

UNIVERSITE KASDI MERBAH-OUARGLA
FACULTÉ DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



MEMOIRE DE FIN D'ETUDE
POUR L'OBTENTION DU DIPLOME DE MASTER ACADEMIQUES

Domaine : Science de la nature et de la vie

Filière: biologie

Spécialité : Microbiologie fondamental et appliquée

Présenter par : BACHI HANANE
BENSAYAH SARA

Thème

Recherche et identification de quelques souches de bactéries acétiques issues du vinaigre traditionnel des dattes du cultivar Hamraya: Etude de la thermo-tolérance

Devant le Jury:

<i>Président :</i> BAYOUCEF ZAHIA	MCB	Université Kasdi Marbah Ouargla
<i>Examineur :</i> MOSBAH SAID	MAA	Université Kasdi Marbah Ouargla
<i>Promoteur:</i> HAMDY WASSILA	MAA	Centre Universitaire Tamanrasset
<i>Co-promoteur :</i> BEN AISSA ATIKA	MCB	Université Kasdi Marbah Ouargla

Année universitaire : 2016/2017

Remerciements

Nous remercions d'abord Dieu qui nous a donné le courage et la patience pour terminer ce travail.

Nous exprimons toute notre gratitude à notre encadreur Mme Hamdi Wssila, MAA département de biologie, institut des sciences et de la technologie, centre universitaire Amine Elokhal Elhadj Moussa Eg Akhamouk-Tamanghasset pour avoir proposé et dirigé ce travail avec une grande rigueur scientifique, de sa disponibilité, ses conseils et la confiance qu'elle nous a accordé pour réaliser ce travail.

Nos vifs remerciements vont plus particulièrement à co-encadreur Mme Benaïssa Atika mcb au département des Sciences Biologiques, à la faculté des Sciences des la Nature et de la Vie à l'Université Kasdi Merbah Ouargla, pour son aide précieuse et ses conseils.

Nous voudrions également exprimer notre vif remerciement pour la présidente :

A Mme BAYOUCEF Zahia (MCB au département de biologie, université d'Ouargla)

Nous voudrions également exprimer notre vif remerciement pour l'examinatrice :

A M MOSBAH SAID(MAA au département de biologie, université de Ouargla) d'avoir accepté d'examiner et de juger ce travail.

Merci à tous

Liste des figures

N°	Titre	Page
01	Coups longitudinale du datte et son noyau du palmier dattier d'après (Belguedj, 2001)	03
02	Classification de dattes selon leurs consistances (Absi, 2010)	04
03	Composition de la datte (Estanove, 1990)	04
04	Protocole expérimentale de fabrication de vinaigre (Brewdusud, 2004)	10
05	Morphologie <i>d'Acétobacter aceti</i> (http : www.vulgaris-medical.com/uplood/visuel-Acetobacter)	13
06	L'oxydation de l'éthanol par les bactéries acétiques (Bougnou, 1988).	17
07	Isolement sur milieu frateur à partir de la solution mère et les dilutions decimales jusqu'à 10^{-3} .	21
08	Purification des souches d'acétobacter	22
09	Taux de croissance des souches (S1 et S2) isolées à partir du vinaigre traditionnel de dattes Hamraya à 30°C	38
10	Taux de croissance des souches (S1 et S2) isolées à partir du vinaigre traditionnel de dattes Hamraya à 35°C	39
11	Taux de croissance des souches (S1 et S2) isolées à partir du vinaigre traditionnel de dattes Hamraya à 40°C	39
12	Taux de croissance des souches (S1 et S2) isolées à partir du vinaigre traditionnel de dattes Hamraya à 45°C	40
13	Taux de croissance des souches (S1 et S2) isolées à partir du vinaigre traditionnel de dattes Hamraya à 50°C	41
14	Taux de croissance des souches (S1 et S2) isolées à partir du vinaigre traditionnel de dattes Hamraya à 55°C	41
15	Taux de croissance des souches (S1 et S2) isolées à partir du vinaigre traditionnel de dattes Hamraya à 60°C	42

Liste des photos

N°	Titre	page
01	Aspect des colonies bactériennes obtenues après isolement sur milieu de Frateur.	29
02	Aspect des colonies après une 5 ^{ème} purification des bactéries isolée sur milieu gélosé de Frateur.	30
03	Aspect des cellules isolées après coloration de Gram sous microscope optique (Grossissement x100).	30
04	Résultats de test de pouvoir suroxydant.	33
05	Résultats test catalase des souches d'Acetobacter isolées.	33
06	Résultat de test de l'utilisation de l'ammonium comme source d'azote.	34
07	Résultat de test pouvoir cétoène.	34
08	Résultat de test de formation d'acide gluconique.	35
09	Résultat de test formation d'acide céto gluconique.	36
10	Résultat de test de pigmentation	36
11	résultat de test de production de cellulose.	37

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
I	Les caractères biochimiques de quelques groupes d'acétobacters. (Girad et Rougieux, 1958).	15
II	caractères culturaux des colonies apparues après l'isolement sur milieu Frateur.	28
III	Caractéristiques morphologiques des bactéries acétiques après coloration de Gram.	31
VI	Les résultats d'identification des souches isolées à partir des échantillons de vinaigre traditionnel de datte de Hamraya.	31

Liste des abréviations

C : colonies.

S : souche.

V : volume.

EVHN°1 : Echantillon Vinaigre Hamraya N°1

EVHN°2 : Echantillon Vinaigre Hamraya N°2

Remerciements

Nous remercions d'abord Dieu qui nous a donné le courage et la patience pour terminer ce travail.

Nous exprimons toute notre gratitude à notre encadreur Mme Hamdi Wssila, MAA département de biologie, institut des sciences et de la technologie, centre universitaire Amine Elokka Elhadj Moussa Eg Akhamouk-Tamanghasset pour avoir proposé et dirigé ce travail avec une grande rigueur scientifique, de sa disponibilité, ses conseils et la confiance qu'elle nous a accordé pour réaliser ce travail.

Nos vifs remerciements vont plus particulièrement à co-encadreur Mme Benaïssa Atika mcb au département des Sciences Biologiques, à la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie à l'Université Kasdi Merbah Ouargla, pour son aide précieuse et ses conseils.

Nous voudrions également exprimer notre vif remerciement pour la présidente :

A Mme BAYOUCEF Zahia (MCB au département de biologie, université d'Ouargla)

Nous voudrions également exprimer notre vif remerciement pour l'examinatrice :

A MME chathouna fatna(MAA au département de biologie, université de Ouargla) d'avoir accepté d'examiner et de juger ce travail.

Merci à tous

Dédicaces

*Je dédie ce modeste travail à mon très cher père
ALI qui m'a toujours soutenu et qui a été toujours
présent pour moi*

*A la plus chère au monde, ma mère qui m'a toujours
offert ses aides morales durant mes études*

*A mes frères : YACINE, IBRAHIM, HAKOU,
MANI, BOUDI*

*A mes sœurs : FATIMA, NOURA, NAZIHA, AFAF,
HADJER, FAIROUZE, AMINA*

*A tous les enfants : NESRINE, DADO, ASMA,
JIDA, ACHREF, NISO, HAMANO NAHOLA,
AROJA, , TAYSIRE ET SANDOUSA*

A mon fiancé : KAMEL ABID

A mes oncles et tantes chacun son nom

A tout ma famille. BACHI ET ABID

*A mon amis intime: HANANE, IMANE(A),
ASOMA, LOUBANA, NASSIMA, MAJDA
IMANE(B), SALIHA(G), SARA, AWIICHA,
HADJORA*

*A toute la promotion de la 2ème Master
microbiologie appliquée, ainsi que tous les étudiants
de la faculté des sciences de la nature et de la vie
(ITAS)*

HANANE



Dédicaces

Je ne trouve aucun mot ou expression, qui vont exprimer mes vifs sentiments de gratitude et remerciement ;

*A mon très cher **père** qui n'a jamais cessé de m'apporter tout dont j'ai besoin pour réaliser ce travail et dans tout mon parcours éducatif, ainsi de sa tendresse et sa compréhension.*

Merci papa ;

*A ma chère **mère** qui a toujours peiné pour me créer les conditions nécessaires pour bien réussir dans mes études.*

Je t'aime maman ;

*A ma soeur ; **Iman.***

*A mon frère ; **Oussama.***

*A mes oncles, tantes (**seade**), cousins (**feade, Ali, Islame, Meataze, Bassite, Akrame**) et cousines.*

*A tous les familles ; **BENSAYAH** et **BENZAOUI.***

A toutes mes amies et à toute la promotion de microbiologie 2016,2017.

*A tous ceux qui **j'aime.** SARA BENSAYAH*



Table de matières

Remerciement	
Liste des figures	
Liste des photos	
Liste des tableaux	
Liste des abréviations	
Introduction	01
Chapitre I : Généralité sur le vinaigre traditionnel des dattes	
I-1-Généralités sur les dattes.....	03
I-1-1-Définition des dattes.....	03
I-1-2-Cultivar des dattes.....	03
I-1-3-Catégories des dattes.....	03
I-1-4-Caractéristiques physico-chimiques des dattes.....	05
I-1-5-Valorisation de la datte.....	05
I-1-5-1-Pâte de dattes.....	05
I-1-5-2-Farine de dattes.....	05
I-1-5-3-Sirop de dattes.....	05
I-1-5-4-Jus de dattes.....	05
I-1-5-5-Marmelades de dattes.....	06
I-1-5-6-Alcool de dattes.....	06
I-1-5-7-Vin de dattes.....	06
I-1-5-8-Vinaigre de dattes.....	06
I-2-Généralité sur le vinaigre.....	06
I-2-1-Historique de vinaigre.....	06
I-2-2-Définition du vinaigre.....	07
I-2-3-Principaux types de vinaigres.....	07
I-2-3-1-Vinaigre de vin.....	07
I-2-3-2-Vinaigre de cidre et de Poiret.....	07
I-2-3-3-Vinaigre dz riz.....	07
I-2-3-4-Vinaigre de betteraves.....	08
I-2-3-5-Vinaigre de malt.....	08
I-2-3-6-Vinaigre balsamique.....	08
I-2-3-7-Vinaigre de datte.....	08
I-2-4-Technique d'élaboration de vinaigre traditionnel.....	08
I-2-5-Processus de la fermentation.....	09
I-2-5-1-Condition de la fermentation.....	09
I-2-5-2-Fermentation alcoolique.....	09
I-2-5-3-Fermentation acétique.....	09
I-2-6-L'importance du vinaigre traditionnel.....	10
I-2-7-Microbiologie de vinaigre.....	10
Chapitre II : Généralité sur la fermentation acétique	
II-1-Les bactéries acétiques.....	11
II-2-Origine.....	11

II-3-Classification.....	11
II-4-Facteur de croissances des bactéries acétiques.....	12
II-4-1-L'acide acétique.....	12
II-4-2-L'oxygène.....	12
II-4-3-Température et ph.....	12
II-4-4-Concentration d'éthanol.....	12
II-4-5-Lumières.....	12
II-5-Caractères généraux des bactéries acétiques.....	13
II-5-1-Caractères cultureux.....	13
II-5-2-Caractères morphologiques et structuraux.....	13
II-6-Caractères biochimiques.....	13
II-6-1-Transformation de l'alcool en acide acétique.....	13
II-6-2-Réaction de la catalase.....	13
II-6-3-Pouvoir cétoène.....	14
II-6-4-Transformation du glucose en acide gluconique.....	14
II-7-Caractères physiologique.....	15
II-8-Besoins nutritionnels.....	15
II-9-Métabolisme.....	16
II-10-Mécanisme biochimique de formation d'acide acétique.....	16

Chapitre III : Méthodologie de travail

III-1-Présentation et la région d'étude.....	18
III-2-Choix des zones d'étude.....	18
III-3-Echantillonnage.....	18
III-4-L'objectif d'étude.....	18
III-5-Matériel d'étude.....	19
III-5-1-Matériel végétal.....	19
III-5-2-Matériel biologiques.....	19
III-5-3-Vinaigre traditionnel de dattes.....	19
III-6-Matériel de laboratoire.....	19
III-7-Milieu de culture.....	20
III-7-1-Méthode de dilution.....	20
III-7-2-Technique d'isolement.....	21
III-7-3-Prélèvement des colonies isolées.....	21
III-7-4-Purification des souches.....	22
III-7-5-Préparations microscopiques.....	23
III-7-5-1-Préparation d'une suspension.....	23
III-7-5-2-Réalisation des examens microscopiques.....	23
III-7-5-2-1-Etat frais.....	23
III-7-5-2-2-Frottis.....	23
III-7-5-2-3-Coloration à l'état frais.....	23
III-7-5-2-4-Coloration des frottis.....	23
III-7-6-Conservation des souches isolées.....	24
III-7-6-1-Conservation des souches isolées à quelques semaines.....	24
III-7-6-2-Conservation des souches isolées à longue durée.....	24

III-7-7-1-Etude des caractères cultureux.....	24
III-7-7-2-Etudes des caractères morphologiques.....	25
III-7-7-3-Etudes des caractères physiologiques et biochimiques	25
III-7-7-3-1-Test de pouvoir suroxydant.....	25
III-7-7-3-2-Test de catalase.....	25
III-7-7-3-3-Pouvoir cétoène.....	26
III-7-7-3-4-Culture en présences d'ammonium comme seule source d'azote et de 3% d'éthanol.....	26
III-7-7-3-5-Présence d'un pigment sur le milieu d'isolement.....	26
III-7-7-3-6-Formation d'acide gluconique à partir du glucose.....	26
III-7-7-3-7-Formation d'acide cetogluconique.....	27
III-8-Etude du thermotolérant des souches isolées.....	27

Chapitre IV : Résultat et discussion

IV-1-Isolement et pré-identification.....	28
IV-2- Résultats des examens microscopiques des colonies obtenues après isolement...	30
IV-3-Résultats de l'identification physiologique et biochimique.....	31
IV-4-Teste du thermo tolérance des souches isolées.....	38
IV-4-1-Teste du thermo-tolérance des souches isolées à 30°C.....	38
IV-4-2-Teste du thermo-tolérance des souches isolées à 35°C	39
IV-4-3-Teste du thermo-tolérance des souches isolées à 40°C	39
IV-4-4-Teste du thermo-tolérance des souches isolées à 45°C.....	40
IV-4-5-Teste du thermo-tolérance des souches isolées à 50°C	40
IV-4-6-Teste du thermo-tolérance des souches isolées à 55°C	41
IV-4-7-Teste du thermo-tolérance des souches isolées à 60°C	41
Conclusion	43
Références bibliographique.....	44

INTRODUCTION

Introduction

La valorisation technologique des dattes permet ainsi de transformer les dattes de faible valeur commerciale ne répondant pas au standard international, et d'améliorer la présentation des dattes réputées pour la bonne valeur marchande (**Harrak et Boujnah, 2012**). Pourraient être transformées pour obtenir divers nouveaux produits (Valorisation), les plus importants produits élaborés sont ; les produits non fermentés comme la farine de dattes, la pâte de dattes, le miel de dattes, le jus de dattes, le sirop de dattesEtc. Les produits de fermentation : le vin de datte, l'alcool de datte, l'acide citrique, la vitamine B12, le vinaigre ...etc (**Bougnou, 1988 ; Ould El Hadj et al, 2001**).

Les populations sahariennes depuis fort longtemps, on eu fabriqué localement leur propre vinaigre. Cette production est une tradition ancestral qui utilise un matériel artisanal et confère au vinaigre élaboré des avantages thérapeutique que l'on ne trouve pas dans le vinaigre industriel (**Ould El Hadj et al, 2001**). Ce dernier est obtenu par une double fermentation, premièrement la fermentation alcoolique (anaérobie) par l'intervention de levure essentiellement *Saccharomyces* ou le sucre de datte est transformé en alcool éthylique, par la suite la fermentation acétique (aérobie) par l'intervention des bactéries acétiques essentiellement *Acétobacter* où l'éthanol est oxydé en acide acétique (**Bougnou, 1988**), et les souches local d'acétobacter se trouve naturellement sur les dattes (**Cheikh, 1994**).

Les bactéries acétiques sont utilisées depuis la plus haute antiquité pour la préparation du vinaigre (**Lambine et German, 1969**).

C'est dans ce contexte que nous avons réalisé une étude expérimental sur le thème de recherche et pre-identification de quelque souche des bactéries acétiques provenant du vinaigre traditionnel des dattes de cultivar Hamraya et une étude de la thermo-tolérance des souches locale identifiées qui poursuivre.

Le développement de ce sujet à été rendu possible en faisant recours aux différentes sources d'information, que se soient écrites comme, les ouvrages, les publications et les revues ainsi que toutes sources d'informations électroniques, qui s'inscrivent dans la thématique du sujet de notre mémoire.

Pour une question d'organisation nous avons articulé notre travail au tour de quatre chapitres dont :

Introduction

Le premier, porte sur une étude bibliographique sur le vinaigre traditionnel de dattes. Le second, porte sur une étude bibliographique sur la fermentation acétique. Le troisième chapitre, est consacré pour la méthodologie de travail. Dans le quatrième, se présente les résultats et la discussion. Et enfin, nous avons terminé notre étude par une conclusion et des perspectives achevant ce travail.

***CHAPITRE I : GÉNÉRALITÉ
SUR LE VINAIGRE
TRADITIONNEL DE DATTES***

Chapitre I : Généralité de vinaigre traditionnel des dattes

I-1-Généralité sur les dattes

I-1-1-Définition des dattes

La datte, fruit du palmier dattier, est une baie ayant une seule graine communément appelé noyau. L'anatomie montre que ce fruit est constitué de trois tissus (**Espiard, 2002 ; Dowson et Aten, 1963; Munier, 1973; Peyron et Gay, 1988**). Une enveloppe fine cellulosique, l'épicarpe ou peau, le mésocarpe est plus ou moins charnu et de consistance variable. Il présente une zone périphérique de couleur plus soutenue et de texture compacte ainsi qu'une zone interne de teinte plus claire et de texture fibreuse, l'endocarpe est réduit à une membrane parcheminée entourant le noyau. Le péricarpe, le mésocarpe et l'endocarpe sont confondus par les conditionneurs sous l'appellation chair ou pulpe (**Munier, 1973**). (Figure n°01).

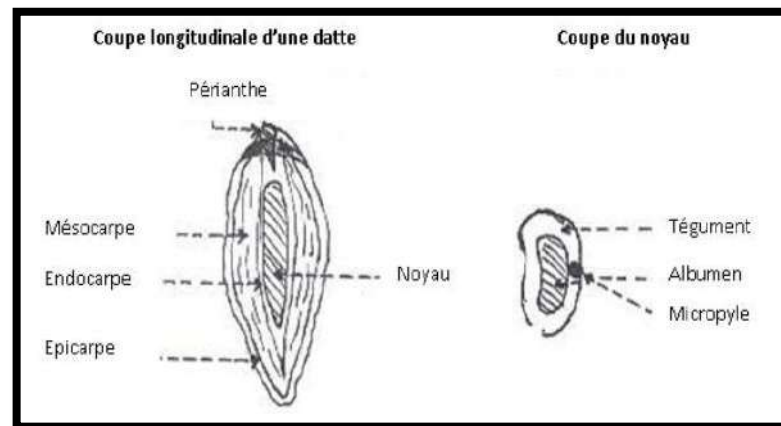


Figure n°01: Coupes longitudinales d'une datte et de son noyau du palmier dattier d'après (**Belguedj, 2001**).

