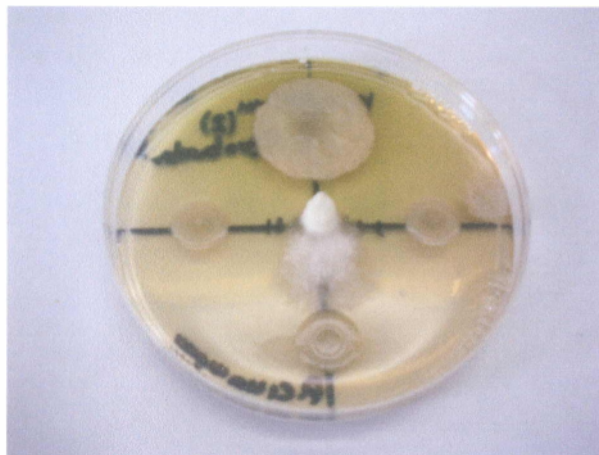


**ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ (ΤΕΙ)  
ΤΜΗΜΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ**

**ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΑΠΟ ΟΡΓΑΝΙΚΑ  
ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ ΜΕ ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΣΕ  
ΦΥΤΟΠΑΘΟΓΟΝΟΥΣ ΜΥΚΗΤΕΣ ΕΔΑΦΟΥΣ**



**ΔΑΜΑΣΚΗΝΟΥ Δ. ΑΘΑΝΑΣΙΑ**

**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ**

**ΚΑΛΑΜΑΤΑ, Απρίλιος 2005**

**ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ (ΤΕΙ)  
ΤΜΗΜΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ**

**ΘΕΜΑ : ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΑΠΟ ΟΡΓΑΝΙΚΑ  
ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ ΜΕ ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΣΕ  
ΦΥΤΟΠΑΘΟΓΟΝΟΥΣ ΜΥΚΗΤΕΣ ΕΔΑΦΟΥΣ**



**ΕΙΣΗΓΗΤΕΣ : ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΥ ΚΑΛΛΙΟΠΗ  
ΗΛΙΟΠΟΥΛΟΣ ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΣ**

**ΔΑΜΑΣΚΗΝΟΥ Δ. ΑΘΑΝΑΣΙΑ  
ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ**

**ΚΑΛΑΜΑΤΑ, Απρίλιος 2005**

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....Σελ.3

ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....Σελ.4

### ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

#### Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΣΤΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΚΑΤΑΠΟΛΕΜΗΣΗ ΑΣΘΕΝΕΙΩΝ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ

1. ΡΙΖΟΣΦΑΙΡΑ : ΕΝΝΟΙΑ ΚΑΙ ΣΗΜΑΣΙΑ.....Σελ.5

2. ΑΠΟΙΚΙΣΜΟΣ ΡΙΖΟΣΦΑΙΡΑΣ – ΡΙΖΟΒΑΚΤΗΡΙΑ.....Σελ.6

3. ΚΟΜΠΟΣΤ : ΘΡΕΨΗ – ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑ.....Σελ.7

3.1 ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΧΡΗΣΗΣ.....Σελ.8

3.2 ΚΑΤΑΣΤΑΛΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΕΝΑΝΤΙΑ ΣΕ ΠΑΘΟΓΟΝΑ.....Σελ.8

4. ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΚΑΤΑΠΟΛΕΜΗΣΗ ΦΥΤΟΠΑΘΟΓΟΝΩΝ  
ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΑΠΟ ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ.....Σελ.9

4.1 ΓΕΝΙΚΑ.....Σελ.9

4.2 ΤΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ ΩΣ ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΙ ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΕΣ.....Σελ.9

4.3 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΙΔΡΟΥΝ ΣΤΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΚΑΤΑΣΤΟΛΗ ΤΗΣ  
ΑΣΘΕΝΕΙΑΣ.....Σελ.11

4.4 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ.....Σελ.11

4.5 ΤΡΟΦΙΚΟΣ ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΜΟΣ (ΣΙΔΗΡΟΦΟΡΑ).....Σελ.13

4.6 ΠΤΗΤΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ.....Σελ.14

4.7 ΑΠΟΙΚΙΣΜΟΣ – ΥΔΡΟΛΥΤΙΚΑ ΕΝΖΥΜΑ.....Σελ.15

4.8 ΕΠΑΓΟΜΕΝΗ ΑΝΤΟΧΗ.....Σελ.15

### ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

#### ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....Σελ.18

## 1. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1.1	ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ.....	Σελ.19
1.2	ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΚΑΙ ΜΥΚΗΤΩΝ.....	Σελ. 20
1.3	ΔΙΑΤΗΡΗΣΗ ΑΠΟΜΟΝΩΣΕΩΝ.....	Σελ.21
1.4	ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΛΙΚΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΚΑΙ ΣΥΝΤΗΡΗΣΗΣ ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΚΑΙ ΜΥΚΗΤΩΝ.....	Σελ.21
1.5	ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΚΑΙ ΜΥΚΗΤΩΝ ΣΕ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥΣ ΜΥΚΗΤΕΣ ΦΥΤΩΝ ΣΕ <i>IN VITRO</i> ΔΟΚΙΜΕΣ.....	Σελ.24
1.5.1	ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΣΕ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥΣ ΜΥΚΗΤΕΣ.....	Σελ.25
1.5.2	ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΜΥΚΗΤΩΝ ΣΕ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥΣ ΜΥΚΗΤΕΣ.....	Σελ.26
1.6	ΕΝΖΥΜΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ <i>IN VITRO</i> .....	Σελ.29
1.7	ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΚΑΜΠΥΛΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ.....	Σελ.30

## 2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΕΙΣ

2.1	ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ.....	Σελ.34
2.1.1	ΡΙΖΟΣΦΑΙΡΙΚΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ.....	Σελ.34
2.1.2	ΕΝΔΟΦΥΤΙΚΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ.....	Σελ.56
2.1.3	ΜΥΚΗΤΕΣ.....	Σελ.66
2.2	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΝΖΥΜΙΚΩΝ ΔΟΚΙΜΩΝ.....	Σελ.71
2.3	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΜΠΥΛΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ.....	Σελ.75
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ .....		Σελ.76
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....		Σελ.88

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Κατ'αρχήν θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα καθηγήτρια βιολογίας κα Παπαδοπούλου Καλλιόπη η οποία μου έδωσε την ευκαιρία να βρεθώ σε ένα εργαστηριακό περιβάλλον, κοντά σε αξιόλογους και καταξιωμένους ανθρώπους. Η επαφή αυτή με βοήθησε να εμπλουτίσω τις γνώσεις μου και να εξελιχθώ ως άνθρωπος. Την ευχαριστώ για την άμεση καθοδήγηση και επίβλεψη, για την κατανόηση και συμπαράσταση που μου παρείχε καθ'όλη τη διάρκεια εκπόνησης της πτυχιακής μου εργασίας, μα πιο πολύ γιατί δείχνει εμπιστοσύνη στο προσωπό μου, πράγμα που με γεμίζει δύναμη και αισιοδοξία.

Οφείλω να ευχαριστήσω τον κ. Δρ. Ζερβάκη Γιώργο, διευθυντή του Εθνικού Ινστιτούτου Αγροτικής Έρευνας (ΕΘ.Ι.ΑΓ.Ε.) για την παροχή του κατάλληλου εργαστηριακού εξοπλισμού, με σκοπό την διεκπεραίωση του παρόντος πειράματος. Επίσης ευχαριστώ το προσωπικό του εργαστηρίου : τον Νεκτάριο, τον Σπύρο, την Μένια και τον Τάκη για την άψογη συνεργασία μας.

Επίσης ευχαριστώ πολύ τον κ. Ηλιόπουλο Αναστάσιο, επίκουρο καθηγητή του ΤΕΙ Καλαμάτας, για τη βοήθεια και τις εύστοχες παρατηρήσεις του στην επιμέλεια του κειμένου της πτυχιακής μου εργασίας.

Και φυσικά ευχαριστώ θερμά τους γονείς μου, Φλώρα και Δημήτρη για την ανεκτίμητη προσφορά τους όλα τα χρόνια των σπουδών μου και ιδιαίτερα την κα. Κατράνα Τένια και τον κ. Ρεμούνδο Γιάννη για τις πολύτιμες συμβουλές τους και την ανεξάντλητη υπομονή τους. Δικαιωματικά τους αφιερώνω αυτήν την εργασία.

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Ο τεράστιος πλούτος του τεχνολογικά ανεπτυγμένου κόσμου, που δημιουργήθηκε μετά τη βιομηχανική επανάσταση, επιτεύχθηκε εις βάρος του φυσικού περιβάλλοντος, το οποίο εδώ και έναν αιώνα περίπου υποφέρει από πάσης φύσεως ανθρώπινες δραστηριότητες. Η γεωργία έχει τα τελευταία χρόνια κατηγορηθεί έντονα ως ένας από τους κύριους παράγοντες αλλοίωσης του περιβάλλοντος. Η ανησυχία της κοινής γνώμης, για τις δυσμενείς επιπτώσεις των γεωργικών δραστηριοτήτων στον πλανήτη μας, έχει ενταθεί.

Για το λόγο αυτό, τα τελευταία χρόνια έχει ωριμάσει η ιδέα της στροφής σε μια μορφή γεωργίας λιγότερο ρυπογόνας και περισσότερο φιλικής προς το περιβάλλον. Η βιολογική καταπολέμηση σημαντικών παθογόνων μελετάται εδώ και 65 χρόνια. Από το 1965 το ενδιαφέρον και η έρευνα σε αυτό το πεδίο έχει αναπτυχθεί πάρα πολύ και έχει βρει άριστες εφαρμογές στη γεωργική πράξη. Ο βιολογικός αυτός έλεγχος φαντάζει ως μια εξαιρετική λύση για το μέλλον της γεωργίας.

Η ανάπτυξη μεθόδων βιολογικής καταπολέμησης εδαφογενών παθογόνων, στηρίζεται μεταξύ άλλων στην αναζήτηση, αξιολόγηση και χρησιμοποίηση ανταγωνιστικών βακτηρίων της ριζόσφαιρας. Στη παρούσα εργασία μελετήθηκε ένας βιολογικός τρόπος καταπολέμησης εδαφικών παθογόνων από μικροοργανισμούς που κατοικούν σε κομποστοποιημένα οργανικά εδαφοβελτιωτικά.

Η εργασία χωρίζεται σε δυο μέρη. Στο εισαγωγικό μέρος γίνεται μια γενική ανασκόπηση των γνωστών δεδομένων στον τομέα της βιολογικής καταπολέμησης των εδαφογενών παθογόνων των φυτών. Στο πειραματικό μέρος αναλύονται οι πειραματικές εργασίες και τα αποτελέσματα της μελέτης διαφόρων μικροοργανισμών εναντίον φυτοπαθογόνων εδάφους. Οι μικροοργανισμοί αυτοί απομονώθηκαν από τρία διαφορετικά εδαφοβελτιωτικά και ελέγχθηκαν *in vitro* για την δυνατότητα τους να ανταγωνίζονται παθογόνους μύκητες εδάφους. Τα αποτελέσματα του πειράματος αυτού αποδείχθηκαν πολύ ενθαρρυντικά καθώς βρέθηκαν μικροοργανισμοί οι οποίοι είχαν την ικανότητα να ανταγωνίζονται παθογόνους μύκητες εδάφους σε εργαστηριακό επίπεδο. Αναμένεται ο περαιτέρω έλεγχος και επιβεβαίωση αυτών σε συνθήκες θερμοκηπίου.

## **ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

**Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΣΤΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ  
ΚΑΤΑΠΟΛΕΜΗΣΗ ΑΣΘΕΝΕΙΩΝ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ**

## 1. ΡΙΖΟΣΦΑΙΡΑ : ΕΝΝΟΙΑ ΚΑΙ ΣΗΜΑΣΙΑ

Έδαφος είναι το υλικό μέσα στο οποίο αναπτύσσονται τα φυτά. Έχει βάθος μερικά μόνο εκατοστά, αλλά είναι αχανές σε έκταση. Το έδαφος αντιπροσωπεύει ένα ετερογενές περιβάλλον το οποίο αποτελείται από στερεή, υγρή και αέρια φάση. Η υπερσχύουσα στερεή φάση αποτελείται από ανόργανα (άμμος, ύλη και άργιλος) και οργανικά στοιχεία. Το πρωταρχικό αυτό υπόστρωμα παρέχει στα φυτά στήριξη, εφοδιασμό με θρεπτικά συστατικά, επαρκείς ποσότητες νερού και ένα αερόβιο περιβάλλον κατάλληλο για τα ριζικά συστήματα.

Οι ρίζες των φυτών, εκτός από το να παρέχουν στήριξη και να εφοδιάζουν τα φυτά με τα απαραίτητα θρεπτικά στοιχεία και νερό, έχουν την ιδιότητα να εμπλουτίζουν, με διάφορους τρόπους, το έδαφος με θρεπτικά υλικά. Συγκεκριμένα έχει αποδειχθεί ότι οι ρίζες, μέσω των ριζικών εκκρίσεων, απελευθερώνουν στο έδαφος ζάχαρα, αμινοξέα, οργανικά οξέα, φαινολικά, πολυσακχαρίτες και άλλους αυξητικούς για τους μικροοργανισμούς παράγοντες. Επίσης για να αντιμετωπίσουν κάποιο εχθρό εκκρίνουν συγκεκριμένα μόρια και πρωτεΐνες (Stintzi και Browse, 2000, Stotz et al., 2000). Μέσω των ριζικών αυτών εκκρίσεων μεταφέρεται στη γύρω περιοχή σχεδόν 5 – 21% όλου του άνθρακα της φωτοσύνθεσης. Οι ριζικές εκκρίσεις είναι τα πιο αξιοσημείωτα μεταβολικά χαρακτηριστικά των ριζών (Marscher, 1995).

Σε φυσικές συνθήκες οι ρίζες είναι σε συνεχή επικοινωνία με τα ριζικά συστήματα των γειτονικών φυτών. Αυτό κατορθώνεται μέσω των εκκρίσεων που δρουν ως "σήματα" και έχουν την ικανότητα να αναγνωρίζουν την παρουσία προσβεβλημένων ριζών και να εμποδίζουν έτσι την επαφή με το υγιές ριζικό σύστημα. Αυτού του είδους η αλληλοπάθεια έχει σημαντικές επιπτώσεις για τη γεωργία.

Η ζώνη γύρω από την επιφάνεια των ριζών ονομάζεται "ριζόσφαιρα". Στη ζώνη αυτή παρατηρείται έντονη μικροβιακή δραστηριότητα. Οι μικροοργανισμοί της ριζόσφαιρας περιλαμβάνουν βακτήρια, ιούς, μύκητες, αρθρόποδα, ακάρεα,



αμοιβάδες, μαστιγοφόρα, ζύμες, ακτινομύκητες και φύκη (άλγη), οι οποίοι σε συνδυασμό με τις ρίζες αποτελούν ένα εξειδικευμένο οικοσύστημα (Ronira, 1991).

