

Origine et dépistage des *Bacillus* contaminants les *vitro*-cultures de Palmier dattier et importance des conditions de manipulations des tissus

Benjama Ah., Cherkaoui B. et Al-Maii S.
Laboratoire de Phytobactériologie, CRHPS-BP. 533, Marrakech

Résumé

Des contaminations bactériennes affectent les tissus du palmier dattier en culture in vitro. La recherche de l'origine du Bacillus contaminant a révélé leur endophytisme. L'utilité d'un test de dépistage est donc nécessaire. Le milieu de culture des tissus adapté et enrichi par la peptone (260 mg/l) et l'extrait de levure (80mg/l) est mis au point pour détecter ces contaminants. Il permet l'extériorisation rapide des contaminations en 1 à 4 jours seulement au lieu d'une semaine voire même des mois pour le milieu de culture non enrichi.

La lutte contre ces bactéries contaminantes est effectuée par des antibiotiques, mais l'efficacité de ces derniers nécessite des mesures d'accompagnement telles que :

□ *Le nettoyage des tissus contaminés par rinçage dans l'eau distillée stérile dans un premier stade qui permet de diminuer la population bactérienne, et ensuite en solution aqueuse d'antibiotiques pour lutter contre ces bactéries avant même la mise en culture des tissus en tubes.*

□ *La stérilisation particulière du matériel (scalpels et pinces pendant 2h. à 180°C/.) contaminés par ces bactéries sporulantes en utilisant le bec benzène et l'alcool 95° s'avère très efficace au moment de leur emploi.*

□ *La lutte contre ces contaminations en utilisant toutes ces précautions sont autant efficaces que les tissus sont jeunes.*

Mots clés : Palmier dattier, culture *in vitro*, contaminations, bactéries, *Bacillus* spp., assainissement

Summary : Origin and detection of *Bacillus* contaminating date palm vitro-culture and importance of manipulations conditions

Tissues of date palm, when cultured in vitro, are subject to bacterial contamination. These contaminations are caused by several Bacillus spp. which are of endophytic nature. Thus early detection of these contaminants is essential to prevent loss of tissus.

The in vitro adapted medium used for tissue of micropropagation supplemented by pepton (260 mg/l) and yeast extract (80 mg/l) was found usefull. This adjusted medium was able to detect contaminants rapidly (1- 4 days) instead of one week or several months with normal medium.

The efficiency of control of the bacteria using antibiotics needs some measures :

□ *Cleaning of contaminated tissues by washing them in distilled water, followed by dipping the tissues in the antibiotics solution, before culturing in the physiological medium.*

□ *Sterilisation of tools (scalpels and forceps at 180°C/2h.), using alcool 95° and bec benzen flame during their utilisation.*

□ *These measures are more useful when culturing young tissue of date palm.*

Key words : Date palm, in-vitro culture, contaminations, bacteria, *Bacillus* spp.

ملخص : مصدر وكشف *Bacillus* لأنسجة النخيل داخل الأنبوب و أهمية طرق استعمال هذه الأنسجة

بن جامع ع.، الشرقاوي ب. و الماعي س.
المعهد الوطني للبحث الزراعي بمراكش

تواجه زراعة أنسجة النخيل مشكل التعفنات البكتيرية الملوثة نوع *Bacillus* spp داخل النسيج. لذلك وضع تحليل معدل يثبت تعفن النسيج أو عدمه قبل بداية الزراعة داخل الأنبوب. فبإضافة المادتين الكيمايئيتين : eptone (260 mg/l) و extrait de levure (80mg/l) إلى الوسط الغذائي للنسيج تمكنا من إبراز البكتيريا المسببة للتعفن خلال يوم إلى أربعة أيام فقط عوض أسبوع أو عدة أشهر بعد الزراعة.

لمقاومة هذه البكتيريا استعملت عدة مضادات حيوية، إلا أن الحصول على فعالية هذه المواد لا يتم إلا إذا اتخذت الإحتياطات التالية :

□ أبانت التجارب على مدى أهمية تقنيات غسل النسيج بالنسبة لنجاح عملية تطهير الأنسجة الملوثة، إذ يجب غسلها بالماء المعقم للتخفيض من عدد البكتيريا الملوثة، ثم بمطول المضاد الحيوي في الماء المعقم للمعالجة الأولية.

