sUNIVERSITE KASDI MERBAH-OUARGLA

FACULTÉ DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

MEMOIRE DE FIN D'ETUDE

POUR L'OBTENTION DU DIPLOME DE MASTER ACADEMIQUE

Domaine : Science de la nature et de la vie

Filière: biologie

Spécialité : Microbiologie fondamental et appliquée

Présenter par : FROUHAT AICHA
DRID AMINA

Thème

Recherche et identification de quelques souches des bactéries acétiques issues du vinaigre traditionnel de datte du cultivar Deglet-Nour : Etude de la thermotolérance

Devant le Jury:

Président :	BAYOUSSEF ZAHIA	**MCB**	**Université Kasdi Marbah de Ouargla**
Examinateur :	BOUDERHEM AMEL	**MAA**	**Université Kasdi Marbah de Ouargla**
Promoteur :	HAMDI WASSILA	**MAA**	**CENTRE Université de Tamanghasstte**
Co-promoteur :	BEN AISSA ATIKA	**MCB**	**Université Kasdi Marbah de Ouargla**

Année universitaire : 2016/2017

DEDICACE

Je dédie ce modeste travail s'est achevé grâce à l'aide de dieu a :
A mes très chers parents pour leur encouragement qui n'ont jamais cessés de mes consentir durant mes années d'études, je demandée à Dieu les protéger et leur réserver une longue vie.
A ma moitié, l'ange de ma vie, mon cher fiancé.
A mes chères sœurs et frères.
A mes oncles et tantes paternels et maternels et leurs enfants.
A toue ma grandfamille.
A mes chères amies : Hanane, Aicha, Sara, Dalalla, Nora, Majda, Mereime, Hadjre, Sakina,Asma
Sans oublier mes amies de section microbiologie promo 2016/2017 en particulier mon binôme AICHA
Mes enseignants pondant les cinq années de formation et aux tous les membres de l'ITAS sans exception.

AMINA

Dédicace

Je dédie ce modeste travail s'est achevé grâce à l'aide de dieu a :

A mes très chers parents pour leur aides, encouragements soutiens, et leur patiences pendant mes années d'études, qui ont été comme de bougie qui brulait pour éclaires mon chemin, source d'amour et d'affection, mes très chers parents « mon père : Mohamad, et ma mère : fatma ».

A ma très chère grand-mère« sassia kiws ».

A mes très chères tantes « fatna et mabrouka ».

A mes chère sœurs mes frères mes chers nièces en particulière rital et neveux et touts ma grande famille «Frouhat et Ben Fardia ».

A Mes très chères amies Hind ,Naima ,Maroua ,Sara ,Asma ,Sara, Aicha ,Yamina ,Hanan ,Amina ,Mabroka Mariam ,Aicha ;Masaoda ,Imane ,Rebha ,Saliha ,Nassima ,Fatma Mardhia pour les bons moments passés ensemble et leurs encouragements précieux lors de l'élaboration de cette thèse .

**A tous ceux ou celles qui ont contribué de près ou de loin sans particulière.*

Frouhat aicha

Remerciments

Au terme de ce travail, nous tenons a exprimer nos remerciements et notre profondre gratitude : avant tout à *"ALLAH"* le tout puissant qui nous a donné le courage et la force

pour mener ce travail jusqu'au bout

Nos remerciements vont affectueusement à notre encadreur*:*

***Mme Hamdi Wassila (MAA** centre de université de Tamanrhasstte**)** et*

***Mme Ben aissa atika** (**MCB** de département de biologie université d'Ouargla)*
Pour, avoir encadré ce travail, pour son aide, ses conseils et sa patience.

Nous voudrons également exprimer notre vif remerciement pour la présidente :
*A **Mme Bayoussef Zahia** (**MCB** de département de biologie université d'Ouargla)*
nous voudrons également exprimer notre vif remerciement pour l'examinatrice :
*A **Melle Boudrheme Amel** (**MAA** de département de biologie université de Ouargla) d'avoir accepté d'examiner et de juger ce travail.*
Nous adressons aussi notre vif remerciement à tous nos professeurs qui ont contribué à notre formation tout au long de ces cinq ans.

*Notre remerciement va également à tout le personnel de la bibliothéque et de laboratoir surtout **M Bgari Laiche** qui ont si généreusement partagé avec nous leurs temps, leurs expériences et leurs connaissances.*

En fin nous sommes très reconnaissante à toutes les personnes qui nous ont aidé de prés ou de loin.

Table des matières

Liste Des Tableaux .....

Liste Des Photos .....

Liste Des Figures .....

Liste des abréviations .....

Introduction..... *1*

Chapitre I:Vinaigre de datte

I.1.Historique *3*

I.2. Production de dattes *3*

I.2.1.Production de datte en Algérie..... *3*

I.3.Valorisation et transformation des dattes..... *4*

I.3.1.Transformation traditionnelle..... *4*

I.3.1.1.Farine ou poudre de dattes *4*

I.3.1.2. Sirop de dattes *4*

I.3.1.3. Jus de dattes..... *4*

I.3.1.4.Margarine *5*

I.4. Vinaigre *5*

I.4.1. Définition..... *5*

I.4.2.Vinaigre de datte *5*

I.4.3. Technique d'élaboration du vinaigre traditionnelle..... *6*

I.4.4.Elaboration de vinaigre traditionnel..... *6*

I.4.5. Processus de fermentation..... *6*

I.4.5.1 Fermentions alcoolique *6*

I.4.5.2. Fermentation acétique *7*

I.4.6. Composition du vinaigre *7*

I.4.7.Les procédés d'acétification *8*

I.4.7.1. Les processus traditionnels « lents »..... *8*

I.4.7.1.1.Le procédé d'Orléans 8

I.4.7.1.2.Le procédé de Schuzenbach 9

I.4.7.2.Les processus modernes « rapides » 10

I.4.7.2.1.La culture immergée (submergée) 10

1.4.8. Développements récents des processus d'acétification 10

I.4.9. Utilisation du vinaigre 11

I.4.10. Les vertus du vinaigre 11

Chapitre II : Bactéries acétiques

II.1. Bactéries acétiques 13

II.2.Besoins nutritionnels 14

II.3.Facteurs influençant sur la croissance des bactéries acétiques 14

II.3.1.Oxygène 14

II.3.2. Température 15

II.3.3. pH 15

II.3.4.Concentration en éthanol 15

II.3.5.Lumières 15

II.3.6.Acide acétique 15

II.4.Classification 15

II.4.1.Caractères culturaux 16

II.4.2.Caractères morphologiques et structuraux 17

II.4.3.Caractères biochimiques 18

II.4.3.1.Réaction de la catalases 18

II.4.3.2.Transformation de l'alcool en acide acétique 18

II.4.3.3.Transformation d'acide lactique en acide acétique 18

II.4.3.4.Pouvoir cétogène 18

II.4.3.5.Production de cellulose 19

II.5.Métabolisme 19

II.5.1.Oxydation des hydrates de carbone 19

II.5.2.Ethanol 19

II.5.3.Sucres et Alcools..... 20

II.5.4.Oxydation de l'acétate 20

Chapitre III:Matériel et méthodes

III.1. L'objectif de travail..... 21

III.2. Méthodologie..... 21

III.2.1.Echantillonnage 21

III.2.2.Techniques d'isolement..... 21

III.2.3.Purification des souches 21

III.3.Pré-identification des bactéries acétiques..... 22

III.3.1.Etudes des caractères culturaux..... 22

III.3.2.Etudes des caractères morphologiques..... 22

III.3.2.1. Aspect microscopiques..... 22

III.3.2.1.3.Coloration de Gram 23

III.3.3.Etudes des caractères biochimiques 23

III.3.3.1.Test de pouvoir suroxydant 23

III.3.3.2.Test de catalase..... 23

III.3.3.3.Pouvoir cétogène 24

III.3.3.4.Culture en présences d'ammonium comme seule source d'azote et de 3% d'éthanol 24

III.3.3.5.Présence d'un pigment sur le milieu d'isolement 24

III.3.3.6.Formation d'acide gluconique à partir du glucose..... 24

III.3.3.7.Formation d'acide cétogluconique 25

III.3.3.8.Production de cellulose..... 25

III.4.Etude de la tolérance des bactéries acétiques aux différents températures..... 25

III.5.Conservation des souches isolées a longue durée 25

Chapitre IV :Résultats et discussion

IV. 1. Résultats d'isolement et purification des colonies des bactéries acétiques *28*

IV.2. Résultats des examens microscopiques des colonies isolées..... *29*

IV.3. Résultats de la pré-identification des bactéries acétiques..... *30*

IV.4. Etude de la tolérance des bactéries acétiques aux températures élève *37*

IV.5 .Etude de la cinétique de la croissance des souches isolées (S_1, S_2 et S_3) à différentes températures (de 30°C à 60°C)..... *43*

Conclusion *48*

Références bibliographiques..... *50*

Liste Des Tableaux

Tableau	Titre	Page
I	Caractéristiques biochimiques des groupes des bactéries acétiques.	**19**
II	Caractères culturaux des colonies apparues sur milieu naturel des différents échantillons.	**28**
III	Caractéristiques morphologiques des bactéries acétiques après coloration de Gram.	**30**
IV	Caractères physiologiques et biochimiques des souches des bactéries acétiques isolés.	**30**
V	Caractéristiques des *Acétobacter* et des *Gluconobacter*.	**37**

Liste Des Photos

Photo	Titre	Page
01	Aspect des colonies des bactéries acétiques sur milieu naturel.	**28**
02	Aspect des colonies après une 4eme purification des bactéries acétiques sur milieu gélosé de Frateur.	**29**
03	Aspect des cellules isolées après coloration de Gram sous microscope optique (Grossissement x100).	**29**
04	Résultats de test de pouvoir suroxydant.	**31**
05	Test de catalase.	**32**
06	Test de pouvoir cétogène des souches (S_1, S_2 et S_3).	**32**
07	Culture sur milieu de Hoyer.	**33**
08	Test de production de cellulose.	**34**
09	Résultats de formation d'acides gluconique à partir de glucose.	**35**
10	Résultats de formation d'acide cétogluconique.	**35**

Liste Des Figures

Figure	Titre	Page
01	Représentation graphique des deux méthodes de production de vinaigre.	**08**
02	Schéma d'un tonneau préparé pour l'acétification selon le procédé d'Orléans.	**09**
03	Schéma de l'acétification à biomasse fixée sur des copeaux de hêtre.	**09**
04	Acetator de Frings.	**10**
05	Morphologie d'*Acétobacter aceti.*	**17**
06	Réaction de formation de dihydroxyacétone à partir de glycérol.	**18**
07	Taux de croissance des souches S_1, S_2 et S_3 isolée de vinaigre traditionnel de datte pendant 24 à 168 heures d'incubation à 30°C.	**38**
08	Taux de croissance des souches S_1, S_2 et S_3 isolée de vinaigre traditionnel de datte pendant 24 à 168 heures d'incubation à 35°C.	**39**
09	Taux de croissance des souches S_1, S_2 et S_3 isolée de vinaigre traditionnel de datte pendant 24 à 168 heures d'incubation à 40°C.	**39**
10	Taux de croissance des souches S_1, S_2 et S_3 isolée de vinaigre traditionnel de datte pendant 24 à 168 heures d'incubation à 45°C.	**40**
11	Taux de croissance des souches S_1, S_2 et S_3 isolée de vinaigre traditionnel de datte pendant 24 à 168 heures d'incubation à 50°C.	**41**
12	Taux de croissance des souches S_1, S_2 et S_3 isolée de vinaigre traditionnel de datte pendant 24 à 168 heures d'incubation à 55°C.	**41**
13	Taux de croissance des souches S_1, S_2 et S_3 isolée de vinaigre traditionnel de datte pendant 24 à 168 heures d'incubation à 60°C.	**42**
14	Cinétique de croissance de la souche S_1 isolée de vinaigre traditionnel de datte pendant 24 à 168 heures d'incubation 30°C à 60°C.	**44**
15	Cinétique de croissance de la souche S_2 isolée de vinaigre traditionnel de datte pendant 24 à 168 heures d'incubation 30°C à 60°C.	**45**
16	Cinétique de croissance de la souche S_3 isolée de vinaigre traditionnel de datte pendant 24 à 168 heures d'incubation 30°C à 60°C.	**46**

Liste des abréviations

NAD	Nicotinamide adénine dinucléotide
NADP	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
SM	Solution mère
EVDN	Vinaigre de datte du cultivar Daghlet –Nour
EVHDN	Vinaigre de datte du cultivar Hchef Daghlet Nour
ADH	Alcool déshydrogénase
ALDH	Aldéhyde déshydrogénase

Introduction

Depuis longtemps les dattes possèdent une originalité profonde dans les coutumes et les habitudes alimentaire de l'homme saharien, et le palmier dattier reste une culture par excellence des régions chaudes et sèches comme le Sahara **(BENHAFID, 1990).**Certaines variétés de dattes d'intérêt commercial négligeable pourraient être transformées pour obtenir divers nouveaux produits **(BOUGHNOU, 1988).**

Les dattes de part leur grande richesse en sucres, peuvent servir en tant que matière première en fermentation pour la production de divers métabolites tels que l'alcool, le vinaigre, l'acide citrique et d'autres substances énergétiques **(BEDRANI et BENZIOUCHE, 2000).**

Depuis longtemps les populations sahariennes produisent du vinaigre traditionnel de dattes en utilisant souvent des variétés de faible valeur marchande. Ce vinaigre est obtenu par voie biologique, après double fermentation: Fermentation alcoolique du jus de dattes où les sucres seront transformés en éthanol (vin) de dattes, en anaérobiose par des levures ; Fermentation acétique du vin de dattes, réalisée en aérobiose par des bactéries acétiques, où l'éthanol métabolisé par les levures sera transformé en acide acétique (constituant principal du vinaigre) **(BOUGHNOU ,1988).**

Le vinaigre est un produit essentiel dans la cuisine. Il a de multiples usages. Il empêche l'oxydation des fruits et des légumes, Il prolonge la durée de vie des aliments**.** En outre, les anciens médecins arabes ont parlé du vinaigre en citant ces effets utiles pour la santé. Il est utilisé pour soigner plusieurs maladies et infections tel que les maux de tête et de gorge, les piqûres des insectes, etc…**(BOUGHNOU ,1988).**

L'objectif de notre travail consiste en la recherche, l'isolement et la pré-identification de quelques souches de bactéries acétiques thermotolérantes de type saharienne issues du vinaigre traditionnel de datte du cultivar Deglet Nour et Hchef Deglet Nour à caractère industriel.

Cette étude est répartie en trois parties, une partie bibliographique dans laquelle un ensemble de données et d'informations concernant notre thème ont été collecté. Cette partie comporte deux chapitres :

- Le *premier chapitre* est un rappelle des généralités sur les vinaigres
- Le *deuxième chapitre* est consacré aux données sur les bactéries acétiques

La deuxième partie est consacrée à la méthodologie adoptée pour réaliser la partie expérimentale.

Les résultats et discussions sont représentés dans la troisième partie.

Une conclusion suivie de perspectives viennent achever notre manuscrit.

Chapitre I
Vinaigre de datte

I.1.Historique

Le vinaigre, malgré son apparence banale est loin d'être sans intérêt reconnaissable à son odeur et son goût piquant. Ce liquide possède une longue histoire qui date de plus de 5000 ans. Sa découverte est intimement liée à la fabrication de vin dont le vinaigre tire son origine. **(HYPERLINK, 2005).**

En effet, le vin exposé à l'air pendant une certaine période se transformera naturellement en liquide au goût acide : c'est la naissance du vinaigre ou du « vin. aigre ». **(HYPERLINK, 2005).**

En 1822, le Botaniste Persoon, reprenant les idées de Fabroni et de Chaptal, attribue la production de vinaigre au voile qui se transforme à la surface du vin laissé à l'air libre. Croyant être en présence d'un champignon, il lui donne le nom de Mycoderma Acéti **(HYPERLINK, 2005).**

Cependant, il faudra attendre Pasteur et son célèbre mémoire sur la fermentation acétique publié en 1864 pour comprendre enfin les véritables mécanismes de son élaboration. Le vinaigre est simplement le produit de l'oxydation de l'alcool par l'oxygène de l'air sous l'action d'un ferment le Mycoderma Acéti. **(HYPERLINK, 2005).**

I.2. Production de dattes

Les principaux pays producteurs de dattes sont : l'Egypte, l'Iran, l'Arabie-Saoudite, le Pakistan, l'Algérie et le Soudan, les Emirates Arabes Unis… . **(MA/DSAEE, 2001).**

Du point de vue quantitatif, la production algérienne représente 10 % de la production mondiale occupant ainsi la quatrième place, mais du point de vue qualitatif, elle occupe le premier rang grâce à la variété Deglet-Nour, la plus appréciée mondialement **(MA/DSAEE, 2001)**.

I.2.1.Production de datte en Algérie

L'Algérie est l'un des plus importants pays producteurs de dattes. La production est estimée à 492.217 tonnes dont 50 % de dattes demi molles (Deglet.Nour) est très apprécié par les consommateurs **(MA/DSAEE, 2001)**, 33 % des dattes sèches (Degla Beida et analogues) et 17 % des dattes molles (Ghars et analogues). Actuellement, la palmeraie algérienne est constituée de plus de 11 millions de palmiers répartis à travers 09 wilayas

sahariennes : Biskra, El.Oued, Ouargla, Ghardaïa, Adrar, Béchar, Tamanrasset, Illizi et Tindouf **(BUELGUEDJ, 2007)**.Près de 58.14% de la production nationale de dattes est réalisée par les deux wilayas suivantes : El.Oued (29.54%) et Biskra (28.6%) **(ANONYME, 2002)**.

I.3.Valorisation et transformation des dattes

L'importance du palmier dattier réside du fait que toutes les parties de cette dernières peuvent être utilisées soit directement pour alimentation humaine et animale soit indirectement à travers les processus industrielle et traditionnelle (vinaigre) **(SEDRA, 2001).**

I.3.1.Transformation traditionnelle

Vue la longue tradition phoenicicole dans nos régions sahariennes, les populations oasiennes locales ont développé un savoir et savoir-faire important en matière de transformation pour le prolongement de l'utilisation/consommation durant toute l'année **(BOUSDIRA, 2007).** Citons quelques exemples comme :

I.3.1.1.Farine ou poudre de dattes

La poudre de dattes est préparée à partir de dattes sèches ou susceptibles de le devenir après dessiccation. Cette farine est utilisée en biscuiterie, pâtisserie, aliments pour enfants **(AIT.AMEUR, 2001 cité par DJOUAB, 2007)** et yaourt **(BEN AMARA et *al.*, 2004).**

I.3.1.2. Sirop de dattes

Le sirop de dattes est un produit naturel extrait des dattes, il est liquide et très concentré, il peut être utilisé comme un édulcorant **(MUNIER, 1973).** Le sirop de dattes peut être fabriqué avec toutes les variétés de dattes **(MUNIER, 1973 et EL.OGAIDI, 1987 cite par MIMOUNI, 2009)**, il peut être considéré comme un sucre inverti naturellement, car il contient des proportions en glucose et fructose presque égales, et une faible quantité de saccharose **(EL.OGAIDI, 1987 cité par MIMOUNI, 2009).**

I.3.1.3. Jus de dattes

Est une denrée alimentaire la plus riche dans des composés neutres tels que les monosaccharides, les disaccharides, les sels minéraux et les vitamines. Ces substances sont considérées comme des éléments essentiels pour la croissance des micro.organismes **(ALEID,**

2011). Donc, le jus de datte peut être utilisé comme substrat pour la production de levure, d'acides organiques, etc **(BOUKHIAR, 2008).**

I.3.1.4.Margarine

La fabrication de la margarine est une technologie connue est maitrisée. La margarine est préparée par l'eau pasteurisée et l'extrait de dattes. L'acidification de la phase aqueuse s'est effectuée par quelques gouttes de jus de citron fraîchement presse **(DJOUAB, 2007**).

I.4. Vinaigre

I.4.1. Définition

Le vinaigre est du vin rendu aigre par développement des bactéries acétiques. Par extension est appelé vinaigre tout produit obtenu par la fermentation acétique des boissons ou de dilutions alcooliques. La fabrication du vinaigre est due aux bactéries acétiques du genre *Acétobacter* **(GUIRAUD, 1998).**

I.4.2.Vinaigre de datte

Les rebuts de dattes et les dattes communes peuvent être utilisés comme matière première de choix pour la production de vinaigre vue leur richesse en sucres. Le vinaigre produit après double fermentation **(BOUGHNOU, 1988)**

- ✓ Fermentation alcoolique en milieu anaérobie *par Saccharomyces cerevisiae* **(MEHAIA et CHERYAN, 1991)**
- ✓ Fermentation acétique en milieu aérobie par *Acétobacter aceti*. Selon **(OUELD EL HADJ et *al*. 2001)**.