Εφήμερα κύτταρα των ριζών, όπως τα ριζικά τριχίδια, αποτελούν ιδανικό υπόστρωμα για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Γενικά οι μικροβιακοί πληθυσμοί της ριζόσφαιρας αγγίζουν τα επίπεδα του  $10^9$  κύτταρα ανά γραμμάριο εδάφους, πληθυσμοί 10 με 100 φορές μεγαλύτεροι από αυτούς που βρίσκονται έξω από τη ζώνη επιρροής της ρίζας (bulk soil). Οι μικροοργανισμοί αυτοί παίζουν καταλυτικό ρόλο στην υγεία και ανάπτυξη των φυτών. Συγκεκριμένα έχει αποδειχθεί ότι, ωφέλιμοι ως προς τα φυτά μικροοργανισμοί, αποικίζουν στις ρίζες των φυτών (ειδικά στελέχη που ανήκουν στα γένη *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Trichoderma spp.*) και ανταγωνίζονται παθογόνα των ριζών, ιδιαίτερα μύκητες (*Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora spp.*) οι οποίοι προκαλούν εκτεταμένες ζημιές στο ριζικό σύστημα των φυτών (Haas et al., 2002).

## 2. ΑΠΟΙΚΙΣΜΟΣ ΡΙΖΟΣΦΑΙΡΑΣ – ΡΙΖΟΒΑΚΤΗΡΙΑ

Ο “**αποικισμός της ριζόσφαιρας**” είναι μια διαδικασία κατά την οποία τα βακτήρια προσκολλούνται στην επιφάνεια του ριζικού συστήματος, το μολύνουν και τέλος το αποικίζουν. Με αυτό το τρόπο κατορθώνουν να επιβιώνουν. Τα βακτήρια αυτά ονομάζονται **ριζοβακτήρια**. Ο αποικισμός αυτός μπορεί να πραγματοποιηθεί από τα βακτήρια είτε στην εξωτερική και γύρω επιφάνεια των ριζών (ριζοσφαιρικά βακτήρια), είτε στο εσωτερικό της ρίζας (ενδοφυτικά βακτήρια).

Αποικιστής ριζών (root colonizer) ονομάζεται το βακτήριο το οποίο όταν εμβολιάζεται στο έδαφος ακολουθεί τις ρίζες, αναπαράγεται και επιβιώνει για πολλές εβδομάδες, παρά την παρουσία του ανταγωνισμού της ριζοσφαιρικής μικροχλωρίδας. Οι αποικιστές ριζών επιδρούν άμεσα ή έμμεσα στο ρυθμό ανάπτυξης των φυτών, μεταβάλλοντας τα διαθέσιμα, για το φυτό, θρεπτικά συστατικά, τη δομή του εδάφους και τη σύνθεση της μικροχλωρίδας ή παράγοντας φυτοτοξικούς μεταβολίτες. Η ικανότητα του βακτηριακού στελέχους να αποικίζει στη ριζόσφαιρα αποτελεί σημαντικό παράγοντα για την ανάπτυξη του φυτού (Loper et al., 1984).

Έχει προταθεί (Howie et al., 1987) ο διαχωρισμός της διαδικασίας αποικισμού της ριζοσφαιρας σε δυο φάσεις.

Στη πρώτη φάση τα βακτήρια έρχονται σε επαφή με τη ρίζα και στη συνέχεια μεταφέρονται προς το ακρορίζιο. Οι ριζικές εκκρίσεις ευθύνονται για την αρχική επαφή των βακτηρίων με την επιφάνεια της ρίζας. Καθώς η ρίζα επιμηκύνεται κάποια βακτήρια μεταφέρονται μαζί με το ακρορίζιο, ενώ άλλα παραμένουν ως πηγή εμβολιασμού σε παλαιότερα τμήματα της ρίζας.

Στη δεύτερη φάση τα βακτήρια διασκορπίζονται τοπικά και πολλαπλασιάζονται με ρυθμό που τους επιτρέπει ο ανταγωνισμός με άλλους μικροοργανισμούς. Τα βακτήρια τείνουν να συναθροίζονται ανάμεσα στα κύτταρα όπου τα θρεπτικά συστατικά είναι πιο άφθονα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να μένουν κάποια κομμάτια στις ρίζες ελεύθερα, χωρίς δηλαδή να αποικιστούν (Weller, 1988).

Ο όρος **αυξητικά ριζοβακτήρια** (Plant Growth – Promoting Rhizobacteria, PGPR) πρωτοκαθιερώθηκε το 1978 (Kloepper και Schroth, 1978) για να περιγραφούν τα ριζοβακτήρια εκείνα τα οποία επάγουν την αύξηση των φυτών μετά από μόλυνση των πολλαπλασιαστικών οργάνων τους. Τα βακτήρια αυτά έχουν την ικανότητα, όχι μόνο να προωθούν την ανάπτυξη των φυτών, αλλά να αυξάνουν την απόδοση της καλλιέργειας και να βοηθούν τα φυτά να αντεπεξέλθουν σε δυσμενείς περιβαλλοντικές συνθήκες (Kloepper et al., 1980 , Van Loon et al., 1998). Επίσης μειώνουν τις μολύνσεις των εδαφογενών παθογόνων συμβάλλοντας ουσιαστικά στην άμυνα των φυτών (Kloepper, 1992 Weller, 1988).

### **3. ΚΟΜΠΟΣΤ : ΘΡΕΨΗ - ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑ**

Τα οργανικά απόβλητα πάντα αποτελούσαν ένα μεγάλο πονοκέφαλο των εργοστασίων και των επιχειρήσεων μη ξέροντας που θα ήταν ασφαλές να διοχετευτούν. Η κομποστοποίηση είναι μια βιοχημική διαδικασία κατά την οποία τα οργανικά απόβλητα μετατρέπονται σε σταθερά θρεπτικά υποστρώματα που μοιάζουν με χούμο (Craft και Nelson, 1996, Ayoub, 1999). Έτσι σήμερα η κομποστοποίηση αποτελεί μια δυναμική βιοχημική διαδικασία που εκμεταλλεύεται ένα μεγάλο μέρος των αποβλήτων και βοηθάει στη μείωση της συσσώρευσης απορριμμάτων στη φύση.

### 3.1 ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΧΡΗΣΗΣ

Ο εναλλακτικός τρόπος διαχείρισης των αποβλήτων (κομποστοποίηση) χρησιμοποιείται ευρέως για να εξασφαλιστεί η σωστή θρέψη των φυτών και η επαναδιοργάνωση της γης. Εδάφη τα οποία έχουν εξασθενήσει από την υπερβολική καλλιέργεια και τις εκτεταμένες καλλιεργητικές τεχνικές, βελτιώνονται σημαντικά με τη προσθήκη κομπόστ. Με την ενσωμάτωση στο έδαφος τέτοιων παραπροϊόντων βελτιώνουμε τις φυσικές ιδιότητες του εδάφους, όπως την υφή και τη δομή του (Agoola, 1990, Smith et al., 1992, Hague et al., 1995, Tomati et al., 1996, Ehaliotis et al., 1998, Gagnon and Simard, 1999, Ouedraogo et al., 2001, Akanbi et al., 2002, Soumare et al., 2003). Αποτρέπεται έτσι η διάβρωση και αυξάνεται η σταθερότητα και συνεκτικότητα του χώματος (Roldan et al., 1996, Gerhard, 1997, Bazzoffi et al., 1998, Edwards et al., 2000). Επίσης αυξάνεται το πορώδες του εδάφους και η υδατοϊκανότητά του (Juo, 1990, Woomer et al., 1994, Aggelides et al., 2000, Ouedraogo et al., 2001, Manios, 2003). Το πιο σημαντικό όμως είναι ότι το έδαφος εμπλουτίζεται με οργανική ουσία η οποία είναι στενά συνδεδεμένη με την αύξηση της μικροβιακής δραστηριότητας στη περιοχή αυτή.

### 3.2 ΚΑΤΑΣΤΑΛΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΕΝΑΝΤΙΑ ΣΕ ΠΑΘΟΓΟΝΑ

Έχει αναφερθεί σε πολλές εργασίες η ικανότητα που παρουσιάζουν κομποστοποιημένα οργανικά εδαφοβελτιωτικά ενάντια σε παθογόνα φυτών περιλαμβανομένων βακτηρίων, μυκήτων και νηματωδών (Hoitink και Fahy, 1986, Oka και Yermiyahu, 2002). Οι περισσότερες αναφορές εστιάζουν το ενδιαφέρον τους στην ανταγωνιστική δραστηριότητα ενάντια σε ορισμένους ωομύκητες όπως *Pythium sp.* (Mandelbaum και Handar, 1990, Ben-Yephet και Nelson, 1999) και *Phytophthora sp.* (Lumsden et al., 1981), αλλά και σε πολλούς δευτερομύκητες όπως το *Fusarium spp.* (Trillas-Gay et al., 1986, Coxrarrere et al., 2002), η *Rhizoctonia solani* (Nelson et al., 1983, Diab et al., 2003), το *Verticillium* και ασκομύκητες όπως η *Sclerotinia homeocarpa* (Boulter et al., 2002). Οι γνώσεις μας για τη διαδικασία με την οποία τα οργανικά βελτιωτικά επηρεάζουν το αποτέλεσμα της ασθένειας είναι ακόμη πολύ περιορισμένες λόγω της πολυπλοκότητας και της ετερογένειας που παρουσιάζουν τα οργανικά μείγματα.

Λαμβάνοντας υπόψη τους βιολογικούς και χημικούς παράγοντες, συμπεραίνεται ότι η καταστολή των ασθενειών οφείλεται στη δράση των μικροοργανισμών που βρίσκονται στα κομπόστ (Hoitink και Boehm, 1999). Η ανταγωνιστική δράση μπορεί να προκύψει και να εκδηλωθεί ως μικροβιακός ανταγωνισμός για θρεπτικά στοιχεία, όπως τα λιπαρά οξέα που εκκρίνονται από τους σπόρους (McKellar και Nelson, 2003), ως παρασιτισμός ή παραγωγή υδρολυτικών ενζύμων και ως επίδραση των αντιμυκητιακών παραγόντων (Singh et al., 2003).

#### **4. ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΚΑΤΑΠΟΛΕΜΗΣΗ ΦΥΤΟΠΑΘΟΓΟΝΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΑΠΟ ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ**

##### **4.1 ΓΕΝΙΚΑ**

Οι συνέπειες της χρήσης χημικών και μικροβιοκτόνων είναι ορατές τόσο στο γύρω φυσικό περιβάλλον όσο και στην ανθρώπινη υγεία. Η προσπάθεια να μειωθούν τα χημικά σκευάσματα που χρησιμοποιούνται στη γεωργία για τη καταστολή φυτοπαθογόνων, αποτελεί αφορμή για τη χρήση βιολογικών παραγόντων.

Τα τελευταία χρόνια, το ενδιαφέρον για τη βιολογική καταπολέμηση των παθογόνων έχει αυξηθεί. Ως βιολογική καταπολέμηση των ασθενειών των φυτών, ορίζεται η μείωση της μόλυνσης ή της δράσης της ασθένειας που προκαλείται από κάποιο παθογόνο, χρησιμοποιώντας ορισμένους μικροοργανισμούς (Roberts και Lohrke, 2003).

##### **4.2 ΤΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ ΩΣ ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΙ ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΕΣ**

Προσπάθειες για τη χρησιμοποίηση βακτηρίων ως βιολογικών ανταγωνιστών έχουν ξεκινήσει από τις αρχές του αιώνα. Το ενδιαφέρον στο πεδίο αυτό αυξήθηκε ιδιαίτερα στα μέσα της δεκαετίας του '60 οπότε και ξεκίνησε πλήθος πειραματικών εφαρμογών (Weller M.D., 1988). Τα βακτήρια της ριζόσφαιρας με ικανότητα να παρέχουν βιολογική αντιμετώπιση ασθενειών είναι λιγότερα από 10% του συνολικού πληθυσμού των ριζοβακτηρίων.

Τα τελευταία 30 χρόνια έχουν απομονωθεί, χαρακτηριστεί και ελεγχθεί για την ανταγωνιστική τους δράση αρκετοί εδαφικοί μικροοργανισμοί. Μελέτες έχουν δείξει ότι μικροοργανισμοί, ειδικά κάποια στελέχη που ανήκουν στις ψευδομονάδες, στους βάκιλλους, στους στρεπτομύκητες και στα τριχόδερμα, ασκούν ανταγωνιστική δραστηριότητα ενάντια σε εδαφογενή παθογόνα.

Αναλυτικά η βιολογική καταπολέμηση στις ασθένειες που προκαλούν τα είδη του γένους *Fusarium sp.*, μπορεί να επιτευχθεί με μύκητες των γενών *Trichoderma sp.*, *Penicillium sp.* και με το βακτήριο *Bacillus subtilis*. Στελέχη του *Bacillus subtilis*, απεδείχθη ότι δρουν ανταγωνιστικά στην αποίκιση της ριζόσφαιρας και περιορίζουν την προσβολή από το *Fusarium sp* στο 50% (Bochow et al., 2001). Παρόμοια δράση είχε και το στέλεχος PCL 1391 του βακτηρίου *Pseudomonas chlororaphis* (Woeng et al., 1998).

Στελέχη των *Pseudomonas fluorescens* και μη παθογόνα στελέχη του *Fusarium oxysporum*, κατέχουν σημαντικό ρόλο στο βιολογικό έλεγχο της ασθένειας που προκαλεί το παθογόνο *Fusarium oxysporum* (Mazzola, 2002). Στα κατασταλτικά εδάφη, οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των παθογόνων και των μη παθογόνων στελεχών του *Fusarium oxysporum*, επιδρούν στον έλεγχο της ασθένειας που προκαλεί το *Fusarium oxysporum* (Fravel, Olivain and Alabouvette, 2003).

Όλα τα παραπάνω αποτελέσματα είναι πάρα πολύ ενθαρρυντικά για το μέλλον της βιολογικής καταπολέμησης με τη χρήση ανταγωνιστικών βακτηρίων όμως τα αποτελέσματα αυτά δεν έχουν εξακριβωθεί, καταμετρηθεί και επαναληφθεί επιτυχώς στη πράξη. Επίσης αυτό που δεν θα πρέπει να ξεχνάμε είναι το γεγονός ότι δεν υπάρχει συσχέτιση της ικανότητας ενός βακτηρίου στο να αναπτύξει ζώνη παρεμπόδισης στο παθογόνο *in vitro* με το να καταφέρει να καταστείλει την ασθένεια στον αγρό από το ίδιο παθογόνο. Στελέχη που δημιουργούν τη μεγαλύτερη ζώνη παρεμπόδισης στο τριβλίο δεν είναι πάντα και οι καλύτεροι βιολογικοί ανταγωνιστές. Γι'αυτό επιβάλλεται το κάθε στέλεχος να δοκιμάζεται και σε πειράματα θερμοκηπίου.

