

Effets de certains antibiotiques et antiseptiques sur les *Bacillus* contaminant les cultures *in vitro* de tissus de palmier dattier

A. Benjama¹, B. Cherkaoui¹ et R. Samson²

¹ Laboratoire de phytobactériologie. Centre régional du Haouz pré-sahara BP : 533 Marrakech, 40 000, Maroc.

² Inra - Station de pathologie végétale, 42, rue Georges Morel, BP 57, 49071-Beaucouzé. France cedex.

Résumé

Les contaminations bactériennes de tissus de *vitro*-plants de palmier dattier, provoquées par des bactéries du genre *Bacillus*, bactéries endophytes et sporulantes, se manifestent en tube sous forme soit de voile soit de film blanc ou jaune.

Sur onze antibiotiques et huit antiseptiques testés pour leur activité contre les cultures bactériennes pures et sur le tissu des *vitro*-plants, deux antibiotiques, la Novobiocine 20 µg/ml et la combinaison novobiocine 20 µg/ml + Gentamycine 10 µg/ml se sont avérés efficaces pour maintenir propres les *vitro*-plants contaminés. Après repiquage sur milieu physiologique normal sans produits antibiotiques, la croissance bactérienne reprend et 95 % des *vitro*-plants sont recontaminés.

Les produits antiseptiques tels que l'azide de Na et le thimerosal se sont avérés phytotoxiques aux doses bactéricides.

Mots clés : *Bacillus*, lutte, antibiotiques, *vitro*-plants, palmier dattier

Abstract

Effect of some antibiotics and antiseptics against *Bacillus* contaminating tissue culture of date palm

Bacterial contaminations of *in vitro* micropropagated date palm, found to be caused by bacteria of the genus *Bacillus*, endophytic and sporulating bacteria, appeared in tube as veil or as yellow or white film.

Among eleven antibiotics and eighth antiseptics, only Novobiocin at 20 µg/ml and a combination of Novobiocin 20 µg/ml and Gentamycin 10 µg/ml were effective against these bacteria, by maintaining clean contaminated *vitro*-plant. However, after transfer onto antibiotic free medium, bacterial contaminations developed again, and as many as 95 % of the *vitro*-plants got contaminated again.

Two antiseptics were phytotoxic at bactericidal concentrations : Sodium azide and thimerosal.

Keys words: *Bacillus*, antibiotics, *vitro*-plants, date palm

ملخص : دراسة فعالية بعض المواد الكيماوية المضادة لبكتيريا *Bacillus*

الملوثة لأنسجة النخيل المزروعة داخل الأنابيب

بن جامع ع 1،، الشرقاوي أ 1،، و سامسون ر 2

1 : المركز الجهوي للبحث الزراعي، مراكش، المغرب

2 : المعهد الوطني للبحث الزراعي، فرنسا

تعتبر زراعة الأنسجة من أهم طرق إكثار نخيل التمر في المغرب، هذه الطريقة تتعرض للتلوث البكتيري الذي يعرقل إكثار الأنسجة. تتلوث هذه الأنسجة داخل الأنابيب بسبب بكتيريا من نوع *Bacillus* الذي يوجد طبيعياً داخل النسيج.

تنتج هذه البكتيريا أبواغا في الأوساط الغذائية المستعملة لزراعة الأنسجة حيث تكون المستعمرات الملوثة حجبا أو طبقة صفراء أو بيضاء على سطح الوسط الغذائي.

قصد محاربة هذه البكتيريا الملوثة، اختبرنا فعالية إحدى عشر مادة مضادة و ثمان مطهرات على البكتيريا بمفردها، ثم على النسيج الملوثة. و أسفرت النتائج على فعالية

المادة Novobiocine بمقدار 20ug/ml و المركب Gen- Novobiocine + (20ug/ml)

tamycine (10ug/ml) كما تمكنت هذه المواد بتطهير الأنسجة من البكتيريا الملوثة مع الإشارة أنه بمجرد نقل الأنسجة المطهرة في وسط غذائي بدون المواد المضادة، تستطيع البكتيريا من جديد تلويث الأنسجة بنسبة % 95.