I-1-2- Cultivar de dattes

Les cultivars de dattes sont très nombreux, seulement quelques unes ont une importance commerciale. Elles se différencient par la saveur, la consistance, la forme, la couleur, le poids et les dimensions (**Djerbi, 1994; Belguedj, 2001**).

I-1-3-Les catégories de dattes

La croissance de la datte est variable. Selon les caractéristique de dattes sont réparties en 03 catégories. Dattes molles, le mésocarpe est très humidifié avec peu de saccharose (31% d'eau) (**Espiard, 2002 ; Gilles, 2000**) par exemple la datte Hamraya, se caractérise essentiellement par une consistance très molle, à taille plus grande que Ghars. Ses dimensions est un poids moyen de 13 g ; Une longueur moyenne de 5.5 cm ; Un diamètre moyen de 2,3 cm (**Laouini, 2014**).

Dattes demi-molles, telle que Deglet Nour (18% d'eau). Dattes Sèche, telle que la Degla Beida, et Mech Degla (12% d'eau) (Etienne, 2002) (Figure n°02).



Figure n°02 : Classification de dattes selon leurs consistances (Absi, 2010).

On 1990, Estanove a classé les dattes selon leur importance économique en 03 catégories :

Dattes nobles : destinées à l'exportation et à la commercialisation à l'échelle nationale.

Dattes communes : destinées à la consommation locale ou l'alimentation du bétail.

Dattes non consommées : représentent les cultivars de faible valeur marchant destinés à l'alimentation animale ou perdues.

I-1-4-Caractéristiques physico-chimiques des dattes

Selon Estanove, 1990 la datte se compose essentiellement d'eau, de sucres réducteurs « glucose et fructose » et de sucres non réducteurs, « saccharose ».

Les constituants non glucidiques représentent les protéines, les lipides, la cellulose, les cendres (sels minéraux), les vitamines et les enzymes (Estanove, 1990) (Figure n°03).

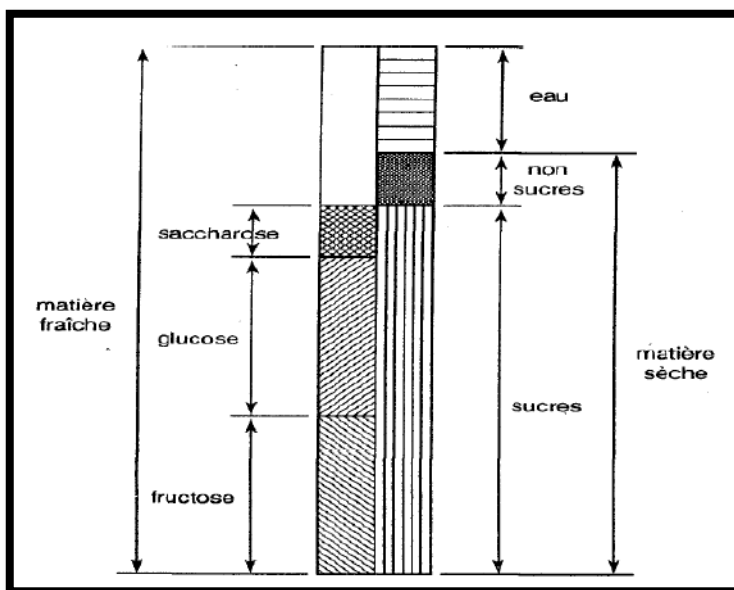


Figure n°03 : Composition de la datte (Estanove, 1990).

I-1-5-Valorisation de la datte

Dès l'Antiquité, en Egypte et au Moyen Orient, les populations élaboraient de nombreux produits avec les dattes qu'elles utilisaient pour leur alimentation et leur pharmacopée (**Husson, 1931 ; Barreveld, 1993 ; Al-hooti et al., 1996, Estanove et Reyenes, 1990**) ont décrit un certain nombre d'utilisations et d'applications potentielles des dattes.

I-1-5-1-Pâte de dattes

Les dattes sont généralement cuites à la vapeur, dénoyautés, macérés, et converti en une forme semi-solide connus sous le nom de patte avec une teneur en humidité d'environ 20-23% et une activité d'eau inférieur à 0,6 (**Ahmed et al., 2005**). La pâte des dattes a été utilisée comme substituant de sucre dans de nombreux aliments. Dans les industries de confiserie, la pate de datte est utilisée comme une des ingrédients majeurs (**Alhamdan et Hassan, 1999**).

I-1-5-2-Farine de dattes

Les dattes macérées sont séchées à moins de 5% d'humidité (**Barreveld, 1993**). On obtient ainsi une farine de couleur claire, d'odeur agréable (**Sawaya et al., 1982**). Elle est utilisée essentiellement en biscuiterie et en pâtisserie (**Barreveld, 1993; Sawaya et al., 1982**).

I-1-5-3-Sirop de dattes

Le sirop de datte, également appelé miel de datte, est un sirop sucré foncé (mélasse de fruit) obtenu à partir d'extrait des dattes et typique de la cuisine arabe. Il est appelé *Rub Al-*

Tamr dans le monde arabe (**Mohamed et Ahmed, 2006**).

Le sirop est préparé à base des dattes cuites dans l'eau, puis filtrées. Le jus extrait est concentré par cuisson à feu doux jusqu'à l'obtention d'un liquide coloré et sirupeux. Le sirop contient principalement des sucres dont le saccharose, le glucose et le fructose (**Mohamed et Ahmed, 2006; Patzold et Bruckner, 2005**). Les mélanoidines et les complexes de ferpolyphénol sont responsables de la couleur foncée du sirop (**Mohamed et Ahmed, 2006**).

I-1-5-4-Jus de dattes

Rouhou et al., 2006 ont montré que la solution brute extraite des dattes après broyage, dilution et filtration a une forte teneur en sucre. Le couplage des traitements enzymatiques et de microfiltration a conduit à l'élaboration d'une boisson clarifiée, modérément acide, présentant une viscosité et une turbidité relativement faible et ayant des

caractéristiques d'écoulement comparables à celles des boissons et jus de fruits connus. Le jus de datte est appelé « Tassabout » ou « el mriss » à (Fezouata, Maroc), « Takerwet » à (Algérie) (**Zirari et al., 2003**).

I-1-5-5-Marmelades de dattes

Les dattes **Al-Hooti et al.(1997)** sont dénoyautées puis réduites en pulpe, portées à évaporation après acidification jusqu'à un pH 2,5 (avec de l'acide citrique, acide ascorbique ou acide tartrique).

La préparation de la marmelade nécessite tout d'abord de faire un sirop par cuisson du sucre dans 50 % d'eau jusqu'à consistance visqueuse. Puis le mélange pulpe de datte et sirop est cuit jusqu'à 67° brix par ajout de pectine à la fin de la cuisson. Après cuisson on obtient une marmelade dont la saveur ne rappelle plus celui de la datte, et dépourvue d'arômes. Il faut par conséquent renforcer le goût par des arômes artificiels ou naturels du type cannelle, menthe, vanille, girofle, cacao, ...etc (**Al-Hooti et al., 1997**).

I-1-5-6-Alcool de dattes

La fabrication de l'alcool de dattes est soumise à une réglementation sévère lorsqu'elle n'est pas prohibée. L'alcool de datte est utilisé à des fins médicales. On obtient environ 25L d'alcool pur 200 kg de dattes (**Reynes, 1997**).

I-1-5-7-Vin de dattes

Le vin de dattes était autrefois de consommation courante dans les pays phoenicicoles, aujourd'hui il est plutôt destiné aux pays industrialisés et peut être produit industriellement.

La majeure partie du sucre de la datte est extrait par diffusion dans l'eau. La fermentation du jus sucré n'est possible qu'après dilution du moût à des concentrations inférieures à 300 g/l (**Reynes, 1997**).

I-1-5-8-Vinaigre de dattes

Une adjonction d'eau à 35-40°C est réalisée à des dattes écrasées jusqu'à l'obtention d'un liquide ayant une concentration en sucres de l'ordre de 220 g/litre. Après macération, les ferments sont ajoutés. On obtient 300 à 400l de vinaigre à 6_7° pour 100 kg de dattes. Un autre procédé consiste à partir du vin de dattes, à rajouter à ce dernier des bactéries acétiques, l'acétification se poursuit pendant six à sept jours à 30°C (**Reynes, 1997**).

I-2-Généralités sur le Vinaigre

I-2-1-Historique

Le vinaigre a été connu par la plupart des anciennes civilisations. Il est utilisé comme condiment, comme agent de conservation...etc. En 1968 **Pasteur** fut le premier à

démontrer que l'acide acétique provenait bien de l'oxydation de l'éthanol par des microorganismes (*Mycoderma aceti*). Et par la suite, **Hansen** a démontré en **1879** la présence de plusieurs espèces bactériennes fait l'oxydation de l'éthanol. En 1899, **Beijerinck** proposa le nom du genre *Acetobacter* (**Bourgeois et larpent, 1996**).

I-2-2-Définition du vinaigre

Le vinaigre est un liquide préparé à partir d'une matière appropriée contenant de l'amidon ou des sucres, selon le procédé biologique de la double fermentation alcoolique et acétique (**Cacqe, 2002**). La première fermentation est alcoolique où les sucres sont transformés en alcool et la seconde fermentation est acétique où l'alcool est transformé en acide acétique par les bactéries acétique (**Maldonado et al., 1975**). Les pluparts des vinaigres sont fabriqués à partir d'alcools divers mélangés à de l'eau (**Divie, 1989**). Tous les aliments susceptibles de produire une fermentation alcoolique peuvent servir à la fabrication du vinaigre (dattes, orange, bananes, riz, vin, etc....) (**solange, 2008**).

I-2-3-Principaux types de vinaigres

Les différences entre ces variétés (vinaigre) sont surtout liées à la matière première de départ, nous pouvons citer (**Bourgeois et larpent, 1996**).

I-2-3-1-Vinaigre du vin

Le vinaigre du vin est un produit constitué de solution aqueuse riche en acide acétique, et résulte d'une fermentation acétique spontanée ou imposée du vin (**Borraï, 1963**). Le vinaigre du vin est un vinaigre de couleur blanchâtre, jaunâtre ou rouge suivant la couleur du vin dont il provient. Il est d'une odeur agréable. L'odeur est d'autant plus développée lorsque le vinaigre est conservé longtemps en fût avant d'être livré à la consommation. La saveur est de fabrication acide et ne produit pas de sensation désagréable à la longue (**Clavet, 1912**).

I-2-3-2-Vinaigre de cidre et de Poiret

Il provient de l'acétification du cidre et du Poiret, de couleur jaunâtre. Ce vinaigre est riche en matière pectiques, la saveur est fortement acide (**Clavet, 1912**).

I-2-3-3-Le vinaigre de riz

Le vinaigre de riz produit en Asie est obtenu après saccharification de l'amidon de riz et fermentation alcoolique (**kuraiwa, 1977**). Suivant les pays, il peut se présenter sous différentes formes : de couleur rouge, piquant et aigre en chine, souvent blanc, moelleux, doux et parfumé aux Japon (**Grelon, 2005**).

I-2-3-4-Vinaigre de betteraves

On obtient en soumettant du jus de betteraves alcoolisé à l'acidification, on mélange d'habitude d'un égal volume de vinaigre d'alcool (Sbihi, 1996).

I-2-3-5-Vinaigre de malt

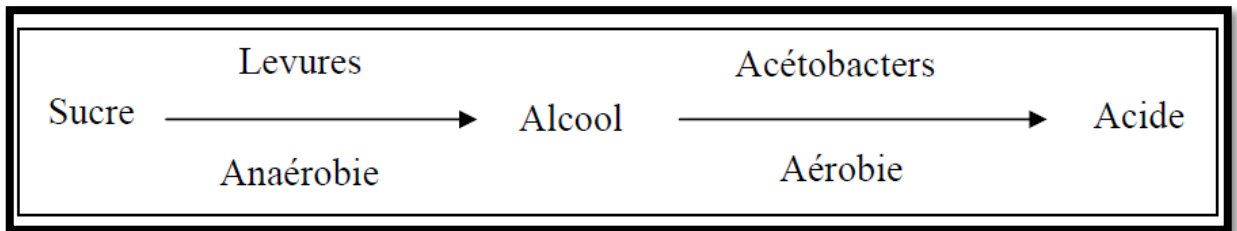
Le vinaigre de malt est le produit obtenu par la fermentation alcoolique et la fermentation acétique subséquente, sans distillation, d'une infusion de malt, d'orge, ou de céréale (Clavet, 1912).

I-2-3-6-Vinaigre balsamique

Le vinaigre balsamique est originaire de Modène. Il se fabrique à partir du moût de raisins sucrés d'un cépage, vendangé tardivement, ce qui lui offre plus de sucre et une saveur incomparable (Grelon, 2005 ; Plessi et al., 2006).

I-2-3-7-Vinaigre de datte

Les dattes peuvent être utilisées comme matière première de choix pour la production de vinaigre vue leur richesse en sucres.

**I-2-4 Technique d'élaboration de vinaigre traditionnel de datte**

C'est une technique artisanale qui confère au vinaigre élaboré des avantages organoleptiques et thérapeutiques que l'on ne retrouve pas chez le vinaigre industriel vendu dans le commerce (Arab et Guezoun, 2003).

Les principales dattes utilisées dans l'élaboration du vinaigre traditionnel de dattes demeurent le cultivar Harchaya, le cultivar Hamraya ou Tazeggart, le cultivar Tacharwit. Elles sont destinées essentiellement à l'alimentation du bétail et comme appoint alimentaire pendant les périodes de disette. Toutefois, le cultivar Déгла Beida, le cultivar Horra, le cultivar Deglet Nour, le cultivar Ghars est également utilisée en vinaigrerie traditionnelle de dattes (Ould El Hadj et al., 2001).

Le vinaigre traditionnel produit au niveau des régions sahariennes Algériennes est obtenu par la mise en fermentation de 1/3 de dattes pour 2/3 d'eau, auxquelles sont additionnées, selon les techniques du savoir-faire traditionnel, certaines substances : Blé, orge, coriandre, piment, sel de table, clous en fer, charbon et huile de table. La durée de fermentation est de 40 à 50 jours (Acourene et al., 2008; Ould El Hadj et al., 2001).

I-2-5-Processus de la fermentation**I-2-5-1-Conditions de fermentation**

Les bactéries acétique sont des acidophiles et tolèrent un pH de 3 à 4. Les acétobacters sont des bactéries aérobies strictes ou facultatives, donc l'oxygène est nécessaire pour oxyder l'éthanol en acide acétique. Les taux d'alcool sont compris entre 7 et 12°, car au-delà de 12° l'éthanol se transforme en gaz carbonique et eau. L'optimum de température pour l'aération se situe entre 30 et 32°C (**Maiorella, 1985**).

I-2-5-2-La fermentation alcoolique :

La fermentation alcoolique se déroule en milieu anaérobie. Elle est assurée par des levures du genre *Saccharomyces* qui sont présentes naturellement sur la datte. Elle est principalement basée sur la transformation des sucres, essentiellement glucose et fructose, qui pénètrent dans la cellule de la levure par diffusion facilitée et subissent une phosphorylation aboutissant à la fin de la fermentation à l'alcool éthylique, mais aussi sur la production de différents composé qui accompagnent cette production alcoolique, et jouant un rôle organoleptique majeur sur la qualité du produit (**Bourgeois et al., 1989 ; Larpent, 1991**).

I-2-5-3-La fermentation acétique

La fermentation acétique est un processus biochimique où l'éthanol est oxydé en acide acétique par le biais de bactéries acétiques dans des conditions stricts d'aérobioses, elle nécessite donc une très forte aération. Les bactéries acétiques n'interviennent que si la teneur en alcool est très faible, leur action peut être favorisée par l'intervention de levures qui oxydent l'éthanol et font donc baisser sa concentration (**Guiraud, 1998 ; Tesfaye et al., 2002**).

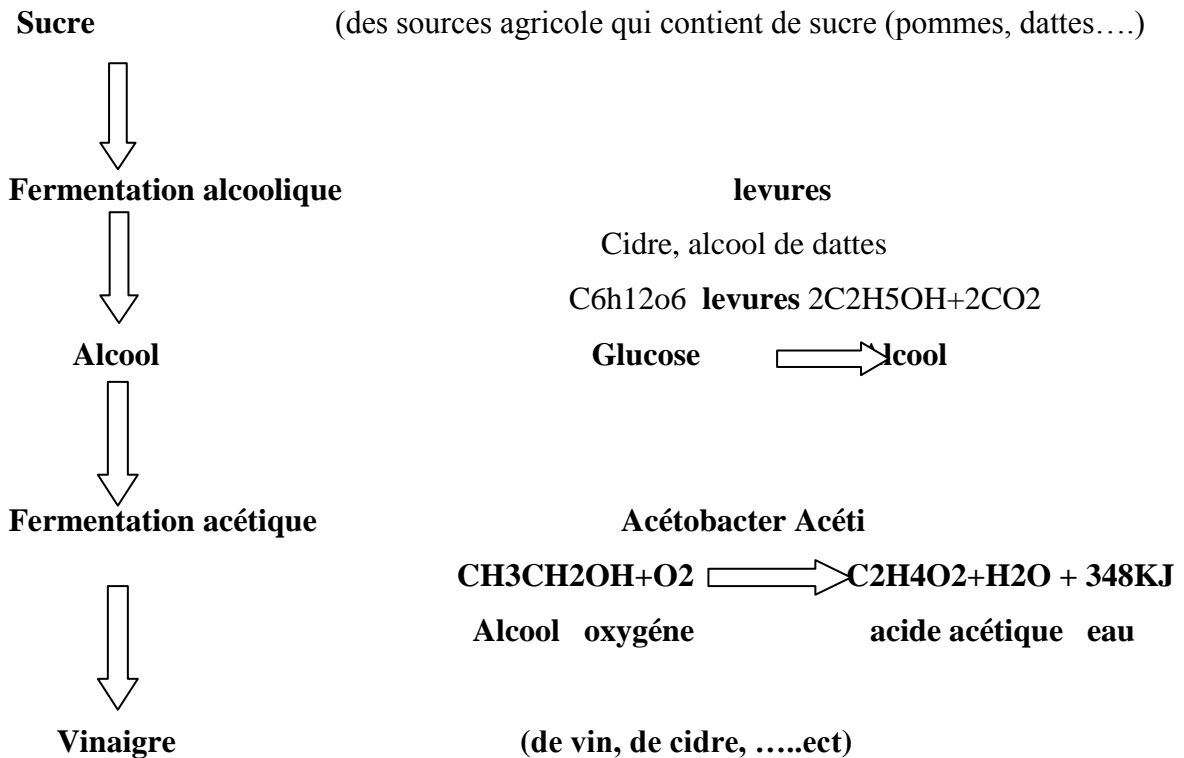


Figure n°04: Protocole expérimentale de fabrication de vinaigre (Brewdusud, 2004).

