ETUDE DES BACTERIES ACETIQUES ISOLEES DE RAISINS ET DE VINS

I. - IDENTIFICATION DES SOUCHES ISOLEES

A.C. BLACKWOOD
Professeur de Microbiologie
Collège Mc. DONALD, Université Mc. GILL
Province de Québec, Canada (*)

L'importance du rôle que jouent les bactéries acétiques dans l'élaboration du vin, et qui ne se limite pas à la simple formation d'acide acétique, est souvent difficile à évaluer. De PASTEUR à nos jours, un grand nombre de recherches concernent l'incidence de ces bactéries en vinification et pendant la conservation du vin. L'identification de ces micro-organismes a été et reste encore un problème difficile. Les études taxonomiques de FRATEUR (1) et plus récemment de DE LEY (2) n'ont pas apporté de simplification. Il est possible cependant d'isoler sélectivement et de caractériser les **Acetobacter** et de les séparer en groupes. Les études de DUPUY (3,4) sur l'isolement et l'identification des bactéries acétiques des vins produits dans le Midi de la France, indiquent qu'il est possible de mener à bien de tels travaux. PEYNAUD et DOMERCQ (5), en 1960, ont montré la présence d'**Acetobacter** sur les raisins du Bordelais. BLOUIN (6) a également mis en évidence l'importance, au point de vue technologique, des bactéries acétiques présentes sur les raisins.

Monsieur PEYNAUD nous a confié l'isolement et l'identification des bactéries acétiques prélevées à la dernière récolte sur les raisins plus ou moins pourris de différents vignobles du Bordelais. Le but était de connaître la microflore acétique des raisins et de la comparer à celle des vins.

A. ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DES CULTURES REPRESENTATIVES D'ACETOBACTER

Les techniques d'isolement et d'identification sont essentiellement celles décrites par DUPUY (3, 4). Nous les citons brièvement.

(*) Travail effectué à l'INSTITUT D'ŒNOLOGIE de BORDEAUX.

1°) **Technique d'isolement**

Les échantillons sont prélevés, soit sous forme de raisins frais dans des poches de toile stérile, soit sous forme de jus dans des bouteilles stériles. A partir des raisins frais, un moût est obtenu par une pressée des fruits à la main, aussi aseptiquement que possible, à travers la poche de toile. Le moût est mis à fermenter en bouteilles stériles.

Des échantillons sont également prélevés à partir du « chapeau ». Assez hétérogènes, plus ou moins imprégnés de jus, ils sont additionnés d'eau stérile et agités vigoureusement; le liquide est décanté dans des bouteilles stériles.

Tous les échantillons sont examinés immédiatement et après des temps variés d'incubation à 28 °C. On ajoute des doses de 0,2 à 0,5 mg par litre d'acide sorbique à certains échantillons pour prévenir le développement des levures.

L'isolement des bactéries est effectué en rayant avec un fil de platine des boîtes de Pétri contenant du moût de bière additionné d'agar, comme le suggère DUPUY (4). La préparation du milieu est modifiée par l'utilisation d'un moût de brasserie, stérilisé en bouteilles et conservé à température ambiante. Avant son emploi, le moût est filtré, additionné d'agar à 2 % et stérilisé; DUPUY préparait le milieu directement à partir de levures suivant la méthode de TOSIC et WALKER (7). Le pH de ce milieu modifié est égal à 4,4 tandis que celui du milieu utilisé par DUPUY est égal à 5,1. Ce milieu d'isolement modifié est très satisfaisant du fait que seules les bactéries du type acétique se développent avec les levures. Après incubation des boîtes à 26-28°C pendant deux ou trois jours, les colonies de bactéries minuscules et peu apparentes, souvent translucides, sont choisies au hasard et repiquées sur le nouvelles boîtes, pour purification. L'exament au microscope de la culture révèle de courts bâtonnets, avec parfois des formes bizarres, quelquefois mobiles. De chaque boîte, une colonie représentative est prélevée pour être repiquée sur milieu solide incliné. Ce milieu est constitué de glucose, d'extrait de levure, de carbonate de calcium; il est solidifié par l'agar.

2°) **Identification taxonomique**

Des cultures sont faites suivant les procédés décrits par DUPUY (4), qui avait légèrement modifié les procédés de FRATEUR (1). Les propriétés suivantes des bactéries sont étudiées et consignées. Les commentaires sont indiqués entre parenthèses :

1) Aspect de la colonie isolée sur agar (peu important pour l'identification taxonomique, mais utile ultérieurement pour vérifier les changements dans la culture).