□ تعقيم الأدوات المستعملة خلال زراعة النسيج (pincés, sclapels)، (180°C/2h) و الملوثة ب (*Bacillus* spp) المفرز للأبواغ ب (Bec benzène) و (Alcool 95°) عند استعمالها.

□ يجب أن يكون النسيج المعالج صغير السن.

الكلمات المفتاحية : النخيل، زراعة الأنسجة، الثوت البكتيري، *Bacillus* spp

Introduction

La micropropagation est une méthode permettant la multiplication *in vitro* des plantes, en conditions aseptiques et stériles. Cependant, beaucoup de cultures *in vitro* des plantes ne gardent pas leur asepsie. Les acariens, les thrips les champignons et les bactéries sont des contaminants potentiels (Blake, 1988 ; Enjalric *et al.*, 1986 ; Leggat *et al.*, 1988).

Les contaminations bactériennes sont considérées comme étant les plus sérieuses. Elles peuvent entraîner la réduction de la multiplication, la vitesse d'enracinement ou même la mort des cultures (Leary *et al.*, 1986 ; Cornu et Michel, 1987 ; Leifert *et al.*, 1989).

Les contaminations en culture des tissus peuvent provenir de deux sources :

- soit avec les tissus des explants (microorganismes vivant en surface ou endophytes).
- soit à travers des erreurs de manipulations au laboratoire (Bradbury, 1988).

L'asepsie est l'élément de base qu'il faut respecter en culture *in vitro* afin d'éviter les contaminations bactériennes, fongiques ou autres.

Ces contaminations sont donc la conséquence de la survie des bactéries à la surface des explants stérilisés, ou sont endophytiques (à l'intérieur du tissu végétal). Les bactéries qui échappent aux techniques usuelles de stérilisation appartiennent à la famille des bactéries formant des spores tel que le genre *Bacillus*.

Le palmier dattier cultivé *in vitro* est contaminé par le genre *Bacillus* (Leary *et al.*, 1986 ; Leary et Chun, 1989 ; Benjama, 1994 ; Benjama et Cherkaoui, 1996).

Le présent travail a pour but la détection de l'origine de ces contaminants, le dépistage des bactéries contaminantes comme moyen de prévention et la désinfection préalable des tissus contaminés. Il met aussi en évidence l'importance des conditions de manipulation dans la préservation des tissus en *in vitro*-culture.

Matériel et Méthodes

Recherche de l'origine des contaminations

L'origine des contaminations bactériennes des tissus du Palmier dattier en culture *in vitro* est la conséquence soit du manipulateur, des conditions de travail, du tissu végétal lui même ou du sol.

Contrôle des conditions du travail au laboratoire

- Contrôle de la stérilité du flux laminaire

Pour contrôler la stérilité des postes de travail, toute la surface des hottes a été recouverte pendant une heure par des boîtes contenant un milieu riche LPGA (Levure 7g/L, Peptone 7g/L,

Glucose 7g/L, Agar 18g/L) stérile. Les boîtes sont ouvertes durant toute l'heure de contrôle. Ces boîtes sont ensuite incubées à 27°C pendant 48 heures.

□ Contrôle de l'autoclave :

Afin de s'assurer du bon fonctionnement de l'autoclave, des échantillons de milieu de culture de tissus autoclavés (à 121°C/20mn) sont ensemencés sur milieu de culture bactérien LPGA. L'incubation dure 48heures à 27°C.

□ Contrôle du four Pasteur

Les pinces et scalpels stérilisés dans le four pasteur à 180°C durant 2 heures, sont passés en surface du milieu LPGA. Ces boîtes sont incubées à 27°C durant 48 heures pour observer la présence ou absence de croissance bactérienne.

Recherche des contaminations bactériennes au sein du tissu végétal non encore multiplié *in vitro*

On découpe et on dépose des petits fragments d'1 mm de diamètre du cœur du palmier dattier à tester sur milieu LPGA (milieu usuel riche) ou bien on broie une partie du cœur du palmier dattier dans l'eau distillée stérile (EDS). A partir du broyat onensemence le milieu de culture bactérien LPGA, et on observe la croissance bactérienne après 48 heures d'incubation à 27°C.