### 4.3 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΙΔΡΟΥΝ ΣΤΗΝ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΚΑΤΑΣΤΟΛΗ ΤΗΣ ΑΣΘΕΝΕΙΑΣ

Έχει αποδειχθεί ότι μεγάλο πλήθος βιολογικών δραστηριοτήτων παίρνουν μέρος για την επιτυχή βιολογική καταστολή των ασθενειών που προκαλούνται από εδαφικά παθογόνα. Σε αυτές συμπεριλαμβάνονται : η ικανότητα αποίκισης του κατάλληλου ξενιστή, η παραγωγή ανταγωνιστικών ενώσεων όπως αντιβιοτικά, τοξίνες, σιδηροφόρα, αμμωνία, κυανιδίνη και υδρολυτικά ένζυμα και ο παρασιτισμός. Επίσης, τα ανταγωνιστικά βακτήρια μπορούν να προστατεύσουν το φυτό μέσω της επαγωγής των μηχανισμών αντοχής του φυτού, της απαλοιφής των σημάτων που προάγουν την ανάπτυξη του παθογόνου και του ανταγωνισμού των θρεπτικών στοιχείων (Baker, 1968 Lam et al., 1993. Thomashow and Weller,1996). Πολύ σημαντικό ρόλο παίζει και η επιτυχής εδραίωση του βακτηριακού πληθυσμού στη ριζόσφαιρα, έτσι ώστε να δημιουργούνται οι κατάλληλες συνθήκες για την αντιμετώπιση των παθογόνων. Πολλοί εδαφικοί παράγοντες, όπως η θερμοκρασία, η εδαφική υγρασία, το Ph και η περιεκτικότητα της αργίλου, επηρεάζουν την επιβίωση και την εγκατάσταση των βακτηρίων και τις άλλες αλληλεπιδράσεις τους με το παθογόνο (Weller, 1988).

### 4.4. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ

Τα αντιβιοτικά αποτελούν μια ετερογενή ομάδα οργανικών ενώσεων, χαμηλού μοριακού βάρους και μικροβιακής προελεύσεως. Σε μικρές συγκεντρώσεις παρεμποδίζουν την ανάπτυξη ή κάποιες μεταβολικές διαδικασίες ορισμένων μικροοργανισμών, συμβάλλοντας στη καταστολή των παθογόνων (Fravel, 1988, Thomashow and Weller,1996). Η παραγωγή των αντιβιοτικών ενδεχομένως να μειώνει ή να παρεμποδίζει την παραγωγή των πολλαπλασιαστικών μονάδων του παθογόνου ή να εμποδίζει την ανάπτυξη του. Τα περισσότερα αντιβιοτικά παράγονται από εδαφογενείς μικροοργανισμούς. Η αντιβίωση είναι ένας πολύ αποτελεσματικός μηχανισμός καταστολής των παθογόνων της ριζόσφαιρας (Fravel, 1988).



Σε πολλές μελέτες έχει αποδειχθεί ότι ένα ή περισσότερα αντιβιοτικά παίζουν σημαντικό ρόλο στην καταστολή της εκάστοτε ασθένειας. Τα περισσότερα δεδομένα που αφορούν την παραγωγή αντιβιοτικών αντλούνται από μετρήσεις που εφαρμόζονται *in vitro*. Εξαιτίας της πολυπλοκότητας του εδάφους παρουσιάζονται δυσκολίες στην ανεύρεση αντιβιοτικών ουσιών στο φυσικό περιβάλλον. Οι τεχνικές ανίχνευσης τους στο έδαφος συνεχώς βελτιώνονται (Fravel, 1988). Συνεπώς, η παραγωγή αντιβιοτικών *in vitro* δεν συνεπάγεται οπωσδήποτε και παραγωγή αντιβιοτικών *in vivo*. Τέλος κάτι που πρέπει να ξεκαθαριστεί είναι το γεγονός ότι η παραγωγή αντιβιοτικών *in vitro* αποτελεί χαρακτηριστικό πολλών ριζοσφαιρικών βακτηρίων και δεν μπορεί να αποτελεί και το μοναδικό κριτήριο ικανότητας τους αντιμετώπισης ασθενειών ή της αύξησης του ρυθμού ανάπτυξης του φυτού (Fravel, 1988).

Η παραγωγή των αντιβιοτικών επηρεάζεται τόσο από βιοτικούς όσο και από αβιοτικούς παράγοντες. Το οξυγόνο, η θερμοκρασία, η υγρασία, το ΡΗ, οι πηγές του άνθρακα και τα μικροστοιχεία παίζουν σημαντικό ρόλο στην παραγωγή των αντιβιοτικών. Μεταξύ των βιοτικών παραγόντων καθοριστικό ρόλο παίζουν το φυτό ξενιστής, το παθογόνο, η μικροχλωρίδα της περιοχής, η πυκνότητα των κυττάρων του παραγόμενου στελέχους, η ποικίλη έκφραση γονιδίων και η ελλιπής αποίκηση του φυτού του ξενιστή από τον βιολογικό παράγοντα (Βενιεράκη Α.Σ., 2002).

Τα βακτηριακά στελέχη που λειτουργούν ως βιοπαράγοντες παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλομορφία όσον αφορά το είδος και τον αριθμό των αντιβιοτικών που παράγουν. Η παραγωγή του αντιβιοτικού **ωομυκίνη Α** γίνεται από το στέλεχος του βακτηρίου *P. fluorescens* και το *Pseudomonas putida* συμβάλλοντας στη καταστολή της σηψιρριζίας (*Pythium sp.*) στο σιτάρι (Thomashow and Weller, 1996). Οι **φenaζίνες** είναι αντιβιοτικά που παράγονται από τα στελέχη του *P. fluorescens* 2-79 και *Pseudomonas aureofaciens* 30-84 που καταστέλλουν την ανάπτυξη του *Gaeumanomyces graminis var. tritici*. Οι **φλορογλουσινόλες** είναι αντιβιοτικά μεταβολίτες βακτηριακής και φυτικής προέλευσης με αντιβακτηριακή και αντιμυκητιακή δράση με φυτοτοξικές, κάποιες φορές, ιδιότητες.

Η **2,4 διακετυλοφλορογλουσινόλη** παράγεται από φθορίζουσες ψευδομονάδες, ευρέως διαδεδομένες, και έχει χρησιμοποιηθεί εναντίον των μυκήτων *Thielaviopsis basicola* και *Pythium ultimum*. (Βενιεράκη Α.Σ., 2002). Άλλα αντιβιοτικά παραγόμενα από ψευδομονάδες είναι η **πυολουτεορίνη** με ανταγωνιστική δράση ενάντια στους μύκητες *P.ultimum*, *Verticillium dahliae*, *Alternaria sp.*, *Fusarium sp.*, *Rh.solani* και *T.basicol* και η **πυρολνιτρίνη** ενάντια στο μύκητα *Aphanomyces cochliodes* και στον *Rh.solani* (Haas, Keel και Reimmann, 2002).

Διάφορα στελέχη των βακίλων επίσης, παράγουν αντιβιοτικά που μπορεί να δράσουν αποτελεσματικά ως καταστολείς ασθενειών και αποτελούν δυναμικούς παράγοντες βιολογικής αντιμετώπισης. Έχει αποδειχθεί ότι το στέλεχος του *Bacillus cereus* UW85 έχει κατασταλτική δράση σε ασθένειες που προκαλούνται από ωομύκητες. Επίσης ανάλυση μεταλλαγμένων στελεχών του *Bacillus cereus* έδειξαν ότι η κατασταλτικότητα που εμφανίζεται οφείλεται στη παραγωγή δυο αντιβιοτικών, της **ζβιττερμυκίνης** και της **κανοσαμίνης**. Τα αντιβιοτικά αυτά καταστέλλουν τις ασθένειες και παρεμποδίζουν την ανάπτυξη των ωομυκητών (Raaijmakers Vlami και Souza, 2002).

#### 4.5 ΤΡΟΦΙΚΟΣ ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΜΟΣ (ΣΙΔΗΡΟΦΟΡΑ)

Τα περισσότερα θρεπτικά συστατικά στη περιοχή της ριζόσφαιρας προέρχονται από τις εκκρίσεις των ριζών. Οι μικροοργανισμοί ανταγωνίζονται μεταξύ τους για τροφή και για βασικά θρεπτικά στοιχεία στο έδαφος. Ο ανταγωνισμός μεταξύ των βιολογικών παραγόντων και του παθογόνου μπορεί να οδηγήσει στη μείωση της δράσης του παθογόνου λόγω έλλειψης απαραίτητων συστατικών. Μεγάλοι πληθυσμοί βακτηρίων, εγκαθίσταται στο ριζικό σύστημα και καταναλώνουν το διαθέσιμο ποσοστό του άνθρακα και του αζώτου που είναι απαραίτητα για την ενεργοποίηση των μορφών διαχείμασης των παθογόνων ή για τον αποικισμό της ριζόσφαιρας (Thomashow and Weller, 1996).

Το πιο χαρακτηριστικό παράδειγμα αυτής της περίπτωσης είναι ο θρεπτικός ανταγωνισμός για το σίδηρο. Ο σίδηρος βρίσκεται στο έδαφος σε άφθονες ποσότητες, αλλά επί το πλείστον απαντάται στην αδιάλυτη μορφή του, το υδροξείδιο του



σιδήρου. Η μορφή αυτή δεν είναι αφομοιώσιμη από τα βακτήρια. Για το λόγο αυτό τα βακτήρια διαθέτουν ειδικούς μηχανισμούς δέσμευσης του σιδήρου στα κύτταρα τους.

Τα σιδηροφόρα είναι ενώσεις μικρού μοριακού βάρους οι οποίες μεταφέρουν τα ιόντα σιδήρου στα κύτταρα ορισμένων βακτηρίων (Handelsman, 1996). Έτσι τα σιδηροφόρα συμβάλλουν στη μείωση των ιόντων σιδήρου στη ριζόσφαιρα, έχοντας ως αποτέλεσμα τη μείωση της ανάπτυξης των παθογόνων. Αυτό συμβαίνει γιατί τα παθογόνα παρουσιάζουν ευαισθησία στη παρουσία των σιδηροφόρων επειδή i) δεν μπορούν να παράγουν μεγάλες ποσότητες σιδηροφόρων, ii) είναι ανίκανα να χρησιμοποιήσουν τα σιδηροφόρα που παράγονται από τα βακτήρια και iii) οι μικρές παραγόμενες ποσότητες σιδηροφόρων που παράγουν, μπορεί να χρησιμοποιηθούν από τους ανταγωνιστές (Weller, 1988).

Ο Kloepper, 1980 ήταν ο πρώτος που απέδειξε τη σημαντικότητα της παραγωγής σιδηροφόρων, ως μηχανισμού του βιολογικού ελέγχου. Έχει αποδειχθεί ότι τα σιδηροφόρα εμπλέκονται στη καταστολή του *Fusarium oxysporum*, του *G.graminis var. tritici* και του *Pythium sp.*

#### 4.6 ΠΤΗΤΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ

Ορισμένα βακτήρια ασκούν ανταγωνιστική δράση κατά ορισμένων παθογόνων οφειλόμενη στη παραγωγή πτητικών ουσιών. Στελέχη του *Enterobacter cloacae* παρουσιάζουν ανταγωνιστική δράση εναντίων μυκήτων του γένους *Pythium sp.* σε φυτά αγγουριάς, τοματιάς, βαμβακιού, φασολιού και τεύτλου, προκαλώντας παρεμπόδιση της αύξησης των υφών του μύκητα και συγκόλληση των κυτταρικών τοιχωμάτων του. Η ουσία που είναι υπεύθυνη δεν είναι αντιβιοτικό, τοξίνη ή ένζυμο που προκαλεί λύση των κυττάρων. Προσδιορίστηκε ότι η ουσία, στην οποία οφείλεται η παρεμποδιστική δράση, είναι η αμμωνία. Στελέχη του *Pseudomonas fluoerescens*, όπως το CHA0 παράγουν ομοίως πτητικές ουσίες, μια εκ των οποίων είναι το υδροκυάνιο (Lam et al., 1993).

#### 4.7 ΠΑΡΑΣΙΤΙΣΜΟΣ - ΥΔΡΟΛΥΤΙΚΑ ΕΝΖΥΜΑ

Ο παρασιτισμός είναι ένα φαινόμενο, κατά την εκδήλωση του οποίου, οι ανταγωνιστικοί μικροοργανισμοί παράγουν συγκεκριμένα ένζυμα που προκαλούν λύση των κυττάρων των παθογόνων μυκήτων. Η ιδιότητα αυτή μπορεί να αποτελέσει χρήσιμο εργαλείο στη βιολογική καταπολέμηση παθογόνων μικροοργανισμών.

Ένζυμα όπως οι χιτινάσες ή οι γλουκανάσες, παράγονται από τους βιολογικούς παράγοντες και έχει αποδειχθεί ότι ευθύνονται για την καταστολή των παθογόνων των φυτών. Η χιτίνη και η γλουκάνη είναι βασικά συστατικά των κυτταρικών τοιχωμάτων των μυκήτων, οπότε τα υδρολυτικά αυτά ένζυμα μπορούν να τις αποδιατάξουν.

Η βιοσύνθεση των ενζύμων ως μηχανισμός στη διαδικασία της βιολογικής καταπολέμησης, προτάθηκε από τους Karat et al., 1996 και Elad και Karat, 1999, οι οποίοι υποστήριξαν ότι η βιολογική καταπολέμηση του *B.cinerea* από το *T.harzianum* στα φύλλα του φασολιού, οφείλεται στη δράση των πρωτεασών που παράγονται από το *T.harzianum* και αδρανοποιούν τα υδρολυτικά ένζυμα που παράγονται από τον *B.cinerea*.

Ο παρασιτισμός αυτού του είδους εκδηλώνεται κυρίως ως μυκοπαρασιτισμός και οι μύκητες που λαμβάνουν μέρος στη βιολογική καταπολέμηση παράγουν σειρά λυτικών ενζύμων τα οποία έχουν ατομική δράση ή συνεργιστική δράση σε μείγματα μεταξύ τους ή με αντιβιοτικά για την εξασθένηση των κυτταρικών τοιχωμάτων των παθογόνων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι οι μύκητες *Trichoderma spp.* και *Gliocladium virens*, αλλά η συμβολή τους στην καταστολή της ασθένειας παραμένει αβέβαιη.

#### 4.8 ΕΠΑΓΟΜΕΝΗ ΑΝΤΟΧΗ

Η αντοχή των φυτών κατά των ασθενειών υποδηλώνεται με περιορισμό των συμπτωμάτων, απεικονίζοντας την ανικανότητα του παθογόνου να αναπτυχθεί, να πολλαπλασιαστεί και να διαδοθεί.

