

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



UNIVERSITE KASDI MERBAH OUARGLA

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département des Sciences Biologiques



THESE

En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat ès Sciences

Spécialité : Biologie

Option : Microbiologie appliquée

THEME

Recherche et identification de quelques souches de bactéries acétiques issues du vinaigre traditionnel de dattes du Sahara Septentrional est-Algérien: Etude du pouvoir acidifiant

Présentée par **HAMDI Wassila**

Le **30/06/2021**

Devant le jury

Président	:	OULD EL HADJ-KHELIL Aminata	Pr.	U. Ouargla
Directeur de these:	:	OULD EL HADJ Mohamed Didi	Pr.	U. Ouargla
Examineur	:	BOUAL Zakaria	Pr.	U. Ouargla
Examineur	:	BOULENAOUR Noureddine	Pr.	U. El Bayadh
Examineur	:	ABEKHTI Abdelkader	MCA	U. Adrar
Examineur	:	BENMEDOUR Tarek	MCA	U. Biskra

Année universitaire 2020/2021

Remerciements

Avant tout je remercie Dieu Tout Puissant, de m'avoir accordé la force, le courage et les moyens pour la réalisation ce travail.

Je tiens tout particulièrement à témoigner ma profonde gratitude et mes vifs remerciements à Monsieur OULD EL HADJ Mohamed Didi, Professeur au département des sciences biologiques de la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'université Kasdi Merbah-Ouargla, d'avoir accepté de m'encadrer sur le thème, de m'avoir apporté une attention tout au long de ce travail, orienté, encouragé et de me fait bénéficier de ses précieux conseils.

C'est avec un grand plaisir que j'adresse mes remerciements à Madame OULD EL HADJ-KHELIL Amina, Professeur au département des sciences biologiques de la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'université Kasdi Merbah-Ouargla, pour l'honneur qu'elle me fait en acceptant de présider ce jury.

A Monsieur BOUAL Zakaria, Professeur au département des sciences biologiques de la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'université Kasdi Merbah-Ouargla, pour l'honneur qu'il me fait en acceptant d'examiner ce travail, j'exprime mon grand respect, mes vifs remerciements, et ma profonde gratitude.

A Monsieur BOULENOUAR Noureddine, Professeur au département des sciences de la nature et de la vie du centre universitaire Nour El Bachir-El Bayadh, pour l'honneur qu'il me fait en acceptant d'examiner ce travail, j'exprime mon grand respect, mes vifs remerciements, et ma profonde gratitude.

A Monsieur BENMEDOUR Tarek, Maître de conférences au département de biologie de la faculté des sciences de la nature de l'université Mohamed Khider-Biskra, pour l'honneur qu'il me fait en acceptant d'examiner ce travail, j'exprime mon grand respect, mes vifs remerciements, et ma profonde gratitude.

A Monsieur ABEKHTI Abdelkader, Maître de conférences au département de biologie de la faculté des sciences de la nature de l'université Ahmed Draya-Adrar, pour l'honneur qu'il me fait en acceptant d'examiner ce travail, j'exprime mon grand respect, mes vifs remerciements, et ma profonde gratitude.

Mes vifs remerciements s'adressent à tout le personnel du laboratoire de pédagogie de la faculté des sciences et technologies.

Mes vifs remerciements s'adressent à tout le personnel du laboratoire de contrôle de qualité et emballage (CAQUE) de Tamanrasset, et leur directeur Mr SAADOU Yahia.

Mes remerciements vont également à tout le personnel du laboratoire de l'établissement public sanitaire Mesbah Baghdad, et leur chef M^r KOUNI Djamel.

Je profité pour remercier, M^{me} BOUSSEHAL Nassima, M^{me} KATEB Leila, M^{me} CHIBANI Aicha, M^{me} BOUDERHEM Amel, M^{me} BENAÏSSA Atika, M^{me} BENAÏSSA Asma, M^r CHEGGA Abdellah, M^{me} KEBAB Ryma, M^r BACHIKH Noureddine, M^r LABED Brahim, M^{lle} BASSEDIK Aida, M^{me} DRICI Habiba et M^r BENATALLAH Mohamed pour leurs aides et encouragements

En fin, à tout ceux ou celles qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail, à mes chers parents
Mohamed Jayeb et Kafsia, pour leurs sacrifices et
encouragements à mon égard, que Dieu leur accorde une
longue vie,

À mes chers sœurs et frères,

À mon cher époux Mustapha et mes adorables
petits ; Ahmed, Salsabil et Nour

À toute ma famille de près ou de loin,

À tous mes amis,

Pour m'avoir constamment soutenu moralement et
encouragé à aller de l'avant, face aux difficultés rencontrées.

Liste des abréviations

ADH	Alcool DésHydrogénase
ADN	Adénosine DésoxyriboNucléotide
ACP	Analyse en Composantes Principales
API 20 NE	Appareils et Procédés d'Identification des non Entérobactéries
API 20 Strep	Appareils et Procédés d'Identification des Streptocoques
ALDH	Aldéhyde Déshydrogénase ou acétaldéhyde Déshydrogénase
ANOVA	Analysis of variance (analyse de la variance)
AT	Acidité Totale
CAH	Classification Ascendante Hiérarchique
DHA	DésHydroxyAcetone
DO	Densité optique
GYC	Glucose, Yeats extract and Calcium carbonate (Glucose, Extrait de levure et Carbonate de calcium)
GYEA	Glucose, Yeats extract, Ethanol and Acetic Acid (Glucose, Extrait de levure, Ethanol et Acide acétique)
h	Heure
H⁺	Proton
OENO	Organisation Européenne des Normes Œnologique
pH	Potentiel hydrogen
TCA	Tri Carboxylic Acid cycle (Cycle des acides tricarboxyliques)
UFC	Unité Formant Colonie
UV	Ultra-Violet

Liste des figures

N°	Figure	Pages
1	Situation géographique de la cuvette de Ouargla (Algérie) (Google Earth, 2020)	12
2	Schéma récapitulatif du protocole expérimental	14
3	Cultivars de dattes utilisées dans la préparation du vinaigre traditionnel de dattes	28
4	Répartition des cultivars selon les échantillons de vinaigre traditionnel de dattes	28
5	Ecarts de tri de dattes inclus dans la préparation du vinaigre traditionnel de dattes.	29
6	Répartition des échantillons du vinaigre traditionnel de dattes selon la qualité de dattes	29
7	Répartition des échantillons de vinaigre traditionnel de dattes selon la durée de conservation	30
8	Vinaigres traditionnels de dattes	31
9	Répartition des souches de bactéries acétiques identifiées des échantillons de vinaigres de dattes selon les cultivars de dattes	47
10	Répartition des souches de bactéries acétiques issues des vinaigres traditionnels de dattes de la cuvette de Ouargla	48
11	Répartition des bactéries acétiques isolées sur différents milieux de culture	50
12	Assimilation des substrats hydrocarbure par les bactéries acétiques	55
13	Effet de l'éthanol sur la souche <i>Acetobacter aceti</i> subsp. <i>aceti</i> issue de vinaigre traditionnel de dattes	57
14	Effet de l'éthanol sur la souche <i>Acetobacter aceti</i> subsp. <i>liquifaciens</i> issue de vinaigre traditionnel de dattes	57
15	Effet de l'éthanol sur la souche <i>Acetobacter aceti</i> subsp. <i>orleanensis</i> issue de vinaigre traditionnel de dattes	58
16	Effet de l'éthanol sur la souche <i>Acetobacter pasteurianus</i> subsp. <i>ascendens</i> issue de vinaigre traditionnel de datte	58
17	Effet de l'éthanol sur la souche <i>Acetobacter pasteurianus</i> subsp. <i>lovanensis</i> issue de vinaigre traditionnel de dattes	59
18	Effet de l'éthanol sur la souche <i>Gluconobacter oxydans</i> subsp. <i>industrius</i> issue de vinaigre traditionnel de dattes	60
19	Effet de l'acide acétique sur la souche <i>Acetobacter aceti</i> subsp. <i>aceti</i> issus de vinaigre traditionnel des dattes	62
20	Effet de l'acide acétique la souche <i>Acetobacter aceti</i> subsp. <i>liquifaciens</i> issus de vinaigre traditionnel des dattes	62
21	Effet de l'acide acétique la souche <i>Acetobacter aceti</i> subsp. <i>orleanensis</i> issus de vinaigre traditionnel des dattes	63
22	Effet de l'acide acétique la souche <i>Acetobacter pasteurianus</i> subsp. <i>ascendens</i> issus de vinaigre traditionnel des dattes	63
23	Effet de l'acide acétique la souche <i>Acetobacter pasteurianus</i> subsp. <i>lovanensis</i> issus de vinaigre traditionnel des dattes	64

24	Effet de l'acide acétique la souche <i>Gluconobacter oxydans</i> subsp. <i>industrius</i> issus de vinaigre traditionnel des dattes	65
25	Cercle de corrélation des variables de vinaigre traditionnel de dattes	82
26	Projection des individus	83
27	Tendances globales des différents échantillons du vinaigre traditionnel de dattes de la cuvette de Ouargla	84
28	Cercle de corrélation des variables environnementaux des bactéries acétiques issues du vinaigre traditionnel de dattes	85
29	Projection des individus	86
30	Tendances globales des bactéries acétiques issues du vinaigre traditionnel de dattes de la cuvette de Ouargla	87
31	Dendrogramme de la classification ascendante hiérarchique (CAH) des échantillons du vinaigre traditionnel de dattes	88
32	Dendrogramme de la classification ascendante hiérarchique (CAH) des souches issues du vinaigre traditionnel de dattes	89

Liste des tableaux

N°	Tableaux	Pages
1	Caractères organoleptiques des échantillons du vinaigre traditionnel de dattes à l'état brut	31
2	Analyses physico-chimiques des vinaigres traditionnels de dattes	32-33
3	Analyse de la variance appliquée aux paramètres physicochimiques des vinaigres traditionnels de dattes	35
4	Coefficients normalisés (Variable) de l'analyse de la variance appliquée aux paramètres physicochimiques des vinaigres traditionnels de dattes	36
5	Moyennes estimées pour le facteur paramètres physicochimiques des vinaigres traditionnels de dattes	36
6	Isolements et purification des bactéries acétiques	38
7	Caractères cultureux et morphologiques des colonies isolées sur milieux gélosés	39
8	Caractères physiologiques et biochimiques des isolats	41
9	Bactéries acétiques identifiées dans les vinaigres traditionnels de dattes	45
10	Types des bactéries acétiques identifiées dans les vinaigres traditionnels de dattes	47
11	Somme des isolats issues des échantillons de vinaigre traditionnel de dattes sur 4 milieux d'isolement	51
12	Bactéries acétiques issues de 6 milieux différents d'isolement	52-53
13	Analyses biochimiques des bactéries acétiques	54
14	Croissance des bactéries acétiques à différente concentration de l'éthanol	61
15	Croissance des bactéries acétiques à différente concentration de l'acide acétique	65
16	Productivité de la souche <i>Acetobacter aceti</i> subsp. <i>aceti</i>	68
17	Productivité de la souche <i>Acetobacter aceti</i> subsp. <i>liquifaciens</i>	68
18	Productivité de la souche <i>Acetobacter aceti</i> subsp. <i>orleanensis</i>	69
19	Productivité de la souche <i>Acetobacter pasteurianus</i> subsp. <i>ascendens</i>	69
20	Productivité de la souche <i>Acetobacter pasteurianus</i> subsp. <i>lovaniensis</i>	70
21	Productivité de la souche <i>Acetobacter pasteurianus</i> subsp. <i>pasteurianum</i>	70
22	Productivité de la souche <i>Gluconobacter oxydans</i> subsp. <i>industrius</i>	71
23	Croissance optimum et productivité d'acide acétique des bactéries acétiques	72
24	Analyse de la variance appliquée aux paramètres microbiologiques des vinaigres traditionnels de dattes	75
25	Coefficients normalisés (Variable) de l'analyse de la variance appliquée aux paramètres microbiologiques des vinaigres traditionnels de dattes	75
26	Moyennes estimées pour le facteur paramètres microbiologiques des vinaigres traditionnels de dattes	76
27	Conservation de la souche <i>Acetobacter aceti</i> subsp. <i>aceti</i>	77
28	Conservation de la souche <i>Acetobacter aceti</i> subsp. <i>liquifaciens</i>	77
29	Conservation de la souche <i>Acetobacter aceti</i> subsp. <i>orleanensis</i>	77

30	Conservation de la souche <i>Acetobacter aceti</i> subsp. <i>xylinum</i>	78
31	Conservation de la souche <i>Acetobacter pasteurianus</i> subsp. <i>pasteurianum</i>	78
32	Conservation de la souche <i>Acetobacter pasteurianus</i> subsp. <i>lovaniensis</i>	78
33	Conservation de la souche <i>Acetobacter pasteurianus</i> subsp. <i>ascendens</i>	79
34	Conservation de la souche <i>Gluconobacter oxydans</i> subsp. <i>industrius</i>	79
35	Caractéristique des axes	80
36	Caractéristique des axes	84

Table des matières

Table des matières

Introduction	1
Chapitre I.- Méthodologie de travail	
I.1.- Principe adopté.....	11
I.2.- Présentation de la région d'étude	12
I.3.- Choix des zones de prélèvement.....	13
I.4.- Enquête.....	13
I.5.- Echantillonnage des vinaigres traditionnels.....	13
I.6.- Méthodes d'analyses.....	13
I.6.1.- Analyses physico-chimiques du vinaigre.....	14
I.6.1.1.- Détermination du pH	14
I.6.1.2.- Détermination de la conductivité.....	15
I.6.1.3.- Mesure de la densité.....	15
I.6.1.4.- Détermination de la teneur en acidité totale.....	16
I.6.2.- Analyses microbiologiques du vinaigre.....	17
I.6.2.1.- Isolement de bactéries acétiques contenues dans le vinaigre traditionnel de dattes..	17
I.6.2.2.- Purification des souches des bactéries acétiques	18
I.6.2.3.- Identification et caractérisation des bactéries acétiques.....	18
I.6.2.4.- Caractérisation des bactéries acétiques identifiées.....	22
I.6.2.5.- Conservation des souches bactérienne.....	24
I.7.- Exploitation des résultats.....	20
I.7.1.- Analyses de la variance.....	25
I.7.2.- Analyse en composante principale (ACP).....	26
I.7.3.- Classification ascendante hiérarchique (CAH)	26
Chapitre II.- Résultats et discussion	
II.1.- Vinaigre traditionnel de dattes issues du savoir-faire traditionnel de la cuvette de Ouargla.....	27
II.1.1.- Répartition des échantillons et mode d'obtention du vinaigre traditionnel de dattes récoltées dans la cuvette de Ouargla.....	27
II.1.2.- Caractéristiques organoleptiques du vinaigre traditionnel de dattes.....	30
II.2.- Caractéristiques physico-chimiques.....	32
II.2.1.- Acidité totale.....	33
II.2.2.-pH.....	34
II.2.3.- Conductivité électrique (CE).....	34
II.2.5.- Densité.....	35
II.3.- Analyses microbiologiques.....	36
II.3.1.- Isollements des bactéries acétiques.....	37
II.3.2.- Caractères cultureux et morphologiques des souches isolées.....	39
II.3.3.- Caractérisation phénotypique (pré-identification des bactéries acétiques).....	40
II.3.3.1.- Test de l'oxydase.....	42
II.3.3.- Pouvoir suroxydant.....	42
II.3.3.3.- Test de la catalase.....	42
II.3.3.4.- Utilisation de NH_4^+ comme source d'azote.....	43

II.3.3.5.- Pouvoir cétoène.....	43
II.3.3.6.- Production de l'acide gluconique.....	43
II.3.3.7.- Production de l'acide cétoconique.....	44
II.3.3.8.- Formation de pigment brun hydrosoluble.....	44
II.3.3.9.- Production de cellulose.....	44
II.3.4.- Répartition des bactéries acétiques selon l'origine du vinaigre.....	46
II.3.5.- Répartition taxonomique des bactéries acétiques.....	47
II.3.6.- Optimisation d'un milieu d'isolement.....	49
II.3.7.- Caractérisation des souches de bactéries acétiques isolées.....	54
II.3.7.1.- Analyses biochimiques.....	54
II.3.7.2.- Etude de la tolérance des bactéries acétiques à l'éthanol.....	56
II.3.7.3.- Etude de la tolérance des bactéries acétiques à l'acide acétique.....	61
II.3.8.- Etude du pouvoir acidifiant des bactéries acétiques.....	67
II.3.9.- Conservation des bactéries acétiques.....	77
II.4.- Exploitation des résultats.....	80
II.4.1.- Analyse en composantes principales: ACP).....	80
II.4.2.- Classification ascendante hiérarchique (CAH).....	87
Conclusion	90
Références bibliographiques	93
Annexes	109

Introduction

Le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) est «l'arbre» emblématique des régions arides et semi-arides de l'Ancien Monde (Gros-Balthazard et *al.*, 2013). Cette espèce est comptée parmi les plantes qui luttent contre la sécheresse et d'autres facteurs environnementaux défavorables tels que le vent (espèce xérophyte; thermophile, halophile) et aussi contre les animaux. Elle est une plante désertique adaptée au climat désertique, dans toute l'acception du terme « adaptation ». C'est-à-dire qu'elle se trouve mieux au désert qu'ailleurs (Ozenda, 2004; Babahani, 2012).

Dans le Sahara algérien, le palmier dattier est le pilier des écosystèmes oasiens où il permet de limiter les dégâts d'ensablement, jouant un rôle protecteur contre le rayonnement solaire intense pour les cultures sous-jacentes (Belaid, 2015; Bouguedoura et *al.*, 2017).

L'Algérie est un pays phoenicicole classé au sixième rang mondial et au premier rang dans le Maghreb pour ses grandes étendues de culture avec 160 000 hectares et plus de 2 millions de jardins (Bouguedoura et *al.*, 2017). En 2017, elle est reclassée en troisième pays producteurs de dattes dans le monde, dont elle couvre une superficie de 167.663 hectares, une production de 1.058.559 tonnes et une part de la production mondiale de 13.68% (Ali et *al.*, 2020). Elle occupe une place importante parmi les pays producteurs et exportateurs de dattes dans le monde. Plus encore, elle se classe en première place en termes de qualité, grâce à la variété Deglet Nour (Benziouche et Cheriet, 2012).

La palmeraie algérienne est répartie à 67 % dans le Sud-est (El Oued, Ouargla, Ghardaïa et Biskra), et 21 % au Sud-ouest (Adrar et Bechar), l'extrême Sud (Tamanrasset, Illizi et Tindouf) avec 10 % et d'autres régions qui représentent 2 % de la palmeraie mais contribuent pour beaucoup dans la production nationale (Babahani, 2011; Boudjenah-Haroun et *al.*, 2017).

Le palmier dattier donne une gamme étendue de produits, et en premier lieu: la datté, aliment de grande valeur énergétique. Elle permet à des millions de familles de se maintenir dans des régions à climats difficiles (Toutain, 1967). Dans la région de Ouargla (Sahara Septentrional est-Algérien), le palmier dattier est une source de divers produits, à savoir les dattes et les différents organes qui sont destinés à l'artisanat, à la construction, à la production d'énergie, au fourrage, à l'utilisation culinaire, thérapeutique et cosmétique, ce qui confère une originalité importante pour la vie sociale et économique des oasiens (Sebihi, 2014; Senoussi et *al.*, 2017).

Après la récolte, les dattes molles sont consommées fraîches (difficiles à conserver) ou bien sont conservées entassées puis vendues en pains, dans des peaux, des jarres, des sacs de jute... Le jus des fruits pressés, est appelé « miel de dattes ». Il est utilisé en pâtisserie. Les dattes sèches mûrissent en principe sur l'arbre, mais elles se conservent bien en milieu sec et elles sont peu fragiles. Certaines dattes sèches et demi-sèches sont cotées sur les marchés africains (Sénégal, Mali et Niger). C'est dans la catégorie des dattes demi-molles que l'on classe les meilleures dattes, principalement Deglet-Nour. Elle fait l'objet d'un commerce international importante (Toutain, 1967).

Les dattes perdues peuvent représenter des proportions supérieures à 30% de la production mondiale (Besbes et *al.*, 2006).

En Algérie, la capacité de conditionnement et de transformation des dattes a doublé au cours de la dernière décennie, grâce à l'extension de la capacité des unités existantes et à l'installation de nouvelles unités et la privatisation du secteur. Néanmoins, elle reste insuffisante (3600 tonnes/an) par rapport à la production de dattes et à la quantité de dattes qui nécessitent une valorisation (Benzouche et Cheriet, 2012).

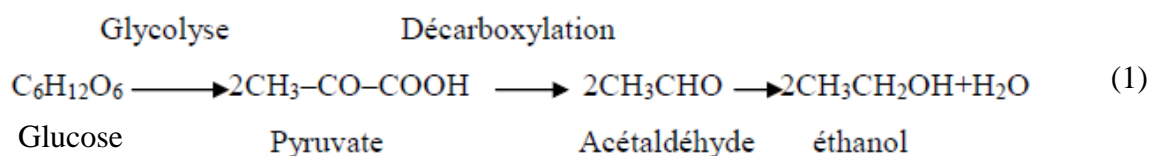
Il existe plus de 2000 variétés de dattes fraîches dans le monde (Al-Shahib et Marshall, 2003). En Algérie, la production annuelle moyenne de dattes est plus de 500000 tonnes (Bouguedoura et al., 2017), avec plus de 17 millions de palmiers et plus de 800 variétés (Benzouche et Cheriet, 2012). Parmi les 940 cultivars algériens recensés, 13 ont été cités par Idder et al. (2009) dans la cuvette de Ouargla. Ils sont Tamsrit, Deglet-Nour, Ghars, Degla-Beida, Takermoust, Ticherwit, Timjouhart, Hamraya, Harchaya, Mizit, Bayd-Hmam et Ben Azizi. Au Sahara septentrional est-Algérien, les cultivars Deglet-Nour, Degla-Beida, Mech-Degla, Ghars, Tinicine, Tantboucht et Tafzwin, présentent une importance économique réelle (valeur marchande intéressante). Tanslit et Hamraya sont rares et produisent des dattes de faible valeur marchande (Acourene et al., 2007), aussi nommé dattes communes et dattes secondaires rejeté dans la nature. Ils constituent une nuisance certaine pour l'environnement et un gaspillage de matière organique utile (Kaidi et Touzi, 2001). Mimouni et Siboukeur (2015), ont illustré que Hamra, Timnaceur, Tegaza, Tezerzait et Takerboucht compte 30 à 50% de la production nationale, susceptibles d'être récupérées et transformées avec les écarts de tri.

En effet, jusqu'à l'année 2012 il n'existe aucune technologie de transformation de nature à valoriser les variétés communes Algériennes (les co-produits ou les écarts de tri), hormis quelques pratiques traditionnelles empiriques (Benahmed Djilali et al., 2012). Cependant, la littérature scientifique fait mention de certaines transformations technologiques, par exemple la production de confitures, de gelées, de jus et de sirop de dattes (Elleuch et al., 2008). Il est possible de les transformer en produits à plus haute valeur ajoutée plus facilement commercialisables, tels que des boissons, des biocarburants et même des tensioactifs (Benselama et al., 2016). La datte peut être utilisée comme matière première dans l'élaboration de nombreux produits dont le sucre liquide, les pâtes de dattes, les jus, les sirops, les boissons gazeuses, la confiserie, l'alcool et le vinaigre de dattes (Ould El Hadj et al., 2001; Sayah et Ould El Hadj, 2010; Bouaziz et Ould El Hadj, 2010), la production de la levure boulangère (Ould El Hadj et al., 2006), de protéines d'organismes unicellulaires (P.O.U) (Bessah et Touzi, 2001), et de bioéthanol (Kaidi et Touzi, 2001). A ce jour, il est marqué sur des dizaines de sociétés de traitement et de transformation de dattes, tel que Lina Dattes à Biskra, Algérie et El Lina Production à Blida, Algérie. En 2015, il a été enregistré environ 20 entreprises activant dans la transformation de la datte passant à plus de 80 entreprises en 2017 dans différentes wilayas du pays pour obtenir des produits dérivés de dattes comme le sucre de dattes, le miel, les dattes fourrées, le vinaigre de dattes, la farine de dattes, le café de dattes.

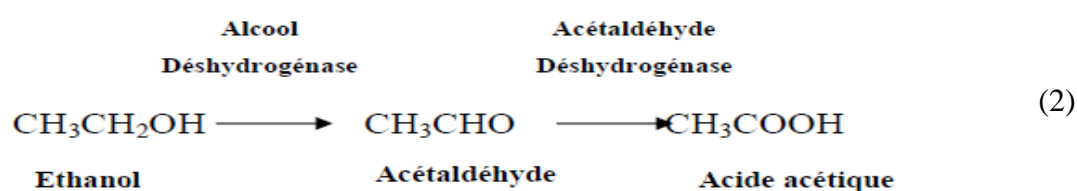
L'Algérie importe des quantités considérables de vinaigre presque de 2.401 million de dollars sur 5 ans (ITS, 2018). L'élaboration du vinaigre traditionnel de dattes comme produit de terroir est une solution qui peut réduire largement cette facturation.

Autrement, une grande variété de vinaigres traditionnels est produite dans le monde entier. L'une des variétés de vinaigre les plus célèbres est le vinaigre balsamique traditionnel produit à partir de moûts cuits et concentrés de raisins blancs ou rouges (Budak *et al.*, 2014). Le vinaigre est produit par un processus de fermentation en deux étapes, qui sont la fermentation alcoolique et la fermentation acétique. La fermentation alcoolique se produit habituellement avec la fermentation des sources appropriées de sucre ou d'hydrate de carbone par des levures. La deuxième étape, est le processus par lequel l'éthanol produit est oxydé en acide acétique par les bactéries acétiques (Mehaia et Cheryan, 1991; Isham *et al.*, 2019)

La fermentation alcoolique se déroule en milieu anaérobie. Elle est assurée par des levures du genre *Saccharomyces* qui sont présentées naturellement sur les dattes. 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. Ainsi, différents composés qui accompagnent cette production alcoolique, et jouant un rôle organoleptique majeur sur la qualité du produit (Bourgeois et Larpent, 1990). La réaction se déroule selon l'équation (1).



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 (Bourgeois et Larpent, 1990), selon la réaction (2).



La plupart des variétés de vinaigres sont d'origine végétale, sauf ceux du lactosérum ou du miel (Matsushita *et al.*, 2016). Il existe différents types de vinaigre selon la matière première utilisée. Il est à noter le vinaigre de céréales chinois, le vinaigre de grain, le vinaigre de noix de coco, le vinaigre imbibé de vin, le vinaigre de pomme (Song *et al.*, 2019). Plusieurs substrats sont utilisés, tels que le vin de raisin et de riz, purées de céréales fermentées ou de malt et de cidre de pomme fermenté et jus des dattes, ...etc (Hutkins, 2006).

Dans l'industrie alimentaire, le vinaigre est principalement utilisé comme un acidulent, un agent aromatisant et un agent de conservation, mais il a aussi de nombreuses autres applications de transformation des aliments. Il se retrouve dans des aliments transformés, y compris les vinaigrettes,

la mayonnaise, la moutarde et les sauces ketchup, le pain et les produits de boulangerie, les aliments marinés, les aliments en conserve, et les marinades et sauces. En plus de son utilisation comme ingrédient alimentaire dans la cuisine ou comme boisson en l'arrosant d'eau et de jus (Hutkins, 2006; Isham *et al.*, 2019), le vinaigre a également longtemps été utilisé comme désinfectant typique, comme agent de nettoyage, et comme un produit chimique industriel en raison de ses fortes propriétés de déminéralisation (Hutkins, 2006). Les bienfaits thérapeutiques fonctionnelles du vinaigre incluent l'activité antibactérienne (ralentir la croissance des microbes dans les produits alimentaires et contribuer à la conservation et à l'augmentation de la durée de vie des produits alimentaires), l'activité antioxydante (Krusong *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2020), la réduction de la pression artérielle, la réduction des effets du diabète, la prévention des maladies cardiovasculaires et le cancer (Budak *et al.*, 2014; Isham *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2020).

Les procédés industriels existants pour la production du vinaigre ont été développés en Europe. Deux principales technologies sont utilisées; la fermentation du biofilm dans des générateurs de ruissellement, et les fermentations submergées dans des cuves aérées et agitées (Sievers *et al.*, 1992). Anciennement, le vinaigre était fabriqué par le procédé d'Orléans (procédé lent), le procédé rapide (procédé générateur) et le procédé de culture submergée. De nos jours, le procédé rapide et le procédé de culture submergée, sont développés et utilisés pour la production commerciale de vinaigre. Le traitement ultérieur du vinaigre, après conversion du substrat en acide acétique, peut comprendre la filtration, la distillation de clarification et la pasteurisation à 74°C (165.2°F) avant sa mise en bouteille (Saha et Banerjee, 2013). En général, la fermentation statique (lente), est utilisée dans la production du vinaigre traditionnelle (Nanda *et al.*, 2001).

Les bactéries acétiques sont un groupe de micro-organismes répandus dans la nature (Sengun, 2017), présentes dans les fruits et les légumes (Erkmen et Bozoglu, 2016). Elles sont isolées à partir de sources très variées; café arabica, plantes de café, fèves de cacao fermentées, fruits tropicaux, pommes pourries, racines de maïs, racines des cannes à sucre, cerises, fraises, raisins, fruits séchés, fleurs, pollen, riz, bières, cidres et vins (Longin, 2016). 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 (Tsfaye *et al.*, 2002; Branger, 2004).

La plupart des genres de bactéries productrices d'acide acétique sont des *Acetobacter* et *Gluconobacter*. Elles sont des Gram négatives ou Gram variable, non-sporulé, ellipsoïdes ou cellules en forme de bâtonnet qui peuvent se retrouver seules ou regroupées en paires ou en petites chaînettes. Leur taille varie entre 0.4 et 1 µm de large et 0.8 et 4.5 µm de long. Ils pourraient être mobiles en raison de la présence des flagelles péritriches ou polaires. Ils ont un métabolisme aérobie obligatoire, avec l'oxygène comme accepteur terminal d'électron, une catalase positive et une oxydase négative (Madigan *et al.*, 2007; Erkmen et Bozoglu, 2016).

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 utiliser l'ammonium comme source d'azote (Devies, 1989; Bourgois et Larpent, 1996). Celles qui réalisent la fermentation acétique de

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 utilisée dans l'industrie les besoins nutritionnels sont plus complexes et la croissance nécessite l'adjonction d'extraits de levure (Devies, 1989; Bourgois et Larpent, 1996).

Parmi les caractéristiques des bactéries acétiques; elles peuvent oxyder l'alcool éthylique en acide acétique, ce qui est souhaitable dans la fabrication du vinaigre, mais aussi de boissons alcoolisées; ce qui oxyde davantage l'acide acétique et l'acide lactique en présence d'oxygène en eau et CO₂. Les bactéries du genre *Gluconobacter*, ont la particularité de ne pas pouvoir oxyder complètement leur donneur organique d'électrons en CO₂. Elles utilisent donc l'éthanol comme donneur d'électrons et l'oxydant au moyen des quinones uniquement en acide acétique, quelles excrètent dans le milieu; elles sont par conséquent très tolérantes à l'acidité. La plupart des souches peuvent se développer à des valeurs de pH inférieur à 5. Leur demande en oxygène pendant la croissance est très élevée et le problème majeur de la production du vinaigre est l'insuffisance en aération du milieu (Madigan et al., 2007). Le pH optimum pour la croissance est de 5 à 6.5, alors qu'ils peuvent pousser à des valeurs plus faibles (3-4). Les bactéries acétiques sont des mésophiles, dont leur température optimale varie entre 28 et 30°C et sont considérablement affectée par l'augmentation de la température, bien que certaines espèces sont reconnues comme thermotolérants (Sengun, 2017; Mamlouk et Gullo, 2013). *G.oxydans* oxyde le D-sorbitol en L-sorbose qui est utilisé dans la préparation de l'acide ascorbique; et certaines espèces peuvent provoquer un déficit excessif en substances nutritives, comme le *A.aceti* subsp. *suboxydans* (Erkmen et Bozoglu, 2016).

Les premiers essais de classification des bactéries acétiques sont dus à Hansen (1894) et Vissert (1925), fut les premiers 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 (CH₃COOH en CO₂ et H₂O), oxydation du lactate en CO₂ et H₂O, oxydation du glycérol en dihydroxyacétone, production d'acide gluconique à partir du glucose. Certains caractères cultureux (température optimale, formation de pigment, de voile utilisable possible de sels ammoniacaux comme seule source d'azote...etc). Selon Bergy (1957), les genres *Gluconobacter* et *Acétobacter* ont été classées dans la famille des *Pseudomonaceae* et dans la tribu des *Pseudomonadae*. Elles ont été en quatre groupes biochimiques:

- Groupe peroxydant : représenté par *Acétobacter peroxydant*.
- Groupe oxydants : représenté par *Acétobacter pasteruianum*.
- Groupe suboxydants : représenté par *Gluconobacter suboxydans*.
- Groupe mesoxydants : représenté par *Acétobacter aceti*.

Les bactéries acétiques sont placées actuellement dans le groupe des acétates (Matsushita et al., 2016; Naloka1 et al., 2020). Elles appartiennent taxonomiquement à la famille des *Acetobacteraceae* de la classe des *Alpha-Proteobacteria* (Matsushita et al., 2016; Paradh et Hill, 2016; Lynch et al., 2019; Gao et al., 2020; Naloka1 et al., 2020), sur la base de la phylogénie, la physiologie et l'écologie. Les bactéries acétiques ont été classées par Matsushita et al. (2016), en 17 genres, dont de nombreuses espèces ont été signalées dans les genres *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Gluconacetobacter*, *Asaia* et *Komagataeibacter*. Parmi les 12 autres genres, *Acidomonas*, *Kozakia*,

Swaminathania, *Saccharibacter*, *Neosaia*, *Granulibacter*, *Tanticharoenia*, *Ameyamaea*, *Endobacter*, *Nguyenibacter* et *Swingsia* sont monotypiques; le genre *Neokomagataea* contient deux espèces. Dans la classe des *Gamma-Protéobactéries*, le genre *Frateuria* a été mentionné taxonomiquement comme étant de pseudo-bactérie acétique. Selon König et al. (2017) et Bekatorou (2019), la révision du groupe des bactéries acétiques est passée de deux genres et cinq espèces en 1984 aux 19 genres et plus de 70 espèces actuels.

La taxonomie des bactéries acétiques est encore en évolution en raison de la connaissance limitée de leur phylogénie, de l'isolement pénible et de la problématique de conservation de ces souches (De Vero et Giudici, 2008). Selon Micciche et al. (2020), *Acidiphilium multivorum* est étroitement lié taxonomiquement au groupe de bactéries acétique, qui produit du vinaigre à partir des sucres et d'éthanol et que l'on trouve dans des produits tels que le vin. Elle est découlée de la famille des *Acetobacteraceae* et grâce à ses gènes présents, elle peut être une collection pratique pour la production industrielle d'acide acétique.

Les bactéries acétiques sont utilisées dans les fermentations en cascade et les différents processus alimentaires dont la production d'additifs alimentaires, tels que les acides acétique et gluconique. Dans certains cas, elles entraînent des oxydations sur les matières végétales, telles que les fruits et les fleurs, et peuvent être responsables de la détérioration de certains aliments (Erkmen et Bozoglu, 2016). Sur le plan industriel, elles sont de grande importance et comme leur nom l'indique, elles produisent principalement de l'acide acétique. Elles sont également utilisées dans diverses applications biotechnologiques (Paradh et Hill, 2016), comme la production des pigments, ainsi que différentes sortes d'exo-polysaccharides (Mamlouk et Gullo, 2013). En effet, la plupart des espèces ont la capacité de transformer l'éthanol en acide acétique, et jouent un rôle pendant leurs processus de fermentation (Yu et al. ; 2020; Sengun , 2017), par exemple dans la production de vinaigre, les laits fermentés traditionnels, comme le kéfir et la production de la vitamine C. D'autre part, les bactéries acétiques amélioreraient la croissance des plantes et appartiendraient donc au groupe des « Plant Growth-Promoting Bacteria » (PGPB) (Matsushita et al., 2016). Les bactéries acétique isolées provenant de sources sûres, telles que les produits laitiers fermentés, peuvent être introduites comme probiotiques en raison de leurs fortes activités de fermentation et d'acidification et de la production de vitamine C (Haghshenas et al., 2015). L'espèce *Acidiphilium multivorum* a été utilisée dans l'extraction du soufre et de la pyrite au Japon (Micciche et al., 2020), d'autres espèces d'*Acetobacter spp.* produisent de la cellulase extracellulaire pour hydrolyser la cellulose et produire du glucose (Erkmen et Bozoglu, 2016).

Par ailleurs, les bactéries acétiques utilisent l'éthanol comme principal substrat durant leur croissance. Cependant, le degré de tolérance à l'éthanol dépend de l'espèce et de la souche mais en général, sa toxicité est plus grande en pH acide. Les bactéries du genre *Acetobacter* préfèrent l'éthanol ou le glucose pour leur croissance, à l'inverse des bactéries du genre *Gluconobacter* qui préfère le glucose (Matsushita et al., 2016).

Les bactéries acétiques se développent dans un milieu considéré comme stressant pour les microorganismes (généralement à forte teneur en éthanol ou en acide acétique, deux composés qui sont normalement utilisés pour leur activité antimicrobienne) (Bekatorou, 2019). En effet, il existe

plusieurs machineries moléculaires responsables de la tolérance à l'acide acétique chez les bactéries acétiques, citées dans les points suivants;

1- La prévention de l'efflux d'acide acétique dans la cellule :

Les bactéries acétiques optimisent la proportion de composant lipidique de la membrane et forment davantage de polysaccharide à la surface des cellules pour empêcher l'efflux d'acide acétique.

2- L'assimilation de l'acide acétique :

Les bactéries acétiques ont acquis la capacité de convertir l'acide acétique intracellulaire par l'intermédiaire du cycle alternatif de cycle des acides tricarboxyliques (TCA).

3- L'efflux d'acide acétique par transporteur ou pompe :

Les bactéries acétiques possèdent deux types de systèmes d'acide acétique intracellulaire de décharge, dont l'un est un transporteur putatif d'ATP-Binding Cassette (ABC), et l'autre est une pompe d'efflux conduite par une force de motif de proton.

4- La protection de protéines cytoplasmiques contre la dénaturation par les protéines de stress général :

Les bactéries acétiques s'adaptent aux changements environnementaux des cellules en induisant des chaperons qui stabilisent la structure des protéines de l'acidification de la cellule à l'intérieur, et en synthétisant les enzymes qui décomposent les espèces réactives d'oxygène pour maintenir l'environnement intracellulaire fonctionnel (Matsushita et *al.*, 2016; Qiu et *al.*, 2021).

D'après Sengun (2017), la réponse des bactéries acétique au stress causé par la présence de l'acide acétique ou l'éthanol, a permis de différencier la réponse produite dans deux conditions différentes: a) des conditions de choc et b) un stress acide continu. Dans la première condition, les bactéries réagissent contre un ajout soudain d'une certaine quantité de stresser exogène (acétique). Une réponse similaire est déclenchée lorsque des cellules non adaptées sont cultivées dans des milieux liquides avec des concentrations élevées d'acide acétique. D'autre part, dans la deuxième condition (fermentation de l'acide acétique), les bactéries qui poussent dans le bouillon d'éthanol sont exposées à des gradients infimes d'acide acétique; une conséquence de l'augmentation progressive de l'acide acétique endogène produit par l'oxydation métabolique de l'éthanol.

Dans cette même perspective, il est possible de considérer l'importance des bactéries acétiques dans le domaine industriel car elles sont résistantes aux changements pendant la fermentation et d'autres facteurs de stress (Sengun, 2017; Qiu et *al.*, 2021). Les souches thermotolérantes isolées des sources naturelles possèdent une productivité modérée des produits souhaités, ce qui entraîne la nécessité d'acquérir de souches avec un meilleur rendement pour une application industrielle. L'adaptation des bactéries pourrait potentiellement améliorer la thermotolérance de plusieurs souches (Sengun, 2017; Beheshti-Maal et Shafiee, 2019). Les mécanismes thermotolérants des bactéries acétiques n'ont pas été bien compris. Des gènes relatifs aux réponses de choc thermique, telles que *groELS*, *grpE*, *dnaKJ*, et *clpB* sont présentés dans les

souches d'*Acetobacter* (Matsutani et al., 2016; Sengun, 2017; Qiu et al., 2021). Les systèmes de choc thermique, GroESL et DnaKJ, sont parmi les protéines cytosoliques les plus abondantes chez les procaryotes et les eucaryotes. Ces chaperons et chaperonins sont des protéines de stress général qui protègent d'autres protéines contre la dénaturation et l'agrégation causées par la chaleur, mais aussi les contraintes environnementales comme oxydatif, acide, sel, famine ou stress organique de solvant. Les deux systèmes sont connus pour être induits différemment dans différents micro-organismes, par divers stress résultant des changements environnementaux (Maleki et al., 2016; Edkins et Boshoff, 2021; Qiu et al., 2021).

La première étape pour le développement de cultures de démarrage destinées à la fabrication de vinaigre est basée sur la sélection de levures et des bactéries acétiques sauvages ayant une activité compétitive pendant le processus de fermentation complète. La composition du milieu nutritif, la température de fermentation, l'aération de l'environnement, les caractéristiques physiologiques des espèces de bactéries acétique utilisées, le pH, ...etc. sont des facteurs qui influencent le métabolisme provoqué par les bactéries acétiques et l'accumulation d'acide acétique (Stoychev et al., 2020). De ce fait, la tolérance à une concentration élevée en sucre est appliquée à dans la sélection de bactéries acétiques, car après la fermentation alcoolique, des quantités substantielles de sucres (20 à 40 % de la teneur initiale) peuvent encore rester non fermentés. Lorsque le processus de fermentation commence, les réactions d'oxydation (processus de transformation du sucre en éthanol et de l'éthanol en acide acétique) libèrent une quantité d'énergie significative, et par conséquent, une augmentation de la température à des valeurs supérieures à 38°C (Vinicius De Melo Pereira et al., 2019). D'autre part, la température de croissance des bactéries acétiques est comprise entre 5 et 42 °C, avec une température optimale entre 25 et 30 °C. Les acétobacters peuvent croître dans une fourchette de pH de 4 à 7 avec une température optimale de 5.5 à 6.5 °C (Erkmen et Bozoglu, 2016).

Avec l'avancement des fermentations à grande échelle, il est apparu le besoin de sélectionner des microorganismes bien adaptés pour le traitement industriel. De nombreuses bactéries acétiques ont été sélectionnées avec des caractéristiques spécifiques pour la réalisation de divers produits alimentaires, y compris les micro-organismes à caractères sahariens. En effet, de nombreuses études scientifiques ont impliqué la sélection de nouvelles souches avec des propriétés fonctionnelles diverses et spécifiques. Par conséquent, la sélection de souches microbiennes thermotolérantes réduit les coûts de traitement en éliminant la nécessité d'ajouter un processus de refroidissement (Gupta et al., 2019).

L'analyse des bactéries acétiques et leurs utilisations industrielles nécessitent leur isolement, identification et conservation même si des difficultés se sont présentées à cela et sont soulignées à maintes reprises ces dernières décennies. En fait, les bactéries acétiques sont considérées comme des micro-organismes "fastidieux" en raison de leur faible récupération par les méthodes microbiologiques classiques telles que les cultures sur gélose (Bekatorou, 2019). Les différences entre la population de micro-organismes dénombrés au microscope et sur les géloses peuvent être de plusieurs raisons, voire sans aucune récupération sur les milieux (Torija et al., 2010). Ce manque de cultivabilité pourrait être attribué à l'utilisation de milieux qui ne sont pas appropriés. Par exemple, après observation au microscope, il est évident que les bactéries acétiques ont tendance à

former des agrégats qui, après ensemencement, forment une seule colonie, bien qu'ils puissent contenir plus d'une espèce. Malgré ces aspects de milieux non appropriés et sélectifs et d'agrégation cellulaire, la raison principale peut être due au statut de "Viable mais non cultivable" (VBNC). Cet état a été détecté dans des conditions extrêmes telles que dans le vin (Millet et Lonvaud-Funel, 2000) ou le vinaigre (Torija et al., 2010) ou tout simplement expliquée par le fait que toutes les conditions environnementales ne peuvent pas être reproduites sur un même milieu de culture, notamment pour les environnements à forts gradients physico-chimiques. Pour cela, les méthodes de la culture indépendantes pour l'estimation des populations de bactéries acétiques dans les deux milieux (vin et vinaigre) ont été développées par les méthodes de biologie moléculaire et considéré comme le meilleur choix pour une identification rapide et précise. Cependant, les deux méthodes de la culture dépendante et indépendante doivent être utilisées conjointement pour fournir une description précise de la diversité réelle présente dans les vins ou les vinaigres (Bekatorou, 2019).

Des techniques moléculaires telles que la composition en acides gras, l'électrophorèse des protéines cytosoliques, le pourcentage de contenu G+C et l'hybridation ADN-ADN ont été incorporé dans l'édition de Bergey de 1984 pour la classification des bactéries (Bekatorou, 2019). Ainsi, il existe différentes méthodes de biologie moléculaire testées et développées, pour faciliter l'identification des bactéries acétique isolées; à savoir : le profilage des plasmides, la réaction en chaîne de l'ADN polymérase polymorphe amplifiée aléatoire (RAPD-PCR), l'électrophorèse sur gel à gradient dénaturant (DGGE) du gène d'ARNr 16S partiel amplifié par PCR. Autrement, l'utilisation de gène de l'ARNr 16S et 23S après amplification par PCR est nécessaire pour déterminer le polymorphisme de la longueur des fragments de restriction (RFLP). La technique de PCR d'une région spécifique sur *nifH*, *nifD* ou *adhA*, consensus intergénique répétitif entérobactérien (ERIC)-PCR, rep-PCR, hybridation ADN-ADN, (GTG)₅-PCR, analyse de séquence des gènes de ménage et spectrométrie de masse à temps de vol par ionisation par désorption laser assistée par matrice (MALDI-TOF MS) sont additionné (Štornik et al., 2016). La nouvelle génération de séquençage (NGS) est un outil biologique puissant, flexible, indispensable et universel qui a imprégné plusieurs domaines d'étude biologique (Raza et Ahmad, 2016).

Les procédés les plus utilisés pour la conservation des souches sont presque exclusivement la congélation et la lyophilisation, vue leur satisfaction aux critères de qualité microbienne (conservation au longue durée, transport et reprise de l'activité). Cependant, il existe d'autre procédés à utilisation moindre (réfrigération à 4°C, conservation sous forme d'émulsion entre deux phases non miscibles à -0°C et déshydratation par réduction d'activité de l'eau) (Madigan et al., 2007).

Au cours du processus de fermentation, l'accumulation d'éthanol et d'acide acétique et l'augmentation de de température sont les principaux facteurs qui favorisent la croissance et l'activité microbienne (Vinicius De Melo Pereira et al., 2019).

Face à ce constat, la présente étude recherche à valoriser un produit tiroir le vinaigre traditionnel de datte et la flore acétique existante.

L'étude est une prospection à mettre en évidence le choix des dattes en vinaigrerie traditionnels de dattes, étudier les caractéristiques physico-chimiques et microbiologiques de différents types de vinaigres traditionnels de dattes issus du savoir-faire des populations de la cuvette de Ouargla. Elle porte sur l'isolement et l'identification des bactéries acétiques avec des essais d'optimiser un milieu plus approprié à leur isolement. Il s'agit aussi d'étudier les propriétés des bactéries productrices d'acide acétique et leur capacité à tolérer les stress abiotiques et biotiques, de déterminer le pouvoir acidifiant des bactéries acétiques indigènes du Sahara Septentrional est-algérien vis-à-vis des facteurs climatiques arides. Enfin, de contribuer à la conservation des souches obtenues sur quelques co-produits de palmier dattier, dans des conditions naturelles et moins couteuses.

Nos travaux de caractérisation et de valorisation microbiologique laisse continuer et approfondir certains travaux précédents de Ould El Hadj *et al.* (2001) et Bouaziz et Ould El Hadj (2010), réalisés sur la caractérisation et l'évaluation de quelques vinaigres traditionnels de dattes issus de la cuvette de Ouargla. L'objectif principal de ces travaux été le contrôle de qualité hygiénique et la caractérisation physico-chimiques et biochimiques.

L'étude est structurée en deux chapitres. Dans la partie expérimentale, il est décrit les méthodes et les techniques adoptées. La seconde partie est consacrée à la présentation et à l'interprétation des résultats obtenus ainsi qu'à leur discussion. Une conclusion générale suivit de perspectives, achèvent le travail.

Chapitre I

Méthodologie de travail

Le chapitre 1 traite de la présentation de la zone d'étude, la collection des échantillons de vinaigres traditionnels de dattes, des analyses physico-chimiques et microbiologiques mais aussi du traitement des résultats par des analyses statistiques.

I.1.- Principe adopté

Dans la cuvette de Ouargla, le palmier dattier donne une gamme étendue de produits, la valorisation de ses sous-produits devient une opportunité socioéconomique, écologique et culturel. Le vinaigre traditionnel de dattes est préparé et consommé localement dans le Sahara Septentrional est-Algérien.

Les analyses physico-chimiques sont effectuées pour la caractérisation du vinaigre traditionnel de différents cultivars de dattes (Deglet-Nour, Hamraya et Harchaya) préparé par les habitants de la localité de Ouargla.

Les bactéries acétiques sont très répandues dans la nature. Ce sont des microorganismes très important dans l'industrie alimentaire grâce à leur capacité à dégrader différents substrats en produits finaux, d'oxyder divers types des sucres et d'alcools en acides organiques (Sengun, 2017). La valorisation de divers substrats (plantes spontanées, résidus agricoles, déchets de l'industrie agro-alimentaire...etc) fourni un milieu de culture bon marché (faible coût). Les contraintes de l'industrie (thermique, acétique et éthanologique) peuvent être mortelles pour certaines cellules (Taweecheep *et al.*, 2019). Pour cela, l'utilisation des souches résistantes est indispensable. Dans des conditions de stress en vinaigrerie, les bactéries acétiques restent en état viable non cultivable (VNC), elles sont isolées et identifiées sur différents milieux de culture pour chercher le milieu le plus approprié pour la croissance de ce type de bactéries. Ainsi, l'étude des caractéristiques biochimiques de quelques souches de bactéries acétiques indigènes (sahariennes) issues du vinaigre traditionnel de dattes de la cuvette de Ouargla (Sahara Septentrional est-Algérien), à la recherche de substrats assimilables s'impose. Ces bactéries pourraient être utilisées dans des procédures industrielles à grande échelle et ayant des aptitudes diverses vis-à-vis des incidents d'accumulation de substrat éthanol ou de produit d'acide acétique durant la production, où leurs tolérances. La production de vinaigre à l'échelle industriel se fait par la méthode de bullage (submergé) (Stoychev *et al.*, 2020). Pour la sélection des souches thermotolérantes, une étude de la tolérance des bactéries acétiques aux températures élevées est effectuée. De même, à la recherche de souches performantes (reproductives) en vinaigrerie traditionnelle de dattes, une étude comparative en acétification entre les souches est entamée. Une contribution à la conservation des souches sahariennes issues de vinaigre traditionnel de dattes de la cuvette de Ouargla, dans des conditions naturelles (moins couteuses et sans consommation d'énergie électrique) et à la valorisation de quelques sous-produits du palmier dattier est accompli. Elle est considérée comme une étude de l'alternative et de préservation de leurs caractéristiques technologiques de types sahariens.

Des analyses statistiques (analyse de la variance [ANOVA], analyse en composantes principales [ACP] et la classification ascendante hiérarchique [CAH]), ont permis de confirmer les relations existantes entre les différentes souches bactériennes et leur environnement.

I.2.- Présentation de la région d'étude

La cuvette de Ouargla est située au sud-est de l'Algérie, à environ 800 km au sud-est d'Alger. Elle est considérée comme l'une des plus grandes oasis du Sahara Algérien. Elle s'étend sur environ 30 km de long et 12 à 18 km de large, à une altitude variant de 103 à 150 m. Elle est bordée à l'ouest par un plateau de 200 à 230 m d'altitude et à l'est par un plateau à moins de 160 m d'altitude (fig. 1) (Rouvilleis-Brigol, 1975).

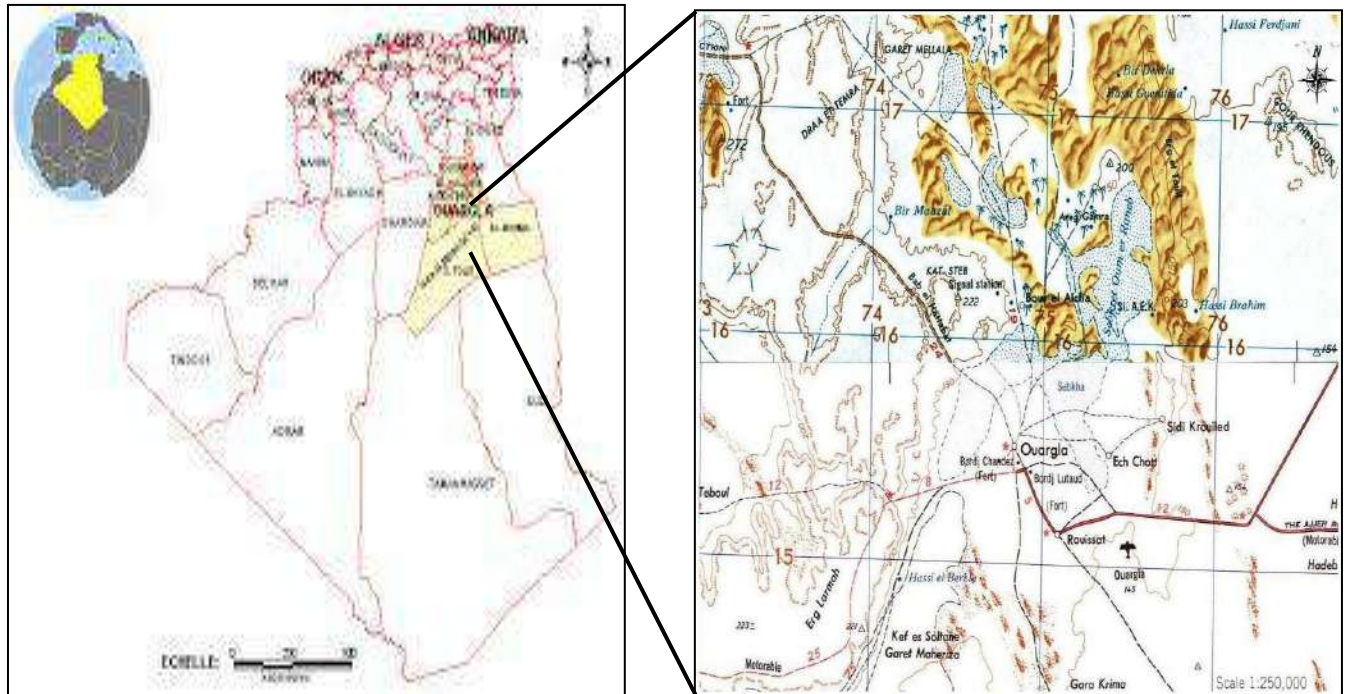


Figure 1.- Situation géographique de la cuvette de Ouargla (Algérie) (Google Earth, 2020)

Le climat de Ouargla est du type saharien hyper aride, à hiver tempéré, et d'une sécheresse permanente. Cette sécheresse du désert est due essentiellement à une insuffisance des précipitations, mais elle est accentuée par l'irrégularité du régime des pluies qui permet l'existence de longues périodes sans une goutte d'eau (Ozenda, 2004). Les températures maximales enregistrées les 2 dernières années selon l'ONM (2019), sont de l'ordre de 51.3°C en juillet 2018 et 50°C en juillet 2019.

Ouargla regroupe des habitants divers par les origines et variés dans les modes de vie. Au mode de vie du sédentaire correspond un habitat traditionnel, adapté à des activités presque exclusivement agricoles et localisé dans les ksours, villages ou villes fortifiés (Rouvilleis-Brigol,

1975). Sa position géostratégique fait qu'elle occupe le centre d'une cuvette endoréique appelée "cuvette de Ouargla". Elle se localise dans le lit de l'oued M'ya, depuis les ruines de Sedrata et Gara Krime au sud jusqu'au Hassi El-Khefif au nord.(Senoussi *et al.*, 2017).

I.3.- Choix des zones d'étude

A Ouargla, les palmeraies ont un rôle socioéconomique, surtout durant la période de la récolte des dattes (automne) après leur maturation au stade de Tmar. La cuvette de Ouargla est une zone phoenicole saharienne par excellence. Les habitudes alimentaires, sans oublier les coutumes et les traditions sont basées essentiellement sur les dattes, les sous-produits de dattes et du palmier dattier.

I.4.- Enquête

Pour mettre en évidence l'influence du milieu extérieur et mode de préparation sur la qualité physico-chimique et microbiologique de du vinaigre traditionnel de dattes, une enquête sur terrain est effectuée. L'enquête a lieu entre 2014 et la fin 2019 selon un questionnaire déjà établi. Des visites ont été entreprises auprès de certains artisans afin d'assister à l'élaboration de produit fini ou de les faire interviewés sur leur savoir-faire artisanal. Il s'agit des localités de Beni thour, Gara Nord, Ifri, El Ksar, Said Otba, Tazgart, Mekhadma et Ain Beida.