La double fermentation spontanée des dattes trempées dans l'eau permet la production d'un vinaigre traditionnel très apprécié au sud Algérien **(OUELD EL HADJ et *al*. 2001)**.

Parmi les cultivars des dattes utilisée pour la fabrication de vinaigre on site:

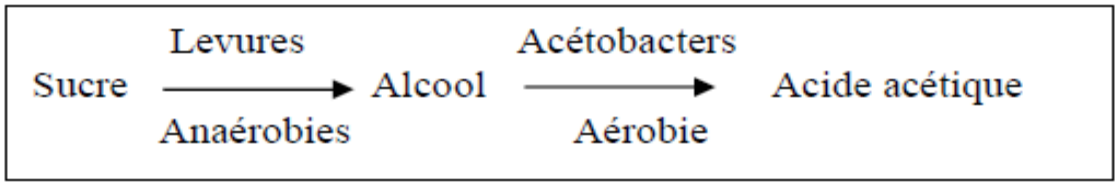
- ✓ **Deglet-Nour :** Datte demi molle sont très appréciées, et sont aussi largement utilisées en vinaigrerie traditionnelle **(SEBIHI, 1996).**

Les cultivars Deglet- Nour est un cultivar demi-molle de forme ovoïde et parfois droite. Au stade *Tmar*, sa couleur est variable. Elle est abondent dans la région d'Ouargla

(HANNACHI et *al*., 1998). Elle est consommée fraîche. Elle se conserve bien et a une bonne valeur marchande **(MA ATALLAH, 1970;cité PAR ALMI et NOURI, 1996).**

I.4.3. Technique d'élaboration du vinaigre traditionnelle

La technique d'élaboration du vinaigre traditionnelle est basée sur une double fermentation combinée: anaérobie et aérobie. Cette bioconversion utilise des levures et des bactéries acétiques présentes naturellement dans la datte. Celles ci entraînent une production d'éthanol qui est transformé en acide acétique. C'est un procédé ou les deux réactions biotechnologiques se déroulent au même temps, bien que les exigences des organismes unis cellulaires mis en jeu différent en matière d'oxygène **(OULD EL HADJ et *al* ., 2001).**



I.4.4.Elaboration de vinaigre traditionnel

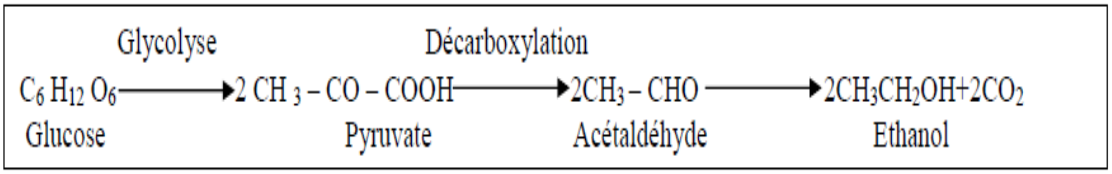
Après parage, triage et lavage des dattes, à une mesure de datte est ajoutée deux mesures d'eau du robinet. Au mélange ainsi obtenu et additionné selon les habitudes traditionnelle des zones de production divers produits en faible proportion, parmi les quels: grain de blé (7grains), grains d'orge. (7grains) Harmel (7grains), coriandre (7grains), quelque pincées de piment, quelque pincées de sel de table, un ou deux cloux en fer en fonction de la quantité de produit. Le mélange est mis en fermentation durant quarante à cinquante jours à la température ambiante, dans une gargoulette ou jarre bouchée avec du gypse ou avec du lif de palmier, laissant un micro trou d'aération. Ce temps écoulé, la jarre ou le récipient est débouché. Il est procédé au tamisage, le produit ainsi obtenu est le vinaigre traditionnel **(OULD EL HADJ et *al* ., 2001).**

I.4.5. Processus de fermentation

I.4.5.1 Fermentions alcoolique

La fermentation alcoolique se déroule en milieu anaérobie. Elle est assurée par des levures du genre *Saccharomyces* qui sont présentes naturellement sur la datte. Elle est principalement basée sur la transformation des sucres, essentiellement glucose et fructose, qui pénètrent dans la cellule de la levure par diffusion facilitée et subissent une phosphorylation

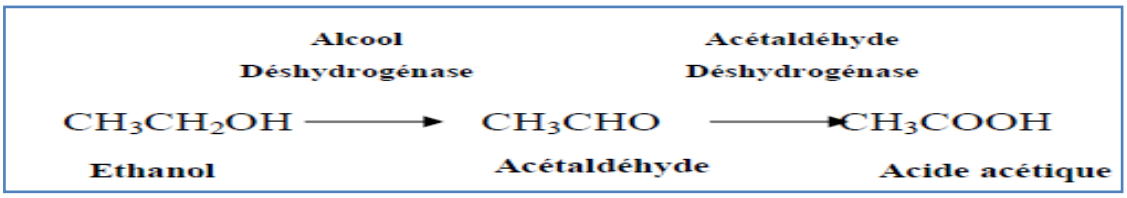
aboutissant à la fin de la fermentation à l'alcool éthylique, mais aussi sur la production de différents composé qui accompagnent cette production alcoolique, et jouant un rôle organoleptique majeur sur la qualité du produit **(BOUORGEOIS et LARPENT, 1990)**. La réaction se déroule selon l'équation suivante :



I.4.5.2. Fermentation acétique

La fermentation acétique assurée par les *Acétobacters* qui oxydent l'éthanol en acide acétique en présence d'oxygène. Les bactéries acétiques n'interviennent que si la teneur en alcool est faible **(GUIRAUD, 1998 ; TESFAYE *et al.*, 2002)**.

Elle met en jeu des déshydrogénases membranaires liées à des cytochromes **(BOURGOIS et *al*, 1990)**, selon la réaction suivante:



I.4.6. Composition du vinaigre

La composition d'un vinaigre est intimement liée à la matière première de départ. L'acide acétique constitue son composant majoritaire avec des concentrations dépassants généralement 45 g/l. Selon le type du vinaigre, les composants particuliers se présentent en quantités différentes. Les critères de différenciation sont, entre autres, les taux en extrait sans sucre, en sorbite, en acétoïne, en acide lactique, en acide tartrique, ou en lactose **(MATHEIS *et al.*, 1995)**.

Toutefois, il est important de souligner la formation de nouveaux composés au cours du processus d'acétification (produit de fermentation) ou résultant de l'interaction entre des Composants entre eux : L'acétaldéhyde contribue à la flaveur du vinaigre **(BOUGHNOU, 1988)** et les « mélanoïdines » à haut poids moléculaire procurent une coloration brune au vinaigre. Ces polymères sont dotées d'un pouvoir antioxydant

remarquable qui à fait l'objet de plusieurs recherches **(QUIGPING *et al.*, 2007).**

I.4.7.Les procédés d'acétification

Le premier procédé mis au point par les hommes consistait en la conversion spontanée du vin en vinaigre sous l'action de bactéries se trouvant sur les fruits, dans les récipients ou dans l'air, en laissant le vin en contact avec l'air **(BOURGEOIS et LARPENT, 1996)**.

Du point de vue technologique, il y a deux processus de fabrication du vinaigre

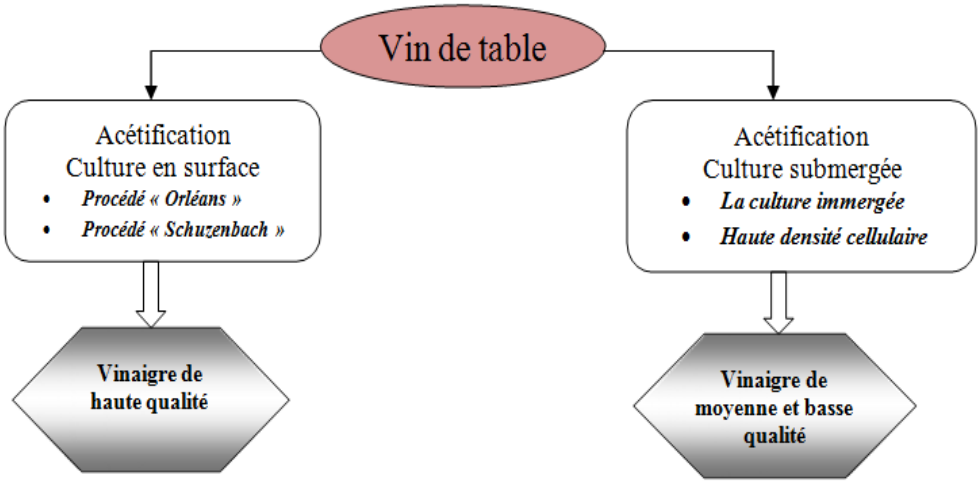


Figure 1: Représentation graphique des deux méthodes de production de vinaigre **(TESFAYE *et al.*, 2002)**

I.4.7.1. Les processus traditionnels « lents »

C'est une méthode statique, où les bactéries acétiques sont placées dans l'interface liquide.air alors se trouvant en contact direct avec l'oxygène de l'air (**GUIRAUD., 1998)** on distingue :

I.4.7.1.1.Le procédé « d'Orléans » ou encore appelé le procédé de Pasteur

Le vin est oxydé dans des tonneaux exposés à l'air. Il se forme un voile de bactéries acétiques. Le soutirage du vinaigre et l'addition de vin se font par le fond du récipient **(Figure 02) (BOURGEOIS et LARPENT, 1996 ; GUIRAUD, 1998 ; TESFAYE *et al.*, 2002 ; CALLEJON *et al.*, 2009)**.

Toutefois, cette méthode présente l'inconvénient de ne pouvoir produire que des petites quantités. Mais, un vinaigre d'excellente qualité.

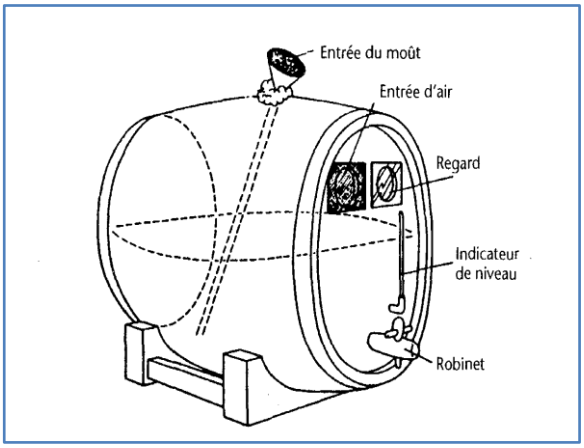


Figure 02 : Schéma d'un tonneau préparé pour l'acétification selon le procédé d'Orléans (**BOURGEOIS et LARPENT, 1996).**

I.4.7.1.2.Le procédé de Schuzenbach

Le vin ruisselle dans des colonnes contenant des coupeaux de chêne ou de hêtre sur les quelles se développent les bactéries acétiques, trouvant ainsi des conditions satisfaisantes pour oxyder l'éthanol. Le liquide en cours d'acétification est recyclé jusqu'à l'épuisement de l'éthanol**. FRINGS (1932)** améliora ce procédé en pratiquant une aération forcée et un contrôle de la température **(figure03) (BOURGEOIS et LARPENT, 1996 ; GUIRAUD, 1998)**.

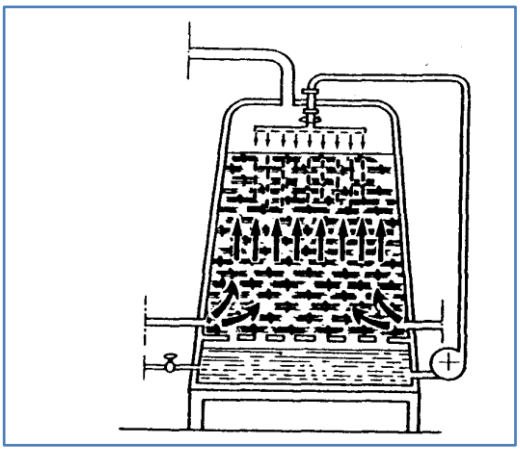


Figure 03: Schéma de l'acétification à biomasse fixée sur des copeaux de hêtre (**BOURGEOIS et LARPENT, 1996).**

Ces procédés traditionnels ne sont utilisés que pour certains vinaigres où l'acétification et le vieillissement sont simultanés **(TESFAYE *et al.*, 2002)**.

I.4.7.2.Les processus modernes « rapides »

I.4.7.2.1.La culture immergée (submergée)

Ce procédé s'effectue dans des fermenteurs muni d'un système d'aération forcé (Acétator, Cavitator, fermenteur de colonne...) **(GUIRAUD, 1998)**.

Cette méthode est introduite au début du 20ème siècle. Aujourd'hui, elle est employée pour la production de la majorité des vinaigres commerciaux, destinés à tous types de consommation. C'est **(HAROMAKA *et al.* 1950.1963)** qui ont montré que la fermentation acétique est réalisable avec une bonne performance en milieu liquide bien aéré, soit une production spécifique d'acide de 21 g par gramme de bactéries et par heure à 30 °C. **(BOURGEOIS et LARPENT, 1996 ; CALLEJON *et al.*, 2009)**.

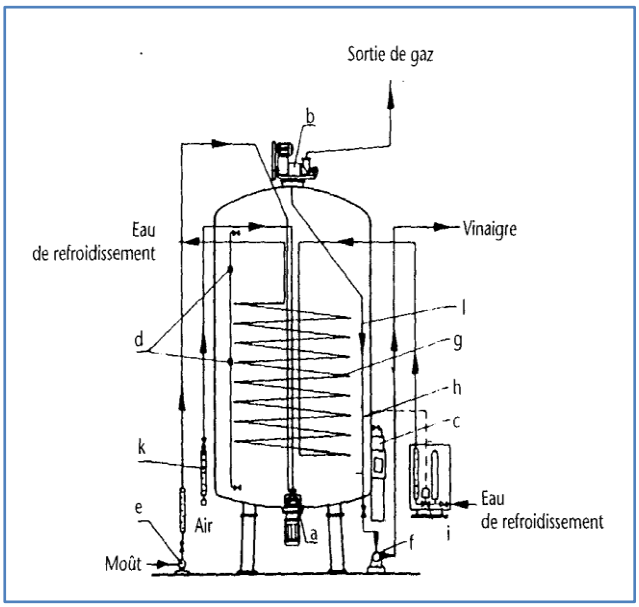


Figure 4 : Acetator de Frings **(BOURGEOIS et LARPENT, 1996).**

a : moteur et aérateur; b : briseur de mousse; c : alcoolographe; d : niveaux de contrôle; e : pompe d'entrée ; f: pompe de soutirage ; g : circuit de refroidissement; h : thermomètre; I : vanne d'arrivée d'eau ; k : débitmètre d'air; I : circuit de retour.

1.4.8. Développements récents des processus d'acétification

Les récentes recherches sont focalisées dans le but d'augmenter le rendement tout en améliorant la qualité du vinaigre. Afin d'accomplir cet objectif, différentes stratégies sont envisagées **(BOURGEOIS et LARPENT, 1996 ; TESFAYE *et al.*, 2002)**:

- Concevoir un meilleur système d'acétification ;
- Sélectionner les bactéries les plus productives ;
- Optimiser les conditions opératoires du processus…

I.4.9. Utilisation du vinaigre

- Les utilisations culinaires du vinaigre ont été très nombreuses :

Fabrication du moutard, mayonnaise, sauces...conservation de la viande, des poissons, des légumes, des fruits de saison, des gâteaux, des épices… **(DIVIES, 1996)**, car il empêche l'oxydation des fruits et légumes **(CACQE, 2002; cité par ARAB et GUEZZOUN, 2003).**

- Le vinaigre traditionnel est utilisé aussi en médecin traditionnelle, il est utilisé pour soigner plusieurs maladies et infections tel que :

Les maux de tête et de gorge, la constipation, les pellicules, les toux, les piqûres des insectes, les brûlures, etc. **(ARAB et GUEZZOUN, 2003).**

En autre, les anciens médecins ont parlé du vinaigre en citant ces effets utiles et nuisibles pour la santé. Il calme les douleurs d'estomac. Il prévient les tumeurs. Il facilite la digestion. Il améliore l'appétit **(KOUDAMA, 1990; cité par ARAB et GUEZZOUN, 2003).**

- **En usage domestique**,

Le vinaigre est considéré comme antiseptique s'utilisent dans le nettoyage du sol, des vitres. Il sert souvent comme antimoustique, s'il est mélangé à la farine, désinfectant, désodorisant, détartrant, fixant par exemple de couleur des vêtements, …etc. **(GRELON, 2005 ; cité par BOUAZIZ, 2009)**

I.4.10. Les vertus du vinaigre

D'après certaines recherches, le vinaigre serait un des aliments les plus sains au monde et reconnu très tôt pour ses étonnantes propriétés bienfaisantes. Il contribue à la régulation de la glycémie et de la pression sanguine, il stimule l'absorption du calcium **(ANONYME, 2007 ; QINGPING et *al.*, 2007).**

Il a été prouvé également qu'il réduit la fièvre, qu'il favorise l'extraction des substances toxiques corporelles, qu'il facilite les régimes alimentaires et qu'il agit comme

désinfectant. En fait, la consommation de vinaigre pendant les repas accroît le sentiment de plénitude, ce qui réduit la quantité d'aliments consommés **(ANONYME, 2007 ; QINGPING *al.*, 2007).**

De plus, les résultats très encourageants présentés par **RENGASWAMY** et son équipe du Centre international de recherche sur le cancer (ClRC) de Lyon, cité par **(LD,2007),** ayant développé une technique très peu onéreuse et efficace de dépistage du cancer du col de l'utérus à base d'acide acétique, composant du vinaigre **(LD, 2007).**

Chapitre II
Bactéries acétiques

II.1. Bactéries acétiques

Les bactéries acétiques sont très répandues dans la nature elles sont présentées à la surfaces des plantes (fleurs et fruits) **(GALZY et GUIRAUD, 1980)** ; c'est leur habitat naturel **(HAMIDI et SLIMANI ,2008)**, dans l'air, dans les vins Elles se présentent au microscope sous forme de petits bâtonnets gram négatifs, aérobies stricts et leur métabolisme est strictement respiratoire où l'oxygène est l'accepteur final d'électron. Souvent groupées en paires et parfois en chaînettes.

Elles sont parfois allongées, asporulées, généralement mobiles. Leurs tailles varient de 0,5 à 0,8µm de large et 0,9 à 4,2 µm de long. Ils sont oxydase négative, ont un métabolisme de type oxydatif. Ce sont les agents de la fermentation acétique qui est une oxydation incomplète de l'éthanol **(GUIRAUD, 2003).**

Les bactéries acétiques sont représentées par les genres *Acétobacter* qui peuvent oxyder l'acide acétique et l'acide lactique en CO_2 et H_2O (pouvoir suroxydant alors que *Gluconobacter* qui ne le peut pas). Certains oxydent aussi d'autres composés (glycérol, glucose…) et d'autres matières telles que la cellulose. Leurs température optimale de croissance se situe aux environs de 30 °C, leurs pH optimum de croissance est entre 5,4 et 6,3 **(LARPENT, 1997 et KERSTERS et *al.*, 2006)**.

Leur croissance est inhibée par des teneurs au.delà de 40 g/l en acide acétique et un décroissement est enregistré à partir de la valeur limite de 120 g/l d'une part, et d'autre part pour des concentrations en substrat (éthanol) supérieur à 40 g/l **(BERRAUD, 2000)**

Elles sont très tolérantes aux pH acides. Leurs implications dans la fermentation acétique ont été mises en évidence par **Pasteur en 1868**. Leurs développements se manifestent par la formation d'un voile de surface sur le vin ou le cidre (la mère du vinaigre). Seul ce voile contient des cellules vivantes aérobies strictes. Les *Acétobacters* oxydent plus l'éthanol que le glucose, par contre les *Gluconobacter* ont plus d'affinité au glucose que pour l'éthanol. Contrairement au genre *Gluconobacter* qui s'arrête à l'acide acétique lors de l'oxydation de l'éthanol, le genre *Acétobacter* peut poursuivre l'oxydation jusqu'au stade CO_2 et H_2O quand la concentration en éthanol s'appauvrit **(TESFAYE et *al.*, 2002 ; BRANGER, 2008)**. Un arrêt de l'oxygénation ou l'absence de l'éthanol entraine la mort des cellules **(BOURGEOIS et LARPENT, 1996)**.