I-2-6-L'importance du vinaigre traditionnel

Le vinaigre à de multiples usages, il est utilisé comme condiment ou comme agent de conservation en raison de son acidité (Guiraud, 1998), conservation de la viande, des légumes, des fruits de saison des gâteaux et des épices (Boutageais et al., 1998). Donc, le vinaigre empêche l'oxydation des fruits et des légumes, il prolonge la durée de vie des aliments (Cacqe, 2002).

Le vinaigre est un produit thérapeutique, avant d'être condiment, c'est sans doute le premier antibiotique de tous temps (Arab et Guezzoun, 2003). Il est utilisé pour calme les douleurs d'estomac, il guérit la jaunisse, il est bon pour la rate, étanche la soif, il facilite la digestion,.....etc (Arab et Guezzoun, 2003).

I-2-7-Microbiologie de vinaigre

En 1998, Giraud dit que le vinaigre contient peu de microorganismes lorsqu'il est prélevé dans des bonnes conditions, il s'agit essentiellement des levures, des moisissures et des bactéries acétiques.

CHAPITRE II : GÉNÉRALITÉ
SUR LA FERMENTATION
ACÉTIQUE

Chapitre II: Généralité sur la fermentation acétique

II-1-Les bactéries acétiques

La taxonomie des bactéries acétique a beaucoup évolué depuis que l'on a recours aux méthodes moléculaires. En 1980, elle était simple, limitée à l'existence de deux genres *Acetobacter* et *Gluconobacter*. Le premier contenait des trois espèces *A. aceti*, *A. pasteurianus* et *A. peroxydans* ; le deuxième comprenait une seule espèce *G. oxydans*. Mais pour la plupart des espèces, des sous espèces étaient différenciées par des caractères phénotypique (**Aline et al., 2010**).

Les bactéries acétique constituent sont de gram négatif à métabolisme oxydatif, asporulés (**Aline et al., 2010**). Tous les membres de la famille des *Acétobactéraceae* sont strictement aérobies et leur métabolisme est strictement respiratoire ou l'oxygène est l'accepteur final d'électron. Leurs implications dans la fermentation acétique ont été mises en évidence par Pasteur en 1868. Les genres *Acétobacters* oxydent plus l'éthanol que le glucose, par contre les genres de *Gluconobacter* on plus d'affinité au glucose que pour l'éthanol. Le genre *Gluconobacter* qui s'arrête à l'acide acétique lors de l'oxydation de l'éthanol, le genre *Acétobacter* peut poursuivre l'oxydation jusqu'au stade CO₂ et H₂O quand la concentration en éthanol s'appauvrit (**Tesfaye et al., 2002; Branger, 2008**).

Les bactéries acétiques sont des procaryotes hétérotrophes et chimio-organotrophes (**Tekkouk, 1997**).

II-2-origine

En 1982 **Michael et Pleczar**, dit que les bactéries acétiques sont très répandues dans la nature sur les fruits et les légumes. C'est leur habitat naturel (**Tekkouk, 1997**).

Les bactéries acétiques sont isolées de végétaux en fermentation alcoolique (**Prevot, 1961**), dans les jus de vinaigre et les boissons alcoolique (**Michal et Pleczar, 1982**).

II-3-Classification

Plusieurs classifications de ces bactéries ont été proposées par **Hansen** en 1878, faisant appel à de nombreux caractères. La plus récente tient compte de leur faculté d'oxyder CH₃COOH en CO₂ et H₂O ou lactate de calcium, de leur pouvoir cétogène, de leur faculté de produire de l'acide gluconique aux dépens du glucose, et aussi de la présence de catalase, et de certains caractères cultureux (température optimales, formation de pigments, de voiles utilisable possible de sels ammoniacaux comme seul source d'azoteetc) (**Lambin et German, 1969**).

En 1957, **Bergy's** manuel de classification dans la 8^{ème} édition dit que les genres *Gluconobacter*, *Acetomonas* et *Acetobacter* entrent dans la famille des *Pseudomonaceae* et

dans la tribu des *pseudomonadae*. Les bactéries acétiques sont classées en quatre groupes (Glazy, 1980).

- Groupe suboxydans : représente par *Gluconobacter suboxydans*.
- Groupe mesoxydans : représente par *Acétobacter aceti*.
- Groupe oxydans : représente par *Acétobacter pasterianus*.
- Groupe peroxydans : représente par *Acétobacter pyroxydans* (Belkacem, 1987).

II-4-Facteur de croissances des bactéries acétiques

II-4-1-L'acide acétique

L'acide acétique était activateur de la croissance des acétobacter jusqu'à la valeur de 2° (Bourgeois et Larpent, 1996).

II-4-2-Oxygène

La fermentation acétique était réalisable avec une bonne performance en milieu liquide bien aéré. La formation d'un gramme d'acide acétique nécessite tout l'oxygène contenu dans deux litres d'air et l'arrêt d'oxygénation entraîne la destruction des cellules. Cependant à des teneurs élevées l'oxygène entraîne une oxydation de l'acide acétique (Poxixoo, 2003 ; Belkacem, 1987).

II-4-3-Température et pH

La température optimale de croissance des bactéries acétique se situe aux environs de 30°C, elle augmente la rapidité de l'acétification avec laquelle se déroule la réaction (Kersters et al., 2006 ; Poxixoo, 2003). De grands systèmes de refroidissement sont utilisés dans les bio-fermenteurs pour maintenir les températures optimales de vie des bactéries acétiques dans la fabrication de vinaigre (Mounir et al., 2016).

Et leur pH optimum de croissance est situé entre 5,4 et 6,3 (Kersters et al., 2006).

II-4-4-Concentration d'éthanol

La concentration d'éthanol est entre 10 et 13%, lorsque la concentration est supérieure à 14%(v/v) l'éthanol est oxydé difficilement et incomplètement et lorsque la concentration d'éthanol est inférieure à 7%(v/v) l'acide acétique formé est oxydé en CO₂ et H₂O (Belkacem, 1987 ; Follman, 1983 ; Boughnou, 1988).

II-4-5-Lumières

La lumière diffuse ne permet qu'une fermentation acétique très lente, elle est la plus active à l'obscurité. Les rayons ultra-violetts sont nocifs (Duculot, 1932).

II-5-Caractères généraux des bactéries acétiques

II-5-1-Caractères cultureux

Les colonies d'acétobacter sont blanches, jaunes, irrégulières sur le milieu solide de Frateur (**Ouled El Hadj, 2001**), certaines espèces sont pigmentées et produisent parfois de la cellulose et des polysaccharides (**Bourgeois et Larpent, 1996**).

II-5-2-Caractères morphologiques et structuraux

Les bactéries acétiques se présentent au microscope sous forme de petits bâtonnets, souvent groupées et parfois en chainettes. Leur taille varie de 0,5 à 1 μm de large et 2 à 3 μm de long. Les formes d'involution sont fréquentes (**Bourgeois et Larpent, 1990**). Elles ont des formes bacillaires, quelquefois ellipsoïdales, il existe des espèces immobiles, et d'autres mobiles avec un cil polaire. Elles croissent bien en général sur autolysat ou extrait de levure additionné d'éthanol et d'autres substances oxydables (**Prevot, 1961**) (Figure n°05).

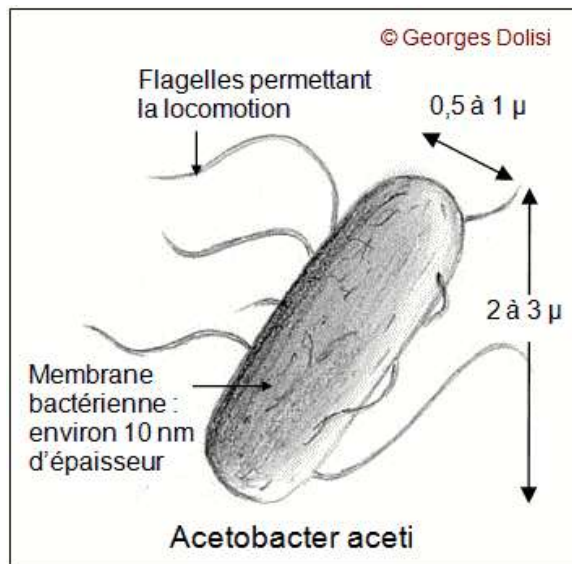


Figure n°05 : Morphologie d'*Acetobacter aceti* ([http : www.vulgaris-medical.com/upload/visuel-Acetobacter](http://www.vulgaris-medical.com/upload/visuel-Acetobacter)).

II-6-Caractères biochimiques

II-6-1-Transformation de l'alcool en acide acétique

Tous les espèces de la tribu d'*Acetobacter*, oxydent l'alcool en acide acétique, mais les espèces *A. peroxydans*, *A. oxydans* et *A. mesoxydans* sont capables d'oxyder l'acide acétique produit et de le transformer en gaz carbonique et eau (**Girad et Rougieux, 1958**).

II-6-2-Réaction de la catalase

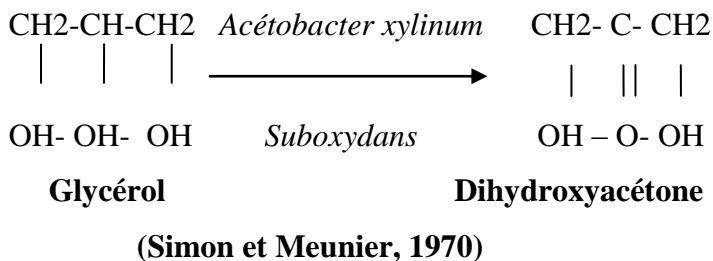
La présence de la catalase dans le microorganisme permet la décomposition de l'eau oxygénée produit à la fin de la chaîne oxydoréduction. Seules les espèces du groupe

peroxydants sont catalase négatives, ces espèces comptent parmi les seules aérobies catalase négatives (**Girad et Rougieux, 1958**).

II-6-3-Pouvoir cétoène

Ce pouvoir se caractérise par la propriété de transformer la fonction alcool secondaire en fonction cétone, du fait de cette propriété les acétobacters sont utilisés industriellement pour produire des acides cétoniques comme l'acide ascorbique (vitamine C) (**Girad et Rougieux, 1958**).

Le pouvoir cétoène se rencontre chez les espèces des groupes mesoxydants et suboxydants. C'est à partir de glycérol qu'il y a production de dihydroxyacétone par *Acétobacter xylinum*, *Acétobacter suboxydants* suivant la réaction (**Girad et Rougieux, 1958**).

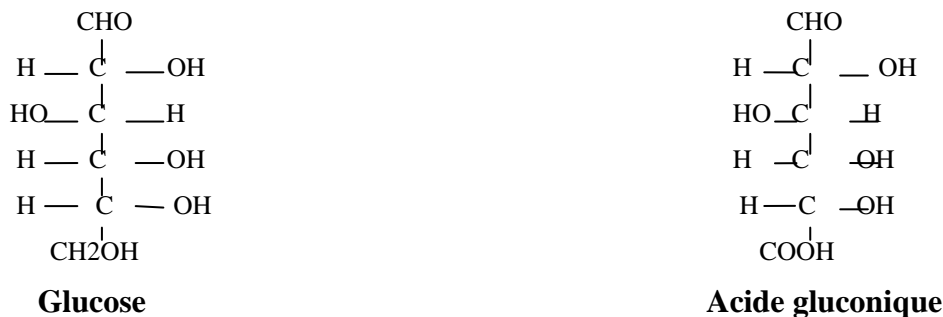


La production d'acide 5-cétogluconique aux dépens de glucose, par *Acétobacter suboxydants*.

Glucose $\xrightarrow{\text{Acetobacter suboxydants}}$ Acide 5-cetogluconique (**Simon et Meunier, 1970**).

II-6-4-Transformation du glucose en acide gluconique

Cette propriété appartient à toutes les espèces d'*Acetobacter*, sauf à celles du groupe peroxydants et *Acétobacter ascendens* du groupe oxydants (**Girad et Rougieux, 1958**), selon l'équation suivante :



(Simon et Meunier, 1970).

Tableau n° I : Les caractères biochimiques de quelques groupes d'acétobacters. (Girad et Rougieux, 1958).

Groupes	Catalase	Oxydation de l'acide acétique	Oxydation des lactates de calcium	Formation d'acide gluconique	Pouvoir cétoènes
Peroxydans	-	+	+	-	-
Oxydans	+	+	+	+	-
Mesoxydans	+	+	+	+	+
Suboxydans	+	+	+	+	+

II-7-Caractère physiologique

L'Acétobacter est dit sur-oxydateur, car il peut oxyder l'acide acétique jusqu'au dioxyde de carbone par son cycle complet des acides tricarboxylique (Gerom et al., 2002).

Certaines souches d'acétobacters forment des micro-fibrilles extracellulaires de cellulose qui entoure la masse des bactéries en division. La cellulose est formée de manière interne et sécrétée à travers des pores située dans l'enveloppe externe lipopolysaccharidique (Gerom et al., 2002).

Des cellules non proliférant des bactéries peuvent synthétiser la cellulose en anaérobiose à partir de mannitol de fructose et de glucose (Lambin et German, 1969).

La résistance des bactéries à l'acide acétique et leur acidiphilie, reste encore inexpliquée. On peut penser que la membrane de ces bactéries riche en acide gras saturés reste relativement imperméable à cet acide qui se trouve sous forme non dissociée dans les conditions industrielles (Bourgeois et Larpent, 1990).

La protection des bactéries contre l'acide acétique du milieu est vraisemblablement due à un système membranaire énergétique, couplé au métabolisme de l'éthanol, car l'arrêt de l'oxygénation et l'absence d'éthanol, entraine la mort des cellules (Bourgeois et Larpent, 1996).

II-8-Besoins nutritionnels

La majorité des souches d'acétobacter sont auxotrophes pour quelques vitamines, notamment l'acide para-amino-benzaoïque, la thiamine et l'acide pantothéique, leur croissance nécessite l'extrait de levures. Les besoins nutritionnel des bactéries acétiques dépendent étroitement de la source de carbone, elles peuvent utiliser l'ammonuim comme source d'azote, l'acide α -cétoglutarique et l'acide aspartique paraissent particulièrement efficaces. Les bactéries réalisant la fermentation acétique des vinaigres d'alcools sont

susceptibles de se développer sur un milieu minéral à deux sources de carbone, le glucose et l'éthanol mais sur les substrats utilisées dans l'industrie (**Bourgeois et Larpent, 1996**). Dans tous les cas, les concentrations cellulaires restent faibles (**Divies, 1970**).

II-9-Métabolisme

La particularité des bactéries acétiques est d'oxyder une grande variété de substrats et accumuler quasi intégralement les produits dans le milieu, les bactéries acétiques possèdent des déshydrogénases très actives situées sur leurs systèmes membranaires et intimement couplées à la chaîne cytochromique (**Mastsushita et al., 1985 ; Bourgeois et Larpent, 1996**).

A côté des enzymes membranaires, les bactéries acétiques possèdent des éthanol et acétaldéhyde déshydrogénases solubles liées au NAD et au NADP (**Kerstens et al., 2006 ; Bourgoi et Larpent, 1996**).

De nombreux sucres peuvent être oxydés directement. Le glucose est oxydé en acide gluconique, il peut aussi après phosphorylation être entièrement oxydé en CO₂ et H₂O (**Huge et al., 1955**). La capacité céto-gène à partir du glucose est très différente selon les souches (**Stadler-Szoke et Coll, 1980**). On peut retrouver à côté de l'acide gluconique l'acide 2-céto-gluconique, l'acide 5-céto-gluconique et l'acide 2-5-céto-gluconique (**Bourgoi et Larpent, 1996**).

Les bactéries du genre *Acetobacter* (**Divies, 1972**) oxydent l'éthanol en acide acétique et ensuite oxydent l'acétate lorsque l'éthanol a disparu du milieu de culture. L'éthanol inhibe et réprime les enzymes d'oxydation de l'acétate, l'acide acétique inhibe sa propre oxydation pour des concentrations supérieures à 08° et inférieure à 3° (**Bourgeois et Larpent, 1990**).

II-10-Mécanisme biochimique de formation d'acide acétique

Le mécanisme est de type oxydatif ou la présence d'oxygène est obligatoire, l'oxydation de l'éthanol fait intervenir trois enzymes il s'agit de l'alcool cytochrome 533 réductases (E₁) ; de la coenzyme indépendante déshydrogénase (E₂) et de la NADP dépendante déshydrogénase (E₃) (**Chose et Bhadra, 1985 cites in Bounou, 1988**) (**Figure n°06**)

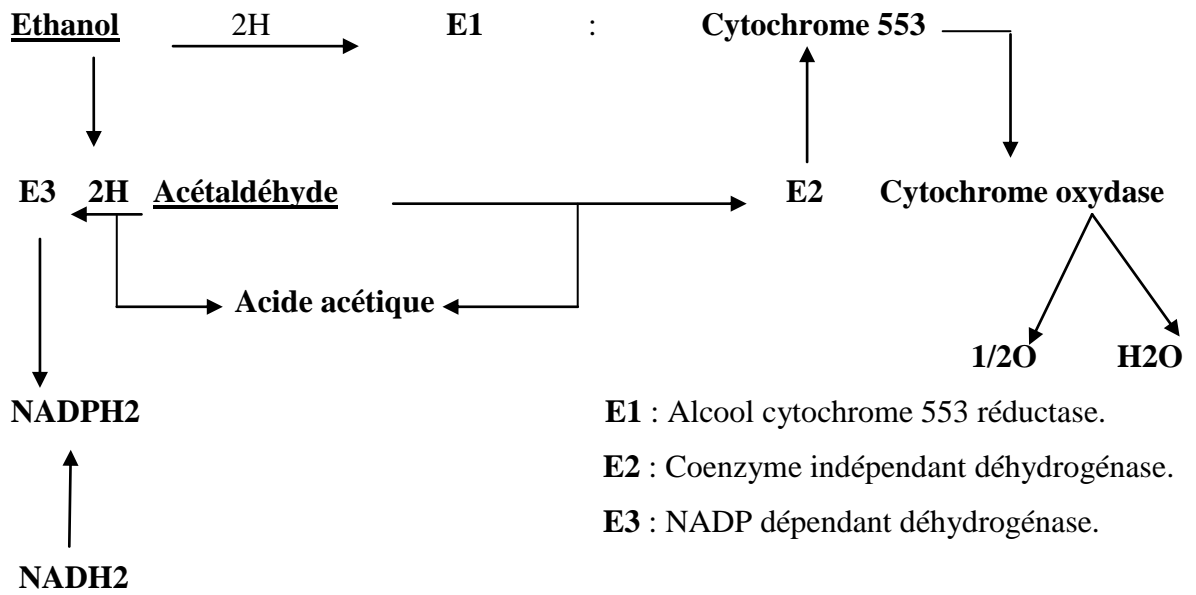


Figure n°06: L'oxydation de l'éthanol par les bactéries acétiques (Bougnou, 1988).

CHAPITRE III :
MÉTHODOLOGIE DE
TRAVAIL

Chapitre III : Méthodologie de travail**III-1-Présentation et la région d'étude**

Le Sahara septentrional est le plus grands déserts du monde (**Castany, 1987**), Au Sahara, la culture dominante est palmier dattier, l'oasis est avant tout une palmeraie, entre ces palmiers dattier on trouve les arbres fruitiers.