2) Couleur de la colonie sur glucose-extrait de levure-carbonate de calcium-agar (utile dans l'identification de deux espèces).

3) Aspect microscopique du microorganisme (pas très stable, des formes anormales apparaissant fréquemment ; cependant tous se présentent sous la forme de courts bâtonnets).

4) Mobilité du microorganisme (caractéristique variable).

5) Coloration de Gram, réaction après 24 à 48 heures de culture en milieu liquide (toutes les bactéries doivent être Gram-négatives).

6) La production d'une pellicule lourde est notée (beaucoup de cultures produisent une pellicule légère, mais une pellicule lourde et résistante indique une production de cellulose par **Acetobacter xylinum)**.

7) La production d'acide à partir du glucose est déterminée par l'observation de la disparition du carbonate de calcium sur les milieux inclinés contenant 10 % de glucose, 0,1 % d'extrait de levure (Difco), 3 % de carbonate de calcium et 2 % d'agar.

8) La production d'acide cétogluconique est déterminée grâce à l'apparition de cristaux de sel de calcium typiques dans le milieu précédent (dans ces conditions, la production de céto-5 gluconate de calcium indique que l'organisme est un **Pseudomonaceae)**.

9) La production de catalase est observée après deux à trois jours de croissance sur le même milieu (7) en mélangeant une anse de culture à une goutte d'eau oxygénée sur une lame de verre et en observant l'apparition de petites bulles d'oxygène.

10) La transformation de l'éthanol en acide acétique est testée sur le milieu contenant 3 % d'éthanol (ajouté aseptiquement au milieu juste avant l'ensemencement), 0,1 % d'extrait de levure (Difco), 2 % de carbonate de calcium et 2 % d'agar. Les tests sont habituellement faits sur boîte de Pétri en portant une anse de culture sur de l'agar; 4 ou 5 cultures sont essayées sur la même boîte. Chaque fois que le test est négatif sur boîte de Pétri un autre essai est fait sur milieu incliné du même type. La disparition du carbonate de calcium est aisément détectée (tous les **Acetobacter** doivent donner un test positif sur ce milieu, les

cultures donnant un test négatif ne sont pas classées comme **Acetobacter).**

11) La suroxydation de l'acide acétique est observée sur les mêmes boîtes ou cultures inclinées décrites en 10) quand on note la reprécipitation du carbonate de calcium. L'examen au microscope à faible grossissement est nécessaire pour voir les petits cristaux de carbonate de calcium formés autour de la culture. Ces tests sont seuls valables et si on le désire, d'autres essais peuvent être faits en milieu liquide (1,4).

12) L'utilisation du lactate est testée sur un milieu contenant 2 % de lactate de calcium, 0,1 % d'extrait de levure (Difco) et 2 % d'agar. En utilisant la même technique que celle décrite pour l'oxydation de l'éthanol, plusieurs cultures peuvent être comparées facilement sur une seule boîte de Pétri. La précipitation du carbonate de calcium indique l'utilisation du lactate. Elle est généralement facile à observer visuellement; cependant, pour les cultures se développant lentement, une faible quantité seulement de carbonate précipite, et un contrôle sous microscope à faible grossissement est alors nécessaire.

13) L'activité cétogène est déterminée sur un milieu contenant 2 % de glycérol, 0,1 % d'extrait de levure (Difco) et 2 % d'agar. Utilisant la technique oxydogramme de FRATEUR, le développement de plusieurs cultures est transféré dans des boîtes de Pétri contenant le milieu, et après 16 heures d'incubation à 26-28 °C on détecte la production de dihydroxyacétone par réduction directe à froid de la liqueur de Fehling. La zone de précipité d'oxyde de cuivre autour de la culture est facilement observée.

La conservation de la culture est faite sur un milieu ne produisant pas d'acide, contenant 3 % de glycérol, 0,1 % d'extrait de levure (Difco) et 2 % d'agar. Après croissance, les cultures sont conservées à basse température.

B. **RESULTATS**

1°) **Identification des cultures**

51 cultures ont été isolées et 43 ont été identifiées. La position taxonomique de ces cultures est résumée dans le tableau I.

