococcus* HS-9 (3,323 g/l) (Rahman et al., 2020), *Nostoc carneum* MBDU 709 (0,58 g/l) (Anahas et Muralitharan, 2018), *Synechocystis* PCC 6803 (1,18 g/l) , *Synechococcus* PCC 7942 (1,09 g/l), *Nostoc muscorum* (0,76 g/l), *Oscillatoria* sp (0,76 g/l), *Lyngbya* sp (0,64 g/l) et *Phormidium* sp (1,07 g/l) (Patel et al ., 2018).

La microalgue verte isolée *Coelastrella* S3A a été cultivé dans un milieu BBM riche en extrait de sol à  $75 \mu\text{M photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  à une température de  $35 \text{ }^\circ\text{C}$  pour 16 jours, la avec la biomasse sèche obtenue était de 10.86 g/l. Les travaux précédents de la culture de différentes espèces de *Coelastrella* montrent leur capacité à produire de la biomasse dans la gamme de (0,78) 1,10–1,85 (3,0) g/l. *Coelastrella* S3A étudiée a présenté des rendements de biomasse largement plus haussés comparé aux valeurs enregistrées pour autres espèces de Genre *Coelastrella* dans des études antérieures telles que *Coelastrella multistriata* MZ–Ch23 (1.30g/l) (Maltsev et al., 2021), *Coleastrella* sp. FI69 (Narayanan et al., 2018), *Coelastrella* sp. strain BGV (7.7 g/l) (Dimitrova et al., 2017) and *Coelastrella* sp. F50 (Hu et al., 2013).

Un taux de croissance rapide et une productivité élevée de la biomasse sont des caractéristiques clés souhaitables pour la sélection des microalgues pour les cultivées pour des fins commerciales (Oyewumi and Olukunle, 2018).. Les taux de croissance élevés des microalgues couplés à la facilité de culture en font une alternative prometteuse pour plusieurs processus, notamment avec les problèmes de pollution environnementale, changement climatique et effet de serre croissant (Mutanda et al. 2011). Dans ce contexte, la prospection de la biodiversité des sources thermales peuvent être une recherche fructueuse pour exploiter la flore naturellement disponible (Ratha et al., 2012).

Les standards d'expérience de la croissance algale dans les conditions de laboratoire non optimisées ont été utilisés pour établir les taux de croissance, la productivité de la biomasse et le contenu d'acides gras de quatre espèces de microalgues sélectionnées dans cette étude. Globalement, le taux de croissance moyen (allant de 9.39 à 12.68 g/L) était largement supérieures à ceux enregistrés dans d'autres études, les quatre espèces ont une croissance rapide et sont facile à récolter avec un large intervalle de tolérance de température (Oyewumi and Olukunle, 2018). Les espèces de *Coelastrella* ont un large éventail d'utilisations biotechnologiques. Certaines souches de *Coelastrella* combinent la capacité à accumuler des caroténoïdes secondaires (jusqu'à 2 % de poids sec) et des lipides

(jusqu'à 50 % de poids sec) avec une haute résistance aux divers facteurs de stress (Maltsev et al., 2021).

### 5. Profil d'acides gras

#### 5.1. Composition en acides gras *Coelastrella thermophila* var. *globulina*

Le contenu en AG de *Coelastrella thermophila* var. *globulina* se trouve dans le tableau 6. Le profil d'AG de notre isolat était constitué d'une proportion élevée d'acides gras monoinsaturés (AGMI) ( $51,12 \% \pm 0,12$ ), de  $27,01 \% \pm 0,09$  d'acides gras saturés (AGS) et de  $21,87 \% \pm 0,05$  d'acides gras polyinsaturés (AGPI).

Dans l'ensemble, l'acide palmitique (16:0) était l'AGS prédominant ( $21,45 \% \pm 0,08$ ), l'acide oléique (18: 1n-9) était l'AGMI le plus répandu ( $35,95 \% \pm 0,07$ ) et l'acide linoléique (18: 2n-6) était l'AGPI le plus abondant ( $14,38 \% \pm 0,03$ ). Un autre AGPI d'intérêt qui exhibe une proportion relativement élevée du total d'AG était l'acide  $\alpha$ -linoléique (18: 3n-3) ( $04,22\% \pm 0,07$ ), tandis que 20: 4n-6 (acide araquidonique, ARA) et 18: 3n- 6 ( $\gamma$ -acide linoléique, GLA) n'en avait que 0,13 % et 0,96 %, respectivement. L'acide eicosapentanoïque (20:5n-3, EPA) et l'acide Ddocosahexaénoïque (DHA) n'ont pas été détectés. Récemment, diverses études ont rapporté l'intérêt biotechnologique de ce genre en raison de sa teneur en pigments et en acides gras, ainsi que pour une utilisation potentielle pour la bioremédiation (Abe et al., 2007 ; Hu et al. 2013; Kawasaki et coll. 2013 ; Luo et al., 2016 ; Thao et al. 2017; Wang et al. 2020).

La capacité des algues à accumuler de grandes quantités d'AG par rapport à d'autres organismes est l'une des qualités qui leur permettent de vivre dans des environnements extrêmes (Sadvakasova et al., 2019). La souche isolée avait un profil en AG remarquable et pourrait être un candidat prometteur à des fins biotechnologiques (Abe et al., 2007 ; Minyuk et al., 2017) car elle présente une forte proportion d'acide oléique et un pourcentage relativement élevé d'AGPI (Tableau 6). Récemment, diverses études ont rapporté l'intérêt biotechnologique de ce genre en raison de sa teneur élevée en pigments et en acides gras, ainsi que pour une utilisation potentielle en bioremédiation (Goecke et al., 2020).

Des pourcentages d'AG comparables ont été rapportés dans la souche thermotolérante *Coelastrella* sp. F50 avec 26,25 % d'AGS et 41,47 % d'AGMI (Hu et al., 2013) et la souche thermotolérante *Coelastrella* sp. FI69 avec 27% de AGS, et une valeur élevée de ou

AGMI (Narayanan et al., 2018), les deux respectivement Ils différaient des autres souches de *Coelastrella*, telles que *Coelastrella* sp. L3 avec une valeur AGS élevée (62,97%) (Thao et al., 2017) ainsi que *Coelastrella multistriata* (Maltsev et al., 2021) et *Coelastrella* sp. FGS-001(Goecke et al., 2020), qui contenaient tous deux une forte proportion d'AGPI (66,80 % et 42,71 %, respectivement) (Tableau 6).

Cependant, *Coelastrella* S3A a pu générer des niveaux d'AG importants à une température relativement élevée (35 ° C) dans des conditions de laboratoire par rapport aux autres souches de *Coelastrella*, qui ont été cultivées à des températures relativement plus basses. Tout cela fait de cette microalgue une option intéressante pour la production d'AG à des fins biotechnologiques ((Hu et al., 2013 ; Abe et al., 2007).

Le profil AG de la souche étudiée présentait une longueur de chaîne moyenne qui variait de C14 à C20, ce qui est typique des microalgues (D'Alessandro et al., 2018). Il est généralement contenu dans des matières premières appropriées pour la production de biodiesel et garantit des paramètres de biodiesel de haute qualité (Mutanda et al., 2011 ; Oliveira et al., 2018). Les biodiesels générés à partir d'AGS et d'AGMI à chaîne carbonée courte sont de meilleure qualité. La souche étudiée présentait des proportions relativement élevées d'AGS et d'AGMI, ce qui la qualifie comme candidate pour fournir des matières premières également pour la production de biodiesel (Sadvakasova et al., 2019).

Le principal AGS était l'acide palmitique, le principal AGMI était l'acide oléique, tandis que l'acide linoléique (LA) et  $\alpha$ -linoléique (ALA) étaient dominants dans les AGPI. Nos résultats sont cohérents avec ceux rapportés pour d'autres souches de *Coelastrella* (Hu et al., 2013; Goecke et al., 2020; Abe et al., 2007; Minyuk et al., 2017; Dimitrova et al., 2017; Narayanan et al., 2018). Les différences de composition en AG de notre souche dans des conditions d'incubation différentes peuvent favoriser la synthèse d'un type ou d'un autre et mériter des études plus approfondies.

Notre *Coelastrella thermophila* var. *globulina* présentait des teneurs élevées en AGPI totaux omega-6 et omega-3, ce qui est caractéristique des souches de *Coelastrella* (Maltsev et al., 2021). Les acides gras polyinsaturés (AGPI), à savoir les oméga-3 et les oméga-6, sont des composants essentiels de l'alimentation humaine et animale; ces acides gras, ne peuvent pas être synthétisés par le corps humain. Par conséquent, l'apport de sources externes est impératif (Sadvakasova et al., 2019; Pôjo, et al., 2021).

L'AL était également présent et prédominait dans les AGPI omega-6, tandis que l'ALA prédominait dans les AGPI omega-3. Par conséquent, les teneurs élevées en AG linoléiques et  $\alpha$ -linoléniques de notre espèce font de la biomasse une source précieuse de supplément nutritionnel et un additif alimentaire potentiel pour les animaux, où l'ALA et/ou l'AL pourraient répondre aux exigences essentielles en AG (Tableau 6) (Dimitrova et al., 2017).

Bien que les pourcentages d'acide g-linolénique GLA (18:3n-6, GLA) (0,96%) et d'acide stéaridonique (18:4n-3, SA) (1,16%) ne soient pas élevés, la présence de ces deux AG est intéressante car ils peuvent favoriser métaboliquement la production d'ARA et d'EPA dans les cellules humaines, qui sont essentielles (D'Alessandro et al., 2018 ; Vargas et al., 1998). De même, la production de 0,96 % de GLA par la souche étudiée semble être relativement supérieure aux valeurs enregistrées chez les autres souches de *Coelastrella* (Hu et al., 2013 ; Thao et al., 2017; Narayanan et al., 2018 ; Maltsev et al., 2021; Goecke et al., 2020) et autres microalgues vertes thermophiles (D'Alessandro et al., 2018).

L'acide docosahexaénoïque (DHA, 22:6, n-3), acide eicosapentaénoïque (EPA, 20:5 n-3), acide  $\alpha$ -linolénique (ALA, 18:3 n-3), acide arachidonique (ARA, 20:4 n-6) et l'acide  $\gamma$ -linolénique (GLA, 18:3, n-6); ils ont suscité un intérêt considérable en ce qui concerne la santé humaine, notamment pour moduler le risque de maladies prévalentes (Pôjo, et al., 2021).

*Coelastrella* S3A, isolée d'une source thermale algérienne à haute température (63 °C), a démontré sa capacité à se développer en culture à une température plus basse (35 °C) que dans son habitat naturel. Cette flexibilité thermique est importante dans les procédures d'investigation car elle permet non seulement de rechercher la variabilité de la teneur en AG due aux facteurs environnementaux, mais également l'exploitation dynamique de ce constituant (Zili et al., 2015). Les microalgues se sont révélées être la matière première la plus prometteuse en termes de productivité de la biomasse, de teneur élevée en huile, de forte capacité d'adaptation aux environnements défavorables, de métaux lourds, de substances toxiques, de concentration élevée de CO<sub>2</sub> et d'absence de concurrence avec les terres cultivables (Chisti 2007). La forte demande en acides gras polyinsaturés, notamment les espèces oméga-3 à longue chaîne (eicosapentaénoïque,

docosahexaénoïque et  $\alpha$ -linoléique), est due à leur pertinence pour la santé humaine, avec de multiples fonctions neutralisantes et actions pharmacologiques (Maltsev et al., 2021).

Tenant en compte leur grande teneur en acides gras et de caroténoïdes, ainsi que leur croissance rapide et une forte résistance aux conditions stressantes, en font des espèces de genre *Coelastrella* des candidats potentiels pour la production à grande échelle des acides gras d'intérêt biotechnologique, des pigments naturels et de biocarburants (Wang et al., 2019). La biomasse de microalgues a été considérée comme une matière première alternative pour la production de biodiesel en raison de systèmes de culture simples, et du potentiel de répondre aux demandes actuelles mondiales en matière de biocarburants (Ghasemi Naghdi et al., 2016)

Le criblage des espèces de microalgues indigènes est nécessaire pour évaluer leur potentiel biotechnologique, en particulier dans les environnements extrêmes ; certaines de ces espèces peuvent être plus bénéfiques que les espèces exploitées dans le domaine commercial.

**Tableau 6.** Composition des acides gras de *Mastigocladus laminosus* (%).

Acides gras	<i>Mastigocladus laminosus</i> S.4.BB	<i>Mastigocladus laminosus</i> S4.B11	<i>Mastigocladus laminosus</i> S.9BB
<b>10:0</b>	0,12 ±0,07	0,03 ±0,03	0,00 ±0,00
<b>12:0</b>	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
<b>14:0</b>	1,17 ±0,09	0,99 ±0,12	1,38 ±0,18
<b>15:0</b>	0,18 ±0,03	0,15 ±0,03	0,30 ±0,13
<b>16:0</b>	53,16 ±0,30	51,41 ±0,26	52,71 ±2,46
<b>18:0</b>	3,44 ±0,64	2,98 ±0,26	4,40 ±0,42
<b>20:0</b>	0,13 ±0,02	0,18 ±0,04	0,19 ±0,01
<b>22:0</b>	0,16 ±0,05	0,17 ±0,00	0,26 ±0,01
<b>24:0</b>	0,06 ±0,01	0,00 ±0,00	0,12 ±0,00
<b>Totale AGS</b>	58,42 ±1,09	55,91 ±0,16	59,37 ±1,74
<b>14:1n-5</b>	0,04 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
<b>15:1n-5</b>	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
<b>16:1n-7</b>	7,11 ±0,37	3,46 ±0,18	7,25 ±0,78
<b>18:1n-9</b>	29,46 ±0,49	36,60 ±1,33	24,47 ±1,42
<b>18:1n-7</b>	4,14 ±0,46	3,44 ±0,77	6,66 ±2,00
<b>20:1n-9</b>	0,04 ±0,00	0,04 ±0,00	0,00 ±0,00
<b>22:1n-9</b>	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
<b>24:1n-9</b>	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
<b>Totale AGMI</b>	40,78 ±1,11	43,54 ±0,38	38,39 ±1,36
<b>18:2n-6</b>	0,69 ±0,07	0,32 ±0,05	1,76 ±0,28
<b>18:3n-6</b>	0,10 ±0,01	0,02 ±0,02	0,00 ±0,00
<b>20:2n-6</b>	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
<b>20:3n-6</b>	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,18 ±0,04
<b>20:4n-6</b>	0,02 ±0,01	0,10 ±0,10	0,00 ±0,00
<b>22:2n-6</b>	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
<b>22:4n-6</b>	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
<b>Total n-6 AGPI</b>	0,81 ±0,06	0,44 ±0,13	1,93 ±0,32
<b>18:3n-3</b>	0,05 ±0,01	0,04 ±0,01	0,21 ±0,05
<b>18:4n-3</b>	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
<b>20:3n-3</b>	0,00 ±0,00	0,04 ±0,04	0,00 ±0,00
<b>20:5n-3</b>	0,07 ±0,02	0,06 ±0,01	0,10 ±0,00
<b>22:5n-3</b>	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
<b>22:6n-3</b>	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
<b>Total n-3 AGPI</b>	0,11 ±0,02	0,13 ±0,06	0,31 ±0,05
<b>18:1 trans9</b>	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
<b>18:2 trans 9-12</b>	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
<b>Total</b>	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
<b>Totale AGPI</b>	0,92 ±0,08	0,57 ±0,19	2,25 ±0,37
<b>n-3/n-6</b>	0,13 ±0,01	0,30 ±0,04	0,16 ±0,00
<b>ARA/EPA</b>	0,63 ±0,27	1,61 ±1,61	0,00 ±0,00



### 5.2. Composition en acides gras des souches de *Mastigocladus laminosus*

La composition en AG des trois souches était équivalente et aucune variation significative n'a été détectée (Tableau 7). La teneur en AGS variait de 55,91 % à 59,37 %, avec des AGMI de 38,39 % à 43,54 %, et la teneur en AGPI variait de 0,57 % à 2,25 % (Tableau 7). Le profil FA des trois souches était dominé par 16:0 et 18:1n-9, trouvés à des valeurs élevées allant de 51,41 à 53,16% et 24,47% à 36,60%, respectivement, et par des valeurs modérément élevées de 18:0 et 18 :1n-7 allant de 2,98 % à 4,40 % et de 3,44 % à 6,66 %, respectivement. Les valeurs d'AGPI comme le 20:5n-3 (EPA) étaient relativement faibles, de 0,06 % à 0,10 % (Tableau 7).

Dans tous les cas, le palmitique (16:0) était l'AGS prédominant. L'acide oléique (18:1n-9) était l'AGPI prédominant et l'acide linoléique (18:2n-6) était l'AGPI le plus abondant (0,32-1,76%). Linoléique et arachidonique (ARA, 20:4n-6), avec des valeurs toujours inférieures à 0,10%, étaient présents dans toutes les souches et prédominaient parmi les n-6, tandis que l' $\alpha$ -linoléique (ALA, 18:3n-3) et eicosapentaénoïque (EPA, 20:5n-3) étaient prédominants parmi les acides n-3 (les valeurs allaient de 0,04 à 0,21 % et de 0,06 à 0,10 %, respectivement) (Tableau 7). L'acide docosahexaénoïque (DHA) n'a été détecté dans aucune souche.

Les souches de *M. laminosus* ont montré des profils FA intéressants et peut-être une nouvelle matière première potentielle prometteuse pour les biocarburants. Les compositions en AG des cyanobactéries thermophiles étaient relativement différentes de celles des cyanobactéries communes et d'autres souches de microalgues rapportées dans des études antérieures telles que les travaux d'Anahas et Muralitharan (2018), Oliveira et al. (2018), Gayathri et al. (2018) et Lu et al. (2020). *M. laminosus* montre une excellente tolérance à la dessiccation (Miller et al., 2007) et synthétise généralement des AG monoénoïques 14:0, 14:1, 16:0, 16:1, 16:2, 18:0 et 18:1 ( Murata et al., 1992 ; Los et Mironov, 2015).

Les souches isolées dans la présente étude avaient une forte proportion d'AGS et d'AGMI avec une longueur de chaîne moyenne de C14 à C20, qui sont les principaux constituants du biodiesel, ce qui les rend extrêmement précieuses pour la production de biodiesel (Sadvakasova et al. , 2019 ; Arif et al., 2019) car des proportions plus élevées d'AGMI et d'AGS sont favorisées dans les profils pétroliers (Ortiz-Martínez et al., 2019).

Les AGPI détectés dans toutes les souches étaient relativement faibles. De faibles valeurs d'AGPI suggèrent un carburant de haute qualité produit par ces espèces (Oliveira et al., 2018). De plus, la proportion d'AF contenant quatre doubles liaisons ou plus était bien inférieure à 0,5 % selon les normes biodiesel EN 14214 ; la concentration en AG contenant quatre doubles liaisons ne doit pas dépasser la limite de 1 % (tableau 2).

Dans tous les profils, le FA principal était l'acide palmitique (16:0), qui est typique de la plupart des carburants biodiesel de deuxième génération et garantit d'excellents paramètres de qualité du biodiesel (Oliveira et al., 2018) et était suivi par l'acide oléique (18:1n-9). Des valeurs élevées d'acide oléique suggèrent de meilleures propriétés pour le biodiesel algal résultant (Lee et al., 2014) et augmentent les valeurs de stabilité oxydative du biodiesel pour un meilleur stockage à long terme (Mutanda et al., 2011) (tableau 2). Les valeurs d'acide  $\alpha$ -linoléique (18:3n-3) variaient dans une fourchette étroite de 0,04 % à 0,21 %, ce qui est bien en deçà de la limite de 12 % fixée par les normes EN 14214. De même, des quantités minimales d'acides gras à longue chaîne (> C18) ont été détectées et étaient inférieures à 0,10 %. Il est bien connu que la teneur en lipides des cellules cyanobactériennes varie non seulement selon les espèces, mais aussi selon les milieux de croissance et la phase de croissance cellulaire (Cordeiro et al., 2017). La composition chimique du milieu de culture affecte la quantité de biomasse et sa composition lipidique ; ainsi, le contrôle de la composition chimique du milieu de culture est essentiel pour atteindre une production accrue de lipides (Sharafi et al., 2021), et donc le milieu de culture est essentiel pour une production accrue de lipides.

De plus, la proportion d'AG peut être modifiée et augmentée en fonction des objectifs biotechnologiques car les valeurs d'AG dans les algues sont influencées par les variations des conditions de croissance (Gonzalez-Silvera et al., 2017). La synthèse des lipides peut être améliorée par la privation de N<sub>2</sub>, entre autres facteurs de stress (Kumar et al., 2017), et les températures basses et élevées sont favorisées pour atteindre des niveaux de lipides élevés en fonction des souches : les taux d'insaturation dans les FA augmentent à basses températures, principalement les acides linoléique et  $\alpha$ -linoléique (Gonzalez-Silvera et al., 2017 ; Minhas et al., 2016), tandis que ceux des AG saturés totaux augmentent à haute température. Le niveau d'insaturation à basse température est élevé, principalement en raison d'une concentration en oxygène dissous plus élevée, permettant aux enzymes dépendantes de l'oxygène, appelées oméga-3 désaturases, d'être actives (Minhas et al.,

2016). Par conséquent, les valeurs de FA dans les cyanobactéries peuvent être modifiées et améliorées pour atteindre les objectifs biotechnologiques (Cordeiro et al., 2017 ; Sharafi et al., 2021).

De plus, la biomasse de cyanobactéries est une biomasse alternative appropriée pour la production d'énergie car elle est renouvelable et neutre en carbone. Par conséquent, un rendement élevé en biomasse a entraîné une récolte élevée d'acides gras (Fuad Hossain, 2020). Les trois espèces de *M. laminosus* ont présenté des rendements de biomasse largement plus hauts que d'autres espèces de *Mastigocladus* rapportées dans des études précédentes (Rezanka et al., 2012; Smith-Bädorf et al., 2013; Prihantini et al., 2021).

**Tableau 7.** Composition des acides gras de *C. thermophila* var. globulina (%).

Acides gras	<i>C. thermophila</i> var. globulina
14:0	0.40±0.03
15:0	1.39±0.08
16:0	21.45±0.08
18:0	2.88±0.03
20:0	0.44±0.02
22:0	0.27±0.01
24:0	0.19±0.01
Totale AGS	27.01±0.09
15:1n-5	0.12±0.01
16:1n-9	4.67±0.04
16:1n-7	0.71±0.02
18:1n-9 (oleic)	35.95±0.07
18:1n-7	3.04±0.05
20:1n-9	6.45±0.08
22:1n-9	0.08±0.01
24:1n-9	0.10±0.01
Totale AGMI	51.12±0.12
18:2n-6 (linoleic acid)	14.38±0.03
18:3n-6 (γ-linolenic)	0.96±0.02
20:3n-6	0.27±0.00
20:4n-6 (araquidonic)	0.13±0.01
Total n-6 AGPI	15.80±0.09
18:3n-3 (α-linolenic)	4.22±0.07
18:4n-3	1.16±0.02
22:5n-3	0.29±0.01
Totale n-3 AGPI	05.76±0.10
Totale AGPI	21.87±0.05

## 6. Propriétés du biodiesel des acides gras de souches de *Mastigocladus laminosus*

Afin d'avoir des propriétés physique de biodiesel adéquates, les proportions d'AGS et d'AGMI doivent être supérieures à l'AGPI. Dans cette étude, onze propriétés différentes du biodiesel ont été évaluées. Les résultats ont montré que presque tous les paramètres étaient en accord avec les normes internationales de biodiesel EN 14214 (Europe), ASTM D6751-02 (US). Les propriétés biodiesel des trois souches de cyanobactéries étudiées sont présentées dans le tableau 8, comparées à d'autres espèces végétales et microalgales.

Les valeurs OS, CN, IV et  $\nu$  sont conformes aux normes internationales requises recommandées par EN 14214 et ASTM D6751 (Tableau 8) (ASTM 6751, 2012 ; EN 14214, 2012). La sélection optimale des espèces de microalgues pour la production prospective de biodiesel nécessite des spécifications acceptables des EMAG car les paramètres du biodiesel sont principalement influencés par le profil FA (Zaki et al., 2021).