و من جهة أخرى، لقد أبانت النتائج أن استعمال المادتين Azide Na و Thimerosal يؤدي إلى تسمم و قتل أنسجة النخيل و لو بمحلول أدنى قادر على كبح نمو البكتيريا.

كلمات مفتاحية : مقاومة، مضادات حيوية، زراعة الأنسجة، النخيل،

Introduction

Les contaminations bactériennes *in vitro* de tissus de cultures de palmier dattier apparaissent à n'importe quelle phase de cette culture, phase d'initiation, d'élongation ou d'enracinement (Benjama 1994). Selon Boxus et Terzi (1987), les contaminations bactériennes ne se manifestent pas souvent sur les milieux de prolifération ou d'élongation, alors qu'elles apparaissent sur le milieu d'enracinement. Elles diminuent le taux de multiplication, réduisent la vitesse d'enracinement ou même entraînent la mort des cultures causant ainsi une grande perte au stade de la production commerciale (Fisse *et al.* 1987 ; Cornu et Michel 1987 ; Leifert *et al.* 1989a ; Leifert et Waites 1992).

Les bactéries contaminantes peuvent être introduites en culture *in vitro* soit sur le matériel végétal, soit à l'aide des instruments ou de verreries contaminés (Leifert *et al.* 1989b ; Leifert et Waites 1992). Les contaminations bactériennes de palmier dattier représentent un handicap sérieux à la maîtrise du processus de multiplication des têtes de clones sélectionnés. Nous nous proposons de tester

certaines substances antibiotiques et antiseptiques et les techniques appropriées à leur utilisation pour lutter contre ces bactéries contaminantes.

Matériel et méthodes

Matériel végétal

Les tests sont pratiqués sur des *vitro-plants* de palmier dattier contaminés, de la variété Ziz, cultivée au laboratoire de physiologie végétale depuis 1987.

Matériel bactérien

Les souches pures étudiées sont différentes espèces de *Bacillus* (Benjama 1994) (tableau 1).

Tableau 1. Différentes espèces de *Bacillus* isolées de *vitro*-cultures de palmier dattier et de bananier

Espèce déterminée	Aspect de la contamination en tube	Plante d'origine
<i>Bacillus pumilus</i>	voile	Palmier dattier (Inra)
<i>Bacillus brevis</i>	voile	Palmier dattier (Inra)
<i>Bacillus cereus</i>	film blanc	Palmier dattier et Bananier (Doo)
<i>Bacillus laterosporus</i>	film blanc	Palmier dattier (Inra)
<i>Bacillus cereus</i>	film blanc + voile	Palmier dattier (Inra)
<i>Bacillus sphaericus</i>	film orange	Palmier dattier (Inra)
<i>Bacillus circulans</i>	film crème	Palmier dattier (Inra) (Doo)
<i>Bacillus sp.</i>	film crème	Bananier (Doo)
<i>Bacillus subtilis</i>	film crème	Bananier (Doo)

(Source : Benjama 1994)

* Inra : Institut national de la recherche agronomique, Marrakech

* Doo: Domaine de Oued ouislane, Meknès

Détermination de l'activité inhibitrice d'antibiotiques et antiseptiques

Préparation du milieu de culture

Dix-neufs produits, 11 antibiotiques et 8 antiseptiques, ont été testés à différentes concentrations vis-à-vis de la croissance des souches pures de bactéries contaminantes (tableau 2). Les produits antibiotiques et antiseptiques sont incorporés après autoclavage au milieu de culture stérile (LPGA) en surfusion.

Préparation des cultures bactériennes

Les bactéries contaminantes ont été isolées, purifiées, identifiées et conservées sous huile de paraffine stérile sur milieu de culture LPGA (Levure 7 g/l, Peptone 7 g/l, Glucose 7 g/l, Agar 18 g/l). Des cultures âgées de 24 h ont été utilisées pour préparer des suspensions bactériennes ($5 \cdot 10^8$ bactéries/ml).

A l'aide de l'ensemencement multipoints qui permet de déposer des gouttes calibrées de 10^4 bactéries/goutte, nous avons ensemencé des boîtes de milieu LPGA

contenant les concentrations des produits à tester. Le témoin consiste en la culture des suspensions bactériennes sur LPGA sans substances. L'essai est répété trois fois dans les mêmes conditions d'expérimentation. L'incubation se fait à 27 °C durant 72 heures. La croissance bactérienne est observée toutes les 24 heures pendant 3 jours.