La résistance des bactéries à l'acide acétique, reste encore inexpliquée. Il est possible que la richesse de la membrane de ces bactéries en acide gras saturés la rende relativement imperméable à cet acide qui se trouve sous forme indissocié dans les conditions industrielles **(BOURGEOIS et LARPENT, 1996)**.

Chaque bactérie produit des sous produits plus ou moins agréables lors de la fermentation acétique. Comme pour les levures, le choix d'une bonne souche est un des facteurs de la qualité du vinaigre **(GUIRAUD, 2003).**

(BOURGEOIS ET LARPENT,1996 ; GUIRAUD,2003), ont travaillé sur les bactéries acétiques. Ils ont trouvé que les bactéries acétiques sont capables de transformer 80 % du glucose en acide gluconique à l'aide d'une enzyme glucose oxydase et 20 % utilisé comme source de carbone et d'énergie. Ils ont prouvé aussi que cette bactérie est capable d'oxyder le mannitol, fructose, maltose, galactose, lactate de sodium et l'éthanol et l'acétate de sodium **(GUIRAUD, 2003 ; BOURGEOIS et LARPENT, 1996).**

II.2.Besoins nutritionnels

Les besoins nutritionnels des *Acétobacter* dépendent étroitement de la source de carbone. La majorité des souches sont auxotrophes pour quelques vitamines notamment l'acide para.benzoïque, la niacine, la thiamine et l'acide pantothénique. Elles peuvent utilise l'ammonium comme source d'azote (**DEVIES,1989 ; BOURGOIS et LAPRENT, 1996**).

Les bactéries réalisent la fermentation acétique des vinaigre d'alcool sont susceptibles de développer sur un milieu minéral à deux sources de carbone, le glucose et l'éthanol mais sur le substrat utilisées dans l'industrie les besoins nutritionnels sont plus complexes et la croissance nécessite l'adjonction d'extraits de levure (**DEVIES, 1989 ; BOURGOIS et LAPRENT, 1996**).

II.3.Facteurs influençant sur la croissance des bactéries acétiques

II.3.1.Oxygène

Plusieurs auteurs ont montré que la fermentation acétique était réalisable avec une bonne performance en milieu liquide bien aéré: une remarquable production spécifique d'acide de la population bactérienne utilisée qui est égale à 21 g d'acide produit par gramme de bactéries et par heure à 30 °C. La formation d'un gramme d'acide acétique nécessite tout l'oxygène contenu dans deux litres d'air. Les arrêts d'oxygénation entraînent la destruction des

cellules Cependant à des teneurs élevées l'oxygène entraîne une oxydation de l'acide acétique **(BELKACEM, 1987).**

II.3.2. Température

La température augmente la rapidité de l'acétification avec laquelle se déroule la réaction. Est compris entre 15°C et 40°C l'optimum de croissance se suite à 30°C **(ABOULALA, 2008)**.

II.3.3. pH

Le pH idéal pour réussir un vinaigre va de 3,5 à 5. A pH bas les bactéries se reproduisent encore mais beaucoup **plus lentement (POXIXOO, 2003).**

II.3.4.Concentration en éthanol

Les concentrations en éthanol comprises entre 10 et 13 % sont aisément converties en acide acétique. Pour des concentrations supérieures à 14 % (volume par volume), l'éthanol est oxydé difficilement et incomplètement. De même lorsque la teneur en éthanol est inferieur à 7% (v/v) L'acide acétique formé est oxydé en CO_2 et H_2O **(BELKACEM, 1987).**

Les meilleurs vinaigres sont réalisés à partir de vins qui titrent moins de 8°. En outre, il est conseillé de laisser en fin de fabrication 0,2° d'alcool non transformé pour empêcher la suroxydation de l'acide produit **(FOLLMAN, 1983;BOUGHNOU ,1988).**

II.3.5.Lumières

La fermentation acétique ne se fait presque plus à la lumières solaire directe. La lumières diffuse ne permet qu'une fermentation très lente. Elle est la plus active à l'obscurité. Les rayons ultra-violets sont nocifs **(DUCULOT, 1932).**

II.3.6.Acide acétique

(BAR et *al.*, 1987) Ont observé que l'acide acétique était activateur de la croissance des *Acétobacters* jusqu'à la valeur de 2° (**BOURGEOIS et LARPENT, 1996).**

II.4.Classification

Ce que caractérisent les bactéries acétiques, c'est leur remarquable capacité d'oxyder

l'éthanol en acide acétique à des pH acide **(BOURGEOIS, LARPENT, 1996).**

Les premiers essais de classification sont dus à **HANSEN (1894) ; VISSERT (1925),** fut le premier à proposer une classification basée sur des critères biochimiques.

FRATEUR (1950) fut le mérite de réduire beaucoup le nombre d'espèces en utilisant cinq critères : catalase, suroxydation de l'acide acétique (CH_3COOH en CO_2 et H_2O), oxydation du lactate en CO_2 et H_2O, oxydation du glycérol en dihydroxyacétone, production d'acide gluconique à partir du glucose. Certains caractères culturaux (température optimale, formation de pigment, de voile utilisable possible de sels ammoniacaux comme seul source d'azote…..). Selon **BERGY (1957),** les genres *Gluconobacter*, et *Acétobacter* entrent dans la famille des *Pseudomenaceae* et dans la tribu des *Pseudomenadeae*. Les bactéries acétiques sont classées en quarts groupes biochimiques :

- Groupe peroxydant : représente par *Acétobacter peroxydant*.
- Groupe oxydans : représente par *Acétobacter pasteruianum*.
- Groupe suboxydans : représente par *Gluconobacter suboxydans*.
- Groupe mesoxydans : représente par *Acétobacter aceti*.

Puis **LEIFSON (1954**), distingua dans les bactéries acétiques celles qui ont des flagelles péritriches, et oxydent l'acétate, le genre *Acétobacter* de celles qui ont des flagelle polaires, le genre *Acetomonas*. **CARR et SHIMWELL (1968) , ASAI(1968),** proposèrent de remplacer *Acetomonas* par *Gluconobacter*. les expériences d'hybridation de **GILLIS et DE LEY (1980)** , ont bien montré qu'en réalité, les deux genres devaient être regroupés dans la même famille des *Acétobacteriaceae*. La 9^{éme} édition du manuel **BERGY(1957)** a retenu cette proposition.

Généralement la classification d'*Acétobacter* est basée sur les caractères culturaux, morphologiques, structuraux, biochimiques, et physiologiques.

II.4.1.Caractères culturaux

La température optimale de croissances d'*Acétobacter* est située entre 25°C et 30°C. Tous les *Acétobacter* sont caractérisés par leurs propriétés de former des voiles (mère de vinaigre) plus ou moins important à la surface de milieux nutritifs. Cette voile est selon les espèces par exemples *Acétobacter xylinum*, forme une membrane mucilagineuse épaisse et *Acétobacter pasteruianum* ne produit pas de voile **(LAMBIN et GERMAN, 1969).**

Les colonies d'*Acétobacter* sont blanches, jaunes, irrégulières sur milieu solide de Frateur en boites de pétri **(OULED El HADJ, 2001).** Certain souches d'*Acétobacter* possèdent un pigment brun comme *Acétobacter aceti*. Il ya des souches capable d'utilise les sels ammoniacaux du milieu de Hoyer comme seule source d'azote comme *Acétobacter aceti*, et d'autre part *Acétobacter xylinum*, *Acétobacter pasteruianum rancens* qui sont incapables de s'en contenter **(LAMBIN et GERMAN 1969).**

II.4.2.Caractères morphologiques et structuraux

Les cellules des bactéries acétiques apparaissent au microscope optique sous forme des bacilles Gram négatif quelque fois coccobacille. Elles se présentent fréquemment par paires ayant l'aspect de sablier et associés en chainette courtes ou longues. Les cellules sont longues, filamenteuses et présentent des renflements fusiformes **(APRIA, 1979).** Leur taille varie de 0,5 à 0, 8 µm de large et 0,9 à 4,2 µm de long **(BOURGEOIS, LARPENT,1996).** La plus part des espèces sont mobiles par flagelles péritriches **(Figure05)**. Elles sont asporulées et quelques espèces sont encapsulées par une capsule polysaccharidique pour *Acétobacter capsulatum* et cellulose pour *Acétobacter aceti xylinum.*

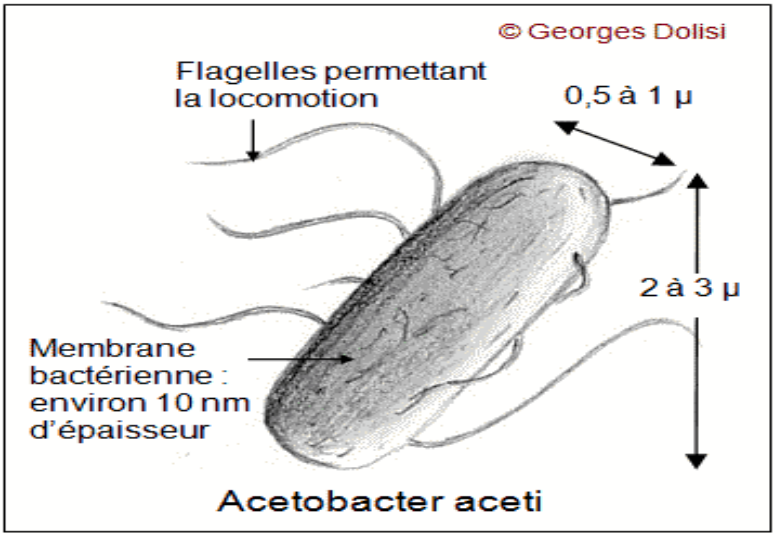


Figure 05 : morphologie d'*Acétobacter aceti*

(http://www.vulgaris.medical.com/upload/visuel.Acetobacter)

II.4.3.Caractères biochimiques

Les bactéries acétiques sont des chimioorganotrophes hétérotrophes aérobies (**DIVIES, 1989 ; BOURGOIS et LAPRENT, 1996**). Qui ont les caractères biochimiques suivant :

II.4.3.1.Réaction de la catalases

La présence de cette enzyme dans le microorganisme permet la décomposition de l'eau oxygénée produit en fin de chaine d'oxydoréduction. Seules les espèces du groupe peroxydans sont catalase négatives **(GIRARD et ROUGIEUX, 1958).**

II.4.3.2.Transformation de l'alcool en acide acétique

Toutes les espèces de cette tribu oxydent l'alcool en acide acétique, mais les espèces des groupes peroxydans et mesoxydans sont capables d'oxyder l'acide acétiques produit et de la transformer gaz carbonique et eau (CO_2+H_2O) **(GIRARD et ROUGIEUX ,1958).**

II.4.3.3.Transformation d'acide lactique en acide acétique

Les représentants des groupes peroxydans, oxydans et mesoxydans métabolisent l'acide lactique en acide acétiques et plus possédant un pouvoir très élève poursuivent la transformation jusqu'à production d'eau et de gaz carbonique **(GIRARD et ROUGIEUX ,1958).**

II.4.3.4.Pouvoir cétogène

Ce pouvoir se caractérise par la propriété de transformer la fonction alcool secondaire en fonction cétone. Le pouvoir cétogène se rencontre chez les espèces des groupes mesoxydans et suboxydans. C'est à partir de glycérol qu'il y a production de dihydroxyacétone par *Acétobacter xylinum*, *Acétobacter suboxydans* suivant la réaction : **(Figure 04)** et **(Tableau I)**

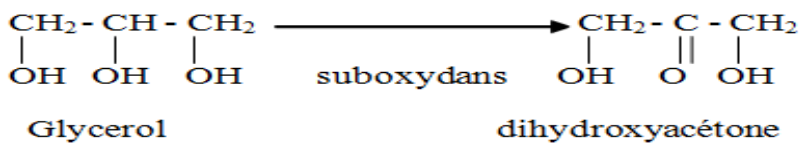


Figure 06 : Réaction de formation de dihydroxyacétone à partir de glycérol **(SIMON** et **MAUNIER, 1970)**

Cette caractérisation des groupes par leurs caractères biochimiques et résumée dans le **(tableau I)**

Tableau I : caractéristiques biochimiques des groupes des bactéries acétiques **(GIRARD et ROUGIEUX, 1958)**

Groupe	Catalase	Oxydation de l'acide acétiques	Oxydation du lactate de Ca formation de $CaCo_3$	Formation d'acide gluconique	Pouvoir cétogéne
Peroxydans	-	+	+	-	-
Oxydans	+	+	+	+ -	-
Mesoxydans	+	+ -	+	+	+
Suboxydans	+	-	-	+	+

II.4.3.5.Production de cellulose

Certaines souches d'*Acétobacter* forment des microfibrilles, extracellulaires de cellulose qui entoure la masse des bactéries en division **(PERRY, 2002).**

Des cellules non proliférantes des bactéries peuvent en quelques heures synthétiser la cellulose en anaérobiose à partir de mannitol de fructose et de glucose **(LAMBIN et GERMAN, 1969).**

Les cellules sont alors enrobées dans un grand masse de fibrilles de cellulose .la cellulose est formée de manière interne et secrétée à travers des pores situés dans l'enveloppe externe lipopolysaccharidique. Dans les cultures non agitées, les cellules synthétisant la cellulose sont favorisées, et dans les cultures agitées, les mutant dépourvus de cellulose prédominent **(PERRY, 2002).**

Certaines espèces comme *Acétobacter xylinum* élaborent une paroi constituée de cellulose **(LAMBIN et GERMAN ,1969).**

II.5.Métabolisme

II.5.1.Oxydation des hydrates de carbone

La particularité des bactéries acétiques est d'oxyder une variété de substrats et d'accumuler quasi.intégralement les produits dans le milieu.

II.5.2.Ethanol

les bactéries acétiques possèdent des déshydrogénases très actives situées sur leurs

membranaires **(MASTSUSHITA et *al*., 1985)**, et intimement couplés à chaine cytochromique **(BOURGOI et LARPENT, 1996).**

A cote des enzymes membranaires, les bactéries acétiques possèdent des éthanols et acétaldéhydes déshydrogénases solubles liées au NAD+ et au NADP+ **(KING et CHLDELIN, 1955 ; KERSTERS et LEY, 1966; DIVIES, 1972 ; BOURGOI et LARPENT, 1996).**

II.5.3.Sucres et Alcools

De nombreux sucres peuvent être oxydés directement. Le glucose est oxydé en acide gluconique. Il peut aussi après phosphorylation être entièrement oxydé en CO_2 et H_2O. **(HAUGE et *al* ., 1955 ; KITOS et al ., 1957)** ont pu montrer dans ce cas l'importance du cycle des pentoses. **(CHELDEHIN,1960)** propose la capacité cétogène à partir du glucose est très différente selon les souches **(STADLER.SZOKE et *al* ., 1980).**

II.5.4.Oxydation de l'acétate

Les bactéries du genre *Acétobacter* possèdent toutes les enzymes du cycle tricarboxylique **(RAO, 1955)** et donc peuvent suroxyder l'acétate. Certaines espèces d'*Acétobacter* possèdent en outre les enzymes du cycle glyoxylique **(LEISINGER, 1965)**. Elles peuvent alors utiliser l'éthanol comme unique source de carbone dans le milieu de **HOYER (1898).** Les bactéries du genre *Acétobacter* **(DIVIES, 1972)** oxydent l'éthanol en acide acétique et ensuite oxydent l'acétate lorsque l'éthanol disparaît du milieu de culture. L'éthanol inhibe et réprime les enzymes d'oxydation de l'acétate. L'acide acétique inhibe sa propre oxydation pour des concentrations supérieures à 8° acide acétique au pH de 3 **(BOURGEOIS et LARPENT, 1996).**

Chapitre III
Matériel et méthodes

III.1. L'objectif de travail

L'objectif de notre travail est la recherche, l'isolement et l'identification des souches des bactéries acétiques de types sahariens isolées de vinaigres traditionnels de dattes issus du savoir faire des populations de la localité de Ouargla.

Une étude de la tolérance des bactéries acétiques aux températures élevées sera effectuée, pour la sélection des souches thermotolérantes identifiées à caractère industriel.

III.2. Méthodologie

III.2.1.Echantillonnage

Les échantillons de vinaigre de dattes sont récoltés, dans des flacons en verre stériles à raison d'un 250ml par cultivar de datte.

En vinaigrerie traditionnelle, le choix des cultivars de dattes est orienté par leur disponibilité, leur abondance et leur appréciation pour la fabrication du vinaigre traditionnel.

Nous avons utilisé au cours de nos expériences deux échantillonnes d'un seul cultivar des dattes. Il s'agit de Daglet –Nour et Hchef Daglet –Nour. Ce cultivar est classé comme sous produit du palmier dattier à cause de leur faible valeur marchande.

Toutes, les remarques et indications sont notées sur une fiche de renseignement accompagnant chaque échantillon de vinaigre. Les indications concernent le cultivar de dattes utilisés, le pourcentage eau/datte, la durée de fermentation, les caractéristiques organoleptiques, etc. **(ANNEXE N°1).**

III.2.2.Techniques d'isolement

La technique d'isolement consiste à prélever 0.2ml de la solution mère ou 0.1ml de dilutions (de 10^{-1} à 10^{-3}) à l'aide d'une pipette pasteur, puis après avoir coulé le milieu naturel en boite de pétri on ensemence en surface du milieu solidifié par râteau. Les boites sont incubées à 30°C pendant 48 heures **(ABOULALA, 2008).**

III.2.3.Purification des souches

Pour assurer la purification des souches, on fait plusieurs isolements successifs sur milieu Frateur. Apres l'incubation, l'observation des caractères culturaux permet de designer la pureté des souches. L'examen microscopique est réalisé à partir des colonies isolées sur

milieu de culture. Les colonies issues des derniers isolements sont ensemencées sur des tubes à gélose inclinée (milieu Frteur) **(GUIRAUD, 2012).**

III.3.Pré-identification des bactéries acétiques

L'identification des souches pures de bactéries acétiques, fait appel à des caractères culturaux, morphologique et physiologiques. Elle se fait en réalisant une galerie de tests biochimiques. **(ABOULALA, 2008).**

III.3.1.Etudes des caractères culturaux

Il s'agit de noter l'aspect des cultures en milieu solide gélosé de Frateur. **(TEKKOUK, 1997**). On notera la forme, la couleur, la taille et l'aspect des colonies **(ABOULALA, 2008)**.

III.3.2.Etudes des caractères morphologiques

Elles permettent d'observer la morphologique, la taille, le mode de regroupement, le mode de multiplication et la mobilité des cellules bactériennes. Cette étude comprend des examens microscopiques à l'état frais, puis des examens microscopiques après coloration sur frottis fixés (coloration de gram) **(GUIRAUD, 2012)**.