Le CN du biodiesel désigne l'intervalle de temps entre injection de carburant et l'ignition. Les valeurs de CN du biodiesel de cyanobactéries étudiées se situaient dans l'intervalle autorisé déterminée par les normes de biodiesel US ASTM D6751 ( $\geq 47$ ) et EN 14214 ( $\geq 51$ ) (tableau 3). Les valeurs de CN variaient de 65,0 à 65, ce qui est la même gamme que *Desmonostoc muscorum* MBDU 105 (CN = 65) mais étaient plus élevées que les valeurs présentées par les huiles végétales comme le tournesol et le soja. *Nostoc calcicola* MBDU 602 avait une valeur CN plus élevée (CN = 201) (Tableau 8).

Les valeurs de  $\rho$  prédites variaient dans une fourchette étroite de 834 à 802 (kg/m<sup>3</sup>) ; les valeurs de  $\rho$  pour les trois souches étaient légèrement inférieures aux normes de biodiesel fixées par la norme EN 14214 (860–900 kg/m<sup>-3</sup>).  $\rho$  est une spécification de carburant cruciale qui influence les performances du moteur (Arguelles et al., 2018) et les valeurs SV variaient de 195,8 à 202,2 mg/g. Les valeurs HHV et LCSF sont passées de 36,2 à 37,7 (MJ/kg) et de 6,5 à 7,4 (wt. %), respectivement.

Les valeurs d'OS des souches étudiées étaient significativement supérieures aux limites fixées par les deux normes biodiesel US ASTM D6751 ( $\geq 3$  h) et EN 14214 ( $\geq 8$  h). Les valeurs d'OS étaient également beaucoup plus élevées que toutes les valeurs d'OS du carburant dérivé des cyanobactéries et des plantes citées dans le tableau 3. Des valeurs élevées de CN et d'OS sont des avantages essentiels pour le stockage du biodiesel pendant de longues périodes (Karatay et Dönmez, 2011). Les valeurs de  $\nu$  prévues se situaient dans

les plages de viscosité de 1,9 à 6,0 mm<sup>2</sup>/sable de 3,5 à 5,0 mm<sup>2</sup>/s données par les normes de biodiesel US ASTM D6751 et EN 14214, respectivement ; cela peut entraîner une bonne combustion, des émissions plus faibles et une dilution réduite de l'huile (Knothe 2008; Arguelles et al., 2018).

Les valeurs SV et HHV étaient cohérentes avec les valeurs de microalgues rapportées dans des études antérieures comme la microalgue verte *Scenedesmus abundans* (Mandotra et al., 2014), *Nostoc spongiaeforme* 417 MBDU 704 et *Nostoc punctiforme* MBDU 621 (Gayathri et al., 2018) et avec les autres plantes et cyanobactéries citées dans le tableau 3. Les valeurs d'IV montrent que l'instauration totale dans une combinaison d'acides gras (Arguelles et al., 2018) était inférieure à la limite maximale fixée par les normes internationales EN 14214 ( $\leq -120\text{gI}2\ 100\text{g}^{-1}$  gras). Ni les normes américaines ASTM D6751 ni EN 14214 ne spécifient des valeurs pour les critères HHV, LCSF, SV et DU (Tableau 8). Une valeur IV élevée peut entraîner l'apparition et l'accumulation de glycérides et la précipitation de graisse dans le moteur (Arguelles et al., 2018).

CFPP indique les performances d'écoulement du biodiesel à basse température (Gayathri et al., 2018). Les valeurs CFPP pour les souches S4BB et S9BB étaient de 5,6 °C et 6,9 °C, respectivement, légèrement supérieures à la limite spécifiée par la norme Biodiesel EN 14214 ( $\leq 5/\leq -20$  °C) compte tenu du niveau élevé de SFA. Alors que la valeur CFPP pour la souche S4B11 a une valeur de 4,2 °C répondant aux valeurs des normes EN 14214 sur le biodiesel ( $\leq 5/\leq -20$ )). Les valeurs élevées de CFPP sont une caractéristique de la plupart des carburants produits par les espèces de microalgues. Cependant, des additifs ou le mélange de biodiesel avec du pétrodiesel peuvent être utilisés pour réduire les valeurs CFPP (Knothe, 2008).

Dans l'ensemble, les souches thermophiles de *Mastigochladus* étudiées avaient de meilleures propriétés de biodiesel, ou elles se situaient dans la même gamme que celles rapportées pour d'autres plantes ou matières premières de cyanobactéries. Les valeurs obtenues respectaient les propriétés de carburant requises par les normes internationales sur le biodiesel, ainsi que la dominance des AGS ; ces données associées aux paramètres évaluent la qualité du biodiesel, la production de la biomasse, sont favorables à la production de biodiesel de haute qualité (Oliveira et al., 2018). Ces résultats indiquent le grand potentiel de production de lipides par ces espèces de cyanobactéries thermophiles algérienne, et avec de futures modifications génétiques et des études expérimentales

supplémentaires, ces micro-organismes pourraient représenter des substituts potentiels aux sources actuelles de production de biodiesel.

La sélection de souches appropriées de microalgues qui fonctionnent bien dans les conditions locales est importante pour établir une production à base d'algues système (Alshareef, 2021). Les efforts de caractérisation des algues provenant d'environnements uniques devraient se poursuivre à la fois pour des objectifs de conservation de la biodiversité et de biotechnologie (Hu et al., 2008), en isolant les microalgues à haute productivité et à composition lipidique intéressante d'habitats spécifiques et extrêmes et en optimisant leurs conditions de croissance pour générer des biomasses élevées pour la production de biodiesel (Lee et al., 2014 ; Arif et al., 2019) ou d'autres composés potentiellement intéressants. Ce travail, il s'agit du premier rapport indiquant les propriétés du carburant biodiesel telles que SV, IV DU, CFPP, LCSF, CP et PP de *Mastigocladus laminosus* en conformité avec les normes internationales.

### **7. Évaluation de l'activité antimicrobienne des extraits de *Coelastrella thermophila* et des variétés de *Mastigocladus laminosus***

Les activités antimicrobiennes des extraits organiques de *Coelastrella thermophila* et des variétés de *Mastigocladus laminosus* isolées des sources thermale algérienne ont été évalués la méthode de diffusion par disque contre trois bactéries pathogènes (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, et *Pseudomonas aeruginosa*) et une levure (*Candida albicans*). L'étude expérimentale a révélé que les extraits organiques des microalgues n'ont montré aucune activité remarquable contre les agents pathogènes testés. Une telle réponse inhabituelle pourrait être attribuée au masquage d'activité antimicrobienne par la présence de certains composés inhibiteurs dans les extraits. En plus La nature du solvant et la méthode d'extraction influent directement sur la composition des extraits et par conséquent sur leur activité antimicrobienne (Sastry et Rao., 1994).

**Tableau 8.** Propriétés prédites du biodiesel à partir des profils d'AG de *Mastigocladus laminosus* (Boutarfa et al., 2022).

Espèces des microalgues	Spécifications de Biodiesel ASTM D6751-02	Spécifications Biodiesel EN 14214	<i>Mastigocladus laminosus</i> S.4.BB Cette étude	<i>Mastigocladus laminosus</i> S4.B11 cette étude	<i>Mastigocladus laminosus</i> S.9BB Cette étude	<i>Nostoc calcicola MBDU 602</i> (Anahas and Muralitharan, 2015)	<i>Desmonostoc muscorum MBDU 105</i> (Anahas and Muralitharan, 2015)	<i>Myxosarcina sp.</i> (Jawaharraja et al., 2015)	Soja	Tournesol
Composition en AG	/	/	AGS 58.070 AGMI 36.610 AGPI 0.790	AGS 55.470 AGMI 40.100 AGPI 0.340	AGS 58.790 AGMI 31.720 AGPI 1.760	AGS 61.78 AGMI 6.46 AGPI 5.56	AGS 66.30 AGMI 8.25 AGPI 13.62	AGS 39 ± 5.3 AGMI 61 ± 5 AGPI 0	AGS 16.346 AGMI 24.918 AGPI 58.668 (Yaşar, 2020)	AGS10.14 AGMI 36.37 AGPI 53.33 (Yaşar, 2020)
IV (gI <sub>2</sub> 100g <sup>-1</sup> fat)	/	≤120	35.146	37.034	32.431	23.73	40.36	56 ± 5	69.82 Demirbas,2003	132.32 Demirbas,2003
CN	≥ 47	≥ 51	65.378	65.019	66.873	201.50	65.39	60 ± 0.2	38.1 Demirbas,2003	50 (Yaşar, 2020)
OS (hrs)	≥ 6	≥ 6	151.868	349.442	69.596	7.09	6.40	/	1.5 (Yaşar, 2020)	0.9 (Yaşar, 2020)
DU (wt. %)	/	/	38.190	40.780	35.240	17.59	35.50	61± 5	142.25 (Yaşar, 2020)	143.02 (Yaşar, 2020)
SV (mg/g)	/	/	202.252	201.766	195.839	68.04	193.73	210 ± 3	220.78 Demirbas,2003	34.4 Demirbas,2003
ν (mm <sup>2</sup> /s)	1.9–6.0	3.5–5.0	3.628	3.695	3.469	2.15	3.96	-1.5 ± 0	4.37 (Yaşar, 2020)	4.30 (Yaşar, 2020)
ρ (g/cm <sup>3</sup> )	0.86–0.90	0.86–0.90	0.830	0.834	0.802	0.88	0.87	1.1 ± 0	0.882 (Yaşar, 2020)	0.882 (Yaşar, 2020)
LCSF (wt. %)	/	/	7.036	6.586	7.471	58.36	22.71	6 ± 1	3.73 (Yaşar, 2020)	3.23 (Yaşar, 2020)
CFPP (°C)	/	≤5/-20	5.628	4.214	6.995	166.89	54.89	2 ± 2	-6 (Yaşar, 2020)	-4 (Yaşar, 2020)
HHV (MJ kg <sup>-1</sup> )	Report	Report	37.538	37.751	36.272	40.81	40.88	35 ± 0	39.6 Demirbas,2003	39.6 Demirbas,2003





# **Conclusion et perspectives**

### Conclusion et perspectives

Les algues microscopiques sont des micro-organismes qui ont des traits morphologiques, physiologiques et génétiques différents qui confèrent la capacité de produire différents métabolites biologiquement actifs. La biotechnologie des microalgues est devenue un objet d'étude pour divers domaines, en raison des bioproduits variés qui peuvent être obtenus à partir de ces micro-organismes. Les algues microscopiques ont été ces dernières années le centre d'une attention croissante dans les domaines des biotechnologies pour une part la production de biocarburants renouvelables plus propres est du plus grand intérêt à base de lipides et d'acides gras polyinsaturés (AGPI) et d'autres part l'utilisation thérapeutiques et nutritionnelles de leurs métabolites y inclus les AG.

Récemment, les algues microscopiques thermophiles ont été exploitées de manière lucrative dans divers domaines de recherche et de développement, notamment l'agriculture, l'industrie pharmaceutique, la bioremédiation et la production de biocarburants. Néanmoins, d'autres investigations sont nécessaires pour l'amélioration de ces recherches. En utilisant des nouveaux outils et des techniques de biotechnologie afin d'obtenir des produits de haute qualité.

L'Algérie compte plus de 240 sources thermales, principalement situées dans la zone nord-est, avec des caractéristiques physiques et chimiques variables. Le présent travail a été mené dans le cadre d'une étude de la biodiversité des microalgues thermophiles des sources thermales algériennes, où la grande diversité des microalgues reste encore totalement inexplorée. Nous concentrons sur les futures applications biotechnologiques.

Nous avons pu isoler et identifier 29 espèces des algues microscopiques par microscopie au niveau du genre voire espèce. Quatre isolats de microalgues cultivés ont été sélectionnés pour une caractérisation et une exploration plus approfondie de leurs potentialités biotechnologiques. La caractérisation par microscopie et par des tests de biologie moléculaire de ces isolats nous a permis d'identifier les quatre espèces de microalgues comme étant : une algue verte *Coelastrella thermophila* var. *Globulina* et trois souches de *M. laminosus*.

Les résultats de la caractérisation biochimique de profil Id'AG témoignent aussi du potentiel des quatre espèces isolées comme sources d'acides gras d'intérêt biotechnologique particulièrement pour les AGPI. L'espèce *Coelastrella thermophila* var. *Globulina* isolé contient des AG essentiels à haute valeur commerciale, tels que oméga-3 et oméga-6, entre

autres, et présente un profil d'AG intéressant pour la biotechnologie algale à des températures plus élevées, notamment en tant que complément alimentaire. Cette algue verte présente également un profil d'AG approprié avec des valeurs élevées d'AG saturés et d'AG mono-insaturés, et les principaux AG trouvés étaient des AG avec 16 à 20 atomes de carbone, qui peuvent être utilisés efficacement comme matière première pour la production de biodiesel. Notre travail, constitue le premier isolement d'une espèce de genre *Coelastrella* à partir de sources thermale dans le monde entier

Les espèces de *M. laminosus* ont montré une composition d'AG intéressante; pouvant représenter une source d'AG essentiels d'intérêt commercial. Ils présentent un profil AG adéquat avec une proportion élevée d'AGS et d'AGMI avec des valeurs allant de 55,91 % à 59,37 % et de 38,39 % à 43,54 %, respectivement. Le principal acide gras était l'acide palmitique (16:0), avec des valeurs comprises entre 51,41 et 53,16 %, aussi les AG détectés se caractérisent des chaînes avec 14 à 20 atomes de carbone ; représentant une excellente matière première pour la production de biodiesel. Les propriétés calculées du biocarburant basées sur la composition en acides gras, principalement l'indice d'iode (IV, 35,00 gI<sub>2</sub>/100g de matière grasse), l'indice de saponification (SV, 202,20 mg/g), l'indice de cétane (CN, 65,00) et le degré d'insaturation (DU, 38,10 wt. %) étaient conformes aux normes internationales ASTM D6751 (USA) et EN 14214.

La caractérisation des algues provenant d'environnements uniques devraient se poursuivre pour une part explorer et conserver la biodiversité de ces habitats et d'autre part pour des objectifs biotechnologiques ; en isolant des microalgues avec haute productivité et une composition lipidique intéressante des habitats spécifiques extrêmes et l'optimisation de leurs conditions de croissance pour générer un rendement élevé de la biomasse afin de produire de biodiesel ou d'autres composés potentiellement intéressants.

Ce travail, de bioprospection des microalgues des sources thermales constitue une recherche originale, qui représente le premier rapport révélant la diversité des microalgues eucaryotes y compris les chlorophycées et les diatomées dans les sources thermales algériennes. Les résultats obtenus sont prometteurs et encourageants. Des études plus approfondie sur la biodiversité des sources thermales en Algérie et ailleurs sont fortement recommandées pour fournir des données permettant de sélectionner des souches de microalgues ayant une composition biochimique intéressante et des applications biotechnologiques potentielles.

Dans des travaux futurs, nous essayerons :

-d'étaler le travail pour la caractérisation des espèces isolées et cultivées par les outils de la biologie moléculaire.

-D'étudier avec plus de précision le profil lipidique des souches isolées;

- L'optimisation du rendement de la biomasse algale et des lipides, par le choix des conditions de croissance convenable pour chaque souche isolée et cultivée.

-L'identification des souches potentiellement valorisables dans la production de métabolites de haute valeur biotechnologiques etc...

# **Références bibliographiques**

- Abdelwahab, H.E.M., Amin, A.S. 2017. Diatoms Diversity of Thermal Springs in the Southwest Region, Saudi Arabia. Egypt. Acad. J. Biolog. Sci. 8(2), 59–74.
- Abe, K., Hattori, H., Hirano, M. 2007. Accumulation and antioxidant activity of secondary carotenoids in the aerial microalga *Coelastrella striolata* var. *multistriata*. Food Chem. 100, 656–661.
- Aboal, M., González-Silvera, D., Roldán, M., Hernández-Mariné, M., López-Jiménez, J.Á., Whitton, B.A. 2014. The freshwater alga *Chrootheca richteriana* (Rhodophyta) as a potential source of lipids. Food Chem. 162, 143-8.
- Abou-Shanab, R.A.I., Hwang, J.H., Yunchul, C., Booki, M., Jeon, HunB. 2011. "Characterization of microalgal species isolated from fresh water bodies as a potential source for biodiesel production," Applied Energy. 88. 3300-3306.
- Aguilera, A., Souza-Egipsy, V., Amils, R. 2012. Photosynthesis in Extreme Environments. In *Artificial Photosynthesis*, 1<sup>st</sup> ed.; Najafpour, M.M., Eds.; InTech Rijeka, Croatia. pp 271-288.
- Alain, K., Marteinsson, V.T., Miroshnichenko, M.L., Bonch-Osmolovskaya, E.A., Prieur, D., Birrien, J.L. 2002. *Marinitoga piezophila* sp. nov., a rod-shaped, thermo-piezophilic bacterium isolated under high hydrostatic pressure from a deep-sea hydrothermal vent. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 52, 1331–1339.
- Alcamán, M.E., Fernández, C., Delgado, A., Bergman, B., Díez, B. 2015. The cyanobacterium *Mastigocladus* fulfills the nitrogen demand of a terrestrial hot spring microbial mat. ISME J. 9, 2290–2303.
- Alcorta, J., Vergara-Barros, P., Antonaru, L.A. Alcamán-Arias, M. E., D.J. Nürnberg., Díez, B et al., 2019. *Fischerella thermalis*: a model organism to study thermophilic diazotrophy, photosynthesis and multicellularity in cyanobacteria. Extremophiles. 23, 635–647.
- Alsenani, F., Tupally, K.R., Chua, E.T., Eltanahy, E., Alsufyani, H., Parekh, H. S., & Schenk, P. M. 2020. Evaluation of microalgae and cyanobacteria as potential sources of antimicrobial compounds. Saudi Pharm J. 28(12), 1834-1841.

- Alshareef, M. 2021. Identification and Growth Characterization of Native Microalgae Isolated from Different Environments of Saudi Arabia. *Biosci. Biotechnol. Res. Commun.*14(3), 1065-1076.
- Alverson, A. J., Jansen, R. K., Theriot, E. C. 2007. Bridging the Rubicon: Phylogenetic analysis reveals repeated colonizations of marine and fresh waters by thalassiosiroid diatoms. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 45(1), 193-210.
- Amarouche-Yala, S, Benouadah, A.E.O., Bentabet, A., López-García, P. 2014. Morphological and phylogenetic diversity of thermophilic cyanobacteria in Algerian hot springs. *Extremophiles*.18, 1035-1047.
- Amirouch, N., Bouguedoura N., Hadj-Arab, H. 2009. *Botanique*. Houma édition Alger. pp 17.
- Anahas, A.M.P., Muralitharan, G. 2018. Characterization of heterocystous cyanobacterial strains for biodiesel production based on fatty acid content analysis and hydrocarbon production. *Ener Conver Manag.* 157, 423-437.
- Ananya, A. K., Ahmad, I. Z. 2014. Cyanobacteria "the blue green algae" and its novel applications: A brief review, *Int. J. Innov. Appl. Stud.* 7, 251-261.
- Andersen, R.A. 2005. *Algal Culturing Techniques*, Elsevier Academic Press, Burlington, Massachusetts.
- Arif, M, Bai, Y., Usman, M., Jalalah, M., Harraz, F.A., Al-Assiri, M.S, Li, X., Salama, E.S., Zhang, C. 2019. Highest accumulated microalgal lipids (polar and non-polar) for biodiesel production with advanced wastewater treatment: Role of lipidomics. *Bioresour Technol.* 298, 122299.
- ASTM - American society for testing and materials, D6751. 2012. Standard specification for biodiesel fuel blend stock (B100) for middle distillate fuels.
- Avalos, J., Carmen Limón, M. 2015. Biological roles of fungal carotenoids. *Curr Genet.* 61, 309–324.
- Ayehunie, S., Belay A., Baba, T W., Ruprecht, R M. 1998 . Inhibition of HIV- 1 replication by an aqueous extract of *Spirulina platensis*. *J Aquir Immun Defic Syndr Hum Retrovirol* . 18, 7-12.

- Bauman, A. J., Simmonds, P. G. 1969. Fatty Acids and Polar Lipids of Extremely Thermophilic Filamentous Bacterial Masses from Two Yellowstone Hot Springs. *Journal of Bacteriology*, 98(2), 528-531.
- Bahri, F., Saibi, H. 2011. Cherchali M-El-Hocine. Characterization, classification, and determination of drinkability of some Algerian thermal waters. *Arab J Geosci.* 4, 207 –219.
- Barsanti, L., Gualtieri, P. 2007. *Algae Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology*. *J. Phycol.* 43, 412–414.
- Barsanti, L., Gualtieri, P. 2014. *Algae Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology*. 2nd Edition, CRC Press. Boca Raton, USA. pp 320.
- Bauer, A.W., Kirby, W.M.M., Sherris, J.C., Turck, M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.* 45, 493–496.
- Becker, W. 2003. Microalgae in Human and Animal Nutrition. In *Handbook of Microalgal Culture*; John Wiley & Sons: Hoboken, NJ, USA. pp 312–351.
- Belhai, M., Fujimitsu, Y., Nishijima, J., Bersi, M. 2017. Hydrochemistry and gas geochemistry of the northeastern Algerian geothermal waters. *Arab J Geosci.* 10,743.
- Belghit, I., Rasinger, J.D., Heesch S., Biancarosa I., Liland N., Torstensen B., Waagbø R., Lock. Bellinger, E., SIGEE D. 2010. *Freshwater Algae (Identification and Use as Bioindicator)*. 1st edition. Wiley-Blackwell (John Wiley and Sons, Ltd). UK. pp 271.
- Benamara, A., Kherici-Bousnoubra, H., Bouabdallah, F. 2017. Thermo-mineral waters of Hammam Meskoutine (north-east Algeria): composition and origin of mineralization. *J Water Land Dev.* 34, 47–57.
- Berkani, C., Houha, B. 2017. Physico-Chemical and therapeutic characteristics of the thermo-mineralwaters of Khenchela region (Northeastern Algeria). *JMES.* 8, 1546-1553.
- Bhattacharjee, M. 2016. Pharmaceutically valuable bioactive compounds of algae. *Asian J Pharm Clin Res.* 9, 43-47.



- Borowitzka, M A., Borowitzka, L J. 1987. Vitamins and Fine Chemicals from Micro-Algae. In M.A. Borowitzka, and L.J. Borowitzka (Eds) Micro-Algal, Biotechnology, New York. Cambridge University Press.
- Bouaicha, F., Dib, H., Bouteraa, O. Manchar N., Boufaa, K., Chabour, N., Demdoun, A. 2019. Geochemical assessment, mixing behavior and environmental impact of thermal waters in the Guelma geothermal system, Algeria. *Acta Geochim.* 38, 683–702.
- Boutarfa, S., Senoussi, M.M., Gonzalez-Silvera, D., López-Jiménez, J.Á., Aboal, M. 2022. The Green Microalga *Coelastrella thermophila* var. *globulina* (Scenedesmaceae, Chlorophyta) Isolated from an Algerian Hot Spring as a Potential Source of Fatty Acids. *Life*, 12(4), 560.
- Cantin, I. 2010. La production biodiesel à partir des Microalgues ayant un métabolisme hétérotrophe. These en environnement. Université de Sherbrooke. pp 87.
- Cantonati, M., Lange-Bertalot, H. 2010. Diatom biodiversity of springs in the Berchtesgaden National Park (north-eastern Alps, Germany), with the ecological and morphological characterization of two species new to science. *Diatom Research.* 25(2), 251–280.
- Cardozo, K.H.M ., Guaratini, T., Barros, M O., Falcao, V R., Tomon, A P. 2007. Metabolites form algae with economically impact. *Comp Biochem Physiol Part C.* 146, 60-78.
- Castenholz, R.W. 1969. Thermophilic blue-green algae and the thermal environment. *Bacteriol Rev.*33, 476-504.
- Castenholz, R.W. 1976. The effect of sulfide on the blue-green algae of hot springs. I. New Zealand and Iceland. *J. Phycol.* 12, 54–68.
- Castenholz, R.W. 1996. Endemism and biodiversity of thermophilic cyanobacteria. *Nova Hedwigia Beih*, 112, 33–47.
- Chenaker, H., Houha, H., Vincent, V. 2018. Hydrogeochemistry and geothermometry of thermal water from northeastern Algeria. *Geothermics.* 75, 137–145.
- Chen, G.-Q., Jiang, X.-R. 2018. Next generation industrial biotechnology based on extremophilic bacteria. *Current Opinion in Biotechnology*, 50, 94-100.