Η επαγόμενη αντοχή είναι το φαινόμενο κατά το οποίο το φυτό παρουσιάζει αυξημένη αμυντική ικανότητα λόγω κατάλληλης διέγερσης των ενεργών αμυντικών μηχανισμών του από ένα παθογόνο (Van Loon, 1997). Δηλαδή το ανοσοποιητικό σύστημα του φυτού, είναι βασισμένο σε μια πολύπλοκη αντίδραση, με την οποία το φυτό έχει την ικανότητα να αναγνωρίζει τους εχθρούς και να αντιδρά εναντίον τους.

Για να καταπολεμήσει παθογόνα και έντομα, χρησιμοποιεί φυσικά και χημικά εμπόδια, όπως μηχανισμούς άμυνας, οι οποίοι ενεργοποιούνται σύμφωνα με την επίθεση. Οι δραστηριοποιήσεις άμυνας ρυθμίζονται από ένα δίκτυο αλληλοσυνδεδεμένων μονοπατιών μετατροπής των ορμονών σημάτων, όπως το σαλικυλικό οξύ (SA), το γιασμονικό οξύ (JA) και το αιθυλένιο (ET). Επίσης μπορούν να εμπλέκονται κάποιες άλλες ορμόνες όπως τα μπρασινανοστεροειδή και το αποσχισικό οξύ. Οι συγκεντρώσεις των SA, ET, JA σε σχέση με τη μόλυνση από το παθογόνο ή τους τραυματισμούς που προκαλούνται στο φυτό από φυτοφάγα ζώα, οδηγούν στην ενεργοποίηση των γονιδίων που σχετίζονται με την άμυνα του φυτού (Pieterse και Van Loon, 2004).

Εκτός από την αντίδραση τους σε μία τοπική επίθεση, μπορούν να οργανώσουν μια διασυστηματική αντίδραση, η οποία προσδίδει αυξημένη αμυντική ικανότητα, ακόμη και στα σημεία που βρίσκονται πιο μακριά από το σημείο της αρχικής εισβολής.

Οι μηχανισμοί επαγόμενης αντοχής είναι : 1) η επίκτητη διασυστηματική αντοχή (Systemic Acquired Resistance, **SAR**) και 2) η επαγόμενη διασυστηματική αντοχή (Induced Systemic Resistance, **ISR**)

Η **SAR** αποτελεί αντίδραση σε μια τοπική μόλυνση ή σε κάποιο εξασθενημένο παθογόνο και εκδηλώνεται διασυστηματικά ως μεταγενέστερη ανθεκτικότητα σε ένα ευρύ φάσμα άλλων παθογόνων.

Οι παράγοντες που παίζουν ρόλο στην εμφάνιση της **SAR** είναι οι εξής : 1) τα παθογόνα, 2) οι μη παθογόνοι μικροοργανισμοί, 3) οι μη μολυσματικές μορφές παθογόνων μικροοργανισμών, 4) οι παθογόνοι μικροοργανισμοί που καθίστανται μη μολυσματικοί από συγκεκριμένες περιβαλλοντικές συνθήκες, 5) οι ασυμβίβαστες

φυλές παθογόνων μικροοργανισμών, 6) οι μεγαλομοριακές ενώσεις παθογόνων, 7) οι χημικές ενώσεις, 8) τα φυτικά εκχυλίσματα (Van Loon, 1998).

Η **ISR** είναι ένας μηχανισμός αντίστασης του φυτού ο οποίος ενεργοποιείται κατά την αποίκιση των ριζών από επιλεγμένα στελέχη μη παθογόνων ριζοβακτηρίων. Πρόκειται για ένα μηχανισμό εξίσου αποτελεσματικό εναντίων μυκητολογικών, βακτηριολογικών και ιολογικών ασθενειών των φυτών.

Η διάρκεια της αποτελεσματικότητας της θεωρείται μεγαλύτερη από εκείνη των μυκητοκτόνων εξειδικευμένης δράσης. Επίσης το φαινόμενο αυτό εμφανίζεται διασυστηματικά, σε αντίθεση με τα μυκητοκτόνα μη εξειδικευμένης δράσης τα οποία είναι προστατευτικά.

Τα φυτά αντιδρούν ενεργοποιώντας τους μηχανισμούς τους μόνο σε περίπτωση ανάγκης και συγκεκριμένα για τα ετήσια φυτά, ο μηχανισμός αυτός τα προστατεύει καθ' όλη τη διάρκεια του βιολογικού κύκλου τους. Η ανοσοποίηση αυτή μπορεί να μεταδίδεται από το υποκείμενο στο εμβόλιο. Τέλος είναι εξακριβωμένο και απολύτως λογικό ότι, τόσο ο άνθρωπος όσο και το περιβάλλον, δεν διατρέχουν κανένα κίνδυνο, αφού κατά την ανοσοποίηση χρησιμοποιούνται μηχανισμοί που προϋπήρχαν στα φυτά (Kuc, 1990).

Το μόνο μειονέκτημα που έχει αυτός ο μηχανισμός επαγωγής ανθεκτικότητας είναι ότι δεν εμφανίζεται οικονομικά ανταγωνισμός σε σχέση με τη χημική καταπολέμηση, αν και η αποτελεσματικότητά του είναι συγκρίσιμη με εκείνη των διασυστηματικών μυκητοκτόνων.

## **ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ  
ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ**

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το πείραμα που αναφέρεται στη παρούσα εργασία διεξήχθη από την 21<sup>η</sup> Σεπτεμβρίου 2003 έως την 26<sup>η</sup> Ιουνίου 2004 και πραγματοποιήθηκε στις εργαστηριακές εγκαταστάσεις του Εθνικού Ινστιτούτου Αγροτικής Έρευνας (ΕΘ.ΙΑΓ.Ε).

Με τη παρούσα μελέτη επιδιώχθηκαν τα εξής :

1) Στο πρώτο σκέλος του πειράματος απομονώσαμε, από κομπόστ με επισχετική δράση, ένα μεγάλο αριθμό μικροοργανισμών (βακτηρίων και μυκήτων). Οι μικροοργανισμοί αυτοί απομονώθηκαν από τη ριζόσφαιρα αλλά και μέσα από τις ρίζες φυτών τομάτας.

2) Ως δεύτερο σκέλος της εργασίας διερευνήθηκε *in vitro* η ανταγωνιστική δράση που τυχόν παρουσίαζαν οι απομονωμένοι μικροοργανισμοί στην ανάπτυξη παθογόνων μυκήτων. Το μέρος αυτό αποτελεί το μεγαλύτερο κομμάτι του πειράματος. Τα βακτήρια και οι μύκητες που εμπόδισαν τη φυσιολογική ανάπτυξη των παθογόνων μυκήτων επιλέχθηκαν από όλους τους υπόλοιπους μικροοργανισμούς και συνεχίστηκε ο πειραματικός τους έλεγχος.

3) Στο τρίτο σκέλος τα “ικανά” στελέχη ελέγχθηκαν, με μια σειρά ενζυμικών δοκιμών, αν έχουν την ικανότητα να παράγουν συγκεκριμένα ένζυμα τα οποία καταλύουν διαφορετικά δομικά μέρη των παθογόνων μυκήτων. Ο έλεγχος αυτός έγινε για να διερευνήσουμε σε ποιο μηχανισμό οφείλεται η ανταγωνιστική δράση που εμφανίζουν οι μικροοργανισμοί ενάντια σε συγκεκριμένα παθογόνα.

4) Το τελευταίο σκέλος του πειράματος είχε ως στόχο τον έλεγχο *in planta* των ανταγωνιστικών βακτηρίων. Δηλαδή θα πρέπει να ελέγξουμε αν τα συγκεκριμένα ανταγωνιστικά βακτήρια προστατεύουν τα φυτά από τους παθογόνους μύκητες σε <<πραγματικές>> συνθήκες ανάπτυξης. Το μέρος αυτό δεν αναφέρεται ολοκληρωμένο στη συγκεκριμένη πτυχιακή εργασία.

## 1. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 1.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

Ο σκοπός του πειράματος είναι η απομόνωση από κομπόστ στελέχους βακτηρίου ή μύκητα το οποίο να ασκεί ανταγωνιστική δράση στην ανάπτυξη παθογόνων μυκήτων. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν τρία διαφορετικά είδη κομπόστ στα οποία, σε προηγούμενες έρευνες, είχε παρατηρηθεί ανθεκτικότητα φυτών τομάτας *Lycopersicon esculendum* ενάντια σε παθογόνους μικροοργανισμούς (Καβρουλάκης Ν. και συναργάτες, 2004 και Ntougias et. al., 2003).

Το πρώτο κομπόστ Kal 1 προέρχεται από στέμφυλα και πυρηνόξυλο. Το δεύτερο Kal 2 προέρχεται από ελαιόφυλλα και ελαιόζουμα και το τρίτο Kal 3 από εξαντλημένο υπόστρωμα καλλιέργειας μανιταριών.

Το πρώτο βήμα του πειράματος ήταν η παρασκευή διαλύματος 3% w/v από το Kal 1 σε κωνική φιάλη των 250 ml (3 gr από το Kal 1 σε 100 ml απιονισμένο νερό). Στη συνέχεια έγιναν δυο διαδοχικές αραιώσεις περιεκτικότητας 10%. Η ίδια διαδικασία επαναλαμβάνεται και με τα άλλα δυο κομπόστ (Kal 2 και Kal 3).

Από τη πρώτη αραιώση του Kal 1 πήραμε με μια πιπέτα 500μl και τα τοποθετήσαμε σε τριβλία με θρεπτικά υλικά PSM, TSM, FSM, LB, PDA, και KINGS. Η εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε στο θάλαμο νηματικής ροής. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται ομοίως και για τη δεύτερη αραιώση αλλά και για τα υπόλοιπα κομπόστ αντίστοιχα.

Τα τριβλία σφραγίστηκαν καλά και τοποθετήθηκαν σε θάλαμο επώασης ρυθμισμένο στους 25 °C. Μετά από μια με δυο μέρες έγινε έλεγχος στα τριβλία και ανακαλλιέργεια των ανεπτυγμένων μικροοργανισμών σε ξεχωριστά υποστρώματα. Η διαδικασία επαναλήφθηκε έως ότου αποκτήσαμε ένα καθαρό και μοναδιαίο στέλεχος του επιθυμητού μικροοργανισμού. Με την παραπάνω εργασία απομονώθηκαν ριζοσφαιρικοί μικροοργανισμοί.

Ταυτόχρονα με αυτό απομονώθηκαν και ενδοφυτικοί οργανισμοί. Οι ενδοφυτικοί οργανισμοί απομονώθηκαν από τις ρίζες φυτών τομάτας οι σπόροι των οποίων σπάρθηκαν σε γλαστράκια που το κάθε ένα περιείχε 48 gr τύρφης και 16 gr από το Kal 1. Ομοίως έγινε και για τα Kal 2 και Kal 3. Οι σπόροι της τομάτας επιβάλλεται πριν τη σπορά να απολυμανθούν σε διάλυμα χλωρίνης 10% για 5 λεπτά έτσι ώστε τα φυτά να απαλλαγθούν από τυχόν επιπλέον μικροβιακό φορτίο.

Μόλις τα φυτά έβγαλαν το πρώτο πραγματικό φυλλαράκι τους τα ξεριζώσαμε με προσοχή και με ειδικό νυστέρι κόψαμε τη περιοχή της ρίζας. Αφού η ρίζα καθαρίστηκε προσεχτικά τοποθετήθηκε ένα μικρό κομματάκι πάνω σε κάθε θρεπτικό υπόστρωμα PSM, TSM, FSM, LB, PDA, KINGS. Στη συνέχεια τα τριβλία τοποθετήθηκαν σε θάλαμο επώασης ρυθμισμένο στους 25<sup>0</sup>C. Ομοίως και με τα ενδοφυτικά, κάναμε έλεγχο και ανακαλλιέργειες έως ότου αποκτήσαμε μοναδιαίες και καθαρές αποικίες.

## 1.2 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΚΑΙ ΜΥΚΗΤΩΝ

Η καλλιέργεια των μικροοργανισμών έγινε σε κατάλληλα θρεπτικά υποστρώματα ξεχωριστά για το καθένα. Τα θρεπτικά αυτά υλικά περιέχουν διαφορετικά συστατικά έτσι ώστε να καλύπτουν τις ιδιαιτερότητες του κάθε μικροοργανισμού. Αντίστοιχος πίνακας με τα αναλυτικά στοιχεία του κάθε υποστρώματος ανάπτυξης αναφέρεται παρακάτω στη παράγραφο 1.4 του πειραματικού μέρους.

Οι καλλιέργειες μπορούν να πραγματοποιηθούν είτε σε στερεό είτε σε υγρό υπόστρωμα. Οι υγρές καλλιέργειες τοποθετήθηκαν για ανάπτυξη στο orbital στους 25<sup>0</sup>C. Σε αυτό το θάλαμο επώασης γίνεται συνεχής ανάδευση έτσι ώστε να παρέχεται το απαραίτητο οξυγόνο στους μικροοργανισμούς μέχρι να αναπτυχθούν. Ο χρόνος παραμονής εξαρτάται από το είδος των μικροοργανισμών που καλλιεργούμε. Τα βακτήρια τα αφήσαμε για 1-2 ημέρες μέχρι να παρατηρηθεί στο υγρό υπόστρωμα το χαρακτηριστικό “θόλωμα” χρησιμοποιώντας υγρό θρεπτικό LB, ενώ τους μύκητες 4-5 ημέρες μέχρι να δημιουργηθεί μυκήλιο, σε θρεπτικό PDB.



Οι στερεές καλλιέργειες τοποθετήθηκαν σε θάλαμο επώασης στους 25 °C. Ο χρόνος παραμονής και τα θρεπτικά μέσα παρέμειναν τα ίδια με τη μόνη διαφορά ότι στη παρασκευή των θρεπτικών προστέθηκε 17% άγαρ για να πήξει το υπόστρωμα. Τα εντεροβακτήρια αναπτύχθηκαν με τον ίδιο τρόπο, τόσο σε υγρή όσο και σε στερεή καλλιέργεια σε θρεπτικό LB, αλλά σε θάλαμο ειδικά ρυθμισμένο στους 37 °C.

### 1.3 ΔΙΑΤΗΡΗΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΜΟΝΩΣΕΩΝ

Όλες οι καλλιέργειες βακτηρίων και μυκήτων διατηρήθηκαν, αφού καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικά υποστρώματα, στο ψυγείο στους 4°C. Η ανανέωση των μυκήτων γινόταν περίπου κάθε μήνα ενώ των βακτηρίων συντομότερα, ανάλογα πάντα με το στέλεχος.