I.5.- Echantillonnage des vinaigres traditionnels

La collecte des échantillons se fait dans différentes localités de la cuvette de Ouargla qui sont participés dans la fabrication du vinaigre traditionnel de différents cultivars de dattes (Hamraya, Harchaya, Deglet-Nour). Durant l'échantillonnage, il est noté sur des fiches de renseignement la date de fabrication, la technique d'élaboration du produit, les cultivars de dattes utilisés et les caractéristiques organoleptiques (annexe 1).

Les échantillons de vinaigre sont récoltés à raison du 500 mL à 1.5 litre dans des flacons stériles en verre. Ils sont étiquetés et toutes les informations sur l'échantillon, sont notées. Ils sont entreposés à la température ambiante avant analyse.

I.6.- Méthodes d'analyse

Afin d'étudier les caractéristiques physico-chimiques et microbiologiques des différents vinaigres traditionnels de dattes récoltés, différents paramètres sont étudiés. Toutes les analyses sont répétées trois fois dans un but de fiabilité statistique.

Les analyses physico-chimiques sont effectuées sur les échantillons bruts de vinaigres traditionnels de dattes. Les bactéries isolées sont identifiées puis caractérisées par rapport aux

stress abiotiques qu'elles peuvent subir en fermentation (fig. 2).

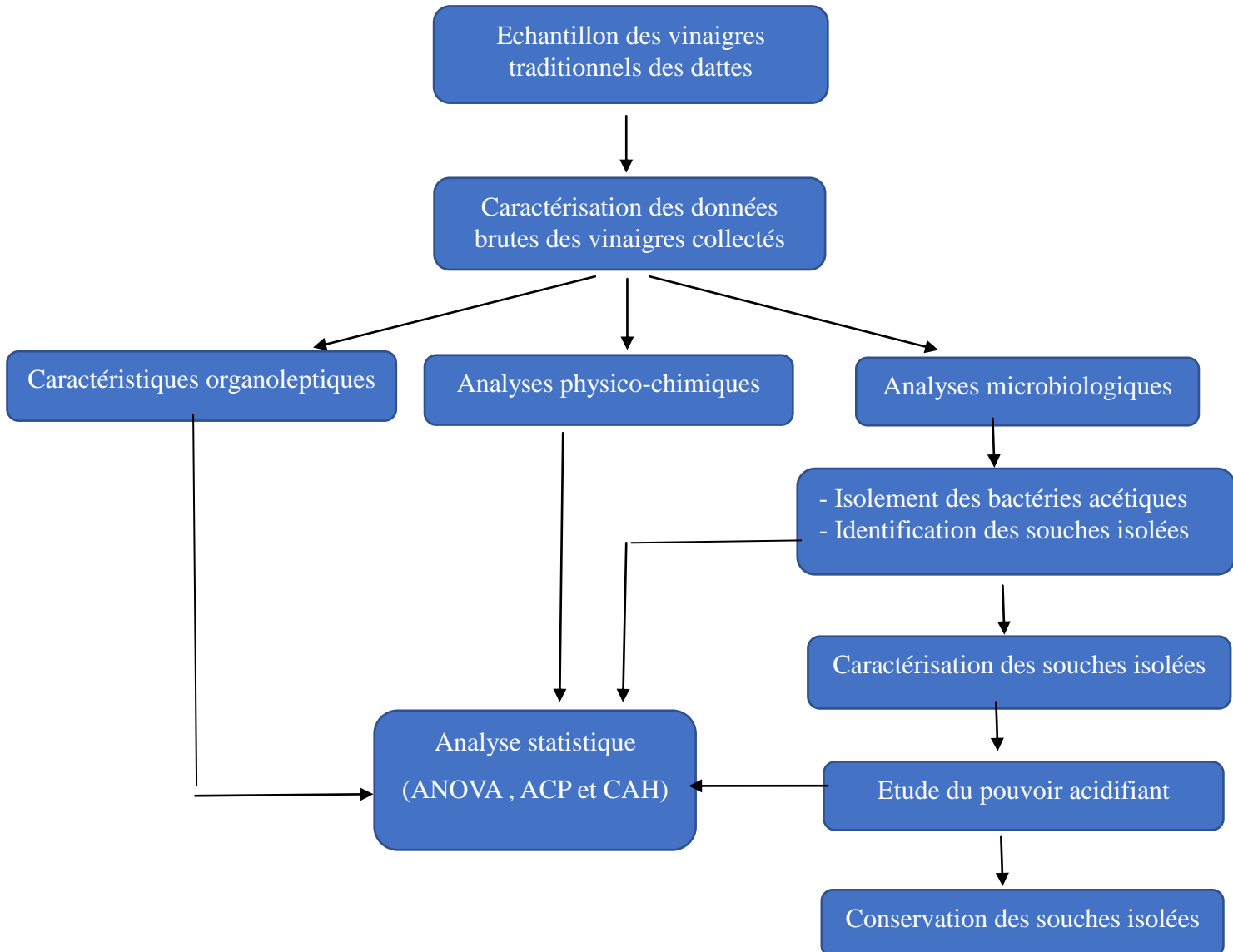


Figure 2.- Schéma récapitulatif du protocole expérimental

I.6.1.- Analyses physico-chimiques du vinaigre

Les analyses physicochimiques du vinaigre comportent le pH, la conductivité électrique, la densité et l'acidité totale.

I.6.1.1.- Détermination du pH

Le pH renseigne sur l'activité métabolique de la microflore présente (Mbungu, 2016). Il est le potentiel en ions H^+ et déterminé par les concentrations relatives d'acides et de bases (Voet et Voet, 2016).

L'échantillon à examiner est amené au contact de l'électrode par circulation. Il est mesuré directement à l'aide d'une électrode de pH-mètre étalonné à raison de 50mL. Il consiste à tremper l'électrode dans le bêcher de l'échantillon, laisser stabiliser un moment, puis noter le pH. Il est nécessaire d'effectuer un certain nombre de mesures pour être assuré de la constance de la valeur obtenue (Rodier, 2005). Les mesures sont exprimées en unités de pH, à la température de 20 °C.

I.6.1.2.- Détermination de la conductivité électrique

La conductivité électrique est la capacité de conduire le courant électrique dans une solution aqueuse et dépend de la présence des ions, de leur valence, leur concentration totale et relative, de leur mobilité et de leur température (Manns, 2007). Le mesure de la conductivité électrique permet d'évaluer rapidement mais très approximativement la minéralisation globale. Elle ne reflète qu'une minéralisation globale et ne permet pas d'identifier les éléments chimiques en cause (Rodier, 2005).

D'une façon générale, opérer avec de la verrerie rigoureusement propre et rincée, avant usage. Agiter le liquide afin que la concentration ionique entre les électrodes soit identique à celle du liquide ambiant. Cette agitation permet aussi d'éliminer les bulles d'air sur les électrodes. Introduire alors le thermomètre aussi près que possible de la cellule. Opérer de préférence à la température de référence de 20°C. La température du liquide ne devra en aucun cas varier pendant la mesure. L'utilisation du bain thermostaté facilite l'équilibre thermique et améliore les résultats de la mesure.

Pour la détermination de la conductivité, il est utilisé un conductivimètre multiélément. Elle est déterminée après rinçage plusieurs fois de l'électrode, d'abord avec de l'eau distillée puis plongée dans un récipient contenant 50mL de l'échantillon à examiner. Faire la mesure en prenant soin que l'électrode soit complètement immergée. Le résultat de la conductivité est donné directement en mS/cm. Elle s'exprime à 20°C selon la formule suivante (Rodier, 2005):

$$C.E \text{ (mS/cm)} = C.E \text{ m} \times F$$

C.E m: conductivité électrique mesurée

F: facteur de correction en fonction de la température

I.6.1.3.- Mesure de la densité

La densité d'une substance est égale à la masse volumique de la substance divisée par la masse volumique du corps de référence à la même température. Pour les liquides, l'eau est utilisée comme référence. La masse volumique de l'eau est mesurée à la température de 4°C, qui correspond à une température où sa masse volumique passe par un maximum. On indique cette

température de référence en mettant 4 en indice. La notation devient alors d_4 . Pour des raisons pratiques, la mesure de la masse volumique de la substance s'effectue à la température ambiante et généralement à 20°C.

La densité renseigne sur l'état des produits par la mise en œuvre du taux de matière solide et de la viscosité. Elle renseigne sur l'aptitude des microorganismes vis-à-vis de l'état physique du milieu (Ould El Hadj *et al.*, 2001).

La densité est mesurée à l'aide d'un densimètre. Le principe consiste à plonger dans 100 mL de vinaigre maintenu à la température de 15°C, un densimètre gradué.

La technique de mesure varie suivant la précision de mesure recherchée. Les mesures de routine s'effectuent le plus souvent avec un densimètre standard en verre lesté au plomb. Le densimètre est plongé dans le liquide préalablement placé dans une éprouvette. L'enfoncement dans le fluide varie en fonction de sa densité dont la valeur est obtenue directement grâce à une échelle graduée. Des étalons de densité permettent de vérifier l'étalonnage du densimètre.

Pour une mesure plus précise, on utilise un picnomètre. Ce petit récipient dont la forme rappelle celle de la fiole, est caractérisé par un volume très précis. La détermination de la densité s'effectue par pesée. Il est impératif de conserver le même picnomètre pour mesurer la masse d'eau et la masse de substance. Il est également préférable de dégazer les solutions en plaçant le picnomètre dans une enceinte sous-vide. Des densimètres automatiques sont également disponibles et permettent d'avoir des mesures de masse volumique précises à $\pm 0.001 \text{ g/mL}$. Le liquide est placé dans un tube oscillant. La période de vibration est proportionnelle à la masse volumique du liquide. Le «picnomètre» a servi à la mesure de la densité des échantillons de vinaigres de dattes. Les résultats exprimés par lecture direct (Audigie *et al.*, 1984).

I.6.1.4.- Détermination de la teneur en acidité totale

L'acidité totale d'un vinaigre désigne l'acidité titrable en présence de phénolphtaléine en solution alcoolique, comme indicateur. Le principe repose sur la neutralisation des acides de l'échantillon par une solution alcaline (Hitos *et al.*, 2000).

La détermination de la teneur en acidité totale est réalisée selon la méthode numéro 52 de l'organisation européenne des normes œnologiques éditée en année 2000 (OENO 52 2000) (Camín *et al.*, 2013) relative au vinaigre de vin (OIV, 2018). La solution d'hydroxyde de sodium 0.5 N en présence d'un indicateur (solution alcoolique de phénolphtaléine à 1 g pour 100 mL) sont utilisés. Dans une fiole jaugée de 100 mL, dissoudre 1 g de phénolphtaléine avec une quantité suffisante d'éthanol à 95% (v/v) et porter au trait de jauge (Hitos *et al.*, 2000).

Il faut homogénéiser l'échantillon par agitation et filtrer si nécessaire. Dans une fiole conique de 250 mL, introduire 10 mL de vinaigre, additionner d'eau récemment bouillie et froide

pour que la solution se présente à peine colorée. Il est ajouté quelques gouttes de l'indicateur et titrer avec la solution d'hydroxyde de sodium jusqu'à coloration rose persistante. La teneur en acidité totale, exprimée en grammes d'acide acétique de l'échantillon, est donnée par la formule (Hitos *et al.*, 2000):

$$AT \text{ (g/L)} = 3.V$$

AT: acidité totale

V: volume de la solution d'hydroxyde de sodium utilisée pour titration (mL)

I.6.2.- Analyses microbiologiques du vinaigre

Les vinaigres collectés sont soumis à des analyses microbiologiques, afin de rechercher de bactéries acétiques. L'étude a donc porté sur l'isolement et la caractérisation des bactéries acétiques.

I.6.2.1.- Isolement de bactéries acétiques contenues dans le vinaigre traditionnel de dattes

L'isolement de bactéries acétiques repose sur l'utilisation des milieux de culture repartis sur boîte de Pétri. Dans ce cas un germe isolé donne naissance à une colonie macroscopique qui lui est caractéristique et facile à compter (Dupin, 1992).

L'ensemencement est réalisé à partir de la mère de vinaigre (biofilm des bactéries acétiques formé à la surface du vinaigre), en procédant par la méthode de dilution si nécessaire. Il est réalisé des dilutions de 1 mL d'échantillon (suspension mère issue de vinaigre de dattes) est ajouté 9 mL d'eau physiologique stérile. Après homogénéisation, la solution mère d'étude à 10^{-1} est prête. Il est procédé une seconde dilution allant jusqu'à 10^{-3} , en utilisant 4 tubes à essais stériles contenant chacun 9 mL d'eau physiologique stérile. Les analyses s'effectuent à partir des dilutions obtenues (Madigan *et al.*, 2007).

Dans des boîtes de Pétri sont préalablement coulées, des milieux d'isolement 0.2 mL de vinaigre ou de la mère et des dilutions (10^{-1} à 10^{-3}) sont prélevées à l'aide d'une pipette Pasteur, et étalées. Les boîtes sont incubées à 30°C pendant 72 heures (Kim, 2019a).

La plupart des denrées alimentaires contenant des bactéries acétiques renferment également d'autres bactéries, des levures et parfois des moisissures. L'isolement des bactéries acétiques en vue de leur identification ou de leur numérotation peut donc demander l'emploi de milieu de culture sélectif doté de propriétés antibactériennes et si possible antifongiques. Le milieu de culture de base pour les bactéries acétiques est un milieu liquide glucosé contenant du CaCO_3 (bouillon pour les bactéries acétiques) (Guiraud, 2003). Pour un isolement sélectif, les colonies des bactéries acétiques peuvent être identifiées sur gélose à l'éthanol et au CaCO_3 (Madigan *et al.*, 2007).

L'isolement sélectif des bactéries acétiques a été effectuées par culture sur une gamme de milieux de base tel que Frateur et d'autres milieux, sont élaborés et développés au niveau de laboratoire où la source de carbone a été l'éthanol ou le glucose. Ainsi, la gélose nutritive modifiée (GN modifiée), est un milieu de gélose nutritive auquel a été additionné du carbonate de calcium (CaCO_3), d'extrait de levure et de l'éthanol. Le milieu naturel gélosé offre de meilleures conditions de multiplication pour des bactéries acétiques. Il est préparé à base de vinaigre traditionnel de dattes. Le milieu Frateur et le milieu naturel sont modifiés par addition de la spiruline au lieu de l'extrait de levure comme facteur de stimulation de la croissance des bactéries acétiques. La spiruline est connue par sa teneur exceptionnelle en protéines (60 à 70 %), par sa teneur en matière sèche et d'autres nutriments notamment les lipides essentiels et les vitamines. La souche utilisée est issue de la région de Taguemart à Tamanrasset (Algérie). Elle est cultivée et commercialisée sous forme de poudre de part de Mr Hiri Abdelkader (producteur locale de l'un des souches Algériennes). La spiruline est le nom commun de l'espèce *Arthrospira platensis* des cyanobactéries (anciennement appelées algues bleues).

I.6.2.2.- Purification des souches des bactéries acétiques

Après culture des bactéries sur milieux sélectifs plusieurs colonies sont obtenues. Pour purifier les souches, des isolements successifs réalisés sur milieu Frateur ou GYC jusqu'à l'obtention de colonies pures bien distinctes, homogènes et stables. Ces dernières sont ensemencées et conservées sur des tubes à gélose inclinés afin de les identifier et de les caractériser. La purification des souches sur milieu gélosé se fait par la méthode des stries. La vérification de la pureté de la souche s'effectue par plusieurs repiquages sur des boîtes de Pétri contenant le milieu solide. La pureté des souches est confirmée par prélèvement de colonies après chaque repiquage, par observation microscopique. Ainsi après l'incubation, l'observation des caractères culturels permet de désigner la pureté des souches. A partir des colonies isolées sur milieu de culture, l'examen microscopique est réalisé (Guiraud, 2012).

I.6.2.3.- Identification et caractérisation des bactéries acétiques

L'identification et la caractérisation des souches bactériennes pures se font par une galerie de tests biochimiques, après caractérisations des cultures d'un point de vue morphologique et physiologique, puis confirmation par des analyses moléculaires.

I.6.2.3.1.- Etude des caractères culturels

L'examen macroscopique est effectué pour les souches obtenues. C'est le premier test effectué après isolement des souches. Il s'agit de noter l'aspect des colonies sur les milieux solides gélosés. La culture des souches après purification sur les milieux gélosés d'isolements à savoir Frateur, GYC, GN modifié et milieu naturel; permet d'obtenir des colonies séparées facile à décrire. Il porte sur la description des tailles, des formes, des aspects des surfaces, des couleurs

et des opacités des colonies. C'est un examen qui peut être effectué à l'œil nu ou à l'aide d'une loupe binoculaire (Ruangpan et Tendencia, 2004).

I.6.2.3.2.- Etude des caractères morphologiques

Les souches de bactéries acétiques isolées des vinaigres traditionnels de dattes sont caractérisées. Chaque isolat est désigné par un numéro de code. Elles permettent d'observer sous un microscope optique la morphologie des cellules bactériennes (cocci, batonnet, etc.), la taille (court, long, etc.), le mode de regroupement et multiplication (isolé, diplo, amas, etc.), des caractères structuraux (mobilité et type de ciliature). Cette étude comprend des examens microscopiques à l'état frais, puis des examens microscopiques après coloration sur frottis fixés. Des caractères structuraux peuvent être mis en évidence par la coloration de Gram qui permet une distinction des bactéries en deux grands groupes selon les parois différentes (Shen et Zhang, 2017).

I.6.2.3.2.1.- Préparations microscopiques

Les examens microscopiques nécessitent la préparation d'une suspension bactérienne en prélevant des colonies pures et les mettre en suspension dans un diluant de l'eau physiologique. Si la suspension est trop trouble, il est ajusté l'opacité par l'ajout d'eau physiologique (Madigan et *al.*, 2007).

I.6.2.3.2.2.- Examens microscopiques

Elles sont effectuées sur des lames de verre ordinaire (76 x 26 x 1.2 mm), avec utilisation des lamelles couvre objets très fins. On distingue deux types de préparations microscopiques (état frais et frottis) (Cappuccino et Sherman, 2014).

Les examens à l'état frais sont toutefois utilisés pour les observations de la viabilité, la taille, la forme, le mode de regroupement et la mobilité. L'observation se fait directement avec l'objectif du grossissement X40, à partir d'une suspension bactérienne (Delarras, 2007).

Parallèlement pour compléter l'observation microscopique et déduire les types de parois des bactéries isolées, l'examen après coloration de Gram est effectué à partir d'un frottis bactérien fixés sur une lame de verre (Tortora, 2003). La coloration de Gram est une double coloration qui nous permet de connaître la forme, l'arrangement, la pureté ainsi que la nature biochimique de la paroi des cellules purifiées. Cette coloration est réalisée systématiquement sur les différentes colonies purifiées pour préciser le caractère Gram+ ou Gram-. Avec cette coloration double, les bactéries Gram positif apparaissent en violet foncé tandis que celles de Gram négatif sont colorées en rose ou en rouge (Delarras, 2008).

I.6.2.3.3.- Etude des caractères physiologiques et biochimiques

Après isolement des bactéries en milieu nutritive solide comme décrit précédemment, le milieu Frateur, le milieu GYC, la GN et le milieu naturel, les bactéries sont étudiées. La caractérisation physiologique et biochimique des souches isolées a été effectuée conformément au manuel de Bergy de systématique bactériologique (1984) (*Bergy's Manual of Systematic Bacteriology*) et aux publications de Guiraud et Galzy (1980), Guiraud (2003, 2012), Sharafi et al. (2010) et Diba et al. (2015).

I.6.2.3.3.1.- Test de l'oxydase

L'enzyme oxydase joue un rôle essentiel dans le fonctionnement du système de transport d'électrons au cours de la respiration aérobie. Cytochrome oxydase catalyse l'oxydation d'un cytochrome réduit par l'oxygène moléculaire (O_2), entraînant la formation de H_2O ou H_2O_2 . Les bactéries aérobies, ainsi que certains anaérobies facultatifs et microaérophiles, montrent une activité oxydase (Delarras, 2007).

La recherche de l'oxydase s'effectue avec des disques oxydase. Déposer le disque sur une lame porte-objet, l'humidifier avec deux gouttes d'eau distillée stérile et écraser la colonie testée sur le disque. Une réaction positive se traduit par un virage rapide du réactif de l'incolore au violet (Guiraud, 2012).

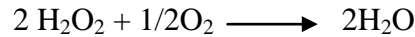
Le N-diméthyl-paraphénylène diamine (PDA) est utilisée comme réactif, généralement imprégné sur des disques (disques oxydases) prêts à l'emploi du commerce. En solution le N-diméthyl-paraphénylène diamine (PDA) est incolore sous sa forme réduite et violet sous sa forme oxydée. Un de ces disques est placé sur une lame et une colonie y est déposée avec une pipette pasteur. S'il y a apparition d'une tache violette au bout de 30 secondes, la bactérie est présente d'activité de l'oxydase positive. L'absence de couleur violette signifie que la bactérie est dépourvue d'oxydase. La méthode du papier filtre peut également être utilisée (Cappuccino et Sherman, 2014).

I.6.2.3.3.2.- Pouvoir suroxydant

Le pouvoir suroxydant est un test de mise en évidence de l'oxydation complète de l'éthanol par les bactéries acétiques en H_2O et CO_2 , sur milieu gélosé de Carr contenant le vert de bromocrésol pendant 96h à $30^\circ C$. Le virage du milieu bleu-vert au jaune indique que les bactéries appartiennent au genre *Gluconobacter* (éthanol \longrightarrow acide acétique). Autrement, le virage du milieu au jaune puis au bleu, signifie la présence des bactéries du genre *Acétobacter* (éthanol \longrightarrow acétique $\longrightarrow H_2O + CO_2$) (Guiraud, 2003).

I.6.2.3.3.3.- Test de catalase

La catalase est une enzyme, qui permet la dégradation d'eau oxygénée qui résulte de l'oxydation par l'oxygène de l'air par la réaction suivante (Cappuccino et Sherman, 2014):



Sur une lame de verre propre, déposer une goutte 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 donc catalase positive, au cas contraire c'est-à-dire pas de formation de bulles observable, la bactérie ne possède pas l'enzyme donc elle est catalase négative (Cappuccino et Sherman, 2014).

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.

I.6.2.3.3.4.- Pouvoir cétoène

Certaines bactéries acétiques peuvent transformer le glycérol en dihydroxyacétone, qui peut être mise en évidence par la liqueur de Fehling. Ce pouvoir se caractérise par la propriété de transformer la fonction alcool secondaire en fonction cétonique. Du fait de cette propriété les acétobacters sont utilisés industriellement pour produire des acides cétoniques comme l'acide ascorbique (vitamine C). Un milieu gélosé au glycérol est coulé en boîtes de Pétri et ensemencé avec des souches isolées. Après 48 h 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 cétoène (Guiraud et Galzy, 1980, Larpent, 1997).

I.6.2.3.3.5.- Culture en présence de NH_4^+ comme seule source d'azote

La culture se réalise en utilisant le milieu liquide de Hoyer-Frateur à 3% d'éthanol. 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 d'une membrane de couleur blanche (Guiraud, 2012).

I.6.2.3.3.6.- Présence d'un pigment sur le milieu d'isolement

Les souches de bactéries acétiques obtenues sur les milieux d'isolements, sont examinées afin de déterminer s'ils possèdent un pigment rose ou brun. Il est utilisé un milieu gélose glycose carbonate; les souches sont ensemencées et incubées à 30°C, pendant 48 h. Il est noté la présence ou l'absence de la pigmentation brune (Guiraud, 2003).

I.6.2.3.3.7.- Formation d'acide gluconique à partir du glucose

La formation d'acide gluconique à partir du glucose est déterminée sur le milieu de culture gélosé à base du glucose et du carbonate de calcium. Ce test est mis en évidence sur le milieu de culture de base pour les bactéries acétiques, qui contient du glucose et du carbonate de calcium. Après 48 h d'incubation à une température de 30°C, la production d'acide gluconique se traduit par dissolution des carbonates de calcium et clarification du milieu autour des colonies (Sengun, 2017).

I.6.2.3.3.8.- Formation d'acide céto gluconique

Le milieu de Haynes est un bouillon élaboré à base d'extrait de levure, peptone, glucose et phosphate dipotassique. Il sert à mettre en évidence la formation d'acide céto gluconique à partir de glucose. Après incubation des souches de bactéries acétiques du genre *Acetobacter* et *Gluconobacter* isolées à une température de 30°C pendant 48 h, 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). Les acides céto gluconiques produites sont de nature 2-céto gluconique, 5-céto gluconique et 2,5-céto gluconique

I.6.2.3.3.9.- Production de la biocellulose

La biocellulose produite par les souches de bactéries acétiques est mise en évidence sur le bouillon pour bactéries acétiques. La pellicule formée à la surface du milieu est prélevée et placée dans une capsule ou sur une lame et recouverte de réactif iodé (Lugol), puis d'acide sulfurique à 60%. Le développement d'une couleur bleue signifie une production de cellulose (Guiraud et Galzy, 1980).

I.6.2.4.- Caractérisation des bactéries acétiques identifiées

La recherche des souches résistantes et performantes est un paramètre clé dans l'industrie du vinaigre. Plusieurs caractères souhaitables sont mis en évidence par leur capacité à produire des changements sur différents milieux.

I.6.2.4.1.- Analyses biochimiques

Les analyses biochimiques effectuées sur bactéries acétiques pour tester leur tendance à assimiler les substrats organiques tel que l'esculine, l' α -galactose, le β -galactose, le ribose, l'arabinose, le mannitol, le sorbitol, le lactose, le tréhalose, le glucose, la raffinose et la gélatine; comme source de carbone. Des galeries API 20 NE et API 20 Strep contenant des substrats déshydratés sont utilisés pour mettre en évidence les activités enzymatiques ou de la fermentation des sucres (Delarras, 2007).

L'utilisation de la galerie nécessite tout d'abord une préparation au préalable. La préparation de l'inoculum est une étape primordiale dans la fiabilité des résultats d'une galerie API. 1 à 4 colonies de morphologie identique issues des cultures jeunes (18-24 heures) sont ajoutées au réactif des galeries (suspension bactérienne d'opacité égale à 0.5 de Mc Farland) et puis par une pipette Pasteur les galeries sont remplies (Delarras, 2007).

Les cupules remplies de suspension en évitant les bulles d'air, sont incubées à $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ pendant une semaine. La révélation est permise par la présence d'indicateurs colorés dans les substrats. Un changement de couleur du milieu dans le tube, signifie généralement que le test est positif, en se référant afin de permettre l'interprétation des résultats. Après incubation, la lecture de la galerie doit se faire en se référant au tableau fourni par le fabricant.

I.6.2.4.2.- Préparation de la pré-culture

La préparation de la pré-culture, est effectuée à partir de suspensions bactériennes (10 mL) sur milieu GYEA et incubation à 30°C durant une semaine, pour avoir une culture de densité optique à 600nm de l'ordre de 0.7 ou 0.8 (phase exponentielle) (Arzul et Quiniou, 2014). Le volume adéquat de l'inoculum est prélevé selon la formule (Coulibaly *et al.*, 2018):

$$C_1V_1=C_2V_2$$

C_1 : 0.7 ou 0.8, C_2 : 0.5, V_1 : 10 mL, V_2 : volume à rechercher; à raison de $\text{DO}_{600\text{nm}} = 0.5$ avec C_2 : concentration de départ.

I.6.2.4.3.- Production de l'acide acétique

Un volume bien déterminé (250 mL) de milieu liquide GYEA (Glucose, extrait de levure, éthanol, acide acétique) en erlenmeyer est ensemencé, et incubé dans un incubateur agitateur (200 tr/min) à 30°C . Un échantillon de 5 mL est prélevé au cours du temps chaque 24 h, en ayant soin de ne pas dégrader la pellicule bactérienne qui se forme en surface. Il est mélangé à 5mL de culture, 20mL d'eau distillée, puis 3-5 gouttes d'indicateur phénolphtaléine sont ajoutées. La solution est titrée avec NaOH à 0.5 N. La quantité (g) de l'acide acétique produit dans 100 mL de milieu est calculée selon la formule suivante:

acide acétique (g / 100mL) = Volume de NaOH (mL) utilisé pour le titrage $\times 0.03 \times 20$ (Sharafi *et al.*, 2010; Diba *et al.*, 2015).

I.6.2.4.4.- Etude de la tolérance des bactéries acétiques aux facteurs abiotiques

Les bactéries acétiques sont le principal agent de production du vinaigre, à cet effet, toutes conditions extérieures pouvant perturber leurs activités, peuvent donc affecter la qualité du vinaigre. Ainsi, il sera effectué plusieurs tests vis-à-vis de la tolérance des bactéries à certains

facteurs abiotiques et biotiques (température, acidité et substrat éthanol) pour une meilleure productivité en acide acétique.

I.6.2.4.4.1.- Etude de la tolérance des bactéries acétiques aux températures élevées

La thermotolérance des souches isolées est réalisée dans des milieux liquides de GYEA 2% à base d'extrait de levure, glucose, éthanol et acide acétique, ensemencé et incubé à différentes températures (30°C, 35°C, 40°C, 45°C, 50°C, 55°C et 60°C). Ces écarts de températures sont enregistrés dans la cuvette de Ouargla. Toutes les cultures sont comparées avec une culture témoin (50 mL). Les flacons sont inoculés avec des colonies jeunes des souches isolées de vinaigre de cultivars de Hamraya, Harchaya et Deglet-Nour, après 48 h d'incubation à 30°C puis incubées à des températures différentes. La quantité totale de biomasse produite est déterminée en mesurant l'absorbance de la culture sur un spectrophotomètre à 600 nm (densité optique mesuré par spectrophotomètre UV-visible chaque 24 h) pour tous les échantillons (Coulibaly *et al.*, 2018).

I.6.2.4.4.2.- Etude de la tolérance à l'éthanol

Les bactéries acétiques du vinaigre de dattes sont inoculées à partir des pré-cultures dans un milieu liquide à base d'extrait de levure, glucose, éthanol et acide acétique (GYEA 2%) modifiée avec 2%, 4%, 6%, 8% et 10% d'éthanol. Incubées à 30°C pendant 168 heures. La quantité de biomasse produite est déterminée en mesurant l'absorbance de la culture à 600 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible chaque 24 h (Perumpuli *et al.*, 2014; Mounir *et al.*, 2015).

I.6.2.4.4.3.- Etude de la tolérance à l'acide acétique

Afin de déterminer la tolérance des souches isolées de vinaigre traditionnel de dattes, un milieu GYEA à base d'extrait de levure, glucose, éthanol et acide acétique est élaboré. Chaque ingrédient représente 2% de sa composition dans le milieu. Le milieu GYEA est modifié par différentes concentrations d'acide acétique à raison de 0%, 2%, 4%, 6%, 8% et 10%, ayant des pH de 6.49 ± 0.02 , 3.47 ± 0.01 , 3.29 ± 0.01 , 3.18 ± 0.01 , 3.06 ± 0.01 , 2.94 ± 0.01 respectivement. (Perumpuli *et al.*, 2014), puis inoculée avec la pré-culture. Les cultures sont incubées à 30 °C pendant 168 heures. La croissance est déterminée en mesurant l'absorbance après chaque 24 heures avec un spectrophotomètre UV-visible à 600 nm pour tous les échantillons (Mounir *et al.*, 2015).

I.6.2.5.- Conservation des souches bactériennes

Les souches pures obtenues sur milieux d'isolements sont ensemencées sur gélose inclinée et conservée à 4°C au réfrigérateur pour identification. Pour éviter la perte des souches un repiquage chaque semaine est effectué. Les souches identifiées sont conservées par

congélation en utilisant un milieu sélectif liquide tel que le milieu Frateur, GYC, GYEA, GN modifiée et milieu naturel. Après centrifugation et lavages des souches bactériennes, 15% de cryoprotecteur (glycérol) est ajouté aux cultures avant leur congélation. La réfrigération permet de conserver des cultures bactériennes pendant un temps court, mais la congélation est utilisée pour une longue durée de conservation allant d'une année au plus selon le type et la concentration de cryoprotecteur additionné. Il est possible à tout moment de ranimer les micro-organismes par décongélation (Tortora, 2003).

Ainsi, différents support synthétiques et naturels pour une durée de trois mois sont utilisés. Les co-produits destinés à être comme supports de conservation naturels sont les feuilles de palme (foliole), Le fibrillum (Lif) et les périanthes (cupules) des dattes. Avant d'ensemencer les suspensions bactériennes, les supports précités sont lavés et séchés à l'air libre. La couche supérieure des feuilles est grattée pour enlever la cires epicuticulaires puis coupé en carrée de 1cm². Encore, pour le fibrillum est coupé en carrée de 1cm². Le gel de silice et le coton chirurgical sont des supports synthétiques utilisés pour comparer leur pouvoir conservatif avec celles naturelles. Le coton est préparé sous forme des boules de 1cm de diamètre. Le gel de silice récupéré à partir des emballages fermés des produits d'habillement (chaussures) ou des matériels informatiques, sous forme des boules de 0.2 à 0.6 cm de diamètre. L'ensemble des supports est stérilisé chacun à part dans des buccales en verre par autoclavage à 120°C pendant 15 min. Ils sont transférés dans des boites de Pétri stérile, où les périanthes sont mis sur un lit (support) de coton dont la face creuse est restée en haut. Les supports préparés sont imbibés des suspensions bactériennes, et le gel de silice est tapissé sur la surface des cultures (colonies) en boites Petri afin de les conservées. L'ensemble est entreposé à température ambiante dans des boites de Petri fermé durant trois mois du l'hiver au printemps à l'abri de contamination (Janvier, Février et Mars).

I.7.- Exploitation des résultats

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à la diversité de la communauté bactérienne acétogènes de vinaigre traditionnel de dattes tant sur le plan phénotypique que génétique et sur l'évaluation de leurs capacités de croitre en présence de stresses abiotiques.

I.7.1.- Analyses de la variance

Il est utilisé pour la présente étude l'analyse de la variance (ANOVA). C'est une méthode de comparaison de plusieurs moyennes. Elle permet de tirer des conclusions sur l'indication de l'effet des différents paramètres physicochimiques et microbiologiques sur la qualité des vinaigres et les facteurs abiotiques sur les bactéries acétiques indigènes (Haccoun et Cousineau, 2009).

I.7.2.- Analyse en composantes principales (ACP)

L'analyse en composantes principales (ACP), est une méthode statistique descriptive. Son objectif est de présenter sous une forme graphique, le maximum des informations contenues dans un tableau de données. Les données comportent n variables quantitatives. Les individus peuvent être représentés dans un espace à p dimensions (Philippeau, 1986).

C'est l'une des méthodes d'analyses multidimensionnelles qui visent à structurer, à résumer et à synthétiser les données en vue de comprendre le phénomène étudié. Les résultats de l'analyse en composantes principales (ACP) se présentent essentiellement sous la forme d'une suite de graphes. Les projections des individus et des variables figurent simultanément sur les mêmes graphiques. Deux individus proches sur la représentation sont semblables vis-à-vis de toutes les variables. Plus les variables se situent près du centre du graphique, moins elles sont discriminantes et inversement (Vilain, 1999). La forme graphique de l'analyse en composantes principales (ACP) réunit à la fois les points caractéristiques des variables observées et les points représentatifs des individus observés (Dagnelie, 1975).

L'ACP permet de décrire les relations existantes entre les différentes souches bactériennes et les différents pouvoirs de production d'acide acétiques d'une part, entre les différentes bactéries acétiques isolées entre elles-mêmes et leur environnement d'origine (vinaigre de différents cultivars de dattes), d'autre part. L'analyse en composantes principales (ACP) appliquée à l'étude des bactéries acétiques issus de vinaigre, sera réalisée en tenant compte de leur point d'isolement, pour établir la relation entre les variables quantitatives, c'est-à-dire la relation entre les différentes souches.

I.7.3.- Classification ascendante hiérarchique (CAH)

C'est la recherche d'une typologie ou segmentation, c'est-à-dire d'une partition ou répartition des individus en classes ou catégories. Ceci est fait en optimisant un critère visant à regrouper les individus dans des classes, chacune le plus homogène possible et entre elles les plus distinctes possible.

Il s'agit de regrouper itérativement les individus, en commençant par le bas (les deux plus proches) et en construisant progressivement un arbre ou dendrogramme regroupant finalement tous les individus en une seule classe à la racine. Ceci suppose de savoir calculer à chaque étape ou regroupement la distance entre un individu et un groupe ainsi que celle entre deux groupes. Ceci nécessite donc pour l'utilisateur de cette méthode de faire un choix supplémentaire: comment définir la distance entre deux groupes connaissant celles de tous les couples d'individus entre ces deux groupes. Le nombre de classes est déterminé a posteriori à la vue du dendrogramme ou d'un graphique représentant la décroissance de la hauteur de chaque saut ou écart de distance opéré à chaque regroupement (Baccini et *al.*, 2008).

Chapitre II

Résultats et discussion

II.1.- Vinaigre traditionnel de dattes issues du savoir-faire traditionnel de la cuvette de Ouargla

Dans le présent travail, il est analysé un vinaigre assez particulier produit traditionnellement à partir des dattes par quelques familles de la cuvette de Ouargla. Les analyses ont porté sur les aspects physico-chimiques et microbiologiques. Il est procédé à l'isolement et la caractérisation des bactéries acétiques, productrices d'acide acétique.

II.1.1.- Répartition des échantillons et mode d'obtention du vinaigre traditionnel de dattes récoltées dans la cuvette de Ouargla

L'étude porte sur l'analyse de 63 échantillons de vinaigre traditionnel de dattes, préparé artisanalement par quelques familles de la cuvette de Ouargla (Sahara septentrional est-algérien) noté de Ha1 jusqu'au Dn63 (Ha1, Ha2, Dn3, Dn4, Dn5, Ha6, Ha7, Dn8, Dn9, Ha10, Ha11, Ha12, Hr13, Ha14, Ha15, Dn16, Ha17, Hr18, Dn19, Dn20, Dn21, Dn22, Ha23, Ha24, Hr25, Dn26, Hr27, Ha28, Hr29, Ha30, Hr31, Hr32, Ha33, Ha34, Ha35, Ha36, Dn37, Ha38, Hr39, Ha40, Dn41, Dn42, Dn43, Ha44, Dn45, Ha46, Dn47, Dn48, Hr49, Dn50, Hr51, Dn52, Dn53, Ha54, Dn55, Dn56, Ha57, Hr58, Dn59, Ha60, Dn61, Ha62 et Dn63). Ha représente les échantillons des cultivars Hamraya, Hr évoque celles des cultivars Harchaya et Dn pour Deglet-Nour. Les échantillons sont constitués de 26 échantillons (41%) de vinaigres sont préparés à partir de la variété Hamraya, 26 (41%) de Deglet-Nour et 11 (18%) de Harchaya (fig. 3 et 4). Ce sont les variétés les plus utilisées en vinaigrerie traditionnelle dans cette bande aride. Toutefois, les cultivars les plus utilisés en Algérie sont Temjouhart, Takeryt, Deglet-Nour, Tafezwine, Ghars et Tazeggwaght (Cherif *et al.*, 2014). De même, Degla Beida, Techerwit, Hamraya, Tinissine, Tachrwit, et H'Chef de Deglet-Nour, sont disponibles et abondants en vinaigrerie traditionnelle de dattes (Bouaziz et Ould El Hadj, 2010; Ould El Hadj *et al.*, 2012). Les vinaigres de dattes à base des variétés Deglet Nour ou de Ghars, sont très appréciés. Ces cultivars sont largement utilisés en vinaigrerie traditionnelle. Harchaya appelée aussi Dkel Akerded présente une utilisation préférentielle par fois pour son goût assez particulier, soit acide et sucré (Ould El Hadj *et al.*, 2001). Assabri reste un peu rare ainsi que le cultivar Hamraya connue aussi sous le nom de Tazagart ou Tazeggwaght qui se conserve mal. El Horra est utilisé, à un degré moindre incluant les rebuts de dattes et les écarts de tri (Senoussi *et al.*, 2017).

La plupart des échantillons de vinaigres récoltés sont préparés à partir de dattes de bonne qualité organoleptique. Les 63 échantillons de vinaigre traditionnel de dattes sont répartis en 26 pour Hamraya, 10 pour Harchaya et 20 pour Deglet-Nour. Pour ce qui concerne les écarts de tri de dattes, ils sont inclus dans un seul vinaigre de cultivar Harchaya et 6 vinaigres de cultivar Deglet-Nour (fig. 5 et 6).



Figure 3.- Cultivars de dattes utilisées dans la préparation du vinaigre traditionnel de dattes.
A : Deglet-Nour, B : Harchaya et C : Hamraya.

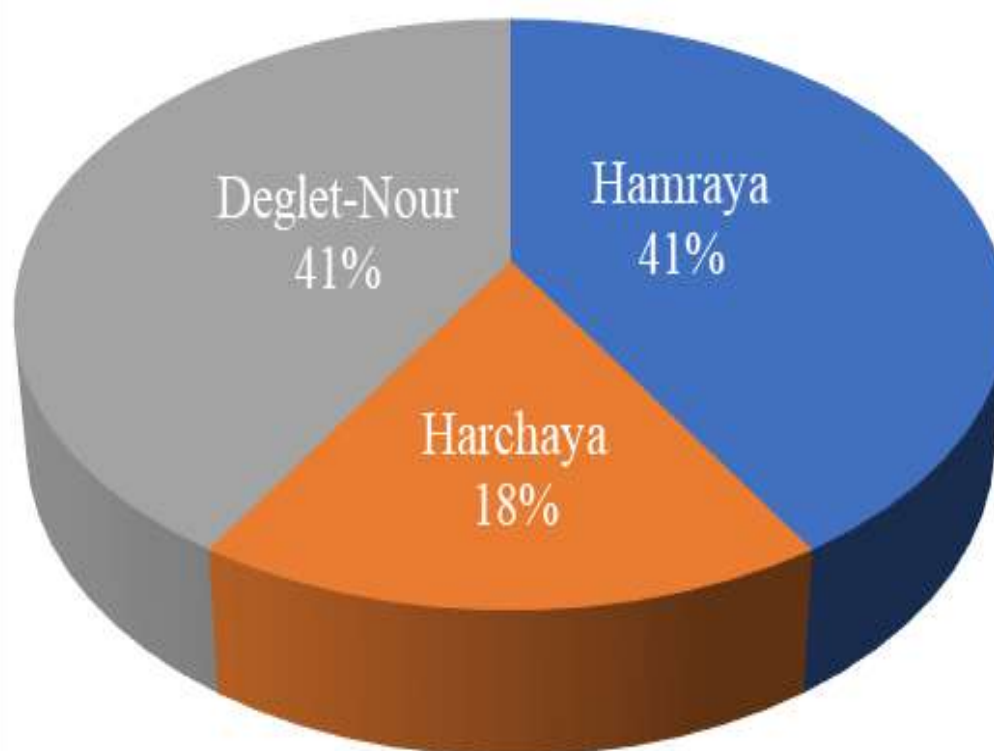


Figure 4.- Répartition des cultivars selon les échantillons de vinaigre traditionnel de dattes

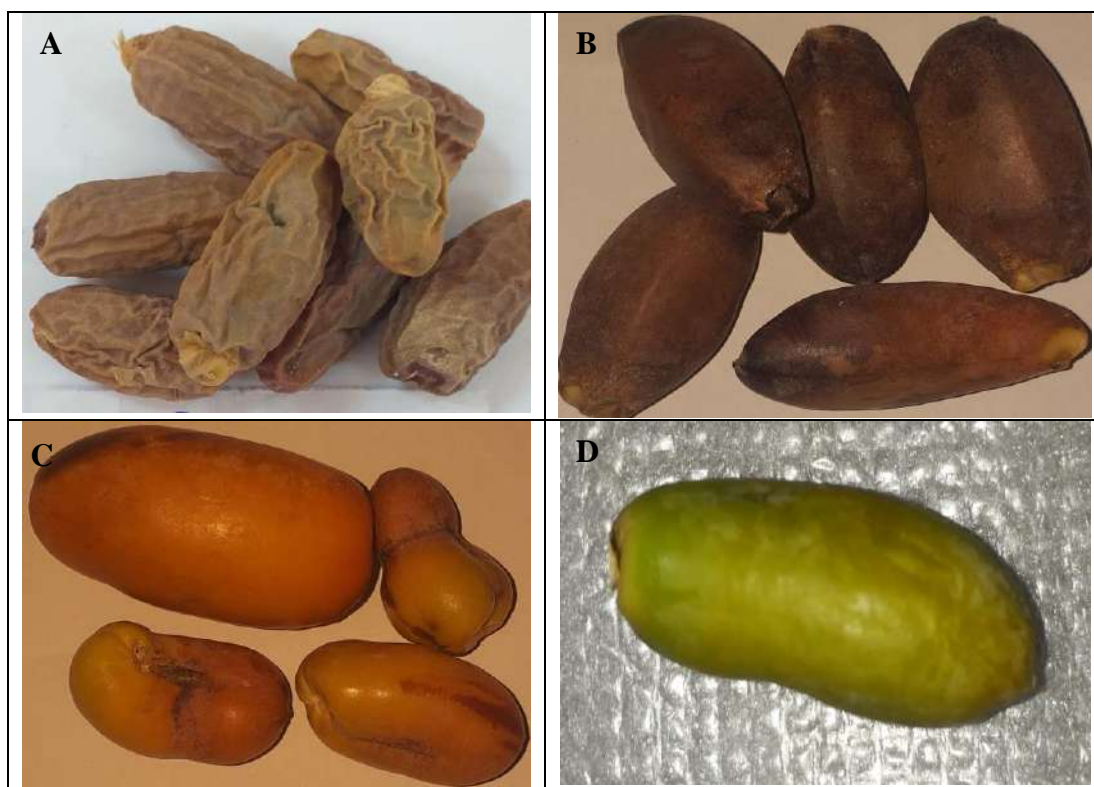


Figure 5.- Ecarts de tri de dattes inclus dans la préparation du vinaigre traditionnel de dattes.
 A : H'Chef, B : Dattes non mûré (Ellilou), C et D : Dattes non mûré (Aguerdom).

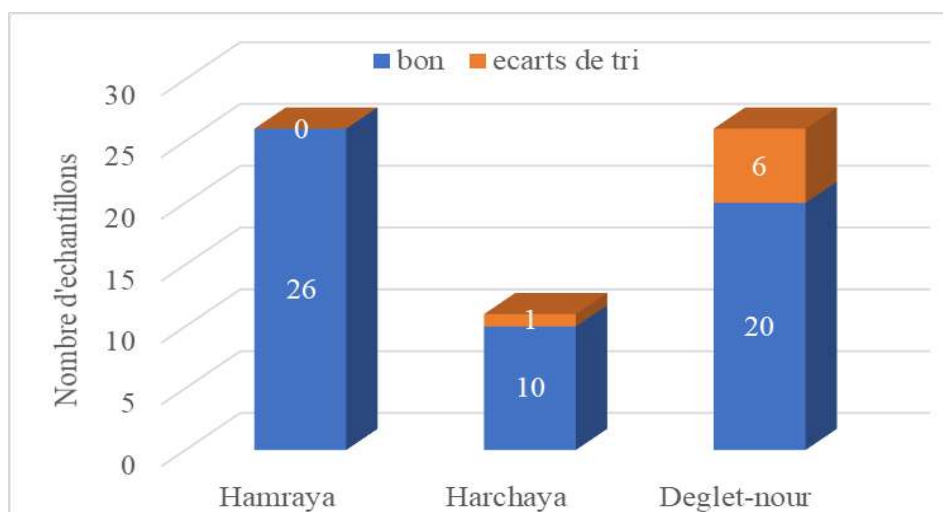


Figure 6.- Répartition des échantillons du vinaigre traditionnel de dattes selon la qualité de dattes

Selon l'avis de certains fabricants, le vinaigre de dattes est consommé après une période de maturation d'un à deux ans de conservation à température ambiante, et peut rester consommable jusqu'aux huit ans selon les familles.

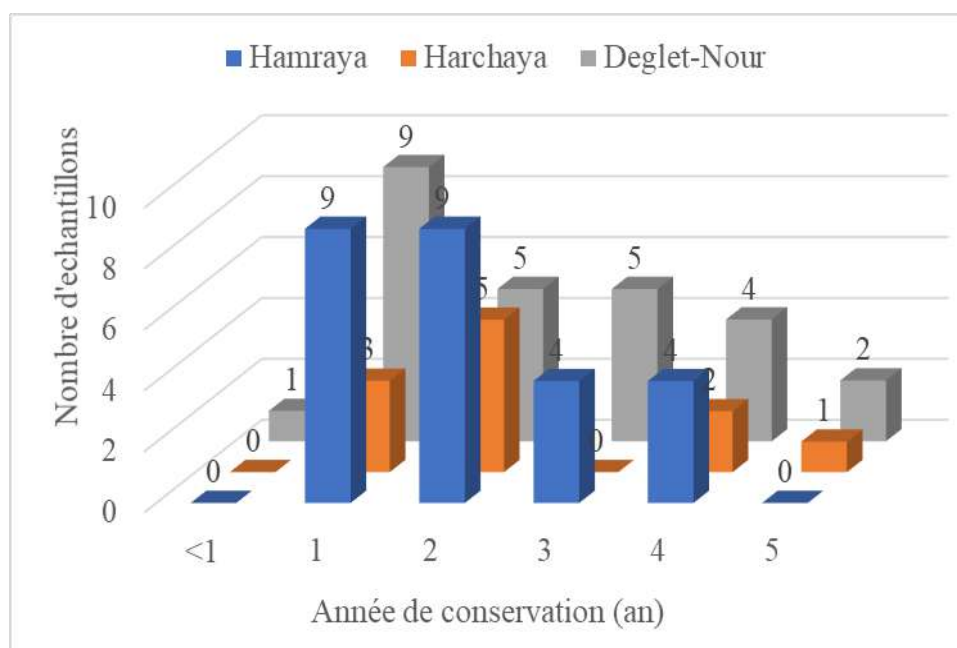


Figure 7.- Répartition des échantillons de vinaigre traditionnel de dattes selon la durée de conservation

Le vinaigre traditionnel de dattes de la cuvette de Ouargla, est consommé ou conservé durant plusieurs années à la température ambiante et à l'ombre sans addition de conservateurs. Cette durée de conservation va de 1 à 5 ans pour la majorité des échantillons de vinaigre de Hamraya et de Deglet-Nour (fig.7).

Il est noté que la méthode de base de préparation du vinaigre traditionnel de dattes, demeure la même pour tous les fabricants (annexe 2). Elle consiste à mettre dans un récipient en plastique 2/3 du volume d'eau auquel est ajouté 1/3 de volume de dattes. Il y est ajouté facultativement quelques additifs pouvant être soit du citron (Hr27 et Hr31), de l'orge (Hr39, Dn53 et Dn61), de 7 graines de blé, 7 graines de l'orge, dokkar (grains de pollen) et 7 graines de harmal (Dn63). La fermentation alcoolique dure 40 jours suivi par 3 jours de fermentation acétique, enfin le mélange subit une filtration et tamisage avant la conservation.

Après ouverture et filtration, certains vinaigriers exposent leur produit à l'air libre pendant quelques jours pour accélérer l'acétification ou au soleil pour obtenir du vinaigre brun (brunissement non enzymatique) (Sebihi, 2014).

Les additifs apportent des co-facteurs aux enzymes (Fer) et riches en enzymes hydrolytiques (ex: blé, orge...etc.) qui produisent des sucres fermentescibles (Voet et Voet, 2016).

II.1.2.- Caractéristiques organoleptiques du vinaigre traditionnel de dattes

Les caractéristiques organoleptiques des échantillons de vinaigre traditionnel de dattes se caractérisent par leur couleur souvent brun foncé pour les vinaigres de Hamraya, brun caramel et

brun clair pour celles de Harchaya et Deglet-Nour (fig. 8). Une odeur de dattes, un gout acide et une viscosité sont notés pour les échantillons (tab. 1).

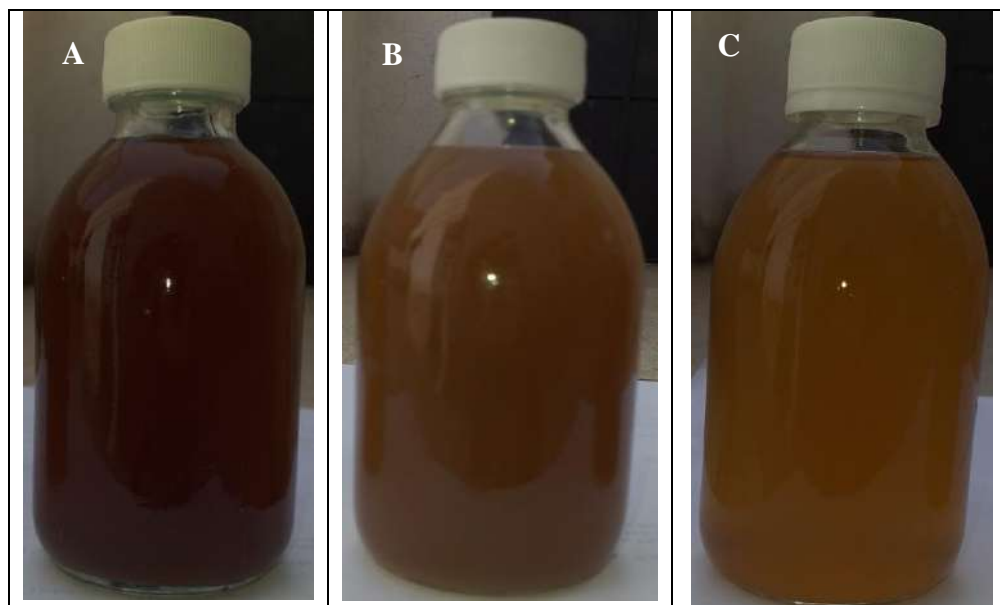


Figure 8.- Vinaigres traditionnels de dattes. A : vinaigre de cultivar Hamraya, B : vinaigre de cultivar Harchaya et C : vinaigre de cultivar Deglet-Nour.

La couleur du vinaigre de datte provient de la composition chimique de la datte. Les sucres réducteurs favorisent le phénomène de brunissement non enzymatique qui est relativement responsable de la coloration brune des dattes (Sayeh et Ould El Hadj, 2010).

Tableau 1.- Caractères organoleptiques des échantillons de vinaigre traditionnel de dattes à l'état brut (Ha: Hamraya, Hr: Harchaya, Dn: Deglet-Nour)

Echantillon	Cultivar	Couleur	Odeur	Saveur	Viscosité	Dilution
Ha1, Ha2, Ha6, Ha7, Ha12, Ha14, Ha15, Ha17, Ha23, Ha24, Ha28, Ha30, Ha33, Ha34, Ha35, Ha36, Ha38, Ha39, Ha40, Ha44, Ha46, Ha54, Ha57, Ha60, Ha62	Hamraya	brun foncé	dattes	acide	faible	non
Hr13, Hr18, Hr25, Hr27, Hr29, Hr31, Hr32, Hr49, Hr51, Hr58, Hr61	Harchaya	brun caramel	dattes	acide	faible	non
Dn3, Dn4, Dn5, Dn8, Dn9, Dn10, Dn11, Dn16, Dn19, Dn20, Dn21, Dn22, Dn26, Dn37, Dn41, Dn42, Dn43, Dn45, Dn47, Dn48, Dn50, Dn52, Dn53, Dn55, Dn56, Dn59, Dn63	Deglet-Nour	brun claire	dattes	acide	faible	non

L'arôme est une fraction complexe, contenant de nombreux composés avec un large éventail de volatilités, polarités et concentrations allant de plusieurs mg/l à ng/l (Mas *et al.*,

2014). Mas *et al.* (2014) ont identifié plus de 100 composés chimiques différents dans l'arôme du vinaigre de vin, y compris les composés de carbonyle, les acétals, les lactones, les acides, les alcools, les phénols, et les esters volatils, qui sont tous impliqués à des degrés différents dans la saveur finale.

Le goût du vinaigre est particulièrement influencé par la matière éthanolique brute à partir de laquelle il était fabriqué. Toutefois, l'acide acétique reste de loin l'arôme prédominant du vinaigre, d'autres composés aromatiques volatils étaient également présents. Ils contribuent au profil aromatique global du vinaigre (Bhat *et al.*, 2014).

II.2.- Caractéristiques physico-chimiques

Les résultats des analyses physico-chimiques de 63 échantillons de vinaigre traditionnel de dattes sont consignés dans le tableau 2.