- Chisti, Y. 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances* 25, 294–306.
- Christie, W. W. 2003. *Lipid analysis in Isolation, separation, identification and structural analysis of lipids*, 3rd ed. Bridgewater, England.
- Chodat, R. 1922. Matériaux pour l'histoire des algues de la Suisse. *Bull Soc Bot Geneve Sér.* 2, 66–114.
- Cooperstone, J.L., Ralston, R.A., Riedl, K.M., Haufe, T.C., Schweiggert, R.M., King, S.A., Timmers, C.D., Francis, D.M., Lesinski, G.B., Clinton, S.K. 2015. Enhanced bioavailability of lycopene when consumed as cis-isomers from tangerine compared to red tomato juice, a randomized, cross-over clinical trial. *Mol. Nutr. Food Res.* 59(4), 658-69.
- Cordeiro, R.S, Vaz, I.C.D., Magalhães S.M.S., Barbosa, F.A.R. 2017. Effects of nutritional conditions on lipid production by cyanobacteria. *An Acad Bras Cienc.*89, 2021-2031.
- Covarrubias, Y., Cantoral-Uriza, E. A., Casas-Flores, J. S., García-Meza, J. V. 2016. Thermophile mats of microalgae growing on the woody structure of a cooling tower of a thermoelectric power plant in Central Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 87(2), 277-287.
- Chu, W.-L. 2012. Biotechnological applications of microalgae. *IeJSME*. 6 (Suppl 1), S24-S37.
- D'Alessandroa, E.B., Soaresa, A.T., da Costaa, D. C., Netoa, H.d.A.S., Fernandesb, V.d.O., Filho, N.R.A. 2018. A thermal water microalga: *Eutetramorus planctonicus* as a promising source of fatty acids and lutein. *J. Environ. Chem. Eng.* 6, 6707–6713.
- Demirbaş, A. 2003. Chemical and Fuel Properties of Seventeen Vegetable Oils. *Energy Sources*, 25,721–728.
- De Moraes, M.G., Vaz, B.D.S., Moraes, E.G.D., Costa, J.A.V. 2015. Biologically active metabolites synthesized by microalgae. *Biomed. Res. Int.*, 1–15
- Dejoye, 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 .pp 177.

- Delgado, J.G. 2007. Euglenophyta from lower Basin of the Caura river, Venezuela. *Acta bot. Venez.* vol. 30 (2), 277-290.
- Dey, B., Lerner, D L., Lusso, P., Boyd, M R., Elder, J H. 2000. Multiple antiviral activities of cyanovirin-N: blocking of human immunodeficiency virus Type 1 gp120 interaction with CD4 and coreceptor and inhibition of diverse enveloped viruses. *J Virol* . 74, 4562-4569.
- Doyle, J. J., Doyle, J. L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*.19, 11-15.
- Dimitrova, P., Marinova, G., Alexandrov, S., Iliev, I., Pilarski, P. 2017. Biochemical characteristics of a newly isolated strain *Coelastrella* sp. BGV cultivated at different temperatures and light intensities. *Annuaire de l'Université de Sofia "St. Kliment Ohridski" Faculte de Biologie*. 102, 139–114.
- Edgar, R. C. 2004. MUSCLE : A multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics*. 5(1), 113.
- EN 14214—European committee for standardization. 2012. Automotive fuels—fatty acid methyl esters (FAME) for diesel engines—requirements and test methods.
- Faller, H. 2011. Les applications et la toxicite des algues marines. Thèse de doctorat en pharmacies. Université de Limoges, France. pp 131.
- Farineau, J., Morot-Gaudry, J.-F. 2018. La photosynthèse ; processus physiques, moléculaires et physiologiques. *QUAE eds*. pp 451.
- Fazlutdinova, A., Gabidullin, Y., Allaguvatova, R., Gaysina, L., 2020, Diatoms in Kamchatka's Hot Spring Soils. *Diversity*. 12, 435. <https://doi.org/10.3390/d12110435>.
- Fazlutdinova, A., Gabidullin, Y., Allaguvatova, R., Gaysina, L., 2021. Diatoms in Volcanic Soils of Mutnovsky and Gorely Volcanoes (Kamchatka Peninsula, Russia). *Microorganisms*. 9, 1851.
- Finsinger, K., Scholz, I., Serrano, A., Morales, S., Uribe-Lorio, L., Mora, M., Sittenfeld, A., Weckesser, J., Hess, W.R. 2008. Characterization of true-branching cyanobacteria from geothermal sites and hot springs of Costa Rica. *Environ Microbiol*. 10, 460-473.

- Folch, J., Lee, M., Stanley, G.A. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem.* 226, 497–509.
- Fleurence, J. 2003. *Les microalgues de l'aliment du futur à l'usine cellulaire.* Édition Ltd 27-37StGeorge, London, pp 177.
- Fuad Hossain, M.d., Ratnayake, R.R., Mahbub, S., Wasantha Kumara K.L., Magana-Arachchi, D.N. 2020. Identification and culturing of cyanobacteria isolated from freshwater bodies of Sri Lanka for biodiesel production. *Saudi J. Biol. Sci.* 27, 1514–1520.
- Fütterer, O., Angelov, A., Liesegang, H., Gottschalk, G., Schleper, C., Schepers, B. 2004. Genome sequence of *Picrophilus torridus* and its implications for life around pH 0. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 9091–9096.
- Garon-L, S. 2004. Etude structurale des polysaccharides pariétaux de l'algue rouge *asparagopsis armata* (Bonnemaisoniales). Thèse de doctorat en chimie. Université de Bretagne. pp 226.
- Gartner, G., Stoyneva-Gartner, M., Uzunov, B. 2021. Algal Toxic Compounds and Their Aeroterrestrial, Airborne and other Extremophilic Producers with Attention to Soil and Plant Contamination: A Review. *Toxins.* 13, 322.
- Ghasemi Naghdi, F., González González, L. M., Chan, W., Schenk, P. M. 2016. Progress on lipid extraction from wet algal biomass for biodiesel production. *Microb. Biotechnol.* 9(6), 718-726.
- Gayathri, M., Shunmugam, S., Mugasundari, A.V., Rahman, P.K.S.M., Muralitharan, G. 2018. Growth kinetic and fuel quality parameters as selective criterion for screening biodiesel producing cyanobacterial strains. *Bioresour Technol.* 247, 453–462.
- Giorgio, A., Carraturo, F., Aliberti, F., De Bonis, S., Libralato, G., Morra, M., Guida, M. 2018. Characterization of microflora composition and antimicrobial activity of algal extracts from Italian thermal muds. *J Nat Sc Biol Med.* 9, 150-8.
- Giuseppina, G., Bachisio, L., Padedda, M., Wetzel, C.E., Cantonati, M., Sechi, N., Lugliè, A., Ector, L. 2019. Diatom assemblages from different substrates of the Casteldoria thermo-mineral spring (Northern Sardinia, Italy). *Bot. Lett.* 166 (1), 14-31.

- Glenn B. McGregor, J. Paul Rasmussen. 2008. Cyanobacterial composition of microbial mats from an Australian thermal spring: a polyphasic evaluation, *FEMS Microbiology Ecology*. 63 (1), 23–35.
- Goecke, F., Noda, J., Paliocha, M., & Gislerød, H. R. 2020. Revision of *Coelastrella* (Scenedesmaceae, Chlorophyta) and first register of this green coccoid microalga for continental Norway. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 36(10), 149.
- Gonzalez-Silvera, D, Pérez, S., Korbee, N., Figueroa, F.L., Asencio, A.D., Aboal, M., López-Jiménez, J.A. 2017. Effects of global change factors on fatty acids and mycosporine-like amino acid production in *Chroothoece richteriana* (Rhodophyta). *J. Phycol.* 53, 999-1009.
- Ghozzi, K., Zenzem, M., Dhiab, R.B, Chalouf, R., Yahia, A., Omrane, H., Ouada, H.B. 2013. Screening of thermophilic microalgae and cyanobacteria from Tunisian geothermal sources. *J Arid Environments*. 97, 14-17.
- Hall, B. G. 2013. Building phylogenetic trees from molecular data with MEGA. *Molecular Biology and Evolution*, 30(5), 1229-1235.
- Hamedi, C. 2019. Caractérisation génétique, physiologique, biochimique et biodiversité des diatomées. Thèse de doctorat. Biotechnologie des organismes aquatiques. Université d'Oran.-Algerie.
- Hayashi, K., Hayashi, T., Kojima, I. 1994. A natural sulfated polysaccharide, calcium spirulan, isolated from *Spirulina platensis* in vitro and ex vivo evaluation of anti-herpes simplex virus and anti-human immunodeficiency virus activities. *AIDS Res Hum Retrovir.* 12, 1463-1471.
- Heldt, H-W., Piechulla, B. 2011. The use of energy from sunlight by photosynthesis is the basis of life on earth. In *Plant Biochemistry (Fourth Edition)*. pp 43-64.
- Hermanson, G.T. 2013. (Strept) avidin– Biotin Systems. In *Bioconjugate Techniques*. 3rd Edition. Pierce Biotechnology, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL. pp 465-505.
- Hobel, C.F.V. 2004. Access to biodiversity and new genes from thermophiles by special enrichment methods. Thèse de doctorat. Faculté des Sciences. Reykjavik. Iceland.p83.

- Hofmann, G., Werum, M., Lange-Bertalot, H. 2013. Diatomeen im Süßwasser – Benthos von Mitteleuropa. Bestimmungsflora Kieselalgen für die ökologische Praxis. Über 700 der häufigsten Arten und ihre Ökologie. Koeltz Scientific Books, Königstein. 908 pp.
- Holman, B.W.B., Kashani, A., Malau-Aduli, A.E.O. 2012. Growth and body conformation responses of genetically divergent Australian sheep to *Spirulina* (*Arthrospira platensis*) supplementation. *Am. J. Exp. Agric.* 2, 160–173.
- Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M., Darzins, A. 2008. Microalgal triacylglycerols as feed stocks for biofuel production: perspectives and advances. *J Plant.* 54, 621-639.
- Hu, C.-W., Chuang, L.-T., Yu, P.-C., Nathan Chen, C.-N. 2013. Pigment production by a new thermotolerant microalga *Coelastrella* sp. F50. *Food Chem.* 138, 2071–2078.
- Huleihel, M., Ishamu, V., Tal, J., Arad, S M. 2001. Antiviral effect of red microalgal polysaccharides on Herpes simplex and Varicella zoster viruses. *J Appl Phycol.* 13, 127-134.
- Jawaharraja, K., Karpagam, R., Ashokkumar, B., Kathiresan, S., Varalakshmi, P. 2015. Green renewable energy production from *Myxosarcina* sp: media optimization and assessment of biodiesel fuel properties. *RSC Adv.* 5, 51149–51157.
- Jones, B., Renaut R.W. 2011. Hot Springs and Geysers. In: Reitner J., Thiel V. (eds) *Encyclopedia of Geobiology. Encyclopedia of Earth Sciences Series.* Springer, Dordrecht.
- Jonker, C.Z., Van Ginkel, C., Olivier, J. 2013. Association between physical and geochemical characteristics of thermal springs and algal diversity in Limpopo Province, South Africa. *Water S.A.* 39, 95-104.
- Kaiwan-arporn, P., Hai, P.D., Thu, N.T., Annachatre, A. P. 2012. Cultivation of cyanobacteria for extraction of lipids. *Biomass Bioenergy.* 44, 142-149.
- Kastovsky, J., Johansen, J.R. 2008. *Mastigocladus laminosus* (Stigonematales, Cyanobacteria): phylogenetic relationship of strains from thermal springs to soil-inhabiting genera of the order and taxonomic implications for the genus. *Phycologia.* 47, 307–320.

- Kitade, Y., Miyabe, Y., Yamamoto, Y., Takeda, H., Shimizu, T., Yasui, H., Kishimura, H. 2018. Structural characteristics of phycobiliproteins from red alga *Mazzaella japonica*. *J. Food Biochem.* 42, (1), e12436.
- Knothe, G. 2008. Designer' biodiesel: Optimizing fatty ester composition to improve fuel properties. *Energy Fuels.* 22, 1358-1364.
- Knothe, G. 2011. Technical evaluation of biodiesel from vegetable oils vs. algae. Will algae-derived biodiesel perform? *Green Chem.* 13, 3048-3065.
- Komárek, J. 2013. Cyanoprokaryota: 3rd Part: Heterocystous Genera, In Büdel B, Gärtner G, Krienitz L, Schagerl M (Eds.), Süßwasserflora von Mitteleuropa. Springer Spektrum., Berlin, Heidelberg, Germany, pp. 1-1130.
- Kumar, R., Biswas, K., Singh, P.K, Singh, P.K, Elumalai, S., Shukla, P., Pabbi, S. 2017 Lipid production and molecular dynamics simulation for regulation of *accD* gene in cyanobacteria under different N and P regimes. *Biotechnol Biofuels.* 10, 94.
- Kumar R. B., Deviram, G., Mathimani, T., Duc, P. A., Pugazhendhi, A. 2019. Microalgae as rich source of polyunsaturated fatty acids. *Biocatal. Agric. Biotechnol.*17, 583-588.
- Lai G.G., Beauger, A., Wetzell, C.E., Padedda, B. M., Voldoire, O', Lugliè' A, Allain, E, Ector, L. 2019. Diversity, ecology and distribution of benthic diatoms in thermo-mineral springs in Auvergne (France) and Sardinia (Italy). *PeerJ.*7, e7238.
- Lange-Bertalot, H., Båk, M., Witkowski, A. 2011. Eunotia and some related genera. [In:] *Diatoms of Europe. Diatoms of the European inland water and comparable habitats.* Vol. 6 H. Lange-Bertalot (Ed.), A.R.G. Gantner Verlag K.G., Ruggell.
- Lange-Bertalot, H., Hofmann, Werum , M., Cantonati, M. 2017. Freshwater benthic diatoms of Central Europe: over 800 common species used in ecological assessments. English edition with updated taxonomy and added species. [In:] M. Cantonati et al. (Eds), Koeltz Botanical Books, Schmitten-Oberreifenberg.
- Lee, K., Eisterhold, M.L., Rindi, F., Palanisami, S., Nam, PK. 2014. Isolation and screening of microalgae from natural habitats in the midwestern United States of America for biomass and biodiesel sources. *J Nat Sci Biol Med.* 5, 333-339.

- Leira, M., Mejjide-Failde, R., Torres, E., 2017. Diatom communities in thermo-mineral springs of Galicia (NW Spain), *Diatom Research*. 32(1), 29-42.
- Liu J, Vanormelingen P, Vyverman W. 2016. Fatty acid profiles of four filamentous green algae under varying culture conditions. *Bioresour Technol*.200:1080-4.
- Lurling, M. 2003. Phenotypic plasticity in the green algae *Desmodesmus* and *Scenedesmus* with special reference to the induction of defensive morphology. *Ann Limnol* 39.
- López-Sandoval, Ó., Montejano, G., Carmona, J., Cantoral, E., Becerra-Absalón, I., 2016. Diversidad algal de un ambiente extremo: el manantial geotermal Los Hervideros, México. *Rev Mex Biodivers*. 87(1), 1-9
- Lu, Y., Zhuoa, C., Lib, Y., Lia, H., Yanga, M., Xua, D., He, H. 2020. Evaluation of filamentous heterocystous cyanobacteria for integrated pig-farm biogas slurry treatment and bioenergy production. *Bioresour Technol*. 297, 122418.
- Lucchetti, A. 2014. Modélisation et conception d'un système de culture de microalgues. Thèse de doctorat. École Nationale Supérieure des Mines de Paris, France. pp196.
- Lukavský, J., Furnadzhieva, S., Pilarski, P. 2011. Cyanobacteria of the thermal spring at Pancharevo, Sofia, Bulgaria. *Acta Bot Croat*. 70, 191–208.
- Lund, J.W. 2004. Geothermal direct-heat utilization. In: Kępińska B, Popovski K (eds) *Proceedings of the international geothermal days Poland, Kraków and Skopje*, pp 19–33.
- Madeira, M.S., Cardoso, C., Lopes, P.A., Coelho, D., Afonso, C., Bandarra, N.M.; Prates, J.A.M. 2017. Microalgae as feed ingredients for livestock production and meat quality: A review. *Livest. Sci*. 205, 111–121.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J. 2003. *Brock Biology of Microorganisms*, 10th ed. Prentice-Hall International, Upper Saddle River, New Jersey, USA.
- Malpani, M., Varma, A. K., Mondal, P. 2016. Production of bio-oil from algal biomass and its upgradation to biodiesel using CaO-based heterogeneous catalysts. *Int. J. Green Energy*. 13(10), 969–976.



- Malik, F R., Ahmed, S., Rizki, Y M. 2001. Utilization of lignocellulosic waste for the preparation of nitrogenous biofertilizer. Pakistan. J. Biol. Sci. 4, 1217-1220.
- Maltsev, Y., Krivova, Z., Maltseva, S., Maltseva, K., Gorshkova, E., Kulikovskiy, M. 2021. Lipid accumulation by *Coelastrella multistriata* (Scenedesmaceae, Sphaeropleales) during nitrogen and phosphorus starvation. Sci Rep. 11, 19818.
- Mandotra, S.K., Kumar, P., Suseela, M.R., Ramteke, P.W. 2014. Freshwater green microalga *Scenedesmus abundans*: a potential feedstock for high quality biodiesel production. Bioresour Technol. 156, 42-47.
- Manivasagan, P., Bharathiraja, S., Santha Moorthy, M., Mondal, S., Seo, H., Dae Lee, K, Oh, J. 2017. Sustainable Global Resources Of Seaweeds. 1, XXIX, 656.
- Mata, T.M., Martins, A.A., Caetano, N.S. 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. Renew. Sustain. Energy Rev. 14, 217–232.
- Matsukawa, R., Hotta, M., Masuda, Y., Chihara, M., Karube, I. 2004. Antioxidants from Carbon Dioxide Fixing *Chlorella sorokiniana*. J. Appl. Phycol. 12, 263-267.
- Minyuk, G. Chelebieva, E. Chubchikova, I. Dantsyuk, N. Drobetskaya, I. Sakhon, E. Chekanov, K. Solovchenko, A. 2017. Stress-induced secondary carotenogenesis in *Coelastrella rubescens* (Scenedesmaceae, Chlorophyta), a producer of value-added keto-carotenoids. Algae. 32, 1-15.
- Miyashita, K., Hosokawa, M. 2014. Carotenoids as a Nutraceutical Therapy for Visceral Obesity. pp 329-340.
- Miller, S.R., Purugganan, M.D., Curtis, S.E. 2006. Molecular Population Genetics and Phenotypic Diversification of Two Populations of the Thermophilic Cyanobacterium *Mastigocladus laminosus*. Appl Environ Microbiol. 72, 2793–2800.
- Minhas, A. K., Hodgson, P., Barrow, C. J., Adholeya, A. 2016. A Review on the Assessment of Stress Conditions for Simultaneous Production of Microalgal Lipids and Carotenoids. Front Microbiol. 7, 546.

- Miller, S.R., Purugganan, M.D., Curtis, S.E. 2006. Molecular Population Genetics and Phenotypic Diversification of Two Populations of the Thermophilic Cyanobacterium *Mastigocladus laminosus*. *Appl Environ Microbiol.* 72, 2793–2800.
- Mohamed Abdelaziz, A.E. 2014. Isolation and Identification of Native Microalgae for Biodiesel Production. Université de Montréal, pp12.
- Mohammed, S., Eladel, H., Battah, M. 2022. Screening of the potentiality of four green microalgae to be used as feedstock for biodiesel and nutraceutical production. 23, 34.
- Morgan L. Vis. 2005. Freshwater Algae of North America : Ecology and Classification. The Journal of the Torrey Botanical Society, 132(3), 533-534.
- Mondal, M., Khan, A. A., Halder, G. 2019. Estimation of biodiesel properties based on fatty acid profiles of *Chlamydomonas sp.* BTA 9032 and *Chlorella sp.* BTA 9031 obtained under mixotrophic cultivation conditions. *Biofuels.* 12, 1175-1181.
- Moreno, R. 2012. Identification of algal strains by PCR amplification and evaluation of their fatty acid profiles for biodiesel production. Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College. LSU Master's Theses. 2479.
- Mostafa, S.S.M., El-Gendy, N.S.h. 2017. Evaluation of fuel properties for microalgae *Spirulina platensis* bio-diesel. *Arab J Chem.* 10, S2040–S2050.
- Muhammad, G., Alam, M.A., Xiong, W., Lv, Y., Xu, J.L. 2020. Microalgae Biomass Production: An Overview of Dynamic Operational Methods. In *Microalgae Biotechnology for Food, Health and High Value Products*, 1st ed.; Alam, M., Xu, J.L., Wang, Z., Eds., Springer, Singaporepp. 415-432.
- Murata, N., Wada, H. 1992. Gombos, Z. Modes of fatty-acid desaturation in cyanobacteria. *Plant Cell Physiol.* 33, 933–941.
- Murphy, D. J. 2012. Oil Crops as Potential Sources of Biofuels. *Technological Innovations in Major World Oil Crops.* 2, 269–284.
- Mutanda, T., Ramesh, D., Karthikeyan, S., Kumari, S., Anandraj, A., Bux, F. 2011. Bioprospecting for hyper-lipid producing microalgal strains for sustainable biofuel production. *Bioresour Technol.* 102, 57–70.

- Narayanan, G.S., Seepana, S., Elankovan, R., Arumugan, S.; Premalatha, M. 2018. Isolation, identification and outdoor cultivation of thermophilic freshwater microalgae *Coelastrella sp.* FI69 in bubble column reactor for the application of biofuel production. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 14, 357-365.
- Nagappan, S., Bhosale, R., Nguyen, D. D., Pugazhendhi, A., Tsai, P-C., Chang, S. W., Ponnusamy, V. K., Kumar, G. 2020. Nitrogen-fixing cyanobacteria as a potential resource for efficient biodiesel production. *Fuel.* 279, 118440. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.118440>.
- Nikulina, T.V., Kociolek, J.P. 2011. Diatoms from hot springs from Kuril and Sakhalin Islands (Far East, Russia). In *Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology. The Diatom World, Part 3*; Seckbach, J., Kociolek, J.P., Eds.; Springer: Dordrecht, The Netherlands; 19, pp. 333–363.
- Nobel, P.S. 2009. *Physicochemical and Environmental Plant Physiology*. 4th Edition, Academic Press, San Diego. pp 604.
- Gouveia, L., Batista, A.P., Sousa, I., Raymundo, A., Bandarra, N.M. 2008. Microalgae in Novel Food Product. In: *Food Chemistry Research Developments*. Nova science publisher. pp 71-111.
- Ogunkunle, O., Ahmed, N.A. 2021. Overview of Biodiesel Combustion in Mitigating the Adverse Impacts of Engine Emissions on the Sustainable Human–Environment Scenario. *Sustainability.* 13, 5465. <https://doi.org/10.3390/su13105465>.
- Oliveira, D.D. Vasconcelos, C.T. Feitosa, A.M.T. Aboim, J.B. Oliveira, A.N. Xavier, L.P. Santos, A.S. Gonçalves, E.C. Filho, G.N.R. Nascimento, L.A.S. 2018. Lipid profile analysis of three new Amazonian cyanobacteria as potential sources of biodiesel. *Fuel.* 234, 785–788.
- Onker, C.Z., Van -Ginkel, C ., Olivier, J. 2013. Association between physical and geochemical characteristics of thermal springs and algal diversity in Limpopo Province, South Africa. *Water SA [online]*. 39(1), 95-103.
- Ortiz-Martínez, V.M., Andreo-Martínez, P., García-Martínez, N., de los Ríos, A.P., Hernández-Fernández, F.J., Quesada-Medina, J. 2019. Approach to biodiesel production from

microalgae under supercritical conditions by the PRISMA method. *Fuel Proc Technol.* 191, 211-222.

Østensvik, Ø., Skuberg, O.M., Underdak, B., Hormazabal, V. 1998. Antibacterial properties of extracts from selected planktonic cyanobacteria—a comparative study of bacterial bioassays. *J. Appl. Microbiol.* 84, 1117–1124.

Ovando-Chacon, S. L., Tacias-Pascacio, V. G., Ovando-Chacon, G. E., Rosales-Quintero, A., Rodriguez-Leon, A., Ruiz-Valdiviezo, V. M., Servin-Martinez, A. 2020. Characterization of Thermophilic Microorganisms in the Geothermal Water Flow of El Chichón Volcano Crater Lake. *Water*, 12(8), 2172.