Assainissement des vitro-plants contaminés en tubes

Sous conditions stériles, les *vitro-plants* (VP) contaminés sont débarrassés des parties nécrosées sur papier stérile, en flambant à chaque coup scalpel et pinces, et en déplaçant le VP de plus en plus propre sur une partie du papier stérile. Le VP subit ensuite une série de nettoyages. Le premier consiste en un trempage dans un tube contenant 20 ml d'eau distillée stérile, suivi de trois trempages successifs dans la solution antiseptique ou antibiotique. Chaque trempage dure 5 minutes.

Après cette série de nettoyages, le VP est déposé sur un nouveau papier filtre stérile, séché, puis transféré sur milieu de culture de tissu pour jeunes plantules contenant soit une substance ou une combinaison de substances bactéricides à tester. L'incubation se fait dans une chambre de culture à 27 °C à une intensité lumineuse de 2.500 lux et une photopériode de 16 heures de lumière et de 8 heures d'obscurité. Les observations se font toutes les semaines durant 40 jours. Ensuite les VP sans contaminations visibles sont repiqués de nouveau sur milieu de culture ne contenant aucune substance traitante pendant 40 jours et observés chaque semaine. Le nombre de tubes traités est de 100.

Dépistage de la croissance bactérienne par utilisation de milieu riche

On ajoute au milieu physiologique d'initiation de l'extrait de levure (88 mg/l) et de la peptone (265 mg/l) (Boxus et Tersi 1987). Les explants issus du coeur du palmier dattier (clone H 5) y sont repiqués ; ensuite on observe la croissance bactérienne. L'expérimentation est conduite sur 20 tubes enrichis et 10 tubes non enrichis (témoins).

Résultats et discussion

Efficacité des substances testées sur la croissance des Bacillus

Parmi les antibiotiques testés, seules la Novobiocine et la Gentamycine ont inhibé la croissance de toutes les souches pures de *Bacillus* à partir des doses respectives de 1 mg/l et de 3,12 mg/l (tableau 2). Parmi les antiseptiques, le cristal violet, le vert de malachite, l'azide de sodium et le thimerosal sont actifs contre la croissance des *Bacillus*.

Tableau 2. Test de l'efficacité des différentes substances antiseptiques et antibiotiques contre les contaminations bactériennes en culture pure

Produits	Concentrations testées	Concentration minimale inhibitrice
Antibiotiques		
Augmentin Lactamides)		
Bacitracine (Polypeptides)		
Chloramphenicol (Phénicoles)		
Colistine (Polypeptides)	0,5 à 128 mg/l	Inefficaces contre toutes ou la plupart des souches bactériennes
Keflin (β-Lactamines)		
Netilmicine (Aminosides)		
Pénicilline (β-Lactamines)		
Streptomycine (Aminosides)		
Thyroticine		
Gentamycine (Aminosides)	0,64 à 200 mg/l	3,5 mg/l
Novobiocine (sel de Na)	0,5 à 128 mg/l	1 mg/l
Antiseptiques		
Actidione	0,5 à 128 mg/l	
2,4 D	0,5 à 128 mg/l	Inefficaces
Rouge de congo à 0,1 %	2 ; 3 ml/l	
Thiosulfate de Na	8 ; 5 ; 9 g/l	
Azide de Na	0,1 g/l	0,1 g/l
Cristal violet à 0,1 %	1 ml/l à 5 ml/l	1,5 ml/l
Vert de Malachite à 0,1 %	1 ml/l à 7 ml/l	3 ml/l
Thimerosal	0,1 mg/l	0,1 mg/l

Efficacité des substances en présence des vitro-plants contaminés

L'azide de sodium et le thimerosal se sont avérés phytotoxiques à très faible dose (0,1 et 0,01 g/l respectivement) au bout de la première semaine de contact avec les tissus du palmier dattier. Ils sont donc écartés de l'expérimentation. La concentration minimale inhibitrice en cultures pures des autres substances s'est avérée insuffisante pour éliminer les contaminations bactériennes en présence des *vitro-plants* de palmier dattier. Ces doses ont été augmentées et leurs combinaisons essayées.