III.3.2.1. Aspect microscopiques

Elles sont effectuées sur des lames de verre ordinaire (76×26×1,2 mm) propre, on utilise des lamelles couver-objets très fines. Les préparations microscopiques utilisées sont de deux types : Etat frais et frottis **(ABOULALA, 2008).**

III.3.2.1.1.Etat frais (pour observe la viabilité, la forme, le regroupement et la mobilité)

Une goute de suspension bactérienne est déposer au centre de la lame, propre puis on dispose la lamelle sur l'échantillon de façon que la lamelle forme un angle égale 45° pour éviter la formation des bulle d'air. Observer avec une goutte d'huile à immersion avec un grossissement (Gr x100 ou Gr x400) **(GUIRAUD, 2012).**

III.3.2.1.2.Frottis (la cellule est morte)

La réalisation du frottis nécessite d'avoir un frottis fixé, soit par de l'alcool durant 5 minutes (et rinçage à l'eau) ou plus classiquement en effectuant une fixation simple de l'eau

distillé et à la flamme. Pour cette dernière étape, sur une lame on dépose une goutte d'eau distillé; puis ajouter à l'aide d'une anse de platine stérilisée la colonie isoles qu'il faut étaler et fixer à la chaleur à environ 40°C pendant 10 à 15minutes **(GUIRAUD, 2012).**

III.3.2.1.3.Coloration de Gram

C'est la coloration de Gram. Les différentes étapes de cette coloration consistent :

- Coloration par le violet de gentiane, en laissant agir durant 30 secondes à 1 minute;
- Rincer à l'eau déminéralisée,
- Recouvrir les lames par le lugol et laisser agir 20 secondes;
- Rincer à l'eau déminéralisées;
- On peut réaliser une deuxième fois l'opération identiquement pour plus de sécurité.
- Décoloration (rapide) à l'alcool: verser quelques goutte d'alcool ou un mélange alcool-acétone sur la lame inclinée obliquement, et surveiller la décoloration (5 à10 secondes) ;
- Rincer sous un filet d'eau déminéralisées; Le filet d'eau doit être clair à la fin de la décoloration;
- Recoloration à la fuchsine, il faut laisser agir de 30 secondes à 1 minute.
- Laver doucement à l'eau déminéralisée;
- Sécher la lame à l'air libre.
- Observer avec une goutte d'huile à immersion objectif 100 (grossissement x1000) **(GUIRAUD, 2012)**

III.3.3.Etudes des caractères biochimiques

Les tests physiologiques et biochimiques sont portés sur :

III.3.3.1.Test de pouvoir suroxydant

Le pouvoir suroxydant est mis en évidence sur milieu de Carr. Le virage au jaune du vert de bromocrésol pour le genre *Gluconbacter*, et le virage au jaune puis réversion au bleu – vert du vert de bromocrésol pour le genre *Acétobacter*. **(GUIRAUD, 2012).**

III.3.3.2.Test de catalase

La catalase est une enzyme, qui permet la décomposition de l'eau oxygénée qui résulte de l'oxydation par l'oxygène de l'air par la réaction suivante :

$$2H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2H_2O$$

Sur une lame de verre propre, déposer une goute de H_2O_2, puis la mettre en contact avec une colonie isolée, prélevée directement avec une pipette pasteur boutonnée. S'il y a formation de bulle d'air, la bactérie possède la catalase dont catalase positive, au cas contraire c'est-a-dire pas de formation de bulle observables, la bactérie ne possède pas l'enzyme donc elle est catalase négative **(GUIRAUD, 2012).**

Cependant, il ne faut pas utiliser d'anse de platine, car elle réagit avec H_2O_2 et donne un faux positif. Il est déconseillé de faire ce test à partir d'un bouillon de culture ensemencé, car le résultat est moins net. En cas de doute sur le résultat, refaire avec une plus grosse colonie **(GUIRAUD, 2012).**

III.3.3.3.Pouvoir cétogène

Certaines bactéries acétiques peuvent transformer le glycérol en dihydroxyacétone, qui peut être mise en évidence par la liqueur de Fehling. Un milieu gélosé au glycérol est couler en boite de pétri et ensemencé. Après 48 heurs d'incubation à 30° C, la surface du milieu est recouverte de liqueur Fehling. Un halo d'oxyde de cuivre rouge se développe autour des colonies à pouvoir cétogène **(GUIRAUD, 2012).**

III.3.3.4.Culture en présences d'ammonium comme seule source d'azote et de 3% d'éthanol

La culture se réalise en utilisant le milieu liquide de Hoyer-Frateur. L'incubation se fait avec une faible quantité de bactéries, trois gouttes de suspension bactériennes. Le milieu est incubé à 30° C, pendant une période allant de 2 à 14 jours. Le développement est comparé à celui d'un milieu témoin sans ammonium **(GUIRAUD, 2012).** Le développement est traduit par la turbidité **(TEKKOUK, 1997).**

III.3.3.5.Présence d'un pigment sur le milieu d'isolement

Certaines souches de bactéries acétiques possèdent un pigment rose ou brun. Il est utilisé un milieu glycose carbonate solide ; les souches sont ensemencées est incubées à 30° C, pendant 48 heurs. On note la présence ou l'absence de pigmentation **(GUIRAUD, 2012).**

III.3.3.6.Formation d'acide gluconique à partir du glucose

Ce test est mis en évidence sur le milieu de culture de base pour les bactéries acétique qui contient du glucose et de carbonate de calcium. Après 48 heurs d'incubation à une température de 30° C, la production d'acide gluconique se traduise par clarification du milieu autour des colonies **(GUIRAUD, 2012).**

III.3.3.7.Formation d'acide cétogluconique

Le test de formation d'acide cétogluconique à partir de glucose par des bactéries acétiques se réalise en utilisant le milieu de Haynes. Après l'ensemencement des souches dans les tubes qui contiennes se milieu, on les incube à une température de 30° C pendant 48 heures. La révélation se fait à l'aide du réactif de Bénédict avec 10 minutes de chauffage au bain- Marie à 100°C. Il apparaît un précipité rouge orangé **(GUIRAUD, 2012).**

III.3.3.8.Production de cellulose

Elle est mise en évidence sur le bouillon pour bactéries acétiques est incubée à une température de 30° C pendant 48 heures. Il ya une formation d'une pellicule à la surface du milieu, est prélevée et placée dans une capsule ou sur une lame et recouvert de réactif iodé (lugol), puis l'acide sulfurique à 60%. Le développement d'une couleur bleue signifier une production de cellulose **(GUIRAUD, 2012).**

III.4.Etude de la tolérance des bactéries acétiques aux différents températures

La thermotolérance des souches isolées a été réalisé dans des milieux liquide de frateur (50 ml), ensemencé et incubé aux différentes températures ; 30°C, 35°C, 40°C, 45°C, 50°C, 55°C et 60°C. Toutes les cultures sont comparées avec une culture témoin (50 ml). Les flacons ont été inoculés avec des colonies jeunes de 48 h d'incubation à 30C° puis incubées simultanément séparément à des températures différentes. La quantité totale de biomasse. Produite a été déterminée en mesurant l'absorbance de la culture sur un spectrophotomètre à 600 nm (La densité optique mesuré par spectrophotomètre) pour tous les échantillons.

III.5.Conservation des souches isolées a longue durée

Les bactéries acétiques sont centrifugée deux fois avec l'eau physiologie puis ensemencées dans des tubes éppendrofe contient milieu de Frateur liquide, avec le 15% de glycérol, pour amorcer la croissance des germes, puis placés entreposés à - 4°C, ils étaient conservés pondant une année **(VINCENT, 1970)**

Chapitre IV
Résultats et discussion

IV. 1. Résultats d'isolement et purification des colonies des bactéries acétiques

Les résultats d' isolement des bactéries acétiques à partir des échantillons du vinaigre traditionnel de dattes (Daglet Nour et Hechef Daglet Nour) de la cuvette d'Ouargla sur milieu naturel gélosé, sont résumés dans **(tableau II)**.

Tableau II : caractères culturaux des colonies apparues sur milieu naturel des différents échantillons.

Colonie / Échantillons	**Forme**	**Couleur**	**Aspect**	**Taille**
Daglet-Nour	Ronde irrégulière	Blanche brunâtre	Lisse, bombée	Petite (1mm)
	Ronde irrégulière	Blanche brunâtre	Lisse, bombée	Moyenne (2mm)
Hechef Daglet-Nour	irrégulière (sous forme d'étoile)	Blanche	Lisse, plate	Grande (5 mm)

Les résultats des isolements des bactéries acétiques sur milieu naturel, des colonies irrégulières, laissant remarquer que les colonies observées, se présentent des couleurs variables. Les colonies de couleur blanche brunâtre s'observent pour l'échantillon vinaigre Daglet -Nour, les colonies de couleur blanche s'observent pour l'échantillon vinaigre de Hchef Daglet –Nour **(Photo 01).**

Toutes les colonies issues des différents échantillons de vinaigres de dattes ont un contour irrégulier de diamètre de 1 à 5 mm. Les caractères morphologiques et culturaux des colonies présentes des profils caractéristiques correspondent probablement aux bactéries acétiques **(OULD ELHADJ ,2001).**

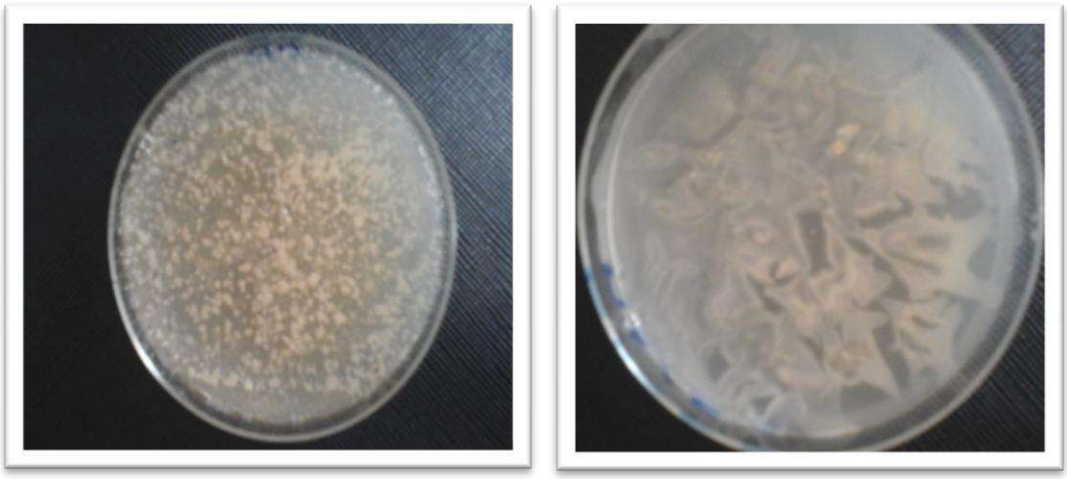


Photo 01: Aspect des colonies des bactéries acétiques sur milieu gélosé naturel

Après des purifications successives sur milieu Frateur des colonies obtenues on a pu distinguer 03 souches **(Photo 02).**

Photo 02 : Aspect des colonies après une 4eme purification des bactéries acétiques sur milieu gélosé de Frateur

IV.2. Résultats des examens microscopiques des colonies isolées

L'examen microscopique des souches à l'état frais, montre que les bactéries sont mobiles. Après coloration de Gram, les bactéries apparaissent sous microscope en forme de coccobacille de taille variable. Leur couleur rose indique que ce sont des Gram négatifs. Elles se regroupent en amas, en chaînette, isolés, ou en diplobacilles **(Photo 03).**

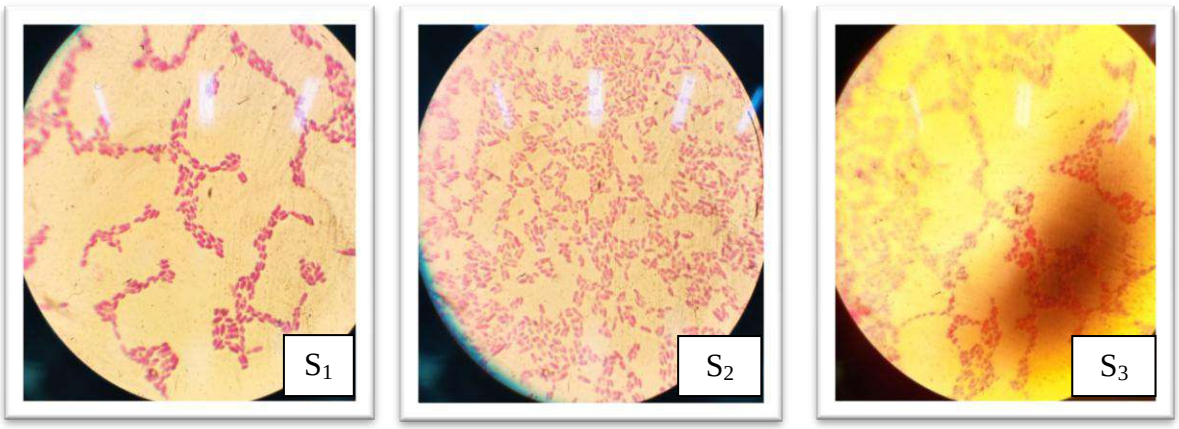


Photo 03 : Aspect des cellules isolées après coloration de Gram sous microscope optique (Grossissement x100)

Pour **ABOULALA (2008)**, cité par **KHELIF (2016),** l'examen microscopique des colonies isolées dans le vinaigre de Daglet-Nour et Hchef Daglet-Nour de différentes régions Ouargla, Ghardaïa et Touggourt, et **KHELIF (2016),** l'examen microscopique des colonies isolées à partir des échantillons du vinaigre traditionnel de datte (Hamraya et Déchet Daglet-

Nour) du Sahara Septentrional Est Algérien, donne les mêmes formes, regroupements et Gram avec nos résultats.

Tableau III : Caractéristiques morphologiques des bactéries acétiques après coloration de Gram.

Echantillons	Morphologie des cellules	Mode de regroupement	Gram	mobilité
Vinaigre Daglet -Nour	Coccobacille	diplobacilles	-	+
Vinaigre de Hchef Daglet -Nour		amas chainette		

IV.3. Résultats de la pré-identification des bactéries acétiques

Les résultats de la pré-identification des 3 souches pures isolées à partir des échantillons du vinaigre traditionnel de datte (Daglet Nour et Hechef Daglet- Nour), selon les caractéristiques physiologiques et biochimiques sont présentés dans le **(Tableau IV)**.

Tableau IV : caractères physiologiques et biochimiques des souches des bactéries acétiques isolés

Echantillon	EVDN				EVHDN			
dilution	SM	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	SM	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}
Pouvoir suroxydans	+	/	/	/	+	/	/	/
Test de catalase	+	/	/	/	+	/	/	/
Culture sur milieu Hoyer (NH4)	+	/	/	/	+	/	/	/
Pouvoir cétogènes	+	/	/	/	+	/	/	/
Formation d'acide gluconique	-	/	/	/	-	/	/	/
Formation d'acide cétogluconique	-	/	/	/	-	/	/	/
Test de pigmentation	-	/	/	/	-	/	/	/
Cellulose	-	/	/	/	-	/	/	/
Sous- espèce	1 3				2			

/ : Absence de culture.

L'ensemencement des souches sur milieu Carr montre que les souches (S_1, S_2 et S_3) ont un virage de vert de bromocrésol au jaune après 48h, c'est-à-dire que le milieu devient acide par l'oxydation d'éthanol en acide acétique, puis une réversion au bleu après 96h, donc

il y à une suroxydation d'acides acétique en CO_2 et H_2O. On conclue que ces souches sont des genres d'*Acétobacter* **(Photo 04).**

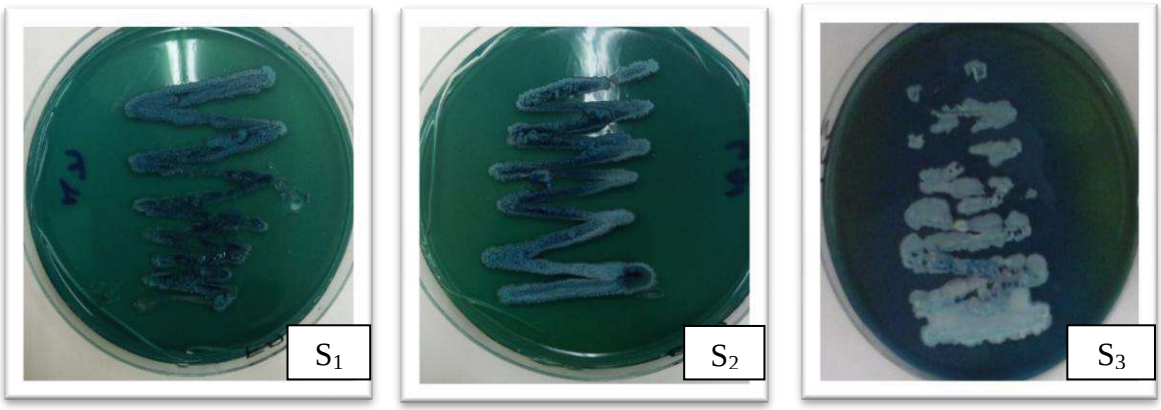


Photo 04 : Résultats du test de pouvoir suroxydant

Alors que les résultats de **ABOULALA (2008),** des colonies isolées dans les vinaigres des dattes Daglet-Nour et Hchef Daglet-Nour de Ouargla, Ghardaïa et Touggourt, et les résultats de **KHELIF (2016),** pour les vinaigres des cultivars Hamraya et Déchet Daglet-Nour de Ouargla, sont relativement proche de nos résultats obtenu où ils ont trouvés un seul genre *Acétobacter*.

Les résultats de l'isolement des bactéries acétiques issues de la canne à sucre et des fruits pourris, laissent remarquer un virage de vert au jaune puis une réversion au bleu sur milieu de Carr, ce qui confirme que sont des genres d'*Acétobacter* **(ARIFUZZAMAN et *al.*, 2014)**. La capacité des souches à convertir la couleur vert de Carr au jaune après 48 heures ont suggéré qu'elles étaient liées à *Gluconobacter* ou *Acétobacter spp*, mais la couleur revenait du milieu Carr du jaune au bleu après 96 heures d'incubation à 30 ° C a montré que la bactérie isolée était une souche suroxydante et a confirmé celle relative à *Acétobacter spp* **(BEHESHTI MAAL et SHAFIEE, 2012).**

Les réactions de la catalase pour les souches (S_1, S_2 et S_3) sont des positive selon la **(photo 05).**

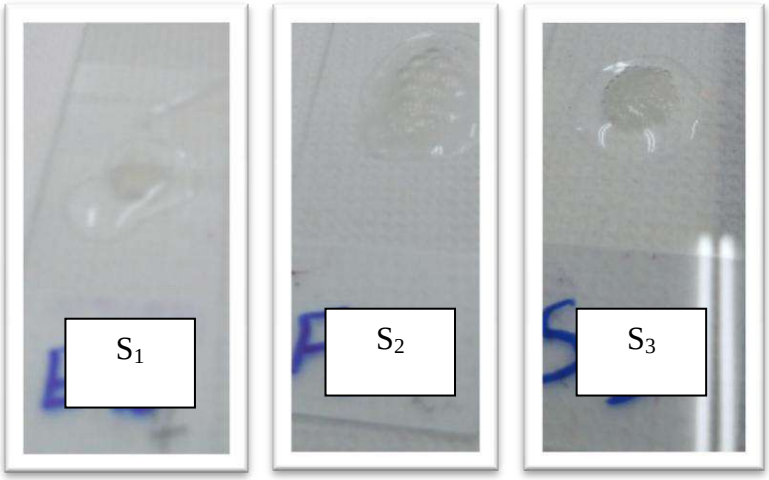


Photo 05 : Résultats du test catalase

Pour **KHELIF (2016)**, les isolats d'*Acétobacter* issues du vinaigre traditionnel de dattes (Hamraya et Déchet Daglet-Nour) d'Ouargla, présentent un catalase positive. Pour **(ARIFUZZAMAN et *al.*, 2014)** toutes les isolats d'*Acétobacter* issues de la canne à sucre et des fruits pourris présentent un catalase positive. L'enzyme catalase permet la décomposition de l'eau oxygénée (H_2O_2) produit en fin de la chaine d'oxydoréduction en O_2 et H_2O **(GUIRAUD, 2012).**

L'incubation des souches pendant 48 heures à 30°C sur milieu gélosé au glycérol puis l'addition de liqueur de Fehling, laisse apparaitre une halo rouge autour de colonies résultant de la précipitation de l'oxyde de cuivre et cela avec toutes les souches (S_1, S_2 et S_3). Donc toutes ces souches ont un pouvoir cétogène **(Photo 06).**

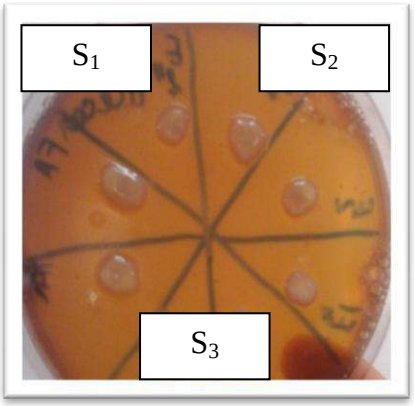


Photo 06 : Teste de pouvoir cétogène des souches (S_1, S_2 et S_3)

Les isolats d'*Acétobacter* issues du vinaigre traditionnel de dattes (Hamraya et Déchet Daglet-Nour) d'Ouargla, ont un pouvoir cétogène **(KHELIF, 2016)**. D'après **ABOULALA**

(2008), si le teste de catalase est positif**,** et le teste du pouvoir cétogène est positif, ça permet de pré-identifier l'espèce *Acétobacter aceti.*

Les résultats de la culture des souches (S_1, S_2 et S_3) pendant 14 jour sur milieu Hoyer, indiquent qu'il y à un développement d'une membrane blanche a la surface de milieu et une turbidité dans les cultures des souches (S_1, S_2 et S_3) en présence d'ammonium. Mais dans les cultures de ces souches en absence d'ammonium il n'y à aucun variation. Donc ces souches peuvent se développer en présence d'ammonium comme seul source d'azote et de 3% d'éthanol (Hoyer positif) **(photo 07).** Ce sont les résultats obtenus par **KHELIF (2016)**, pour les souches d'*Acétobacter,* isolées du vinaigre traditionnel de dattes (Hamraya et Déchet Daglet-Nour) de Ouargla.