Owen, R. B., Renaut, R.W., Jones, B. 2008. Geothermal diatoms: a comparative study of floras in hot spring systems of Iceland, New Zealand, and Kenya. *Hydrobiologia.* 610 (1), 175-192.

Oyewumi, O.O., Olukunle, O.F. 2018. Isolation and Identification of Microalgae from Fresh Water. *JoST* . 9, 71-78.

Patel, V.K., Sundaram, S., Patel, A.K. 2018. Characterization of Seven Species of Cyanobacteria for High-Quality Biomass Production. *Arab J Sci Eng.* 43, 109–121.

Olaizola, M. 2003. Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. *Biomol. Eng.* 20, 459-466.

Pham-Huy, H., Pham-Huy, C. 2008. Free Radicals Antioxidants in disease and health. *Int. J. Biomed. Sci.* 4, 89-96.

Prihantini, N B., Nurmarina, A., Handayani, S., Sjamsuridzal, W., Wardhana, W. 2021. Biomass production of *Mastigocladus* (cyanobacteria) HS-46 in bold basal medium and npk medium to produce high lipid content. *OP Conf. Series: Earth and Environmental Science.* 858, 012012.

Pôjo, V., Tavares, T., Malcata, F.X. 2021. Processing Methodologies of Wet Microalga Biomass Toward Oil Separation: An Overview. *Molecules.* 26(3), 641.

Polvêche, J. 1960. Contribution à l'étude géologique de l'Ouarsenis Oranais. Publications du service de la carte géologique de l'Algérie. Tome I et II. Bulletin No. 24.

- Pentecost, A., Jones, B., Renaut, R.W. 2003. What is a hot spring. *Can J Earth Sci.* 40, 1443–1446.
- Perez-Garcia, O., Escalante, F.M.E., de-Bashan, L.E., Bashan, Y. 2011. Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. *Water Research.* 45, 11–36.
- Pôjo, V., Tavares, T., Malcata, F.X. 2021. Processing Methodologies of Wet Microalga Biomass Toward Oil Separation: An Overview. *Molecules.* 26 (3), 641.
- Porowski A. 2018. Mineral and Thermal Waters. In: Meyers R. (eds) *Encyclopedia of Sustainability Science and Technology.* Springer, New York, NY.
- Prescott, A.G.W. 1978. *How to know the fresh water algae (Third edition).* pp 293.
- Priyadarshani, I., Biswajit, R. 2012. Commercial and industrial applications of micro algae. , A review *J. Algal Biomass Utiln.* 3, 89-100.
- Pruetiworanan, S., Duangjan, K., Pekk, oh. J., Peerapornpisal, Y., Pumas, C. 2017. Effect of pH on heat tolerance of hot spring diatom *Achnantheidium exiguum* AAR L D025–2 in cultivation. *J. Appl. Phycol.* 30(1), 47–5.
- Pumas, C., Pruetiworanan, S., Peerapornpisal, Y. 2018. Diatom diversity in some hot springs of northern Thailand. *Bot.* 24(1), 69–86 .
- Rahman, A., Prihantini, N. B., Nasruddin.N. 2020. Biomass production and synthesis of biodiesel from microalgae *synechococcus* hs-9 (Cyanobacteria) cultivated using bubble column photobioreactors. *Evergreen.* 7, 564-570.
- Ramade, A. 2009. *Eléments d'écologie appliquée.* Dunod, 4ème Edition Paris, France. pp 689.
- Rania, M., Hala, M. 2008. Antibacterial and antifungal activity of Cynobacteria and green Microalgae evaluation of medium components by Plackett-Burman design for antimicrobial activity of *Spirulina platensis*. *Global Journal of Biotechnol. Biochem.* 3, 22-31.
- Ratha, S. K., Prasanna, R., Gupta, V., Dhar, D. W., Saxena, A. K. 2012. Bioprospecting and indexing the microalgal diversity of different ecological habitats of India. *World Journal of Microbiology and Biotechnology,* 28(4), 1657-1667.

- Rezanka, T., Lukavský, J., Siristová, L., Sigler, K. 2012. Regioisomer separation and identification of triacylglycerols containing vaccenic and oleic acids, and  $\alpha$ - and  $\gamma$ -linolenic acids, in thermophilic cyanobacteria *Mastigocladus laminosus* and *Tolythrix* sp. *Phytochem.* 78, 147–155.
- Reviere, B. 2002. *Biologie et phylogénie des algues*. Belin. 1, pp 351.
- Reviere, B. 2002. *Biologie et phylogénie des algues*. Tome 1. Edition .BELIN, Paris. pp 225.
- Righini, H., Francioso, O., Martel Quintana, A., Roberti, R. 2022. Cyanobacteria: A Natural Source for Controlling Agricultural Plant Diseases Caused by Fungi and Oomycetes and Improving Plant Growth. *Horticulturae*. 8, 58.
- Rothschild, L. J., Mancinelli, R. L. 2001. Life in extreme environments. *Nature*, 409(6823), 1092-1101.
- Schlegel, I., Doan, N.T., de Chazal, N., Smith, G.D. 1999. Antibiotic activity of new cyanobacterial isolates from Australia and Asia against green algae and cyanobacteria. *J. Appl. Phycol.* 10, 471–479.
- Ruiz, G. 2005. *Extraction, Détermination Structurale et Valorisation Chimique de phycocolloïdes d'Algues Rouges*. Thèse de doctorat en Chimie appliquée. Université de Limoges-France. pp 265.
- Sadvakasova, A.K., Akmukhanova, N.R., Bolatkhan, K., Zayadan, B.K, Usserbayeva, A.A., Bauenova, M.O., Akhmetkaliyeva, A.E., Allakhverdiev, S.I. 2019. Search for new strains of microalgae-producers of lipids from natural sources for biodiesel production. *Inter J Hydrog Energ.* 44, 5844-5853.
- Saïbi, H. 2009. Geothermal resources in Algeria. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 13, 2544–2552.
- Sastry, V.M.V.S., Rao, G.R.K. 1994. Antibacterial substances from marine algae: Successive extraction using benzene, chloroform and methanol. *Botanica Marina*. 37, 357-360.
- Shaima, A.F., Mohd Yasin, N.H., Ibrahim, N., Takriff, M. S., Gunasekaran, D., Ismaeel, M.Y.Y. 2022. Unveiling antimicrobial activity of microalgae *Chlorella sorokiniana* (UKM2), *Chlorella* sp. (UKM8) and *Scenedesmus* sp. (UKM9). *Saudi J. Biol. Sci.* 29 (2), 1043-1052.

- Sharafi, H., Fooladi, J., Tabatabaei, M., Heravi M.M., Memari, H.R. 2021. Lipid Production Capacity of a Newly Characterized Cyanobacterial Strain *Synechocystis* sp. MH01: A Comparative Performance Evaluation of Cyanobacterial Lipid-Based Biodiesel. Iran. J. Biotechnol. 19, e2313.
- Sheehan, J., Dunahay, T., Benemann, J., Roessler, P. 1998. A look back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program. National Renewable Energy Laboratory.
- Silva, B., Antunes, C., Andrade, F., Ferreira da Silva, E., Grande, J. A., Luís, A. T. 2021. Prokaryotic and eukaryotic diversity in hydrothermal continental systems. Archives of Microbiology, 203(7), 3751-3766.
- Singh, J.S., Kumar, A., Singh, M. 2019. Cyanobacteria: A sustainable and commercial bio-resource in production of bio-fertilizer and bio-fuel from waste waters. Environ Dev Sustain Environmental and Sustainability Indicators. 3-4, 100008..
- Smith-Bädorf, H.D., Chuck, C.J., Mokebo, K.R., Macdonald, H., Davidson, M.G., Scott, R.J. 2013. Bioprospecting the thermal waters of the Roman baths: isolation of oleaginous species and analysis of the FAME profile for biodiesel production. AMB Express. 3, 9.
- Song ,T., Martensson, L., Eriksson, T., Zheng ,W., Rasmussen ,U. 2005. Biodiversity and seasonal variation of the cyanobacterial assemblage in a rice paddy field in Fujian, China. European Materials Societies Microbiology Ecol. 54, 131-140.
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., Isambert, A. 2006. Commercial applications of microalgae. J. Biosci. Bioeng. 101, 87-96.
- Strunecký, O., Kopejtká, K., Goecke, F. Tomasch, J., Lukavský, J., Neori, A., Kahl, S., Pieper, D.H., Pilarski, P., Kaftan, D., Koblížek, M. 2019. High diversity of thermophilic cyanobacteria in Rupite hot spring identified by microscopy, cultivation, single-cell PCR and amplicon sequencing. Extremophiles. 23, 35–48.
- Talebi, A.F., Tabatabaei, M., Chisti, Y. 2014. User-friendly software for predicting the properties of prospective biodiesel. Biofuel Res J. 2, 55–57.
- Thao, T.Y.; Linh, D.T.N.; Si, V.C.; Carter, T.W.; Hill, R.T. 2017. Isolation and selection of microalgal strains from natural water sources in Viet Nam with potential for edible oil production. Mar Drugs. 15, 194.

- Thiroux, s. 2019. Études des interactions entre virus et hôtes archéens hydrothermaux hyperthermophiles. Thèse doctorat l'université de Bretagne occidentale, 304.
- Urbietta, M.S., Toril, E.G., Giaveno, M.A., Bazán, A.A., Donati, E.R. 2014. Archaeal and bacterial diversity in five different hydrothermal ponds in the Copahue region in Argentina. *Syst. Appl. Microbiol.* 37, 429–441.
- Van den Burg, B. 2003. Extremophiles as a source for novel enzymes. *Curr. Opin. Microbiol.* 6, 213–218.
- Van Heurck, H. 1880. Synopsis des Diatomées de Belgique. Atlas. Ducaju & Cie., Anvers.
- Vargas, M.A., Rodríguez, H., Moreno, J., Olivares, H., Del Campo, J. A., Rivas, J., Guerrero, M. G. 1998. Biochemical composition and fatty acid content of filamentous nitrogen-fixing cyanobacteria. *J Phycol.* 34, 812–817.
- Villeneuve V., Pienitz R. 1998. Composition diatomifère de quatre sources thermales au Canada, en Islande et au Japon. *Diatom research.* 13, 1.
- Verma, N.M., Mehrotra, S., Shukla, A., Mishra, B. N. 2010. Prospective of biodiesel production utilizing microalgae as the cell factories: a comprehensive discussion. *Afr. J. Biotechnol.* 9, 1402-1411.
- Viskari, P.J., Colyer, C.L. 2002. Separation and quantitation of phycobiliproteins using phytic acid in capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *J. Chromatogr. J Chromatogr A.* 972(2), 269-276.
- Wall, R., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., Stanton, C. 2010. Fatty acids from fish: the anti-inflammatory potential of long-chain omega-3 fatty acids. *Nutr. Rev.* 68, 280–289.
- Wang, Q., Song, H., Liu, X., Liu, B., Hu, Z., Liu, G. 2019. Morphology and molecular phylogeny of coccoid green algae *Coelastrella* sensu lato (Scenedesmaceae, Sphaeropeales), including the description of three new species and two new varieties. *Journal of Phycology*, 55(6), 1290-1305.
- Watanabe, M., Ikeuchi, M. 2013. Phycobilisome: Architecture of a light-harvesting supercomplex. *Photosynth Res.* 116 (2-3), 265-76.



- Wehr, J.D., Sheath, R.G., Kociolek, J. P. 2002. Freshwater Algae of North America, Ecology and Classification, 1<sup>st</sup> ed., Eds.; Academic Press: Cambridge, Massachusetts, États-Unis.
- Wehr, J. D., Sheath, R.G. 2003. Freshwater algae of North America: ecology and classification. Amsterdam ; Boston: Academic Press.
- Wehr, J. D., Sheath, R. G. 2015. Freshwater algae of North America. London : Academic Press.
- Xu, S. J. Wu, K.-C. Chan, S.C.-Y. Yau, Y.-H. Chan, K.-K. Lee, F.W.-F. 2020. Investigation of growth, lipid productivity, and fatty acid profiles in marine bloom-forming dinoflagellates as potential feedstock for biodiesel. J. Mar. Sci. Eng. 8, 381.
- Yahia, E.M., Jesús Ornelas-Paz, J., Emanuelli, T., Jacob-Lopes, E., Zepka, L.Q. 2017. Cervantes- Paz B: Chemistry, stability, and biological actions of carotenoids. Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry and Human Health. 2, 285-285.
- Yaşar, F. B. 2020. Comparison of fuel properties of biodiesel fuels produced from different oils to determine the most suitable feedstock type. Fuel. 264, 116817.
- Zehlila, A .2017. Caractérisation structurale et fonctionnelle des métabolites de l’algue verte *ulva rigida* au moyen d’une approche protéomique. Thèse de doctorat. Université de Rouen Normandie et de la faculté des sciences de Tunis. pp 7-8.
- Zhang, J., Ma, J., Liu, D., Qin, S., Sun, S., Zhao, J., Sui ,S.F.2017. Structure of phycobilisome from the red alga *Griffithsia pacifica*. Nature. pp551.
- Zhu, L., S. Huo, and L. Qin. 2015. Microalgae-based biodiesel refinery: Sustainability concerns and challenges. Int. J. Green Energy. 12(6), 595–602.
- Zili, F. Mezhoud, N. Trabelsi, L. Chreif, I. Ben Ouada, H. 2015. Fatty acid composition of the thermophilic *Gloeocapsa gelatinosa* under different combinations of temperature, light intensity, and NaNO<sub>3</sub> concentration. J Appl Phycol. 27, 97–107.

# **Annexes**

## Annexe 1: milieu de culture

Tableau 1: Composition chimique de milieu de culture BG-11 riche en extrait de sol

Elément	Concentration (mg/l)
NaNO <sub>3</sub>	150 mg
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 3H <sub>2</sub> O	4 mg
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	7.5 mg
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	3.6 mg
Citric acid	0.6 mg
Ferric ammonium citrate	0.6 mg
Na <sub>2</sub> EDTA – Mg	0.1 mg
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	2 mg
Trace metal mix A <sub>5</sub> + Co <sup>1</sup>	0.1 mL
Eau distillé	89.9 mL
Extrait du sol <sup>2</sup>	10 ml
pH 7.4	

Add 1.5 g agar to 100 mL of medium to give a solid medium.

<sup>1</sup>Trace metal mix A<sub>5</sub> + Co

Elément	Concentration (mg/l)
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	286 mg
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	181 mg
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	22.2 mg
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	39 mg
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	7.9 mg
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	4.9 mg
Eau distillé	100 mL

<sup>2</sup>Préparation d'extrait du sol

À 1000 ml d'eau distillée, ajouter 200 ml de sol (le sol d'une forêt de feuillus non perturbée est préférable) et chauffer à l'autoclave pendant 1 h à 105°C. Une fois refroidi, chauffer à nouveau à l'autoclave pendant 1 h à 105 °C. Passer le surnageant à travers un filtre GF/C, puis passer le filtrat à travers un filtre GF/F. Ajuster à 1000 ml en ajoutant de l'eau distillée. Distribuer 10 ml du filtrat final dans chaque tube à essai et stériliser à l'autoclave pendant 20 min à 121 °C.

**Composition de milieu de culture BBM****Tableau 2:** Composition chimique du milieu BB (pH = 6.6)

<b>Elément</b>	<b>Concentration (g/l)</b>
NaNO <sub>3</sub>	25
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 3 H <sub>2</sub> O	17.5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	7.5
MgSO <sub>4</sub> 7 H <sub>2</sub> O	7.5
CaCl <sub>2</sub> 2 H <sub>2</sub> O	2.5
NaOH	2.5
EDTA	50
KOH	31
FeSO <sub>4</sub> 7 H <sub>2</sub> O	4.98
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (1ml)	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> 11.42	11.42
ZnSO <sub>4</sub> 7 H <sub>2</sub> O	8.82
MnCl <sub>2</sub> 4 H <sub>2</sub> O	1.44
MoO <sub>3</sub>	0.71

### Annexe 3 : Travaux scientifiques

#### Publication internationale :

-Boutarfa, S.; Senoussi, M.M.; Gonzalez-Silvera, D.; López-Jiménez, J.Á.; Aboal, M. The Green Microalga *Coelastrrella thermophila* var. *globulina* (Scenedesmaceae, Chlorophyta) Isolated from an Algerian Hot Spring as a Potential Source of Fatty Acids. *Life* 2022, *12*, 560. <https://doi.org/10.3390/life12040560>.

-Boutarfa, S.; Senoussi, M.M.; Gonzalez-Silvera, D.; López-Jiménez, J.Á.; Aboal, M. 2022. Fatty acids profile of *Mastigocladus laminosus* Cohn ex Kichner isolated from Algerian hot springs as a biofuel feedstock. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 42, 102373. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2022.102373>.

-Boutarfa, S.; Senoussi, M.M.; Aboal, M. 2022. Diatoms diversity from Algerian hot springs. En cours de publication.

#### Communications Internationales :

- Boutarfa, Soumia, González-Silvera, D., López-Jiménez, J.A. & Marina Aboal. «Fatty acid characterization of cyanobacterial strains isolated from Algerian thermal waters». 2<sup>ème</sup> Congrés Iberoamericane des Cyanotoxines et 6<sup>o</sup> Congrés Ibero des Cyanotoxines, 3-5 juillet 2019 - Murcie- Espagne.

- Boutarfa, Soumia, González-Silvera, D., López-Jiménez, J.A. & Marina Aboal « Caracterización de los acidos de linajes de cianobacterias aislados de aguas termaleas de Argelia». Séminaire international et session scientifique de la Société espagnole de phycologie, 4 Octobre 2019 - Malaga- Espagne.



- Boutarfa S. « Identification des algues microscopiques et des cyanobactéries». Séminaire International des Biotechnologies Appliquées à l'Agriculture, la Santé et l'Environnement (SIBAASE I). Khenchela, 17-19 Avril 2016.

#### Communications nationales

- Boutarfa S. « Caractérisation des algues microscopiques et des cyanobactéries des sources hydrothermales de Hammem Es Salihin Khenchela». 2<sup>ème</sup> Séminaire National : Eau, Environnement et Biodiversité (2SNEEB). Khenchela, 27 et 28 Mai 2014.

## Article

# The Green Microalga *Coelastrella thermophila* var. *globulina* (Scenedesmaceae, Chlorophyta) Isolated from an Algerian Hot Spring as a Potential Source of Fatty Acids

Soumia Boutarfa <sup>1,2,\*</sup>, Mohammed Mourad Senoussi <sup>1</sup>, Daniel Gonzalez-Silvera <sup>3</sup>, José Ángel López-Jiménez <sup>3</sup> and Marina Aboal <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Biomolecules and Plant Breeding, Department of Nature and Life Sciences, Faculty of Exact Sciences and Nature and Life Sciences, University of Larbi Ben M'hidi, Oum El Bouaghi 04000, Algeria; senoussi.mohamed.mourad@univ-oeb.dz

<sup>2</sup> Laboratory of Algology, Department of Plant Biology, Faculty of Biology, Espinardo Campus, E-30100 Murcia, Spain; maboal@um.es

<sup>3</sup> Department of Physiology, University of Murcia, E-30100 Murcia, Spain; danigs@um.es (D.G.-S.); joseang@um.es (J.Á.L.-J.)

\* Correspondence: boutarfa.soumia@univ-oeb.dz

**Abstract:** Screening microalgae from extreme environments, including hot springs, is an important research topic that has lately emerged. A thermophilic green alga was isolated from a north-eastern Algerian hot spring at a temperature of 63 °C, and its fatty acid (FA) profile was explored. The strain was cultivated in BBM medium at 35 °C in a 16:8 h light/dark cycle and 75 μM photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. The morphological studies combined with phylogenetic analysis revealed that the isolate was *Coelastrella thermophila* var. *globulina* Q. Wang, H. Song, X. Liu, G. Liu and Z. Hu. The monounsaturated fatty acid (MUFA) content was 51.12%. The saturated fatty acid (SFA) and polyunsaturated fatty acid (PUFA) content, respectively, accounted for 27.01% and 21.87%. The main FA was oleic acid (18:1n-9), whose value was 35.95%, followed in decreasing order by palmitic acid (16:0) with 21.45%, linoleic acid (18:2n-6) with 14.38% and α-linolenic acid (18:3n-3) with 04.22%. The FA profile exhibited high total n-6 and n-3 PUFA values (15.80% and 5.76%, respectively). *Coelastrella thermophila* var. *globulina* is particularly interesting for producing n-6 and n-3 PUFA and is likely suitable for other biotechnological purposes. This is the first time that this taxon has been reported in hot springs. Other species can be expected to be reported, which emphasises the importance of the biodiversity of extreme habitats.

**Keywords:** biotechnology; *Coelastrella thermophila* var. *globulina*; fatty acids; green algae; hot springs



**Citation:** Boutarfa, S.; Senoussi, M.M.; Gonzalez-Silvera, D.; López-Jiménez, J.Á.; Aboal, M. The Green Microalga *Coelastrella thermophila* var. *globulina* (Scenedesmaceae, Chlorophyta) Isolated from an Algerian Hot Spring as a Potential Source of Fatty Acids. *Life* **2022**, *12*, 560. <https://doi.org/10.3390/life12040560>

Academic Editor: Friedrich Jung

Received: 28 March 2022

Accepted: 5 April 2022

Published: 8 April 2022

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



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

## 1. Introduction

Microalgae are a highly diversified group of photosynthetic microorganisms adapted to a wide range of ecological habitats. They can utilise solar energy to combine water and carbon dioxide to generate biomass, which can be used for numerous renewable purposes, such as the production of biodiesel or biochemical products of pharmaceutical interest [1–4].

Microalgae, including Chlorophyceae, inhabit environments ranging from freshwater to extreme habitats such as snow, desert sand and hot springs [5–7]. They have recently been paid increasingly more attention in biotechnology domains for producing lipid-based biodiesel and polyunsaturated fatty acids (FAs) thanks to their potential therapeutic and nutritional uses [8–11]. In addition to fats, a variety of valuable molecules, such as polysaccharides, pigments, antioxidants, antimicrobial, high-value bioactive substances and other chemical compounds, may also be extracted from them to be used for lots of commercial applications, including the cosmetics and pharmaceuticals industries [3,8,11–22].

The genus *Coelastrella* (Chlorophyta, Scenedesmaceae) was reported by Chodat [23]. This genus is described as being unicellular or making few celled aggregates and is remarkable for its sculptured cell wall with several longitudinal ribs [19,24–26]. It has been reported from mainly subaerial and terrestrial habitats, and only rarely from freshwater [25,27]. Several species of this genus show a high propensity to accumulate carotenoids and FAs, especially n-6 and n-3 PUFA, and display good resistance to diverse stresses [19–22,25,26]. Some species have also been proposed for applications in bioremediation, nutrient removal and nanoparticle production [20,28,29].

Nowadays, increasing interest is being shown in hot springs because some authors have proposed that screening microbial diversity from these habitats may be crucial for comprehending their role in biogeochemical cycles and to determine their biotechnological potential [7,30–32]. The thermophilic microalgae that inhabit hot springs are particularly interesting for biologists as the genetic origin of thermophily is not fully understood [33]. Likewise, isolating indigenous microalgae strains from these extreme habitats is essential, and several of these species might be more valuable than commercially available strains [26,34].

Algeria has more than 240 hot springs, mostly across its north-eastern area, with variable physical and chemical parameters [35]. The present work was conducted as part of a study to screen thermophilic microalgae from Algerian hot springs, where the high diversity of microalgae is still unexplored. Thus, we isolated a green alga strain and determined its FA profile by focusing on future biotechnological applications.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Sampling Site and Physico-Chemical Analysis

The Meskhoutine-Guelma spring, located in north-eastern Algeria, was chosen for this study. The study area is semi-arid with annual precipitation of 546.04 mm. The yearly average temperature is 17.75 °C, with mean monthly temperatures ranging from 9.72 °C to 26.76 °C [36]. Algal samples were collected in a small sterile plastic container labelled with sample collection details, including the date, site name, location code and replicate number. The samples taken for the analysis were stored in an icebox (4 °C) in the dark. Measurements of water parameters, including pH, water temperature, conductivity and dissolved oxygen, were taken in the field with a portable multiparameter probe (HORIBA W-23 XD). The water samples for the hydro-chemical analysis were collected using 250 mL polyethylene bottles. The following mineral contents were measured: Mg<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Al<sup>3+</sup>, Li<sup>+</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, Cl<sup>-</sup>, F<sup>-</sup> and Br<sup>-</sup>. Cation species were determined with an Atomic Absorption Spectroscopy (AAAnalyst 600, Shelton, CT, USA). Anion groups were analysed in an Ion Chromatography autosampler (Dionex As40, Sunnyvale, CA, USA) [37,38].