Deux formules se sont révélées intéressantes pour assainir les VP contaminés. La première formule consiste en l'incorporation de la Novobiocine à raison de 20 µg/ml dans le milieu de culture de multiplication des tissus, et la seconde en l'association dans un seul milieu de Novobiocine à 20 µg/ml et Gentamycine à 10 µg/ml. Le pourcentage de *vitro*-plants propres ; c'est à dire à indice de contamination nul, est de 80 % durant les 40 jours de contact pour la Novobiocine (20 µg/ml), alors que pour la Novobiocine + Gentamycine (20/10 µg/ml), ce pourcentage est de 88 % sur 100 *vitro*-plants traités (tableau 3).

Tableau 3. Comportement des *vitro*-plants contaminés, après repiquage sur milieu avec antibiotique

Indice de contamination		0*	1*	2*	3*	total <i>vitro</i> -plants
Transfert sur milieu contenant	Délai de lecture (jours)					
Novobiocine	20	80**	17	0	3	
20 µg/ml	40	80	15	2	2	100
Novobiocine	20	91	7	0	2	
20 µg/ml +						
Gentamycine	40	88	5	2	5	100
10 µg/ml						

* Indice de contamination : 0 = sain, 1 = présence d'un nuage floconneux, 2 = présence d'un voile, 3 = présence d'un film bactérien, ** Pourcentage de tubes propres

Après repiquage des *vitro*-plants propres sur milieu physiologique sans antibiotique, le pourcentage des *vitro*-plants sans contaminations a fortement diminué au bout de 40 jours. Il redescend à 3 % pour la Novobiocine (20 µg/ml) et à 5 % pour la novobiocine + gentamycine (20 µg/ml + 10 µg/ml) (tableau 4). On pourrait expliquer cette chute du pourcentage des VP propres par le fait que :

- les bactéries du *vitro*-plant ne sont pas toutes en contact avec les antibiotiques apportés, et quand elles le sont, la dose d'antibiotiques peut être insuffisante. On a constaté qu' à la dose de 20 µg/ml, la novobiocine est bactéricide, alors qu'à 1 µg/ml, dose minimale inhibitrice, la novobiocine est bactériostatique. On a constaté aussi que ces antibiotiques ne pénètrent qu'à 3 mm dans le tissu par infiltration sous vide. Donc les bactéries qui ne sont pas atteintes par les produits restent vivantes. Elles reprennent leur activité dès que les VP sont repiqués sur un milieu de culture sans antibiotique. Cependant, pour Leifert *et al.* (1989a), des périodes limitées de contact des antibiotiques avec les contaminations causées par *Lactobacillus plantarum* chez *hemerocallis d'ora* peuvent suffire à éliminer les bactéries dans les cultures de tissus et permettre une bonne croissance des VP ;

- les *Bacillus* se conservent sous forme de spores qui leur confèrent une très grande résistance en conditions défavorables (Sneath *et al.* 1988 ; Freny *et al.* 1992). Les antibiotiques ne sont probablement pas efficaces contre cette forme de conservation. Ce qui rend la lutte encore plus difficile ;

- le produit pénètre assez mal dans les tissus des VP âgés. C'est pour cela que les différents auteurs conseillent l'application des traitements au stade explant.

Tableau 4. Comportement des *vitro-plants* propres issus de milieux avec antibiotiques, repiqués sur milieu sans antibiotique

<i>vitro-plants</i> provenant de milieux avec	Délai de lecture (jours)	Indice de contamination				total <i>vitro-plants</i>
		0*	1*	2*	3*	
Novobiocine	20	18**	19	49	14	
20µg/ml	40	3	22	11	64	100
Novobiocine	20	18	10	42	29	
20 µg/ml + Gentamycine	40	5	5	13	76	100
10 µg/ml						

* : Indice de contamination : 0 = sain, 1 = présence d'un nuage floconneux, 2 = présence d'un voile, 3 = présence d'un film bactérien. ** : Pourcentage de tubes propres

Il nous paraît important de noter que malgré les manipulations subies par les *vitro-plants* au cours de nos expériences, nous n'avons observé aucune variation phénotypique des tissus des *vitro-plants* de palmier dattier pouvant être provoquée par les doses d'antibiotiques. D'après les physiologistes, (Aouine, communication personnelle), il faut des doses supérieures à 50 µg/ml pour qu'on puisse éventuellement suspecter des variations génétiques.