Για μεγάλο χρονικό διάστημα αποθήκευσης τα στελέχη τοποθετούνται σε διάλυμα γλυκερόλης 60% (v/v) στους -80°C. Για να πραγματοποιηθεί η διαδικασία αυτή χρειάστηκε πρώτα να καλλιεργήσουμε τους μικροοργανισμούς, που επιθυμούσαμε να συντηρήσουμε για μακρύ χρονικό διάστημα, με τον τρόπο που περιγράψαμε στη παράγραφο 1.2 του πειραματικού μέρους. Έπειτα σε ειδικά αποστειρωμένα φιαλίδια (ependulf) προσθέσαμε με μια πιπέτα 1ml της καλλιέργειας μας και 0,5ml από το διάλυμα της γλυκερόλης. Ακολούθησε πολύ καλή ανάδευση και παραμονή των φιαλιδίων σε υγρό άζωτο για λίγα λεπτά. Αυτό το στάδιο επιβάλλεται να πραγματοποιηθεί έτσι ώστε να έχουμε την ακαριαία ψύξη των μικροοργανισμών. Μετά από αυτό οι μικροοργανισμοί είναι έτοιμοι να αποθηκευτούν για αρκετό χρονικό διάστημα (έως 1 χρόνο) στη κατάψυξη.

### 1.4 ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΛΙΚΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΚΑΙ ΣΥΝΤΗΡΗΣΗΣ ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΚΑΙ ΜΥΚΗΤΩΝ

	10 gr Casein
	5 gr Yeast Extract (YE)
<b>1) LB*:</b>	10 gr NaCl
	1 lt H <sub>2</sub> O

**2) PDB\* :** 24 gr Potato  
1 lt H<sub>2</sub>O

**3) TSM\* :** 3gr Glucose  
0,15 gr KCl  
0,2 gr MgSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O  
1 gr NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>  
1 gr K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
1lt H<sub>2</sub>O

*Μετά την αποστείρωση*

0,25 gr Chloramphenicol  
0,3 gr Fenaminosulf  
0,2 gr Quintozene  
0,15 gr Rose Bengal

2 gr L- Asparagine  
0,5 gr MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O  
0,5 gr KCl  
20 gr D- Galactose  
1 gr K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
1 lt H<sub>2</sub>O

**4) FSM\* :** 5 ml Διάλυμα Α \*      0,278 gr FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O  
0,372 gr Na<sub>2</sub> EDTA  
100 ml H<sub>2</sub>O

*Μετά την αποστείρωση*

1 gr Guintozene  
0,5 gr Oxgal  
1 gr Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> · 10 H<sub>2</sub>O  
0,300gr Streptomycin

**5) KINGS\* :** 20 gr Casein  
2,5 gr K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
15 ml Glycerol  
6 gr MgSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O  
1 lt H<sub>2</sub>O

10 gr Sucrose  $C_{12}H_{22}O_{11}$   
10 ml Glycerol  
5 gr Casein  
**6) PSM\* :** 1 gr  $NaHCO_3$   
1 gr  $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$   
2,3 gr  $K_2HPO_4$   
1 gr N- Lauroyl – Sarcosine  
1 lt  $H_2O$   
*Μετά από αποστείρωση*  
0,02gr Trimethoprin

**7) Tween 80 :** 2ml Tween 80  
1,8 gr agar  
100ml LB

**8) Skim Milk:** 1gr Skim Milk  
1,8gr agar  
100 ml LB

\*Τα θρεπτικά υλικά ανάπτυξης και συντήρησης των βακτηριακών στελεχών και μυκήτων που έχουν αστερίσκο (\*) μπορούν με τη προσθήκη 17% άγαρ να χρησιμοποιηθούν ως στερεά υποστρώματα.

### 1.5 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΚΑΙ ΜΥΚΗΤΩΝ ΣΕ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥΣ ΜΥΚΗΤΕΣ ΦΥΤΩΝ ΣΕ *IN VITRO* ΔΟΚΙΜΕΣ

Στη συνέχεια του πειράματος ελέγξαμε ποίο από τα βακτήρια και από τους μύκητες που απομονώσαμε από τα Kal 1, Kal 2 και Kal 3 παρουσίασε ανταγωνιστική δράση ενάντια σε παθογόνους μύκητες φυτών. Η εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε σε θάλαμο νηματικής ροής κάτω από πλήρως ασηπτικές συνθήκες.

Οι παθογόνοι μύκητες που χρησιμοποιήθηκαν αναγράφονται στον πίνακα 1.

**ΠΙΝΑΚΑΣ 1 : ΠΑΘΟΓΟΝΟΙ ΜΥΚΗΤΕΣ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ**

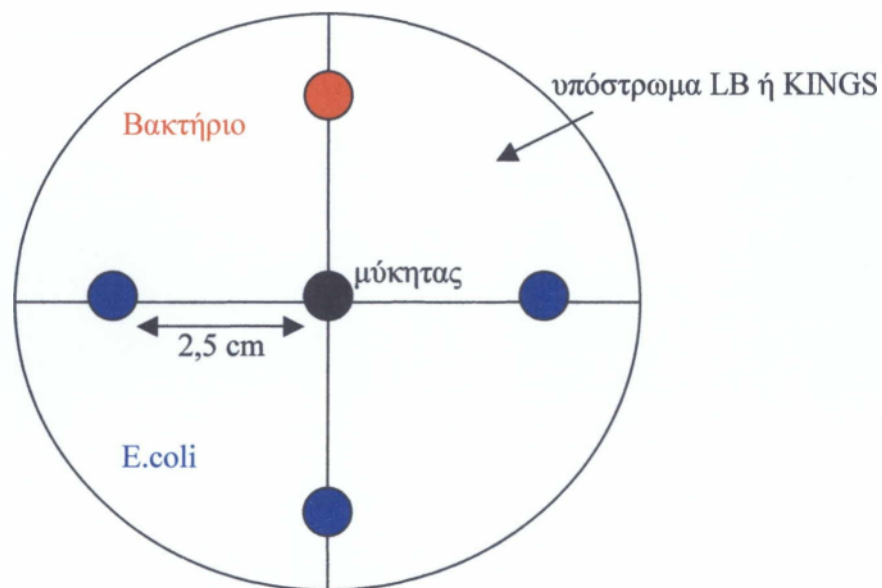
ΟΝΟΜΑ	ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΑ	ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ
<i>Fusarium oxysporum f.sp. radiacis – lycopersici</i>	<i>Forl</i>	GBS 101587 Central Buream vooor Schimmelcultures, Boam, The Netherlands
<i>Fusarium oxysporum f.sp. raphani</i>	<i>Forl raphani</i>	C.Pieterse, Univ. of Utrecht, The Netherlands
<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Rhizoctonia</i>	Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο BP 58
<i>Phytophthora cinammomi</i>	<i>P.cinammomi</i>	Wageningen Agricultural University N 2001 / 6
<i>Phytophthora nicotiana</i>	<i>P.nicotiana</i>	Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο BP I
<i>Septoria lycopersici</i> στέλεχος NEVADA	<i>Septoria</i>	A.Osbourn John Innes Centre , U.K.

### 1.5.1 ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΣΕ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥΣ ΜΥΚΗΤΕΣ

Τα βακτήρια που απομονώσαμε από τα τρία κομπόστ καλλιεργήθηκαν για ένα βράδυ (overnight καλλιέργεια) σε υγρό LB στους 25 °C. Το εντεροβακτήριο *E.coli* καλλιεργήθηκε στους 37 °C και αυτό για μια νύχτα.

Επίσης έπρεπε να ανακαλλιεργήσουμε και τους παθογόνους μύκητες σε φρέσκο θρεπτικό υπόστρωμα έτσι ώστε οι υφές του μύκητα να είναι όσο το δυνατό πιο ενεργές. Όλα τα εργαλεία και τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν πρώτα αποστειρωμένα.

Η διαδικασία του πειράματος φαίνεται παραστατικά στο ακόλουθο σχήμα :



Το παραπάνω σχήμα απεικονίζει τη κάτοψη ενός τριβλίου με στερεό θρεπτικό υπόστρωμα. Ο χαρακτηριστικός σταυρός μας βοήθησε να υπολογίσουμε το κέντρο του κύκλου όπου εκεί τοποθετήθηκε ένα κομμάτι από το παθογόνο μύκητα. Το κομμάτι αυτό αποκόπηκε από τη καλλιέργεια του μύκητα με ειδικό εργαλείο (φελλοτρυπητήρα). Σε απόσταση 2,5 cm από το κέντρο και προς τα πάνω στάξαμε μια σταγόνα ποσότητας 10 μl από το απομονωμένο βακτήριο. Η διαδικασία αυτή έγινε με ειδική πιπέτα. Δεξιά, αριστερά και κάτω από το παθογόνο, σε ίδια πάλι απόσταση και με την ίδια τεχνική, τοποθετήθηκε το εντεροβακτήριο *E.coli*.

Για κάθε βακτήριο με κάθε ένα παθογόνο μύκητα έγιναν τρεις επαναλήψεις. Επίσης η ανταγωνιστική δράση δοκιμάστηκε και σε δυο θρεπτικά υποστρώματα (LB και KINGS). Μετά το τέλος της συγκεκριμένης εργασίας κλείσαμε πολύ καλά το κάθε τριβλίο και το τοποθετήσαμε σε επωαστικό θάλαμο στους 25 °C.

Τα τριβλία ελέγχθηκαν κάθε μέρα την ίδια ακριβώς ώρα. Η ανάπτυξη του μύκητα γίνεται ισομερώς και προς τις τέσσερις κατευθύνσεις (ακτινωτά). Έτσι σε κάθε έλεγχο σημειώσαμε, στο κάτω μέρος του τριβλίου, τα εκατοστά ανάπτυξης των υφών του μύκητα και προς τις τέσσερις κατευθύνσεις. Οι μετρήσεις αυτές μας βοήθησαν να διαπιστώσουμε εάν πραγματοποιήθηκε αναστολή στην ανάπτυξη του παθογόνου μύκητα και να φτιάξουμε τα γραφήματα υπολογίζοντας το μέσο όρο και των τριών επαναλήψεων. Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε έως ότου οι υφές του μύκητα έφτασαν τις άκρες του τριβλίου.

Μη ομοιόμορφη ανάπτυξη του παθογόνου αναμέναμε μόνο από τη μεριά που είχε τοποθετηθεί το εξεταζόμενο βακτήριο (πάνω). Αυτό παρατηρήθηκε οπτικά βλέποντας και ελέγχοντας τη συμπεριφορά ανάπτυξης τόσο του μύκητα όσο και του βακτηρίου. Προς τις άλλες τρεις κατευθύνσεις ο μύκητας μεγάλωσε κανονικά γιατί το συγκεκριμένο εντεροβακτήριο (*E.coli*) είναι γνωστό ότι δεν προκαλεί αναστολή της αύξησης παθογόνων μυκήτων.

### 1.5.2 ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΜΥΚΗΤΩΝ ΣΕ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥΣ ΜΥΚΗΤΕΣ

Εκτός των βακτηρίων, από ορισμένα κομπόστ, απομονώσαμε και μύκητες οι οποίοι ελέγχθηκαν και αυτοί για την ικανότητα τους να ασκούν ανταγωνιστική δράση σε παθογόνους μύκητες φυτών σε *in vitro* δοκιμές. Οι παθογόνοι μύκητες που χρησιμοποιήθηκαν εδώ είναι οι : *Forl* και *P.cinammomi*.

## 1<sup>η</sup> Επέμβαση

Η διαδικασία είναι περίπου παρεμφερής με αυτή των βακτηρίων. Αφού ανακαλλιεργήσαμε όλους τους μύκητες σε φρέσκα υποστρώματα PDA, τους τοποθετήσαμε όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα.

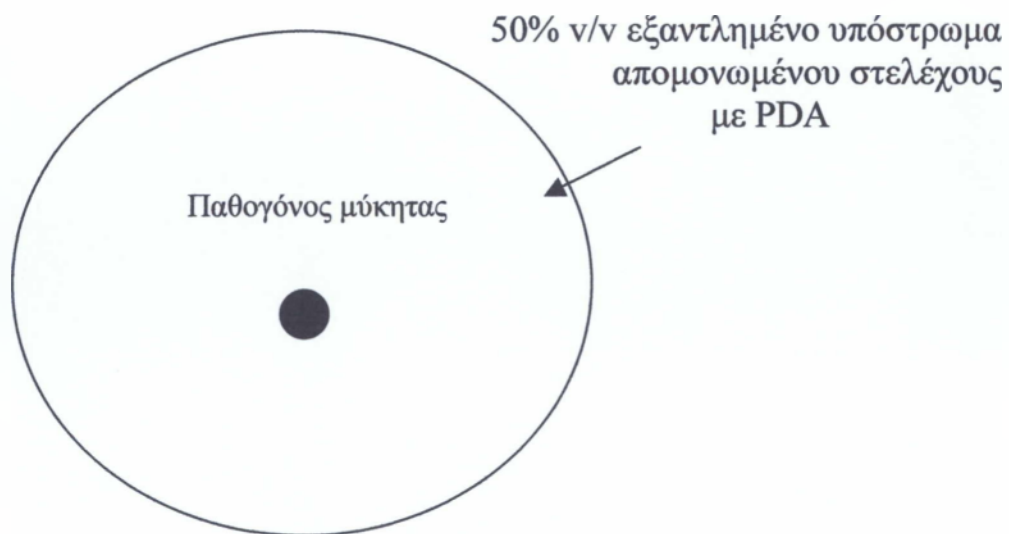


Για κάθε μύκητα με κάθε ένα παθογόνο έγιναν δυο επαναλήψεις. Στη συνέχεια τα τριβλία κλείστηκαν καλά και τοποθετήθηκαν και αυτά σε θάλαμο επώασης στους 25 °C. Η ανάπτυξή τους ελέγχθηκε καθημερινά την ίδια ώρα, με τη μόνη διαφορά ότι δεν πήραμε μετρήσεις γιατί δεν ήταν ξεκάθαρες. Περιοριστήκαμε μόνο σε οπτικές παρατηρήσεις για να γίνει η σύγκριση. Η τελική εικόνα ήταν αυτή που μας έδειξε εάν κάποιος από τους μύκητες που απομονώσαμε από τα κομπόστ εμπόδιζε την ομοιόμορφη ανάπτυξη του παθογόνου.

## 2<sup>η</sup> Επέμβαση

Σε αυτή την εργασία πρώτα καλλιεργήσαμε τους μύκητες, που είχαμε απομονώσει από τα κομπόστ, σε υγρό υπόστρωμα PDB. Στη συνέχεια τοποθετήσαμε τις φιάλες στον ανακινούμενο αναδευτήρα (orbital) για 4 με 5 ημέρες, μέχρι να αναπτυχθεί ο μύκητας.