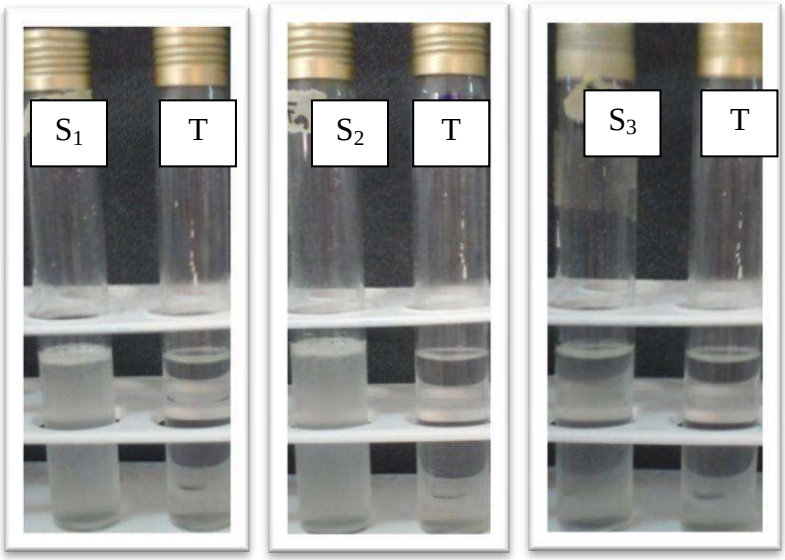


Photo 07 : Résultats de la culture sur milieu de Hoyer

Les testes de recherche de la pigmentation sur milieu d'isolement, sont révélé négatifs et il n'y aucun pigment dans le milieu d'isolement des souches (S_1, S_2 et S_3). Selon **ABOULALA (2008),** le test de pigmentation sur milieu glucose carbonate solide, montre que la sous-espèce de l'espèce *Acétobacter aceti* issues du vinaigre traditionnel des dattes Daglet-Nour et Hchef Daglet-Nour de Ouargla, Ghardaïa et Touggourt présente un résultat négatif. Pour **(KADERE et *al.*, 2008)**, tous les isolats d'*Acétobacter* issues du vin de noix de coco de zones de Mtwapa et Kikambala de la région côtière du Kenya, les résultats de test de formation de pigment brun sur milieu GYP (Glucose, Extrait de levure et peptone) étaient négatifs. Les bactéries acétiques issues de la canne à sucre et des fruits pourris, isolés par

ARIFUZZAMAN et *al.* (2014), présente un résultat négatif de pigmention brune sur milieu GYP.

Concernant la production de cellulose chez (S_1, S_2 et S_3), on a observé le développement d'une pellicule blanche, après l'addition de lugol puis l'acide sulfurique, on n'a pas obtenue des fibres de couleur blanches donc il n'y a pas de production de cellulose **(Photo 08).**

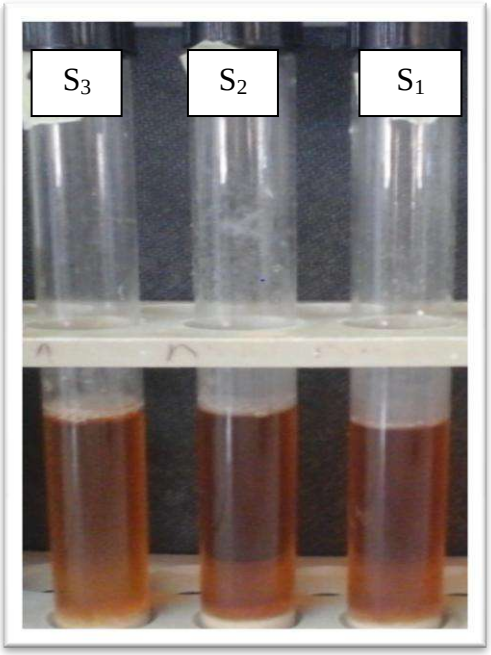


Photo 08 : Résultats du test de la production de cellulose

Le test de production de cellulose présente un résultat négatif pour certains isolats d'*Acétobacter* issues des vinaigres des dattes Daglet-Nour et Hchef Daglet-Nour de Ouargla, Ghardaïa et Touggourt (**ABOULALA, 2008)** et des dattes Hamraya et Déchet Daglet-Nour de Ouargla **(KHELIF, 2016).**

Les souches isolées, sont ensemencées sur milieu glucosé carbonaté solide. Après 48 heures d'incubation on n'observe aucune zone claire autour des colonies pour toutes les souches **(Photo 09).** Ce qui indique l'absence de formation d'acide gluconique à partir de glucose**.**

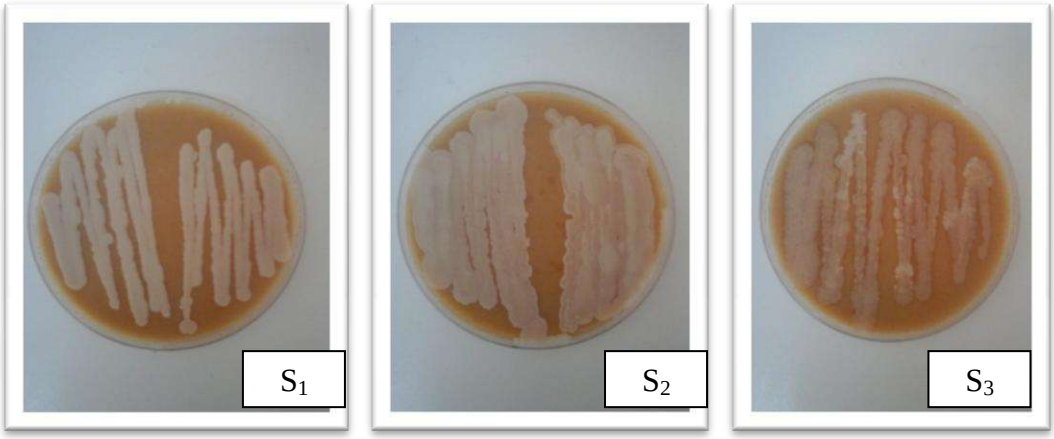


Photo 09 : Résultats du test de formation d'acides gluconique à partir de glucose

Pour certains isolats d'*Acétobacter* du vinaigre traditionnel de dattes (Hamraya et Déchet Daglet-Nour) d' Ouargla, le test de formation d'acide gluconique à partir du glucose sur milieu gélose carbonate de calcium donne un résultat négatif **(KHELIF, 2016)**.

Les souches isolées sont ensemencées sur milieu Haynes liquide. Après 48 heures d'incubation à 30°C, une révélation est poursuivre à l'aide de réactif de Bénédict avec 10 minutes de chauffage au bain-marie à 100°C. On n'observe pas une apparition d'un précipité rouge orange **(Photo 10).** Donc il n'y a pas de formation d'acide cétogluconique.

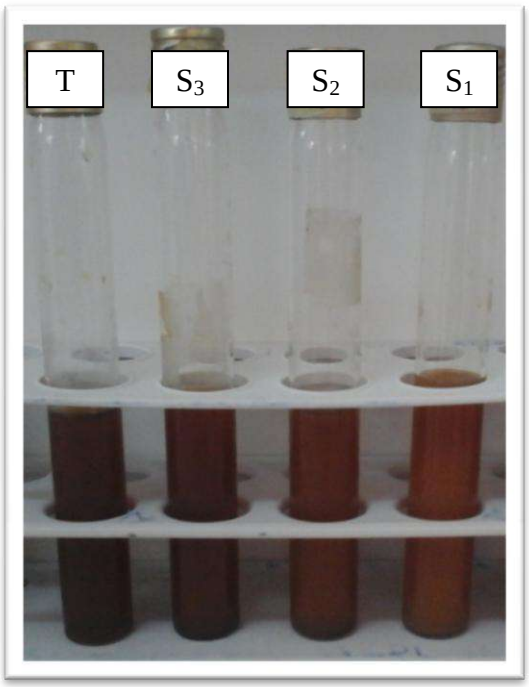


Photo 10 : Résultats de test de formation d'acide cétogluconique

Pour **KHELIF (2016)**, certains isolats d'*Acétobacter* issues du vinaigre traditionnel de dattes (Hamraya et Déchet Daglet-Nour) d'Ouargla ne sont pas capables de produire l'acide cétogluconique.

D'après les résultats des tests des caractères culturaux, microscopiques, physiologiques et biochimiques, et d'après le **(Tableau V) (ANNEX 06)**, qui présente les caractères des bactéries acétiques du genre *Acétobacter* et *Gluconobacter*, nos souches isolée et pré-identifier sont classée comme suivant :

- S_1 : *Acétobacter aceti subsp aceti*
- S_2 : *Acétobacter aceti subsp aceti*
- S_3 : *Acétobacter aceti subsp aceti*

La recherche et l'identification des bactéries acétiques à partir des échantillons du vinaigre traditionnel de dattes de cultivar Dagelt-Nour et Hachef Dagelt-Nour, à faire ressortir 3 souches qui ont été pré-identifiées et classées comme *Acétobacter aceti sub sp aceti* Selon la clé dichotomique de Frateur et le Manuel Bergy de classification dans la 8ème édition. **(OHMORI et *al* ., 1980),** ont obtenus une souche *Acétobacter aceti sub sp aceti*, isolé à partir du moût du vinaigre, des sols des usines du vinaigre et des fruits, qui présente une meilleure activité à 35°C, mais cette activité est totalement disparu à 38°C. pour **(KADERE et *al*., 2008)**, l'isolement des bactéries acétiques à partir du vin traditionnel (Mnazi), a permet de monter la présence des bactéries du genre *Acétobacter* et *Gluconobacter* selon la 9ème édition du Manuel Bergy de systématique bactériologique **(BUCHANAN et GIBBONS, 1984).**

IV.4. Etude de la tolérance des bactéries acétiques aux températures élève

Les 3 souches des bactéries acétiques isolés (S_1 : *Acétobacter aceti subsp aceti*, S_2 : *Acétobacter aceti subsp aceti* et S_3 : *Acétobacter aceti subsp aceti*) à partir du vinaigre traditionnel de dattes du cultivar Daglet Nour et Hechef Daglet Nour, présentent des taux de croissances variables (mesuré par DO à 600nm) dans différentes températures de 30°C à 60°C), sur milieu Frateur liquide **(ANNEXE N°2)**.

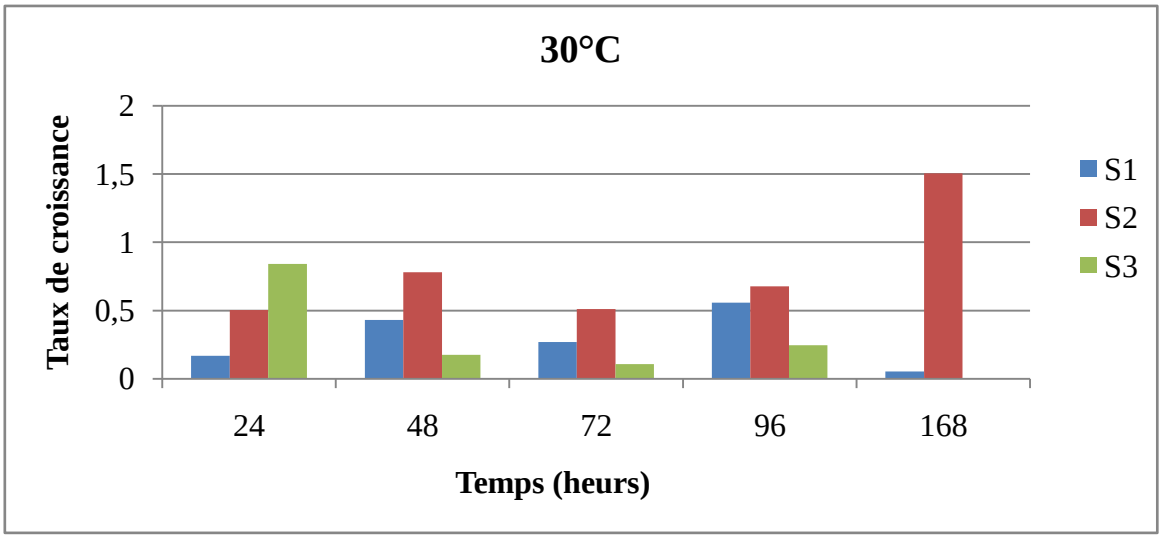


Figure 07 : Taux de croissance des souches S_1, S_2 et S_3 issues du vinaigre traditionnel de dattes pendant 168 heures d'incubation à 30°C.

Les résultats d'examinassions des souches isolées après 24h ,48h, 72h, 96h et 168h d'incubation à 30°C, montrent des taux de croissances qui varie entre 0,15 et 0,7 pour S_1, entre 0,5 et 1,5 pour S_2 et entre 0,3 et 0,81 pour S_3. La souche 2 présente la meilleure croissance avec 1.5 après 168 heurs à 30°C.

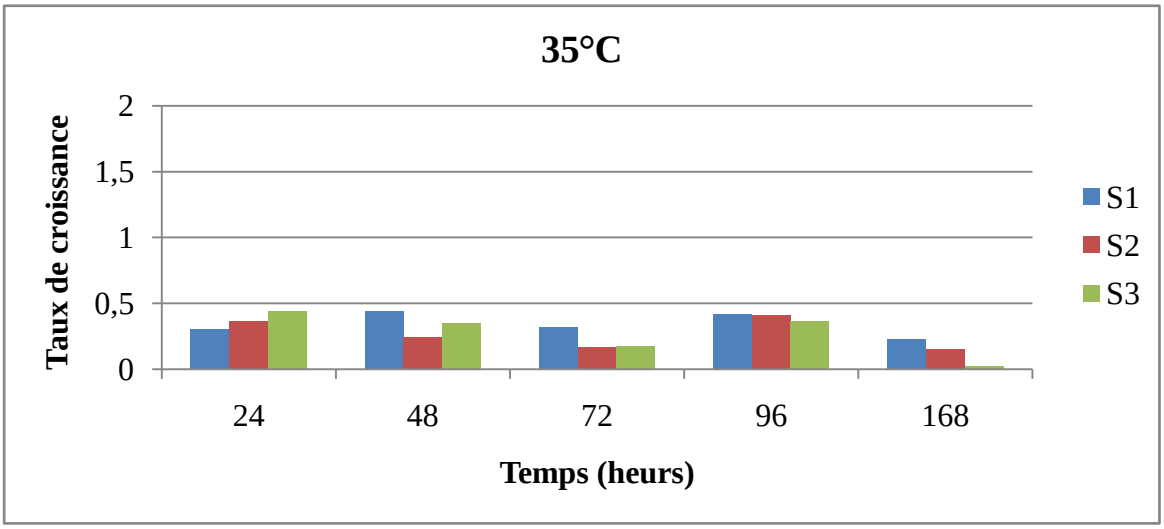


Figure 08 : Taux de croissance des souches S_1, S_2 et S_3 issues du vinaigre traditionnel de dattes pendant 168 heures d'incubation à 35°C.

Les résultats des tests des souches isolés après 24h ,48h, 72h, 96h et 168h d'incubation à 35°C, montrent des taux de croissances qui varie entre 0,22 et 0,42 pour S_1, entre 0,15 et 0,4 pour S_2 et entre 0,3 et 0,42 pour S_3. Où les souche1et 3 apparaissent les meilleures en croissance avec 0.42, après 24heurs pour la souche 3 et après 96 pour la souche 1 à 35°C.

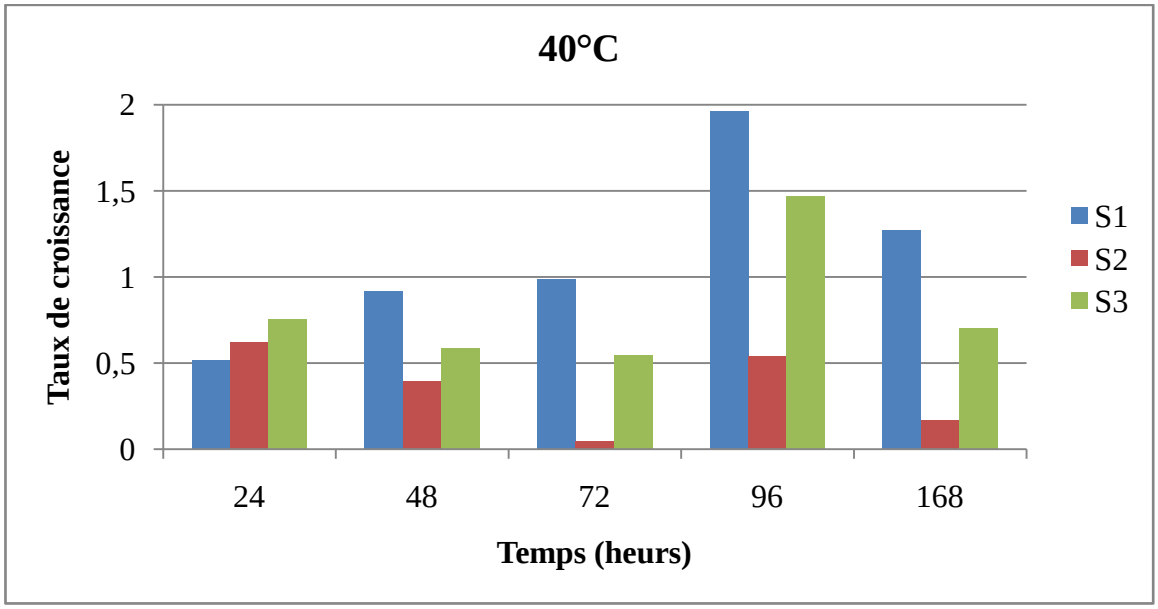


Figure 09 : Taux de croissance des souches S_1, S_2 et S_3 issues du vinaigre traditionnel de dattes pendant 168 heures d'incubation à 40°C.

les résultats d'examinassions des souches isolés après 24h ,48h,72h,96h et 168h d'incubation à 40°C ,montrent des taux de croissances qui varie entre 0,5 et 1,95 pour S_1,pour entre 0,01 et 0,6 pour S_2 et entre 0,51 et 1,4 pour S_3 . On observe qu'à température 40°C la souche1 avec 1.95 après 96 heures, pousse mieux.

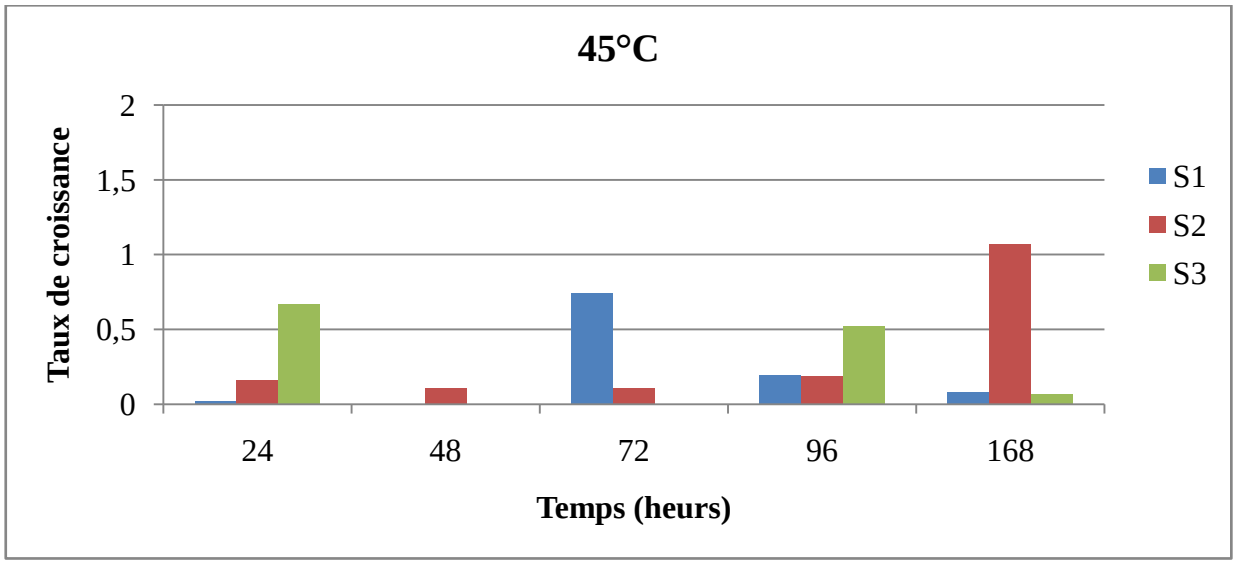


Figure 10 : Taux de croissance des souches S_1, S_2 et S_3 issues du vinaigre traditionnel de dattes pendant 168 heures d'incubation à 45°C.