### 2.2. Isolation and Enrichment Cultures

The cultivation and isolation of strains were carried out under sterile conditions in solid BBM (Bold's basal medium) enriched with soil extract to ensure the growth and multiplication of the green microalga at 35 °C in a 16:8 h light/dark cycle and 75 μM photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. After approximately 3 weeks, algal cells were repeatedly streaked and incubated in identical settings as those mentioned above until the pure isolate was obtained. Monoclonal cultures were selected to produce enough biomass for lipid extraction purposes. The strain was incubated inside 250 mL culture flasks containing the same medium with aeration using an aquarium pump which pumped 1.5 L air per min through a drip set under the same aforementioned conditions for periods lasting up to 3 weeks. The biomass was harvested by centrifugation [39] and frozen at -80 °C until analysed. The strain was deposited in the MAESE culture collection at the University of Murcia (Spain) as MAESE 20.61.

### 2.3. Morphological Identification

The morphological identification of the natural and cultivated materials (designated as S3A) was performed under a light Olympus (BX50) microscope (400–1000) and photographed with an Olympus (U-CMAD-2) camera. Algal cells' size, chloroplast shape, wall thickness and surface ornamentation, reproduction mode, as well as the presence of pyrenoids and starch granules, were determined at both the 40× and 100× magnifications. Morphotypes were identified down to the species level based on the works conducted by Chodat [23], John [24], Wang et al. [25] and Goecke et al. [26].

### 2.4. Molecular Identification and Phylogenetic Analysis

Green alga S3A DNA was extracted from cell pellets' culture material by the Cetyl-Trimethyl Ammonium Bromide (CTAB) extraction method [40]. PCR amplification was conducted in a 12.5 µL volume, which contained approximately 0.5 µL of template DNA, 2 µM of each primer, 0.2 mM of dNTP, two units of Taq DNA polymerase, the manufacturer's buffer and ddH<sub>2</sub>O to the final volume, amplified using primer pairs SSU1004/ITS1DR; SSU301/SSU1147 and SSU1+SSU568 [41]. PCR reactions were performed in the following settings: 4 min at 94 °C, 35 cycles of 60 s at 94 °C, 60 s at 50 °C, 90–120 s at 72 °C, and a final 10 min extension step at 72 °C [39]. The PCR reaction was run on a thermocycler (Eppendorf Mastercycler Gradient, Hamburg, Germany). The negative control PCR was also conducted using the same primers, but without a DNA sample.

The resulting DNA sequences were separated by electrophoresis on 1% agarose gel and examined under ultraviolet light. Following the manufacturer's protocol, the resulting products were purified and excised from agarose gel before being cleaned with a PCR purification kit: GenElute PCR clean-up (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Finally, the purified amplification products were sequenced at the Genomic Service of the University of Murcia with the BigDye terminator cycle sequencing reaction (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using the same PCR primers as those mentioned earlier.

The sequences from our samples were checked against the sequences in the GenBank database via a BlastN search online and were then aligned with the related sequences using MUSCLE. The phylogenetic tree was constructed with MEGA (11.0.10) [42] by neighbour-joining (NJ) based on evolutionary distances [43]. The sequences generated by this research were submitted to the GenBank nucleotide database from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) with accession number OM831388.

### 2.5. Lipid Extraction and Fatty Acids Quantification

Lipids were extracted following the technique proposed by Folch et al. [44]. The conversion of lipids into FA methyl esters (FAMES) was performed by acid-catalysed transesterification of total lipids according to the method of Christie [45]. The total lipid samples were transmethylated overnight in 2 mL of 2% sulphuric acid in methanol (plus 1 mL of toluene to dissolve neutral lipids) at 50 °C. Methyl esters were extracted twice in 5 mL of hexane–diethyl ether (1:1, v/v) after neutralisation with 2 mL of 2% KHCO<sub>3</sub>, dried under nitrogen and redissolved in 1 mL of iso-hexane. FAMES were separated and quantified by gas-liquid chromatography in an SP<sup>TM</sup> 2560 flexible fused silica capillary column (length 100 m, internal diameter 0.25 mm, film thickness 0.20 mm SUPELCO) in a Hewlett–Packard 5890 gas chromatograph. The 140 °C oven temperature was initially increased at a rate of 3 °C min<sup>-1</sup> to 230 °C, followed by 2 °C min<sup>-1</sup>, and then to 240 °C to be held for 12 min. The injector and flame ionisation detector were set at 260 °C. Helium was used as the carrier gas at a pressure of 300 kPa. Peaks were identified by comparing their retention times to appropriate FAME standards from the Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA). Each component's data were reported as a percentage of total content [8,46].



### 3. Results

#### 3.1. Physico-Chemical Characteristics of the Algerian Hot Spring

The temperature of the Meskhoutine spring water was 63 °C, with a neutral pH (7.08) and moderate electrical conductivity (0.23 mS/m) (Table 1). The main anions were Cl<sup>-</sup> (318 mg/L) and HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (366 mg/L), while the main cations were Na<sup>+</sup> (219 mg/L) and Ca<sup>+</sup> (220 mg/L) (Table 1).

**Table 1.** Physico-chemical characterisation of the water from the Algerian hot spring.

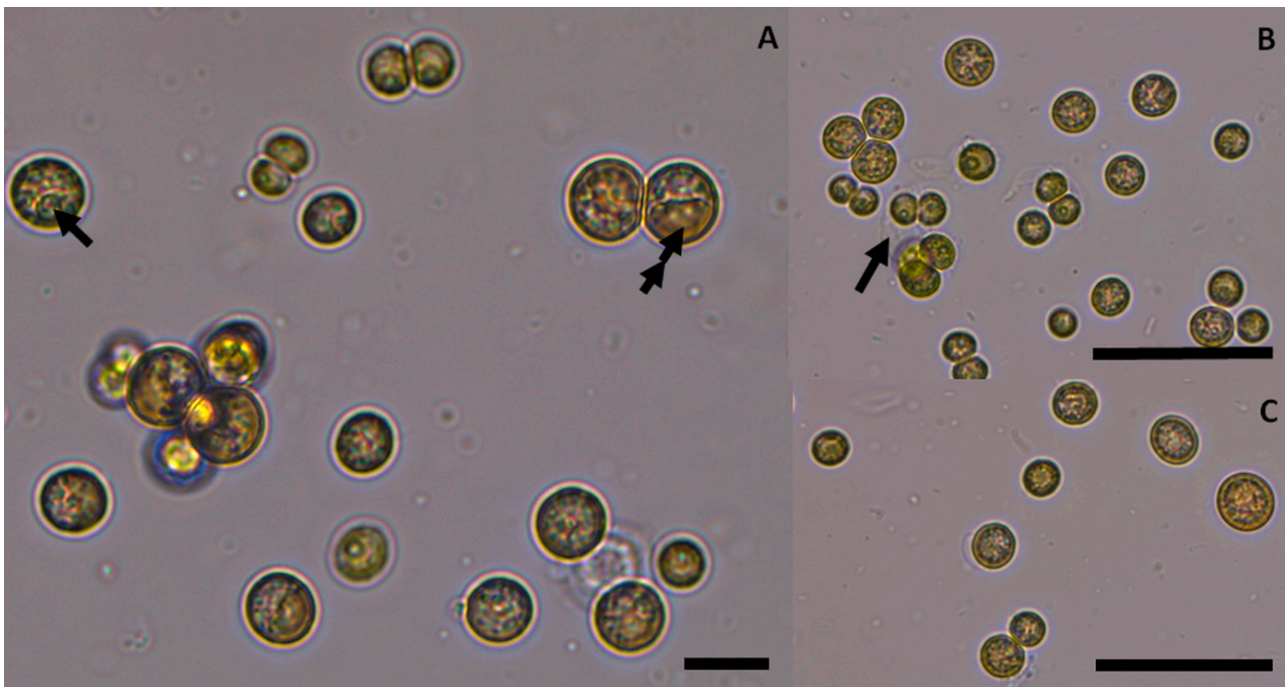
Meskhoutine Hot Spring	Meskhoutine
Locality	Guelma
Coordinates	36°36'0'' N 7°24'0'' E
Temperature °C	63.00
pH	7.08
Conductivity mS/m	0.23
Dissolved oxygen mg/L	0.63
Ca <sup>2+</sup> mg/L	220.00
Mg <sup>2+</sup> mg/L	33.56
Na <sup>+</sup> mg/L	219.00
K <sup>+</sup> mg/L	25.00
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> mg/L	366.00
F <sup>-</sup> mg/L	2.70
Cl <sup>-</sup> mg/L	318.00
Br <sub>2</sub> mg/L	2.17
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> mg/L	367.00
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> mg/L	0.36
SiO <sub>2</sub> mg/L	54.90
Li <sup>+</sup> mg/L	1.16
Fe mg/L	0.13

#### 3.2. Species Description

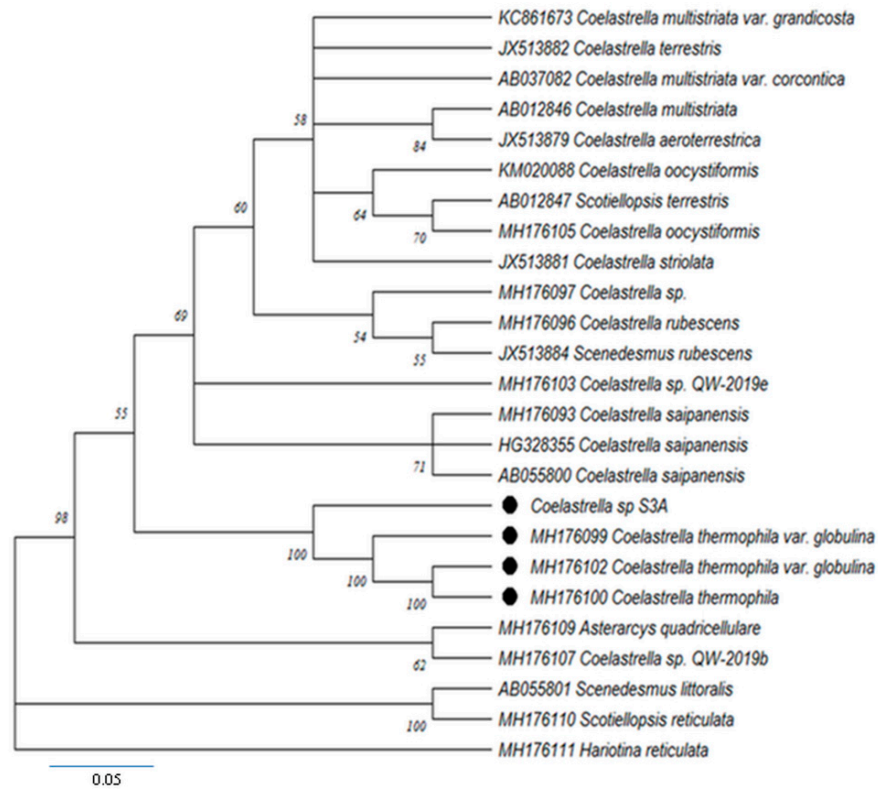
Based on the morphological features, isolate S3A was preliminarily identified as *Coelastrella* sp., characterised as unicellular and occasionally forming aggregates with vegetative cells spherical to subspherical, from 5.4–9 µm in diameter, including a sole parietal and cup-shaped chloroplast that often rapidly changes shape and fragments into blades as cells age. Before cell division, mature cells are almost spherical and measure (8.5) 9.7–14 (18.5) µm in diameter with conspicuous thickenings on cell walls. A distinct pyrenoid was clearly observed in vegetative cells and autospores. The longitudinal ribs on the cell wall of living cells are almost invisible in light microscopy. Reproduction was performed exclusively by autospores (4–16 elongated autospores in the sporangium cell). Aged cells frequently change colour to become brick-red/orange (Figure 1).

#### 3.3. Phylogenetic Identification

A phylogenetic analysis based on the 18S rRNA gene sequence and a comparison to similar strains in the GenBank database indicated that the strain had a high similarity with other strain sequences of *Coelastrella* (Scenedesmeaceae, Chlorophyceae) (Figure 2). The 18S rDNA phylogeny included 24 taxa. The phylogenetic tree showed a well-supported clade of *Coelastrella* which contained the genera *Coelastrella* and *Asterarcys* (Figure 2). *Coelastrella* S3A formed a sister group with *Coelastrella thermophila* var. *globulina*, as recently described by Wang et al. [25], and the branch have high support values (Figure 2).



**Figure 1.** *Coelastrella thermophila* var. *globulina* in cultures: (A). Cells in various growth stages: a single arrow denotes pyrenoid and a double arrow indicates a big lipid droplet. (B). Mature cells and autospores: an arrow depicts cell wall remnants. (C). Autospores and mature cells. The scale in A represents 10  $\mu\text{m}$ , with 50  $\mu\text{m}$  in (B,C).



**Figure 2.** Phylogenetic tree of the studied *Coelastrella* sp. S3A strain reconstructed using a dataset of 25 18S rDNAs deriving from the genus *Coelastrella* and its relative species in Chlorophyceae. The bootstrap support percentages are shown near the corresponding nodes; the names of species and the strain, as well as the GenBank accession numbers, are shown.

### 3.4. Fatty Acid Composition

The FA contents of the *Coelastrella thermophila* var. *globulina* strain are found in Table 2 compared to other published *Coelastrella* strains. The FA profile in our isolate consisted of a high proportion of monounsaturated fatty acids (MUFA) (51.12% ± 0.12), 27.01% ± 0.09 of saturated fatty acids (SFA) and 21.87% ± 0.05 of polyunsaturated fatty acids (PUFA) (Table 2). Overall palmitic acid (16:0) was the predominant SFA (21.45% ± 0.08), oleic acid (18:1n-9) was the most prevalent MUFA (35.95% ± 0.07) and linoleic acid (18:2n-6) was the most abundant PUFA (14.38% ± 0.03). Another PUFA of interest to show a relatively high proportion of the total was  $\alpha$ -linolenic acid (18:3n-3) (04.22% ± 0.07), while 20:4n-6 (araquidonic acid, ARA) and 18:3n-6 ( $\gamma$ -linolenic acid, GLA) had only 0.13% and 0.96%, respectively. Eicosapentanoic acid (20:5n-3, EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) were not detected (Table 2).

**Table 2.** Fatty acid contents of *Coelastrella thermophila* var. *globulina* strain S3A and comparison to other published *Coelastrella* strains (% wt).

Fatty Acids	<i>Coelastrella thermophila</i> var. <i>globulina</i>	<i>Coelastrella</i> sp. L3	<i>Coelastrella</i> sp. F50	<i>Coelastrella multistriata</i> MZ-Ch23	<i>Coelastrella</i> sp. FGS-001	<i>Coelastrella</i> sp. F169	<i>Coelastrella striolata</i> var. <i>multistriata</i>	<i>Coelastrella Rubescens</i> V 195	<i>Coelastrella</i> sp. BGV
	This study	[10]	[16]	[19]	[26]	[47]	[20]	[21]	[22]
14:0	0.40	2.46	-	0.25	-	0.35	-	-	2.60
15:0	1.39	0.60	-	-	0.15	-	-	-	-
16:0	21.45	35.98	22.23	18.61	17.70	19.88	17.90	20.05	20.30
18:0	2.88	14.54	3.55	1.49	0.24	3.85	1.30	0.80	-
20:0	0.44	1.26	0.47	-	-	0.87	-	-	-
22:0	0.27	3.80	-	0.27	-	0.87	-	-	-
24:0	0.19	-	-	-	-	-	-	-	-
Total SFA	27.01	62.97	26.25	21.16	18.68	34.00	18.90	22.00	22.90
15:1n-5	0.12	-	-	-	-	-	-	-	-
16:1n-9	4.67	-	-	-	-	-	-	-	-
16:1n-7	0.71	2.64	3.34	1.63	11.18	2.70	1.00	1.00	-
18:1n-9	35.95	19.53	36.47	8.05	22.60	31.43	13.10	6.80	26.00
18:1n-7	3.04	-	1.53	2.63	-	-	2.20	-	-
20:1n-9	6.45	1.21	0.43	-	0.21	-	-	-	-
22:1n-9	0.08	-	-	-	-	-	-	-	-
24:1n-9	0.10	-	-	-	-	-	-	-	-
Total MUFA	51.12	24.52	41.47	12.04	35.43	37.00	15.30	11.60	26.00
18:2n-6	14.38	6.24	13.57	7.32	7.12	14.99	22.70	20.80	15.60
18:3n-6	0.96	0.32	1.07	-	0.89	-	-	-	-
20:3n-6	0.27	-	-	-	-	-	-	-	-
20:4n-6	0.13	-	-	-	-	-	-	-	-
Totaln-6 PUFA	15.80	-	-	-	-	-	-	-	-
18:3n-3	4.22	3.82	8.63	38.12	32.40	6.92	28.30	30.40	35.50
18:4n-3	1.16	-	1.33	-	-	-	-	-	-
22:5n-3	0.29	-	-	-	-	-	-	-	-
Totaln-3 PUFA	5.76	-	-	-	-	-	-	-	-
Total PUFA	21.87	10.38	30.87	66.80	42.71	27.00	51.00	61.20	51.10

## 4. Discussion

The temperature of the Meskhoutine-Guelma spring water is high (63 °C) with a chemical composition that is characteristic of the so-called mineral springs [48]. This spring has been used for therapeutic and bathing purposes because its water is not suitable as drinking water or for agriculture activities [35,49]. The eukaryotic thermophilic organisms growing in these hot springs have been poorly studied but may provide new and interesting chemical compounds to be biotechnologically obtained, and to enhance the value of these habitats in conservation [50].

The green microalga isolated from submerged stones morphologically fitted *Coelastrella thermophila* var. *globulina*, which has been recently described by Wang et al. [25]; 18S rDNA sequencing and the BLAST analysis confirmed its identification. *Coelastrella* S3A was clustered together with *Coelastrella thermophila* var. *globulina*, with good support, and this clade was consistent with the morphological data. There was a 100% similarity between the *Coelastrella* S3A sequence and the sequences of the material of *Coelastrella thermophila* var. *globulina* uploaded to GeneBank by Wang et al. [25]. However, this genus has a complicated

taxonomic history, which has been revised a number of times on the basis of morphological or molecular data [25].

The taxon has been previously reported from wet concrete floors or stones submerged in rivers. Algal cells are initially dark green but become brick-red or orange as they age, which indicates increased carotenoids synthesis [20,26,51]. Changes in chloroplast shape as cells age have also been reported in other *Coelastrella* strains [19,25]. To the best of our knowledge, neither *Coelastrella* nor any species or variety has been reported previously from hot springs in Algeria or elsewhere.

The ability of algae to accumulate large amounts of FAs compared to other organisms is one of the qualities that allow them to live in extreme environments [48]. The isolated strain had a remarkable FA profile and could be a promising candidate for biotechnological purposes [20,21] because it presents a high proportion of oleic acid and a relatively high percentage of PUFA (Table 2). Comparable FA percentages have been reported in thermotolerant strain *Coelastrella* sp. F50 with 26.25% of SFA and 41.47% of MUFA [16], and thermotolerant strain *Coelastrella* sp. FI69 with 27% of SFA, and a high value for MUFA [47]. They differed from other *Coelastrella* strains, such as freshwater *Coelastrella* sp. L3 with a high SFA value (62.97%) [10], and also *Coelastrella multistriata* [19] and terrestrial *Coelastrella* sp. FGS-001 [26], both of which contained a high proportion of PUFA (66.80% and 42.71%, respectively) (Table 2). However, *Coelastrella* S3A was able to generate valuable FA levels at a relatively high temperature (35 °C) under laboratory conditions compared to other *Coelastrella* strains, which were cultivated at relatively lower temperatures. All this makes this microalga an attractive option for FA production for biotechnological purposes [16,20]. The FA profile of the studied strain presented an average chain length that varied from C14 to C20, which is typical of microalgae (Table 2) [52]. It is usually contained in suitable feedstock for biodiesel production and guarantees high-quality biodiesel parameters [53,54]. The biodiesel generated from SFA and MUFA with a short-carbon chain are of higher quality. The studied strain exhibited relatively high proportions of SFA and MUFA, which qualifies it as a candidate for providing raw materials also for biodiesel production [48].

The main SFA was palmitic acid, the principal MUFA was oleic acid, while linoleic acid (LA) and  $\alpha$ -linolenic acid (ALA) acids were dominant in PUFA (Table 2). Our findings are consistent with those reported for other *Coelastrella* strains (Table 2) [16,20–22,26,47]. The differences in FA composition of our strain under differing incubation conditions may promote the synthesis of one type or another and merit further studies.

Our *Coelastrella thermophila* var. *globulina* strain presented high contents of total n-6 and n-3 PUFA (Table 2), which is characteristic of *Coelastrella* strains [19]. The FAs from the n-6 and n-3 series are an essential complement in human and animal diets [8,52,55,56]. LA was also present and predominated in n-6 PUFA, while ALA was prominent in n-3 PUFA (Table 2). Therefore, the high linoleic and  $\alpha$ -linolenic FA contents in our strain makes biomass a valuable nutritional supplement source and a prospective food additive for animals, where ALA and/or LA could meet essential FA requirements (Table 2) [22].

Although the percentages of GLA (18:3n-6, GLA) (0.96%) and stearidonic acid (18:4n-3, SA) (1.16%) were not high, the presence of these two FAs is interesting because they can metabolically promote ARA and EPA production in human cells, which are essential [52,57]. Likewise, the production of 0.96% GLA by the studied strain seemed relatively higher than the values recorded in other *Coelastrella* strains (Table 2) [10,16,19,26,47] and other thermophilic green microalgae [52]. *Coelastrella* S3A, isolated from an Algerian hot spring at a high temperature (63 °C), demonstrated the ability to grow in culture at a lower temperature (35 °C) than in its natural habitat. This thermal flexibility is important in investigative procedures because it enables not only research into the variability of FA content due to environmental factors, but also into the dynamic exploitation of this constituent [58].

## 5. Conclusions

The morphological features of the studied strain match those of the genus *Coelastrella* defined by Chodat in 1922, and the strain established a sister cluster with the newly defined

*C. thermophila* var. *globulina* Q. Wang, H. Song, X. Liu, G. Liu and Z. Hu. The *Coelastrella* S3A strain contains essential FAs of high commercial value, such as n-3 and n-6, among others, and presents an interesting FA profile for algal biotechnology at higher temperatures, particularly as a dietary supplement. This green alga also exhibits a suitable FA profile with high SFA and MUFA values, and the main FAs found were C16–C20, which can be used effectively as raw material for biodiesel production. More biodiversity studies at hot springs in Algeria and elsewhere are highly recommended for providing data to select microalgal strains with an interesting chemical composition. This is the first report of a *Coelastrella* strain from hot springs worldwide.

**Author Contributions:** Conceptualisation, S.B., M.M.S. and M.A.; methodology, S.B., M.M.S. and M.A.; writing—original draft, S.B. and M.A.; validation, S.B., M.M.S., D.G.-S., J.Á.L.-J. and M.A.; data curation, S.B., M.M.S., D.G.-S., J.Á.L.-J. and M.A.; writing—review and editing, S.B., M.M.S., D.G.-S., J.Á.L.-J. and M.A. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This work was supported by the Algerian ministry of Higher Education and Scientific Research which provided grants (scholarship program PNE 2018) for S.B.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** Relevant data is contained within the article.

**Acknowledgments:** The University of Murcia (Spain) for providing all the facilities and materials to conduct the research, and the Algerian Ministry for Higher Education and Scientific Research. We also thank María del Mar Santiago from the Agroforestral Research Service of the University of Murcia and María Ángeles Caravaca from the Botany Area at the University of Murcia for technical support with cultures. The authors are also grateful to José Luis Cánovas and Yerai Gomez Leyva from the Botany Area of the Plant Biology Department at the University of Murcia for technical support with the phylogenetic analysis.

