



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

**Σχολή Γεωπονικών Επιστημών**

**Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής & Αγροτικού Περιβάλλοντος**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**

**ΦΥΤΙΑΤΡΙΚΗ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ**

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ**

<<Χαρακτηρισμός και έλεγχος ευαισθησίας σε αντιβιοτικά και χαλκό απομονώσεων του φυτοπαθογόνου βακτηρίου *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* από περιοχές της Κεντρικής και Νοτίου Ελλάδας>>

**Αγγελική- Μαρία Ρουμελιώτη**

**Βόλος 2022**

<<Χαρακτηρισμός και έλεγχος ευαισθησίας σε αντιβιοτικά και χαλκό απομονώσεων του φυτοπαθογόνου βακτηρίου *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* από περιοχές της Κεντρικής και Νοτίου Ελλάδας.>>

“Characterization, antibiotic resistance and susceptibility to copper of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* isolates from Central and Southern Greece.”

Αγγελική- Μαρία Ρουμελιώτη

Μέλη Τριμελούς Εξεταστικής Επιτροπής:

1. Ευάγγελος Βέλλιος, Επίκουρος Καθηγητής (Επιβλέπων)
2. Παναγιώτης Μαδέσης, Επίκουρος Καθηγητής
3. Dr Φεβρωνία Λιολιοπούλου, μέλος ΕΔΙΠ

Copyright © ΡΟΥΜΕΛΙΩΤΗ ΑΓΓΕΛΙΚΗ- ΜΑΡΙΑ, 2022.

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

Απαγορεύεται η αντιγραφή, αποθήκευση και διανομή της παρούσας διατριβής, εξ ολοκλήρου ή τμήματος αυτής, για εμπορικό σκοπό. Επιτρέπεται η ανατύπωση, αποθήκευση και διανομή για σκοπό μη κερδοσκοπικό, εκπαιδευτικής ή ερευνητικής φύσης, υπό την προϋπόθεση να αναφέρεται η πηγή προέλευσης.

Η έγκριση της Μεταπτυχιακής Διατριβής Ειδίκευσης από το Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δε δηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα.

## Πρόλογος

Με την ολοκλήρωση της Μεταπτυχιακής Διατριβής Ειδίκευσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Βέλλιο Ευάγγελο, για την υποστήριξη, την επιστημονική του καθοδήγηση και για τις πολύτιμες γνώσεις που μου προσέφερε κατά τη διάρκεια των σπουδών μου.

Ευχαριστίες οφείλω και στην κ. Λιολιοπούλου Φεβρωνία, για την υποστήριξη και τη βοήθεια της καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της Μεταπτυχιακής Διατριβής Ειδίκευσης, καθώς και για τις πολύτιμες γνώσεις που μου προσέφερε.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω και τον κ. Μαδέση Παναγιώτη, για την υλικοτεχνική υποστήριξη κατά την διεξαγωγή του πειράματος, καθώς και την Δρ. Τσαλίκη Ελένη από το Ινστιτούτο Γενετικής Βελτίωσης και Φυτογενετικών Πόρων του ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ, για τη δωρεά σπόρων καπνού για την πραγματοποίηση των πειραμάτων.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω του γονείς και την αδερφή μου, που είναι πάντα δίπλα μου και με βοηθούν να πραγματοποιήσω τους στόχους μου.

## <<Περίληψη>>

Στην παρούσα Μεταπτυχιακή Διατριβή Ειδίκευσης, πραγματοποιήθηκε απομόνωση του βακτηρίου *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* από όγκους ελιάς, από περιοχές της Κεντρικής και Νοτίου Ελλάδος. Τα βακτήρια που απομονώθηκαν, χαρακτηρίστηκαν με βιοχημικά τεστ και με μοριακές μεθόδους. Σε 20 απομονώσεις που ταυτοποιήθηκαν ως *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, πραγματοποιήθηκε έλεγχος ευαισθησίας στο χαλκό, με τη μέθοδο εμπλουτισμού του θρεπτικού υποστρώματος με διάφορες συγκεντρώσεις. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα 19 από τις 20 απομονώσεις είναι ανθεκτικές στο χαλκό. Στη συνέχεια, έγινε έλεγχος ευαισθησίας 15 απομονώσεων στα αντιβιοτικά, με τη μέθοδο διάχυσης σε άγαρ με χρήση δισκίων διηθητικού χαρτιού εμποτισμένων με το αντιβιοτικό (disc diffusion method). Τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής: πενικιλίνη, στρεπτομυκίνη, ερυθρομυκίνη, τετρακυκλίνη και χλωραμφαινικόλη. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, όλες οι απομονώσεις είναι ευαίσθητες στην στρεπτομυκίνη, τετρακυκλίνη και χλωραμφαινικόλη και ανθεκτικές στην πενικιλίνη. Όσον αφορά την ερυθρομυκίνη, δύο απομονώσεις είναι μετρίως ευαίσθητες και οι υπόλοιπες ανθεκτικές.

Λέξεις κλειδιά: ανθεκτικότητα, θεικός χαλκός, ερυθρομυκίνη, πενικικιλίνη, στρεπτομυκίνη, τετρακυκλίνη, χλωραμφαινικόλη

## <<Summary>>

In the present study, isolates of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* were isolated from olive knots from Central and Southern Greece. The bacterial isolates were characterized by biochemical tests and molecular methods. Twenty isolates were evaluated *in vitro* for their sensitivity to copper compounds (copper sulfate) and fifteen isolates were evaluated for sensitivity to antibiotics (streptomycin, penicillin, tetracycline, chloramphenicol, erythromycin). Evaluation of copper and antibiotic sensitivity was performed using agar dilution assay and disc diffusion method respectively. According to the results, regarding sensitivity to copper compounds, nineteen out of twenty isolates were found copper resistant. Regarding sensitivity to antibiotics, fifteen and thirteen out of fifteen were found resistant to penicillin and erythromycin respectively. Additionally, two out of fifteen were characterized as intermediate sensitive to erythromycin and fifteen were found sensitive to tetracycline, chloramphenicol and streptomycin.

Key words: resistance, copper sulfate, erythromycin, penicillin, tetracycline, chloramphenicol, streptomycin

«Εγώ, η Αγγελική- Μαρία Ρουμελιώτη, είμαι η συγγραφέας αυτής της Μ.Δ.Ε. Αυτή η Μ.Δ.Ε. αντικατοπτρίζει την έρευνα που έγινε από εμένα και δεν έχει υποβληθεί (εξ ολοκλήρου ή μέρος της) σαν Μ.Δ.Ε. ή ως μέρος Διδακτορικής Διατριβής σε αυτό ή άλλο Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών Ιδρυμάτων Τριτοβάθμιας Εκπαίδευσης του εσωτερικού ή εξωτερικού. Όποια συνεργασία καθώς και το μέγεθος αυτής δηλώνονται επακριβώς στο αντίστοιχο πεδίο αυτής της διατριβής. Επίσης έχω διαβάσει όλες τις βιβλιογραφικές αναφορές που παρατίθενται στο τέλος.»

«Ως επιβλέπων της έρευνας που περιγράφεται σε αυτή τη διατριβή, δηλώνω ότι όλοι οι όροι του Εσωτερικού Κανονισμού του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών του Τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος έχουν τηρηθεί από την κα Αγγελική- Μαρία Ρουμελιώτη».



## Περιεχόμενα

|  |     |
|--|-----|
| Κατάλογος πινάκων.....   | xii |
| Κατάλογος εικόνων.....   | xxv |
| 1. Εισαγωγή.....   | 1   |
| 1.1 Φυτοπαθογόνα βακτήρια και παγκόσμια παραγωγή.....  | 1   |
| 1.2 Η ασθένεια <<καρκίνωση της ελιάς>>.....  | 1   |
| 1. 3.1 <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> .....                             | 3   |
| 1.3.2 Ταυτοποίηση του παθογόνου.....   | 4   |
| 1.4 Χρήση χαλκού στη φυτοπροστασία .....   | 5   |
| 1.4.1 Ιστορικά στοιχεία.....   | 5   |
| 1.4.2 Μηχανισμός δράσης.....   | 6   |
| 1.4.3 Ανθεκτικότητα φυτοπαθογόνων βακτηρίων στο χαλκό.....                                   | 7   |
| 1.4.4 Ανθεκτικότητα <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> στο χαλκό .....      | 8   |
| 1.5.1 Χρήση αντιβιοτικών στη φυτοπροστασία .....   | 8   |
| 1.5.2 Παραδείγματα αντιβιοτικών και μηχανισμός δράσης .....                                  | 9   |
| 1.5.2.1 Χλωραμφαινικόλη .....  | 9   |
| 1.5.2.2 Ερυθρομυκίνη .....   | 11  |
| 1.5.2.3 Πενικιλίνες.....   | 11  |
| 1.5.2.4 Τετρακυκλίνες .....  | 12  |
| 1.5.2.5 Στρεπτομυκίνη.....   | 13  |
| 1.5.3 Ανθεκτικότητα βακτηρίων στα αντιβιοτικά.....   | 14  |
| 1.5.4 Ανθεκτικότητα <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> στα αντιβιοτικά..... | 15  |
| 2. Υλικά και μέθοδοι .....   | 17  |
| 2.1 Θρεπτικά υποστρώματα .....   | 17  |
| 2.1.1 Παρασκευή στερεού θρεπτικού υποστρώματος King's B .....                                | 17  |

|  |    |
|--|----|
| 2.1.2 Παρασκευή υγρού θρεπτικού υποστρώματος King's B .....  | 17 |
| 2.1.3 Παρασκευή στερεού θρεπτικού υποστρώματος NSA.....  | 17 |
| 2.1.4 Παρασκευή στερεού θρεπτικού υποστρώματος Mueller Hinton Agar (MHA).....  | 18 |
| 2.2 Προσδιορισμός συγκέντρωσης βακτηριακών κυττάρων σε υγρή καλλιέργεια.....   | 18 |
| 2.3 Απομόνωση <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> .....  | 18 |
| 2.4 Μορφολογία απομονωθέντων βακτηρίων και χρώση Gram.....   | 20 |
| 2.5 Βιοχημική ταυτοποίηση απομονωθέντων βακτηρίων.....   | 20 |
| 2.5.1 Παραγωγή φθορίζουσών ουσιών σε King' B .....   | 20 |
| 2.5.2 Παραγωγή λεβάνης .....   | 21 |
| 2.5.3 Παραγωγή πηκτινολυτικών ενζύμων .....  | 21 |
| 2.6 Μοριακή ταυτοποίηση απομονωθέντων βακτηρίων.....   | 22 |
| 2.6.1 Απομόνωση DNA .....  | 22 |
| 2.6.2 Υπολογισμός ποσότητας και καθαρότητας DNA.....   | 22 |
| 2.6.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης- PCR.....  | 23 |
| 2.6.4 Οριζόντια ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης .....  | 23 |
| 2.7 Βιοδοκιμές παθογένειας απομονωθέντων βακτηρίων.....  | 24 |
| 2.7.1 Αντίδραση υπερευαισθησίας σε φυτά καπνού.....  | 24 |
| 2.8.1 Επιλογή κατάλληλου θρεπτικού υποστρώματος για τον έλεγχο ευαισθησίας των απομονώσεων του βακτηρίου <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> στα αντιβιοτικά ..... | 24 |
| 2.8.2 Δοκιμές in vitro για τον καθορισμό ευαισθησίας απομονωθέντων βακτηρίων στα αντιβιοτικά.....  | 25 |
| 2.9 Δοκιμές in vitro για τον καθορισμό ευαισθησίας απομονωθέντων βακτηρίων στο χαλκό.....  | 26 |
| 2.10 Στατιστική ανάλυση.....   | 26 |
| 3. Αποτελέσματα .....  | 28 |

|  |    |
|--|----|
| 3.1 Απομόνωση <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> .....  | 28 |
| 3.2 Μορφολογία απομονωθέντων βακτηρίων και χρώση Gram .....  | 29 |
| 3.3 Βιοχημική ταυτοποίηση απομονωθέντων βακτηρίων.....   | 30 |
| 3.4 Μοριακή ταυτοποίηση απομονωθέντων βακτηρίων.....   | 32 |
| 3.5 Βιοδοκιμές παθογένειας απομονωθέντων βακτηρίων.....  | 33 |
| 3.6 Απομονώσεις που κατατάσσονται στο είδος <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> ....   | 34 |
| 3.7 Δοκιμές in vitro για τον καθορισμό ευαισθησίας απομονωθέντων βακτηρίων στα αντιβιοτικά.....  | 36 |
| 3.7.1 Επιλογή κατάλληλου θρεπτικού υποστρώματος για τον έλεγχο ευαισθησίας των απομονώσεων του βακτηρίου <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> στα αντιβιοτικά ..... | 36 |
| 3.7.2 Έλεγχος ευαισθησίας απομονώσεων του βακτηρίου <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> στην τετρακυκλίνη .....  | 51 |
| 3.7.2.1 Έλεγχος ευαισθησίας απομονώσεων του βακτηρίου <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> σε ποσότητα τετρακυκλίνης 1 μg.....                                      | 51 |
| 3.7.2.2 Έλεγχος ευαισθησίας απομονώσεων του βακτηρίου <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> σε ποσότητα τετρακυκλίνης 10 μg.....                                     | 54 |
| 3.7.2.3 Έλεγχος ευαισθησίας απομονώσεων του βακτηρίου <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> σε ποσότητα τετρακυκλίνης 30 μg.....                                     | 56 |
| 3.7.3 Έλεγχος ευαισθησίας απομονώσεων του βακτηρίου <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> στη χλωραμφαινικόλη.....   | 58 |
| 3.7.3.1 Έλεγχος ευαισθησίας απομονώσεων του βακτηρίου <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> σε ποσότητα χλωραμφαινικόλης 10 μg.....                                  | 60 |
| 3.7.3.2 Έλεγχος ευαισθησίας απομονώσεων του βακτηρίου <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> σε ποσότητα χλωραμφαινικόλης 30 μg.....                                  | 63 |
| 3.7.4 Έλεγχος ευαισθησίας απομονώσεων του βακτηρίου <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> στην ερυθρομυκίνη .....  | 66 |
| 3.7.4.1 Έλεγχος ευαισθησίας απομονώσεων του βακτηρίου <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> σε ποσότητα ερυθρομυκίνης 10 μg.....                                     | 67 |

|   |     |
|---|-----|
| 3.7.4.2 Έλεγχος ευαισθησίας απομονώσεων του βακτηρίου <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> σε ποσότητα ερυθρομυκίνης 15 μg.....  | 69  |
| 3.7.4.3 Έλεγχος ευαισθησίας απομονώσεων του βακτηρίου <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> σε ποσότητα ερυθρομυκίνης 30 μg.....  | 72  |
| 3.7.5 Έλεγχος ευαισθησίας απομονώσεων του βακτηρίου <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> στη στρεπτομυκίνη .....                 | 75  |
| 3.7.5.1 Έλεγχος ευαισθησίας απομονώσεων του βακτηρίου <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> σε ποσότητα στρεπτομυκίνης 1 μg.....  | 76  |
| 3.7.5.2 Έλεγχος ευαισθησίας απομονώσεων του βακτηρίου <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> σε ποσότητα στρεπτομυκίνης 10 μg..... | 78  |
| 3.7.5.3 Έλεγχος ευαισθησίας απομονώσεων του βακτηρίου <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> σε ποσότητα στρεπτομυκίνης 50 μg..... | 81  |
| 3.7.6 Έλεγχος ευαισθησίας απομονώσεων του βακτηρίου <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> στην πενικιλίνη.....                    | 86  |
| 3.7.6.1 Έλεγχος ευαισθησίας απομονώσεων του βακτηρίου <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> σε ποσότητα πενικιλίνης 50 μg.....    | 86  |
| 3.7.6.2 Έλεγχος ευαισθησίας απομονώσεων του βακτηρίου <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> σε ποσότητα πενικιλίνης 100 μg.....   | 88  |
| 3.7.6.3 Έλεγχος ευαισθησίας απομονώσεων του βακτηρίου <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> σε ποσότητα πενικιλίνης 250 μg.....   | 91  |
| 3.8 Δοκιμές in vitro για τον καθορισμό ευαισθησίας απομονωθέντων βακτηρίων στο χαλκό..  | 93  |
| 4. Συζήτηση .....   | 96  |
| 5. Βιβλιογραφία .....   | 100 |
| 5.1 Ξενόγλωσση βιβλιογραφία .....   | 100 |
| 5.2 Ελληνική βιβλιογραφία .....   | 108 |

## Κατάλογος Πινάκων

|  |    |
|--|----|
| Πίνακας 1. Κωδικοί απομονώσεων και περιοχές δειγματοληψιάς.....  | 19 |
| Πίνακας 2. Συγκεντρώσεις διαλυμάτων που παρασκευάστηκαν για το κάθε αντιβιοτικό.....   | 26 |
| Πίνακας 3. Ποσότητες αντιβιοτικών που τοποθετήθηκαν στα δισκία για τον έλεγχο ευαισθησίας των απομονώσεων του φυτοπαθογόνου βακτηρίου <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> στα αντιβιοτικά..... | 26 |
| Πίνακας 4. Αποτελέσματα όλων των δοκιμών για τις απομονώσεις βακτηρίων από όγκους ελιάς.....   | 35 |
| Πίνακας 5. Μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης παρουσία 1 μg στρεπτομυκίνης, για τα 3 υποστρώματα.....   | 37 |
| Πίνακας 6. Μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης παρουσία 10 μg στρεπτομυκίνης, για τα 3 υποστρώματα .....   | 37 |
| Πίνακας 7. Μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης παρουσία 50 μg στρεπτομυκίνης, για τα 3 υποστρώματα .....   | 37 |
| Πίνακας 8. Μέθοδος πολλαπλών συγκρίσεων με το κριτήριο Tukey μεταξύ των 3 υποστρωμάτων, για ποσότητα στρεπτομυκίνης 1 μg.....  | 38 |
| Πίνακας 9. Μέθοδος πολλαπλών συγκρίσεων με το κριτήριο Tukey μεταξύ των 3 υποστρωμάτων, για ποσότητα στρεπτομυκίνης 10 μg.....   | 38 |
| Πίνακας 10. Μέθοδος πολλαπλών συγκρίσεων με το κριτήριο Tukey μεταξύ των 3 υποστρωμάτων, για ποσότητα στρεπτομυκίνης 50 μg.....  | 38 |
| Πίνακας 11. Στατιστικός έλεγχος t των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης που προέκυψαν παρουσία 1 μg στρεπτομυκίνης, στο KB 1,5% και ΜΗΑ.....   | 39 |
| Πίνακας 12. Στατιστικός έλεγχος t των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης που προέκυψαν παρουσία 10 μg στρεπτομυκίνης, στο KB 1,5% και KB 1,7%.....  | 39 |
| Πίνακας 13. Στατιστικός έλεγχος t των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης που προέκυψαν παρουσία 50 μg στρεπτομυκίνης, στο KB 1,5% και KB 1,7%.....  | 39 |
| Πίνακας 14. Μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς των μέσων όρων των διαμέτρων ζωνών παρεμπόδισης παρουσία 10 μg χλωραμφαινικόλης, για τα 3 υποστρώματα .....  | 41 |

|   |    |
|---|----|
| Πίνακας 15. Μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης παρουσία 30 µg χλωραμφαινικόλης, για τα 3 υποστρώματα ..... | 41 |
| Πίνακας 16. Μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης παρουσία 60 µg χλωραμφαινικόλης, για τα 3 υποστρώματα ..... | 41 |
| Πίνακας 17. Μέθοδος πολλαπλών συγκρίσεων με το κριτήριο Tukey μεταξύ των 3 υποστρωμάτων, για ποσότητα χλωραμφαινικόλης 10 µg.....                             | 42 |
| Πίνακας 18. Μέθοδος πολλαπλών συγκρίσεων με το κριτήριο Tukey μεταξύ των 3 υποστρωμάτων, για ποσότητα χλωραμφαινικόλης 30 µg.....                             | 42 |
| Πίνακας 19. Μέθοδος πολλαπλών συγκρίσεων με το κριτήριο Tukey μεταξύ των 3 υποστρωμάτων, για ποσότητα χλωραμφαινικόλης 60 µg.....                             | 42 |
| Πίνακας 20. Στατιστικός έλεγχος t των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης που προέκυψαν παρουσία 10 µg χλωραμφαινικόλης, στο KB 1,5% και ΜΗΑ..... | 42 |
| Πίνακας 21. Στατιστικός έλεγχος t των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης που προέκυψαν παρουσία 30 µg χλωραμφαινικόλης, στο KB 1,7% και ΜΗΑ..... | 43 |
| Πίνακας 22. Στατιστικός έλεγχος t των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης που προέκυψαν παρουσία 30 µg χλωραμφαινικόλης, στο KB 1,5% και ΜΗΑ..... | 43 |
| Πίνακας 23. Στατιστικός έλεγχος t των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης που προέκυψαν παρουσία 60 µg χλωραμφαινικόλης, στο KB 1,7% και ΜΗΑ..... | 43 |
| Πίνακας 24. Μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης παρουσία 10 µg ερυθρομυκίνης, για τα 3 υποστρώματα .....    | 45 |
| Πίνακας 25. Μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης παρουσία 15 µg ερυθρομυκίνης, για τα 3 υποστρώματα.....     | 45 |
| Πίνακας 26. Μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης παρουσία 30 µg ερυθρομυκίνης, για τα 3 υποστρώματα .....    | 45 |
| Πίνακας 27 Μέθοδος πολλαπλών συγκρίσεων με το κριτήριο Tukey μεταξύ των 3 υποστρωμάτων, για ποσότητα ερυθρομυκίνης 10 µg.....                                 | 45 |
| Πίνακας 28. Μέθοδος πολλαπλών συγκρίσεων με το κριτήριο Tukey μεταξύ των 3 υποστρωμάτων, για ποσότητα ερυθρομυκίνης 15 µg.....                                | 46 |

|  |    |
|--|----|
| Πίνακας 29. Μέθοδος πολλαπλών συγκρίσεων με το κριτήριο Tukey μεταξύ των 3 υποστρωμάτων, για ποσότητα ερυθρομυκίνης 30 μγ. ....                                | 46 |
| Πίνακας 30. Στατιστικός έλεγχος t των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης που προέκυψαν παρουσία 30 μγ ερυθρομυκίνης, στο KB 1,7% και ΜΗΑ.....     | 46 |
| Πίνακας 31. Μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης παρουσία 1 μγ τετρακυκλίνης, για τα 3 υποστρώματα .....      | 47 |
| Πίνακας 32. Μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης παρουσία 10 μγ τετρακυκλίνης, για τα 3 υποστρώματα .....     | 48 |
| Πίνακας 33. Μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης παρουσία 30 μγ τετρακυκλίνης, για τα 3 υποστρώματα .....     | 48 |
| Πίνακας 34. Μέθοδος πολλαπλών συγκρίσεων με το κριτήριο Tukey μεταξύ των 3 υποστρωμάτων, για ποσότητα τετρακυκλίνης 1 μγ. ....                                 | 48 |
| Πίνακας 35. Μέθοδος πολλαπλών συγκρίσεων με το κριτήριο Tukey μεταξύ των 3 υποστρωμάτων, για ποσότητα τετρακυκλίνης 10 μγ.....                                 | 49 |
| Πίνακας 36. Μέθοδος πολλαπλών συγκρίσεων με το κριτήριο Tukey μεταξύ των 3 υποστρωμάτων, για ποσότητα τετρακυκλίνης 30 μγ.....                                 | 49 |
| Πίνακας 37. Στατιστικός έλεγχος t των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης που προέκυψαν παρουσία 10 μγ τετρακυκλίνης, στο KB 1,5% και KB 1,7%..... | 49 |
| Πίνακας 38. Στατιστικός έλεγχος t των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης που προέκυψαν παρουσία 10 μγ τετρακυκλίνης, στο ΜΗΑ και KB 1,7%.....     | 49 |
| Πίνακας 39. Στατιστικός έλεγχος t των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης που προέκυψαν παρουσία 30 μγ τετρακυκλίνης στο ΜΗΑ και KB 1,7%.....      | 50 |
| Πίνακας 40. Μέσοι όροι διαμέτρων ζωνών παρεμπόδισης των 15 απομονώσεων, παρουσία 1 μγ τετρακυκλίνης.....   | 52 |
| Πίνακας 41. Μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των 15 απομονώσεων, παρουσία 1 μγ τετρακυκλίνης.....         | 52 |
| Πίνακας 42. Μέθοδος πολλαπλών συγκρίσεων με το κριτήριο Tukey μεταξύ των 15 απομονώσεων, για ποσότητα τετρακυκλίνης 1 μγ.....                                  | 53 |

|  |    |
|--|----|
| Πίνακας 43. Μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων PSS69 2α, PSS71 1α, PSS87α, PSS100α και PSS94α, παρουσία 1 μg τετρακυκλίνης.....   | 53 |
| Πίνακας 44. Μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων PSS73α, PSS77 1α, PSS60α και PSS104α, παρουσία 1 μg τετρακυκλίνης.....             | 53 |
| Πίνακας 45. Μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων PSS58 1α, PSS86α και PSS103α, παρουσία 1 μg τετρακυκλίνης.....                     | 53 |
| Πίνακας 46. Μέσοι όροι διαμέτρων ζωνών παρεμπόδισης των 15 απομονώσεων, παρουσία 10 μg τετρακυκλίνης.....  | 54 |
| Πίνακας 47. Μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των 15 απομονώσεων, παρουσία 10 μg τετρακυκλίνης.....  | 55 |
| Πίνακας 48. Μέθοδος πολλαπλών συγκρίσεων με το κριτήριο Tukey μεταξύ των 15 απομονώσεων, για ποσότητα τετρακυκλίνης 10 μg.....   | 55 |
| Πίνακας 49. Μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων PSS59α, PSS60α, PSS100α και PSS87α, παρουσία 10 μg τετρακυκλίνης.....              | 55 |
| Πίνακας 50. Μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων PSS69 2α, PSS94α, PSS102α και PSS77 1α, παρουσία 10 μg τετρακυκλίνης.....              | 55 |
| Πίνακας 51. Μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων PSS73α, PSS71 1α, PSS58 1α, PSS104α και PSS103α, παρουσία 10 μg τετρακυκλίνης..... | 56 |
| Πίνακας 52. Στατιστικός έλεγχος t των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων PSS113α και PSS103α που προέκυψαν παρουσία 10 μg τετρακυκλίνης..                               | 56 |
| Πίνακας 53. Μέσοι όροι διαμέτρων ζωνών παρεμπόδισης των 15 απομονώσεων, παρουσία 30 μg τετρακυκλίνης.....  | 57 |
| Πίνακας 54. Μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των 15 απομονώσεων, παρουσία 30 μg τετρακυκλίνης.....  | 57 |



|   |    |
|---|----|
| Πίνακας 55. Μέθοδος πολλαπλών συγκρίσεων με το κριτήριο Tukey μεταξύ των 15 απομονώσεων, για ποσότητα τετρακυκλίνης 30 µg. ....   | 57 |
| Πίνακας 56. Μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων PSS59α, PSS87α, PSS77 1α και PSS94α παρουσία 30 µg τετρακυκλίνης.....             | 58 |
| Πίνακας 57. Μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων, PSS102α, PSS104α, PSS58 1α και PSS103α παρουσία 30 µg τετρακυκλίνης.....         | 58 |
| Πίνακας 58. Μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων PSS73α, PSS113α, PSS60α, PSS69 2α και PSS71 1α, παρουσία 30 µg τετρακυκλίνης..... | 58 |
| Πίνακας 59. Μέσοι όροι διαμέτρων ζωνών παρεμπόδισης των 15 απομονώσεων, παρουσία 10 µg χλωραμφαινικόλης.....  | 61 |
| Πίνακας 60. Μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των 15 απομονώσεων, παρουσία 10 µg χλωραμφαινικόλης.....  | 61 |
| Πίνακας 61. Μέθοδος πολλαπλών συγκρίσεων με το κριτήριο Tukey μεταξύ των 15 απομονώσεων, για ποσότητα χλωραμφαινικόλης 10 µg.....   | 61 |
| Πίνακας 62. Στατιστικός έλεγχος t των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων PSS69 2α και PSS73α, που προέκυψαν παρουσία 10 µg χλωραμφαινικόλης.....                       | 62 |
| Πίνακας 63. Στατιστικός έλεγχος t των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων PSS102α και PSS71 1α , που προέκυψαν παρουσία 10 µg χλωραμφαινικόλης.....                     | 62 |
| Πίνακας 64. Μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων PSS104α, PSS59α και PSS87α παρουσία 10 µg χλωραμφαινικόλης.....                   | 62 |
| Πίνακας 65. Στατιστικός έλεγχος t των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων PSS58 1α και PSS60α, που προέκυψαν παρουσία 10 µg χλωραμφαινικόλης.....                       | 63 |

|   |    |
|---|----|
| Πίνακας 66. Μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων PSS86α, PSS113α και PSS103α παρουσία 10 µg χλωραμφαινικόλης.....          | 63 |
| Πίνακας 67. Μέσοι όροι διαμέτρων ζωνών παρεμπόδισης των 15 απομονώσεων, παρουσία 30 µg χλωραμφαινικόλης.....  | 64 |
| Πίνακας 68. Μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των 15 απομονώσεων, παρουσία 30 µg χλωραμφαινικόλης.....                                  | 64 |
| Πίνακας 69. Μέθοδος πολλαπλών συγκρίσεων με το κριτήριο Tukey μεταξύ των 15 απομονώσεων, για ποσότητα χλωραμφαινικόλης 30 µg.....   | 65 |
| Πίνακας 70. Μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων PSS73α, PSS100α και PSS69 2α, παρουσία 30 µg χλωραμφαινικόλης.....        | 65 |
| Πίνακας 71. Μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων PSS94α, PSS71 1α και PSS77 1α, παρουσία 30 µg χλωραμφαινικόλης.....       | 65 |
| Πίνακας 72. Μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων PSS59α, PSS87α, PSS102α και PSS104α, παρουσία 30 µg χλωραμφαινικόλης..... | 65 |
| Πίνακας 73. Μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων PSS86α, PSS113α και PSS103α, παρουσία 30 µg χλωραμφαινικόλης.....         | 66 |
| Πίνακας 74. Στατιστικός έλεγχος t των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων PSS60α και PSS58 1α, που προέκυψαν παρουσία 30 µg χλωραμφαινικόλης.....               | 66 |
| Πίνακας 75. Μέσοι όροι διαμέτρων ζωνών παρεμπόδισης των 15 απομονώσεων, παρουσία 10 µg ερυθρομυκίνης.....   | 68 |
| Πίνακας 76. Μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των 15 απομονώσεων, παρουσία 10 µg ερυθρομυκίνης.....                                     | 68 |
| Πίνακας 77. Μέθοδος πολλαπλών συγκρίσεων με το κριτήριο Tukey μεταξύ των 15 απομονώσεων, για ποσότητα ερυθρομυκίνης 10 µg. ....   | 69 |

|  |    |
|--|----|
| Πίνακας 78. Στατιστικός έλεγχος t των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων PSS100α και PSS102α, που προέκυψαν παρουσία 10 μg ερυθρομυκίνης..69  | 69 |
| Πίνακας 79. Μέσοι όροι διαμέτρων ζωνών παρεμπόδισης των 15 απομονώσεων, παρουσία 15 μg ερυθρομυκίνης.....70  | 70 |
| Πίνακας 80. Μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των 15 απομονώσεων, παρουσία 15 μg ερυθρομυκίνης.....70  | 70 |
| Πίνακας 81. Μέθοδος πολλαπλών συγκρίσεων με το κριτήριο Tukey μεταξύ των 15 απομονώσεων, για ποσότητα ερυθρομυκίνης 15 μg.....71   | 71 |
| Πίνακας 82. Μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων PSS73α, PSS69 2α, PSS113α και PSS100α, παρουσία 15 μg ερυθρομυκίνης.....71                                       | 71 |
| Πίνακας 83. Μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων PSS102α, PSS104α, PSS71 1α, PSS59α και PSS77 1α, παρουσία 15 μg ερυθρομυκίνης.....71                             | 71 |
| Πίνακας 84. Στατιστικός έλεγχος t των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων PSS58 1α και PSS103α, που προέκυψαν παρουσία 15 μg ερυθρομυκίνης..71   | 71 |
| Πίνακας 85. Μέσοι όροι διαμέτρων ζωνών παρεμπόδισης των 15 απομονώσεων, παρουσία 30 μg ερυθρομυκίνης.....72  | 72 |
| Πίνακας 86. Μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των 15 απομονώσεων, παρουσία 30 μg ερυθρομυκίνης.....73  | 73 |
| Πίνακας 87. Μέθοδος πολλαπλών συγκρίσεων με το κριτήριο Tukey μεταξύ των 15 απομονώσεων, για ποσότητα ερυθρομυκίνης 30 μg. ....73  | 73 |
| Πίνακας 88. Στατιστικός έλεγχος t των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων PSS100α και PSS86α, που προέκυψαν παρουσία 30 μg ερυθρομυκίνης...73  | 73 |
| Πίνακας 89. Στατιστικός έλεγχος t των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων PSS113α και PSS87α, που προέκυψαν παρουσία 30 μg ερυθρομυκίνης..74   | 74 |
| Πίνακας 90. Μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων PSS69 2α, PSS73α, PSS59α, PSS77 1α, PSS60α, PSS71 1α , PSS102α και PSS104α, παρουσία 30 μg ερυθρομυκίνης. ....74 | 74 |

|  |    |
|--|----|
| Πίνακας 91. Στατιστικός έλεγχος t των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων PSS58 1α και PSS103α, που προέκυψαν παρουσία 30 µg ερυθρομυκίνης..                                     | 74 |
| Πίνακας 92. Μέσοι όροι διαμέτρων ζωνών παρεμπόδισης των 15 απομονώσεων, παρουσία 1 µg στρεπτομυκίνης.....  | 77 |
| Πίνακας 93. Μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των 15 απομονώσεων, παρουσία 1 µg στρεπτομυκίνης.....  | 77 |
| Πίνακας 94. Μέθοδος πολλαπλών συγκρίσεων με το κριτήριο Tukey μεταξύ των 15 απομονώσεων, για ποσότητα στρεπτομυκίνης 1 µg. ....  | 77 |
| Πίνακας 95. Μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων PSS59α, PSS77 1α, PSS60α, PSS58 1α, PSS100α και PSS104α, παρουσία 1 µg στρεπτομυκίνης..... | 78 |
| Πίνακας 96. Μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων PSS73α, PSS69 2α, PSS71 1α, PSS86α, PSS87α και PSS102α, παρουσία 1 µg στρεπτομυκίνης.....  | 78 |
| Πίνακας 97. Μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων PSS113α, PSS103α και PSS94α, παρουσία 1 µg στρεπτομυκίνης.....                             | 78 |
| Πίνακας 98. Μέσοι όροι διαμέτρων ζωνών παρεμπόδισης των 15 απομονώσεων, παρουσία 10 µg στρεπτομυκίνης.....   | 79 |
| Πίνακας 99. Μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των 15 απομονώσεων, παρουσία 10 µg στρεπτομυκίνης.....   | 79 |
| Πίνακας 100. Μέθοδος πολλαπλών συγκρίσεων με το κριτήριο Tukey μεταξύ των 15 απομονώσεων, για ποσότητα στρεπτομυκίνης 10 µg. ....  | 80 |
| Πίνακας 101. Στατιστικός έλεγχος t των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων PSS58 1α και PSS100α, που προέκυψαν παρουσία 10 µg στρεπτομυκίνης.....                                | 80 |
| Πίνακας 102. Μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων PSS73α, PSS71 1α, PSS59α, PSS77 1α, PSS60α και PSS87α, παρουσία 10 µg στρεπτομυκίνης..... | 80 |

|  |    |
|--|----|
| Πίνακας 103. Μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων PSS94α, PSS102α και PSS69 2α, παρουσία 10 µg στρεπτομυκίνης. ....   | 81 |
| Πίνακας 104. Στατιστικός έλεγχος t των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων PSS86α και PSS104α, που προέκυψαν παρουσία 10 µg στρεπτομυκίνης..   | 81 |
| Πίνακας 105. Στατιστικός έλεγχος t των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων PSS113α και PSS103α, που προέκυψαν παρουσία 10 µg στρεπτομυκίνης.....   | 81 |
| Πίνακας 106. Μέσοι όροι διαμέτρων ζωνών παρεμπόδισης των 15 απομονώσεων, παρουσία 50 µg στρεπτομυκίνης.....  | 82 |
| Πίνακας 107. Μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των 15 απομονώσεων, παρουσία 50 µg στρεπτομυκίνης.....  | 83 |
| Πίνακας 108. Μέθοδος πολλαπλών συγκρίσεων με το κριτήριο Tukey μεταξύ των 15 απομονώσεων, για ποσότητα στρεπτομυκίνης 50 µg.....   | 83 |
| Πίνακας 109. Στατιστικός έλεγχος t των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων PSS58 1α και PSS87α, που προέκυψαν παρουσία 50 µg στρεπτομυκίνης..  | 83 |
| Πίνακας 110. Στατιστικός έλεγχος t των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων PSS58 1α και PSS100α, που προέκυψαν παρουσία 50 µg στρεπτομυκίνης.....  | 84 |
| Πίνακας 111. Μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων PSS73α, PSS59α, PSS77 1α, PSS60α, PSS69 2α, PSS71 1α, PSS86α, PSS94α, PSS102α και PSS104α, παρουσία 50 µg στρεπτομυκίνης..... | 84 |
| Πίνακας 112. Στατιστικός έλεγχος t των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων PSS103α και PSS113α, που προέκυψαν παρουσία 50 µg στρεπτομυκίνης.....   | 84 |
| Πίνακας 113. Μέσοι όροι διαμέτρων ζωνών παρεμπόδισης των 15 απομονώσεων, παρουσία 50 µg πενικιλίνης.....   | 87 |
| Πίνακας 114. Μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των 15 απομονώσεων, παρουσία 50 µg πενικιλίνης.....   | 87 |

|  |    |
|--|----|
| Πίνακας 115. Μέθοδος πολλαπλών συγκρίσεων με το κριτήριο Tukey μεταξύ των 15 απομονώσεων, για ποσότητα πενικιλίνης 50 µg.....  | 87 |
| Πίνακας 116. Μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων PSS59α, PSS102α, PSS103α και PSS104α, παρουσία 50 µg πενικιλίνης.....           | 88 |
| Πίνακας 117. Μέσοι όροι διαμέτρων ζωνών παρεμπόδισης των 15 απομονώσεων, παρουσία 100 µg πενικιλίνης.....  | 89 |
| Πίνακας 118. Μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των 15 απομονώσεων, παρουσία 100 µg πενικιλίνης.....  | 89 |
| Πίνακας 119. Μέθοδος πολλαπλών συγκρίσεων με το κριτήριο Tukey μεταξύ των 15 απομονώσεων, για ποσότητα πενικιλίνης 100 µg.....   | 89 |
| Πίνακας 120. Μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων PSS73α, PSS77 1α και PSS71 1α, παρουσία 100 µg πενικιλίνης. ....                | 90 |
| Πίνακας 121. Στατιστικός έλεγχος t των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων PSS102α και PSS113α, που προέκυψαν παρουσία 100 µg πενικιλίνης....                          | 90 |
| Πίνακας 122. Στατιστικός έλεγχος t των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων PSS59α και PSS104α, που προέκυψαν παρουσία 100 µg πενικιλίνης..                             | 90 |
| Πίνακας 123. Μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων PSS60α, PSS58 1α και PSS103α, παρουσία 100 µg πενικιλίνης.....                  | 90 |
| Πίνακας 124. Μέσοι όροι διαμέτρων ζωνών παρεμπόδισης των 15 απομονώσεων, παρουσία 250 µg πενικιλίνης.....  | 91 |
| Πίνακας 125. Μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των 15 απομονώσεων, παρουσία 250 µg πενικιλίνης.....  | 92 |
| Πίνακας 126. Μέθοδος πολλαπλών συγκρίσεων με το κριτήριο Tukey μεταξύ των 15 απομονώσεων, για ποσότητα πενικιλίνης 250 µg.....   | 92 |
| Πίνακας 127. Μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων PSS73α, PSS69 2α, PSS71 1α, PSS94α και PSS87α, παρουσία 250 µg πενικιλίνης..... | 92 |

|   |    |
|---|----|
| Πίνακας 128. Μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων PSS77 1α, PSS86α, PSS59α, PSS100α και PSS102α, παρουσία 250 μg πενικιλίνης.....  | 92 |
| Πίνακας 129. Μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων PSS104α, PSS103α, PSS113α, PSS58 1α και PSS60α, παρουσία 250 μg πενικιλίνης..... | 93 |
| Πίνακας 130. Ανάπτυξη απομονώσεων του βακτηρίου PSS σε 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις Cu.....   | 94 |
| Πίνακας 131. Τιμές διαμέτρων ζωνών παρεμπόδισης ανά αντιβιοτικό, για ανθεκτικές, μετρίως ευαίσθητες και ευαίσθητες απομονώσεις (Bauer et al. 1966).....   | 98 |

## Κατάλογος εικόνων

|  |    |
|--|----|
| Εικόνα 1. Όγκοι σε κλάδους ελιάς .....   | 3  |
| Εικόνα 2. Τυπικές αποικίες βακτηρίων που απομονώθηκαν από όλους τους όγκους ελιάς....  | 28 |
| Εικόνα 3. Κίτρινες αποικίες βακτηρίων που απομονώθηκαν από ορισμένους όγκους ελιάς...  | 29 |
| Εικόνα 4. Αποικίες λευκού χρώματος και διαμέτρου μερικών εκατοστών, βακτηρίων που απομονώθηκαν από όγκους που συλλέχθηκαν από την περιοχή του Βρονταμά.....            | 29 |
| Εικόνα 5. Ραβδοειδή βακτηριακά κύτταρα της απομόνωσης PSS52 α, μετά από χρώση Gram.....  | 30 |
| Εικόνα 6. Ραβδοειδή βακτηριακά κύτταρα της απομόνωσης PSS54 2K, μετά από χρώση Gram.....   | 30 |
| Εικόνα 7. Φθορισμός σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα King's B.....   | 31 |
| Εικόνα 8. Παραγωγή πηκτινολυτικών ενζύμων από την απομόνωση PSS60 αμ.....  | 31 |
| Εικόνα 9. Παραγωγή πηκτινολυτικών ενζύμων από την απομόνωση PSS58 1αμ.....   | 32 |
| Εικόνα 10. Απομόνωση βακτηρίου (PSS59 K) που δεν παράγει πηκτινολυτικά ένζυμα.....   | 32 |
| Εικόνα 11. Ζώνες DNA μετά από τοποθέτηση της πηκτής αγαρόζης σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας.....   | 33 |
| Εικόνα 12. Αντίδραση υπερευαισθησίας σε φύλλο καπνού από τις απομονώσεις PSS104α, PSS54 2α, PSS100α και PSS52α.....  | 34 |
| Εικόνα 13. Ζώνες παρεμπόδισης στα 3 διαφορετικά θρεπτικά υποστρώματα (KB 1,5%, KB 1,7%, MHA), για ποσότητες στρεπτομυκίνης 1, 10 και 50 μg.....                        | 36 |
| Εικόνα 14. Ζώνες παρεμπόδισης στα 3 διαφορετικά θρεπτικά υποστρώματα (KB 1,5%, KB 1,7%, MHA), για ποσότητες γλωραμφαινικόλης 10, 30 και 60 μg.....                     | 40 |
| Εικόνα 15. Ζώνες παρεμπόδισης στα 3 διαφορετικά υποστρώματα (KB 1,5%, KB 1,7%, MHA), για ποσότητες ερυθρομυκίνης 10, 15 και 30 μg.....                                 | 44 |
| Εικόνα 16. Ζώνες παρεμπόδισης στα 3 διαφορετικά θρεπτικά υποστρώματα (KB 1,5%, KB 1,7%, MHA), για ποσότητες τετρακυκλίνης 1, 10 και 30 μg.....                         | 47 |
| Εικόνα 17. Ζώνες παρεμπόδισης που σχηματίστηκαν για ποσότητες τετρακυκλίνης 1, 10 και 30 μg, κατά τον έλεγχο ευαισθησίας της απομόνωσης PSS100α στην τετρακυκλίνη..... | 51 |



|  |    |
|--|----|
| Εικόνα 18. Ζώνες παρεμπόδισης που σχηματίστηκαν για ποσότητες χλωραμφαινικόλης 10 και 30 μg, κατά τον έλεγχο ευαισθησίας της απομόνωσης PSS100α στην χλωραμφαινικόλη.....                                      | 59 |
| Εικόνα 19. Ζώνες παρεμπόδισης που σχηματίστηκαν για ποσότητες ερυθρομυκίνης 10, 15 και 30 μg, κατά τον έλεγχο ευαισθησίας της απομόνωσης PSS100α στην ερυθρομυκίνη.....  | 67 |
| Εικόνα 20. Ζώνες παρεμπόδισης που σχηματίστηκαν για ποσότητες στρεπτομυκίνης 1, 10 και 50 μg, κατά τον έλεγχο ευαισθησίας της απομόνωσης PSS100α στη στρεπτομυκίνη .....                                       | 75 |
| Εικόνα 21. Ζώνες παρεμπόδισης που σχηματίστηκαν για ποσότητες πενικιλίνης 50, 100 και 250 μg, κατά τον έλεγχο ευαισθησίας της απομόνωσης PSS104α στην πενικιλίνη.....  | 86 |
| Εικόνα 22. Ανάπτυξη απομονώσεων PSS113α (a), PSS71 1α (b), PSS86α (c) PSS114 α (d), απουσία χαλκού στο θρεπτικό υπόστρωμα (0) και για συγκεντρώσεις χαλκού 29,99 ppm (1), 44,48 ppm (2) και 99,34 ppm (3)..... | 94 |

## 1. Εισαγωγή

### 1.1 Φυτοπαθογόνα βακτήρια και παγκόσμια παραγωγή

Σύμφωνα με το FAO (2009), μέχρι το 2050 αναμένεται ραγδαία αύξηση του παγκόσμιου πληθυσμού. Για την κάλυψη των αναγκών του, υπολογίζεται ότι η παραγωγή τροφίμων πρέπει να αυξηθεί σε ποσοστό 70%. Το γεγονός αυτό φέρνει την γεωργία αντιμέτωπη με νέες προκλήσεις, κυρίως λόγω της έλλειψης φυσικών πόρων και καλλιεργούμενων εκτάσεων. Συνεπώς, η αναμενόμενη αύξηση πρόκειται να καλυφθεί με αύξηση των αποδόσεων των ήδη καλλιεργούμενων εκτάσεων (FAO, 2009). Το 16% της παγκόσμιας παραγωγής χάνεται εξαιτίας φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών (Ficke et al. 2018). Σημαντικές απώλειες προκύπτουν από ασθένειες που προκαλούνται από φυτοπαθογόνα βακτήρια και κυρίως από είδη βακτηρίων που ανήκουν στα γένη *Erwinia*, *Pseudomonas* και *Xanthomonas* (Sundin et al. 2016). Τα περισσότερα είδη φυτών συμπεριλαμβανομένων και των καλλιεργούμενων, προσβάλλονται από τουλάχιστον ένα είδος βακτηρίου. Σε πολλές περιπτώσεις, παρατηρείται μείωση της παραγωγής και υποβάθμιση της ποιότητας (Tampakaki et al. 2009). Ωστόσο, η αντιμετώπιση των ασθενειών που προκαλούν τα φυτοπαθογόνα βακτήρια και κατά συνέπεια η αύξηση των αποδόσεων των καλλιεργειών που προσβάλλουν, είναι δύσκολη (Tampakaki et al. 2009, Sundin et al. 2016). Αυτό προκύπτει από τα χαρακτηριστικά των βακτηρίων, όπως είναι ο γρήγορος πολλαπλασιασμός τους και από την αλόγιστη χρήση των εμπορικά διαθέσιμων χημικών μέσων, που είχε ως συνέπεια την ανάπτυξη ανθεκτικότητας (Sundin et al. 2016). Συνεπώς, είναι απαραίτητο να πραγματοποιηθεί από την επιστημονική κοινότητα, μελέτη των φυτοπαθογόνων βακτηρίων και έλεγχος της ευαισθησίας τους σε αντιμικροβιακές ουσίες. Υπολογίζεται ότι παγκοσμίως, το οικονομικό αντίκτυπο από ασθένειες που προκαλούνται από φυτοπαθογόνα βακτήρια, είναι περίπου 1 δισεκατομμύριο δολάρια το χρόνο (Martins et al. 2018). Απώλειες στην παραγωγή προκαλούνται και από βακτήρια τα οποία δεν θεωρούνται οικονομικής σημασίας. Παράδειγμα αποτελεί το φυτοπαθογόνο βακτήριο *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* που προκαλεί την ασθένεια της ελιάς γνωστή ως <<καρκίνωση>> (Schroth et al. 1973).

### 1.2 Η ασθένεια <<καρκίνωση της ελιάς>>

Η <<καρκίνωση της ελιάς>>, είναι μια από τις σημαντικότερες ασθένειες της ελιάς (*Olea europaea* L), η οποία συναντάται στις περισσότερες ελαιοκομικές περιοχές και κυρίως στις παραμεσόγειες (Buonaurio et al. 2015). Η πρώτη αναφορά, έγινε τον 4<sup>ο</sup> αιώνα π.Χ. από το Θεόφραστο. Προκαλείται από το βακτήριο *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (Moretti et

al. 2016). Τα συμπτώματα της ασθένειας, παρατηρούνται στα εναέρια όργανα του φυτού (Buonauro et al. 2015). Το χαρακτηριστικό σύμπτωμα είναι ο σχηματισμός όγκων σε νεαρούς κλαδίσκους, κλάδους, βραχίονες και στον κορμό του δέντρου (Εικόνα 1) και σε σπάνιες περιπτώσεις στα νεύρα των φύλλων και στους καρπούς (Salman et al. 2022). Στην περιοχή της μόλυνσης, αρχικά παρατηρείται η δημιουργία μιας κοιλότητας λόγω της κατάρρευσης των φυτικών κυττάρων. Στη συνέχεια, από την περιφέρεια της κοιλότητας, αρχίζει ο σχηματισμός του όγκου (Quesada et al. 2010). Σύμφωνα με τους Schroth et al. (1973), η ασθένεια έχει ως αποτέλεσμα σημαντική μείωση της παραγωγής, καθώς οι καρποί των προσβεβλημένων δέντρων έχουν μικρότερο μέγεθος από τους καρπούς των υγιών. Η μείωση είναι ανάλογη με την σοβαρότητα της ασθένειας. Σημαντικό ρόλο στις απώλειες παίζει η θέση και ηλικία των όγκων, καθώς και η πυκνότητα φύτευσης των δέντρων. Από την ασθένεια επηρεάζεται και η ποιότητα των καρπών (Schroth et al. 1973, Quesada et al. 2010). Η αντιμετώπιση της εφόσον γίνει εγκατάσταση του παθογόνου, είναι δύσκολη. Σημαντική είναι η πρόληψη (Mina et al. 2020, Quesada et al. 2010). Τα μόνα διαθέσιμα χημικά μέσα είναι χαλκούχα σκευάσματα (Nguyen et al. 2018). Στην Ελλάδα, οι εγκεκριμένες δραστικές ουσίες για την αντιμετώπιση της ασθένειας σύμφωνα με το Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων, είναι ο βορδιγάλειος πολτός, ο οξυχλωριούχος χαλκός, το υδροξείδιο του χαλκού και ο θειικός χαλκός (Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων 2022). Για το λόγο αυτό, η επιστημονική κοινότητα αναζητά εναλλακτικές μεθόδους αντιμετώπισης. Παράδειγμα αποτελεί το πείραμα των Krid et al. (2012), οι οποίοι χρησιμοποίησαν ως παράγοντα βιολογικής αντιμετώπισης ένα στέλεχος του βακτηρίου *Bacillus subtilis*. Σε παρόμοιο πείραμα, οι Mina et al. (2020), απομόνωσαν βακτήρια από διάφορα όργανα δέντρων ελιάς και αξιολόγησαν την αποτελεσματικότητά τους για τον έλεγχο του *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*. Το πιο αποτελεσματικό ήταν ένα στέλεχος του βακτηρίου *Bacillus amyloliquefaciens*, όπου με δοκιμή στον αγρό, μειώθηκε η σοβαρότητα της ασθένειας. Πειράματα πραγματοποιούνται και με αιθέρια έλαια, τα οποία αποτελούνται από ενώσεις που έχουν αντιμικροβιακές ιδιότητες (Bouaichi et al. 2015).