Les résultats de croissance des souches isolés après 24h ,48h, 72h, 96h et 168h d'incubation à 45°C, montrent des taux qui varie entre 0,04 et 0,72 pour S_1, entre 0,1 et 1,07 pour S_2 et entre 0,8 et 0,68 pour S_3. À température de 45°C, la meilleure souche en croissance est S_2 avec 1,07 après 168 heurs.

.

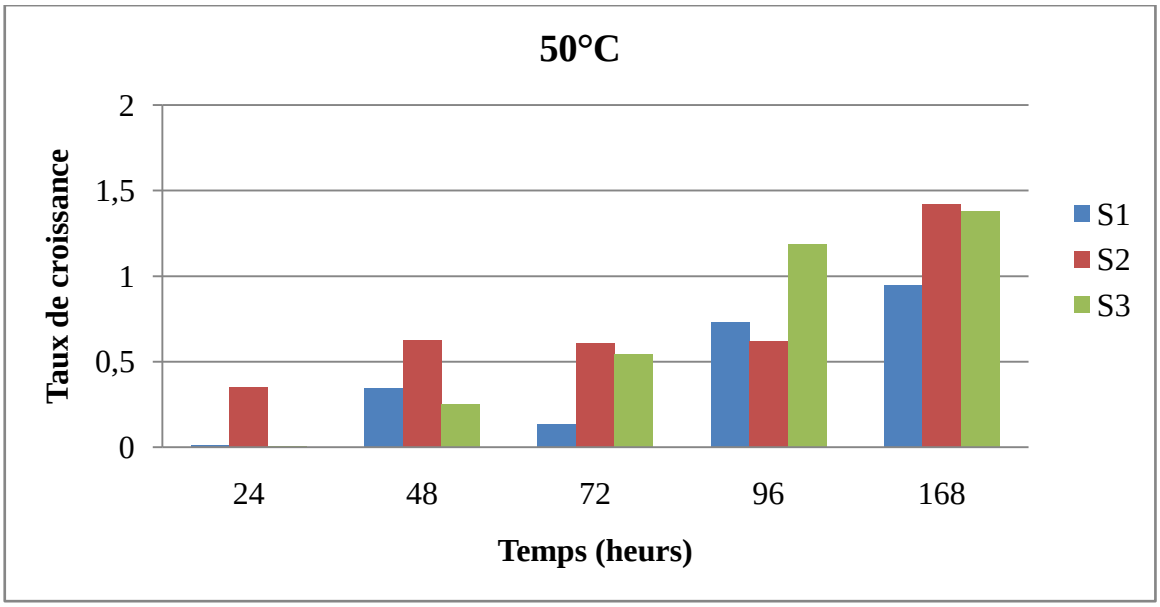


Figure 11 : Taux de croissance des souches S_1, S_2 et S_3 issues du vinaigre traditionnel de dattes pendant 168 heures d'incubation à 50°C.

Après 24h ,48h, 72h ,96h et 168h d'incubation, les résultats de croissances à 50°C des souches isolés montrent des taux qui varie entre 0,01 et 0,95 pour S_1, entre 0,35 et 1.42 pour S_2 et entre 0,25 et 1,38 pour S_3. Dont les meilleures sont celle de la souche 2 avec 1.42 après 168 heurs et la souche 3 avec 1.38 après 168 heurs

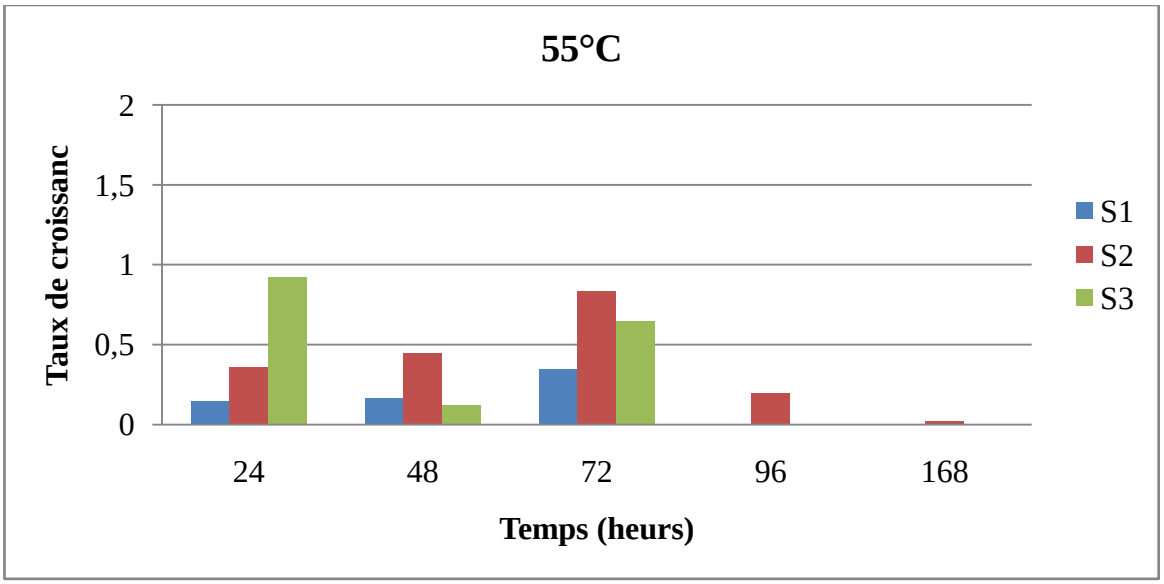


Figure 12 : Taux de croissance des souches S_1, S_2 et S_3 issues du vinaigre traditionnel de dattes pendant 168 heures d'incubation à 55°C.

L'incubation des souches isolés à 55°C après 24h ,48h, 72h ,96h et 168h donne des résultats montrant des taux de croissances qui varie entre 0,15 et 0,35 pour S_1, entre 0,02 et 0.83 pour S_2 et entre 0,13 et 0,93 pour S_3. On observe qu'à Cette température la souche 3 révélé la meilleure en croissance avec 0.93 après 24 heurs.

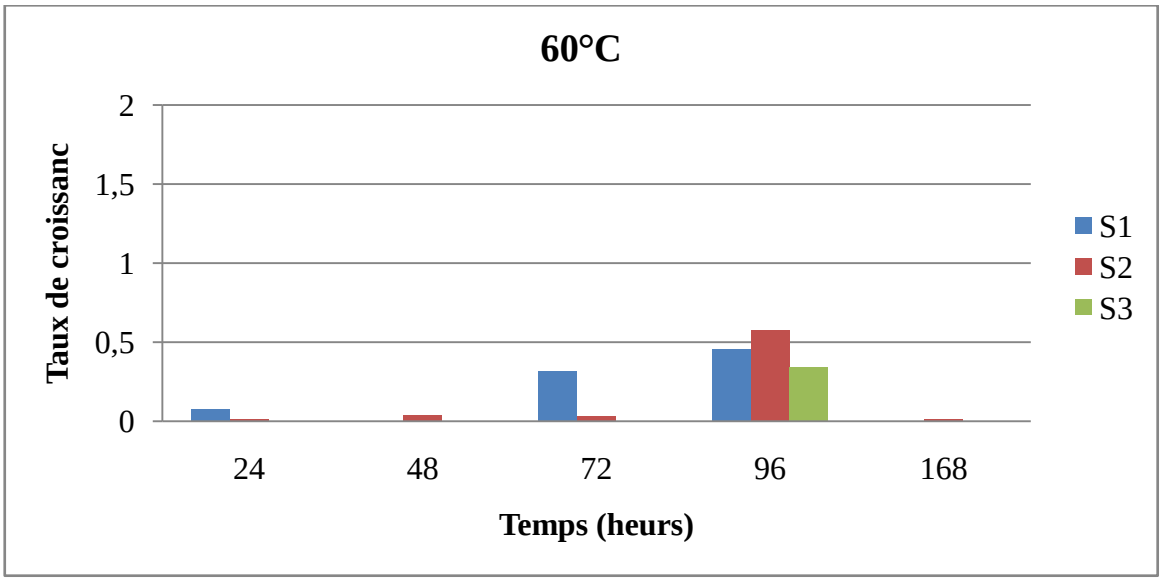


Figure 13 : Taux de croissance des souches S_1, S_2 et S_3 issues du vinaigre traditionnel de dattes pendant 168 heures d'incubation à 60°C.

Les résultats d'examinassions des souches isolés après 24h ,48h, 72h ,96h et 168h d'incubation à 60°C, montrent des taux de croissances qui varie entre 0,08 et 0,46 pour S_1, entre 0,001et 0.57 pour S_2 et 0.34 pour S_3. La bonne croissance est observé la souche 2 avec 0.57 après 96 heurs.

Les interprétations des **(figures 7, 8, 9, 10, 11, 12 et 13)** laissent remarquer que toutes les souches (S_1, S_2 et S_3) poussent sur milieu Frateur liquide aux températures élevées (35°C, 40°C, 45°C, 50°C, 55°C et 60°C), avec recours à température mésophile de 30°C. Mais avec des variations des taux de croissance. Aussi que la souche1 a une bonne croissance à 35°C 40°C et 60°C, la souche 2 a une bonne croissance à 30°C, 45°C, 50°C, 55°C et 60°C, la souche 3 a une bonne croissance à 35°C, 50°C, et 55°C.

Concernant la tolérance des bactéries acétiques aux hautes températures dans notre étude, on a isolés des souches qui tolèrent des températures de 35°C jusqu'à 60°C, et 40°C,

45°C, 50°C et 55°C sont les meilleures températures de croissance préféré par les souches (S_1, S_2 et S_3) issue du vinaigre traditionnel de dattes. Ces hautes températures de 35°C jusqu'à 60°C sont celles enregistrés dans la cuvette de Ouargla, vue les conditions climatiques durant la période estivale dans cette zone aride **(LE HOUROU ,1990).**

Ces observations ont montré que les souches d'*Acétobacters* isolées à partir des échantillons du vinaigre traditionnel de dattes de cultivar Daglet-Nour et Hechef Daglet-Nour peuvent s'adapter rapidement à l'extrême des conditions telles que des températures élevées de 35°C à 60 °C. Par contre, la plupart des espèces des bactéries acétiques peuvent pousser à 37 ° C mais pas à 45 ° C **(MATSUSHITA, et *al*., 2016).** Les souches des bactéries acétiques isolées à partir des dattes Iranien détériorés tolèrent des températures de 36 à 38°C **(BHESHTI-MAAL, 2014).**

Alors que les résultats de **MOUNIR et *al.* (2016)** pour l'isolement des bactéries acétiques issues de vinaigres traditionnels (de datte et de pomme), vins, jus de fruits et les miels et les fruits, ont montré que toutes les souches d'*Acétobacter* sauf les souches de vinaigre traditionnel de dattes et de pomme ont considérablement poussées à 35° C et 41° C.

Pour **BEHESHTI MAAL et SHAFIEE (2012),** les examens de tolérance de la souche *Acetobacter* isolée de la pêche iranienne à des températures élevées telles que 34°C, 36°C, 38°C et 40 °C, ont montré que la croissance de la souche *Acetobacter* isolée pourrait augmenter sur les modifications de milieu de Carr avec des concentrations d'éthanol de 2,5% et 5% au 34 °C, 36 °C, 38 °C et 40 ° C après 24-96 heures d'incubation.

Les isolats d'*Acetobacter* et de *Gluconobacter* issues des vinaigres domestiques dans les villes de l'Iran (Téhéran, Qazvin, Abhar, Takestan) de **MOGHADAMI et *al.* (2013),** peuvent poussée à 40 ° C.

Pour **MOUNIR et *al.* (2016),** les taux d'inactivation thermique de l'ADH (Alcool déshydrogénase) et de l'ALDH (Aldéhyde déshydrogénase) étaient supérieurs à 38°C pour toutes les souches d'*Acétobacters*, et l'ADH était plus Thermosensible que l'ALDH. Ainsi, l'ADH était moins thermostable que l'ALDH.

Pour **PERUMPULI et *al.* (2014),** l'activité ADH et ALDH dans les fractions membranaires des souches d'*Acetobacters* cultivés à 37°C pendant 24 heur avec et sans éthanol et ont été comparés avec *A. pasteuranus* mésophile. Les résultats a révélé que les

activités ADH et ALDH des souches thermotolérance étaient plus fortes que celles de la souche mésophile lorsque les cellules ont été cultivées à 37°C.

Les travaux de **MATSUTANI et *al*, (2016),** ont élucidés la séquence complète du génome de la bactérie thermotolérante, *A.pasteurianus* SKU1108, et l'ont comparée à celle d'autres souches *A. pasteurianus* thermotolaires et mésophiles. En utilisant une analyse génomique comparée des souches étroitement liées, ils ont révélé plusieurs gènes candidats qui sous-tendent le phénotype de la thermotolérance. D'autres recherches de ces souches étroitement liées peuvent fournir de nouvelles connaissances sur les causes génétiques de leurs phénotypes spécifiques.

IV.5 .Etude de la cinétique de la croissance des souches isolées (S_1, S_2 et S_3) à différentes températures (de 30°C à 60°C)

Le suivi de la densité optique des 3 souches (S_1, S_2 et S_3) issues du vinaigre traditionnel de dattes (Deglet Nour et Hchef Deglet Nour) pendant 168 heures, sur milieu Frateur liquide, est démonter sur les **(figures 14,15 et16)**.

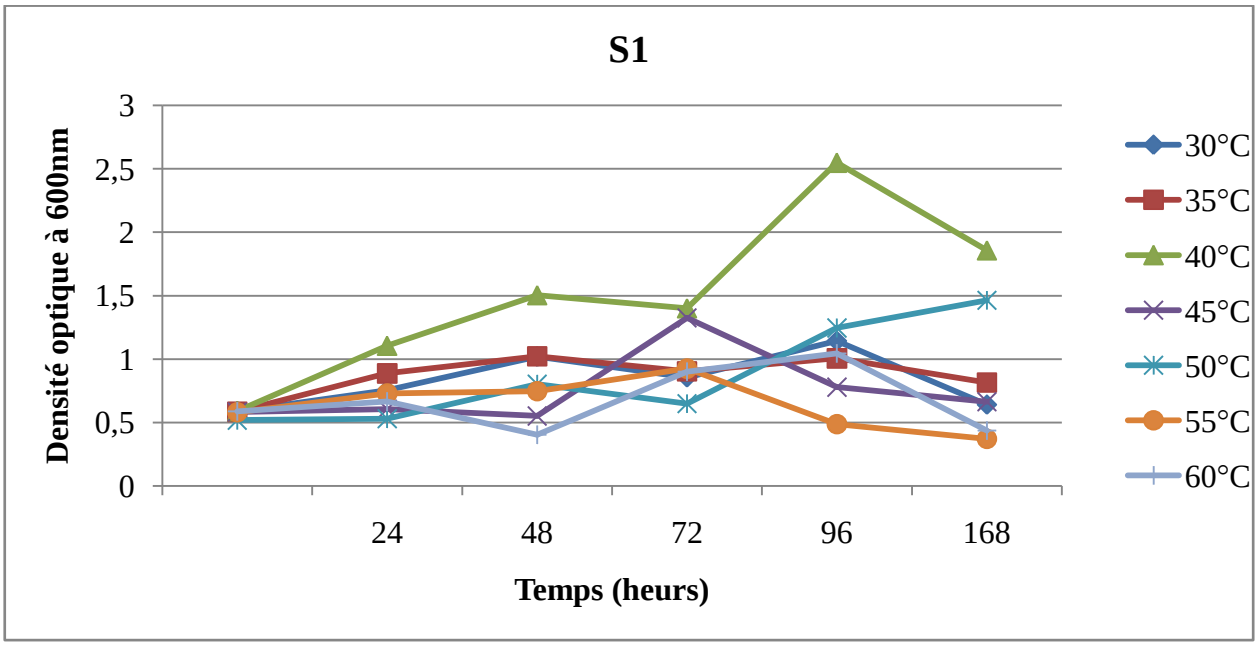


Figure 14 : La cinétique de la croissance de la souche S_1 issue du vinaigre traditionnel de dattes pendant 168 heures d'incubation à différentes températures.

La croissance bactérienne de la souche S_1 sur la **(figure14)** a présenté quartes phases caractéristiques de la croissance diauxique (diphasique).

Une première phase de croissance pendant 48h d'incubation à 30 °C, 35°C ,40°C et 50°C, suivi par une phase de ralentissement jusqu'à 72h, une reprise de croissance maximale à 96h, puis ralentissement après, sauf à 45°C la croissance de la souche 1 est rechuté à partir de 72h d'incubation. À 50°C la croissance est progresse pendant 72h d'incubation, puis régresse jusqu'au minimum après 168h. La température de 60°C n'est pas optimale pour la croissance de la souche 1 où elle pendant 48h, reprit en max après 96h et rédiminuée après.

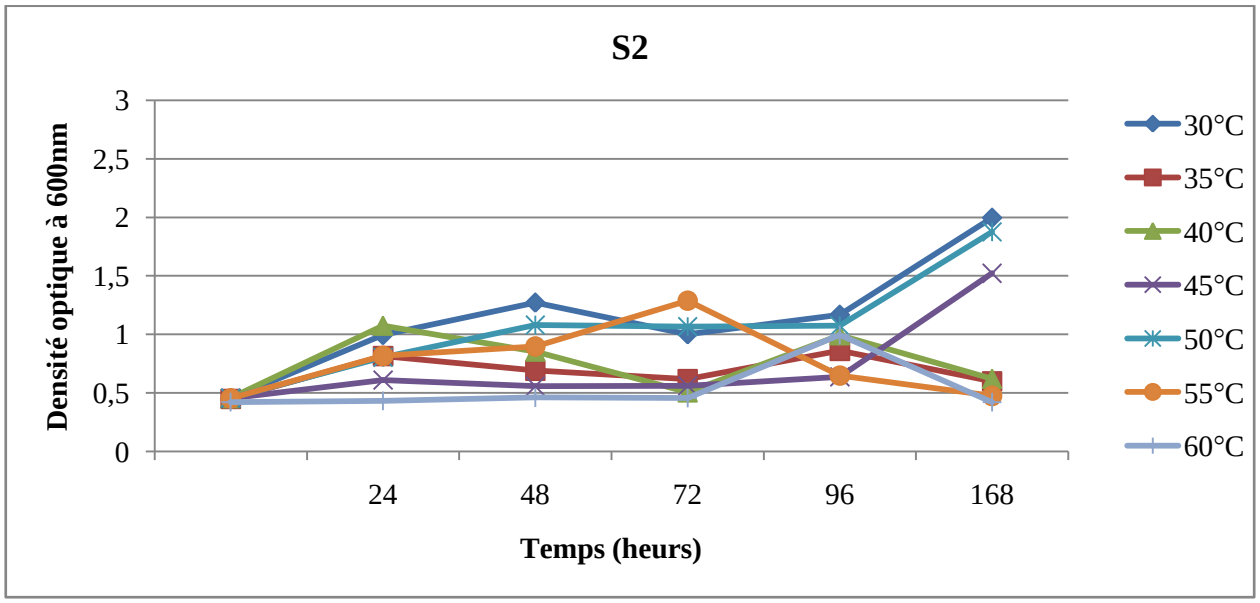


Figure 15 : La cinétique de la croissance de la souche S_2 issue du vinaigre traditionnel de dattes pendant 168 heures d'incubation à différentes températures

L'allure des courbes de croissances de la souche 2 (**Figure15),** laisse apparaitre quartes phases caractéristiques de la croissance diauxique.

Les courbes d'incubation de la souche 2 à 30°C, 45°C et 50°C semblent présentés des allures similaires, avec des croissances caractéristiques à chaque température. Dont elles progressent, puis diminues et repris leurs croissances après 96h en maximum.

Ce qui concerne les courbes de croissance aux 35°C et 40°C, ont la même allure, une évolution après 24h, ainsi un ralentissement à 72h, et une reprise de l'évolution à 96h suivi par diminution.

A 55°C la croissance de la souche 2 est progressive jusqu'à 72h, puis diminue le minimum après 168h.

La croissance de la souche 2 à 60°C est nettement faible pendant 72h, et diminue à partir de 96h selon la **(figure 15)**.