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

## References

1. Abou-Shanab, R.A.I.; Hwang, J.-H.; Yunchul, C.; Booki, M.; Jeon, B.-H. Characterization of microalgal species isolated from fresh water bodies as a potential source for biodiesel production. *Appl. Energy* **2011**, *88*, 3300–3306. [[CrossRef](#)]
2. De la Vega, M.; Díaz, E.; Vila, M.; León, R. Isolation of a new strain of *Picochlorum* sp. and characterization of its potential biotechnological applications. *Biotechnol. Prog.* **2011**, *27*, 1535–1543. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Mimouni, V.; Ulmann, L.; Pasquet, V.; Mathieu, M.; Picot, L.; Bougaran, G.; Cadoret, J.-P.; Morant-Manceau, A.; Schoefs, B. The Potential of Microalgae for the Production of Bioactive Molecules of Pharmaceutical Interest. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2012**, *13*, 2733–2750. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Xu, S.J.; Wu, K.-C.; Chan, S.C.-Y.; Yau, Y.-H.; Chan, K.-K.; Lee, F.W.-F. Investigation of Growth, Lipid Productivity, and Fatty Acid Profiles in Marine Bloom-Forming Dinoflagellates as Potential Feedstock for Biodiesel. *J. Mar. Sci. Eng.* **2020**, *8*, 381. [[CrossRef](#)]
5. Aguilera, A.; Souza-Egipsy, V.; Amils, R. Photosynthesis in Extreme Environments. In *Artificial Photosynthesis*, 1st ed.; Najafpour, M.M., Ed.; InTech: Rijeka, Croatia, 2012; pp. 271–288.
6. Jonker, C.Z.; Van Ginkel, C.; Olivier, J. Association between physical and geochemical characteristics of thermal springs and algal diversity in Limpopo Province, South Africa. *Water SA* **2013**, *39*, 95–104. [[CrossRef](#)]
7. Patel, A.; Matsakas, L.; Rova, U.; Christakopoulos, P. A perspective on biotechnological applications of thermophilic microalgae and cyanobacteria. *Bioresour. Technol.* **2019**, *278*, 424–434. [[CrossRef](#)]
8. Aboal, M.; González-Silvera, D.; Roldán, M.; Hernández-Mariné, M.; López-Jiménez, J.Á.; Whitton, B.A. The freshwater alga *Chroothecce richteriana* (Rhodophyta) as a potential source of lipids. *Food Chem.* **2014**, *162*, 143–148. [[CrossRef](#)]
9. Liu, J.; Vanormelingen, P.; Vyverman, W. Fatty acid profiles of four filamentous green algae under varying culture conditions. *Bioresour. Technol.* **2016**, *200*, 1080–1084. [[CrossRef](#)]
10. Thao, T.Y.; Linh, D.T.N.; Si, V.C.; Carter, T.W.; Hill, R.T. Isolation and selection of microalgal strains from natural water sources in Viet Nam with potential for edible oil production. *Mar. Drugs* **2017**, *15*, 194. [[CrossRef](#)]
11. Lee, S.; Lim, S.R.; Jeong, D.G.; Kim, J.H. Characterization of an Oleaginous Unicellular Green Microalga, *Lobosphaera incisa* (Reisigl, 1964) Strain K-1, Isolated From a Tidal Flat in the Yellow Sea, Republic of Korea. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 2159. [[CrossRef](#)]
12. Metzger, P.; Largeau, C. *Botryococcus braunii*: A rich source for hydrocarbons and related ether lipids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2005**, *66*, 486–496. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

13. Spolaore, P.; Joannis-Cassan, C.; Duran, E.; Isambert, A. Commercial applications of microalgae. *J. Biosci. Bioeng.* **2006**, *101*, 87–96. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Mata, T.M.; Martins, A.A.; Caetano, N.S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2010**, *14*, 217–232. [[CrossRef](#)]
15. Bux, F. Biotechnological applications of microalgae. *Int J. Food Microbiol.* **2013**, *6*, S24–S37.
16. Hu, C.-W.; Chuang, L.-T.; Yu, P.-C.; Chen, C.-N.N. Pigment production by a new thermotolerant microalga *Coelastrrella* sp. F50. *Food Chem.* **2013**, *138*, 2071–2078. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. De Moraes, M.G.; Vaz, B.D.S.; Moraes, E.G.D.; Costa, J.A.V. Biologically active metabolites synthesized by microalgae. *Biomed. Res. Int.* **2015**, *2015*, 835761. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Gagnarda, C.; Larochea, C.; Pierrea, G.; Dubessaya, P.; Delattrea, C.; Gardarina, C.; Gourvil, P.; Probertb, I.; Dubuffetc, A.; Michaud, P. Screening of marine microalgae: Investigation of new exopolysaccharide producers. *Algal. Res.* **2019**, *44*, 101711. [[CrossRef](#)]
19. Maltsev, Y.; Krivova, Z.; Maltseva, S.; Maltseva, K.; Gorshkova, E.; Kulikovskiy, M. Lipid accumulation by *Coelastrrella multistriata* (Scenedesmaceae, Sphaeropeales) during nitrogen and phosphorus starvation. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 19818. [[CrossRef](#)]
20. Abe, K.; Hattori, H.; Hirano, M. Accumulation and antioxidant activity of secondary carotenoids in the aerial microalga *Coelastrrella striolata* var. *multistriata*. *Food Chem.* **2007**, *100*, 656–661. [[CrossRef](#)]
21. Minyuk, G.; Chelebieva, E.; Chubchikova, I.; Dantsyuk, N.; Drobetskaya, I.; Sakhon, E.; Chekanov, K.; Solovchenko, A. Stress-induced secondary carotenogenesis in *Coelastrrella rubescens* (Scenedesmaceae, Chlorophyta), a producer of value-added keto-carotenoids. *Algae* **2017**, *32*, 1–15. [[CrossRef](#)]
22. Dimitrova, P.; Marinova, G.; Alexandrov, S.; Iliev, I.; Pilarski, P. Biochemical characteristics of a newly isolated strain *Coelastrrella* sp. BGV cultivated at different temperatures and light intensities. *Annu. L Univ. Sofia St. Kliment Ohridski Fac. Biol.* **2017**, *102*, 139–146.
23. Chodat, R. Matériaux pour l'histoire des algues de la Suisse. *Bull. Soc. Bot Geneve. Sér.* **1922**, *2*, 66–114. (In French)
24. John, D.M. Filamentous and plantlike green algae. In *Freshwater Algae of North America, Ecology and Classification*, 1st ed.; Wehr, J., Sheath, R., Kociolek, J.P., Eds.; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2002; pp. 311–352.
25. Wang, Q.; Song, H.; Liu, X.; Liu, B.; Hu, Z.; Liu, G. Morphology and molecular phylogeny of coccoid green algae *Coelastrrella* sensu lato (Scenedesmaceae, Sphaeropeales), including the description of three new species and two new varieties. *J. Phycol.* **2019**, *55*, 1290–1305. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Goecke, F.; Noda, J.; Paliocha, M.; Gislerød, H.R. Revision of *Coelastrrella* (Scenedesmaceae, Chlorophyta) and first register of this green coccoid microalga for continental Norway. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2020**, *36*, 149. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Ancona-Canché, K.; López-Adrián, S.; Espinosa-Aguilar, M.; Garduño-Solórzano, G.; Toledano-Thompson, T.; Narváez-Zapata, J.; ValdezOjeda, R. Molecular phylogeny and morphologic data of strains of the genus *Coelastrrella* (Chlorophyta, Scenedesmaceae) from a tropical region in North America (Yucatán Peninsula). *Bot. Sci.* **2017**, *95*, 527–537. [[CrossRef](#)]
28. MubarakAli, D.; Arunkumar, J.; Nag, K.H.; SheikSyedIshack, K.A.; Baldev, E.; Pandiaraj, D.; Thajuddin, N. Gold nanoparticles from Pro and eukaryotic photosynthetic microorganisms—Comparative studies on synthesis and its application on biolabelling. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2013**, *103*, 166–173. [[CrossRef](#)]
29. Luo, L.; He, H.; Yang, C.; Wen, S.; Zeng, G.; Wu, M.; Zhou, Z.; Lou, W. Nutrient removal and lipid production by *Coelastrrella* sp. in anaerobically and aerobically treated swine wastewater. *Bioresour. Technol.* **2016**, *216*, 135–141. [[CrossRef](#)]
30. Hindák, F.; Kvíderová, J.; Lukavský, J. Growth characteristics of selected thermophilic strains of cyanobacteria using crossed gradients of temperature and light. *Biologia* **2013**, *68*, 830–837. [[CrossRef](#)]
31. Strunecký, O.; Kopejtká, K.; Goecke, F.; Tomasch, J.; Lukavský, J.; Neori, A.; Kahl, S.; Pieper, D.H.; Pilarski, P.; Kaftan, D.; et al. High diversity of thermophilic cyanobacteria in Rupite hot spring identified by microscopy, cultivation, single-cell PCR and amplicon sequencing. *Extremophiles* **2019**, *23*, 35–48. [[CrossRef](#)]
32. Adjeroud, M.; Escuder-Rodríguez, J.-J.; González-Siso, M.-I.; Kecha, M. Metagenomic Investigation of Bacterial and Archaeal Diversity of Hammam Essalihine Hot Spring from Khenchela, Algeria. *Geomicrobiol. J.* **2020**, *37*, 804–817. [[CrossRef](#)]
33. Bauman, A.J.; Simmonds, P.G. Fatty Acids and Polar Lipids of Extremely Thermophilic Filamentous Bacterial Masses from Two Yellowstone Hot Springs. *J. Bacteriol.* **1969**, *98*, 528–531. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Covarrubias, Y.; Cantoral-Uriza, E.A.; Casas-Flores, J.S.; García-Meza, J.V. Thermophile mats of microalgae growing on the woody structure of a cooling tower of a thermoelectric power plant in Central Mexico. *Rev. Mex. Biodivers.* **2016**, *87*, 277–287. [[CrossRef](#)]
35. Bouaicha, F.; Dib, H.; Bouteraa, O.; Manchar, N.; Boufaa, K.; Chabour, N.; Demdoun, A. Geochemical assessment, mixing behavior and environmental impact of thermal waters in the Guelma geothermal system, Algeria. *Acta. Geochim.* **2019**, *38*, 683–702. [[CrossRef](#)]
36. Foued, B.; Hénia, D.; Lazhar, B.; Nabil, M.; Nabil, C. Hydrogeochemistry and geothermometry of thermal springs from the Guelma region, Algeria. *J. Geol. Soc. India* **2017**, *90*, 226–232. [[CrossRef](#)]
37. Michalski, R. Ion Chromatography as a Reference Method for Determination of Inorganic Ions in Water and Wastewater. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **2006**, *36*, 107–127. [[CrossRef](#)]
38. García, R.; Belmont, R.; Padilla, H.; Torres, M.D.C.; Baez, A.P. Determination of inorganic ions and trace elements in total suspended particles at three urban zones in the Mexico City Metropolitan Area and one rural site. *Atmos. Res.* **2009**, *94*, 313–319. [[CrossRef](#)]

39. Muhammad, G.; Alam, M.A.; Xiong, W.; Lv, Y.; Xu, J.L. Microalgae Biomass Production: An Overview of Dynamic Operational Methods. In *Microalgae Biotechnology for Food, Health and High Value Products*, 1st ed.; Alam, M., Xu, J.L., Wang, Z., Eds.; Springer: Singapore, 2020; pp. 415–432.
40. Doyle, J.J.; Doyle, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* **1987**, *19*, 11–15.
41. Alverson, A.J.; Jansen, R.K.; Theriot, E.C. Bridging the Rubicon: Phylogenetic analysis reveals repeated colonizations of marine and fresh waters by thalassiosiroid diatoms. *Mol. Phylogenetics Evol.* **2007**, *45*, 193–210. [[CrossRef](#)]
42. Tamura, K.; Stecher, G.; Kumar, S. MEGA 11: Molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Mol. Biol. Evol.* **2021**, *38*, 3022–3027. [[CrossRef](#)]
43. Hall, B.G. Building phylogenetic trees from molecular data with MEGA. *Mol. Biol. Evol.* **2013**, *30*, 1229–1235. [[CrossRef](#)]
44. Folch, J.; Lee, M.; Stanley, G.A. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* **1957**, *226*, 497–509. [[CrossRef](#)]
45. Christie, W.W. *Lipid Analysis in Isolation, Separation, Identification and Structural Analysis of Lipids*, 3rd ed.; The Oily Press: Bridgewater, UK, 2003; pp. 373–387.
46. Gonzalez-Silvera, D.; Pérez, S.; Korbee, N.; Figueroa, F.L.; Asencio, A.D.; Aboal, M.; López-Jiménez, J.A. Effects of global change factors on fatty acids and mycosporine-like amino acid production in *Chroothoece richteriana* (Rhodophyta). *J. Phycol.* **2017**, *53*, 999–1009. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Narayanan, G.S.; Seepana, S.; Elankovan, R.; Arumugan, S.; Premalatha, M. Isolation, identification and outdoor cultivation of thermophilic freshwater microalgae *Coelastrella* sp. Fl69 in bubble column reactor for the application of biofuel production. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **2018**, *14*, 357–365. [[CrossRef](#)]
48. Sadvakasova, A.K.; Akmukhanova, N.R.; Bolatkhan, K.; Zayadan, B.K.; Ussebayeva, A.A.; Bauenova, M.O.; Akhmetkaliyeva, A.E.; Allakhverdiev, S.I. Search for new strains of microalgae-producers of lipids from natural sources for biodiesel production. *Int. J. Hydrogen Energy* **2019**, *44*, 5844–5853. [[CrossRef](#)]
49. Bahri, F.; Saibi, H.; Cherchali, M.E.H. Characterization, classification, and determination of drinkability of some Algerian thermal waters. *Arab. J. Geosci.* **2011**, *4*, 207–219. [[CrossRef](#)]
50. Najjar, I.N.; Sherpa, M.T.; Das, S.; Das, S.; Thakur, N. Microbial ecology of two hot springs of Sikkim: Predominate population and geochemistry. *Sci. Total Env.* **2018**, *637–638*, 730–745. [[CrossRef](#)]
51. Alshareef, M.; Elbeshehy, E.K.F.; Alshehrif, W.A.; Omar, H.H. Identification and Growth Characterization of Native Microalgae Isolated from Different Environments of Saudi Arabia. *Biosci. Biotechnol. Res. Commun.* **2021**, *14*, 1065–1075. [[CrossRef](#)]
52. D’Alessandro, E.B.; Soares, A.T.; da Costaa, D.C.; Neto, H.d.A.S.; Fernandes, V.d.O.; Filho, N.R.A. A thermal water microalga: *Eutetramorus planctonicus* as a promising source of fatty acids and lutein. *J. Environ. Chem. Eng.* **2018**, *6*, 6707–6713. [[CrossRef](#)]
53. Mutanda, T.; Ramesh, D.; Karthikeyan, S.; Kumari, S.; Anandraj, A.; Bux, F. Bioprospecting for hyper-lipid producing microalgal strains for sustainable biofuel production. *Bioresour. Technol.* **2011**, *102*, 57–70. [[CrossRef](#)]
54. Oliveira, D.D.; Vasconcelos, C.T.; Feitosa, A.M.T.; Aboim, J.B.; Oliveira, A.N.; Xavier, L.P.; Santos, A.S.; Gonçalves, E.C.; Filho, G.N.R.; Nascimento, L.A.S. Lipid profile analysis of three new Amazonian cyanobacteria as potential sources of biodiesel. *Fuel* **2018**, *234*, 785–788. [[CrossRef](#)]
55. Wall, R.; Ross, R.P.; Fitzgerald, G.F.; Stanton, C. Fatty acids from fish: The anti-inflammatory potential of long-chain omega-3 fatty acids. *Nutr. Rev.* **2010**, *68*, 280–289. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Kaiwan-arporn, P.; Hai, P.D.; Thu, N.T.; Annachhatre, A.P. Cultivation of cyanobacteria for extraction of lipids. *Biomass Bioenergy* **2012**, *44*, 142–149. [[CrossRef](#)]
57. Vargas, M.A.; Rodriguez, H.; Moreno, J.; Olivares, H.; Del campo, J.A.; Rivas, J.; Guerrero, M.G. Biochemical composition and fatty acid content of filamentous nitrogen-fixing cyanobacteria. *J. Phycol.* **1998**, *34*, 812–817. [[CrossRef](#)]
58. Zili, F.; Mezhoud, N.; Trabelsi, L.; Chreif, I.; Ben Ouada, H. Fatty acid composition of the thermophilic *Gloeocapsa gelatinosa* under different combinations of temperature, light intensity, and NaNO<sub>3</sub> concentration. *J. Appl. Phycol.* **2015**, *27*, 97–107. [[CrossRef](#)]

Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

# Biocatalysis and Agricultural Biotechnology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/bab](http://www.elsevier.com/locate/bab)

## Fatty acids profile of *Mastigocladus laminosus* Cohn ex Kichner isolated from Algerian hot springs as a biofuel feedstock

Soumia Boutarfa<sup>a,c,\*</sup>, Mohammed Mourad Senoussi<sup>a</sup>, Daniel González-Silvera<sup>b</sup>, José Ángel López-Jiménez<sup>b</sup>, Marina Aboal<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of Biomolecules and Plant Breeding, Department of Nature and Life Sciences, Faculty of Exact Sciences and Nature and Life Sciences, University of Larbi Ben M'hidi, Oum-El-Bouaghi, 04000, Algeria

<sup>b</sup> Department of Physiology, University of Murcia, E-30100, Murcia, Spain

<sup>c</sup> Laboratory of Algology, Department of Plant Biology, Faculty of Biology, Espinardo Campus, E-30100, Murcia, Spain

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Biofuel  
Cyanobacteria  
Fatty acids  
Hot springs  
Nostocales

### ABSTRACT

Cyanobacterial lipids are considered the feedstock of future sustainable biodiesel production, and extremophiles are usually preferred for biotechnological purposes to ease the cultivation problems. However, thermal springs have been scarcely investigated from a biotechnological perspective. Three strains of *Mastigocladus laminosus* Cohn ex Kichner were isolated from hot springs in Algeria, and their fatty acid profiles were studied. The content of saturated fatty acids ranged from 55.91% to 59.37%, while monounsaturated fatty acids and polyunsaturated fatty acids ranged from 38.39% to 43.54% and 0.57%–2.25%, respectively. The main fatty acid was palmitic acid (16:0), with values within the 51.41–53.16% range, followed by oleic acid (18:1n-9) with 24.47–36.60%, and minimal quantities of  $\alpha$ -linolenic acid (18:3n-3, below 1%) and long-chain fatty acids (>C18, below 0.5%). The potential biodiesel fuel properties matched the European biodiesel standards EN 14214 (European Norms) and the American standard ASTM D6751 (American Society for Testing and Materials), and were relatively better than other studied cyanobacteria and vegetable oils. The presented data show the interest of *Mastigocladus* and probably other thermophilic strains in different biotechnology fields, especially biofuel production.

### 1. Introduction

The development of cleaner renewable biofuel technologies is of the greatest interest regarding global warming and the scarcity of energy natural resources (Mondal et al., 2019). Biodiesel has lately received more attention because it is eco-friendly, renewable, non-toxic, and emits fewer gaseous pollutants than conventional fuels (Mostafa and El-Gendy, 2017; Ogunkunle and Ahmed, 2021).

Microalgae are an important alternative source for conventional raw materials thanks to their carbon neutrality, lower hydrocarbon and sulphur emissions, and longer engine lifetime (Mondal et al., 2019; Nagappan et al., 2020). Microalgae with high lipid content, fast growth rate, and extremophile nature may be excellent candidates for biofuel generation (Nagappan et al., 2020).

Cyanobacteria (blue-green algae) are considered a valuable natural source of bioactive compounds and diverse types of metabolites exhibiting anti-cancer, anti-viral, antibacterial, antifungal, and anti-inflammatory activities (Zaki et al., 2021; Righini et al.,

\* Corresponding author. Laboratory of Biomolecules and Plant Breeding, Department of Nature and Life Sciences, Faculty of Exact Sciences, Nature and Life Sciences, University of Larbi Ben M'hidi, Oum-El-Bouaghi 04000, Algeria.

E-mail addresses: [boutarfa\\_soumia@yahoo.fr](mailto:boutarfa_soumia@yahoo.fr) (S. Boutarfa), [senoussi1@yahoo.fr](mailto:senoussi1@yahoo.fr) (M.M. Senoussi), [danigs@um.es](mailto:danigs@um.es) (D. González-Silvera), [joseang@um.es](mailto:joseang@um.es) (J.Á. López-Jiménez), [maboal@um.es](mailto:maboal@um.es) (M. Aboal).

<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2022.102373>

Received 22 December 2021; Received in revised form 11 May 2022; Accepted 12 May 2022

Available online 15 May 2022

1878-8181/© 2022 Elsevier Ltd. All rights reserved.



2022). Moreover, their high lipid production, high cell growth, and adaptability to culture conditions make them ideal lipid sources for biofuel production ((Oliveira et al., 2018; Singh et al., 2019).

Cyanobacteria can generate higher proportion of lipids than plants. Likewise various cyanobacteria can accumulate significant quantities of triacylglyceride (TAG) as a reserve lipid in suitable culturing conditions (ranging from 20 to 50 percent of dry cell weight) (Kumar et al., 2017). Nevertheless, most studies have concentrated on biodiesel production from vegetable oil, mainly palm oil, sunflower oil, sugarcane oil, soybean oil, and other higher plants (Fuad Hossain et al., 2020).

Cyanobacteria live and can adapt to grow in a wide range of extreme environments, including highly saline waters, substrates highly contaminated with metals, deserts, and hot springs (Nandagopal et al., 2021). Hot springs constitute a reservoir of a wide range of microorganisms, most of which are cyanobacteria, synthesizing interesting, and sometimes exclusive, biotechnological products with unique biochemical pathways (Jones and Renault, 2011; Lukavský et al., 2011). Extremophile organisms have been poorly studied, and therefore, isolating and screening microalgae/cyanobacteria from these under-explored habitats may offer new insights for research and for selecting new strains with high potential for biofuel production, which is not usually the case for other existing biodiesel feedstocks (Mata et al., 2010; Olguin, 2012).

Of all cyanobacteria, the filamentous heterocystous species are very interesting for the production of biomass and chemicals as they can utilise atmospheric nitrogen as the exclusive nitrogen resource, and their filamentous nature offers an advantage for harvesting processes (Anabas and Muralitharan, 2015). Thermophilic filamentous cyanobacteria species modulate their membrane fluidity by inhibiting 16:0 fatty acid (FA) elongations and by increasing monoenoic 16:1 FA production (Los and Mironov, 2015). Cyanobacteria can produce FA with chains longer than 18 carbon atoms, which are present in a small proportion. Vargas et al. (1998) consider that this capacity is not a common characteristic of cyanobacteria.

True-branching filamentous and heterocystous *Mastigocladus laminosus* Cohn ex Kirchner is a good example of an extremophile: it was originally isolated from hot springs and dominates thermal microbial mats in near-neutral pH waters (Kastovsky and Johansen, 2008) with a worldwide distribution (Castenholz, 1976; McGregor and Rasmussen, 2008). *M. laminosus* shows excellent freezing and desiccation tolerance (Castenholz, 1996) and usually synthesises monoenoic FA 14:0, 14:1, 16:0, 16:1, 16:2, 18:0 and 18:1 (Murata et al., 1992; Los and Mironov, 2015).

The FA profile significantly influences the physical and chemical properties of biofuels. Thus, microalgal biodiesel requires certain physical and chemical specifications set by different international standards, such as US ASTM D 6751 Biodiesel Standard in the USA (American Society for Testing and Materials) and EN 14214 Standard in Europe (European Norms) (Prabhu et al., 2019; Uma et al., 2020).

In Algeria, there are more than 240 hot springs with temperatures ranging from 22 °C to 98 °C and located in different areas, mainly in the north-eastern region (Benamara et al., 2017), with different chemical compositions (Foued et al., 2017). The diversity of Algerian thermophilic cyanobacteria has been rarely studied (Amarouche-Yala et al., 2014), and their biotechnological potential remains unexplored. Therefore, this study aims to determine the biotechnological potential for biodiesel production of *Mastigocladus laminosus* isolated from two Algerian hot springs.

## 2. Material and methods

### 2.1. Sampling sites and physical-chemical analysis

Two hot springs from north-eastern Algeria with differing ecological features were chosen for this study: the Essalihin spring-Khenchela and the Ouled Ali spring-Guelma (Table 1). Samples were collected from each locality between February and March 2019. Cyanobacteria mat samples were collected in sterile small plastic containers labelled with site name, location code, date, and replicate number. Samples were transported to the laboratory under cold (4 °C) and dark conditions.