TABLEAU I

Identification et classification des souches de bactéries étudiées
(d'après FRATEUR)

Acetobacter	**peroxydans** 0	**oxydans** 15	**mesoxydans** 6	**suboxydans** 21
43 cultures	non cétogènes 16		cétogènes 27	
Pseudomonas 8 cultures	non encore classés : 2 produisant de l'acide céto-5 gluconique 6 oxydant le glucose			

2°) **Répartition des Acetobacter**

a) **Raisins de la région des Graves**

Les échantillons préparés à partir des raisins prélevés dans quatre vignobles, sont d'excellentes sources d'**Acetobacter.** Après traitement au sorbate et après incubation pendant des périodes variées, on procède aux isolements : 20 cultures d'**Acetobacter** ont été obtenues à partir de ces quatre échantillons. La méthode d'isolement tend à donner la souche prédominante à un moment déterminé et ceci est variable comme le montre le tableau II.

Les deux autres échantillons ont donné des résultats du même ordre.

TABLEAU II

Répartition des **Acetobacter sp.** dans le moût de raisins pourris.

Echantillon	Temps d'incubation en jours			
	0	3	16	30
N° 1	**suboxydans**	**suboxydans**	**oxydans**	**suboxydans mesoxydans (Pseudomonas)**
N° 2	non isolé	**suboxydans**	**suboxydans mesoxydans**	**suboxydans (Pseudomonas)**

b) **Vinification**

Plusieurs groupes d'échantillons sont prélevés à différentes hauteurs d'une cuve en fermentation. Tous donnent le même genre de résultats : le marc est une bonne source d'**Acetobacter** et le moût en fermentation est pauvre en bactéries acétiques. Un essai a été fait pour déterminer le nombre d'**Acetobacter** en rayant le milieu d'une anse de platine, directement avec une dilution de l'échantillon. Après incubation, si le développement des levures n'est pas trop important, il est possible de compter les colonies bactériennes (Tableau III). Les chiffres trouvés sont valables seulement dans chaque série, puisque la standardisation de la technique n'est pas possible.

TABLEAU III

Nombre relatif **d'Acetobacter** à partir d'échantillons variés

Echantillon	N° 1		N° 2	
Date	2 octobre	8 octobre	9 octobre	11 octobre
Dilution	104	0	0	0
Mélange de marc	0	5	18	6
Haut de la cuve	0	6	13	2
Milieu de la cuve	—	—	1	—
Bas de la cuve	0	2	1	0

Le nombre de cultures isolées des divers échantillons est sans doute une indication de leur distribution. Ainsi, quand les 31 cultures d'**Acetobacter sp.** sont isolées de leur milieu d'origine, les données résumées ci-dessus indiquent que les raisins dans la région de Graves sont les meilleures sources, avec le mélange de marc en fermentation. Quand ces cultures sont classées selon leurs propriétés cétogènes il est intéressant de noter que les raisins sont surtout une bonne source de bactéries de type fortement cétogène, tandis que dans le marc on observe l'inverse (Tableau IV). Comme cela sera discuté plus loin pour les échantillons de la région de Sauternes, l'addition de sorbate peut favoriser la prédominance des types cétogènes, et ainsi fausser les données. Un petit essai comparatif est fait avec les prélèvements d'une même cuve où les échantillons sont mis à incuber avec et sans sorbate. Dans ce cas, un **Acetobacter** cétogène et trois non cétogènes sont isolés en l'absence de sorbate, alors qu'aucun **Acetobacter** cétogène et cinq non cétogènes sont trouvés en présence de sorbate.

TABLEAU IV

Distribution d'**Acetobacter sp.** par rapport à leur origine et à leurs propriétés cétogènes

Echantillon	Nombre de cultures isolées	Distribution des cultures	
		cétogènes	non cétogènes
Raisins	20	18	2
Marc en fermentation	10	1	9
Haut de la cuve	0	0	0
Bas de la cuve	1	0	1

c) **Raisins de la région de Sauternes**

Une série d'échantillons attaqués par **Botrytis cinerea** (pourriture noble) étaient prélevés et un moût était préparé. Le moût est divisé en deux parties; du sorbate est ajouté dans l'une des deux. Après incubation pendant 8 jours, les échantillons sont ensemencés par stries sur agar et les colonies représentatives sont prélevées. Les résultats sont indiquées en détail dans le tableau V.