Tableau 2.- Analyses physico-chimiques des vinaigres traditionnels de dattes (E: Echantillon, Ha: Hamraya, Hr: Harchaya, Dn: Deglet-Nour)

E	Acidité totale (g/l)	Densité	CE mS/cm	pH	E	Acidité totale (g/l)	Densité	CE mS/cm	pH
Ha1	6.90±0.15	1.01	7.93±0.01	3.28±0.01	Ha33	14.6±0.3	1.01	7.92±0.01	3.10±0.01
Ha2	9.24±0.15	1.025	8.24±0.01	3.26±0.01	Ha34	13.6±0.15	1.01	4.71±0.01	3.13±0.01
Dn3	8.22±0.15	1.02	6.66±0.01	3.44±0.01	Ha35	13.4±0.15	1.01	8.43±0.01	3.40±0.01
Dn4	18±0.15	1.01	7.99±0.01	3.72±0.01	Ha36	13.6±0.15	1.02	7.34±0.01	3.35±0.01
Dn5	14.4±0.15	1.02	8.88±0.01	3.81±0.01	Dn37	16.1±0.15	1.02	6.90±0.01	3.29±0.01
Ha6	15.2±0.15	1.01	9.43±0.01	3.77±0.01	Ha38	10.6±0.15	1.01	6.94±0.01	3.35±0.01
Ha7	18.8±0.15	1.01	8.06±0.01	3.53±0.01	Hr39	33.7±0.15	1.01	8.40±0.01	3.27±0.01
Dn8	24.8±0.15	1.02	8.70±0.01	3.5±0.01	Ha40	8.5±0.15	1.01	8.80±0.01	3.21±0.01
Dn9	13.2±0.15	1.01	9.20±0.01	3.6±0.01	Dn41	16.2±0.15	1.02	7.57±0.01	3.48±0.01
Ha10	16.4±0.15	1.01	8.37±0.01	3.4±0.01	Dn42	12±0.30	1.01	6.55±0.01	3.40±0.01
Ha11	14.6±0.15	1.01	8.83±0.01	3.6±0.01	Dn43	12.8±0.15	1.01	7.27±0.01	3.28±0.01
Ha12	17± 0.15	1.01	7.49 ±0.01	3.37±0.01	Hr44	11.8±0.15	1.02	7.21±0.01	3.39±0.01
Hr13	12.4±0.15	1.02	8.18±0.01	3.22±0.01	Dn45	12.2±0.15	1.01	7.65±0.01	3.16±0.01

Ha14	14.2±0.15	1.01	9.34±0.01	3.55±0.01	Ha46	11.9±0.30	1.01	6.85±0.01	3.36±0.01
Ha15	17.8±0.15	1.01	7.06±0.01	3.34±0.01	Dn47	35.4±0.30	1.01	7.74±0.01	3.28±0.01
Dn16	23.8±0.15	1.02	8.00±0.01	3.28±0.01	Dn48	10.9±0.15	1.01	5.78±0.01	3.16±0.01
Ha17	12.2±0.15	1.01	9.18±0.01	3.37±0.01	Hr49	7.7±0.10	1.01	4.60±0.01	3.78±0.01
Hr18	15.4±0.15	1.01	7.37±0.01	3.26±0.01	Dn50	11.3± 0.3	1.01	8.86±0.01	3.09±0.01
Dn19	13.6±0.15	1.01	8.07±0.01	3.26±0.01	Hr51	16.7±0.15	1.01	7.76±0.01	3.2±0.01
Dn20	12.1±0.15	1.02	7.36±0.01	3.27±0.01	Dn52	17.4±0.15	1.01	8.91±0.01	3.09±0.01
Dn21	12.5±0.15	1.01	7.85±0.01	3.43±0.01	Dn53	16.7±0.15	1.01	7.62±0.01	3.19±0.01
Dn22	14.6±0.15	1.01	9.10±0.01	3.35±0.01	Ha54	10.3± 0.3	1.01	8.52±0.01	3.2±0.01
Ha23	13.4±0.15	1.01	6.20±0.01	3.33±0.01	Dn55	16.7±0.15	1.01	7.18±0.01	3.23±0.01
Ha24	12.1±0.15	1.01	9.14±0.01	3.26±0.01	Dn56	28.7±0.15	1.01	9.14±0.01	3.1±0.011
Hr25	24.2± 0.3	1.02	8.31±0.01	3.26±0.01	Ha57	8.5±0.15	1.01	7.78±0.01	3.09±0.01
Dn26	78.4 ± 2.1	1.01	9.11±0.01	3.01±0.01	Hr58	16.2±0.15	1.02	8.57±0.01	3.21±0.01
Hr27	21.0±0.15	1.01	7.20±0.01	3.52±0.01	Dn59	12±0.30	1.01	8.57±0.01	3.10±0.01
Ha28	9.3± 0.3	1.01	8.82± 0.01	3.34±0.01	Ha60	12.8±0.15	1.01	8.27±0.01	3.09±0.01
Hr29	15.7±0.15	1.01	6.68±0.01	3.39±0.01	Dn61	11.8±0.15	1.02	8.21±0.01	3.21±0.01
Ha30	16.4±0.15	1.01	8.87±0.01	3.33±0.01	Ha62	12.2±0.15	1.01	8.65±0.01	3.31±0.01
Hr31	15.7±0.15	1.01	6.72±0.01	3.44±0.01	Dn63	11.9±0.30	1.01	7.85±0.01	3.22±0.01
Hr32	19.4±0.15	1.01	5.87±0.01	3.21±0.01					

II.2.1.- Acidité totale

Pour l'acidité totale, il ressort que tous les échantillons de vinaigres présentent des concentrations en acidité totale très différentes, avec une concentration maximale de l'ordre de 78.4±2.10 g/l pour l'échantillon de vinaigre Dn26 du cultivar Deglet-Nour, suivi de l'échantillon Dn47 du même cultivar (35.4±0.30 g/l). L'échantillon Hr39 avec 33.7±0.15 g/l issu du cultivar Harchaya (ajout de l'orge), ainsi que 23.8±0.15 g/l pour le vinaigre issu de H'Chef Deglet-Nour (Dn16). L'acidité la plus faible est enregistrée pour l'échantillon Hr49 issu du cultivar Harchaya avec une valeur de 7.7±0.10 g/l, suivi d'une valeur de 8.8±0.15 g/l pour l'échantillon Ha40 issus

de cultivar Hamraya. La préparation de ces échantillons de vinaigre, est exempte de tout additif (tab. 2). Il est recommandé des acidités totales de 6% pour le vinaigre de vin blanc et de 5% pour les autres vinaigres (J.O.R.A.D.P, 1998).

Le pourcentage faible en acidité totale présent dans les échantillons résulte de l'action combinée des microorganismes dans le moût (Ould El Hadj *et al.*, 2001).

En industrie, la production du vinaigre se déroule en deux temps séparés, la fermentation dans le cas de la vinaigrerie traditionnelle, un processus combiné en une fois. En même temps qu'il y a production d'alcool ceci entraîne la production d'acide acétique par oxydation de l'éthanol (Ould El Hadj *et al.*, 2001).

L'acidité totale résulte de l'activité des bactéries acétiques qui produisent de l'acide acétique, de l'acide gluconique et de l'acide céto gluconique, de l'activité métabolique des levures *Saccharomyces cerevisiae* qui produisent de l'acide succinique et l'acide lactique en petite quantité issus de l'activité des bactéries lactiques (Solieri et Giudici, 2009).

II.2.2.- pH

Les valeurs du pH des échantillons du vinaigre traditionnel de dattes, sont comprises entre 3.01 ± 0.01 et 3.78 ± 0.01 respectivement pour les échantillons de vinaigre Dn26 issu de cultivar Deglet-Nour, vinaigre et l'échantillon Hr49 issus du cultivar Harchaya. Hr49 issu du cultivar Harchaya présente la valeur du pH la plus élevée (3.78 ± 0.01) avec une valeur d'acidité la plus faible (7.7 ± 0.10 g/l) contrairement à celle de l'échantillon Ha15 qui apparait une valeur en pH la plus basse (3.01 ± 0.01) et une acidité totale la plus élevée (78.4 ± 2.10 g/l) (tab. 2).

Bouaziz et Ould El Hadj (2010) signalent 3.65 ± 0.005 et 3.40 ± 0.005 pour les vinaigres traditionnels de dattes de types Tinissine et Tachrwit. Pour le vinaigre blanc industriel les pH se situent entre 2.10 et 2.45 (Coldis, 2014) et 2.75 ± 0.75 pour le vinaigre balsamique (Reitzel, 2011). Toutefois, un pH bas engendre vraisemblablement un milieu extrêmement acide; cela pourrait être inhibiteur et restrictif pour les micro-organismes pathogènes et même retardé l'acétification par les bactéries acétiques (Albornoz et Estéban, 2012).

Le pH est un facteur important qui influence la plupart des réactions biochimiques catalysées par des enzymes, ce qui permet la biodisponibilité des nutriments et la solubilité des éléments minéraux pour les micro-organismes (Salama *et al.*, 2016).

II.2.3. Conductivité électrique (CE)

La valeur la plus élevée de la conductivité électrique, est de l'ordre de 9.18 ± 0.01 mS/cm observée pour le vinaigre de Hamraya Ha17, suivi de 9.14 ± 0.01 mS/cm relative à l'échantillon Dn24 issus du même cultivar et celle de l'échantillon Ha26 issus du cultivar Deglet-Nour avec une valeur de 9.11 ± 0.01 mS/cm. Les plus faibles valeurs sont celles de l'échantillon Hr49 issus

du cultivar Harchaya et Ha34 issus du cultivar Hamraya avec $4.60 \pm 0.01 \text{ mS/cm}$ et $4.71 \pm 0.01 \text{ mS/cm}$ respectivement (tab. 2).

Mbungu *et al.* (2016) rapportent que pour un vinaigre traditionnel préparé à bases de déchets de mangues, la conductivité est de $3.83 \pm 0.11 \text{ mS/cm}$ ($3.09 \pm 0.09 \text{ mS/cm}$ pour le vinaigre commercial). Pour Rodier (2005), les valeurs élevées reflètent la présence des ions en abondance dans les échantillons, issus de la dissolution des sels, des acides et des minéraux. La richesse des dattes en éléments minéraux est de l'ordre de 649-754 mg de potassium/100g de dattes (Djebri, 1994 et Siboukeur, 1997), 268-290 mg de Chlore/100g de dattes pour Djebri (1994) et 256 mg/100g de dattes pour Siboukeur (1997) et le calcium de 58.3-58.8 mg/100g de dattes pour Djebri (1994), 80.50 mg/100g de dattes pour Siboukeur (1997) et 93.63 mg/100g de dattes pour Alkaabi *et al.* (2011). Pour Mimouni (2015), les teneurs sont de $48.27 \pm 122 \text{ mg/100}$ de potassium, de $222.27 \pm 44.24 \text{ mg/100g}$ de chlore et de $13.14 \pm 5.5 \text{ mg/100g}$ de calcium dans le cultivar Deglet-Nour.

L'absence d'un nettoyage efficace des dattes, et sans oublier l'eau du robinet se caractérise par une charge non négligeable en sels dissous (1075 mg/l) et une conductivité allant jusqu'à 3.5 mS/cm pour les eaux de la cuvette de Ouargla (Hamdi, 2011). L'ajout de sel de table selon le besoin pourrait être à l'origine de la conductivité électrique élevée (Ould El Hadj *et al.*, 2001). La conductivité reflète le degré de salinité et la biodisponibilité d'éléments chimiques à des grandes concentrations pourrait avoir un effet toxique sur la croissance microbienne et de même un changement d'un paramètre clé, le pH (Salama *et al.*, 2016).

II.2.4. Densité

Sur le tableau 2, il apparaît des densités presque constantes pour tous les échantillons de vinaigre (1.01 et 1.02). Cette stabilité est due probablement à la filtration des échantillons de vinaigre traditionnel. La filtration élimine les substances solides et colloïdales en suspension. Les valeurs notées pour le vinaigre de mangues sont de l'ordre de 1.015 et 1.017 (Mbungu *et al.*, 2016). Pour le vinaigre commercial de cidre, la densité est d'environ 1.01 (Ould El Hadj *et al.*, 2001)

Tableau 3.- Analyse de la variance appliquée aux paramètres physicochimiques des vinaigres traditionnels de dattes (Ddl: degré de liberté; Pr: probabilité)

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	3	8278.988	2759.663	116.490	<0.0001
Erreur	248	5875.156	23.690		
Total corrigé	251	14154.144			

L'analyse de la variance montre un effet très hautement significatif des paramètres physicochimiques sur la qualité des vinaigres traditionnels de dattes élaborés dans la cuvette de

Ouargla car F de Fisher = 116.490 pour Pr < 0.0001 (tab. 3).

Tableau 4.- Coefficients normalisés (Variable) de l'analyse de la variance appliquée aux paramètres physicochimiques des vinaigres traditionnels de dattes

Source	Valeur	Erreur standard	t	Pr > t	Borne inférieure (95%)	Borne supérieure (95%)
Paramètres-Acidité Totale (g/l)	0.733	0.050	14.638	<0.0001	0.635	0.832
Paramètres-CE mS/cm	0.262	0.050	5.222	<0.0001	0.163	0.360
Paramètres-Densité	-0.134	0.050	-2.666	0.008	-0.232	-0.035
Paramètres-pH	0.000	0.000				

Ce qui concerne l'analyse de la variance appliquée aux paramètres physicochimiques des vinaigres traditionnels de dattes des variables (tab. 4), il parait une très haute signification pour la variation de l'acidité totale et la conductivité électrique (Pr < 0.0001). Par contre la variation n'est pas significative pour la densité et les variables sont homogènes (Pr > 0.005). Pour le pH, le carré moyen résiduel est nul, donc il n'y a pas de variation, comme indique le tableau 4, presque tous les échantillons présentent une homogénéité.

Tableau 5.- Moyennes estimées pour le facteur paramètres physicochimiques des vinaigres traditionnels de dattes

Modalité	Moyenne estimées	Erreur standard	Borne inférieure (95%)	Borne supérieure (95%)
Acidité Totale (g/l)	16.018	0.613	14.811	17.226
CE mS/cm	7.853	0.613	6.646	9.061
Densité	1.012	0.613	-0.195	2.220
pH	3.324	0.613	2.117	4.532

Le tableau des moyennes (tab. 5), laisse apparaitre que la densité a le moindre effet (1.012), par contre l'acidité total présente plus d'effet (16.018) sur la qualité physicochimique des vinaigres.

II.3.- Analyses microbiologiques

Le vinaigre est considéré comme un aliment sain et un milieu défavorable à la prolifération des bactéries pathogènes qui préfèrent un environnement neutre, mais il est favorable à la prolifération des levures, des moisissures, des bactéries lactiques et acétiques (Mbungu *et al.*, 2016). La présente étude s'est focalisée sur une analyse du microbiote bénéfique qui a comme produit final, le vinaigre à partir des dattes.

II.3.1.- Isolements des bactéries acétiques

Les résultats des observations microscopiques de l'état frais des 63 échantillons de vinaigre traditionnel de dattes de différents cultivars à savoir; Hamraya, Harchaya et Deglet-Nour, sont consignés dans le tableau 6. Ils se remarquent la présence des formes bactériennes bacillaires, coccobacilles et cocci viables mobiles. Des moisissures et des levures en forme de bourgeonnement sont aussi présentes.

Selon Albornoz (2012), les micro-organismes impliqués dans l'élaboration des vinaigres sont principalement des levures et des bactéries acétiques. Certains aliments traditionnels fermentés sont fabriqués par une interaction complexe entre différents micro-organismes, tels que le vinaigre, la choucroute, cornichons et olives. Le vinaigre est le produit du processus en deux étapes. Dans un premier temps, le processus est généralement initié par les levures qui décomposent le glucose en alcool éthylique avec la libération de CO₂ par voie anaérobie. En seconde étape, l'éthanol est oxydé en acide acétique et eau en aérobiose par des bactéries acétiques (Erkmen, 2016; Isham *et al.*, 2019). Les moisissures servent à fournir des sucres fermentescibles aux levures à partir des substrats bruts (Yun, 2019). La présence d'autres formes cellulaires telles que des levures ou des moisissures notifie que la fermentation alcoolique n'est pas achevée.

L'isolement des bactéries acétiques sur milieu gélosé de Frateur, milieu à base de glucose, extrait de levure et CaCO₃ (GYC), gélose nutritive modifiée ou milieu naturel, après incubation à 30°C pendant 2 à 5 jours et observations microscopiques laissent apparaître une diversité de la population de bactéries, de levures et de moisissures. Au total, 154 isolats de bactéries acétiques obtenues et sélectionnées dans 56 échantillons de vinaigre traditionnel de dattes de la cuvette de Ouargla. Chaque isolat est désigné par un numéro de code (tab. 6).

Dans des échantillons du vinaigre de dattes du cultivar Deglet-Nour, sont isolés 66 isolats (IDn3, IDn4, IDn5, IDn6, IDn7, IDn8, IDn12, IDn13, IDn27, IDn28, IDn29, IDn30, IDn31, IDn32, IDn37, IDn38, IDn39, IDn40, IDn43, IDn60, IDn61, IDn70, IDn71, IDn72, IDn73, IDn74, IDn75, IDn81, IDn82, IDn85, IDn86, IDn89, IDn90, IDn91, IDn93, IDn94, IDn95, IDn96, IDn97, IDn98, IDn110, IDn111, IDn112, IDn115, IDn116, IDn119, IDn120, IDn121, IDn122, IDn123, IDn126, IDn131, IDn132, IDn134, IDn135, IDn136, IDn139, IDn142, IDn143, IDn145, IDn146, IDn147, IDn148, IDn151 et IDn154). Pour celui du cultivar Hamraya sont notés 61 isolats (IHa1, IHa2, IHa9, IHa10, IHa11, IHa14, IHa15, IHa16, IHa17, IHa18, IHa19, IHa20, IHa23, IHa24, IHa25, IHa26, IHa33, IHa34, IHa51, IHa52, IHa53, IHa54, IHa55, IHa56, IHa57, IHa58, IHa59, IHa62, IHa63, IHa64, IHa67, IHa78, IHa69, IHa76, IHa77, IHa78, IHa79, IHa80, IHa92, IHa99, IHa100, IHa101, IHa102, IHa108, IHa109, IHa113, IHa114, IHa117, IHa118, IHa127, IHa128, IHa129, IHa130, IHa137, IHa140, IHa141, IHa152, IHa153). Les isolats des échantillons du vinaigre du cultivar Harchaya ont été moins nombreux, soit 27 (I Hr21, I Hr22, I Hr35, I Hr36, I Hr41, I Hr42, I Hr44, I Hr45, I Hr46, I Hr47, I Hr48, I Hr49, I Hr50, I Hr65, I Hr66, I Hr83, I Hr84, I Hr87, I Hr88, I Hr103, I Hr104, I Hr105, I Hr106, I Hr107, I Hr124, I Hr125, I Hr133, I Hr138, I Hr144, I Hr149 et I Hr150).

Tableau 6.- Isolements et purification des bactéries acétiques (E: Echantillon, Ha: Hamraya, Hr: Harchaya, Dn: Deglet-Nour)

Type du vinaigre	Echantillons (isolats)	Echantillons (sans isolats)	Nombre d'isolats
Vinaigre du cultivar Hamraya	Ha1, Ha2, Ha6, Ha7, Ha10, Ha11, Ha12, Ha14, Ha15, Ha17, Ha23, Ha24, Ha28, Ha33, Ha34, Ha35, Ha36, Ha38, Ha40, Ha44, Ha46, Ha54, Ha57, Ha60, Ha62	Ha30	61
Vinaigre du cultivar Harchaya	Hr13, Hr25, Hr27, Hr29, Hr31, Hr32, Hr39, Hr49, Hr51, Hr58	Hr18	27
Vinaigre du cultivar Deglet-Nour	Dn3, Dn4, Dn5, Dn8, Dn9, Dn19, Dn21, Dn26, Dn26, Dn30, Dn31, Dn37, Dn41, Dn42, Dn43, Dn47, Dn49, Dn50, Dn52, Dn53, Dn55, Dn56, Dn59, Dn61, Dn63	Dn16, Dn20, Dn22, Dn45, Dn48	66
Totale	56	07	154
	63		

Les échantillons de vinaigre de dattes Dn16 issus du H'Chef Deglet-Nour, Dn20, Dn22, Dn45, Dn48 du cultivar Deglet-Nour, Hr18 issu du cultivar Harchaya, Ha30 du cultivar Hamraya, ne produisent pas des colonies caractéristiques sur les milieux d'isolement gélosé (tab. 6).

L'absence des bactéries, peut être due à un déséquilibre dans les conditions de croissance, sachant que les bactéries acétiques sont sensibles aux paramètres de croissance surtout à l'apport faible en oxygène, engendrant un état stressant pour les bactéries ce qui les rend difficile leur développement sur milieu gélosé. Le phénomène a été décrit par Millet et Lonvaud-Funel (2000) comme un état viable mais non cultivable (VNC) des micro-organismes du vin pendant le stockage. Il a été démontré par Crotti *et al.* (2010) qu'ils étaient capables d'entrer dans l'état viable non cultivable. La récupération de l'état viable et cultivable a été très rapide dès que l'O₂ était disponible (Millet et Lonvaud-Funel, 2000).

Longin (2016), a signalé que l'isolement et la préservation des bactéries acétiques n'est pas facile. Tous les milieux de croissance ne permettent pas la croissance des bactéries acétiques et ils sont sélectifs d'une souche à l'autre. Les bactéries acétiques qui sont capables de croître sur un milieu solide ont potentiellement une grande capacité métabolique. La difficulté n'est pas seulement dans leur culture, isolement et identification, mais les cellules parfois sont présentées en état viable non cultivable (VNC) (Roos et De Vuyst, 2018). Certaines souches de bactéries acétiques peuvent être en état viable non cultivable pour résister aux conditions environnementales difficiles. Un passage rapide en état viable non cultivable est indiqué par Melo (2016) et Mathew *et al.* (2019), chez les bactéries acétiques, principalement dans des conditions de privation d'oxygène, et de baisse considérable du pH en raison de la production continue de l'acide acétique qui est un métabolite énergétique principal.

Le maintien des bactéries acétiques avec succès sur gélose GYP, est réalisé grâce à l'addition du CaCO_3 qui neutralisent l'acide acétique produit et soulagé le stress physiologique qui conduit à l'état viable non cultivable des cellules (Mathew *et al.*, 2019). Le CaCO_3 présente des effets négatifs sur la production de métabolites secondaires, mais des effets positifs sur la formation de biomasse cellulaire et de métabolites primaires (Yi *et al.*, 2015).

Les bactéries qui peuvent être cultivées en laboratoire ne représentent qu'une petite fraction de la diversité totale qui existe dans la nature. Les progrès récents dans la culture de ces espèces comprennent la co-culture avec d'autres bactéries, la recréation de l'environnement en laboratoire, et la combinaison de ces approches avec la technologie de microculture pour augmenter le débit et l'accès aux espèces rares. Ces études démêlent les mécanismes moléculaires de l'incultivabilité et identifient les facteurs de croissance qui favorisent la croissance d'organismes auparavant incultes (Stewart, 2012). La technique Direct Epifluorescent Filter Technique (DEFT) permet de compter les cellules par leur pouvoir d'hydrolyser des esters fluorescents (Millet et Lonvaud-Funel, 2000).

II.3.2.- Caractères cultureux et morphologiques des souches isolées

Les souches sont caractérisées morphologiquement selon l'aspect de la colonie et la forme, mobilité et le mode de groupement des bactéries. Les résultats des tests macroscopiques et microscopiques des 154 isolats figurent dans le tableau 7.

Tableau 7.- Caractères cultureux et morphologiques des colonies isolées sur milieux gélosés.

Observations macroscopiques				Observations microscopiques			
Aspect	Forme	Couleur	Taille (mm)	Morphologie des cellules	Mode de groupement	Gram	Mobilité
Rugueux-Plate lisse bombée	Ronde, pléomorphe, étoile	Transparente, blanche, beige, jaune, orange et marron	0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4 et 5	Cocci, coccobacille, bacille courte, bacille filamenteux	Isolé, diplo, tétrade, chaînette, amas	Négatif et variable	Mobile et immobile

L'observation à l'état frais des échantillons du vinaigre de dattes sous microscope optique indique la présence des formes bactériennes bacillaire, coccobacille et cocci viables pourvues d'une mobilité, suggère d'être des bactéries acétiques.

Les colonies suspectes d'être des bactéries acétiques, isolées et purifiées à partir des échantillons du vinaigre de dattes présentent différentes couleurs allant du blanc, transparente, beige, crème, marron, orange à jaune (tab. 7). Pour Diba *et al.* (2015), les souches isolées à partir des fruits décomposés destinés à la production de vinaigre sont des colonies de couleur blanchâtre, brun et jaune pâle sur milieu glucosé à base d'extrait de levure et carbonate de calcium (GYC).

Les 154 isolats apparaissent sous différentes formes, à savoir ronde, pléomorphe et étoile, contour régulier et irrégulier, aspect rugueux, lisse, plate et bombée, avec des tailles variantes entre 0.5 et 5 mm (tab. 7). Selon Zahoor *et al.* (2006), dans le cas des échantillons de jus de canne à sucre, de décharge d'eau et de pomme pourrie, la plupart des colonies étaient petites, blanches, sphériques, ponctuéées, surélevées et blanc cassé. Aydin et Aksoy (2009) isolent des bactéries acétiques productrices de cellulose à partir de déchets de fermentation de vinaigre de couleur crème et beige. Pour Zahoor *et al.* (2006), le diamètre des colonies à la surface des boites de milieu standard (GYC) ne dépasse pas 3 mm, pour Albornoz (2012), la taille varie entre 0.4-1 mm. Les bactéries acétiques issues de la mangue jeté étant lisses et d'autres visqueuses, irrégulières et étalées (Ndoye *et al.*, 2007).

Les formes bacille ou coccobacille, sont les plus dominantes par rapport aux cocci. Les cellules présentent un mode de regroupement en amas, chaînette, diplobacille, diplococcobacille, diplococcus, tétrade et seul (isolé). Elles présentent une mobilité modéré, qui est due à la présence des flagelles péritriches ou polaires (Mamlouk et Gullo, 2013). L'examen de Gram montre généralement des bactéries Gram négatif mais certaines peuvent être de Gram variable (tab. 5). Beheshti-Maal et Shafiee (2010), ont identifié des bactéries du genre *Acetobacter* de forme cocci ou coccobacille, regroupées en diplo ou bien isolées. Ils ont trouvé quelques streptobacilles Gram négatif. Selon Kadere *et al.* (2008) et Arifuzzaman *et al.* (2014), les souches d'*Acetobacter* et *Gluconobacter* de vin de noix de coco et de bagasse de canne à sucre, jus de canne à sucre, eau de traitement du jus de canne à sucre, sol, pommes pourries, raisins rouges pourris et raisins blancs pourris respectivement sont des Gram négatifs. Ilse et Paul (2008), signalent que les bactéries acétiques sont des bactéries à Gram négatif, des coccoïdes ou des bâtonnets. Pour Ghariani *et al.* (2017), les bactéries acétiques retirées de la sève du palmier tunisien (lagmi), sur milieu gélosé GYPG (Glucose, extrait de levure, peptone), sont blanches, crèmes, pales, de forme circulaire bombée ou convexe, étoile, rugueuse, lisse, plate, de taille petite, moyenne et grande. Le Gram est négatif à variable, bacille simple, paire en chaînette, cocci, coccobacilles. Les bactéries acétiques de vinaigre de fruits excédentaires sont mobiles en raison de la présence des flagelles péritriches ou polaire (Albornoz, 2012). Mais, Diba *et al.* (2015), et Aydin et Aksoy (2009) obtiennent des bactéries acétiques mobiles et non mobiles isolées à partir des fruits décomposés destinés à la production de vinaigre et de déchets de vinaigre fermenté respectivement.

II.3.3.- Caractérisation phénotypique (pré-identification des bactéries acétiques)

Le tableau 8 résume les caractères physiologiques et biochimiques des 154 souches isolées à partir du vinaigre traditionnel de dattes.

Tableau 8.- Caractères physiologiques et biochimiques des isolats (-: Test négatif, +: test positif, ±: test variable, nd: non identifiable)

Isolats	Tests									Espèces	Sous espèces	Total
	Oxydase	Pouvoir suroxydant	Catalase	Culture sur milieu De Hoyer (NH ₄ ⁺)	Pouvoir Cétogène Glycérol	Formation d'acide gluconique à partir du Glucose	Formation d'acide cetogluconique	Pigment	Cellulose			
IDn8, IHa11, IHR21, IHa23, IDn28, IHR35, IHR44, IHR47, IHa62, IHa63, IDn72, IDn74, IHa76, IHa79, IDn81, IDn82, IDn86, IDn90, IDn96, IDn97, IHR103, IDn106, IDn107, IHa108, IDn110, IDn111, IDn116, IHa117, IHa118, IDn119, IDn120, IDn123, IHR124, IHR125, IDn126, IHa127, IHa129, IHR133, IDn134, IDn135, IHR138, IDn139, IDn142, IDn143, IHR144, IDn146, IDn147, IDn148, IHR149, IHR150, IDn151, IHa152, IHa153, IDn154	-	+	+	+	+	+	-	-	-	A.aceiti	<i>aceiti</i>	54
IHa53, IHa54, IHa55, IHa56, IHa57, IDn115, IDn121, IDn122, IDn131, IDn132, IHa140	-	+	+	-	+	+	-	+	-		<i>liquifaciens</i>	11
IHa26, IHa34, IHR48, IHa80, IDn93, IDn94, IHa99, IHa100, IHa101, IHa102, IHR104, IHa113, IHa114	-	+	+	-	+	+	-	-	-		<i>orleanensis</i>	13
IDn5, IDn6, IHa9	-	+	+	-	+	+	+	-	+		<i>xylinum</i>	3
IHa25, IDn37, IDn38, IHR49, IHa51, IHa64, IDn71, IHa77, IHR83	-	+	+	-	-	+	-	-	-	A.pasteurianus	<i>pasteurianum</i>	9
IDn7, IHa10, IHa52, IHR87, IDn98	-	+	+	-	-	-	-	-	-		<i>ascendens</i>	5
IDn85, IHR88, IDn89, IDn91, IHa92, IHa137	-	+	+	+	-	+	+	-	-		<i>lovanensis</i>	6
IHa105, IHa128	-	-	+	-	+	+	-	-	-	G.oxydans	<i>industrius</i>	2
IHa1, IHa2, IDn3, IDn4, IDn12, IDn13, IHa14, IHa15, IHa16, IHa17, IHa18, IHa19, IHa20, IHR22, IHa24, IDn27, IDn29, IDn30, IDn31, IDn32, IHa33, IHR36, IDn39, IDn40, IHR41, IHR42, IHa43, IHR45, IHR46, IHR50, IHa58, IHa59, IDn60, IDn61, IHR65, IHR66, IHa67, IHa68, IHa69, IDn70, IDn73, IDn75, IHa78, IHR84, IDn95, IHa109, IDn112, IHa130, IDn136, IHa141, IDn145	-	±	±	±	±	±	-	-	-	nd	nd	51

II.3.3.1.- Test de l'oxydase

La mise en évidence de l'enzyme respiratoire oxydase ou cytochrome oxydase pour les 154 isolats issus de 63 échantillons du vinaigre traditionnel de dattes des cultivars (Hamraya, Harchaya, Deglet-Nour), est négative car ils n'y a pas oxydation de N-diméthyle-paraphénylène diamine (tab. 8). Les genres des bactéries acétiques ne possèdent pas de cytochrome oxydase. Au niveau de la chaîne respiratoire des bactéries oxydase +, il y a le cytochrome c et a. par contre les bactéries oxydase sont pourvues de cytochrome O (Sengun et Karabiyikli, 2011; Albornoz et Esteban, 2012; Matsushita *et al.*, 2016).

II.3.3.2.- Pouvoir suroxydant

Sur 154 souches testées sur milieu de Carr, 123 ont montré un pouvoir suroxydant. Les souches à pouvoir suroxydant possèdent les enzymes du cycle des acides tricarboxylique peuvent être du genre *Acetobacter* (Larpen, 1997).

Sur la base de la méthode décrite par Carr (1968), les souches d'*Acetobacter* sont capables de suroxyder l'éthanol en acide acétique et enfin en CO₂ et H₂O par le cycle d'acide tricarboxylique dans des conditions neutres et acides (pH 7.0 et 4.5). Attendu qu'en raison d'un cycle non fonctionnel d'acide tricarboxylique chez le genre *Gluconobacter*, il ne peut pas oxyder la plupart des acides organiques tels que l'acétique, le citrique, le lactique, le malique, le pyruvique et le succinique.

Des études menées sur La pré-identification des *Acetobacter* par Beheshti-Maal (2014), Ghariani *et al.* (2016), Aydin et Aksoy (2009) et Kadere *et al.* (2008) à partir de plusieurs substrats (palmier dattier iranien, sève du palmier tunisien [Lagmi], déchets de fermentation du vinaigre et boisson de noix de coco [Mnazi]), ont démontré leur pouvoir suroxydant.

II.3.3.3.- Test de la catalase

Toutes les souches isolées des échantillons du vinaigre traditionnel de différents cultivars (Degla-Nour, Hamraya et Harchaya) possèdent une catalase. Pour Beheshti-Maal (2014), Konate *et al.* (2014) et Yamada (2016), les *Acetobacters* possèdent une catalase, mais dépourvues chez *Acetobacter peroxydans* (Guiraud et Galzy, 1980; Matsushita *et al.*, 2016) et *Acetobacter pasteurianus* subsp. *paradoxus* (Guiraud et Galzy, 1980). Pour Arifuzzaman *et al.* (2014), *Acetobacter aceti*, *Acetobacter pasteurianus*, *Acetobacter orleansis*, *Acetobacter cibinongensis* et *Gluconobacter* spp, isolés de bagasse de canne à sucre, jus de canne à sucre, eau de traitement du jus de canne à sucre, sol, pommes pourries, raisins rouges pourris et raisins blancs pourris, présentent l'enzyme catalase. Les bactéries acétiques des genres *Acetobacter* et *Gluconobacter* indigènes provenant de pommes, figes, raisins, abricots, dattes, nectarines, prune, pêche et poire, isolé, caractérisé et optimisé par Beheshti-Maal et Shafiee (2010), sont ainsi pourvues de catalase.

II.3.3.4.- Utilisation de NH_4^+ comme source d'azote

Les cultures des 154 isolats en milieu Hoyer pendant 14 jours à 30°C, révèlent un développement d'une turbidité résultante de l'assimilation de l'ammonium comme seule source d'azote et de 3% d'éthanol chez 85 isolats.

Selon les caractéristiques physiologiques des *Acetobacter* et *Gluconobacter* uniquement certaines espèces du genre *Acetobacter* peuvent se développer en présence d'ammonium comme seule source d'azote et de 3% d'éthanol, se sont *Acetobacter aceti* subsp. *aceti*, *Acetobacter pasteurianus* subsp. *lovanensis*, *Acetobacter pasteurianus* subsp. *estunensis* et *Acetobacter peroxydans* (Guiraud et Galzy, 1980). Les souches aptes à assimiler le NH_4^+ comme seule source d'azote appartiennent donc au genre *Acetobacter*. Les bactéries acétiques isolées par Kadere *et al.* (2008), issues de boisson de noix de coco peuvent se développer en présence d'ammonium comme seule source d'azote.

II.3.3.5.- Pouvoir cétoène

Il est à noter que 107 souches ont prouvées l'aptitude de transformer le glycérol en dihydroxyacétone (DHA) mis en évidence par l'apparition d'un halo d'oxyde de cuivre rouge autour des colonies, parmi les 154 isolats testés sur gélosé au glycérol. Stasiak et Blazejak (2009) rapportent que les souches exercent un pouvoir cétoène, disposent d'une enzyme membranaire qui s'appelle la glycérol-déshydrogénase (GLDH) capable d'oxyder le glycérol en dihydroxyacétone.

Les résultats de Son *et al.* (2002), de la souche *Acetobacter xylinum* KJ-1 issue de fruits corrompus et de vinaigre traditionnel fermenté montrent que la cétoénèse du glycérol était positive. Les souches qui sont dépourvues de cette enzyme ne peuvent être que des espèces d'*Acetobacter pasteurianus* et *Acetobacter peroxydans*, et donc ils possèdent un pouvoir cétoène négatif (Longin, 2016).

II.3.3.6.- Production de l'acide gluconique

Au total, 117 isolats à partir des 154 souches testées pour la production d'acide gluconique sur gélosé glucosé carbonaté, présentent une précipitation remarquable des carbonates de calcium avec un éclaircissement autour des colonies ce qui témoigne de leur capacité à produire l'acide gluconique à partir du glucose. L'enzyme responsable de la production des gluconates à partir du glucose est le glucose déshydrogénase (Prust *et al.*, 2005).

La plupart des sous espèces des genres *Acetobacter* et *Gluconobacter* produisent de l'acide gluconique à partir du glucose (Tharinee *et al.*, 2015; Guiraud et Galzy, 1980), sauf *Acetobacter pasteurianus* subsp. *ascendens* et *Acetobacter pasteurianus* subsp. *paradoxus* (Guiraud et Galzy, 1980).

II.3.3.7.- Production de l'acide céto gluconique

Les 26 souches expérimentées sur le bouillon de HAYNES pour le test de production de l'acide céto gluconique révélé par le réactif de Bénédict, sont inaptes à produire l'acide céto gluconique à partir du glucose.

Pour Dutta et Gachhui (2007) et Ndoye *et al.* (2007), certaines souches de bactéries acétiques du genre *Acetobacter* et *Gluconobacter*, produisent des acides céto gluconique de nature 2- ketogluconique, 5-ketogluconique et 2,5-ketogluconique.

II.3.3.8.- Formation de pigment brun hydrosoluble

Sur les 154 isolats testés pour la formation de pigments bruns ou roses, 17 isolats uniquement issues du vinaigre traditionnel de dattes ont révélé cette pigmentation sur milieu gélosé, glucosé et carbonaté. Ces souches ont des critères de pouvoir suroxydant des acétates en CO₂ et H₂O, de catalase positive, de pouvoir céto gène et de formation de pigment brun sur le milieu glucosé carbonaté, affirment La pré-identification d'une souche d'*Acetobacter aceti* subsp. *liquifasciens* (Guiraud et Galzy, 1980).

En 2012, Romero-Cortes *et al.*, ont isolés des bactéries acétiques à partir de grain de cacao fermentés, et Kadere *et al.* (2008), ont isolé et identifié des bactéries acétiques de genres *Acetobacter* et *Gluconobacter* à partir de noix de coco (Mnazi) démunies de pigment brun hydrosoluble.

II.3.3.9.- Production de cellulose

Les 154 souches qui ont été soumises au test de production de la cellulose ont pu développer une pellicule blanchâtre à la surface des tubes de bouillon pour bactéries acétiques, mais après révélation par du réactif iodé (Iugol) et acide sulfurique à 60% l'inaptitude de la majorité des isolats à produire de la cellulose, exceptées 3 souches.

Pour Aydın et Aksoy (2009), les pellicules produites à la surface du milieu par les bactéries acétiques ne sont pas essentiellement de la cellulose et nécessitent un traitement supplémentaire pour la confirmation, c'est de mettre en ébullition le bouillon centrifugé avec NaOH 0.5 N et observé la résistance de la cellulose dans ces conditions. Lavasani *et al.* (2017), a traité les pellicules avec une solution de NaOH 1% à 90°C pendant 15 min.

La production de la cellulose est appropriée à deux souches *Acetobacter pasteurianus* subsp. *estunensis* et *Acetobacter aceti* subsp. *xylinum*. Cette dernière est reclassée actuellement dans un nouveau genre qui est *Komagataeibacter* et l'espèce dénommée par Yamada (2008) *Komagataeibacter xylinum* (Matsushita *et al.*, 2016).

Les travaux de Shouji *et al.* (2014), réalisés sur le vinaigre traditionnel de dattes fait découler des bactéries acétiques productrices de cellulose.

La formation de la pellicule cellulosique se fait à la surface du bouillon dans une culture statique (Son *et al.*, 2002). Lorsque les bactéries acétiques se développent dans un récipient sans agitation, elles forment en surface une pellicule de cellulose dans laquelle elles se développent. C'est un moyen de rester en surface du liquide là où l'oxygène est facilement disponible (Madigan *et al.*, 2007; Yun *et al.*, 2019). La production de polysaccharides par les bactéries acétiques a eu un effet négatif sur la filtrabilité du produit (Vinicius De Melo Pereira *et al.*, 2019). La formation de cellulose empêche la bonne production d'acide acétique et affecte la qualité sensorielle du vinaigre (Gullo *et al.*, 2019).

Le rendement de la cellulose dépend non seulement du micro-organisme, mais aussi de la méthode de production. Traditionnellement, la cellulose bactérienne est produite soit statiquement, soit par agitation. Bien que l'agitation augmente le taux de diffusion de l'oxygène, elle provoque la formation de mutants sans cellulose, abaissant ainsi le rendement, la plupart du temps (Aydin et Aksoy, 2009). Une membrane bien compacte est obtenue en culture statique, où des sphères de différentes tailles sont produites dans une culture à système d'agitation. Sur milieu gélose de glucose et extrait de levure (GY), une lisse couche de biocellulose est observée en surface des boîtes de Pétri (Gullo *et al.*, 2019).

Par ailleurs, une plus grande productivité de cellulose est observée en utilisant le mannitol comme substrat de carbone suivi par le glucose et le saccharose. Diverses sources d'azote (peptone, sulfate d'ammonium ou hydrolysate de caséine) ont été jugées appropriées pour la synthèse de cellulose associée au saccharose, au glucose ou au mannitol (Longin, 2016). Ou bien par utilisation de double source de carbone (glucose et éthanol, sucres modifiées et polyols) (Gullo *et al.*, 2019).

Tableau 9.- Bactéries acétiques identifiées dans les vinaigres traditionnels de dattes

Souche \ Sources	Vinaigre de Hamraya	Vinaigre de Harchaya	Vinaigre de Deglet-Nour	Total
<i>A. aceti</i> subsp. <i>aceti</i>	13	12	29	54
<i>A. aceti</i> subsp. <i>liquifaciens</i>	6	0	5	11
<i>A. aceti</i> subsp. <i>orleanensis</i>	9	2	2	13
<i>A. aceti</i> subsp. <i>xylum</i>	1	0	2	3
<i>A. pasteurianus</i> subsp. <i>pasteurianum</i>	4	2	3	9
<i>A. pasteurianus</i> subsp. <i>ascendens</i>	2	1	2	5
<i>A. pasteurianus</i> subsp. <i>lovaniensis</i>	2	1	3	6
<i>G. oxydans</i> subsp. <i>industrius</i>	1	1	0	2
Total	38	19	46	103

Les tests biochimiques et morphologiques conventionnels des 154 isolats issus des échantillons du vinaigre traditionnel de dattes des cultivars Hamraya, Harchaya et Deglet-Nour de la cuvette de Ouargla, ont été réalisées suivant les directives de Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (tab. 7 et 8) (De Ley *et al.*, 1984). Les 103 souches pré-identifiées selon la clé dichotomique de Frateur, ont permis de découler 8 noms de bactéries acétiques (tab. 9). 07 souches ont été classées dans le genre *Acetobacter* (*Acetobacter aceti* subsp. *aceti*, *Acetobacter aceti* subsp. *orleanensis*, *Acetobacter aceti* subsp. *liquifaciens*, *Acetobacter aceti* subsp. *xylinum*, *Acetobacter pasteurianus* subsp. *pasteurianum*, *Acetobacter pasteurianus* subsp. *lovaniensis* et *Acetobacter pasteurianus* subsp. *ascendens*) et 1 souche fait partie du genre *Gluconobacter* (*Gluconobacter oxydans* subsp. *industrius*). Un nombre de 51 isolats restant, ont été non identifiables du fait qu'ils n'ont pas une corrélation des tests biochimiques pour attribuer le nom exact.

II.3.4.- Répartition des bactéries acétiques selon l'origine du vinaigre

Il apparait sur les tableaux 8 et 9 que les 26 échantillons de vinaigres issus de Hamraya, sont les plus diversifiés en bactéries acétiques. Ils renferment toutes les souches isolées (*Acetobacter aceti* subsp. *aceti*, *Acetobacter aceti* subsp. *orleanensis*, *Acetobacter aceti* subsp. *liquifaciens*, *Acetobacter aceti* subsp. *xylinum*, *Acetobacter pasteurianus* subsp. *pasteurianum*, *Acetobacter pasteurianus* subsp. *lovaniensis*, *Acetobacter pasteurianus* subsp. *ascendens* et *Gluconobacter oxydans* subsp. *industrius*), suivi par les 26 échantillons du vinaigre de cultivar Deglet-Nour qui totalisent 7 souches (*Acetobacter aceti* subsp. *aceti*, *Acetobacter aceti* subsp. *orleanensis*, *Acetobacter aceti* subsp. *liquifaciens*, *Acetobacter aceti* subsp. *xylinum*, *Acetobacter pasteurianus* subsp. *pasteurianum*, *Acetobacter pasteurianus* subsp. *lovaniensis* et *Acetobacter pasteurianus* subsp. *ascendens*) et enfin 6 souches (*Acetobacter aceti* subsp. *aceti*, *Acetobacter aceti* subsp. *orleanensis*, *Acetobacter pasteurianus* subsp. *pasteurianum*, *Acetobacter pasteurianus* subsp. *lovaniensis*, *Acetobacter pasteurianus* subsp. *ascendens* et *Gluconobacter oxydans* subsp. *industrius*) issues à partir des 11 échantillons du vinaigres du cultivar Harchaya.

L'isolement et La pré-identification physiologique et biochimique des bactéries acétiques à partir des échantillons de vinaigre traditionnel de dattes, ont révélé que le vinaigre de cultivars Deglet-Nour, Hamraya et Harchaya renferment 44%, 37% et 19% de souches respectivement, et par ordre décroissant selon le tableau 10 et la figure 9.

La souche d'*A.pasteurianus* est isolée dans du vinaigre de céréale, le vinaigre balsamique traditionnel, le vin, la bière, le cidre, le vinaigre de vin, et le vinaigre de fruit. *A.aceti* dans le vinaigre de vin, le vinaigre balsamique traditionnel, le vinaigre de fruit, le vin. *A.oeni* dans le vin. *A.cerevisiae* dans la bière. *A.pomorum* dans le vinaigre Cidre. *A.nitrogenifigens* dans le thé de Kombucha et le vin. *K.europaesus* dans le vin, le vinaigre de vin et le vinaigre balsamique traditionnel. *K.oboediens* dans le vinaigre de vin. *K.hansenii* dans le vin, vinaigre de vin, le vinaigre balsamique traditionnel et le thé de kombucha. *K.intermedius* dans le vinaigre de cidre. *K.xylinus* dans le vinaigre de vin, les fruits. *G.oxydans* dans les fruits, jus de fruit, vin et bière (Sengun, 2017).

Tableau 10.- Types des bactéries acétiques pré-identifiées dans les vinaigres traditionnels de dattes (+: presence, -: absence)

Souches Cultivar du vinaigre	<i>Acetobacter aceti</i> subsp. <i>aceti</i>	<i>Acetobacter aceti</i> subsp. <i>liquifaciens</i>	<i>Acetobacter aceti</i> subsp. <i>orleanensis</i>	<i>Acetobacter aceti</i> subsp. <i>xylum</i>	<i>Acetobacter pasteurianus</i> subsp. <i>pasteurianum</i>	<i>Acetobacter pasteurianus</i> subsp. <i>ascendens</i>	<i>Acetobacter pasteurianus</i> subsp. <i>lovanensis</i>	<i>Gluconobacter oxydans</i> subsp. <i>industrius</i>
Hamraya	+	+	+	+	+	+	+	+
Harchaya	+	-	+	-	+	+	+	+
Deglet-Nour	+	+	+	+	+	+	+	-

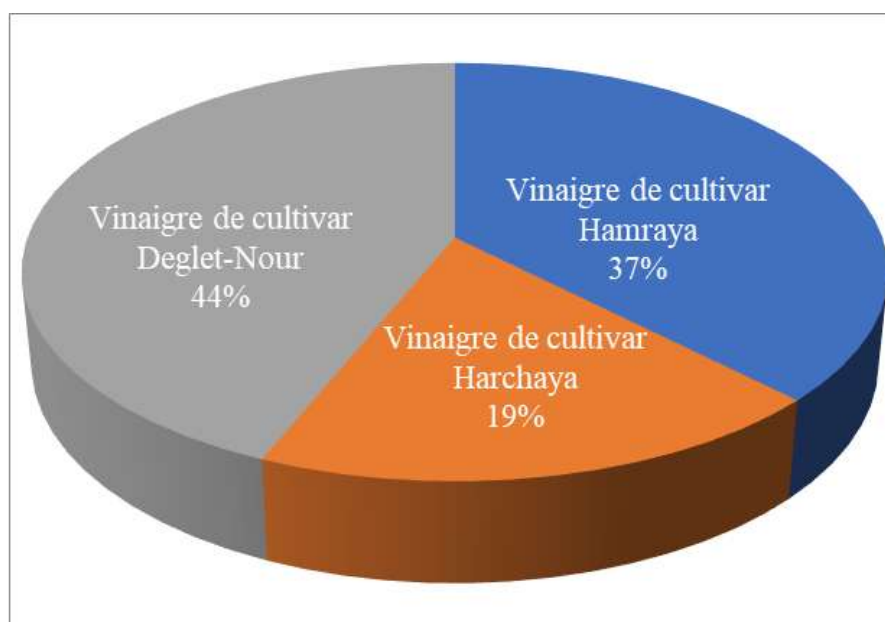


Figure 9.- Répartition des souches de bactéries acétiques identifiées des échantillons de vinaigres de dattes selon les cultivars de dattes

II.3.5.- Répartition taxonomique des bactéries acétiques

La pré-identification des acétobacters a permis l'attribution de 103 noms de sous-espèces appartenant au genre *Acetobacter* (101 souches [98%]) et *Gluconobacter* (2 souches [2%]) parmi les 154 isolats obtenues (fig. 10). 81 sous-espèces d'*Acetobacter aceti* et 20 sous-espèces d'*Acetobacter pasteurianus* (%). Une dominance d'*Acetobacter aceti* subsp. *aceti* par 54 isolats (52%), 11 isolats sont des *Acetobacter aceti* subsp. *liquifaciens* (11%), 13 isolats sont des *Acetobacter aceti* subsp. *orleanensis* (12%) et 3 isolats sont des *Acetobacter aceti* subsp. *xylum* (3%). 09 isolats sont des *Acetobacter pasteurianus* subsp. *pasteurianum* (9%), 05 isolat sont des *Acetobacter pasteurianus* subsp. *ascendens* (5%) et 6 isolats sont des *Acetobacter pasteurianus*

subsp. *lovanensis* (6%). 2 isolats sont des *Gluconobacter oxydans* subsp. *industrius* (2%).

Acetobacter pasteurianus thermo-tolérant et producteur de grande quantité d'acide acétique, est isolé et identifié dans le vin de palmier par Konate *et al.* (2014).

Cependant, Kadere *et al.* (2008), Beheshti-Maal (2014) et Diba *et al.* (2015), ont obtenu les genres *Acetobacter* et *Gluconobacter* à partir du Noix de coco (Mnazi), de dattes Irlandaises et des fruits décomposés (raisins, mangues, pomme, etc) respectivement, qui nécessitent une identification complémentaire. Deux souches de bactéries acétiques, identifiées par des techniques moléculaires comme étant affiliées à l'espèce *Acetobacter pasteurianus*, ont été isolées respectivement de Cactus et de pommes par Mounir (2016). En ce qui concerne le vinaigre traditionnel du vin, une nouvelle espèce *Acetobacter europaeus* (*Komagataeibacter europaeus*) a été isolée de fermentations de vinaigre submergées en Allemagne et en Suisse (Matsushita *et al.*, 2016). Sokollek *et al.* (1998), ont isolé deux espèces de bactéries acétiques; *Acetobacter oboediens* (*Komagataeibacter oboediens*) et *Acetobacter pomorum* à partir des fermentations du vin rouge et du vinaigre de cidre.

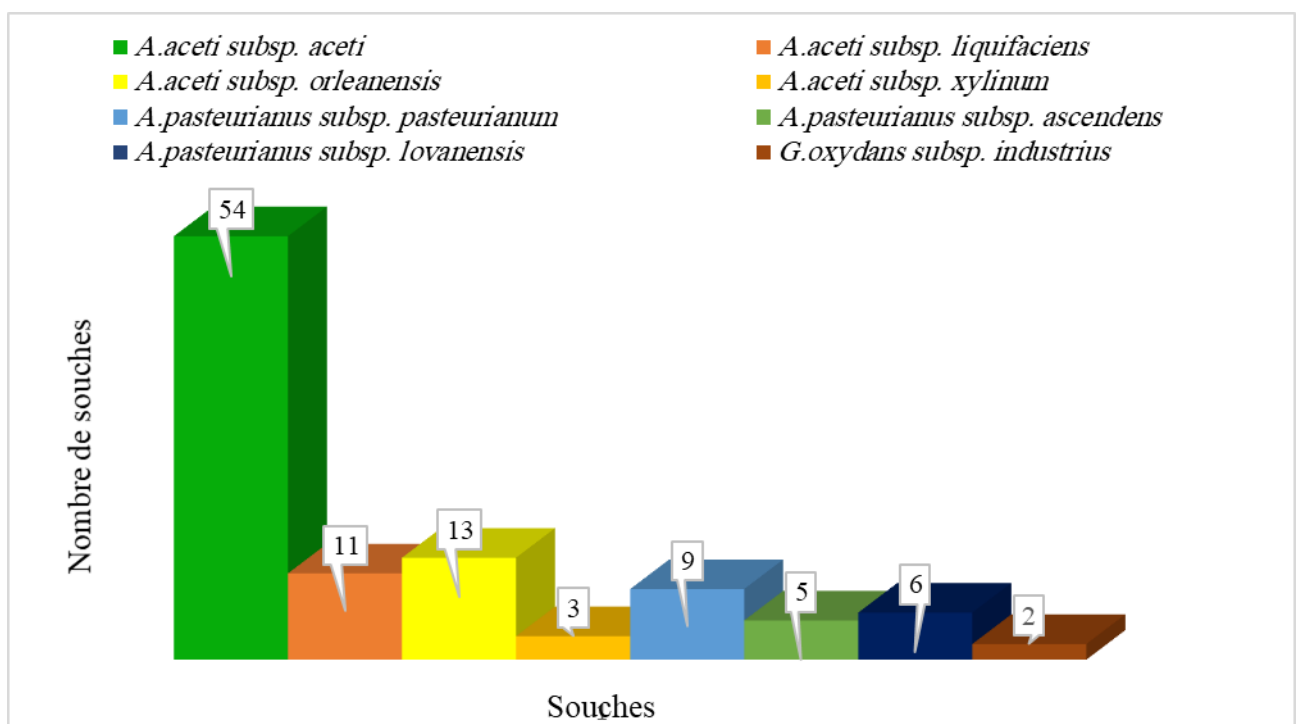


Figure 10.- Répartition des souches de bactéries acétiques issues des vinaigres traditionnels de dattes de la cuvette de Ouargla

Les méthodes de l'identification et de la caractérisation phénotypiques des bactéries acétiques sont fastidieuses, non fiables et durent très longtemps. Les nouvelles technologies de la biologie moléculaire ont été employées comme alternatives et complémentaires de correction en taxonomie. Les genres *Acetobacter* et *Gluconobacter* ont été introduits longtemps par Beijerinck en 1898 (*Acetobacter*) et par Asai en 1935 (*Gluconobacter*) et les premiers systèmes de

classification de ces bactéries étaient basées principalement sur les caractéristiques morphologiques et biochimiques (Cleenwerck et De Vos, 2008). Par exemple la souche *Acetobacter aceti* subsp. *liquifasciens* actuellement dénommée *Gluconacetobacter liquifaciens* est classée dans le genre *Gluconacetobacter* selon la nouvelle classification (Matsushita *et al.*, 2016). Pour cela l'approche polyphasique est la meilleure pour des problèmes de l'identification pour l'exactitude des résultats obtenus en un laps de temps (Gomes *et al.*, 2018).

Les approches moléculaires sont fortement recommandées pour l'identification des bactéries acétiques. L'amplification et le séquençage du gène de l'ARNr 16S donnent d'excellents résultats pour l'identification au niveau du genre, mais ne suffisent pas pour différencier les espèces dans le genre. De nombreuses études antérieures ont montré que le gène de l'ARNr 16S n'est pas un outil utile pour l'identification des espèces car le gène de l'ARNr 16S présent dans certains cas permet un polymorphisme entre les espèces ou des hétérogénéités macro ou micro qui sont préjudiciables à l'identification (Montet et Ray, 2016). Les souches appartenant à la même espèce de bactéries acétiques pourraient être comparées aux techniques moléculaires classiques telles que l'électrophorèse sur gel à champ pulsé (Pulsed-Field Gel Electrophoresis: PFGE), ou aux techniques répétitives de PCR basées sur la séquence (rep-PCR) utilisant le Consensus Intergénique Répétitif Enterobactérien (ERIC), les éléments palindromiques extragènes répétitifs (REP) ou (GTG) 5 avec des séquences résultats (Montet et Ray, 2016).

II.3.6.- Optimisation d'un milieu d'isolement

Six milieux de cultures sont testés afin de sélectionner le plus approprié à l'isolement des bactéries acétiques. Ainsi, 14 échantillons de vinaigre traditionnel de dattes des cultivars Deglet-Nour, Hamraya et Harchaya ont étéensemencés sur six différents milieux de culture [milieu Frateur, milieu Frateur modifiée, milieu à base de glucose, extrait de levure et CaCO₃ (GYC), gélose nutritive modifiée et milieu naturel, milieu naturel modifiée à 30°C pendant 24-48 heures]. Les résultats sont consignés dans le tableau 11. 123 isolats sont obtenus, avec 32 isolats sur milieu de Frateur, 25 sur milieu Frateur modifiée, 28 sur milieu naturel modifiée, 16 sur gélose nutritive modifiée, 12 sur milieu GYC et 10 isolats sur milieu naturel.