Αφού είχαμε την επιθυμητή ανάπτυξη φιλτράραμε το υγρό μέσα από τουλπάνι και κρατήσαμε το υπερκείμενο της καλλιέργειας. Το μυκήλιο που απέμεινε στο μέσο φιλτραρίσματος το πετάξαμε. Το φιλτραρισμένο υγρό το αποστειρώσαμε για 20 λεπτά στους  $121\text{C}^{\circ}$  βαθμούς και σε πίεση 1,1atm. Μετά την αποστείρωση αναμείξαμε το εξαντλημένο υπόστρωμα του μύκητα με ίση ποσότητα από PDA (50% v/v). Τέλος στρώσαμε το υλικό αυτό σε τριβλία και περιμέναμε να σταθεροποιηθεί. Σε αυτά τα τριβλία καλλιεργήσαμε τους παθογόνους μύκητες *Forl* και *P. cinammomi* από δυο επαναλήψεις για το κάθε παθογόνο με τον αντίστοιχο απομονωμένο μύκητα, όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα. Επίσης τους παθογόνους μύκητες τους καλλιεργήσαμε και σε σκέτο PDA το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως το τυφλό δείγμα μας. Δηλαδή ήταν το μέτρο σύγκρισης της ανάπτυξης των παθογόνων.



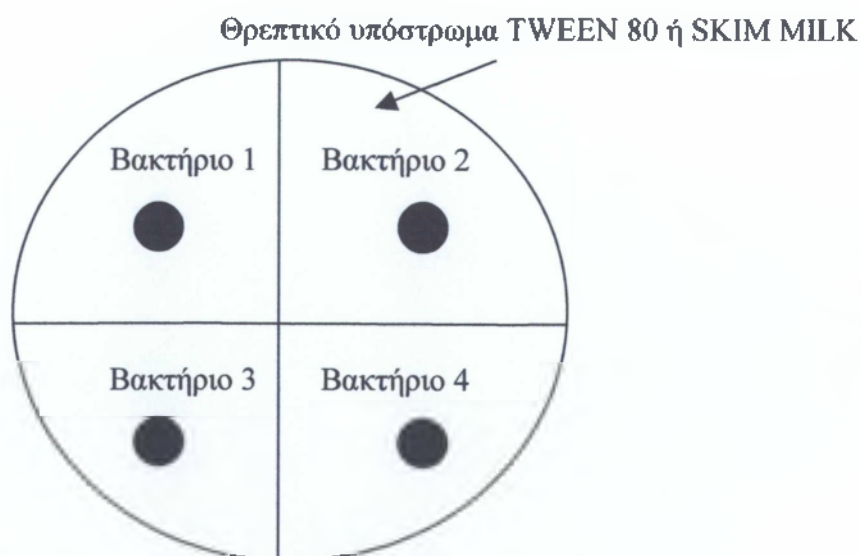
Μετά τα τριβλία κλείστηκαν καλά και τοποθετήθηκαν σε θάλαμο επώασης στους  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Κάθε μέρα ελέγχονταν τα τριβλία και σημειώνονταν τα εκατοστά ανάπτυξης του παθογόνου. Το πείραμα ολοκληρώθηκε όταν το παθογόνο αναπτύχθηκε πλήρως στα τυφλά δείγματα (σκέτο PDA). Έτσι στο τέλος συγκρίνοντας τις μετρήσεις είδαμε αν τελικά οι συγκεκριμένοι μύκητες που απομονώσαμε από τα κομπόστ αναστέλλουν την ανάπτυξη των παθογόνων και με αυτό τον τρόπο.



## 1.6 ENZYMIKES ΔΟΚΙΜΕΣ *IN VITRO*

Για να μπορέσουμε να κατανοήσουμε το μηχανισμό που χρησιμοποιούν ορισμένοι μικροοργανισμοί, έτσι ώστε να κατορθώνουν να ασκούν ανταγωνιστική δράση σε παθογόνους μύκητες φυτών, θα πρέπει να ελέγξουμε αν οι μικροοργανισμοί αυτοί παράγουν κάποια συγκεκριμένα ένζυμα. Το κάθε ένζυμο ξεχωριστά έχει την ικανότητα να καταλύει διαφορετικά δομικά μέρη του σώματος των παθογόνων μυκήτων με αποτέλεσμα να τον καταστρέφει. Στη συγκεκριμένη εργασία ελέγξαμε αν τα βακτήρια που απομονώσαμε από τα τρία κομπόστ παρήγαγαν τα ένζυμα : λιπάσες και πρωτεάσες. Ο έλεγχος αυτός έγινε με κατάλληλα θρεπτικά υποστρώματα πάνω στα οποία καλλιεργήσαμε τα βακτήρια. Τα υποστρώματα είναι το TWEEN 80 για τον έλεγχο της λιπάσης και το SKIM MILK για τον έλεγχο της πρωτεάσης, των οποίων οι συνταγές αναγράφονται στη παράγραφο 1.4 του πειραματικού μέρους.

Στη πράξη τώρα, η πρώτη εργασία που πραγματοποιήθηκε ήταν η καλλιέργεια των απομονωμένων βακτηρίων σε υγρό θρεπτικό LB. Τις καλλιέργειες αυτές τις τοποθετήσαμε σε ανακινούμενο θάλαμο επώασης (orbital) στους 25 °C για 18 ώρες. Αφού αναπτύχθηκαν οι καλλιέργειες πήραμε με μια ειδική πιπέτα ποσότητα 500μl από την καλλιέργεια των βακτηρίων και τη στάξαμε στα θρεπτικά υποστρώματα TWEEN 80 και SKIM MILK. Για πιο αξιόπιστα αποτελέσματα, για κάθε βακτήριο πραγματοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις με το αντίστοιχο υπόστρωμα. Τα βακτήρια τοποθετήθηκαν ανά τέσσερα σε κάθε τριβλίο, όπως φαίνεται χαρακτηριστικά στο παρακάτω σχήμα.



Μετά το τέλος αυτής της διαδικασίας κλείσαμε καλά τα τριβλία και τα βάλουμε σε θάλαμο επώασης στους 25 °C για μια με δυο ημέρες. Τα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν οπτικά. Στην περίπτωση που το βακτήριο είχε την ικανότητα να παράγει το ένζυμο λιπάση, τότε γύρω από τη σταγόνα του βακτηρίου σχηματιζόταν ένα θόλωμα μέσα στο οποίο ξεχώριζαν μικρές κουκίδες σαν σταγονίδια. Αυτό ήταν ένδειξη ότι το βακτήριο είχε την ικανότητα παραγωγής εξωκυτταρικής λιπάσης. Ενώ αν το βακτήριο παρήγαγε το ένζυμο πρωτεάση τότε γύρω από το βακτήριο σχηματιζόταν ένα διάφανο στεφάνι, σημάδι που μας έδειχνε ότι το βακτήριο είχε την ικανότητα παραγωγής εξωκυτταρικών πρωτεασών, γι' αυτό και το υπόστρωμα γύρω του άλλαζε χρώμα και από κίτρινο που είναι κανονικά γινόταν διαφανές. Τόσο τα λίπη όσο και οι πρωτεΐνες είναι συστατικά της κυτταρικής μεμβράνης των παθογόνων μυκήτων, οπότε γίνεται αντιληπτό ότι αν καταστραφούν αυτές οι ουσίες καταστρέφεται και ο ίδιος ο μύκητας.

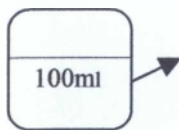
## 1.7 ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΚΑΜΠΥΛΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ

Ο τελευταίος έλεγχος που έγινε στα βακτήρια ήταν η δημιουργία καμπύλης της ανάπτυξής τους. Αυτό πραγματοποιήθηκε για να μπορέσουμε να υπολογίσουμε ακριβώς τη ποσότητα και το μέγεθος των κυττάρων που έχει το κάθε βακτήριο ξεχωριστά κάτω από τις ίδιες συνθήκες ανάπτυξης. Τα αποτελέσματα θα χρησιμοποιηθούν στο επόμενο στάδιο του πειράματος που είναι ο έλεγχος *in planta* της ανταγωνιστικής δράσης των βακτηρίων σε παθογόνους μύκητες φυτών. Το πειραματικό αυτό τμήμα δεν περιέχεται στη συγκεκριμένη εργασία.

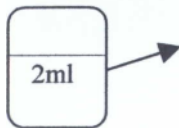
## 1<sup>η</sup> Επέμβαση

Σε αυτή την επέμβαση μετρήσαμε σε φωτόμετρο τις τιμές OD των καλλιεργούμενων βακτηρίων τα οποία είχαν υποστεί ειδική μεταχείριση.

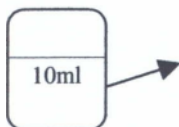
Η πρώτη ενέργεια που έγινε ήταν η καλλιέργεια των απομονωμένων βακτηρίων σε 100ml υγρό LB και η ανάπτυξη τους σε ανακινούμενο θάλαμο επώασης (orbital) στους 25 °C για 18 ώρες ακριβώς. Το χρονικό όριο των 18 ωρών επιβάλλεται να τηρηθεί σωστά γιατί πρέπει να γνωρίζουμε επακριβώς πόσα κύτταρα αναπτύσσονται από το κάθε ένα βακτήριο, στο συγκεκριμένο χρονικό διάστημα, κάτω από ίδιες συνθήκες. Από το αρχικό αυτό διάλυμα φτιάξαμε τη πρώτη αραιώση παίρνοντας 1ml αρχικού διαλύματος και προσθέτοντας 1ml υγρό LB. Στη συνέχεια πήραμε πάλι 1ml από το αρχικό διάλυμα αλλά το αραιώσαμε με 9ml υγρό LB για να φτιάξουμε τη δεύτερη αραιώση. Για να γίνει πιο ξεκάθαρη η διαδικασία παρατίθεται το παρακάτω σχήμα.



A) Αρχική καλλιέργεια  
Βακτηρίου : 100 ml LB + ΒΑΚΤΗΡΙΟ



B) 1<sup>η</sup> αραιώση : 1ml καλλιέργειας + 1ml LB



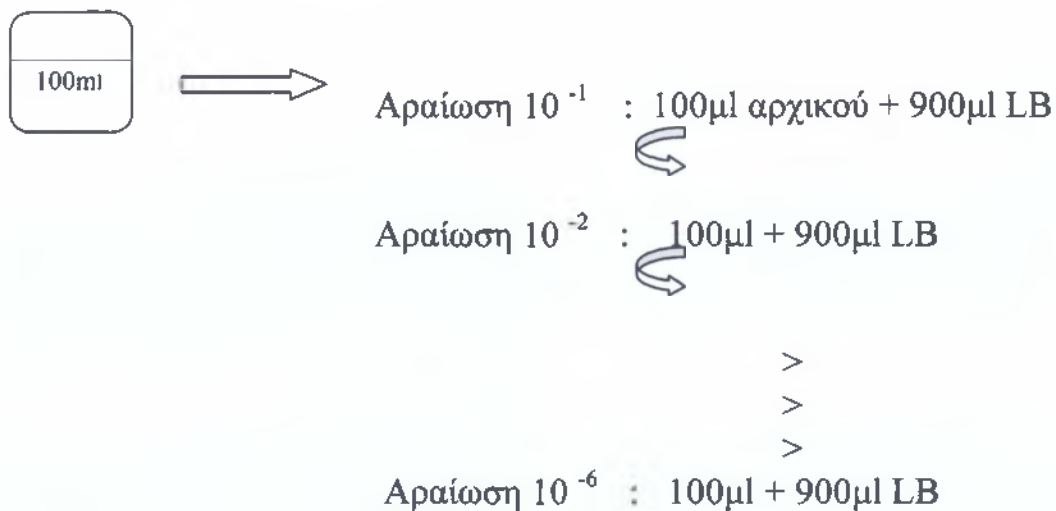
Γ) 2<sup>η</sup> αραιώση : 1ml καλλιέργειας + 9ml LB

Από τα τρία παραπάνω διαλύματα πήραμε συγκεκριμένη ποσότητα από το κάθε ένα την οποία τη τοποθετήσαμε στο φωτόμετρο. Αφού κάναμε τις απαραίτητες ρυθμίσεις του μηχανήματος τότε σημειώσαμε την ένδειξη της τιμής OD που εμφανίστηκε στην οθόνη. Οι τρεις μετρήσεις σημειώθηκαν ξεχωριστά για κάθε βακτήριο. Ουσιαστικά η τιμή OD μας δείχνει το πόσο εύκολα ή δύσκολα διαπερνά το φως το εκάστοτε διάλυμα και εξαρτάται πάντα από την πυκνότητα των κυττάρων που έχει το κάθε ένα.

## 2<sup>η</sup> Επέμβαση

Στη δεύτερη επέμβαση χρησιμοποιήσαμε πάλι το αρχικό διάλυμα (Α), από τη πρώτη επέμβαση, από το οποίο κάναμε έξι διαδοχικές αραιώσεις όπως φαίνονται στο παρακάτω σχήμα.

Αρχικό διάλυμα (Α)



Απο την αραιώση 10<sup>-4</sup> πήραμε 100μl με ειδική πιπέτα και τα απλώσαμε ομοιόμορφα με πιπέτα παστέρ σε τριβλίο με στερεό θρεπτικό LB. Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε ομοίως για τις αραιώσεις 10<sup>-5</sup> και 10<sup>-6</sup> από δυο επαναλήψεις για το καθένα. Στη συνέχεια τα τριβλία σφραγίστηκαν καλά και τοποθετήθηκαν σε επωαστικό θάλαμο στους 25 °C για μια με δυο ημέρες μέχρι να σχηματιστούν ορατές και μετρήσιμες αποικίες βακτηρίων. Τέλος μετρήσαμε τις αποικίες των βακτηρίων μια προς μια, ξεχωριστά για κάθε αραιώση, και σημειώσαμε τις μετρήσεις. Ο λόγος που χρησιμοποιήσαμε τις μετρήσεις των τριών τελευταίων αραιώσεων (10<sup>-4</sup>, 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-6</sup>) είναι για να μπορούμε με ευκολία να καταμετρήσουμε τις πολυάριθμες αποικίες που αναπτύχθηκαν στα τριβλία.

Οι δυο επεμβάσεις εφαρμόστηκαν για όλα τα βακτήρια που απομονώσαμε από τα κομπόστ (ενδοφυτικά και ριζοσφαιρικά).

Τις μετρήσεις που πήραμε και από τις δυο παραπάνω επεμβάσεις τις χρησιμοποιήσαμε στο πρόγραμμα excel του υπολογιστή. Αυτό το πρόγραμμα μας έδωσε κάποιες τιμές οι οποίες εφαρμόζονται στον εξής τύπο :

$$y = ax + \beta$$

όπου  $y$  : τιμή του OD  
 $a$  : μεταβλητή  
 $\beta$  : τεταγμένη  
 $x$  : κύτταρα βακτηρίου/ ml διαλύματος

Έτσι λύνοντας την εξίσωση ως προς  $x$  μπορέσαμε κάθε φορά να υπολογίσουμε τον ακριβή αριθμό κυττάρων του εκάστοτε βακτηρίου σε συγκεκριμένη ποσότητα θρεπτικού διαλύματος. Στο τέλος ο αριθμός  $x$  πολλαπλασιάζεται με την αντίστοιχη αραιώση από την οποία πήραμε τις μετρήσεις της 2<sup>ης</sup> επέμβασης. Αναλυτικά οι τύποι με τις αντίστοιχες αραιώσεις βρίσκονται στη παράγραφο 2.3 του πειραματικού μέρους, στον πίνακα 10.