TABLEAU V

Distribution des **Acetobacter** par rapport à l'origine et au traitement

Echantillon	Nombre d'échantillons	Addition de sorbate de potassium	Nombre d'**Acetobacter sp.** isolés	
			type cétogène	type non cétogène
Raisins sains	4	—	0	3
	4	+	2	1
Raisins atteints de pourriture noble	3	—	0	2
	3	+	2	0

La conclusion intéressante est que le sorbate exerce une forte influence sélective inhibant les bactéries acétiques non cétogènes et favorisant les types fortement oxydants. Cependant il est difficile d'être affirmatif sur des conclusions tirées d'un nombre aussi faible d'échantillons.

TESTS D'IDENTIFICATION

Numéro de la souche	ORIGINE	Caractères macroscopiques		Caractères microscopiques		Caractères physiologiques						Nom de la souche
		Type de la colonie	Couleur	Forme	Mobilité	formation d'acide à partir du glucose	cristaux de 5-céto-gluconate de calcium	formation d'acide à partir de l'éthanol	suroxydation de l'acide acétique	utilisation de l'acide lactique	formation de composés cétoniques sur glycérol	
5	Léognan	très petite, visqueuse	opaque	bacilles courts en chainettes	+	+	+	+		−	+	**Ac. suboxydans**
6	Léognan	petite, claire	opaque	bacilles courts,	−	+	+	+		−	+	**Ac. suboxydans**
7	Pessac	petite, plate	opaque	bacilles courts	−	+	+	+		+	+	**Ac. mesoxydans**
8	Léognan	petite, lisse	opaque	bacilles courts, légère pellicule	−	+		+		−	+	**Ac. suboxydans**
9	Léognan	lisse	opaque	bacilles courts, légère pellicule	−	+		+		−	+	**Ac. suboxydans**
10	Léognan	petite, lisse	rose, opaque	bacilles courts par paires	+	+	+	+		−	+	**Ac. suboxydans var. roseum**

11	Barsac	petite, lisse	claire	petits bacilles courts	—	+		+	+	—	**Ac. oxydans**
12	Pessac	très petite, lisse	opaque	bacilles courts	—	—		—	—	+	**Pseuromonas sp.**
13	Pessac	très petite, lisse	opaque	bacilles courts	—	+		+	—	+	**Ac. suboxydans**
14	Léognan (1)	petite, lisse	opaque	bacilles courts par paires	+	+		+	—	—	**Ac. suboxydans**
15	Léognan	petite, lisse	opaque	bacilles courts	±	+		±	—	—	**Ac. oxydans**
16	Léognan	petite, lisse plate	opaque	bacilles courts	+	+	+	+	—	—	**Ac. suboxydans**
17	Léognan	petite, lisse	opaque	bacilles courts et coques par paires	—	+	+	+	—	+	**Ac. suboxydans**
18	Léognan	petite, lisse	rose sombre	bacilles courts	—	+		+	+	+	**Ac. mesoxydans**
19	Pessac	petite, lisse	crème	bacilles courts	—	+	+	+	—	+	**Ac. suboxydans**
20	Pessac	très petite, rugueuse dure	opaque	pellicule épaisse, bacilles courts et coques par paires	—	+	+	±	+	+	**Ac. mesoxydans var. xylinum**
21	Léognan (1)	très petite, muqueuse	claire	bacilles courts	—	+					(Faible développement)
22	Léognan	petite, muqueuse, bombée	claire	bacilles courts	—	+		+	+	—	**Ac. oxydans**

TESTS D'IDENTIFICATION

Numéro de la souche	ORIGINE	Caractères macroscopiques		Caractères microscopiques		Caractères physiologiques						Nom de la souche
		Type de la colonie	Couleur	Forme	Mobilité	formation d'acide à partir du glucose	cristaux de 5-céto-gluconate de calcium	formation d'acide à partir de l'éthanol	suroxydation de l'acide acétique	utilisation de l'acide lactique	formation de composés cétoniques sur glycérol	
23	Léognan (2)	lisse, plate	brun rouge (sur glucose)	bacilles courts et coques par paires	+	—		—			+	(culture perdue)
24	Léognan	petite, lisse	opaque	bacilles courts	—	+		+		+	—	**Ac. oxydans**
25	Léognan	petite rugueuse et dure	opaque	pellicule épaisse, bacilles courts, coques par paires	+	—	+	+	+	+	+	**Ac. mesoxydans var. xylinum**
26	Léognan (2)	très petite, lisse	opaque	bacilles courts, visqueux	+	—		±		+	—	**Ac. oxydans**
27	Sauternes	très petite, lisse	opaque	bacilles courts, épais	—	—		+	+	+	—	**Ac. oxydans**