Le plus grand nombre d'isolats est obtenu sur milieu Frateur. Par contre, certains échantillons ne donnent pas d'isolats sur les milieux gélose nutritive modifiée, GYC et naturel, d'où l'absence de colonies suspects d'être des bactéries acétiques dans les échantillons Dn50, Dn52, Dn53 et Dn61 issues de cultivars Deglet-Nour, Ha57 issues de cultivar Hamraya et l'échantillon Hr51 issues du cultivar Harchaya isolés sur gélose nutritive modifiée. Les échantillons Dn53, Dn61 issus de cultivars Deglet-Nour et les échantillons Ha54, Ha57 issues de cultivar Hamraya isolés sur milieu GYC, et les échantillons Dn50, Dn53 et Dn61 issus de cultivars Deglet-Nour et Ha54 issu de cultivar Hamraya sont isolés sur milieu naturel.

Les bactéries acétiques sont des micro-organismes exigeants, en raison de leur isolement difficile et leur culture nécessite plusieurs milieux synthétiques (Crotti *et al.*, 2010), à

titre d'exemple le milieu d'extrait de levure, de glucose et de CaCO_3 (GYC), d'extrait de levure Peptone Mannitol (YPM) et d'acide acétique éthanol (AE) (Montet et Ray, 2016).

Le milieu Frateur a donné plus d'isolats par rapport au milieu Frateur additionné de la spiruline (Frateur [30%], Frateur modifiée [16%]). À l'inverse, le milieu naturel enrichi par la spiruline est démontré plus performant que le milieu naturel en isolement des bactéries acétiques (milieu naturel modifiée [20%], milieu naturel [8%]). La gélose nutritive modifiée hébergé 15% et le milieu GYC a renfermé 11%. La spiruline présente une composition presque similaire à celle de l'extrait de levure en acides aminées et vitamines (annexe 4 et 5). Selon Shao *et al.* (2019), Elle présente une valeur nutritive élevée (riche en vitamines, acides aminées et minéraux) et de nombreuses activités biologiques telles que l'activité antimicrobienne. Ce qui inhibe la croissance de quelques bactéries acétiques quand elle est rajoutée dans leurs milieux d'isolement. L'activité antibactérienne de la spiruline est due à la présence des acides acrylique, propionique, benzoïque et mandélique (Kokou *et al.*, 2012). Doumandji et Alili (2012), ont émis des réserves en ce qui concerne la croissance de certaines bactéries exigeantes en présence de la spiruline et compté la complexité existant entre les interactions bactériennes (positives ou négatives).

La pré-identification phénotypique des 123 isolats issus des échantillons du vinaigre traditionnel de dattes des cultivars Deglet-Nour, Hamraya et Harchaya dans la cuvette de Ouargla, ont permis de caractériser 6 souches de bactéries acétiques. Cinq (05) souches appartiennent au genre *Acetobacter* (*Acetobacter aceti* subsp. *aceti*, *Acetobacter aceti* subsp. *orleanensis*, *Acetobacter aceti* subsp. *liquifaciens*, *Acetobacter pasteurianus* subsp. *lovanensis* et *Acetobacter pasteurianus* subsp. *ascendens*) et 1 souche fait partie du genre *Gluconobacter* (*Gluconobacter oxydans* subsp. *industrius*) (tab. 12 et fig. 11).

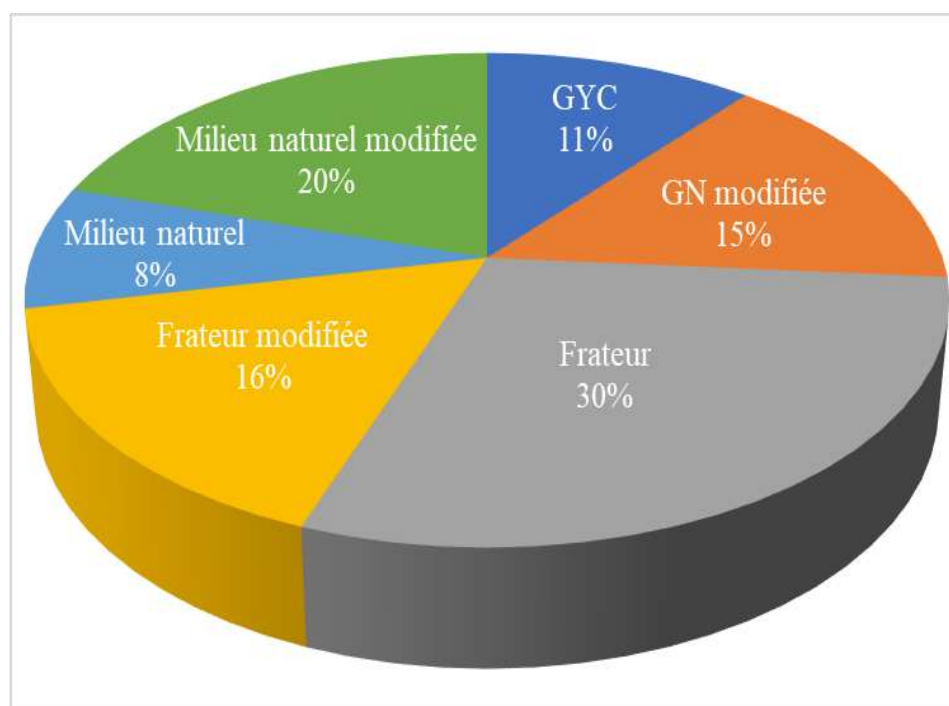


Figure 11.- Répartition des bactéries acétiques isolées sur différents milieux de culture

Tableau 11.- Somme des isolats issues des échantillons de vinaigre traditionnel de dattes sur 6 milieux d'isolement (E: Echantillons, Hm: Hamraya, Hr: Harchaya, Dn: Deglet-Nour)

	Fratureur			Fratureur modifié			Milieu naturel			Naturel modifié			Gélose nutritive modifié			GYC		
	Hm	Hr	Dn	Hm	Hr	Dn	Hm	Hr	Dn	Hm	Hr	Dn	Hm	Hr	Dn	Hm	Hr	Dn
Echantillons (isolat)	Ha54, Ha57, Ha59, Ha62	Hr51, Hr58	Dn50, Dn52, Dn53, Dn55, Dn56, Dn59, Dn60, Dn63	Ha54, Ha57, Ha59, Ha62	Hr51, Hr58	Dn50, Dn52, Dn53, Dn55, Dn56, Dn59, Dn60, Dn63	Ha57, Ha60, Ha62	Hr51, Hr58	Dn52, Dn55, Dn56, Dn59, Dn63	Ha54, Ha57, Ha59, Ha62	Hr51, Hr58	Dn50, Dn52, Dn53, Dn55, Dn56, Dn59, Dn60, Dn63	Ha54, Ha60, Ha62	Hr58	Dn55, Dn56, Dn59, Dn63	Ha60, Ha62	Hr51, Hr58	Dn50, Dn52, Dn55, Dn56, Dn59, Dn63
Echantillons (sans isolat)	/	/	/	/	/		Ha54	/	Dn50, Dn53, Dn61	/	/	/	Ha57	Hr51	Dn50, Dn52, Dn53, Dn61	Ha54, Ha57	/	Dn53, Dn61
Nombre d'isolats	9	5	18	3	8	14	3	2	5	8	4	16	6	2	8	2	3	7
Total	32			25			10			28			16			12		
	123																	

	Fracteur	Fracteur modifié	Milieu naturel	Milieu naturel modifié	Gélose nutritive modifiée	GYC	Total
Deglet-Nour	<i>9 Acetobacter aceti</i> subsp. <i>aceti</i>	<i>1 Acetobacter aceti</i> subsp. <i>aceti</i>	<i>4 Acetobacter aceti</i> subsp. <i>aceti</i>	<i>4 Acetobacter aceti</i> subsp. <i>aceti</i>	<i>4 Acetobacter acet</i> subsp. <i>aceti</i>	<i>6 Acetobacter aceti</i> subsp. <i>aceti</i>	28
	<i>2 Acetobacter aceti</i> subsp. <i>orleanensis</i>		/		/	/	2
	<i>1 Acetobacter aceti</i> subsp. <i>liquifaciens</i>		/	<i>2 Acetobacter aceti</i> subsp. <i>liquifaciens</i>	<i>4 Acetobacter aceti</i> subsp. <i>liquifaciens</i>	/	7
	<i>3 Acetobacter pasteurianus</i> subsp. <i>lovanensis</i>		/		/	/	3
	<i>1 Acetobacter pasteurianus</i> subsp. <i>ascendens</i>	<i>8 Acetobacter pasteurianus</i> subsp. <i>ascendens</i>	/	<i>6 Acetobacter pasteurianus</i> subsp. <i>ascendens</i>	/	/	15
		<i>1 Gluconobacter oxydans</i> subsp. <i>industrius</i>					1
Hamraya	<i>1 Acetobacter aceti</i> subsp. <i>aceti</i>	<i>1 Acetobacter aceti</i> subsp. <i>aceti</i>	/	<i>2 Acetobacter aceti</i> subsp. <i>aceti</i>	<i>4 Acetobacter aceti</i> subsp. <i>aceti</i>	<i>2 Acetobacter aceti</i> subsp. <i>aceti</i>	10
	<i>6 Acetobacter aceti</i> subsp. <i>orleanensis</i>	/	/		/	/	6
	/		<i>1 Acetobacter aceti</i> subsp. <i>liquifaciens</i>	<i>1 Acetobacter aceti</i> subsp. <i>liquifaciens</i>	/	/	2
	<i>1 Acetobacter pasteurianus</i> subsp. <i>lovanensis</i>		<i>1 Acetobacter pasteurianus</i> subsp. <i>lovanensis</i>		/	/	2
		<i>4 Acetobacter pasteurianus</i> subsp. <i>ascendens</i>		<i>2 Acetobacter pasteurianus</i> subsp. <i>ascendens</i>			6
	/		/		<i>1 Gluconobacter oxydans</i> subsp. <i>industrius</i>	/	1

Harchaya	<i>1 Acetobacter aceti</i> subsp. <i>aceti</i>		<i>2 Acetobacter aceti</i> subsp. <i>aceti</i>	<i>1 Acetobacter aceti</i> subsp. <i>aceti</i>	<i>2 Acetobacter aceti</i> subsp. <i>aceti</i>	<i>3 Acetobacter aceti</i> subsp. <i>aceti</i>	9
	<i>1 Acetobacter aceti</i> subsp. <i>orleanensis</i>		/		/	/	1
	<i>1 Acetobacter pasteurianus</i> subsp. <i>lovanensis</i>		/		/	/	1
	<i>1 Acetobacter pasteurianus</i> subsp. <i>ascendens</i>	<i>1 Acetobacter pasteurianus</i> subsp. <i>ascendens</i>	/	<i>1 Acetobacter pasteurianus</i> subsp. <i>ascendens</i>	/	/	3
	<i>1 Gluconobacter oxydans</i> subsp. <i>industrius</i>		/		/	/	1
Total	29	16	8	20	15	11	98

II.3.7.- Caractérisation des souches de bactéries acétiques isolées

Les souches de bactéries acétiques isolées et identifiées dont *Acetobacter aceti* subsp. *aceti*, *Acetobacter aceti* subsp. *orleanensis*, *Acetobacter aceti* subsp. *liquifaciens*, *Acetobacter pasteurianus* subsp. *lovanensis*, *Acetobacter pasteurianus* subsp. *ascendens* et *Gluconobacter oxydans* subsp. *industrius*), sont caractérisées pour leur performance industrielle.

II.3.7.1.- Analyses biochimiques

Les résultats des analyses biochimiques d'assimilation de 12 substrats différents (esculine, α et β galactose, ribose, arabinose, mannitol, sorbitol, lactose, tréhalose, raffinose, gélatine et glucose), sont présentés dans le tableau 13.

Tableau 13.- Analyses biochimiques des bactéries acétiques [+: Positive; -: Négative; ESC: esculine; α et β GAL: galactose; RIB: ribose; ARA: arabinose; MAN: mannitol; SOR: sorbitol; LAC: lactose; TRE: tréhalose; RAF: raffinose; GEL: gélatine; GLU(F): fermentation; GLU(A): assimilation]

Souches Substrat	ESC	α - GAL	β - GAL	RIB	ARA	MAN	SOR	LAC	TRE	RAF	GLU (F)	GEL	GLU (A)
<i>A. aceti</i> subsp. <i>aceti</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>A. aceti</i> subsp. <i>liquifaciens</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>A. aceti</i> subsp. <i>orleanensis</i>	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-
<i>A. pasteurianus</i> subsp. <i>ascendens</i>	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. pasteurianus</i> subsp. <i>lovanensis</i>	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-
<i>G. oxydans</i> subsp. <i>industrius</i>	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+

L'analyse des résultats de tableau 13, laisse apparaitre que les souches des genres *Acetobacter* et *Gluconobacter* testées, sont aptes à oxyder l'esculine et l' α -galactose. La souche *Acetobacter aceti* subsp. *aceti* n'oxyde ni le β -galactose, ni le glucose, et ne fermente ni ribose, ni arabinose, ni mannitol, ni sorbitol, ni lactose, ni tréhalose, ni raffinose, ni glucose, mais dégrade la gélatine. Par contre *Acetobacter aceti* subsp. *liquifaciens* peut assimiler et fermenter le glucose. Il est incapable d'oxyder le β -galactose, et de fermenter le ribose, l'arabinose, le mannitol, le sorbitol, le lactose, tréhalose, raffinose, à l'exception de la gélatine, qui est

dégradable.

La gélatine et le β -galactose, sont dégradés par *Acetobacter aceti* subsp. *orleanensis*. L'arabinose, le mannitol, le lactose, le raffinose sont également fermentés, au contraire du ribose, de sorbitol, de tréhalose. Pour le glucose, il n'est ni fermentescible, ni assimilable par la souche. *Acetobacter pasteurianus* subsp. *ascendens* est incapable d'oxyder le β -galactose et le glucose. Ne fermente que l'arabinose et ne dégrade pas la gélatine. Cependant, *Acetobacter pasteurianus* subsp. *lovanensis*, a fermenté l'arabinose, le mannitol, le lactose, le raffinose et le tréhalose, à l'exception du ribose, du sorbitol et du glucose. L'oxydation du β -galactose et du glucose n'a été pas prouvée. Mais, la gélatine est dégradée. La souche *Gluconobacter oxydans* subsp. *industrius* n'a assimilé que le glucose et dégradé la gélatine.

En comparant les souches selon leur capacité d'assimiler des substrats carbohydrates, il apparaît par ordre décroissant; *Acetobacter aceti* subsp. *orleanensis* et *Acetobacter pasteurianus* subsp. *lovanensis* qui ont assimilé 8 substrats (66.67%), puis *Acetobacter aceti* subsp. *liquifaciens* et *Gluconobacter oxydans* subsp. *industrius* 4 substrats (33.33%) et enfin *Acetobacter aceti* subsp. *aceti* et *Acetobacter pasteurianus* subsp. *ascendens* 3 substrats (25%) (fig. 12).

Acetobacter aceti subsp. *orleanensis* et *Acetobacter pasteurianus* subsp. *lovanensis*, ont un grand pouvoir pour dégrader plusieurs sources de carbohydrates. Les souches qui peuvent hydrolyser l'esculine en monomère de glucose ont libéré une enzyme β -glucosidase. Pour les substrats α -galactose et β -galactose sont hydrolysés à l'aide des enzymes α -galactosidase et β -galactosidase, respectivement. Pour dégrader la gélatine, une gélatinase doit être produite par les souches d'*Acetobacter* et *Gluconobacter* testés.

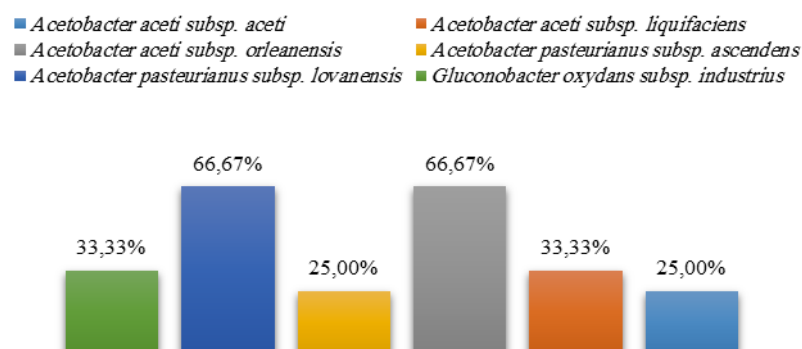


Figure 12.- Assimilation des substrats organiques par les bactéries acétiques

La fermentation du glucose, du ribose, de l'arabinose, du lactose, du tréhalose, de la raffinose, du mannitol et du sorbitol, dévoilent une acidification des milieux après production d'acides organiques par les bactéries acétiques. Les bactéries acétiques ont une aptitude à oxyder par fermentation, de nombreux types de substrats en produits finaux de haute valeur, dont l'acide acétique constituant principal du vinaigre, l'acide ascorbique (vitamine C), l'acide gluconique, cetogluconique, la production de la cellulose et la dextrane (Sengun et Karabiyikli, 2011).

Les bactéries acétiques sont capables d'utiliser l'arabinose, le fructose, le glucose, le galactose, le ribose et la xylose. L'oxydation directe des sucres, sans phosphorylation est incomplète, conduit aux cétones correspondantes. Le glucose est donc oxydé en acide gluconique. Les bactéries du genre *Gluconobacter* peuvent dégrader un grand nombre de sucres: L-arabinose, D-galactose, D-glucose, D-mannose, D-xylose. Certaines souches du genre *Acetobacter* conduisent aussi à produire l'acide dicétonique. Par la même voie, d'aldose, de mannose ou de galactose conduisent à la production de leurs acides. Cependant, c'est l'oxydation complète des sucres qui fournit aux bactéries l'énergie nécessaire à leur croissance. La voie métabolique d'utilisation des sucres est la voie des hexoses monophosphates. Chez certaines souches d'*Acetobacter* s'y ajoute le cycle des acides tricarboxyliques, absent chez *Gluconobacter*. Cela est lié à la non fonctionnalité des deux enzymes du cycle, α -ketoglutarate déshydrogénase et succinate déshydrogénase. Les enzymes de la glycolyse n'existent pas ou seulement en partie chez les bactéries acétiques (Longin, 2016).

Selon Kadere *et al.*, (2008), les souches du genre *Acetobacter* isolé de la noix de coco sont capables de fermenter l'arabinose, le xylose, le ribose, le glucose, le galactose, le mannose, le melibiose et le tréhalose, et ne fermentent pas l'amylgdine, la cellibiose, l'esculine, le fructose, le lactose, le maltose, le mannitol, le melezitose, le na-gluconate, le raffinose, le rhamnose, la salicine, le sorbitol, le saccharose et peuvent croître sur la gélatine, sans la liquéfaction.

Les isolats d'*Acetobacter pasteurianus*, du vin ivoirien par de Konate *et al.* (2014), oxydent le xylose, le glycérol, le glucose, l'éthanol, l'acide acétique, l'acide lactique, et sont incapables d'oxyder le galactose, le mannose, le saccharose, le mannitol, le sorbitol et le fructose. Romero-Cortes *et al.* (2012) ont isolé des bactéries acétiques à partir de cacao, oxydant l'éthanol mais n'hydrolyse pas la cellulose.

II.3.7.2.- Etude la tolérance des bactéries acétiques à l'éthanol

Les résultats de croissance des souches *Acetobacter aceti* subsp. *aceti*, *Acetobacter aceti* subsp. *liquifaciens*, *Acetobacter aceti* subsp. *orleanensis*, *Acetobacter pasteurianus* subsp. *ascendens*, *Acetobacter pasteurianus* subsp. *lovanensis*, et *Gluconobacter oxydans* subsp. *industrius* issus de vinaigres traditionnels de dattes des cultivars Deglet Nour, H'Chef Deglet Nour, Hamraya et Harchaya, pendant 168 heures, sur milieu liquide à base d'extrait de levure, de glucose, d'éthanol et d'acide acétique (YGEA), sont présentés sur les figures (13, 14, 15, 16, 17 et 18). Les souches démarrent leur croissance à partir de 0.5 ± 0.005 à 600 mn.

La figure 13 représente l'évolution de la biomasse de la souche *Acetobacter aceti* subsp. *aceti* sous forme de courbes qui possèdent des allures de variation relativement similaires durant la période d'incubation à différentes concentrations d'éthanol. Les variations des densités optiques montrent une augmentation à 24h correspondant aux 0.504 ± 0.013 (2%), 0.525 ± 0.004 (4%), 0.577 ± 0.003 (6%), 0.591 ± 0.003 (8%) et 0.627 ± 0.01 (10%), puis une diminution jusqu'au 48h. Une reprise de croissance est enregistrée à partir de 72h jusqu'à 120h avec des concentrations de 0.586 ± 0.004 (2%), 0.573 ± 0.006 (4%), 0.552 ± 0.008 (6%), 0.605 ± 0.005 (8%) et

0.560±0.004 (10%), puis une légère diminution.

Les concentrations optimales pour la croissance sont remarquables à 10% (0.627± 0.01), 8% (0.591±0.003), 6% (0.577±0.003), ce qui se traduit par une meilleure productivité en acide acétique en 24h, et une tolérance de l'éthanol en 168 h.

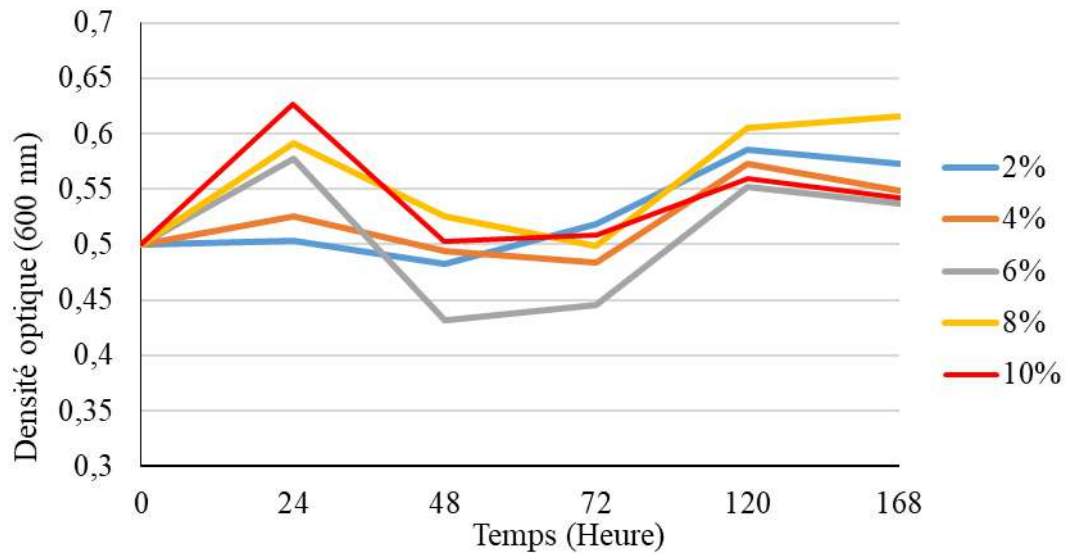


Figure 13.- Effet de l'éthanol sur la souche *Acetobacter aceti* subsp. *aceti* issue de vinaigre traditionnel de dattes

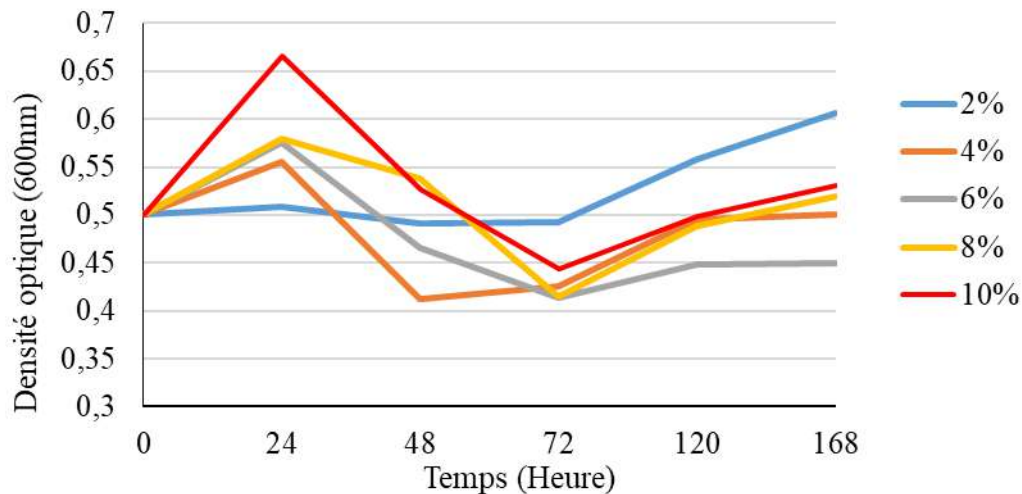


Figure 14.- Effet de l'éthanol sur la souche *Acetobacter aceti* subsp. *liquifaciens* issue de vinaigre traditionnel de dattes

Au vu de la figure 14, la croissance de la souche *Acetobacter aceti* subsp. *liquifaciens* à différentes concentrations d'éthanol, apparaît semblable durant l'incubation. L'évolution de la

biomasse de départ atteint 0.508 ± 0.001 (2%), 0.555 ± 0.002 (4%), 0.575 ± 0.010 (6%), 0.580 ± 0.003 (8%) et 0.666 ± 0.004 (10%) à 24h. Cette croissance est suivie par une diminution après 24h. Une reprise de croissance remarquable est révélée à partir de 72h du 0.493 ± 0.008 (2%), 0.425 ± 0.002 (4%), 0.414 ± 0.007 (6%), 0.415 ± 0.004 (8%) et 0.444 ± 0.001 (10%), au 0.606 ± 0.004 (2%), 0.501 ± 0.008 (4%), 0.450 ± 0.006 (6%), 0.519 ± 0.002 (8%) et 0.530 ± 0.002 (10%) à 168h. Les bactéries tolèrent des concentrations allant de 10% d'éthanol qui est la plus adéquat où la croissance est maximale en temps réduit (24h), ce qui traduit une bonne production d'acide acétique dans le milieu après consommation de l'éthanol.

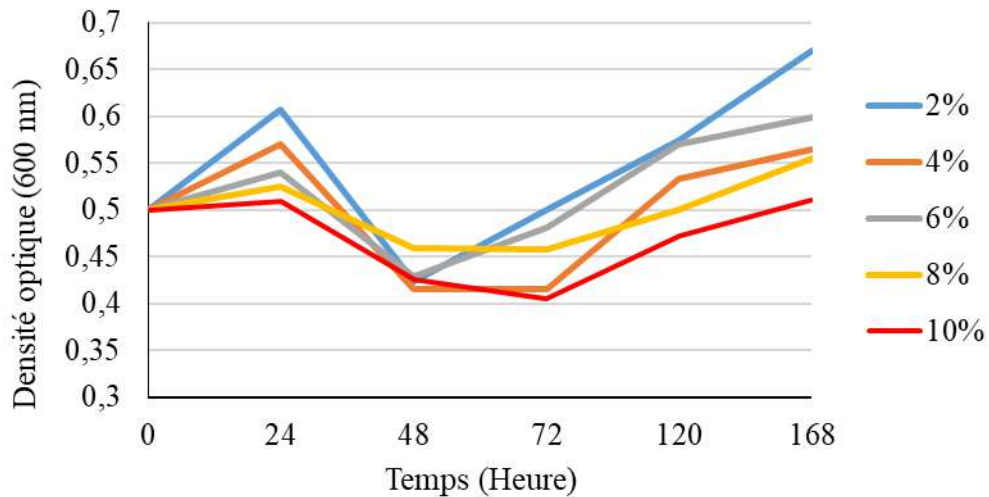


Figure 15.- Effet de l'éthanol sur la souche *Acetobacter aceti* subsp. *orleanensis* issue de vinaigre traditionnel de dattes

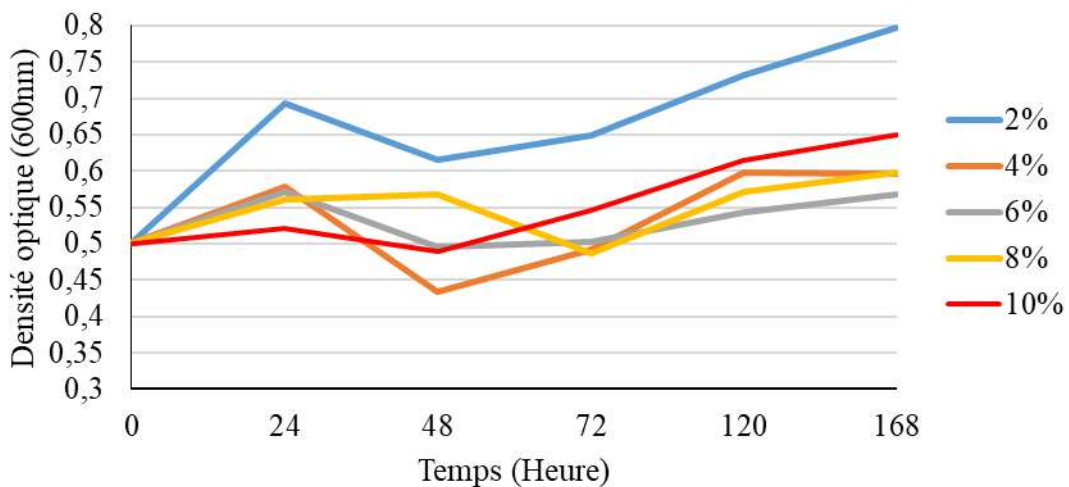


Figure 16.- Effet de l'éthanol sur la souche *Acetobacter pasteurianus* subsp. *ascendens* issue de vinaigre traditionnel de datte

La croissance de la souche *Acetobacter aceti* subsp. *orleanensis* dans le temps à différentes concentrations d'éthanol, révèle des fourches de tolérance allant de 2% jusqu'à 10% d'éthanol (fig. 15). Les densités optiques enregistrées après 24h sont de 0.608 ± 0.003 (2%), 0.571 ± 0.008 (4%), 0.540 ± 0.005 (6%), 0.524 ± 0.011 (8%) et 0.509 ± 0.004 (10%). Une diminution est remarquée après 24h. La souche reprend la croissance au bout du 48h au 72h jusqu'à 168h avec 0.671 ± 0.058 (2%), 0.565 ± 0.011 (4%), 0.599 ± 0.001 (6%), 0.555 ± 0.006 (8%) et 0.511 ± 0.005 (10%). Approximativement, à 10%, il n'y a pas de croissance considérable car c'est une d'adaptation au milieu en 168h. Les faibles concentrations d'éthanol sont idéales pour la croissance de la souche.

L'évolution de la croissance *Acetobacter pasteurianus* subsp. *ascendens* représentée dans la figure 16, montre des densités optiques décroissantes de 2% à 10%, atteignant 0.693 ± 0.004 (2%), 0.578 ± 0.004 (4%), 0.572 ± 0.003 (6%), 0.560 ± 0.004 (8%) et 0.521 ± 0.003 (10%) en 24h, et diminue après 48h. Une augmentation significative apparaît en 120h et 168h, avec 0.797 ± 0.013 (2%), 0.596 ± 0.006 (4%), 0.568 ± 0.004 (6%), 0.598 ± 0.012 (8%) et 0.649 ± 0.002 (10%).

La souche croît mieux avec 2% d'éthanol durant 168h avec une tolérance au-delà de 4% et arrive à 10%.

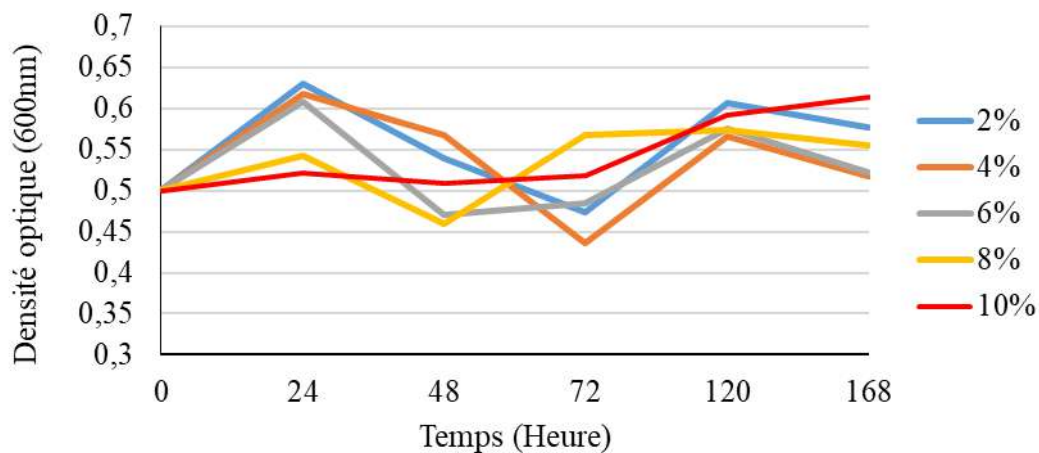


Figure 17.- Effet de l'éthanol sur la souche *Acetobacter pasteurianus* subsp. *lovanensis* issue de vinaigre traditionnel de dattes

La variation de croissance d'*Acetobacter pasteurianus* subsp. *lovanensis* au cours de 168 h d'incubation à différentes concentrations d'éthanol, est rapportée sur la figure 17. Les cellules ont évolué en croissance pendant 24h avec des densités optiques 0.522 ± 0.002 (10%), 0.542 ± 0.008 (8%), 0.608 ± 0.005 (6%), 0.618 ± 0.015 (4%) et 0.630 ± 0.010 (2%), puis chutées entre 48 et 72h. À 120h presque le maximum de la biomasse est atteint avec 0.592 ± 0.002 (10%), 0.574 ± 0.002 (8%), 0.575 ± 0.001 (6%), 0.566 ± 0.006 (4%) et 0.606 ± 0.007 (2%). Les faibles concentrations en éthanol (2%, 4% et 6%) restent les plus appropriées pour la culture de la souche *Acetobacter pasteurianus* subsp. *lovanensis* avec une tolérance à 10%.

La concentration de la souche *Gluconobacter oxydans* subsp. *industrius* obtenue sur la figure 18, illustre que toutes les concentrations d'éthanol pour la souche possèdent des allures presque similaires. La biomasse augmentée durant 24h d'incubation avec 0.542 ± 0.001 (10%), 0.544 ± 0.001 (8%), 0.591 ± 0.004 (6%), 0.606 ± 0.002 (4%) et 0.636 ± 0.005 (2%), avec une diminution de croissance, vers 48h et 72h. La souche reprend son évolution jusqu'à 168h en 2%, 4%, 6%, 8% et 10% avec 0.586 ± 0.003 , 0.557 ± 0.005 , 0.558 ± 0.008 , 0.467 ± 0.002 et 0.527 ± 0.015 respectivement. La fourchette de croissance optimale de la souche se situe entre 2% et 6% d'éthanol mais tolère jusqu'à 10%.

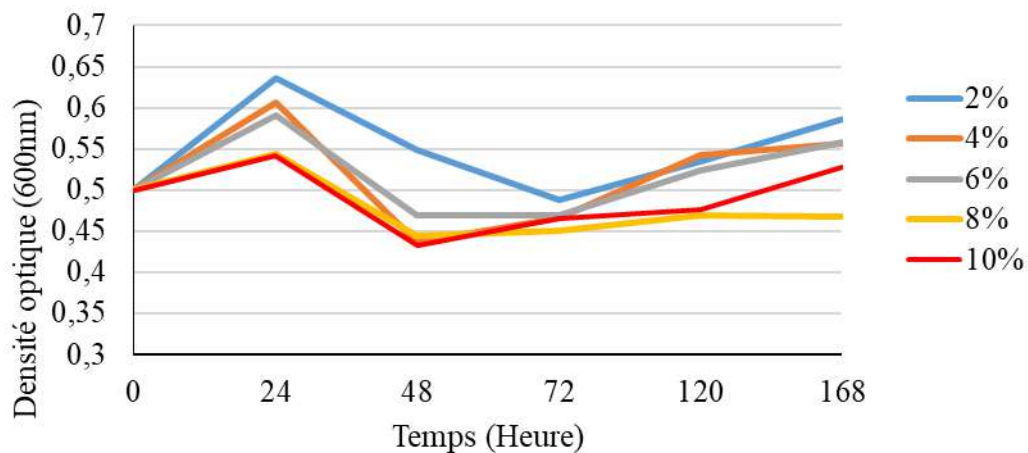


Figure 18.- Effet de l'éthanol sur la souche *Gluconobacter oxydans* subsp. *industrius* issue de vinaigre traditionnel de dattes

La croissance des souches examinées sur les figures 13-18, présente quatre phases caractéristiques de la croissance diauxique (diphase). Une première phase de croissance pendant 24 h incubation, suivie par une phase de ralentissement entre 48h et 72h, une reprise de croissance maximale entre 120h et 168 h, puis un ralentissement achevant à certaines concentrations.

Chinnawirotpisan *et al.* (2003) et Saeki *et al.* (1997, 1999), signalent que les souches du genre *Acetobacter* montrent toujours trois phases caractéristiques de croissance dans les milieux alcooliques. La première consiste à l'oxydation de l'alcool (éthanol) en acide acétique par enzyme alcool déshydrogénase (ADH), la seconde n'est pas une étape de croissance et la troisième est la suroxydation de l'éthanol par l'aldéhyde déshydrogénase (ALDH) en CO_2 et H_2O . Pour la souche *Gluconobacter oxydans* subsp. *industrius*, la troisième phase consiste à en une adaptation et tolérance vis-à-vis de l'acide acétique produit sans suroxydation.

Il est à constater que les souches issues du vinaigre traditionnel de dattes des cultivars Deglet-Nour, H'Chef Deglet Nour, Hamraya et Harchaya, peuvent croître et tolèrent des milieux supplémentés de concentrations d'éthanol (2% et 10%). Mais *Acetobacter aceti* subsp. *aceti* et *Acetobacter aceti* subsp. *liquifaciens* sont plus résistantes (10%), suivi par *Acetobacter aceti*

subsp. *orleanensis*, *Acetobacter pasteurianus* subsp. *ascendens* (8%), puis *Acetobacter pasteurianus* subsp. *lovanensis* et *Gluconobacter oxydans* subsp. *industrius* en présence de 6% d'éthanol (tab. 14).

Beheshti-Maal (2010, 2014), ont signalé que les souches d'*Acetobacter* isolées de cerise rouge blanche et du palmier dattier en Iran, avaient résister dans les concentrations l'éthanol entre 5 et 9 % et 2.5% et 6% respectivement. Une autre étude de Beheshti-Maal *et al.*, (2012), sur des souches *Acetobacter* de l'Iran, isolé de pêches, notent une croissance à des concentrations élevées en éthanol de 7 à 10%. Seyram *et al.*, (2009), ont isolé des bactéries acétiques pouvant se développer à des concentrations de 6% et tolèrent jusqu'à 12% d'alcool. Les cellules restent viables dans le vin avec 10 à 14% d'éthanol (Du Toit et Pretorius, 2002).

Tableau 14.- Croissance des bactéries acétiques à différente concentration de l'éthanol (Très bonne: +++, bonne: ++, modéré: +)

Souche	Concentration				
	2%	4%	6%	8%	10%
<i>Acetobacter aceti</i> subsp. <i>aceti</i>	+	+	+++	+++	+++
<i>Acetobacter aceti</i> subsp. <i>liquifaciens</i>	+	++	++	++	+++
<i>Acetobacter aceti</i> subsp. <i>orleanensis</i>	+++	+++	++	++	+
<i>Acetobacter pasteurianus</i> subsp. <i>ascendens</i>	+++	++	++	++	+
<i>Acetobacter pasteurianus</i> subsp. <i>lovanensis</i>	+++	+++	+++	+	+
<i>Gluconobacter oxydans</i> subsp. <i>industrius</i>	+++	++	++	+	+

Selon Gullo et Giudici (2008), la capacité d'oxyder l'éthanol est une caractéristique générale des bactéries acétiques, mais il existe une grande variabilité entre les souches et les espèces en ce qui concerne la quantité d'acide acétique produite. Dans certaines cas, l'éthanol est préféré par rapport aux sucres, par exemple pour les genres *Acetobacter* et *Gluconacetobacter*. Toutefois, une exception est notée pour des espèces du genre *Gluconobacter* qui oxydent les sucres plus facilement que l'alcool.

II.3.7.3.- Etude de la tolérance des bactéries acétiques à l'acide acétique

Les résultats de suivi des densités optiques des souches *Acetobacter aceti* subsp. *aceti*, *Acetobacter aceti* subsp. *liquifaciens*, *Acetobacter aceti* subsp. *orleanensis*, *Acetobacter pasteurianus* subsp. *ascendens*, *Acetobacter pasteurianus* subsp. *lovanensis* et *Gluconobacter oxydans* subsp. *industrius* isolées du vinaigre traditionnel des dattes des cultivars Deglet Nour, H'Chef Deglet-Nour, Hamraya et Harchaya, pendant 168h, sur milieu liquide à base d'extrait de levure, glucose, éthanol et acide acétique (GYEA) modifiée avec 0% (pH=6.46±0.02), 2% (pH=3.47±0.01), 4% (pH=3.29±0.01), 6% (pH=3.18±0.01), 8% (pH=3.06±0.01) et 10% (pH=2.94±0.01) d'acide acétique, sont présentées sous forme des courbes sur les figures 19, 20,

21, 22, 23 et 24. Les souches démarrent leur croissance à partir de densité optique 0.5 ± 0.006 à 600 nm.

Après 24h d'incubation, la croissance de la souche *Acetobacter aceti* subsp. *aceti* augmente avec des densités optiques croissantes; 0.553 ± 0.008 (0%), 0.555 ± 0.003 (2%), 0.582 ± 0.002 (10%), 0.568 ± 0.004 (4%), 0.617 ± 0.005 (8%) et 0.780 ± 0.006 (6%). La concentration de 6% d'acide acétique, donne une courbe représentant le pic maximum de croissance. Une diminution vers les concentrations (4% et 8%) et plus loin vers 10% et 2%. Une décroissance jusqu'à 120h, puis la souche reprend la croissance vers 168h avec 0.377 ± 0.003 (2%), 0.451 ± 0.004 (4%), 0.733 ± 0.003 (6%), 0.541 ± 0.002 (8%) et 0.363 ± 0.004 (10%). A l'exception de 0% d'acide acétique l'allure de la courbe est presque stable (fig. 19).

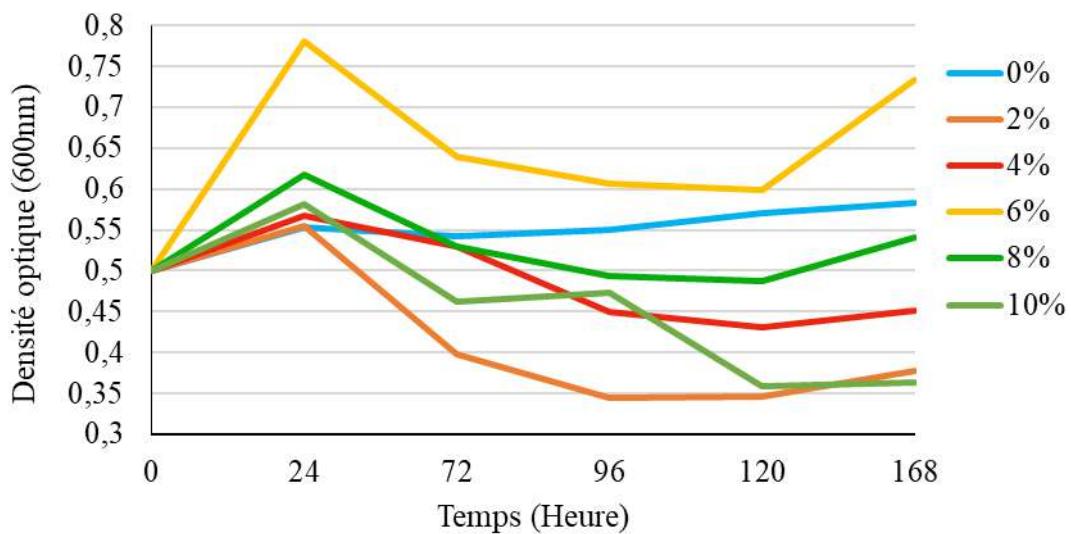


Figure 19.- Effet de l'acide acétique sur la souche *Acetobacter aceti* subsp. *aceti* issus de vinaigre traditionnel des dattes

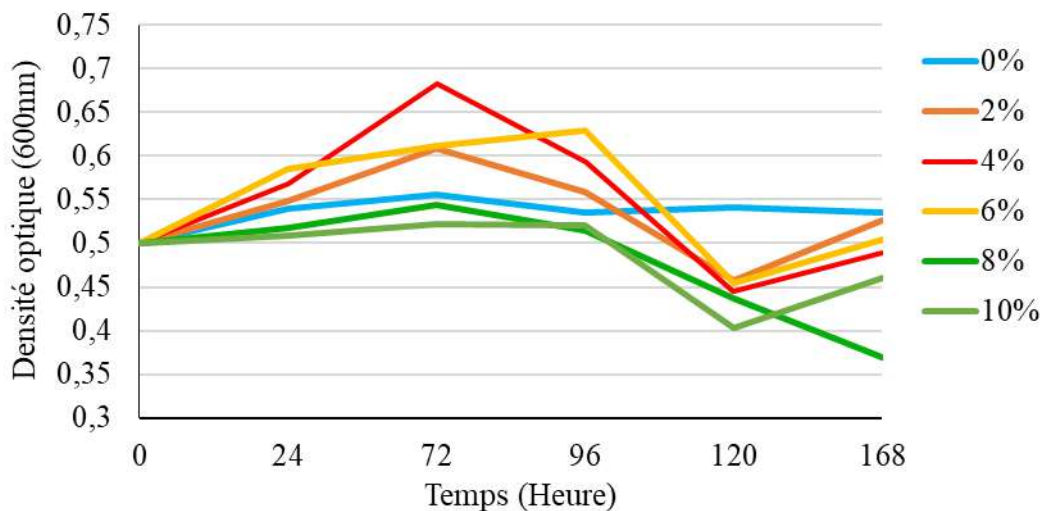


Figure 20.- Effet de l'acide acétique la souche *Acetobacter aceti* subsp. *liquifaciens* issus de vinaigre traditionnel des dattes

La figure 20 indique une croissance maximale d'*Acetobacter aceti* subsp. *liquifaciens* jusqu'à 72h avec 0.608 ± 0.005 (2%) et 0.544 ± 0.004 (8%) où l'optimum de croissance est situé aux alentours de 4% d'acide acétique (DO= 0.682 ± 0.002). Pour 6% et 10%, leurs maximums sont atteints à 96h avec 0.611 ± 0.002 et 0.522 ± 0.003 respectivement. Une chute est enregistrée pour la majorité, puis la croissance reprend à 120h vers 168 h, avec 0.527 ± 0.002 (2%), 0.489 ± 0.005 (4%), 0.505 ± 0.004 (6%), 0.369 ± 0.002 (8%) et 0.461 ± 0.005 (10%). En absence d'acide acétique, il n'y a pas de croissance significative.

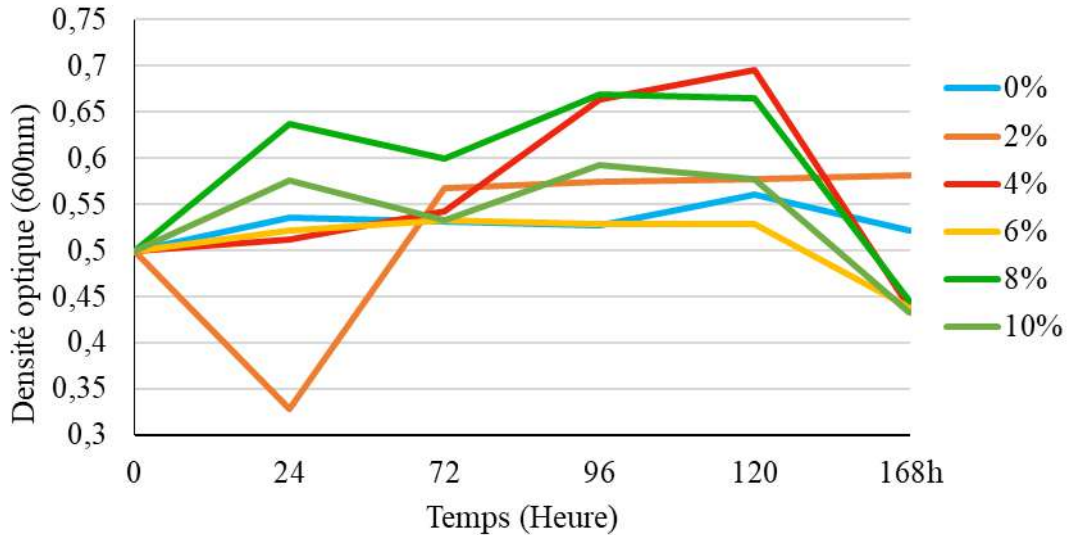


Figure 21.- Effet de l'acide acétique la souche *Acetobacter aceti* subsp. *orleanensis* issus de vinaigre traditionnel des dattes

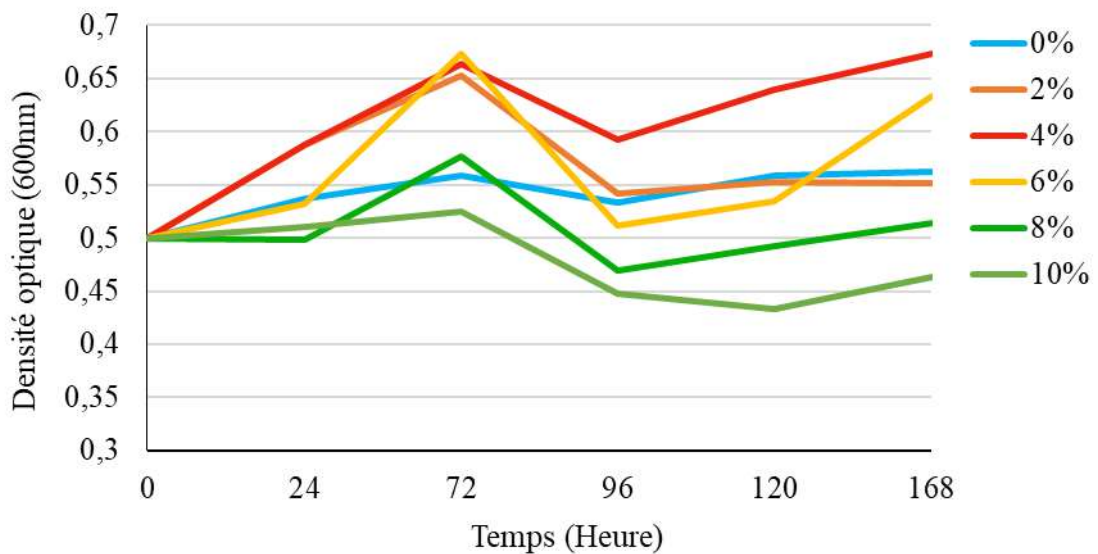


Figure 22.- Effet de l'acide acétique la souche *Acetobacter pasteurianus* subsp. *ascendens* issus de vinaigre traditionnel des dattes

Acetobacter aceti subsp. *orleanensis* (fig. 21), évolue de 0.323 ± 0.002 (2%), 0.512 ± 0.023 (4%), 0.522 ± 0.002 (6%), 0.576 ± 0.004 (10%) et 0.637 ± 0.012 (8%) au bout de 24h. Une décroissance à 72h est notée pour la majorité des concentrations. La reprise apparait entre 96 h et 120 h avec 0.696 ± 0.007 (4%), 0.528 ± 0.005 (6%), 0.665 ± 0.002 (8%) et 0.577 ± 0.001 (10%), et régressé après 120 h. Cette souche en milieu exempte d'acide acétique ne dépasse guère 0.560 ± 0.001 après 168 h. La chute de la biomasse avec 0.323 ± 0.002 (2%) d'acide acétique après 24 h, est affectée par le manque d'oxygène.

La figure 22 laisse apparaître une croissance lente d'*Acetobacter pasteurianus* subsp. *ascendens*. En 72h, les densités optiques sont de l'ordre de 0.673 ± 0.007 (6%), de 0.663 ± 0.002 (4%), de 0.653 ± 0.005 (2%), de 0.577 ± 0.001 (8%) et 0.525 ± 0.004 (10%) par ordre décroissant. Puis une diminution jusqu'à 96 h, et une reprise de la croissance où les valeurs marquées à 168 h sont de 0.551 ± 0.005 (2%), 0.673 ± 0.002 (4%), 0.633 ± 0.006 (6%), 0.514 ± 0.009 (8%) et 0.463 ± 0.009 (10%) d'où la tolérance de la souche. L'évolution de la croissance à 0% d'acide acétique, se maintient toujours entre 0.5 ± 0.004 et 0.562 ± 0.003 .

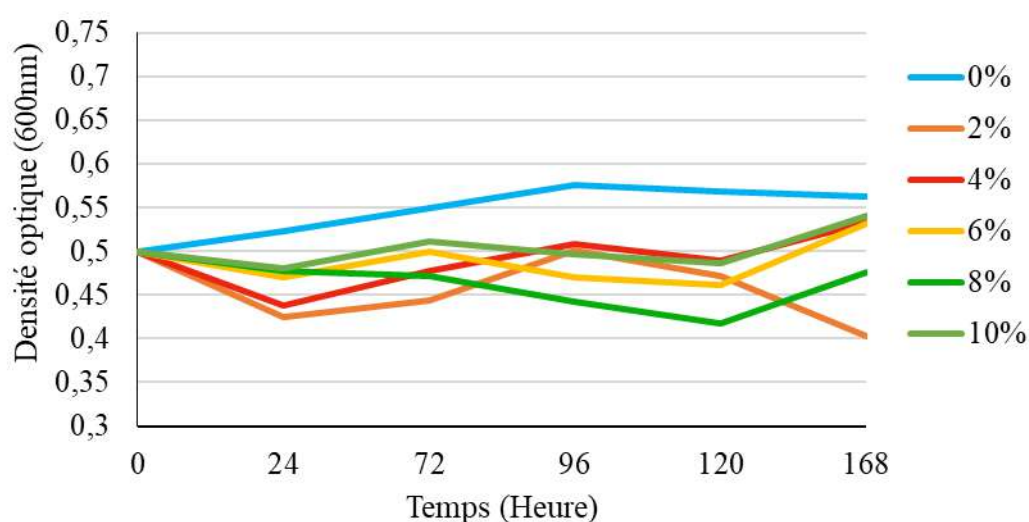


Figure 23.- Effet de l'acide acétique la souche *Acetobacter pasteurianus* subsp. *lovanensis* issus de vinaigre traditionnel des dattes

L'addition de l'acide acétique à la culture d'*Acetobacter pasteurianus* subsp. *lovanensis* cause un stress aux cellules bactériennes, ce qui se traduit par des courbes présentant des allures proches et décroissantes après leur démarrage avec une DO=0.5. Les densités optiques à 24 h sont de 0.480 ± 0.001 (10%), 0.472 ± 0.002 (8%), 0.470 ± 0.002 (6%), 0.438 ± 0.003 (4%) et 0.425 ± 0.005 (2%), se traduisant une augmentation des concentrations en acide acétique allant 2% jusqu'à 10%. En absence de l'acide acétique, la souche se développe lentement avec des densités se situant entre 0.575 ± 0.006 et 0.562 ± 0.006 (fig. 23).

Les densités optiques de *Gluconobacter oxydans* subsp. *industrius* obtenues durant 72 h en ordre décroissant et de 0.671 ± 0.002 (4%), 0.634 ± 0.002 (6%), 0.630 ± 0.019 (2%), 0.615 ± 0.020 (8%) et 0.561 ± 0.033 (10%). Une diminution du 72 h au 168 h 0.434 ± 0.007 (4%), 0.402 ± 0.006

(6%), 0.427 ± 0.013 (2%), 0.398 ± 0.003 (8%) et 0.468 ± 0.004 (10%) (fig. 24).

La culture de la souche *Gluconobacter oxydans* subsp. *industrius* en absence de l'acide acétique (0%) reste réduite entre 0.580 ± 0.005 (120h) et 0.530 ± 0.001 (168h).

La phase exponentielle après 24h, peut être expliquée par une adaptation exceptionnelle, et assimilation de l'excès d'acide produit et additionné au milieu par la shunte de glyoxylate. Mais la deuxième phase de déclin (du 72h au 168h), peut être due à l'incapacité de *Gluconobacter oxydans* subsp. *industrius* à répondre à un stress par accumulation d'acide acétique dans le milieu à cause de ce qui cause la lyse des cellules (fig. 24).