Recherche des contaminations bactériennes par analyse microbiologique du sol et de la rhizosphère des rejets

Huit échantillons du sol de la rizhosphère du sol des principaux clones et variétés cultivées *in vitro*, ont été ramenés du domaine de recherche de Zagora et analysés au laboratoire de Phytobactériologie sur le plan microbiologique (Tableau 1).

Un gramme du sol de chaque échantillon est mis en solution dans 4.5 ml d'EDS. Cette solution subit ensuite une série de dilutions de 10 en 10. Trois isolements par dilution sont réalisés sur milieu de King *et al* (1954) additionnée d'actidione (antifongique). Le milieu ensemencé est incubé à 27°C durant 24 à 48 heures. Les souches bactériennes isolées subissent les tests majeurs d'identification des *Bacillus* à savoir : les caractères morphologiques, Gram, la catalase et la sporulation.

Dépistage, en culture *in vitro*, de la croissance bactérienne par utilisation de milieu riche adapté

On a pris le milieu de Boxus et Terzi (1987) qu'on a adapté au palmier dattier par addition de l'extrait de levure (80 mg/L) et de la peptone (260 mg/L) au milieu physiologique utilisé pour la multiplication des *in vitro*-tissu du palmier dattier.

les explants issus du coeur du palmier dattier y sont repiqués. L'expérimentation est conduite sur 20 tubes enrichis et 10 tubes non enrichis (témoins). L'incubation se fait dans une chambre de culture à 27°C à une intensité lumineuse de 2500 lux, et une photopériode de 16/8. L'observation de la croissance bactérienne se fait durant une semaine.

Nettoyage des tissus contaminés

Quarante huit plantules appartenant au génotype Ziz (clone du palmier dattier), et dont la contamination bactérienne est sous forme de film au dessus du milieu de culture font l'objet de cette expérience. Sous conditions stériles, les *vitro*plants contaminés sont débarrassés des parties nécrosées sur papier stérile, les pinces et scalpels sont trempés dans l'alcool 95° et flambés au bec benzen à chaque coup de scalpel et pince, et en déplaçant le *vitro*-plant de plus en plus propre sur une partie du papier stérile.

Le *vitro*-plant subit ensuite une série de nettoyage. La première consiste en un rinçage dans un tube contenant 20 ml d'EDS, suivi de trois rinçages successifs dans une solution d'EDS contenant la novobiocine à 20µg/ml. Chaque trempage dure cinq mn en agitation. Après cette série de nettoyage, le *vitro*-plant (VP) "apparemment propre" est déposé sur un nouveau papier filtre stérile, séché, puis transféré sur milieu de culture de tissus contenant la novobiocine à 20µg/ml. Le témoin consiste en un simple rinçage des tissus contaminés dans l'EDS. L'incubation se fait dans une chambre de culture à 27°C, à une intensité lumineuse de 2500 Lux et une photopériode de 16/8 heures. Les observations se font toutes les semaines durant 40 jours. Ensuite, les *vitro*-plants maintenus propres sont repiqués de nouveau sur milieu de culture de tissus ne contenant pas le produit traitant (repiquage normal) pendant 40 jours et observés chaque semaine.

Résultats et discussion

Origine des contaminations

Contrôle des conditions de travail :

stérilité du flux laminaire :

Le test de contrôle de la stérilité des postes de travail s'est révélé négatif, c'est à dire qu'il n'y avait pas de développement des bactéries sur milieu de culture LPGA. Ce contrôle de l'endroit de travail est à répéter d'une manière périodique.

Contrôle de l'autoclave

Le milieu contenu dans les tubes avec des tissus contaminés *in vitro* et autoclavés, a été réensemencé sur milieu de culture bactérien LPGA stérile. Il s'est révélé exempt de contaminations bactériennes à l'exception de quelques tubes. On conseille alors d'augmenter l'autoclavage de ces tubes contaminés (verrerie sale) à deux fois 20 mn, à 121°C, espacées d'un léger refroidissement pour provoquer des chocs thermiques qui sont fatales aux bactéries.

Contrôle du matériel de manipulation

Les résultats de ce contrôle sont négatifs. La stérilisation des scalpels et pinces dans le four pasteur à 180°C pendant 2 heures est efficace. Cependant, on recommande leur stérilisation juste avant leur utilisation, et l'emploi de l'alcool 95° et le bec Benzène pour leur flambage.