28	Sauternes	très petite, lisse	opaque	bacilles courts, longs	—	—		+	+	+	—	**Ac. oxydans**
29	Sauternes	très petite, lisse blanche	opaque	bacilles courts en amas	—	+		+	+	+	—	**Ac. oxydans**
30	Sauternes	très petite, lisse blanche	opaque	bacilles	—			+	+	+	—	**Ac. oxydans**
31	Barsac	très petite, lisse, transparente	brun foncé	bacilles groupés pellicule mince	—	+		+	+	+	+	**Ac. mesoxydans**
32	Barsac (3)	très petite, lisse, transparente	claire	bacilles groupés en chaînettes	—			+	+	+	—	**Ac. oxydans**
33	Barsac (3)	très petite, lisse, transparente	claire	bacilles groupés en chaînettes	+	+		+	+	+	—	**Ac. oxydans**
34	Sauternes	très petite, lisse transparente	légèrement rosé, opaque	bacilles en chaînes et en amas	—	+	+	+		—	+	**Ac. suboxydans**
35	Sauternes	très petite, lisse, transparente	légèrement rosé, opaque	bacilles en chaînes et en amas	—	+		+		—	+	**Ac. suboxydans var. roseum**
36	Sauternes	très petite, lisse, transparente	opaque	bacilles très courts en chaînes	—	+	+	+		—	+	**Ac. suboxydans**
37	Sauternes	très petite, lisse, transparente	opaque	bacilles en chaînes et en amas	—	+	+	+		—	+	**Ac. suboxydans**
38	Barsac (3)	petite, lisse, blanche	légèrement rosé, opaque	bacilles par paires	+	+	+	+		—	+	**Ac. suboxydans**

TESTS D'IDENTIFICATION

Numéro de la souche	ORIGINE	Caractères macroscopiques		Caractères microscopiques		Caractères physiologiques						Nom de la souche
		Type de la colonie	Couleur	Forme	Mobilité	formation d'acide à partir du glucose	cristaux de 5-céto-gluconate de calcium	formation d'acide à partir de l'éthanol	suroxydation de l'acide acétique	utilisation de l'acide lactique	formation de composés cétoniques sur glycérol	
39	Preignac	petite, lisse, blanche	opaque	bacilles très courts	—	+	+	+		—	+	**Ac. suboxydans**
40	Léognan	petite, lisse, transparente	opaque	bacilles très courts	—	+	+	+		—	+	**Ac. suboxydans**
41	Léognan	petite, lisse, blanche	légèrement rosé, opaque	bacilles très courts, pellicule lourde	—	+	+	+		+	+	**Pseuromonas sp.**
42	Léognan	petite, rugueuse, gélatineuse	claire	bacilles en amas, pellicule lourde	—	+	+	—		+	+	**Pseudomonas sp**
43	Léognan	petite, lisse, transparente	opaque	bacilles très courts	—	+	+	+		—	+	**Ac. suboxydans**
44	Léognan	petite, lisse, blanche	opaque sombre	bacilles très petits	—	+	+	+		—	+	**Ac. suboxydans**

45	Léognan	très petite, transparente et unie		bacilles visqueux	—	+	+	—		—	+	**Pseuromonas sp.**
46	Pessac	petite, lisse bombée,	opaque	bacilles très courts	—	+	+	+		—	+	**Ac. suboxydans**
47	Pessac	petite, lisse, opaque	opaque	bacilles très courts	—	+	+	+		—	+	**Ac. suboxydans**
48	Léognan (2)	petite, lisse, blanche	claire	bacilles en chaînes	—	+		+	+	+	—	**Ac. oxydans**
49	Léognan (2)	taille moyenne, lisse	opaque	bacilles	—	+		+	+	+	—	**Ac. oxydans**
50	Léognan	lisse	opaque	bacilles très courts	—	±		+	+	+	—	**Ac. oxydans**
51	Léognan (1)	taille moyenne, lisse	claire	longs bacilles	—	+		+	+	+	—	**Ac. oxydans**
52	Léognan (2)	taille moyenne, lisse	opaque	bacilles en chaînes et en amas	—	±		+	+	?	—	**Ac. oxydans**
53	Léognan	moyenne, lisse, gélatineuse	opaque	bacilles	+	—		—		+	—	**Pseuromonas sp.**

(1) moût en fermentation.