La wilaya de Ouargla est situe au sud-est d'Alger d'une distance de 800 km de capital.

Elle est limité au :

Nord-Est par la wilaya d'El-oued.

Nord-Ouest par la wilaya de Djelfa et Ghardaïa.

Sud-Ouest par la wilaya d'Illizi. (**Anonyme, 2006**).

III-2-Choix des zones d'étude

En tenir compte du cultivar de datte, le choix de la zone d'étude a porté sur la localité d'Ouargla. Elles représentent la zone phoenicioles par excellence. Les habitudes alimentaires, et les traditions sont basées essentiellement sur les dattes, et les sous produits de dattes et du palmier dattiers (**Aboulala, 2008**).

III-3-Echantillonnage

Les échantillons de vinaigre traditionnel de dattes sont récoltés, dans des bouteilles en verre stériles de 250 ml par cultivar de datte. Les flacons sont entreposés à la température ambiante

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

III-4-L'objectif de travail

L'objectif de notre travail est la recherche, l'isolement et pré-identification de quelques souches des bactéries acétique provenant de vinaigre traditionnel de type saharienne des populations de la localité de Ouargla, produit à partir des de dattes Hamraya. Une étude de la tolérance de ces bactéries acétiques isolées aux hautes températures élevées est ensuite réalisée, pour la sélection des souches thermo-tolérantes qui pourront avoir un caractère industriel.

III-5-Matériel d'étude

III-5-1-Matériel végétal

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

Nous avons utilisé au cours de nos essais la datte Hamraya (Tazagart). Ces dattes sont classées comme sous produit du palmier dattier à cause de leur valeur marchande.

III-5-2-Matériel biologique

Le micro-organisme mis en jeu pour la production traditionnelle du vinaigre est une multitude de la flore bactérienne. Il s'agit les bactéries acétiques présentes naturellement dans le substrat de la fermentation.

III-5-3-Vinaigre traditionnel de dattes

Cette production du vinaigre est une tradition ancestrale utilisant un matériel artisanal qui confère au vinaigre élaboré des avantages que l'on ne retrouve pas chez le vinaigre industriel. (Ouled El Hadj et al., 2001), Selon la méthode suivant:

Après parage, triage et lavage des dattes, à une mesure de datte est ajoutée deux mesures d'eau du robinet.

Au mélange ainsi obtenu, est additionné selon les habitudes traditionnelles des zones de production divers produits en faible proportion, parmi lesquels : grain de blé (7 grains), grains d'orge (7 grains), harmel (7 grains), coriandre (7 grains), quelques pincées de piment, quelques pincées de sel de table, un ou deux clous en fer en fonction de la quantité du produit... Le mélange est mis en fermentation durant quarante à cinquante jours à la température ambiante, dans une gargoulette ou jarre bouchée avec du gypse ou avec du lif de palmier, laissant un microtron d'aération. Ce temps écoulé, la jarre ou le récipient est débouché. Il est procédé au tamisage. Le produit ainsi obtenu est le vinaigre traditionnel (Ouled El hadj et al., 2001).

Toutefois, malgré les avantage dont bénéficie ce vinaigre, le temps de production est très long (Ouled El Hadj et al., 2001).

III-6-Matériel de laboratoire

Les verriers et matériels en plastiques utilisée pour la présente d'étude se compose de :

Erlenmeyer ,1000ml	Préparation des milieux des cultures
Eprouvette	Titration
Boite de pétri (100 Boite)	Écoulements des milieux des cultures
Pipette pasteur	Isollements des germes
Flacons des 250ml	Des milieux des cultures
Pipette graduée	Préparation des milieux des cultures et titration
Tubes à essai stériles	Réalisation des dilutions + les milieux des cultures
Tubes à éppendorf	Centrifugation et pour conservation des souches

III-7-Milieux de culture

L'isolement des bactéries acétiques en vue de leur identification ou de leur numération peut donc demander l'emploi de milieu sélectif doté de propriétés antibactérienne et si possible antifongique. Le milieu de culture de base pour les bactéries acétiques est un milieu liquide glucose contenant du CaCO₃ (bouillon pour les bactéries acétiques). Pour un isolement sélectif, il est préférable d'utiliser un milieu à l'éthanol du type de ceux décrite pour différencier les *Acétobacter* des *Gluconbacter* et qui permettant a la fois un isolement et une différenciation : le milieu gélose de Carr, ou milieu gélose de Frateur (Guiraud, 2003).

III-7-1-Méthode de dilution

A partir de vinaigre de datte traditionnelle (solution mère) on fait la méthode de dilution décimale successive, où on prélève aseptiquement 1 ml de la suspension mère à l'aide d'une pipette graduée stérile de 1 ml munie d'une poire à aspiration, l'homogénéisation du prélèvement se fait par aspiration refoulement trois fois, transférer aseptiquement le 1 ml prélevé dans le premier tube 10⁻¹, la pipette ne devant pas pénétrer dans les 09 ml de diluant.

A l'aide d'une deuxième pipette stérile de 01 ml procéder de même du tube 10⁻¹ au tube 10⁻² et faire de même pour le dernies tubes 10⁻³, en utilisant à chaque prélèvement une pipette nouvelle stérile (Guiraud, 1998).

III-7-2-Techniques d'isolement

La technique d'isolement consiste à prélever 0,2 ml de solution mère et 0,1 ml des dilutions (10^{-1} à 10^{-3}) à l'aide d'une pipette Pasteur stérile pour l'étalement.

Les boîtes sont incubées à 30°C pendant 48 heures (Aboulala, 2008).

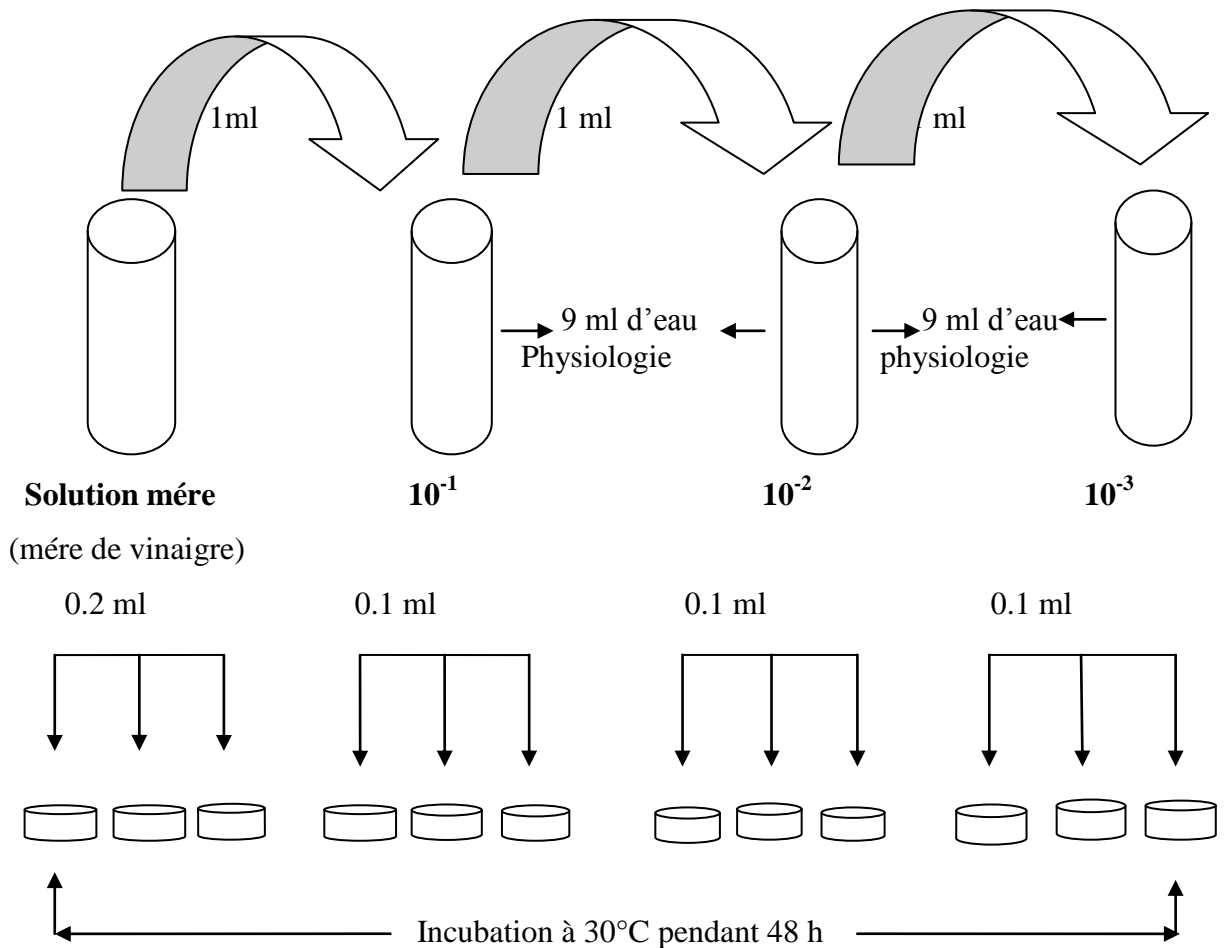


Figure n° 07 : Isolement sur milieu frateur à partir de la solution mère et les dilutions décimales jusqu'à 10^{-3} .

III-7-3-Prélèvement des colonies isolées

On prélève les colonies apparaissant morphologiquement différentes. Sur le milieu d'isolement (milieu Frateur), et par étalement régulier, les prélèvements s'effectuent, prenant tout les colonies isolées, et les colonies apparaissant morphologiquement différents sur les autres. Il nécessaires de prélever au hasard plusieurs colonies d'un même type pour vérifier l'homogénéité (Guiraud, 2003).

III-7-4-Purification des souches

Pour assurer la purification des souches, on fait plusieurs isolements successifs sur milieu Frateur. Les colonies apparues dans le dernier isolement sont mises en tube à gélose incliné. La vérification de la pureté de la souche s'effectue par plusieurs repiquages du tube incliné au milieu solide sur des boîtes de Pétri.

Après l'incubation, l'observation des caractères culturels permet de designer la pureté des souches c'est-à-dire la présence d'un ou plusieurs organismes.

Si l'on constate la présence de plusieurs souches, il faut les séparer par d'autres repiquages.

L'examen microscopique est réalisé à partir des colonies isolées sur milieu de culture (Guiraud, 2003).

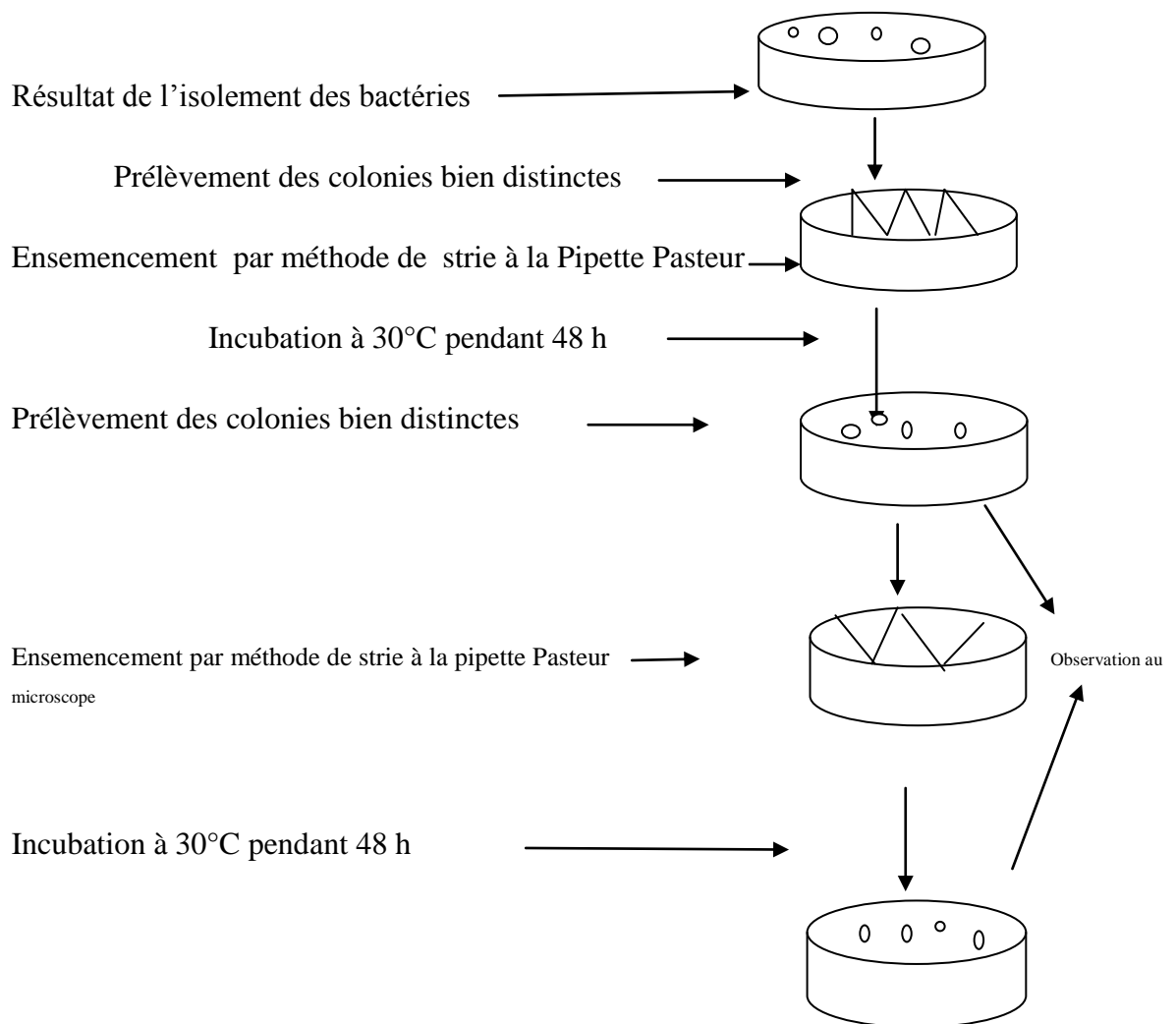


Figure n°08 : Purification des souches d'acétobacter

III-7-5-Préparations microscopiques

Aux préparations microscopiques on parle de la suspension bactérienne.

III-7-5-1-Préparations d'une suspension bactérienne

On met stérilement de l'eau physiologique dans des tube a essai, puis on prélevé les colonies pures et les mettre en suspension, si la suspension est trop trouble, ajuster l'opacité en ajoutant de l'eau physiologique (**Guiraud, 2003**).

III-7-5-2-Réalisation des examens microscopiques

Elles sont effectuées sur des lames de verre ordinaire (76×26×1,2 mm) propre, les préparations microscopiques utilisées sont de deux types : Etat frais et frottis (**Aboulala, 2008**).

III-7-5-2-1-Etat frais

Une goutte de suspension bactérienne est déposer au centre de la lame, la manipulation s'effectue de manière aseptique, la lame est placée près du bec Bunsen pour observé les cellules vivante (**Guiraud, 2003**).

III-7-5-2-2-Frottis

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

Pour cette étape, sur une lame on dépose une goutte d'eau stérile, puis ajouter à l'aide d'une anse de platine stérilisée une goutte des colonies isolées qu'il faut étaler et fixer à la chaleur à environ 40°C pendant 10 à 15minutes (**Guiraud, 2003**).

III-7-5-2-3-Coloration à l'état frais

Elle nécessite l'utilisation de colorants vitaux : rouge neutre, bleu de méthylène vert janus, une goutte de colorant est mélangée à la goutte de suspension entre lame et lamelle (**Guiraud, 2003**).

III-7-5-2-4-Coloration des frottis

C'est la coloration de Gram, ce fait selon les étapes suivant :

- ✓ Coloration par le violet de gentiane, en laissant agir durant 30 secondes à 1 minute ;
- ✓ Rincer à l'eau déminéralisées, puis on recouvre les lames par le lugol (solution d'iode iodo-iodurée) par étalement du lugol et laisser agir 20 secondes ;
- ✓ Rincer à l'eau déminéralisées ;

- ✓ On peut réaliser une deuxième fois l'opération identiquement pour plus de sécurité.
- ✓ Décoloration (rapide) à l'alcool : verser à goutte l'alcool ou un mélange alcool-acétone sur la lame inclinée obliquement (5 à 10 secondes) ;
- ✓ Rincer sous un filet d'eau déminéralisée ;
- ✓ Recoloration à la fuchsine, il faut laisser agir de 30 secondes à 1 minute.
- ✓ Laver doucement à l'eau déminéralisée ;
- ✓ Sécher la lame sur bec Bunsen à 40°C, 10 à 15 minutes.
- ✓ Observer avec une goutte d'huile à immersion objectif 100 (grossissement x1000) (**Guiraud, 2003**).

III-7-6-Conservation des souches isolées

III-7-6-1-Conservation des souches isolées à quelques semaines

La conservation se fait dans des tubes de gélose inclinée (milieu de Frateur) (**Bougnou, 1988**), selon la méthode suivante :

- 1-A l'aide d'une pipette Pasteur, prélever la colonie suspecte isolée ;
- 2-Ensemencer l'inoculum sur milieu Frateur incliné ;
- 3-Incuber le milieu ensemencé à 30°C pendant 48h ;
- 4-conserver la culture à 4°C. (**Guiraud, 2003**).

III-7-6-2-Conservation des souches isolées à longue durée :

Premièrement les bactéries acétiques isolées sont centrifugées deux fois avec l'eau physiologique puis ensemencées dans des tubes épendorf contenant milieu de Frateur liquide, avec le 15% de glycérol, pour amorcer la croissance des germes et enfin placés entreposés à -4°C, ils étaient conservés une année (**Vincent, 1970**).

III-7-7-Identification des souches isolées

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

III-7-7-1-Etude des caractères cultureux

Il s'agit de noter l'aspect des cultures en milieu solide gélosé de Frateur. Les cultures sont incubées à 30° C pendant 48 heures (**Tekkouk, 1997**). On notera la forme, la taille et la couleur des colonies (**Bourgeois et Leveau, 1980**).

III-7-7-2-Etudes des caractères morphologiques

Cette étude s'effectue par examen microscopique. Elle permet d'observer la morphologie des cellules, leur taille, le mode de multiplication, leur mode de groupement et des caractères structuraux (mobilité) (Guiraud, 2003)

L'examen microscopique comprend, un examen à l'état frais et un examen après coloration sur frottis fixé (Bourgeois et Leveau, 1980).