Εικόνα 1. Όγκοι σε κλάδους ελιάς

### 1. 3.1 *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*

Το φυτοπαθογόνο βακτήριο *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (PSS) κατατάσσεται στο φύλο Proteobacteria, στη κλάση Gammaproteobacteria, στην τάξη Pseudomonadales και στην οικογένεια Pseudomonadaceae (Ramos et al. 2012). Τα φυτοπαθογόνα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* ανήκουν στο *Pseudomonas syringae* complex, το οποίο αποτελείται από 15 είδη και 65 διαφορετικούς παθότυπους, τα οποία κατηγοριοποιούνται σε φυλογενετικά group (Moreno-Perez et al. 2020). Το *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, ανήκει στο φυλογενετικό group 3, το οποίο αποτελείται από βακτήρια που προκαλούν όγκους σε ξυλώδεις ξενιστές (Caballo-Ponce et al. 2017, Moreno-Perez et al. 2020). Κύριος ξενιστής του βακτηρίου είναι η καλλιεργούμενη ελιά (*Olea europaea* L). Έχει βρεθεί ότι πιθανοί ξενιστές του μπορεί να είναι και φυτά που ανήκουν στο είδος *Punica granatum* L (Buonauro et al. 2015). Τα βακτήρια του *Pseudomonas syringae* complex, αναστέλλουν τους αμυντικούς μηχανισμούς των κυττάρων των ξενιστών τους, εξαιτίας της παραγωγής και έγχυσης πρωτεϊνών στο κυτταρόπλασμα του ξενιστή. Οι πρωτεΐνες αυτές παράγονται από το εκκριτικό μονοπάτι τύπου III (Rodríguez-Palenzuela et al. 2010). Ο σχηματισμός των όγκων στα φυτά, είναι αποτέλεσμα της παραγωγής από το βακτήριο, ινδολυλοξικού οξέος (IAA) και κυτοκινίνων (Penyalver et al. 2000, Rodríguez-Palenzuela et al. 2010).

### 1.3.2 Ταυτοποίηση του παθογόνου

Από όγκους ελιάς, εκτός από το βακτήριο *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, μπορούν να απομονωθούν και άλλα βακτήρια τα οποία ανήκουν στα γένη *Burkholderia*, *Hafnia*, *Pseudomonas* και *Streptomyces*, καθώς και τα είδη *Pantoea agglomerans* και *Erwinia toletana* (Moretti et al. 2011, Ramos et al. 2012). Ορισμένα είδη συμβιώνουν με το *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* και υπάρχουν αναφορές ότι συμβάλλουν στην αύξηση της σοβαρότητας της ασθένειας (Marchi et al. 2006, Buonauro et al. 2015). Η ταυτοποίηση απομονώσεων από όγκους ελιάς, ως *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, μπορεί να γίνει με βιοχημικές και μοριακές μεθόδους, με μελέτη της παθογένειας και με αλληλούχιση του γονιδιώματος και σύγκριση των αλληλουχιών με βάση δεδομένων (Bozkurt et al. 2014). Αρχικά προτείνεται η απομόνωση να γίνει σε θρεπτικό υπόστρωμα PVF-1, το οποίο δεν επιτρέπει την ανάπτυξη σαπροφυτικών βακτηρίων. Ωστόσο, εκτός από το PVF-1, ως θρεπτικό υπόστρωμα μπορεί να χρησιμοποιηθεί King's B και NSA (Surico & Lavermicocca 1989). Οι αποικίες του *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* στο PVF-1 αναπτύσσονται αργά, είναι λευκές και έχουν διάμετρο 2-3 mm. Όταν ως θρεπτικό υπόστρωμα χρησιμοποιείται NSA, οι αποικίες αναπτύσσονται γρήγορα, έχουν λευκό ή απαλό κίτρινο χρωματισμό, διάμετρο 0,5-2,9 mm και ακανόνιστα περιθώρια (Surico & Lavermicocca 1989, Moretti et al. 2011). Οι βιοχημικές μέθοδοι, για την ταυτοποίηση βακτηρίων που ανήκουν στο γένος *Pseudomonas* και παράγουν φθορίζουσες χρωστικές περιγράφονται από τους Leliott et al. (1966). Το βακτήριο *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* είναι Gram αρνητικό, προκαλεί αντίδραση υπερευαισθησίας σε φυτά καπνού και δεν παράγει οξειδάση και πηκτινολυτικά ένζυμα (Ramos et al. 2012, Moretti et al. 2008). Ορισμένες απομονώσεις του φθορίζουν (Leliott et al. 1966). Όσον αφορά την παραγωγή λεβάνης σε θρεπτικό υπόστρωμα που περιέχει 5% σουκρόζη, βρέθηκε ότι ορισμένες απομονώσεις είναι ικανές να παράγουν. Η διάκριση γίνεται με βάση τη μορφολογία της αποικίας στο θρεπτικό υπόστρωμα και η ταυτοποίηση με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) (Marchi et al. 2005). Για την ταυτοποίηση του βακτηρίου προτείνονται μοριακές μέθοδοι, όπως είναι η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) (Penyalver et al. 2000). Η αλληλουχία στόχος προς ενίσχυση μπορεί να βρίσκεται στο γονίδιο *iaaL* ή στο γονίδιο *ptz*. Στην πρώτη περίπτωση οι εκκινητές είναι οι IAALF (5'-GGCACCAGCGGCAACATCAA-3') και IAALR (5'-CGCCCTCGGAACTGCC ATAC-3'), ενώ στη δεύτερη οι *ptzF* (5'-TTATTCTTGAGGGGGGTC-3') και *ptzR* (5'-CGATATCCGTCAATATCTT-3') (Penyalver et al. 2000, Moretti et al. 2008). Το γονίδιο *iaaL* κωδικοποιεί το ένζυμο indoleacetate-lysine synthetase και το γονίδιο *ptz* το ένζυμο isopentenyl transferase, το οποίο συμμετέχει στη βιοσύνθεση των κυτοκινίνων (Rodríguez-

Palenzuela et al. 2010, Cinelli et al. 2013). Επίσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί η μοριακή μέθοδος γνωστή ως πολυμορφισμός μήκους ενισχυμένων τμημάτων (AFLP) (Sisto et al. 2007). Σημαντικό είναι το γεγονός, ότι το γονιδίωμα του βακτηρίου έχει αλληλουχηθεί πλήρως (NCBI database, accession number CP078139), οπότε μπορεί με αυτό τον τρόπο να προκύψει ταυτοποίηση (Rodríguez-Palenzuela et al. 2010, Bozkurt et al. 2014, Turco et al. 2022). Η μελέτη παθογένειας μπορεί να πραγματοποιηθεί με εμβολιασμό με το παθογόνο, φυτών ελιάς που προήλθαν από ιστοκαλλιέργεια ή με εμβολιασμό νεαρών βλαστών φυτών ελιάς που καλλιεργούνται σε θερμοκήπιο (Rodríguez- Moreno et al. 2008). Μια νέα και γρήγορη μέθοδος, περιλαμβάνει τη χρήση νεαρών φύλλων ελιάς. Ο εμβολιασμός γίνεται στο κεντρικό νεύρο και τα φύλλα διατηρούνται σε ελεγχόμενες συνθήκες για δέκα ημέρες. Η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων γίνεται μετά από παρατήρηση στο μικροσκόπιο (Salman et al. 2022).

## **1.4 Χρήση χαλκού στη φυτοπροστασία**

### **1.4.1 Ιστορικά στοιχεία**

Η πρώτη αναφορά για τη χρήση χαλκούχων ενώσεων στην αντιμετώπιση φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών έγινε το 1807, από τον Benedict Prevost. Σε πειράματά του παρατήρησε ότι υδατικά διαλύματα θεικού χαλκού ή νερό στο οποίο έχει προστεθεί σκόνη από χαλκούχο μέταλλο ή κομμάτι από το μέταλλο για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα και σε συγκεκριμένες συνθήκες, αναστέλλουν τη βλάστηση σπορίων του μύκητα *Tilletia tritici* (Schneiderhan 1937, Prevost 1939). Ο Prevost, πραγματοποίησε πειράματα και σε επίπεδο αγρού, στα οποία έσπειρε σπόρους σιταριού οι οποίοι αρχικά είχαν εμβολιαστεί με σπόρια του μύκητα και στη συνέχεια είχαν εμβαπτιστεί σε υδατικό διάλυμα θεικού χαλκού (Prevost 1939). Μια ακόμα αναφορά έγινε το 1861 από τον Radclyffe, ο οποίος χρησιμοποίησε υδατικό διάλυμα θεικού χαλκού για την αντιμετώπιση του μύκητα που προκαλεί το ωίδιο της τριανταφυλλιάς (Schneiderhan 1937). Ωστόσο, η χρήση χαλκούχων σκευασμάτων για τον έλεγχο φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών, ξεκίνησε μετά το 1882 με την τυχαία ανακάλυψη του Γάλλου επιστήμονα Pierre-Marie Alexis Millardet (Schneiderhan 1937, La Torre et al. 2018). Στην περιοχή Bordeaux της Γαλλίας, οι παραγωγοί ψέκαζαν τα αμπέλια με ένα μείγμα θεικού χαλκού ( $\text{Cu}_2\text{SO}_4$ ) και υδροξειδίου του ασβεστίου ( $\text{CaOH}_2$ ), ώστε να αποτρέψουν περαστικούς και ζώα από την κατανάλωση σταφυλιών. Ο Millardet, παρατήρησε ότι τα φύλλα των ψεκασμένων πρέμων, δεν είχαν προσβληθεί από το μύκητα *Plasmopara viticola* (Lamichhane et al. 2018). Έτσι, πραγματοποίησε μια σειρά πειραμάτων, στα οποία δοκίμασε την αποτελεσματικότητα μειγμάτων θεικού χαλκού και υδροξειδίου του ασβεστίου σε διάφορες αναλογίες, σε

αμπελώνες προσβεβλημένους με το μύκητα (Schneiderhan 1937, Lamichhane et al. 2018). Τα αποτελέσματα του δημοσιεύτηκαν το 1885 (Schneiderhan 1937). Το μείγμα έμεινε γνωστό ως βορδιγάλειος πολτός και είναι το πρώτο μυκητοκτόνο που χρησιμοποιήθηκε παγκοσμίως (Schneiderhan 1937, Lamichhane et al. 2018). Ένα από τα μειονεκτήματα της χρήσης του που έγινε γρήγορα αντιληπτό, ήταν ο κίνδυνος φυτοτοξικότητας, η οποία μπορεί να αποδοθεί στο pH του μείγματος ή στην ικανότητα των ιόντων χαλκού να διεισδύουν στους νεαρούς φυτικούς ιστούς. Λύση στο πρόβλημα έδωσε η ανακάλυψη νέων χαλκούχων ενώσεων, οι οποίες δεν ξεπλένονται εύκολα από τις φυτικές επιφάνειες και έχουν μεγαλύτερη υπολειμματικότητα (Ζιώγας και Μαρκόγλου 2017, Lamichhane et al. 2018). Στη φυτοπροστασία, οι χαλκούχες ενώσεις χρησιμοποιούνται κυρίως ως μυκητοκτόνα και βακτηριοκτόνα. Σημαντικό είναι το γεγονός, ότι τα χαλκούχα σκευάσματα, είναι από τα λίγα που επιτρέπονται για την αντιμετώπιση ασθενειών που οφείλονται σε φυτοπαθογόνα βακτήρια (Cornish et al. 2017). Στην Ευρωπαϊκή Ένωση, μετά την απαγόρευση των αντιβιοτικών, είναι τα μόνα που χρησιμοποιούνται. Στην Ελλάδα για παράδειγμα, για την αντιμετώπιση του βακτηρίου *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, επιτρέπεται μόνο η χρήση σκευασμάτων των οποίων η δραστική είναι ο χαλκός (Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων 2022).

#### 1.4.2 Μηχανισμός δράσης

Στη φύση ο χαλκός συναντάται στην στοιχειακή του μορφή αλλά και σε μεγάλες ποσότητες κυρίως σε ορυκτά όπως είναι ο χαλκοπυρίτης ( $\text{CuFeS}_2$ ) και ο χαλκοσίτης ( $\text{Cu}_2\text{S}$ ) (Trevors & Cotter 1990, Brown et al. 1992). Ωστόσο, μπορεί να προέρχεται και από ανθρωπογενείς δραστηριότητες, όπως είναι τα απόβλητα από βιομηχανίες εξαγωγής χαλκού από ορυκτά (Trevors & Cotter 1990). Ρύπανση των αγροτικών κυρίως εκτάσεων, προκύπτει από τη χρήση χαλκούχων σκευασμάτων στη γεωργία. Οι χαλκούχες ενώσεις χρησιμοποιούνται ως μυκητοκτόνα, βακτηριοκτόνα και φυτοκτόνα, ως λιπάσματα, αλλά και για τη συντήρηση προϊόντων. Στη ζωική παραγωγή χρησιμοποιούνται ως αυξητικοί παράγοντες και πρόσθετα σε ζωοτροφές. Η κοπριά από τα ζώα, η οποία εφαρμόζεται και ως λίπασμα, περιέχει μεγάλες ποσότητες χαλκού. Ο χαλκός είναι απαραίτητο ιχνοστοιχείο για όλους σχεδόν τους οργανισμούς (Cervantes & Gutierrez-Corona 1994). Αποτελεί συμπαραγοντα ορισμένων ενζύμων και συστατικό πρωτεϊνών που συμμετέχουν σε βιοχημικές και φυσιολογικές διαδικασίες, όπως είναι η μεταφορά ηλεκτρονίων, η αναπνοή, οι αντιδράσεις οξειδοαναγωγής (Trevors & Cotter 1990, Cervantes & Gutierrez-Corona 1994, Fan et al. 2022). Όσον αφορά τους μικροοργανισμούς, η συγκέντρωση που απαιτείται για την ανάπτυξή τους είναι από 1-10  $\mu\text{M}$ . Σε μεγαλύτερες ποσότητες είναι τοξικός για τα κύτταρα (Cervantes & Gutierrez-Corona

1994). Το ενεργό συστατικό που είναι υπεύθυνο για την τοξικότητα είναι το ιόν  $\text{Cu}^{2+}$ . Συνεπώς όταν χρησιμοποιείται σε μονοσθενή μορφή, πρέπει να οξειδωθεί για να δράσει (Ζιώγας και Μαρκόγλου 2017). Η τοξικότητα επηρεάζεται από διάφορους περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως είναι το pH, η υγρασία και η θερμοκρασία, αλλά και από την αλληλεπίδραση με άλλα ιόντα (Trevors & Cotter 1990). Αναφέρεται ότι στο εσωτερικό των κυττάρων έχει περισσότερους από έναν στόχους (Brown et al. 1992). Ένας από τους μηχανισμούς δράσης είναι η ρήξη των κυτταρικών τοιχωμάτων ή των κυτταρικών μεμβρανών, λόγω οξείδωσης των πρωτεϊνών ή των λιπιδίων τους. Η οξείδωση προκύπτει από την δημιουργία στο εσωτερικό των κυττάρων ενεργών ριζών υδροξυλίου, η παραγωγή των οποίων είναι αποτέλεσμα της αντίδρασης του ιόντος  $\text{Cu}^+$  με υπεροξείδιο του υδρογόνου (αντίδραση Fenton). Από τα προϊόντα της αντίδρασης επηρεάζεται και το DNA του μικροοργανισμού. Ταυτόχρονα, το ιόν  $\text{Cu}^{2+}$  μπορεί να προσδεθεί σε λειτουργικές ομάδες ενζύμων, νουκλεϊκών οξέων και λιπιδίων και να τις τροποποιήσει (Brown et al. 1992, Cervantes & Gutierrez-Corona 1994, Fowler et al. 2019, Fan et al. 2022)

#### **1.4.3 Ανθεκτικότητα φυτοπαθογόνων βακτηρίων στο χαλκό**

Το 1990, η επιστημονική κοινότητα, εξέφρασε την ανησυχία της για την ανθεκτικότητα των φυτοπαθογόνων βακτηρίων στο χαλκό (McManus et al. 2002). Τα βακτήρια από τη φύση τους διαθέτουν μηχανισμούς με τους οποίους ελέγχουν την πρόσληψη του χαλκού (Brown et al. 1992). Ωστόσο, όπως αναφέρθηκε, ο χαλκός σε υψηλές συγκεντρώσεις είναι τοξικός για τα κύτταρα (Cervantes & Gutierrez-Corona 1994). Η εκτεταμένη χρήση χαλκούχων σκευασμάτων στη φυτοπροστασία, οδήγησε στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας σε πολλά είδη βακτηρίων (Fan et al. 2022). Οι Goto et al. (1994), σε πείραμά τους, πραγματοποίησαν έλεγχο ευαισθησίας στο χαλκό, σε φυτοπαθογόνα είδη βακτηρίων που ανήκουν στα γένη *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Erwinia*, *Agrobacterium*, *Clavibacter* και *Curtobacterium*. Ανθεκτικότητα παρατηρήθηκε σε όλα τα γένη, με τα περισσότερα είδη να ανήκουν στο γένος *Pseudomonas*. Στα βακτήρια, η ανθεκτικότητα ελέγχεται από γονίδια τα οποία συνήθως εδράζονται σε πλασμίδια και μεταθετά στοιχεία (τρανσποζόνια) (La Torre et al. 2018). Υπάρχουν αναφορές ότι ορισμένα γονίδια μπορεί να εδράζονται και στο χρωμόσωμα (Cervantes & Gutierrez-Corona 1994). Δεδομένου ότι το  $\text{Cu}^{2+}$  έχει πολλούς στόχους στο εσωτερικό των κυττάρων, η ανθεκτικότητα δεν αποδίδεται στην τροποποίηση των στόχων. Ταυτόχρονα, επειδή ο χαλκός είναι απαραίτητος σε μικρές ποσότητες για τα κύτταρα, δεν υπάρχουν μηχανισμοί που εμποδίζουν εξ ολοκλήρου την πρόσληψη χαλκού (Brown et al. 1992). Η ανθεκτικότητα προκύπτει είτε με μεταφορά του ιόντος από το κυττόπλασμα στο περίπλασμα, είτε με σύνθεση πρωτεϊνών που προστατεύουν



το κύτταρο ή οξειδώνουν το ιόν πριν εισέλθει στο κύτταρο (La Torre et al. 2018). Στα ανθεκτικά βακτήρια του *Pseudomonas syringae* complex, συνήθως παρατηρείται δέσμευση του ιόντος στο περίπλασμα. Υπεύθυνα θεωρούνται τέσσερα γονίδια (*copABCD*), τα οποία εδράζονται στο πλασμίδιο pPT23D (Fan et al. 2022).

#### **1.4.4 Ανθεκτικότητα *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* στο χαλκό**

Οι Quesada et al. 2010, προσδιόρισαν την ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση θεικού χαλκού για μια ευαίσθητη απομόνωση του βακτηρίου *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*. Στη συνέχεια, πραγματοποίησαν απομονώσεις από 557 δείγματα, έχοντας εμπλουτίσει το θρεπτικό υπόστρωμα με την ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (0,7 mM). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, δεν εντόπισαν ανθεκτικά στελέχη του βακτηρίου. Ανθεκτικότητα δεν εντοπίστηκε και σε πείραμα που πραγματοποιήθηκε από τον Khlaif (2006). Σύμφωνα με πείραμα των Bouaichi et al. 2019, κατά τον έλεγχο ευαισθησίας απομονώσεων του βακτηρίου στο χαλκό, εκτός από τη συγκέντρωση, πρέπει να λαμβάνεται υπόψη και το χρονικό διάστημα επώασης της καλλιέργειας. Οι Nguyen et al. 2018 σε πείραμά τους, πραγματοποίησαν *in vitro*, έλεγχο ευαισθησίας 147 απομονώσεων του βακτηρίου *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* στο χαλκό. Ο έλεγχος έγινε με τη μέθοδο εμπλουτισμού του θρεπτικού υποστρώματος με θεικό χαλκό. Απομονώσεις που αναπτύχθηκαν μόνο στη χαμηλότερη συγκέντρωση χαλκού (10 µg/mL), χαρακτηρίστηκαν ως ευαίσθητες, ενώ απομονώσεις που αναπτύχθηκαν στη μεγαλύτερη (50 µg/mL), ως ανθεκτικές. Οι υπόλοιπες χαρακτηρίστηκαν ως μετρίως ευαίσθητες. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, το 2% των απομονώσεων ήταν ανθεκτικές στο χαλκό, ενώ το 95,3% ευαίσθητες.

#### **1.5.1 Χρήση αντιβιοτικών στη φυτοπροστασία**

Μετά την ανακάλυψη των αντιβιοτικών και την παραγωγή τους σε εμπορική κλίμακα για χρήση στην Ιατρική, οι επιστήμονες αξιολόγησαν την αποτελεσματικότητά τους για την αντιμετώπιση φυτοπαθογόνων βακτηρίων (Pramer 1959). Σκοπός ήταν η άμβλυνση των προβλημάτων που προέκυψαν από τις ήδη χρησιμοποιούμενες χημικές ενώσεις για την αντιμετώπιση ασθενειών με αίτια τα βακτήρια (Pramer 1959, Misato et al. 1977). Δοκιμές πραγματοποιήθηκαν με περισσότερα από 40 αντιβιοτικά, ωστόσο λίγα από αυτά χρησιμοποιήθηκαν στην πράξη (McManus & Stockwell 2001). Ορισμένα ήταν χημικά ασταθή σε συνθήκες περιβάλλοντος και αναποτελεσματικά σε χαμηλές δόσεις. Σε υψηλές δόσεις

υπήρξαν περιπτώσεις στις οποίες μετά την εφαρμογή τους παρατηρήθηκε φυτοτοξικότητα. Ένα ακόμα μειονέκτημα ήταν το υψηλό κόστος (Misato et al. 1977, Sundin & Wang 2018). Από τα πρώτα αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν στη φυτοπροστασία ήταν η στρεπτομυκίνη, για την αντιμετώπιση του βακτηρίου *Erwinia amylovora*, που προκαλεί την ασθένεια βακτηριακό κάψιμο (McManus et al. 2002). Σήμερα, η χρήση των αντιβιοτικών στη φυτοπροστασία παρουσιάζει περιορισμούς σε ότι αφορά το νομοθετικό πλαίσιο (McManus et al. 2002, Stockwell & Duffy 2012). Ωστόσο, στην πράξη αναφέρεται ότι δεν υπάρχει επαρκής επιτήρηση από τις αρμόδιες αρχές (Taylor & Reeder 2020). Ένας από τους κυριότερους λόγους που οδήγησε στον περιορισμό της χρήσης τους, είναι η ανάπτυξη ανθεκτικότητας και η ανησυχία της επιστημονικής κοινότητας για αδυναμία αντιμετώπισης ασθενειών του ανθρώπου που προκαλούνται από βακτήρια (McManus et al. 2002, Stockwell & Duffy 2012). Αντιβιοτικά χρησιμοποιούνται σε λίγες περιπτώσεις και κυρίως για καλλιέργειες μεγάλης οικονομικής σημασίας. Μερικά από αυτά είναι η στρεπτομυκίνη, η οξυτετρακυκλίνη, η κασουγκαμυκίνη και η γενταμυκίνη (Haynes et al. 2020). Οι πληροφορίες σχετικά με τις χώρες στις οποίες χρησιμοποιούνται αντιβιοτικά είναι ελάχιστες. Υπολογίζεται ότι τη μεγαλύτερη κατανάλωση αντιβιοτικών έχουν οι Η.Π.Α. (Taylor & Reeder 2020). Ωστόσο, έχουν θεσπιστεί κανόνες με σκοπό την ορθή χρήση τους. Σύμφωνα με τον Οργανισμό Προστασίας Περιβάλλοντος των Η.Π.Α. (EPA), ο παραγωγός κατά τη χρήση αντιβιοτικών, είναι υποχρεωμένος να φορά κατάλληλο ρουχισμό και η είσοδος στον αγρό επιτρέπεται μετά από 12 ώρες. Παράλληλα καθορίζονται ο χρόνος από την τελευταία επέμβαση ως τη συγκομιδή και τα ανώτατα όρια υπολειμμάτων στο συγκομισμένο προϊόν (Stockwell & Duffy 2012). Στην Ευρώπη, η χρήση αντιβιοτικών στη φυτοπροστασία έχει απαγορευτεί (Sundin & Wang 2018). Εξαιρέση αποτελούν η Αυστρία και η Ελβετία, οι οποίες επιτρέπουν τη χρήση της στρεπτομυκίνης σε μικρές ποσότητες σε περιπτώσεις έκτακτης ανάγκης, για την αντιμετώπιση του βακτηρίου *Erwinia amylovora* (Haynes et al. 2020).

## **1.5.2 Παραδείγματα αντιβιοτικών και μηχανισμός δράσης**

### **1.5.2.1 Χλωραμφαινικόλη**

Η χλωραμφαινικόλη ανακαλύφθηκε το 1947. Ο Ehrlich και οι συνεργάτες του, απομόνωσαν από το έδαφος, ένα στέλεχος βακτηρίου που άνηκε στο είδος *Streptomyces venezuelae* (Ehrlich et al. 1947, Pongs 1979, Berendsen et al. 2013). Μετά την καλλιέργειά του σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα, βρέθηκε ότι το διήθημα είχε αντιμικροβιακές ιδιότητες. Η ουσία που απομονώθηκε, ονομάστηκε αρχικά chloromycetin (Ehrlich et al. 1947). Τα βακτήρια του

γένους *Streptomyces*, ανήκουν στους Ακτινομύκητες που είναι Gram θετικά βακτήρια και χαρακτηρίζονται από την ικανότητά τους να παράγουν διάφορα αντιβιοτικά (Chater 2013). Χλωραμφαινικόλη μπορεί να παραχθεί από διάφορα είδη Ακτινομυκήτων (Pongs 1979, Berendsen et al. 2013). Η χλωραμφαινικόλη, είναι από τα πρώτα αντιβιοτικά που παράχθηκε με χημικά μέσα. Ο μοριακός τύπος της ένωσης είναι ο εξής:  $C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$ . Είναι ιδιαίτερα διαλυτή στην αιθανόλη, στη μεθανόλη, στον οξεϊκό αιθυλεστέρα και στην ακετόνη (International Agency for Research on Cancer 1990). Χρησιμοποιείται ως βακτηριοστατική ένωση και θεωρείται αντιβιοτικό ευρέου φάσματος. Σε συγκεντρώσεις 10  $\mu\text{g/mL}$  είναι αποτελεσματική έναντι μεγάλου αριθμού θετικών κατά Gram βακτηρίων και σε συγκεντρώσεις 0.2-5  $\text{mg/mL}$  καταστέλλει την ανάπτυξη αρνητικών κατά Gram βακτηρίων (Pongs 1979). Παρεμποδίζει επίσης την ανάπτυξη ορισμένων αναερόβιων βακτηρίων (Kucers 1982). Στα προκαρυωτικά κύτταρα δρα παρεμποδίζοντας τη σύνθεση των πρωτεϊνών. Συγκεκριμένα προσκολλάται στην υπομονάδα 50S του 70S ριβοσώματος παρεμποδίζοντας την ενεργότητα της πεπτιδυλοτρανσφεράσης με αποτέλεσμα την αδυναμία δημιουργίας πεπτιδικών δεσμών μεταξύ των αμινοξέων. Η διαδικασία αυτή είναι αναστρέψιμη (Scholar 2007, Abdollahi & Mostafalou 2014). Τα ευκαρυωτικά κύτταρα είναι κατά κύριο λόγο ανθεκτικά στη χλωραμφαινικόλη, ωστόσο έχει βρεθεί ότι μπορεί να παρεμποδίσει τη σύνθεση πρωτεϊνών στα ερυθροποιητικά κύτταρα των θηλαστικών (Pongs 1979, Abdollahi & Mostafalou 2014). Στη φυτική παραγωγή χρησιμοποιήθηκε δοκιμαστικά το 1949 για τον έλεγχο του βακτηρίου *Agrobacterium tumefaciens* (Anderson & Cottlieb 1952). Οι Misato et al. 1977 αναφέρουν ότι έχει χρησιμοποιηθεί σε διάφορες χώρες για την αντιμετώπιση ασθενειών που οφείλονται σε φυτοπαθογόνα βακτήρια. Το 1964, εγκρίθηκε η χρήση της για καλλιέργειες ρυζιού στην Ιαπωνία (Misato et al. 1977). Σήμερα δεν χρησιμοποιείται στη φυτοπροστασία (Sundin & Wang 2018). Στην Ευρωπαϊκή Ένωση, στις Η.Π.Α., στον Καναδά, στην Κίνα και την Ιαπωνία, η χρήση της στη ζωική παραγωγή απαγορεύτηκε, καθώς βρέθηκε ότι σχετίζεται με την πρόκληση απλαστικής αναιμίας στον άνθρωπο. Η Ευρωπαϊκή Ένωση έχει θεσπίσει ανώτατα όρια για την ανίχνευσή της στα ζωικά προϊόντα (Berendsen et al. 2010, Berendsen et al. 2013). Στην Ιατρική χρησιμοποιείται σε ειδικές περιπτώσεις, όπως για παράδειγμα σε ασθενείς με αλλεργία στις β-λακτάμες και στην τετρακυκλίνη, σε περιπτώσεις ανθεκτικότητας και σε αναπτυσσόμενες χώρες κυρίως για τον τυφοειδή πυρετό (Scholar 2007, Abdollahi & Mostafalou 2014).

### 1.5.2.2 Ερυθρομυκίνη

Το αντιβιοτικό ερυθρομυκίνη (ερυθρομυκίνη Α) ανήκει στη χημική ομάδα των μακρολιδίων. Οι ενώσεις της ομάδας αυτής αποτελούνται από δακτυλίους λακτόνης, οι οποίοι είναι συνδεδεμένοι μέσω γλυκοζιτικών δεσμών με σάκχαρα (Vardanyan & Hruby 2006). Απομονώθηκε το 1952 από τον James McGuire και τους συνεργάτες του, από υγρή καλλιέργεια ενός στελέχους του βακτηρίου *Streptomyces erythraeus*, το οποίο είναι γνωστό και σαν *Saccharopolospora erythraea* (Kucers 1982, Roberts 2014). Δεν παράγεται με χημικά μέσα (Vardanyan & Hruby 2006, National Centre for Biotechnology Information 2022a). Από το διήθημα την καλλιέργειας, εκτός από την ερυθρομυκίνη Α μπορούν να απομονωθούν και 2 παράγωγα, η ερυθρομυκίνη Β και C (Vardanyan & Hruby 2006). Ο μοριακός της τύπος είναι ο εξής:  $C_{37}H_{67}NO_{13}$ . Είναι ιδιαίτερα διαλυτή στην ακετόνη, στην αιθανόλη, στο χλωροφόρμιο και στον οξεϊκό αιθυλεστέρα. Στο νερό διαλύεται με δυσκολία (National Centre for Biotechnology Information 2022a). Σε pH μικρότερο από 5, χάνει την αποτελεσματικότητά της. Είναι βακτηριοστατική ένωση, ωστόσο σε μερικά είδη βακτηρίων μπορεί να δράσει και σαν βακτηριοκτόνο (Hahn 1967). Αυτό εξαρτάται από την συγκέντρωση του αντιβιοτικού, την ευαισθησία του μικροοργανισμού, τον ρυθμό ανάπτυξης και το μέγεθος των αποικιών. Δρα ενάντια σε μεγάλο αριθμό Gram θετικών βακτηρίων, αλλά σε μικρό Gram αρνητικών (Hahn 1967, Vardanyan & Hruby 2006). Στα προκαρυωτικά κύτταρα δρα παρεμποδίζοντας τη σύνθεση των πρωτεϊνών. Συγκεκριμένα, προσκολλάται στην υπομονάδα 50S του ριβοσώματος, παρεμποδίζοντας τη δράση της πεπτιδυλοτρανσφεράσης που έχει σαν αποτέλεσμα την αδυναμία δημιουργίας πεπτιδικών δεσμών και κατά συνέπεια την επιμήκυνση της πεπτιδικής αλυσίδας (Vardanyan & Hruby 2006, Roberts 2014, National Centre for Biotechnology Information 2022a). Σήμερα χρησιμοποιείται στην Ιατρική για τη θεραπεία διάφορων ασθενειών, σε ασθενείς αλλεργικούς στην πενικιλίνη και στην ζωική παραγωγή (Roberts 2014).

### 1.5.2.3 Πενικιλίνες

Η πενικιλίνη ανακαλύφθηκε το 1928, από μια τυχαία παρατήρηση του Alexander Fleming σε καλλιέργεια σταφυλλόκοκκου που είχε επιμολυνθεί με μύκητα του γένους *Penicillium*. Στο εμπόριο εισήχθη το 1946 (Miller 2002). Οι πενικιλίνες παράγονται από μύκητες του γένους *Penicillium* και κυρίως από το είδος *Penicillium chrysogenum* και ανήκουν στις β-λακτάμες, μαζί με τις κεφαλοσπορίνες και τις καρβαπενέμες (Moore & Nygren 2004, Davis 2018). Η περαιτέρω κατηγοριοποίηση των εμπορικά διαθέσιμων ενώσεων που ανήκουν στις

πενικιλίνες, μπορεί να γίνει με βάση τη σύνθεση (φυσικές, ημισυνθετικές, συνθετικές ενώσεις), με βάση την ανθεκτικότητα του μορίου στις β-λακταμάσες και το εύρος του φάσματος δράσης (Miller 2002, Moore & Nygren 2004). Τα αντιβιοτικά που ανήκουν στις β-λακτάμες είναι βακτηριοστατικές ενώσεις (Davis 2018). Οι πενικιλίνες είναι αποτελεσματικές έναντι των Gram θετικών βακτηρίων, αλλά αναποτελεσματικές έναντι ιών, μυκήτων και στα περισσότερα αρνητικά κατά Gram βακτήρια (Vardanyan & Hruby 2006). Για να δράσουν, πρέπει να εισέλθουν στο βακτηριακό κύτταρο. Η αδυναμία ελέγχου των Gram αρνητικών βακτηρίων οφείλεται στην ύπαρξη ενός στρώματος λιποπολυσχαριτών, το οποίο μειώνει την ικανότητα του αντιβιοτικού να διεισδύσει στο εσωτερικό του κυττάρου (Davis 2018). Όλες οι πενικιλίνες παρεμποδίζουν τη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος, μέσω πρόσδεσης σε ένζυμα που συμμετέχουν στη δημιουργία των πεπτιδογλυκάνων. Το κύτταρο τελικά οδηγείται σε ρήξη (Miller 2002, Davis 2018). Η πενικιλίνη G είναι φυσική ένωση και συναντάται με τη μορφή αλάτων, με σκοπό την σταθερότητα της ένωσης κατά την αποθήκευση ή τη μείωση του ρυθμού απορρόφησής της και κατά συνέπεια τη δράση της για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα (Miller 2002). Είναι άχρωμη ή λευκή σε κρυσταλλική μορφή και άοσμη. Σε αντίθεση με την ερυθρομυκίνη και την χλωραμφαινικόλη, είναι ιδιαίτερα διαλυτή στο νερό (Ahmadi & Mostafarour 2017). Είναι αποτελεσματική ενάντια στα Gram θετικά βακτήρια, ωστόσο δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον έλεγχο αρνητικών κατά Gram βακτηρίων, καθώς είναι ανθεκτικά. Ταυτόχρονα είναι ευαίσθητη στις β-λακταμάσες, σε αντίθεση με ορισμένες ημισυνθετικές (Vardanyan & Hruby 2006). Στο παρελθόν, έχει χρησιμοποιηθεί σε διάφορα πειράματα με σκοπό τη αντιμετώπιση ασθενειών που οφείλονται σε φυτοπαθογόνα βακτήρια, όπως για παράδειγμα σε αυτές που προκαλούνται από τα βακτήρια *Erwinia amylovora* και *Xanthomonas juglandis*, ωστόσο δεν ήταν αποτελεσματική (Anderson & Cottlieb 1952).

#### 1.5.2.4 Τετρακυκλίνες

Το πρώτο αντιβιοτικό που ανήκει στην ομάδα των τετρακυκλίνων, είναι η χλωροτετρακυκλίνη, η οποία απομονώθηκε το 1948 από καλλιέργεια του βακτηρίου *Streptomyces aureofaciens*. Η ένωση ονομάστηκε αρχικά aeromycin. Το 1949, από το είδος *Streptomyces rimosus*, απομονώθηκε η οξυτετρακυκλίνη (terramycin) (Ramachanderan & Schaefer 2021). Αργότερα ανακαλύφθηκε και η τετρακυκλίνη (Kucers 1952, Nguyen et al. 2014). Η τετρακυκλίνη παράγεται από το είδος *Streptomyces viridifaciens* και από στελέχη του είδους *Streptomyces aureofaciens* (Vardanyan & Hruby 2006). Τα αντιβιοτικά αυτά είναι πρώτης γενιάς. Αργότερα με τροποποιήσεις δημιουργήθηκαν και οι τετρακυκλίνες δεύτερης και τρίτης γενιάς, οι οποίες χαρακτηρίζονται από μεγαλύτερη αντιμικροβιακή ικανότητα και μειωμένη τοξικότητα

(Nguyen et al. 2014). Οι τετρακυκλίνες είναι αντιβιοτικά ευρέως φάσματος και χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο θετικών και αρνητικών κατά Gram βακτηρίων και ορισμένων μυκοπλασμάτων και πρωτόζωων (Kucers 1952, Chopra & Roberts 2001, Vardanyan & Hruby 2006, Davis 2018). Τα ευκαρυωτικά κύτταρα δεν παρουσιάζουν ευαισθησία, καθώς η πρόσληψη της ένωσης στο κύτταρο γίνεται με διαφορετικό τρόπο και παρόλο που η τετρακυκλίνη μπορεί να συνδεθεί στο ριβόσωμά τους, η συγγένεια είναι μικρή (Ramachandran & Schaefer 2021). Όλες οι ενώσεις που ανήκουν στις τετρακυκλίνες είναι βακτηριοστατικές και η δράση τους είναι αναστρέψιμη (Chopra & Roberts 2001). Σε υψηλές συγκεντρώσεις αναφέρεται ότι μπορεί να έχουν βακτηριοκτόνο δράση (Davis 2018). Δρουν παρεμποδίζοντας τη σύνθεση των πρωτεϊνών. Συγκεκριμένα, αφού εισέλθουν στο εσωτερικό των κυττάρων, προσδένονται στην υπομονάδα 30S του ριβοσώματος, με αποτέλεσμα την αδυναμία σύνδεσης του αμινοακύλ-tRNA με το mRNA κατά τη μετάφραση (Chopra & Roberts 2001, Vardanyan & Hruby 2006, Ramachandran & Schaefer 2021). Για να δράσουν οι τετρακυκλίνες, το pH του περιβάλλοντος πρέπει να είναι κατά προτίμηση όξινο (Davis 2018). Χαρακτηριστικό των ενώσεων αυτών, είναι η μεγάλη υπολλειματικότητά τους στο έδαφος και η δυσκολία αποικοδόμησης. Σήμερα, οι τετρακυκλίνες χρησιμοποιούνται ευρέως στην Ιατρική για την αντιμετώπιση διάφορων ασθενειών, στην κτηνιατρική και στη ζωική παραγωγή σαν ρυθμιστές ανάπτυξης (Lu et al. 2018). Στην φυτοπροστασία, χρησιμοποιήθηκε κυρίως η οξυτετρακυκλίνη, για την αντιμετώπιση διάφορων ασθενειών (Misato et al. 1977). Στις Η.Π.Α. χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση του βακτηριακού καψίματος, σε περιπτώσεις ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό στρεπτομυκίνη. Επίσης το 2016 εγκρίθηκε η χρήση της για καλλιέργειες εσπεριδοειδών (Sundin and Wang 2018). Χρησιμοποιείται επίσης στο Μεξικό, για το βακτηριακό κάψιμο και για ασθένειες κηπευτικών λαχανικών που οφείλονται σε είδη που ανήκουν στα γένη *Pectobacterium*, *Pseudomonas* και *Xanthomonas* (Haynes et al. 2020).

#### 1.5.2.5 Στρεπτομυκίνη

Το αντιβιοτικό στρεπτομυκίνη, ανήκει στη χημική ομάδα των αμινογλυκοζιτών, στην οποία ανήκουν και τα αντιβιοτικά νεομυκίνη, γενταμυκίνη και καναμυκίνη (Davis 2018). Οι ενώσεις της ομάδας αυτής αποτελούνται από δύο ή περισσότερα αμινοσάκχαρα συνδεδεμένα σε ένα δακτύλιο με γλυκοζιτικούς δεσμούς (Vardanyan & Hruby 2006, Davis 2018). Η στρεπτομυκίνη παράγεται από το βακτήριο *Streptomyces griseus* και ανακαλύφθηκε το 1944 (Sundin 2018). Ο μοριακός τύπος της ένωσης είναι ο εξής:  $C_{21}H_{39}N_7O_{12}$ . (National Center for Biotechnology Information 2022b). Είναι ιδιαίτερα διαλυτή στο νερό και αναφέρεται ότι η δραστηριότητά της μειώνεται σε αλκαλικό pH ή πολύ όξινο pH. Σε διαλύματα είναι σταθερή όταν η θερμοκρασία

είναι μικρότερη από 28 °C και το pH 3-7. Επίσης είναι υγροσκοπική (Lemieux & Wolfrom 1948, National Center for Biotechnology Information 2022b). Είναι βακτηριοστατική ένωση και χρησιμοποιείται για τον έλεγχο αρνητικών κατά Gram βακτηρίων και ορισμένων θετικών κατά Gram. Δρα παρεμποδίζοντας τη σύνθεση των πρωτεϊνών. Συγκεκριμένα, μετά την ενεργή είσοδο στο βακτηριακό κύτταρο, συνδέεται στην υπομονάδα 30S του ριβοσώματος, με αποτέλεσμα την αδυναμία μετάφρασης και κατά συνέπεια της σύνθεσης των πρωτεϊνών (Vardanyan & Hruby 2006, Davis 2018). Αυτή η διεργασία επηρεάζει και την ημιπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης, με αποτέλεσμα την είσοδο του αντιβιοτικού στο κύτταρο με μεγαλύτερο ρυθμό. Το κύτταρο τελικά οδηγείται σε ρήξη (Davis 2018). Χρησιμοποιείται κυρίως στην Ιατρική αλλά και στην Κτηνιατρική (Vardanyan & Hruby 2006, Davis 2018, National Center for Biotechnology Information 2022b). Η στρεπτομυκίνη είναι το πρώτο αντιβιοτικό που χρησιμοποιήθηκε στη φυτοπροστασία. Υπάρχουν αναφορές ότι ήταν αποτελεσματική έναντι του μύκητα *Phytophthora macrospora* (Misato et al. 1977). Σήμερα, η χρήση της επιτρέπεται στις Η.Π.Α. για την αντιμετώπιση διάφορων ασθενειών που οφείλονται σε φυτοπαθογόνα βακτήρια, στο Καναδά, στο Ισραήλ και στο Μεξικό για την αντιμετώπιση του βακτηριακού καψίματος και για τον ίδιο σκοπό σε περιπτώσεις έκτακτης ανάγκης στην Αυστρία και στην Ελβετία (Haynes et al. 2020).

### **1.5.3 Ανθεκτικότητα βακτηρίων στα αντιβιοτικά**

Η ανακάλυψη των αντιβιοτικών έδωσε τη δυνατότητα για την θεραπεία σοβαρών ασθενειών του ανθρώπου, που οφείλονται σε παθογόνα βακτήρια. Παρόλα αυτά, η λανθασμένη και αλόγιστη χρήση τους οδήγησε στην δημιουργία ανθεκτικών στελεχών, με αποτέλεσμα την εκ νέου απειλή της δημόσιας υγείας (Ventola 2015). Το γεγονός αυτό οδήγησε στην επαναξιολόγηση της χρήσης τους, σε τομείς εκτός της Ιατρικής (Stockwell & Duffy 2012). Ωστόσο, η ανθεκτικότητα των βακτηρίων στα αντιβιοτικά, προυπήρχε της ανακάλυψης και χρήσης τους (Peterson & Kaur 2018). Το 1940, πριν την χρήση της πενικιλίνης για θεραπευτικούς σκοπούς, υπήρξε αναφορά σχετικά με ένα ένζυμο που παρεμποδίζει τη δράση της (Abraham & Chain 1940). Τα αντιβιοτικά παράγονται από μικροοργανισμούς, οι οποίοι είναι από τη φύση τους ανθεκτικοί σε αυτά (Peterson & Kaur 2018). Μέσω της συνεξέλιξης των ειδών και της οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων μεταξύ διαφορετικών ειδών, βακτήρια ευαίσθητα, παρουσίασαν ανθεκτικότητα (Sundin et al. 2016, Peterson & Kaur 2018). Η οριζόντια μεταφορά γονιδίων, γίνεται με ανταλλαγή γενετικού μεταξύ δύο βακτηρίων με συζευκτικά ινίδια ή μέσω βακτηριοφάγων (Peterson & Kaur 2018). Ταυτόχρονα, ανθεκτικότητα μπορεί να προκύψει και χωρίς οριζόντια μεταφορά, με μεταλλάξεις, ως

αποτέλεσμα της πίεσης επιλογής (Sundin & Wang 2018). Όσον αφορά τα φυτοπαθογόνα βακτήρια, η ανάπτυξη ανθεκτικότητας σε περιοχές όπου η χρήση των αντιβιοτικών στη φυτική παραγωγή απαγορεύεται, μπορεί να αποδοθεί στη χρήση κοπριάς η οποία προέρχεται από ζώα που έχουν δεχτεί θεραπεία με αντιβιοτικά, στο νερό άρδευσης ή από μεταφορά γονιδίων ανθεκτικότητας από ανθεκτικά βακτήρια του περιβάλλοντος (Haynes et al. 2020). Οι Berendsen et al. 2010, σε πείραμά τους, εντόπισαν υπολείμματα χλωραμφαινικόλης σε φυτικό υλικό από περιοχές όπου η χρήση της απαγορεύεται. Οι στρατηγικές ανθεκτικότητας των βακτηρίων στα αντιβιοτικά είναι οι εξής: τροποποίηση του αντιβιοτικού στο εσωτερικό του κυττάρου, παρεμπόδιση του αντιβιοτικού να εισέλθει στο κύτταρο και τροποποίηση ή προστασία του μορίου στόχου. Για το κάθε αντιβιοτικό, ο μηχανισμός είναι διαφορετικός (Sundin and Wang 2018). Όσον αφορά την πενικιλίνη, η ανθεκτικότητα των βακτηρίων, μπορεί να είναι επίκτητη (οριζόντια μεταφορά γονιδίων ή μεταλλάξεις) ή φυσική. Τα ανθεκτικά βακτήρια παράγουν β-λακταμάσες, ένζυμα που καταστρέφουν το αντιβιοτικό ή στην περίπτωση των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων δεν επιτρέπουν την είσοδο του μορίου στο εσωτερικό των κυττάρων (Miller 2002). Στην περίπτωση της τετρακυκλίνης, η ανθεκτικότητα μπορεί να οφείλεται σε ενεργή αποβολή του αντιβιοτικού από το εσωτερικό των κυττάρων, παραγωγή πρωτεϊνών (TetM and TetO) που προστατεύουν το ριβόσωμα, διάσπαση της τετρακυκλίνης ή τροποποίηση του σημείου πρόσδεσης στο ριβόσωμα (Ramachanderaan & Schaefer 2021). Η ανθεκτικότητα στη στρεπτομυκίνη προκύπτει είτε από την ύπαρξη γονιδίων που κωδικοποιούν ένζυμα διάσπασής της ή από μεταλλάξεις που έχουν σαν αποτέλεσμα την τροποποίηση του ριβοσώματος (Sundin and Wang 2018). Βακτήρια ανθεκτικά στη χλωραμφαινικόλη, συνήθως φέρουν γονίδια που εδράζονται σε πλασμίδια και κωδικοποιούν ένζυμο που επηρεάζει τη δράση της. Η ανθεκτικότητα στην ερυθρομυκίνη οφείλεται σε τροποποίηση του σημείου πρόσδεσής της ή σε παρεμπόδιση του αντιβιοτικού να εισέλθει στο κύτταρο (Vardanyan & Hruby 2006).

#### **1.5.4 Ανθεκτικότητα *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* στα αντιβιοτικά**

Έχει βρεθεί ότι φυτοπαθογόνα βακτήρια του *Pseudomonas syringae* complex, στο οποίο ανήκει και το *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, φέρουν πλασμίδια τα οποία ανήκουν στην κατηγορία pPT23A. Τα πλασμίδια της κατηγορίας αυτής, χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη του γονιδίου *repA* (Perez-Martinez et al. 2008, Bardaji et al. 2011). Συνήθως, στα πλασμίδια αυτά εδράζονται γονίδια που προσφέρουν ανθεκτικότητα στο χαλκό και στα αντιβιοτικά (Perez-Martinez et al. 2008). Οι Bardaji et al. (2011), πραγματοποίησαν αλληλούχηση των πλασμιδίων μιας απομόνωσης του βακτηρίου *Pseudomonas savastanoi* pv.



*savastanoi*, με σκοπό τον την μελέτη του ρόλου των πλασμιδίων στην παθογένεση. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, εντόπισαν 3 πλασμίδια, τα οποία ανήκουν στην κατηγορία pPT23A. Οι Fernandes και Marcelo (2008), σε πείραμά τους, πραγματοποίησαν έλεγχο ευαισθησίας στα αντιβιοτικά σε δέκα στελέχη του βακτηρίου *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, 2 στελέχη ήταν ανθεκτικά σε 8 αντιβιοτικά, ανάμεσα στα οποία ήταν η χλωραμφαινικόλη, η πενικιλίνη, η ερυθρομυκίνη και η διυδροστρεπτομυκίνη. Σε πείραμα που πραγματοποιήθηκε από τους Nguyen et al. (2018), αξιολογήθηκε η αποτελεσματικότητα των αντιβιοτικών κασουγκαμυκίνη και οξυτετρακυκλίνη, για την αντιμετώπιση του βακτηρίου *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*. In vitro και τα δύο αντιβιοτικά ήταν αποτελεσματικά και δεν εντοπίστηκε ανθεκτικό στέλεχος του βακτηρίου. Η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση για την οξυτετρακυκλίνη, ήταν μικρότερη από αυτή της κασουγκαμυκίνης. Ωστόσο, σε πειράματα αγρού δεν ήταν αποτελεσματική, γεγονός που αποδίδεται στην ευαισθησία του αντιβιοτικού στην υπεριώδη ακτινοβολία (Nguyen et al. 2018). Οι Bouaichi et al. (2019), πραγματοποίησαν έλεγχο ευαισθησίας στα αντιβιοτικά, μεταξύ των οποίων ήταν και η χλωροτετρακυκλίνη και η στρεπτομυκίνη, σε στέλεχος του βακτηρίου *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*. Μετά από τοποθέτηση σε δισκία 5 μL διαλύματος στρεπτομυκίνης 20 μg/mL, η ζώνη παρεμπόδισης που σχηματίστηκε είχε διάμετρο 24 mm, συνεπώς το βακτήριο ήταν ευαίσθητο. Ευαισθησία παρατηρήθηκε και στο αντιβιοτικό χλωροτετρακυκλίνη, καθώς στη μικρότερη συγκέντρωση, η ζώνη παρεμπόδισης που σχηματίστηκε ήταν 26 mm (Bouaichi et al. 2019). Σε παρόμοιο πείραμα, απομόνωση του βακτηρίου *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* ήταν ευαίσθητη στα αντιβιοτικά στρεπτομυκίνη, ερυθρομυκίνη και τετρακυκλίνη (Khlaif 2006).