Standard physical parameters, including pH, water temperature, dissolved oxygen, and conductivity DO, were measured in the field by a multiparameter probe HORIBA W-23 XD. The water samples for the chemical analysis were collected using 250 mL polyethylene bottles.  $Mg^{2+}$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $HCO_3^-$ ,  $Cl^-$ ,  $SO_4^{2-}$ ,  $NO_3^-$ ,  $SiO_2$ , Br,  $Li^+$  and  $F^-$  contents were measured with an Atomic Absorption Spectroscopy (AAAnalyst 600, Shelton USA) for anions and an Ion Chromatography autosampler (Dionex As40, California USA) for cations, with a precision better than 5%.

### 2.2. Isolation and enrichment cultures

The isolation of strains was carried out in solid culture media (BG-11 and BBM enriched with soil extract). After 4–8 weeks, the microcolonies grown on a solid medium were streaked on new plates. This process was repeated several times until monoclonal colonies were obtained. All the strains were deposited in the Microalgae edaphic from South-East Spain culture collection (MAESE) located in Murcia University (Spain). Cultures were maintained in a culture chamber (Panasonic MLR-352-PE) at 35 °C, and the light was provided by fluorescent tubes (Panasonic FL 40SS ENW/37 of cool daylight) 16: 8 h light/dark and a light intensity of 75  $\mu M$  photons  $m^{-2} s^{-1}$ . The three strains designated as S4BB, S4B11 and S9BB selected to produce enough biomass for lipid extractions were cultivated in 500 mL flasks with liquid medium and aeration and were incubated under the previously indicated conditions for periods of up to 3 weeks. Three replicates were incubated for each strain. Biomass was harvested by sieving via microfiltration using a 40  $\mu m$  cell strainer (Verma et al., 2010). Biomass production of 9.39, 18.36, and 12.68 g/l was obtained for the strains S4BB, S4B11, and S9BB, respectively. The obtained biomass was frozen and maintained at  $-80$  °C until analysis.

**Table 1**  
Physical and chemical characterisation of water from the studied Algerian hot springs.

Hot springs	Ouled Ali	Essalihin
Locality	Guelma	Khenchela
Altitude (masl)	1079	416
Coordinates	35° 26 '20.12 "N 7° 05 08.46" E	36°34'28.63"N 7°22'49.74"E
Temperature (°C)	55.0	57.0
pH	7.0	6.8
Conductivity (mS/m)	2.2	3.7
Dissolved oxygen (mg/l)	16.2	5.3
Ca <sup>2+</sup> (mg/l)	294.1	199.4
Mg <sup>2+</sup> (mg/l)	41.0	22.7
Na <sup>+</sup> (mg/l)	69.0	601.2
K <sup>+</sup> (mg/l)	7.0	18.0
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg/l)	255.0	295.3
F <sup>-</sup> (mg/l)	2.2	0.4
Cl <sup>-</sup> (mg/l)	191.2	692.5
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (mg/l)	290.1	254.0
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg/l)	0.2	3.9
SiO <sub>2</sub> (mg/l)	50.4	43.4
Li <sup>+</sup> (mg/l)	0.1	0.5
Br <sup>-</sup> (mg/l)	1.2	0.4

### 2.3. Morphological study and taxonomic identification

The taxonomic identification of field and cultivated cyanobacteria was based on morphological characters observed under a light Olympus (BX50) microscope and photographed with an Olympus U-CMAD-2 camera. The filament morphology and diameter, shape and size of vegetative cells and heterocysts, the position of heterocysts, the appearance of the sheaths, and the presence of hormogonia and akinetes were all recorded. Measurements were performed at different magnifications (40x and 100x). Approximately 50 measurements were recorded for each of the relevant morphological characters. Morphotypes were identified to the species level following the taxonomy of Komárek (2013) and the review of Kastovsky and Johansen (2008).

### 2.4. Lipid extraction and fatty acids (FA) quantification

Lipids were extracted according to Folch et al. (1957). Briefly, samples were homogenized in 20 mL of chloroform/methanol (2:1 v/v) in a tissue disrupter (IKA ULTRA-TURRAX T 25 digital; IKA-WERKE, Staufen, Germany). Non-lipid impurities were removed by washing with 0.88% KCl. Lipid weight was determined gravimetrically after evaporating the solvent under a stream of nitrogen. FA methyl esters (FAMES) were prepared by acid-catalysed transesterification of total lipids according to the method of Christie (2003). The total lipid samples were *trans*-methylated overnight in 2 ml of 2% sulphuric acid in methanol (plus 1 ml of toluene to dissolve neutral lipids) at 50 °C. Methyl esters were extracted twice in 5 ml of hexane–diethyl ether (1:1, v/v) after neutralisation with 2 ml of 2% KHCO<sub>3</sub>, dried under nitrogen and redissolved in 1 ml of iso-hexane. FAMES were separated and quantified by gas-liquid chromatography in an SP<sup>TM</sup> 2560 flexible fused silica capillary column (length 100 m, internal diameter 0.25 mm, film thickness 0.20 mm SUPELCO) in a Hewlett–Packard 5890 gas chromatograph. The 140 °C oven temperature was initially increased at a rate of 3 °C min<sup>-1</sup> to 230 °C, followed by 2 °C min<sup>-1</sup>, and then to 240 °C to be held for 12 min. The injector and flame ionisation detector were set at 260 °C. Helium was used as the carrier gas at a pressure of 300 kPa. Peaks were identified by comparing their retention times to appropriate FAME standards from Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA). The data for individual components was expressed as a percentage of total content.

### 2.5. Predicting biodiesel properties according to the FA profile

Biodiesel properties, including oxidative stability (OS), iodine value (IV), density ( $\rho$ ), saponification value (SV), degree of unsaturation (DU), cetane number (CN), kinematic viscosity ( $\nu$ ), and high heating value (HHV), saturated fatty acid (SFA) levels, monounsaturated fatty acid (MUFA) levels, polyunsaturated fatty acid (PUFA) levels, cold flow properties in the form of cloud point (CP), pour point (PP) filter, plugging point (CFPP), and long-chain saturation factor (LCSF) were estimated by the Biodiesel Analyzer® software, ver. 2.2 (available at "<http://www.brteam.ir/biodieselanalyzer>") based on the FA measured in each strain (Talebi et al., 2014). Biofuel properties originating from the cyanobacteria strains were compared to international biodiesel standards to evaluate their quality. Biodiesel fuel qualifications were given by biodiesel standards US ASTM D6751 for the USA and EN 14214 for Europe (ASTM 6751, 2012; EN 14214, 2012).

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Physical and chemical characteristics of the water from the studied hot springs

The temperature of the two thermal springs was 57 °C at the Essalihin spring-Khenchela and 55 °C at the Ouled Ali spring-Guelma. pH values varied from 6.8 (Essalihin spring) to 7.0 (Ouled Ali spring), with electrical conductivities indicating saline water (2.22 and 3.74 mS/m at the Ouled Ali spring and the Essalihin spring, respectively). The studied hot springs can be considered hyperthermal and highly mineralized (Saïbi, 2009).

At the Essalihin spring, the main anions were  $\text{Cl}^-$  and  $\text{HCO}_3^-$ , while the main cations were  $\text{Na}^+$  and  $\text{Ca}^+$ . The main anions for the Ouled Ali spring were  $\text{HCO}_3^-$  and  $\text{SO}_4^{2-}$ , whereas  $\text{Ca}^+$  and  $\text{Na}^+$  were the dominant cations (Table 1). The proportion of the major anions and cations was related to the lithological nature of the collection sites, corresponding to various geological complex systems (Chenaker et al., 2018). The Essalihine spring waters correspond to sodium-chloride type from Triassic evaporates (Berkani and Houha, 2017), while the Ouled Ali springs present chloride calcic facies (Chenaker et al., 2018).

#### 3.2. Morphological variation of *Mastigocladus laminosus*

Three strains of *M. laminosus* were isolated and cultivated: designated as S4BB and S4B11 from the Ouled Ali spring and S9BB from the Essalihine spring. The three strains perfectly match the description of *M. laminosus* (Fig. 1, Table S1) (Komárek, 2013).

Based on a combination of morphology and ecology, the three strains were identified as thermophilic strain *M. laminosus* (Komárek, 2013; Kastovsky and Johansen, 2008). The morphological differences observed among the three isolated strains were probably related to differences in the chemical characteristics of the hot springs and culture media composition (Castenholz, 1976). *M. laminosus* was isolated in this study at temperatures of 55 °C and 57 °C, as referred to in previous records of Miller et al. (2006), Finsinger et al. (2008), Komárek (2013) and Alcamán et al. (2015).

#### 3.3. FA composition

The FA composition in the three strains was equivalent, and no significant variations were detected (Table 2). The SFA content ranged from 55.91% to 59.37%, with MUFA from 38.39% to 43.54%, and the PUFA content ranged from 0.57% to 2.25% (Table 2). The FA profile of the three strains was dominated by 16:0 and 18:1n-9, found at high values ranging from 51.41 to 53.16% and

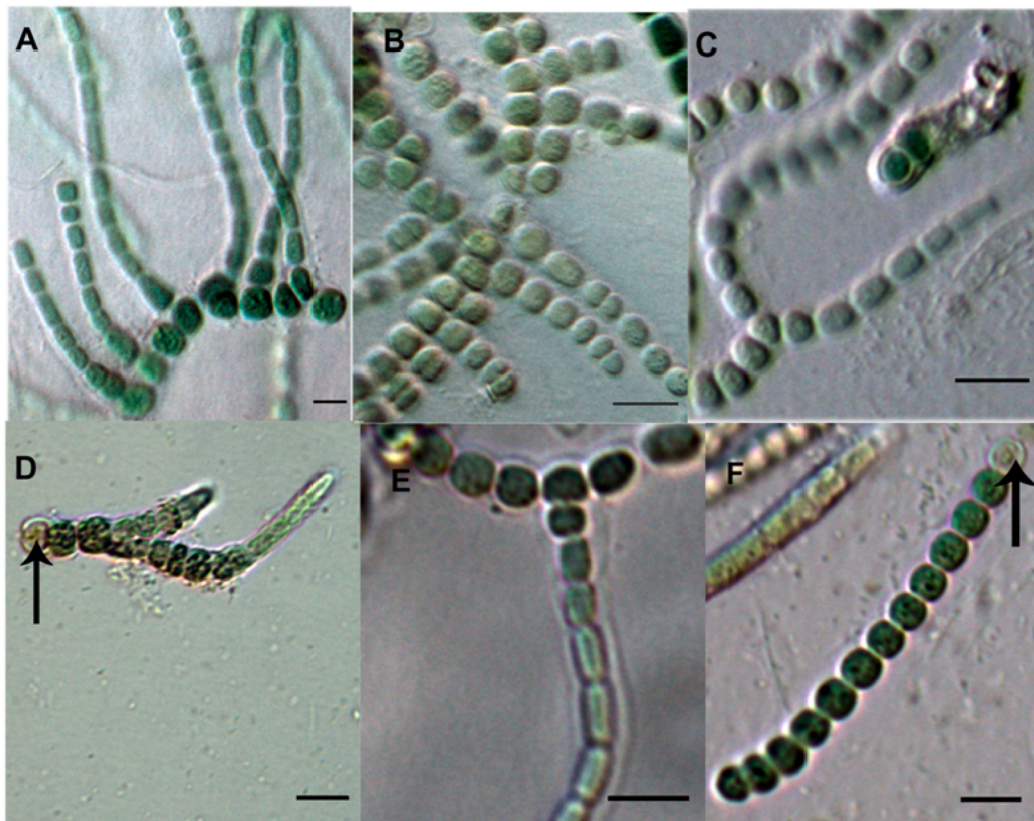


Fig. 1. Morphological variability of *Mastigocladus laminosus* strains. A. Profuse branching of main filament. B. Main filament with two cell rows. C. Y-branching shape. D. Growing branches and a terminal heterocyte. E. T-branching. F. Hormogonium with a terminal heterocyte. Heterocytes are indicated by an arrow. Scale bar = 10  $\mu\text{m}$ .

Table 2

Fatty acid contents of *Mastigocladus laminosus* strains (% wt). Values are the mean  $\pm$  standard deviations (nd = not detected).

Fatty acids	S4BB	S4B11	S9BB
10:0	0.12 $\pm$ 0.07	0.03 $\pm$ 0.03	nd
12:0	nd	nd	nd
14:0	1.17 $\pm$ 0.09	0.99 $\pm$ 0.12	1.38 $\pm$ 0.18
15:0	0.18 $\pm$ 0.03	0.15 $\pm$ 0.03	0.30 $\pm$ 0.13
16:0	53.16 $\pm$ 0.03	51.41 $\pm$ 0.26	52.71 $\pm$ 2.46
18:0	3.44 $\pm$ 0.64	2.98 $\pm$ 0.26	4.40 $\pm$ 0.42
20:0	0.13 $\pm$ 0.02	0.18 $\pm$ 0.04	0.19 $\pm$ 0.01
22:0	0.16 $\pm$ 0.05	0.17 $\pm$ 0.00	0.26 $\pm$ 0.01
24:0	0.06 $\pm$ 0.01	nd	0.12 $\pm$ 0.00
Total SFA	58.42 $\pm$ 1.09	55.91 $\pm$ 0.16	59.37 $\pm$ 1.74
14:1n-5	0.04 $\pm$ 0.00	nd	nd
15:1n-5	nd	nd	nd
16:1n-7	7.11 $\pm$ 0.37	3.46 $\pm$ 0.18	7.25 $\pm$ 0.78
18:1n-9	29.46 $\pm$ 0.49	36.60 $\pm$ 1.33	24.47 $\pm$ 1.42
18:1n-7	4.14 $\pm$ 0.46	3.44 $\pm$ 0.77	6.66 $\pm$ 2.00
20:1n-9	0.04 $\pm$ 0.00	0.04 $\pm$ 0.00	nd
22:1n-9	nd	nd	nd
24:1n-9	nd	nd	nd
Total MUFA	40.78 $\pm$ 1.11	43.54 $\pm$ 0.38	38.39 $\pm$ 1.36
18:2n-6	0.69 $\pm$ 0.07	0.32 $\pm$ 0.05	1.76 $\pm$ 0.28
18:3n-6	0.10 $\pm$ 0.01	0.02 $\pm$ 0.02	nd
20:2n-6	nd	nd	nd
20:3n-6	nd	nd	0.18 $\pm$ 0.04
20:4n-6	0.02 $\pm$ 0.01	0.10 $\pm$ 0.10	nd
22:2n-6	nd	nd	nd
22:4n-6	nd	nd	nd
Total n-6 PUFA	0.81 $\pm$ 0.06	0.44 $\pm$ 0.13	1.93 $\pm$ 0.32
18:3n-3	0.05 $\pm$ 0.01	0.04 $\pm$ 0.01	0.21 $\pm$ 0.05
18:4n-3	nd	nd	nd
20:3n-3	nd	0.04 $\pm$ 0.04	nd
20:5n-3	0.07 $\pm$ 0.02	0.06 $\pm$ 0.01	0.10 $\pm$ 0.00
22:5n-3	nd	nd	nd
22:6n-3	nd	nd	nd
Total n-3 PUFA	0.11 $\pm$ 0.02	0.13 $\pm$ 0.06	0.31 $\pm$ 0.05 $\pm$
18:1 trans 9	nd	nd	nd
18:2 trans 9-12	nd	nd	nd
Total	nd	nd	nd
Total PUFA	0.92 $\pm$ 0.08	0.57 $\pm$ 0.19	2.25 $\pm$ 0.37
n-3/n-6	0.13 $\pm$ 0.01	0.30 $\pm$ 0.04	0.16 $\pm$ 0.00
ARA/EPA	0.63 $\pm$ 0.27	1.61 $\pm$ 1.61	0.00 $\pm$ 0.00

24.47%–36.60%, respectively, and by moderately high values of 18:0 and 18:1n-7 ranging from 2.98% to 4.40% and from 3.44% to 6.66%, respectively. The values of PUFA like 20:5n-3 (EPA) were relatively low, from 0.06% to 0.10% (Table 2).

In all cases, palmitic (16:0) was the predominant SFA. Oleic (18:1n-9) was the predominant MUFA, and linoleic (18:2n-6) was the most abundant PUFA (0.32–1.76%). Linoleic and arachidonic (ARA, 20:4n-6), with values always lower than 0.10%, were present in all the strains and predominated among n-6, while  $\alpha$ -linolenic (ALA, 18:3n-3) and eicosapentaenoic (EPA, 20:5n-3) acids were predominant among n-3 (values were ranging from 0.04 to 0.21% and from 0.06 to 0.10%, respectively) (Table 2). Docosahexaenoic acid (DHA) was not detected in any strain.

Strains of *M. laminosus* showed interesting FA profiles and maybe a promising new potential feedstock for biofuels. The FA compositions in thermophilic cyanobacteria were relatively different from those in common cyanobacteria and other microalgae strains reported in previous studies such as the works of Anahas and Muralitharan (2018), Oliveira et al. (2018), Gayathri et al. (2018) and Lu et al. (2020). The strains isolated in the present study had a high proportion of SFA and MUFA with an average chain length of C14 to C20, which are the major constituents of biodiesel, this makes them extremely valuable for biodiesel production (Sadvakasova et al., 2019; Arif et al., 2019) because higher proportions of MUFA and SFA are favoured in oil profiles (Ortiz-Martínez et al., 2019).

The PUFA detected in all the strains were relatively low. Low PUFA values suggest high-quality fuel produced by these species (Oliveira et al., 2018). Furthermore, the proportion of FA containing four double bonds, or more was well below 0.5% according to biodiesel standards EN 14214; the concentration of FA containing four double bonds must not exceed the 1% limit (Table 2).

In all profiles, the main FA was palmitic acid (16:0), which is typical in most second-generation biodiesel fuels and guarantees excellent biodiesel quality parameters (Oliveira et al., 2018) and was followed by oleic acid (18:1n-9). High oleic acid values suggest better properties for the resulting algal biodiesel (Lee et al., 2014) and increase the biodiesel oxidative stability values for better long-term storage (Mutanda et al., 2011) (Table 2). The  $\alpha$ -linolenic acid values (18:3n-3) varied within a narrow range from 0.04% to 0.21%, which is well below the 12% limit set by the EN 14214 standards. Likewise, minimal amounts of long-chain fatty acids (>

C18) were detected and were below 0.10%. It is well known that the lipid content of cyanobacterial cells varies not only by species, but also by growing settings and cell growth phase (Cordeiro et al., 2017). The chemical composition of the culture medium affects the amount of biomass and its lipid composition; thus, the control of the chemical composition of the culture medium is essential to attain increased lipid production (Sharafi et al., 2021), and therefore the culture medium is essential for increased lipid production.

Moreover, the proportion of FA can be modified and enhanced according to biotechnological aims because FA values in algae are influenced by variations in growth conditions (Gonzalez-Silvera et al., 2017). Lipid synthesis can be improved by N<sub>2</sub> starvation, among other stress factors (Kumar et al., 2017), and both low and high temperatures are favoured to achieve elevated lipid levels depending on the strains: the unsaturation rates in FA increase at low temperatures, mainly linoleic and  $\alpha$ -linolenic acids (Gonzalez-Silvera et al., 2017; Minhas et al., 2016), while those of total saturated FA rise at high temperatures. The unsaturation level at low temperatures is high, mainly due to a higher dissolved oxygen concentration, allowing oxygen-dependent enzymes, known as omega-3 desaturases, to be active (Minhas et al., 2016). Hence, FA values in cyanobacteria can be changed and enhanced to meet biotechnological goals (Cordeiro et al., 2017; Sharafi et al., 2021).

Furthermore, cyanobacteria biomass is a suitable alternative biomass for energy production since it is renewable and carbon neutral. Hence, elevated biomass yield resulted in high fatty acid harvesting (Fuad Hossain et al., 2020). The three strains of *M. laminosus* showed much higher biomass yields than other *Mastigocladus* strains reported in previous studies, such as *M. laminosus* (CCAP 1447/3) (0.8 g/l) (Smith-Bärdorf et al., 2013), *M. laminosus* Sofia (0.53 g/l), *M. laminosus* Carlsbad (0.48 g/l) (Rezanka et al., 2012), *Mastigocladus* HS-46 (2.09 g/l) (Prihantini et al., 2021), and in other cyanobacteria species as *Synechococcus* HS-9 (3.323 g/l) (Rahman et al., 2020), *Nostoc carneum* MBDU 709 (0.58 g/l) (Anahas and Muralitharan, 2018), *Synechocystis* PCC 6803 (1.18 g/l), *Synechococcus* PCC 7942 (1.09 g/l), *Nostoc muscorum* (0.76 g/l), *Oscillatoria* sp (0.76 g/l), *Lyngbya* sp (0.64 g/l) and *Phormidium* sp (1.07 g/l) (Patel et al., 2018).

### 3.4. Biodiesel proprieties

The biodiesel properties of the three studied cyanobacteria strains are found in Table 3, compared to other vegetable and microalgal species, and those for European (EN 14214) and US (ASTM D6751) international standards. The OS, CN, IV and  $\nu$  values met the requisite international standards recommended by EN 14214 and ASTM D6751 (Table 3) (ASTM 6751, 2012; EN 14214, 2012).

The optimal selection of microalgae species for prospective biodiesel production requires acceptable specifications of FAMES because biodiesel parameters are influenced mainly by the FA profile (Zaki et al., 2021). The CN values of the studied cyanobacteria biodiesel fell within the authorised range determined by Biodiesel Standards US ASTM D6751 ( $\geq 47$ ) and EN 14214 ( $\geq 51$ ) (Table 3). CN values ranged from 65.0 to 65, which is the same range as *Desmonostoc muscorum* MBDU 105 (CN = 65) but were higher than the values presented by vegetable oils like sunflower and soya bean. *Nostoc calcicola* MBDU 602 had a higher CN value (CN = 201) (Table 3).

The predicted  $\rho$  values varied within a narrow range of 834–802 (kg/m<sup>3</sup>); the  $\rho$  values for the three strains were slightly below the biodiesel standards set by EN 14214 (860–900 kg/m<sup>3</sup>) (Table 3).  $\rho$  is a crucial fuel specification that influences the engine performance (Arguelles et al., 2018), and SV values ranged from 195.8 to 202.2 mg/g (Table 3). The HHV and LCSF values went from 36.2 to 37.7 (MJ/kg) and 6.5 to 7.4 (wt. %), respectively (Table 3).

The OS values of the studied strains were significantly higher than the limits set by both Biodiesel Standards US ASTM D6751 ( $\geq 3$  h) and EN 14214 ( $\geq 8$  h). The OS values were also much higher than all the OS values of the fuel derived from the cyanobacteria and plants cited in Table 3. High CN and OS values are essential advantages for biodiesel storage for long periods (Karatay and Dönmez, 2011). The predicted  $\nu$  values fell within the viscosity ranges of 1.9–6.0 mm<sup>2</sup>/s and 3.5–5.0 mm<sup>2</sup>/s given by Biodiesel Standards US ASTM D6751 and EN 14214, respectively (Table 3); this may lead to good combustion, lower emissions, and reduced oil dilution (Knothe, 2008; Arguelles et al., 2018).

The SV and HHV values were consistent with the microalgae values reported in previous studies as the green microalga *Scenedesmus abundans* (Mandotra et al., 2014), *Nostoc spongiaeforme* 417 MBDU 704 and *Nostoc punctiforme* MBDU 621 (Gayathri et al., 2018) and with the other plants and cyanobacteria cited in Table 3. The IV values show that the total unsaturation in a fatty acid combination (Arguelles et al., 2018) were lower than the maximum limit set by international standards EN 14214 ( $\leq -120$ g<sub>1</sub> 100 g<sup>-1</sup> fat) (Table 3). Neither US ASTM D6751 nor EN 14214 standards specifies values for the HHV, LCSF, SV, and DU criteria (Table 3). High IV value may lead to the occurrence and build-up of glycerides, and grease precipitation in the motor (Arguelles et al., 2018).

CFPP indicates the flow performance of biodiesel at low temperatures (Gayathri et al., 2018). The CFPP values for strains S4BB and S9BB were 5.6 °C and 6.9 °C, respectively, slightly higher than the limit specified by Biodiesel standard EN 14214 ( $\leq 5$ / $\leq -20$  °C) given the high SFA level (Table 3). Whereas, the CFPP value for the S4B11 strain has a value of 4.2 °C (Table 3) meeting the values in EN 14214 biodiesel standards ( $\leq 5$ / $\leq -20$ ). High CFPP values are a characteristic of most fuels produced by microalgal species. However, additives or mixing biodiesel with petrodiesel can be used to lower CFPP values (Knothe, 2008).