III-7-7-3-Etudes des caractères physiologiques et biochimiques

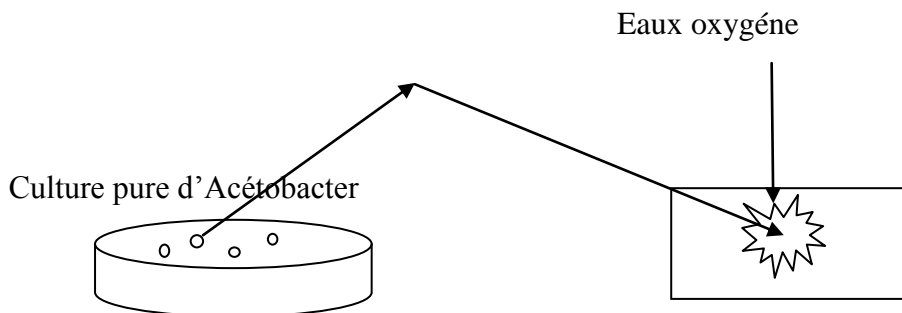
On étudier les caractères physiologique suivant :

III-7-7-3-1-Test de pouvoir suroxydant

Le pouvoir suroxydant est mis en évidence sur milieu de Carr. Le virage au jaune du vert de bromocrésol pour le genre *Gluconbacter*, et le virage au jaune puis réversion au bleu –vert du vert de bromocrésol pour le genre *Acétobacter*. Il doit être vérifié par culture sur le milieu gélosé au lactate de calcium. Ce milieu est réparti en boîtes de pétri et ensemencé par touche. La production de CO₂ et donc le pouvoir suroxydant se traduisent par une précipitation de carbonate de calcium autour des colonies après 48 heures d'incubation entre 28°C et 30 ° C. La zone claire indique la présence du genre *Gluconbacter* et la zone claire plus une précipitation marginale note la présence du genre *Acétobacter* (Guiraud, 1998).

III-7-7-3-2-Test de catalase

La catalase permet la dégradation de l'eau oxygénée qui résulte de l'oxydation, par l'oxygène de l'air. Une goutte d'eau oxygénée est placée sur une lame et un peu de culture en milieu solide y est repartie, un dégagement gazeux abondant sous forme de mousse ou de bulles traduit la décomposition de l'eau oxygénée sous l'action de la catalase selon la réaction suivant :

$$\text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow \text{H}_2\text{O} + \frac{1}{2} \text{O}_2 \text{ (Guiraud, 1998).}$$


S'il y a formation de bulle d'air, la bactérie possède la catalase dont catalase positive (cat⁺), au cas contraire c'est-à-dire pas formation de bulle observables, la bactérie ne possède pas l'enzyme donc elle est catalase négative (cat⁻) (**Guiraud, 2003**).

Cependant, il ne faut pas utiliser d'anse de platine, car elle réagit avec H₂O₂ et donne un faux positif. Il est déconseillé de faire ce test à partir d'un bouillon de culture ensemencé, car le résultat est moins net. En cas de doute sur le résultat, refaire avec une plus grosse colonie (**Guiraud, 2003**).

III-7-7-3-3-Pouvoir cétoène

Certaines bactéries acétiques peuvent transformer le glycérol en dihydroxyacétone, qui peut être mise en évidence par la liqueur de Fehling. Un milieu gélosé au glycérol est couler en boîte de pétri et ensemencé par touches. Après 48 heures 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, 1998**).

III-7-7-3-4-Culture en présences d'ammonium comme seule source d'azote et de 3% d'éthanol

La culture est réalisée, en utilisant le milieu liquide de Hoyer-Frateur. L'incubation se fait avec une faible quantité de bactéries, une à trois gouttes de suspension bactériennes. Le milieu est incubé à 30° C, pendant une période allant de 2 à 14 jours. Le développement s'est traduit par la formation d'une membrane de couleur blanche et est comparé à celui d'un milieu témoin sans ammonium (**Guiraud, 1998**).

III-7-7-3-5-Présence d'un pigment sur le milieu d'isolement

Certaines souches de bactéries acétiques possèdent un pigment rose ou brun. Pour mettre en évidence cette pigmentation on utilisé un milieu glucose carbonate solide ; les souches sont ensemencées est incubées à 30° C, pendant 48 heures. On note la présence ou l'absence de pigmentation (**Guiraud, 2003**).

III-7-7-3-6-Formation d'acide gluconique à partir du glucose

Elle est mise en évidence sur le milieu de culture de base (glucosé carbonaté) pour les bactéries acétique qui contient du glucose et de carbonate de calcium. La production d'acide gluconique se traduise après 48 heures d'incubation à une température de 30° C par clarification du milieu autour des colonies (**Guiraud, 2003**).

III-7-7-3-7-Formation d'acide céto gluconique :

Le test de formation d'acide céto gluconique à partir de glucose par des bactéries acétiques se réalise en utilisant le milieu de Haynes. Après l'ensemencement des souches dans les tubes, on les incube à une température de 30° C pendant 48 heures. La révélation se fait à l'aide du réactif de Bénédict avec 10 minutes de chauffage au bain- Marie à 100°C. Il apparaît un précipité rouge orangé (**Guiraud, 2003**).

III-7-7-3-8-Production de cellulose :

Elle est mise en évidence sur le bouillon pour les bactéries acétiques est incubé à une température de 30° C pendant 48 heures. Il ya une formation d'un Pellicule à la surface du milieu, est prélevée et placée dans une capsule ou sur une lame et recouvert de réactif iodé (Iugol) puis l'acide sulfurique à 60% (**Guiraud, 2003**). Le développement des fibres d'une couleur bleue signifie une production de cellulose (**Gibbs et Shapton, 1968**).

III-8- Etude de la tolérance des bactéries acétiques aux températures élève :

La thermo-tolérance des souches isolées a été réalisé dans des milieux liquide de Frateur (50ml), ensemencé et incubé aux différentes températures ; 30°C, 35°C, 40°C, 45°C, 50°C, 55°C et 60°C. Toutes les cultures sont comparées avec une culture blanc (50 ml). Les flacons ont été inoculés avec des colonies jeunes de 48 h d'incubation à 30C° puis incubées simultanément séparément à des températures différentes. La quantité totale de biomasse produite a été déterminée en mesurant l'absorbance de la culture sur un spectrophotomètre à 600 nm (DO mesuré par Spectrophotomètre) pour tous les échantillons (**Mounir et al., 2016**).

***CHAPITRE IV : RÉSULTATS
ET DISCUSSION***

Chapitre IV : Résultats et discussion

IV-1-Isolement et pré-identification

Les résultats des isolements des bactéries acétiques en se basant sur les critères culturels obtenus sur milieu Frateur, à partir des échantillons du vinaigre traditionnel des dattes des cultivars de Hamraya (EVHN°1 et EVHN°2), récoltés dans la cuvette de Ouargla, sont présentés dans le tableau II.

Tableau II: Caractères culturels des colonies obtenues après isolement sur milieu Frateur.

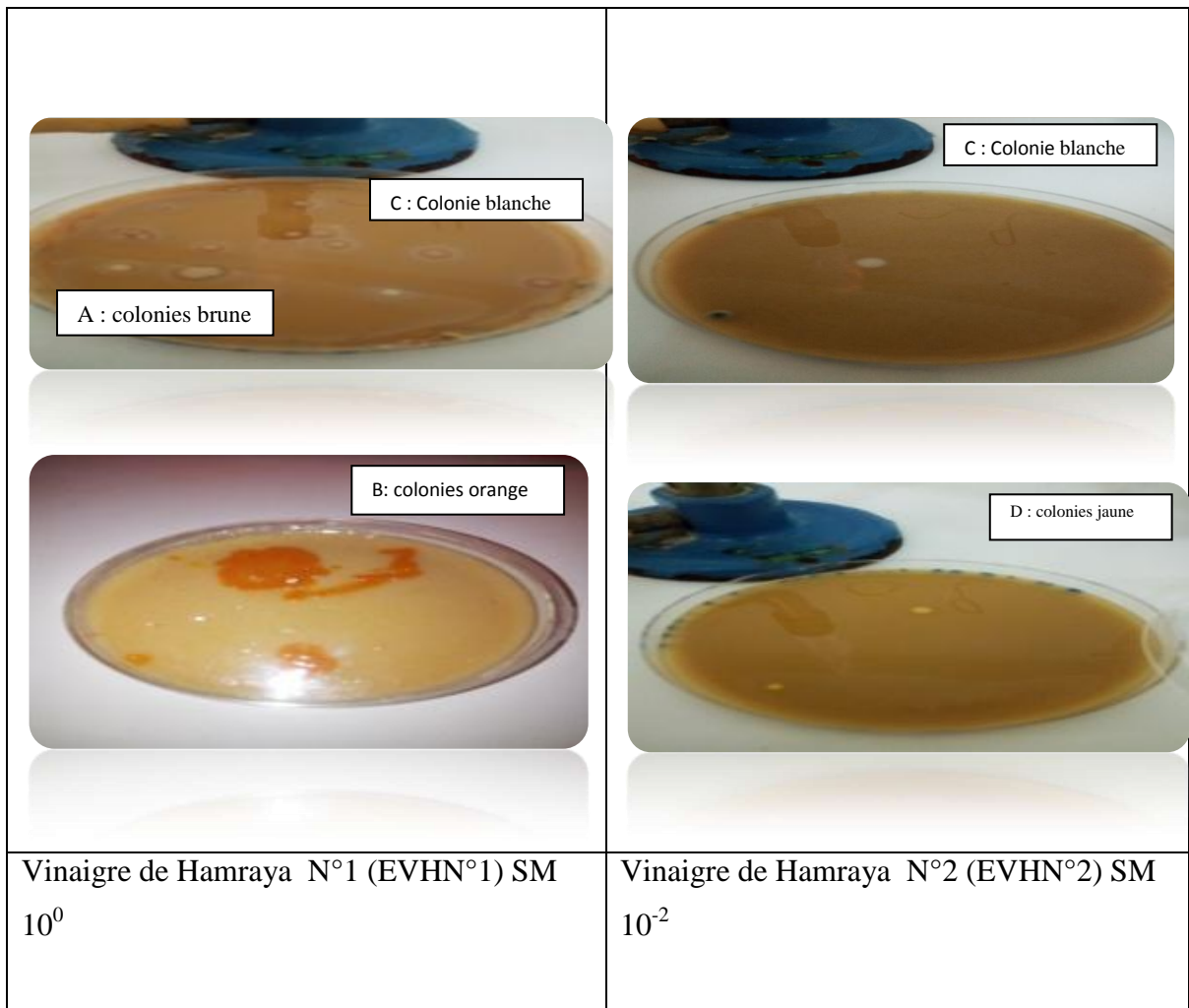
Provenance	Echantillon	Critères culturels des colonies			
		Forme	Couleur	Aspect	Taille
Ouargla	Vinaigre de Hamraya N°1 (EVHN°2)	Ronde irrégulière	Brune	Lisse	Moyenne
		Ronde irrégulière	Orange	Lisse	Moyenne
		Ronde irrégulière	Blanchâtre	Lisse	Moyenne
	Vinaigre de Hamraya N°2 (EVHN°2)	Ronde régulière	Jaunâtre	Lisse	Petite
		Ronde irrégulière	Blanchâtre	Lisse	Moyenne

À l'issue des résultats de culture des échantillons de vinaigre cultivar Hamraya N°1 et N° 2 sur le milieu sélectif Frateur, des colonies avec différents critères culturels sont obtenues, ces critères ont varié pour les colonies d'un même échantillon et pour celles provenant des deux types d'échantillons.

Les colonies cultivées sur milieu solides présentent deux types de formes et de taille, ronde à contour régulier ayant une petite taille et ronde à contour irrégulier avec une taille moyenne. Toutes les colonies obtenues ont le même aspect « lisse ». Pour ce qui est de la couleur de ces colonies quatre couleurs sont visualisées à savoir la couleur, brune, orange et blanchâtre notés pour le premier échantillon (Vinaigre de cultivar de Hamraya N°1(EVHN°1) et jaunâtre et blanchâtre pour les colonies appartenant au deuxième échantillon (vinaigre de cultivar de Hamraya N°2(EVHN°2)). Toutes les colonies bactériennes apparaissant sous forme de nappes bactériennes (Tableau II, Photos 1).

Selon **Ould El Hadj (2001)**, toutes les colonies issues des différents échantillons de vinaigres de dattes ont un contour irrégulier de diamètre de 2 à 4 mm. Les caractères morphologiques et culturels de la majorité des colonies obtenues présentent des profils

qui concordent avec ceux signalé par l'auteur. Ces caractéristiques correspondent probablement aux bactéries acétiques.



Photos 1 : Aspect des colonies bactériennes obtenues après isolement sur milieu de Frateur

Pour la purification, chaque colonie ayant des critères morphologiques différents des autres et être bien isolée sur le milieu de culture gélosé sélectif, estensemencées sur le milieu de Frateur coulé en boîte de pétri par la méthode de stries. Une série de repiquage est appliquée pour chaque colonie. Ce deuxième ensemencement est réalisé pour vérifier l'homogénéité des cellules de chaque type de colonies (Photos 2).

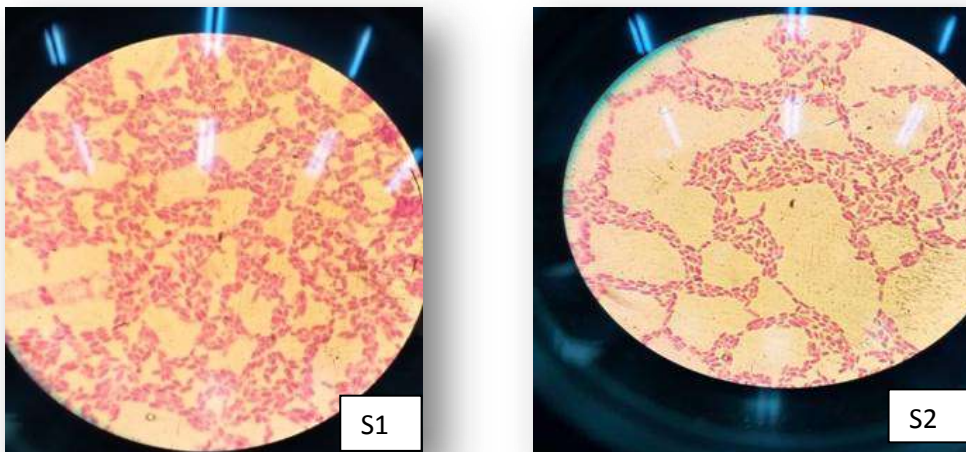


Photos 2 : Aspect des colonies après une 5^{ème} purification des bactéries isolée sur milieu gélosé de Frateur.

IV-2- Résultats des examens microscopiques des colonies obtenues après isolement

Après la coloration à l'état frais, on observe que les bactéries sont mobiles, les cellules sont longues, filamenteuses et présentent des renflements fusiformes.

L'examen microscopique de ces souches après coloration de Gram, les bactéries apparaissent sous forme de bâtonnets de taille variable, de couleur rose donc ces bactéries sont de Gram négative et elles sont regroupent en forme isolées ou en chaînette (**Photos 3, Tableau III**).



Photos 3 : Aspect des cellules isolées après coloration de Gram sous microscope optique (Grossissement x100).

Pour **Soheir (2012)**, l'examen microscopique des colonies bactérienne acétique isole dans le thé de Kombicha en Egypte donne la même forme et Gram avec nos résultats.

Tableau III : Caractéristiques microscopiques des bactéries acétiques après coloration de Gram et observation à l'état frais.

Provenance	Echantillon de vinaigre	Morphologie de la cellule	Mode de regroupement	Gram	Mobilité
Ouargla	Vinaigre de Hamraya 01	Bâtonnets et filamenteuses	isolées ou en chaîne	-	+
	Vinaigre de Hamraya 02				

IV-3-Résultats de l'identification physiologique et biochimique

Selon la clé dichotomique proposée par Frateur, cette identification fait appel à des caractères culturels, morphologiques et physiologiques, et en réalisant une galerie de tests biochimiques, les 04 souches sont isolées à partir des 02 échantillons de vinaigre traditionnel de dattes Hamraya (Tableau IV).

Tableau IV: Résultats d'identification des souches isolées à partir des échantillons de vinaigre traditionnel de datte de Hamraya

	EVHN°1				EVHN°2			
	SM	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	SM	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³
Pouvoir suroxydants	+	*	+	+	+	*	+	*
Test de catalase	+	*	+	+	+	*	+	*
Culture sur M Hoyer (NH4)	+	*	+	+	+	*	+	*
Pouvoir céto-gènes	+	*	+	+	+	*	+	*
Formation d'acide gluconique	-	*	-	-	-	*	-	*
Formation d'acide céto-gluconique	-	*	-	-	-	*	-	*
Test de pigmentation	-	*	-	-	-	*	-	*
Cellulose	-	*	-	-	-	*	-	*
Numéro de souche	01	*	02	01	02	*	02	*
Espèce et sous espèce	<i>A.aceti sub sp aceti</i>	*	<i>A.aceti sub sp aceti</i>	<i>A.aceti sub sp aceti</i>	<i>A.aceti sub sp aceti</i>	*	<i>A.aceti sub sp aceti</i>	*

* : absence de culture.

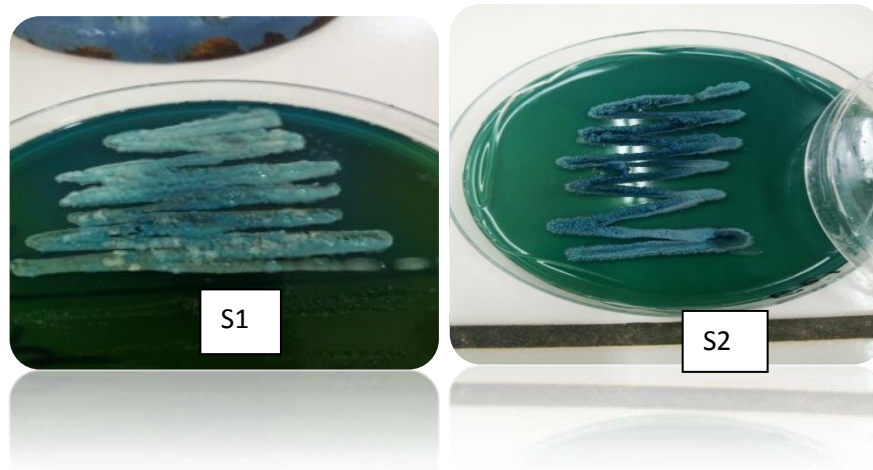
Après la réalisation du premier test du pouvoir suroxydant, réalisé sur milieu de carr et permet de mettre en évidence la différence entre les bactéries du genre *Acétobacter* et celles du genre *Gluconobacter*, le résultat obtenu est comme la suite :

Le virage de l'indicateur coloré du bleu-vert au jaune sous l'effet de la production d'acide acétique, puis la réversion au bleu-vert, ceci indique que ces bactéries sont du genre *Acétobacter* car ce genre a la capacité d'oxyder l'acide acétique en CO₂ et H₂O. Alors que le virage de l'indicateur coloré au jaune du vert de bromocrésol est spécifique aux bactéries du genre *Gluconobacter*, puisque ce genre a la capacité de produire de l'acide acétique (**Guiraud, 1998 et Girard et Rougieux, 1958**).

Pour les deux souches 01 et 02, on remarque le virage de couleur au jaune après 24h puis la réversion au vert après 48h. On conclue que ces souches semblent appartenir au genre *Acetobacter*.

Beheshti-Maal et Shafiee (2012), les bactéries acétique isolé à partir de pêche iranienne sont de pouvoir suroxydant positif.

Et pour les autres souches S3 et S4 on n'observe aucun changement de couleur de milieu de carr. donc ces souches ne sont pas des bactéries acétiques (**Photos 4**).