## 2. Υλικά και μέθοδοι

### 2.1 Θρεπτικά υποστρώματα

Για την απομόνωση, τη διατήρηση καθώς και τον έλεγχο ευαισθησίας στο χαλκό απομονώσεων του βακτηρίου *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, παρασκευάστηκε στερεό και υγρό θρεπτικό υπόστρωμα King's B. Για να διαπιστωθεί αν οι απομονώσεις παράγουν λεβάνη (LOPAT test) χρησιμοποιήθηκε στερεό NSA. Για τον έλεγχο ευαισθησίας στα αντιβιοτικά, ως θρεπτικό υπόστρωμα παρασκευάστηκε Mueller Hinton Agar (MHA).

#### 2.1.1 Παρασκευή στερεού θρεπτικού υποστρώματος King's B

Για την παρασκευή 1000 mL υποστρώματος, χρησιμοποιήθηκαν 20 g πεπτόνη, 1,96 g  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  (Merck), 1,5 g  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (Merck), 15 mL γλυκερόλη, 15 g άγαρ (Sigma) (όπως περιγράφεται στη Ρουμελιώτη 2021). Για την απομόνωση του βακτηρίου και για τις βιοχημικές δοκιμές χρησιμοποιήθηκε Proteose peptone (OXOID), ενώ για τις υπόλοιπες δοκιμές και τη διατήρηση των βακτηρίων Bacteriological peptone (OXOID). Το υλικό αποστειρώθηκε στους 121 °C, με πίεση 15 psi για 15 min και διαμοιράστηκε σε γυάλινα αποστειρωμένα τρυβλία διαμέτρου 90 mm (12 mL/τρυβλίο). Με πεχαμέτρηση προέκυψε ότι το pH του ήταν 6,99.

#### 2.1.2 Παρασκευή υγρού θρεπτικού υποστρώματος King's B

Υγρό θρεπτικό υπόστρωμα KB (20 g Proteose peptone (OXOID), 1,96 g  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  (Merck), 1,5 g  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (Merck), 15 ml γλυκερόλη σε 1000 mL απεσταγμένο νερό). Για την παρασκευή του υποστρώματος θερμάνθηκαν η πεπτόνη με 900 mL απεσταγμένο νερό, χωρίς να φτάσουν σε βρασμό και στο διάλυμα προστέθηκαν τα υπόλοιπα συστατικά. Πραγματοποιήθηκε ογκομέτρηση, το υλικό διαμοιράστηκε σε γυάλινα φιαλίδια τύπου McCartney (10 mL/φιαλίδιο) και αποστειρώθηκε στους 121 °C (15 psi, 15 min).

#### 2.1.3 Παρασκευή στερεού θρεπτικού υποστρώματος NSA

Για την παρασκευή 1000 mL υποστρώματος χρησιμοποιήθηκαν 28 g LAB M Nutrient Agar, 3 g άγαρ (Sigma) και 50 g D (+)- σακχαρόζη (Roth) (όπως περιγράφεται στη Ρουμελιώτη 2021). Το υλικό αποστειρώθηκε στους 121 °C (15 psi, 15 min) και διαμοιράστηκε σε γυάλινα αποστειρωμένα τρυβλία διαμέτρου 90 mm (15 mL/τρυβλίο).

### **2.1.4 Παρασκευή στερεού θρεπτικού υποστρώματος Mueller Hinton Agar (MHA)**

Για την παρασκευή 1000 ml υποστρώματος, χρησιμοποιήθηκαν 2 g βόειου εκχυλίσματος (OXOID), 17,5 g peptone from casein (CAS: 91079-40-2, PanReac AppliChem), 1,5 g άμυλο πατάτας (CAS-No.: 9005-84-9, PanReac AppliChem) και 17 g άγαρ (Sigma). Σε κωνική φιάλη προστέθηκαν όλα τα υλικά με 800 mL απεσταγμένο νερό και πραγματοποιήθηκε θέρμανση μέχρι βρασμού και μέχρι το υλικό να γίνει διαυγές. Ακολούθησε ογκομέτρηση στα 1000 mL, το υλικό αποστειρώθηκε στους 121 °C (15 psi, 15 min) και διαμοιράστηκε σε γυάλινα αποστειρωμένα τρυβλία διαμέτρου 90 mm (24 mL/τρυβλίο, πάχος υποστρώματος 4 mm). Το pH ρυθμίστηκε μετά την αποστείρωση με προσθήκη διαλύματος NaOH 0,1 N στο 7,1.

### **2.2 Προσδιορισμός συγκέντρωσης βακτηριακών κυττάρων σε υγρή καλλιέργεια**

Για τον έλεγχο ευαισθησίας των απομονώσεων του βακτηρίου PSS στα αντιβιοτικά και στο χαλκό και για τις δοκιμές για την αντίδραση υπερευαισθησίας στα φυτά καπνού, οι καλλιέργειες έπρεπε να έχουν συγκέντρωση βακτηριακών κυττάρων περίπου  $1,5 \cdot 10^8$  CFU/mL (Lelliott et al. 1966, Nguyen et al. 2018, Bouaichi et al. 2019). Η εκτίμηση του αριθμού των βακτηριακών κυττάρων, έγινε με βάση τη θολρότητα της καλλιέργειας και την κλίμακα McFarland. Για το σκοπό αυτό, δημιουργήθηκε ένα διάλυμα θολρότητας 0,5, τιμή η οποία με βάση την κλίμακα αντιστοιχεί σε συγκέντρωση κυττάρων  $10^8$ -  $2 \cdot 10^8$  CFU/mL. Σε 10 mL διαλύματος περιέχονται 0,05 mL υδατικού διαλύματος BaCl<sub>2</sub> (1,175% w/v) και 9,95 mL υδατικού διαλύματος H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1% v/v) (Hudzicki 2009). Μετά από ανακίνηση των φιαλιδίων, συγκρίθηκε η θολρότητα τους. Αν η θολρότητα των υγρών καλλιεργειών ήταν μεγαλύτερη από αυτή του διαλύματος, πραγματοποιούνταν αραιώση με προσθήκη αποστειρωμένου υγρού King's B. Μετά την αραιώση, πραγματοποιήθηκε μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (OD) των υγρών καλλιεργειών, με τη χρήση φασματοφωτόμετρου.

### **2.3 Απομόνωση *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi***

Η απομόνωση του βακτηρίου έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο των Nguyen et al. 2018, με ελάχιστες τροποποιήσεις. Οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν σε περιοχές της Νοτίου και Κεντρικής Ελλάδας. Στον Πίνακα 1, παρουσιάζονται ο κωδικός απομόνωσης και οι περιοχές δειγματοληψίας. Αρχικά συλλέχθηκαν κλαδιά από φυτά ελιάς με νεοσχηματισμένους και κλειστούς όγκους. Τα δείγματα (κλαδίσκοι), αμέσως μετά τη συλλογή τους τοποθετούνταν σε πλαστικές σακούλες, σημαίνονταν κατάλληλα και μεταφέρονταν με παγοκύστες στο

Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας του ΠΘ, όπου τοποθετούνταν στους 4 °C. Η απομόνωση των βακτηρίων λάμβανε χώρα εντός 24 ωρών από τη συλλογή. Εξάιρεση αποτέλεσαν τα δείγματα από Πελοπόννησο και Κρήτη, όπου η απομόνωση πραγματοποιήθηκε έως και μια εβδομάδα μετά τη συλλογή τους. Στο εργαστήριο, πραγματοποιήθηκε αρχικά απολύμανση των κλαδίσκων που φέραν όγκους με χαρτί εμποτισμένο με αιθανόλη 90%, για 30sec. Υπό ασηπτικές συνθήκες και με τη χρήση νυστεριού, έγινε οριζόντια τομή στους όγκους, ώστε να φανερωθεί το εσωτερικό τους. Το εσωτερικό των νεαρών όγκων από τους οποίους πραγματοποιήθηκε απομόνωση ήταν πράσινο. Παλιοί ανοιχτοί όγκοι με καστανό μεταχρωματισμό στο εσωτερικό τους δεν επιλέχθηκαν. Τις λίγες φορές που επιχειρήθηκε η απομόνωση του παθογόνου αιτίου από ανοιχτούς όγκους, αυτό δεν κατέστη δυνατό λόγω της ανάπτυξης σαπροφυτικών μυκήτων και βακτηρίων. Κομμάτια 1-2 mm, αφαιρέθηκαν υπό ασηπτικές συνθήκες από το εσωτερικό των όγκων με νυστέρι και τοποθετήθηκαν σε φιαλίδια φυγοκέντρησης τύπου Eppendorf όγκου 1,5 mL. Τα φιαλίδια περιείχαν 600 µL αποστειρωμένο δις απεσταγμένο νερό. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε έντονη ανάδευση (vortex) για περίπου 1 min. Τέλος, πραγματοποιήθηκε διασπορά 50 µL από το κάθε φιαλίδιο σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό υπόστρωμα King's B. Τα τρυβλία τοποθετήθηκαν στον επωαστικό θάλαμο (25 °C), για 48 h.

Πίνακας 1. Κωδικοί απομονώσεων και περιοχές δειγματοληψίας.

| ΚΩΔΙΚΟΣ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ | ΠΕΡΙΟΧΗ                |
|--------------------|------------------------|
| PSS52              | Αλμυρός, Μαγνησία      |
| PSS54              | Νέα Αγχίαλος, Μαγνησία |
| PSS58              | Βρονταμάς, Λακωνία     |
| PSS59              | Βρονταμάς, Λακωνία     |
| PSS60              | Βρονταμάς, Λακωνία     |
| PSS69              | Φυτόκο, Μαγνησία       |
| PSS71              | Φυτόκο, Μαγνησία       |
| PSS73              | Φυτόκο, Μαγνησία       |
| PSS77              | Λεφόκαστρο, Μαγνησία   |
| PSS86              | Άνω Γατζέα, Μαγνησία   |
| PSS87              | Μαλάκι, Μαγνησία       |
| PSS89              | Αγριά, Μαγνησία        |
| PSS94              | Διρός, Λακωνία         |
| PSS96              | Διρός, Λακωνία         |
| PSS100             | Κροκεές, Λακωνία       |
| PSS102             | Γερολιμένας, Λακωνία   |
| PSS103             | Γερολιμένας, Λακωνία   |
| PSS104             | Γερολιμένας, Λακωνία   |
| PSS113             | Μάτι, Κρήτη            |
| PSS114             | Βοριάς, Κρήτη          |

## 2.4 Μορφολογία απομονωθέντων βακτηρίων και χρώση Gram

Για τη χρώση Gram χρησιμοποιήθηκαν τα εξής αντιδραστήρια: Διάλυμα κρυσταλλικού ιώδους, διάλυμα αιθανόλης/ακετόνης (4:1), διάλυμα σαφρανίνης και διάλυμα Lugol's (Merck, Cat. No. 1.11885). Πριν τη χρώση, πραγματοποιήθηκε καθήλωση των βακτηριακών κυττάρων κάθε απομόνωσης σε αντικειμενοφόρους πλάκες. Για το σκοπό αυτό, στην άκρη κάθε αντικειμενοφόρου τοποθετήθηκαν 10 µL αποστειρωμένου δις απεσταγμένου νερού. Με τη βοήθεια βακτηριολογικού κρίκου, αφαιρούνταν με απόξεση μικρό τμήμα αποικίας βακτηρίου ηλικίας 24-48 h, που είχε αναπτυχθεί σε στερεό King's B, μεταφέρονταν στο νερό και γινόταν ανάμιξη μέχρι απελευθέρωσης των βακτηριακών κυττάρων. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε Gram θετικό βακτήριο. Η καθήλωση επιτεύχθηκε με πέρασμα της αντικειμενοφόρου πάνω από γυμνή φλόγα, μέχρι να εξατμιστεί το νερό. Η χρώση έγινε με την εξής διαδικασία:

- Κάλυψη της κηλίδας με διάλυμα κρυσταλλικού ιώδους για 1 min
- Ξέπλυμα με διάλυμα Lugol's
- Κάλυψη της κηλίδας με διάλυμα Lugol's για 1 min
- Ξέπλυμα με αποστειρωμένο απεσταγμένο νερό για 5 sec
- Τοποθέτηση της αντικειμενοφόρου στην αιθανόλη και ανάδευση για 20-60 sec, μέχρι να μην παρατηρείται απελευθέρωση χρωστικής
- Κάλυψη της κηλίδας με διάλυμα σαφρανίνης για 1 min
- Ξέπλυμα με αποστειρωμένο απεσταγμένο νερό για 5 sec
- Αξιολόγηση των αποτελεσμάτων (κόκκινος χρωματισμός στην κηλίδα αντιστοιχεί σε αρνητικά κατά Gram βακτήρια, μπλε χρωματισμός αντιστοιχεί σε θετικά κατά Gram βακτήρια)

Μετά τη χρώση τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε σύνθετο οπτικό μικροσκόπιο (Nicon Labophot-2), που έφερε ψηφιακή φωτογραφική μηχανή MOTIC 10 Mpixel και εξετάστηκαν σε μεγάλη μεγέθυνση με ελαιοκαταδυτικό φακό, με σκοπό τον προσδιορισμό του σχήματός τους.

## 2.5 Βιοχημική ταυτοποίηση απομονωθέντων βακτηρίων

### 2.5.1 Παραγωγή φθοριζουσών ουσιών σε King' B

Για να διαπιστωθεί η παραγωγή φθοριζουσών ουσιών από τις απομονώσεις, πραγματοποιήθηκε επίστρωση τους σε γυάλινα τρυβλία που περιείχαν στερεό King's B. Σε κάθε τρυβλίο,

τοποθετήθηκαν 4 απομονώσεις. Τα τρυβλία τοποθετήθηκαν για επώαση στους 25 °C. Ο έλεγχος έγινε μετά από 48 h, σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας (365 nm).

### **2.5.2 Παραγωγή λεβάνης**

Για να διαπιστωθεί αν οι απομονώσεις παράγουν λεβάνη (levan), πραγματοποιήθηκε επίστρωση τους σε τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα NSA. Τα τρυβλία τοποθετήθηκαν για επώαση στους 25 °C και μετά από 48 h έγινε αξιολόγηση των αποτελεσμάτων. Σύμφωνα με τους Lelliott et al. (1966), οι απομονώσεις παράγουν λεβάνη, αν στο θρεπτικό υπόστρωμα οι αποικίες είναι λευκές, υπερυφωμένες και με βλεννώδη μορφή. Σύμφωνα με τους Marchi et al. (2005), οι απομονώσεις δεν παράγουν λεβάνη αν οι αποικίες είναι θολές με γκρι ή απαλό κίτρινο χρωματισμό, με επίπεδη επιφάνεια ή ελάχιστα υπερυφωμένες.

### **2.5.3 Παραγωγή πηκτινολυτικών ενζύμων**

Για να διαπιστωθεί αν οι απομονώσεις παράγουν πηκτινολυτικά ένζυμα, πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός τεμαχίων κονδύλων πατάτας με υγρές καλλιέργειες των βακτηρίων, ηλικίας 24 h. (Lelliott et al. 1966). Αρχικά, οι κόνδυλοι πατάτας ξεπλύθηκαν με νερό βρύσης, αφήθηκαν να στεγνώσουν, αφαιρέθηκε η φλούδα τους και κόπηκαν σε δίσκους πάχους περίπου 1 cm. Τα τεμάχια, εμβαπτίστηκαν σε αιθανόλη 90% και με τη βοήθεια λαβίδας πέρασαν πάνω από γυμνή φλόγα. Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένα τρυβλία. Στο κάτω μέρος των τρυβλίων είχε τοποθετηθεί διηθητικό χαρτί, το οποίο είχε εμποτιστεί με 5 mL αποστειρωμένο δις απεσταγμένο νερό. Με αποστειρωμένο νυστέρι, δημιουργήθηκαν δύο κάθετες τομές (βάθος περίπου 5 mm, μήκος 15 mm) στο κέντρο κάθε φέτας. Ο εμβολιασμός, έγινε στο σημείο που τέμονταν οι δύο τομές, με 30 μL από την υγρή καλλιέργεια του βακτηρίου. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε στέλεχος βακτηρίου που απομονώθηκε από μολυσμένους κονδύλους πατάτας με συμπτώματα μαλακής σήψης και ως αρνητικοί μάρτυρες αποστειρωμένο δις απεσταγμένο νερό και υγρό θρεπτικό υπόστρωμα King's B. Τα τρυβλία τοποθετήθηκαν στον επωαστικό θάλαμο (25 °C, σκοτάδι) για 48 h.

## 2.6 Μοριακή ταυτοποίηση απομονωθέντων βακτηρίων

### 2.6.1 Απομόνωση DNA

Η απομόνωση του DNA των βακτηρίων έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Llor et al. 1999, με ελάχιστες τροποποιήσεις. Αρχικά, μεμονωμένες αποικίες από την κάθε απομόνωση τοποθετήθηκαν σε φιαλίδια τύπου McCartney με 10 mL υγρού King's B και επωάστηκαν στους 25 °C σε επωαστικό θάλαμο με περιστρεφόμενη βάση (150 rpm) για 24 h. Στη συνέχεια, 1,5 mL από την κάθε υγρή καλλιέργεια τοποθετήθηκαν σε πλαστικά φιαλίδια φυγοκέντρησης τύπου Eppendorf όγκου 1,5 mL και πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στα 17.000 x g για 5 min. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 500 μL ρυθμιστικού διαλύματος (200 mM Tris HCL pH 7,5 CAS:77-8-1, 250 mM NaCl CAS:7647-14-5, 25 mM EDTA CAS: 6381-92-6, 0,5% SDS CAS:151-21-3, 2% PVP) και ακολούθησε έντονη ανάδευση (vortex). Τα φιαλίδια τοποθετήθηκαν σε επωαστικό θάλαμο στους 25 °C για 1 h με παράλληλη συνεχή ανακίνηση (150 rpm). Έπειτα πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στα 5.000 x g για 5 min και 450 μL από το υπερκείμενο τοποθετήθηκαν σε φιαλίδια φυγοκέντρησης τύπου Eppendorf όγκου 1,5 mL και προστέθηκαν 450 μL ισοπροπανόλης. Πραγματοποιήθηκε ανακίνηση του περιεχομένου και αφέθηκαν για μία ώρα στους 25 °C. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 13.000 x g για 10 min, το υπερκείμενο απορρίφθηκε και το ίζημα κάθε φιαλιδίου αφέθηκε να στεγνώσει. Τέλος έγινε επαναιώρηση του ιζήματος σε 100 μL υπερκάθαρο νερό και τα δείγματα τοποθετήθηκαν στους -20 °C μέχρι περαιτέρω χρήσης.

### 2.6.2 Υπολογισμός ποσότητας και καθαρότητας DNA

Ο υπολογισμός της ποσότητας και της καθαρότητας του DNA έγινε με τη χρήση φασματοφωτόμετρου. Αρχικά 5 μL DNA από την κάθε απομόνωση τοποθετήθηκαν σε φιαλίδια φυγοκέντρησης μαζί με 95 μL αποστειρωμένου δις απεσταγμένου νερού (αραίωση 1:20). Τα 100 μL τοποθετήθηκαν σε κυψελίδα και μετρήθηκε η απορρόφηση του φωτός στα 260 nm και στα 280 nm. Η τιμή OD στα 260 nm επιτρέπει τον ποσοτικό προσδιορισμό του DNA. Συγκεκριμένα ισχύει ότι για μη αραιωμένο DNA και τιμή OD 1, η ποσότητα του δίκλωνου DNA στο δείγμα είναι 50 ng/μL. Συνεπώς για αραίωση 1:20,  $C_{DNA} = OD_{260} * 1000$  (ng/μL). Ο υπολογισμός του λόγου  $OD_{260}/OD_{280}$  επιτρέπει τον προσδιορισμό της καθαρότητας του DNA. Το DNA είναι καθαρό όταν  $1,8 < OD_{260}/OD_{280} < 2$  (Sambrook et al. 1989).

### 2.6.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης- PCR

Αρχικά πραγματοποιήθηκε αραίωση του DNA που απομονώθηκε με υπερκάθαρο νερό ώστε να προκύψει συγκέντρωση DNA 50 ng/μL. Για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction- PCR) και την ταυτοποίηση των απομονώσεων του βακτηρίου PSS, οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι εξής: IAALF 5'-GGCACCAGCGGCAACATCAA-3' και IAALR 5'-CGCCCTCGGAACTGCCATAC-3'. Η αλληλουχία στόχος προς ενίσχυση βρίσκεται στο γονίδιο *iaaL* και αποτελείται από 454 βάσεις (bp) (Penyalver et al. 2000). Σε κάθε φιαλίδιο τοποθετήθηκαν 12,5 μL one-Taq 2x Master Mix with Standard Buffer (NEB), 0,5 μL από τον κάθε εκκινητή (συγκέντρωσης 1 μg/μL), 9,5 μL H<sub>2</sub>O (DEPC) και 2 μL από το αραιωμένο DNA. Τα φιαλίδια με το μείγμα αντίδρασης τοποθετήθηκαν στον θερμοκυκλοποιητή. Το θερμοκρασιακό προφίλ της αντίδρασης ήταν το εξής: 1 κύκλος στους 80 °C για 20 sec, 1 κύκλος στους 94 °C για 5 min, ακολούθησαν 35 κύκλοι (94 °C 30 sec, 62 °C 30 sec, 68 °C 30 sec) και τέλος 1 κύκλος στους 68 °C για 5 min και 1 κύκλος στους 10 °C για 10 sec. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε DNA από μια απομόνωση του βακτηρίου *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (PSS4) που διέθετε το Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας και ως αρνητικός υπερκάθαρο νερό. Τα προϊόντα της PCR, τοποθετήθηκαν στους -20 °C μέχρι να χρησιμοποιηθούν περαιτέρω.

### 2.6.4 Οριζόντια ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αгарόζης

Για το διαχωρισμό των μορίων DNA που προέκυψαν από την PCR πραγματοποιήθηκε οριζόντια ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αгарόζης (1% w/v). Ως ρυθμιστικό διάλυμα χρησιμοποιήθηκε TBE (10,8 g/L Tris, 5,5 g/L Boric acid, 0,5 M EDTA pH 8.0, H<sub>2</sub>O). Η <<φόρτιση>> της πηκτής έγινε με τα δείγματα προς ανάλυση (5 μL προϊόντος PCR με 2 μL ρυθμιστικού διαλύματος φόρτωσης (Type III gel loading buffer, 6x: 0,25% bromophenol blue, 0,25% xylene cyanol, 30% glycerol, in water)), με το δείκτη μοριακού βάρους (1 kb ladder NEB) και με τον αρνητικό και θετικό μάρτυρα. Μετά την ηλεκτροφόρηση, ακολούθησε χρώση του DNA με βρωμιούχο αιθίδιο σύμφωνα με τους Sambrook et al. (1989), ώστε μετά από τοποθέτηση της πηκτής σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας, να καταστούν ορατές οι ζώνες του DNA.



## 2.7 Βιοδοκιμές παθογένειας απομονωθέντων βακτηρίων

### 2.7.1 Αντίδραση υπερευαισθησίας σε φυτά καπνού

Οι δοκιμές πραγματοποιήθηκαν σε φυτά καπνού (*Nicotiana tabacum* L.), ποικιλίας Ξάνθη 81. Οι σπόροι ήταν δωρεά από το Ινστιτούτο Γενετικής Βελτίωσης και Φυτογενετικών Πόρων του ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ (Θέρμη, Θεσσαλονίκη) και διατηρήθηκαν σε θερμοκρασία 4 °C, μέχρι τη φύτευσή τους. Τα φυτά διατηρούνταν σε κατάλληλα διαμορφωμένο χώρο του εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας, με φωτοπερίοδο 15 h φως και 9 h σκοτάδι. Ο συμπληρωματικός φωτισμός έγινε με λάμπες (Osram Fluora T8 36 W- 77 120 cm). Η θερμοκρασία του χώρου κατά τη διάρκεια ανάπτυξης των φυτών ήταν 24-26 °C. Πριν τις δοκιμές, βακτηριακά κύτταρα από την κάθε απομόνωση τοποθετήθηκαν με τη βοήθεια αποστειρωμένου βακτηριολογικού κρίκου σε φιαλίδια τύπου McCartney, που περιείχαν 10 mL αποστειρωμένο υγρό King's B. Τα φιαλίδια τοποθετήθηκαν στον επωαστικό θάλαμο με περιστρεφόμενη βάση (Orbital shaker- incubator), στους 25 °C και στα 150 rpm, για 24 h. Για την προετοιμασία των εμβολίων, αρχικά πραγματοποιήθηκε αραίωση των υγρών καλλιιεργειών με αποστειρωμένο υγρό King's B, ώστε η συγκέντρωση των βακτηριακών κυττάρων να είναι περίπου  $10^8$  CFU/mL (Lelliott et al. 1966). Υπό ασηπτικές συνθήκες, 1,5 mL από την κάθε αραιωμένη καλλιέργεια τοποθετήθηκαν σε φιαλίδια φυγοκέντρησης τύπου Eppendorf όγκου 2 mL. Πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση σε 5100 x g, για 10 min στους 4 °C. Στη συνέχεια το υπερκείμενο απορρίφθηκε, στο ίζημα προστέθηκε 1,5 mL αποστειρωμένο δις απεσταγμένο νερό και πραγματοποιήθηκε ανάδευση μέχρι να γίνει επαναιώρηση του ιζήματος. Η δοκιμή έγινε σε φύλλα υγιή με βαθύ πράσινο χρώμα, με τη βοήθεια αποστειρωμένης σύριγγας τύπου ινσουλίνης, χωρίς τη βελόνα. Ο εμβολιασμός πραγματοποιήθηκε στην κάτω επιφάνεια των φύλλων, κοντά σε νευρώσεις. Πριν αρχίσει η πίεση του εμβόλου της σύριγγας, το ανοιχτό στόμιο της ερχόταν σε επαφή με την επιδερμίδα του φύλλου, ενώ κατά τη διάρκεια της έκχυσης, ασκούνταν ελαφρά πίεση στην πάνω επιφάνεια του φύλλου, πίσω από το σημείο εμβολιασμού. Η έκχυση διήρκησε έως ότου ο ιστός να αποκτήσει υδατώδη εμφάνιση. Για κάθε απομόνωση πραγματοποιήθηκαν δύο επαναλήψεις. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε αποστειρωμένο δις απεσταγμένο νερό. Η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων έγινε μετά από 24-72 ώρες (hpi).

### 2.8.1 Επιλογή κατάλληλου θρεπτικού υποστρώματος για τον έλεγχο ευαισθησίας των απομονώσεων του βακτηρίου *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* στα αντιβιοτικά

Με σκοπό την επιλογή του κατάλληλου θρεπτικού διαλύματος για τον έλεγχο ευαισθησίας των απομονώσεων του βακτηρίου PSS στα αντιβιοτικά, δοκιμάστηκαν 3 διαφορετικά

υποστρώματα. Οι δοκιμές έγιναν σε μία απομόνωση με τη μέθοδο που περιγράφεται στην παράγραφο 2.8.2. Τα υποστρώματα ήταν τα εξής: King's B με περιεκτικότητα σε άγαρ 1,5% (12 mL/τρυβλίο), King's B με περιεκτικότητα σε άγαρ 1,7 % και MHA (24 mL/τρυβλίο). Πραγματοποιήθηκε σύγκριση των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης που προέκυψαν για την κάθε συγκέντρωση αντιβιοτικού σε κάθε υλικό.

### **2.8.2 Δοκιμές in vitro για τον καθορισμό ευαισθησίας απομονωθέντων βακτηρίων στα αντιβιοτικά**

Τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής: θειικό άλας στρεπτομυκίνης (SERVA, 750 unit/mg), άλας πενικιλλίνης G με κάλιο (ROTH, 1600 unit/mg), χλωραμφαινικόλη (Carl Roth GmbH), υδροχλωρική τετρακυκλίνη (Carl Roth GmbH) και ερυθρομυκίνη (Carl Roth GmbH). Ο έλεγχος ευαισθησίας στα αντιβιοτικά πραγματοποιήθηκε σε 15 απομονώσεις του βακτηρίου, με τη μέθοδο διάχυσης σε άγαρ με τη χρήση δισκίων διηθητικού χαρτιού εμποτισμένων με το αντιβιοτικό. Για τα αντιβιοτικά στρεπτομυκίνη, πενικιλλίνη, ερυθρομυκίνη και τετρακυκλίνη δοκιμάστηκαν 3 συγκεντρώσεις, ενώ για την χλωραμφαινικόλη 2. Για κάθε συγκέντρωση και απομόνωση έγιναν 3 επαναλήψεις. Αρχικά παρασκευάστηκαν τα διαλύματα των αντιβιοτικών. Στον Πίνακα 2, παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις των διαλυμάτων για το κάθε αντιβιοτικό. Στην περίπτωση της στρεπτομυκίνης, τετρακυκλίνης και πενικιλλίνης διαλύτης ήταν αποστειρωμένο δις απεσταγμένο νερό, ενώ για την χλωραμφαινικόλη και ερυθρομυκίνη η αιθανόλη. Για τον έλεγχο ευαισθησίας κάθε απομόνωσης, πραγματοποιήθηκε διασπορά 100  $\mu$ L από την υγρή καλλιέργεια, σε τρυβλία με MHA. Ποσότητα ίση με 5  $\mu$ L από το κάθε διάλυμα αντιβιοτικού προστέθηκε σε δισκίο διηθητικού χαρτιού (Macherey- Nagel MN 640 md, Ashless Filter Circles) με διάμετρο 6mm. Στο κάθε τρυβλίο, υπό ασηπτικές συνθήκες, τοποθετήθηκε ένα δισκίο διηθητικού χαρτιού από την κάθε συγκέντρωση του αντιβιοτικού και ως μάρτυρας ένα δισκίο με αποστειρωμένο απεσταγμένο νερό ή αιθανόλη (αναλόγως με το διαλύτη που χρησιμοποιήθηκε για το αντιβιοτικό). Οι ποσότητες αντιβιοτικών στα δισκία παρουσιάζονται στον Πίνακα 3. Στις ποσότητες περιλαμβάνονται και οι ποσότητες που προτείνονται από τους Bauer et al. (1966) (χλωραμφαινικόλη 30  $\mu$ g, τετρακυκλίνη 30  $\mu$ g, στρεπτομυκίνη 10  $\mu$ g, ερυθρομυκίνη 15  $\mu$ g) . Τα τρυβλία τοποθετήθηκαν για επώαση στους 25 °C, για 48 h. Μετά την επώαση, μετρήθηκαν οι ζώνες παρεμπόδισης που προέκυψαν, δηλαδή η διάμετρος κύκλου που σχηματίστηκε γύρω από κάθε δισκίο, συμπεριλαμβανομένης της διαμέτρου του δισκίου διηθητικού χαρτιού. Η μέτρηση έγινε με χάρακα και για κάθε συγκέντρωση αντιβιοτικού και επανάληψη λήφθηκαν 2 μετρήσεις και υπολογίστηκε ο μέσος όρος της ζώνης παρεμπόδισης.

Πίνακας 2. Συγκεντρώσεις διαλυμάτων που παρασκευάστηκαν για το κάθε αντιβιοτικό.

| ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΟ     | ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ (μg/μL) |    |    |
|-----------------|--------------------------------|----|----|
| Στρεπτομυκίνη   | 0,2                            | 2  | 10 |
| Πενικιλίνη      | 10                             | 20 | 50 |
| Τετρακυκλίνη    | 0,2                            | 2  | 6  |
| Ερυθρομυκίνη    | 2                              | 3  | 6  |
| Χλωραμφαινικόλη | 2                              | 6  |    |

Πίνακας 3. Ποσότητες αντιβιοτικών που τοποθετήθηκαν στα δισκία για τον έλεγχο ευαισθησίας των απομονώσεων του φυτοπαθογόνου βακτηρίου PSS στα αντιβιοτικά.

| ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΟ     | ΠΟΣΟΤΗΤΑ ΣΕ ΔΙΣΚΙΟ (μg) |    |     |     |
|-----------------|-------------------------|----|-----|-----|
| Στρεπτομυκίνη   | 0                       | 1  | 10  | 50  |
| Πενικιλίνη      | 0                       | 50 | 100 | 250 |
| Τετρακυκλίνη    | 0                       | 1  | 10  | 30  |
| Ερυθρομυκίνη    | 0                       | 10 | 15  | 30  |
| Χλωραμφαινικόλη | 0                       | 10 | 30  |     |

## 2.9 Δοκιμές in vitro για τον καθορισμό ευαισθησίας απομονωθέντων βακτηρίων στο χαλκό

Ο έλεγχος ευαισθησίας στο χαλκό πραγματοποιήθηκε σε 20 απομονώσεις του βακτηρίου με τη μέθοδο εμπλουτισμού θρεπτικού υποστρώματος με διάφορες ποσότητες χαλκού. Το θρεπτικό υπόστρωμα ήταν στερεό King's B (12 mL/τρυβλίο). Ο χαλκός που χρησιμοποιήθηκε ήταν θειικός χαλκός με μοριακό τύπο  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  και μοριακό βάρος 249,68 (Sigma CAS:7758-99-8). Οι δοκιμές έγιναν με 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις χαλκού (29,99 ppm, 44,48 ppm, 99,34 ppm Cu), οι οποίες επιλέχθηκαν με βάση τα πειράματα των Quesada et al. (2010), Nguyen et al. (2018) και Bouaichi et al. (2019). Οι συγκεντρώσεις αυτές αντιστοιχούν σε 0,47 mM, 0,7 mM και 1,56 mM  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ . Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν τρυβλία με στερεό King's B. Για την κάθε συγκέντρωση και απομόνωση πραγματοποιήθηκαν 3 επαναλήψεις. Κάθε τρυβλίο χωρίστηκε σε τεταρτημόρια και σε κάθε τμήμα τοποθετήθηκαν 10 μL υγρής καλλιέργειας από κάθε απομόνωση (4 απομονώσεις ανά τρυβλίο). Πραγματοποιήθηκε επώαση στους 25 °C και έπειτα από 48 h έγινε αξιολόγηση των αποτελεσμάτων.

## 2.10 Στατιστική ανάλυση

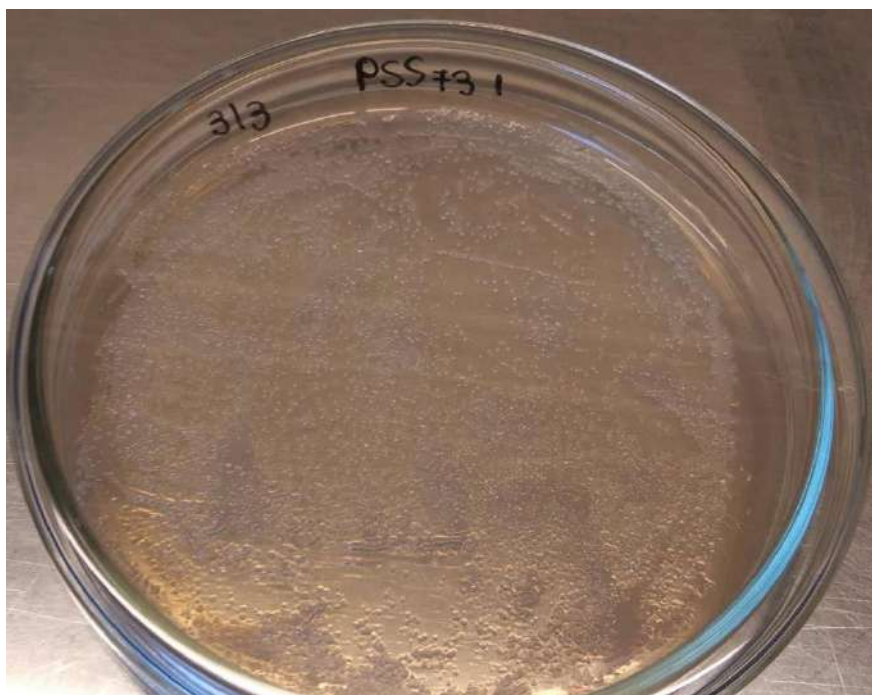
Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε στο Microsoft Excel. Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων στα πειράματα με τον έλεγχο ευαισθησίας των απομονώσεων

στα αντιβιοτικά και της δοκιμής του κατάλληλου θεραπευτικού υποστρώματος, πραγματοποιήθηκε αρχικά μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς (one-way ANOVA), ώστε να διαπιστωθεί αν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων όρων που προέκυψαν από τις μετρήσεις. Η υπόθεση  $H_0$  ήταν ότι οι μέσοι όροι δε διέφεραν μεταξύ τους. Αν κάποιος ή όλοι οι μέσοι όροι διέφεραν μεταξύ τους ( $F > F_{critical}$ ), πραγματοποιούνταν μέθοδος πολλαπλών συγκρίσεων με το κριτήριο Tukey (HSD test), ώστε να βρεθούν ποιοι μέσοι όροι διέφεραν μεταξύ τους. Στο test αυτό συγκρίθηκε το  $q$  με το  $q_{critical}$ . Το  $q_{critical}$  προκύπτει από το Studentized Range  $q$  Table (<http://www.real-statistics.com/statistics-tables/studentized-range-q-table/>). Η τιμή του  $q$  δίνεται από τον τύπο  $q = \text{Διαφορά} / \text{Τυπικό σφάλμα}$ , όπου διαφορά είναι η απόλυτη τιμή της διαφοράς των μέσων όρων (ανά δύο). Το τυπικό σφάλμα δίνεται από τον τύπο  $\text{Τυπικό σφάλμα} = \sqrt{0,5 * MSw * (1/n_1 + 1/n_2)}$ . Η τιμή του MSw (Means square error within groups) προκύπτει από τον πίνακα ANOVA. Τα  $n_1, n_2$  είναι ο αριθμός των επαναλήψεων. Αν  $q > q_{critical}$ , τα ζεύγη διέφεραν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους. Τέλος με μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς και στατιστικό έλεγχο  $t$  (t-test) οι μέσοι όροι ομαδοποιήθηκαν. Ο στατιστικός έλεγχος  $t$  χρησιμοποιήθηκε στην περίπτωση που έπρεπε να βρεθεί αν δυο μέσοι όροι ανήκουν στην ίδια ομάδα ( $P\text{-two tail} > \alpha$ , όπου  $\alpha = 0,05$ ).

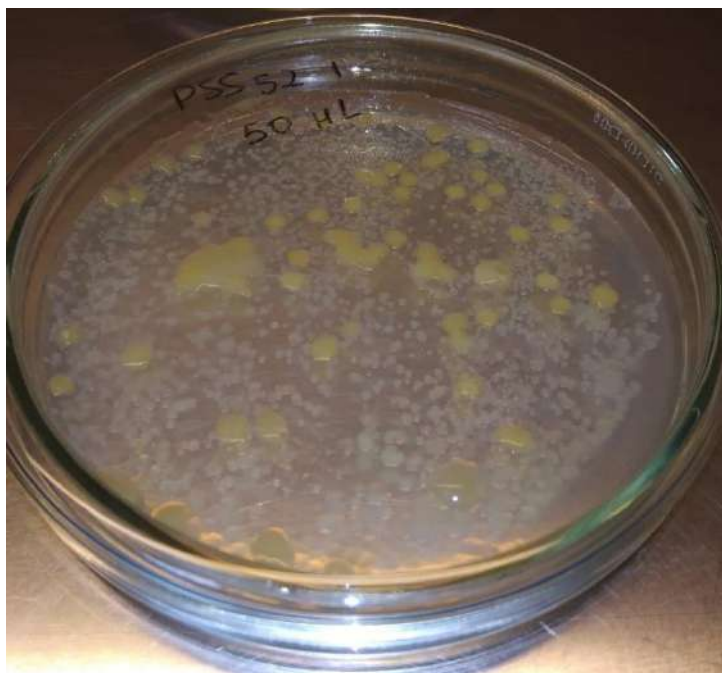
### 3. Αποτελέσματα

#### 3.1 Απομόνωση *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*

Μετά από 48 h επώασης στους 25 °C, μεμονωμένες αποικίες προέκυψαν σε όλα τα τρυβλία. Αποικίες κυκλικές, με χρώμα λευκό προς ανοιχτό κίτρινο και διάμετρο μερικά χιλιοστά, παρατηρήθηκαν σε όλα τα τρυβλία (Εικόνα 2). Στις απομονώσεις αυτές δίπλα από τον κωδικό, σημειώνεται το γράμμα α. Σε ορισμένα τρυβλία, εκτός από τις λευκές αποικίες, σχηματίστηκαν και αποικίες με έντονο κίτρινο χρωματισμό, κυκλικές με ακανόνιστα περιθώρια, βλενώδη μορφή και διάμετρο μεγαλύτερη από αυτήν των λευκών (Εικόνα 3). Στις απομονώσεις αυτές μετά τον κωδικό ακολουθεί το γράμμα Κ. Επίσης, από όγκους που συλλέχθηκαν από τον Βρονταμά Λακωνίας, απομονώθηκαν βακτήρια, τα οποία σχηματίζουν αποικίες λευκές, με διάμετρο μερικά εκατοστά. Ο κωδικός των απομονώσεων αυτών λήγει με τα γράμματα αμ (Εικόνα 4).



Εικόνα 2. Τυπικές αποικίες βακτηρίων που απομονώθηκαν από όλους τους όγκους ελιάς.



Εικόνα 3. Κίτρινες αποικίες βακτηρίων που απομονώθηκαν από ορισμένους όγκους ελιάς.

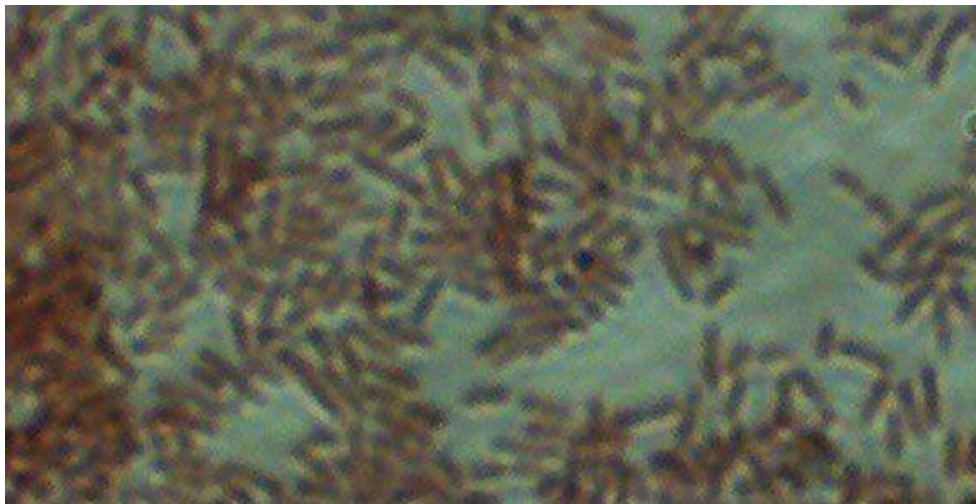


Εικόνα 4. Αποικίες λευκού χρώματος και διαμέτρου μερικών εκατοστών, βακτηρίων που απομονώθηκαν από όγκους που συλλέχθηκαν από την περιοχή του Βρονταμά.

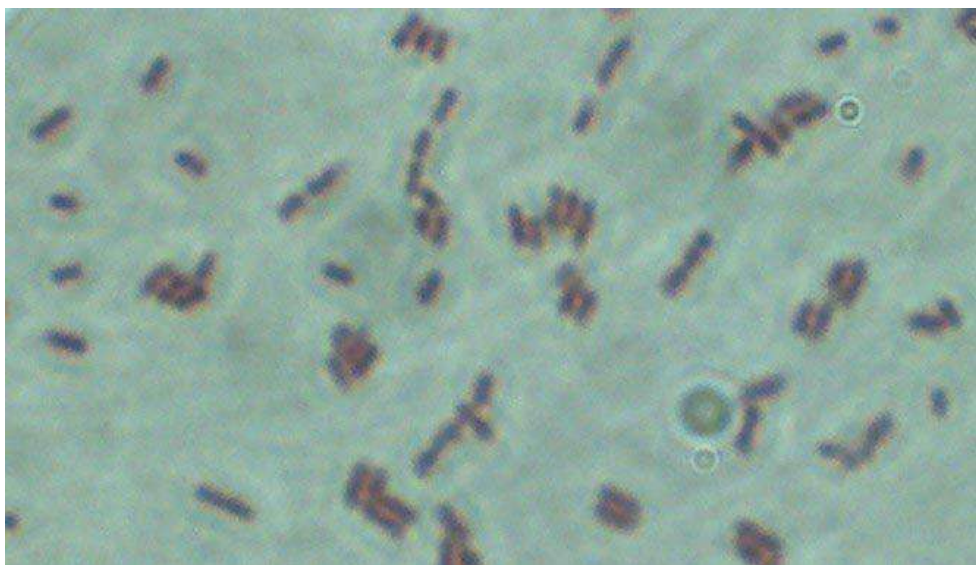
### **3.2 Μορφολογία απομονωθέντων βακτηρίων και χρώση Gram**

Από τη χρώση Gram, προέκυψε ότι οι απομονώσεις PSS52 α, PSS54 2α, PSS 58 1α, PSS59α, PSS60α, PSS69 2α, PSS71 1α, PSS73α, PSS77 1α, PSS86α, PSS87α, PSS89 1α, PSS94α, PSS96α, PSS100α, PSS102α, PSS103α, PSS104α, PSS113α και PSS114α είναι Gram

αρνητικές. Με παρατήρηση στο μικροσκόπιο, διαπιστώθηκε ότι το σχήμα των κυττάρων τους είναι ραβδοειδές (Εικόνα 5). Οι απομονώσεις PSS52 K, PSS54 2K, PSS59 K, PSS96 K, PSS102 K και PSS103 K είναι επίσης Gram αρνητικές και το σχήμα των κυττάρων τους είναι ραβδοειδές (Εικόνα 6). Οι απομονώσεις PSS58 1 αμ και PSS60αμ, είναι Gram θετικές.



Εικόνα 5. Ραβδοειδή βακτηριακά κύτταρα της απομόνωσης PSS52 α, μετά από χρώση Gram (Μεγέθυνση 2000x).

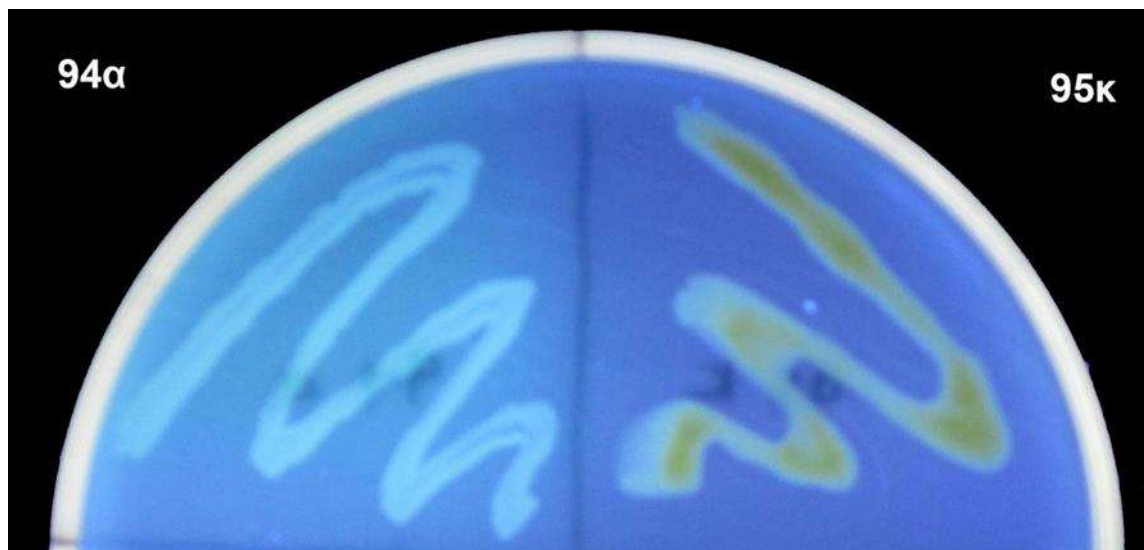


Εικόνα 6. Ραβδοειδή βακτηριακά κύτταρα της απομόνωσης PSS54 2K, μετά από χρώση Gram (Μεγέθυνση 2000x).

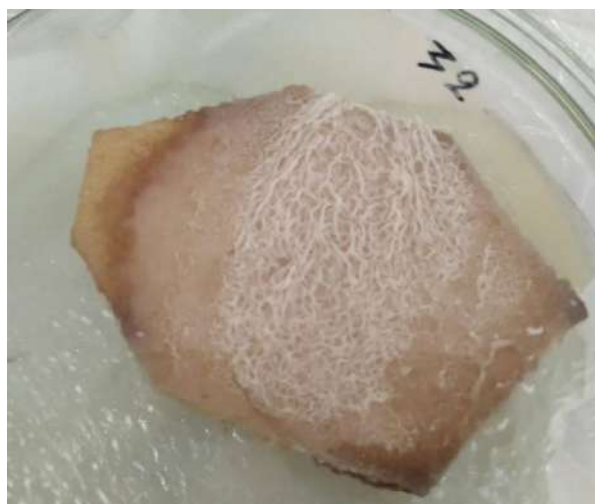
### **3.3 Βιοχημική ταυτοποίηση απομονωθέντων βακτηρίων**

Οι απομονώσεις PSS52 α, PSS54 2α, PSS 58 1α, PSS59α, PSS60α, PSS69 2α, PSS71 1α, PSS73α, PSS77 1α, PSS86α, PSS87α, PSS89 1α, PSS94α, PSS96α, PSS100α, PSS102α, PSS103α, PSS104α, PSS113α και PSS114α δεν παράγουν λεβάνη και πηκτινολυτικά ένζυμα. Οι απομονώσεις αυτές, εκτός από τις PSS69 2α και PSS100α, φθορίζουν (Εικόνα 7). Οι

απομονώσεις PSS58 1αμ και PSS60αμ δεν φθορίζουν, δεν παράγουν λεβάνη και παράγουν πηκτινολυτικά ένζυμα (Εικόνα 8, Εικόνα 9). Οι απομονώσεις PSS52 Κ, PSS54 2Κ, PSS59 Κ, PSS96 Κ, PSS102 Κ και PSS103 Κ δεν φθορίζουν (Εικόνα 7), δεν παράγουν πηκτινολυτικά ένζυμα (Εικόνα 10) και παράγουν λεβάνη.



Εικόνα 7. Φθορισμός σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα King's B. Αριστερά: παραγωγή φθορίζουσών ουσιών από την απομόνωση PSS94α. Δεξιά: απομόνωση βακτηρίου που σχηματίζει κίτρινες αποικίες, η οποία δε φθορίζει.

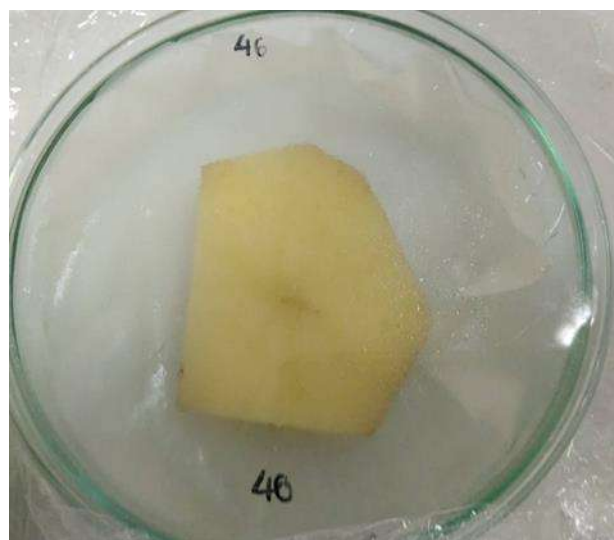


Εικόνα 8. Παραγωγή πηκτινολυτικών ενζύμων από την απομόνωση PSS60 αμ.





Εικόνα 9. Παραγωγή πηκτινολυτικών ενζύμων από την απομόνωση PSS58 1αμ.