Les résultats de ce contrôle sont négatifs. La stérilisation des scalpels et pinces dans le four pasteur à 180°C pendant 2 heures est efficace. Cependant, on recommande leur stérilisation juste avant leur utilisation, et l'emploi de l'alcool 95° et le bec Benzène pour leur flambage.

Les résultats de contrôle des conditions de manipulation des tissus et les essais d'isolement des *Bacillus* à partir de matériel stérile sont négatifs. Nos résultats ne concordent pas avec ceux trouvés par Singha et al. (1987) qui ont pu isoler les souches de *Bacillus spp* à partir de pinces striées usagées, trempées dans l'alcool 70°C ou 95°C et flambées à travers un brûleur. Ils ont rapporté que le flambage au bec benzène fournit une stérilisation efficace. Constantine et al. (1979) rapportent eux aussi la survie de *Bacillus pumilus* sur des pinces flambées à l'alcool 75°C. Ces résultats montrent que l'alcool 75°C et le brûleur ne suffisent pas pour détruire les spores de *Bacillus*. En revanche, ces auteurs rapportent que l'insertion des pinces dans le "bacti-cinerator" constitue un moyen de stérilisation efficace.

A notre sens les résultats trouvés par Singha et al. (1987) étaient prévisibles puisque la stérilisation des pinces était faite au départ dans un autoclave (121°C pendant 20 mn) et non pas dans un four Pasteur bien conçu pour la stérilisation de ce genre de matériel (C'est à dire 180°C au moins pendant 2 heures au plus). Pourtant on partage le même avis sur le fait que malgré l'immersion dans l'éthanol suivie par le flambage à l'aide du brûleur comme moyen de stérilisation, la procédure est inadéquate contre les *Bacillus spp.* qui produisent des spores résistantes à la température et qui sont récalcitrants à l'éthanol. La stérilisation efficace des instruments contaminés par des bactéries formant des endospores exige leur exposition aux fortes températures obtenues par le couple rinçage à l'alcool 95°C - flambage au bec benzène (flamme bleu) ou dans un bacti-cinerator.

Contrôle de la propreté du tissu végétal nouvellement introduit pour la micropropagation par milieu riche (dépistage)

Comme le montre la Figure 1, les tissus découpés et déposés sur le milieu de culture adapté et enrichi ont révélé la présence des bactéries au sein du tissu végétal issu des rejets de palmier dattier fraîchement introduit au laboratoire de culture de tissus. Les bactéries ont été identifiées comme des *Bacillus* (Benjama, 1994 ; Benjama et Cherkaoui, 1996).



Figure 1. Développement bactérien à partir de macérat entourant le coeur de palmier dattier

Cassells (1991) confirme ce résultat. Il avance que les *Bacillus* appartenant à la catégorie des bactéries de forme "L" associées aux plantes sont intracellulaires et donc leur désinfection par des antiseptiques de surface ne les atteint pas. Ils échappent donc aux effets de la stérilisation de surface du matériel végétal. Ces contaminations restent donc à l'état de latence pour ne manifester leur croissance qu'à travers les milieux de culture des tissus. Il serait donc nécessaire de les dépister avant que le tissu végétal ne soit multiplié *in vitro*. Cette analyse nous montre donc que ces *Bacillus* arrivent avec le tissu du palmier dattier à partir du champs. Ce qui confirme leur origine et leur caractère endophyte tel que développé dans ce travail.

Analyse microbiologique du sol

A partir des huit échantillons de sol de rhizosphère analysés des rejets de palmier dattier à Zagora, 48 souches bactériennes différentes sur le plan morphologique, ont été isolées (Tableau 1).

Tableau 1. Localités des souches bactériennes isolées à partir du sol des rejets au domaine expérimental de Zagora

localité	nombre de souches	% de <i>Bacillus</i>
Nebch AF15	12 (7BS; 3F; 1BSS)	14.5
AJ1	6 (4BS; 1F; 1ni)	8.3
P10 Sud BSTMN F17	8 (4BS; 3F; 1ni)	16.6
Essai Bayoud/ BFG	6 (6BS)	12.5
Essai Bayoud /JIL	4 (3BS; 1ni)	6.2
Essai Bayoud /AIRL	4 (3BS; 1F)	6.2
P9 Sud A AJ1	5 (4BS; 1BSS)	10.4
AF15	3 (1F; 1BSS)	6.2
Total	48 (32 BS, 3 BSS; 10 F; 3 ni)	80.9

ni : non identifiée; BS : *Bacillus* avec spores; BSS : *Bacillus* sans spores

L'identification de ces bactéries contaminantes a révélé qu'il s'agit du genre *Bacillus* pour la plupart. Le but de l'analyse microbiologique du sol est de confirmer l'origine de ces *Bacillus*.