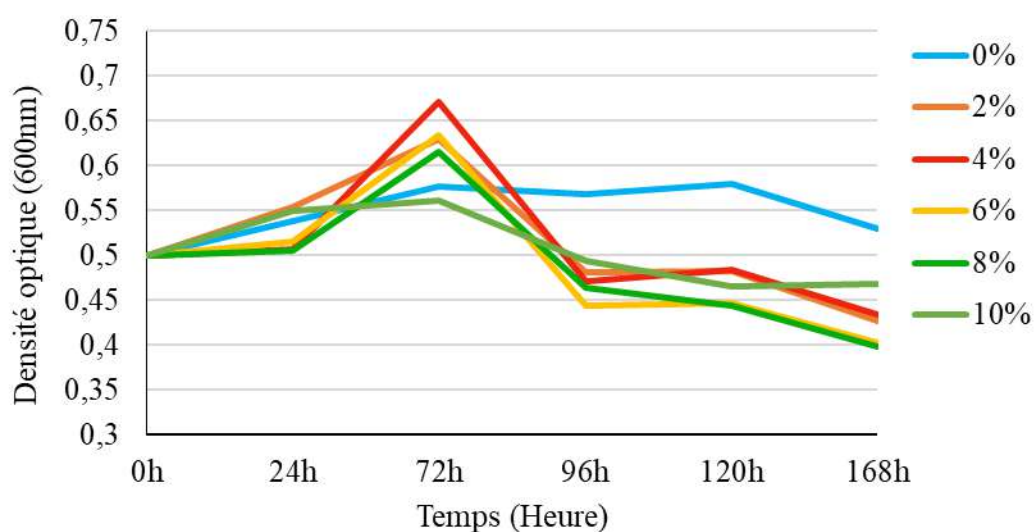


Figure 24.- Effet de l'acide acétique la souche *Gluconobacter oxydans* subsp. *industrius* issus de vinaigre traditionnel des dattes

Les souches expérimentées à différentes concentrations d'acide acétique, ont révélé une tolérance totale jusqu'au 10% (pH= 2.94), à l'exception d'*Acetobacter pasteurianus* subsp. *lovanensis*. La tolérance est dans l'ordre qui suit *Acetobacter aceti* subsp. *aceti*, *Acetobacter aceti* subsp. *orleanensis*, *Acetobacter aceti* subsp. *liquifaciens*, *Acetobacter pasteurianus* subsp. *ascendens*, et *Gluconobacter oxydans* subsp. *industrius*) (tab. 15).

Tableau 15.- Croissance des bactéries acétiques à différente concentration de l'acide acétique (Très bonne: +++, bonne: ++, modéré: +, mauvaise: -, très mauvaise: ---)

Souche	Concentration					
	0%	2%	4%	6%	8%	10%
<i>Acetobacter aceti</i> subsp. <i>aceti</i>	+	+	++	+++	++	++
<i>Acetobacter aceti</i> subsp. <i>liquifaciens</i>	+	++	+++	++	+	+
<i>Acetobacter aceti</i> subsp. <i>orleanensis</i>	+	+	+	+	+++	++
<i>Acetobacter pasteurianus</i> subsp. <i>ascendens</i>	+	+++	+++	+++	++	+
<i>Acetobacter pasteurianus</i> subsp. <i>lovanensis</i>	+	---	---	-	-	-
<i>Gluconobacter oxydans</i> subsp. <i>industrius</i>	+	++	+++	++	++	+

En absence d'acide acétique, la croissance des souches reste pratiquement constante. C'est peut-être dû à l'absence d'acide qui réprime la croissance, l'acide acétique était un activateur de croissance des bactéries jusqu'à la valeur de 2% d'acide pour une plus forte concentration (Multon, 1999). L'activité de l'ADH est beaucoup plus stable dans des conditions acides chez les bactéries du genre *Acetobacter* que les bactéries du genre *Gluconobacter*, ce qui explique que les *Acetobacter* produisent une quantité plus élevée d'acide acétique (Longin, 2016).

Parmi les mécanismes d'adaptation aux réponses à un stress environnemental toxique, le changement des composants membranaires cellulaires cité par Matsushita *et al.* (2007). Dans le cas de l'acide acétique protoné, forme non chargée de cet acide, pénètre facilement à travers la membrane microbienne et se dissocie à l'intérieur de la cellule à un pH plus élevé du cytoplasme bactérien. Les produits, en particulier les H^+ libérés, mais aussi CH_3COO^- , sont toxiques pour la cellule. Au cours de la production de vinaigre, les cellules sont non seulement exposées à l'acide acétique présenté déjà comme l'un des composants dans le milieu de croissance, mais en outre à l'acide acétique produits à partir de l'éthanol. Le processus d'oxydation est effectué par des enzymes liés à la surface périplasmique de la membrane cytoplasmique interne. L'acide acétique produit passivement diffuse dans le cytoplasme et est probablement transporté hors de la cellule par une pompe à efflux. À côté de ce système d'efflux, la cellule doit en outre s'adapter à des concentrations élevées d'acide acétique dans sa membrane et empêcher la diffusion de l'acide acétique dans le cytoplasme (Matsushita *et al.*, 2007).

Les souches d'*Acetobacter* acidophiles isolées par Saeki *et al.* (1997), ont tolérées de 15 à 21% d'acide acétique mais leur optimale croissance se situant entre 4 et 8%.

Le pH optimal pour la croissance et la production d'acide acétique, avait une gamme plus large allant du 3 à 5. Les bactéries acétiques sont également capables de croître à des valeurs de pH inférieures où l'activité bactérienne a été détectée pour des valeurs de pH inférieures à 3 (Sharafi *et al.*, 2010).

L'enzyme citrate synthétase joue un rôle clé dans la résistance des bactéries acétiques, qui détoxifie l'acide acétique par incorporation dans le cycle tricarboxylique ou la shunte de glyoxylate. La synthèse de citrate pourrait également fournir les grandes quantités d'ATP nécessaires pour surmonter l'effet toxique de l'acide acétique. Une souche d'*Acetobacter* a abaissé son pH interne comme réponse au pH externe inférieur. La bactérie était encore capable de se développer avec une petite variation de pH existant au-dessus de la membrane cellulaire. Cependant, l'adaptation à des concentrations élevées d'acétate semble être une condition préalable de tolérance élevée (Du Toit et Pretorius, 2002).

Le transcriptome analysé a indiqué que l'éthanol réprime de manière significative le cycle de TCA au niveau transcriptionnel pour *A. aceti* NBRC 14818. La faible activité du cycle TCA peut expliquer pourquoi l'acétate produit est accumulé. Pendant l'oxydation incomplète de l'éthanol par les bactéries acétiques, l'éthanol est exclusivement utilisé comme source d'énergie

(au niveau périplasmique), et le cycle TCA ne fonctionne que pour répondre à la demande de synthèse de matériaux cellulaires. Ainsi, il doit y avoir un régulateur transcriptionnel globale pour *A. aceti* qui réprime les gènes du cycle TCA en présence d'éthanol (Matsushita *et al.*, 2016).

Lorsque l'éthanol et le glucose sont tous deux présents dans le milieu de culture, le métabolisme de débordement du glucose pourrait se produire pour *A. aceti* NBRC 14818 en raison de la répression éthanol-négociée des gènes de cycle de TCA et des niveaux relativement élevés d'expression genes de l'enzyme glycolytique. Un tel métabolisme de débordement accélère l'accumulation cytoplasmique de l'acétate et de l'acétyl-CoA, qui empêchent l'oxydation d'éthanol dans le cytoplasme, et mène à l'oxydation incomplète de l'éthanol dans le periplasm. Une carence dans la voie glyoxylate favorise le métabolisme de débordement du glucose et est bénéfique pour la production industrielle de vinaigre à partir de l'éthanol (Matsushita *et al.*, 2016).

II.3.8.- Etude de pouvoir acidifiant des bactéries acétiques

Vue l'origine des bacteries étudiées (indigènes), l'étude est basée sur l'effet de différentes températures sur leurs activités. Les sept souches isolées des vinaigres traditionnels de dattes (*Acetobacter aceti* subsp. *aceti*, *Acetobacter aceti* subsp. *liquifaciens*, *Acetobacter aceti* subsp. *orleanensis*, *Acetobacter pasteurianus* subsp. *ascendens*, *Acetobacter pasteurianus* subsp. *lovaniensis*, *Acetobacter pasteurianus* subsp. *pasteurianum* et *Gluconobacter oxydans* subsp. *Industrius*) sont testées pour leur performance et leur activité à différentes températures (30°C, 35°C, 40°C, 45°C, 50°C, 55°C, 60°C). Par ailleurs, l'étude ne concerne pas la souche *Acetobacter aceti* subsp. *xylinum* qui est très intéressante pour produire la biocellulose de haute qualité et néfaste dans la qualité organoleptique du vinaigre en empêchant la bonne rentabilité.

Tout d'abord, l'acide acétique ajouté dans le milieu de culture formulé à 2% au début est consommé par les souches d'acétobacters, avant de commencer leur propre production (tab. 16-22).

La souche *Acetobacter aceti* subsp. *aceti* se développe à 40°C avec un maximum de densité optique à 120h de 3.3 ± 0.0005 , avec productivité d'acide acétique de 3.02% à 40°C et 120h. Dans l'intervalle de température de 30°C à 50°C, des densités optiques sont les plus élevées, d'où une bonne reproduction à 40°C (tab. 16).

La souche *Acetobacter aceti* subsp. *liquifaciens*, atteint son maximum de croissance à 40°C avec une densité optique de 2.888 ± 0.002 (120h) et une production modérée de 1.76% (48h). Entre 30°C et 50°C la croissance parait appréciable, mais la production en acide acétique n'atteint son maximum qu'à 45°C pour 2.84% d'acidité à 120h (tab.17).

Tableau 16.- Productivité de la souche *Acetobacter aceti* subsp. *aceti*

		0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
30°C	DO	0.5±0.001	0.62±0.024	1.6±0.037	1.1±0.010	1.36±0.005	2.21±0.006
	Acidité %	2	0.92	1.16	0.92	1.46	2.84
35°C	DO	0.5±0.001	0.22±0.001	0.22±0.009	0.04±0.010	0.15±0.004	0.49±0.002
	Acidité %	2	1.4	1.04	0.98	1.16	2.96
40°C	DO	0.5±0.001	2.48±0.007	2.534±0.001	2.972±0.011	2.764±0.010	3.3±0.0005
	Acidité %	2	1.94	2.06	2.24	2.84	3.02
45 °C	DO	0.5±0.001	1.404±0.001	1.138±0.003	1.001±0.015	0.921±0.001	1.3±0.019
	Acidité %	2	1.1	1.46	1.58	1.58	2
50°C	DO	0.5±0.001	0.774±0.002	2.198±0.027	2.231±0.004	2.436±0.003	2.423±0.002
	Acidité %	2	1.46	1.46	1.84	1.16	1.28
55°C	DO	0.5±0.001	2.161±0.0057	1.472±0.006	1.494±0.008	0.552±0.008	0.002±0.001
	Acidité %	2	1.34	1.52	1.04	1.04	1.04
60°C	DO	0.5±0.001	1.329±0.002	1.233±0.0005	1.266±0.002	0.002±0.001	0
	Acidité %	2	0.92	0.72	1.16	1.16	1.16

Tableau 17.- Productivité de la souche *Acetobacter aceti* subsp. *liquifaciens*

		0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
30°C	DO	0.5±0.001	0.3±0.005	0.3±0.005	1.25±0.004	2.4±0.0015	2.1±0.002
	Acidité %	2	0.86	0.8	0.8	1.7	1.94
35°C	DO	0.5±0.001	0.11±0.004	0.8±0.0005	1.2±0.0011	1.39±0.053	2.16±0.030
	Acidité %	2	1.46	0.86	1.16	0.92	1.76
40°C	DO	0.5±0.001	1.002±0.001	2.1±0.002	2.629±0.001	2.602±0.010	2.888±0.002
	Acidité %	2	1.1	1.76	1.22	1.16	1.34
45°C	DO	0.5±0.001	0.971±0.001	1.896±0.003	1.518±0.003	1.709±0.003	1.339±0.001
	Acidité %	2	1.46	2.18	1.52	1.76	2.84
50°C	DO	0.5±0.001	0.534±0.037	0.48±0.004	1.005±0.003	1.855±0.002	1.859±0.005
	Acidité %	2	1.28	1.28	1.4	1.16	1.76
55°C	DO	0.5±0.001	1.656±0.0022	1.637±0.009	1.303±0.0017	0.94±0.004	0
	Acidité %	2	0.86	0.92	0.92	0.92	0.92
60°C	DO	0.5±0.001	0.903±0.001	0.639±0.001	0.545±0.002	0	0
	Acidité %	2	0.62	0.74	0.74	0.74	0.74

Les densités optiques appréciables sont enregistrées entre 30°C, 35°C, 40°C et 50°C avec 2.73±0.001, 2.54±0.001, 3.3±0.005 et 2.773±0.004 respectivement après 120h avec des acétifications de 3.56%, 2.64%, 2.3% et 2.24% respectivement (tab. 18).

Tableau 18.- Productivité de la souche *Acetobacter aceti* subsp. *orleanensis*

		0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
30°C	DO	0.5±0.001	0.44±0.002	1.5±0.008	1.3±0.001	2.16±0.005	2.73±0.001
	Acidité %	2	1.04	1.1	0.8	1.04	3.56
35°C	DO	0.5±0.001	0.11±0.001	0.06±0.008	0.28±0.002	1.25±0.005	2.54±0.001
	Acidité %	2	1.04	0.8	0.8	1.16	2.84
40°C	DO	0.5±0.001	0.997±0.001	2.317±0.001	2.974±0.010	2.949±0.009	3.3±0.005
	Acidité %	2	1.22	1.34	2	1.82	2.3
45°C	DO	0.5±0.001	1.397±0.007	1.07±0.009	1.561±0.003	1.58±0.001	1.042±0.003
	Acidité %	2	1.46	1.52	2.18	2.3	2.24
50°C	DO	0.5±0.001	0.594±0.001	1.716±0.037	2.42±0.015	2.61±0.004	2.773±0.004
	Acidité %	2	1.52	0.92	1.28	0.92	1.04
55°C	DO	0.5±0.001	1.31±0.003	1.938±0.0005	1.111±0.0005	0.687±0.004	0.005±0.002
	Acidité %	2	1.22	1.16	1.16	1.16	1.16
60°C	DO	0.5±0.001	1.508±0.005	1.534±0.007	1.479±0.004	0.05±0.002	0
	Acidité %	2	0.86	0.92	0.86	0.86	0.86

Tableau 19.- Productivité de la souche *Acetobacter pasteurianus* subsp. *ascendens*

		0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
30°C	DO	0.5±0.001	0.66±0.003	1±0.001	1.11±0.0005	1.79±0.004	2.35±0.001
	Acidité %	2	1.1	1.34	0.86	1.16	3.5
35°C	DO	0.5±0.001	0.11±0.008	0.11±0.003	0.89±0.0005	1.85±0.001	2.27±0.004
	Acidité %	2	0.92	0.86	1.28	1.16	3.5
40°C	DO	0.5±0.001	0.764±0.004	2.125±0.005	2.693±0.003	2.437±0.004	2.779±0.003
	Acidité %	2	1.34	1.82	2.12	1.7	2.9
45°C	DO	0.5±0.001	1.356±0.005	2.202±0	1.528±0.003	2.003±0.002	1.61±0.001
	Acidité %	2	1.16	2.8	1.64	2.78	2
50°C	DO	0.5±0.001	0.712±0.002	1.234±0.004	1.765±0.005	1.743±0.004	1.858±0.003
	Acidité %	2	1.04	1.22	1.28	1.76	1.16
55°C	DO	0.5±0.001	0.744±0.0005	0.437±0.0005	1.509±0.004	0.632±0.004	0
	Acidité %	2	1.22	1.04	1.34	1.34	1.34
60°C	DO	0.5±0.001	1.18±0.009	1.171±0.006	1.232±0.001	0.005±0.002	0
	Acidité %	2	0.86	0.84	1.22	1.22	1.22

Pour la densité optique de la souche *Acetobacter pasteurianus* subsp. *ascendens* testé, 30°C, 35°C et 40°C représentent les meilleures températures de développement à 120h avec des densités optiques de 2.35±0.001 (30°C), 2.27±0.004 (35°C) et 2.779±0.003 (40°C) pour des concentrations d'acide acétique de 3.5% (30°C et 35°C) et 2.9% (40°C). La souche a marqué une densité optique de 2.003±0.002 et une production de 2.78% après 96h (45°C) (tab. 19).

Tableau 20.- Productivité de la souche *Acetobacter pasteurianus* subsp. *lovaniensis*

		0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
30°C	DO	0.5±0.001	0.22±0.002	0.8±0.001	0.55±0.001	1.8±0.002	2.3±0.008
	Acidité %	2	1.34	1.46	0.74	1.04	1.7
35°C	DO	0.5±0.001	0.09±0.005	0.09±0.002	0.01±0.005	0.1±0.006	0.79±0.0005
	Acidité %	2	1.22	1.16	0.8	1.1	2.12
40°C	DO	0.5±0.001	1.37±0.001	2.27±0.004	2.693±0.001	2.387±0.003	2.86±0.028
	Acidité %	2	1.22	1.7	1.7	1.4	2
45°C	DO	0.5±0.001	2.112±0.001	299±0.003	1.461±0.003	2.517±0.015	3.3±0
	Acidité %	2	1.58	1.94	1.4	1.94	1.46
50°C	DO	0.5±0.001	0.506±0.001	0.547±0.002	1.902±0.004	2.341±0.001	2.512±0.003
	Acidité %	2	1.64	1.4	1.58	1.22	0.86
55°C	DO	0.5±0.001	1.819±0.0005	1.239±0.003	1.752±0.001	0.567±0.001	0
	Acidité %	2	0.86	0.92	0.92	0.92	0.92
60°C	DO	0.5±0.001	1.413±0.002	1.389±0.001	1.303±0.003	0.005±0.001	0.001±0.02
	Acidité %	2	0.86	1.22	0.92	0.92	0.92

Les résultats du tableau 20 de la productivité de la souche *Acetobacter pasteurianus* subsp. *lovaniensis* ont révélé un rendement de croissance entre 40°C et 50°C avec une densité optique situant entre 2.3±0.008 (120h) à 30°C et 3.3±0 (120h) à 45°C. Néanmoins, la meilleure production en acide acétique est réalisée à des températures plus basses (30°C et 45°C), avec un maximum de 2.12% (120h) à 35°C.

Tableau 21.- Productivité de la souche *Acetobacter pasteurianus* subsp. *pasteurianum*

		0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
30°C	DO	0.5±0.001	0.44±0.0023	0.18±0.015	1.04±0.001	1.37±0.009	2.2±0.0005
	Acidité %	2	0.95	0.86	0.86	1.1	2.54
35°C	DO	0.5±0.001	0.2±0.0005	0.41±0.0011	0.33±0.001	1.41±0.0005	2.54±0.005
	Acidité %	2	1.34	0.98	0.8	0.98	2.9
40°C	DO	0.5±0.001	0.794±0.002	2.368±0.001	2.814±0.001	2.717±0.001	2.906±0.005
	Acidité %	2	0.92	1.4	1.4	1.76	1.04
45°C	DO	0.5±0.001	1.934±0.006	1.352±0.001	1.461±0.002	2.812±0.006	2.055±0.002
	Acidité %	2	2.18	1.7	2.06	3.02	2.78
50°C	DO	0.5±0.001	0.383±0.005	1.483±0.010	2.285±0.006	2.61±0.026	2.632±0.003
	Acidité %	2	1.34	1.52	1.16	1.10	1.58
55°C	DO	0.5±0.001	0.582±0.004	1.219±0.003	1.313±0.005	0.804±0.001	0
	Acidité %	2	1.22	2.18	2.18	2.12	2.12
60°C	DO	0.5±0.001	0.829±0.007	0.722±0.001	0.736±0.002	0.002±0.0005	0
	Acidité %	2	0.86	1.04	0.8	0.8	0.8

Acetobacter pasteurianus subsp. *pasteurianum* a montré une croissance marquée dans un intervalle de températures (30°C et 50°C) correspond aux densités optiques 2.055 ± 0.002 (120h) à 45°C et 2.906 ± 0.005 C (120h) à 40°C. En parallèle, la production maximale d'acide acétique reste 3.02% (96h) à 45°C, 2.9% (120h) à 35°C et 2.54 (120h) à 30°C (tab. 21).

Pour les températures inférieures à 55°C, il a été noté de meilleures densités optiques avec un maximum à 120h (2.864 ± 0.022 en 40°C). Le maximum de l'acide acétique produit après 96h, par *Gluconobacter oxydans* subsp. *industrius* est de 2.18% à 45°C (tab. 22).

Tableau 22.- Productivité de la souche *Gluconobacter oxydans* subsp. *industrius*

		0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
30°C	DO	0.5 ± 0.001	0.11 ± 0.005	0.44 ± 0.001	1 ± 0.001	1.07 ± 0.004	2.04 ± 0.006
	Acidité %	2	0.74	0.92	0.92	0.86	0.8
35°C	DO	0.5 ± 0.001	0.33 ± 0.001	0.33 ± 0.002	0.14 ± 0.001	0.98 ± 0.006	1.64 ± 0.004
	Acidité %	2	1.34	0.98	1.1	1.4	1.34
40°C	DO	0.5 ± 0.001	0.62 ± 0.001	2.274 ± 0.001	2.976 ± 0.005	2.638 ± 0.001	2.864 ± 0.022
	Acidité %	2	1.16	0.92	1.58	1.46	1.4
45°C	DO	0.5 ± 0.001	1.23 ± 0.005	1.962 ± 0.008	2.666 ± 0.009	1.817 ± 0.004	2.488 ± 0.004
	Acidité %	2	1.34	1.7	2	2.18	1.94
50°C	DO	0.5 ± 0.001	0.728 ± 0.004	2.123 ± 0.007	1.982 ± 0.003	2.137 ± 0.005	2.17 ± 0.003
	Acidité %	2	1.22	1.22	1.34	1.04	0.86
55°C	DO	0.5 ± 0.001	0.918 ± 0.002	2.052 ± 0.002	1.78 ± 0.0005	0.567 ± 0.001	0
	Acidité %	2	1.42	2.18	2.18	2.12	2.12
60°C	DO	0.5 ± 0.001	1.445 ± 0.001	1.371 ± 0.0005	1.294 ± 0.0005	0.005 ± 0.005	0
	Acidité %	2	0.86	0.74	0.74	0.74	0.8

Toutes les souches tolèrent des températures allant jusqu'à 60°C, et aux alentours de 40°C se situent leur température optimale de croissance et de productivité. Par contre, les températures élevées de 55°C et 60°C, ne sont pas adéquates ni à une bonne croissance ni à une production rentable des souches issues des vinaigres traditionnels de dattes. Ces hautes températures se situant entre 35°C et 60°C sont celles enregistrées dans la cuvette de Ouargla, vu les conditions climatiques durant la période estivale dans cette zone aride (Le Hourou, 1990).

La comparaison de comportement des sept souches testées à différentes températures (tab. 23), laisse apparaître que la souche *Acetobacter aceti* subsp. *orleanensis* (3.56%, 30°C) donne le meilleur rendement de production. Pour des températures plus hautes, il est à retenir les souches *Acetobacter pasteurianus* subsp. *ascendens* (3.5%, 30 et 35°C), *Acetobacter pasteurianus* subsp. *pasteurianum* (3.02%, 45°C), *Acetobacter aceti* subsp. *aceti* (3.02%, 40°C). Il a été trouvé que les analyses physicochimiques des échantillons de vinaigres traditionnels de dattes présentent des acidités titrables allant de 78.4 ± 2.10 g/l pour Dn26 à base de cultivar Deglet-Nour à 7.7 ± 0.10 g/l pour l'échantillon Hr49 issu de cultivar Harchaya (tab. 1).

Tableau 23.- Croissance optimum et productivité d'acide acétique des bactéries acétiques

Souche	Densité optique	Acide acétique (%)	Temps (heure)
<i>Acetobacter aceti</i> subsp. <i>aceti</i>	3.3±0.0005 (40°C)	3.02 (40°C)	120
<i>Acetobacter aceti</i> subsp. <i>liquifaciens</i>	2.888±0.002 (40°C)	2.84 (45°C)	120
<i>Acetobacter aceti</i> subsp. <i>orleanensis</i>	3.3±0.005 (40°C)	3.56 (30°C)	120
<i>Acetobacter pasteurianus</i> subsp. <i>ascendens</i>	2.779±0.003 (40°C)	3.5 (30 et 35°C)	120
<i>Acetobacter pasteurianus</i> subsp. <i>lovaniensis</i>	3.3±0 (45°C)	2.12 (35°C)	120
<i>Acetobacter pasteurianus</i> subsp. <i>pasteurianum</i>	2.906±0.005 (40°C)	3.02 (45°C)	120/ 96
<i>Gluconobacter oxydans</i> subsp. <i>industrius</i>	2.864±0.022 (40°C)	2.18 (45°C)	120/ 96

Les souches d'*Acetobacters* isolées à partir des échantillons du vinaigre traditionnel de dattes des cultivars Deglet-Nour, Hamraya et Harchaya, peuvent s'adapter rapidement aux conditions extrêmes telles que des températures élevées de 35°C à 60°C, ceci peut s'expliquer par une possible tolérance aux températures. La température constitue un des paramètres majeurs influençant le développement des bactéries au sein des aliments (vinaigre) et de l'environnement (Prescott *et al.*, 2003). Pour la présente étude, le phénotype de la thermotolérance des bactéries acétiques est due à une adaptation thermique (Matsutani *et al.*, 2016) au climat du Sahara algérien. Par ailleurs, la plupart des espèces des bactéries acétiques peuvent se développer à 37°C mais pas à 45°C pour Matsushita *et al.* (2016). Les souches des bactéries acétiques isolées à partir des dattes Iranien détériorés peuvent tolérer des températures de 36 à 38°C (Beheshti-Maal, 2014). Mounir *et al.* (2016), signalent que toutes les souches d'*Acetobacter* sauf les souches de vinaigre traditionnel de dattes et de pomme se développent parfaitement entre 35°C et 41°C. Pour Beheshti-Maal et Shafiee (2010), 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 sa croissance pourrait augmenter avec les modifications du milieu de Carr par des concentrations d'éthanol de 2.5% et 5% à 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 pousser à 40°C. En 1980, Ohmori *et al.*, ont obtenu une souche *A. aceti* subsp *aceti*, isolée à partir du mout du vinaigre, des sols des usines du vinaigre et des fruits, qui présente une meilleure activité à 35°C, mais cette activité a totalement disparu à 38°C. Beheshti-Maal *et al.* (2019) constatent qu'avec l'augmentation de la température, la croissance et la production d'acide chez *Acetobacter ghanensis* KBMNS-IAUF-6 issue des bananes, diminue dans le milieu de culture. Beheshti-Maal et Shafiee (2019), ont confirmé que la température et le pourcentage d'éthanol étaient les facteurs significatifs de la production d'acide acétique par l'*Acetobacter pasteurianus* KBMNS-IAUF-2. Ainsi, de petites variations de la température et de la quantité d'éthanol ont eu un effet significatif sur le taux de production d'acide acétique. Généralement, la production industrielle de l'acide acétique de certaines espèces de bactéries acétiques est effectuée à 25-30 °C. La chaleur est habituellement générée pendant le processus de fermentation, ce qui entraîne une augmentation de la température, laquelle a un effet limitant

important sur la croissance des cellules bactériennes. Les températures élevées peuvent affecter la cellule bactérienne en endommageant les membranes cellulaires et en dénaturant les biomolécules tels que l'ADN, l'ARN, les protéines, les ribosomes et les enzymes (Taweecheep *et al.*, 2019).

L'examen bioinformatique de génome de la souche AIU 301 d'*Acidiphilium multivorum* (une bactérie Gram-négative acidophile et aérobie) et *A. pasteurianus* 386B a été étudié afin de déterminer les voies métaboliques potentielles associées à la production d'acides organiques et à l'absorption de métaux par Micciche *et al.* (2020). Ce qui dévoile que les deux souches partagent les voies de l'aldéhyde et de l'alcool déshydrogénase, qui sont utilisées dans la production de vinaigre. 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'*Acetobacters*, et l'ADH était plus Thermosensible que l'ALDH. 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 avec et sans éthanol et ont été comparés avec *A. pasteurianus* mésophile. Les résultats ont révélé que les activités ADH et ALDH des souches thermotolérantes 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. 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.

Les bactéries acétiques ont été développées pour résister à ces facteurs de stress, ce qui a permis d'acquérir la capacité de résistance caractéristique. En fait, il a été signalé que des chaperons moléculaires comprenant des protéines de choc thermique, la ClpB, le système DnaK-DnaJ-GrpE et le système GroESGroEL sont induits par des facteurs de stress tels que la chaleur, l'éthanol et l'acide acétique pendant la fermentation de l'acide acétique (Taweecheep *et al.*, 2019). Les organismes répondent au stress thermique en induisant la synthèse d'un groupe de protéines hautement conservées appelées Hsps. Les Hsps forment un groupe de protéines corégulées dont la vitesse de synthèse varie avec la température mais augmente rapidement après une augmentation soudaine de la température ou en réponse à d'autres stress environnementaux. En plus de jouer un rôle important dans la thermotolérance et de faire face à d'autres stress physiologiques, les Hsps jouent un rôle vital dans le fonctionnement normal des cellules en agissant comme chaperons pour favoriser le repliement de la plupart des protéines cellulaires et la protéolyse des protéines potentiellement délétères et mal repliées (Konkel *et al.*, 1998). La réponse au choc thermique implique l'induction de nombreuses protéines appelées protéines de choc thermique, ou Hsp, en réponse aux variations de température. Les Hsp comprennent des chaperons et des protéases qui sont vraisemblablement essentiels pour surmonter les changements qui impliquent la dénaturation des protéines (Maleki *et al.*, 2016).

Au vu des résultats obtenus de productivité se situant entre 2.12% (35°C) et 3.56% (30°C), par rapport à ceux de Beheshti-Maal et Shafiee (2019) qui rapportent un taux de production d'acide acétique de 97% (34°C); Klawpiyapamornkun et al. (2015), Diba et al. (2015) et Hutchinson et al. (2019) ont signalé des taux de production d'acide acétique de 60% (28°C), ils sont faibles. Le mode d'ensemencement de la culture mère peut influencer sur le rendement de la souche. Beheshti-Maal et Shafiee (2019), ont utilisé un acéteur miniature équipé d'un système d'aération par barbotage et toutes les 24 heures, 2% d'éthanol (v/v) étaient progressivement ajoutés à l'acéteur pour atteindre une concentration de 8.87% pendant 120 heures. Klawpiyapamornkun et al. (2015), ont signalé que la quantité d'acide acétique produite par les isolats de bactéries acétiques en utilisant l'aération par agitateur rotatif a été calculée du 1.78 au 1.81% après 24 heures. Des taux d'acide acétique produit allant de 3 au 9.6% à 37°C après 72 heures ont été indiqués par les isolats de Diba et al. (2015) dans le milieu GYEA. Hutchinson et al. (2019), ont montré une amélioration des taux d'acétification lorsque les cellules étaient immobilisées sur les épis de maïs dans des conditions statiques. De plus, une faible aération a montré de meilleurs taux d'acétification (1.45-1.56 g-L-jour-1), tandis que seules les cellules en suspension ont pu achever les fermentations (1.2 g-L-jour-1) dans des conditions d'aération élevée.

Taweecheep et al. (2019), ont obtenu 3 souches thermotolérantes après modification génétique (*Komagataeibacter oboediens* MSKU 3, la souche T4 et la souche E3). Elles tolèrent les températures allant de 37°C à 39°C. Elles pouvaient produire une acidité de 2.82% avec 3% d'éthanol à 39°C et de 3.54% avec 5.5% d'éthanol à 37°C pour T4 et E3. Contrairement à la souche parentale, MSKU 3, aucune production d'acide acétique ni à 39°C ni à 5.5 % d'éthanol. En outre, l'analyse de la cartographie du génome des souches T4 et E3 par rapport au génome de la souche parentale MSKU 3 a révélé plusieurs gènes mutés qui sont associés à la thermotolérance ou à l'adaptation à l'éthanol. Ceci nécessite l'amélioration de la souche *Komagataeibacter oboediens* pour améliorer encore la fermentation du vinaigre avec une forte concentration d'éthanol à haute température (Taweecheep et al., 2019).

Krusong et al. (2020), ont testé l'acétification des cellules bactériennes avec de l'oxygène dissous de 3.5 à 4.5 ppm à 35±1°C. Le rendement obtenu est de 2.857±0.1-6.3±0.2 g/L/jour d'acide acétique avec une croissance maximale des cellules. L'immobilisation des bactéries acétiques sur un support composé d'une matrice d'éponge de luffa avec recyclage de l'oxygène dans le milieu donne des rendements élevés jusqu'à 77.3%.

La formulation de la culture peut être simple (une seule souche) ou complexe sous forme d'un consortium microbien (composé de plusieurs souches) jouant un rôle dans l'efficacité de procédé industriel. Matsushita et al. (2016), rapportent que l'utilisation d'un mélange de différentes souches de bactéries acétiques comme culture mère bactérienne dans la production de vinaigre a été utile pour la production de vinaigre et facile à optimiser à l'échelle du processus de fermentation.

Les résultats de l'analyse de la variance mentionné dans le tableau 24 ont montré un effet très hautement significatif des paramètres microbiologiques (F de Fisher = 26.742; Pr < 0.0001). De ce faite les facteurs abiotiques environnementaux influent sur la microflore acétique, par conséquence sur la diversité microbienne et la qualité des vinaigres traditionnels de dattes.

Tableau 24.- Analyse de la variance appliquée aux paramètres microbiologiques des vinaigres traditionnels de dattes (Ddl: degré de liberté; Pr: probabilité)

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	24	133.988	5.583	26.742	<0.0001
Erreur	150	31.315	0.209		
Total corrigé	174	165.303			

Tableau 25.- Coefficients normalisés (Variable) de l'analyse de la variance appliquée aux paramètres microbiologiques des vinaigres traditionnels de dattes

Source	Valeur	Erreur standard	t	Pr > t	Borne inférieure (95%)	Borne supérieure (95%)
Paramètres-Aa% 30°C	0.386	0.049	7.846	<0.0001	0.289	0.484
Paramètres-Aa% 35°C	0.402	0.049	8.162	<0.0001	0.305	0.499
Paramètres-Aa% 40°C	0.303	0.049	6.161	<0.0001	0.206	0.401
Paramètres-Aa% 45°C	0.354	0.049	7.179	<0.0001	0.256	0.451
Paramètres-Aa% 50°C	0.146	0.049	2.967	0.003	0.049	0.243
Paramètres-Aa% 55°C	0.177	0.049	3.599	0.000	0.080	0.275
Paramètres-Aa% 60°C	0.087	0.049	1.774	0.078	-0.010	0.185
Paramètres-Ac 0%	-0.001	0.049	-0.030	0.976	-0.099	0.096
Paramètres-Ac 10%	-0.004	0.049	-0.084	0.933	-0.101	0.093
Paramètres-Ac 2%	-0.001	0.049	-0.011	0.991	-0.098	0.097
Paramètres-Ac 4%	0.010	0.049	0.208	0.835	-0.087	0.108
Paramètres-Ac 6%	0.008	0.049	0.173	0.863	-0.089	0.106
Paramètres-Ac 8%	0.001	0.049	0.019	0.985	-0.096	0.098
Paramètres-DO 30°C	0.359	0.049	7.290	<0.0001	0.262	0.456
Paramètres-DO 35°C	0.258	0.049	5.243	<0.0001	0.161	0.355
Paramètres-DO 40°C	0.502	0.049	10.195	<0.0001	0.405	0.599
Paramètres-DO 45°C	0.278	0.049	5.655	<0.0001	0.181	0.376
Paramètres-DO 50°C	0.368	0.049	7.464	<0.0001	0.270	0.465
Paramètres-DO 55°C	-0.100	0.049	-2.024	0.045	-0.197	-0.002
Paramètres-DO 60°C	-0.071	0.049	-1.443	0.151	-0.168	0.026
Paramètres-Eth 10%	0.004	0.049	0.083	0.934	-0.093	0.101
Paramètres-Eth 2%	0.013	0.049	0.268	0.789	-0.084	0.111
Paramètres-Eth 4%	0.002	0.049	0.031	0.975	-0.096	0.099
Paramètres-Eth 6%	0.002	0.049	0.032	0.974	-0.096	0.099
Paramètres-Eth 8%	0.000	0.000				

Le tableau 25 laisse apparaître un effet très hautement significatif de l'acide acétique produit à 30°C, 35°C, 40°C, 45°C, et 55°C ($Pr < 0.0001$) et à 50°C ($Pr < 0.005$) par les souches isolées, et son influence sur la qualité des vinaigres traditionnels de dattes étudiées. En parallèle, les densités optiques à 30°C, 35°C, 40°C, 45°C, et 50°C ($Pr < 0.0001$) et à 55°C ($Pr < 0.005$) ont montré des effets très hauts significatifs. Cependant, il est prouvé que pour l'acide acétique produit à 60°C, les concentrations du 0% au 10% d'acide acétique, la densité optique obtenue à 60°C, la concentration de 2%, 4%, 6% et 10% d'éthanol, la variation n'est pas significative et les variables sont homogènes ($Pr > 0.005$). Pour la concentration de 8% d'éthanol, l'erreur standard est nul, donc il n'y a pas de variation, comme indique le tableau 25, presque la croissance de toutes les souches dévoile une homogénéité.

Dans le tableau des moyennes (tab. 26), il est apparu que la densité optique à 40°C a le plus grand effet (2.985), par contre la densité optique à 55°C présente le moindre d'effet (0.001) sur activité des souches issues des vinaigres traditionnels de dattes.

Tableau 26.- Moyennes estimées pour le facteur paramètres microbiologiques des vinaigres traditionnels de dattes

Modalité	Moyenne estimées	Erreur standard	Borne inférieure (95%)	Borne supérieure (95%)
Aa% 30°C	2.411	0.173	2.070	2.753
Aa% 35°C	2.489	0.173	2.147	2.830
Aa% 40°C	2.000	0.173	1.659	2.341
Aa% 45°C	2.249	0.173	1.907	2.590
Aa% 50°C	1.220	0.173	0.879	1.561
Aa% 55°C	1.374	0.173	1.033	1.716
Aa% 60°C	0.929	0.173	0.587	1.270
Ac 0%	0.488	0.173	0.147	0.829
Ac 10%	0.475	0.173	0.133	0.816
Ac 2%	0.493	0.173	0.151	0.834
Ac 4%	0.546	0.173	0.205	0.887
Ac 6%	0.537	0.173	0.196	0.879
Ac 8%	0.500	0.173	0.159	0.841
DO 30°C	2.276	0.173	1.934	2.617
DO 35°C	1.776	0.173	1.434	2.117
DO 40°C	2.985	0.173	2.644	3.327
DO 45°C	1.876	0.173	1.535	2.218
DO 50°C	2.318	0.173	1.977	2.659
DO 55°C	0.001	0.173	-0.340	0.342
DO 60°C	0.143	0.173	-0.198	0.484
Eth 10%	0.516	0.173	0.174	0.857
Eth 2%	0.561	0.173	0.220	0.902
Eth 4%	0.503	0.173	0.162	0.844
Eth 6%	0.503	0.173	0.162	0.844
Eth 8%	0.495	0.173	0.154	0.837

II.3.9.- Conservation des bactéries acétiques

Les résultats de réactivation des souches conservées (*Acetobacter aceti* subsp. *aceti*, *Acetobacter aceti* subsp. *orleanensis*, *Acetobacter aceti* subsp. *liquifaciens*, *Acetobacter aceti* subsp. *xylum*, *Acetobacter pasteurianus* subsp. *pasteurianum*, *Acetobacter pasteurianus* subsp. *lovaniensis*, *Acetobacter pasteurianus* subsp. *ascendens* et *Gluconobacter oxydans* subsp. *industrius*) par congélation, adsorption sur gel de silice et immobilisation sur plusieurs supports, dont le coton et les co-produits du palmier dattier (foliole, fibrillum et périanthes) sont illustrés suivant les tableaux 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 et 35.

Tableau 27.- Conservation de la souche *Acetobacter aceti* subsp. *aceti* [+ : Présence de culture; - : Absence de culture]

	Congélation	Coton	Gel de silice	Foliole	Fibrillum	Périanthes
Viabilité	+	+	+	-	+	+
Acide acétique (%)	2.9±0.001	2.52±0.002	2.48±0.001	-	2.72±0.004	2.6±0.002

A l'exception de la foliole, la souche *Acetobacter aceti* subsp. *aceti* a été conservée avec succès par congélation et sur les supports synthétiques et naturels (tab. 27). Ainsi pour l'aptitude de production de l'acide acétique est maintenu après son reviviation et estimé du 2.48±0.001% (gel de silice) au 2.9±0.001% (congélation).

Tableau 28.- Conservation de la souche *Acetobacter aceti* subsp. *liquifaciens* [+ : Présence de culture; - : Absence de culture]

	Congélation	Coton	Gel de silice	Foliole	Fibrillum	Périanthes
Viabilité	+	+	+	+	+	+
Acide acétique (%)	2.4±0.001	2.1±0.001	1.8±0.001	1.92±0.001	2.1±0.001	1.92±0.001

La souche *Acetobacter aceti* subsp. *liquifaciens* est revivifiée après conservation dans toutes les conditions testées, avec une activité en production d'acide acétique gardé selon le tableau 28 entre 1.8±0.001% (gel de silice) et 2.4±0.001% (congélation).

Tableau 29.- Conservation de la souche *Acetobacter aceti* subsp. *orleanensis* [+ : Présence de culture; - : Absence de culture]

	Congélation	Coton	Gel de silice	Foliole	Fibrillum	Périanthes
Viabilité	+	+	+	+	+	+
Acide acétique (%)	2.4±0.001	2.22±0.001	1.92±0.001	1.92±0.001	1.8±0.001	2.4±0.001

La culture de la souche *Acetobacter aceti* subsp. *orleanensis* est obtenu après son conservation sur tous les substrats utilisés. Sa réactivation a permis d'enregistrer des taux d'acide acétique considérés du $1.8\pm 0.001\%$ (fibrillum) au $2.4\pm 0.001\%$ (congélation et périanthes) (tab. 29).

Tableau 30.- Conservation de la souche *Acetobacter aceti* subsp. *xylinum* [+ : Présence de culture; - : Absence de culture]

	Congélation	Coton	Gel de silice	Foliole	Fibrillum	Périanthes
Viabilité	+	+	+	+	+	+
Acide acétique (%)	2.52 ± 0.001	1.92 ± 0.004	2.1 ± 0.001	1.9 ± 0.002	1.92 ± 0.001	2.22 ± 0.001

La fiabilité de la conservation de la souche *Acetobacter aceti* subsp. *xylinum* est élucidé par une viabilité totale sur les support utilisés dans le tableau 30. L'acide acétique produit est de l'ordre de $1.9\pm 0.002\%$ (foliole) et $2.52\pm 0.001\%$ (congélation).

Tableau 31.- Conservation de la souche *Acetobacter pasteurianus* subsp. *pasteurianum* [+ : Présence de culture; - : Absence de culture]

	Congélation	Coton	Gel de silice	Foliole	Fibrillum	Périanthes
Viabilité	+	+	+	+	+	+
Acide acétique (%)	2.49 ± 0.001	2.03 ± 0.001	2.02 ± 0.001	1.80 ± 0.001	2.27 ± 0.001	2.48 ± 0.001

Dans le tableau 31, il semble que la souche *Acetobacter pasteurianus* subsp. *pasteurianum* a été bien conservée par congélation et par utilisation de différents support sous conditions naturels (à l'air libre). Les taux d'acide acétique produit, varié entre $1.80\pm 0.001\%$ (foliole) et $2.49\pm 0.001\%$ (congélation).

Tableau 32.- Conservation de la souche *Acetobacter pasteurianus* subsp. *lovaniensis* [+ : Présence de culture; - : Absence de culture]

	Congélation	Coton	Gel de silice	Foliole	Fibrillum	Périanthes
Viabilité	+	+	+	-	-	-
Acide acétique (%)	2.62 ± 0.001	1.8 ± 0.001	2.1 ± 0.001	-	-	-

Acetobacter pasteurianus subsp. *lovaniensis* ne se conserve pas dans les co-produits de palmier dattier. L'acide acétique produit après réactivation est de $2.62\pm 0.001\%$ (congélation),

2.1±0.001% (gel de silice) et 1.8±0.001% (coton) (tab. 32).

Tableau 33.- Conservation de la souche *Acetobacter pasteurianus* subsp. *ascendens* [+ : Présence de culture; - : Absence de culture]

	Congélation	Coton	Gel de silice	Foliole	Fibrillum	Périanthes
Viabilité	+	+	+	-	+	+
Acide acétique (%)	2.4±0.001	2.22±0.002	1.92±0.001	-	1.8±0.001	2.1±0.001

Le tableau 33 montre que les bactéries de la souche *Acetobacter pasteurianus* subsp. *ascendens* sont revivifiées en utilisant plusieurs conservateurs, et ceci n'est malheureusement plus le cas pour la foliole. L'activité en production d'acide acétique est située entre 1.8±0.001% (fibrillum) et 2.4±0.001% (congélation).

Tableau 34.- Conservation de la souche *Gluconobacter oxydans* subsp. *industrius* [+ : Présence de culture; - : Absence de culture]

	Congélation	Coton	Gel de silice	Foliole	Fibrillum	Périanthes
Viabilité	+	+	+	+	-	+
Acide acétique (%)	2.22±0.001	2.1±0.003	1.8±0.001	1.8±0.001	-	2.22±0.002

Les résultats de conservation de la souche *Gluconobacter oxydans* subsp. *industrius*, mentionné dans le tableau 34, ont révélés l'inaptitude des bactéries à se revivifiée sur le fibrillum. Contrairement aux autres supports, l'acide acétique produit est de 1.8±0.001% (gel de silice et foliole) et 2.22±0.001% (congélation et périanthes).

Les co-produits de palmier dattier sont composés principalement par les hydrates de carbone (cellulose, hémicellulose, lignine, dioxyde de silicium [SiO₂] et silicium [Si]) (Chehma, 2001; Rajae Rad et al., 2015). Donc, ils sont déconseillés pour la conservation des bactéries pathogènes car les produits acides du métabolisme diminuent rapidement leur viabilité.

Les cellules entières encapsulées dans des gels de silice sont utilisées dans une grande variété d'applications en biomédecine, en biotechnologie et en biorémédiation. La conservation des bactéries *Escherichia coli* biodégradant l'atrazine encapsulés dans un gel de silice à long terme par dessiccation a été étudié par Mutlu et al. (2015). Ils ont démontré que les gels de silice partiellement desséchés préservait et améliorait l'activité biocatalytique des bactéries encapsulées pendant 3 mois, lorsque les gels ont été stockés à 4 °C.

L'un des principaux facteurs dans le développement de nouvelles souches est leur stabilité, est le moyen de préserver et d'entreposer les cultures afin que leurs caractéristiques

soigneusement sélectionnées ne soient pas perdues. Cela peut impliquer le stockage dans de l'azote liquide ou lyophilisation (Waites et *al.*, 2001).

Selon Heckly (1978), la conservation des micro-organismes dans l'azote liquide est probablement la meilleure méthode, mais une congélation lente avec un agent cryoprotecteur est souhaitable afin de conserver une viabilité ou une activité maximale. Pour la conservation à long terme des organismes qui peuvent résister à la déshydratation, la lyophilisation est la méthode la plus économique et la plus fiable. Bien que de nombreux organismes lyophilisés survivent bien à température ambiante, toutes les cultures doivent être réfrigérées. Puisqu'une excellente survie a été démontrée à 4°C, ce qui engendre des dépenses supplémentaires liées à l'utilisation de températures de stockage plus basses et apparition des souches mutantes.

Hamoudi (2005), a constatée une nette amélioration de la lyophilisation lorsque des cultures de *Geotrichum candidum* était combiné avec les agents protecteurs (tréhalose, saccharose et maltose). La température de transition vitreuse des agents protecteurs, qui dépend de manière significative de la teneur en eau, pourrait contribuer à la stabilité des souches pendant le stockage. A travers les résultats de Benoussaid et *al.* (2018), il est considéré que la lyophilisation est une technique préconisée dans le cas des *Pseudomonas fluorescents* vue que c'est une conception appropriée pour la production de cultures bactériennes concentrées, établie pour préserver les microorganismes en gardant leurs viabilités et efficacités avec l'avantage de stabilisation de l'état du matériel biologique séché, pour des éventualités de conservation et de stockage aux températures ambiantes, pour de longues périodes, ajoutant les facilités de transport et de manipulation. Pour que le la lyophilisation soit prioritaire et recommandé, il est suggéré d'assurer une cryoprotection adéquate avant le processus de lyophilisation.

Pour Arkad'eva (1983) et Verlhac (2019), la viabilité des micro-organismes dépend de leur nature, de l'âge et de la densité de la population, des conditions de stockage et de récupération des cellules. Différentes méthodes de conservation à long terme ont influés sur la survie, les propriétés physiologiques et biochimiques des microorganismes à basses et ultra-basses températures, lyophilisation, séchage, stockage sous l'huile minérale, ...etc.

II.4.- Exploitation des résultats

II.4.1.- Analyse en composantes principales (ACP)

Dans cette partie, les résultats de traitement des données statistiques par l'Analyse en composantes principales (ACP) ont évoqué la liaison entre les types des vinaigres, leur physico-chimie, leur diversité en bactéries acétiques et leur pouvoir acidifiant en condition de stress.

L'analyse en composantes principales (ACP), permet d'approuver les variables les plus contributives. Les variables plus contributives se trouvent à proximité du cercle. Proche du centre, se trouvent les variables ayant une faible contribution. Dans la présente étude, toutes les variables quantitatives analysées sont prises en considération. Les variables qualitatives ne sont

pas prises en considération. Ils sont stables durant les conditions d'analyse du fait que les vinaigres analysés présentent des couleurs, d'odeurs, et de goûts caractéristiques aux leurs qualités organoleptiques.

La corrélation entre les axes principaux et les variables qu'il soit contributive à un axe, exige une valeur de corrélation, et corrélation au carré, élevée. La valeur alpha = 0.05 au plus (seuil de signification) a été pris en considération.

Dans le tableau 35, il figure 17.504 % de variabilité sur l'axe 1 et un cumulé avec l'axe 2 considéré de 32.136 %. Pour cela l'explication de variation des analyses des échantillons du vinaigre traditionnel de dattes, s'effectue sur l'axe 1 et 2.

Tableau 35.- Caractéristique des axes

	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12
Valeur propre	2.101	1.756	1.492	1.337	1.080	0.970	0.873	0.718	0.557	0.447	0.397	0.274
Variabilité (%)	17.504	14.632	12.431	11.142	8.999	8.079	7.273	5.987	4.642	3.721	3.308	2.282
% cumulé	17.504	32.136	44.567	55.710	64.709	72.788	80.061	86.047	90.689	94.410	97.718	100

La figure 25 montre que la conductivité électrique (CE), A5 pasteurianum (*Acetobacter pasteurianus* subsp. *pasteurianum*), A6 ascendens (*Acetobacter pasteurianus* subsp. *ascendens*), sont proches de la proximité du cercle et de l'axe 1. Ils présentent à cet effet, une forte contribution sur l'axe 1. Parallèlement, le pH, la souche A1 aceti (*Acetobacter aceti* subsp. *aceti*), la souche, A4 xylinum (*Acetobacter aceti* subsp. *xylinum*) et G8 industrius (*Gluconobacter oxydans* subsp. *industrius*), sont très proches de l'axe 2 et de la proximité du cercle. Ils sont contributifs à l'explication de la variabilité de l'axe 2. La densité, l'acidité totale, la souche A2 liquifaciens (*Acetobacter aceti* subsp. *liquifaciens*), A3 orleanensis (*Acetobacter aceti* subsp. *orleanensis*) et A7 lovaniensis (*Acetobacter pasteurianus* subsp. *lovaniensis*), se rapprochent du centre du cercle, d'où leur faible contribution à l'explication de la variabilité.

Sur la figure 25, il apparaît plusieurs corrélations entre les variables, qui ont des valeurs élevées présentes au tableau de corrélation (annexe 6). La corrélation positive entre le pH, la densité, la conductivité électriques, les souches A1 aceti (*Acetobacter aceti* subsp. *aceti*), A2 liquifaciens (*Acetobacter aceti* subsp. *liquifaciens*), A4 xylinum (*Acetobacter aceti* subsp. *xylinum*) et A6 ascendens (*Acetobacter pasteurianus* subsp. *ascendens*), A7 lovaniensis (*Acetobacter pasteurianus* subsp. *lovaniensis*) et G8 industrius (*Gluconobacter oxydans* subsp. *industrius*), semble s'expliquer par la richesse des vinaigres de faible acidité par ces souches. La corrélation est négative entre l'acidité totale, et les souches A3 orleanensis (*Acetobacter aceti* subsp. *orleanensis*) et A5 pasteurianum (*Acetobacter pasteurianus* subsp. *pasteurianum*). La corrélation entre le pH et la conductivité électriques, montre que la conductivité est induite par dissociation des sels et l'ensemble des acides produits par les souches A1 aceti (*Acetobacter aceti* subsp. *aceti*), A2 liquifaciens (*Acetobacter aceti* subsp. *liquifaciens*), A4 xylinum

(*Acetobacter aceti* subsp. *xylinum*), A6 ascendens (*Acetobacter pasteurianus* subsp. *ascendens*), A7 lovaniensis (*Acetobacter pasteurianus* subsp. *lovaniensis*) et G8 industrius (*Gluconobacter oxydans* subsp. *industrius*). Ainsi qu'une baisse de pH engendrée par une forte acidité du vinaigre.

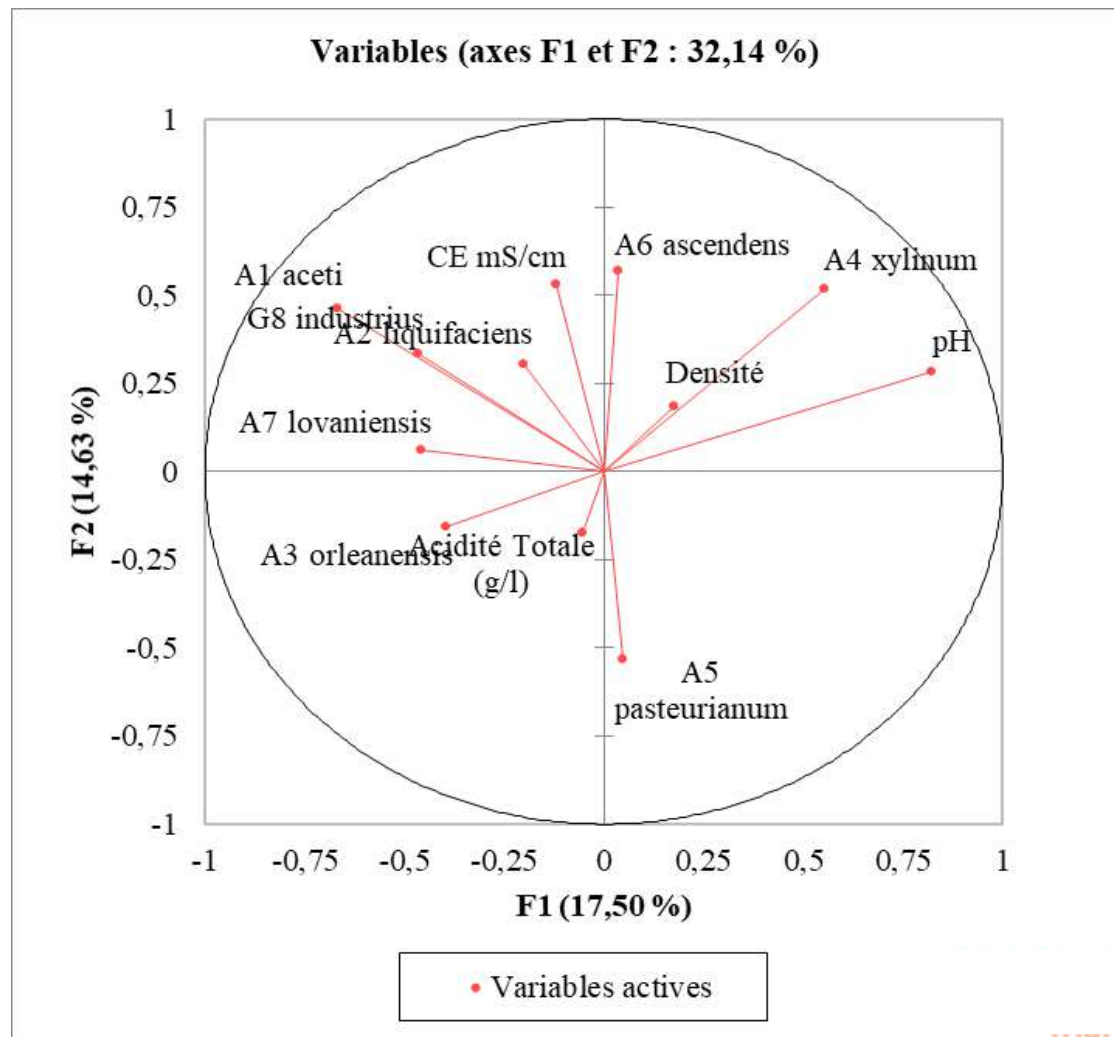


Figure 25.- Cercle de corrélation des variables de vinaigre traditionnel de dattes

La figure 26 montre la répartition des 63 échantillons de vinaigre traditionnel de dattes de cultivars Hamraya, Harchaya et Deglet-Nour de la cuvette de Ouargla. Elle donne 5 groupes de tendances différentes. Le premier groupe rassemble les individus Dn4, Dn5 et Ha6, se trouve du côté positif de l'axe 1 et 2. Dn26, Hr32, Ha34, Ha35, Dn42 et Hr49 sont des individus du deuxième groupe, trouvé du côté négatif de l'axe 2. Du côté négatif de l'axe 1 et 2 se trouve l'individu Ha57 de troisième groupe. Le groupe quatre représente les individus Hr51, Dn56, Hr58 et Ha60, situés au côté positif de l'axe 2. Le reste des individus est inclus dans le groupe cinq se situant au milieu des axes 1 et 2.