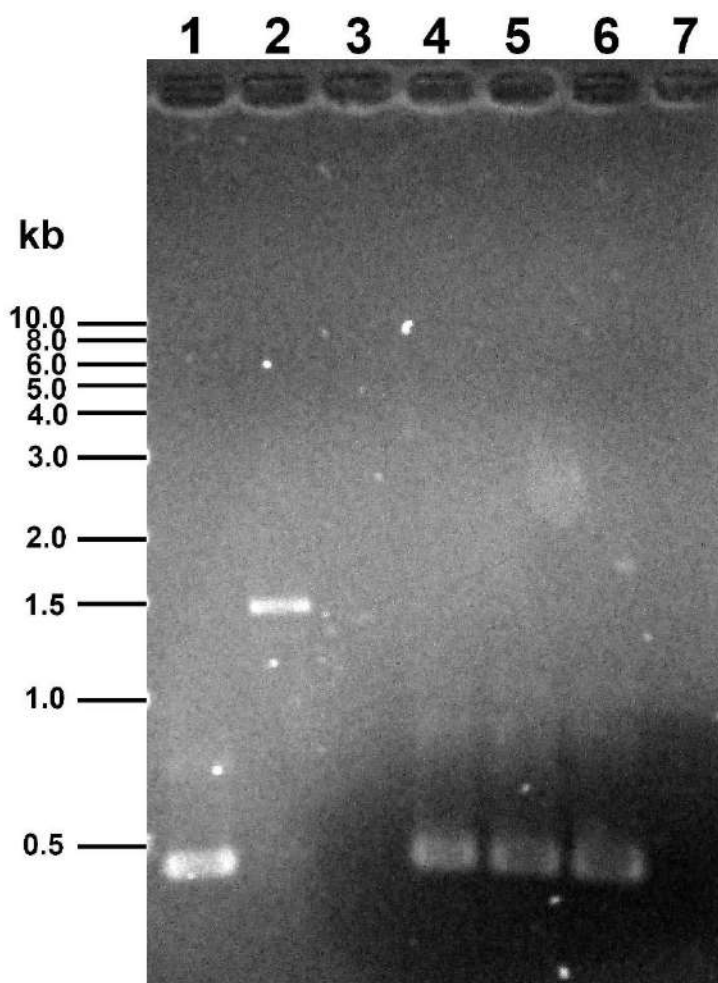


Εικόνα 10. Απομόνωση βακτηρίου (PSS59 K) που δεν παράγει πηκτινολυτικά ένζυμα

### 3.4 Μοριακή ταυτοποίηση απομονωθέντων βακτηρίων

Απομόνωση DNA πραγματοποιήθηκε μετά τα βιοχημικά τεστ, σε απομονώσεις που παρουσιάζουν τα χαρακτηριστικά του φυτοπαθογόνου βακτηρίου PSS, όπως οι PSS104α, PSS54 2α και PSS52α και σε μια απομόνωση που σχηματίζει κίτρινες αποικίες (PSS101 K). Μετά την απομόνωση του DNA, από τις μετρήσεις στο φασματοφωτόμετρο, προέκυψε ότι το DNA που απομονώθηκε σε όλες τις περιπτώσεις δεν ήταν υψηλής καθαρότητας και η ποσότητά του ανά  $\mu\text{L}$  ήταν από 330-770 ng. Μετά από αραιώση, ώστε να προκύψει συγκέντρωση 50 ng/ $\mu\text{L}$ , την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, την οριζόντια ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης, τη χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο και τη τοποθέτηση της

πηκτής στην τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας, παρατηρήθηκαν οι ζώνες DNA. Ζώνη στα 454 kb, παρατηρήθηκε στις απομονώσεις PSS104α, PSS54 2α και PSS52α, ενώ στην απομόνωση PSS101K δεν παρατηρήθηκε ζώνη (Εικόνα 11). Συνεπώς, οι απομονώσεις PSS104α, PSS54 2α και PSS52α χαρακτηρίστηκαν ως PSS. Λαμβάνοντας υπόψιν τη μορφολογία της αποικίας, τα βιοχημικά τεστ και τα αποτελέσματα από τις μοριακές μεθόδους για τις απομονώσεις PSS104α, PSS54 2α και PSS52α, οι απομονώσεις με κωδικό που στο τέλος έχει το γράμμα α, θεωρήθηκαν ως PSS.



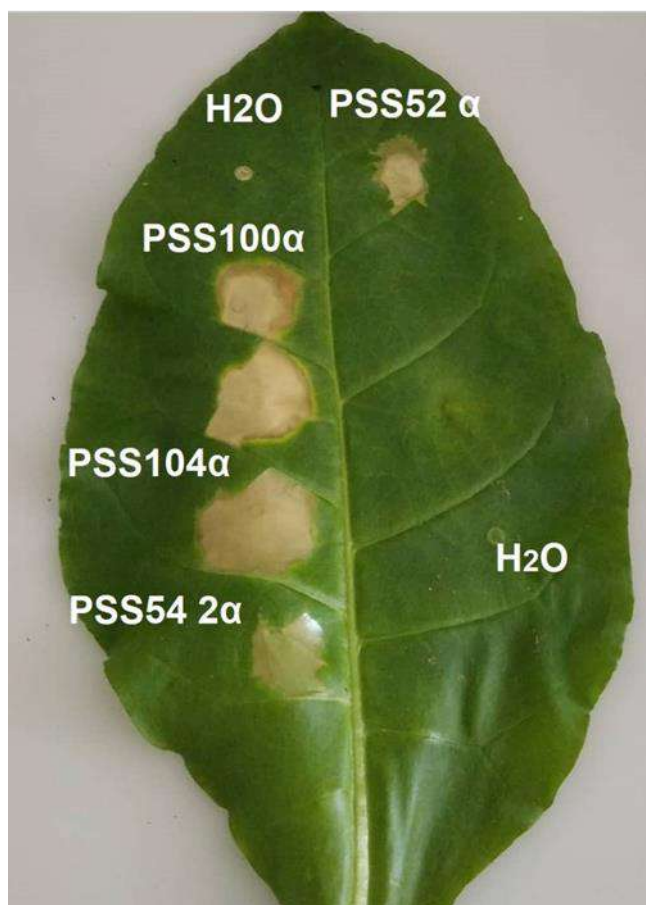
Εικόνα 11. Ζώνες DNA μετά από τοποθέτηση της ηκτικής αгарόζης σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας (1: PSS104α, 2: PSS101 K, 3: Gram + απομόνωση, 4: PSS54 2α, 5: PSS52 1α, 6: PSS4 (μάρτυρας), 7: H<sub>2</sub>O).

### 3.5 Βιοδοκιμές παθογένειας απομονωθέντων βακτηρίων

Οι απομονώσεις PSS52 α, PSS54 2α, PSS 58 1α, PSS59α, PSS60α, PSS69 2α, PSS71 1α, PSS73α, PSS77 1α, PSS86α, PSS87α, PSS89 1α, PSS94α, PSS96α, PSS100α, PSS102α, PSS103α, PSS104α, PSS113α και PSS114α, προκαλούν αντίδραση υπερευαισθησίας στον καπνό (Εικόνα 12), καθώς στις θέσεις εμβολιασμού, μετά από 48 h παρατηρήθηκε νέκρωση. Οι απομονώσεις PSS58 1αμ και PSS60αμ, δεν προκαλούν αντίδραση υπερευαισθησίας σε φυτά

καπνού, καθώς στις θέσεις εμβολιασμού δεν παρατηρήθηκε κανένα σύμπτωμα. Στις απομονώσεις PSS52 K, PSS54 2K, PSS59 K, PSS96 K, PSS102 K και PSS103 K δεν έγινε δοκιμή.

Με μέτρηση στο φασματοφωτόμετρο προέκυψε ότι για καλλιέργεια με συγκέντρωση βακτηριακών κυττάρων  $10^8$ -  $2 \cdot 10^8$  CFU/mL, η οπτική πυκνότητα (OD) στα 600 nm είναι 0,1519. Η οπτική πυκνότητα του υγρού King's B στα 600 nm είναι 0,0726.



Εικόνα 12. Αντίδραση υπερευαισθησίας σε φύλλο καπνού από τις απομονώσεις PSS104α, PSS54 2α, PSS100α και PSS52α. Στην περίπτωση του νερού, δεν παρατηρήθηκε νέκρωση και στις 2 επαναλήψεις.

### 3.6 Απομονώσεις που κατατάσσονται στο είδος *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*

Το βακτήριο PSS, είναι Gram αρνητικό, δεν παράγει πηκτινολητικά ένζυμα, προκαλεί αντίδραση υπερευαισθησίας σε φυτά καπνού και ορισμένες απομονώσεις του παράγουν λεβάνη και φθορίζουσες χρωστικές (Leliott et al. 1966, Ramos et al. 2012, Moretti et al. 2008). Στον Πίνακα 4, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τη χρώση Gram, τις βιοχημικές δοκιμές και από τις δοκιμές παθογένειας, για τις απομονώσεις και οι αναμενόμενες αντιδράσεις

απομονώσεων του PSS. Με βάση τα αποτελέσματα αυτά και λαμβάνοντας υπόψη τη θετική αντίδραση των PSS52, PSS54 2α και PSS104α στη μοριακή μέθοδο ταυτοποίησης, οι απομονώσεις PSS52 α, PSS54 2α, PSS 58 1α, PSS59α, PSS60α, PSS69 2α, PSS71 1α, PSS73α, PSS77 1α, PSS86α, PSS87α, PSS89 1α, PSS94α, PSS96α, PSS100α, PSS102α, PSS103α, PSS104α, PSS113α και PSS114α επιλέχθηκαν για τις in vitro δοκιμές με το χαλκό και τα αντιβιοτικά.

Πίνακας 4. Αποτελέσματα όλων των δοκιμών για τις απομονώσεις βακτηρίων από όγκους ελιάς. Το + υποδεικνύει θετική αντίδραση, ενώ το – αρνητική. Σε όσες απομονώσεις δεν έχει σημειωθεί αντίδραση, δεν έγιναν δοκιμές.

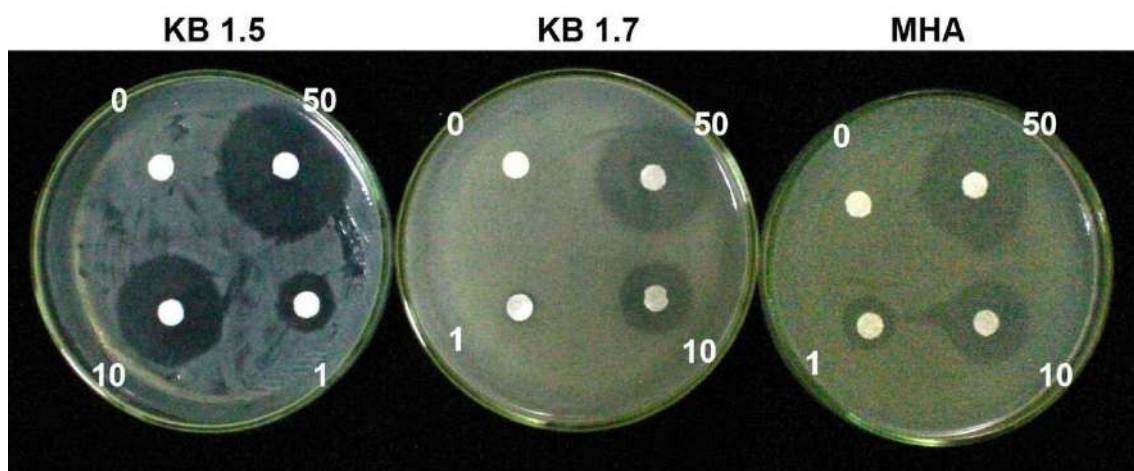
| ΑΠΟΜΟΝΩΣΕΙΣ                                | ΦΘΟΡΙΣΜΟΣ | ΛΕΒΑΝΗ | GRAM | ΠΗΚΤΙΝΟΛΥΤΙΚΑ | ΚΑΠΝΟΣ |
|--|-----------|--------|------|---------------|--------|
| PSS52 α                                    | +         | -      | -    | -             | +      |
| PSS52 Κ                                    | -         | +      | -    | -             |        |
| PSS54 2α                                   | +         | -      | -    | -             | +      |
| PSS54 2Κ                                   | -         | +      | -    | -             |        |
| PSS58 1α                                   | +         | -      | -    | -             | +      |
| PSS58 1αμ                                  | -         | -      | +    | +             | -      |
| PSS59 α                                    | +         | -      | -    | -             | +      |
| PSS59 Κ                                    | -         | +      | -    | -             |        |
| PSS60 α                                    | +         | -      | -    | -             | +      |
| PSS60 αμ                                   | -         | -      | +    | +             | -      |
| PSS69 2α                                   | -         | -      | -    | -             | +      |
| PSS71 1α                                   | +         | -      | -    | -             | +      |
| PSS73 α                                    | +         | -      | -    | -             | +      |
| PSS77 1α                                   | +         | -      | -    | -             | +      |
| PSS86 α                                    | +         | -      | -    | -             | +      |
| PSS87 α                                    | +         | -      | -    | -             | +      |
| PSS89 1α                                   | +         | -      | -    | -             | +      |
| PSS94 α                                    | +         | -      | -    | -             | +      |
| PSS96 α                                    | +         | -      | -    | -             | +      |
| PSS96 Κ                                    | -         | +      | -    | -             |        |
| PSS100 α                                   | -         | -      | -    | -             | +      |
| PSS102 α                                   | +         | -      | -    | -             | +      |
| PSS102 Κ                                   | -         | +      | -    | -             |        |
| PSS103 α                                   | +         | -      | -    | -             | +      |
| PSS103 Κ                                   | -         | +      | -    | -             |        |
| PSS104 α                                   | +         | -      | -    | -             | +      |
| PSS113 α                                   | +         | -      | -    | -             | +      |
| PSS114 α                                   | +         | -      | -    | -             | +      |
| <i>P. savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> | (+/-)     | (+/-)  | -    | -             | +      |

### 3.7 Δοκιμές *in vitro* για τον καθορισμό ευαισθησίας απομονωθέντων βακτηρίων στα αντιβιοτικά

#### 3.7.1 Επιλογή κατάλληλου θρεπτικού υποστρώματος για τον έλεγχο ευαισθησίας των απομονώσεων του βακτηρίου *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* στα αντιβιοτικά

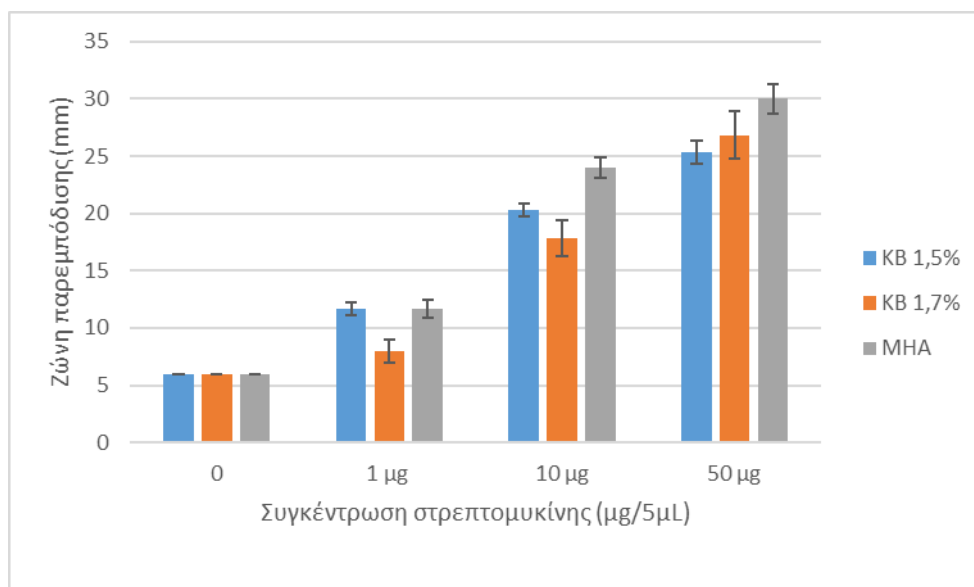
Όπως αναφέρθηκε, τα υποστρώματα που δοκιμάστηκαν ήταν King's B με περιεκτικότητα σε άγαρ 1,5%, King's B με περιεκτικότητα σε άγαρ 1,7% και MHA. Για τις δοκιμές επιλέχθηκε τυχαία μια απομόνωση PSS, η PSS104α. Τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η στρεπτομυκίνη, η τετρακυκλίνη, η χλωραμφαινικόλη και η ερυθρομυκίνη.

Μετά από εφαρμογή των διαφορετικών ποσοτήτων στρεπτομυκίνης (1  $\mu$ g, 10  $\mu$ g, 50  $\mu$ g), ζώνες παρεμπόδισης παρατηρήθηκαν σε όλα τα υποστρώματα και σε όλες τις ποσότητες (Εικόνα 13). Στο Διάγραμμα 1, παρουσιάζονται οι μέσοι όροι των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης και η τυπική απόκλιση, για κάθε συγκέντρωση στρεπτομυκίνης και θρεπτικό υπόστρωμα. Με μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς, προέκυψε ότι σε όλες τις συγκεντρώσεις, υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων όρων των ζωνών παρεμπόδισης, καθώς  $F > F_{critical}$  (Πίνακας 5, Πίνακας 6, Πίνακας 7).



Εικόνα 13. Ζώνες παρεμπόδισης στα 3 διαφορετικά θρεπτικά υποστρώματα (KB 1,5%, KB 1,7%, MHA), για ποσότητες στρεπτομυκίνης 1, 10 και 50  $\mu$ g.

Διάγραμμα 1. Μέσος όρος και τυπική απόκλιση των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης που προέκυψαν στα 3 διαφορετικά θρεπτικά υποστρώματα (KB 1,5%, KB 1,7%, MHA), για ποσότητες στρεπτομυκίνης στα δισκία 1 μg, 10 μg και 50 μg



Πίνακας 5. Μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης παρουσία 1 μg στρεπτομυκίνης, για τα 3 υποστρώματα.

| ANOVA               |          |    |          |          |          |          |
|---------------------|----------|----|----------|----------|----------|----------|
| Source of Variation | SS       | df | MS       | F        | P-value  | Fcrit    |
| Between Groups      | 26,88889 | 2  | 13,44444 | 21,04348 | 0,001943 | 5,143253 |
| Within Groups       | 3,833333 | 6  | 0,638889 |          |          |          |
| Total               | 30,72222 | 8  |          |          |          |          |

Πίνακας 6. Μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης παρουσία 10 μg στρεπτομυκίνης, για τα 3 υποστρώματα.

| ANOVA               |          |    |          |          |          |          |
|---------------------|----------|----|----------|----------|----------|----------|
| Source of Variation | SS       | df | MS       | F        | P-value  | Fcrit    |
| Between Groups      | 57,72222 | 2  | 28,86111 | 23,61364 | 0,001432 | 5,143253 |
| Within Groups       | 7,333333 | 6  | 1,222222 |          |          |          |
| Total               | 65,05556 | 8  |          |          |          |          |

Πίνακας 7. Μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης παρουσία 50 μg στρεπτομυκίνης, για τα 3 υποστρώματα.

| ANOVA               |          |    |          |          |         |          |
|---------------------|----------|----|----------|----------|---------|----------|
| Source of Variation | SS       | df | MS       | F        | P-value | Fcrit    |
| Between Groups      | 34,05556 | 2  | 17,02778 | 7,127907 | 0,02599 | 5,143253 |
| Within Groups       | 14,33333 | 6  | 2,388889 |          |         |          |
| Total               | 48,38889 | 8  |          |          |         |          |

Με μέθοδο πολλαπλών συγκρίσεων, βρέθηκαν τα ζεύγη των υποστρωμάτων για κάθε συγκέντρωση, μεταξύ των οποίων οι ζώνες παρεμπόδισης παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές (Πίνακας 8, Πίνακας 9, Πίνακας 10) και τα υποστρώματα ομαδοποιήθηκαν. Για ποσότητα στρεπτομυκίνης 1 μg, οι ζώνες παρεμπόδισης στα KB 1,5% και MHA, δεν διέφεραν στατιστικά σημαντικά, καθώς με στατιστικό έλεγχο t προέκυψε ότι  $P_{two-tail} > \alpha$ , όπου  $\alpha=0,05$  (Πίνακας 11). Για ποσότητες στρεπτομυκίνης 10 μg και 50 μg, οι ζώνες παρεμπόδισης στα KB 1,5% και KB 1,7%, δεν διέφεραν στατιστικά σημαντικά, καθώς με στατιστικό έλεγχο t προέκυψε ότι  $P_{two-tail} > \alpha$ , όπου  $\alpha=0,05$  (Πίνακας 12, Πίνακας 13)

Πίνακας 8. Μέθοδος πολλαπλών συγκρίσεων με το κριτήριο Tukey μεταξύ των 3 υποστρωμάτων, για ποσότητα στρεπτομυκίνης 1 μg. Ζεύγη που διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ( $q > q_{critical}$ ), σημειώνονται με πράσινο χρώμα.

| q                    | KB 1,5%    | KB 1,7%    | MHA |
|----------------------|------------|------------|-----|
| KB 1,5%              | x          |            |     |
| KB1,7%               | 7,945466 x |            |     |
| MHA                  | 0          | 7,945466 x |     |
| $q_{critical}=4,339$ |            |            |     |

Πίνακας 9. Μέθοδος πολλαπλών συγκρίσεων με το κριτήριο Tukey μεταξύ των 3 υποστρωμάτων, για ποσότητα στρεπτομυκίνης 10 μg. Ζεύγη που διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ( $q > q_{critical}$ ), σημειώνονται με πράσινο χρώμα.

| q                    | KB 1,5%    | KB 1,7%   | MHA |
|----------------------|------------|-----------|-----|
| KB 1,5%              | x          |           |     |
| KB1,7%               | 3,916747 x |           |     |
| MHA                  | 5,744563   | 9,66131 x |     |
| $q_{critical}=4,339$ |            |           |     |

Πίνακας 10. Μέθοδος πολλαπλών συγκρίσεων με το κριτήριο Tukey μεταξύ των 3 υποστρωμάτων, για ποσότητα στρεπτομυκίνης 50 μg. Ζεύγη που διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ( $q > q_{critical}$ ), σημειώνονται με πράσινο χρώμα.

| q                    | KB 1,5%    | KB 1,7%    | MHA |
|----------------------|------------|------------|-----|
| KB 1,5%              | x          |            |     |
| KB1,7%               | 1,680947 x |            |     |
| MHA                  | 5,229612   | 3,548665 x |     |
| $q_{critical}=4,339$ |            |            |     |

Πίνακας 11. Στατιστικός έλεγχος t των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης που προέκυψαν παρουσία 1 μg στρεπτομυκίνης, στο KB 1,5% και MHA.

| t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances |          |             |
|---|----------|-------------|
|   | KB 1,5%  | MHA         |
| Mean  | 11,66667 | 11,66666667 |
| Variance                                      | 0,333333 | 0,583333333 |
| Observations                                  | 3        | 3           |
| Hypothesized Mean Difference                  | 0        |             |
| df  | 4        |             |
| t   | 0        |             |
| P(T<=t) one-tail                              | 0,5      |             |
| t critical one-tail                           | 2,131847 |             |
| P(T<=t) two tail                              | 1        |             |
| t critical two tail                           | 2,776445 |             |

Πίνακας 12. Στατιστικός έλεγχος t των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης που προέκυψαν παρουσία 10 μg στρεπτομυκίνης, στο KB 1,5% και KB 1,7%.

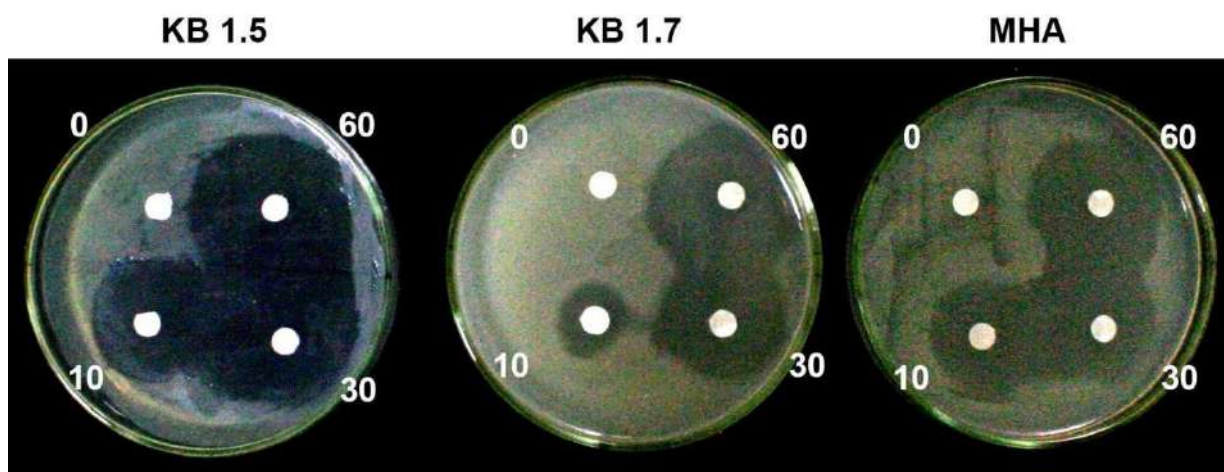
| t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances |          |             |
|---|----------|-------------|
|   | KB 1,7%  | KB 1,5%     |
| Mean  | 17,83333 | 20,33333333 |
| Variance                                      | 2,583333 | 0,333333333 |
| Observations                                  | 3        | 3           |
| Hypothesized Mean Difference                  | 0        |             |
| df  | 3        |             |
| t   | -2,53546 |             |
| P(T<=t) one-tail                              | 0,042508 |             |
| t critical one-tail                           | 2,353363 |             |
| P(T<=t) two tail                              | 0,085016 |             |
| t critical two tail                           | 3,182446 |             |

Πίνακας 13. Στατιστικός έλεγχος t των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης που προέκυψαν παρουσία 50 μg στρεπτομυκίνης, στο KB 1,5% και KB 1,7%.

| t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances |          |             |
|---|----------|-------------|
|   | KB 1,5%  | KB 1,7%     |
| Mean  | 25,33333 | 26,83333333 |
| Variance                                      | 1,083333 | 4,333333333 |
| Observations                                  | 3        | 3           |
| Hypothesized Mean Difference                  | 0        |             |
| df  | 3        |             |
| t   | -1,11631 |             |
| P(T<=t) one-tail                              | 0,172823 |             |
| t critical one-tail                           | 2,353363 |             |
| P(T<=t) two tail                              | 0,345646 |             |
| t critical two tail                           | 3,182446 |             |

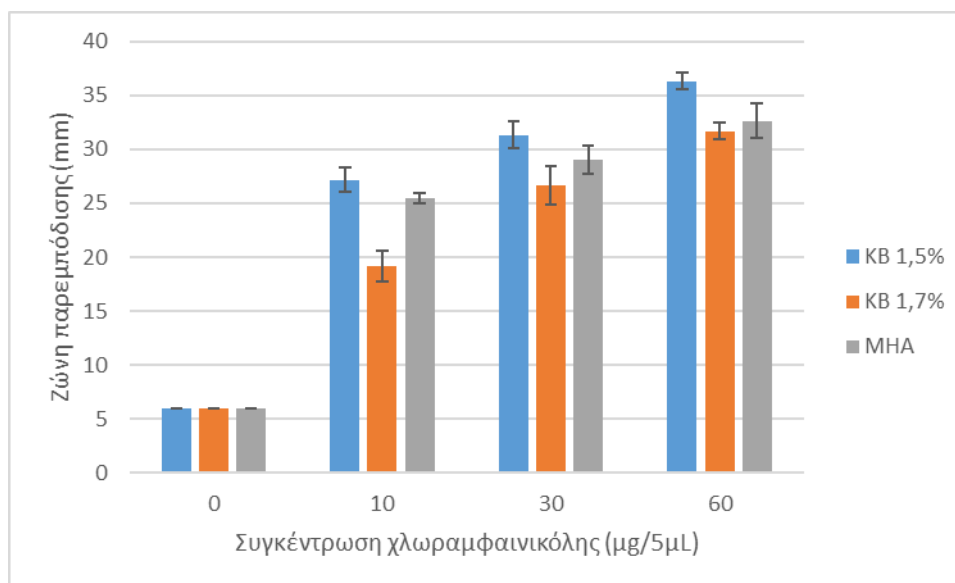


Στην περίπτωση της χλωραμφαινικόλης, ζώνες παρεμπόδισης δημιουργήθηκαν σε όλα τα υποστρώματα (KB 1,5 %, KB 1,7%, ΜΗΑ) και στις 3 ποσότητες (10 μg, 30 μg, 60 μg) (Εικόνα 14). Στο Διάγραμμα 2, παρουσιάζονται οι μέσοι όροι των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης και η τυπική απόκλιση, για κάθε συγκέντρωση και θρεπτικό υπόστρωμα. Με μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς προέκυψε ότι σε όλες τις συγκεντρώσεις, υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης, καθώς  $F > F_{critical}$  (Πίνακας 14, Πίνακας 15, Πίνακας 16).



Εικόνα 14. Ζώνες παρεμπόδισης στα 3 διαφορετικά θρεπτικά υποστρώματα (KB 1,5%, KB 1,7%, ΜΗΑ), για ποσότητες χλωραμφαινικόλης 10, 30 και 60 μg.

Διάγραμμα 2. Μέσος όρος και τυπική απόκλιση των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης που προέκυψαν στα 3 διαφορετικά υποστρώματα (KB 1,5%, KB 1,7%, ΜΗΑ), για ποσότητες χλωραμφαινικόλης στα δισκία 10 μg, 30 μg και 60 μg.



Πίνακας 14. Μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς των μέσων όρων των διαμέτρων ζωνών παρεμπόδισης παρουσία 10 μg χλωραμφαινικόλης, για τα 3 υποστρώματα.

| ANOVA               |          |    |          |          |          |          |
|---------------------|----------|----|----------|----------|----------|----------|
| Source of Variation | SS       | df | MS       | F        | P-value  | Fcrit    |
| Between Groups      | 106,8889 | 2  | 53,44444 | 43,72727 | 0,000265 | 5,143253 |
| Within Groups       | 7,333333 | 6  | 1,222222 |          |          |          |
| Total               | 114,2222 | 8  |          |          |          |          |

Πίνακας 15. Μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης παρουσία 30 μg χλωραμφαινικόλης, για τα 3 υποστρώματα.

| ANOVA               |          |    |          |          |          |          |
|---------------------|----------|----|----------|----------|----------|----------|
| Source of Variation | SS       | df | MS       | F        | P-value  | Fcrit    |
| Between Groups      | 32,66667 | 2  | 16,33333 | 7,636364 | 0,022438 | 5,143253 |
| Within Groups       | 12,83333 | 6  | 2,138889 |          |          |          |
| Total               | 45,5     | 8  |          |          |          |          |

Πίνακας 16. Μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης παρουσία 60 μg χλωραμφαινικόλης, για τα 3 υποστρώματα

| ANOVA               |          |    |          |          |          |          |
|---------------------|----------|----|----------|----------|----------|----------|
| Source of Variation | SS       | df | MS       | F        | P-value  | Fcrit    |
| Between Groups      | 36,22222 | 2  | 18,11111 | 14,48889 | 0,005048 | 5,143253 |
| Within Groups       | 7,5      | 6  | 1,25     |          |          |          |
| Total               | 43,72222 | 8  |          |          |          |          |

Με μέθοδο πολλαπλών συγκρίσεων με το κριτήριο Tukey, βρέθηκαν τα ζεύγη των υποστρωμάτων για κάθε συγκέντρωση, μεταξύ των οποίων οι ζώνες παρεμπόδισης παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές (Πίνακας 17, Πίνακας 18, Πίνακας 19) και τα υποστρώματα ομαδοποιήθηκαν. Για ποσότητα χλωραμφαινικόλης 10 μg, οι ζώνες παρεμπόδισης στα KB 1,5% και ΜΗΑ, δεν διέφεραν στατιστικά σημαντικά, καθώς με στατιστικό έλεγχο t προέκυψε ότι  $P \text{ two-tail} > \alpha$ , όπου  $\alpha=0,05$  (Πίνακας 20). Για ποσότητα χλωραμφαινικόλης 30 μg, οι ζώνες παρεμπόδισης για το ζεύγος KB 1,5% και ΜΗΑ και για το ζεύγος KB 1,7% και ΜΗΑ, δεν διέφεραν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους, καθώς με στατιστικό έλεγχο t προέκυψε ότι  $P \text{ two-tail} > \alpha$ , όπου  $\alpha=0,05$  (Πίνακας 21, Πίνακας 22). Για ποσότητα χλωραμφαινικόλης 60 μg, οι ζώνες παρεμπόδισης για το ζεύγος 1,7% και ΜΗΑ, δεν διέφεραν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους, καθώς με στατιστικό έλεγχο t προέκυψε ότι  $P \text{ two-tail} > \alpha$ , όπου  $\alpha=0,05$  (Πίνακας 23).

Πίνακας 17. Μέθοδος πολλαπλών συγκρίσεων με το κριτήριο Tukey μεταξύ των 3 υποστρωμάτων, για ποσότητα χλωραμφαινικόλης 10 μg. Ζεύγη που διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ( $q > q_{critical}$ ), σημειώνονται με πράσινο χρώμα.

| q               | KB 1,5%  | KB 1,7%  | MHA |
|-----------------|----------|----------|-----|
| KB 1,5%         | x        |          |     |
| KB1,7%          | 12,53359 | x        |     |
| MHA             | 2,611165 | 9,922426 | x   |
| qcritical=4,339 |          |          |     |

Πίνακας 18. Μέθοδος πολλαπλών συγκρίσεων με το κριτήριο Tukey μεταξύ των 3 υποστρωμάτων, για ποσότητα χλωραμφαινικόλης 30 μg. Ζεύγη που διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ( $q > q_{critical}$ ), σημειώνονται με πράσινο χρώμα.

| q               | KB 1,5%  | KB 1,7%  | MHA |
|-----------------|----------|----------|-----|
| KB 1,5%         | x        |          |     |
| KB1,7%          | 5,526794 | x        |     |
| MHA             | 2,763397 | 2,763397 | x   |
| qcritical=4,339 |          |          |     |

Πίνακας 19. Μέθοδος πολλαπλών συγκρίσεων με το κριτήριο Tukey μεταξύ των 3 υποστρωμάτων, για ποσότητα χλωραμφαινικόλης 60 μg. Ζεύγη που διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ( $q > q_{critical}$ ), σημειώνονται με πράσινο χρώμα.

| q               | KB 1,5%  | KB 1,7%  | MHA |
|-----------------|----------|----------|-----|
| KB 1,5%         | x        |          |     |
| KB1,7%          | 7,229569 | x        |     |
| MHA             | 5,680376 | 1,549193 | x   |
| qcritical=4,339 |          |          |     |

Πίνακας 20. Στατιστικός έλεγχος t των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης που προέκυψαν παρουσία 10 μg χλωραμφαινικόλης, στο KB 1,5% και MHA.

| t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances |             |      |
|---|-------------|------|
|   | KB 1,5%     | MHA  |
| Mean  | 27,16666667 | 25,5 |
| Variance                                      | 1,333333333 | 0,25 |
| Observations                                  | 3           | 3    |
| Hypothesized Mean Difference                  | 0           |      |
| df  | 3           |      |
| t   | 2,294157339 |      |
| P(T<=t) one-tail                              | 0,052776326 |      |
| t critical one-tail                           | 2,353363435 |      |
| P(T<=t) two tail                              | 0,105552651 |      |
| t critical two tail                           | 3,182446305 |      |

Πίνακας 21. Στατιστικός έλεγχος t των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης που προέκυψαν παρουσία 30 µg χλωραμφαινικόλης, στο KB 1,7% και MHA.

| t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances |          |      |
|---|----------|------|
|   | KB 1,7%  | MHA  |
| Mean  | 26,66667 | 29   |
| Variance                                      | 3,083333 | 1,75 |
| Observations                                  | 3        | 3    |
| Hypothesized Mean Difference                  | 0        |      |
| df  | 4        |      |
| t   | -1,83829 |      |
| P(T<=t) one-tail                              | 0,069938 |      |
| t critical one-tail                           | 2,131847 |      |
| P(T<=t) two tail                              | 0,139876 |      |
| t critical two tail                           | 2,776445 |      |

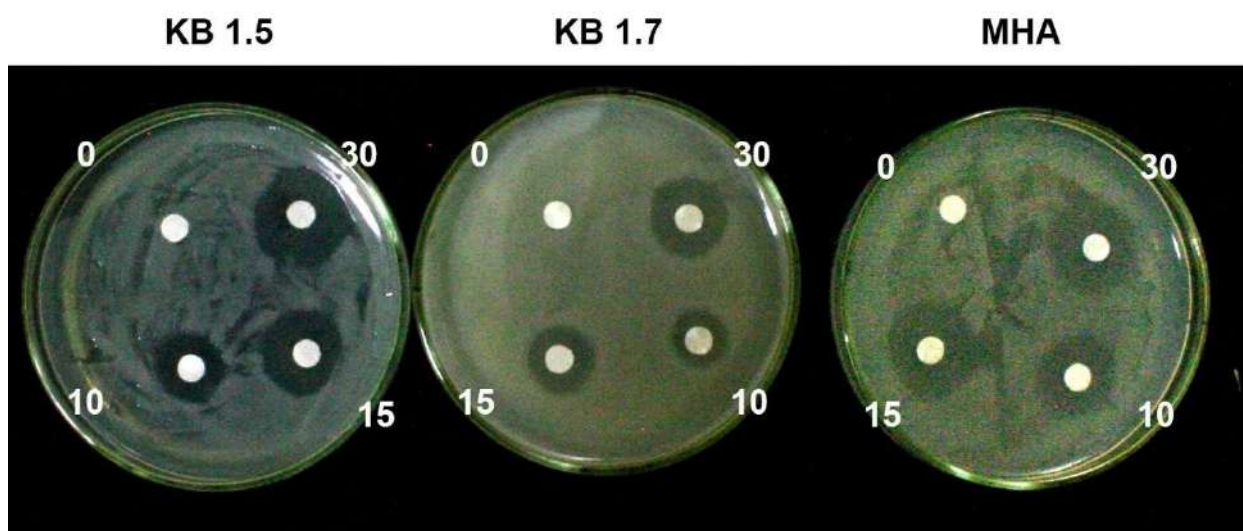
Πίνακας 22. Στατιστικός έλεγχος t των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης που προέκυψαν παρουσία 30 µg χλωραμφαινικόλης, στο KB 1,5% και MHA.

| t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances |          |      |
|---|----------|------|
|   | KB 1,5%  | MHA  |
| Mean  | 31,33333 | 29   |
| Variance                                      | 1,583333 | 1,75 |
| Observations                                  | 3        | 3    |
| Hypothesized Mean Difference                  | 0        |      |
| df  | 4        |      |
| t   | 2,213594 |      |
| P(T<=t) one-tail                              | 0,04563  |      |
| t critical one-tail                           | 2,131847 |      |
| P(T<=t) two tail                              | 0,09126  |      |
| t critical two tail                           | 2,776445 |      |

Πίνακας 23. Στατιστικός έλεγχος t των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης που προέκυψαν παρουσία 60 µg χλωραμφαινικόλης, στο KB 1,7% και MHA.

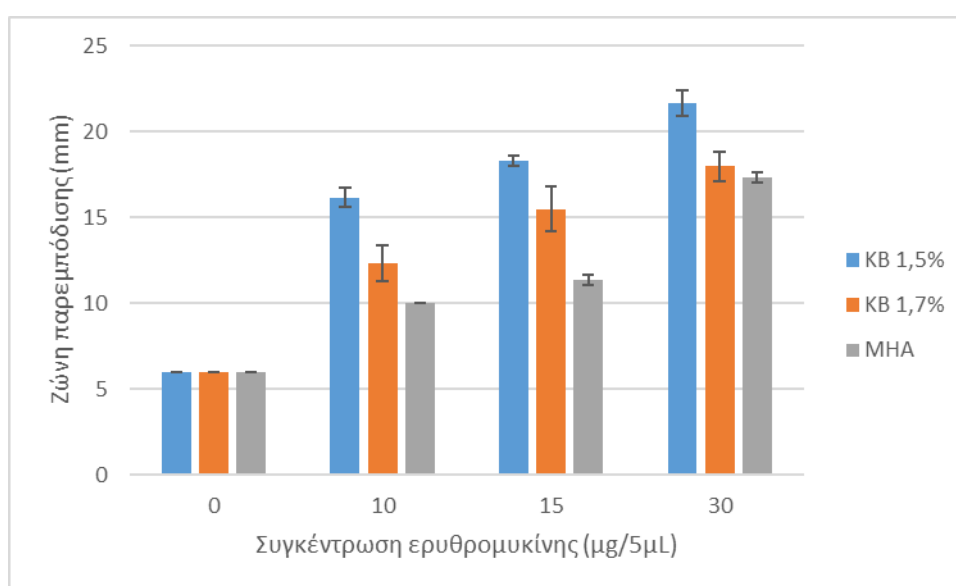
| t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances |           |            |
|---|-----------|------------|
|   | KB 1,7%   | MHA        |
| Mean  | 31,666667 | 32,666667  |
| Variance                                      | 0,5833333 | 2,58333333 |
| Observations                                  | 3         | 3          |
| Hypothesized Mean Difference                  | 0         |            |
| df  | 3         |            |
| t   | -0,973329 |            |
| P(T<=t) one-tail                              | 0,2010892 |            |
| t critical one-tail                           | 2,3533634 |            |
| P(T<=t) two tail                              | 0,4021785 |            |
| t critical two tail                           | 3,1824463 |            |

Στην περίπτωση της ερυθρομυκίνης, ζώνες παρεμπόδισης παρατηρήθηκαν και στα 3 θρεπτικά υποστρώματα (KB 1,5%, KB 1,7%, MHA) και σε όλες τις ποσότητες (10 μg, 15 μg, 30 μg) (Εικόνα 15). Στο Διάγραμμα 3, παρουσιάζονται οι μέσοι όροι των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης και η τυπική απόκλιση, για κάθε συγκέντρωση ερυθρομυκίνης και θρεπτικό υπόστρωμα. Με μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς, προέκυψε ότι σε όλες τις συγκεντρώσεις, υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης, καθώς  $F > F_{critical}$  (Πίνακας 24, Πίνακας 25, Πίνακας 26).



Εικόνα 15. Ζώνες παρεμπόδισης στα 3 διαφορετικά θρεπτικά υποστρώματα (KB 1,5%, KB 1,7%, MHA), για ποσότητες ερυθρομυκίνης 10, 15 και 30 μg.

Διάγραμμα 3. Μέσος όρος και τυπική απόκλιση των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης που προέκυψαν στα 3 διαφορετικά υποστρώματα, για ποσότητες ερυθρομυκίνης στα δισκία 10 μg, 15 μg και 30 μg.



Πίνακας 24. Μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης παρουσία 10 μg ερυθρομυκίνης, για τα 3 υποστρώματα.

| ANOVA               |          |    |          |          |         |          |
|---------------------|----------|----|----------|----------|---------|----------|
| Source of Variation | SS       | df | MS       | F        | P-value | Fcrit    |
| Between Groups      | 58,16667 | 2  | 29,08333 | 61,58824 | 0,0001  | 5,143253 |
| Within Groups       | 2,833333 | 6  | 0,472222 |          |         |          |
| Total               | 61       | 8  |          |          |         |          |

Πίνακας 25. Μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης παρουσία 15 μg ερυθρομυκίνης, για τα 3 υποστρώματα.

| ANOVA               |          |    |          |          |          |          |
|---------------------|----------|----|----------|----------|----------|----------|
| Source of Variation | SS       | df | MS       | F        | P-value  | Fcrit    |
| Between Groups      | 74,38889 | 2  | 37,19444 | 58,21739 | 0,000118 | 5,143253 |
| Within Groups       | 3,833333 | 6  | 0,638889 |          |          |          |
| Total               | 78,22222 | 8  |          |          |          |          |

Πίνακας 26. Μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης παρουσία 30 μg ερυθρομυκίνης, για τα 3 υποστρώματα.

| ANOVA               |          |    |          |          |          |          |
|---------------------|----------|----|----------|----------|----------|----------|
| Source of Variation | SS       | df | MS       | F        | P-value  | Fcrit    |
| Between Groups      | 32,66667 | 2  | 16,33333 | 34,58824 | 0,000508 | 5,143253 |
| Within Groups       | 2,833333 | 6  | 0,472222 |          |          |          |
| Total               | 35,5     | 8  |          |          |          |          |

Με μέθοδο πολλαπλών συγκρίσεων με το κριτήριο Tukey, βρέθηκαν τα ζεύγη των υποστρωμάτων για κάθε συγκέντρωση, μεταξύ των οποίων οι ζώνες παρεμπόδισης παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές (Πίνακας 27, Πίνακας 28, Πίνακας 29) και τα υποστρώματα ομαδοποιήθηκαν. Για ποσότητα ερυθρομυκίνης 10 μg και 15 μg οι ζώνες παρεμπόδισης όλων των ζευγών διέφεραν στατιστικά μεταξύ τους, καθώς  $q > q_{critical}$ . Για ποσότητα ερυθρομυκίνης 30 μg, οι ζώνες παρεμπόδισης για το ζεύγος KB 1,7% και MHA, δεν διέφεραν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους, καθώς με στατιστικό έλεγχο t προέκυψε ότι  $P_{two-tail} > \alpha$ , όπου  $\alpha = 0,05$  (Πίνακες 30)

Πίνακας 27. Μέθοδος πολλαπλών συγκρίσεων με το κριτήριο Tukey μεταξύ των 3 υποστρωμάτων, για ποσότητα ερυθρομυκίνης 10 μg. Ζεύγη που διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ( $q > q_{critical}$ ), σημειώνονται με πράσινο χρώμα.

| q                      | KB 1,5%  | KB 1,7%  | MHA |
|------------------------|----------|----------|-----|
| KB 1,5%                | x        |          |     |
| KB 1,7%                | 9,661933 | x        |     |
| MHA                    | 15,54311 | 5,881176 | x   |
| $q_{critical} = 4,339$ |          |          |     |

Πίνακας 28. Μέθοδος πολλαπλών συγκρίσεων με το κριτήριο Tukey μεταξύ των 3 υποστρώματων, για ποσότητα ερυθρομυκίνης 15  $\mu\text{g}$ . Ζεύγη που διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ( $q > q_{\text{critical}}$ ), σημειώνονται με πράσινο χρώμα.

| q               | KB 1,5%    | KB 1,7%    | MHA |
|-----------------|------------|------------|-----|
| KB 1,5%         | x          |            |     |
| KB1,7%          | 6,139679 x |            |     |
| MHA             | 15,16862   | 9,028939 x |     |
| qcritical=4,339 |            |            |     |

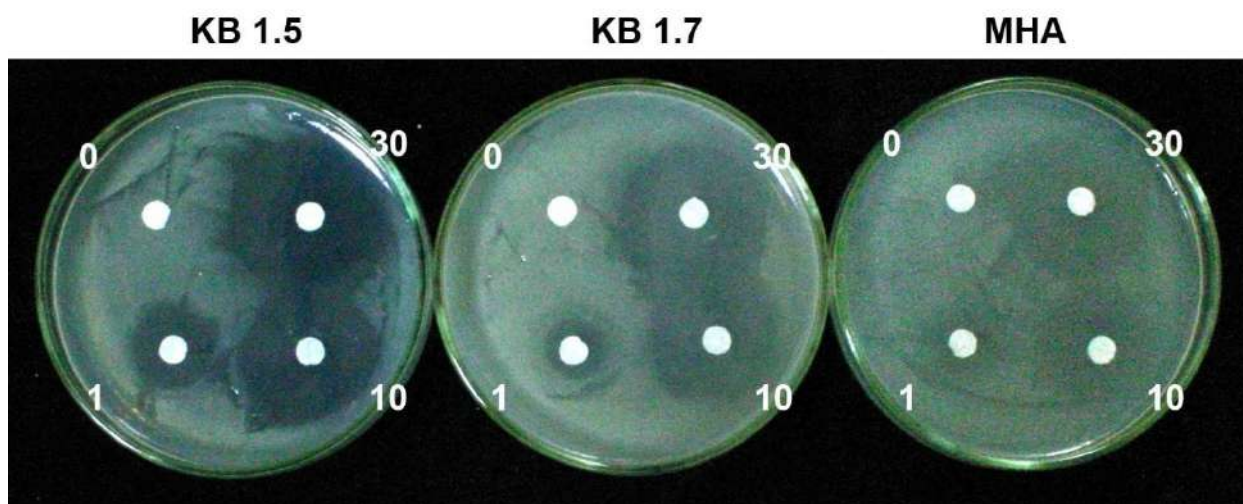
Πίνακας 29. Μέθοδος πολλαπλών συγκρίσεων με το κριτήριο Tukey μεταξύ των 3 υποστρώματων, για ποσότητα ερυθρομυκίνης 30  $\mu\text{g}$ . Ζεύγη που διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ( $q > q_{\text{critical}}$ ), σημειώνονται με πράσινο χρώμα.

| q               | KB 1,5%    | KB 1,7%    | MHA |
|-----------------|------------|------------|-----|
| KB 1,5%         | x          |            |     |
| KB1,7%          | 9,241849 x |            |     |
| MHA             | 10,92218   | 1,680336 x |     |
| qcritical=4,339 |            |            |     |

Πίνακας 30. Στατιστικός έλεγχος t των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης που προέκυψαν παρουσία 30  $\mu\text{g}$  ερυθρομυκίνης, στο KB 1,7% και MHA

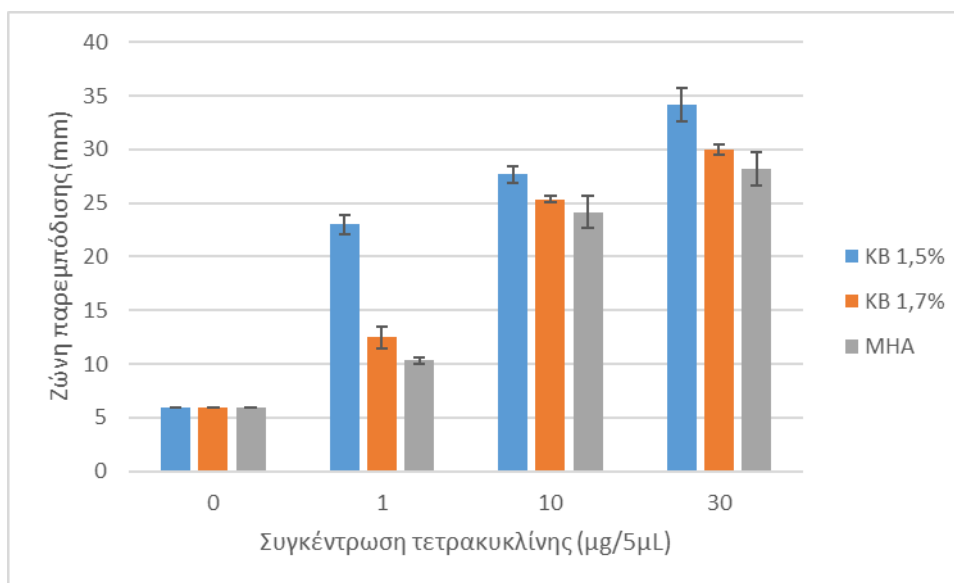
| t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances |          |             |
|---|----------|-------------|
|   | KB 1,7%  | MHA         |
| Mean  | 18       | 17,33333333 |
| Variance                                      | 0,75     | 0,083333333 |
| Observations                                  | 3        | 3           |
| Hypothesized Mean Difference                  | 0        |             |
| df  | 2        |             |
| t   | 1,264911 |             |
| P(T<=t) one-tail                              | 0,166667 |             |
| t critical one-tail                           | 2,919986 |             |
| P(T<=t) two tail                              | 0,333333 |             |
| t critical two tail                           | 4,302653 |             |

Στην περίπτωση της τετρακυκλίνης, ζώνες παρεμπόδισης δημιουργήθηκαν σε όλα τα υποστρώματα (KB 1,5%, KB 1,7%, MHA) και σε όλες τις ποσότητες (1  $\mu\text{g}$ , 10  $\mu\text{g}$ , 30  $\mu\text{g}$ ) (Εικόνα 16). Στο Διάγραμμα 4, παρουσιάζονται οι μέσοι όροι των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης και η τυπική απόκλιση, για κάθε συγκέντρωση τετρακυκλίνης και θρεπτικό υπόστρωμα. Με ανάλυση μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς, προέκυψε ότι σε όλες τις συγκεντρώσεις, υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων όρων των ζωνών παρεμπόδισης, καθώς  $F > F_{\text{critical}}$  (Πίνακας 31, Πίνακας 32, Πίνακας 33).