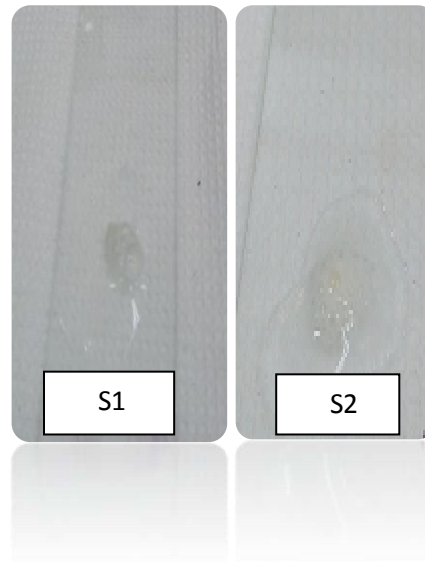


Photos 4 : Résultats de test de pouvoir suroxydant

La recherche de la catalase est un test fondamental pour l'identification des souches, après la réalisation du test catalase, nos souches d'*Acétobacter* sont de catalase positive (production d'O₂ et l'apparition de bulles) (Photos 5).

$\text{H}_2\text{O}_2 \xrightarrow{\text{catalase}} \text{H}_2\text{O} + 1/2 \text{O}_2$. Donc cet enzyme qui catalyse la dégradation du peroxyde d'hydrogène (Guiraud, 2003).

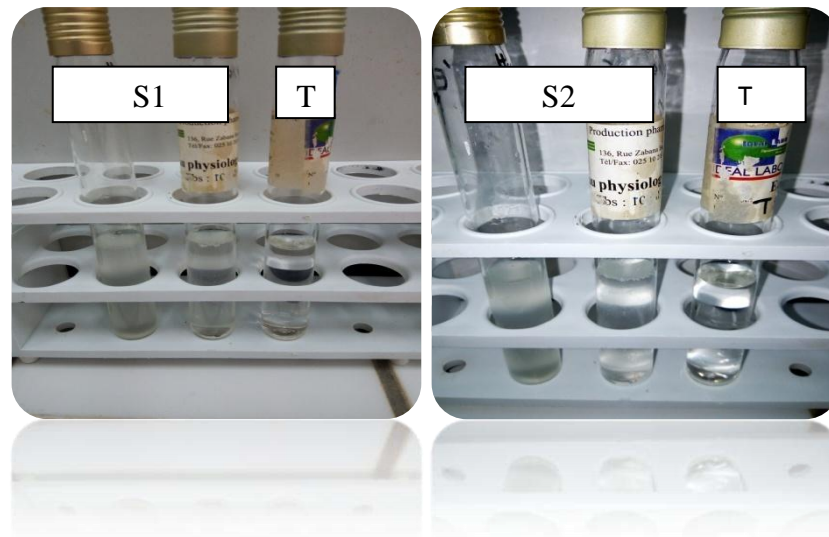
Beheshti-Mall et Shafiee (2012), toutes les souches d'acétobacter isolées à partir de pêche iranienne sont de catalase positive.



Photos 5 : Résultats du test catalase des souches d'*Acetobacter* isolées.

Pour la culture sur milieu de Hoyer pendant 72h à 30°C, test de l'utilisation des sels ammoniacaux comme source d'azote les résultats montrent que les deux souches sont de Hoyer⁺ (Photos 6).

Pour Kader *et al.*, (2008), trouvent que les bactéries acétiques isolées à partir de noix de coco sont de Hoyer⁺ donc il y a le développement des souches qui utilisent des sels ammoniacaux comme source d'azote. Ce résultat se traduit par l'apparition de turbidité de milieu, ce résultat est proche à nos résultats.



Photos 6 : Résultat de test de l'utilisation de l'ammonium comme source d'azote.

Le pouvoir céto-gène est positive lorsque après l'incubation 48h à 30°C sur milieu gélosé au glycérol puis l'addition de liqueur de Fehling, on observe un halo rouge autour de colonies résultat de la précipitation de l'oxyde de cuivre, ceci est observé avec toutes les souches *Acétobacter* isolées (Photos 7). **khelif, (2016), a** trouvé des bactéries acétiques isolée a partir de vinaigre traditionnel des dattes Hamraya à pouvoir céto-gène positif.

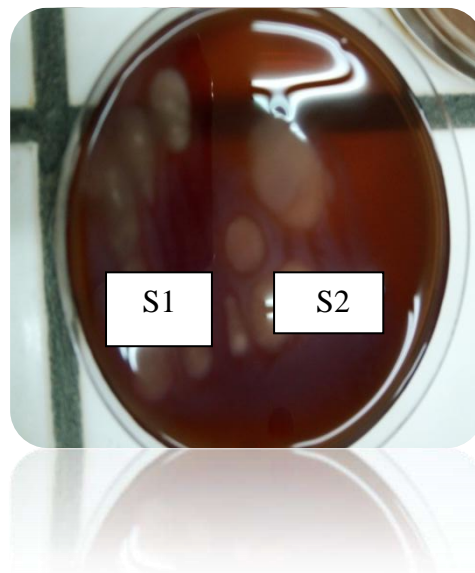
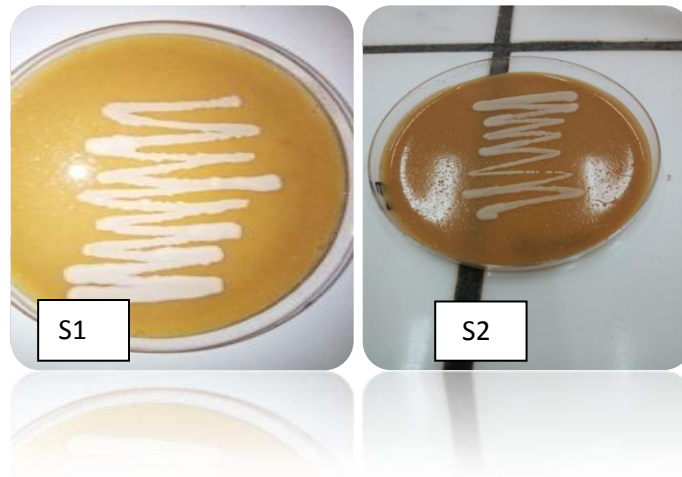


Photo 7: Résultat de test pouvoir céto-gène.

Pour la formation d'acide gluconique à partir de glucose. Après 48 h d'incubation des deux souches isolées ensemencées sur milieu glucosé carbonaté solide, les zones

claires n'apparaissent pas autour des colonies, donc les deux souches ne prouvent pas produit l'acide gluconique (Photos 8).

Pour **Hamidi et Slimani, (2008)**, ont isolée des bactéries acétiques issues du vinaigre traditionnel de dattes de la région de M'Zab, qui forment l'acide gluconique à partir de glucose.



Photos 8 : Résultat de test de formation d'acide gluconique

Le résultat de formation de l'acide céto-gluconique montre que les deux souches d'*Acétobacter* n'ont pas la capacité de produire cet acide car après l'ensemencement des souches dans les tubes, et incubation à une température de 30°C pendant 48 heures. La révélation à l'aide du réactif de Bénédict avec 10 minutes de chauffage au bain- Marie à 100°C nous n'observons pas un précipité rouge orangé (**Photo 8**).

Les travaux de **Li et al., (2011)**, de l'isolement et l'identification des bactéries acétiques issues des dépôts abricot, montre la présence des bactéries acétiques qui ne peuvent pas former l'acide céto-gluconique.

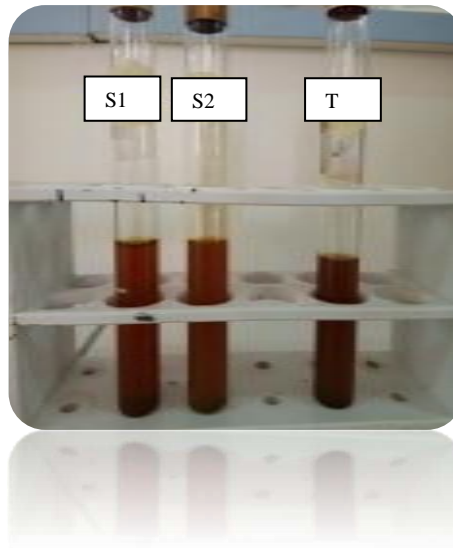


Photo 9 : Résultat du test formation d'acide céto gluconique.

Le résultat de test de pigmentation, montre que les deux souches (S1 et S2) n'ont pas de pigment sur milieu glucose carbonate solide après 48h d'incubation à 30°C (Photo 9).

Kader et al.(2008), trouvent que les bactéries acétiques isolée a partir de noix de coco ne peuvent par produit de pigment.



Photo 10 : Résultat de test de pigmentation.

Et pour la production de la cellulose et après l'incubation nous observons l'apparitions d'une pellicule à la surface de milieu mais lorsque nous additionnons Lugol avec l'acide sulfurique, nous ne observons aucun changement, donc pas de développement des fibres de couleur bleue. Ceci indique qu'il n'y a pas la production de cellulose pour les deux souches (Photo 10).

Romero-Cortes et *al.*, (2012) trouvent dans les études d'isolement et caractérisation des bactéries acétique dans la fermentation des souches bactérienne acétique ne prouvent pas produit la cellulose.

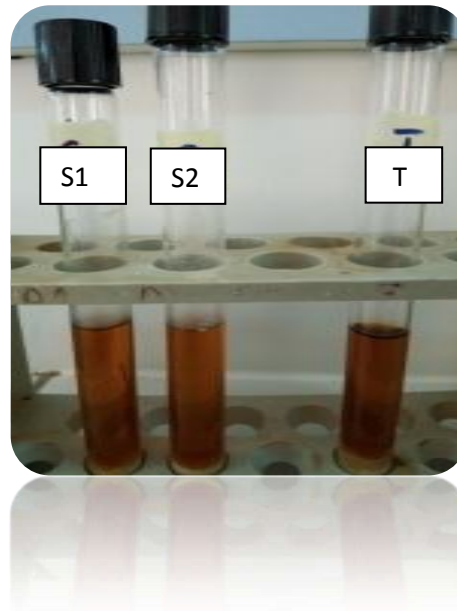


Photo 11 : Résultat de test de production de cellulose.

D'après les résultats des testes, de la recherche et la pré-identification des bactéries acétique à partir des échantillons du vinaigre traditionnel de dattes du cultivar de Hamraya, on fait ressortir deux souches qui ont été pré-identifiée et classée souche 1 ; *Acétobacter aceti sub sp aceti* et souche 2 ; *Acétobacter aceti sub sp aceti*.

Selon la clé dichotomique de Frateur et le Manuel de Bergy de classification dans la 8^{ème} édition (si le pouvoir suroxydant positive signifie la présence du genre *Acétobacter*, si le pouvoir cétoène ⁺, Pas de pigment et culture sur Hoyer ⁺ c'est l'espèce *A. aceti*), par conséquence les deux souches pré-identifier ; *A. aceti subsp aceti* (Giraud, 2003).

Selon **khelif** (2016), l'isolement et l'identification des bactéries acétiques issus de vinaigre traditionnel de Hamraya a permet de montrer la présence des bactéries de la sous-espèce *A.aceti sub sp aceti*.

Pour **Kader et al.** (2008) et Buchanan et Gibbons, (1984), l'isolement des bactéries acétiques à partir du vin traditionnel (Mnazi), a permet de montrer la présence des

bactéries du genre *Acétobacter* et *Gluconobacter* selon la 9^{ème} édition du Manuel Bergy de systématique bactériologique.

Les travaux de **Ohmori et al. (1980)**, montre la présence d'une souche *A. acéti subsp acéti*, isolée à partir du mout du vinaigre, des sols des usines du vinaigre et des fruits.

IV-4-Teste du thermo tolérance des souches isolées

Dans une étude de recherche d'une souche thermo-tolérante, les deux souches de bactéries acétiques isolées à partir du vinaigre traditionnel de dattes cultivar de Hamraya, présentent des taux de croissances variable aux différentes températures d'incubation utilisées, les résultats enregistrés sont consignés dans les figures 09, 10, 11, 12,13, 14 et 15.

IV-4-1-Teste du thermo-tolérance des souches isolées à 30°C

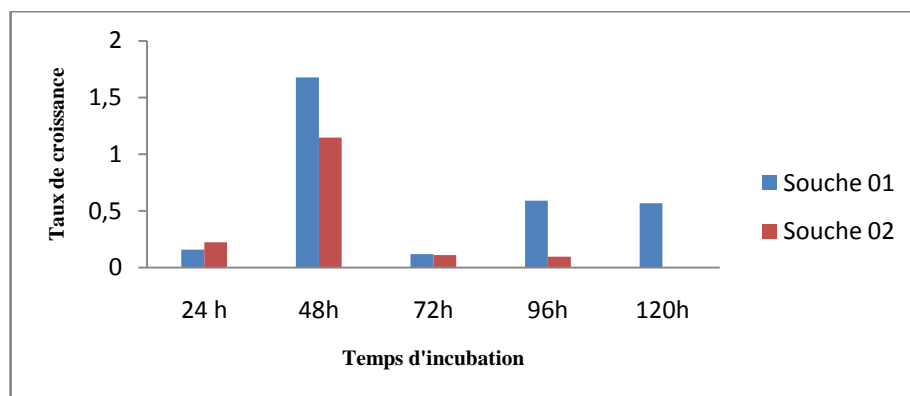


Figure n°9 : Taux de croissance des souches (S1 et S2) isolées à partir du vinaigre traditionnel de dattes Hamraya à 30°C.

Les résultats d'évaluation de croissance des deux souches isolées après incubation à 30°C et pendant 24h, 48h, 72h, 96h et 120h, montre des taux de croissance qui varient entre 0.118 et 1.678 pour la souche 01 et entre 0.097 et 0.147 pour la souche 02.

Le taux de croissance de la souche 1 est nettement supérieure à celle notée pour la souche 2 après 48h et 96h d'incubation, alors qu'après 120h la souche 2 montre des niveaux de croissance nul par contre la souche 1 présente un taux de croissance de 0.568, sachant qu'après 24h la souche 2 montre un niveau de croissance plus élevé de l'ordre de 0.224 (**Figure 09**).

IV-4-2-Teste du thermo-tolérance des souches isolées à 35°C

En ce qui concerne l'incubation des souches isolés après 24h, 48h, 72h, 96h et 120h à température 35°C, le taux de croissance varie entre 0.081 et 0.529 pour la souche 01 et entre 0.079 et 0.236 pour la souche 02 (Figure n°10).

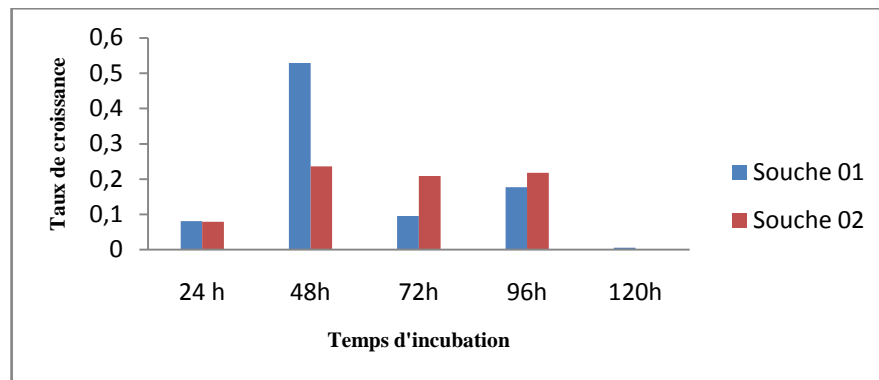


Figure n°10 : Taux de croissance des souches (S1 et S2) isolées à partir du vinaigre traditionnel de dattes Hamraya à 35°C.

Pour cette température les souches étudiées montrent le même profil de croissance que celui enregistré à la température 30°C après 48h (Figure n°10). Alors que la souche 2 représente des taux de croissance plus élevés à 72 et 96h. Les taux de croissance notés pour les deux souches sont équivalents après 24h (Figure n°10).

IV-4-3-Teste du thermo-tolérance des souches isolées à 40°C

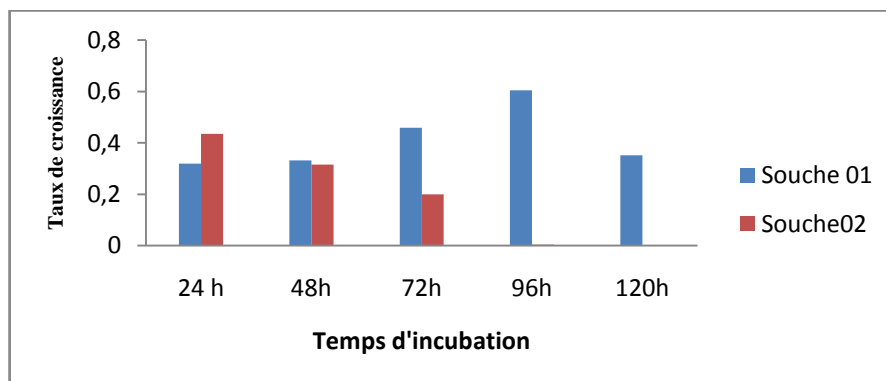


Figure n°11 : Taux de croissance des souches (S1 et S2) isolées à partir du vinaigre traditionnel de dattes Hamraya à 40°C.

Les résultats d'examinations des souches isolés après 24h, 48h, 72h, 96h et 120h d'incubation à 40C°, montre que le taux de croissance varie entre 0.319 et 0.604 pour la souche **01** et entre 0.199 et 0.435 pour la souche **02**.

La croissance de la souche 1 est nettement supérieure à celle notée pour la souche 2 après 96h d'incubation, alors qu'après 120h la souche 2 montre des niveaux de croissance nulle par contre la souche 1 présente un taux de croissance de 0.352.

IV-4-4-Teste du thermo tolérance des souches isolées à 45°C

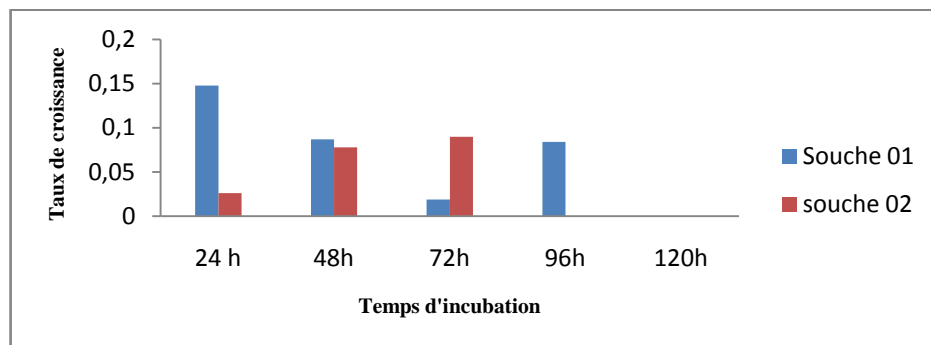


Figure n°12 : Taux de croissance des souches (S1 et S2) isolées à partir du vinaigre traditionnel de dattes Hamraya à 45°C

Le taux de croissance varie entre 0.019 et 0.148 pour la souche **01** et entre 0.026 et 0.098 pour la souche **02** après 24h, 48h, 72h, 96h, 120 h d'incubation à température 45C°.