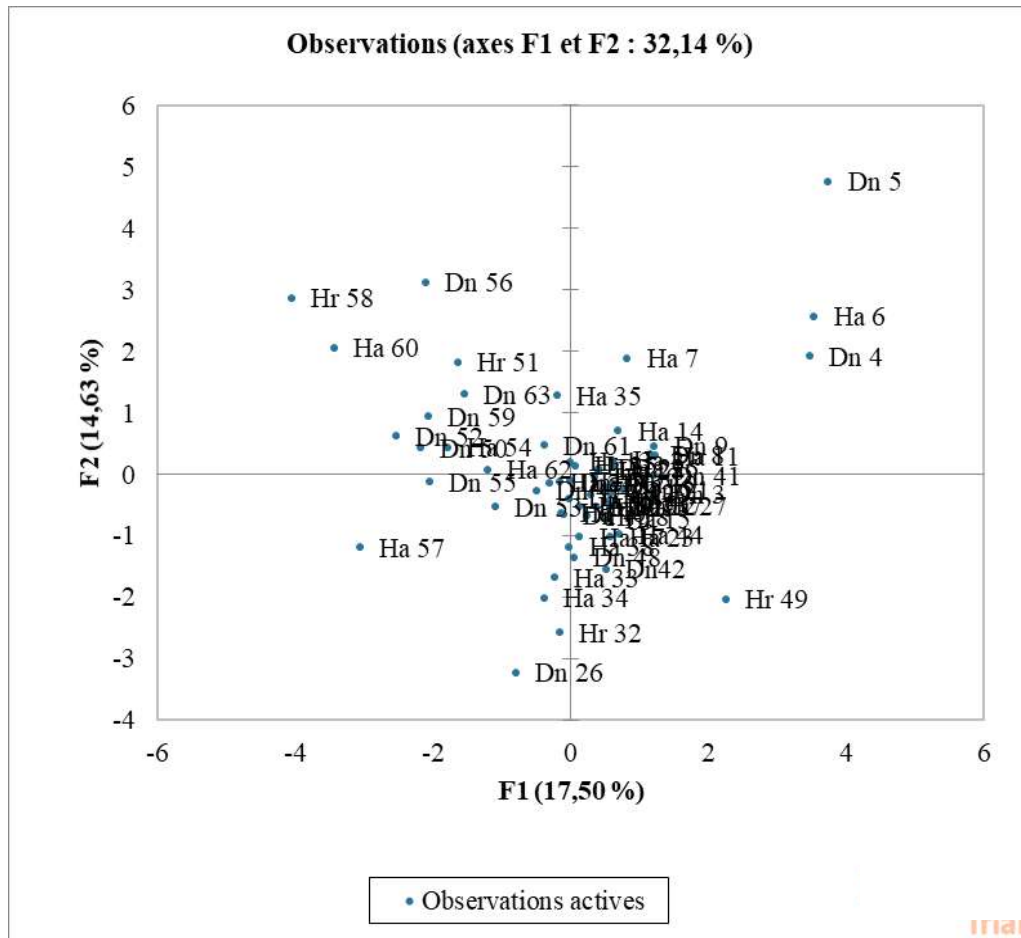


Figure 26.- Projection des individus

La représentation graphique des individus et des variables dans la figure 27, montre que les individus de groupe 1, se caractérisent par leur pH et la présence de la souche A4 xylinum (*Acetobacter aceti* subsp. xylinum). Le groupe 2, est caractérisé par la souche A5 pasteurianum (*Acetobacter pasteurianus* subsp. pasteurianum). La souche A3 orleanensis (*Acetobacter aceti* subsp. orleanensis) caractérise le troisième groupe. Le groupe 4 est caractérisé par la conductivité électriques, A1 aceti (*Acetobacter aceti* subsp. aceti), la souche et G8 industrius (*Gluconobacter oxydans* subsp. industrius). Près du centre, se localise le groupe 5, il ne présente pas des caractéristiques bien déterminées. Il partage presque tous ses caractères avec les autres groupes.

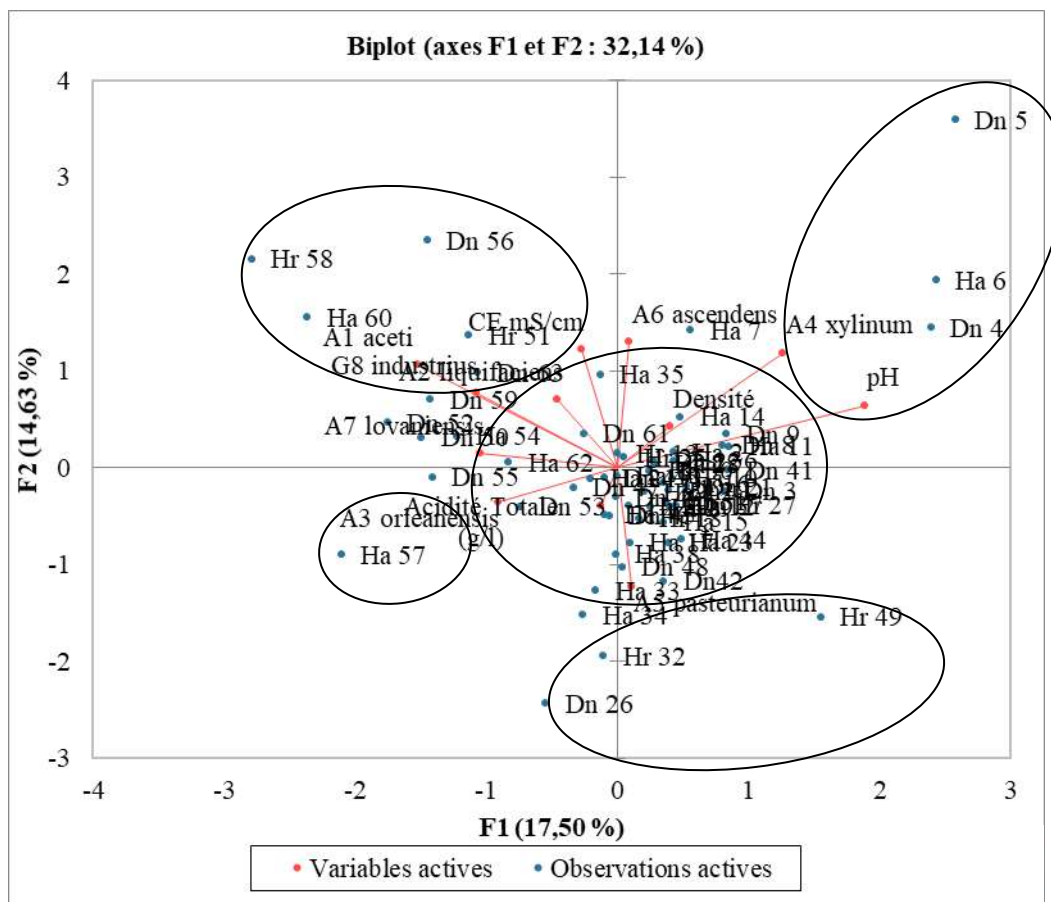


Figure 27.- Tendances globales des différents échantillons du vinaigre traditionnel de dattes de la cuvette de Ouargla

L'axe 1 présente 49.942% de variabilité, le cumulé entre les deux axes 1 et 2 représente 70.698% (tab. 36). Pour cela, l'explication des souches testées est réalisée par l'axe 1 et 2 pour les facteurs abiotiques.

Tableau 36.- Caractéristique des axes

	F1	F2	F3	F4	F5	F6
Valeur propre	12.485	5.189	2.766	2.187	1.320	1.052
Variabilité (%)	49.942	20.757	11.063	8.747	5.282	4.210
% cumulé	49.942	70.698	81.761	90.508	95.790	100.000

La caractérisation des souches isolées par rapport aux variations environnementaux et leur effet sur l'activité et la survie des souches a montré plusieurs corrélations sur la figure 28.

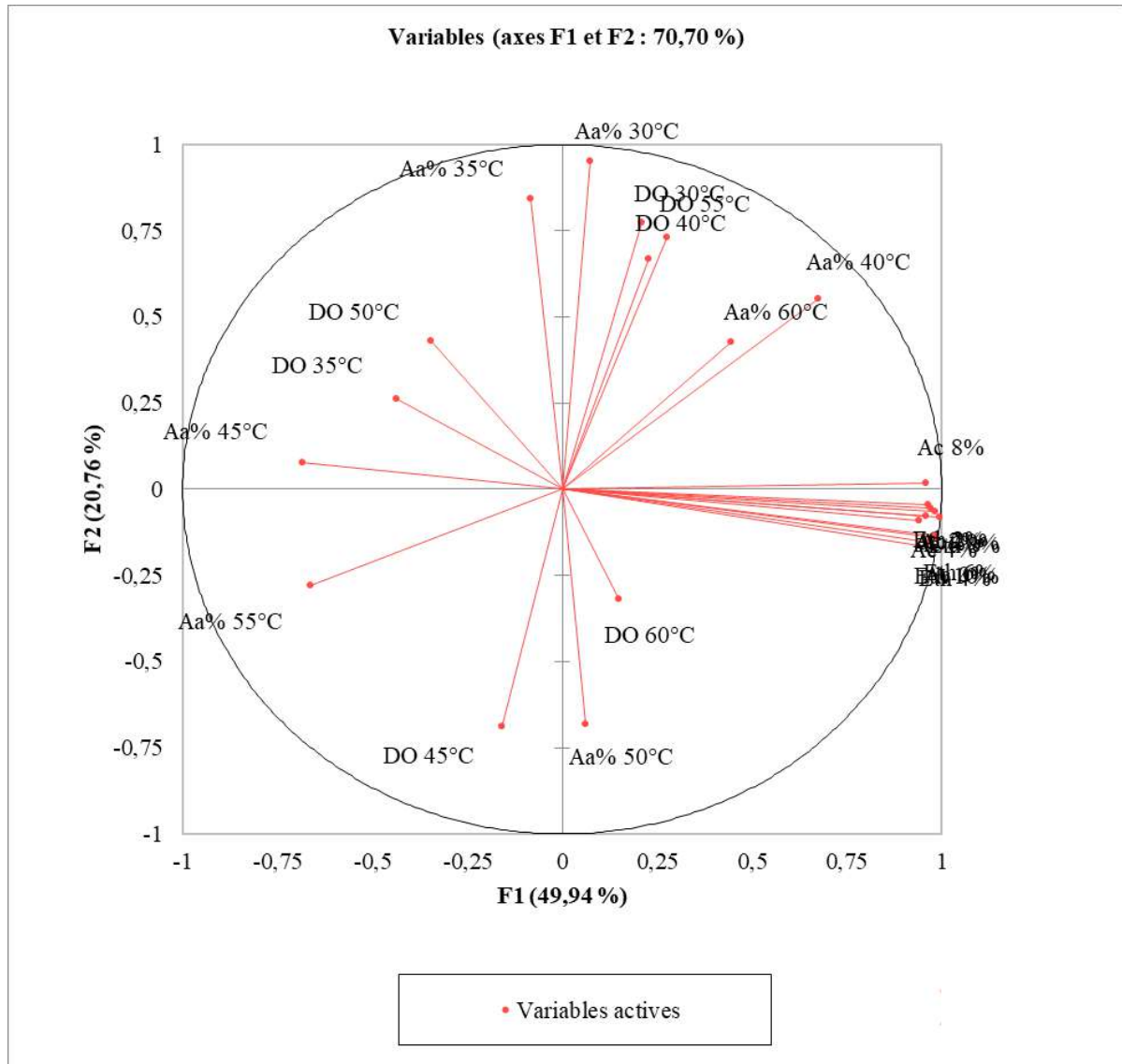


Figure 28.- Cercle de corrélation des variables environnementales des bactéries acétiques issues du vinaigre traditionnel de dattes

Le cercle de la figure 28 a dévoilé un niveau de corrélation significative pour les variables responsable de la fermentation acétique des souches isolées du vinaigre traditionnel de dattes (annexe 7). A côté de l'axe 1 et à proximité du cercle de troue, DO55°C, DO45°C, DO40°C et DO30°C (densité optique à 50°C, 55°C, 45°C, 40°C et 30°C), Aa 30°C, Aa 35°C et Aa 50°C (la production de l'acide acétique). A proximité de cercle et à côté de l'axe 2 se trouve Aa 45°C, Aa 55°C (production de l'acide acétique à 45°C et 55°C), Eth 2%, Eth 4%, Eth 6%, Eth 8%, Eth 10% (concentration en substrat éthanol), Ac 0%, Ac 2%, Ac4%, Ac 6%, Ac 8% et Ac10% (la concentration du milieu en acide à 8 et 10%). Au centre du cercle se trouve la production d'acide acétique 60°C et DO à 60°C, 50°C et 35°C.

La corrélation positive entre Ac 8%, Aa 30%, Aa 35%, Aa 40%, Aa 45%, Aa 60%, DO 30°C, DO 35°C, DO 40°C, DO 50°C et DO 55°C. Elle est négative pour Eth 2%, Eth 4%, Eth 6%, Eth 8%, Eth 10%, DO 45°C, DO 60°C, Ac 0%, Ac 2%, Ac 4%, Ac 6%, Ac 0% et Ac 10%.

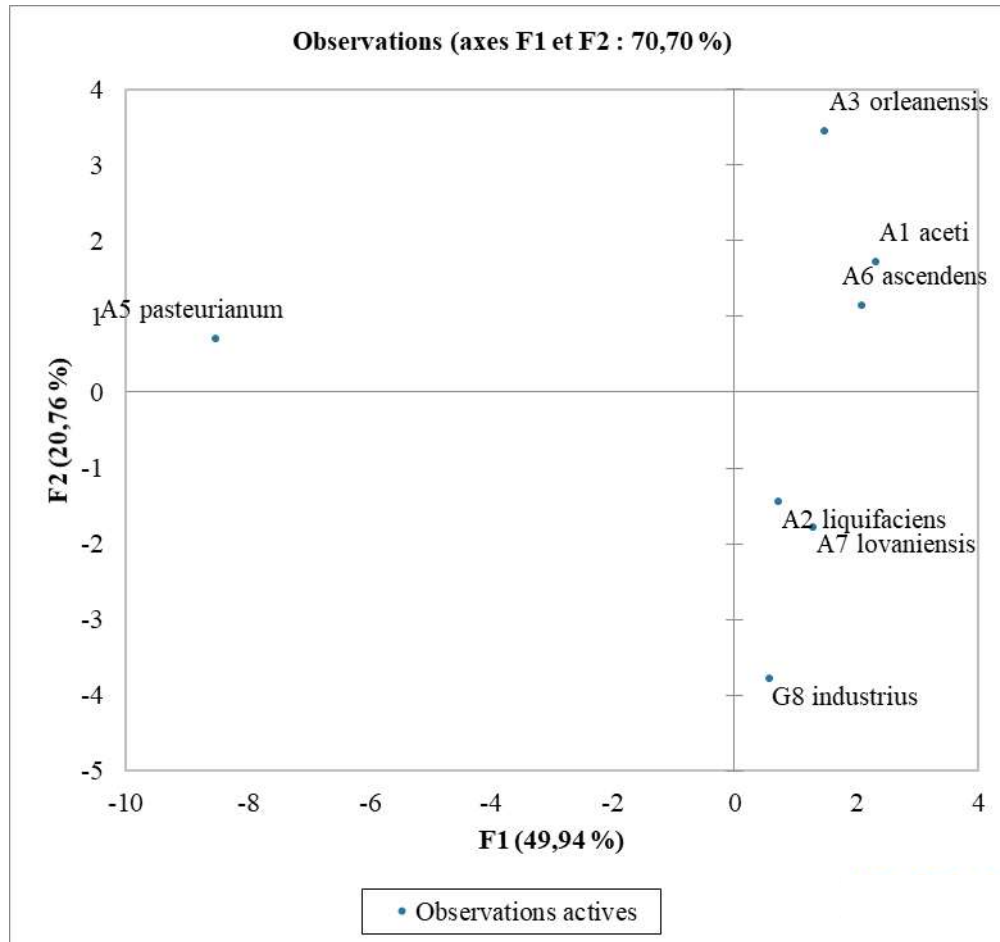


Figure 29.- Projection des individus

La répartition des individus dans la figure 29, a révélé la présence de trois groupes. Le groupe 1 renferme les individus A1 aceti (*Acetobacter aceti* subsp. *aceti*), A3 orleanensis (*Acetobacter aceti* subsp. *orleanensis*) et A6 ascendens (*Acetobacter pasteurianus* subsp. *ascendens*). Le groupe 2 contient A2 liquifaciens (*Acetobacter aceti* subsp. *liquifaciens*), A7 lovaniensis (*Acetobacter pasteurianus* subsp. *lovaniensis*) et G8 industrius (*Gluconobacter oxydans* subsp. *industrius*). Dans le troisième groupe se trouve A5 pasteurianum (*Acetobacter pasteurianus* subsp. *pasteurianum*).

La représentation des souches dans la figure 30, montre que les individus de groupe 1, se caractérisent par des productions idéales en acide acétique à 40°C. Le groupe 2, est caractérisé par des productions en acide acétique à 50°C, et les variations des paramètres environnementaux (concentrations en éthanol et acide acétique) qui influent sur la viabilité et l'activité des souches.

Le groupe 2, est caractérisé par des productions en acide acétique à 45°C.

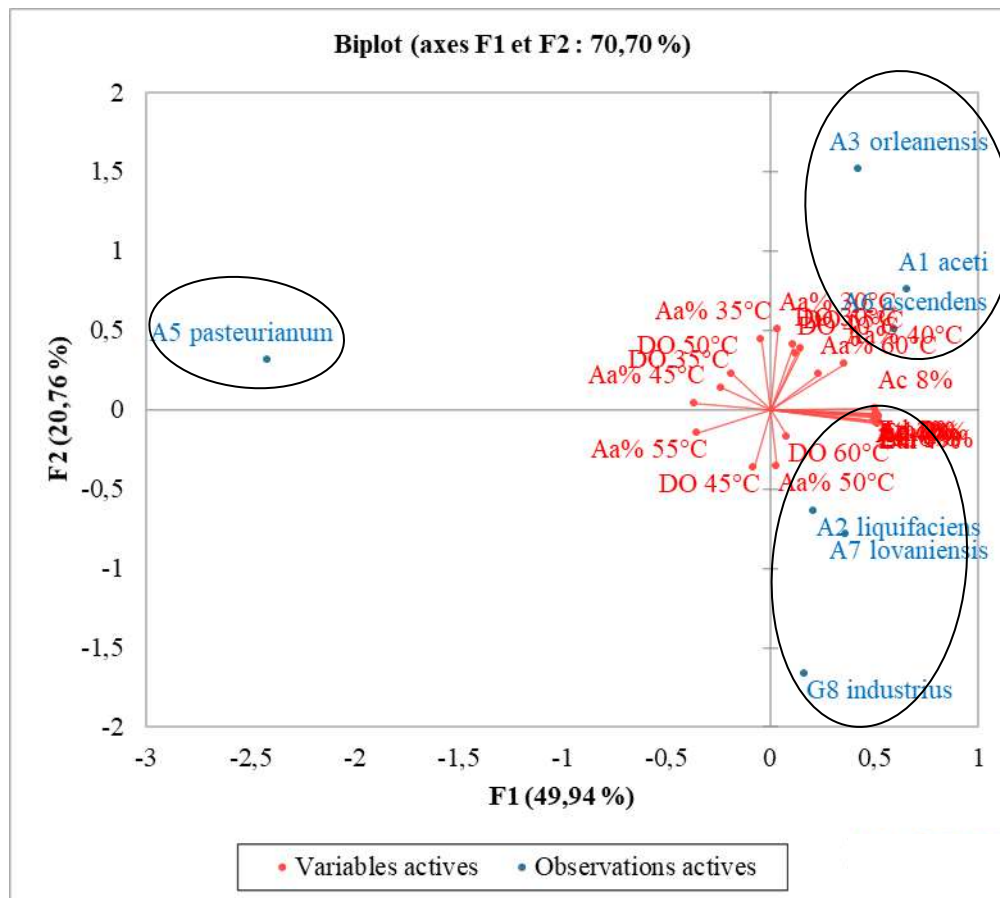


Figure 30.- Tendances globales des bactéries acétiques issues du vinaigre traditionnel de dattes de la cuvette de Ouargla

II.4.2.- Classification ascendante hiérarchique (CAH)

La classification ascendante hiérarchique des échantillons du vinaigre traditionnel de dattes (CAH), a permis de grouper les individus selon leurs tendances, et d'établir des liaisons entre eux. Elle effectue un regroupement de manière à rassembler dans chaque groupe les individus les plus semblables selon un critère assimilé à une distance. La classification des individus en classes est exécutée dont, l'homogénéité soit maximale à l'intérieur de chaque classe et l'hétérogénéité soit maximale d'une classe à l'autre.

Le graphique de la classification des échantillons des vinaigres traditionnels de dattes (fig. 31) montre, le regroupement des observations en quatre groupes incluant sous deux classes:

Un premier groupe (classe 1) représentant une étroite liaison entre Hr 51, Ha 7, Dn 56, Dn 63 et Ha 35 et les échantillons Ha 57, Dn 53, Dn 52, Ha 54, Dn 50, Dn 59, Ha 62 et Dn 55 qui sont liés à leur tour par Ha 60 et Hr 58.

Un deuxième groupe (classe 2) est constitué par les échantillons restants, la liaison se fait comme suit : Une dépendance entre le groupe 1 (Dn22, Ha30, Ha10, Ha40, Dn9, Ha 11, Ha14 et Ha15, Ha12, Hr18, Hr27, Dn21, Ha1, Dn45, Dn43 et Dn19), qui sont tous deux en relation étroite avec le groupe 2 (Ha33, Ha17, Dn47, Hr39). Ces deux groupes sont en liaison avec le groupe 3 (Dn42, Ha38, Hr32 et Hr49) et le groupe 4 (Dn48, Ha23, Hr31, Hr29, Ha46 et Ha34). Le groupe 5 (Dn37, Dn20, Dn41, Dn3, Ha36, Ha44, Dn61, Hr13, Ha2, Dn16, Hr25 et Dn8) est lié avec les 4 premiers groupes. Dn26 est en liaison avec le groupe 1, le groupe 2, le groupe 3, le groupe 4 et le groupe 5. Le tout est en relation avec l'échantillon Dn4, Ha6 et Dn5.

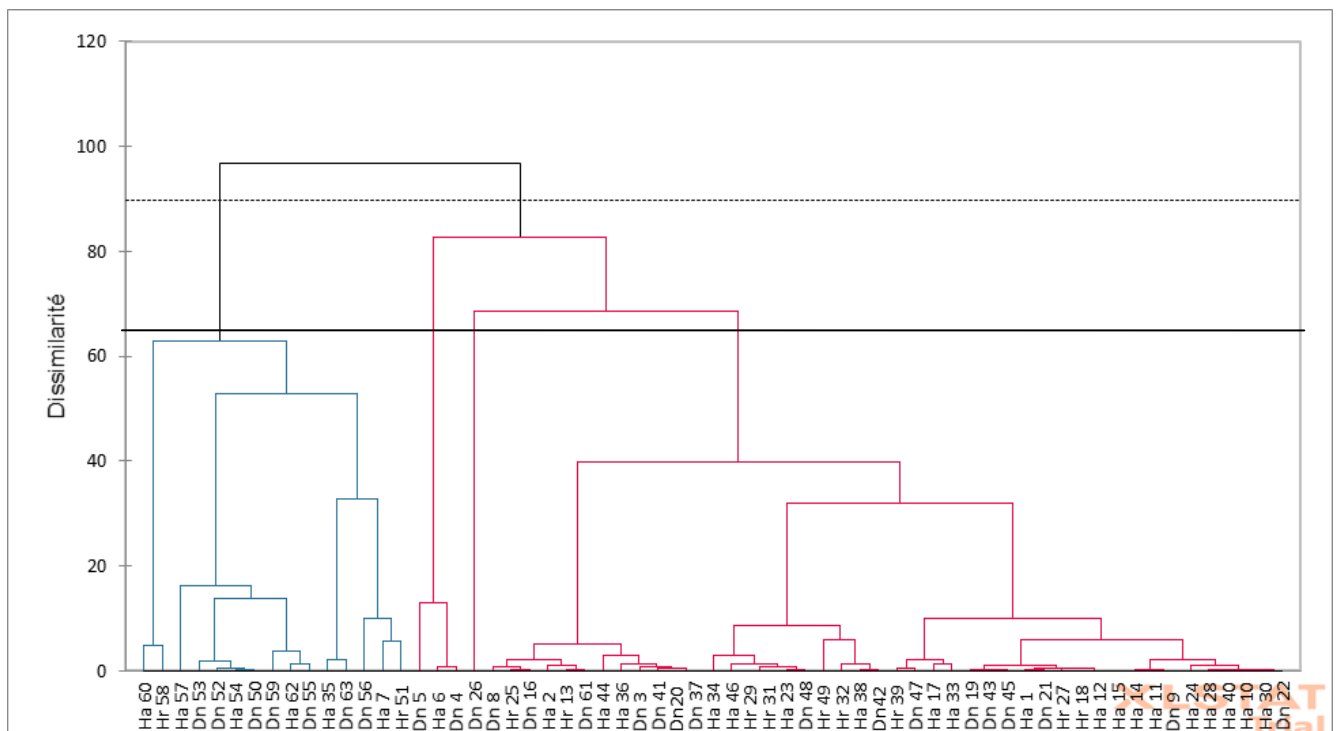


Figure 31.- Dendrogramme de la classification ascendante hiérarchique (CAH) des échantillons du vinaigre traditionnel de dattes.

Le traitement statistique des souches isolées, identifiées et caractérisées, issues des vinaigres traditionnels de dattes par la méthode de la classification ascendante hiérarchique, fait ressortir deux classes (fig. 32).

Une classe a dévoilé une étroite liaison entre A3 orleanensis (*Acetobacter aceti* subsp. *orleanensis*) et A6 ascendens (*Acetobacter pasteurianus* subsp. *ascendens*), qui sont lié avec A1 aceti (*Acetobacter aceti* subsp. *aceti*).

Une deuxième classe a groupée A2 liquifaciens (*Acetobacter aceti* subsp. *liquifaciens*), et G8 industrius (*Gluconobacter oxydans* subsp. *industrius*) qui sont en relation avec A7 lovaniensis (*Acetobacter pasteurianus* subsp. *lovaniensis*). Le tout est en liaison avec A5 pasteurianum (*Acetobacter pasteurianus* subsp. *pasteurianum*).

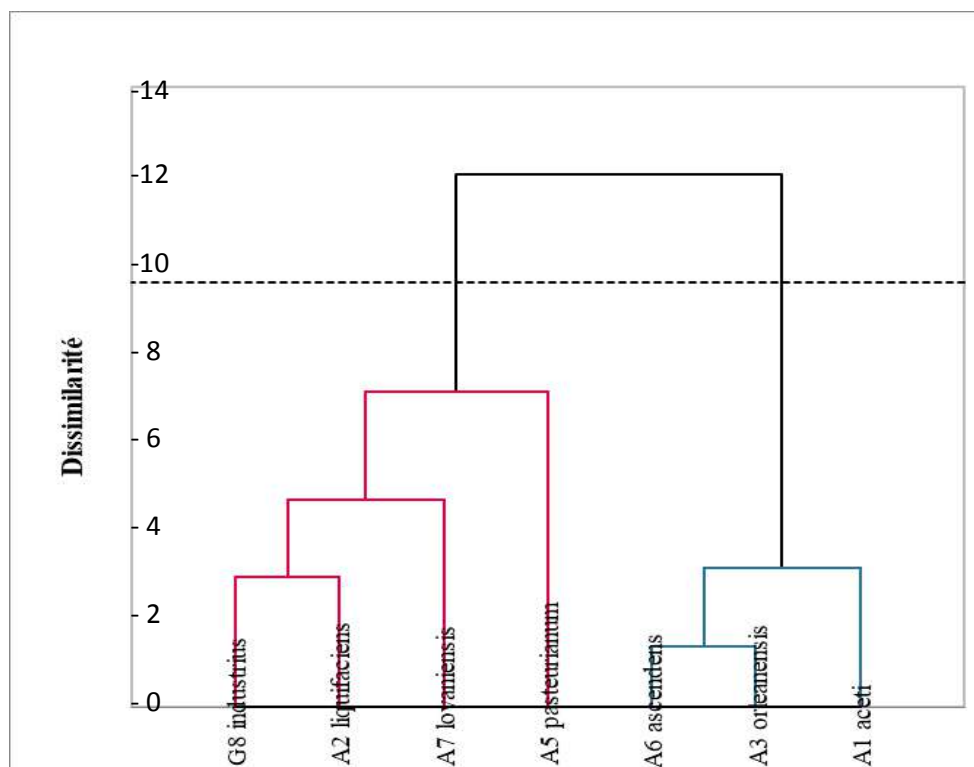


Figure 32.- Dendrogramme de la classification ascendante hiérarchique (CAH) des souches issues du vinaigre traditionnel de dattes.

Conclusion

La présente étude portant sur la recherche et l'identification de quelques souches de bactéries acétiques issues du vinaigre traditionnel de dattes du Sahara Septentrional est-Algérien, laisse apparaître des propriétés fascinantes. L'enquête ethnobotanique menée sur le savoir-faire traditionnel du vinaigre de dattes a révélé que les 63 échantillons sont élaborés selon la même méthode (2/3 eau et 1/3 dattes) à part des additions pour certains fabricants de du citron (Hr27 et Hr31), de l'orge (Hr39, Dn53 et Dn61), des graines de blé, des graines de l'orge, dokar (grains de pollen) et des graines de harmal (Dn63). Sur le plan organoleptique, la composition chimique de la datte est responsable de tous les caractères, dont les vinaigres ont une couleur brune dans l'ensemble, avec un goût acide, une viscosité faible et une odeur de dattes. L'acidité est faible par rapport aux normes préconisées (7.7g/l et 35.4g/l) à l'exception de l'échantillon E26 issue du cultivar Deglet-Nour (78.4g/l). Les conductivités électriques sont très élevées allant de 4.60mS/cm (Hr49) à 9.18mS/cm (Ha17). Les pH varient entre 3.01 (Dn26) et 3.78 (Hr49), reste au-delà des pH des vinaigres commercialisés (2.10 et 2.45). Les résultats physico-chimiques obtenus témoignent un produit qui ne peut pas faire l'objet d'une commercialisation à son état, à cause d'un nettoyage non efficace des dattes, et la charge minérale élevée l'eau du robinet utilisé dans la préparation artisanale, sans oublier l'action combinée des microorganismes dans le moût.

En Algérie, il n'existe plus d'études réalisées sur l'exploitation de la microflore acétique. En contrepartie, plusieurs auteurs dans le monde ont montré que les vinaigres traditionnels de dattes renferment un potentiel appréciable en bactéries acétiques producteurs des métabolites d'intérêts industriels, englobant les genres *Acetobacter* et *Gluconobacter*. Les analyses microbiologiques des 63 échantillons de vinaigre de dattes de la cuvette de Ouargla, ont permis l'isolement de 154 isolats bactériens. Ils présentent différents caractères cultureux et morphologiques (rugueux, plat, lisse, bombé), et formes (ronde, pléomorphe et étoile). Leur couleur reste soit transparente, blanche, beige, marron, jaune et orange avec leur taille allant de 0.5 mm à 5 mm de diamètre. Les caractères physiologiques et biochimiques, et l'identification de 154 isolats, donnent 103 souches identifiables appartenant au genre *Acetobacter* et *Gluconobacter*. Elles se répartissent en 8 souches dont *Acetobacter aceti* subsp. *aceti*, *Acetobacter aceti* subsp. *liquifaciens*, *Acetobacter aceti* subsp. *orleanensis*, *Acetobacter aceti* subsp. *xylinum*, *Acetobacter pasteurianus* subsp. *ascendens*, *Acetobacter pasteurianus* subsp. *lovaniensis*, *Acetobacter pasteurianus* subsp. *pasteurianum* et *Gluconobacter oxydans* subsp. *industrius*. Les vinaigres du cultivar Hamraya, sont les plus diversifiés en souches acétiques hébergeant près de 8 souches, puis celle des Deglet-Nour avec 7 souches, et enfin Harchaya avec 6 souches. Concernant la répartition des souches isolées, il est révélé que *Acetobacter aceti* subsp. *aceti*, est mieux représenté (52%).

Vu des exigences nutritionnelles des bactéries acétiques et les interactions bactériennes existants, leur isolement sur six (6) milieux de cultures a révélé que le milieu Frateur reste le plus approprié (30% des souches pré-identifiées). Il a donné des résultats qualitatifs et quantitatifs rassurants sur l'utilisation de ce milieu qui date depuis 1950. En plus, des résultats encourageants sont obtenus sur milieu naturel enrichi par la spiruline (20%), et d'autres déplorables sur milieu Frateur modifié par addition de la spiruline comme source des facteurs de croissance au lieu de l'extrait de levure (16%). Ce qui laisse à émettre des réserves pour l'effet de la spiruline sur la

croissance de certaines bactéries acétiques et l'interaction des autres paramètres culturels.

La caractérisation des bactéries acétiques isolées, a révélé que les souches *Acetobacter aceti* subsp. *orleanensis* et *Acetobacter pasteurianus* subsp. *lovaniensis*, ont montré un profil de flexibilité à l'assimilation de plusieurs substrats comme source de carbone de 66.67% (8 parmi 12 substrats testés). Leur pouvoir de dégradation des substrats allant des sucres simples (GLU: glucose), sucres alcool (MAN: mannitol; SOR: sorbitol), jusqu'au substrats complexes (ESC: esculine; α et β GAL: galactose; RIB: ribose; ARA: arabinose; LAC: lactose; TRE: tréhalose; RAF: raffinose; GEL: gélatine).

Il a été constaté d'après les études de l'effet de stress abiotiques sur les bactéries acétiques que les souches issues du vinaigre traditionnel de dattes tolèrent les changements environnementaux de leur culture (fermentation). Ces études, ont permis de dégager la grande importance des facteurs environnementaux sur la croissance et l'activité des souches. La résistance des souches aux modifications de concentration en éthanol, se situe entre 2 et 10%. Mais *Acetobacter aceti* subsp. *aceti*, *Acetobacter aceti* subsp. *liquifaciens* restent les plus tolérantes (10%). Concernant l'acide acétique, *Acetobacter aceti* subsp. *aceti* et *Acetobacter aceti* subsp. *orleanensis* résiste mieux à un choc acide de l'ordre de 10% (pH= 2.94±0.01). Toutes les souches sont résistantes de 2-10%, à l'exception de *Acetobacter pasteurianus* subsp. *lovaniensis* qui ne supporte pas le stress acide.

L'acide acétique est produit en faible quantité par les souches sauvages. Pour cela, différentes approches sont examinées comme l'optimisation du procédé de fermentation (composition du milieu de culture, conditions physicochimiques, ...etc). Il est décisif que l'ensemble des souches obtenues tolèrent des températures comprises entre 30°C et 60°C avec des températures de croissance optimum à leurs activités se situant entre 35°C et 45°C. Toutefois, 40°C demeure le maximum pour la majorité des souches (*Acetobacter aceti* subsp. *aceti*, *Acetobacter aceti* subsp. *orleanensis* et *Acetobacter pasteurianus* subsp. *lovaniensis* par 3.3±0.0005).

La conservation des souches bactériennes est favorisée par les substances nutritives. L'utilisation du gel de silice, coton et co-produits du palmier dattier (foliole, fibrillum [lif] et périanthes) peut contribuer dans leur valorisation et être une nouvelle alternative aux méthodes coûteuses (congélation et lyophilisation) de conservation et transport des souches à intérêts industriels. Il a été démontré que la viabilité et l'activité de quelques bactéries acétiques (*Acetobacter aceti* subsp. *liquifaciens*, *Acetobacter aceti* subsp. *orleanensis*, *Acetobacter aceti* subsp. *xylinum* et *Acetobacter pasteurianus* subsp. *pasteurianum*) issues du vinaigre traditionnel de dattes sont maintenues sur tous les conservateurs pendant 3 mois à l'air libre durant la période hivernale. *Acetobacter aceti* subsp. *aceti*, *Acetobacter pasteurianus* subsp. *lovaniensis*, *Acetobacter pasteurianus* subsp. *ascendens* et *Gluconobacter oxydans* subsp. *industrius* sont préservées actives après congélation et sur les substrats synthétiques et perdus dans quelques supports naturels.

L'analyse en composantes principales (ACP), a révélé une hétérogénéité physico-chimique et microbiologique entre les 3 types de vinaigre traditionnel de dattes (Hamraya, Harchaya et Deglet-Nour). Il semble que la qualité des dattes n'a aucun effet sur les bactéries acétiques. Elle

importe peu durant cette étude. Toutefois, les souches isolées ont révélé des comportements différents selon le type ou la variation des conditions de stress (éthanol, acidité et température).

La classification ascendante hiérarchique (CAH) des échantillons du vinaigre traditionnel de dattes analysés, a découlé quatre pôles d'individues. A l'échelle des souches, le traitement a dégagé deux groupes classés selon leur interaction avec les facteurs environnementaux abiotiques.

En perspectives, la réponse aux demandes réglementaires nationales et internationales du marché du vinaigre, nécessite une optimisation des paramètres pour le vinaigre traditionnel de dattes du Sahara Septentrional est-Algérien. Il est à proposer une séparation des deux phases de fermentations, une diffusion maximale des sucres avant fermentation alcoolique et ainsi l'oxygénation.

L'identification des souches isolées est à compléter par utilisation de la technologie de la nouvelle génération de séquençage (Next Génération Séquençing: NGS). C'est une approche de métagénomique par fusil de chasse pour identifier la composition microbienne de l'échantillon soumis et adopté une cartographie et un assemblage des données pour éliminer les espèces contaminantes qui étaient présentes à des niveaux d'abondance très faibles.

Il est recommandé d'approfondir l'étude sur l'effet de la concentration de l'éthanol et de l'acide acétique sur la croissance des bactéries acétiques, le fonctionnement des enzymes responsables de la production de vinaigre (ADH et ALDH) et la productivité de l'acide acétique dans les conditions extrêmes de températures, d'acidité et de concentration en éthanol, et de tester les souches à grande échelle, afin d'améliorer leur utilisation industrielle. L'analyse et le séquençage complète du génome de ces souches pour fournir des informations détaillées sur les mécanismes sous-jacents à la thermotolérance, production d'acide acétique et d'identifier les gènes essentiels à la croissance à haute température afin d'obtenir une compréhension plus approfondie sur la génétique responsable de la thermotolérance et de l'activité des souches.

Les souches thermotolérantes indigènes isolées du vinaigre traditionnel de dattes sont attrayante pour plusieurs utilisations industrielles, ce qui exige une amélioration génétique et un test à échelle pilote (optimisation des paramètres de production) pour être prêtes à l'emploi avant l'inoculation dans le fermenteur à grande échelle.

En plus de l'intérêt de la conservation des souches par plusieurs méthodes naturelles simples et moins chères, l'évaluation de leur efficacité est nécessaire par un suivi hebdomadaire et durant une longue durée en période estivale.

Références bibliographiques

Acourene S., Allam A., Taleb B., et Tama M., 2007.- Inventaire des différents cultivars de palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) des régions de Oued-Righ et de Oued-Souf (Algérie). Science et Changements Planétaires/Sécheresse, 18: 135–142.

Albornoz H., et Esteban C., 2012.- Microbiological analysis and control of the fruit vinegar production process. Doctoral Thesis to receive the degree of Doctor with International Mention. Rovira I Virgili University, Department of Biochemistry and Biotechnology, Faculty of Oenology Tarragona, Spain, 281p

Ali Z., Ma H., Ayim I., et Wali A., 2018.- Efficacy of new beverage made of dates vinegar and garlic juice in improving serum lipid profile parameters and inflammatory biomarkers of mildly hyperlipidemic adults: A double-blinded, randomized, placebo-controlled study. Journal of Food Biochemistry, 42: 25-45.

Ali Z., Li J., Zhang Y., Naeem N., Younas S., et Javeed F., 2020.- Dates (*Phoenix Dactylifera*) and Date Vinegar: Preventive Role against Various Diseases and Related in Vivo Mechanisms. Food Reviews International: 1–28.

Al-Shahib W., et Marshall R.J., 2003.- The fruit of the date palm: its possible use as the best food for the future? International Journal of Food Sciences and Nutrition, 54: 247–259.

Alkaabi J. M., Al-Dabbaghi B., Ahmad S., Saadi H. F., Gariballa S., et Al Ghazali M., 2011.- Glycemic indices of five varieties of dates in healthy and diabetic subjects. *J. Nutr.*, 59: 1-10

Al-Shahib W., et Marshall R.J., 2003.- The fruit of the date palm: its possible use as the best food for the future? International Journal of Food Sciences and Nutrition, 54: 247–259.

Arifuzzaman M., Zahid Hasan M., Badier Rahman S. M., et Kamruzzaman Pramanik M., 2014.- Isolation and characterization of *Acetobacter* and *Gluconobacter spp* from sugarcane and rotten fruits. BioSciences, 8 (9): 359-365.

Arkad'eva Z.A., 1983.- Factors affecting the viability and properties of microorganisms in different preservation methods-A review. Nauchnye Doki Vyss Shkoly Biol Nauki, (4):93-105.

Arzul G., et Quiniou F., 2014.- Plancton marin et pesticides : quels liens ? 1st Editions. QUAE GIE, Cedex France, 124 p.

Audigié Cl, Figarella J., et Zonszain F., 1984.- Méthodes d'analyse de substances glucidiques. In: Manipulations d'analyse biochimique. Nouvelle édition, Ed. Doin Paris, 274 p.

Aydin Y. A., et Aksoy N. D., 2009.- Isolation of cellulose producing bacteria from wastes of vinegar fermentation. Proceedings of the World Congress on Engineering and Computer Science, 20-22 October, San Francisco, USA, 1, 4 p.

Babahani S., 2011.- Analyses biologique et agronomique de palmiers mâles et conduite de l'éclaircissage des fruits chez les cultivars Ghars et Deglet Nour. Thèse de doctorat, Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie – El Harrach, 220 p.

Babahani S., 2012.- Effet de la température sur l'évolution des fruits chez quelques variétés du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.). Algerian journal of arid environment, 2 (1): 36-41

Baccini A., Besse Ph., Déjean S., Martin P., Robert-Granié C., et San Cristobal M., 2008.- Analyse statistique des données d'expression. Support de formation en ligne, www.lsp.ups-tlse.fr/Biopuces, 135p

Beaujeu-Garnier J., 1963.- Nomades et nomadisme au Sahara, 1963. L'Information Géographique, 27 (3), 136 p.

Beheshti-Maal K., et Shafiee R., 2010.- Isolation and characterization of an *Acetobacter* strain from Iranian white-red cherry as a potential strain for cherry vinegar production in microbial biotechnology. Asian Journal of Biotechnology, 1: 53-59.

Beheshti-Maal K., 2014.- Identification of a thermo-tolerant *Acetobacter* strain isolated from Iranian date palm (Rotab) suitable for date vinegar production in agricultural biotechnology. Advances in Environmental Biology, 8: 1063–1071.

Beheshti-Maal K., et Shafiee N., 2019.- A novel high ethanol-thermo-tolerant *Acetobacter pasteurianus* KBMNS-IAUF-2 strain and the optimization of acetic acid production using the Taguchi statistical method. Advanced Research in Microbial Metabolites & Technology, 2: 1–12.

Beheshti-Maal K., et Shafiee R., 2010.- Characterization of an *Acetobacter* Strain Isolated from Iranian Peach that Tolerates High Temperatures and Ethanol Concentrations. International Journal of Biotechnology and Bioengineering, 4: 146–150.

Beheshti-Maal K., et Shafiee N., 2019.- Isolation and Identification of A Novel Strain of *Acetobacter ghanensis* KBMNS-IAUF-6 from Banana Fruit, Resistant to High Temperature and Ethanol Concentration. Iranian Journal of Medical Microbiology, 13: 251–265.

Bekatorou A., 2019. Advances in Vinegar Production. Ed. CRC Press Inc, Boca Raton, FL, 523 p.

Belaid D., 2015.- La culture du palmier dattier en Algérie. Sciences et techniques agronomiques, 35 p.

Benoussaid N., Benchabane M., et Thonart P., 2018.- Identification de souches de *Pseudomonas*

fluorescents et application de leurs lyophilisats pour le biocontrôle de la fusariose vasculaire de la tomate. *Revue Agrobiologia*, 8(1): 753-764

Bellankimath A., Katti A., Hemalata V.B., et Meti B.S., 2017.- Isolation and Characterization of the Indigenous Acetic Acid Bacteria from Western Ghats Soil Samples. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*, 6(9): 1255-1265.

Benahmed Djilali A., Benrachedi K., et Benamara S., 2012.- Possibilité de production d'un vinaigre biologique de dattes cultivées dans le sud Algérien. *Sciences & Technologie, C, Biotechnologies* 35: 20-24.

Benselama O., Ahmed Zaid T., et Benmounah A., 2016.- Valorisation des dattes pour la fabrication de tensioactifs non ioniques. *Revue des matériaux et énergies renouvelables* 1: 59-64.

Benziouche S.E., et Cheriet F., 2012.- Structure et contraintes de la filière dattes en Algérie. *New Medit*, 11 (4): 49-57.

Bergey D.H., Krieg N.R., et Holt J.G., 1984.- *Bergey's manual of systematic bacteriology* Ed. Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2648 p.

Besbes S., Cheikh-Rouhou S., Blecker C., Hentati B., Deroanne C., et Attia H., 2006.- Voies de valorisation des pulpes de dattes. *Microbiolo. Hyg. Alim*, 18 (52): 3-7.

Bessah R., et Touzi A., 2001.- Production de Protéines d'Organismes Unicellulaires (POU) à partir des Déchets de Dattes. *Rev. Energ. Ren. : Production et Valorisation – Biomasse*: 37-40.

Bhat S.V., Akhtar R., et Amin T., 2014.- An Overview on the Biological Production of Vinegar. *International Journal of Fermented Foods*, 3 (2): 139-155.

Bouaziz S., et Ould El Hadj M. D., 2010.- Contribution à l'étude des caractéristiques physico-chimiques et biochimiques de quelques types de vinaigres traditionnels de dattes obtenues à partir de quelques variétés de la région de Ouargla. *Annales Des Sciences et Technologie*, 2: 80-86.

Boudjenah-Haroun S., Bouallala M., Djerroudi O., Halouadji M., et Limam Z., 2017.- Caractéristiques physicochimiques et biométriques de quelques variétés de dattes consommées dans la région d'Adrar (Sud-ouest d'Algérie). *ElWahat pour les Recherches et les Etudes*, 10: 1-20.

Bouguedoura N., Benkhalifa A., et Bennaceur M. 2017.- Le palmier dattier en Algérie : Situation, contraintes et apports de la recherche. In *Biotechnologies Du Palmier Dattier*, F. Aberlenc-Bertossi, Ed. Marseille: IRD Éditions, Pp 15-22.

- Bourgeois C. M., et Larpent J. P. (1990).- Microbiologie alimentaire: Tome II les fermentations alimentaires. Ed. Technique et Documentation, Paris, Pp 121-176.
- Bourgeois C. M., et Larpent J. P., (1996).- Microbiologie alimentaire: Aliments fermentés et fermentation alimentaires. 2^{ème} Ed. Technique et documentations, 352- 623p.
- Branger A., 2004.- Fabrication de produits alimentaires par fermentation: l'ingénierie. Tech. Ing., Agroaliment F2 (F3501): 1-17.
- Budak N.H., Aykin E., Seydim A.C., Greene A.K., et Guzel- Seydim Z.B., 2014.- Functional Properties of Vinegar. Journal of Food Science, 79: R757–R764.
- Camin F., Bontempo L., Perini M., Tonon A., Breas O., Guillou C., Moreno-Rojas J., et Gagliano G., 2013.- Control of wine vinegar authenticity through $\delta^{18}O$ analysis. Food Control, 29: 107–111
- Cappuccino J.G., et Sherman N., 2014.- Microbiology: A Laboratory Manual. Ed. Pearson, 560 p.
- Carr J.G., 1968.- Methods for identifying acetic acid bacteria. In Identification methods for microbiologists, Gibbs B.M., Shapton D.A., Ed. Academic Press, UK, London, Pp 1–8.
- Cehma A., 2001.- Valorisation des Sous-Produits du Palmier Dattier en Vue de leur Utilisation en Alimentation du Bétail. Rev. Energ. Ren. : Production et Valorisation – Biomasse: 59–64.
- Cherif B., Bouras N., Oumouna M., Ould El Hadj M. D., Holtz M. D., et Sabaou N., 2014.- Ethno-pharmacological use and antimicrobial activity of traditional date vinegar of Ghardaïa. Algerian journal of arid environment, 4 (1): 83-93.
- Chinnawirotpisan P. G., Theeragool S., Limtong H., Toyama O., Adachi., et Matsushita K., 2003.- Quinoprotein alcohol dehydrogenase is involved in catabolic acetate production, while NAD-dependent alcohol dehydrogenase in ethanol assimilation in *Acetobacter pasteurianus* SKU1108. Journal of bioscience and bioengineering, 96 (6): 564-571.
- Cleenwerck I., et De Vos P., 2008.- Polyphasic taxonomy of acetic acid bacteria: an overview of the currently applied methodology. International Journal of Food Microbiology, 125 (1): 2-14.
- Coulibaly P.M., Goualié B.G., Samagaci L., Ouattara H.G., et Niamké S.L., 2018.- Screening of Thermotolerant Acetic Acid Bacteria Involved in Cocoa Fermentation in Six Major Cocoa Producing Regions in Côte d'Ivoire. Biotechnology Journal International, 21(2): 1–15.

Crotti E., Rizzi A., Chouaia B., Ricci I., Favia G., Alma A., Sacchi L., Bourtzis K., Mandrioli M., et Cherif A., 2010.- Acetic acid bacteria, newly emerging symbionts of insects. *Applied Environmental Microbiology*, 76 (21), 6963–6970.

Dagnelie P., 1975.- *Analyse statistique à plusieurs variables*. Ed. Imprimerie J. Duculot, Gembloux, 362 p.

Doumandji A., et Alili D., 2012.- Effet in vitro de la spiruline sur l'évolution des bactéries lactiques thermophiles. *Revue Agrobiologia*, 2: 67-74

De Vero L., et Giudici P., 2008.- Genus-specific profile of acetic acid bacteria by 16S rDNA PCR-DGGE. *International Journal of Food Microbiology*, 125 (1): 96–101.

De Ley J., Gillis M., Swings J., Krieg N. R., et Holt J. G., 1984.- *Bergey's manual of systematics bacteriology*, Williams & Wilkins, Boltimore, London, 1: 268-78.

Delarras C. 2007.- *Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire*. Ed. Tec & Doc Lavoisier, 476p.

Devies C., 1989.- *Le vinaigre, Microbiologie Alimentaire, les Fermentations Alimentaires*. Ed. Lavoisier, Paris, Pp 93-105.

Diba F., Alam F., et Talukder A., 2015.- Screening of Acetic Acid Producing Microorganisms from Decomposed Fruits for Vinegar Production. *Advances in Microbiology*, 5 (5): 291-297.

Djebri M., 1994.- *Le précis de phoeniciculture*. Ed. FAO, Rome, Pp 52 – 58

Dpat, 2006.- *Annuaire statistique de la wilaya de Ouargla*. Direction de la planification et de l'aménagement du territoire: 8-12

Du Toit W., et Pretorius I., 2002.- The occurrence, control and esoteric effect of acetic acid bacteria in winemaking. *Annals of Microbiology*, 25 (2): 155-179.

Dupin H., 1992.- *Alimentation et nutrition humaines*. Ed. ESF, Paris, 1544 p.

Edkins A.L., et Boshoff A., 2021.- General Structural and Functional Features of Molecular Chaperones. In *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Ed. Springer, 1340: 11–73.

Elleuch M., Besbes S., Roiseux O., Blecker C., Deroanne C., Drira N. E., et Attia H., 2008.- Date flesh: Chemical composition and characteristics of the dietary fibre. *Food Chemistry*, 111 (3): 676-682.

Erkmen O., et Bozoglu T.F., 2016.- Food microbiology: Principles into practice. Ed. Wiley, West Sussex, UK, 944 p.

Fiset J.F., 2001.- Récupération de métaux en solution par adsorption sur différentes biomasses végétales : application à des effluents industriels. Thèse du Doctoral, Université du Québec, Institut national de la recherche scientifique, Maîtrise en sciences de l'eau, 258 p.

Rajae Rad A., Ahmadi F., Mohammadabadi T., Ziaee E., Polikarpov I., 2015.- Combination of Sodium Hydroxide and Lime as a Pretreatment for Conversion of Date Palm Leaves into a Promising Ruminant Feed: An Optimization Approach. Waste and Biomass Valorization 6 (2) : 243-252.

Gao L., Wu X., Zhu C., Jin Z., Wang W., et Xia X., 2020.- Metabolic engineering to improve the biomanufacturing efficiency of acetic acid bacteria: advances and prospects. Critical Reviews in Biotechnology 40 (4):522-538.

Ghariani M., Hamdi M., Beneduce L., Capozzi V., et Massa S., 2017.- Identification of acetic acid bacteria isolated from Tunisian palm sap. African Journal of Microbiology Research, 11 (15): 596-602.

Gomes R. J., Borges M. F., Rosa M. F., Castro-Gómez R. J. H., et Spinosa W. A., 2018.- Acetic Acid Bacteria in the Food Industry: Systematics, Characteristics and Applications. Food Technol. Biotechnol, 56: 139-151.

Gros-Balthazard M., Newton C., Ivorra S., Pintaud J.-C., et Terral J.-F., 2013.- Origines et domestication du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.). État de l'art et perspectives d'étude. Revue d'ethnoécologie- 4: 1-15.

Guiraud J.P., 1998.- Microbiologie alimentaire. Ed. Dunod, Paris, Pp 163-505.

Guiraud J.P., 2003.- Microbiologie alimentaire. Ed. Dunod, Paris, 651p.

Guiraud J.P., 2012.- Microbiologie alimentaire. Ed. Dunod, Paris, 696 p.

Guiraud J., et Galzy P., 1980.- L'analyse microbiologique dans les industries alimentaires. Editions de l'Usine nouvelle, Paris, 236p.

Gullo M., et Giudici P., 2008.- Acetic acid bacteria in traditional balsamic vinegar: Phenotypic traits relevant for starter cultures selection. International Journal of Food Microbiology, 125 (1): 46-53.

Gupta D., Chakraborty R., Kabir H., Halder S., Biswas K., Chowdhury J., Mondal A., Majumdar S., Haque M., Ghosh S., Banerjee A., et Sinha S.N., 2020.- Screening of organic acid production

- potentiality of a rice rhizospheric purple non sulfur bacterium *rubrivivax gelatinosus* strain RASN4. *International Journal of Advanced Research and Review*, 5 (2): 80–111.
- Gurevich A., Saveliev V., Vyahhi N., et Tesler G., 2013.- QUASt: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics*, 29: 1072–1075.
- Haccoun R.R., et Cousineau D., 2009.- *Statistiques : Concepts et applications*. Ed. Presses de l'Université de Montréal, Montréal, 456p.
- Haghshenas B., Nami Y., Abdullah N., Radiah D., Rosli R., Barzegari A., et Yari Khosroushahi A., 2015.- Potentially probiotic acetic acid bacteria isolation and identification from traditional dairies microbiota. *International Journal of Food Science & Technology*, 50 (4): 1056-1064.
- Hamdi W., 2011.- *Qualité hygiénique et caractéristiques physicochimiques des eaux domestiques de quelques localités de la cuvette de Ouargla*. Mémoire de Magister, Université Kasdi Merbah, Ouargla, 91 p.
- Hamoudi L., 2005.- *Effet des agents protecteurs sur la survie des cultures concentrées de *Geotrichum candidum* durant la lyophilisation et l'entreposage*. thèse de doctorat, université Laval, Québec, 80 p.
- Heckly R.J., 1978.- Preservation of microorganisms. *Advances in Applied Microbiology*, 1 (24) :1-53.
- Hitos P., Pons A., Martin Hinojosa I., Gomez R., Hernandez A. et Muñoz J., 2000.- Validation des méthodes d'analyse pour l'acidité totale, fixe et volatile, les substances réductrices non volatiles, le cuivre et le zinc dans les vinaigres de vin. Feuille Vert de l'OIV, n° 1115, 476 p.
- Hutchinson U.F., Gqozo S., Jolly N.P., Chidi B.S., Du Plessis H.W., Mewa-Ngongang M., et Ntwampe S.K.O., 2019.- Aeration, Agitation and Cell Immobilization on Corncobs and Oak Wood Chips Effects on Balsamic-Styled Vinegar Production. *Journal of Food Science*, 8 (8): 1-8.
- Hutkins R.W., 2006.- *Microbiology and Technology of Fermented Foods*. Ed. Wiley-Blackwell Chicago, Ames, Iowa, USA, 488 p.
- Idder M.A., Idder-Ighili H., Saggou H., et Pintureau B., 2009.- Taux d'infestation et morphologie de la pyrale des dattes *Ectomyelois ceratoniae* (Zeller) sur différentes variétés du palmier dattier *Phoenix dactylifera* (L.). *Cahiers Agricultures*, 18 (1): 63-71.
- Isham N. K. M., Mokhtar N., Fazry S., et Lim S. J., 2019.- The development of an alternative fermentation model system for vinegar production. *LWT- Food Science and Technology*, 100: 322-327.