Εικόνα 16. Ζώνες παρεμπόδισης στα 3 διαφορετικά θρεπτικά υποστρώματα (KB 1,5%, KB 1,7%, MHA), για ποσότητες τετρακυκλίνης 1, 10 και 30 µg.

Διάγραμμα 4. Μέσος όρος και τυπική απόκλιση των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης που προέκυψαν στα 3 διαφορετικά υποστρώματα (KB 1,5%, KB 1,7%, MHA), για ποσότητες τετρακυκλίνης στα δισκία 1 µg, 10 µg και 30 µg.



Πίνακας 31. Μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης παρουσία 1 µg τετρακυκλίνης, για τα 3 υποστρώματα.

| ANOVA               |          |    |          |          |          |          |
|---------------------|----------|----|----------|----------|----------|----------|
| Source of Variation | SS       | df | MS       | F        | P-value  | Fcrit    |
| Between Groups      | 275,3889 | 2  | 137,6944 | 225,3182 | 2,27E-06 | 5,143253 |
| Within Groups       | 3,666667 | 6  | 0,611111 |          |          |          |
| Total               | 279,0556 | 8  |          |          |          |          |



Πίνακας 32. Μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης παρουσία 10 µg τετρακυκλίνης, για τα 3 υποστρώματα.

| ANOVA               |          |    |          |          |          |          |
|---------------------|----------|----|----------|----------|----------|----------|
| Source of Variation | SS       | df | MS       | F        | P-value  | Fcrit    |
| Between Groups      | 19,05556 | 2  | 9,527778 | 10,39394 | 0,011237 | 5,143253 |
| Within Groups       | 5,5      | 6  | 0,916667 |          |          |          |
| Total               | 24,55556 | 8  |          |          |          |          |

Πίνακας 33. Μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης παρουσία 30 µg τετρακυκλίνης, για τα 3 υποστρώματα.

| ANOVA               |          |    |          |          |          |          |
|---------------------|----------|----|----------|----------|----------|----------|
| Source of Variation | SS       | df | MS       | F        | P-value  | Fcrit    |
| Between Groups      | 56,72222 | 2  | 28,36111 | 17,30508 | 0,003225 | 5,143253 |
| Within Groups       | 9,833333 | 6  | 1,638889 |          |          |          |
| Total               | 66,55556 | 8  |          |          |          |          |

Με μέθοδο πολλαπλών συγκρίσεων με το κριτήριο Tukey, βρέθηκαν τα ζεύγη των υποστρωμάτων για κάθε συγκέντρωση τετρακυκλίνης, μεταξύ των οποίων οι ζώνες παρεμπόδισης παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές (Πίνακας 34, Πίνακας 35, Πίνακας 36) και στη συνέχεια τα υποστρώματα ομαδοποιήθηκαν. Για ποσότητα τετρακυκλίνης 1 µg οι ζώνες παρεμπόδισης όλων των ζευγών διέφεραν στατιστικά μεταξύ τους, καθώς  $q > q_{critical}$ . Για ποσότητα τετρακυκλίνης 10 µg, οι ζώνες παρεμπόδισης για το ζεύγος KB 1,5% και KB 1,7% διέφεραν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους, καθώς με στατιστικό έλεγχο t προέκυψε ότι  $P \text{ two-tail} < \alpha$ , όπου  $\alpha=0,05$  (Πίνακας 37). Για το ζεύγος KB 1,7% και MHA δεν διέφεραν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους, καθώς με στατιστικό έλεγχο t προέκυψε ότι  $P \text{ two-tail} > \alpha$ , όπου  $\alpha=0,05$  (Πίνακες 38). Για ποσότητα τετρακυκλίνης 30 µg δεν διέφεραν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους οι ζώνες που σχηματίστηκαν στο MHA και στο KB 1,7%, καθώς με στατιστικό έλεγχο t προέκυψε ότι  $P \text{ two-tail} > \alpha$ , όπου  $\alpha=0,05$  (Πίνακας 39)

Πίνακας 34. Μέθοδος πολλαπλών συγκρίσεων με το κριτήριο Tukey μεταξύ των 3 υποστρωμάτων, για ποσότητα τετρακυκλίνης 1 µg. Ζεύγη που διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ( $q > q_{critical}$ ), σημειώνονται με πράσινο χρώμα.

| q                    | KB 1,5%  | KB 1,7%  | MHA |
|----------------------|----------|----------|-----|
| KB 1,5%              | x        |          |     |
| KB1,7%               | 23,26429 | x        |     |
| MHA                  | 28,06486 | 4,800568 | x   |
| $q_{critical}=4,339$ |          |          |     |

Πίνακας 35. Μέθοδος πολλαπλών συγκρίσεων με το κριτήριο Tukey μεταξύ των 3 υποστρωμάτων, για ποσότητα τετρακυκλίνης 10 µg. Ζεύγη που διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ( $q > q_{critical}$ ), σημειώνονται με πράσινο χρώμα.

| q                            | KB 1,5%    | KB 1,7%    | MHA |
|------------------------------|------------|------------|-----|
| KB 1,5%                      | x          |            |     |
| KB1,7%                       | 4,221159 x |            |     |
| MHA                          | 6,331738   | 2,110579 x |     |
| q <sub>critical</sub> =4,339 |            |            |     |

Πίνακας 36. Μέθοδος πολλαπλών συγκρίσεων με το κριτήριο Tukey μεταξύ των 3 υποστρωμάτων, για ποσότητα τετρακυκλίνης 30 µg. Ζεύγη που διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ( $q > q_{critical}$ ), σημειώνονται με πράσινο χρώμα.

| q                            | KB 1,5%    | KB 1,7%    | MHA |
|------------------------------|------------|------------|-----|
| KB 1,5%                      | x          |            |     |
| KB1,7%                       | 5,637345 x |            |     |
| MHA                          | 8,117777   | 2,480432 x |     |
| q <sub>critical</sub> =4,339 |            |            |     |

Πίνακας 37. Στατιστικός έλεγχος t των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης που προέκυψαν παρουσία 10 µg τετρακυκλίνης, στο KB 1,5% και KB 1,7%.

| t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances |           |             |
|---|-----------|-------------|
|   | KB 1,5%   | KB 1,7%     |
| Mean  | 27,666667 | 25,33333333 |
| Variance                                      | 0,5833333 | 0,083333333 |
| Observations                                  | 3         | 3           |
| Hypothesized Mean Difference                  | 0         |             |
| df  | 3         |             |
| t   | 4,9497475 |             |
| P(T<=t) one-tail                              | 0,0079121 |             |
| t critical one-tail                           | 2,3533634 |             |
| P(T<=t) two tail                              | 0,0158242 |             |
| t critical two tail                           | 3,1824463 |             |

Πίνακας 38. Στατιστικός έλεγχος t των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης που προέκυψαν παρουσία 10 µg τετρακυκλίνης, στο MHA και KB 1,7%.

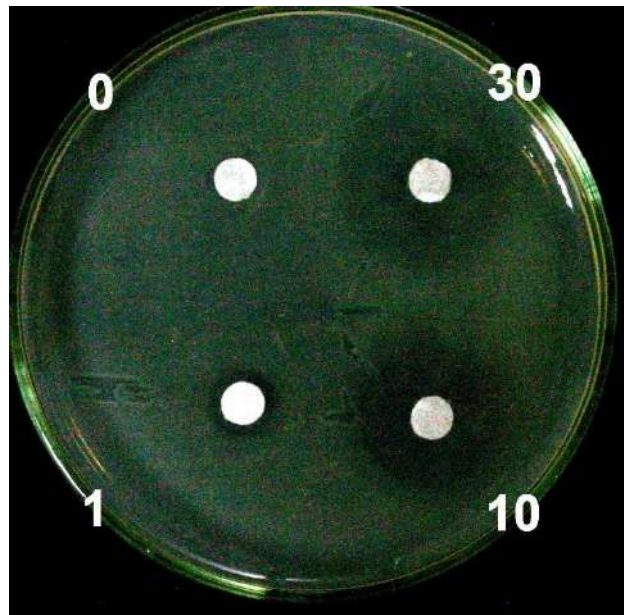
| t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances |          |             |
|---|----------|-------------|
|   | MHA      | KB 1,7%     |
| Mean  | 24,16667 | 25,33333333 |
| Variance                                      | 2,083333 | 0,083333333 |
| Observations                                  | 3        | 3           |
| Hypothesized Mean Difference                  | 0        |             |
| df  | 2        |             |
| t   | -1,37281 |             |
| P(T<=t) one-tail                              | 0,151737 |             |
| t critical one-tail                           | 2,919986 |             |
| P(T<=t) two tail                              | 0,303474 |             |
| t critical two tail                           | 4,302653 |             |

Πίνακας 39. Στατιστικός έλεγχος t των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης που προέκυψαν παρουσία 30 µg τετρακυκλίνης στο MHA και KB 1,7%.

| t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances |             |         |
|---|-------------|---------|
|   | MHA         | KB 1,7% |
| Mean  | 28,16666667 | 30      |
| Variance                                      | 2,333333333 | 0,25    |
| Observations                                  | 3           | 3       |
| Hypothesized Mean Difference                  | 0           |         |
| df  | 2           |         |
| t   | -1,97565832 |         |
| P(T<=t) one-tail                              | 0,093428301 |         |
| t critical one-tail                           | 2,91998558  |         |
| P(T<=t) two tail                              | 0,186856602 |         |
| t critical two tail                           | 4,30265273  |         |

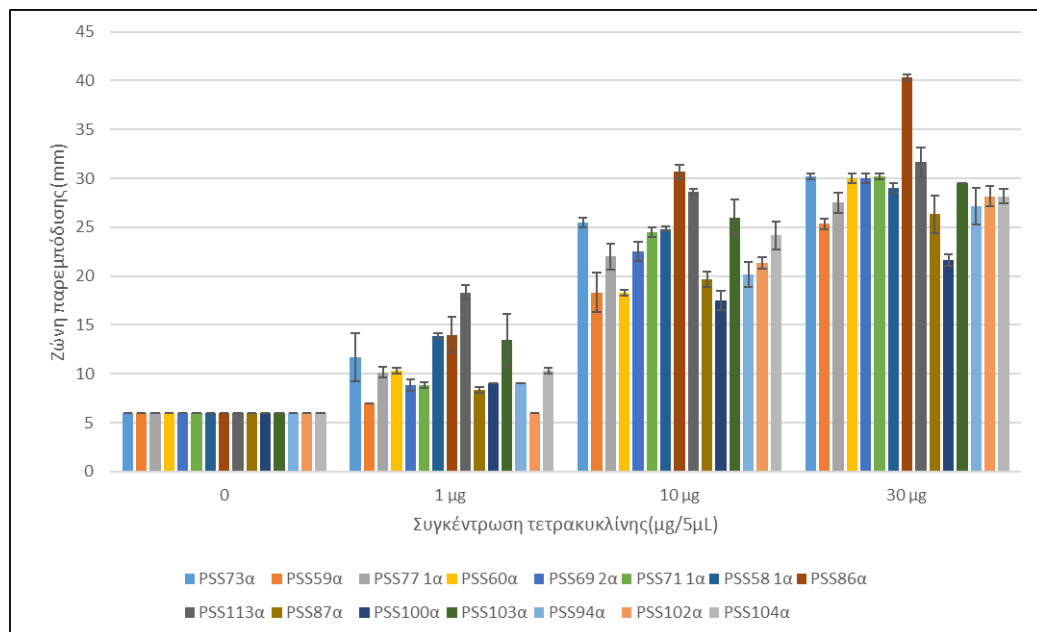
### 3.7.2 Έλεγχος ευαισθησίας απομονώσεων του βακτηρίου *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* στην τετρακυκλίνη

Κατά τον έλεγχο ευαισθησίας των 15 απομονώσεων του βακτηρίου PSS στο αντιβιοτικό τετρακυκλίνη, με τη μέθοδο διάχυσης σε άγαρ με τη χρήση δισκίων διηθητικού χαρτιού εμποτισμένων με τετρακυκλίνη, δημιουργήθηκαν ζώνες παρεμπόδισης σε όλες τις συγκεντρώσεις από όλες τις απομονώσεις. Εξάιρεση αποτελεί η απομόνωση PSS102α, όπου για ποσότητα τετρακυκλίνης 1 µg, δεν σχηματίστηκε ζώνη παρεμπόδισης γύρω από το δισκίο (6 mm). Στην Εικόνα 17, παρουσιάζονται οι ζώνες παρεμπόδισης που σχηματίστηκαν για ποσότητες τετρακυκλίνης 1, 10 και 30 µg, κατά τον έλεγχο ευαισθησίας της απομόνωσης PSS100α στην τετρακυκλίνη Στο Διάγραμμα 5, παρουσιάζεται για την κάθε απομόνωση και ποσότητα, ο μέσος όρος των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης που προέκυψε από τις τρεις επαναλήψεις και η αντίστοιχη τυπική απόκλιση.



Εικόνα 17. Ζώνες παρεμπόδισης που σχηματίστηκαν για ποσότητες τετρακυκλίνης 1, 10 και 30 µg, κατά τον έλεγχο ευαισθησίας της απομόνωσης PSS100α στην τετρακυκλίνη.

Διάγραμμα 5. Μέσος όρος διαμέτρων ζωνών παρεμπόδισης και τυπική απόκλιση των απομονώσεων του βακτηρίου PSS, που σχηματίστηκαν παρουσία 1 µg, 10 µg και 30 µg τετρακυκλίνης,



### 3.7.2.1 Έλεγχος ευαισθησίας απομονώσεων του βακτηρίου *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* σε ποσότητα τετρακυκλίνης 1 µg

Στον Πίνακα 40, παρουσιάζεται ο μέσος όρος των ζωνών παρεμπόδισης των 15 απομονώσεων, παρουσία 1µg τετρακυκλίνης. Για τη ποσότητα αυτή, με μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς, προέκυψε ότι μεταξύ των ζωνών παρεμπόδισης των 15 απομονώσεων, υπάρχουν

στατιστικά σημαντικά διαφορές, καθώς  $F > F_{critical}$  (Πίνακας 41). Με μέθοδο πολλαπλών συγκρίσεων με το κριτήριο Tukey, βρέθηκαν τα ζεύγη των απομονώσεων στα οποία  $q > q_{critical}$ , δηλαδή διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους (Πίνακας 42) και στη συνέχεια οι απομονώσεις ομαδοποιήθηκαν. Στη πρώτη ομάδα ανήκουν οι απομονώσεις PSS59α και PSS102 α, καθώς με Tukey HSD test προέκυψε ότι  $q < q_{critical}$ . Στην δεύτερη ομάδα ανήκουν οι απομονώσεις PSS69 2α, PSS71 1α, PSS87α, PSS100α και PSS94α, με μέσους όρους διαμέτρων 8,33- 9 mm, καθώς με μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς, προέκυψε ότι  $F < F_{critical}$  και συνεπώς οι ζώνες παρεμπόδισης δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους (Πίνακας 43). Ομοίως βρέθηκε ότι στην τρίτη ομάδα με μέσους όρους διαμέτρων 10,16-11,66 mm, ανήκουν οι PSS73α, PSS77 1α, PSS60α και PSS104α (Πίνακας 44) και στην τέταρτη με μέσους όρους 13,5-14 mm, οι PSS58 1α, PSS86α και PSS103α ( $F < F_{critical}$ ) (Πίνακας 45). Η PSS113α είχε τη μεγαλύτερη ζώνη παρεμπόδισης (18,33 mm) και δεν ανήκει σε καμία ομάδα.

Πίνακας 40. Μέσοι όροι διαμέτρων ζωνών παρεμπόδισης των 15 απομονώσεων, παρουσία 1  $\mu\text{g}$  τετρακυκλίνης.

|           | 1 $\mu\text{g}$ τετρακυκλίνης          |
|-----------|--|
| Απομόνωση | Μ.ο. διαμέτρου ζώνης παρεμπόδισης (mm) |
| PSS58 1α  | 13,83333333                            |
| PSS59α    | 7                                      |
| PSS60α    | 10,33333333                            |
| PSS69 2α  | 8,833333333                            |
| PSS71 1α  | 8,833333333                            |
| PSS73α    | 11,66666667                            |
| PSS77 1α  | 10,16666667                            |
| PSS86α    | 14                                     |
| PSS87α    | 8,333333333                            |
| PSS94α    | 9                                      |
| PSS100α   | 9                                      |
| PSS102α   | 6                                      |
| PSS103α   | 13,5                                   |
| PSS104α   | 10,33333333                            |
| PSS113α   | 18,33333333                            |

Πίνακας 41. Μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των 15 απομονώσεων, παρουσία 1  $\mu\text{g}$  τετρακυκλίνης.

| ANOVA               |           |    |          |          |          |         |
|---------------------|-----------|----|----------|----------|----------|---------|
| Source of Variation | SS        | df | MS       | F        | P-value  | Fcrit   |
| Between Groups      | 426,94444 | 14 | 30,49603 | 25,41336 | 7,93E-13 | 2,03742 |
| Within Groups       | 36        | 30 | 1,2      |          |          |         |
| Total               | 462,94444 | 44 |          |          |          |         |

Πίνακας 42. Μέθοδος πολλαπλών συγκρίσεων με το κριτήριο Tukey μεταξύ των 15 απομονώσεων, για ποσότητα τετρακυκλίνης 1 µg. Ζεύγη που διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ( $q > q_{critical}$ ), σημειώνονται με πράσινο χρώμα.

| q               | PSS73α    | PSS59α    | PSS77 1α  | PSS60α    | PSS69 2α | PSS71 1α   | PSS58 1α   | PSS86α   | PSS113α   | PSS87α   | PSS100α   | PSS103α   | PSS94α    | PSS102α  | PSS104α |
|-----------------|-----------|-----------|-----------|-----------|----------|------------|------------|----------|-----------|----------|-----------|-----------|-----------|----------|---------|
| PSS73α          | x         |           |           |           |          |            |            |          |           |          |           |           |           |          |         |
| PSS59α          | 7,37865 x |           |           |           |          |            |            |          |           |          |           |           |           |          |         |
| PSS77 1α        | 2,37171   | 5,00694 x |           |           |          |            |            |          |           |          |           |           |           |          |         |
| PSS60α          | 0,70088   | 5,270463  | 0,26352 x |           |          |            |            |          |           |          |           |           |           |          |         |
| PSS69 2α        | 2,20088   | 2,898755  | 2,10819   | 2,37171 x |          |            |            |          |           |          |           |           |           |          |         |
| PSS71 1α        | 2,20088   | 2,898755  | 2,10819   | 2,37171   | 0 x      |            |            |          |           |          |           |           |           |          |         |
| PSS58 1α        | 1,53421   | 10,80445  | 5,79751   | 5,53399   | 7,905694 | 7,905694 x |            |          |           |          |           |           |           |          |         |
| PSS86α          | 1,70088   | 11,06797  | 6,06103   | 5,79751   | 8,169217 | 8,169217   | 0,263523 x |          |           |          |           |           |           |          |         |
| PSS113α         | 10,5409   | 17,91957  | 12,9126   | 12,6491   | 15,02082 | 15,02082   | 7,115125   | 6,8516 x |           |          |           |           |           |          |         |
| PSS87α          | 5,27046   | 2,108185  | 2,89875   | 3,16228   | 0,790569 | 0,790569   | 8,696264   | 8,9598   | 15,8114 x |          |           |           |           |          |         |
| PSS100α         | 4,21637   | 3,162278  | 1,84466   | 2,10819   | 0,263523 | 0,263523   | 7,642171   | 7,9057   | 14,7573   | 1,0541 x |           |           |           |          |         |
| PSS103α         | 2,89875   | 10,2774   | 5,27046   | 5,00694   | 7,378648 | 7,378648   | 0,527046   | 0,7906   | 7,64217   | 8,1692   | 7,11512 x |           |           |          |         |
| PSS94α          | 4,21637   | 3,162278  | 1,84466   | 2,10819   | 0,263523 | 0,263523   | 7,642171   | 7,9057   | 14,7573   | 1,0541   | 0         | 7,11512 x |           |          |         |
| PSS102α         | 8,95979   | 1,581139  | 6,58808   | 6,8516    | 4,479893 | 4,479893   | 12,38559   | 12,649   | 19,5007   | 3,6893   | 4,74342   | 11,8585   | 4,74342 x |          |         |
| PSS104α         | 2,10819   | 5,270463  | 0,26352   | 0         | 2,371708 | 2,371708   | 5,533986   | 5,7975   | 12,6491   | 3,1623   | 2,10819   | 5,00694   | 2,10819   | 6,8516 x |         |
| qcritical=5,211 |           |           |           |           |          |            |            |          |           |          |           |           |           |          |         |

Πίνακας 43. Μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων PSS69 2α, PSS71 1α, PSS87α, PSS100α και PSS94α, παρουσία 1 µg τετρακυκλίνης.

| ANOVA               |     |    |       |      |          |         |
|---------------------|-----|----|-------|------|----------|---------|
| Source of Variation | SS  | df | MS    | F    | P-value  | Fcrit   |
| Between Groups      | 0,9 | 4  | 0,225 | 2,25 | 0,136037 | 3,47805 |
| Within Groups       | 1   | 10 | 0,1   |      |          |         |
| Total               | 1,9 | 14 |       |      |          |         |

Πίνακας 44. Μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων PSS73α, PSS77 1α, PSS60α και PSS104α, παρουσία 1 µg τετρακυκλίνης.

| ANOVA               |          |    |          |          |          |          |
|---------------------|----------|----|----------|----------|----------|----------|
| Source of Variation | SS       | df | MS       | F        | P-value  | Fcrit    |
| Between Groups      | 4,395833 | 3  | 1,465278 | 0,890295 | 0,486567 | 4,066181 |
| Within Groups       | 13,16667 | 8  | 1,645833 |          |          |          |
| Total               | 17,5625  | 11 |          |          |          |          |

Πίνακας 45. Μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων PSS58 1α, PSS86α και PSS103α, παρουσία 1 µg τετρακυκλίνης.

| ANOVA               |          |    |          |          |          |          |
|---------------------|----------|----|----------|----------|----------|----------|
| Source of Variation | SS       | df | MS       | F        | P-value  | Fcrit    |
| Between Groups      | 0,388889 | 2  | 0,194444 | 0,056452 | 0,945608 | 5,143253 |
| Within Groups       | 20,66667 | 6  | 3,444444 |          |          |          |
| Total               | 21,05556 | 8  |          |          |          |          |

### 3.7.2.2 Έλεγχος ευαισθησίας απομονώσεων του βακτηρίου *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* σε ποσότητα τετρακυκλίνης 10 µg

Στον Πίνακα 46, παρουσιάζεται ο μέσος όρος των ζωνών παρεμπόδισης των 15 απομονώσεων, για ποσότητα τετρακυκλίνης 10 µg. Με μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς προέκυψε ότι μεταξύ των ζωνών παρεμπόδισης των 15 απομονώσεων, υπάρχουν στατιστικά σημαντικά διαφορές, καθώς  $F > F_{critical}$  (Πίνακας 47). Με μέθοδο πολλαπλών συγκρίσεων με το κριτήριο Tukey, βρέθηκαν τα ζεύγη των απομονώσεων στα οποία  $q > q_{critical}$ , δηλαδή διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους (Πίνακας 48) και στη συνέχεια οι απομονώσεις ομαδοποιήθηκαν. Στη πρώτη ομάδα, με τις μικρότερες ζώνες παρεμπόδισης (17,5-19,6 mm), ανήκουν οι PSS59α, PSS60α, PSS100α και PSS87α καθώς με μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς, βρέθηκε ότι  $F < F_{critical}$  και συνεπώς οι μέσοι όροι των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους (Πίνακας 49). Ομοίως βρέθηκε ότι στη δεύτερη ομάδα (20,26-22,5 mm), ανήκουν οι PSS69 2α, PSS94α, PSS102α και PSS77 1α (Πίνακας 50) και στη τρίτη (24,16-26 mm), οι PSS73α, PSS71 1α, PSS58 1α, PSS104α και PSS103α (Πίνακας 51). Οι απομονώσεις PSS103α και PSS113α με μέσο όρο διαμέτρων 26 και 28,6 mm αντίστοιχα, ανήκουν τέταρτη ομάδα, καθώς με στατιστικό έλεγχο  $t$  προέκυψε ότι οι μέσοι όροι των ζωνών παρεμπόδισης δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ( $P \text{ two-tail} > \alpha$ , όπου  $\alpha=0,05$ ) (Πίνακας 52). Η PSS86α δεν ανήκει σε καμία ομάδα και έχει τη μεγαλύτερη ζώνη παρεμπόδισης (30,66 mm).

Πίνακας 46. Μέσοι όροι διαμέτρων ζωνών παρεμπόδισης των 15 απομονώσεων, παρουσία 10 µg τετρακυκλίνης.

|           | 10 µg τετρακυκλίνης                    |
|-----------|--|
| Απομόνωση | Μ.ο. διαμέτρου ζώνης παρεμπόδισης (mm) |
| PSS58 1α  | 24,83333333                            |
| PSS59α    | 18,33333333                            |
| PSS60α    | 18,33333333                            |
| PSS69 2α  | 22,5                                   |
| PSS71 1α  | 24,5                                   |
| PSS73α    | 25,5                                   |
| PSS77 1α  | 22                                     |
| PSS86α    | 30,66666667                            |
| PSS87α    | 19,66666667                            |
| PSS94α    | 20,16666667                            |
| PSS100α   | 17,5                                   |
| PSS102α   | 21,33333333                            |
| PSS103α   | 26                                     |
| PSS104α   | 24,16666667                            |
| PSS113α   | 28,66666667                            |

Πίνακας 47. Μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των 15 απομονώσεων, παρουσία 10 µg τετρακυκλίνης.

| ANOVA               |          |    |          |          |          |            |
|---------------------|----------|----|----------|----------|----------|------------|
| Source of Variation | SS       | df | MS       | F        | P-value  | Fcrit      |
| Between Groups      | 630,1111 | 14 | 45,00794 | 39,71289 | 1,76E-15 | 2,03742044 |
| Within Groups       | 34       | 30 | 1,133333 |          |          |            |
| Total               | 664,1111 | 44 |          |          |          |            |

Πίνακας 48. Μέθοδος πολλαπλών συγκρίσεων με το κριτήριο Tukey μεταξύ των 15 απομονώσεων, για ποσότητα τετρακυκλίνης 10 µg. Ζεύγη που διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ( $q > q_{critical}$ ), σημειώνονται με πράσινο.

| q               | PSS73α  | PSS59α   | PSS77 1α  | PSS60α    | PSS69 2α   | PSS71 1α  | PSS58 1α  | PSS86α  | PSS113α    | PSS87α   | PSS100α   | PSS103α   | PSS94α   | PSS102α   | PSS104α |
|-----------------|---------|----------|-----------|-----------|------------|-----------|-----------|---------|------------|----------|-----------|-----------|----------|-----------|---------|
| PSS73α          | x       |          |           |           |            |           |           |         |            |          |           |           |          |           |         |
| PSS59α          | 11,66 x |          |           |           |            |           |           |         |            |          |           |           |          |           |         |
| PSS77 1α        | 5,69442 | 5,9656 x |           |           |            |           |           |         |            |          |           |           |          |           |         |
| PSS60α          | 11,66   | 0        | 5,96559 x |           |            |           |           |         |            |          |           |           |          |           |         |
| PSS69 2α        | 4,88094 | 6,7791   | 0,81349   | 6,77908 x |            |           |           |         |            |          |           |           |          |           |         |
| PSS71 1α        | 1,62698 | 10,033   | 4,06745   | 10,033    | 3,253957 x |           |           |         |            |          |           |           |          |           |         |
| PSS58 1α        | 1,08465 | 10,575   | 4,60977   | 10,5754   | 3,796283   | 0,54233 x |           |         |            |          |           |           |          |           |         |
| PSS86α          | 8,40606 | 20,066   | 14,1005   | 20,0661   | 13,28699   | 10,033    | 9,49071 x |         |            |          |           |           |          |           |         |
| PSS113α         | 5,1521  | 16,812   | 10,8465   | 16,8121   | 10,03303   | 6,77908   | 6,23675   | 3,254 x |            |          |           |           |          |           |         |
| PSS87α          | 9,49071 | 2,1693   | 3,79628   | 2,1693    | 4,609772   | 7,86373   | 8,40606   | 17,897  | 14,64281 x |          |           |           |          |           |         |
| PSS100α         | 13,0158 | 1,3558   | 7,3214    | 1,35582   | 8,134892   | 11,3888   | 11,9312   | 21,422  | 18,16793   | 3,5251 x |           |           |          |           |         |
| PSS103α         | 0,81349 | 12,474   | 6,50791   | 12,4735   | 5,694425   | 2,44047   | 1,89814   | 7,5926  | 4,338609   | 10,304   | 13,8293 x |           |          |           |         |
| PSS94α          | 8,67722 | 2,9828   | 2,98279   | 2,98279   | 3,796283   | 7,05024   | 7,59257   | 17,083  | 13,82932   | 0,8135   | 4,33861   | 9,49071 x |          |           |         |
| PSS102α         | 6,77908 | 4,8809   | 1,08465   | 4,88094   | 1,898142   | 5,1521    | 5,69442   | 15,185  | 11,93118   | 2,7116   | 6,23675   | 7,59257   | 1,8981 x |           |         |
| PSS104α         | 2,1693  | 9,4907   | 3,52512   | 9,49071   | 2,711631   | 0,54233   | 1,08465   | 10,575  | 7,321403   | 7,3214   | 10,8465   | 2,98279   | 6,5079   | 4,60977 x |         |
| qcritical=5,211 |         |          |           |           |            |           |           |         |            |          |           |           |          |           |         |

Πίνακας 49. Μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων PSS59α, PSS60α, PSS100α και PSS87α, παρουσία 10 µg τετρακυκλίνης.

| ANOVA               |          |    |          |          |          |          |
|---------------------|----------|----|----------|----------|----------|----------|
| Source of Variation | SS       | df | MS       | F        | P-value  | Fcrit    |
| Between Groups      | 7,229167 | 3  | 2,409722 | 1,676329 | 0,248381 | 4,066181 |
| Within Groups       | 11,5     | 8  | 1,4375   |          |          |          |
| Total               | 18,72917 | 11 |          |          |          |          |

Πίνακας 50. Μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων PSS69 2α, PSS94α, PSS102α και PSS77 1α, παρουσία 10 µg τετρακυκλίνης.

| ANOVA               |          |    |          |          |          |          |
|---------------------|----------|----|----------|----------|----------|----------|
| Source of Variation | SS       | df | MS       | F        | P-value  | Fcrit    |
| Between Groups      | 9,166667 | 3  | 3,055556 | 2,619048 | 0,122842 | 4,066181 |
| Within Groups       | 9,333333 | 8  | 1,166667 |          |          |          |
| Total               | 18,5     | 11 |          |          |          |          |



Πίνακας 51. Μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων PSS73α, PSS71 1α, PSS58 1α, PSS104α και PSS103α, παρουσία 10 μg τετρακυκλίνης.

| ANOVA               |          |    |          |          |          |         |
|---------------------|----------|----|----------|----------|----------|---------|
| Source of Variation | SS       | df | MS       | F        | P-value  | Fcrit   |
| Between Groups      | 6,666667 | 4  | 1,666667 | 1,408451 | 0,299995 | 3,47805 |
| Within Groups       | 11,83333 | 10 | 1,183333 |          |          |         |
| Total               | 18,5     | 14 |          |          |          |         |

Πίνακας 52. Στατιστικός έλεγχος t των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων PSS113α και PSS103α που προέκυψαν παρουσία 10 μg τετρακυκλίνης.

| t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances |             |         |
|---|-------------|---------|
|   | PSS113α     | PSS103α |
| Mean  | 28,66666667 | 26      |
| Variance                                      | 0,083333333 | 3,25    |
| Observations                                  | 3           | 3       |
| Hypothesized Mean Difference                  | 0           |         |
| df  | 2           |         |
| t   | 2,529822128 |         |
| P(T<=t) one-tail                              | 0,06356422  |         |
| t critical one-tail                           | 2,91998558  |         |
| P(T<=t) two tail                              | 0,127128439 |         |
| t critical two tail                           | 4,30265273  |         |

### 3.7.2.3 Έλεγχος ευαισθησίας απομονώσεων του βακτηρίου *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* σε ποσότητα τετρακυκλίνης 30 μg

Στον Πίνακα 53, παρουσιάζεται ο μέσος όρος των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των 15 απομονώσεων, για ποσότητα τετρακυκλίνης 30 μg. Με μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς προέκυψε ότι μεταξύ μέσων όρων των ζωνών παρεμπόδισης των 15 απομονώσεων, υπάρχουν στατιστικά σημαντικά διαφορές, καθώς  $F > F_{critical}$  (Πίνακας 54). Με μέθοδο πολλαπλών συγκρίσεων με το κριτήριο Tukey, βρέθηκαν τα ζεύγη των απομονώσεων στα οποία  $q > q_{critical}$ , δηλαδή διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους (Πίνακας 55) και στη συνέχεια οι απομονώσεις ομαδοποιήθηκαν. Η απομόνωση PSS100α έχει τη μικρότερη ζώνη παρεμπόδισης, με διάμετρο 21,66 mm και δεν ανήκει σε καμία ομάδα. Στη πρώτη ομάδα, με μέσο όρο διαμέτρων 25,3-27,1 mm, ανήκουν οι PSS59α, PSS87α, PSS77 1α και PSS94α, καθώς με μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς βρέθηκε ότι μεταξύ των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικά διαφορές ( $F < F_{critical}$ ) (Πίνακας 56). Ομοίως, βρέθηκε ότι οι PSS102α, PSS104α, PSS58 1α και PSS103α με μέσο όρο διαμέτρων 28,16-29,5 mm, ανήκουν στην δεύτερη ομάδα (Πίνακας 57) και οι PSS73α, PSS113α, PSS60α, PSS69 2α και PSS71 1α με μέσο όρο διαμέτρων 30-31,66 mm στην τρίτη

(Πίνακας 58). Η απομονώση PSS86α έχει τη μεγαλύτερη διάμετρο ζώνης παρεμπόδισης (40,33 mm) και δεν ανήκει σε καμία ομάδα.

Πίνακας 53. Μέσοι όροι διαμέτρων ζωνών παρεμπόδισης των 15 απομονώσεων, παρουσία 30 µg τετρακυκλίνης.

|           | 30 µg τετρακυκλίνης                    |
|-----------|--|
| Απομόνωση | Μ.ο. διαμέτρου ζώνης παρεμπόδισης (mm) |
| PSS58 1α  | 29                                     |
| PSS59α    | 25,33333333                            |
| PSS60α    | 30                                     |
| PSS69 2α  | 30                                     |
| PSS71 1α  | 30,16666667                            |
| PSS73α    | 30,16666667                            |
| PSS77 1α  | 27,5                                   |
| PSS86α    | 40,33333333                            |
| PSS87α    | 26,33333333                            |
| PSS94α    | 27,16666667                            |
| PSS100α   | 21,66666667                            |
| PSS102α   | 28,16666667                            |
| PSS103α   | 29,5                                   |
| PSS104α   | 28,16666667                            |
| PSS113α   | 31,66666667                            |

Πίνακας 54. Μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των 15 απομονώσεων, παρουσία 30 µg τετρακυκλίνης.

| ANOVA               |          |    |             |            |          |         |
|---------------------|----------|----|-------------|------------|----------|---------|
| Source of Variation | SS       | df | MS          | F          | P-value  | Fcrit   |
| Between Groups      | 665,5778 | 14 | 47,54126984 | 45,7616501 | 2,41E-16 | 2,03742 |
| Within Groups       | 31,16667 | 30 | 1,038888889 |            |          |         |
| Total               | 696,7444 | 44 |             |            |          |         |

Πίνακας 55. Μέθοδος πολλαπλών συγκρίσεων με το κριτήριο Tukey μεταξύ των 15 απομονώσεων, για ποσότητα τετρακυκλίνης 30 µg. Ζεύγη που διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ( $q > q_{critical}$ ), σημειώνονται με πράσινο.

| q               | PSS73α  | PSS59α   | PSS77 1α  | PSS60α | PSS69 2α  | PSS71 1α  | PSS58 1α | PSS86α  | PSS113α   | PSS87α   | PSS100α   | PSS103α  | PSS94α   | PSS102α | PSS104α |
|-----------------|---------|----------|-----------|--------|-----------|-----------|----------|---------|-----------|----------|-----------|----------|----------|---------|---------|
| PSS73α          | x       |          |           |        |           |           |          |         |           |          |           |          |          |         |         |
| PSS59α          | 8,213 x |          |           |        |           |           |          |         |           |          |           |          |          |         |         |
| PSS77 1α        | 4,532   | 3,6819 x |           |        |           |           |          |         |           |          |           |          |          |         |         |
| PSS60α          | 0,283   | 7,9302   | 4,24831 x |        |           |           |          |         |           |          |           |          |          |         |         |
| PSS69 2α        | 0,283   | 7,9302   | 4,24831   | 0 x    |           |           |          |         |           |          |           |          |          |         |         |
| PSS71 1α        | 0       | 8,2134   | 4,53153   | 0,2832 | 0,28322 x |           |          |         |           |          |           |          |          |         |         |
| PSS58 1α        | 1,983   | 6,2309   | 2,54899   | 1,6993 | 1,69932   | 1,98254 x |          |         |           |          |           |          |          |         |         |
| PSS86α          | 17,28   | 25,49    | 21,808    | 17,56  | 17,5597   | 17,2765   | 19,259 x |         |           |          |           |          |          |         |         |
| PSS113α         | 2,549   | 10,762   | 7,08051   | 2,8322 | 2,83221   | 2,54899   | 4,53153  | 14,73 x |           |          |           |          |          |         |         |
| PSS87α          | 6,514   | 1,6993   | 1,98254   | 6,2309 | 6,23085   | 6,51407   | 4,53153  | 23,79   | 9,06306 x |          |           |          |          |         |         |
| PSS100α         | 14,44   | 6,2309   | 9,91272   | 14,161 | 14,161    | 14,4443   | 12,4617  | 31,72   | 16,9932   | 7,9302 x |           |          |          |         |         |
| PSS103α         | 1,133   | 7,0805   | 3,39865   | 0,8497 | 0,84966   | 1,13288   | 0,84966  | 18,41   | 3,68187   | 5,3812   | 13,3114 x |          |          |         |         |
| PSS94α          | 5,098   | 3,1154   | 0,56644   | 4,8148 | 4,81475   | 5,09797   | 3,11543  | 22,37   | 7,64696   | 1,4161   | 9,34628   | 3,9651 x |          |         |         |
| PSS102α         | 3,399   | 4,8148   | 1,13288   | 3,1154 | 3,11543   | 3,39865   | 1,4161   | 20,68   | 5,94763   | 3,1154   | 11,0456   | 2,2658   | 1,6993 x |         |         |
| PSS104α         | 3,399   | 4,8148   | 1,13288   | 3,1154 | 3,11543   | 3,39865   | 1,4161   | 20,68   | 5,94763   | 3,1154   | 11,0456   | 2,2658   | 1,6993   | 0 x     |         |
| qcritical=5,211 |         |          |           |        |           |           |          |         |           |          |           |          |          |         |         |

Πίνακας 56. Μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων PSS59α, PSS87α, PSS77 1α και PSS94α παρουσία 30 μg τετρακυκλίνης.

| ANOVA               |          |    |          |          |          |          |
|---------------------|----------|----|----------|----------|----------|----------|
| Source of Variation | SS       | df | MS       | F        | P-value  | Fcrit    |
| Between Groups      | 8,416667 | 3  | 2,805556 | 1,320261 | 0,333681 | 4,066181 |
| Within Groups       | 17       | 8  | 2,125    |          |          |          |
| Total               | 25,41667 | 11 |          |          |          |          |

Πίνακας 57. Μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων, PSS102α, PSS104α, PSS58 1α και PSS103α παρουσία 30 μg τετρακυκλίνης.

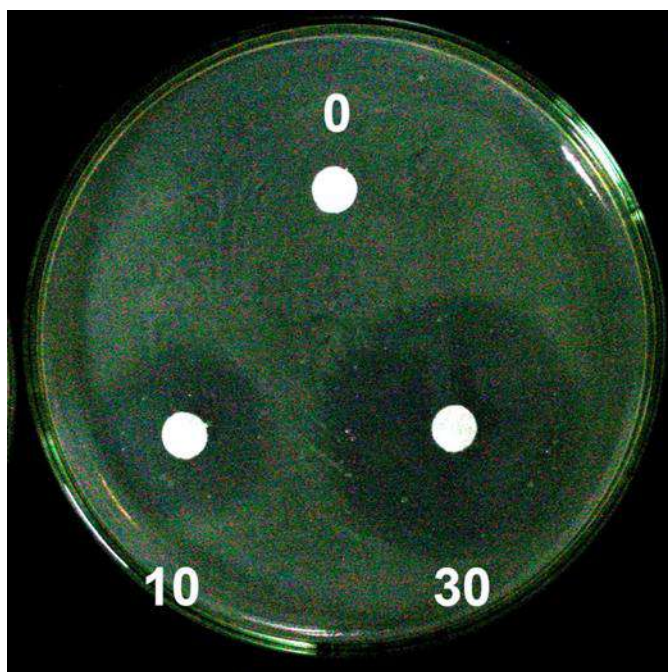
| ANOVA               |          |    |          |          |          |          |
|---------------------|----------|----|----------|----------|----------|----------|
| Source of Variation | SS       | df | MS       | F        | P-value  | Fcrit    |
| Between Groups      | 3,895833 | 3  | 1,298611 | 1,416667 | 0,307547 | 4,066181 |
| Within Groups       | 7,333333 | 8  | 0,916667 |          |          |          |
| Total               | 11,22917 | 11 |          |          |          |          |

Πίνακας 58. Μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων PSS73α, PSS113α, PSS60α, PSS69 2α και PSS71 1α, παρουσία 30 μg τετρακυκλίνης.

| ANOVA               |      |    |       |          |          |         |
|---------------------|------|----|-------|----------|----------|---------|
| Source of Variation | SS   | df | MS    | F        | P-value  | Fcrit   |
| Between Groups      | 6,1  | 4  | 1,525 | 2,541667 | 0,105549 | 3,47805 |
| Within Groups       | 6    | 10 | 0,6   |          |          |         |
| Total               | 12,1 | 14 |       |          |          |         |

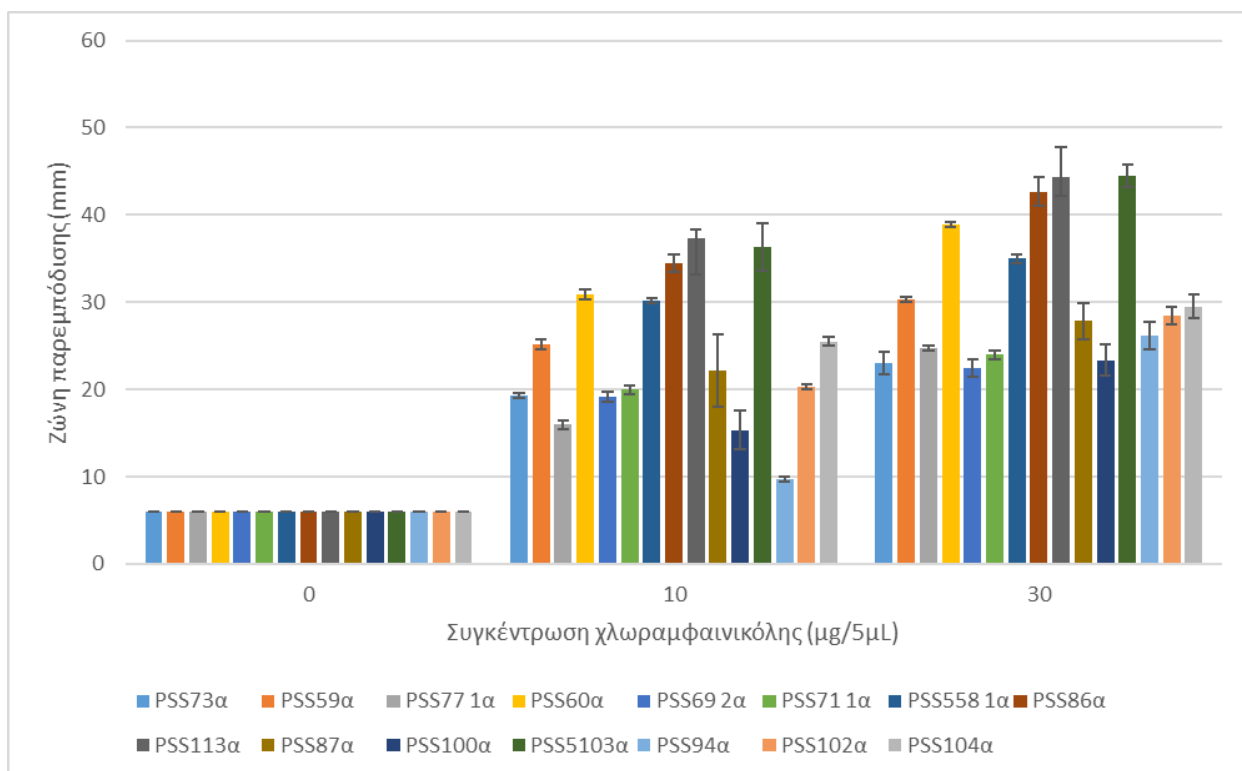
### 3.7.3 Έλεγχος ευαισθησίας απομονώσεων του βακτηρίου *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* στην χλωραμφαινικόλη

Κατά τον έλεγχο ευαισθησίας των 15 απομονώσεων του βακτηρίου *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* στη χλωραμφαινικόλη, με τη μέθοδο διάχυσης σε άγαρ με τη χρήση δισκίων διηθητικού χαρτιού εμποτισμένων με το αντιβιοτικό, δημιουργήθηκαν ζώνες παρεμπόδισης σε όλες τις ποσότητες από όλες τις απομονώσεις. Στην Εικόνα 18. παρουσιάζονται οι ζώνες παρεμπόδισης που σχηματίστηκαν για ποσότητες χλωραμφαινικόλης 10 και 30 μg, κατά τον έλεγχο ευαισθησίας της απομόνωσης PSS100α στην χλωραμφαινικόλη. Μέσα στις ζώνες διακρίνονται μεμονωμένες αποικίες. Στην περίπτωση αυτή, η μέτρηση της διαμέτρου έγινε στο διάστημα ανάμεσα από τις αποικίες που βρισκόταν πιο κοντά στο δισκίο. Στο Διάγραμμα 6, παρουσιάζεται για την κάθε απομόνωση και ποσότητα, ο μέσος όρος των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης που προέκυψε από τις τρεις επαναλήψεις και η αντίστοιχη τυπική απόκλιση.



Εικόνα 18. Ζώνες παρεμπόδισης που σχηματίστηκαν για ποσότητες χλωραμφαινικόλης 10 και 30 µg, κατά τον έλεγχο ευαισθησίας της απομόνωσης PSS100α στην χλωραμφαινικόλη. Μέσα στις ζώνες διακρίνονται μεμονωμένες αποικίες.

Διάγραμμα 6. Μέσος όρος διαμέτρων ζωνών παρεμπόδισης και τυπική απόκλιση των απομονώσεων του βακτηρίου PSS, που σχηματίστηκαν παρουσία 10 µg και 30 µg χλωραμφαινικόλης,



### 3.7.3.1 Έλεγχος ευαισθησίας απομονώσεων του βακτηρίου *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* σε ποσότητα χλωραμφαινικόλης 10 µg

Στον Πίνακα 59, παρουσιάζεται ο μέσος όρος των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των 15 απομονώσεων, για ποσότητα χλωραμφαινικόλης 10 µg. Με μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς προέκυψε ότι μεταξύ των ζωνών παρεμπόδισης των 15 απομονώσεων, υπάρχουν στατιστικά σημαντικά διαφορές, καθώς  $F > F_{critical}$  (Πίνακας 60). Με μέθοδο πολλαπλών συγκρίσεων με το κριτήριο Tukey, βρέθηκαν τα ζεύγη των απομονώσεων στα οποία  $q > q_{critical}$ , δηλαδή διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους (Πίνακας 61) και στη συνέχεια οι απομονώσεις ομαδοποιήθηκαν. Η απομόνωση PSS94α, είχε τη μικρότερη ζώνη παρεμπόδισης (διάμετρος 9,66 mm) και δεν ανήκει σε καμία ομάδα. Στην πρώτη ομάδα, ανήκουν οι απομονώσεις PSS69 2α και PSS73α με μέσο όρο διαμέτρου 19,16 και 19,33 mm αντίστοιχα, καθώς με στατιστικό έλεγχο t μεταξύ των μέσων όρων των ζωνών παρεμπόδισης, προέκυψε ότι  $P \text{ two-tail} > \alpha$ , όπου  $\alpha = 0,05$  και συνεπώς δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές (Πίνακας 62). Ομοίως βρέθηκε ότι στη δεύτερη ανήκουν οι PSS102α και PSS71 1α, με μέσο όρο διαμέτρων 20-20,33 mm (Πίνακας 63). Στη τρίτη ομάδα ανήκουν οι PSS104α, PSS59α και PSS87α (διάμετρος 22,16-25,5 mm), καθώς με μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς μεταξύ των μέσων όρων των ζωνών παρεμπόδισης, προέκυψε ότι  $F < F_{critical}$  και συνεπώς δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές (Πίνακας 64). Στη τέταρτη ομάδα ανήκουν οι PSS58 1α και PSS60α, με μέσο όρο διαμέτρων 30,16 και 30,83 mm αντίστοιχα. Με στατιστικό έλεγχο t μεταξύ των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης, προέκυψε ότι  $P \text{ two-tail} > \alpha$ , όπου  $\alpha = 0,05$  και συνεπώς δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές (Πίνακας 65). Στη πέμπτη ομάδα ανήκουν οι PSS86α, PSS113α και PSS103α καθώς με μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς μεταξύ των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης, προέκυψε ότι δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $F < F_{critical}$ ) (Πίνακας 66). Οι απομονώσεις αυτές είχαν τις μεγαλύτερες ζώνες παρεμπόδισης (διάμετρος 34,5-37,3).