Parmi les 48 souches bactériennes isolées, 10 seulement sont fluorescentes sur le milieu King B et al (1954), soit un pourcentage de 20 % environ de l'échantillon réalisé. Les 35 autres souches sont des *Bacillus* (Tableau 1). Parmi ces 35 souches bactériennes, 3 seulement (354-4, 360-2, 360-6) ne possèdent pas de forme de résistance à savoir la spore. Quand aux autres souches (32) ayant la forme de bâtonnet droit ou courbé, Gram+ ou Gram-, possédant l'activité catalase et résistantes à une température de 80°C durant 10 minutes grâce à leur forme de conservation - la spore- sont attribuées au genre *Bacillus*. Le pourcentage élevé (environ 80 %) que représentent ces *Bacillus* par rapport à la population indigène du sol constitue donc un argument puissant de l'origine des contaminations bactériennes du tissu du palmier dattier en culture *in vitro*. L'eau d'irrigation à partir des puits et bassins a été analysée et a révélé aussi la présence des *Bacillus*. Ces bactéries sont absorbées par les tissus du palmier dattier pour vivre en conditions endophytes.

Dépistage des contaminations bactériennes dans les tissus

Les contaminations bactériennes peuvent survenir à n'importe quelle phase de la culture des tissus du palmier dattier. Ceci a été aussi observé (Boxus *et al.*, 1987) sur d'autres cultures tels que les arbres fruitiers et le fraisier où les contaminations ne montrent pas de symptômes sur les milieux de prolifération ou d'élongation, alors qu'elles se révèlent importantes sur le milieu d'enracinement. Cette constatation est valable pour les tissus de palmier dattier. Le dépistage des bactéries contaminantes, s'avère intéressant dès l'entrée du rejet au laboratoire. L'utilisation du milieu de culture de tissu adapté et enrichi, a permis l'extériorisation rapide des contaminants en un à quatre jours (sur les 20 tubes-100 %) alors que sur ce même milieu non enrichi, la croissance bactérienne est lente et faible (apparition du voile bactérien au bout de sept jours et plus dans six tubes sur dix). Ce test permet de ne multiplier *in vitro* que les explants issus de cœur non contaminé, alors que les explants contaminés doivent systématiquement subir les traitements nécessaires pour leur assainissement. Cette stratégie de lutte contre les contaminations bactériennes est aussi adoptée par certains auteurs (Cassells, 1986 ; Fisse *et al.*, 1987 ; Cassells *et al.*, 1988 ; Benjama *et al.*, 1996). D'autres auteurs ont eux aussi mis au point un autre milieu riche à base de " tryptic soy broth " à 4g/l (Leifert *et al.*, 1991) pour le dépistage des bactéries.

Effet du nettoyage sur la réussite de l'assainissement des *vitro*-plants très contaminés

Après 40 jours de traitement des *vitro*-plants et 40 jours après leurs repiquages sur milieu normal, le pourcentage de *vitro*-plants "propres" est de 5 % pour ceux qui ont subi une technique de nettoyage appropriée, alors que ce pourcentage est nul pour les *vitro*-plants témoins (simple rinçage dans l'EDS) et ce durant les vingt premiers jours du traitement (Tableau 2).

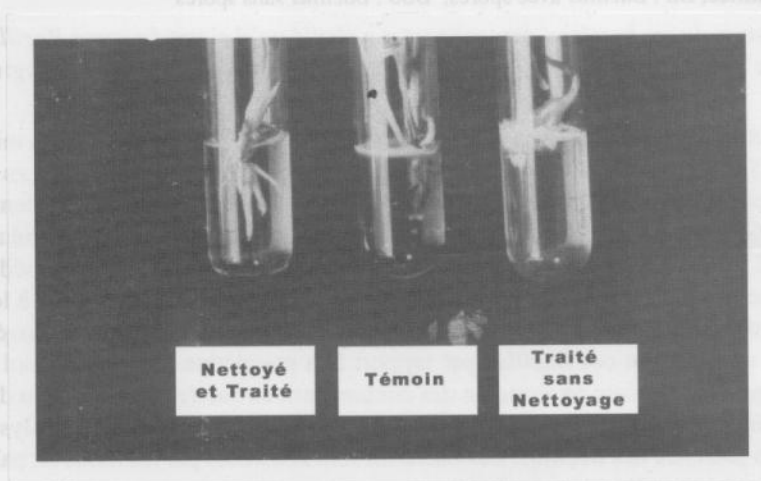


Figure 2. Effet du nettoyage sur la réussite de l'assainissement

Tableau 2. Pourcentage de culture propres obtenues avec ou sans nettoyage (témoin)