Dépistage des contaminations bactériennes

Les contaminations bactériennes peuvent s'exprimer à n'importe quelle phase (initiation, élongation, enracinement) de la culture des tissus du palmier dattier. Ceci a été observé par Boxus et Terzi (1987) sur d'autres cultures tels que les arbres fruitiers et le fraisier. Les auteurs rapportent que les contaminations bactériennes ne se manifestent pas sur les milieux de prolifération ou d'élongation, mais seulement sur le milieu d'enracinement. Pour cela, le dépistage des bactéries contaminantes, s'avère intéressant dès l'initiation de la culture *in vitro* des explants. L'utilisation du milieu physiologique enrichi nous a permis l'extériorisation rapide des contaminations par *Bacillus* en 4 jours sur les 20 tubes (100 %), alors que les milieux non enrichis n'ont manifesté la

croissance bactérienne qu'au bout de 7 jours d'incubation, dans 6 tubes sur 10 (apparition du voile bactérien). L'intérêt de ce test consiste à dépister en un espace de temps réduit, les explants contaminés pour leur éventuel traitement. On peut reconnaître les rejets contaminés qui seront soit traités soit écartés.

Conclusion

Les bactéries du genre *Bacillus*, apportées vraisemblablement par l'explant, sont très difficiles à combattre à cause de leur capacité de sporulation, et donc d'adaptation aux conditions défavorables à leur croissance.

Les résultats obtenus jusqu'à présent semblent être prometteurs. Le travail se poursuit dans l'investigation d'autres produits plus efficaces contre ces contaminations. Cependant, sur le plan pratique et afin de limiter au maximum ces contaminations, des mesures simples sont à préconiser :

- la stérilisation de la verrerie et des instruments de repiquage, en four Pasteur à 180 °C pendant 2 heures juste avant leur utilisation;
- l'autoclavage des tubes usagés (tubes + milieu physiologique + contaminants) pendant 1 heure à 121°C;
- le nettoyage des *vitro-plants* avant leur assainissement est indispensable afin de diminuer la population bactérienne et la réduire à un seuil qui permettrait aux substances de jouer leur rôle antiseptique ou antibiotique;
- maintenir toutes les souches du palmier dattier en milieu physiologique avec 20 µg/ml de Novobiocine ou avec la combinaison Novobiocine - Gentamycine (20-10 µg/ml);
- ne repiquer que les souches du palmier dattier traitées et propres, et éliminer tous les tubes contaminés.

Remerciements

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

Références bibliographiques

- Benjama A. (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.
- Boxus Ph. and Terzi J.M. (1987). Big losses due to bacteria contaminations can be avoided in mass propagation scheme. *Acta Horticulturae*, **212** : 91-93.
- Cornu D. and Michel M.F. (1987). Bacteria contaminants in shoot cultures of *Prunus avium* L. Choice and phytotoxicity of antibiotics. *Acta Horticulturae*, **212** : 83-86.
- Fisse C., Batlle A. and Pera J. (1987). Endogenous bacteria elimination in ornamental explants. *Acta horticulturae*, **212** : 87-90.

Frenay J., Renaud F., Hansen W and Bollet C. (1992). *Bacillus*. Manuel de bactériologie clinique, 1 : 491-50

Leifert C. and Waites W.M. (1992). Bacterial growth in plant tissue culture media. *Journal of applied bacteriology*, **72**.

Leifert C., Waites W.M., Camotta H. and Nicholas J.R. (1989a). *Lactobacillus plantarum* ; a deleterious contaminant of plant tissue cultures. *Journal of applied bacteriology*, **67** : 363-370.

Leifert C., Waites W.M. and Nicholas J.R. (1989b). Bacterial contaminants of micropropagated plant cultures. *Journal of applied bacteriology*, **67** : 353-361.

Sneath P.H.A., Mair N.S., Holt J.G. (1988). Bergey's manual of systematic bacteriology. vol.2 : 1104-1138.