Πίνακας 59. Μέσοι όροι διαμέτρων ζωνών παρεμπόδισης των 15 απομονώσεων, παρουσία 10 µg χλωραμφαινικόλης.

|           | 10 µg χλωραμφαινικόλης                 |
|-----------|--|
| Απομόνωση | Μ.ο. διαμέτρου ζώνης παρεμπόδισης (mm) |
| PSS58 1α  | 30,16666667                            |
| PSS59α    | 25,16666667                            |
| PSS60α    | 30,83333333                            |
| PSS69 2α  | 19,16666667                            |
| PSS71 1α  | 20                                     |
| PSS73α    | 19,33333333                            |
| PSS77 1α  | 16                                     |
| PSS86α    | 34,5                                   |
| PSS87α    | 22,16666667                            |
| PSS94α    | 9,66666667                             |
| PSS100α   | 15,33333333                            |
| PSS102α   | 20,33333333                            |
| PSS103α   | 36,33333333                            |
| PSS104α   | 25,5                                   |
| PSS113α   | 37,33333333                            |

Πίνακας 60. Μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των 15 απομονώσεων, παρουσία 10 µg χλωραμφαινικόλης.

| ANOVA               |          |    |          |          |          |         |
|---------------------|----------|----|----------|----------|----------|---------|
| Source of Variation | SS       | df | MS       | F        | P-value  | Fcrit   |
| Between Groups      | 2852,244 | 14 | 203,7317 | 89,44321 | 1,64E-20 | 2,03742 |
| Within Groups       | 68,33333 | 30 | 2,277778 |          |          |         |
| Total               | 2920,578 | 44 |          |          |          |         |

Πίνακας 61. Μέθοδος πολλαπλών συγκρίσεων με το κριτήριο Tukey μεταξύ των 15 απομονώσεων, για ποσότητα χλωραμφαινικόλης 10 µg. Ζεύγη που διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ( $q > q_{critical}$ ), σημειώνονται με πράσινο.

| q                            | PSS73α   | PSS59α    | PSS77 1α | PSS60α | PSS69 2α | PSS71 1α | PSS58 1α | PSS86α  | PSS113α | PSS87α | PSS100α | PSS103α | PSS94α | PSS102α  | PSS104α |
|------------------------------|----------|-----------|----------|--------|----------|----------|----------|---------|---------|--------|---------|---------|--------|----------|---------|
| PSS73α                       | x        |           |          |        |          |          |          |         |         |        |         |         |        |          |         |
| PSS59α                       | 6,694555 | x         |          |        |          |          |          |         |         |        |         |         |        |          |         |
| PSS77 1α                     | 3,82546  | 10,520016 | x        |        |          |          |          |         |         |        |         |         |        |          |         |
| PSS60α                       | 13,19784 | 6,5032825 | 17,0233  | x      |          |          |          |         |         |        |         |         |        |          |         |
| PSS69 2α                     | 0,191273 | 6,8858285 | 3,634187 | 13,389 | x        |          |          |         |         |        |         |         |        |          |         |
| PSS71 1α                     | 0,765092 | 5,9294634 | 4,590552 | 12,433 | 0,95637  | x        |          |         |         |        |         |         |        |          |         |
| PSS58 1α                     | 12,43275 | 5,7381904 | 16,25821 | 0,7651 | 12,624   | 11,6677  | x        |         |         |        |         |         |        |          |         |
| PSS86α                       | 17,40584 | 10,711289 | 21,2313  | 4,208  | 17,5971  | 16,6408  | 4,9731   | x       |         |        |         |         |        |          |         |
| PSS113α                      | 20,65749 | 13,96293  | 24,48295 | 7,4596 | 20,8488  | 19,8924  | 8,22474  | 3,25164 | x       |        |         |         |        |          |         |
| PSS87α                       | 3,251641 | 3,4429143 | 7,077102 | 9,9462 | 3,44291  | 2,48655  | 9,1811   | 14,1542 | 17,4058 | x      |         |         |        |          |         |
| PSS100α                      | 4,590552 | 11,285108 | 0,765092 | 17,788 | 4,39928  | 5,35564  | 17,0233  | 21,9964 | 25,248  | 7,8422 | x       |         |        |          |         |
| PSS103α                      | 19,50985 | 12,815292 | 23,33531 | 6,312  | 19,7011  | 18,7448  | 7,0771   | 2,104   | 1,14764 | 16,258 | 24,1004 | x       |        |          |         |
| PSS94α                       | 11,09383 | 17,78839  | 7,268375 | 24,292 | 10,9026  | 11,8589  | 23,5266  | 28,4997 | 31,7513 | 14,345 | 6,50328 | 30,6037 | x      |          |         |
| PSS102α                      | 1,147638 | 5,5469174 | 4,973098 | 12,05  | 1,33891  | 0,38255  | 11,2851  | 16,2582 | 19,5098 | 2,104  | 5,73819 | 18,3622 | 12,241 | x        |         |
| PSS104α                      | 7,077102 | 0,382546  | 10,90256 | 6,1207 | 7,26837  | 6,31201  | 5,35564  | 10,3287 | 13,5804 | 3,8255 | 11,6677 | 10,8333 | 18,171 | 5,929463 | x       |
| q <sub>critical</sub> =5,211 |          |           |          |        |          |          |          |         |         |        |         |         |        |          |         |

Πίνακας 62. Στατιστικός έλεγχος t των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων PSS69 2α και PSS73α, που προέκυψαν παρουσία 10 μg χλωραμφαινικόλης,

| t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances |          |          |
|---|----------|----------|
|   | PSS69 2α | PSS73α   |
| Mean  | 19,16667 | 19,33333 |
| Variance                                      | 0,333333 | 0,083333 |
| Observations                                  | 3        | 3        |
| Hypothesized Mean Difference                  | 0        |          |
| df  | 3        |          |
| t   | -0,44721 |          |
| P(T<=t) one-tail                              | 0,342519 |          |
| t critical one-tail                           | 2,353363 |          |
| P(T<=t) two tail                              | 0,685038 |          |
| t critical two tail                           | 3,182446 |          |

Πίνακας 63. Στατιστικός έλεγχος t των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων PSS102α και PSS71 1α, που προέκυψαν παρουσία 10 μg χλωραμφαινικόλης,

| t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances |             |          |
|---|-------------|----------|
|   | PSS102α     | PSS71 1α |
| Mean  | 20,33333333 | 20       |
| Variance                                      | 0,083333333 | 0,25     |
| Observations                                  | 3           | 3        |
| Hypothesized Mean Difference                  | 0           |          |
| df  | 3           |          |
| t   | 1           |          |
| P(T<=t) one-tail                              | 0,195501109 |          |
| t critical one-tail                           | 2,353363435 |          |
| P(T<=t) two tail                              | 0,391002219 |          |
| t critical two tail                           | 3,182446305 |          |

Πίνακας 64. Μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων PSS104α, PSS59α και PSS87α παρουσία 10 μg χλωραμφαινικόλης.

| ANOVA               |          |    |          |          |         |          |
|---------------------|----------|----|----------|----------|---------|----------|
| Source of Variation | SS       | df | MS       | F        | P-value | Fcrit    |
| Between Groups      | 20,22222 | 2  | 10,11111 | 1,693023 | 0,26122 | 5,143253 |
| Within Groups       | 35,83333 | 6  | 5,972222 |          |         |          |
| Total               | 56,05556 | 8  |          |          |         |          |

Πίνακας 65. Στατιστικός έλεγχος t των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων PSS58 1α και PSS60α, που προέκυψαν παρουσία 10 µg χλωραμφαινικόλης,

| t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances |          |             |
|---|----------|-------------|
|   | PSS58 1α | PSS60α      |
| Mean  | 30,16667 | 30,83333333 |
| Variance                                      | 0,083333 | 0,333333333 |
| Observations                                  | 3        | 3           |
| Hypothesized Mean Difference                  | 0        |             |
| df  | 3        |             |
| t   | -1,78885 |             |
| P(T<=t) one-tail                              | 0,085793 |             |
| t critical one-tail                           | 2,353363 |             |
| P(T<=t) two tail                              | 0,171586 |             |
| t critical two tail                           | 3,182446 |             |

Πίνακας 66. Μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων PSS86α, PSS113α και PSS103α παρουσία 10 µg χλωραμφαινικόλης.

| ANOVA               |          |    |          |          |          |          |
|---------------------|----------|----|----------|----------|----------|----------|
| Source of Variation | SS       | df | MS       | F        | P-value  | Fcrit    |
| Between Groups      | 12,38889 | 2  | 6,194444 | 1,922414 | 0,226375 | 5,143253 |
| Within Groups       | 19,33333 | 6  | 3,222222 |          |          |          |
| Total               | 31,72222 | 8  |          |          |          |          |

### 3.7.3.2 Έλεγχος ευαισθησίας απομονώσεων του βακτηρίου *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* σε ποσότητα χλωραμφαινικόλης 30 µg

Στον Πίνακα 67, παρουσιάζεται ο μέσος όρος των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των 15 απομονώσεων, για ποσότητα χλωραμφαινικόλης 30 µg. Με μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς, προέκυψε ότι μεταξύ των μέσων όρων των ζωνών παρεμπόδισης των 15 απομονώσεων, υπάρχουν στατιστικά σημαντικά διαφορές, καθώς  $F > F_{critical}$  (Πίνακας 68). Με μέθοδο πολλαπλών συγκρίσεων με το κριτήριο Tukey, βρέθηκαν τα ζεύγη των απομονώσεων στα οποία  $q > q_{critical}$ , δηλαδή διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους (Πίνακας 69) και στη συνέχεια οι απομονώσεις ομαδοποιήθηκαν. Οι απομονώσεις PSS73α, PSS100α και PSS69 2α, με τις μικρότερες ζώνες παρεμπόδισης (διάμετρος 22,5-23,3 mm), ανήκουν στην πρώτη ομάδα, καθώς με μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς μεταξύ των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης, προέκυψε ότι  $F < F_{critical}$  και συνεπώς δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές (Πίνακας 70). Ομοίως, βρέθηκε ότι στη δεύτερη με μέσο όρο διαμέτρου 24-26,1 mm, ανήκουν οι PSS94α, PSS71 1α και PSS77 1α (Πίνακας 71), στην τρίτη με μέσο όρο 27,8-29,5 οι PSS59α, PSS87α, PSS102α και PSS104α (Πίνακας 72) και στην



τέταρτη οι PSS86α, PSS113α και PSS103α (Πίνακας 73), με τις μεγαλύτερες ζώνες παρεμπόδισης (διάμετρος 42,66-44,5 mm). Οι PSS60α (διάμετρος 38,83 mm) και PSS58 1α (διάμετρος 35 mm) δεν ανήκουν σε καμία ομάδα και με στατιστικό έλεγχο t, προέκυψε ότι μεταξύ των μέσων όρων των των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης, υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές, καθώς  $P \text{ two-tail} < \alpha$ , όπου  $\alpha = 0,05$  (Πίνακας 74).

Πίνακας 67. Μέσοι όροι διαμέτρων ζωνών παρεμπόδισης των 15 απομονώσεων, παρουσία 30  $\mu\text{g}$  χλωραμφαινικόλης.

| 30 $\mu\text{g}$ χλωραμφαινικόλης |  |
|-----------------------------------|--|
| Απομόνωση                         | Μ.ο. διαμέτρου ζώνης παρεμπόδισης (mm) |
| PSS58 1α                          | 35                                     |
| PSS59α                            | 30,33333333                            |
| PSS60α                            | 38,83333333                            |
| PSS69 2α                          | 22,5                                   |
| PSS71 1α                          | 24                                     |
| PSS73α                            | 23                                     |
| PSS77 1α                          | 24,66666667                            |
| PSS86α                            | 42,66666667                            |
| PSS87α                            | 27,83333333                            |
| PSS94α                            | 26,16666667                            |
| PSS100α                           | 23,33333333                            |
| PSS102α                           | 28,5                                   |
| PSS103α                           | 44,5                                   |
| PSS104α                           | 29,5                                   |
| PSS113α                           | 44,33333333                            |

Πίνακας 68. Μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των 15 απομονώσεων, παρουσία 30  $\mu\text{g}$  χλωραμφαινικόλης.

| ANOVA               |          |    |          |          |          |         |
|---------------------|----------|----|----------|----------|----------|---------|
| Source of Variation | SS       | df | MS       | F        | P-value  | Fcrit   |
| Between Groups      | 2705,144 | 14 | 193,2246 | 90,10474 | 1,47E-20 | 2,03742 |
| Within Groups       | 64,33333 | 30 | 2,144444 |          |          |         |
| Total               | 2769,478 | 44 |          |          |          |         |

Πίνακας 69. Μέθοδος πολλαπλών συγκρίσεων με το κριτήριο Tukey μεταξύ των 15 απομονώσεων, για ποσότητα χλωραμφαινικόλης 30 μg. Ζεύγη που διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ( $q > q_{critical}$ ), σημειώνονται με πράσινο.

| q                            | PSS73α     | PSS59α      | PSS77 1α   | PSS60α   | PSS69 2α  | PSS71 1α  | PSS58 1α  | PSS86α   | PSS113α   | PSS87α   | PSS100α   | PSS103α   | PSS94α   | PSS102α    | PSS104α |
|------------------------------|------------|-------------|------------|----------|-----------|-----------|-----------|----------|-----------|----------|-----------|-----------|----------|------------|---------|
| PSS73α                       | x          |             |            |          |           |           |           |          |           |          |           |           |          |            |         |
| PSS59α                       | 8,673705 x |             |            |          |           |           |           |          |           |          |           |           |          |            |         |
| PSS77 1α                     | 1,971297   | 6,7024085 x |            |          |           |           |           |          |           |          |           |           |          |            |         |
| PSS60α                       | 18,72732   | 10,053613   | 16,75602 x |          |           |           |           |          |           |          |           |           |          |            |         |
| PSS69 2α                     | 0,591389   | 9,2650941   | 2,562686   | 19,319 x |           |           |           |          |           |          |           |           |          |            |         |
| PSS71 1α                     | 1,182778   | 7,4909272   | 0,788519   | 17,545   | 1,77417 x |           |           |          |           |          |           |           |          |            |         |
| PSS58 1α                     | 14,19334   | 5,5196305   | 12,22204   | 4,534    | 14,7847   | 13,0106 x |           |          |           |          |           |           |          |            |         |
| PSS86α                       | 23,2613    | 14,587595   | 21,29      | 4,534    | 23,8527   | 22,0785   | 9,06796 x |          |           |          |           |           |          |            |         |
| PSS113α                      | 25,2326    | 16,558892   | 23,2613    | 6,5053   | 25,824    | 24,0498   | 11,0393   | 1,9713 x |           |          |           |           |          |            |         |
| PSS87α                       | 5,71676    | 2,9569449   | 3,745464   | 13,011   | 6,30815   | 4,53398   | 8,47658   | 17,5445  | 19,5158 x |          |           |           |          |            |         |
| PSS100α                      | 0,394259   | 8,2794458   | 1,577037   | 18,333   | 0,98565   | 0,78852   | 13,7991   | 22,867   | 24,8383   | 5,3225 x |           |           |          |            |         |
| PSS103α                      | 25,42973   | 16,756021   | 23,45843   | 6,7024   | 26,0211   | 24,2469   | 11,2364   | 2,16843  | 0,19713   | 19,713   | 25,0355 x |           |          |            |         |
| PSS94α                       | 3,745464   | 4,9282415   | 1,774167   | 14,982   | 4,33685   | 2,56269   | 10,4479   | 19,5158  | 21,4871   | 1,9713   | 3,3512    | 21,6843 x |          |            |         |
| PSS102α                      | 6,505279   | 2,1684263   | 1,366588   | 12,222   | 7,09667   | 5,3225    | 7,68806   | 16,756   | 18,7273   | 0,7885   | 6,11102   | 18,9244   | 2,7598 x |            |         |
| PSS104α                      | 7,688057   | 0,9856483   | 1,414539   | 11,039   | 1,55075   | 6,50528   | 6,50528   | 15,5732  | 17,5445   | 1,9713   | 7,2938    | 17,7417   | 3,9426   | 1,182778 x |         |
| q <sub>critical</sub> =5,211 |            |             |            |          |           |           |           |          |           |          |           |           |          |            |         |

Πίνακας 70. Μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων PSS73α, PSS100α και PSS69 2α, παρουσία 30 μg χλωραμφαινικόλης.

| ANOVA               |          |    |          |          |          |          |
|---------------------|----------|----|----------|----------|----------|----------|
| Source of Variation | SS       | df | MS       | F        | P-value  | Fcrit    |
| Between Groups      | 1,055556 | 2  | 0,527778 | 0,271429 | 0,771172 | 5,143253 |
| Within Groups       | 11,66667 | 6  | 1,944444 |          |          |          |
| Total               | 12,72222 | 8  |          |          |          |          |

Πίνακας 71. Μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων PSS94α, PSS71 1α και PSS77 1α, παρουσία 30 μg χλωραμφαινικόλης.

| ANOVA               |          |    |          |     |          |          |
|---------------------|----------|----|----------|-----|----------|----------|
| Source of Variation | SS       | df | MS       | F   | P-value  | Fcrit    |
| Between Groups      | 7,388889 | 2  | 3,694444 | 3,8 | 0,085869 | 5,143253 |
| Within Groups       | 5,833333 | 6  | 0,972222 |     |          |          |
| Total               | 13,22222 | 8  |          |     |          |          |

Πίνακας 72. Μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων PSS59α, PSS87α, PSS102α και PSS104α, παρουσία 30 μg χλωραμφαινικόλης.

| ANOVA               |          |    |          |          |          |          |
|---------------------|----------|----|----------|----------|----------|----------|
| Source of Variation | SS       | df | MS       | F        | P-value  | Fcrit    |
| Between Groups      | 10,08333 | 3  | 3,361111 | 1,875969 | 0,212019 | 4,066181 |
| Within Groups       | 14,33333 | 8  | 1,791667 |          |          |          |
| Total               | 24,41667 | 11 |          |          |          |          |

Πίνακας 73. Μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων PSS86α, PSS113α και PSS103α, παρουσία 30 µg χλωραμφαινικόλης.

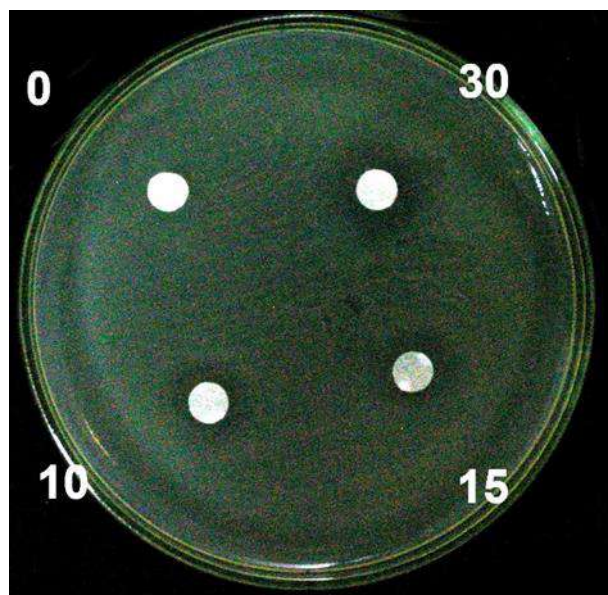
| ANOVA               |          |    |          |          |          |          |
|---------------------|----------|----|----------|----------|----------|----------|
| Source of Variation | SS       | df | MS       | F        | P-value  | Fcrit    |
| Between Groups      | 6,166667 | 2  | 3,083333 | 0,581152 | 0,587889 | 5,143253 |
| Within Groups       | 31,83333 | 6  | 5,305556 |          |          |          |
| Total               | 38       | 8  |          |          |          |          |

Πίνακας 74. Στατιστικός έλεγχος t των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων PSS60α και PSS58 1α, που προέκυψαν παρουσία 30 µg χλωραμφαινικόλης.

| t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances |          |          |
|---|----------|----------|
|   | PSS60α   | PSS58 1α |
| Mean  | 38,83333 | 35       |
| Variance                                      | 0,083333 | 0,25     |
| Observations                                  | 3        | 3        |
| Hypothesized Mean Difference                  | 0        |          |
| df  | 3        |          |
| t   | 11,5     |          |
| P(T<=t) one-tail                              | 0,000706 |          |
| t critical one-tail                           | 2,353363 |          |
| P(T<=t) two tail                              | 0,001411 |          |
| t critical two tail                           | 3,182446 |          |

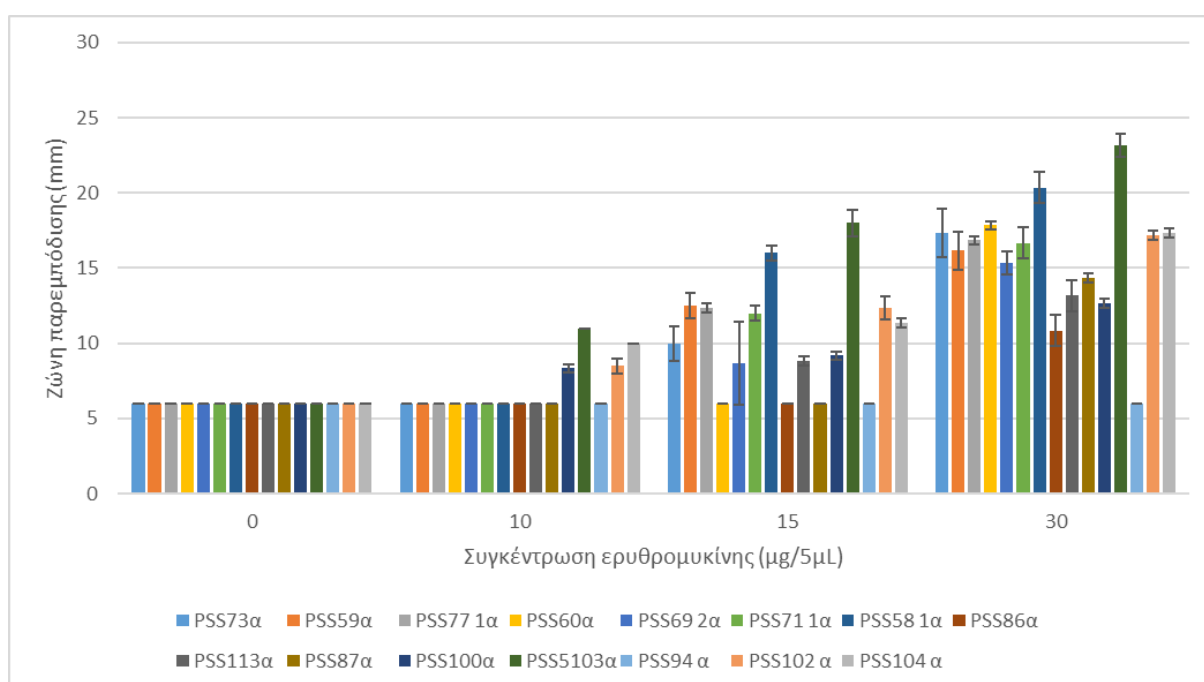
### 3.7.4 Έλεγχος ευαισθησίας απομονώσεων του βακτηρίου *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* στην ερυθρομυκίνη

Στο Διάγραμμα 7, παρουσιάζεται για την κάθε απομόνωση και ποσότητα ερυθρομυκίνης, ο μέσος όρος των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης που προέκυψε από τις τρεις επαναλήψεις και η αντίστοιχη τυπική απόκλιση. Για ποσότητα ερυθρομυκίνης 10 µg, κατά τον έλεγχο ευαισθησίας των απομονώσεων PSS73α, PSS59α, PSS77 1α, PSS60α, PSS69 2α, PSS71 1α, PSS58 1α, PSS86α, PSS113α, PSS87α και PSS94α, δεν δημιουργήθηκαν ζώνες παρεμπόδισης (6 mm). Απουσία ζωνών παρατηρήθηκε και για τις απομονώσεις PSS60α, PSS86α, PSS87α και PSS94α, στην ποσότητα 15 µg. Για ποσότητα στα δισκία 30 µg, ζώνη παρεμπόδισης σχηματίστηκε σε όλες οι απομονώσεις, εκτός από την PSS94α. Στην Εικόνα 19, παρουσιάζονται οι ζώνες παρεμπόδισης που σχηματίστηκαν κατά τον έλεγχο ευαισθησίας της απομόνωσης PSS100α στην ερυθρομυκίνη.



Εικόνα 19. Ζώνες παρεμπόδισης που σχηματίστηκαν για ποσότητες ερυθρομυκίνης 10, 15 και 30  $\mu\text{g}$ , κατά τον έλεγχο ευαισθησίας της απομόνωσης PSS100α στην ερυθρομυκίνη.

Διάγραμμα 7. Μέσος όρος διαμέτρων ζωνών παρεμπόδισης και τυπική απόκλιση των απομονώσεων του βακτηρίου PSS, που σχηματίστηκαν παρουσία 10  $\mu\text{g}$ , 15  $\mu\text{g}$  και 30  $\mu\text{g}$  ερυθρομυκίνης.



### 3.7.4.1 Έλεγχος ευαισθησίας απομονώσεων του βακτηρίου *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* σε ποσότητα ερυθρομυκίνης 10 $\mu\text{g}$

Στον Πίνακα 75, παρουσιάζεται ο μέσος όρος των ζωνών παρεμπόδισης των 15 απομονώσεων, για ποσότητα ερυθρομυκίνης 10  $\mu\text{g}$ . Με μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς, προέκυψε ότι μεταξύ των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των 15 απομονώσεων, υπάρχουν στατιστικά

σημαντικά διαφορές, καθώς  $F > F_{critical}$  (Πίνακας 76). Με μέθοδο πολλαπλών συγκρίσεων με το κριτήριο Tukey, βρέθηκαν τα ζεύγη των απομονώσεων στα οποία  $q > q_{critical}$ , δηλαδή διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους (Πίνακας 77) και στη συνέχεια οι απομονώσεις ομαδοποιήθηκαν. Οι απομονώσεις PSS73α, PSS59α, PSS77 1α, PSS60α, PSS69 2α, PSS71 1α, PSS58 1α, PSS86α, PSS113α, PSS87α και PSS94α ανήκουν στην πρώτη ομάδα (6 mm). Στη δεύτερη, με τις μικρότερες ζώνες παρεμπόδισης (διάμετρος 8,33-8,5 mm), ανήκουν οι απομονώσεις PSS100α και PSS102α, καθώς με στατιστικό έλεγχο t, προέκυψε ότι μεταξύ των μέσων όρων των ζωνών παρεμπόδισης, δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $P_{two-tail} > \alpha$ , όπου  $\alpha = 0,05$ ) (Πίνακας 78). Οι απομονώσεις PSS104α και PSS103α, με μέσο όρο διαμέτρων 10 και 11 mm αντίστοιχα, δεν ανήκουν σε καμία ομάδα και οι ζώνες παρεμπόδισης τους, σύμφωνα με τη μέθοδο πολλαπλών συγκρίσεων με το κριτήριο Tukey, διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους.

Πίνακας 75. Μέσοι όροι διαμέτρων ζωνών παρεμπόδισης των 15 απομονώσεων, παρουσία 10 μg ερυθρομυκίνης.

|           | 10 μg ερυθρομυκίνης                    |
|-----------|--|
| Απομόνωση | Μ.ο. διαμέτρου ζώνης παρεμπόδισης (mm) |
| PSS58 1α  | 6                                      |
| PSS59α    | 6                                      |
| PSS60α    | 6                                      |
| PSS69 2α  | 6                                      |
| PSS71 1α  | 6                                      |
| PSS73α    | 6                                      |
| PSS77 1α  | 6                                      |
| PSS86α    | 6                                      |
| PSS87α    | 6                                      |
| PSS94α    | 6                                      |
| PSS100α   | 8,333333333                            |
| PSS102α   | 8,5                                    |
| PSS103α   | 11                                     |
| PSS104α   | 10                                     |
| PSS113α   | 6                                      |

Πίνακας 76. Μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των 15 απομονώσεων, παρουσία 10 μg ερυθρομυκίνης.

| ANOVA               |          |    |          |          |          |         |
|---------------------|----------|----|----------|----------|----------|---------|
| Source of Variation | SS       | df | MS       | F        | P-value  | Fcrit   |
| Between Groups      | 119,8111 | 14 | 8,557937 | 385,1071 | 7,34E-30 | 2,03742 |
| Within Groups       | 0,666667 | 30 | 0,022222 |          |          |         |
| Total               | 120,4778 | 44 |          |          |          |         |

Πίνακας 77. Μέθοδος πολλαπλών συγκρίσεων με το κριτήριο Tukey μεταξύ των 15 απομονώσεων, για ποσότητα ερυθρομυκίνης 10 μg. Ζεύγη που διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ( $q > q_{critical}$ ), σημειώνονται με πράσινο.

| q                                 | PSS73α | PSS59α | PSS77 1α | PSS60α | PSS69 2α | PSS71 1α | PSS58 1α | PSS86α | PSS113α  | PSS87α  | PSS100α  | PSS103α | PSS94α | PSS102α | PSS104α |
|-----------------------------------|--------|--------|----------|--------|----------|----------|----------|--------|----------|---------|----------|---------|--------|---------|---------|
| PSS73α                            | x      |        |          |        |          |          |          |        |          |         |          |         |        |         |         |
| PSS59α                            |        | 0 x    |          |        |          |          |          |        |          |         |          |         |        |         |         |
| PSS77 1α                          |        |        | 0 x      |        |          |          |          |        |          |         |          |         |        |         |         |
| PSS60α                            |        |        |          | 0 x    |          |          |          |        |          |         |          |         |        |         |         |
| PSS69 2α                          |        |        |          |        | 0 x      |          |          |        |          |         |          |         |        |         |         |
| PSS71 1α                          |        |        |          |        |          | 0 x      |          |        |          |         |          |         |        |         |         |
| PSS58 1α                          |        |        |          |        |          |          | 0 x      |        |          |         |          |         |        |         |         |
| PSS86α                            |        |        |          |        |          |          |          | 0 x    |          |         |          |         |        |         |         |
| PSS113α                           |        |        |          |        |          |          |          |        | 0 x      |         |          |         |        |         |         |
| PSS87α                            |        |        |          |        |          |          |          |        |          | 0 x     |          |         |        |         |         |
| PSS100α                           | 27,111 | 27,111 | 27,11088 | 27,111 | 27,11088 | 27,1109  | 27,11088 | 27,111 | 27,11088 | 27,1109 | x        |         |        |         |         |
| PSS103α                           | 58,095 | 58,095 | 58,09475 | 58,095 | 58,09475 | 58,0948  | 58,09475 | 58,095 | 58,09475 | 58,0948 | 30,98387 | x       |        |         |         |
| PSS94α                            |        |        | 0        | 0      | 0        | 0        | 0        | 0      | 0        | 0       | 27,11088 | 58,0948 | x      |         |         |
| PSS102α                           | 29,047 | 29,047 | 29,04738 | 29,047 | 29,04738 | 29,0474  | 29,04738 | 29,047 | 29,04738 | 29,0474 | 1,936492 | 29,0474 | 29,047 | x       |         |
| PSS104α                           | 46,476 | 46,476 | 46,4758  | 46,476 | 46,4758  | 46,4758  | 46,4758  | 46,476 | 46,4758  | 46,4758 | 19,36492 | 11,619  | 46,476 | 17,4284 | x       |
| <b>q<sub>critical</sub>=5,211</b> |        |        |          |        |          |          |          |        |          |         |          |         |        |         |         |

Πίνακας 78. Στατιστικός έλεγχος t των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων PSS100α και PSS102α, που προέκυψαν παρουσία 10 μg ερυθρομυκίνης.

| t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances |          |         |
|---|----------|---------|
|   | PSS100α  | PSS102α |
| Mean  | 8,333333 | 8,5     |
| Variance                                      | 0,083333 | 0,25    |
| Observations                                  | 3        | 3       |
| Hypothesized Mean Difference                  | 0        |         |
| df  | 3        |         |
| t   | -0,5     |         |
| P(T<=t) one-tail                              | 0,325724 |         |
| t critical one-tail                           | 2,353363 |         |
| P(T<=t) two tail                              | 0,651448 |         |
| t critical two tail                           | 3,182446 |         |

### 3.7.4.2 Έλεγχος ευαισθησίας απομονώσεων του βακτηρίου *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* σε ποσότητα ερυθρομυκίνης 15 μg

Στον Πίνακα 79, παρουσιάζεται ο μέσος όρος των ζωνών παρεμπόδισης των 15 απομονώσεων, για ποσότητα ερυθρομυκίνης 15 μg. Με μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς, προέκυψε ότι μεταξύ των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των 15 απομονώσεων, υπάρχουν στατιστικά σημαντικά διαφορές, καθώς  $F > F_{critical}$  (Πίνακας 80). Με μέθοδο πολλαπλών συγκρίσεων με το κριτήριο Tukey, βρέθηκαν τα ζεύγη των απομονώσεων στα οποία  $q > q_{critical}$ , δηλαδή διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους (Πίνακας 81) και στη συνέχεια οι απομονώσεις ομαδοποιήθηκαν. Στην πρώτη ομάδα ανήκουν οι PSS60α, PSS86α, PSS87α και PSS94α (6 mm). Με μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς προέκυψε ότι στη δεύτερη ομάδα ανήκουν PSS73α, PSS69 2α, PSS113α και PSS100α που έχουν τις μικρότερες ζώνες παρεμπόδισης (διάμετρος 8,6-10 mm), καθώς προέκυψε ότι οι μέσοι όροι των διαμέτρων

των ζωνών παρεμπόδισης δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ( $F < F_{critical}$ ) (Πίνακας 82). Ομοίως, στην τρίτη βρέθηκε ότι ανήκουν οι PSS102α, PSS104α, PSS71 1α, PSS59α και PSS77 1α, με μέσο όρο παρεμπόδισης 11,3-12,3 mm (Πίνακας 83). Οι PSS58 1α και PSS103α δεν ανήκουν σε καμία ομάδα και με στατιστικό έλεγχο t προέκυψε ότι οι μέσοι όροι των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης (16 και 18 mm αντίστοιχα) διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους, καθώς  $P \text{ two-tail} < \alpha$ , όπου  $\alpha = 0,05$  (Πίνακας 84).

Πίνακας 79. Μέσοι όροι διαμέτρων ζωνών παρεμπόδισης των 15 απομονώσεων, παρουσία 15  $\mu\text{g}$  ερυθρομυκίνης.

|           | 15 $\mu\text{g}$ ερυθρομυκίνης         |
|-----------|--|
| Απομόνωση | Μ.ο. διαμέτρου ζώνης παρεμπόδισης (mm) |
| PSS58 1α  | 16                                     |
| PSS59α    | 12,5                                   |
| PSS60α    | 6                                      |
| PSS69 2α  | 8,666666667                            |
| PSS71 1α  | 12                                     |
| PSS73α    | 10                                     |
| PSS77 1α  | 12,33333333                            |
| PSS86α    | 6                                      |
| PSS87α    | 6                                      |
| PSS94α    | 6                                      |
| PSS100α   | 9,166666667                            |
| PSS102α   | 12,33333333                            |
| PSS103α   | 18                                     |
| PSS104α   | 11,33333333                            |
| PSS113α   | 8,833333333                            |

Πίνακας 80. Μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των 15 απομονώσεων, παρουσία 15  $\mu\text{g}$  ερυθρομυκίνης.

| ANOVA               |          |    |          |         |          |         |
|---------------------|----------|----|----------|---------|----------|---------|
| Source of Variation | SS       | df | MS       | F       | P-value  | Fcrit   |
| Between Groups      | 567,1333 | 14 | 40,50952 | 51,3501 | 4,73E-17 | 2,03742 |
| Within Groups       | 23,66667 | 30 | 0,788889 |         |          |         |
| Total               | 590,8    | 44 |          |         |          |         |

Πίνακας 81. Μέθοδος πολλαπλών συγκρίσεων με το κριτήριο Tukey μεταξύ των 15 απομονώσεων, για ποσότητα ερυθρομυκίνης 15 µg. Ζεύγη που διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ( $q > q_{critical}$ ), σημειώνονται με πράσινο.

| q               | PSS73α | PSS59α | PSS77 1α | PSS60α | PSS69 2α | PSS71 1α | PSS58 1α | PSS86α | PSS113α | PSS87α | PSS100α | PSS103α | PSS94α | PSS102α | PSS104α |
|-----------------|--------|--------|----------|--------|----------|----------|----------|--------|---------|--------|---------|---------|--------|---------|---------|
| PSS73α          | x      |        |          |        |          |          |          |        |         |        |         |         |        |         |         |
| PSS59α          | 4,8752 | x      |          |        |          |          |          |        |         |        |         |         |        |         |         |
| PSS77 1α        | 4,5502 | 0,325  | x        |        |          |          |          |        |         |        |         |         |        |         |         |
| PSS60α          | 7,8003 | 12,676 | 12,35051 | x      |          |          |          |        |         |        |         |         |        |         |         |
| PSS69 2α        | 2,6001 | 7,4753 | 7,150298 |        | 5,2002   | x        |          |        |         |        |         |         |        |         |         |
| PSS71 1α        | 3,9002 | 0,975  | 0,650027 |        | 11,7     | 6,50027  | x        |        |         |        |         |         |        |         |         |
| PSS58 1α        | 11,7   | 6,8253 | 7,150298 | 19,501 | 14,3006  | 7,800325 | x        |        |         |        |         |         |        |         |         |
| PSS86α          | 7,8003 | 12,676 | 12,35051 | 0      | 5,20022  | 11,70049 | 19,5008  | x      |         |        |         |         |        |         |         |
| PSS113α         | 2,2751 | 7,1503 | 6,825284 | 5,5252 | 0,32501  | 6,175257 | 13,9756  | 5,5252 | x       |        |         |         |        |         |         |
| PSS87α          | 7,8003 | 12,676 | 12,35051 | 0      | 5,20022  | 11,70049 | 19,5008  | 0      | 17,2257 | x      |         |         |        |         |         |
| PSS100α         | 1,6251 | 6,5003 | 6,175257 | 6,1753 | 0,97504  | 5,52523  | 13,3256  | 6,1753 | 0,65003 | 6,1753 | x       |         |        |         |         |
| PSS103α         | 15,601 | 10,725 | 11,05046 | 23,401 | 18,2008  | 11,70049 | 3,90016  | 23,401 | 17,8757 | 23,401 | 17,2257 | x       |        |         |         |
| PSS94α          | 7,8003 | 12,676 | 12,35051 | 0      | 5,20022  | 11,70049 | 19,5008  | 0      | 5,52523 | 0      | 6,17526 | 23,401  | x      |         |         |
| PSS102α         | 4,5502 | 0,325  | 0        | 12,351 | 7,1503   | 0,650027 | 7,1503   | 12,351 | 6,82528 | 12,351 | 6,17526 | 11,0505 | 12,351 | x       |         |
| PSS104α         | 2,6001 | 2,2751 | 1,950081 | 10,4   | 5,20022  | 1,300054 | 9,10038  | 10,4   | 4,8752  | 10,4   | 4,22518 | 13,0005 | 10,4   | 1,95008 | x       |
| qcritical=5,211 |        |        |          |        |          |          |          |        |         |        |         |         |        |         |         |

Πίνακας 82. Μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων PSS73α, PSS69 2α, PSS113α και PSS100α, παρουσία 15 µg ερυθρομυκίνης.

| ANOVA               |       |    |          |          |          |          |
|---------------------|-------|----|----------|----------|----------|----------|
| Source of Variation | SS    | df | MS       | F        | P-value  | Fcrit    |
| Between Groups      | 4,25  | 3  | 1,416667 | 0,328502 | 0,806342 | 6,591382 |
| Within Groups       | 17,25 | 4  | 4,3125   |          |          |          |
| Total               | 21,5  | 7  |          |          |          |          |

Πίνακας 83. Μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων PSS102α, PSS104α, PSS71 1α, PSS59α και PSS77 1α, παρουσία 15 µg ερυθρομυκίνης.

| ANOVA               |     |    |      |          |          |         |
|---------------------|-----|----|------|----------|----------|---------|
| Source of Variation | SS  | df | MS   | F        | P-value  | Fcrit   |
| Between Groups      | 2,6 | 4  | 0,65 | 1,857143 | 0,194713 | 3,47805 |
| Within Groups       | 3,5 | 10 | 0,35 |          |          |         |
| Total               | 6,1 | 14 |      |          |          |         |

Πίνακας 84. Στατιστικός έλεγχος t των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων PSS58 1α και PSS103α, που προέκυψαν παρουσία 15 µg ερυθρομυκίνης

| t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances |           |         |
|---|-----------|---------|
|   | PSS58 1α  | PSS103α |
| Mean  | 16        | 18      |
| Variance                                      | 0,25      | 0,75    |
| Observations                                  | 3         | 3       |
| Hypothesized Mean Difference                  | 0         |         |
| df  | 3         |         |
| t   | -3,464102 |         |
| P(T<=t) one-tail                              | 0,0202597 |         |
| t critical one-tail                           | 2,3533634 |         |
| P(T<=t) two tail                              | 0,0405193 |         |
| t critical two tail                           | 3,1824463 |         |



### 3.7.4.3 Έλεγχος ευαισθησίας απομονώσεων του βακτηρίου *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* σε ποσότητα ερυθρομυκίνης 30 μg

Στον Πίνακα 85, παρουσιάζεται ο μέσος όρος των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των 15 απομονώσεων, για ποσότητα ερυθρομυκίνης 30 μg. Με μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς, προέκυψε ότι μεταξύ των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των 15 απομονώσεων, υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές, καθώς  $F > F_{critical}$  (Πίνακας 86). Με μέθοδο πολλαπλών συγκρίσεων με το κριτήριο Tukey, βρέθηκαν τα ζεύγη των απομονώσεων στα οποία  $q > q_{critical}$ , δηλαδή διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους (Πίνακας 87) και στη συνέχεια οι απομονώσεις ομαδοποιήθηκαν. Η PSS94α δεν ανήκει σε καμία ομάδα (6 mm). Στην πρώτη ομάδα με στατιστικό έλεγχο t ( $P \text{ two-tail} > \alpha$ , όπου  $\alpha = 0,05$ ), βρέθηκε ότι ανήκουν οι PSS86α και PSS100α (Πίνακας 88), οι οποίες έχουν τις μικρότερες ζώνες παρεμπόδισης (διάμετρος 10,83 και 12,66 mm) και στη δεύτερη, με διάμετρο ζωνών 13,16-14,33 mm, οι PSS113α και PSS87α (Πίνακας 89). Στην τρίτη ανήκουν οι PSS69 2α, PSS73α, PSS59α, PSS77 1α, PSS60α, PSS71 1α, PSS102α και PSS104α (διάμετρος 15,33-17,83 mm), καθώς με μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς βρέθηκε ότι μεταξύ των μέσων όρων των ζωνών παρεμπόδισης δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $F < F_{critical}$ ) (Πίνακας 90). Με στατιστικό έλεγχο t βρέθηκε ότι οι μέσοι όροι των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των PSS58 1α και PSS103α, οι οποίοι ήταν και οι μεγαλύτεροι (20,33 και 23,16 mm αντίστοιχα), διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ( $P \text{ two-tail} < \alpha$ , όπου  $\alpha = 0,05$ ) (Πίνακας 91).

Πίνακας 85. Μέσοι όροι διαμέτρων ζωνών παρεμπόδισης των 15 απομονώσεων, παρουσία 30 μg ερυθρομυκίνης.

|           | 30 μg ερυθρομυκίνης                    |
|-----------|--|
| Απομόνωση | Μ.ο. διαμέτρου ζώνης παρεμπόδισης (mm) |
| PSS58 1α  | 20,33333333                            |
| PSS59α    | 16,16666667                            |
| PSS60α    | 17,83333333                            |
| PSS69 2α  | 15,33333333                            |
| PSS71 1α  | 16,66666667                            |
| PSS73α    | 17,33333333                            |
| PSS77 1α  | 16,83333333                            |
| PSS86α    | 10,83333333                            |
| PSS87α    | 14,33333333                            |
| PSS94α    | 6                                      |
| PSS100α   | 12,66666667                            |
| PSS102α   | 17,16666667                            |
| PSS103α   | 23,16666667                            |
| PSS104α   | 17,33333333                            |
| PSS113α   | 13,16666667                            |

Πίνακας 86. Μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των 15 απομονώσεων, παρουσία 30 µg ερυθρομυκίνης.

| ANOVA               |          |    |          |          |          |         |
|---------------------|----------|----|----------|----------|----------|---------|
| Source of Variation | SS       | df | MS       | F        | P-value  | Fcrit   |
| Between Groups      | 681,2444 | 14 | 48,66032 | 71,79391 | 3,93E-19 | 2,03742 |
| Within Groups       | 20,33333 | 30 | 0,677778 |          |          |         |
| Total               | 701,5778 | 44 |          |          |          |         |

Πίνακας 87. Μέθοδος πολλαπλών συγκρίσεων με το κριτήριο Tukey μεταξύ των 15 απομονώσεων, για ποσότητα ερυθρομυκίνης 30 µg. Ζεύγη που διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ( $q > q_{critical}$ ), σημειώνονται με πράσινο.

| q                            | PSS73α   | PSS59α    | PSS77 1α   | PSS60α   | PSS69 2α   | PSS71 1α  | PSS58 1α  | PSS86α  | PSS113α  | PSS87α   | PSS100α   | PSS103α   | PSS94α   | PSS102α   | PSS104α |
|------------------------------|----------|-----------|------------|----------|------------|-----------|-----------|---------|----------|----------|-----------|-----------|----------|-----------|---------|
| PSS73α                       | x        |           |            |          |            |           |           |         |          |          |           |           |          |           |         |
| PSS59α                       | 2,4545 x |           |            |          |            |           |           |         |          |          |           |           |          |           |         |
| PSS77 1α                     | 1,0519   | 1,40257 x |            |          |            |           |           |         |          |          |           |           |          |           |         |
| PSS60α                       | 1,0519   | 3,50643   | 2,103861 x |          |            |           |           |         |          |          |           |           |          |           |         |
| PSS69 2α                     | 4,2077   | 1,75322   | 3,155791   | 5,2597 x |            |           |           |         |          |          |           |           |          |           |         |
| PSS71 1α                     | 1,4026   | 1,05193   | 0,350643   | 2,4545   | 2,805147 x |           |           |         |          |          |           |           |          |           |         |
| PSS58 1α                     | 6,3116   | 8,76609   | 7,363512   | 5,2597   | 10,5193    | 7,71416 x |           |         |          |          |           |           |          |           |         |
| PSS86α                       | 13,675   | 11,2206   | 12,62316   | 14,727   | 9,467373   | 12,2725   | 19,9867 x |         |          |          |           |           |          |           |         |
| PSS113α                      | 8,7661   | 6,31158   | 7,714156   | 9,818    | 4,558365   | 7,36351   | 15,0777   | 4,909 x |          |          |           |           |          |           |         |
| PSS87α                       | 6,3116   | 3,85708   | 5,259652   | 7,3635   | 2,103861   | 4,90901   | 12,6232   | 7,3635  | 2,4545 x |          |           |           |          |           |         |
| PSS100α                      | 9,818    | 7,36351   | 8,766086   | 10,87    | 5,610295   | 8,41544   | 16,1296   | 3,8571  | 1,05193  | 3,5064 x |           |           |          |           |         |
| PSS103α                      | 12,273   | 14,727    | 13,32445   | 11,221   | 16,48024   | 13,6751   | 5,96094   | 25,948  | 21,0386  | 18,584   | 22,0905 x |           |          |           |         |
| PSS94α                       | 23,844   | 21,3892   | 22,79182   | 24,896   | 19,63603   | 22,4412   | 30,1553   | 10,169  | 15,0777  | 17,532   | 14,0257   | 36,1163 x |          |           |         |
| PSS102α                      | 0,3506   | 2,10386   | 0,701287   | 1,4026   | 3,857078   | 1,05193   | 6,66223   | 13,324  | 8,41544  | 5,9609   | 9,46737   | 12,6232   | 23,493 x |           |         |
| PSS104α                      | 0        | 2,4545    | 1,05193    | 1,0519   | 4,207721   | 1,40257   | 6,31158   | 13,675  | 8,76609  | 6,3116   | 9,81802   | 12,2725   | 23,844   | 0,35064 x |         |
| q <sub>critical</sub> =5,211 |          |           |            |          |            |           |           |         |          |          |           |           |          |           |         |

Πίνακας 88. Στατιστικός έλεγχος t των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων PSS100α και PSS86α, που προέκυψαν παρουσία 30 µg ερυθρομυκίνης.

| t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances |             |             |
|---|-------------|-------------|
|   | PSS100α     | PSS86α      |
| Mean  | 12,66666667 | 10,83333333 |
| Variance                                      | 0,083333333 | 1,083333333 |
| Observations                                  | 3           | 3           |
| Hypothesized Mean Difference                  | 0           |             |
| df  | 2           |             |
| t   | 2,939873661 |             |
| P(T<=t) one-tail                              | 0,049422444 |             |
| t critical one-tail                           | 2,91998558  |             |
| P(T<=t) two tail                              | 0,098844887 |             |
| t critical two tail                           | 4,30265273  |             |

Πίνακας 89. Στατιστικός έλεγχος t των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων PSS113α και PSS87α, που προέκυψαν παρουσία 30 μg ερυθρομυκίνης.

| t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances |             |             |
|---|-------------|-------------|
|   | PSS113α     | PSS87α      |
| Mean  | 13,16666667 | 14,33333333 |
| Variance                                      | 1,083333333 | 0,083333333 |
| Observations                                  | 3           | 3           |
| Hypothesized Mean Difference                  | 0           |             |
| df  | 2           |             |
| t   | -1,87082869 |             |
| P(T<=t) one-tail                              | 0,101137982 |             |
| t critical one-tail                           | 2,91998558  |             |
| P(T<=t) two tail                              | 0,202275965 |             |
| t critical two tail                           | 4,30265273  |             |

Πίνακας 90. Μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων PSS69 2α, PSS73α, PSS59α, PSS77 1α, PSS60α, PSS71 1α, PSS102α και PSS104α, παρουσία 30 μg ερυθρομυκίνης.

| ANOVA               |          |    |          |          |          |          |
|---------------------|----------|----|----------|----------|----------|----------|
| Source of Variation | SS       | df | MS       | F        | P-value  | Fcrit    |
| Between Groups      | 13       | 7  | 1,857143 | 2,409266 | 0,068861 | 2,657197 |
| Within Groups       | 12,33333 | 16 | 0,770833 |          |          |          |
| Total               | 25,33333 | 23 |          |          |          |          |

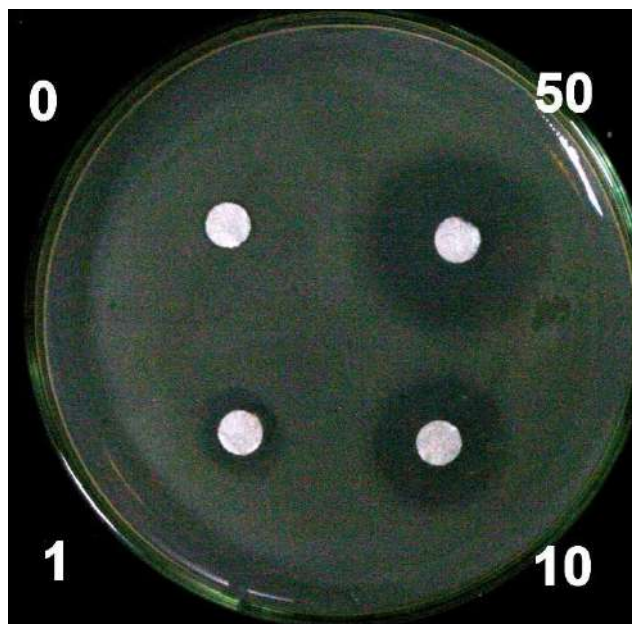
Πίνακας 91. Στατιστικός έλεγχος t των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων PSS58 1α και PSS103α, που προέκυψαν παρουσία 30 μg ερυθρομυκίνης.

| t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances |             |             |
|---|-------------|-------------|
|   | PSS58 1α    | PSS103α     |
| Mean  | 20,33333333 | 23,16666667 |
| Variance                                      | 1,083333333 | 0,583333333 |
| Observations                                  | 3           | 3           |
| Hypothesized Mean Difference                  | 0           |             |
| df  | 4           |             |
| t   | -3,8013156  |             |
| P(T<=t) one-tail                              | 0,00954103  |             |
| t critical one-tail                           | 2,13184679  |             |
| P(T<=t) two tail                              | 0,01908205  |             |
| t critical two tail                           | 2,77644511  |             |

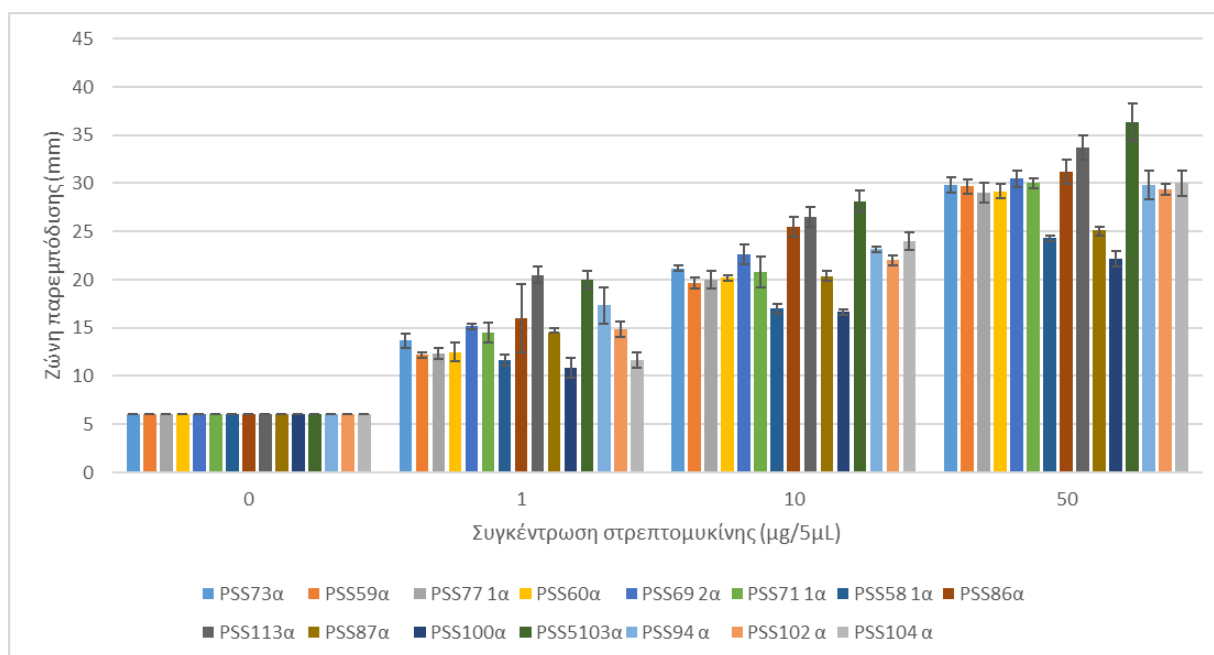
### 3.7.5 Έλεγχος ευαισθησίας απομονώσεων του βακτηρίου *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* στην στρεπτομυκίνη

Κατά τον έλεγχο ευαισθησίας των 15 απομονώσεων του βακτηρίου PSS στο αντιβιοτικό στρεπτομυκίνη, με τη μέθοδο διάχυσης σε άγαρ με τη χρήση δισκίων διηθητικού χαρτιού εμποτισμένων με στρεπτομυκίνη, δημιουργήθηκαν ζώνες παρεμπόδισης σε όλες τις συγκεντρώσεις από όλες τις απομονώσεις. Στην Εικόνα 20, παρουσιάζονται οι ζώνες παρεμπόδισης που σχηματίστηκαν για ποσότητες στρεπτομυκίνης 1, 10 και 50 µg, κατά τον έλεγχο ευαισθησίας της απομόνωσης PSS100α στην στρεπτομυκίνη. Στο Διάγραμμα 8, παρουσιάζεται για την κάθε απομόνωση και συγκέντρωση, ο μέσος όρος των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης που προέκυψε από τις τρεις επαναλήψεις και η αντίστοιχη τυπική απόκλιση.