	Pourcentage de tissus propres	
	Durant traitement	Après repiquage
Tissus nettoyés	30 % (au 40 ème jour)	5 % (au 40 ème jour)
Témoin	0 % (au 20 ème jour)	0 %

Le traitement est donc sans efficacité si le *vitro*-plant contaminé n'est pas soigneusement nettoyé (fig.2) et les tissus âgés (stade plantule).

Les résultats du tableau 2 montrent donc bien que les techniques de nettoyage à priori sont, pour une grande part, importantes pour l'obtention de *vitro*-plants propres. Ce pourcentage est plus élevé quand on a affaire à des tissus jeunes (explant ou au stade bourgeons) et quand ces tissus nettoyés sont maintenus en milieu avec antibiotiques (100 % de tubes propres). Ces tissus se multiplient normalement sans aucune anomalie ni phytotoxicité.

Le flambage à chaque coup de scalpel et pince permet d'éliminer un grand nombre de bactéries qui permet d'éviter ainsi la contamination d'une autre partie du *vitro*-plant qui pourrait être indemne. Le rinçage des *vitro*-plants dans l'EDS avant son traitement par les antibiotiques permet de diminuer la population bactérienne. Cette population mesurée par dilution et comptage est de l'ordre de $8,4.10^9$ cfu/ml de milieu très contaminé au départ. Elle diminue à $8,4.10^5$ cfu/ml après rinçage de ces tissus. Cette population devient ainsi plus vulnérable vis-à-vis des produits antibiotiques. L'idée se rapportant aux techniques appropriées de nettoyage, nécessaires pour sauver les génotypes en culture est aussi avancée par Cornu et Michel (1987). Les cultures assainies serviront pour un nouveau programme de prolifération.

Conclusion

Cette étude met en évidence :

- L'endophytisme des *Bacillus* contaminants les *vitro*-plants de palmier dattier, qui sont originaires du sol et de l'eau d'irrigation.
- L'utilité du milieu riche pour le dépistage des bactéries contaminantes très tôt avant l'initiation de la culture des tissus afin de réduire les grandes pertes causées par ces contaminations.
- La nécessité de contrôler périodiquement les endroits de travail.
- La nécessité des précautions qu'il faut prendre en considération dans les manipulations des tissus en *vitro*-culture (nettoyage, rinçage et flambage des instruments).
- L'intérêt de l'utilisation de l'alcool 95°C, au lieu de 75°C, et le flambage par le bec benzène (flamme bleu) revêt un grand intérêt dans les travaux en bactériologie et en culture de tissus pour la réussite de l'assainissement des tissus contaminés. C'est le bec benzène qui fournit une stérilisation efficace.
- La stérilisation des instruments infectés par les bactéries formant les endospores, notamment les *Bacillus*, dans le four pasteur, juste avant leur utilisation, est indispensable et revêt un caractère particulier.

□ L'intérêt du nettoyage des tissus très contaminés préalablement par l'eau distillée stérile avant leur mise en tube de milieu physiologique contenant les antibiotiques, contribuent à la propreté de ces tubes qui peuvent constituer les repères de redémarrage de la multiplication sur des bases assainies et sans contaminations. Le pourcentage faible au départ (20 % de tubes propres par rapport aux témoins qui est de 100 % contaminés) doit augmenter à condition que ces mesures soient maintenues dans les temps après plusieurs repiquages (nettoyage en eau distillée suivie de rinçage par des bains d'antibiotiques et mises des tissus en milieu physiologique auquel on a additionné la novobiocine et la gentamycine au moins pendant 3 repiquages successifs de quarante jours chacun) (Benjama et Charkaoui, 1997).