- ITS, 2018.- International Trade Statistic (ITS). Liste des produits au niveau 4 chiffres importé par l'Algérie en 2017 produits détaillés dans la catégorie suivante : 22, Boissons, liquides alcooliques et vinaigres.
- J.O.R.A.D.P, 1998.- Journal officiel de la République Algérienne N°18 du 29 Mars 1998. Arrêté interministériel du 24 Rajab 1418 correspondant au 25 novembre 1997 relatif aux Spécifications techniques et aux modalités et conditions de mise à la consommation des vinaigres, 31 p.
- Kadere T. T., Miyamoto T., Oniang'o R. K., Kutima P. M., et Njoroge S. M., 2008.- Isolation and identification of the genera *Acetobacter* and *Gluconobacter* in coconut toddy (mnazi). *African Journal of Biotechnology*, 7(16): 2963-2971.
- Kaidi F., et Touzi A., 2001. Production de bioalcool à partir des déchets de dattes. *Revue Des Energies Renouvelables, Production et Valorisation- Biomasse*: 75-78.
- Klawpiyapamornkun T., Bovonsombut S., et Bovonsombut S., 2015.- Isolation and Characterization of Acetic acid Bacteria from Fruits and Fermented fruit juices for Vinegar Production. *Food and Applied Bioscience Journal*, 3 (1): 30–38.
- Konate M., Akpa E., Koffi L., Kra K., Megnanou R., et Niamke S., 2014.- Isolation of thermotolerant and high acetic acid-producing *Acetobacter pasteurianus* from Ivorian palm wine. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 26 (9):773-785.
- König H., Uden G., Fröhlich J., 2017.- *Biology of Microorganisms on grapes, in must and in wine*. Ed. Springer, New York, 710 p.
- Konkel M. E., Kim B. J., Klena J. D., Young C. R., et Ziprin R., 1998.- Characterization of the Thermal Stress Response of *Campylobacter jejuni*. *Infection and Immunity*, 66 (8): 3666–3672.
- Kim D. H., Chon J. W., Kim H., et Seo K. H., 2019a.- Development of a novel selective medium for the isolation and enumeration of acetic acid bacteria from various foods. *Food Control* 106: 7-17.
- Kim D. H., Lim H. W., Kim S. H., et Seo K. H., 2019b.- Development of a real-time PCR assay for rapid screening of acetic acid bacteria as a group in food products. *Food Control*, 100: 78-82.
- Kokou F., Makridis P., Kentouri M., et Divanach P., 2012.- Anti-bacterial activity in microalgae cultures. *Aquacult. Res*, 43: 1520-1527.
- Krusong W., Sriphochanart W., Suwapanich R., Mekkerdchoo O., Sriprom P., Wipatanawin A., et Massa S., 2020.- Healthy dried baby corn silk vinegar production and determination of its main organic volatiles containing antimicrobial activity. *LWT- Food Science and Technology*,

117: 1-9.

Larpent J. P., 1997. Microbiologie alimentaire: Techniques de laboratoire. Ed. TEC & DOC, paris, 1092 p.

Lavasani P.S., Motevaseli E., Shirzad M., et Modarressi M.H., 2017.- Isolation and identification of *Komagataeibacter xylinus* from Iranian traditional vinegars and molecular analyses. *Iranian Journal of Microbiology*, 9(6): 338-347.

Longin C., 2016.- Développement de méthodes permettant la détection et la quantification de microorganismes d'altération du vin ; Etude de facteurs de développement. Thèse doctorat en Sciences des Aliments, Spécialité Microbiologie, Université de Bourgogne, 200 p.

Lynch K.M., Zannini E., Wilkinson S., Daenen L., et Arendt E.K., 2019.- Physiology of Acetic Acid Bacteria et Their Rôle in Vinegar and Fermented Beverages. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18: 587-625.

Madigan M., Martinko J., et Prieur D., 2007.- Bock, Biologie des micro-organismes. Ed. Pearson Education France, Paris, 1088 p.

Maleki F., Khosravi A., Nasser A., Taghinejad H., et Azizian M., 2016.- Bacterial heat shock protein activity. *Journal of clinical and diagnostic research*, 10 (3): BE01-BE03.

Mamlouk D., et Gullo M., 2013.- Acetic acid bacteria: physiology and carbon sources oxidation. *Indian Journal of Microbiology*, 53 (4): 377-384.

Manns R., 2007.- Guide de mesure de la conductivité. Ed. JUMO, 40 p.

Mas A., Torija M. J., García-Parrilla M. C., et Troncoso A. M., 2014.- Acetic acid bacteria and the production and quality of wine vinegar. *Scientific World Journal*, 2014: 1-6.

Mathew B., Agrawal S., Nashikkar N., Bundale S., et Upadhyay A., 2019.- Isolation of Acetic Acid Bacteria and Preparation of Starter Culture for Apple Cider Vinegar Fermentation. *Advances in Microbiology*, 9: 556-569.

Matsushita K., Toyama H., Tonouchi N., et Okamoto-Kainuma A., 2016.- Acetic Acid Bacteria: Ecology and Physiology. Springer, New York, 358 p.

Matsutani M., Hirakawa H., Hiraoka E., Theeragool G., Yakushi T., et 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 and Environments* 31: 395-400.

Mbungu C., Tshimenga K., Nsambu P., Tshibadi C.M., Muwawa J., et Kanyinda J.N.M., 2016.- Qualité microbiologique, caractéristiques Biochimiques et Physico-Chimiques d'un vinaigre artisanal à base des mangues jetées/[Microbiological Quality, Biochemical and Physical-Chemical characteristics of artisanal vinegar based piers mangoes]. International Journal of Innovation and Applied Studies, 17 (3): 947-953.

Mehaia M.A., et Cheryan M., 1991. Fermentation of date extracts to ethanol and vinegar in batch and continuous membrane reactors. Enzyme and Microbial Technology, 13: 257-261.

Melo J., 2016.- Microbiology of Vinegar: from Isolation, Phenetic Characterization and Detection of Acetic Acid Bacteria to Microbial Profiling of an Industrial Production. Mémoire de Master Microbiologie, 47 p.

Micciche A.C., Barabote R.D., Dittoe D.K., et Ricke S.C., 2020.- *In silico* genome analysis of an acid mine drainage species, *Acidiphilium multivorum*, for potential commercial acetic acid production and biomining. Journal of Environmental Science and Health, Part B 55 (5): 447-454.

Millet V., et Lonvaud-Funel A., 2000.- The viable but non-culturable state of wine micro-organisms during storage. Letters in Applied Microbiology, 30 (2): 136-141.

Mimouni Y., 2015.- Développement de produits diététiques hypoglycémiant à base de dattes molles variété « Ghars », la plus répandue dans la cuvette de Ouargla. Thèse de doctorat, Université Kasdi Merbah Ouargla, 128 p.

Mimouni Y., et Siboukeur O., 2015.- Innovation des produits diététiques hypoglycémiant à base de dattes: Transformation des dattes. Ed. Éditions universitaires européennes, 160 p.

Moghadami F., Soudi M. R., Sepehr S., et Rezvanianzade M. R., 2013.- Evaluation of Thermotolerance of Native Strains of Acetic acid Bacteria in Iran. International Research Journal, of Applied and Basic Sciences 4: 2670-2675.

Montet D., et Ray R.C., 2016.- Fermented Foods, Part I: Biochemistry and Biotechnology. Ed. CRC Press, 413 p.

Mounir M., Shafiei R., Zarmehrkorshid R., Hamouda A., Ismaili Alaoui M., et Thonart P., 2016.- Simultaneous production of acetic and gluconic acids by a thermotolerant *Acetobacter* strain during acetous fermentation in a bioreactor. Journal of Bioscience and Bioengineering, 121: 166-171.

Mounir M., Shafiei R., Zarmehrkorshid R., Hamouda A., Alaoui M.I., et Thonart P., 2015.- Evaluation of thermotolérant *Acetobacter pasteurianus* strains isolated from Moroccan fruits

catalyzing oxidative fermentation at high temperature. *Communication in Agricultural and Applied Biological Sciences*, 80 (1): 37-43.

Multon J.L., 1999.- *Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agro-alimentaires, Analyses des constituants alimentaires*. Tec & Doc, 476 p.

Mutlu B.R., Hirschev K., Wackett L.P., et Aksan A., 2015.- Long-term preservation of silica gel-encapsulated bacterial biocatalysts by desiccation. *J Sol-Gel Sci Technol* 74: 823–833.

Naloka K., Yukphan P., Matsutani M., Matsushita K., et Theeragool G., 2020.- *Komagataeibacter diospyri* sp. nov., a novel species of thermotolerant bacterial nanocellulose-producing bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70 (1): 251-258.

Nanda K., Taniguchi M., Ujike S., Ishihara N., Mori H., Ono H., et Murooka Y., 2001.- Characterization of Acetic Acid Bacteria in Traditional Acetic Acid Fermentation of Rice Vinegar (Komesu) and Unpolished Rice Vinegar (Kurosu) Produced in Japan. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 986-990.

Ndoye B., Cleenwerck I., Engelbeen K., Dubois-Dauphin R., Guiro A.T., Van Trappen S., Willems A., et Thonart P., 2007.- *Acetobacter senegalensis* sp. nov., a thermotolerant acetic acid bacterium isolated in Senegal (sub-Saharan Africa) from mango fruit (*Mangifera indica* L.). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57: 1576-1581.

Ohmori S., Masai H., Arima K., et Beppu T., 1980.- Isolation and Identification of Acetic Acid Bacteria for Submerged Acetic Acid Fermentation at High Temperature. *Agricultural and Biological Chemistry* 44 (12): 2901-2906.

OIV, 2018.- *Organisation internationale de la vigne et du vin. Recueil des méthodes d'analyse des vinaigres de vin*, 2 p.

ONM, 2019.- *Office nationale de la météorologie. Données climatiques de l'année 2019*.

Ould El Hadj M. D., Sebihi A. H., et Siboukeur O., 2001.- Qualité Hygiénique et Caractéristiques Physico-Chimiques du Vinaigre Traditionnel de Quelques Variétés de Dattes de la Cuvette de Ourgla. *Rev. Energ. Ren, Production et Valorisation-Biomasse*, 6: 87–92.

Ould El Hadj M.D., Bitour Z., et Siboukeur O., 2006.- Etude de la production de levure boulangère (*Saccharomyces Cerevisiae*) Cultivée Sur mout de rebuts de dattes. *Courrier Du Savoir*, 7: 13-18.

Ozenda P., 2004.- *Flore et végétation du Sahara*. CNRS, Paris, 670 p.

- Paradh A. et Hill A.E., 2016.- Gram negative bacteria in brewing- A review. *Advances in Microbiology*, 6: 195-209.
- Peng Y., Leung H.C.M., Yiu S.M., et Chin F.Y.L., 2010.- IDBA – A Practical Iterative de Bruijn Graph De Novo Assembler. In *Research in Computational Molecular Biology*, B. Berger. Ed. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Pp 426–440.
- Perumpuli P., Watanabe T., et Toyama H., 2014.- Identification and characterization of thermotolerant acetic acid bacteria strains isolated from coconut water vinegar in Sri Lanka. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 78 (3): 533-541.
- Philippeau G., 1986.- Comment interpréter les résultats d'une analyse en composantes principales. ITCF, Paris, 63 p
- Prescott L.M., Harley J., Klein D.A., Bacq-Calberg C.M., et Dusart J., 2003.- *Microbiologie*. De Boeck, 1137 p.
- Prust C., Hoffmeister M., Liesegang H., Wiezer A., Fricke W.F., Ehrenreich A., Gottschalk G., et Deppenmeier U., 2005.- Complete genome sequence of the acetic acid bacterium *Gluconobacter oxydans*. *Nature Biotechnology*, 23: 195-200.
- Qiu X., Zhang Y., et Hong H., 2021.- Classification of acetic acid bacteria and their acid resistant mechanism: A mini-review.. *AMB Express*, 11(29):1-15.
- Quézel P., 1978.- Analysis of the flora of Mediterranean and Saharan Africa. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 65: 479-534.
- Raza K., et Ahmad S., 2016.- Principle, analysis, application and challenges of next-generation sequencing: A review. *Biology arXiv: Genomics*, 1-29.
- Rodier J., 2005.- *L'analyse de l'eau : eaux naturelles, eaux résiduaires, eau de mer : chimie, physico-chimie, microbiologie, biologie, interprétation des résultats*. Ed. Dunod, Paris, 1384 p.
- Romero-Cortes T., Robles-Olvera V., Rodriguez-Jimenes G., et Ramírez-Lepe M., 2012.- Isolation and characterization of acetic acid bacteria in cocoa fermentation. *African Journal of Microbiology Research*, 6 (2): 339-347.
- Rouvillois-Brigol M., 1975.- *Le Pays de Ouargla, Sahara Algérien: variations et organisation d'un espace rural en milieu désertique*. Département de géographie de l'Université de Paris-Sorbonne, 316 p.

Ruangpan L., et Tendencia E.A., 2004.- Laboratory manual of standardized methods for antimicrobial sensitivity tests for bacteria isolated from aquaculture. Southeast Asian Fisheries Development Center, Aquaculture Department, Philippines, Iloilo, 55 p.

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*, 61 (2):317-323.

Saha P., et Banerjee S., 2013.- Optimization of process parameters for vinegar production using banana fermentation. *International Journal of Research in Engineering and Technology*, 2 (9): 501-514.

Salama Y., Ph C., Mountadar M., Rihani M., et Assobhei O., 2016.- Study of physicochemical and bacteriological quality of wastewater discharged into coastal waters from the city of El Jadida and proposed a system of treatment based on biodenitrification. *Algerian Journal of Arid Environment*, 6: 1–14.

Sayah Z., et Ould El Hadj M. D., 2010.- Etude comparative des caracteristiques physico-chimiques et biochimiques des dattes de la cuvette de Ouargla. *Annales Des Sciences et Technologie*, 2 (1): 87-92.

Sebihi A.H., 2014.- Valorisation des produits du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L); source de promotion des produits de terroirs: Cas de la région de Ouargla. Mémoire de magister, Université Kasdi Merbah Ouargla, 207 p.

Sengun I. Y., 2017.- *Acetic Acid Bacteria: Fundamentals and Food Applications*. CRC Press, 358 p.

Sengun I.Y., et Karabiyikli S., 2011. Importance of acetic acid bacteria in food industry. *Food Control*, 22: 647-656.

Senoussi A., Babahani S., et Sebihi A., 2017.- Le palmier et la datte: Un arbre et un fruit a haute valeur ajoutée. Cas de la region de Ouargla. *African Review of Science, Technology and Development*, 2: 1–12.

Seyram K. Sossou Y. A., Simplicite D. K. et Comlan S., 2009.- Etude des écorces d'ananas transformées en vinaigre par biotechnologie. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 12: 859-865.

Sharafi S., Rasooli I., et Beheshti-Maal K., 2010.- Isolation, characterization and optimization of indigenous acetic acid bacteria and evaluation of their preservation methods. *Iran Journal of Microbiol*, 2: 38–45.

Shao W., Ebaid R., El-Sheekh M., Abomohra A., et Eladel H., 2019.- Pharmaceutical applications and consequent environmental impacts of Spirulina (Arthrospira): A review. *Grasas y Aceites*, 70 (1): e292.

Shen C., et Zhang Y., 2017.- *Food Microbiology Laboratory for the Food Science Student: A Practical Approach*. Ed. Springer, New York, 103 p.

Shouji O., Hiroshi M., Kei A., et Teruhiko B., 2014.- Isolation and Identification of Acetic Acid Bacteria for Submerged Acetic Acid Fermentation at High Temperature. *Agricultural and Biological Chemistry*, 4 (12): 2901-2906.

Sokollek S.J., Hertel C., et Hammes W.P., 1998.- Description of *Acetobacter oboediens* sp. nov. and *Acetobacter pomorum* sp. nov., two new species isolated from industrial vinegar fermentations. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 48: 935–940.

Solieri L., et Giudici P., 2009. *Vinegars of the World*. Ed. Springer, Pp 1–16.

Son Changjin Seonyong C., Jieun L., et Seonggiun K., 2002.- Isolation and Cultivation Characteristics of *Acetobacter xylinum* KJ-1 Producing Bacterial Cellulose in Shaking Cultures. *J. Microbiol. Biotechnol*, 12 (5): 722-728.

Song J., Zhang J. H., Kang S. J., Zhang H. Y., Yuan J., Zeng C. Z., Zhang F., et Huang Y. L., 2019.- Analysis of microbial diversity in apple vinegar fermentation process through 16s rDNA sequencing. *Food Science & Nutrition*, 7: 1230–1238.

Siboukeur O., 1997. *Qualité nutritionnelle, hygiénique et organoleptique du jus de dattes*. Thèse Magister en Sciences Alimentaires, INA.

Sievers M., Sellmer S., et Teuber M., 1992.- *Acetobacter europaeus* sp. nov., a Main Component of Industrial Vinegar Fermenters in Central Europe. *Systematic and Applied Microbiology*, 15: 386–392.

Stasiak L., et Blazejak S., 2009.- Acetic acid bacteria - perspectives of application in biotechnology - A review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 59: 17–23.

Stewart E.J., 2012.- Growing Unculturable Bacteria. *Journal of Bacteriology*, 194 (16): 4151–4160.

Štornik A., Skok B., et Trček J., 2016.- Comparison of Cultivable Acetic Acid Bacterial Microbiota in Organic and Conventional Apple Cider Vinegar. *Food Technol Biotechnol*, 54: 113–119.

- Stoychev J. T., Lekova S. D., et Terziyski G. P., 2020.- Studying and Modeling of the Process Acetification. *International Journal of Scientific Research and Engineering Development*, 3 (2): 421-430.
- Taweecheep P., Naloka K., Matsutani M., Yakushi T., Matsushita K., et Theeragool G., 2019.- In Vitro Thermal and Ethanol Adaptations to Improve Vinegar Fermentation at High Temperature of *Komagataeibacter oboediens* MSKU 3. *Appl Biochem Biotechnol*, 189: 144–159.
- Tharinee K., Sakunnee B., et Bovonsombut S., 2015.- Isolation and Characterization of Acetic acid Bacteria from Fruits and Fermented fruit juices for Vinegar Production. *Food and Applied, Bioscience Journal*, 3(1): 30-38.
- 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*, 13: 12-21.
- Toriya M.J., Mateo E., Guillamón J.M., et Mas A., 2010.- Identification and quantification of acetic acid bacteria in wine and vinegar by TaqMan–MGB probes. *Food Microbiology* 27: 257–265.
- Tortora G. J., Funke D. R., Case C. L., 2012.- Introduction à la microbiologie. 2^{ème} édition, Erpi Sciences, Paris, 624 p.
- Toutain G., 1967.- Le palmier dattier, culture et production. *Al Awamia* 25, Pp 83–151.
- Trček J., Jernejc K., et Matsushita K., 2007.- The highly tolerant acetic acid bacterium *Gluconacetobacter europaeus* adapts to the presence of acetic acid by changes in lipid composition, morphological properties and PQQ-dependent ADH expression. *Extremophiles* 11: 627–635.
- Verlhac P., 2019.- Étude et optimisation des cycles de lyophilisation d'une souche probiotique modèle. Thèse du doctorat, Génie chimique. Université de Lyon, 122 p.
- Vilain., 1999.- Méthodes expérimentales en agronomie pratique et analyse. Ed. Lavoisier, Paris, 337 p.
- Vinicius De Melo Pereira G., De Carvalho Neto D. P., Junqueira A. C. D. O., Karp S. G., Letti L.A., Magalhães Júnior A. I., et Soccol C. R., 2020.- A review of selection criteria for starter culture development in the food fermentation industry. *Food Reviews International*, 36: 135–167.
- Voet D., et Voet J.G., 2016.- Biochimie. Ed. De Boeck, 1784 p.

Yamada Y., 2016.- Systematics of Acetic Acid Bacteria. In Acetic Acid Bacteria: Ecology and Physiology, K. Matsushita, H. Toyama, N. Tonouchi, and A. Okamoto-Kainuma, Ed. Springer Japan, Tokyo, Pp 1–50.

Yi J.S., Kim M., Kim S.-J., et Kim B.G., 2015.- Effects of Sucrose, Phosphate, and Calcium Carbonate on the Production of Pikromycin from *Streptomyces venezuelae*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25: 496–502.

Yun J.H., Kim J.H., et Lee J.E., 2019.- Surface Film Formation in Static-Fermented Rice Vinegar: A Case Study. *Mycobiology* 47: 250–255.

Yu Y., Li X., Zhang J., Chai L.J., Lu Z.M., et Xu Z.H., 2020.- *Lactobacillus jinshani* sp. nov., isolated from solid-state vinegar culture of Zhenjiang aromatic vinegar. *Antonie van Leeuwenhoek*, 113 : 43–54.

Zahoor T., Siddique F., et Farooq U., 2006. Isolation and characterization of vinegar culture (*Acetobacter aceti*) from indigenous sources. *British Food Journal*, 108: 429-439.

Zhang X. L., Zheng Y., Xia M.L., Wu Y.N., Liu X.J., Xie S.K., Wu Y.F., et Wang M., 2020.- Knowledge Domain and Emerging Trends in Vinegar Research: A Bibliometric Review of the Literature from WoSCC. *Foods*, 9 (166) : 1-34.

Annexes

Annexe 1.-Fiche de renseignement

N° d'échantillons:

1/ le vinaigre:

Lieu de fabrication de vinaigre	
Datte de fabrication de vinaigre	
Datte de l'échantionnage	
Quantité de vinaigre collecter: (mL)	

2/ la datte:

La variété: Deglet-nour	Degla-beida	Hchef deglet-nour	Tacherwit
Hamraya	Horra	Harchaya	Assabri
L'état de datte:	bien	déchet	
Le stade de maturation: Tmar			

3/ Techniques de préparation et de stockage:

Lavage de datte:			
Volume de datte:	1/3	2/3	Autre:
Volume d'eau:	1/3	2/3	Autre:
Type de récipient:	Argile	Métallique	Plastique
Durée de fermentation alcoolique (jours)			
Additifs:			
Sel NaCl (g)			
Orge 7 grain			
Harmel 7grain			
Blé			
Cariante			
Charbon			
Piment			
Durée de fermentation acétique (jours)			
Tamisage et filtration			
L'exposition à la lumière (brunissement)			
Durée de stockage			
Conditions de stockage: T°: optimal			
Lumière:			

4/ Contrôle organoleptique:

Couleur	
Odeur	
Saveur	
Viscosité	
Dilution	
pH	

Annexe 2.- Différents modes de préparation des échantillons de vinaigres traditionnels de dattes

(Ve: volume eau, Vd: volume dattes, Fal/J: Fermentation alcoolique par jour, Fac/J:

Fermentation acétique par jour, T+F: traitement et filtration, T: température, Ha: Hamraya, Hr:

Harchaya, Dn: Deglet-Nour)

Echantillon	Vd	Ve	Additifs	Récipient	Fal/ J	Fac/J	T+F	T (°C)	Lumière
Ha1	1/3	2/3	/	Plastique	40	3	Filtration	35	Ombre
Ha2	1/3	2/3	/	Plastique	40	3	Filtration	Ambiante	Ombre
Dn3	1/3	2/3	/	Plastique	40	3	Filtration	35	Ombre
Dn4	1/3	2/3	/	Plastique	40	3	Filtration	Ambiante	Ombre
Dn5	1/3	2/3	/	Plastique	40	3	Filtration	Ambiante	Ombre
Ha6	1/3	2/3	/	Plastique	40	3	Filtration	Ambiante	Ombre
Ha7	1/3	2/3	/	Plastique	40	3	Filtration	Ambiante	Ombre
Dn8	1/3	2/3	/	Plastique	40	3	Filtration	Ambiante	Ombre
Dn9	1/3	2/3	/	Plastique	40	3	Filtration	Ambiante	Ombre
Ha10	1/3	2/3	/	Plastique	40	3	Filtration	Ambiante	Ombre
Ha11	1/3	2/3	/	Plastique	40	3	Filtration	Ambiante	Ombre
Ha12	1/3	2/3	/	Plastique	40	3	Filtration	Ambiante	Ombre
Hr13	1/3	2/3	/	Plastique	40	3	Filtration	Ambiante	Ombre
Ha14	1/3	2/3	/	Plastique	40	3	Filtration	Ambiante	Ombre
Ha15	1/3	2/3	/	Plastique	40	3	Filtration	Ambiante	Ombre
Dn16	1/3	2/3	/	Plastique	40	3	Filtration	Ambiante	Ombre
Ha17	1/3	2/3	/	Plastique	40	3	Filtration	Ambiante	Ombre
Hr18	1/3	2/3	/	Plastique	40	3	Filtration	Ambiante	Ombre
Dn19	1/3	2/3	/	Plastique	40	3	Filtration	Ambiante	Ombre
Dn20	1/3	2/3	/	Plastique	40	3	Filtration	Ambiante	Ombre
Dn21	1/3	2/3	/	Plastique	40	3	Filtration	Ambiante	Ombre
Dn22	1/3	2/3	/	Plastique	40	3	Filtration	Ambiante	Ombre
Ha23	1/3	2/3	/	Plastique	40	3	Filtration	Ambiante	Ombre
Ha24	1/3	2/3	/	Plastique	40	3	Filtration	Ambiante	Ombre
Hr25	1/3	2/3	/	Plastique	40	3	Filtration	Ambiante	Ombre
Dn26	1/3	2/3	/	Plastique	40	3	Filtration	Ambiante	Ombre
Hr27	1/3	2/3	Citron	Plastique	40	3	Filtration	Ambiante	Ombre
Ha28	1/3	2/3	/	Plastique	40	3	Filtration	Ambiante	Ombre
Hr29	1/3	2/3	/	Plastique	40	3	Filtration	Ambiante	Ombre
Ha30	1/3	2/3	/	Plastique	40	3	Filtration	Ambiante	Ombre
Hr31	1/3	2/3	Ghars	Plastique	40	3	Filtration	Ambiante	Ombre
Hr32	1/3	2/3	/	Plastique	40	3	Filtration	Ambiante	Ombre
Ha33	1/3	2/3	/	Plastique	40	3	Filtration	Ambiante	Ombre
Ha34	1/3	2/3	/	Plastique	40	3	Filtration	Ambiante	Ombre
Ha35	1/3	2/3	/	Plastique	40	3	Filtration	Ambiante	Ombre
Ha36	1/3	2/3	/	Plastique	40	3	Filtration	Ambiante	Ombre
Dn37	1/3	2/3	/	Plastique	40	3	Filtration	Ambiante	Ombre

Ha38	1/3	2/3	/	Plastique	40	3	Filtration	Ambiante	Ombre
Hr39	1/3	2/3	Orge	Plastique	40	3	Filtration	Ambiante	Ombre
Ha40	1/3	2/3	/	Plastique	40	3	Filtration	Ambiante	Ombre
Dn41	1/3	2/3	/	Plastique	40	3	Filtration	Ambiante	Ombre
Dn42	1/3	2/3	/	Plastique	40	3	Filtration	Ambiante	Ombre
Dn43	1/3	2/3	/	Plastique	40	3	Filtration	Ambiante	Ombre
Hr44	1/3	2/3	/	Plastique	40	3	Filtration	Ambiante	Ombre
Dn45	1/3	2/3	/	Plastique	40	3	Filtration	Ambiante	Ombre
Ha46	1/3	2/3	/	Plastique	40	3	Filtration	Ambiante	Ombre
Dn47	1/3	2/3	/	Plastique	40	3	Filtration	Ambiante	Ombre
Dn48	1/3	2/3	/	Plastique	40	3	Filtration	Ambiante	Ombre
Hr49	1/3	2/3	/	Plastique	40	3	Filtration	Ambiante	Ombre
Dn50	1/3	2/3	/	Plastique	40	3	Filtration	Ambiante	Ombre
Hr51	1/3	2/3	/	Plastique	40	3	Filtration	Ambiante	Ombre
Dn52	1/3	2/3	/	Plastique	40	3	Filtration	Ambiante	Ombre
Dn53	1/3	2/3	Orge	Plastique	40	3	Filtration	Ambiante	Ombre
Ha54	1/3	2/3	/	Plastique	40	3	Filtration	Ambiante	Ombre
Dn55	1/3	2/3	/	Plastique	40	3	Filtration	Ambiante	Ombre
Dn56	1/3	2/3	/	Plastique	40	3	Filtration	Ambiante	Ombre
Ha57	1/3	2/3	/	Plastique	40	3	Filtration	Ambiante	Ombre
Hr58	1/3	2/3	/	Plastique	40	3	Filtration	Ambiante	Ombre
Dn59	1/3	2/3	/	Plastique	40	3	Filtration	Ambiante	Ombre
Ha60	1/3	2/3	/	Plastique	40	3	Filtration	Ambiante	Ombre
Dn61	1/3	2/3	Orge	Plastique	40	3	Filtration	Ambiante	Ombre
Ha62	1/3	2/3	/	Plastique	40	3	Filtration	Ambiante	Ombre
Dn63	1/3	2/3	7 blé, 7 orge, dokar, 7 harmal	Plastique	40	3	Filtration	Ambiante	Ombre

Annexe 3.- Milieu de culture

1.- Milieu d'isolement et de purification

1.1.- Milieu de Frateur

Extrait de levure.....	30g
CaCO ₃	20g
Agar.....	20g
Eau distillée.....	1000mL
pH= 5.97	

Autoclavage à 120°C pendant 15mn, refroidir à 45°C, rajouter avant l'emploi 100 mL d'éthanol à 15% stérilisé par filtration et couler en boîtes de pétri en homogénéisant bien.

1.2.- Milieu de Frateur modifié

Poudre de spiruline.....	20g
CaCO ₃	20g
Agar.....	20g
Eau distillée.....	1000mL
pH= 5.5	

Autoclavage à 120°C pendant 15mn, refroidir à 45°C, rajouter avant l'emploi 100 mL d'éthanol à 15% stérilisé par filtration et couler en boîtes de pétri en homogénéisant bien.

1.3.- Milieu Glucose, Yeast extract [Extrait de levure] et Carbonate de calcium (GYC)

Extrait de levure.....	10g/L
D-glucose.....	50 g/L
CaCO ₃	30g/L
Agar.....	25 g/L
Eau distillée.....	1000 mL
pH = 6.10	

Autoclavage à 120°C pendant 15mn, refroidir à 45°C et couler en boîtes de Pétri.

1.4.- Gélose nutritive modifiée

Peptone.....	10g
Chlorure de sodium.....	5g
Extrait de bœuf	5g
Extrait de levure.....	5g
Gélose.....	15g
CaCO ₃	20g
Eau distillée.....	1000 mL
pH = 5.91	

Autoclavage à 120°C pendant 15mn, refroidir à 45°C, rajouter avant l'emploi 100 mL d'éthanol à 15% stérilisé par filtration et couler en boîtes de Pétri en homogénéisant bien.

1.5.- Milieu naturel

Agar.....	4g
Vinaigre.....	40mL

Eau distillée.....160mL
pH = 4.41

1.6.- Milieu naturel modifié

Poudre de spiruline.....20g
Agar.....4g
Vinaigre..... 40mL
Eau distillée.....160mL
pH = 5.41

2. Milieu d'identification

2.1.-Milieu de Carr

Extrait de levure.....30g
Vert de bromocrésol.....0.02g
Agar20g
Eau distillée.....1000mL
Autoclage 15 mn à 120°C, ajouter 3% d'Ethanol stérilisé par filtration avant emploi (45°C) et couler en boîte de Pétri.

2.2- Milieu de test de pouvoir cétoène (Oxydation de Glycérol)

Extrait de levure.....5g
Glycérol.....20g
Agar20g
Eau distillée.....1000mL
Autoclavage à 120°C pendant 15mn, refroidir à 45°C et couler en boîte de Pétri.

2.3.- Milieu de Hoyer (utilisation de NH₄ comme source d'azote)

(NH₄)₂SO₄.....2g
K₂HPO₄.....0.1g
KH₂PO₄.....0.9g
MgSO₄ – 7H₂O.....0.25g
FeCl₃, 6H₂O.....5mg
Eau distillée.....1000mL
Repartir en tube à essai à raison de 09mL, stériliser à 120°C pendant 15mn, ajouter pour chaque tube 1mL d'éthanol à 30% stérilisé préalablement par filtration.

2.4.- Milieu de test de pigmentation (formation de pigments bruns hydrosolubles)

Glucose.....50g
Extrait de levure.....10g
CaCO₃.....30g
Agar25g
Eau distillée.....1000mL
pH = 4.5
Stériliser à 120°C pendant 15mn, refroidir à 45°C et repartir en boîte de Pétri.

2.5.- Milieu de formation d'acide gluconique

Extrait de levure.....	10g
Glucose.....	100g
CaCO ₃	20g
Agar	20g
Eau distillée.....	1000mL

Stérilisation à 120°C pendant 15mn et refroidir à 45°C, repartir en boîte de Pétri.

2.6.- Milieu de formation d'acide cetogluconique

Extrait de levure.....	1g
Peptone	1.5g
Phosphate di-potassique.....	1g
Glucose.....	40g
Eau distillée.....	1000mL

Repartir en tube à raison de 10mL et stériliser à l'autoclave 120°C pendant 15mn.

2.7.- Milieu de test de production de Cellulose (Bouillon pour Bactéries acétiques)

Extrait de levure	10g
Glucose.....	100g
CaCO ₃	20g
Eau distillée	1000mL

Repartir en tube à raison de 10mL et stériliser à l'autoclave 120°C pendant 15mn.

2.8.- Réactif de Bénédict

Sulfate de Cuivre	1.7g
Carbonate di-sodique anhydre.....	10g
Citrate de sodium.....	17.3g
Eau distillée	100mL

2.9.- Liqueur de Fehling

Mélanger avant emploi volume à volume les deux solutions:

Solution A : (Sulfate de cuivre 70g, soude caustique 100g, eau distillée 100mL)

Solution B : Tartrate double de sodium et potassium 350g, eau distillée qsp 1000mL.

2.10.- Milieu Glucose, Yeast extract [Extrait de levure], Ethanol et Acide acétique (GYEA) à 2%

Extrait de levure	20g
Glucose.....	20g
Ethanol	2%
Acide acétique.....	2%
Eau distillée	1000mL

Repartir en tube à raison de 10mL et stériliser à l'autoclave 120°C pendant 15mn. L'éthanol est rajouté après autoclavage.

Annexe 4.- Composition chimique de l'extrait de levure pour 100 g de produit

Extrait sec	94.0 - 98.0
Azote total	10.0 - 11.8
Azote aminé	4.8 - 6.3
Protéines (Nx6.25)	62.5 - 73.8
Hydrates de carbone (valeurs indicatives)	7.0 - 13.0
Cendres déchlorurées (valeurs indicatives)	11.5 - 15.5
Chlorure de sodium	< 0.5
pH= 6.8 - 7.2 à 25°C	

4.1.- Composition moyenne en vitamines (mg par kg de matière sèche) (valeurs indicatives)

B1 (Thiamine)	100 - 120
B2 (Riboflavine)	80 - 120
B5 (Panthothénate de calcium)	120 - 200
B6 (Pyridoxine)	60 - 80
PP (Niacine)	900 - 1100
B12 (cyanocobalamine)	(µg/kg) 5 - 15

4.2.- Composition moyenne en acides aminés totaux (exprimée pour 16 g d'azote protéique soit 100 g de protéines brutes) (valeurs indicatives)

Alanine	8.8
Lysine	8.0
Arginine	5.1
Méthionine	1.4
Acide aspartique	9.9
Phénylalanine	3.7
Cystine	0.9
Proline	4.0
Acide glutamique	16.3
Sérine	4.6
Glycine	4.8
Thréonine	4.3
Histidine	2.1
Tyrosine	2.4
Isoleucine	5.5
Tryptophane	1.3
Leucine	7.6
Valine	5.9

Annexe 5.- Composition chimique de la spiruline (*Arthrospira platensis*)

5.1.- Composition chimique pour 100 g de produit

Protéines	60 g
Fibres	5 g
Bêta-carotène	150 à 240 mg
Vitamine E (alpha-tocopherol).....	10 mg
Vitamine B1 (thiamine).....	3.5 mg
.Vitamine B2	4 mg
Vitamine B6	1.1 mg
Vitamine B12 (cobalamine).....	0.2 mg
Phycocyanine	7 à 8 mg
Lutéine	2 mg
Zéaxanthine	110 mg
Chlorophylle a	0.6 g
Superoxyde Dismutase (SOD).....	100 K à 400 K UI
Acide gamma-linoléique	1 à 1.35 g
Acide linoléique	0.8 à 1 g
Fer	50 à 60 mg
Calcium	1 g
Phosphore	0.8 g
Magnésium	0.4 g
Zinc	3 mg
Potassium	1.75 g
ADN	0.46 g
ARN	2.45 g

5.2.- Répartition des acides aminés pour 60 g de protéines

Acide aspartique.....	6 g
Acide g.....	9 g
Alanine	4.8 g
Arginine	4.2 g
Cystine	0.7 g
Glycine	3.1 g
Histidine	1.1 g
Isoleucine	3.35 g
Lysine	3 g
Méthionine	1.5 g
Phénylalanine	2.7 g
Proline	2.35 g
Sérine	3 g
Thréonine	3.2 g
Tryptophane	1 g
Tyrosine	2.6 g
Valine	3.7 g

Annexe 6.- Matrice de corrélation pour les échantillons des vinaigres traditionnels de dates de la cuvette de Ouargla

Variables	Acidité Totale (g/l)	Densité	CE mS/cm	pH	A1 aceti	A2 liquifaciens	A3 orleanensis	A4 xylinum	A5 pasteurianum	A6 ascendens	A7 lovaniensis	G8 industrius
Acidité Totale (g/l)	1	-0,049	0,201	-0,188	-0,007	-0,008	-0,119	-0,004	0,425	0,099	-0,086	-0,029
Densité	-0,049	1	0,013	0,083	-0,012	-0,082	-0,124	0,053	-0,100	0,012	-0,172	0,112
CE mS/cm	0,201	0,013	1	-0,013	0,180	0,106	-0,066	0,194	-0,161	0,150	0,120	0,098
pH	-0,188	0,083	-0,013	1	-0,339	-0,086	-0,216	0,565	-0,069	0,131	-0,335	-0,180
A1 aceti	-0,007	-0,012	0,180	-0,339	1	0,184	0,127	-0,087	-0,112	0,221	0,155	0,491
A2 liquifaciens	-0,008	-0,082	0,106	-0,086	0,184	1	-0,087	-0,057	-0,093	0,125	-0,083	0,087
A3 orleanensis	-0,119	-0,124	-0,066	-0,216	0,127	-0,087	1	-0,076	0,000	-0,089	0,221	0,077
A4 xylinum	-0,004	0,053	0,194	0,565	-0,087	-0,057	-0,076	1	-0,081	0,247	-0,073	-0,040
A5 pasteurianum	0,425	-0,100	-0,161	-0,069	-0,112	-0,093	0,000	-0,081	1	-0,095	-0,118	-0,066
A6 ascendens	0,099	0,012	0,150	0,131	0,221	0,125	-0,089	0,247	-0,095	1	0,137	-0,047
A7 lovaniensis	-0,086	-0,172	0,120	-0,335	0,155	-0,083	0,221	-0,073	-0,118	0,137	1	-0,059
G8 industrius	-0,029	0,112	0,098	-0,180	0,491	0,087	0,077	-0,040	-0,066	-0,047	-0,059	1

Annexe 7.- Matrice de corrélation pour les souches issues du vinaigre traditionnel de dattes de la cuvette de Ouargla

Variables	Eth 2%	Eth 4%	Eth 6%	Eth 8%	Eth 10%	Ac 0%	Ac 2%	Ac 4%	Ac 6%	Ac 8%	Ac 10%	DO 30°C	Aa% 30°C	DO 35°C	Aa% 35°C	DO 40°C	Aa% 40°C	DO 45°C	Aa% 45°C	DO 50°C	Aa% 50°C	DO 55°C	Aa% 55°C	DO 60°C	Aa% 60°C
Eth 2%	1	0,966	0,958	0,959	0,938	0,957	0,979	0,960	0,900	0,935	0,944	0,241	0,085	-0,249	-0,073	0,048	0,611	-0,121	-0,649	-0,446	0,124	0,204	-0,557	0,119	0,416
Eth 4%	0,966	1	0,996	0,986	0,962	0,996	0,963	0,952	0,929	0,949	0,985	0,134	-0,094	-0,432	-0,247	0,109	0,540	-0,012	-0,699	-0,368	0,199	0,188	-0,586	0,228	0,317
Eth 6%	0,958	0,996	1	0,988	0,960	0,998	0,965	0,961	0,924	0,960	0,993	0,169	-0,073	-0,412	-0,255	0,166	0,527	-0,062	-0,664	-0,337	0,170	0,246	-0,619	0,208	0,277
Eth 8%	0,959	0,986	0,988	1	0,985	0,993	0,977	0,950	0,962	0,953	0,983	0,133	-0,005	-0,443	-0,167	0,176	0,606	-0,132	-0,647	-0,403	0,094	0,214	-0,664	0,158	0,382
Eth 10%	0,938	0,962	0,960	0,985	1	0,968	0,966	0,923	0,947	0,896	0,940	0,029	-0,044	-0,440	-0,188	0,055	0,558	-0,100	-0,601	-0,522	0,047	0,074	-0,697	0,185	0,374
Ac 0%	0,957	0,996	0,998	0,993	0,968	1	0,969	0,959	0,947	0,963	0,993	0,127	-0,078	-0,440	-0,245	0,167	0,548	-0,076	-0,660	-0,366	0,184	0,222	-0,607	0,178	0,313
Ac 2%	0,979	0,963	0,965	0,977	0,966	0,969	1	0,984	0,939	0,958	0,959	0,162	0,057	-0,255	-0,136	0,111	0,570	-0,234	-0,534	-0,501	0,119	0,214	-0,598	0,017	0,355
Ac 4%	0,960	0,952	0,961	0,950	0,923	0,959	0,984	1	0,897	0,970	0,958	0,188	-0,004	-0,176	-0,237	0,136	0,464	-0,239	-0,476	-0,446	0,218	0,277	-0,523	-0,023	0,215
Ac 6%	0,900	0,929	0,924	0,962	0,947	0,947	0,939	0,897	1	0,929	0,937	-0,009	-0,006	-0,504	-0,115	0,216	0,659	-0,214	-0,581	-0,466	0,166	0,160	-0,555	-0,011	0,489
Ac 8%	0,935	0,949	0,960	0,953	0,896	0,963	0,958	0,970	0,929	1	0,982	0,248	0,053	-0,298	-0,161	0,328	0,580	-0,277	-0,548	-0,289	0,218	0,411	-0,516	-0,042	0,308
Ac 10%	0,944	0,985	0,993	0,983	0,940	0,993	0,959	0,958	0,937	0,982	1	0,206	-0,025	-0,418	-0,216	0,271	0,569	-0,137	-0,647	-0,279	0,176	0,332	-0,602	0,136	0,302
DO 30°C	0,241	0,134	0,169	0,133	0,029	0,127	0,162	0,188	-0,009	0,248	0,206	1	0,740	0,308	0,539	0,523	0,439	-0,359	-0,237	0,528	-0,463	0,821	-0,335	0,047	0,189
Aa% 30°C	0,085	-0,094	-0,073	-0,005	-0,044	-0,078	0,057	-0,004	-0,006	0,053	-0,025	0,740	1	0,338	0,915	0,450	0,621	-0,670	0,033	0,193	-0,710	0,573	-0,312	-0,313	0,551
DO 35°C	-0,249	-0,432	-0,412	-0,443	-0,440	-0,440	-0,255	-0,176	-0,504	-0,298	-0,418	0,308	0,338	1	0,186	-0,204	-0,394	-0,395	0,672	-0,067	-0,068	0,130	0,373	-0,519	-0,372
Aa% 35°C	-0,073	-0,247	-0,255	-0,167	-0,188	-0,245	-0,136	-0,237	-0,115	-0,161	-0,216	0,539	0,915	0,186	1	0,273	0,633	-0,435	-0,047	0,183	-0,663	0,307	-0,131	-0,212	0,712
DO 40°C	0,048	0,109	0,166	0,176	0,055	0,167	0,111	0,136	0,216	0,328	0,271	0,523	0,450	-0,204	0,273	1	0,432	-0,576	-0,059	0,595	-0,246	0,877	-0,308	-0,253	0,147
Aa% 40°C	0,611	0,540	0,527	0,606	0,558	0,548	0,570	0,464	0,659	0,580	0,569	0,439	0,621	-0,394	0,633	0,432	1	-0,338	-0,630	-0,047	-0,344	0,395	-0,524	0,000	0,912
DO 45°C	-0,121	-0,012	-0,062	-0,132	-0,100	-0,076	-0,234	-0,239	-0,214	-0,277	-0,137	-0,359	-0,670	-0,395	-0,435	-0,576	-0,338	1	-0,443	0,098	0,334	-0,581	0,224	0,787	-0,185
Aa% 45°C	-0,649	-0,699	-0,664	-0,647	-0,601	-0,660	-0,534	-0,476	-0,581	-0,548	-0,647	-0,237	0,033	0,672	-0,047	-0,059	-0,630	-0,443	1	-0,075	-0,048	-0,088	0,419	-0,654	-0,541
DO 50°C	-0,446	-0,368	-0,337	-0,403	-0,522	-0,366	-0,501	-0,446	-0,466	-0,289	-0,279	0,528	0,193	-0,067	0,183	0,595	-0,047	0,098	-0,075	1	-0,183	0,593	0,110	0,234	-0,188
Aa% 50°C	0,124	0,199	0,170	0,094	0,047	0,184	0,119	0,218	0,166	0,218	0,176	-0,463	-0,710	-0,068	-0,663	-0,246	-0,344	0,334	-0,048	-0,183	1	-0,234	0,623	-0,172	-0,306
DO 55°C	0,204	0,188	0,246	0,214	0,074	0,222	0,214	0,277	0,160	0,411	0,332	0,821	0,573	0,130	0,307	0,877	0,395	-0,581	-0,088	0,593	-0,234	1	-0,286	-0,230	0,056
Aa% 55°C	-0,557	-0,586	-0,619	-0,664	-0,697	-0,607	-0,598	-0,523	-0,555	-0,516	-0,602	-0,335	-0,312	0,373	-0,131	-0,308	-0,524	0,224	0,419	0,110	0,623	-0,286	1	-0,378	-0,293
DO 60°C	0,119	0,228	0,208	0,158	0,185	0,178	0,017	-0,023	-0,011	-0,042	0,136	0,047	-0,313	-0,519	-0,212	-0,253	0,000	0,787	-0,654	0,234	-0,172	-0,230	-0,378	1	-0,020
Aa% 60°C	0,416	0,317	0,277	0,382	0,374	0,313	0,355	0,215	0,489	0,308	0,302	0,189	0,551	-0,372	0,712	0,147	0,912	-0,185	-0,541	-0,188	-0,306	0,056	-0,293	-0,020	1

Annexe 8.- Classification ascendante hiérarchique (CAH) des échantillons des vinaigres traditionnels de dates de la cuvette de Ouargla

Observation	Classe	Distance au barycentre
Ha 1	1	1.127
Ha 2	1	2.717
Ha 6	1	5.096
Ha 7	2	3.687
Ha 10	1	0.898
Ha 11	1	1.448
Ha 12	1	0.617
Ha 14	1	1.606
Ha 15	1	0.735
Ha 17	1	1.969
Ha 23	1	1.454
Ha 24	1	1.810
Ha 28	1	1.272
Ha 30	1	1.254
Ha 33	1	1.969
Ha 34	1	3.086
Ha 35	2	5.086
Ha 36	1	1.784
Ha 38	1	1.953
Ha 40	1	1.396
Ha 44	1	1.978
Ha 46	1	1.769
Ha 54	2	2.126
Ha 57	2	5.249
Ha 60	2	4.503
Ha 62	2	2.262
Hr 13	1	1.904
Hr 18	1	0.816
Hr 25	1	1.947
Hr 27	1	0.763
Hr 29	1	0.985
Hr 31	1	0.968
Hr 32	1	3.150
Hr 39	1	1.750
Hr 49	1	3.950
Hr 51	2	3.975
Hr 58	2	6.247
Dn 3	1	2.150
Dn 4	1	4.474
Dn 5	1	6.721
Dn 8	1	1.908
Dn 9	1	1.673

Dn 16	1	1.756
Dn 19	1	0.965
Dn20	1	1.788
Dn 21	1	0.842
Dn 22	1	1.394
Dn 26	1	8.243
Dn 37	1	1.791
Dn 41	1	1.644
Dn42	1	2.091
Dn 43	1	0.942
Dn 45	1	1.107
Dn 47	1	1.739
Dn 48	1	1.979
Dn 50	2	2.347
Dn 52	2	2.269
Dn 53	2	2.724
Dn 55	2	2.298
Dn 56	2	4.357
Dn 59	2	1.046
Dn 61	1	2.127
Dn 63	2	3.662

Annexe 9.- Classification ascendante hiérarchique (CAH) des souches issues du vinaigre traditionnel de dattes de la cuvette de Ouargla

Observation	Classe	Distance au barycentre
A1 aceti	1	1.450
A2 liquifaciens	2	1.571
A3 orleanensis	1	1.192
A5 pasteurianum	2	2.049
A6 ascendens	1	1.005
A7 lovaniensis	2	2.222
G8 industrius	3	0.000

Annexe 10.- Clé dichotomique de Frateur**1.- Pouvoir suroxydant (+)***Gluconobacter oxydans***1.1.- Pigment rose sur milieu Glucosé (-)***Gluconobacter oxydans* subsp. *oxydans* (température optimale 18-21°C)*Gluconobacter oxydans* subsp. *industrius* (température optimale 30-35°C)**1.2.- Pigment rose sur milieu Glucosé (+)***Gluconobacter oxydans* subsp. *suboxydans**Gluconobacter oxydans* subsp. *melanogenes***2.- Pouvoir suroxydant (+)****2.1.- Catalase (-)****2.1.1.- Culture sur milieu de Hoyer (+)***Acetobacter peroxydans* subsp. *peroxydans***2.1.2.- Culture sur milieu de Hoyer (-)***Acetobacter pasteurianus* subsp. *paradoxus***2.2.- Catalase (+)****2.2.1.- Pouvoir cétoène (+)***Acetobacter aceti***2.2.1.1.- Pigment brun (+)***Acetobacter aceti* subsp. *liquifaciens***2.2.1.2.- Pigment brun (-), Culture sur milieu de Hoyer (-)***Acetobacter aceti* subsp. *xylinum* (cellulose +)*Acetobacter aceti* subsp. *orleanensis* (cellulose -)**2.2.2.- Pouvoir cétoène (-)***Acetobacter pasteurianus***2.2.2.1.- Culture sur milieu de Hoyer (+)***Acetobacter pasteurianus* subsp. *lovaniensis* (cellulose -)*Acetobacter pasteurianus* subsp. *estunensis* (cellulose +)**2.2.2.2.- Culture sur milieu de Hoyer (-)***Acetobacter pasteurianus* subsp. *pasteurianum* (acide gluconique +)*Acetobacter pasteurianus* subsp. *ascendens* (acide gluconique -)

Recherche et identification de quelques souches de bactéries acétiques issues du vinaigre traditionnel de dattes du Sahara Septentrional est-Algérien: Etude du pouvoir acidifiant

Résumé.- Le présent travail est focalisé sur la recherche et l'identification de quelques souches de bactéries acétiques. Il vise la valorisation des vinaigres traditionnels de dattes de quelques cultivars, récoltés dans la cuvette de Ouargla (Sahara septentrional est-algérien), par des analyses physico-chimiques et microbiologique. L'étude portée sur 63 échantillons de vinaigre traditionnel de dattes répartis entre 3 cultivars dont 26 échantillons (41%) de vinaigres sont préparés à partir de la variété Hamraya, 26 (41%) de Deglet-Nour et 11 (18%) de Harchaya. Un seul vinaigre de cultivar Harchaya et 6 vinaigres de cultivar Deglet-Nour, sont élaborés à partir des écarts de tri, destinés à l'alimentation du bétail. Les durées de conservation des vinaigres traditionnels de dattes, se situent, suivant les échantillons de dattes, entre 2 à 8 ans. Les résultats des analyses physico-chimiques des vinaigres, laissent apparaître, un produit de faible acidité totale (7.7g/l-78.4g/l), un pH acide (3.01 et 3.78), une conductivité électrique très élevée (4.64 mS/cm à 9.14mS/cm), et une densité stable (1.01 et 1.02) voisine de celles des vinaigres commercialisés. Les résultats des analyses microbiologiques des 63 échantillons du vinaigre traditionnel de dattes des cultivars Hamraya, Harchaya et Deglet-Nour, ont permis l'identification de 103 souches de bactéries acétiques parmi les 154 isolats, appartenant aux genres *Acetobacter* et *Gluconobacter*. Pour un total de 8 souches obtenues, il est les sous-espèces *Acetobacter aceti* subsp. *aceti*, *Acetobacter aceti* subsp. *liquifaciens*, *Acetobacter aceti* subsp. *orleanensis*, *Acetobacter aceti* subsp. *xylum*, *Acetobacter pasteurianus* subsp. *ascendens*, *Acetobacter pasteurianus* subsp. *lovaniensis*, *Acetobacter pasteurianus* subsp. *pasteurianum* et *Gluconobacter oxydans* subsp. *industrius*. La souche *Acetobacter aceti* subsp. *aceti* est très présente (52%) parmi les souches identifiées. Dans les vinaigres du cultivar Hamraya, sont notées toutes les souches identifiées (8), alors dans ceux de Deglet-Nour et Harchaya, ne se rencontrent que 7 à 6 souches respectivement. L'essai d'optimisation d'un milieu d'isolements sur 6 milieux de culture a donné 30% d'isolats identifiables sur milieu Frateur, 20% sur milieu naturel modifiée, qui ont figurés les plus appropriés. Le milieu Frateur modifiée, la gélose nutritive modifiée, le milieu GYC et le milieu naturel ont découlés 16%, 15%, 11% et 8% des souches respectivement. Par conséquent, la spiruline additionnée aux milieux de cultures n'est pas toujours stimulatrice de la croissance des bactéries acétiques.

Deux souches, *Acetobacter aceti* subsp. *orleanensis* et *Acetobacter pasteurianus* subsp. *lovaniensis*, peuvent assimiler la majorité des substrats carbohydrates qui représente 66.67 %. Les souches cultivées sur milieu GYEA ont montré une tolérance à d'éthanol (2 à 10%), toutefois, *Acetobacter aceti* subsp. *aceti* et *Acetobacter aceti* subsp. *liquifaciens* ont de très bonnes croissances à 10% d'éthanol. Pour l'acide acétique, la résistance à l'état de stress est modérée (2% et 10%), mais *Acetobacter aceti* subsp. *aceti* et *Acetobacter aceti* subsp. *orleanensis*, sont les plus acidophiles (10%). Les souches de bactéries acétiques isolées des échantillons de vinaigre traditionnel de dattes, sont thermotolérantes (30°C et 60°C), leur optimum de croissance se situe entre 40°C et 45°C. Cependant, la souche *Acetobacter aceti* subsp. *aceti*, reste plus adaptée aux stress abiotiques de la température, de l'éthanol et de l'acide acétique. Elle est la plus productrice d'acide acétique (DO=3.3±0.0005, 3.02% d'acidité à 40°C). Toutes les souches obtenues, ont été bien conservées sur le gel de silice, le coton et après congélation. En fait, les co-produits du palmier dattier (foliole, fibrillum [lif] et périanthes) ont retenu la viabilité et l'activité des souches *Acetobacter aceti* subsp. *liquifaciens*, *Acetobacter*

aceti subsp. *orleanensis*, *Acetobacter aceti* subsp. *xylinum* et *Acetobacter pasteurianus* subsp. *pasteurianum*. Cependant, la conservation d'*Acetobacter aceti* subsp. *aceti*, *Acetobacter pasteurianus* subsp. *lovaniensis*, *Acetobacter pasteurianus* subsp. *ascendens* et *Gluconobacter oxydans* subsp. *industrius* est modérée sur les co-produits. L'analyse en composantes principales (ACP), laisse apparaître des variations de quelques paramètres (physicochimiques et microbiologiques) des vinaigres traditionnels de dattes issus des cultivars Hamraya, Harchaya et Deglet-Nour, avec des différences remarquables entre les conditions de croissance, et de production des souches. Les échantillons du vinaigre traditionnel de dattes ont été groupés en quatre classes et les souches en deux classes de tendance différente selon la classification ascendante hiérarchique (CAH).

Mots clés: Vinaigre, dattes, bactéries acétiques, tolérance, stress abiotique, thermotolérance, acidophilie, Sahara.