Εικόνα 20. Ζώνες παρεμπόδισης που σχηματίστηκαν για ποσότητες στρεπτομυκίνης 1, 10 και 50 µg, κατά τον έλεγχο ευαισθησίας της απομόνωσης PSS100α στην στρεπτομυκίνη.



Διάγραμμα 8. Μέσος όρος των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης και τυπική απόκλιση των απομονώσεων του βακτηρίου PSS, που σχηματίστηκαν παρουσία 1 μg, 10 μg και 50 μg στρεπτομυκίνης.



### 3.7.5.1 Έλεγχος ευαισθησίας απομονώσεων του βακτηρίου *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* σε ποσότητα στρεπτομυκίνης 1 μg

Στον Πίνακα 92, παρουσιάζεται ο μέσος όρος των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των 15 απομονώσεων, για ποσότητα στρεπτομυκίνης 1 μg. Με μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς προέκυψε ότι μεταξύ των ζωνών παρεμπόδισης των 15 απομονώσεων, υπάρχουν στατιστικά σημαντικά διαφορές, καθώς  $F > F_{critical}$  (Πίνακας 93). Με μέθοδο πολλαπλών συγκρίσεων με το κριτήριο Tukey βρέθηκαν τα ζεύγη των απομονώσεων στα οποία  $q > q_{critical}$ , δηλαδή διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους (Πίνακας 94) και στη συνέχεια οι απομονώσεις ομαδοποιήθηκαν. Με Μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς προέκυψε ότι απομονώσεις PSS59α, PSS77 1α, PSS60α, PSS58 1α, PSS100α και PSS104α ανήκουν στη πρώτη ομάδα (Πίνακας 95), καθώς οι μέσοι όροι των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης (10,83-12,33 mm) δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ( $F > F_{critical}$ ). Ομοίως, βρέθηκε ότι στη δεύτερη, με μέσο όρο διαμέτρων ζωνών παρεμπόδισης 13,66-16mm, ανήκουν οι PSS73α, PSS69 2α, PSS71 1α, PSS86α, PSS87α και PSS102α (Πίνακας 96) και στη τρίτη οι PSS113α, PSS103α και PSS94α (Πίνακας 97), με τις μεγαλύτερες ζώνες παρεμπόδισης (διάμετρος 17,33-20,5 mm)

Πίνακας 92. Μέσοι όροι διαμέτρων ζωνών παρεμπόδισης των 15 απομονώσεων, παρουσία 1 µg στρεπτομυκίνης.

|           | 1 µg στρεπτομυκίνης                    |
|-----------|--|
| Απομόνωση | Μ.ο. διαμέτρου ζώνης παρεμπόδισης (mm) |
| PSS58 1α  | 11,66666667                            |
| PSS59α    | 12,16666667                            |
| PSS60α    | 12,5                                   |
| PSS69 2α  | 15,16666667                            |
| PSS71 1α  | 14,5                                   |
| PSS73α    | 13,66666667                            |
| PSS77 1α  | 12,33333333                            |
| PSS86α    | 16                                     |
| PSS87α    | 14,5                                   |
| PSS94α    | 17,33333333                            |
| PSS100α   | 10,83333333                            |
| PSS102α   | 14,83333333                            |
| PSS103α   | 20                                     |
| PSS104α   | 11,66666667                            |
| PSS113α   | 20,5                                   |

Πίνακας 93. Μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των 15 απομονώσεων, παρουσία 1 µg στρεπτομυκίνης.

| ANOVA               |          |    |          |          |          |         |
|---------------------|----------|----|----------|----------|----------|---------|
| Source of Variation | SS       | df | MS       | F        | P-value  | Fcrit   |
| Between Groups      | 364,2444 | 14 | 26,01746 | 16,78546 | 1,78E-10 | 2,03742 |
| Within Groups       | 46,5     | 30 | 1,55     |          |          |         |
| Total               | 410,7444 | 44 |          |          |          |         |

Πίνακας 94. Μέθοδος πολλαπλών συγκρίσεων με το κριτήριο Tukey μεταξύ των 15 απομονώσεων, για ποσότητα στρεπτομυκίνης 1 µg. Ζεύγη που διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ( $q > q_{critical}$ ), σημειώνονται με πράσινο.

| q                            | PSS73α | PSS59α  | PSS77 1α | PSS60α | PSS69 2α | PSS71 1α | PSS58 1α | PSS86α  | PSS113α | PSS87α | PSS100α | PSS103α | PSS94α | PSS102α | PSS104α |
|------------------------------|--------|---------|----------|--------|----------|----------|----------|---------|---------|--------|---------|---------|--------|---------|---------|
| PSS73α                       | x      |         |          |        |          |          |          |         |         |        |         |         |        |         |         |
| PSS59α                       | 2,0868 | x       |          |        |          |          |          |         |         |        |         |         |        |         |         |
| PSS77 1α                     | 1,855  | 0,23187 | x        |        |          |          |          |         |         |        |         |         |        |         |         |
| PSS60α                       | 1,6231 | 0,46374 | 0,23187  | x      |          |          |          |         |         |        |         |         |        |         |         |
| PSS69 2α                     | 2,0868 | 4,17365 | 3,94178  | 3,7099 | x        |          |          |         |         |        |         |         |        |         |         |
| PSS71 1α                     | 1,1593 | 3,24617 | 3,0143   | 2,7824 | 0,92748  | x        |          |         |         |        |         |         |        |         |         |
| PSS58 1α                     | 2,7824 | 0,69561 | 0,92748  | 1,1593 | 4,86926  | 3,94178  | x        |         |         |        |         |         |        |         |         |
| PSS86α                       | 3,2462 | 5,333   | 5,10113  | 4,8693 | 1,15935  | 2,086825 | 6,02861  | x       |         |        |         |         |        |         |         |
| PSS113α                      | 9,5066 | 11,5935 | 11,3616  | 11,13  | 7,41982  | 8,3473   | 12,2891  | 6,26048 | x       |        |         |         |        |         |         |
| PSS87α                       | 1,1593 | 3,24617 | 3,0143   | 2,7824 | 0,92748  | 0        | 3,94178  | 2,08683 | 8,3473  | x      |         |         |        |         |         |
| PSS100α                      | 3,9418 | 1,85496 | 2,08683  | 2,3187 | 6,02861  | 5,101128 | 1,15935  | 7,18795 | 13,4484 | 5,1011 | x       |         |        |         |         |
| PSS103α                      | 8,811  | 10,8979 | 10,666   | 10,434 | 6,72421  | 7,651692 | 11,5935  | 5,56487 | 0,69561 | 7,6517 | 12,7528 | x       |        |         |         |
| PSS94α                       | 5,1011 | 7,18795 | 6,95608  | 6,7242 | 3,0143   | 3,941781 | 7,88356  | 1,85496 | 4,40552 | 3,9418 | 9,04291 | 3,70991 | x      |         |         |
| PSS102α                      | 1,6231 | 3,70991 | 3,47804  | 3,2462 | 0,46374  | 0,463739 | 4,40552  | 1,62309 | 7,88356 | 0,4637 | 5,56487 | 7,18795 | 3,478  | x       |         |
| PSS104α                      | 2,7824 | 0,69561 | 0,92748  | 1,1593 | 4,86926  | 3,941781 | 0        | 6,02861 | 12,2891 | 3,9418 | 1,15935 | 11,5935 | 7,8836 | 4,40552 | x       |
| q <sub>critical</sub> =5,211 |        |         |          |        |          |          |          |         |         |        |         |         |        |         |         |

Πίνακας 95. Μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων PSS59α, PSS77 1α, PSS60α, PSS58 1α, PSS100α και PSS104α, παρουσία 1 μg στρεπτομυκίνης.

| ANOVA               |          |    |          |          |          |          |
|---------------------|----------|----|----------|----------|----------|----------|
| Source of Variation | SS       | df | MS       | F        | P-value  | Fcrit    |
| Between Groups      | 5,569444 | 5  | 1,113889 | 1,956098 | 0,158198 | 3,105875 |
| Within Groups       | 6,833333 | 12 | 0,569444 |          |          |          |
| Total               | 12,40278 | 17 |          |          |          |          |

Πίνακας 96. Μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων PSS73α, PSS69 2α, PSS71 1α, PSS86α, PSS87α και PSS102α, παρουσία 1 μg στρεπτομυκίνης.

| ANOVA               |          |    |          |          |          |          |
|---------------------|----------|----|----------|----------|----------|----------|
| Source of Variation | SS       | df | MS       | F        | P-value  | Fcrit    |
| Between Groups      | 9,111111 | 5  | 1,822222 | 0,741243 | 0,607266 | 3,105875 |
| Within Groups       | 29,5     | 12 | 2,458333 |          |          |          |
| Total               | 38,61111 | 17 |          |          |          |          |

Πίνακας 97. Μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων PSS113α, PSS103α και PSS94α, παρουσία 1 μg στρεπτομυκίνης.

| ANOVA               |          |    |          |          |          |          |
|---------------------|----------|----|----------|----------|----------|----------|
| Source of Variation | SS       | df | MS       | F        | P-value  | Fcrit    |
| Between Groups      | 17,38889 | 2  | 8,694444 | 5,131148 | 0,050224 | 5,143253 |
| Within Groups       | 10,16667 | 6  | 1,694444 |          |          |          |
| Total               | 27,55556 | 8  |          |          |          |          |

### 3.7.5.2 Έλεγχος ευαισθησίας απομονώσεων του βακτηρίου *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* σε ποσότητα στρεπτομυκίνης 10 μg

Στον Πίνακα 98, παρουσιάζεται ο μέσος όρος των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των 15 απομονώσεων, για ποσότητα στρεπτομυκίνης 10 μg. Με μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς προέκυψε ότι μεταξύ των ζωνών παρεμπόδισης των 15 απομονώσεων, υπάρχουν στατιστικά σημαντικά διαφορές, καθώς  $F > F_{critical}$  (Πίνακας 99). Με μέθοδο πολλαπλών συγκρίσεων με το κριτήριο Tukey, βρέθηκαν τα ζεύγη των απομονώσεων στα οποία  $q > q_{critical}$ , δηλαδή διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους (Πίνακας 100) και οι απομονώσεις ομαδοποιήθηκαν. Στην πρώτη ομάδα, με τις μικρότερες ζώνες παρεμπόδισης (16,66-17 mm), ανήκουν οι PSS58 1α και PSS100α, καθώς με στατιστικό έλεγχο t, προέκυψε ότι δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης τους ( $P_{two-tail} > \alpha$ , όπου  $\alpha = 0,05$ ) (Πίνακας 101). Οι απομονώσεις PSS73α, PSS71 1α, PSS59α,

PSS77 1α, PSS60α και PSS87α, με διάμετρο ζωνών 19,66-21,16 mm, όπως προέκυψε μετά από μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς ( $F < F_{critical}$ ) (Πίνακας 102) ανήκουν στη δεύτερη ομάδα. Ομοίως, βρέθηκε ότι στην τρίτη ομάδα ανήκουν οι PSS94α, PSS102α και PSS69 2α (διάμετρος ζώνης 22-23,16 mm) (Πίνακας 103). Με στατιστικό έλεγχο t, προέκυψε ότι στη τέταρτη ανήκουν οι PSS86α και PSS104α (Πίνακας 104), με διάμετρο ζωνών 24-25,5 mm και στη πέμπτη οι PSS113α και PSS103α (Πίνακας 105), καθώς δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης τους ( $P \text{ two-tail} > \alpha$ , όπου  $\alpha=0,05$ ). Οι PSS113α και PSS103α, έχουν τις μεγαλύτερες ζώνες παρεμπόδισης (διάμετρος 26,5 και 28,16 mm αντίστοιχα).

Πίνακας 98. Μέσοι όροι διαμέτρων ζωνών παρεμπόδισης των 15 απομονώσεων, παρουσία 10 μg στρεπτομυκίνης.

|           | 10 μg στρεπτομυκίνης                   |
|-----------|--|
| Απομόνωση | Μ.ο. διαμέτρου ζώνης παρεμπόδισης (mm) |
| PSS58 1α  | 17                                     |
| PSS59α    | 19,66666667                            |
| PSS60α    | 20,16666667                            |
| PSS69 2α  | 22,66666667                            |
| PSS71 1α  | 20,83333333                            |
| PSS73α    | 21,16666667                            |
| PSS77 1α  | 20                                     |
| PSS86α    | 25,5                                   |
| PSS87α    | 20,33333333                            |
| PSS94α    | 23,16666667                            |
| PSS100α   | 16,66666667                            |
| PSS102α   | 22                                     |
| PSS103α   | 28,16666667                            |
| PSS104α   | 24                                     |
| PSS113α   | 26,5                                   |

Πίνακας 99. Μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των 15 απομονώσεων, παρουσία 10 μg στρεπτομυκίνης.

| ANOVA               |          |    |          |          |          |         |
|---------------------|----------|----|----------|----------|----------|---------|
| Source of Variation | SS       | df | MS       | F        | P-value  | Fcrit   |
| Between Groups      | 441,3111 | 14 | 31,52222 | 48,49573 | 1,06E-16 | 2,03742 |
| Within Groups       | 19,5     | 30 | 0,65     |          |          |         |
| Total               | 460,8111 | 44 |          |          |          |         |



Πίνακας 100. Μέθοδος πολλαπλών συγκρίσεων με το κριτήριο Tukey μεταξύ των 15 απομονώσεων, για ποσότητα στρεπτομυκίνης 10 µg. Ζεύγη που διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ( $q > q_{critical}$ ), σημειώνονται με πράσινο.

| q                            | PSS73α    | PSS59α    | PSS77 1α   | PSS60α   | PSS69 2α   | PSS71 1α   | PSS58 1α   | PSS86α   | PSS113α    | PSS87α    | PSS100α  | PSS103α   | PSS94α   | PSS102α    | PSS104α |
|------------------------------|-----------|-----------|------------|----------|------------|------------|------------|----------|------------|-----------|----------|-----------|----------|------------|---------|
| PSS73α                       | x         |           |            |          |            |            |            |          |            |           |          |           |          |            |         |
| PSS59α                       | 3,22252 x |           |            |          |            |            |            |          |            |           |          |           |          |            |         |
| PSS77 1α                     | 2,5064    | 0,71611 x |            |          |            |            |            |          |            |           |          |           |          |            |         |
| PSS60α                       | 2,14834   | 1,07417   | 0,358057 x |          |            |            |            |          |            |           |          |           |          |            |         |
| PSS69 2α                     | 3,22252   | 2,5064    | 5,728919   | 5,3709 x |            |            |            |          |            |           |          |           |          |            |         |
| PSS71 1α                     | 0,71611   | 2,5064    | 1,790287   | 1,4322   | 3,938632 x |            |            |          |            |           |          |           |          |            |         |
| PSS58 1α                     | 8,95144   | 5,72892   | 6,445034   | 6,8031   | 12,17395   | 8,235321 x |            |          |            |           |          |           |          |            |         |
| PSS86α                       | 9,30949   | 12,532    | 11,8159    | 11,458   | 6,086976   | 10,02561   | 18,26093 x |          |            |           |          |           |          |            |         |
| PSS113α                      | 11,4578   | 14,6804   | 13,96424   | 13,606   | 8,235321   | 12,17395   | 20,40927   | 2,1483 x |            |           |          |           |          |            |         |
| PSS87α                       | 1,79029   | 1,43223   | 0,716115   | 0,3581   | 5,012804   | 1,074172   | 7,161149   | 11,1     | 13,24813 x |           |          |           |          |            |         |
| PSS100α                      | 9,66755   | 6,44503   | 7,161149   | 7,5192   | 12,89007   | 8,951436   | 0,716115   | 18,977   | 21,12539   | 7,87726 x |          |           |          |            |         |
| PSS103α                      | 15,0384   | 18,2609   | 17,54481   | 17,187   | 11,8159    | 15,75453   | 23,98985   | 5,7289   | 3,580574   | 16,8287   | 24,706 x |           |          |            |         |
| PSS94α                       | 4,29669   | 7,51921   | 6,803091   | 6,445    | 1,074172   | 5,012804   | 13,24813   | 5,0128   | 7,161149   | 6,08698   | 13,9642  | 10,7417 x |          |            |         |
| PSS102α                      | 1,79029   | 5,0128    | 4,296689   | 3,9386   | 1,43223    | 2,506402   | 10,74172   | 7,5192   | 9,667551   | 3,58057   | 11,4578  | 13,2481   | 2,5064 x |            |         |
| PSS104α                      | 6,08698   | 9,30949   | 8,593378   | 8,2353   | 2,864459   | 6,803091   | 15,03841   | 3,2225   | 5,370862   | 7,87726   | 15,7545  | 8,95144   | 1,7903   | 4,296689 x |         |
| q <sub>critical</sub> =5,211 |           |           |            |          |            |            |            |          |            |           |          |           |          |            |         |

Πίνακας 101. Στατιστικός έλεγχος t των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων PSS58 1α και PSS100α, που προέκυψαν παρουσία 10 µg στρεπτομυκίνης.

| t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances |          |              |
|---|----------|--------------|
|   | PSS58 1α | PSS100α      |
| Mean  | 17       | 16,66666667  |
| Variance                                      | 0,25     | 0,0833333333 |
| Observations                                  | 3        | 3            |
| Hypothesized Mean Difference                  | 0        |              |
| df  | 3        |              |
| t   | 1        |              |
| P(T<=t) one-tail                              | 0,195501 |              |
| t critical one-tail                           | 2,353363 |              |
| P(T<=t) two tail                              | 0,391002 |              |
| t critical two tail                           | 3,182446 |              |

Πίνακας 102. Μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων PSS73α, PSS71 1α, PSS59α, PSS77 1α, PSS60α και PSS87α, παρουσία 10 µg στρεπτομυκίνης.

| ANOVA               |          |    |          |       |          |          |
|---------------------|----------|----|----------|-------|----------|----------|
| Source of Variation | SS       | df | MS       | F     | P-value  | Fcrit    |
| Between Groups      | 4,569444 | 5  | 0,913889 | 1,316 | 0,321119 | 3,105875 |
| Within Groups       | 8,333333 | 12 | 0,694444 |       |          |          |
| Total               | 12,90278 | 17 |          |       |          |          |

Πίνακας 103. Μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων PSS94α, PSS102α και PSS69 2α, παρουσία 10 μg στρεπτομυκίνης.

| ANOVA               |          |    |          |          |          |          |
|---------------------|----------|----|----------|----------|----------|----------|
| Source of Variation | SS       | df | MS       | F        | P-value  | Fcrit    |
| Between Groups      | 2,055556 | 2  | 1,027778 | 2,176471 | 0,194654 | 5,143253 |
| Within Groups       | 2,833333 | 6  | 0,472222 |          |          |          |
| Total               | 4,888889 | 8  |          |          |          |          |

Πίνακας 104. Στατιστικός έλεγχος t των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων PSS86α και PSS104α, που προέκυψαν παρουσία 10 μg στρεπτομυκίνης.

| t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances |          |         |
|---|----------|---------|
|   | PSS86α   | PSS104α |
| Mean  | 25,5     | 24      |
| Variance                                      | 1        | 0,75    |
| Observations                                  | 3        | 3       |
| Hypothesized Mean Difference                  | 0        |         |
| df  | 4        |         |
| t   | 1,963961 |         |
| P(T<=t) one-tail                              | 0,060502 |         |
| t critical one-tail                           | 2,131847 |         |
| P(T<=t) two tail                              | 0,121004 |         |
| t critical two tail                           | 2,776445 |         |

Πίνακας 105. Στατιστικός έλεγχος t των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων PSS113α και PSS103α, που προέκυψαν παρουσία 10 μg στρεπτομυκίνης.

| t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances |          |             |
|---|----------|-------------|
|   | PSS113α  | PSS103α     |
| Mean  | 26,5     | 28,1666667  |
| Variance                                      | 1        | 1,083333333 |
| Observations                                  | 3        | 3           |
| Hypothesized Mean Difference                  | 0        |             |
| df  | 4        |             |
| t   | -2       |             |
| P(T<=t) one-tail                              | 0,058058 |             |
| t critical one-tail                           | 2,131847 |             |
| P(T<=t) two tail                              | 0,116117 |             |
| t critical two tail                           | 2,776445 |             |

### 3.7.5.3 Έλεγχος ευαισθησίας απομονώσεων του βακτηρίου *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* σε ποσότητα στρεπτομυκίνης 50 μg

Στον Πίνακα 106, παρουσιάζεται ο μέσος όρος των ζωνών παρεμπόδισης των 15 απομονώσεων, για ποσότητα στρεπτομυκίνης 50 μg. Με μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς, προέκυψε ότι μεταξύ των ζωνών παρεμπόδισης των 15 απομονώσεων, υπάρχουν

στατιστικά σημαντικά διαφορές, καθώς  $F > F_{critical}$  (Πίνακας 107). Με μέθοδο πολλαπλών συγκρίσεων με το κριτήριο Tukey, βρέθηκαν τα ζεύγη των απομονώσεων στα οποία  $q > q_{critical}$ , δηλαδή διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους (Πίνακας 108) και στη συνέχεια οι απομονώσεις ομαδοποιήθηκαν. Οι απομονώσεις PSS58 1α, PSS87α και PSS100α, δεν ανήκουν σε καμία ομάδα και με στατιστικό έλεγχο t προέκυψε ότι οι μέσοι όροι των ζωνών παρεμπόδισης για τα ζεύγη PSS58 1α, PSS87α (Πίνακας 109) και PSS58 1α, PSS100α (Πίνακας 110) διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ( $q < q_{critical}$ ). Στην πρώτη ομάδα, με μέσο όρων διαμέτρων ζωνών παρεμπόδισης 29,33-31,16 mm, ανήκουν οι PSS73α, PSS59α, PSS77 1α, PSS60α, PSS69 2α, PSS71 1α, PSS86α, PSS94α, PSS102α και PSS104α καθώς με μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς, προέκυψε ότι μεταξύ των ζωνών παρεμπόδισης, δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $F < F_{critical}$ ) (Πίνακας 111). Στη δεύτερη ομάδα ανήκουν οι PSS113α και PSS103α, αφού με στατιστικό έλεγχο t βρέθηκε ότι μεταξύ των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης (33,66 και 36,33 mm αντίστοιχα) δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $q > q_{critical}$ ) (Πίνακας 112).

Πίνακας 106. Μέσοι όροι διαμέτρων ζωνών παρεμπόδισης των 15 απομονώσεων, παρουσία 50 µg στρεπτομυκίνης.

| 50 µg στρεπτομυκίνης |  |
|----------------------|--|
| Απομόνωση            | Μ.ο. διαμέτρου ζώνης παρεμπόδισης (mm) |
| PSS58 1α             | 24,33333333                            |
| PSS59α               | 29,66666667                            |
| PSS60α               | 29,16666667                            |
| PSS69 2α             | 30,5                                   |
| PSS71 1α             | 30                                     |
| PSS73α               | 29,83333333                            |
| PSS77 1α             | 29                                     |
| PSS86α               | 31,16666667                            |
| PSS87α               | 25,16666667                            |
| PSS94α               | 29,83333333                            |
| PSS100α              | 22,16666667                            |
| PSS102α              | 29,33333333                            |
| PSS103α              | 36,33333333                            |
| PSS104α              | 30                                     |
| PSS113α              | 33,66666667                            |

Πίνακας 107. Μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των 15 απομονώσεων, παρουσία 50 µg στρεπτομυκίνης.

| ANOVA               |          |    |          |          |          |         |
|---------------------|----------|----|----------|----------|----------|---------|
| Source of Variation | SS       | df | MS       | F        | P-value  | Fcrit   |
| Between Groups      | 503,5778 | 14 | 35,96984 | 34,99768 | 1,02E-14 | 2,03742 |
| Within Groups       | 30,83333 | 30 | 1,027778 |          |          |         |
| Total               | 534,4111 | 44 |          |          |          |         |

Πίνακας 108. Μέθοδος πολλαπλών συγκρίσεων με το κριτήριο Tukey μεταξύ των 15 απομονώσεων, για ποσότητα στρεπτομυκίνης 50 µg. Ζεύγη που διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ( $q > q_{critical}$ ), σημειώνονται με πράσινο.

| q               | PSS73α    | PSS59α    | PSS77 1α   | PSS60α  | PSS69 2α   | PSS71 1α   | PSS58 1α   | PSS86α   | PSS113α    | PSS87α    | PSS100α   | PSS103α   | PSS94α   | PSS102α   | PSS104α |
|-----------------|-----------|-----------|------------|---------|------------|------------|------------|----------|------------|-----------|-----------|-----------|----------|-----------|---------|
| PSS73α          | x         |           |            |         |            |            |            |          |            |           |           |           |          |           |         |
| PSS59α          | 0,28475 x |           |            |         |            |            |            |          |            |           |           |           |          |           |         |
| PSS77 1α        | 1,42374   | 1,13899 x |            |         |            |            |            |          |            |           |           |           |          |           |         |
| PSS60α          | 1,13899   | 0,85424   | 0,284747 x |         |            |            |            |          |            |           |           |           |          |           |         |
| PSS69 2α        | 1,13899   | 1,42374   | 2,562727   | 2,278 x |            |            |            |          |            |           |           |           |          |           |         |
| PSS71 1α        | 0,28475   | 0,56949   | 1,708484   | 1,4237  | 0,854242 x |            |            |          |            |           |           |           |          |           |         |
| PSS58 1α        | 9,39666   | 9,11192   | 7,972927   | 8,2577  | 10,53565   | 9,681412 x |            |          |            |           |           |           |          |           |         |
| PSS86α          | 2,27798   | 2,56273   | 3,701716   | 3,417   | 1,13899    | 1,993232   | 11,67464 x |          |            |           |           |           |          |           |         |
| PSS113α         | 6,54919   | 6,83394   | 7,972927   | 7,6882  | 5,410201   | 6,264443   | 15,94585   | 4,2712 x |            |           |           |           |          |           |         |
| PSS87α          | 7,97293   | 7,68818   | 6,54919    | 6,8339  | 9,111917   | 8,257675   | 1,423737   | 10,251   | 14,52212 x |           |           |           |          |           |         |
| PSS100α         | 13,0984   | 12,8136   | 11,67464   | 11,959  | 14,23737   | 13,38313   | 3,701716   | 15,376   | 19,64757   | 5,12545 x |           |           |          |           |         |
| PSS103α         | 11,1051   | 11,3899   | 12,52889   | 12,244  | 9,966159   | 10,8204    | 20,50181   | 8,8272   | 4,555958   | 19,0781   | 24,2035 x |           |          |           |         |
| PSS94α          | 0         | 0,28475   | 1,423737   | 1,139   | 1,13899    | 0,284747   | 9,396664   | 2,278    | 6,54919    | 7,97293   | 13,0984   | 11,1051 x |          |           |         |
| PSS102α         | 0,85424   | 0,56949   | 0,569495   | 0,2847  | 1,993232   | 1,13899    | 8,542422   | 3,1322   | 7,403432   | 7,11868   | 12,2441   | 11,9594   | 0,8542 x |           |         |
| PSS104α         | 0,28475   | 0,56949   | 1,708484   | 1,4237  | 0,854242   | 0          | 9,681412   | 1,9932   | 6,264443   | 8,25767   | 13,3831   | 10,8204   | 0,2847   | 1,13899 x |         |
| qcritical=5,211 |           |           |            |         |            |            |            |          |            |           |           |           |          |           |         |

Πίνακας 109. Στατιστικός έλεγχος t των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων PSS58 1α και PSS87α, που προέκυψαν παρουσία 50 µg στρεπτομυκίνης.

| t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances |          |              |
|---|----------|--------------|
|   | PSS58 1α | PSS100α      |
| Mean  | 24,33333 | 22,16666667  |
| Variance                                      | 0,083333 | 0,5833333333 |
| Observations                                  | 3        | 3            |
| Hypothesized Mean Difference                  | 0        |              |
| df  | 3        |              |
| t   | 4,596194 |              |
| P(T<=t) one-tail                              | 0,009678 |              |
| t critical one-tail                           | 2,353363 |              |
| P(T<=t) two tail                              | 0,019356 |              |
| t critical two tail                           | 3,182446 |              |

Πίνακας 110. Στατιστικός έλεγχος t των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων PSS58 1α και PSS100α, που προέκυψαν παρουσία 50 μg στρεπτομυκίνης.

| t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances |          |             |
|---|----------|-------------|
|   | PSS58 1α | PSS87α      |
| Mean  | 24,33333 | 25,16666667 |
| Variance                                      | 0,083333 | 0,083333333 |
| Observations                                  | 3        | 3           |
| Hypothesized Mean Difference                  | 0        |             |
| df  | 4        |             |
| t   | -3,53553 |             |
| P(T<=t) one-tail                              | 0,012055 |             |
| t critical one-tail                           | 2,131847 |             |
| P(T<=t) two tail                              | 0,02411  |             |
| t critical two tail                           | 2,776445 |             |

Πίνακας 111. Μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων PSS73α, PSS59α, PSS77 1α, PSS60α, PSS69 2α, PSS71 1α, PSS86α, PSS94α, PSS102α και PSS104α, παρουσία 50 μg στρεπτομυκίνης.

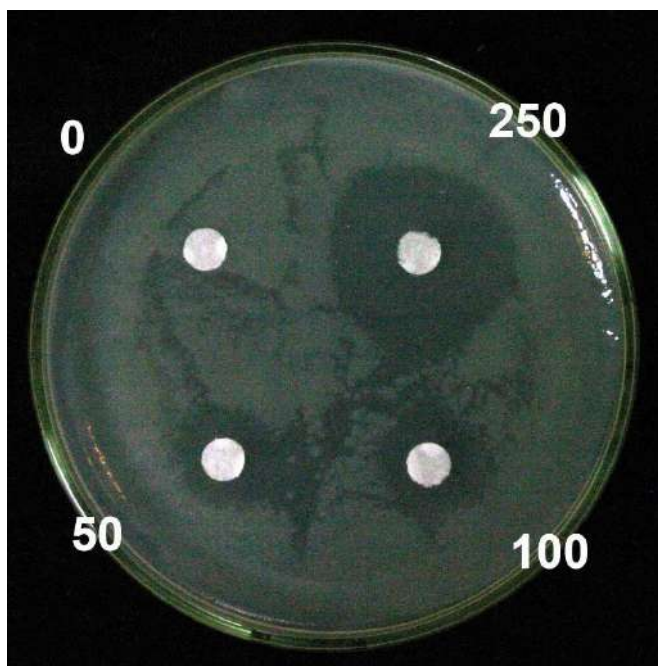
| ANOVA               |        |    |          |          |          |          |
|---------------------|--------|----|----------|----------|----------|----------|
| Source of Variation | SS     | df | MS       | F        | P-value  | Fcrit    |
| Between Groups      | 11,075 | 9  | 1,230556 | 1,295322 | 0,299151 | 2,392814 |
| Within Groups       | 19     | 20 | 0,95     |          |          |          |
| Total               | 30,075 | 29 |          |          |          |          |

Πίνακας 112. Στατιστικός έλεγχος t των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων PSS103α και PSS113α, που προέκυψαν παρουσία 50 μg στρεπτομυκίνης.

| t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances |          |             |
|---|----------|-------------|
|   | PSS103α  | PSS113α     |
| Mean  | 36,33333 | 33,66666667 |
| Variance                                      | 3,583333 | 1,583333333 |
| Observations                                  | 3        | 3           |
| Hypothesized Mean Difference                  | 0        |             |
| df  | 3        |             |
| t   | 2,032002 |             |
| P(T<=t) one-tail                              | 0,067542 |             |
| t critical one-tail                           | 2,353363 |             |
| P(T<=t) two tail                              | 0,135083 |             |
| t critical two tail                           | 3,182446 |             |

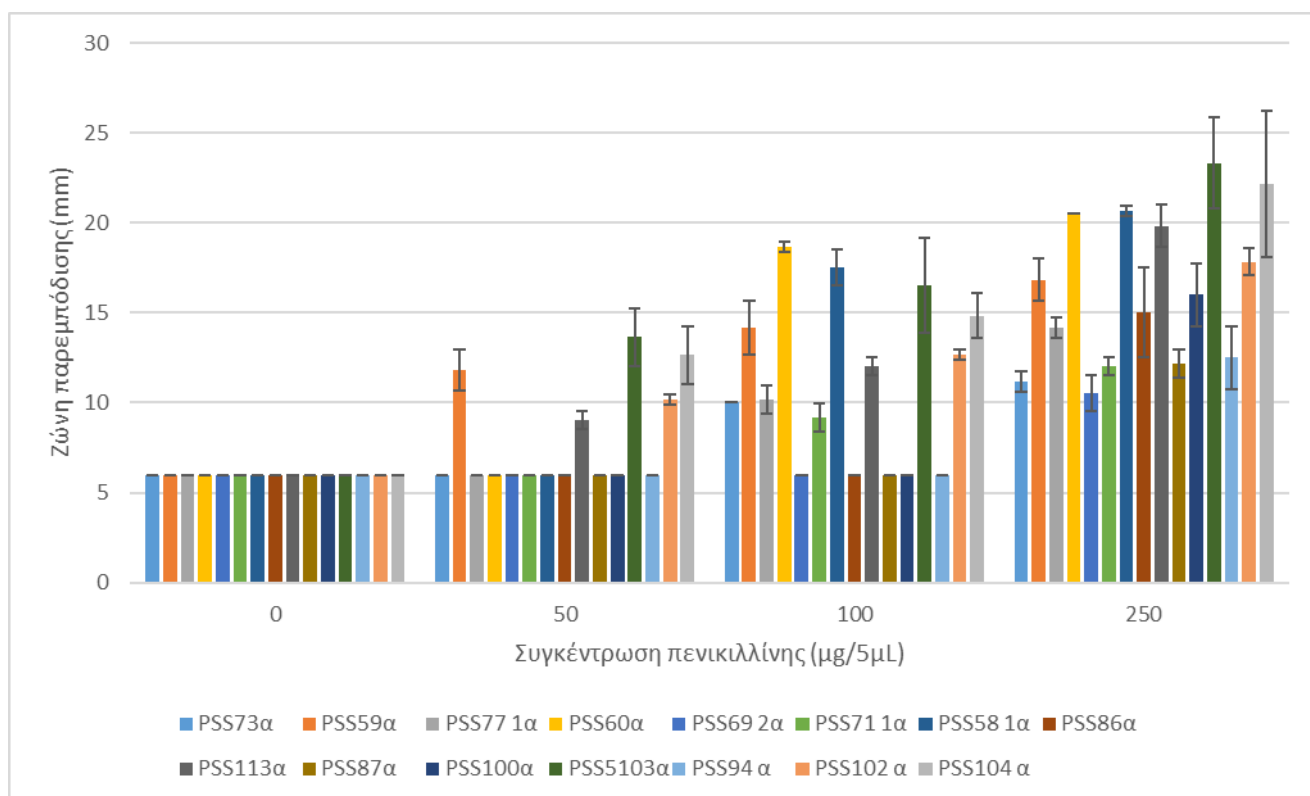
### 3.7.6 Έλεγχος ευαισθησίας απομονώσεων του βακτηρίου *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* στην πενικιλίνη

Στο Διάγραμμα 9, παρουσιάζεται για την κάθε απομόνωση και ποσότητα πενικιλίνης, ο μέσος όρος των ζωνών παρεμπόδισης που προέκυψε από τις τρεις επαναλήψεις και η αντίστοιχη τυπική απόκλιση. Για ποσότητα πενικιλίνης 50 μg, κατά τον έλεγχο ευαισθησίας των απομονώσεων PSS73α, PSS77 1α, PSS60α, PSS69 2α, PSS71 1α, PSS58 1α, PSS86α, PSS87α, PSS100α και PSS94α, δεν δημιουργήθηκαν ζώνες παρεμπόδισης. Απουσία ζωνών παρατηρήθηκε και για τις απομονώσεις PSS69 2α, PSS86α, PSS87α, PSS100α και PSS94α στην ποσότητα 100 μg. Παρουσία 250 μg πενικιλίνης στα δισκία, ζώνη παρεμπόδισης σχηματίστηκε σε όλες οι απομονώσεις. Στην Εικόνα 21, παρουσιάζονται οι ζώνες παρεμπόδισης που σχηματίστηκαν για ποσότητες πενικιλίνης 50, 100 και 250 μg, κατά τον έλεγχο ευαισθησίας της απομόνωσης PSS104α στην πενικιλίνη



Εικόνα 21. Ζώνες παρεμπόδισης που σχηματίστηκαν για ποσότητες πενικιλίνης 50, 100 και 250 μg, κατά τον έλεγχο ευαισθησίας της απομόνωσης PSS104α στην πενικιλίνη.

Διάγραμμα 9. Μέσος όρος των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης και τυπική απόκλιση των απομονώσεων του βακτηρίου PSS, που σχηματίστηκαν παρουσία 50, 100 μg και 250 μg πενικιλίνης.



### 3.7.6.1 Έλεγχος ευαισθησίας απομονώσεων του βακτηρίου *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* σε ποσότητα πενικιλίνης 50 μg

Στον Πίνακα 113, παρουσιάζεται ο μέσος όρος των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των 15 απομονώσεων, για ποσότητα πενικιλίνης 50 μg. Με μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς, προέκυψε ότι μεταξύ των ζωνών παρεμπόδισης των 15 απομονώσεων, υπάρχουν στατιστικά σημαντικά διαφορές, καθώς  $F > F_{critical}$  (Πίνακας 114). Με μέθοδο πολλαπλών συγκρίσεων με το κριτήριο Tukey, βρέθηκαν τα ζεύγη των απομονώσεων στα οποία  $q > q_{critical}$ , δηλαδή διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους (Πίνακας 115) και στη συνέχεια οι απομονώσεις ομαδοποιήθηκαν. Οι απομονώσεις PSS73α, PSS77 1α, PSS60α, PSS69 2α, PSS71 1α, PSS58 1α, PSS86α, PSS87α, PSS100α και PSS94α ανήκουν στην πρώτη ομάδα, λόγω απουσίας σχηματισμού ζώνης παρεμπόδισης. Η PSS113α, με τη μικρότερη ζώνη παρεμπόδισης (διάμετρος 9 mm) δεν ανήκει σε καμία ομάδα. Στη δεύτερη ομάδα, με μέσο όρο διαμέτρων ζωνών παρεμπόδισης 10,16-13,66 mm, μετά από μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς  $F > F_{critical}$  (Πίνακας 116), βρέθηκε ότι ανήκουν οι PSS59α, PSS102α, PSS103α και PSS104α.

Πίνακας 113. Μέσοι όροι διαμέτρων ζωνών παρεμπόδισης των 15 απομονώσεων, παρουσία 50 µg πενικιλίνης.

|           | 50 µg πενικιλίνης                      |
|-----------|--|
| Απομόνωση | Μ.ο. διαμέτρου ζώνης παρεμπόδισης (mm) |
| PSS58 1α  | 6                                      |
| PSS59α    | 11,83333333                            |
| PSS60α    | 6                                      |
| PSS69 2α  | 6                                      |
| PSS71 1α  | 6                                      |
| PSS73α    | 6                                      |
| PSS77 1α  | 6                                      |
| PSS86α    | 6                                      |
| PSS87α    | 6                                      |
| PSS94α    | 6                                      |
| PSS100α   | 6                                      |
| PSS102α   | 10,16666667                            |
| PSS103α   | 13,66666667                            |
| PSS104α   | 12,66666667                            |
| PSS113α   | 9                                      |

Πίνακας 114. Μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των 15 απομονώσεων, παρουσία 50 µg πενικιλίνης.

| ANOVA               |          |    |          |          |          |         |
|---------------------|----------|----|----------|----------|----------|---------|
| Source of Variation | SS       | df | MS       | F        | P-value  | Fcrit   |
| Between Groups      | 341,4111 | 14 | 24,38651 | 53,53136 | 2,62E-17 | 2,03742 |
| Within Groups       | 13,66667 | 30 | 0,455556 |          |          |         |
| Total               | 355,0778 | 44 |          |          |          |         |

Πίνακας 115. Μέθοδος πολλαπλών συγκρίσεων με το κριτήριο Tukey μεταξύ των 15 απομονώσεων, για ποσότητα πενικιλίνης 50 µg. Ζεύγη που διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ( $q > q_{critical}$ ), σημειώνονται με πράσινο.

| q               | PSS73α   | PSS59α   | PSS77 1α | PSS60α   | PSS69 2α    | PSS71 1α | PSS58 1α | PSS86α   | PSS113α  | PSS87α   | PSS100α  | PSS103α  | PSS94α   | PSS102α  | PSS104α |
|-----------------|----------|----------|----------|----------|-------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|---------|
| PSS73α          | x        |          |          |          |             |          |          |          |          |          |          |          |          |          |         |
| PSS59α          | 14,96948 | x        |          |          |             |          |          |          |          |          |          |          |          |          |         |
| PSS77 1α        | 0        | 14,96948 | x        |          |             |          |          |          |          |          |          |          |          |          |         |
| PSS60α          | 0        | 14,96948 |          | 0        | x           |          |          |          |          |          |          |          |          |          |         |
| PSS69 2α        | 0        | 14,96948 |          | 0        |             | 0        | x        |          |          |          |          |          |          |          |         |
| PSS71 1α        | 0        | 14,96948 |          | 0        |             | 0        |          | 0        | x        |          |          |          |          |          |         |
| PSS58 1α        | 0        | 14,96948 |          | 0        |             | 0        |          | 0        |          | 0        | x        |          |          |          |         |
| PSS86α          | 0        | 14,96948 |          | 0        |             | 0        |          | 0        |          | 0        |          | 0        | x        |          |         |
| PSS113α         | 7,69859  | 7,270891 | 7,69859  | 7,69859  | 7,698590305 | 7,69859  | 7,69859  | 7,69859  | x        |          |          |          |          |          |         |
| PSS87α          | 0        | 14,96948 |          | 0        |             | 0        |          | 0        |          | 7,69859  | x        |          |          |          |         |
| PSS100α         | 0        | 14,96948 |          | 0        |             | 0        |          | 0        |          | 7,69859  | 2,566197 | x        |          |          |         |
| PSS103α         | 19,67418 | 4,704694 | 19,67418 | 19,67418 | 19,67417522 | 19,67418 | 19,67418 | 19,67418 | 11,97558 | 19,67418 | 19,67418 | x        |          |          |         |
| PSS94α          | 0        | 14,96948 |          | 0        |             | 0        |          | 0        |          | 7,69859  |          | 0        | 19,67418 | x        |         |
| PSS102α         | 10,69249 | 4,276995 | 10,69249 | 10,69249 | 10,69248653 | 10,69249 | 10,69249 | 10,69249 | 2,993896 | 10,69249 | 10,69249 | 8,981689 | 10,69249 | x        |         |
| PSS104α         | 17,10798 | 2,138497 | 17,10798 | 17,10798 | 17,10797846 | 17,10798 | 17,10798 | 17,10798 | 9,409388 | 17,10798 | 17,10798 | 2,566197 | 17,10798 | 6,415492 | x       |
| qcritical=5,211 |          |          |          |          |             |          |          |          |          |          |          |          |          |          |         |



Πίνακας 116. Μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων PSS59α, PSS102α, PSS103α και PSS104α, παρουσία 50 μg πενικιλίνης.

| ANOVA               |          |    |          |   |          |          |
|---------------------|----------|----|----------|---|----------|----------|
| Source of Variation | SS       | df | MS       | F | P-value  | Fcrit    |
| Between Groups      | 19,75    | 3  | 6,583333 | 4 | 0,051894 | 4,066181 |
| Within Groups       | 13,16667 | 8  | 1,645833 |   |          |          |
| Total               | 32,91667 | 11 |          |   |          |          |

### 3.7.6.2 Έλεγχος ευαισθησίας απομονώσεων του βακτηρίου *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* σε ποσότητα πενικιλίνης 100 μg

Στον Πίνακα 117, παρουσιάζεται ο μέσος όρος των ζωνών παρεμπόδισης των 15 απομονώσεων, για ποσότητα πενικιλίνης 100 μg. Με μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς, προέκυψε ότι μεταξύ των ζωνών παρεμπόδισης των 15 απομονώσεων, υπάρχουν στατιστικά σημαντικά διαφορές, καθώς  $F > F_{critical}$  (Πίνακας 118). Με μέθοδο πολλαπλών συγκρίσεων με το κριτήριο Tukey, βρέθηκαν τα ζεύγη των απομονώσεων στα οποία  $q > q_{critical}$ , δηλαδή διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους (Πίνακας 119) και στη συνέχεια οι απομονώσεις ομαδοποιήθηκαν. Οι απομονώσεις PSS69 2α, PSS86α, PSS87α, PSS100α και PSS94α ανήκουν στην πρώτη ομάδα, αφού δεν σχηματίστηκαν ζώνες παρεμπόδισης. Στη δεύτερη, με μέσο όρο διαμέτρων ζωνών παρεμπόδισης 9,16-10,16 mm ανήκουν οι PSS73α, PSS77 1α και PSS71 1α, καθώς με μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς, προέκυψε ότι μεταξύ των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης, δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $F < F_{critical}$ ) (Πίνακας 120). Στη τρίτη ομάδα, με διάμετρο 12-12,66 mm, ανήκουν οι PSS102α και PSS113α και στην τέταρτη, με διάμετρο 14,16 και 14,83 mm, οι PSS59α και PSS104α, αφού με στατιστικό έλεγχο t βρέθηκε ότι μεταξύ των μέσων όρων των ζωνών παρεμπόδισης του κάθε ζεύγους, δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $q > q_{critical}$ ) (Πίνακας 121, Πίνακας 122). Στη πέμπτη, με μέσο όρο διαμέτρων ζωνών παρεμπόδισης 16,5-18,66 mm ανήκουν οι PSS60α, PSS58 1α και PSS103α, καθώς με μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς, προέκυψε ότι μεταξύ των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης, δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $F < F_{critical}$ ) (Πίνακας 123)

Πίνακας 117. Μέσοι όροι διαμέτρων ζωνών παρεμπόδισης των 15 απομονώσεων, παρουσία 100 µg πενικιλίνης.

|           | 100 µg πενικιλίνης                     |
|-----------|--|
| Απομόνωση | Μ.ο. διαμέτρου ζώνης παρεμπόδισης (mm) |
| PSS58 1α  | 17,5                                   |
| PSS59α    | 14,16666667                            |
| PSS60α    | 18,66666667                            |
| PSS69 2α  | 6                                      |
| PSS71 1α  | 9,16666667                             |
| PSS73α    | 10                                     |
| PSS77 1α  | 10,16666667                            |
| PSS86α    | 6                                      |
| PSS87α    | 6                                      |
| PSS94α    | 6                                      |
| PSS100α   | 6                                      |
| PSS102α   | 12,66666667                            |
| PSS103α   | 16,5                                   |
| PSS104α   | 14,83333333                            |
| PSS113α   | 12                                     |

Πίνακας 118. Μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των 15 απομονώσεων, παρουσία 100 µg πενικιλίνης.

| ANOVA               |          |    |          |          |          |         |
|---------------------|----------|----|----------|----------|----------|---------|
| Source of Variation | SS       | df | MS       | F        | P-value  | Fcrit   |
| Between Groups      | 869,4111 | 14 | 62,10079 | 69,00088 | 6,96E-19 | 2,03742 |
| Within Groups       | 27       | 30 | 0,9      |          |          |         |
| Total               | 896,4111 | 44 |          |          |          |         |

Πίνακας 119. Μέθοδος πολλαπλών συγκρίσεων με το κριτήριο Tukey μεταξύ των 15 απομονώσεων, για ποσότητα πενικιλίνης 100 µg. Ζεύγη που διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ( $q > q_{critical}$ ), σημειώνονται με πράσινο.

| q               | PSS73α     | PSS59α     | PSS77 1α   | PSS60α     | PSS69 2α   | PSS71 1α   | PSS58 1α   | PSS86α     | PSS113α    | PSS87α   | PSS100α    | PSS103α    | PSS94α     | PSS102α    | PSS104α |
|-----------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|----------|------------|------------|------------|------------|---------|
| PSS73α          | x          |            |            |            |            |            |            |            |            |          |            |            |            |            |         |
| PSS59α          | 7,607258 x |            |            |            |            |            |            |            |            |          |            |            |            |            |         |
| PSS77 1α        | 0,30429    | 7,302967 x |            |            |            |            |            |            |            |          |            |            |            |            |         |
| PSS60α          | 15,8231    | 8,215838   | 15,51881 x |            |            |            |            |            |            |          |            |            |            |            |         |
| PSS69 2α        | 7,302967   | 14,91023   | 7,607258   | 23,12606 x |            |            |            |            |            |          |            |            |            |            |         |
| PSS71 1α        | 1,521452   | 9,128709   | 1,825742   | 17,34455   | 5,781516 x |            |            |            |            |          |            |            |            |            |         |
| PSS58 1α        | 13,69306   | 6,085806   | 13,38877   | 2,130032   | 20,99603   | 15,21452 x |            |            |            |          |            |            |            |            |         |
| PSS86α          | 7,302967   | 14,91023   | 7,607258   | 23,12606   | 0          | 5,781516   | 20,99603 x |            |            |          |            |            |            |            |         |
| PSS113α         | 3,651484   | 3,955774   | 3,347193   | 12,17161   | 10,95445   | 5,172935   | 10,04158   | 10,95445 x |            |          |            |            |            |            |         |
| PSS87α          | 7,302967   | 14,91023   | 7,607258   | 23,12606   | 0          | 5,781516   | 20,99603   | 0          | 10,95445 x |          |            |            |            |            |         |
| PSS100α         | 7,302967   | 14,91023   | 7,607258   | 23,12606   | 0          | 5,781516   | 20,99603   | 0          | 10,95445   | 0 x      |            |            |            |            |         |
| PSS103α         | 11,86732   | 4,260064   | 11,56303   | 3,955774   | 19,17029   | 13,38877   | 1,825742   | 19,17029   | 8,215838   | 19,17029 | 19,17029 x |            |            |            |         |
| PSS94α          | 7,302967   | 14,91023   | 7,607258   | 23,12606   | 0          | 5,781516   | 20,99603   | 0          | 10,95445   | 0        | 0          | 19,17029 x |            |            |         |
| PSS102α         | 4,868645   | 2,738613   | 4,564355   | 10,95445   | 12,17161   | 6,390097   | 8,824419   | 12,17161   | 1,217161   | 12,17161 | 12,17161   | 6,998677   | 12,17161 x |            |         |
| PSS104α         | 8,824419   | 1,217161   | 8,520129   | 6,998677   | 16,12739   | 10,34587   | 4,868645   | 16,12739   | 5,172935   | 16,12739 | 16,12739   | 3,042903   | 16,12739   | 3,955774 x |         |
| qcritical=5,211 |            |            |            |            |            |            |            |            |            |          |            |            |            |            |         |