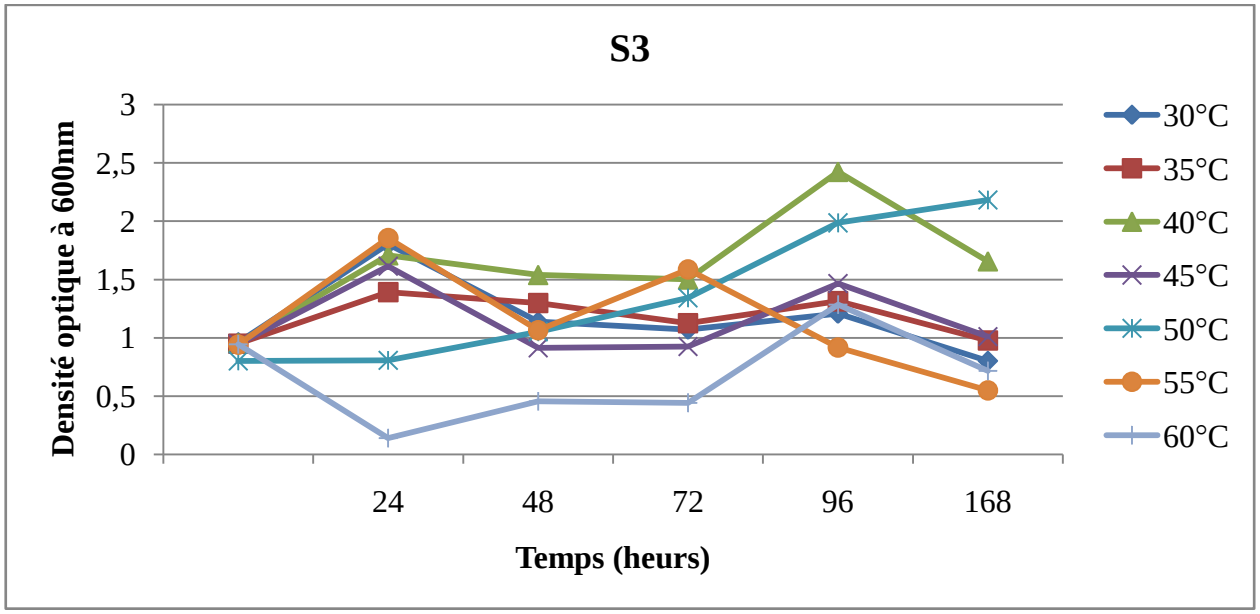


Figure 16 : La cinétique de la croissance de la souche S_3 issue du vinaigre traditionnel de dattes pendant 168 heures d'incubation à différentes températures.

A la lumière de la **(figure 16)**, la cinétique de la croissance de la souche S_3 est parié diauxique et présente quartes phases caractéristiques de la croissance.

Les courbes de croissance à 30 °C ,35°C, 40°C ,45°C présentent presque des cinétiques semblables et des croissances variables à chaque température **(Figure 16)**, qui commence à augmenter jusqu'à 24h, puis diminué et stabilisé jusqu'à 72h, ainsi augmentation commence après, et atteint le maximum à 96h et une diminution achevé.

Pour la température de 50°C, la souche 3 suivi un rythme progressif dés l'ensemencement jusqu'à 168h.

A 55°C la souche 3 évolue en croissance après 48h d'incubation, puis ralentie et reprend sa croissance à 72h, suivant par rechute à de faibles valeurs.

Par contre la température de 60°C n'est pas adéquate pour la souche S_3, où la croissance est tardé jusqu'à 72h et augmenté à 96h et fini par ralentir à 168h.

Les travaux de **KONATE et *al* . (2014)**, ont énoncés que les résultats de la croissance bactérienne ont présenté trois phases caractéristiques de la croissance diauxique. Une première phase de croissance, une phase de ralentissement. Ensuite, une deuxième phase de croissance.

La cinétique de la croissance des souches (S_1, S_2 et S_3) issues du vinaigre traditionnel de dattes, apparue polyphasique, ce qui est peut être expliquée par consommation totale de la première source de carbone (Alcool) et l'utilisation de l'acide acétique obtenu par l'oxydation de l'alcool en tant que deuxième source de carbone. **CHINNAWIROTPISAN et *al*. (2003)** et **SAEKI et *al*. (1997, 1999).** Ont affirmés cette phénomène biochimique par ; les souches *Acetobacter* sont toujours montrent trois caractéristiques de croissance dans les milieux alcooliques. Le premier est de l'oxydation de l'alcool en acide acétique, le second n'est pas une étape de croissance et le dernier est la suroxydation de l'acide acétique accumulé.

Conclusion

La recherche et la pré-identification des bactéries acétiques issues de deux échantillons de vinaigre traductionnel de dattes de cultivar Deglet-Nour et Hchef Deglet-Nour de la cuvette de Ouargla, montre la présence d'un seul genre de bactéries acétiques : *Acétobacter*.

A la lumière des résultats des caractères culturaux, qui révèlent la présence de trois types de colonies ayant chacune les critères suivants :

Colonie 1 dont la forme est ronde à contour irrégulier, la couleur est blanche brunâtre, l'aspect sur le milieu de culture est lisse bombé et avec une petite taille dont le diamètre de la colonie est de1mm.

Colonie 2, dont les critères culturaux sont : une forme ronde à contour irrégulier, une couleur est blanche brunâtre, un aspect lisse bombé et une taille moyenne car les colonies ont un diamètre de 2mm.

Pour ce qui est de la colonie 3, elle présente sous une forme d'étoile à contour irrégulier, une couleur blanche, un aspect sur le milieu de culture, lisse plat et la taille des colonies sont de 5mm donc de grande taille.

L'observation microscopique des cellules provenant de ces colonies montre que toutes les bactéries sont mobiles (état frais), Gram négatif (coloration de gram).

Selon les caractérisations physiologiques et biochimiques, trois types de souches sont pré identifiées. Ces trois souches sont de la même espèce *Acétobacter aceti* et la même sous - espèces : *Acétobacter aceti sub sp aceti.*

L'étude de la thermotolérance des bactéries acétiques montre que les trois souches ont pu croitre en les incubant aux différentes températures utilisées (30°C, 35°C, 40°C, 45°C, 50°C, 55°C et 60°C) dans des cultures discontinues, mais avec des variations légères de leur taux de croissance entre les souches. Le taux de croissance le plus élèves est égale 1.95 pour la souche (S_1) à 40°C ; 1.42 pour la souche (S_2) à 50°C et 1.38 pour la souche (S_3) à 50°C.

Ainsi pour ce qui est de la cinétique de croissance de ces souches, elles ont présenté quatre phases caractéristiques de la croissance diauxique. Une première phase de croissance suivie d'une phase de ralentissement. Et une deuxième étape qui se résume en une deuxième phase de croissance et une phase de ralentissement.

Donc ces souches peuvent être utilisées en tant que souches thermotolérantes à échelle industrielle ou bien dans des bioréacteurs pour la production de vinaigre à grande échelle.

En perspectives il est recommandé :

L'analyse et le séquençage complète du génome de ces souches pour fournir des informations détaillées sur les mécanismes sous-jacents à la thermotolérance et d'identifier les gènes essentiels à la croissance à haute température afin d'obtenir une compréhension plus claire du fond génétique responsable de la thermotolérance,

Approfondir l'étude sur l'effet de la concentration de l'éthanol et de l'acide acétique sur la croissance des bactéries acétique , le fonctionnement des enzyme responsable de la production de vinaigre (ADH et ALDH) et la productivité de l'acide acétique dans ces conditions (haute température , acidité et concentration en éthanol) et de tester ces souches à grande échelle, afin d'améliorer leur utilisation industrielle.

Références bibliographiques

- **ABOULALA S. (2008):** Recherche et identification de quelques souches de bactéries acétiques issues de vinaigre traditionnel de datte, et l'étude d'une propriété technologique : pouvoir acidifiant. Mémoire de la fin d'étude pour l'obtention diplôme d'ingénieur d'état en biotechnologie.
- **ALEID S.M. (2011):** Chapter 32 Industrial Biotechnology. University Al-Hassa, Saudi Arabia, 675,679- 681 p.
- **ALMIA., NOURI S. (1996) :** L'évolution des caractéristiques biométriques et Biochimiques de trois cultivars de dattes (Deglet Nour, Ghars et Degla Beida). Thèse Ingénieur Agronomie .Université d'Ouargla.
- **ANONYME. (1980) :** Analyses quantitatives. Ed. ITMA, Alger ,56-78p
- **ANONYME. (2002)** : Statistiques agricoles : Superficies et productions. ministère de l'agriculture et du développement rural. Série A, 5-6p.
- **ANONYME. (2007)** : Document Agriculture et Agroalimentaire Canada : Le marché mondial du vinaigre, possibilités pour les exportateurs canadiens de vinaigre. Agriculture et Agroalimentaire. Canada ,16 p.
- **ANONYME.(2006) :** Ouargla: réalisation en cours d'une étude d'amélioration de l'élevage en zones sahariennes ,150p
- **APRIA**. **(1979)** : Microbiologie et industrie alimentaire. Annales du congrés international. Paris. Tome 1, 2,3 et 4.
- **ARAB H., GUEZZOUN KH. (2003) :** Contribution à l'étude des caractéristiques physicochimique et biochimique du vinaigre traditionnel de datte de la cuvette de l'Ouargla : vertu thérapeutique. Mémoire de l'université d'Ouargla, 18, 23-29 p.
- **ARIFUZZAMAN M.D., ZAHID HASAN M.D., BADIER RAHMAN S.M., KAMRUZZAMAN PRAMANIK MD. (2014):** Isolation and characterization of *Acetobacter* and *Gluconobacter* spp from sugarcane and rotten fruits. Trade Science Research & Reviews *in* BioSciences .Vol. 8(9) :359-365
- **ASAI T. (1968) :** Bactéries Acide acétique: Classification et Biochemical Activités. Université de Tokyo Press, Tokyo, Japon.
- **BAR R., GAYNER JL., KIRWAN DJ. (1987) :** Un motif d'inhibition du produit hors du commun:batch fermentation de l'acide acétique. Biotech Bioeng. Vol. 29 : 796-8.
- **BEDRANI S., BENZIOUCHE S.E. (2000):** Preceding the congress Arab.The

Contribution of the Scientific Research and the New Technologies in the Development and the Value Enhancement of the Arid and Semi Arid Regions El-Oued".

- **BEHESHTI MAAL K., SHAFIEE R. (2012):** Characterization of an *Acetobacter* Strain Isolated from Iranian Peach that Tolerates High Temperatures and EthanolConcentrations. Internatonal Journal of biologie and lif science. Vol. 8 :4.
- **BELGUED J.M. (2007) :** Evaluation du sous-secteur des dattes en Algérie. INA ,El-Harrach,60p.
- **BELKACEM M. (1987) :** Contribution à la production d'acide acétique à partir du lactosérum. Thèse Ingénieur. INA, El HARRACH, 21-25p.
- **BEN AMARA S., CHBANE H., BON KHLIFA M., (2004).** Essai de formulation d'en yaourt naturel aux dattes. Resue industrie Agricole et alimentaire. Actualités techniques et scientifique N°1/2 mensuel ,11-14p.
- **BENHAFID H. (1990)** : Contribution à l'analyse des problèmes technico - administratifs de l'office national des dattes. Mémoire de technicien supérieur. ITAS. Ouargla, 2-19 p.
- **BERRAUD C. (2000) :** Production de vinaigre hautement concentrée dans une culture en fed- batch. Journal of Biotechnology Letters. Vol. 22:451-454.
- **BORRAIS M. (1963) :** Grand La Rousse. Encyclopédique. Ed libraire Larousse. Paris.
- **BOUAZIZ S. (2009) :** Caractérisation physico-chimique et biochimique de quelques vinaigres traditionnels des dattes issus de cultivars de la région d'Ouargla. Magistère en biologie université d'Ouargla, 5-9p.
- **BOUGHNOU N. (1988) :** Essai de production du vinaigre à partir des déchets de dattes.Thèse de Magister INA. El-Harrach ,82p.
- **BOUKHIAR A. (2008):** Analyse du processus traditionnel d'obtenition du Vinaigre de date tel qu'appliqué au sud Algérien essai d'optimisation (technologie du Vinaigre, la fermentation spontanée).Mémoire de Master. Universite M'hamed Bougara Boumerdes.
- **BOURGEOIS C. M., LARPENT J. P. (1990) :** Microbiologie alimentaire. Tome II les fermentations alimentaires .Ed technique et documentation. Paris, 121-140,171-17**6**p.
- **BOURGEOIS C. M., LARPENT T. P., (1996)** : Microbiologie alimentaire.

Aliment fermentés et fermentation alimentaires. Tome 2 éme Edition et documentations, 352- 623p.

- **BOUSDIRA K. (2007) :** Contribution à la connaissance de la biodiversité du palmier dattier pour une meilleure gestion et une valorisation de la biomasse : caractérisation morphologique et biochimique des dattes de cultivars les plus connus de la région du du M'zab, classification et évaluation de la qualité, thèse de Magister d'état en génie alimentaire, option technologie agro-alimentaire, université M'hammed Bouguerra,Boumerdès, 157 pages.
- **BRANGER A. (2008) :** Fabrication des produits alimentaires par fermentation: l e s ferments. Technique de l'ingénieur .F 3500,1-16 p.
- **BUCHANAN R.E., GIBBNS N.E. (1984)** : Family VI. Acetobacteraceae. I n: Bergey'ss Manual of Systematic Bacteriology. The Williams and Wilkins Co.. Baltimore.Vol. 1, 267-78p.
- **CALLEJÓN R.M., TESFAYE W., TORIJA M.J., MAS A., TRONCOSO A.M., MORALES M.L. (2009)**: Volatile compounds in red wine vinegars obtained by submerged and surface acetification in different woods. Journal of Food Chemistry. Vol. 113: 1252–1259 .
- **CARR J.G., SHIMWELL J.L. (1968):** Pigment souches productrices de Acetobacter aceti. Nature, 186, 331-332 p.
- **CHINNAWIROTPISAN P., G., THEERAGOOL S., LIMTONG H., TOYAMA O., ADACHI., MATSUSHITA K., (2003)** : Quinoprotein alcohol dehydrogenase is involved in catabolic acetate production, while NAD-dependent alcohol dehydrogenase in ethanol assimilation in *Acetobacterpasteurianus* SKU1108. J. Biosci. Bioeng.Vol. 96:564-571.
- **Codex alimentaire. (1987) :** Norme codex pour le vinaigre. Norme régionale africaine. Codex. STAN, 162 p.
- **DE LEY J., GILLIS M. (1980) :** Intra- et similitudes égrené du ribosome Cistrons d'acide ribonucléique d'Acétobacter et Gluconobacter. International Joournal des Systematiques Bacteriologie 30, 7-27p. *Acétobacteriaceae*. Manuel de Bergey de Systematique Bacteriologie. Williams and Wilkins Baltimore, Baltimore vol. 1 : 267-278.

- **DIVIES C. (1989) :** Le vinaigre, microbiologie alimentaire. Les fermentations alimentaires. Ed.Tec et Doc. Lavoisier, Paris.Vol 2 :121-147.
- **DIVIES C. (1989) :** Le vinaigre. Microbiologie alimentaire les fermentations alimentaires. Ed *Tec et Doc*, 93-105p.
- **DJOUAB A. (2007) :** Préparation et incorporation dans la margarine d'un extait de dattes des variétés sèches. Mémoire de Magister en Génie Alimentaire. Université M'Hamed Bougara Boumerdès, 43-132 p.
- **DUCULOT. (1932) :** C, H, B Beall 175 *Acetobactereacea* (orto-epia de eliot johen et du bartas-Goulat Gallica, etudes en philogy, XIII, 1946.255-262p.
- **FOLLMAN H. (1983):** Acetic-acid. Chap 3.Vol 5: 388-407.
- **GALZY P. GUIRAUD J.(1980)** : L'analyse microbiologie dans les industries alimentaires. Ed. l'usine nouvelle. Paris,239p.
- **GIRARD., ROUGIEUX. (1958) :** Technique de microbiologies agricole. Ed. dunod, paris ,307-320p.
- **GUIRAUD J. P. (1998) :** Microbiologie alimentaire. Ed. Dunod. Paris, 163-505p.
- **GUIRAUD J.P. (2003) :** Microbiologie alimentaire. Ed .Dunod. Paris.
- **GUIRAUD J.P.(2012)** : Microbiologie alimentaire. Ed .Dunod. Paris, 267-270p.
- **HAMIDI A., SLIMANI A. (2008) :** Identification des souches d'*acétobacter* isolées à partir du vinaigre traditionnel de datte de la région de M'Zab. DESS, Université d'Ouargla.
- **HANNACHI S., KHITRI D. (1998) :** Inventaire variétal de la palmeraie algérienne. Ed.CDRS.
- **HAUGE J.G., KING T.E., CHELDELIN V.H. (1955) :** Oxydation de dihydroxyacetone via le cycle pentose dans suboxydans *Acetobacte*r. J. Biol. Chem. Vol.214: 11-26.
- **KADERE T. T., MIYAMOTO T., ONIANG R. K., KUTIMA P. M.,NJOROGE S. M.(2008) :** Isolation and identification of the genera *Acetobacter* and *Gluconobacter* in coconut toddy (mnazi). African Journal of Biotechnology. Vol. 7 (16) :2963-2971.
- **KERSTERS K., LISDIYANTI P., KOMAGATA K, SWINGS J.(2006):** The Family *Acetobacteraceae*: The Genera *Acetobacter*, *Acidomonas*. Asaia, *Gluconacetobacter*, *Gluconobacter*, et Kozakia. Journal of Prokaryotes 5. Chapter 3.1.8, 163–200.

- **KHELIF F. (2016)** : Recherche et identification des quelques souches des bactéries acétiques issues de Vinaigre traductionnel des dates du Sahara Septentrional Est Algérien: Etude du pouvoir acidifiant. Mémoire de Masters en Microbiologie. Université Kasdi Marbah Ouargla.
- **KONATE M., ESSOH AKPA E., BAN KOFFI L, SEVERIN KRA K.A., MEGNANOU R.M., NIAMKE S. (2014):** Isolation of thermotolerant and high acetic acid-producing *Acetobacter pasteurianus* from Ivorian palm wine. Emir. J. Food Agric.Vol. 26 (9): 773-785.
- **L.D.(2007) :** Du vinaigre pour sauver des vies. Revue de Biotribune « Springer 2007 », Vol.2 : 4.
- **LAMBIN ., GERMAN A. (1969) :**Précis de microbiologie. Tome 1 Ed. Masson. Paris, 515p.
- **LARPENT J.P. (1991)**. Biotechnologie des levures. Ed. Masson. Paris, 97p.
- **LARPENT J.P. (1997) :** Microbiologie Alimentaire : techniques de laboratoire. Edition Tec & Doc, 1073 p.
- **LEISINGER K M., SCHMITT K. (1996):** «Survivre au Sahel, défi non verser l'écologie et la politique de développement» ISNAR, Pays-Bas.
- **MA/DSAEE. (2001)** : Statistiques agricoles : Superficies et productions. Ministère de l'agriculture et du développement rural. Série A, 5-6 p.
- **MATHEIS W., BOURGEOIS J., CAPEROS J., FEUSI J., GIRARD J.M., HELBLINGN J., HISCHENHUBER C. (1995)** : Vinaigre de fermentation. MSDA (manuel suisse des denrées alimentaires).
- **MATSUSHITA K., TOYAMA H., ADACHI**. **(1985) :** Chaînes et bioénergétique des bactéries acétiques respiratoires. Adv. Microb. Physiol, 36, 247-301 .
- **MATSUTANI M., HIRAKAWA H., HIRAOKA E., THEERAGOOL G., YAKUSHI T., MATSUSHITA K. (2016):** Complete Genome Sequencing and Comparative Genomic Analysis of the Thermotolerant Acetic Acid Bacterium, *Acetobacter pasteurianus* SKU1108, Provide a *New Insight into Thermotolerance.* Microbes Environ. Vol. 00: 0, 000-000.
- **MEHAIA M.A., CHERYAN M. (1991)** :Fermentation of date extracts to ethanol and vinegar in batch and continous membrane reactors. Journal of Enzyme Microb.

Technol, Vol. 13:257-261.