(2) marc

(3) raisins aigres

(4) raisins atteints de pourriture noble.

C. DISCUSSION ET CONCLUSION

La méthode d'isolement des bactéries acétiques à partir des raisins et à des étapes variées de la vinification est facilement applicable. Il est probable qu'une méthode quantitative pourrait être imaginée, si c'était souhaitable; sur le milieu sélectif employé, les autres genres de bactéries poussent difficilement. L'addition d'acide sorbique contrôle la croissance des levures et semble favoriser l'isolement des bactéries acétiques cétogènes.

Les raisins ont une flore prédominante d'**Acetobacter** cétogènes tandis que le marc en fermentation possède une flore à prédominance non cétogène; le moût en fermentation contient peu d'**Acetobacter,** mais DUPUY (1957) a isolé 28 souches non cétogènes et 8 souches cétogènes dans les vins. Il a trouvé un grand nombre de **peroxydans** (12 sur 36), tandis que dans ces essais aucun **peroxydans** n'a été rencontré. Des types d'**Acetobacter sp.** fortement oxydants trouvés sur le raisin, aux types très faiblement oxydants trouvés en vinification, la transition peut paraître d'abord difficile à expliquer; en réalité elle est soumise à des paramètres tels que la résistance à l'alcool, l'anhydride sulfureux, les conditions d'anaérobiose, etc.

Les difficiles problèmes de taxonomie de groupe n'ont pas été abordés, et les résultats sont basés sur la classification de FRATEUR qui divise les bactéries acétiques en quatre groupes. De récentes suggestions de LEIFSON (8), ASAI et SHODA (9), DE LEY (2) et STANIER et *al.* (10), sont sans doute plus raisonnables. Elles divisent les bactéries acétiques en deux groupes. Dans le groupe des **suboxydans,** fortement oxydants, on classe **Pseudomonas sp.;** le reste est classé comme **Acetobacter sp.** Si ce système était adopté, beaucoup d'**Acetobacter sp.** devraient être classés comme **Pseudomonas sp.** Le seul critère utilisé dans cette étude (l'oxydation de l'alcool en acide acétique) pour séparer les **Acetobacter** n'est plus alors aussi important. Dans une étude élargie de ce problème, on doit penser à la présence sur les raisins de **Pseudomonas** qui ont la possibilité de produire rapidement des composés cétogènes dans certaines conditions à partir du glucose, et qui ne peuvent être classés comme bactéries acétiques.

Nous tenons à remercier très vivement Mademoiselle DOMERCQ et Madame LAFON dont l'assistance et les conseils, à tous les stades de cette recherche, ont été indispensables et très appréciés.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) FRATEUR J. — Essai sur la systématique des **Acetobacter, La cellule,** 1950, **53**, 287-392.

(2) DE LEY J. — Comparative carbohydrate metabolism and a proposal for a phylogenetic relationship of the acetic bacteria, **J. gen. Microbiology,** 1961, **24,** 31.

(3) DUPUY P. — Recherche d'une technique d'isolement des **Acetobacter** du vin, **Ann. Technol. Agric.,** 1952, **1,** 107-112.

(4) DUPUY P. — Les **Acetobacter** du vin. Identification de quelques souches, **Ann. Technol. Agric.,** 1957, **2,** 217-233.

(5) PEYNAUD E. et DOMERCQ S. — Présence démontrée de bactéries lactiques sur les raisins mûrs, **C.R. Acad. Sci.,** 1961, **252,** 343.

(6) BLOUIN J. — Contribution à l'étude des combinaisons de l'anhydride sulfureux dans les moûts et les vins, **Thèse Docteur-Ingénieur,** Bordeaux 1965.

(7) TOSIC J. et WALKER T.K. — A procedure for characterization of the acetic acid bacteria, **J. Soc. Chem. Ind.,** 1946, **65,** 104-107.

(8) SEIFSON E. — The flagellab and taxonomy of species of **Acetobacter, Antonie van Leewenhoek,** 1954, **20,** 102.

(9) ASAI T. et SHODA K. — The taxonomy of **Acetobacter** and allied oxidative bacteria, **J. gen, Appl. Microbiology,** 1959, **4,** 289.

(10) STANIER R.Y., PALLERONI N.J. et DOUDOROFF M. — The aerobic **Pseudomonas :** a taxonomic study, **J. gen. Appl. Microbiology,** 1966, **43,** 159.