Πίνακας 120. Μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων PSS73α, PSS77 1α και PSS71 1α, παρουσία 100 µg πενικιλίνης.

| ANOVA               |          |    |          |          |          |          |
|---------------------|----------|----|----------|----------|----------|----------|
| Source of Variation | SS       | df | MS       | F        | P-value  | Fcrit    |
| Between Groups      | 1,722222 | 2  | 0,861111 | 2,214286 | 0,190449 | 5,143253 |
| Within Groups       | 2,333333 | 6  | 0,388889 |          |          |          |
| Total               | 4,055556 | 8  |          |          |          |          |

Πίνακας 121. Στατιστικός έλεγχος t των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων PSS102α και PSS113α, που προέκυψαν παρουσία 100 µg πενικιλίνης.

| t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances |           |         |
|---|-----------|---------|
|   | PSS102α   | PSS113α |
| Mean  | 12,666667 | 12      |
| Variance                                      | 0,0833333 | 0,25    |
| Observations                                  | 3         | 3       |
| Hypothesized Mean Difference                  | 0         |         |
| df  | 3         |         |
| t   | 2         |         |
| P(T<=t) one-tail                              | 0,069663  |         |
| t critical one-tail                           | 2,3533634 |         |
| P(T<=t) two tail                              | 0,139326  |         |
| t critical two tail                           | 3,1824463 |         |

Πίνακας 122. Στατιστικός έλεγχος t των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων PSS59α και PSS104α, που προέκυψαν παρουσία 100 µg πενικιλίνης.

| t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances |             |             |
|---|-------------|-------------|
|   | PSS59α      | PSS104α     |
| Mean  | 14,1666667  | 14,83333333 |
| Variance                                      | 2,333333333 | 1,583333333 |
| Observations                                  | 3           | 3           |
| Hypothesized Mean Difference                  | 0           |             |
| df  | 4           |             |
| t   | -0,58345997 |             |
| P(T<=t) one-tail                              | 0,295449282 |             |
| t critical one-tail                           | 2,131846786 |             |
| P(T<=t) two tail                              | 0,590898564 |             |
| t critical two tail                           | 2,776445105 |             |

Πίνακας 123. Μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων PSS60α, PSS58 1α και PSS103α, παρουσία 100 µg πενικιλίνης.

| ANOVA               |          |    |          |          |          |          |
|---------------------|----------|----|----------|----------|----------|----------|
| Source of Variation | SS       | df | MS       | F        | P-value  | Fcrit    |
| Between Groups      | 7,055556 | 2  | 3,527778 | 1,309278 | 0,337404 | 5,143253 |
| Within Groups       | 16,16667 | 6  | 2,694444 |          |          |          |
| Total               | 23,22222 | 8  |          |          |          |          |

### 3.7.6.3 Έλεγχος ευαισθησίας απομονώσεων του βακτηρίου *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* σε ποσότητα πενικιλίνης 250 µg

Στον Πίνακα 124, παρουσιάζεται ο μέσος όρος των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των 15 απομονώσεων, για ποσότητα πενικιλίνης 250 µg. Με μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς προέκυψε ότι μεταξύ των ζωνών παρεμπόδισης των 15 απομονώσεων, υπάρχουν στατιστικά σημαντικά διαφορές, καθώς  $F > F_{critical}$  (Πίνακας 125). Με μέθοδο πολλαπλών συγκρίσεων με το κριτήριο Tukey, βρέθηκαν τα ζεύγη των απομονώσεων στα οποία  $q > q_{critical}$ , δηλαδή διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους (Πίνακας 126) και στη συνέχεια οι απομονώσεις ομαδοποιήθηκαν. Στην πρώτη ομάδα ανήκουν οι PSS73α, PSS69 2α, PSS71 1α, PSS94α και PSS87α, με μέσο όρο διαμέτρων ζωνών παρεμπόδισης 10,5-12,5 mm, στη δεύτερη οι PSS77 1α, PSS86α, PSS59α, PSS100α και PSS102α (διάμετρος 14,16-17,8 mm) και στην τρίτη οι PSS104α, PSS103α, PSS113α, PSS58 1α και PSS60α (διάμετρος 19,83-23,3 mm), καθώς με μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς μεταξύ των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης προέκυψε ότι δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $F < F_{critical}$ ) (Πίνακας 127, Πίνακας 128, Πίνακας 129)

Πίνακας 124. Μέσοι όροι διαμέτρων ζωνών παρεμπόδισης των 15 απομονώσεων, παρουσία 250 µg πενικιλίνης.

|           | 250 µg πενικιλίνης                     |
|-----------|--|
| Απομόνωση | Μ.ο. διαμέτρου ζώνης παρεμπόδισης (mm) |
| PSS58 1α  | 20,66666667                            |
| PSS59α    | 16,83333333                            |
| PSS60α    | 20,5                                   |
| PSS69 2α  | 10,5                                   |
| PSS71 1α  | 12                                     |
| PSS73α    | 11,16666667                            |
| PSS77 1α  | 14,16666667                            |
| PSS86α    | 15                                     |
| PSS87α    | 12,16666667                            |
| PSS94α    | 12,5                                   |
| PSS100α   | 16                                     |
| PSS102α   | 17,83333333                            |
| PSS103α   | 23,33333333                            |
| PSS104α   | 22,16666667                            |
| PSS113α   | 19,83333333                            |

Πίνακας 125. Μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των 15 απομονώσεων, παρουσία 250 µg πενικιλίνης.

| ANOVA               |          |    |          |          |         |         |
|---------------------|----------|----|----------|----------|---------|---------|
| Source of Variation | SS       | df | MS       | F        | P-value | Fcrit   |
| Between Groups      | 756,1444 | 14 | 54,01032 | 19,75987 | 2,2E-11 | 2,03742 |
| Within Groups       | 82       | 30 | 2,733333 |          |         |         |
| Total               | 838,1444 | 44 |          |          |         |         |

Πίνακας 126. Μέθοδος πολλαπλών συγκρίσεων με το κριτήριο Tukey μεταξύ των 15 απομονώσεων, για ποσότητα πενικιλίνης 250 µg. Ζεύγη που διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ( $q > q_{critical}$ ), σημειώνονται με πράσινο.

| q                            | PSS73α     | PSS59α     | PSS77 1α   | PSS60α     | PSS69 2α   | PSS71 1α   | PSS58 1α   | PSS86α    | PSS113α    | PSS87α     | PSS100α    | PSS103α    | PSS94α     | PSS102α    | PSS104α |
|------------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|---------|
| PSS73α                       | x          |            |            |            |            |            |            |           |            |            |            |            |            |            |         |
| PSS59α                       | 5,936658 x |            |            |            |            |            |            |           |            |            |            |            |            |            |         |
| PSS77 1α                     | 3,142936   | 2,793721 x |            |            |            |            |            |           |            |            |            |            |            |            |         |
| PSS60α                       | 9,778024   | 3,841367   | 6,635088 x |            |            |            |            |           |            |            |            |            |            |            |         |
| PSS69 2α                     | 0,69843    | 6,635088   | 3,841367   | 10,47645 x |            |            |            |           |            |            |            |            |            |            |         |
| PSS71 1α                     | 0,873038   | 5,06362    | 2,269898   | 8,904986   | 1,571468 x |            |            |           |            |            |            |            |            |            |         |
| PSS58 1α                     | 9,952632   | 4,015974   | 6,809695   | 0,174608   | 10,65106   | 9,079594 x |            |           |            |            |            |            |            |            |         |
| PSS86α                       | 4,015974   | 1,920683   | 0,873038   | 5,76205    | 4,714404   | 3,142936   | 5,936658 x |           |            |            |            |            |            |            |         |
| PSS113α                      | 9,079594   | 3,142936   | 5,936658   | 0,69843    | 9,778024   | 8,206556   | 0,873038   | 5,06362 x |            |            |            |            |            |            |         |
| PSS87α                       | 1,047645   | 4,889012   | 2,095291   | 8,730379   | 1,746076   | 0,174608   | 8,904986   | 2,968329  | 8,031948 x |            |            |            |            |            |         |
| PSS100α                      | 5,06362    | 0,873038   | 1,920683   | 4,714404   | 5,76205    | 4,190582   | 4,889012   | 1,047645  | 4,015974   | 4,015974 x |            |            |            |            |         |
| PSS103α                      | 12,74635   | 6,809695   | 9,603417   | 2,968329   | 13,44478   | 11,87332   | 2,793721   | 8,730379  | 3,666759   | 11,69871   | 7,682733 x |            |            |            |         |
| PSS94α                       | 1,396861   | 4,539797   | 1,746076   | 8,381164   | 2,095291   | 0,523823   | 8,555771   | 2,619114  | 7,682733   | 0,349215   | 3,666759   | 11,34949 x |            |            |         |
| PSS102α                      | 6,984303   | 1,047645   | 3,841367   | 2,793721   | 7,682733   | 6,111265   | 2,968329   | 2,968329  | 2,095291   | 5,936658   | 1,920683   | 5,76205    | 5,587442 x |            |         |
| PSS104α                      | 11,5241    | 5,587442   | 8,381164   | 1,746076   | 12,22253   | 10,65106   | 1,571468   | 7,508126  | 2,444506   | 10,47645   | 6,46048    | 1,222253   | 10,12724   | 4,539797 x |         |
| q <sub>critical</sub> =5,211 |            |            |            |            |            |            |            |           |            |            |            |            |            |            |         |

Πίνακας 127. Μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων PSS73α, PSS69 2α, PSS71 1α, PSS94α και PSS87α,, παρουσία 250 µg πενικιλίνης.

| ANOVA               |          |    |          |          |          |         |
|---------------------|----------|----|----------|----------|----------|---------|
| Source of Variation | SS       | df | MS       | F        | P-value  | Fcrit   |
| Between Groups      | 8        | 4  | 2        | 1,935484 | 0,180997 | 3,47805 |
| Within Groups       | 10,33333 | 10 | 1,033333 |          |          |         |
| Total               | 18,33333 | 14 |          |          |          |         |

Πίνακας 128. Μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων PSS77 1α, PSS86α, PSS59α, PSS100α και PSS102α, παρουσία 250 µg πενικιλίνης.

| ANOVA               |          |    |          |          |          |         |
|---------------------|----------|----|----------|----------|----------|---------|
| Source of Variation | SS       | df | MS       | F        | P-value  | Fcrit   |
| Between Groups      | 25,23333 | 4  | 6,308333 | 2,742754 | 0,089146 | 3,47805 |
| Within Groups       | 23       | 10 | 2,3      |          |          |         |
| Total               | 48,23333 | 14 |          |          |          |         |

Πίνακας 129. Μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς των μέσων όρων των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων PSS104α, PSS103α, PSS113α, PSS58 1α και PSS60α, παρουσία 250 µg πενικιλίνης.

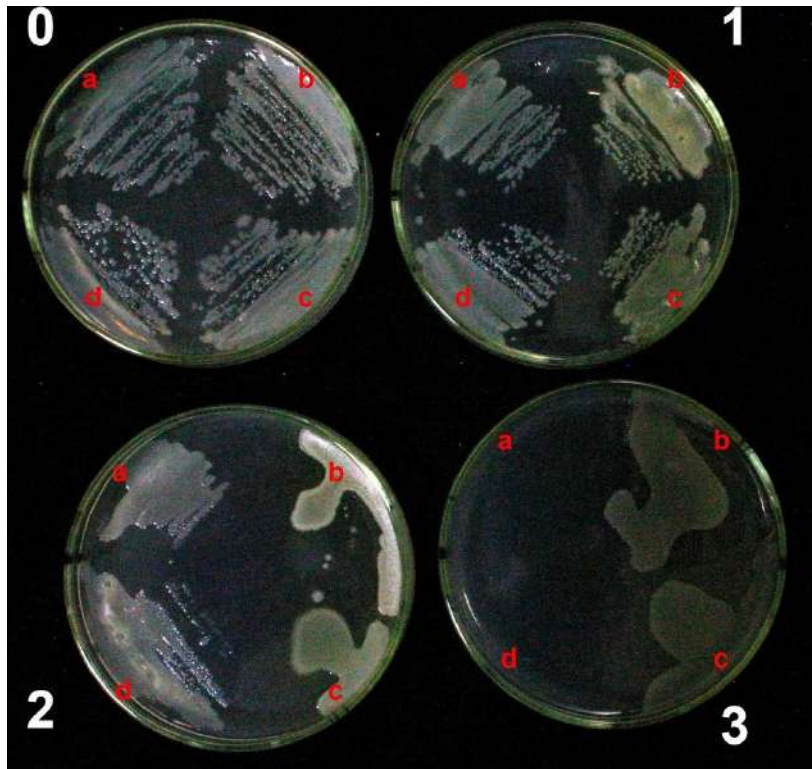
| ANOVA                      |           |           |           |          |                |              |
|----------------------------|-----------|-----------|-----------|----------|----------------|--------------|
| <i>Source of Variation</i> | <i>SS</i> | <i>df</i> | <i>MS</i> | <i>F</i> | <i>P-value</i> | <i>Fcrit</i> |
| Between Groups             | 24,23333  | 4         | 6,058333  | 1,244863 | 0,352975       | 3,47805      |
| Within Groups              | 48,66667  | 10        | 4,866667  |          |                |              |
| Total                      | 72,9      | 14        |           |          |                |              |

### 3.8 Δοκιμές *in vitro* για τον καθορισμό ευαισθησίας απομονωθέντων βακτηρίων στο χαλκό

Στον Πίνακα 130, συνοψίζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τον έλεγχο ευαισθησίας των 20 απομονώσεων του βακτηρίου PSS στο θεϊκό χαλκό. Στη μικρότερη συγκέντρωση Cu (29,99 ppm), όλες οι απομονώσεις εκτός από τις PSS60α και PSS58 1α, αναπτύχθηκαν κανονικά. Στις απομονώσεις PSS60α και PSS58 1α παρατηρήθηκε μικρή ανάπτυξη. Στα 44,48 ppm Cu, η απομόνωση PSS58 1 α δεν αναπτύχθηκε καθόλου, ενώ οι απομονώσεις PSS114α, PSS113α και PSS60α, αναπτύχθηκαν ελάχιστα. Οι υπόλοιπες απομονώσεις αναπτύχθηκαν κανονικά. Για συγκέντρωση Cu 99,34 ppm, ελάχιστη ανάπτυξη παρατηρήθηκε στις απομονώσεις PSS59α και PSS103α, ενώ καθόλου ανάπτυξη στις PSS114α, PSS113α, PSS60α, PSS58 1α και PSS104 α. Οι υπόλοιπες αναπτύχθηκαν κανονικά. Στην Εικόνα 22, παρουσιάζεται η ανάπτυξη των απομονώσεων PSS114 α, PSS113α, PSS86α και PSS71 1α, απουσία χαλκού στο θρεπτικό υπόστρωμα και για συγκεντρώσεις χαλκού 29,99 ppm, 44,48 ppm, 99,34 ppm.

Πίνακας 130. Ανάπτυξη απομονώσεων του βακτηρίου PSS σε 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις Cu.

| Απομονώσεις          | Συγκέντρωση Cu |           |           |           |
|----------------------|----------------|-----------|-----------|-----------|
|                      | 0 ppm          | 29,99 ppm | 44,48 ppm | 99,34 ppm |
| PSS52α               | +              | +         | +         | +         |
| PSS54 2α             | +              | +         | +         | +         |
| PSS58 1α             | +              | *         | -         | -         |
| PSS59α               | +              | +         | +         | *         |
| PSS60 α              | +              | *         | *         | -         |
| PSS69 2α             | +              | +         | +         | +         |
| PSS71 1α             | +              | +         | +         | +         |
| PSS73α               | +              | +         | +         | +         |
| PSS77 1α             | +              | +         | +         | +         |
| PSS86α               | +              | +         | +         | +         |
| PSS87α               | +              | +         | +         | +         |
| PSS89 1α             | +              | +         | +         | +         |
| PSS94α               | +              | +         | +         | +         |
| PSS96α               | +              | +         | +         | +         |
| PSS100α              | +              | +         | +         | +         |
| PSS102α              | +              | +         | +         | +         |
| PSS103α              | +              | +         | +         | *         |
| PSS104α              | +              | +         | +         | -         |
| PSS113α              | +              | +         | *         | -         |
| PSS114α              | +              | +         | *         | -         |
| Κανονική ανάπτυξη: + |                |           |           |           |
| Μικρή ανάπτυξη: *    |                |           |           |           |
| Καμία ανάπτυξη: -    |                |           |           |           |



Εικόνα 22. Ανάπτυξη απομονώσεων PSS113α (a), PSS71 1α (b), PSS86α (c) PSS114 α (d), απουσία χαλκού στο θρεπτικό υπόστρωμα (0) και για συγκεντρώσεις χαλκού 29,99 ppm (1), 44,48 ppm (2) και 99,34 ppm (3).



#### 4. Συζήτηση

Κατά την απομόνωση του βακτηρίου PSS από τους όγκους ελιάς, η μορφολογία των αποικιών που ήταν κοινή για όλες τις απομονώσεις σε όλα τα τρυβλία, παρουσιάζει τα χαρακτηριστικά που περιγράφονται από τους Surico και Lavermicocca (1989) και τους Moretti et al. (2011). Το βακτήριο PSS είναι Gram αρνητικό, προκαλεί αντίδραση υπερευαισθησίας σε φυτά καπνού και δεν παράγει οξειδάση και πηκτινολυτικά ένζυμα. Ορισμένες αποικίες του φθορίζουν και παράγουν λεβάνη (Leliott et al. 1966, Ramos et al. 2012, Moretti et al. 2008). Στην παρούσα μελέτη βρέθηκε ότι οι απομονώσεις PSS52 α, PSS54 2α, PSS 58 1α, PSS59α, PSS60α, PSS69 2α, PSS71 1α, PSS73α, PSS77 1α, PSS86α, PSS87α, PSS89 1α, PSS94α, PSS96α, PSS100α, PSS102α, PSS103α, PSS104α, PSS113α και PSS114α είναι Gram αρνητικά φυτοπαθογόνα βακτήρια που δεν παράγουν πηκτινολυτικά ένζυμα και λεβάνη. Το 90% των απομονώσεων αυτών σε θρεπτικό υπόστρωμα King's B, παράγει φθορίζουσες ουσίες. Τα αποτελέσματα αυτά, σε συνδυασμό με τη θετική αντίδραση στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, επιτρέπουν τον χαρακτηρισμό τους ως PSS.

Από όγκους ελιάς, συχνά απομονώνεται και ένα βακτήριο, το οποίο σχηματίζει κίτρινες αποικίες. Το βακτήριο αναφέρεται ότι είναι το *Pantoea agglomerans* και παράγει λεβάνη (Marchi et al. 2006). Παρόμοια μορφολογία αποικίας παρουσιάζει και το είδος *Erwinia toletana*. Ωστόσο, σε καλλιέργεια με θρεπτικό υπόστρωμα NSA, οι αποικίες δεν εμφανίζουν χρωματισμό (Rojas et al. 2004). Στην παρούσα μελέτη, οι απομονώσεις PSS52 K, PSS54 2K, PSS59 K, PSS96 K, PSS102 K και PSS103 K σχηματίζουν κίτρινες αποικίες, παράγουν λεβάνη, ενώ δεν φθορίζουν, δεν παράγουν πηκτινολυτικά ένζυμα και δεν προκαλούν αντίδραση υπερευαισθησίας σε φυτά καπνού. Στις απομονώσεις αυτές πρέπει να πραγματοποιηθεί περαιτέρω χαρακτηρισμός, ώστε να προσδιοριστεί το γένος ή και το είδος.

Σύμφωνα με το πείραμα των Quesada et al. (2010), οι απομονώσεις χαρακτηρίζονται ως ανθεκτικές στο χαλκό, όταν αναπτύσσονται σε συγκέντρωση θειικού χαλκού ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) 0,7 mM. Σύμφωνα με το πείραμα των Nguyen et al. (2018), απομονώσεις με ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση χαλκού (Cu) 10 ppm, χαρακτηρίζονται ως ευαίσθητες, ενώ απομονώσεις που αναπτύσσονται κανονικά σε 50 ppm χαλκού, ως ανθεκτικές. Οι υπόλοιπες χαρακτηρίζονται ως μετρίως ευαίσθητες. Στην παρούσα εργασία, οι συγκεντρώσεις θειικού χαλκού που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο ευαισθησίας των απομονώσεων του βακτηρίου PSS στο χαλκό ήταν 0,47 mM, 0,7 mM και 1,56 mM. Η μόνη απομόνωση που δεν αναπτύχθηκε παρουσία 0,7 mM θειικού χαλκού, ήταν η PSS58 1α. Η ανάπτυξη της παρουσία 30 ppm χαλκού ήταν μικρή. Συνεπώς μπορεί να χαρακτηριστεί ως ευαίσθητη στο χαλκό. Οι υπόλοιπες απομονώσεις είναι πιθανώς ανθεκτικές στο χαλκό. Η πιθανή ανθεκτικότητα μπορεί να

αποδοθεί στην εκτεταμένη χρήση χαλκούχων σκευασμάτων για την αντιμετώπιση ασθενειών των φυτών (Fan et al. 2022). Σύμφωνα με πείραμα των Goto et al. (1994), η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση επηρεάζεται από το θρεπτικό υπόστρωμα, καθώς υπάρχει περίπτωση δέσμευσης του χαλκού από τα συστατικά του. Στο πείραμα που πραγματοποίησε, τα βακτήρια χαρακτηρίστηκαν ανθεκτικά, όταν ήταν ικανά να αναπτυχθούν παρουσία 1,25 mM θειικού χαλκού ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ). Ως θρεπτικό υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε PDA. Στα πειράματα των Quesada et al. (2010) και των Nguyen et al. (2018), χρησιμοποιήθηκαν 3 διαφορετικά θρεπτικά υποστρώματα: PVF-1, MGY (mannitol glutamate yeast extract) και CYEG (molten casitone-yeast extract-glycerol agar). Στα δύο πρώτα θρεπτικά υποστρώματα, η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση που προέκυψε ήταν ίδια.

Όσον αφορά την επιλογή του κατάλληλου θρεπτικού υποστρώματος για τον έλεγχο ευαισθησίας των απομονώσεων του βακτηρίου στα αντιβιοτικά, για το ίδιο αντιβιοτικό, οι μέσοι όροι ζωνών παρεμπόδισης μεταξύ ζευγών που στη μία συγκέντρωση δε διέφεραν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους, σε άλλη συγκέντρωση διέφεραν. Το υλικό που επιλέχθηκε τελικά, ήταν το MHA, το οποίο προτείνεται για τη μέθοδο διάχυσης σε άγαρ και για τον έλεγχο ευαισθησίας στα αντιβιοτικά, βακτηρίων που προκαλούν ασθένειες στον άνθρωπο. Το MHA δεν παρεμποδίζει τη δράση των τετρακυκλίνων, παρουσιάζει καλή επαναληψιμότητα και επιτρέπει την ανάπτυξη των περισσότερων βακτηρίων (Hudzicki 2009, CLSI 2015).

Ο χαρακτηρισμός μιας απομόνωσης ως ευαίσθητη, μετρίως ευαίσθητη ή ανθεκτική σε ένα αντιβιοτικό, κατά τον έλεγχο ευαισθησίας με τη μέθοδο διάχυσης σε άγαρ με χρήση δισκίων διηθητικού χαρτιού, γίνεται με σύγκριση του μέσου όρου της διαμέτρου της ζώνης παρεμπόδισης που προέκυψε για την προτεινόμενη ποσότητα αντιβιοτικού, με δημοσιευμένες τιμές διαμέτρων ζωνών παρεμπόδισης. Οι τιμές αυτές χρησιμοποιούνται για τον καθορισμό ευαισθησίας στα αντιβιοτικά, βακτηρίων που προσβάλλουν τον άνθρωπο (Bauer et al. 1966, CLSI 2015).

Οι προτεινόμενες ποσότητες στα δισκία για τα αντιβιοτικά στρεπτομυκίνη, πενικιλίνη, ερυθρομυκίνη, χλωραμφαινικόλη και τετρακυκλίνη είναι 10  $\mu\text{g}$ , 10 units ή 10  $\mu\text{g}$ , 15  $\mu\text{g}$ , 30  $\mu\text{g}$  και 30  $\mu\text{g}$  αντίστοιχα. Στον Πίνακα 131, παρουσιάζονται οι τιμές των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης ανά αντιβιοτικό, για ανθεκτικές, μετρίως ευαίσθητες και ευαίσθητες απομονώσεις βακτηρίων που προσβάλλουν τον άνθρωπο (Bauer et al. 1966).

Πίνακας 131. Τιμές διαμέτρων ζωνών παρεμπόδισης ανά αντιβιοτικό, για ανθεκτικές, μετρίως ευαίσθητες και ευαίσθητες απομονώσεις (Bauer et al. 1966).

| ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΟ     | ΔΙΑΜΕΤΡΟΣ ΖΩΝΗΣ ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΣΗΣ (mm) |            |                    |            |
|-----------------|-----------------------------------|------------|--------------------|------------|
|                 | ΠΟΣΟΤΗΤΑ ΣΤΟ ΔΙΣΚΙΟ               | ΑΝΘΕΚΤΙΚΕΣ | ΜΕΤΡΙΩΣ ΕΥΑΙΣΘΗΤΕΣ | ΕΥΑΙΣΘΗΤΕΣ |
| Στρεπτομυκίνη   | 10 µg                             | <11        | 12-15              | >15        |
| Πενικιλίνη      | 10 units ή 10 µg                  | <20        | 21-28              | >29        |
| Ερυθρομυκίνη    | 15 µg                             | <13        | 14-17              | >18        |
| Χλωραμφαινικόλη | 30 µg                             | <12        | 13-17              | >18        |
| Τετρακυκλίνη    | 30 µg                             | <14        | 15-18              | >19        |

Στο συγκεκριμένο πείραμα, για ποσότητα στα δισκία 10 µg στρεπτομυκίνης, οι μέσοι όροι των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης όλων των απομονώσεων ήταν μεγαλύτερες από 15 mm, οπότε είναι πιθανώς ευαίσθητες. Με την ομαδοποίηση από την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων, προκύπτει ότι τη μεγαλύτερη ευαισθησία στη στρεπτομυκίνη έχουν οι απομονώσεις PSS113α και PSS103α με μέσο όρο διαμέτρων ζωνών παρεμπόδισης 25,5-28,16 mm. Ακολουθούν οι PSS86α και PSS104α (24-25,5 mm), οι PSS94α, PSS102α και PSS69 2α (22-23,16 mm) και οι PSS73α, PSS71 1 α, PSS59α, PSS77 1α, PSS60α και PSS87α (19,66-21,16 mm). Οι λιγότερο ευαίσθητες είναι οι PSS100α και PSS58 1α με μέσο όρο διαμέτρου ζώνης παρεμπόδισης 16,66 και 17 mm αντίστοιχα.

Για ποσότητα τετρακυκλίνης 30 µg, οι μέσοι όροι των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης όλων των απομονώσεων ήταν μεγαλύτερες από 19 mm, οπότε είναι πιθανώς ευαίσθητες. Μεγαλύτερη ευαισθησία έχει η απομόνωση PSS86α, με μέσο όρο διαμέτρου ζώνης παρεμπόδισης 40,33 mm. Ακολουθούν οι απομονώσεις PSS73α, PSS113α, PSS60α, PSS69 2α, και PSS71 1α (30-31,66 mm), οι PSS102α, PSS104α, PSS58 1α και PSS103α (28,16-29,5 mm) και οι PSS59α, PSS87α, PSS77 1α και PSS94α (25,3-27,1 mm). Τη μικρότερη ευαισθησία στην τετρακυκλίνη, έχει η απομόνωση PSS100α, με διάμετρο ζώνης παρεμπόδισης 21,66 mm.

Ομοίως, όλες οι απομονώσεις είναι πιθανώς ευαίσθητες στην χλωραμφαινικόλη, καθώς οι μέσοι όροι των διαμέτρων των ζωνών παρεμπόδισης ήταν μεγαλύτερες από 18 mm. Μεγαλύτερη ευαισθησία έχουν οι απομονώσεις PSS86α, PSS113α και PSS103α, με μέσο όρο διαμέτρου ζώνης παρεμπόδισης 42,66-44,5 mm. Ακολουθούν οι PSS60α (38,63 mm), PSS58 1α (35 mm), PSS59α, PSS87α, PSS102α και PSS104α (27,8-29,6 mm) και οι PSS94α, PSS71 1α και PSS77 1α (24-26 mm). Μικρότερη διάμετρο ζωνών παρεμπόδισης (22,5-23,3 mm), είχαν οι απομονώσεις PSS73α, PSS100α και PSS69 2α, συνεπώς έχουν τη μικρότερη ευαισθησία στην χλωραμφαινικόλη.

Όσον αφορά το αντιβιοτικό πενικιλίνη, σε καμία από τις ποσότητες δεν σχηματίστηκε ζώνη παρεμπόδισης με διάμετρο μεγαλύτερη από 21 mm. Συνεπώς όλες οι απομονώσεις είναι πιθανώς ευαίσθητες στο αντιβιοτικό.

Για ποσότητα ερυθρομυκίνης 15 µg, μόνο οι απομονώσεις PSS58 1α και PSS103α είχαν διάμετρο ζώνης παρεμπόδισης μεγαλύτερη από 13 mm (16mm και 18 mm αντίστοιχα). Οι απομονώσεις αυτές μπορούν να χαρακτηριστούν ως μετρίως ευαίσθητες. Οι υπόλοιπες απομονώσεις είναι πιθανώς ανθεκτικές στην ερυθρομυκίνη, καθώς οι διαμέτροι των ζωνών παρεμπόδισης ήταν μικρότερες από 13 mm. Μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό έχουν οι απομονώσεις PSS60α, PSS86α, PSS87α και PSS94α, καθώς για ποσότητα ερυθρομυκίνης 15 µg, δεν σχηματίστηκε ζώνη παρεμπόδισης. Ακολουθούν οι PSS73α, PSS68 2α, PSS113α και PSS100α, με διάμετρο ζωνών παρεμπόδισης 8,6-10 mm και οι PSS102α, PSS104α, PSS71 1α, PSS59α και PSS77 1α (11,3-12,3 mm).

Το pH του MHA πρέπει να είναι μεταξύ 7,2 και 7,4 καθώς σε μικρότερες τιμές η αποτελεσματικότητα αντιβιοτικών που ανήκουν στις αμινογλυκοζίδες και στα μακρολίδια μειώνεται (Hudzicki 2009). Η πιθανή ανθεκτικότητα των απομονώσεων στο αντιβιοτικό ερυθρομυκίνη, μπορεί να αποδοθεί στο pH του υποστρώματος. Για το λόγο αυτό είναι απαραίτητο να γίνει έλεγχος για ύπαρξη γονιδίων ανθεκτικότητας με μοριακές μεθόδους. Η πιθανή ανθεκτικότητα των απομονώσεων στο αντιβιοτικό πενικιλίνη G, δεδομένου ότι η χρήση της στη φυτοπροστασία απαγορεύεται, μπορεί να αιτιολογηθεί με την φυσική ανθεκτικότητα των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων στο αντιβιοτικό, λόγω της ύπαρξης επιπλέον στρώματος λιποπολυσακχαριτών. Περαιτέρω, κρίνεται απαραίτητο να γίνει έλεγχος για ύπαρξη γονιδίων που κωδικοποιούν β-λακταμάσες (Vardanyan & Hruby 2006, Davis 2018).

Μελλοντικά, για τον χαρακτηρισμό των απομονώσεων του PSS πιθανόν είναι χρήσιμο να εξετάζεται και ο βαθμός ανθεκτικότητάς τους στην πενικιλίνη, καθώς υπάρχει σαφής διαφοροποίηση, στατιστικώς σημαντική μεταξύ των απομονώσεων.

Αναφέρεται ότι στελέχη βακτηρίων ανθεκτικά στο χαλκό, μπορεί να παρουσιάζουν και ανθεκτικότητα στη στρεπτομυκίνη (Goto et al. 1994). Αυτό δεν επιβεβαιώνεται από την παρούσα εργασία.

## 5. Βιβλιογραφία

### 5.1 Ξενογλώσση βιβλιογραφία

Abdollahi M. and Mostafalou S. 2014. Chloramphenicol. In: Encyclopedia of Toxicology, P. Wexler Eds. Academic Press, Cambridge, MA, USA, pp. 837–840

Abraham E. P. and Chain E. 1940. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. Nature 3713, 837

Ahmadi S. and Mostafapour F. 2017. Survey of Efficiency of Dissolved Air Flotation in Removal Penicillin G Potassium from Aqueous Solutions. British Journal of Pharmaceutical Research 15, 1-11

Anderson H. W. and Cottlieb D. 1952. Plant Disease Control with Antibiotics. Economic Botany 6, 294-308

Bardaji L., Pérez-Martínez I., Rodríguez-Moreno L., Rodríguez-Palenzuela P., Sundin G. W., Ramos C. and Murillo J. 2011. Sequence and Role in Virulence of the Three Plasmid Complement of the Model Tumor-Inducing Bacterium *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* NCPPB 3335. Plos one 6, 1-10

Bauer A. W., Kirby M. M., Sherris J. C. and Turck M., 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. The American Journal of clinical Pathology 45, 493-496

Berendsen B., Pikkemaat, M., Römkens P., Wegh R., van Sisseren M., Stolker L., and Nielen M. 2013. Occurrence of Chloramphenicol in Crops through Natural Production by Bacteria in Soil. Journal of Agricultural and Food Chemistry 61, 4004–4010

Berendsen B., Stolker L., de Jong J., Nielen M., Tserendorj E., Sodnomdarjaa R., Cannavan A. and Elliott C. 2010. Evidence of natural occurrence of the banned antibiotic chloramphenicol in herbs and grass. Analytical and Bioanalytical Chemistry 397, 1955–1963

Bouaichi A., Benkirane R., Habbadi K., Benbouazza A. and Achbani E. H. 2015 Antibacterial activities of the essential oils from medicinal plants against the growth of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* causal agent of olive knot. Journal of Agriculture and Veterinary Science 8, 41-44

Bouaichi A, Lougraimzi H., Ou-zine M., Kotba I., Habbadi K., Benbouazza A., Benkirane R. and Achbani E., 2019. Molecular identification, in vitro copper resistance and antibiotics susceptibility of the causal agent of the olive knot disease in Morocco. Malaysian Journal of Microbiology 15, 1-7

- Buonaurio R., Moretti C., da Silva D. P., Cortese C., Ramos C., and Venturi V. 2015. The olive knot disease as a model to study the role of interspecies bacterial communities in plant disease. *Frontiers in Plant Science* 6, 1-12
- Bozkurt I. A., Soylu S., Mirik M., Ulubas Serce C. and Baysal Ö. 2014. Characterization of bacterial knot disease caused by *Pseudomonas savastanoi* pv.*savastanoi* on pomegranate (*Punica granatum*L.) trees: a new host of the pathogen. *Letters in Applied Microbiology* 59, 520–527
- Brown N. L., Rouch D. A. and Lee B. T. O. 1992. Copper resistance determinants in bacteria. *Plasmid* 27, 41–51
- Buonaurio R., Moretti C., da Silva D. P., Cortese C., Ramos C. and Venturi V. 2015. The olive knot disease as a model to study the role of interspecies bacterial communities in plant disease. *Frontiers in Plant Science* 6, 1-12
- Caballo-Ponce E., Murillo J., Martínez-Gil M., Moreno-Pérez A., Pintado A. and Ramos C. 2017. Knots Untie: Molecular Determinants Involved in Knot Formation Induced by *Pseudomonas savastanoi* in Woody Hosts. *Frontiers in Plant Science* 8, 1-16
- Cervantes C. and Gutierrez-Corona F. 1994. Copper resistance mechanisms in bacteria and fungi. *FEMS Microbiology Reviews* 14, 121–137
- Chater K. F. 2013. Streptomyces. In: Brenner's Encyclopedia of Genetics, S. Maloy and K. Hughes Eds. Academic Press, [n.p], pp. 565–567.
- Chopra I. and Roberts M. 2001. Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 65, 232-260
- Cinelli T., Marchi G., Cimmino A., Marongiu R., Evidente A. and Fiori M. 2013. Heterogeneity of *Pseudomonas savastanoi* populations infecting *Myrtus communis* in Sardinia (Italy). *Plant Pathology* 63, 277–289
- CLSI 2015. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Twenty-Fifth Informational Supplement. CLSI document M100-S25. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute
- Cornish D. A., Schipper M. M., Oldham J. M. AND Vanneste J. L. 2017. Effect of peptones on the ability of plant pathogenic bacteria to grow on media supplemented with copper sulphate. *New Zealand Plant Protection* 70, 265-271

- Davis J. L. 2018. Pharmacologic Principles. In: Equine Internal Medicine. S. Reed, W. Bayly and D. Sellon Eds. Saunders, [n.p], pp. 79–137
- Ehrlich J., Bartz Q. R., Smith R., M., Joslyn D. A. and Burkholder P. R. 1947. Chloromycetin, a New Antibiotic From a Soil Actinomycete. Science 106, 417
- Fan H., Saleem T. and Zou H., 2022. Copper resistance mechanisms in plant pathogenic bacteria. Phytopathologia Mediterranea 61, 129-13
- FAO 2009. Global agriculture towards 2050. [Online]. Available at <[https://www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/Issues\\_papers/HLEF2050\\_Global\\_Agriculture.pdf](https://www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/Issues_papers/HLEF2050_Global_Agriculture.pdf)> [Accessed 5 September 2022]
- Fernandes A. and Marcelo M. 2008. Evaluation of the sensitivity of *Pseudomonas savastanoi* to seventeen antibiotics. Acta Horticulture 791, 565-568.
- Ficke A., Cowger C., Bergstrom G. and Brodal G. 2018. Understanding Yield Loss and Pathogen Biology to Improve Disease Management: Septoria Nodorum Blotch - A Case Study in Wheat. Plant Disease 102, 696–707
- Fowler L., Engqvist H. and Öhman-Mägi C. 2019. Effect of Copper Ion Concentration on Bacteria and Cells. Materials 12, 1-13
- Goto M. Hikota T. Nakajima M. Takikawa Y. and Tsuyumu S. 1994. Occurrence and properties of copper-resistance in plant pathogenic bacteria. Japanese Journal of Phytopathology 60, 147-153
- Hahn, F.E. 1967. Erythromycin and Oleandomycin. In: Antibiotics. D. Gottlieb and P.D Shaw, P.D. Eds. Springer, Berlin, Heidelberg. pp. 378–386
- Haynes E., Ramwell C., Griffiths T., Walker D. and Smith J. 2020. Review of antibiotic use in crops, associated risk of antimicrobial resistance and research gaps. Report to Department for Environment, Food and Rural Affairs (DEFRA) & The Food Standards Agency (FSA). [Online]. Available at <<https://www.food.gov.uk/sites/default/files/media/document/review-of-antibiotic-use-in-crops-associated-risk-of-antimicrobial-resistance-and-research-gaps-final.pdf>> [Accessed 5 September 2022]
- Hudzicki J. 2009. Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol. American Society for Microbiology. [Online]. Available at <<https://asm.org/getattachment/2594ce26-bd44-47f6-8287-0657aa9185ad/Kirby-Bauer-Disk-Diffusion-Susceptibility-Test-Protocol-pdf.pdf>> [Accessed 5 September 2022]

- International Agency for Research on Cancer 1990. Pharmaceutical Drugs. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans 50. [Online]. Available at <<https://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Iarc-Monographs-On-The-Identification-Of-Carcinogenic-Hazards-To-Humans/Pharmaceutical-Drugs-1990>> [Accessed 4 September 2022]
- Khlaif H. 2006. Olive Knot Disease in Jordan. *Jordan Journal of Agricultural Sciences* 2, 387-400
- Krid S., Triki M. A., Gargouri A. and Rhouma A. 2012. Biocontrol of olive knot disease by *Bacillus subtilis* isolated from olive leaves. *Annals of Microbiology* 62, 149–154
- Kucers A. 1982. Chloramphenicol, erythromycin, vancomycin, tetracyclines. *The Lancet* 320, 425–429
- Lamichhane J. R., Osdaghi E., Behlau F., Köhl J., Jones J. B. and Aubertot J.-N. 2018. Thirteen decades of antimicrobial copper compounds applied in agriculture. A review. *Agronomy for Sustainable Development* 38, 1-18
- LaTorre Iovino V. and Caradonia F. 2018. Copper in plant protection: current situation and prospects. *Phytopathologia Mediterranea* 57, 201-236
- Lelliott R. A., Billing E. and Hayward A C. 1966. A Determinative Scheme for the Fluorescent Plant Pathogenic Pseudomonads. *Journal of Applied Bacteriology* 29, 470–480
- Lemieux R. U., & Wolfrom M. L. 1948. The Chemistry of Streptomycin. *Advances in Carbohydrate Chemistry* 3, 337–384
- Llop P., Caruso P., Cubero J., Morente C. and López M. M. 1999. A simple extraction procedure for efficient routine detection of pathogenic bacteria in plant material by polymerase chain reaction. *Journal of Microbiological Methods* 37, 23–31
- Lu L., Liu J., Li Z., Liu Z., Guo J., Xiao Y. and Yang J. 2018. Occurrence and Distribution of Tetracycline Antibiotics and Resistance Genes in Longshore Sediments of the Three Gorges Reservoir, China. *Frontiers in Microbiology* 9, 1-40
- Marchi G., Sisto A., Cimmino A., Andolfi A., Cipriani M. G., Evidente A. and Surico G. (2006). Interaction between *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* and *Pantoea agglomerans* in olive knots. *Plant Pathology* 55, 614–624.



- Marchi G., Viti C., Giovannetti L. and Surico G. 2005. Spread of levan-positive populations of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, the causal agent of olive knot, in central Italy. *European Journal of Plant Pathology* 112, 101–112
- Martins P. M. M., Merfa M. V., Takita M. A. and De Souza A. A. 2018. Persistence in Phytopathogenic Bacteria: Do We Know Enough? *Frontiers in Microbiology* 9, 1-14
- McManus P. S. and Stockwell V. O. 2001. Antibiotic Use for Plant Disease Management in the United States. *Plant Health Progress* 2, 1-10
- McManus P. S., Stockwell V. O., Sundin G. W. and Jones A. L. 2002. Antibiotic use in plant agriculture. *Annual Review of Phytopathology* 40, 443–465
- Miller E. L. 2002. The penicillins: A review and update. *Journal of Midwifery & Women's Health* 47, 426–434
- Mina D., Pereira J. A., Lino-Neto T. and Baptista P. 2020. Screening the Olive Tree Phyllosphere: Search and Find Potential Antagonists Against *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*. *Frontiers in Microbiology* 11, 1-12
- Misato T., Ko K. and Yamaguchi I. 1977. Use of Antibiotics in Agriculture. *Advances in Applied Microbiology* 21, 53-88
- Moreno-Pérez A., Pintado A., Murillo J., Caballo-Ponce E., Tegli S., Moretti C., Rodriguez-Palenzuela P. and Ramos C. 2020. Host Range Determinants of *Pseudomonas savastanoi* Pathovars of Woody Hosts Revealed by Comparative Genomics and Cross-Pathogenicity Tests. *Frontiers in Plant Science* 11, 1-19
- Moore G. A. and Nygren O. 2004. The Nordic Expert Group for Criteria Documentation of Health Risks from Chemicals: 134. Penicillins [Online]. Available at <<https://gupea.ub.gu.se/handle/2077/4336>> [Accessed 7 September 2022]
- Moretti C., Ferrante P., Hosni T., Valentini F., D'Onghia A., Fatmi M. B. and Buonauro M. 2008. Characterization of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* Strains Collected from Olive Trees in Different Countries. In: *Pseudomonas syringae* Pathovars and Related Pathogens – Identification, Epidemiology and Genomics, M. B. Fatmi, A. Collmer, N. S. Iacobellis, J. W. Mansfield, J. Murillo and Ullrich M. Eds. Springer, Dordrecht, pp. 321–329
- Moretti C., Hosni T., Vandemeulebroecke K., Brady C., De Vos P., Buonauro R. and Cleenwerck I. 2011. *Erwinia oleae* sp. nov., isolated from olive knots caused by *Pseudomonas*

*savastanoi* pv. *savastanoi*. International Journal of systematic and evolutionary microbiology 61, 2745–2752

Moretti C., Vinatzer B. A., Onofri A., Valentini F. and Buonauro R. 2016. Genetic and phenotypic diversity of Mediterranean populations of the olive knot pathogen, *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*. Plant Pathology 66, 595–605

National Centre for Biotechnology Information 2022a. Erythromycin. [Online]. Available at <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Erythromycin> > [Accessed 7 September 2022]

National Centre for Biotechnology Information 2022b. Streptomycin [Online]. Available at <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Streptomycin-A#section=Substances-by-Category> > [Accessed 8 September 2022]

Nguyen F., Starosta A. L., Arenz S., Sohmen D., Dönhöfer A. and Wilson D. N. 2014. Tetracycline antibiotics and resistance mechanisms. Biological Chemistry 395, 559-575

Nguyen K. A., Förster H. and Adaskaveg, J. E. 2018. Efficacy of Copper and New Bactericides for Managing Olive Knot in California. Plant Disease 102, 892–898

Penyalver R., Garcia A., Ferrer A., Bertolini E. and Lopez M. M. 2000. Detection of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* in olive plants by enrichment and PCR. Applied and Environmental Microbiology 66, 2673–2677

Pérez-Martínez I. Zhao Y. 2 Murillo J. Sundin G. W. and Ramos C. 2008. Global Genomic Analysis of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* Plasmids. Journal of Bacteriology 190, 625–635

Peterson E. and Kaur P. (2018). Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria: Relationships Between Resistance Determinants of Antibiotic Producers, Environmental Bacteria, and Clinical Pathogens. Frontiers in Microbiology 9, 1-21

Pongs O. 1979. Chloramphenicol. In: Antibiotics, Mechanism of Action of Antibacterial Agents. F.E. Hahn Eds. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 26-42

Pramer D. 1959. The Status of Antibiotics in Plant Disease Control. Advances in Applied Microbiology 1, 75–85.

Prévost B., 1939. Memoir on the immediate cause of bunt or smut of wheat and of several diseases of plants and on preventives of bunt. Translated from the French by G. W. Keitt. American Phytopathological Society, Menasha, Wisconsin, USA

- Quesada J. M., Penyalver R., Pérez-Panadés J., Salcedo C. I., Carbonell E. A. and López M. M. 2010. Comparison of chemical treatments for reducing epiphytic *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* populations and for improving subsequent control of olive knot disease. *Crop Protection* 29, 1413–1420
- Ramos C., Matas-Casado I. M., Bardaji L., Aragoni I. M. and Murillo J., 2012. *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*: some like it knot. *Molecular Plant Pathology* 13, 998-1009
- Ramachandran R. and Schaefer B. 2021. Tetracycline antibiotics. *ChemTexts* 7, 1-42
- Roberts D. J. 2014. Erythromycin. In: *Encyclopedia of Toxicology*, P. Wexler Eds. Academic Press, Cambridge, MA, USA, pp. 453–458
- Rodríguez-Moreno L., Barceló-Muñoz A. and Ramos C. 2008. In vitro analysis of the interaction of *Pseudomonas savastanoi* pvs. *savastanoi* and *nerii* with micropropagated olive plants. *Phytopathology* 98, 815–822
- Rodríguez-Palenzuela P., Matas I. M., Murillo J., López-Solanilla E., Bardaji L., Pérez-Martínez I., Rodríguez-Mosquera M. E., Penyalver R., López M.M., Quesada J. M., Biehl B. S., Perna N. T., Glasner J. D., Cabot E. L. Neeno-Eckwall E., Ramos C. 2010. Annotation and overview of the *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* NCPPB 3335 draft genome reveals the virulence gene complement of a tumour-inducing pathogen of woody hosts. *Environmental Microbiology* 12, 1604-1620
- Rojas A. M., de Los Rios J. E. G., Saux M. F. L., Jimenez P., Reche P., Bonneau S., Sutra L., Mathieu-Daudé F. and McClelland M. 2004. *Erwinia toletana* sp. nov., associated with *Pseudomonas savastanoi*-induced tree knots. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54, 2217–2222
- Salman, M., McClean, A. and Kluepfel, D. 2022 An in vitro bioassay for evaluating the virulence of *Pseudomonas savastanoi* pv *savastanoi* isolates on olive. *Australasian Plant Disease Notes* 17, 1-4
- Sambrook J., Fritsch E. F. and Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. Second ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, United States of America
- Schneiderhan F. J. 1937. Preparation and Properties of Bordeaux Mixtures. *West Virginia Agricultural and Forestry Experiment Station Bulletins*. 283 [Online]. Available at [https://researchrepository.wvu.edu/wv\\_agricultural\\_and\\_forestry\\_experiment\\_station\\_bulletins/284/](https://researchrepository.wvu.edu/wv_agricultural_and_forestry_experiment_station_bulletins/284/) > [Accessed 7 September 2022]

- Scholar E. 2007. Chloramphenicol. In: xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference. S.J. Enna and D. B. Bylund Eds. Elsevier Inc. [n.p], pp. 1-7
- Schroth M. N., Osgood J. W. and Miller T. D. 1973. Assessment of the effect of the olive knot disease on olive yield and quality. *Phytopathology* 63, 1064-1065
- Sisto A., Cipriani M. G., Tegli S., Cerboneschi M., Steaa G. and Santilli E. 2007. Genetic characterization by fluorescent AFLP of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* strains isolated from different host species. *Plant Pathology* 56, 366-372
- Stockwell V.O. and Duffy B. 2012. Use of antibiotics in plant agriculture. *Revue scientifique et technique* 31, 199-210
- Sundin G. W., Castiblanco L. F., Yuan X., Zeng Q. and Yang, C. H. 2016. Bacterial disease management: challenges, experience, innovation and future prospects. *Molecular Plant Pathology* 17, 1506–1518
- Sundin, G. W. and Wang N. 2018. Antibiotic Resistance in Plant-Pathogenic Bacteria. *Annual Review of Phytopathology* 56, 161-180
- Surico G. and Lavermicocca P. 1989. A semiselective medium for the isolation of *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*. *Techniques* 79, 185-190
- Tampakaki A. P., E. Hatziloukas E. and Panopoulos N. J. 2009. Plant Pathogens, Bacterial. In: *Encyclopedia of Microbiology*. M. Schaechter Eds. Academic Press, pp. 655-677
- Taylor P. and Reeder R. 2020. Antibiotic use on crops in low and middle-income countries based on recommendations made by agricultural advisors. *CABI Agriculture and Bioscience* 1, 1-14
- Trevors J.T., Cotter C.M. 1990. Copper toxicity and uptake in microorganisms. *Journal of Industrial Microbiology* 6, 77–84
- Turco S., Drais M. I., Rossini L., Chaboteaux E., Rahi Y. J., Balestra G. M., Iacobellis N. S. and Mazzaglia A. 2022. Complete genome assembly of the levan-positive strain PVFi1 of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* isolated from olive knots in Central Italy. *Environmental Microbiology Reports* 14, 274-285
- Vardanyan R. S. and Hruby V. J. 2006. *Synthesis of Essential Drugs*. 1st ed. Elsevier, Amsterdam

Ventola C. L. 2015. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *Pharmacy and Therapeutics* 40, 277-283.

## 5.2 Ελληνική βιβλιογραφία

Ζιώγας Β. Ν. και Μαρκόγλου Α. Ν. 2017. Γεωργική Φαρμακολογία. Βιοχημεία, Φυσιολογία, Μηχανισμοί Δράσης και Χρήσεις Φυτοπροστατευτικών Προϊόντων. 2η Έκδοση, Greenbooks publications, Αθήνα

Ρουμελιώτη Α. Μ. 2021. Έλεγχος ευαισθησίας σε αντιβιοτικά απομονώσεων των φυτοπαθογόνων βακτηρίων *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* και *Erwinia amylovora* από περιοχές της Κεντρικής Ελλάδας. [Online]. Available at <<https://ir.lib.uth.gr/xmlui/handle/11615/56911>> [Accessed 13 September 2022]

Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων 2022. [Online]. Available at <<https://1click.minagric.gr/oneClickUI/frmFytoPro.zul>> [Accessed 7 September 2022]