Overall, the studied thermophilic *Mastigocladus* strains had better biodiesel proprieties, or they fell within the same range of those reported for other plants or cyanobacteria feedstocks. The obtained values met the required fuel properties of international biodiesel standards (Table 3), along with SFA dominance, showing that the studied cyanobacteria are favourable for producing high-quality biodiesel (Oliveira et al., 2018).

Efforts for the characterisation of algae from unique environments should continue for both biodiversity conservation and biotechnology goals (Hu et al., 2008), isolating microalgae with high productivity and interesting lipid composition from specific and extreme habitats and optimising their growth conditions to generate high biomasses for biodiesel production (Lee et al., 2014; Arif et al., 2019) or other potentially interesting compounds.

**Table 3**

Comparison of predicted biodiesel properties from FA profiles of the three cyanobacterial strains of this study compared to others selected fuel producer organisms.

Cyanobacterial strains	Biodiesel standard <i>ASTM D6751</i>	Biodiesel standard EN <i>14214</i>	<i>Mastigocladus laminosus</i> S4BB This study	<i>Mastigocladus laminosus</i> S4B11 This study	<i>Mastigocladus laminosus</i> S9BB This study	<i>Nostoc calcicola</i> MBDU 602 (Anahas and Muralitharan, 2018)	<i>Desmonostoc muscorum</i> MBDU 105 (Anahas and Muralitharan, 2018)	<i>Myxosarcina</i> sp. (Jawaharraja et al., 2015)	Algae (Yaşar, 2020)	Soybean (Yaşar, 2020; Demirbaş, 2003)	Sunflower (Yaşar, 2020; Demirbaş, 2003)
Fatty Acid Composition (% wt).	/	/	SFA 58.07 MUFA 36.61 PUFA 0.79	SFA 55.47 MUFA 40.10 PUFA 0.34	SFA 58.79 MUFA 31.72 PUFA 1.76	SFA 61.78 MUFA 6.46 PUFA 5.56	SFA 66.30 MUFA 8.25 PUFA 13.62	SFA 39 ± 5.3 MUFA 61 ± 5 PUFA nd	SFA 18.33 MUFA 56.21 PUFA 25.44	SFA 16.34 MUFA 24.91 PUFA 58.66	SFA 10.14 MUFA 36.37 PUFA 53.33
IV (gI <sub>2</sub> /100 g fat)	/	≤120	35.00	37.00	32.43	23.73	40.36	56.00	/	69.82	132.32
CN	≥47	≥51	65.00	65.02	66.87	201.50	65.39	60.00	59.00	38.10	50.00
OS (hrs)	≥3	≥8	151.00	349.44	69.59	7.09	6.40	nd	2.30	1.50	0.90
DU (wt. %)	/	/	38.10	40.78	35.24	17.59	35.50	61.00	107.09	142.25	143.02
SV (mg/g)	/	/	202.20	201.76	195.84	68.04	193.73	210.00	/	220.78	34.40
ν (mm <sup>2</sup> /s)	1.9–6.0	3.5–5.0	3.60	3.69	3.47	2.15	3.96	–1.50	4.55	4.37	4.30
ρ (kg/m <sup>3</sup> )	/	860–900	830.00	834.00	802.00	880.00	870.00	1100.00	881.00	882.00	882.00
LCSF (wt. %)	/	/	7.00	6.59	7.47	58.36	22.71	6.00	5.36	3.73	3.23
CFPP (°C)	/	≤5/≤–20	5.60	4.21	6.99	166.89	54.89	2.00	–14.00	–6.00	–4.00
HHV (MJ/kg)	Report	Report	37.50	37.75	36.27	40.81	40.88	35.00	–	39.60	39.60

#### 4. Conclusion

The strains of *M. laminosus* isolated from the Algerian hot springs showed an interesting FA profile under laboratory conditions that may be suitable for mass cultivation and could represent a source of essential FA of commercial interest. They exhibit a suitable FA profile with high proportion of SFA and MUFA with values ranging from 55.91% to 59.37%, and 38.39%–43.54%, respectively. The main fatty acid was palmitic acid (16:0), with values within the 51.41–53.16% range and with an average chain length of C14 to C20, representing an excellent raw material for biodiesel production. The calculated biodiesel fuel properties based on the fatty acid composition mainly the iodine value (IV, 35.00 gI<sub>2</sub>/100 g fat), saponification value (SV, 202.20 mg/g), cetane number (CN, 65.00) and unsaturation degree (DU, 38.10 wt %) were in accordance with the international standards ASTM D6751 (USA) and EN 14214. Hot springs in Algeria and elsewhere should be more deeply studied to better understand their biodiversity and their potential biotechnological uses.

#### Funding

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

#### Authorship contributions

Category 1: Conception and design of study: S. Boutarfa, M<sup>ed</sup>. M. Senoussi, M. Aboal.

Acquisition of data: S. Boutarfa, M<sup>ed</sup>. M. Senoussi, M. Aboal. D. González-Silvera, J. Á López-Jiménez.

Analysis and/or interpretation of data: S. Boutarfa, D. González-Silvera, J. Á. López-Jiménez, M. Aboal.

Category 2: Drafting the manuscript: S. Boutarfa, M. Aboal. Revising the manuscript critically for important intellectual content: S. Boutarfa, M. Senoussi, D. González-Silvera, J. Á. López-Jiménez, M. Aboal.

Category 3: Approval of the version of the manuscript to be published (the names of all authors must be listed): Boutarfa Soumia, Senoussi Mohamed Mourad, González-Silvera Daniel. <sup>c</sup>, López-Jiménez José Ángel, Aboal Marina.

#### Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

#### Acknowledgments

The Algology Laboratory from Murcia University (Spain) provided all the facilities and materials to conduct the research. Thanks are due to María del Mar Santiago from the Agroforestry Research Service (SEAF) of Murcia University and María Ángeles Caravaca from the Botany Area of Murcia University for technical support with cultures. We also wish to thank the Algerian Ministry for Higher Education and Research. The manuscript has been proofread by a native English translator of scientific works (H&A Traducciones).

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2022.102373>.

#### References

- Alcamán, M.E., Fernández, C., Delgado, A., Bergman, B., Díez, B., 2015. The cyanobacterium *Mastigocladus* fulfills the nitrogen demand of a terrestrial hot spring microbial mat. *ISME J* 9, 2290–2303. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.63>.
- Amarouche-Yala, S., Benouadah, A.E.O., Bentabet, A., López-García, P., 2014. Morphological and phylogenetic diversity of thermophilic cyanobacteria in Algerian hot springs. *Extremophiles* 18, 1035–1047. <https://doi.org/10.1007/s00792-014-0680-7>.
- Anahas, A.M.P., Muralitharan, G., 2015. Isolation and screening of heterocystous cyanobacterial strains for biodiesel production by evaluating the fuel properties from fatty acid methyl ester (FAME) profiles. *Bioresour Technol* 184, 9–17. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.11.003>.
- Anahas, A.M.P., Muralitharan, G., 2018. Characterization of heterocystous cyanobacterial strains for biodiesel production based on fatty acid content analysis and hydrocarbon production. *Ener Conver Manag* 157, 423–437. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2017.12.012>.
- Arguelles, E.D., Laurena, A.C., Monsalud, R.G., Martínez-Goss, M.R., 2018. Fatty acid profile and fuel-derived physico-chemical properties of biodiesel obtained from an indigenous green microalga, *Desmodesmus* sp. (I-AU1), as potential source of renewable lipid and high quality biodiesel. *J. Appl Phycol* 30, 411–419. <https://doi.org/10.1007/s10811-017-1264-6>.
- Arif, M., Bai, Y., Usman, M., Jalalah, M., Harraz, F.A., Al-Assiri, M.S., Li, X., Salama, E.S., Zhang, C., 2019. Highest accumulated microalgal lipids (polar and non-polar) for biodiesel production with advanced wastewater treatment: role of lipidomics. *Bioresour Technol* 298, 122299. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122299>.
- ASTM - American society for testing and materials, D6751, 2012. Standard Specification for Biodiesel Fuel Blend Stock (B100) for Middle Distillate Fuels.
- Benamara, A., Kherici-Bousnoubra, H., Bouabdallah, F., 2017. Thermo-mineral waters of Hammam Meskoutine (north-east Algeria): composition and origin of mineralization. *Journal of Water and Land Development* 34, 47–57. <https://doi.org/10.1515/jwld-2017-0037>.
- Berkani, C., Houha, B., 2017. Physico-Chemical and therapeutic characteristics of the thermo-mineralwaters of Khenchela region (Northeastern Algeria). *JMES* 8, 1546–1553. ID: 26810973.
- Castenholz, R.W., 1976. The effect of sulfide on the blue-green algae of hot springs. I. New Zealand and Iceland. *J. Phycol* 12, 54–68. <https://doi.org/10.1007/BF02010399>.
- Castenholz, R.W., 1996. Endemism and biodiversity of thermophilic cyanobacteria. *Nova Hedwigia Beih.* 112, 33–48.
- Chenaker, H., Houha, H., Vincent, V., 2018. Hydrogeochemistry and geothermometry of thermal water from northeastern Algeria. *Geothermics* 75, 137–145. <https://doi.org/10.1016/j.geothermics.2018.04.009>.
- Christie, W.W., 2003. *Lipid Analysis in Isolation, Separation, Identification and Structural Analysis of Lipids*, third ed. Bridgewater, England.
- Cordeiro, R.S., Vaz, I.C.D., Magalhães, S.M.S., Barbosa, F.A.R., 2017. Effects of nutritional conditions on lipid production by cyanobacteria. *An Acad Bras Cienc* 89, 2021–2031. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201720150707>.

- Demirbaş, A., 2003. Chemical and fuel properties of seventeen vegetable oils. *Energy Sourc* 25, 721–728. <https://doi.org/10.1080/00908310390212426>. EN, 14214, 2012. *Automotive Fuels—Fatty Acid Methyl Esters (FAME) for Diesel Engines—Requirements and Test Methods*. European committee for standardization.
- Finsinger, K., Scholz, I., Serrano, A., Morales, S., Uribe-Lorio, L., Mora, M., Sittenfeld, A., Weckesser, J., Hess, W.R., 2008. Characterization of true-branching cyanobacteria from geothermal sites and hot springs of Costa Rica. *Environ Microbiol* 10, 460–473. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01467.x>.
- Folch, J., Lee, M., Stanley, G.A., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 226, 497–509. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)64849-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)64849-5).
- Foued, B., Hénia, D., Lazhar, B., Nabil, M., Nabil, C., 2017. Hydrogeochemistry and geothermometry of thermal springs from the Guelma region, Algeria. *J Geol Soc India* 90, 226–232. <https://doi.org/10.1007/s12594-017-0703-y>.
- Fuad Hossain, M.D., Ratnayake, R.R., Mahub, S., Wasantha Kumara, K.L., Magana-Arachchi, D.N., 2020. Identification and culturing of cyanobacteria isolated from freshwater bodies of Sri Lanka for biodiesel production. *Saudi J. Biol. Sci.* 27, 1514–1520. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.03.024>.
- Gayathri, M., Shunmugam, S., Mugasundari, A.V., Rahman, P.K.S.M., Muralitharan, G., 2018. Growth kinetic and fuel quality parameters as selective criterion for screening biodiesel producing cyanobacterial strains. *Bioresour Technol* 247, 453–462. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.064>.
- Gonzalez-Silvera, D., Pérez, S., Korbee, N., Figueroa, F.L., Asencio, A.D., Aboal, M., López-Jiménez, J.A., 2017. Effects of global change factors on fatty acids and mycosporine-like amino acid production in *Chroocoece richteriana* (Rhodophyta). *J. Phycol.* 53, 999–1009. <https://doi.org/10.1111/jpy.12560>.
- Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M., Darzins, A., 2008. Microalgal triacylglycerols as feed stocks for biofuel production: perspectives and advances. *J Plant* 54, 621–639. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03492.x>.
- Jawaharrraja, K., Karpagam, R., Ashokkumar, B., Kathiresan, S., Varalakshmi, P., 2015. Green renewable energy production from *Myxosarcina* sp: media optimization and assessment of biodiesel fuel properties. *RSC Adv* 5, 51149–51157. <https://doi.org/10.1039/C5RA09372D>.
- Jones, B., Renaut, R.W., 2011. Hot springs and geysers. In: Reiter, J., Thiel, V. (Eds.), *Encyclopedia of Geobiology*. Encyclopedia of Earth Sciences Series. Springer, Dordrecht. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9212-1\\_103](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9212-1_103).
- Karatay, S.E., Dönmez, G., 2011. Microbial oil production from thermophile cyanobacteria for biodiesel production. *Appl. Energy*. 88, 3632–3635. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2011.04.010>.
- Kastovsky, J., Johansen, J.R., 2008. *Mastigocladus laminosus* (Stigonematales, Cyanobacteria): phylogenetic relationship of strains from thermal springs to soil-inhabiting genera of the order and taxonomic implications for the genus. *Phycologia* 47, 307–320. <https://doi.org/10.2216/PH07-69.1>.
- Knothe, G., 2008. Designer' biodiesel: optimizing fatty ester composition to improve fuel properties. *Energy Fuels* 22, 1358–1364. <https://doi.org/10.1021/ef700639e>.
- Komárek, J., 2013. *Cyanoprokaryota: 3rd part: heterocystous genera*. In: Büdel, B., Gärtner, G., Krienitz, L., Schagerl, M. (Eds.), *Süßwasserflora von Mitteleuropa. Springer Spektrum, Berlin, Heidelberg, Germany*, pp. 1–1130.
- Kumar, R., Biswas, K., Singh, P.K., Singh, P.K., Elumalai, S., Shukla, P., Pabbi, S., 2017. Lipid production and molecular dynamics simulation for regulation of *accD* gene in cyanobacteria under different N and P regimes. *Biotechnol Biofuels* 10, 94. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0776-2>.
- Lee, K., Eisterhold, M.L., Rindi, F., Palanisami, S., Nam, P.K., 2014. Isolation and screening of microalgae from natural habitats in the midwestern United States of America for biomass and biodiesel sources. *J Nat Sci Biol Med* 5, 333–339. <https://doi.org/10.4103/0976-9668.136178>.
- Los, D.A., Mironov, K.S., 2015. Modes of fatty acid desaturation in cyanobacteria: an update. *Life* 5, 554–567. <https://doi.org/10.3390/life5010554>.
- Lu, Y., Zhuo, C., Lib, Y., Lia, H., Yanga, M., Xua, D., He, H., 2020. Evaluation of filamentous heterocystous cyanobacteria for integrated pig-farm biogas slurry treatment and bioenergy production. *Bioresour Technol* 297, 122418. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122418>.
- Lukavský, J., Furnadzhieva, S., Pilarski, P., 2011. Cyanobacteria of the thermal spring at pancharvevo, Sofia, Bulgaria. *Acta Bot Croat* 70, 191–208. <https://doi.org/10.2478/v10184-010-0015-4>.
- Mandotra, S.K., Kumar, P., Suseela, M.R., Ramteke, P.W., 2014. Freshwater green microalga *Scenedesmus abundans*: a potential feedstock for high quality biodiesel production. *Bioresour Technol* 156, 42–47. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.12.127>.
- Mata, T.M., Martins, A.A., Caetano, N.S., 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. *Renew Sustain Energy Rev* 14, 217–232. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.07.020>.
- McGregor, G.B., Rasmussen, J.P., 2008. Cyanobacterial composition of microbial mats from an Australian thermal spring: a polyphasic evaluation. *FEMS Microbiol Ecol* 63, 23–35. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2007.00405.x>.
- Miller, S.R., Purugganan, M.D., Curtis, S.E., 2006. Molecular population genetics and phenotypic diversification of two populations of the thermophilic cyanobacterium *Mastigocladus laminosus*. *Appl Environ Microbiol* 72, 2793–2800. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.4.2793-2800.2006>.
- Minhas, A.K., Hodgson, P., Barrow, C.J., Adhoseya, A., 2016. A review on the assessment of stress conditions for simultaneous production of microalgal lipids and carotenoids. *Front Microbiol* 7, 546. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00546>.
- Mondal, M., Khan, A.A., Halder, G., 2019. Estimation of biodiesel properties based on fatty acid profiles of *Chlamydomonas* sp. BTA 9032 and *Chlorella* sp. BTA 9031 obtained under mixotrophic cultivation conditions. *Biofuels* 12, 1175–1181. <https://doi.org/10.1080/17597269.2019.1600453>.
- Mostafa, S.S.M., El-Gendy, N.S.h., 2017. Evaluation of fuel properties for microalgae *Spirulina platensis* bio-diesel. *Arab J Chem* 10, S2040–S2050. <https://doi.org/10.1016/j.arabj.2013.07.034>.
- Murata, N., Wada, H., Gombos, Z., 1992. Modes of fatty-acid desaturation in cyanobacteria. *Plant Cell Physiol* 33, 933–941. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a078344>.
- Mutanda, T., Ramesh, D., Karthikeyan, S., Kumari, S., Anandraj, A., Bux, F., 2011. Bioprospecting for hyper-lipid producing microalgal strains for sustainable biofuel production. *Bioresour Technol* 102, 57–70. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.077>.
- Nagappan, S., Bhosale, R., Nguyen, D.D., Pugazhendhi, A., Tsai, P.-C., Chang, S.W., Ponnusamy, V.K., Kumar, G., 2020. Nitrogen-fixing cyanobacteria as a potential resource for efficient biodiesel production. *Fuel* 279, 118440. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.118440>.
- Nandagopal, P., Steven, A.N., Chan, L.-W., Rahmat, Z., Jamaluddin, H., Mohd Noh, N.I., 2021. Bioactive metabolites produced by cyanobacteria for growth adaptation and their pharmacological properties. *Biology* 10, 1061. <https://doi.org/10.3390/biology10101061>.
- Ogunkunle, O., Ahmed, N.A., 2021. Overview of biodiesel combustion in mitigating the adverse impacts of engine emissions on the sustainable human–environment scenario. *Sustainability* 13, 5465. <https://doi.org/10.3390/su13105465>.
- Olguin, E.J., 2012. Dual purpose microalgae–bacteria-based systems that treat wastewater and produce biodiesel and chemical products within a Biorefinery. *Biotechnol. Adv.* 30, 1031–1046. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.05.001>.
- Oliveira, D.D., Vasconcelos, C.T., Feitosa, A.M.T., Aboim, J.B., Oliveira, A.N., Xavier, L.P., Santos, A.S., Gonçalves, E.C., Filho, G.N.R., Nascimento, L.A.S., 2018. Lipid profile analysis of three new Amazonian cyanobacteria as potential sources of biodiesel. *Fuel* 234, 785–788. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.03.024>.
- Ortiz-Martínez, V.M., Andreo-Martínez, P., García-Martínez, N., de los Ríos, A.P., Hernández-Fernández, F.J., Quesada-Medina, J., 2019. Approach to biodiesel production from microalgae under supercritical conditions by the PRISMA method. *Fuel Proc Technol* 191, 211–222. <https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2019.03.031>.
- Patel, V.K., Sundaram, S., Patel, A.K., 2018. Characterization of seven species of cyanobacteria for high-quality biomass production. *Arab J Sci Eng* 43, 109–121. <https://doi.org/10.1007/s13369-017-2666-0>.
- Prabhu, K., Jayakuma, r A., Sreelakshmi, K.P., Raha, A., Maitra, M., Radha, P., 2019. Utilization of microbial oil produced from *Pichiakudriavzevii* NCIM 3653 using paper mill sludge as an alternative substrate for biodiesel synthesis. *Biofuels* 12, 1309–1316. <https://doi.org/10.1080/17597269.2019.1619029>.
- Prihantini, N.B., Nurmarina, A., Handayani, S., Sjamsuridzal, W., Wardhana, W., 2021. Biomass production of *Mastigocladus* (cyanobacteria) HS-46 in bold basal medium and npk medium to produce high lipid content. *OP Conf. Series: Earth and Environmental Science* 858, 012012. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/858/1/012012>.
- Rahman, A., Prihantini, N.B., Nasruddin, N., 2020. Biomass production and synthesis of biodiesel from microalgae *synechococcus* hs-9 (Cyanobacteria) cultivated using bubble column photobioreactors. *Evergreen* 7, 564–570. <https://doi.org/10.5109/4150507>.
- Rezanka, T., Lukavský, J., Siristova, L., Sigler, K., 2012. Regioisomer separation and identification of triacylglycerols containing vaccenic and oleic acids, and a- and c-linolenic acids, in thermophilic cyanobacteria *Mastigocladus laminosus* and *Tolypothrix* sp. *Phytochem* 78, 147–155. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2012.02.028>.
- Righini, H., Francioso, O., Martel Quintana, A., Roberti, R., 2022. Cyanobacteria: a natural source for controlling agricultural plant diseases caused by fungi and



- oomycetes and improving plant growth. *Horticulturae* 8, 58. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8010058>.
- Sadvakasova, A.K., Akmukhanova, N.R., Bolatkhan, K., Zayadan, B.K., Ussebayeva, A.A., Bauenova, M.O., Akhmetkaliyeva, A.E., Allakhverdiev, S.I., 2019. Search for new strains of microalgae-producers of lipids from natural sources for biodiesel production. *Inter J Hydrog Energ* 44, 5844–5853. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.01.093>.
- Saibi, H., 2009. Geothermal resources in Algeria. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 13, 2544–2552. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.06.019>.
- Sharafi, H., Fooladi, J., Tabatabaei, M., Heravi, M.M., Memari, H.R., 2021. Lipid production capacity of a newly characterized cyanobacterial strain *Synechocystis* sp. MH01: a comparative performance evaluation of cyanobacterial lipid-based biodiesel. *Iran. J. Biotechnol.* 19, e2313. <https://doi.org/10.30498/IJB.2021.2313>.
- Singh, J.S., Kumar, A., Singh, M., 2019. Cyanobacteria: a sustainable and commercial bio-resource in production of bio-fertilizer and bio-fuel from waste waters. *Environ Dev Sustain Environmental and Sustainability Indicators* 3–4, 100008. <https://doi.org/10.1016/j.indic.2019.100008>.
- Smith-Bädorf, H.D., Chuck, C.J., Mokebo, K.R., Macdonald, H., Davidson, M.G., Scott, R.J., 2013. Bioprospecting the thermal waters of the Roman baths: isolation of oleaginous species and analysis of the FAME profile for biodiesel production. *AMB Express* 3, 9. <https://doi.org/10.1186/2191-0855-3-9>.
- Talebi, A.F., Tabatabaei, M., Chisti, Y., 2014. User-friendly software for predicting the properties of prospective biodiesel. *Biofuel Res J* 2, 55–57. <https://doi.org/10.18331/BRJ2015.1.2.4>.
- Uma, V.S., Dineshababu, G., Uma, L., Prabakaran, D., 2020. Survey and isolation of marine cyanobacteria from eastern coast of India as a biodiesel feedstock. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 24, 101541. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101541>.
- Vargas, M.A., Rodríguez, H., Moreno, J., Olivares, H., Del Campo, J.A., Rivas, J., Guerrero, M.G., 1998. Biochemical composition and fatty acid content of filamentous nitrogen-fixing cyanobacteria. *J Phycol* 34, 812–817. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.1998.340812.x>.
- Verma, N.M., Mehrotra, S., Shukla, A., Mishra, B.N., 2010. Prospective of biodiesel production utilizing microalgae as the cell factories: a comprehensive discussion. *Afr. J. Biotechnol.* 9, 1402–1411. <https://doi.org/10.5897/AJBx09.071>.
- Yaşar, F., 2020. Comparison of fuel properties of biodiesel fuels produced from different oils to determine the most suitable feedstock type. *Fuel* 264, 116817. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2019.116817>.
- Zaki, M.A., Ashour, M., Heneash, A.M.M., Mabrouk, M.M., Alprol, A.E., Khairy, H.M., Nour, A.M., Mansour, A.T., Hassanien, H.A., Gaber, A., Elshobary, M.E., 2021. Potential applications of native cyanobacterium isolate (*Arthrospira platensis* NIOF17/003) for biodiesel production and utilization of its byproduct in marine rotifer (*Brachionus plicatilis*) production. *Sustainability* 13, 1769. <https://doi.org/10.3390/su13041769>.