Research and identification of some strains of acetic acid bacteria coming from the traditional vinegar of dates from the Northern Eastern Algerian Sahara: Study of the acidifying power

Abstract.- The present work is focused on the research and identification of some strains of acetic acid bacteria. It aims at the valorization of the traditional vinegars of dates of some cultivars, harvested in the basin of Ouargla (Algerian Eastern Northern Sahara), by means of physicochemical and microbiological analyses. The study covers 63 samples of traditional date vinegar distributed among 3 cultivars, of which 26 samples (41%) of vinegar are prepared from the Hamraya variety, 26 (41%) from Deglet-Nour and 11 (18%) from Harchaya. Only one vinegar of the Harchaya cultivar and 6 vinegars of the Deglet-Nour cultivar are prepared from the sorting differences, intended for cattle feed. The storage life of the traditional date vinegars, depending on the date samples, ranges from 2 to 8 years. The results of physico-chemical analyses of vinegars, show a product of low total acidity (7.7g/l- 78.4g/l), an acid pH (3.01 and 3.78), a very high electrical conductivity (4.64 mS/cm to 9.14mS/cm), and a stable density (1.01 and 1.02) close to those of commercial vinegars. The results of the microbiological analyses of 63 samples of traditional date vinegar of the cultivars Hamraya, Harchaya and Deglet-Nour, allowed the identification of 103 strains of acetic acid bacteria among the 154 isolates, belonging to the genera *Acetobacter* and *Gluconobacter*. For a total of 8 strains obtained, were the sub-species *Acetobacter aceti* subsp. *aceti*, *Acetobacter aceti* subsp. *liquifaciens*, *Acetobacter aceti* subsp. *orleanensis*, *Acetobacter aceti* subsp. *xylinum*, *Acetobacter pasteurianus* subsp. *ascendens*, *Acetobacter pasteurianus* subsp. *lovaniensis*, *Acetobacter pasteurianus* subsp. *pasteurianum* and *Gluconobacter oxydans* subsp. *industrius*. The *Acetobacter aceti* subsp. *aceti* strain is very present among the strains identified (52%). In the vinegars of the cultivar Hamraya, all the identified strains (8) are noted, while in those of Deglet-Nour and Harchaya, only 7 to 6 strains are found respectively. The test of optimization of a medium of isolations on 6 culture media gave 30% of identifiable isolates on Frateur medium, 20% on modified natural medium, which figured the most appropriate. Modified Frateur medium, modified nutrient agar, GYC medium and natural medium yielded 16%, 15%, 11% and 8% of strains respectively. As a consequence, spirulina added to culture media does not always stimulate the growth of acetic bacteria.

Two strains, *Acetobacter aceti* subsp. *orleanensis* and *Acetobacter pasteurianus* subsp. *lovaniensis*, can assimilate the majority of carbohydrate substrates which represents 66.67%. Strains grown on GYEA medium have shown tolerance to ethanol (2 to 10%), but, *Acetobacter aceti* subsp. *aceti* and *Acetobacter aceti* subsp. *liquifaciens* have very good growth at 10% ethanol. For acetic acid, stress resistance is moderate (2% and 10%), but *Acetobacter aceti* subsp. *aceti* and *Acetobacter aceti* subsp. *orleanensis*, are the most acidophilic (10%). The strains of acetic acid bacteria isolated from traditional date vinegar samples are thermotolerant (30°C and 60°C), their optimum growth range is between 40°C and 45°C. However, the *Acetobacter aceti* subsp. *aceti* strain, remains more adapted to the abiotic stresses of temperature, ethanol and acetic acid. It is the most acetic acid producing strain ($DO=3.3\pm 0.0005$, 3.02% acidity at 40°C). All strains obtained were well preserved on silica gel, cotton and after freezing. In fact, date palm by-products (leaflets, fibrillum [lif] and perianths) retained the viability and activity of *Acetobacter aceti* subsp. *liquifaciens*, *Acetobacter aceti* subsp. *orleanensis*, *Acetobacter aceti* subsp. *xylinum* and *Acetobacter pasteurianus* subsp. *pasteurianum*. However,

preservation of *Acetobacter aceti* subsp. *aceti*, *Acetobacter pasteurianus* subsp. *lovaniensis*, *Acetobacter pasteurianus* subsp. *ascendens* and *Gluconobacter oxydans* subsp. *industrius* is moderate on by-products. The principal component analysis (ACP), shows variations in some parameters (physicochemical and microbiological) of traditional date vinegars from cultivars Hamraya, Harchaya and Deglet-Nour, with remarkable differences between the conditions of growth, and production of strains. The samples of the traditional date vinegar were grouped into four classes and the strains into two classes of different tendency according to the hierarchical ascending classification (CAH).

Key words : Vinegar, dates, acetic acid bacteria, tolerance, abiotic stress, thermotolerance, acidophilia, Sahara.

البحث والتعرف عن بعض سلالات بكتيريا الخل الناتجة عن الخل التقليدي للتمور من شمال شرق الصحراء الجزائرية: دراسة القوة الحمضية

الملخص. يركز هذا العمل على البحث والتعرف على بعض السلالات من بكتيريا الخل. ويهدف إلى تعزيز قيمة خل التمر التقليدي لدبعض أصناف التمور ، المحصودة في حوض ورقلة (شمال شرق الصحراء الجزائرية)، من خلال التحليلات الفيزيائية والكيميائية والميكروبيولوجية. شملت الدراسة 63 عينة من خل التمر التقليدي موزعة على 3 أصناف ، منها 26 عينة (41%) محضرة من صنف الحمرايا ، 26 (41%) من دقلة نور و 11 (18%) من حرشايا. خل واحد من صنف حرشايا و 6 من صنف دقلة نور ، مصنوعان من فروق الفرز ، المخصصة لتغذية الماشية. تتراوح مدة صلاحية خل التمر التقليدي ، اعتماداً على عينات التمور ، من 2 إلى 8 سنوات. كشفت نتائج التحليلات الفيزيائية والكيميائية للخل عن منتج ذو حموضة كلية منخفضة (7.7 جم / لتر - 78.4 جم / لتر) ، ودرجة حموضة حمضية pH (3.01 و 3.78) ، وموصلية كهربائية عالية جداً (4.64 ملي ثانية / سم عند 9.14 ملي ثانية / سم ، وكثافة ثابتة (1.01 و 1.02) قريبة من تلك الموجودة في الخل المباع . سمحت نتائج التحاليل الميكروبيولوجية لـ 63 عينة من خل التمر التقليدي من أصناف الحمرايا وحرشايا ودقلة نور بتحديد 103 سلالة من بكتيريا الخل من بين 154 عزلة تنتمي إلى جنس *Acetobacter* و *Gluconobacter* . في المجموع 8 سلالات تم الحصول عليها، هي الأنواع الفرعية *Acetobacter aceti* subsp. *aceti*, *Acetobacter aceti* subsp. *liquifaciens*, *Acetobacter aceti* subsp. *orleanensis*, *Acetobacter aceti* subsp. *xylinum*, *Acetobacter pasteurianus* subsp. *ascendens*, *Acetobacter pasteurianus* subsp. *lovaniensis*, *Acetobacter pasteurianus* subsp. *pasteurianum* و *Gluconobacter oxydans* subsp. *industrius* . سلالة *Acetobacter aceti* subsp. *aceti* موجود بشكل كبير بين السلالات المحددة (52%). في خل صنف حمرايا ، تم ملاحظة جميع السلالات المحددة (8) ، بينما تم العثور على 7 و 6 سلالات فقط في سلالات دقلة نور وحرشايا. أعطى اختبار التحسين لوسط العزل على 6 أوساط استنابت 30% من العزلات التي يمكن التعرف عليها في وسط فراتور ، و 20% في وسط طبيعي معدل ، واللذان بديا الأنسب. نتج عن وسط فراتور المعدل وأجار المغذي المعدل ووسط GYC والوسط الطبيعي 16% و 15% و 11% و 8% من السلالات على التوالي. وبالتالي ، فإن إضافة السبيرولينا إلى وسط الاستزراع لا تحفز دائماً نمو بكتيريا حمض الخل.

سلالتي *Acetobacter pasteurianus* subsp. و *Acetobacter aceti* subsp. *orleanensis* و *lovaniensis* ، يمكنها استهلاك غالبية الكربوهيدرات التي تمثل 66.67%. أظهرت سلالات نمت في وسط GYEA تحمل الإيثانول (10-2) ، ومع ذلك *Acetobacter aceti* subsp. *aceti* و *Acetobacter aceti* subsp. *liquifaciens* لها نمو جيد جداً في 10 % من الإيثانول. بالنسبة لحمض الخليك ، تكون مقاومة الإجهاد معتدلة (2% و 10%) ، ولكن *Acetobacter aceti* subsp. *aceti* و *Acetobacter aceti* subsp. *orleanensis* ، هي الأكثر مقاومة للحموضة (10%). سلالات بكتيريا الخل المعزولة من عينات خل التمر التقليدية تتحمل الحرارة (من 30 درجة مئوية إلى 60 درجة مئوية) ، ونموها الأمثل يتراوح بين 40 درجة مئوية و 45 درجة مئوية. ومع ذلك ، فإن *Acetobacter aceti* subsp. *aceti* ، تظل أكثر تكيفاً مع الضغوط اللاأحيائية لدرجة الحرارة والإيثانول وحمض الخليك. إنها الأكثر إنتاجية لحمض الخليك (DO = 3.3 ± 0.0005) ، حموضة 3.02% عند 40 درجة مئوية) . تم حفظ جميع السلالات التي تم الحصول عليها بشكل جيد على هلام السيليكا والقطن وبعد التجميد. في الواقع ، احتفظت المنتجات الثانوية لنخيل التمر (السعف ، الليف و عنق التمرة) بحياة ونشاط السلالات *Acetobacter aceti* subsp. *liquifaciens*, *Acetobacter aceti* subsp. *orleanensis*, *Acetobacter pasteurianus* subsp. *pasteurianum* و *Acetobacter aceti* subsp. *aceti*, *Acetobacter pasteurianus* subsp. *lovaniensis* ، فإن حفظ *Acetobacter pasteurianus* subsp. *ascendens* et *Gluconobacter oxydans* subsp. *industrius* كان معدل على المنتجات الثانوية. أظهر تحليل المكون الرئيسي (ACP) تباينات في بعض المتغيرات (الفيزيوكيميائية والميكروبيولوجية) لخل التمر التقليدي من أصناف الحمرايا وحرشايا ودقلة نور، مع وجود اختلافات ملحوظة بين ظروف النمو وإنتاج السلالات. تم تجميع عينات خل التمر التقليدي في أربع فئات والسلالات إلى فئتين ذات اتجاه مختلف حسب التصنيف الهرمي التصاعدي (CAH).

الكلمات المفتاحية: الخل، التمر، بكتيريا الخل، التحمل، الإجهاد اللاأحيائي، التحمل الحراري، الحمضية، الصحراء

CHARACTERIZATION OF ACETIC ACID BACTERIA OF THE TRADITIONAL DATES VINEGAR IN THE OUARGLA BASIN (NORTHERN EAST ALGERIAN SAHARA)

Wassila HAMDI^{*,**}, Asma RAMDANE^{***}, Hadjer DJOUMAA^{***}, Zineb HELLOU^{***},
Mohamed Didi OULD EL HADJ^{*,****}

^{*}Department of Biological Sciences, Faculty of Sciences of Life and the Nature, University of Kasdi Merbah, Ouargla, Algeria

^{**}Laboratory of Science and Environment, University Center of Amine Elokhal ElHadj Moussa Eg. Akhamoukh, Tamanghasset, Algeria

^{***}Department of Biology, University Center of Amine Elokhal ElHadj Moussa Eg Akhamoukh Tamanghasset, Algeria

^{****}Laboratory for the Protection of Ecosystems in Arid and Semi Arides Zones, University of Kasdi Merbah, Ouargla, Algeria

Correspondence author: Wassila Hamdi, Laboratory of Science and Environment, University Center of Amine Elokhal El Hadj Moussa Eg Akhamoukh airport road BP10034 sersouf Tamanghasset, Algeria, phone: +213.664.041.710, e-mail: assila.hamdi@yahoo.com

Abstract. Dates can be used as a raw material for the production of vinegar. This vinegar has significant interests in food, industry and health. Thus, acetic acid bacteria (AAB) introduced in the process of making traditional date vinegar (TDV), ensure its acidity. Six (6) pure strains of AAB *Acetobacter aceti* subsp. *aceti*, *Acetobacter aceti* subsp. *liquifaciens*, *Acetobacter aceti* subsp. *orleanensis*, *Acetobacter pasteurianus* subsp. *ascendens*, *Acetobacter pasteurianus* subsp. *lovaniensis* and *Gluconobacter oxydans* subsp. *industrius* isolated from traditional date vinegars (TDV) of the cultivars Deglet-Nour, Hamraya and Harchaya from the Ouargla basin, are biochemically tested to see their tendency to assimilate some hydrocarbon substrates in the form of miniaturized galleries (API 20 Strep and API 20 NE). These strains are thus cultivated in a liquid medium based on yeast extract, glucose, ethanol and acetic acid (GYEA), modified with 2% to 10% ethanol and acetic acid, to test their resistance under industrial conditions. The tests are used to select the strains that perform best in acetic acid production (vinegar) and ensure their survival during the process. Two strains *Acetobacter aceti* subsp. *orleanensis* and *Acetobacter pasteurianus* subsp. *lovaniensis* can assimilate the majority of carbohydrate substrates which represents 66.67% (08 substrates). The strains grown in GYEA medium showed a total tolerance of 2% to 10% ethanol, but *Acetobacter aceti* subsp. *aceti* and *Acetobacter aceti* subsp. *liquifaciens* have very good growth at 10%. With acetic acid added to bacterial cultures, resistance to the condition is moderate between 2% and 10%, but the two strains *Acetobacter aceti* subsp. *aceti* and *Acetobacter aceti* subsp. *orleanensis*, are the most acidophilic at 10%. *Acetobacter aceti* subsp. *aceti* is the most suitable strain with ethanol and acetic acid stress. So it is the most profitable and likely to be able to withstand the incidents of the vinegar industry. This offers a choice for large industrial scale applications.

Keywords: Traditional date vinegar; acetic acid bacteria; *Acetobacter*; *Gluconobacter*; oxidation; ethanol tolerance; Acidophilia; Algerian Sahara.

INTRODUCTION

Vinegar is a valuable additive, a complement and an effective preservative against spoilage [3]. The Saharan populations for a very long time, had made locally their own traditional date vinegar [17]. Vinegar fermentation is essentially a two-step process, the first being the anaerobic conversion of fermentable sugars to ethanol by yeasts, and the second being the aerobic oxidation of ethanol to acetic acid by acetic acid bacteria (AAB) [13, 14, 21].

AAB are strictly aerobic Gram-negative bacteria [5, 18], classified as an acetous group [16] common in nature. Currently, they belong taxonomically to the class *Alpha-proteobacteria* of the family *Acetobacteraceae* [5, 16, 18]. They are involved in different spontaneous food fermentations [29], which produce various organic acids from different sources. Most species have the ability to convert ethanol into acetic acid, and play a role during their fermentation processes, also have some beneficial effects [22], in the production of vinegar, traditional fermented milks, such as kefir and vitamin C production and as plant growth promoters (PGPR) [13]. The strains used for the production of vinegar belong to the genera *Acetobacter*, *Gluconacetobacter*, *Gluconobacter* [8] and *Komagataeibacter* because of their high capacity for the oxidation of ethanol and their resistance to the resulting acetic acid in the fermentation medium [12]. For this reason, the search for new strains that are

likely to be tolerant and more profitable, remains the concern of the industry.

The work seeks to characterize some strains of AAB from traditional date vinegar (TDV) from the Ouargla basin (Algerian Northern Sahara) in relation to their culture medium. A study of the assimilation of carbon substrates and the tolerance of these bacteria to different concentrations of ethanol and acetic acid, in order to select the best indigenous (Saharan) strains of an industrial nature.

MATERIAL AND METHODS

Six strains of AAB including; *Acetobacter aceti* subsp. *aceti*, *Acetobacter aceti* subsp. *liquifaciens*, *Acetobacter aceti* subsp. *orleanensis*, *Acetobacter pasteurianus* subsp. *ascendens*, *Acetobacter pasteurianus* subsp. *lovaniensis* and *Gluconobacter oxydans* subsp. *industrius*, isolated from traditional date vinegars (TDV) of different cultivars (Hchef Deglet-Nour, Deglet-Nour, Harchaya and Hamraya) from the Ouargla basin are used in the study. A set of fourteen (14) samples of TDV, prepared locally by some families from common dates or date waste by traditional means after the 2014-2019 date harvest season. The isolation of AAB required the use of selective culture agar media containing ethanol and CaCO₃. The process was carried out on Frateur medium, glucose, yeast extract and CaCO₃ (GYC) medium, modified nutrient agar medium and natural medium. The strains were then identified

phenotypically by standard catalase, oxidase and Gram tests. Physiological tests were performed on identification media, namely Carr, Hoyer, Haynes medium, gluconic acid formation agar, pigment production broth, cellulose production agar, glycerol agar, ketogluconic acid formation broth.

Biochemical analyses carried out on AAB to test their tendency assimilated hydrocarbon substrates such as esculin, α -galactose, β -galactose, ribose, arabinose, lactose, trehalose, glucose, raffinose, mannitol, sorbitol and gelatine; as a source of carbon. An API 20 NE and API 20 Strep miniaturized gallery containing dehydrated substrates is used to demonstrate the enzymatic or fermentation activities of BioMérieux France brand sugars from a 0.5 Mac Farland bacterial suspension.

The study of AAB tolerance begin with the preparation of the pre-culture by making bacterial AAB of TDV suspects (10 mL) of GYEA medium and incubating at 30°C for one week, to obtain a culture of optical density at 600 nm of the order of 0.7 or 0.8 (the cells have reached the end of the exponential phase). The appropriate volume of inoculum is taken according to the formula; $C_1V_1=C_2V_2$ at $DO_{600nm}=0.5$ (the starting concentration). Ethanol and acetic acid tolerance were performed by inoculation the pre-cultures in a liquid medium based on 2% yeast extract, 2% glucose, 2% ethanol and 2% acetic acid (YGEA) modified with 2%, 4%, 6%, 8% and 10% ethanol, and 0%, 2%, 4%, 6%, 8% and 10% of acetic acid, equivalent in pH 6.49 ± 0.02 , 3.47 ± 0.01 , 3.29 ± 0.01 , 3.18 ± 0.01 , 3.06 ± 0.01 , 2.94 ± 0.01 . Incubated at 30°C for 168 hours. The amount of cells biomass produced is determined by measuring the absorbance of the culture at 600 nm using a UV-visible spectrophotometer every 24 h.

RESULTS

The results of biochemical analyses of assimilation of 12 different substrates (esculin, α and β galactose, ribose, arabinose, lactose, trehalose, raffinose, glucose, mannitol, sorbitol and gelatin) are presented in table 1.

An overview of the results in table 01 shows that all strains of the genera *Acetobacter* and *Gluconobacter*

tested are capable of oxidizing esculin and α -galactose. The *Acetobacter aceti* subsp. *aceti* strain does not oxidize neither β -galactose nor glucose, and does not ferment neither ribose, nor arabinose, nor mannitol, nor sorbitol, nor lactose, nor trehalose, nor raffinose, nor glucose but does degrade gelatin. On the other hand, *Acetobacter aceti* subsp. *liquifaciens* can assimilate and ferment glucose and able to degrade gelatine. For *Acetobacter aceti* subsp. *orleanensis* strain, has catabolyzed gelatin and β -galactose. Arabinose, mannitol, lactose, raffinose are also fermented, unlike ribose, sorbitol, trehalose. For glucose, it is neither fermentable nor assimilable by the strain. *Acetobacter pasteurianus* subsp. *ascendens* is unable to oxidize β -galactose and glucose, only ferments arabinose and does not degrade gelatin. Concerns *Acetobacter pasteurianus* subsp. *lovaniensis*, fermented arabinose, mannitol, lactose, raffinose and trehalose, with the exception of ribose, sorbitol and glucose, the oxidation of β -galactose and glucose has not been proven, but the gelatin is degraded. The *Gluconobacter oxydans* subsp. *industrius* strain assimilated only glucose and degraded gelatin.

The comparison between strains according to their ability to assimilate carbohydrate substrates (Fig. 1) is organized in descending order; *Acetobacter aceti* subsp. *orleanensis* and *Acetobacter pasteurianus* subsp. *lovaniensis*, used 08 substrates (66.67%), then *Acetobacter aceti* subsp. *liquifaciens* and *Gluconobacter oxydans* subsp. *industrius*, assimilated 04 substrates (33.33%) and finally, *Acetobacter aceti* subsp. *aceti* and *Acetobacter pasteurianus* subsp. *ascendens* by 03 substrates (25.00%).

Thus, biochemical assimilation of some substrates as a source of carbon, shows the flexibility of the two strains *Acetobacter aceti* subsp. *orleanensis* and *Acetobacter pasteurianus* subsp. *lovaniensis* to assimilate several substrates via the enzymes they possess with 66.67% (08 substrates).

The growth results of the strains *Acetobacter aceti* subsp. *aceti*, *Acetobacter aceti* subsp. *liquifaciens*, *Acetobacter aceti* subsp. *orleanensis*, *Acetobacter pasteurianus* subsp. *ascendens*, *Acetobacter pasteurianus* subsp. *lovaniensis* and *Gluconobacter*

Table 1. Biochemical analysis of acetic bacteria

Strains	<i>Acetobacter aceti</i> subsp. <i>aceti</i>	<i>Acetobacter aceti</i> subsp. <i>liquifaciens</i>	<i>Acetobacter aceti</i> subsp. <i>orleanensis</i>	<i>Acetobacter pasteurianus</i> subsp. <i>ascendens</i>	<i>Acetobacter pasteurianus</i> subsp. <i>lovaniensis</i>	<i>Gluconobacter oxydans</i> subsp. <i>industrius</i>
ESC	+	+	+	+	+	+
α -GAL	+	+	+	+	+	+
β -GAL	-	-	+	-	-	-
RIB	-	-	-	-	-	-
ARA	-	-	+	+	+	-
MAN	-	-	+	-	+	-
SOR	-	-	-	-	-	-
LAC	-	-	+	-	+	-
TRE	-	-	-	-	+	-
RAF	-	-	+	-	+	-
GLU(F)	-	+	-	-	-	-
GEL	+	+	+	-	+	+
GLU(A)	-	+	-	-	-	+

+: Positive; -: Negative; ESC: esculin; α and β GAL: galactose; RIB: ribose; ARA: arabinose; MAN: mannitol; SOR: sorbitol; LAC: lactose; TRE: trehalose; RAF: raffinose; GEL: gelatine; GLU(F): fermentation; GLU(A): oxydation.

oxydans subsp. *industrius*, for 168 hours, on a liquid medium YGEA modified by ethanol, are shown in Figures (2-7). Whose strains start their growth from the optical density 0.5 ± 0.005 at 600 nm.

Figure 2a shows the evolution of the biomass of *Acetobacter aceti* subsp. *aceti* strain as curves with relatively similar patterns of variation during the incubation period at different ethanol concentrations.

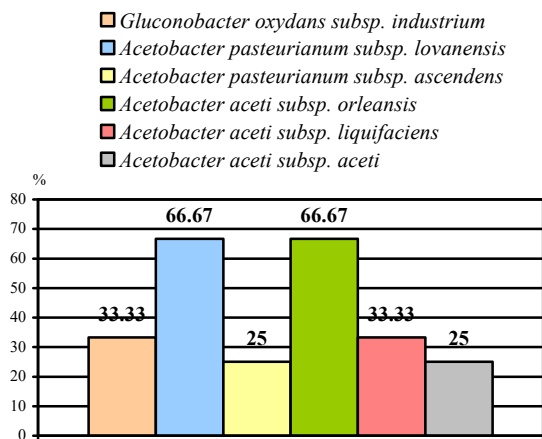


Figure 1. Assimilation of hydrocarbon substrates by acetic acid bacteria

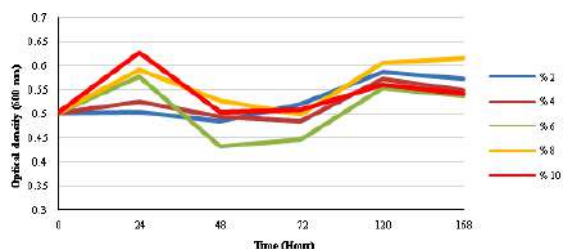


Figure 2a. Tolerance of *Acetobacter aceti* subsp. *aceti* strain from traditional date vinegar to ethanol concentrations

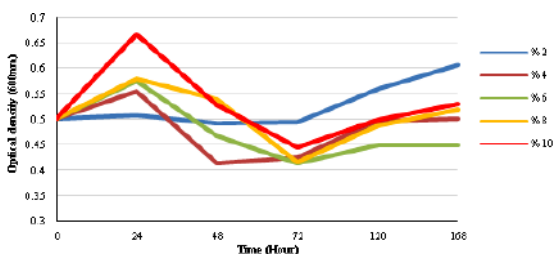


Figure 2b. Tolerance of *Acetobacter aceti* subsp. *liquifaciens* strain from traditional date vinegar with ethanol

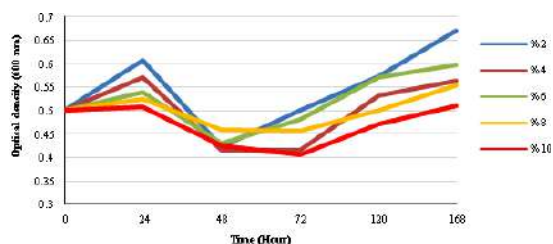


Figure 2c. Tolerance of *Acetobacter aceti* subsp. *orleanensis* strain from traditional date vinegar with ethanol

Variations showing an increase after 24 hours corresponding to optical densities 0.504 ± 0.013 (2%), 0.525 ± 0.004 (4%), 0.577 ± 0.003 (6%), 0.591 ± 0.003 (8%) and 0.627 ± 0.01 (10%), then a decrease after 48h, a resumption of growth from 72h to 120h with concentrations of 0.586 ± 0.004 (2%), 0.573 ± 0.006 (4%), 0.552 ± 0.008 (6%), 0.605 ± 0.005 (8%) and 0.560 ± 0.004 (10%), then a slight decrease. The good concentrations for growth are remarkable at 10% (0.627 ± 0.01), 8% (0.591 ± 0.003), 6% (0.577 ± 0.003), which translates into better acetic acid production in 24 hours, and good tolerance in 168 hours.

In Figure 2b the growth of *Acetobacter aceti* subsp. *liquifaciens* strain in different concentrations of ethanol appears similar during incubation. The evolution of biomass after 24 hours reaches 0.508 ± 0.001 (2%), 0.555 ± 0.002 (4%), 0.575 ± 0.010 (6%), 0.580 ± 0.003 (8%) and 0.666 ± 0.004 (10%), followed by a decrease until 72h. It was remarkable resumption of growth from 0.493 ± 0.008 (2%), 0.425 ± 0.002 (4%), 0.414 ± 0.007 (6%), 0.415 ± 0.004 (8%) and 0.444 ± 0.001 (10%), to 0.606 ± 0.004 (2%), 0.501 ± 0.008 (4%), 0.450 ± 0.006 (6%), 0.519 ± 0.002 (8%) and 0.530 ± 0.002 (10%) at 168 hours. Thus, bacteria tolerate concentrations ranging from 10% ethanol which is the most adequate where growth is maximum in reduced time (24h), which is expressed a good production of acetic acid in the medium after consumption of ethanol.

The growth of *Acetobacter aceti* subsp. *orleanensis* over a period of time at different concentrations of ethanol revealed tolerance forks ranging from 2% to 10% ethanol, shown on the curves (Fig. 2c). The optical density after 24 hours are 0.608 ± 0.003 (2%), 0.571 ± 0.008 (4%), 0.540 ± 0.005 (6%), 0.524 ± 0.011 (8%) and 0.509 ± 0.004 (10%). Then decrease from 48h to 72, the strain catches up with growth at 168h with 0.671 ± 0.058 (2%), 0.565 ± 0.011 (4%), 0.599 ± 0.001 (6%), 0.555 ± 0.006 (8%) and 0.511 ± 0.005 (10%). At almost 10% it is not a considerable growth, it is just an attempt to adapt to the environment during 168 hours. On the other hand, the strain prefers low concentrations of ethanol.

The evolution of growth *Acetobacter pasteurianus* subsp. *ascendens* represented in Figure 2d, showed decreasing optical densities from 2% to 10%, reaching 0.693 ± 0.004 (2%), 0.578 ± 0.004 (4%), 0.572 ± 0.003 (6%), 0.560 ± 0.004 (8%) and 0.521 ± 0.003 (10%) at 24h and decreasing at 48h. A significant increase appeared in 120h and 168h. With 0.797 ± 0.013 (2%), 0.596 ± 0.006 (4%), 0.568 ± 0.004 (6%), 0.598 ± 0.012 (8%) and 0.649 ± 0.002 (10%). The strain grew best with 2% ethanol after 168h with a tolerance to up of 4% and reached 10%.

The variation in growth of *Acetobacter pasteurianus* subsp. *lovanensis* during 168 h incubation in different concentrations of ethanol are reported in Figure 2e.

The cells grew after 24 hours with optical densities of 0.522 ± 0.002 (10%), 0.542 ± 0.008 (8%), 0.608 ± 0.005 (6%), 0.618 ± 0.015 (4%) and 0.630 ± 0.010 (2%), then dropped between 48 and 72 hours. At 120h almost the maximum biomass is reached with 0.592 ± 0.002 (10%), 0.574 ± 0.002 (8%), 0.575 ± 0.001 (6%), 0.566 ± 0.006 (4%) and 0.606 ± 0.007 (2%). Therefore, low ethanol concentrations (2%, 4% and 6%) remain the most suitable for the cultivation of *Acetobacter pasteurianus* subsp. *lovaniensis* strain, reporting 10% resistance.

The concentration of *Gluconobacter oxydans* subsp. *industrius* strain obtained in Figure 2f, illustrates that all ethanol concentrations for the strain have almost similar patterns. Biomass increased during 24 h incubation with 0.542 ± 0.001 (10%), 0.544 ± 0.001 (8%), 0.591 ± 0.004 (6%), 0.606 ± 0.002 (4%)

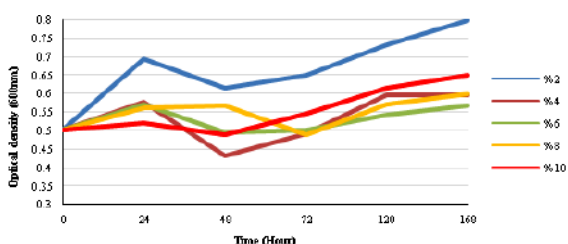


Figure 2d. Tolerance of *Acetobacter pasteurianus* subsp. *ascendens* strain from traditional date vinegar with ethanol

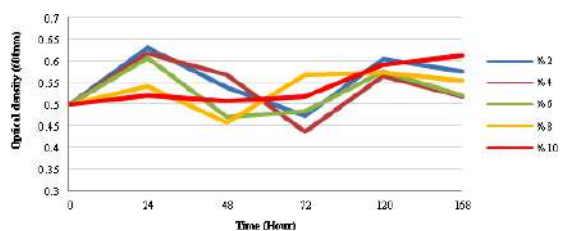


Figure 2e. Tolerance of *Acetobacter pasteurianus* subsp. *lovaniensis* strain from traditional date vinegar with ethanol

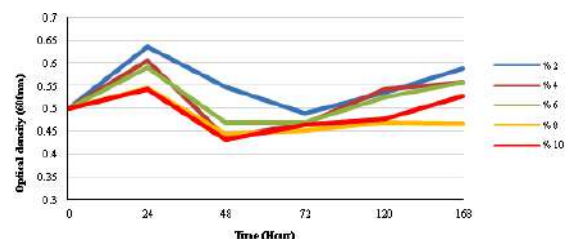


Figure 2f. Tolerance of the *Gluconobacter oxydans* subsp. *industrius* strain from traditional date vinegar with ethanol

and 0.636 ± 0.005 (2%). Then a decrease in growth, at 48 and 72 hours. The strain resumed its evolution at 168h in 2%, 4%, 6%, 8% and 10% with 0.586 ± 0.003 , 0.557 ± 0.005 , 0.558 ± 0.008 , 0.467 ± 0.002 and 0.527 ± 0.015 respectively. The optimal growth range of the strain is between 2% and 6% ethanol but tolerates up to 10%.

The growth of the strains examined in Figures 2a-2f showed four characteristic phases of diauxic (two-phase) growth. A first phase of growth during 24 h incubation, followed by a slowing down phase between 48h and 72h, a maximum growth recovery between 120h and 168h, then slowing down ending at certain concentrations.

From the results of table 2, it seems that strains derived from traditional date vinegar of the cultivars Deglet Nour, Hchef Deglet Nour, Hamraya and Harchaya, can grow and be tolerated in media supplemented with ethanol concentrations between 2% and 10%. But *Acetobacter aceti* subsp. *aceti* and *Acetobacter aceti* subsp. *liquifaciens* are the most resistant with very good growth at 10%, followed by *Acetobacter aceti* subsp. *orleanensis*, *Acetobacter pasteurianus* subsp. *ascendens* with good growth at 8%. Finally, *Acetobacter pasteurianus* subsp. *lovaniensis* and *Gluconobacter oxydans* subsp. *industrius* which grow very good and good respectively in the presence of 6% ethanol.

The results of growth monitoring of the strains *Acetobacter aceti* subsp. *aceti*, *Acetobacter aceti* subsp. *liquifaciens*, *Acetobacter aceti* subsp. *orleanensis*, *Acetobacter pasteurianus* subsp. *ascendens*, *Acetobacter pasteurianus* subsp. *lovaniensis* and *Gluconobacter oxydans* subsp. *industrius* for 168 hours, on a liquid medium YGEA modified with acetic acid, are shown as curves in Figures 3a – 3f. Whose strains start their growth from 0.5 ± 0.006 at 600 nm.

The variation of biomass of *Acetobacter aceti* subsp. *aceti* from an optical density of 0.5 at different concentrations of acetic acid is shown in the form of curves with correlatively identical rates of change during incubation (Fig. 3a). An increase in growth after 24 hours with increasing optical densities; 0.553 ± 0.008 (0%), 0.555 ± 0.003 (2%), 0.582 ± 0.002 (10%), 0.568 ± 0.004 (4%), 0.617 ± 0.005 (8%) and 0.780 ± 0.006 (6%). So 6% acetic acid represents the growth peak, then a decrease towards the two side (4% and 8%) and further towards 2% and 10%. A decrease until 120h, where the strain resumes growth with 0.377 ± 0.003 (2%), 0.451 ± 0.004 (4%), 0.733 ± 0.003 (6%),

Table 2. Comparison of growth of AAB at different ethanol concentration

Strain	Concentration				
	2%	4%	6%	8%	10%
<i>Acetobacter aceti</i> subsp. <i>aceti</i>	+	+	+++	+++	+++
<i>Acetobacter aceti</i> subsp. <i>liquifaciens</i>	+	++	++	++	+++
<i>Acetobacter aceti</i> subsp. <i>orleanensis</i>	+++	+++	++	++	+
<i>Acetobacter pasteurianus</i> subsp. <i>ascendens</i>	+++	++	++	++	+
<i>Acetobacter pasteurianus</i> subsp. <i>lovaniensis</i>	+++	+++	+++	+	+
<i>Gluconobacter oxydans</i> subsp. <i>industrius</i>	+++	++	++	+	+

Very good: +++, good: ++, moderate: +.

0.541 ± 0.002 (8%) and 0.363 ± 0.004 (10%) at 168h. With the exception of 0% acetic acid the curve is almost stable.

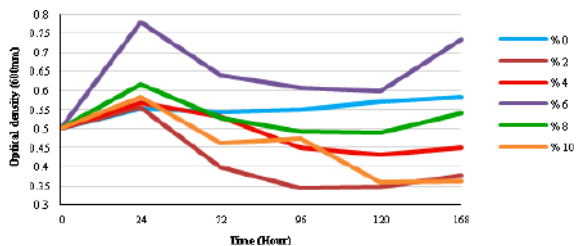


Figure 3a. Tolerance of *Acetobacter aceti* subsp. *aceti* strain from traditional date vinegar with acetic acid

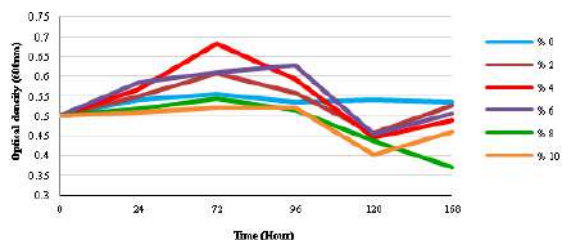


Figure 3b. Tolerance of *Acetobacter aceti* subsp. *liquifaciens* from traditional date vinegar with acetic acid

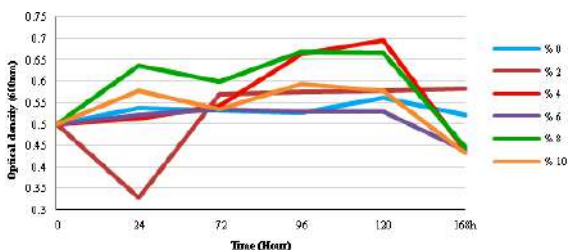


Figure 3c. Tolerance of *Acetobacter aceti* subsp. *orleanensis* strain from traditional date vinegar with acetic acid

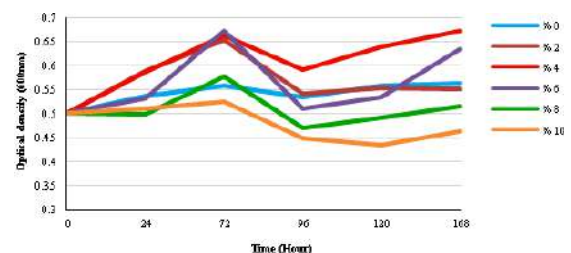


Figure 3d. Tolerance of *Acetobacter pasteurianus* subsp. *ascendens* strain from traditional date vinegar with acetic acid

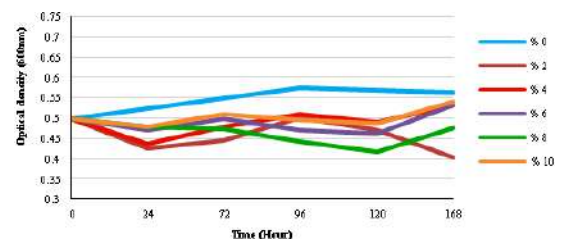


Figure 3e. Tolerance of *Acetobacter pasteurianus* subsp. *lovaniensis* strain from traditional date vinegar with acetic acid

Figure 3b shows a slower majority growth of *Acetobacter aceti* subsp. *liquifaciens* up to 72 hours from bottom to top by 0.608 ± 0.005 (2%), 0.611 ± 0.002 (6%), 0.544 ± 0.004 (8%) and 0.522 ± 0.003 (10%). A regression at 120h, then a return to growth at 168h, of which, 0.527 ± 0.002 (2%), 0.489 ± 0.005 (4%), 0.505 ± 0.004 (6%), 0.369 ± 0.002 (8%) and 0.461 ± 0.005 (10%). In the absence of acetic acid, there is no significant growth. Therefore the optimum growth is around 0.682 ± 0.002 (4%) acetic acid.

Acetobacter aceti subsp. *orleanensis* (Fig. 3c), evolved in the direction of 0.323 ± 0.002 (2%), 0.512 ± 0.023 (4%), 0.522 ± 0.002 (6%), 0.576 ± 0.004 (10%) and 0.637 ± 0.012 (8%) at 24 hours, but majority decay at 72 hour. Increase in 120 hours [0.696 ± 0.007 (4%), 0.528 ± 0.005 (6%), 0.665 ± 0.002 (8%) and 0.577 ± 0.001 (10%)], and regressed afterwards. The bacterium in the acetic acid-free medium hardly exceeds 0.560 during the 168 hours. The drop in biomass for 0.323 ± 0.002 (2%) of acetic acid after 24 hours may be due to a lack of oxygen.

Figure 3d express slow growth of *Acetobacter pasteurianus* subsp. *ascendens*. After 72h, where the optical densities at 0.673 ± 0.007 (6%), 0.663 ± 0.002 (4%) and 0.653 ± 0.005 (2%) are almost juxtaposed, and far from 0.577 ± 0.001 (8%) and 0.525 ± 0.004 (10%). Then a decrease at 96 h, and growth resumes at 168 h with 0.551 ± 0.005 (2%), 0.673 ± 0.002 (4%), 0.633 ± 0.006 (6%), 0.514 ± 0.009 (8%) and 0.463 ± 0.009 (10%) hence the tolerance of the bacteria. On the other hand, the evolution grows 0% acetic acid, always maintains about 0.5 ± 0.004 and 0.562 ± 0.003.

The addition of acetic acid to the culture of *Acetobacter pasteurianus* subsp. *lovaniensis* causes stress to the bacteria, which is expressed by curves showing close and decreasing paces after 24 h, where the optical density is 0.480 ± 0.001 (10%), 0.472 ± 0.002 (8%), 0.470 ± 0.002 (6%), 0.438 ± 0.003 (4%) and 0.425 ± 0.005 (2%) with acetic acid concentrations increasing from 2% to 10% (Fig. 3e). In the absence of acetic acid, the strain grows slowly to 0.575 ± 0.006 and 0.562 ± 0.006.

The optical density of *Gluconobacter oxydans* subsp. *industrius* obtained after 72 hours in decreasing order is the 0.671 ± 0.002 (4%), 0.634 ± 0.002 (6%), 0.630 ± 0.019 (2%), 0.615 ± 0.020 (8%) and 0.561 ± 0.033 (10%). It decrease from 72 h to 168 h by 0.434 ± 0.007 (4%), 0.402 ± 0.006 (6%), 0.427 ± 0.013 (2%), 0.398 ± 0.003 (8%) and 0.468 ± 0.004 (10%) (Fig. 3f).

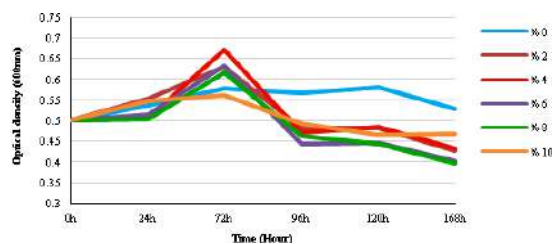


Figure 3f. Tolerance of *Gluconobacter oxydans* subsp. *industrius* strain from traditional date vinegar to acetic acid

Table 3. Comparison of growth of AAB at different acetic acid concentration

Strain	Concentration						
	0%	2%	4%	6%	8%	10%	
<i>Acetobacter aceti</i> subsp. <i>aceti</i>	+	+	++	+++	++	++	
<i>Acetobacter aceti</i> subsp. <i>liquifaciens</i>	+	++	+++	++	+	+	
<i>Acetobacter aceti</i> subsp. <i>orleanensis</i>	+	+	+	+	+++	++	
<i>Acetobacter pasteurianus</i> subsp. <i>ascendens</i>	+	+++	+++	+++	++	+	
<i>Acetobacter pasteurianus</i> subsp. <i>lovaniensis</i>	+	---	---	-	-	-	
<i>Gluconobacter oxydans</i> subsp. <i>industrius</i>	+	++	+++	++	++	+	

Very good: +++, good: ++, moderate: +, bad: -, very bad: ---

Cultivation of the *Gluconobacter oxydans* subsp. *industrius* strain in the absence of acetic acid (0%) remains reduced between 0.580 ± 0.005 (120h) and 0.530 ± 0.001 (168h). The exponential phase (before 72 hours) can be explained by an exceptional adaptation and assimilation of the excess acid produced and added to the medium by the glyoxylate shunt. But the second phase of decline (from 72h to 168h), may be due to the inability of *Gluconobacter oxydans* subsp. *industrius* to respond to a very high stress of acetic acid accumulated in the stressed environment. This causes cell lysis.

The strains tested at different concentrations of acetic acid and compared in Table 3, showed a total tolerance up to 10% (pH= 2.94). The exception was *Acetobacter pasteurianus* subsp. *lovaniensis*. Including the order of growth at high rate of acetic acid is, *Acetobacter aceti* subsp. *aceti*, *Acetobacter aceti* subsp. *orleanensis*, *Acetobacter aceti* subsp. *liquifaciens*, *Acetobacter pasteurianus* subsp. *ascendens*, and *Gluconobacter oxydans* subsp. *industrius*. In the absence of acetic acid, the growth of the strains remains practically constant. *Acetobacter aceti* subsp. *aceti* and *Acetobacter aceti* subsp. *orleanensis* resisted better in an acid shock of about 10% (pH= 2.94 ± 0.01).

Thus, the strain *Acetobacter aceti* subsp. *aceti*, which adapts faster to the stresses of ethanol and 10% acetic acid. For this, it may be a choice for future use on an industrial scale, which requires an optimization of the production parameters before inoculation into the fermenter.

DISCUSSION

In light of our results, AAB strains isolated from traditional date vinegar produced locally in the basin of Ouargla (Algerian Northern Sahara) were found to show a major industrial effect. Strains that have provided the enzyme β -glucosidase, hydrolyzed esculin to glucose monomer. The α -galactose and β -galactose are hydrolyzed using the enzymes α -galactosidase and β -galactosidase. To degrade gelatin, a gelatinase enzyme must be produced by the strains of *Acetobacter* and *Gluconobacter* tested, to provide the amino acid Alanine, Hydroxyproline, Isoleucine, Leucine, Methionine, Phenylalanine, Valine, Aspartic Acid, Glutamic Acid ...etc. The fermentation of glucose, ribose, arabinose, lactose, trehalose, raffinose, mannitol and sorbitol reveals an acidification of the media after production of organic acids by AAB. AAB have the

ability to oxidize in fermentation many types of substrates to high-value end products, including acetic acid, the main constituent of vinegar, ascorbic acid (vitamin C), gluconic acid, ketogluconic acid, cellulose and dextrans production [23]. The best carbon sources for *Acetobacter* strains are, in descending order, ethanol, glycerol and Na-DL-lactate, while for *Gluconobacter*, D-mannitol, sorbitol, glycerol, D-fructose and D-glucose [26]. For the productivity of cellulose, it is preferable to use dual carbon sources e.g. glucose and ethanol, modified sugars and polyols [7]. According to Kadere et al. (2008) [9], strains of the genus *Acetobacter* isolated from coconut are capable of fermenting arabinose, xylose, ribose, glucose, galactose, mannose, melibiose and trehalose. They do not ferment amygdaline, cellobiose, esculin, fructose, lactose, maltose, mannitol, melezitose, α -gluconate, raffinose, rhamnose, salicin, sorbitol, sucrose. They can grow on gelatin, without liquefaction. *Acetobacter pasteurianus* according to Konate et al. (2014) [10] of Ivorian wine, were capable of oxidizing xylose, glycerol, glucose, ethanol, acetic acid, lactic acid and incapable of oxidizing galactose, mannose, sucrose, mannitol, sorbitol and fructose. Romero-Cortes et al. (2012) [19], emerged AAB from cocoa, oxidizing ethanol but does not hydrolyze cellulose.

Chinnawirotpisan et al. (2003) [2], report that strains of the genus *Acetobacter* always show three characteristic growth phases in alcoholic environments. The first is the oxidation of alcohol (ethanol) to acetic acid by the enzyme alcohol dehydrogenase (ADH), the second is not a growth stage and the third is the over-oxidation of the accumulated acetic acid by aldehyde dehydrogenase (ALDH) to CO₂ and H₂O. For the *Gluconobacter oxydans* subsp. *industrius* strain, the third phase consists of an adaptation and tolerance to the acetic acid produced without over-oxidation. Ethanol damages the cell membrane, denatures proteins, interferes with metabolism and causes cell lysis in bacteria [18] and thus for biomolecules such as DNA, RNA, ribosomes and enzymes [27]. Higher concentrations have not been tested because the composition of traditional balsamic and date vinegar is different from industrial vinegar and rarely exceeds 10% alcohol. The concentration of ethanol is not a limiting factor for the growth of AAB [6]. An optimal concentration of $13.45 \pm 0.99\%$ ethanol is optimized for good acetic fermentation [8]. After alcoholic fermentation, even when ethanol concentrations of 5-10% are toxic to AAB, some strains are able to survive in very high ethanol concentrations of up to 15% [11].

Beheshti-Maal (2014) [1], showed that strains of *Acetobacter* isolated from date palm in Iran, were resistant in ethanol concentrations between 5 and 9% and 2.5% and 6% respectively. For a good vinegar process, an alcohol concentration of 10-13% is essential [4]. Our results are in agreement with previous studies reporting growth in ethanol and acetic acid at stressed conditions.

The acid suppresses bacterial growth, which was an activator up to the value of 2% [15]. The acetic acid strength of a good vinegar should be about 6% (at least 4% acetic acid) [4], the minimum acetic acid content in vinegar should be 4% [8]. This explains the choice of the strain introduced in vinegar. The most attractive species of the genus *Komagataeibacter*, *Komagataeibacter europaeus*, *Komagataeibacter intermedius*, *Komagataeibacter oboediens*, *Gluconacetobacter entanii* and *Komagataeibacter maltaceti*, were isolated from industrial vinegar bioreactors where the acetic acid concentration was over 6%. These species are capable of resisting acetic acid up to 15-20%, while species of the genus *Acetobacter* are harmed when acidity rises to 7-8%. This property makes the *Komagataeibacter* species well adapted for application in the fermentation of immersed vinegar [27]. The activity of DHA is much more stable under acidic conditions in bacteria of the genus *Acetobacter* than in bacteria of the genus *Gluconobacter*, which explains why *Acetobacter* produce a higher amount of acetic acid [25]. Adaptive responses of microbial cells to the toxic environment include changes in membrane composition to facilitate the penetration of acetic acid and their dissociation in the cytoplasm (high pH). The cells are exposed to the acetic acid present in the culture medium composition, and that produced from ethanol, during vinegar production. The oxidation process is performed by enzymes bound to the periplasmic surface of the internal cytoplasmic membrane. The acetic acid produced diffuses passively into the cytoplasm and is probably transported out of the cell by an efflux pump. In addition to this efflux system, the cell must also adapt to high concentrations of acetic acid in its membrane and also prevent the diffusion of acetic acid into the cytoplasm [28]. *Acetobacter* acidophilic strains isolated by Saeki et al. (1997) [20], tolerated 15-21% acetic acid but their optimal growth was between 4 and 8%. The optimum pH for growth and acetic acid production had a wider range from 3 to 5. AAB are also able to grow at lower pH values where bacterial activity has been detected at pH values below 3 [24]. The strain *Acetobacter aceti* subsp. *aceti*, isolated in Ouargla basin (Algerian Northern Sahara), has good mechanisms of adaptation to its environment, which is likely to be a better current industrial offer.

REFERENCES

[1] Beheshti-Maal, K., (2014): Identification of a thermo-tolerant *Acetobacter* strain isolated from Iranian date palm (Rotab) suitable for date vinegar production in

agricultural biotechnology. *Advances in Environmental Biology*, 8: 1063-1071.

- [2] Chinnaawirotpisan, P., Theeragool, G., Limtong, S., Toyama, H., Adachi, O.O., Matsushita, K., (2003): Quinoprotein alcohol dehydrogenase is involved in catabolic acetate production, while NAD-dependent alcohol dehydrogenase in ethanol assimilation in *Acetobacter pasteurianus* SKU1108. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 96: 564-571.
- [3] Diba, F., Alam, F., Talukder, A.A., (2015): Screening of Acetic Acid Producing Microorganisms from Decomposed Fruits for Vinegar Production. *Advances in Microbiology*, 5: 291-297.
- [4] Erkmen, O., Bozoglu, T.F., (2016): *Food Microbiology. 1st Volume Set: Principles into Practice*. Wiley, West Sussex, UK, 944 p.
- [5] Gao, L., Wu, X., Zhu, C., Jin, Z., Wang, W., Xia, X., (2020): Review: Metabolic engineering to improve the biomanufacturing efficiency of acetic acid bacteria: advances and prospects. *Critical Reviews in Biotechnology*: 1-17.
- [6] Gullo, M., Caggia, C., De Vero, L., Giudici, P., (2006): Characterization of acetic acid bacteria in traditional balsamic vinegar. *International Journal of Food Microbiology*, 106: 209-212.
- [7] Gullo, M., La China, S., Falcone, P.M., Giudici, P., (2018): Biotechnological production of cellulose by acetic acid bacteria: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102: 6885-6898.
- [8] Isham, N.K.M., Mokhtar, N., Fazry, S., Lim, S.J., (2019): The development of an alternative fermentation model system for vinegar production. *LWT- Food Science and Technology*, 100: 322-327.
- [9] Kadere, T.T., Miyamoto, T., Oniango, 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*, 7: 2963-2971.
- [10] Konate, M., Akpa, E.E., Koffi, L.B., Kra, K.A.S., Megnanou, R.M., Niamke, S., (2014): Isolation of thermotolerant and high acetic acid-producing *Acetobacter pasteurianus* from Ivorian palm wine. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 26: 773-785.
- [11] König, H., Uden, G., Frohlich, J., (2017): *Biology of microorganisms on grapes, in must and in wine*. Springer, New York, 522 p.
- [12] Mathew, B., Agrawal, S., Nashikkar, N., Bundale, S., Upadhyay, A., (2019): Isolation of acetic acid bacteria and preparation of starter culture for apple cider vinegar fermentation. *Advances in Microbiology*, 9: 556-569.
- [13] Matsushita, K., Toyama, H., Tonouchi, N., Okamoto-Kainuma, A., (2016): *Acetic acid bacteria. Ecology and Physiology*. Springer, Japan, 350 p.
- [14] Mounir, M., Shafei, R., Zarmehrkhorshid, R., Hamouda, A., Ismaili Alaoui, M., Thonart, P., (2016): Simultaneous production of acetic and gluconic acids by a thermotolerant *Acetobacter* strain during acetous fermentation in a bioreactor. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 121: 166-171.
- [15] Multon, J.L., (1999): *Techniques d'analyse et de controle dans les industries agro-alimentaires, Analyses des constituants alimentaires*. Tec & Doc, 476 p.
- [16] Naloka, K., Yukphan, P., Matsutani, M., Matsushita, K., Theeragool, G., (2020): *Komagataeibacter diospyri* sp. nov., a novel species of thermotolerant bacterial nanocellulose-producing bacterium. *International Journal*

- of Systematic and Evolutionary Microbiology, 70: 251-258.
- [17] Ould 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. *Revue des Energies Renouvelables: Production et Valorisation-Biomasse*, 6: 87-92.
- [18] Paradh, A., Hill, A.E., (2016): Review: Gram negative bacteria in brewing. *Advances in Microbiology*, 6: 195-209.
- [19] Romero-Cortes, T., Robles-Olvera, V., Rodriguez-Jimenes, G., Ramirez-Lepe, M., (2012): Isolation and characterization of acetic acid bacteria in cocoa fermentation. *African Journal of Microbiology Research*, 6: 339-347.
- [20] 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. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 61(2): 317-323.
- [21] Saha, P., Banerjee, S., (2013): Optimization of process parameters for vinegar production using banana fermentation. *International Journal of Research in Engineering and Technology*, 2: 501-514.
- [22] Sengun, I.Y., (2017): Acetic acid bacteria, Fundamentals and food applications. CRC Press, 358 p.
- [23] Sengun, I.Y., Karabiyikli, S., (2011): Importance of acetic acid bacteria in food industry. *Food Control*, 22: 647-656.
- [24] Sharafi, S., Rasooli, I., Beheshti-Maal, K., (2010): Isolation, characterization and optimization of indigenous acetic acid bacteria and evaluation of their preservation methods. *Iranian Journal of Microbiology*, 2: 38-45.
- [25] Šistková, I., Horsáková, I., Hanková, M., Čížková, H., (2019): *Asaia spp.*, acetic acid bacteria causing the spoilage of non-alcoholic beverages. *Kvasny Prumysl*, 65: 1-5.
- [26] Szymczak, M., Topuz, O., (2018): Acetic acids, advances in research and applications. Nova Science Pub Inc, New York, 203 p.
- [27] Taweecheep, P., Naloka, K., Matsutani, M., Yakushi, T., Matsushita, K., Theeragool, G., (2019): *In vitro* thermal and ethanol adaptations to improve vinegar fermentation at high temperature of *Komagataeibacter oboediens* MSKU 3. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 189: 144-159.
- [28] Trček, J., Jernejc, K., Matsushita, K., (2007): The highly tolerant acetic acid bacterium *Gluconacetobacter europaeus* adapts to the presence of acetic acid by changes in lipid composition, morphological properties and PQQ-dependent ADH expression. *Extremophiles*, 11: 627-635.
- [29] Weldemichael, H., Stoll, D., Weinert, C., Berhe, T., Admassu, S., Alemu, M., Huch, M., (2019): Characterization of the microbiota and volatile components of kocho, a traditional fermented food of Ethiopia. *Heliyon*, 5(6): e01842.

Received: 12 February 2020

Accepted: 30 May 2020

Published Online: 2 June 2020

Analele Universității din Oradea, Fascicula Biologie

<http://www.bioresearch.ro/revistaen.html>

Print-ISSN: 1224-5119

e-ISSN: 1844-7589

CD-ISSN: 1842-6433

University of Oradea Publishing House