- **MIMOUNI Y. (2009) :** Mise au point d'une technique d'extraction de sirops de dattes ; comparaison avec les sirops à haute teneur en fructose (HFCS) issus de l'amidonnerie Mémoire de Magister en Biochimie et Analyse des Bio-Produits, Université Kasdi Marbah Ouargla, 12- 13 p.
- **MOGHADAMI F., SOUDI M.R., SEPEHR S.H., REZVANIANZADE M.R. (2013) :** Evaluation of Thermotolerance of Native Strains of Acetic acid Bacteria in Iran. International Research Journal of Applied and Basic Sciences. Vol 4 (9): 2670-2675.
- **MOUNIR M., SHAFIEI R., ZARMEHRKHORSHID R., HAMOUDA A., ISMAILI ALAOUI M., THONART PH. (2016) :** Simultaneous production of acetic and gluconic acids by a thermotolerant Acetobacter strain during acetous fermentation in a bioreactor. Journal of Bioscience and Bioengineering. Vol. 121 (2) : 166-171.
- **MUNIER P. (1973) :** Le palmier dattier, techniques agricoles et productions tropicales . Ed maison neuve et larosse, paris, 221p.
- **OHMORI S., MASAI H., ARIMA K., BEPPU T. (1980)** : Isolation and Identification of Acetic Acid Bacteria for Submerged Acetic Acid Fermentation at High Temperature. Agric. BioI. Chem.vol. 44 (12) : 2901-2906.
- **OULD HADJ. M.D. CHEICK M.S. SIBOUKEUR O. (2003):** Qualité hygiénique et caractéristiques physico-chimiques du vinaigre traditionnel de quelques variétés de dattes de la cuvette de Ouargla. Revue des énergies renouvelables, NS, Biomasse, CDER, Alger: 87-92.
- **OULED EL HADJ M.D., SEBIHI A.H., SIBOUKEUR O. (2001)**: Qualité hygiénique et caractéristiques physico-chimiques du vinaigre traditionnel de quelques variétés de dattes de la cuvette de Ouargla. Biomasse, numéro spécial, production et valorisation ,164-169p.
- **PERUMPULI P.A.B.N., WATANABE T., TOYAMA H**. **(2014)** : Identification and characterization of thermotolerant acetic acid bacteria strains isolated from coconut water vinegar in Sri Lanka. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. Vol.78(3) : 533-541.
- **QINGPING X.U., WENYI T.A.O., ZONGHUA A.O. (2007)**: Antioxidant activity of vinegar mélanoidines. Journal of Food Chemistry.Vol. 102:841-849.
- **QUIGPING XU., WENYI TAO., ZANGHUA AO. (2007):** Antioxidant activity of

vinegar mélanoidins. Journal of Food Chemistry.Vol. 102, 841-849p.

- **SAEKI A., TANIGUCHI M., MATSUSHITA K., TOYAMA H., THEERAGOOL G., LOTONG N., ADACHI O. (1997)**: Microbiological aspects of acetate oxidation by acetic acid bacteria, unfavorable phenomena in vinegar fermentation. Biosci. Biotechnol. Biochem.Vol. 61:317-323.
- **SEBIHI A. (1996) :** Contribution à l'étude de quelques paramètres de la qualité hygiénique et biochimique du vinaigre traditionnel de quelques variétés de dattes de la cuvette d'Ouargla. INFA/AS. Peu coûteux". Bulletin du réseau TPA. N° 19.
- **SEDRA My H. (2001) :** Descripteur du palmier dattier (phoenix dactylifera L.). Edition INRA Maroc, 195 p.
- **SIMON P., MEUNIER R. (1970) :** Microbiologie industrielle et génie biochimique. édition Masson et Cie. Paris.
- **STADLER-SZOKE A., NYESTE L., et HALLO J. (1980) :** Les études sur les facteurs affectant gluconique et 5 acides cétogluconique formation par Acetobacter. Acta Aliment. 9: 155-172.
- **TEKKOUK F. (1997):** Recherche, isolement et caractérisation de souches d'Acétobacter D'origine locale. Thèse ING.INFS/AS. Ouargla, 6-13p.
- **TESFAY W., MORALES M.L., GARCIA P., TRONCOSO A.M. (2002) :** Wine vinegar: technology, authenticity and quality evaluation. Journal of Trends in Food Science & Technology.Vol. 13:12-21.
- **VINCENT J.M. (1970):** A manual for the practical study of the root-nodule bacteria.IBP handbook N°15. Blackwell Scientific Publishers, Oxford.
- *References électroniques* :
- **ARNAUD J**."*Vinaigre". Site : www.vinajol.com.*
- *http://www.vulgaris-medical.com/upload/visuel-Acetobacter*
- **HYPERLINK. (2005):** Site *: http://Fr.ekopedia.org/vinaigre*
- **POXIXOO F. (2003) :**"Vinaigre élément de base". Site : File : //D: vinaigre 20% à 20%.
- *Références de classification :*
- **Référence ITIS:** Acétobacter Beijerinck, 1898 (fr) (+ version anglaise (en)) (consulté le 30 BackboneTaxonomy.doi: 10,15468 / 39omei Consulté via
- *http://www.gbif.org/species/3221528 sur 16/05/2016*

Annexes

ANNEXE:01

N° d'échantillons : vinaigre de Hchef Daghlet-Nour et de Daghlet-Nour de Ouargla

1 /le vinaigre :

A/ vinaigre de Hchef Daghlet-Nour

Lieu de fabrication de vinaigre :	Ouargla
Datte de fabrication de vinaigre :	Avril 2014
Datte de l'échantillonnage :	2015
Quantité de vinaigre collecté : ml	250 ml

B/ vinaigre de datte Daghlet-Nour

Lieu de fabrication de vinaigre :	Ouargla
Datte de fabrication de vinaigre :	Avril 2014
Datte de l'échantillonnage :	2015
Quantité de vinaigre collecté : ml	250 ml

2 / la datte :

A/ vinaigre de Hchef Daghlet-Nour

La variété :	Hchef daghlet-Nour
L'état de datte :	Déchet
Le stade de maturation :	Tmar

B/ vinaigre de datte Daghlet-Nour

La variété :	Hchef Daghlet-Nour
L'état de datte :	Tmar
Le stade de maturation :	Tmar

3/ Techniques de préparation et de stockage :

Lavage de datte :	Oui
Volume de datte :	1/3
Volume de l'eau :	2/3
Type de récipient :	Plastique
Durée de la fermentation alcoolique (jours) :	40 jours
Additifs :	/
Sel Na cl (g)	/
Org	/
Harmal	/
Blé	/
Cariante	/
Charbon	/
Piment	/
Durée de la fermentation acétique (jours) :	3 jours
Tamisage et filtration :	oui
L'exposition a la lumière (brunissement) :	Non
Durée de stockage :	2 années
Condition de stockage :	T : optimal lumière : non

4 / contrôle organoleptique :

A/ vinaigre de Hchef Daghlet-Nour

La couleur :	Marron clair
Le gout :	Acide
L'odeur :	Caractéristiques de l'odeur de datte
La viscosité :	Oui pour Hchef Daghlet-Nour
La dilution :	Non
PH :	3,5

B/ vinaigre de datte Daghlet-Nour

La couleur :	Marron foncée
Le gout :	Acide
L'odeur :	Caractéristiques de l'odeur de datte
La viscosité :	Non
La dilution :	Non
PH :	3,6

ANNEXE:02

MILIEU DE CULTRE

- **Milieu d'isolement**

Milieu Naturel

Vinaigre naturel de datte	40ml
Agar	4g
Eau distille	160ml

Milieu Frateur

Extrait de levure	30g
Agar	20g
$CaCo_3$ = (carbonate de calcium)	20g
Eau distille	1000ml

Après autoclavage à110°C durant 10 min le milieu est lassai refroidir jusqu'à 45°C .le milieu ainsi refroidis, on ajoute 100 ml d'alcool éthyliques à15% stérile au bin marie pendent 10 minutes à 100°C

- **Milieu d'identification**

Milieu de Carr

Extrait de levure	30g
Agar	20g
vert de bromcreosol	0.02g
Eau distille	1000ml

Après stérilisation à 110°C durant 10 min le milieu lassai refroidir jusqu'à45°C .le milieu ainsi refroidis, on ajoute 20 ml d'alcool éthyliques à15% stérile au bin marie pendent 10 minutes à 100°C.

Milieu de test de pouvoir cétogène : milieu gélosé au glycérol

Extrait de levure	30g
Glycérol	30g
Agar	20g
Eau distille	1000ml

Stériliser à l'autoclave pendant 15°C durant 10 min le milieu lassai refroidir jusqu'à45°C. le milieu ainsi refroidis, on ajoute 100 ml d'alcool éthyliques à15% stérile au bin marie pendent 10 minutes à 100°C

Milieu de test de Hoyer

$(NH_4)_2SO4$	1g
K_2HPO_4	0 ,1g
KH_2PO	0 ,9g
$MgSO_4$ - $7H_2O$	0,25g
$FeCl_3$,$6H_2O$	0,02ml
Eau distille	1000ml

- repartie le milieu en tube a essai (9ml)
- stérilisé à120°C /15min
- ajouter a chaque tube 1ml d'une solution d'éthanol à30 % , stérilisé au bin marie pendent 10 minutes à 100°C

Milieu test de pigmentation

Extrait de levure	30g
Carbonate di sodique anhydre	20g
Agar	20g
Glucose	20g
Eau distille	1000ml

Stériliser le mélange à 1 bar, à autoclave pendant 15 min à 120°C

Milieu test de formation d'acide gluconique à partir du glucose : milieu gélose carbonate de calcium

Extrait de levure	10g
$CaCo_3$=(carbonate de calcium)	20g
Agar	20g
Glucose	100g
Eau distille	1000ml

Après stérilisation à 110°C durant 10 min le milieu lassai refroidir jusqu'à45°C .le milieu ainsi refroidis, on ajoute 100 ml d'alcool éthyliques à15% stérilisé au bin marie pendent 10 minutes à 100°C.

Milieu test de formation d'acide cétogluconique: milieu de Hayenes

Extrait de levure	1g
Peptone	1,5g
Phosphate dipotasiume	1g
Glucose	40g
Eau distille	1000ml

Stériliser à l'autoclave pendant 15 min à120 °C

Milieu de test de production de cellulose : Bouillon pour les bactéries acétiques

Extrait de levure	10g
$CaCo_3$= (carbonate de calcium)	20g
Glucose	100g
Eau distille	1000ml

Stériliser à l'autoclave pendant 15 min à120 °C

Eau physiologique

chlorure de sodium	9g
Eau distille qsq	1000ml

Stériliser à l'autoclave pendant 15 min à120 °C

Réactif de Bénédicte

Sulfate de cuivre	1,7g
Carbonate disodique anhydre	10g
Citrate de sodium	17 ,3g
Eau distille qsq	100ml

ANNEXE:03

CLASSIFICATION

Acétobacter acéti acéti :

Règne	*Bacteria*
Sous-règne	*Negibacteria*
Embranchement	*Proteobacteria*
Classe	*Alphaproteobacteria*
Ordre	*Rhodospirillales*
Famille	*Acétobacteriaceae*
Genre	*Acétobacter*
espèces	*Acétobacter aceti*
subsp	*Acétobacter aceti aceti*

Beijerinck, 1898

ANNEXE:04

Clé dichotomique

Le tableau 04 donne les caractéristiques des principales espèces de bactéries acétiques. Une clé de détermination simplifiée permet l'identification des souches obtenues:

1- **pas de pouvoir suroxydant** : *Gluconobacter oxydans*

Selon Frateur :

- ✓ pas de pigment sur milieu glucosé :
  - température optimale 18-21°C : *G.oxydans subsp oxydans* ;
  - température optimale 30-35°C : *G.oxydans subsp industrius;*
- ✓ pigment rose *:*
  - température optimale 18-21°C : *G.oxydans subsp suboxydans,*
  - température optimale 30-35°C : *G.oxydans subsp melanogenes*

2- **pouvoir suroxydant** : *Acetobacter*

2-1 catalase - :

2.1.1 Culture sur milieu Hoyer + :*A. pasteurianus* ou *A. peroxydans*

2.1.2. Culture sur milieu Hoyer - : A. pasteurianus ou *A. subsp peroxydans* ou *A.paradoxum*

2.2 Catalase + :

- ✓ pouvoir cétogène + :
  - pigment brun *(A.liquefaciens) (A.aceti subsp liquefaciens)*;
  - pas de pigment:
    - culture sur milieu Hoyer + *(A.aceti)(= A.aceti subsp aceti)* ;
    - culture sur milieu Hoyer –
      - cellulose + :*(A. aceti subsp xylinum);*
      - cellulose – : *(A . pasteurianus) (A.aceti subsp orleanensis = mesoxydans)*

2.2.2. Pouvoir cétogène - :

- ✓ culture sur milieu Hoyer +
  - cellulose + : *(A . pasteurianus) (A . pasteurianus subsp estunensis)* ;

- cellulose – : *(A . pasteurianus) (A . pasteurianus subsp lovaniensis)(= A.lovaniense))*;

✓ culture sur milieu Hoyer - :

- *A.gluconique + (A . pasteurianus) (A . pasteurianus subsp pasteurianus)*
- A.gluconique - *(A . pasteurianus) (A . pasteurianus subsp ascendens =A. ascendens).*

ANNEXE 05

- **Les tableaux de taux de croissance pour chaque température à une longueur d'onde 600nm**

Température	30°C				
Heurs / Souches	24	48	72	96	168
1	0,168	0,432	0,270	0,557	0,053
2	0,504	0,781	0,511	0,677	1,506
3	0,842	0,177	0,109	0,246	-0,159

Température	35°C				
Heurs / Souches	24	48	72	96	168
1	0,303	0,438	0,320	0,421	0,230
2	0,368	0,242	0,168	0,411	0,151
3	0,442	0,349	0,175	0,364	0,028

Température	40°C				
Heurs / Souches	24	48	72	96	168
1	0,516	0,915	0,986	1,959	1,269
2	0,619	0,379	0,049	0,537	0,166
3	0,753	0,584	0,544	1,468	0,701

Température	45°C				
Heurs / Souches	24	48	72	96	168
1	0,022	0	0,742	0,193	0,081
2	0,157	0,104	0,108	0,185	1,070
3	0,668	0	0	0,520	0,064

Température	50°C				
Heurs / Souches	24	48	72	96	168
1	0,011	0,346	0,130	0,727	0,946
2	0,348	0,623	0,610	0,617	1,420
3	0,066	0,251	0,540	1,185	1,381

Température	55°C				
Heurs / Souches	24	48	72	96	168
1	0,149	0,167	0,345	0	0
2	0,363	0,444	0,834	0,194	0,021
3	0,925	0,125	0,647	0	0

Température	60°C				
Heurs / Souches	24	48	72	96	168
1	0,078	0	0,314	0,458	0
2	0,011	0,040	0,063	0,574	0,001
3	0	0	0	0,341	0

- **Les tableaux de la densité optiques pour chaque souche à une longueur d'onde 600nm**

Souche 1							
Température / Heurs	30°C	35°C	40°	45°C	50°C	55°C	60°C
0	0.586	0.584	0.589	0.583	0.518	0.58	0.587
24	0.754	0.887	1.105	0.605	0.529	0.729	0.665
48	1.018	1.022	1.504	0.551	0.802	0.747	0.404
72	0.856	0.904	1.575	1.325	0.648	0.925	0.901
96	1.143	1.005	2.548	0.778	1.245	0.486	1.045
168	0.64	0.814	1.858	0.664	1.464	0.371	0.436

Souche 2							
Température / Heurs	30°C	35°C	40°C	45°C	50°C	55°C	60°C
0	0.45	0.448	0.455	0.452	0.456	0.453	0.42
24	0.994	0.815	1.074	0.61	0.804	0.816	0.431
48	1.271	0.69	0.852	0.556	1.079	0.897	0.46
72	1.001	0.616	0.504	0.56	1.066	1.287	0.456
96	1.167	0.86	0.992	0.637	1.073	0.647	0.994
168	1.996	0.599	0.621	1.522	1.876	0.474	0.421

Souche 3							
Température / Heurs	**30°C**	**35°C**	**40°C**	**45°C**	**50°C**	**55°C**	**60°C**
0	0.96	0.95	0.955	0.945	0.801	0.94	0.944
24	1.802	1.392	1.708	1.613	0.807	1.856	0.14
48	1.137	1.299	1.539	0.913	1.052	1.064	0.455
72	1.069	1.125	1.5	0.923	1.341	1.587	0.443
96	1.206	1.314	2.423	1.465	1.986	0.917	1.285
168	0.801	0.978	1.656	1.009	2.182	0.548	0.716

Tableau V: caractéristiques des *Acétobacter* et des *Gluconobacter* **(GUIRAUD, 2012)**

	A.aceti	***A. hansenii***	***A.liquefaciens***	***A.pasteurianus***							***A.xylinum***	***G. oxydans***
Espèce et sous-espèce selon Frateur	***A.aceti subsp. Aceti***	***A.aceti subsp xylinum***	***A.aceti subsp liquefaciens***	***A.pasteurianus subsp pasteurianus***	***A.pasteurianus subsp ascendens***	***A.pasteurianus subsp estunensis***	***A.pasteurianus subsp lovaniensis***	***A.pasteurianus subsp paradoxus***	***A.peroxydans***	***A. aceti orleanensis***	***A. aceti subsp xylinum***	***G. oxydans subsp industrius melanogenes oxydans suboxydens***
Pouvoir Suroxydant	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
Culture sur Hoyer	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
Pouvoir Cétogène	+	+	+	-	-	-	-	-	-	**V**	+	+
Acide gluconique	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+
Acide cétogluconique	+	**V**	**V**	-	-	-	-	-	-	-	+	**V**
Pigment	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	**V**
Cellulose	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-

Recherche et identification de quelques souches des bactéries acétiques issues vinaigre traditionnel de datte du cultivar Deglet-Nour : Etude de la thermotolérance

Résumé :

Les dattes possèdent une grande importance dans la fabrication alimentaire, parmi les quels l'élaboration du vinaigre traditionnel de datte. Ce vinaigre est obtenu par une double fermentation simultanée, alcoolique et acétique. Les résultats de notre étude dont l'objectif est la recherche et de la pré-identification des bactéries acétiques issues du vinaigre traditionnel de dattes et de déchet de dattes du cultivar Daglet Nour, de la cuvette de Ouargla (Sahara Septentrional Est Algérien), ont permet de pré-identifier et de différencier 03 souches (S_1, S_2 et S_3) de la même espèce *Acétobacter aceti* et de la sous - espèces : *Acétobacter aceti sub sp aceti*. Alors que, l'étude de la thermotolérance des souches obtenues, montre leur croissance à des températures aux alentours de 35°C à 60°C, dont elles tolèrent.

Mots clés : vinaigre traditionnelle, déchets de dattes, Sahara, bactéries acétiques, *Acétobacter*, thermotolérances.

Research and identification of some strains of the acetic bacteria derived from the traditional vinegar of the date of the cultivar Deglet-Nour : Study of the thermotolérance

Summary The dates have a great importance in the manufacture of food, among which the elaboration of the traditional vinegar of date. This vinegar is obtained by a double simultaneous fermentation, alcoholic and acetic.The results of our study aiming at the research and pre-identification of acetic bacteria from the traditional vinegar of dates and waste of dates from the cultivar Daglet Nour, from the Ouargla basin (Northern Algerian Sahara) Allows to pre-identify and to differentiate 03 strains (S_1, S_2 and S_3) of the same species *Acetobacter aceti* and the sub-species: *Acetobacter aceti sub sp aceti*. While the study of the thermotolerance of the strains obtained shows their growth at temperatures in the region of 35 ° C. to 60 ° C., to which they tolerate.

Key words: traditional vinegar, date waste, Sahara, acetic bacteria, *Acetobacter*, thermotolerances.

بحث وتحديد بعض سلالات بكتريا حمض الخليك من الخل التقليدي لدقلة نور: دراسة تحمل درجة الحرارة.

الملخص :

تملك التمور أهمية كبيرة في الصناعات الغذائية من بينها تحضير خل التمر التقليدي . يتم الحصول على هذه الخل بواسطة التخمر المزدوج في وقت واحد، كحولي وخلي.

نتائج دراستنا هدفها هو البحث والتعرف على بكتيريا حمض الخليك المصنوع من تمر و بقايا تمر دقلة نور لمنطقة ورقلة (شمال الصحراء الشرقية الجزائرية)، سمح بتحديد و تمييز 03 سلالات من نفس النوع *Acetobacter aceti* ونفس تحت نوع *Acétobacter aceti sub sp aceti*

في حين أن دراسة تحمل درجات الحرارة المرتفعة للسلالات التي تم الحصول عليها، برهن تكاثرهم في درجات الحرارة المجاورة من 35 °C *الى* 60 °C *انها تتحمل.*

كلمات المفتاحية: *خل التقليدي , بقايا التمرة, الصحراء ، بكتيريا حمض الخليك ,.Acétobacter , متحملة للحرارة .*