## 2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΕΙΣ

### 2.1 ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ

Στο τέλος του πειράματος είχαμε συνολικά απομονώσει και από τα τρία διαφορετικά κομπόστ 46 βακτηριακά στελέχη και 8 μύκητες. Τα 30 στελέχη είναι ριζοσφαιρικά ενώ τα υπόλοιπα 16 είναι ενδοφυτικά βακτήρια. Από όλα αυτά διαλέξαμε και κρατήσαμε μόνο τα στελέχη εκείνα που από τα *in vitro* πειράματα έδειξαν ότι αναστέλλουν την ανάπτυξη παθογόνων μυκήτων. Η προέλευση των βακτηρίων και των μυκήτων αλλά και τα αποτελέσματα αυτών αναγράφονται αναλυτικά παρακάτω.

Στους πίνακες συνοψίζεται η αναστολή που εμφάνισε ή όχι το εκάστοτε βακτήριο στην ανάπτυξη του κάθε παθογόνου μύκητα. Με το συν (+) καθορίζεται ο μικροοργανισμός που κατάφερε να αναστείλει την ανάπτυξη του παθογόνου μύκητα ενώ με το πλην (-) εκείνος που δεν επιδρά καθόλου στην ανάπτυξη του παθογόνου. Πιο συγκεκριμένα αποτελέσματα φαίνονται αναλυτικά στις φωτογραφίες και στα γραφήματα που ακολουθούν, με σκοπό την καλύτερη κατανόηση και αξιολόγηση αυτών.

Στους πίνακες, στις φωτογραφίες και στα γραφήματα τα ριζοσφαιρικά βακτήρια συμβολίζονται με το γράμμα R, τα ενδοφυτικά με το γράμμα E και οι μύκητες με το γράμμα F. Τα γράμματα αυτά συνοδεύονται από δυο αριθμούς. Ο πρώτος αριθμός μας δείχνει το κομπόστ από το οποίο έγινε η εκάστοτε απομόνωση (Kal 1, Kal 2, Kal 3), ενώ ο δεύτερος αριθμός συμβολίζει τη σειρά με την οποία απομονώθηκαν οι μικροοργανισμοί από τα κομπόστ.

#### 2.1.1 ΡΙΖΟΣΦΑΙΡΙΚΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ

Από τα 30 στελέχη που απομονώσαμε από τη ριζόσφαιρα τα 18 προήλθαν από το Kal 1, τα 8 από το Kal 2 και τα 4 από το Kal 3. Όλα αυτά τα στελέχη ελέγχθηκαν *in vitro* για την ανταγωνιστική δράση που ασκούν σε παθογόνους μύκητες με τον τρόπο εργασίας που αναφέρθηκε στα υλικά και μέθοδοι. Τα αποτελέσματα που συλλέξαμε αναγράφονται στους πίνακες 2, 3 και 4 και στις φωτογραφίες (Εικ. 1 έως Εικ. 66).

**ΠΙΝΑΚΑΣ 2 : βακτήρια ριζόσφαιρας από κομπόστ Kal 1**

Βακτήρια	Παθογόνοι Μύκητες					
	<i>Forl</i>		<i>P.cinammomi</i>		<i>Rhizoctonia</i>	
	LB	KINGS	LB	KINGS	LB	KINGS
R1.1	-	-	-	-	-	-
R1.2	+	+	+	+	+	+
R1.3	+	+	+	+	+	-
R1.4	+	*	+	*	+	*
R1.5	+	*	+	*	+	*
R1.6	-	-	-	-	-	-
R1.7	-	-	+	+	+	+
R1.8	-	-	+	+	+	+
R1.9	+	*	+	*	+	*
R1.10	-	-	-	-	-	-
R1.11	-	-	-	+	-	+
R1.12	+	-	+	+	-	+
R1.13	-	-	-	-	-	-
R1.14	+	-	-	-	-	-
R1.15	+	-	-	-	-	-
R1.16	-	-	+	-	-	-
R1.17	+	-	-	-	-	+
R1.18	-	-	-	-	-	-

**ΠΙΝΑΚΑΣ 3 : βακτήρια ριζόσφαιρας από κομπόστ Kal 2**

Βακτήρια	Παθογόνοι Μύκητες										
	<i>Forl</i>		<i>P.cinammomi</i>		<i>Rhizoctonia</i>		<i>Forl raphani</i>		<i>P.nicotiana</i>		<i>Septoria</i>
	LB	Kings	LB	Kings	LB	Kings	LB	Kings	LB	Kings	Kings
R2.1	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/	/
R2.2	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/	/
R2.3	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/	/
R2.4a	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
R2.4bi	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/	/
R2.4bii	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	/
R2.5	-	/	-	/	-	/	-	/	-	/	/
R2.6	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	/

**ΠΙΝΑΚΑΣ 4 : βακτήρια ριζόσφαιρας από κομπόστ Kal 3**

Βακτήρια	Παθογόνοι Μύκητες					
	<i>Forl</i>	<i>P.cinammomi</i>	<i>Rhizoctonia</i>	<i>Forl raphani</i>	<i>P.nicotiana</i>	<i>Septoria</i>
	LB	LB	LB	LB	LB	LB
R3.1	+	-	-	-	-	-
R3.2	-	-	-	-	-	-
R3.3	-	-	-	-	-	-
R3.4	-	-	-	-	-	-

Από τους παραπάνω πίνακες είναι ολοφάνερο ότι από το Kal 1 είχαμε τις περισσότερες απομονώσεις αλλά και τα μεγαλύτερα ποσοστά εμφάνισης αναστολής στην ανάπτυξη των παθογόνων μυκήτων. Στο Kal 2 είχαμε λιγότερες απομονώσεις αλλά βρήκαμε και τρία πολύ ισχυρά στελέχη βακτηρίων. Ενώ αντίθετα στο Kal 3 είχαμε και λίγες απομονώσεις αλλά και κανένα από τα βακτήρια δεν παρουσίασε αξιόλογη αναστολή στην ανάπτυξη των παθογόνων μυκήτων.

Παρακάτω παρατίθεται το φωτογραφικό υλικό, στο οποίο φαίνεται ξεκάθαρα η αναστολή στην ανάπτυξη που προκαλεί το εκάστοτε ριζοσφαιρικό βακτήριο στο κάθε ένα παθογόνο μύκητα. Μαζί με τις φωτογραφίες υπάρχουν και τα αντίστοιχα γραφήματα, στα οποία γίνεται σύγκριση του μήκους των υφών (σε cm) του κάθε παθογόνου στη περιοχή ανάπτυξης των απομονωμένων βακτηρίων σε σύγκριση με το μήκος των υφών στη περιοχή ανάπτυξης του εντεροβακτηρίου *E.coli*, από μέρα σε μέρα.

\* Τα βακτήρια : R1.2 , R1.4 , R1.5 , R1.9 μοιάζουν στο τρόπο ανάπτυξης στο θρεπτικό υλικό LB γι' αυτό η επανάληψη στο θρεπτικό υλικό Kings έγινε μόνο στο βακτήριο R1.2

Η εμφάνιση της καθέτου ( / ) στον πίνακα 3 σημαίνει ότι η αντίστοιχη δοκιμή παραλείπεται.



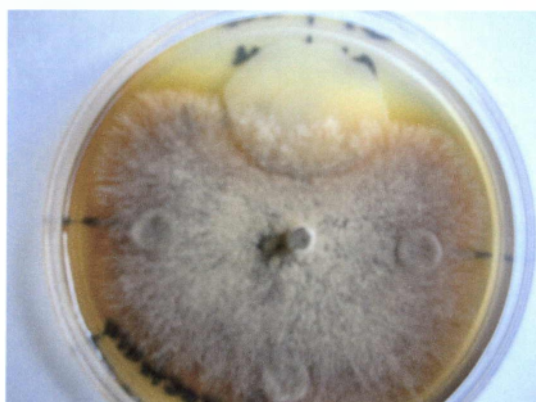
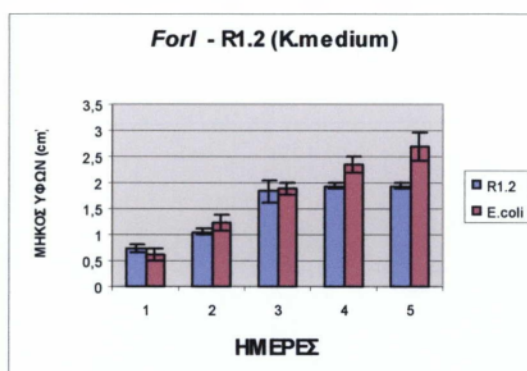
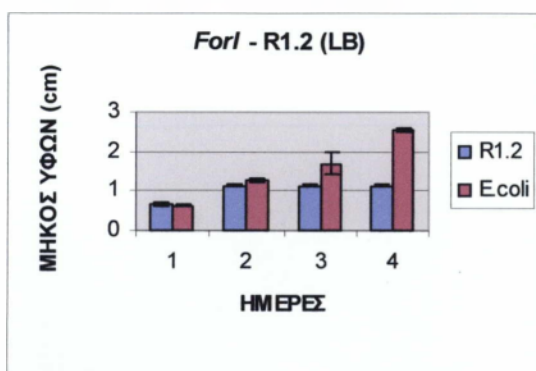
### ΒΑΚΤΗΡΙΟ R1.2



Εικ. 1 : R1.2 – *Forl* (LB)



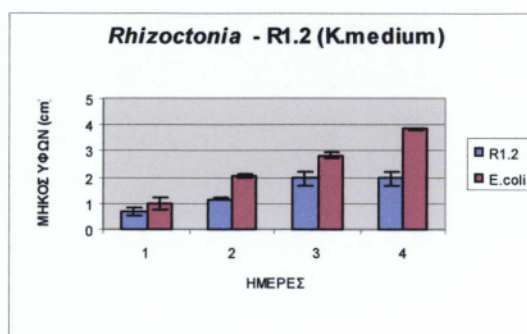
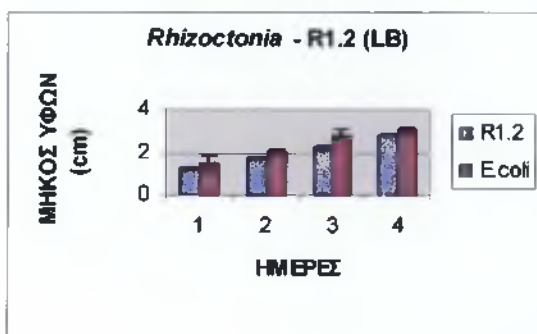
Εικ.2 : R1.2 – *Forl* (Kings)



Εικ.3 : R1.2 – *Rhizoctonia* (LB)

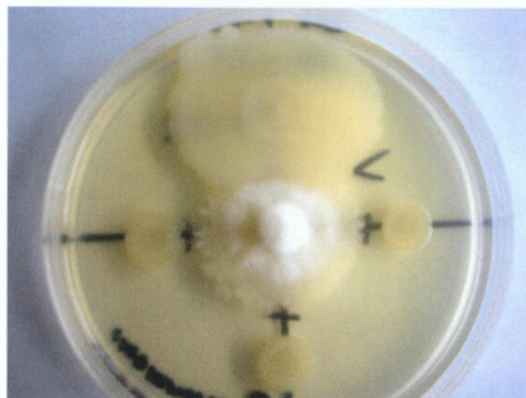


Εικ. 4 : R1.2 – *Rhizoctonia* (Kings)

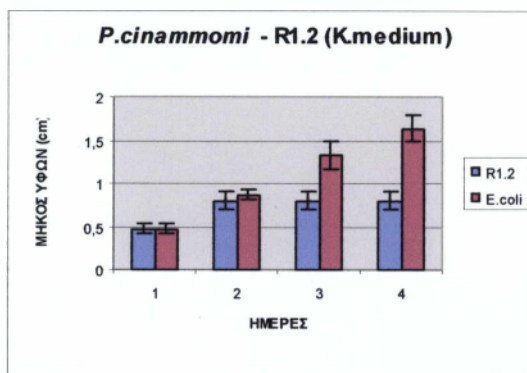
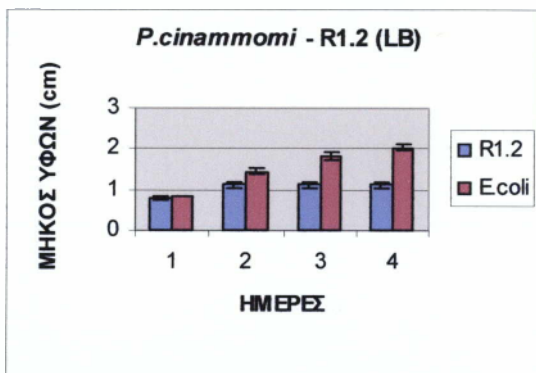




Εικ.5 : R1.2 – *P.cinammomi* (LB)



Εικ.6 : R1.2 – *P.cinammomi* (Kings)



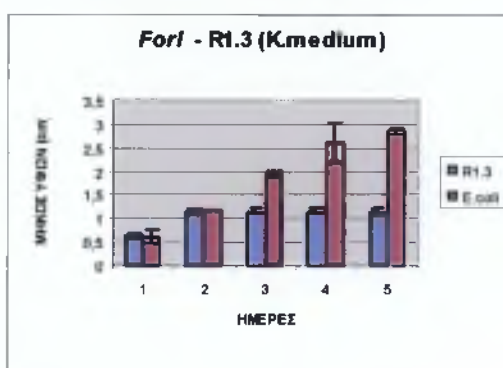
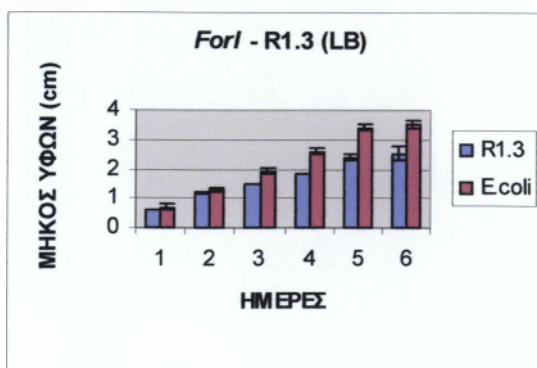
### ΒΑΚΤΗΡΙΟ R1.3



Εικ.7 : R1.3 – *Forl* (LB)