On note que la meilleure croissance 0.148 est après 24h d'incubation pour la S1 et 0.098 pour la S2 après 72h d'incubation.

IV-4-5-Teste du thermo tolérance des souches isolées à 50°C

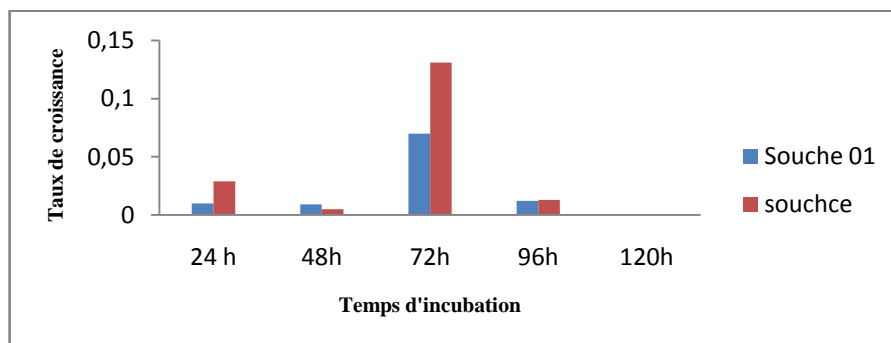


Figure n°13: Taux de croissance des souches (S1 et S2) isolées à partir du vinaigre traditionnel de dattes Hamraya à 50°C.

Pour l'incubation de souches isolées à 50°C après 24h, 48h, 72h, 96h, 120h le taux de croissance varient entre 0.007 et 0.012 pour la S1 et entre 0.005 et 0.131 pour la S2.

On note que la meilleure croissance est 0.07 pour S1 et 0.131 pour S2 après 72h d'incubation. Et après 120h d'incubation les deux souches ont une croissance nul.

IV-4-6-Teste du thermo tolérance des souches isolées à 55°C

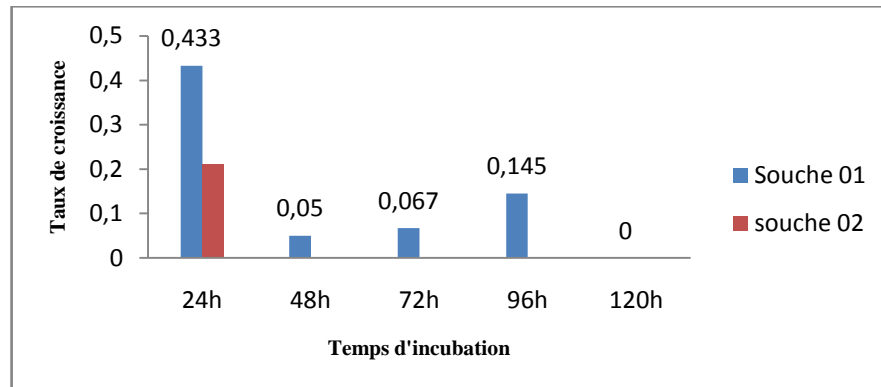


Figure n°14 : Taux de croissance des souches (S1 et S2) isolées à partir du vinaigre traditionnel de dattes Hamraya à 55°C.

Les résultats d'examinations des souches isolés après 24h, 48h, 72h, 96h et 120h d'incubation à 55°C, montre des taux de croissance qui varie entre 0.05 et 0.433 pour la souche 01 et leur meilleur croissance est 0.433 après 24h d'incubation mais pour la souche 02 le taux de croissance après 24h est 0.211 puis il est égale à zéro pour les autres jours d'incubation.

IV-4-7-Teste du thermo tolérance des souches isolées à 60°C

Et pour l'incubation de souches isolées à 60°C après 24h, 48h, 72h, 96h, 120h le taux de croissance varient entre 0.044 et 0.074 pour la souche 01 par contre le taux de croissance de S2 est égale 0.009 après 24h d'incubation est après 48h, 72h, 96h, 120h d'incubation il est égal à zéro.

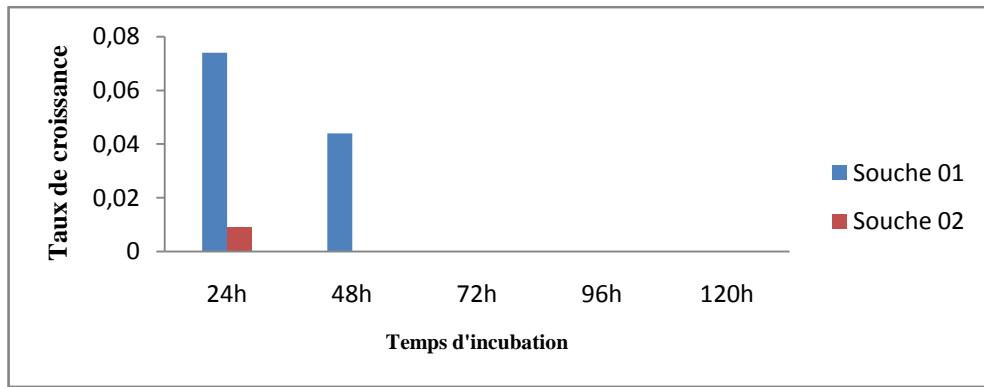


Figure n°15 : Taux de croissance des souches (S1 et S2) isolées à partir du vinaigre traditionnel de dattes Hamraya à 60°C.

Concernant la tolérance des bactéries acétiques aux températures élevées et à l'issue des résultats obtenus dans notre étude après isolement et pré-identification des souches, il semble que les deux souches tolèrent des températures comprises entre 35°C et 60°C.

La croissance optimale des bactéries pré-identifiées *A.aceti sub sp aceti* semble varier entre 35°C et 40°C, mais on note que la souche 01 est mieux adaptée avec la température élaves que la souche 02.

De plus, ils ont affirmé que la température constitué un des paramètres majeure influence le développement des bactéries au sein des aliments (vinaigre) et de l'enivrement (**Prescot et al. ,2002**). La plupart des espèces bactériennes acétiques peuvent pousser à 37°C mais pas à 45°C (**Matsushita, et al., 1985**). Les souches des bactéries acétiques isolées à partir des dattes Iraniennes détériorées tolèrent des températures de 36 à 38°C (**Bheshti-Maal et Shafiee, 2012**).

En 1980, **Ohmori et al.**, ont obtenus 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.

La croissance de nos souches à température 35°C jusqu'à 60°C peut s'expliquer par une possible tolérance aux températures acquises par la souche de leur nature ou zone transférées (**Legrand Sow, 2004**). Car ces hautes températures de 35°C jusqu'à 60°C sont celles enregistrées dans la cuvette de Ouargla, vue les conditions climatiques durant la période estivale dans cette zone aride (**Boudjellal, 2009**).

CONCLUSION

Conclusion

Les résultats d'analyses de la recherche et de pré identification de quelques souches de bactéries acétiques issues des vinaigres traditionnels de datte cultivar de Hamraya échantillonnés au niveau de cuvettes de Ouargla au Sahara septentrional Est algérien révèle la présence sur milieu de culture sélectifs Frateur la présence de quatre types de colonies qui différent entre elles macroscopiquement. Ces colonies sont de différentes tailles et ont des couleurs variées (brune, jaune, orange et blanche). Ceci implique que ces colonies proviennent de cellules bactériennes distinctes.

En appliquant les tests de pouvoir suroxydant sur milieu de carr aux cellules issues des deux colonies ayant la couleur brune et la couleur blanche, les résultats ont permis de mettre en évidence l'appartenance des bactéries issues de deux colonies au genre *Acetobacter*. Alors que les cellules provenant des colonies de couleur orange et jaune S3 et S4, n'appartenaient pas à ce genre malgré qu'elles soient issues du même milieu : le vinaigre.

En complétant les tests sus cités par des tests biochimiques aux bactéries appartenant au genre *Acetobacter*, ce qui a conduit à la mise en évidence que ces bactéries appartenaient à la sous espèce : *Acetobacter. aceti subsp aceti*. Cette bactérie est présente dans les deux échantillons de vinaigre traditionnel cultivar Hamraya.

Concernant la tolérance de ces bactéries acétiques aux températures élevées et à l'issue des résultats obtenus lors de notre étude après isolement et pré identification des souches, il semble que l'ensemble de ces souches tolèrent des températures comprises entre 35°C et 60°C. Avec une température de croissance optimale varies entre 35°C et 40°C.

Les tests de thermo-tolérance appliqués à ces bactéries ont pour objectif la sélection de souches avec de hautes performances pour des applications industrielles ultérieures dans les conditions climatiques (température) de la région lieu de notre étude.

Nos travaux ouvre pour d'autres perspectives, donc cette étude peut être compléter par des analyses à l'échelle moléculaire (d'identification moléculaire telle que le test ARN16S), pour mieux identifier les souches isolées de nos échantillons.

RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUE

- Aboulala. S, (2008).** Recherche et identification de quelques souches de bactéries acétiques issues de vinaigre traditionnel de datte, et l'étude d'une propriété technologique : pouvoir acidifiant. Mémoire de la fin d'étude pour l'obtention diplôme d'ingénieur d'état en biotechnologie. Université d'Oran. P 22.
- Absi. R, (2010).** Analyse de la diversité variétale du palmier Dattier (*Phoenix dactylifera* L). Mémoire de Magister en science agronomiques. Université Mohamed Khider Biskra .P105 .
- Acourene. S, Ammouche. A et Djaafri. K, (2008).** Valorisation des rebuts de dattes par La production de La Levure boulangere, de l'alcool et du vinaigre. Sciences & Technologie C – N°28. P 38-45.
- Ahmed. J, Ramaswamy. H S et Khan. A R, (2005).** Effect of water activity on glass transitions of date paste. *Journal of Food Eng.* **66** : 253–258.
- Alhamdan. A M et Hassan. B H, (1999).** Water sorption isotherms of date pastes as influenced by date cultivar and storage temperature. *Journal of Food Eng.* **39** : 301–306.
- AL-hootis. S, SIDHU. J S, Al-Otaffil. J, Al-ameeri. H et Qabazard. H, (1997).** Processing of some important date cultivars grown in United Arab Emirates into chutney and date relish. *Journal of Food Processing and Preservation.* **21**(1), P 55-68.
- Aline. L F, Vincent. R et Pirre. S, (2010).** Microbiologie du vin, bases fondamentales et applications .Ed. TEC et DOC. Paris. P 140-142.
- Anonyme, 2006 :** Ouargla: réalisation en cours d'une étude d'amélioration de l'élevage en zones sahariennes <img style="width:150px;height:auto;" class="itemRelImg".
- Arab. H et Guzzoun. K (2003).** Contribution à l'étude des caractéristiques physicochimique et biochimique du vinaigre traditionnel de datte de la cuvette de l'Ouargla : vertu thérapeutique, Mémoire de l'université d'Ouargla. P 18-23,29.
- Barreveld. W H, (1993).** Date palm products. FAO Agricultural Services Bulletin N°101. Fao food and Agriculture Organization of the United Nation, Rome.
- Beheshti Maal. K et Shafiee. R, (2012).** Characterization of an *Acetobacter* strain isolated from Iranian peach that tolerates. *International journal of biological and life sciences* **8**:4. P 240-242.
- Bheshti-maal. K, (2014).** Identification of à thermo-tolerant *Acetobacter* strain isolated from Iranian date palm (Rotab) suitable for date vinegar production. *Advances in Environmental Biology*, **8**(10). P 1063-1071.
- Belkacem. M, (1987).** Contribution à la production d'acide acétique à partir du lactosérum. Thèse Ing INA, El Harrach, p 21-25.
- Bougnou. N, (1988).** Essai de production du vinaigre à partir des déchets se dattes. Thèse magister INA. El-Harrach. P 82.
- Boudjellal. L, (2009).** Rôle de l'oasis dans la creation de l'îlot de fraîcheur dans les zones chaudes et arides « cas de l'oasis de Chetma -Biskra -Algérie ». Memoire pour l'obtention du diplôme de magister option: architecture bioclimatique. Université Mentouri Constantine. P 20.
- Bourgeois. C, (2003).** Les vitamines dans les industries agroalimentaires. Ed. Tech et Doc-Lavoisier.Paris. P 483.
- Bourgeois. C M et Leveau. J Y, (1980).**Technique d'analyse et de contrôle microbiologique. Volume III. Ed. Technique et documentation. Paris. P 63-65.
- Bourgeois. C M et Larpent. J P, (1996).** Microbiologie Alimentaire : aliments fermentés et fermentations alimentaires. Tome 2. Ed. Techniques et documentations. P 352, 623.

- Bourgeois. C M et Larpent. J P, (1990).** Microbiologie alimentaire. Tome II les fermentations alimentaires. Ed. Technique et documentation. Paris. P 121-140,171-176.
- Borraï. M, (1963).** Grand la rousse. Encyclopédique. Ed. Libraire Larousse. Paris.
- Buelguedj. M, (2001).** Caractéristiques des cultivars de dattes dans les palmeraies du Sud-Est Algérien., INRAA El-Harrach N° 11. Alger. P 289.
- Branger. A, (2008).** Fabrication des produits alimentaires par fermentation : les ferments. Technique de l'ingénieur F 3500. P 1-16.
- Boughnou. N, (1988).** Essai de production de vinaigre à partir des déchets de dattes. Thèse de Magister, INA (Institut National Agronomique). El-Harrach. P 14-70, 82.
- Boutageois. L, Meschle. S et Zucca B, (1988).** Microbiologie alimentaire aspect microbiologie de la sécurité et de la qualité alimentaires. Ed.Tec et Doc. Le voisin. Paris. Vol I. P 210.
- Brewdusud. N, (2004).** Le vinaigre. Article 36. Version 2.Site <File://Brewdusud.nuxit.Net/xoops>.
- Castany. J, (1987).** Noves aportacions al megalitisme de l'interior de Catalunya,cota zero,3. P 69-70.
- Cacqe. C, (2002).** Rencontres technique .Ed. Laboratoire régional de Constantine. P 11-17,21.
- Clavet. L, (1912).** Alcool méthylique, vinaigres. Ed. Béranger. Paris et Liège. P 47-64.
- Cheikh. M (1994).** Contribution à l'étude de la production d'alcool et de vinaigre par quatre variétés de datte commune (Degla-Beidha, Techerwit, Hamraya et Assabri) de la cuvette d'Ouargla. Thèse Ing, I.N.F.A.S. Ouargla : 1-32.
- Divies C, (1970):** Le vinaigre, microbiologie alimentaire, Les fermentations alimentaires. Ed. Tec et Doc. Paris. P 39-105.
- Divies. C, (1989).** Le vinaigre Microbiologie alimentaire. Les fermentations alimentaires. Ed.Tec et doc. Lavoisier .vol 2: 121-136.
- Djerbi. M, (1994).** Précis de phéniculture, F.A.O, Rome. P 191.
- Dowson. V B W et Aten. A, (1963).** Composition et maturation. Récolte et conditionnement des dattes. Collection FAO, Rome, cahier N°72 : 1-394.
- Duculot. H, (1932).** C, H, B Beall 175 Acetobactereaacea (orto-epia de eliot johen et du bartas-Goulat Gallica, etudes en philogy, XIII, 1946. P 255-262.
- Estanove. P, (1990).** Note technique: Valorisation de la datte. In Options méditerranéennes, série A, N°11. Systèmes agricoles oasiens. Ed. CIHEAM. PP 301- 318.
- Espird. E, (2002).** Introduction à la transformation industrielle des fruits. Ed. Tech et Doc-Lavoisier. P 360.
- Follman. H, (1983).** Acetic-acid.Vol 5.Chap 3. P 388-407.
- Gerome. J, James. T et Stephen. L, (2002).** Microbiologie. Cours et questions de divisions. Ed. Dunod. Paris. P 437-438.
- Gibbs. B M et Shpton. D A, (1968).** Identification methode for microbiologists. Ed. Academic press london. P 1-7.
- Gilles. P, (2000).** Cultiver le palmier dattier. Guide illustre de formation. P 19.
- Girard et Rougieux, (1958).** Technique de microbiologies agricole. Ed. Dunod. Paris. P 307-320.
- Glazy. P et Guiran. D J, (1980).** L'analyse microbiologique dans les industries alimentaire. Ed. L'usine nouvelle. Paris. P 239-245.
- Guiraud. J, (2003).** Microbiologie alimentaire. Ed. RIA Dunod. Paris. p270, 300.

- Guiraud. J P, (1998).** Microbiologie alimentaire. Edition Dunod. Paris.p116-117,163, 209, 615.
- Grelon. B, (2005).** Les bienfaits du vinaigre. Ed. Vecchi, Paris. P 9-40,44-49.
- Hamidi. A et Slimani. A, (2008).** Identification des souches d'acétobacter isolées à partir du vinaigre traditionnel de dattes de la région de M'Zab. Mémoire pour l'obtention du diplôme d'étude supérieure en biologie. Université d'Ouargla. P 61.
- Hauge. J G, King. T E. et Cheldelin. V H, (1955).** Oxydation de dihydroxyacetone via le cycle pentose dans suboxydans *Acetobacter*. J. Biol. Chem. 214: 11-26.
- Harrak. H et Boujnah. M, (2012).** Valorisation technologique des dattes. Ed. INRA. Maroc. P 11.
- Kader. T, Miyamoto. T, Oniang. 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 Vol. 7 (16), pp. 2963-2971. P 2964.
- Kerstens. K, Lisdiyanti. P, Komagata. K et Swings. J, (2006).** The family *Acetobacteraceae* : The Genera *Acetobacter*, *Acidomonas*, *Asaia*, *Gluconacetobacter*, *Gluconobacter*, and *Kozakia*. Journal of Prokaryotes 5. Chapitre 3.1.8. PP 163-200.
- Khelif. F, (2016).** Recherche et identification de quelques souches des bacteries acetiques issues du vinaigre traditionnel des dattes Sahara Septentrional Est Algérien : Etude du pouvoir acidifiant. Mémoire pour l'obtention du diplôme de masters académiques. Université d'Ouargla. P 42.
- Kuraiwa. T, (1977).** Rince vinaigier : oriental homes remedy Igakuska. Tokyo. P 45.
- Lambin. J P et German. A, (1969).** Précis de microbiologie. Tome 1. Ed. Masson et cie. Paris. P 515, 629-635.
- Laouini. L, (2014).** Etude phytochimique et activité biologique d'extrait de des feuilles de *Phoenix dactylifera* L dans la région du Sud d'Algérie (la région d'Oued Souf). Doctorat en sciences en: Chimie Industrielle. Université Mohamed Khider Biskra. P 27.
- Larpent. J P, (1991).** Microbiologie alimentaire : technique de laboratoire. Ed. TEC et DOC. P 1073.
- Legrand-Sow. N, (2004).** Sélection et caractérisation de bactéries lactiques d'origine africaine en vue d'une utilisation comme probiotiques. Ph. D. dissertation. Faculté universitaire des sciences agronomiques de Gembloux. Belgium. P 48.
- Li. F, Fuxian. Z et Bin. Z, (2012).** Isolation and Identification of Acetic Acid Bacteria. Department of Biology, Hanshan Normal University, Chaozhou 521041, China. P 4.
- Maiorella. B L, (1985).** Ethanol comprehensive biotechnology the principal applications and regulation of biotechnology in industry agriculture and medicine .Ed Pergamon.vol 3. P 861-900.
- Maldonado. O, Rolz. C, Shneider et Cabrera. S, (1975).** Wine and vinegar production from tropical fruits. Journ of food Sc. Vol 40, N° 2, pp. 265 – 267.
- Matsushita. K, Toyama. H et Adachi. O, (1985).** Chaînes et bioénergétique des bactéries acétiques respiratoires. Adv. Microb. Physiol. **36** :247-301.
- Michael. J et Pelczar. J R, (1982).** Elements de microbiologie. Ed. H RW. P 457-459.
- Mounir. M, Shafiei. R, Zarmehrkhoshid. R, Hamouda. A, Ismaili Alaoui. M et Thonart. P, (2016).** Simultaneous production of acetic and gluconic acids by a thermo-tolerant *Acetobacter* strain during acetous fermentation in a bioreactor. Journal of Bioscience and Bioengineering.VOL. 121 N° 2, 166-171. P 01.
- Munier. P, (1973).** La datte. In: " Le palmier-dattier". Paris (France) : Maisonneuve et Larose.