Remerciements

Nous remercions nos collègues MM. Anjarne et Bougerfaoui du laboratoire de physiologie végétale de Marrakech pour leur aide précieuse et l'octroi des *vitro*-plants et les milieux de culture de tissu de palmier dattier.

Références bibliographiques

- Benjama Ah. (1994). Isolation of non pathogenic bacterial contaminants of micropropagated date palm (*Phoenix dactylifera* L.) and banana (*musa* sp) in Morocco. Al. Awamia, 85: 89-96.
- Benjama Ah., Cherkaoui B. (1997). Control of *Bacillus* contaminating date palm tissue in micropropagation using antibiotics. Pathogen and Microbial contamination Management in Micropropagation: 207-211.
- Benjama Ah., Cherkaoui B. , Samson R. (1996). Effet de certains antibiotiques et antiseptiques sur les *Bacillus* contaminant les cultures *in vitro* de tissus de palmier dattier . Al Awamia, 93: 53-61.
- Blake J. (1988). Mites and thrips as bacterial and fungal vectors between plant tissue cultures. Acta Horticulturae, 225 : 163-166.
- Bradbury J.F.(1988). Identification of cultivable bacterial from plants and plant tissue by use of simple classical methods. Acta Hort, 225 : 27-68.
- Cassells A.C. (1986). Production of healthy plants. In Alderson P.G., Dulforce W.N. (Eds). Micropropagation in horticulture: Practice and Commercial problems: 53-70. Institute of horticulture, London
- Cassells A.C. (1991). Problems in tissue culture: Culture contamination. Deburgh P.C. and Zimmerman r.h. (Eds). Micropropagation : 31-44.
- Cassells A.C., Hammey M.A., Carney B.F., Mc Carty E. Mc Hugh A. (1988). Problems posed by culturable bacterial endophytes in the establishment of axenic cultures of *Pelargonium x domesticum*: The use of *Xanthomonas pelargonium* specific ELISA, DNA probs and culture indexing in the screening of antibiotic treated donor plants. Acta Hort., 225: 153-162.
- Constantine D.R., Wiltshire S., Beddows C. (1979). Contamination of cultures. Long Ashton Res. Sta. rpt.: 74 (Abstr).
- Cornu D., Michel M.F (1987). Bacteria contaminants in shoot cultures of *Prunus avium* L. choice and phytotoxicity of antibiotics. Acta horticulturae, 212: 83-86.

- Enjarlic F., Carron M.P., Lardet L. (1988). Contamination of primary cultures in tropical areas : The case of *Hevea brasiliensis*. Acta Horticulturae, 225 : 57- 65.
- Fisse.C., Batlle A., Pera J (1987). Endogenous bacteria elimination in ornamental explants. Acta horticulturae, 212 : 87-90.
- King E.O., Ward M. K., Raney D.E (1954). Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. Journal of laboratory and clinical medicine, 44 : 301-307.
- Leary J.V., Chun W.W.C. (1989). Pathogenicity of *Bacillus Circulans* to seedlings of Date Palm (*Phoenix dactylifera*). Plant Disease, 73 (4) : 353-354.
- Leary J.V., Nelson N., Tisserat B., Allingham E. A. (1986). Isolation of pathogenic *Bacillus circulans* from callus cultures and healthy offshoots of date palm (*Phoenix dactylifera* L.). Applied and environmental microbiology vol. 52, No. 5 : 1173-1176.
- Leggat I.V., Waites W.M., Leifert C., Nicholas J. (1988). Characterisation of micro-organisms isolated from plants during micropropagation. Acta horticulturae, 225 : 93-102.
- Leifert C., Waites W.M., Nicholas J.R. (1989). Bacterial contaminants of micropropagated plant cultures. Journal of Applied Bacteriology, 67 : 353-361.
- Leifert C., Camotta H., Wright S.M., Waites B. Cheyne V. A., Waites W.M. (1991). Elimination of *lactobacillus plantarum*, *corynebacterium spp.*, *staphylococcus saprophytian* and *Pseudomonas paucimobilis* from micropropagated hemerocallis, choisya and *Delphinium* cultres using antibiotics. journal of Applied Bacteriology, 71 : 307-330.
- Singha S., Bissonnette G., Double M.L. (1987). Methods for sterilising instruments contaminated with *Bacillus sp*. From plant tissue cultres, Horticultural Science, 22(4) : 659.