P 209, 141-150.

Ohmori. S, Masai. H, Arima. k et Teruhiko B, (1980). Isolation and Identification of acetic acid bacteria for submerged acetic acid fermentation at high temperature. OnlineJournal homepage. *Agric. Biol. Chem.*, 44 (12),pp 2901-2906.

Ould El Hadj. M D et Sebihi. A H. et Siboukeur. O, (2001). Qualité hygiénique et caractéristiques physicochimiques du vinaigre traditionnel de quelques variétés de dattes de la cuvette d'Ouargla. *Rev. Energ. Ren. Production et valorisation – Biomasse*, pp. 87-92, 88, 164-169.

Patzold. R et Bruckner. H, (2005). Mass Spectrometric detection and formation of d'amino acids in processed plant saps, syrups, and fruit juice concentrates. *J. agric. food chem*, **53**, 9722-9729.

Peyron. G et GAY. F, (1988). Contribution à l'évaluation du patrimoine génétique Egyptien : Phénologie du palmier dattier (*Phoenix dactylifera L*). CIRAD-DSA.

Plessi. M, Bertelli. D et Miglietta. F, (2006). Extraction and identification by GC-MS of phenolic acids in traditional balsamic vinegar from Modena. *Journal of Food Composition and Analysis*. P 49-54.

Poxixoo. F, (2003). Vinaigre élément de base. Site : Fille:// : vinaigre 20/0 à 20/2 imprimé.

Prescott. L M, Harley. J P, Klein. D A, (2002). Microbiologie deuxième édition française. P 818.

Prevot. A R, (1961). Traité de systématique bactérienne. Tomel. Ed. Dunod. Paris. P 61, 64.

Romero-Cortes. T, Robles-Olvera. V, Rodriguez-Jimenes. G et Ramirez-Lepe. M, (2012). Isolation and characterization of acetic acid bacteria in cocoa fermentation. *African Journal of Microbiology Research* Vol. 6(2), pp. 339-347. P 344.

Reynes. M, (1997). Influence d'une technique de des infestations par micro-ondes sur les critères de qualité physico-chimiques et biochimiques de la datte. P 44-46.

Rouhou. S C, Baklouti. S, Hadj-Taïeb. N, Besbes. S, Chaabouni. S, Blecker. C et Attia. H, (2006). Élaboration d'une boisson à partir d'écart de triage de dattes : clarification par traitement enzymatique et microfiltration. *Fruits*, **61**, 389-399.

Sawaya. W N, Khatchadourian. H A, Khalil. J K, Safi. W M et Al-Shalhat. A, (1982). Growth and compositional changes during the various developmental stages of some Saudi Arabian date cultivars. *J. Food Sci*, **47** (5).

Sebihi A, (1996). Contribution à l'étude de quelques paramètres de la qualité hygiénique et biochimique du vinaigre traditionnel de quelques variétés de dattes de la cuvette d'Ouargla, INFA/AS. peu coûteux". *Bulletin du réseau TPA*. N° 19.

Soheir. S A , (2012). **16S rRNA Gene Sequence Detection of Acetic Acid Bacteria Isolated from Tea Kombucha.** *New York Science Journal*, 5(3). P 57.

Simon. P et Meunier. R, (1970). Microbiologie industrielle et génie biochimique. Ed. Masson et C^{le} ED. Paris. P 13-26.

Solange. M, (2008). La mini- encyclopédie des aliments, achat, préparation, utilisation, cuisson, conservation, valeur nutritive, techniques celinaires illustrées. Edition Québec Amérique. Canada. P 462.

Stadler-Szoke. A, Nyeste. L et Hallo. J, (1980). Les études sur les facteurs affectant gluconiques et 5 acides céto gluconique formation par *Acetobacter*. *Acta Aliment.* (9): 155-172.

Tekkouk. F, (1997). Contribution à l'étude de quelques paramètres de la qualité hygiénique et biochimique du vinaigre traditionnel de quelques variétés de dattes de cuvette de Ourgla. Thèse Ing, I.N.F.A.S . Ouragla. P 7-45.

Tekkouk. F, (1997). Recherche, isolement et caractérisation de souches d'Acétobacter D'origine locale. Thèse ING.INFS/AS. Ouargla. P 6-13.

Tesfay. W, Morales. M L, Garcia. P, Trancoso. A M, (2002). Wine vinegar : technology, authenticity and quality evaluation, Journal of trends in food science and technology. Vol 13. p12-21.

Vincent. J M, (1970). A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. IBP handbook N°15. Blackwell Scientific Publishers, Oxford.

Zirari. A, Harrak. H, Chetto. A, Lalaoui. Y R. et Outlioua. K, (2003). Contribution à la Réhabilitation de la Diversité Génétique du palmier dattier dans l'Oasis de Fezouata. Rapport d'Atelier Diagnostic Participatif du Projet RAB 98G31. Fezouata.

Références de classification :

Référence ITIS: Acétobacter Beijerinck, 1898 (fr) (+ version anglaise (en)) (consulté le 30 BackboneTaxonomy.doi: 10,15468 / 39omei Consulté via <http://www.gbif.org/species/3221528> sur 16/05/2016.

ANNEXES

L'échantillon : le vinaigre traditionnel de datte cultivar Hamraya d' Ouargla.

I- Le vinaigre :

Date d'échantillonnage	2016
Date de fabrication de vinaigre	EVHN°1 : 1 October 2015 EVHN°2 : 2 Juillet 2016
Lieu de fabrication de vinaigre	Ouargla
Quantité de vinaigre en ml	500 ml

II- La datte :

Cultivar	Hamraya
Le stade de maturation	Tmar

III- Méthode de préparation et de stockage :

Lavage de datte	Oui
Volume de datte	1/3
Volume d'eau	2/3
Le récipient utilise	Récipient en plastique
Durée de la fermentation alcoolique	40 jours
Durée de la fermentation acétique	03 jours
Additifs :	
Sel NaCl (g)	/
Org	/
Blé	/
Cariante	/
Piment	/
Charbon	/
Harmal	/
Tamisaage et filtration	Oui
L'exposition a la lumière (brunissement)	Non
	01 à 02 ans

Durée de stockage	
Les conditions de stockage	T° : optimal Lumière : non

IV- Contrôle organoleptique :

La couleur	Brune fonce
Le gout	Acide
L'odeur	Odeur de vinaigre
La dilution	Non
Ph	EVHN°1 =3.4 EVHN°2 =3.6
La viscosité	Non

MILIEU DE CULTRE

Milieu d'isolement

Milieu Frateur :

Extrait de levure	30 g
Carbonate de calcium	20 g
Agar	20 g
Eau distillée	1000 g

-Après stérilisation (autoclavage) à 110°C pendant 10 min le milieu est laissé refroidir jusqu'à 45°C, puis on ajoute 100 ml d'alcool éthyliques à 15%.

Milieus des identifications :

Milieu de care :

Extrait de levure	30 g
Agar	20 g
Vert de bromocresol	1 ml
L'eau distillée	1000 ml

-Après stérilisation (autoclavage) à 110°C pendant 10 min le milieu est laissé refroidir jusqu'à 45°C, puis on ajoute 100 ml d'alcool éthyliques à 20%.

Milieu gélosé au glycérol : test de pouvoir cétoène

Extrait de levure	30 g
Glycérol	30 g
Agar	20 g
L'eau distillée	1000 ml

-Autoclavage pendant 15°C durant 10 min le milieu laissé refroidir jusqu'à 45°C. le milieu ainsi refroidis, on ajoute 100 ml d'alcool éthyliques à 15%.

Milieu de test de Hoyer :

Sulfate d'ammonium	1 g
Phosphate dibotassique	0.1 g
Phosphate monopotassique	0.9 g
Sulfate de magnésium	0.025 g
Perchlorure de fer	0.02 ml
L'eau distillée	1000 ml

-Repartir ce milieu en tubes a essai (09ml) puis en autoclave 15 min a 120C°.

- Avant l'emploi, ajouter dans chaque tube de milieu 1 ml d'une solution stérilisée par filtration d'éthanol a 30%.

Milieu test de pigmentation :

Extrait de levure	30 g
Carbonate disodique anhydre	20 g
Glucose	20 g
Agar	20g
L'eau distillée	1000 ml

-Avant l'emploi autoclave a 120C° pendant 15 min.

Milieu gélosé carbonaté solide (milieu de test d'acide gluconique) :

Extrait de levure	10 g
Carbonate de calcium	20 g
Glucose	100 g
Agar	25 g
L'eau distillée	1000 ml

-Après stérilisation (autoclavage) à 110°C pendant 10 min le milieu est lassai refroidir jusqu'à 45°C, puis on ajoute 100 ml d'alcool éthyliques à 15%.

Milieu de Hayenes (milieu test de formation d'acide cetogluconique):

Extrait de levure	1 g
Peptone	1,5 g
Phosphate dipotasuime	1 g

Glucose	40 g
L'eau distillée	100 ml

-Stérilisation à l'autoclave a 120C° pendant 15 min.

Bouillon pour les bactéries (milieu teste de production de cellulose).

Extrait de levure	10 g
Carbonate de calcium	20 g
Glucose	100 g
L'eau distillée	1000 ml

-Repartir en tubes à essais 09 à 10 ml de ce milieu.

- Stérilisation à l'autoclave a 120C° pendant 15 min.

Eau physiologique :

Chlorure de sodium	9 g
L'eau distillée	1000 ml

- Stérilisation à l'autoclave a 120C° pendant 15 min.

Réactif de Bénédicté :

Sulfate de cuivre	
Carbonat disodique anhydre	
Citrat de sodium	
L'eau distillée	

Clé de détermination permet l'identification :

1-Pas de pouvoir suroxydant : Genre *Gluconobacter oxydans*

- **Pas de pigment sur milieu d'isolement :** *Gluconobacter oxydans oxydans*, *Gluconobacter oxydans industrius*.
- **Pigment rose :** *Gluconobacter oxydans suboxydans*, *Gluconobacter oxydans melanogenes*.

2-Pouvoir suroxydant : *Acétobacter*.

2-1-Catalase - :

- **Culture sur milieu de Hoyer + :** *Acetobacter pasteurianus* ou *Acetobacter peroxydans*.
- **Culture sur milieu de Hoyer - :** *Acetobacter pasteurianus paradoxus* (*Acetobacter paradoxum*).

2-2-Catalase +

2-2-1-Pouvoir cétoène +

2-2-1-1-Pigment brun : *Acetobacter aceti liquefaciens* (*Acetobacter liquefaciens*)

2-2-1-2-Pas de pigment :

2-2-1-2-1-Culture sur milieu de Hoyer + : *Acetobacter aceti aceti* (*Acetobacter aceti*)

2-2-1-2-2-Culture sur milieu de Hoyer - :

- **Cellulose + :** *Acetobacter aceti xylinum* (*Acetobacter xylinum*).
- **Cellulose - :** *Acetobacter pasteurianus*, *Acetobacter aceti orleanensis* = *Acetobacter mesooxydans*.

2-2-2-Pouvoir cétoène - :

2-2-2-1-Culture sur milieu de Hoyer + :

- **Cellulose + :** *Acetobacter pasteurianus estunensis*.
- **Cellulose - :** *Acetobacter pasteurianus lovaniensis*.

2-2-2-2-Culture sur milieu de Hoyer- :

- **Acide gluconique + :** *Acetobacter pasteurianus pasteurianus=Acetobacter ranceus.*
- **Acide gluconique - :** *Acetobacter pasteurianus axendens= Acetobacter axendens*

Tableau : Caractéristiques du *Acetobacter* et *Gluconobacter* :

Espèce et sous- espèce selon Frateur	A.ace <i>t</i> i	A. hansenii	A.liq <i>uefa</i> ciens	A.pasteu rianus							A.xylinu m	G. oxydans
	A.ace <i>t</i> i subsp. ace <i>t</i> i	A.ace <i>t</i> i subsp xylinum	A.ace <i>t</i> i subsp liquefaciens	A.pasteurians subsp pasteurians	A.pasteurians subsp ascendens	A.pasteurians subsp estunensis	A.pasteurians subsp lovaniensis	A.pasteurians subsp paradoxus	A.peroxydans	A. ace <i>t</i> i orleanensis	A. ace <i>t</i> i subsp xylinum	G. oxydans subsp industrius melanogenes oxydans suboxydens
Pouvoir suroxydant	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
Culture sur hoyer	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
Pouvoir cétogène	+	+	+	-	-	-	-	-	-	V	+	+
Acide gluconique	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+
A.5 cétogluconique	+	V	V	-	-	-	-	-	-	-	+	V
Pigment	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	V
Cellulose	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-

V : variable.

Classification

Acétobacter acéti acéti :

Règne	Bacteria
Sous - règne	<i>Negibacteria</i>
Embranchement	<i>Proteobacteria</i>
Classe	<i>Alphaproteobacteria</i>
Ordre	<i>Rhodospirillales</i>
Famille	<i>Acétobacteriaceae</i>
Genre	<i>Acétobacter</i>
espèces	<i>Acétobacter acéti</i>
subsp	<i>Acétobacter acéti subsp acéti</i>

Annexes 06 : Taux de croissance après la réalisation du test de thermotolérant.**Tableau n°01 : Taux de croissance après incubation à température 30°C.**

La longueur d'onde = 600 nm					
Tempe (h)	24h	48h	72h	96h	120h
Souche 1	0.159	1.678	0.118	0.591	0.568
Souche 2	0.224	1.147	0.112	0.097	0.001

Tableau n°02 : Taux de croissance après incubation à température 35°C.

La longueur d'onde = 600 nm					
Tempe (h)	24h	48h	72h	96h	120h
Souche 1	0.081	0.529	0.095	0.177	0.005
Souche 2	0.079	0.236	0.209	0.218	0

Tableau n°03 : Taux de croissance après incubation à température 40°C.

La longueur d'onde = 600 nm					
Tempe (h)	24h	48h	72h	96h	120h
Souche 1	0.319	0.331	0.459	0.604	0.352
Souche 2	0.435	0.315	0.199	0.004	0

Tableau n°04 : Taux de croissance après incubation à température 45°C.

La longueur d'onde = 600 nm					
Tempe (h)	24h	48h	72h	96h	120h
Souche 1	0.148	0.087	0.019	0.048	0
Souche 2	0.026	0.098	0.090	0	0

Tableau n°05 : Taux de croissance après incubation à température 50°C.

La longueur d'onde = 600 nm					
Tempe (h)	24h	48h	72h	96h	120h
Souche 1	0.01	0.009	0.007	0.012	0
Souche 2	0.029	0.005	0.131	0.013	0

Tableau n°06: Taux de croissance après incubation à température 55°C.

La longueur d'onde = 600 nm					
Tempe (h)	24h	48h	72h	96h	120h
Souche 1	0.433	0.05	0.067	0.145	0
Souche 2	0.211	0	0	0	0

Tableau n°07 : Taux de croissance après incubation à température 60°C.

La longueur d'onde = 600 nm					
Tempe (h)	24h	48h	72h	96h	120h
Souche 1	0.074	0.044	0	0	0
0Souche 2	0,009	0	0	0	0

Résumé

Depuis longtemps les populations sahariennes ont eu à fabriquer localement leur propre vinaigre de dattes. Cette production est un savoir faire local découlant de la tradition ancestrale utilisant un matériel artisanal. Qui est basé sur l'intervention des bactéries acétique qui transforme l'éthanol produit par les levures en acide acétique.

Quatre souches bactéries S1, S2, S3 et S4 et ont été isolées à partir du vinaigre traditionnel de dattes cultivar Hamraya de la cuvette d'Ouargla. Les résultats des analyses microbiologiques permettent de pré-identifier les deux souches (S1 et S2) comme *Acetobacter aceti sub sp aceti*. Ces dernières révèlent des profils de tolérances aux températures comprises entre 35°C à 60°C. Dont leur optimale de croissance est compris entre 35°C et 40°C, qui peuvent utilisées pour des buts industrielles.

Mots clés : vinaigre traditionnel, cultivar Hamraya, bactéries acétiques, analyse microbiologique, *Acetobacter*, Thermo-tolérant.

Abstract

For a long time the Saharan populations have had to make their own local vinegar locally. This production is a local know-how arising from ancestral tradition using artisanal materials. This is based on the intervention of acetic bacteria which transforms the ethanol produced by the yeasts into acetic acid.

Four strains bacteria S1, S2, S3 and S4 and were isolated from the traditional vinegar of dates Hamraya cultivar of the Ouargla basin. The results of the microbiological analyzes make it possible to pre-identify the two strains (S1 and S2) as *Acetobacter aceti sub sp aceti*. The latter reveal profiles of tolerances at temperatures between 35 ° C and 60 ° C. Their optimal growth range from 35 ° C to 40 ° C, which can be used for industrial purposes.

Key words: traditional vinegar, Hamraya cultivar, acetic bacteria, microbiological analysis, *Acetobacter*, Thermo-tolerant.

المخلص

مند قدم الزمان كان السكان الصحراويين يقومون بالصناعة التقليدية لخلهم محليا من التمور. حيث كانوا يستعملون في هذا الإنتاج مواد حرفية في حين تستند هذه الصناعة الى تدخل بكتيريا الخل التي تقوم بتحويل الايثانول الذي تنتجه الخميرة إلى حمض الخليك. أربعة سلالات بكتيرية س1س2س3 وس4 تم عزلها من الخل التقليدي المصنوع من تمر حمرايا بورقلة.

نتائج التحليل الميكروبيولوجي سمح بتحديد سلالتين من النوع *Acetobacter aceti subsp aceti* أما في ما يخص السلالة المقاومة للحرارة فأظهرت النتائج أن كلا السلالتين تقاوم من الدرجة 35°م إلى 60°م التي يمكن استعمالها لأهداف صناعية.

الكلمات المفتاحية: الخل التقليدي, مقاومة الحرارة, تمر حمرايا, بكتيريا الخل, التحليل الميكروبيولوجي *Acetobacter* ,