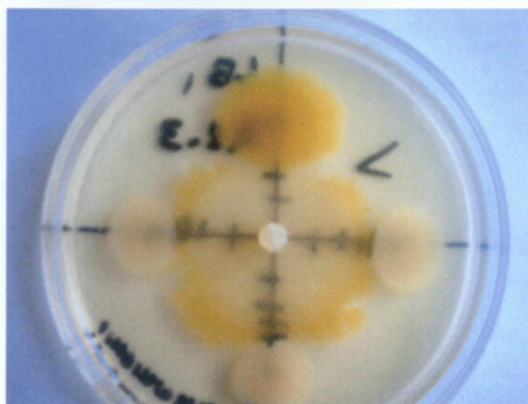


Εικ.8 : R1.3 – *Forl* (Kings)

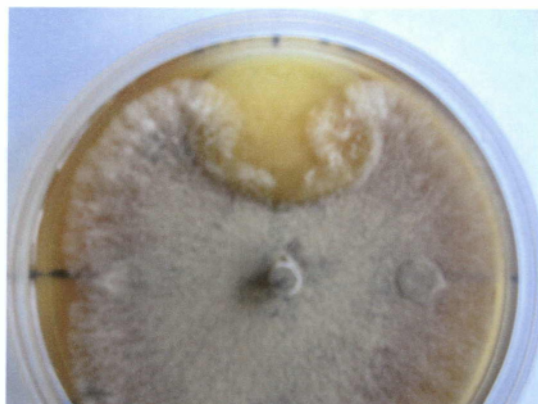
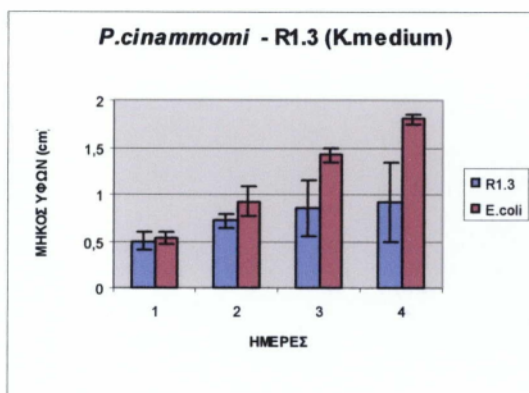
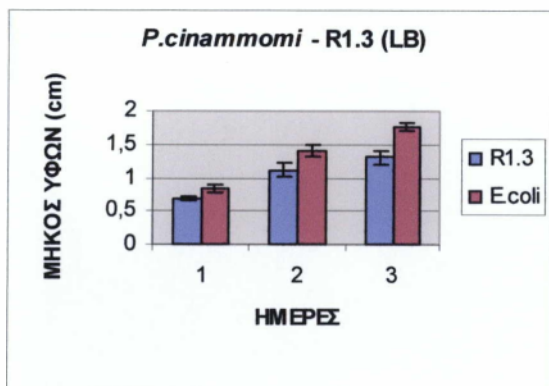




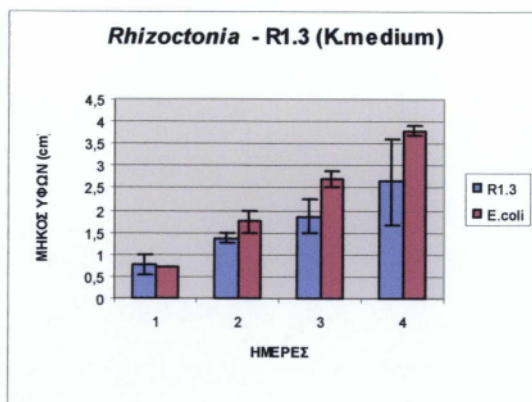
Εικ.9 : R1.3 – *P. cinammomi* (LB)

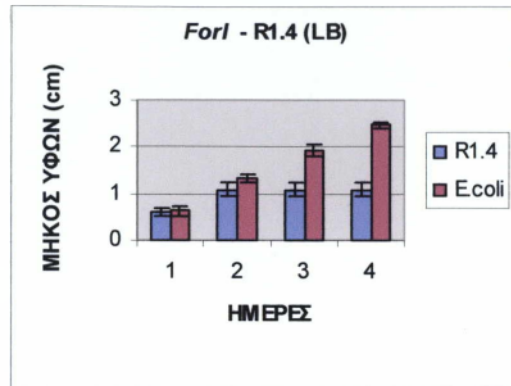
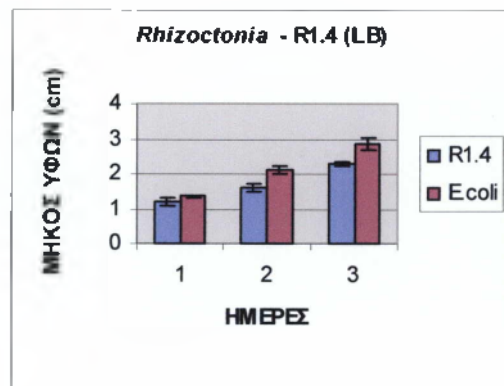
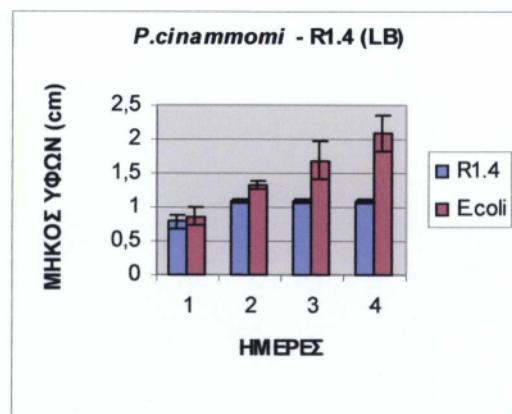


Εικ.10 : R1.3 – *P. cinammomi* (Kings)



Εικ.11 : R1.3 – *Rhizoctonia* (Kings)

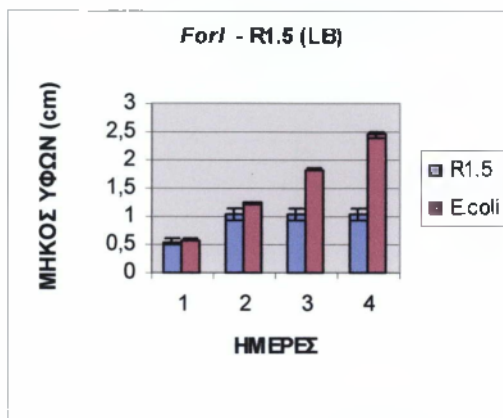


**ΒΑΚΤΗΡΙΟ R1.4**Εικ.12 : R1.4 – *Forl* (LB)Εικ.13 : R1.4 – *Rhizoctonia* (LB)Εικ.14 : R1.4 – *P. cinammomi* (LB)

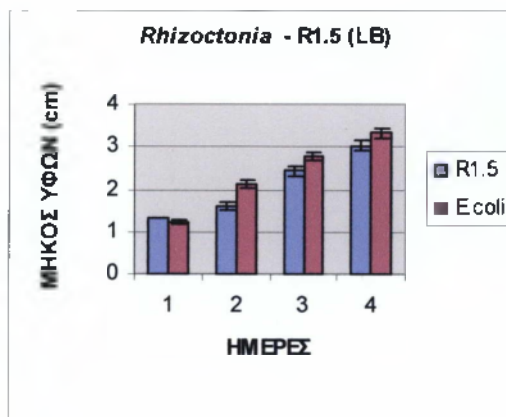
**ΒΑΚΤΗΡΙΟ R1.5**



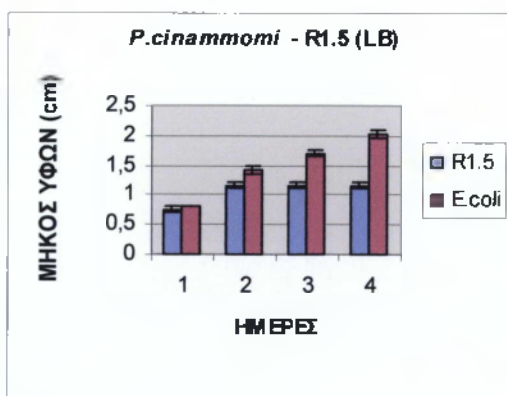
Εικ.15 : R1.5 – *Forl* (LB)



Εικ.16 : R1.5 – *Rhizoctonia* (LB)



Εικ.17 : R1.5 – *P. cinammomi* (LB)



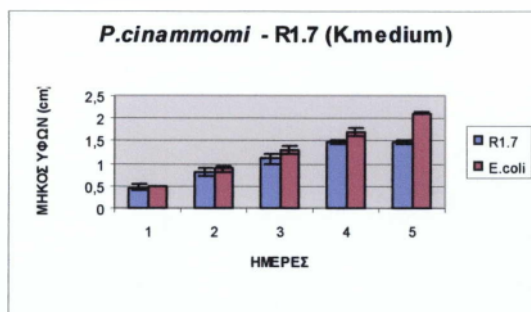
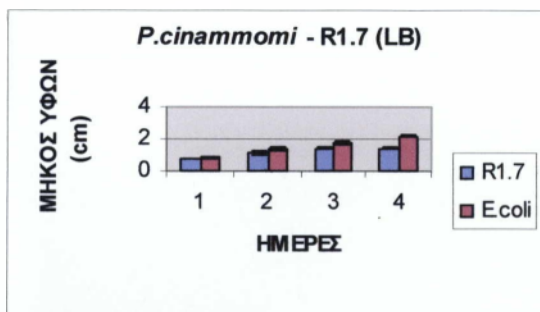
**ΒΑΚΤΗΡΙΟ R1.7**



Εικ18 : R1.7 - *P.cinammomi* (LB)



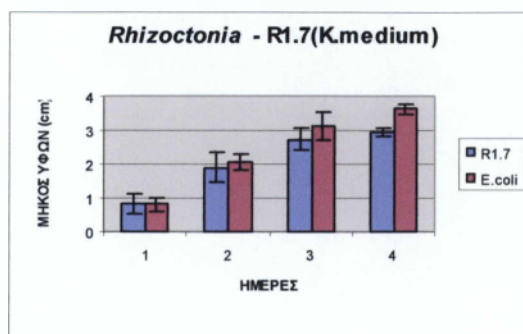
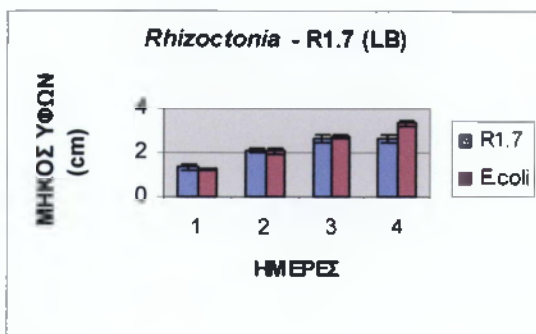
Εικ19 : R1.7 - *P.cinammomi* (Kings)



Εικ.20 : R1.7 - *Rhizoctonia* (LB)



Εικ.21 : R1.7 - *Rhizoctonia* (Kings)



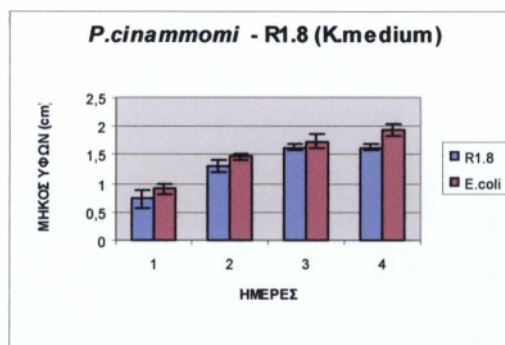
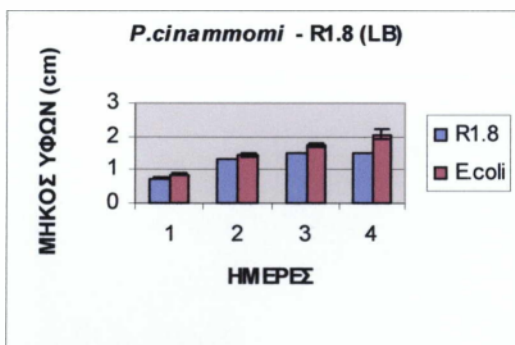
### ΒΑΚΤΗΡΙΟ R1.8



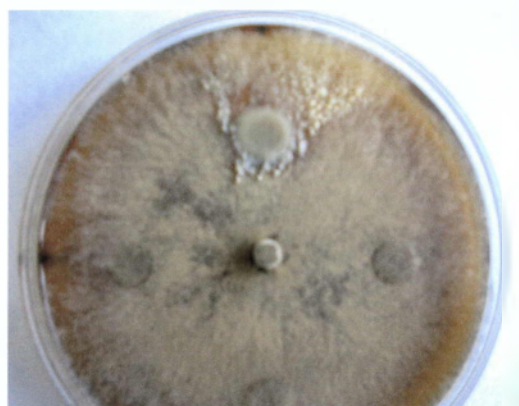
Εικ.22 : R1.8 – *P.cinammomi* (LB)



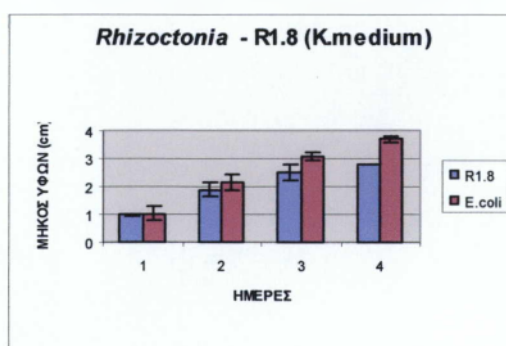
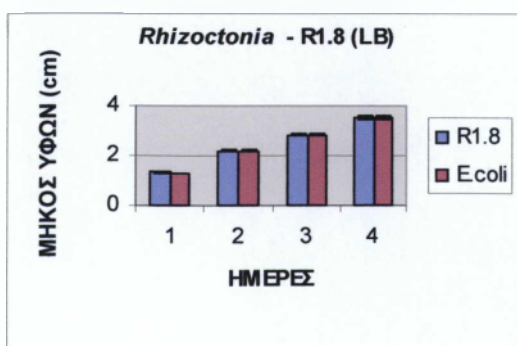
Εικ.23 : R1.8 – *P.cinammomi* (Kings)



Εικ.24 : R1.8 – *Rhizoctonia* (LB)



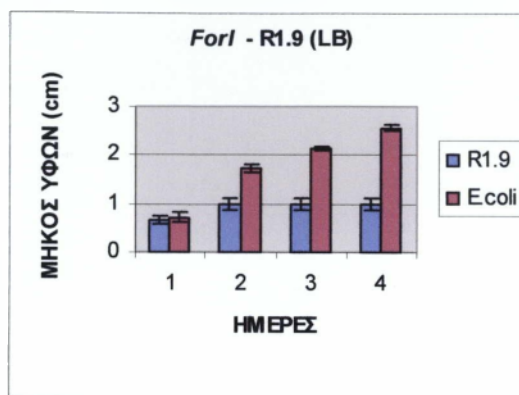
Εικ.25 : R1.8 – *Rhizoctonia* (Kings)



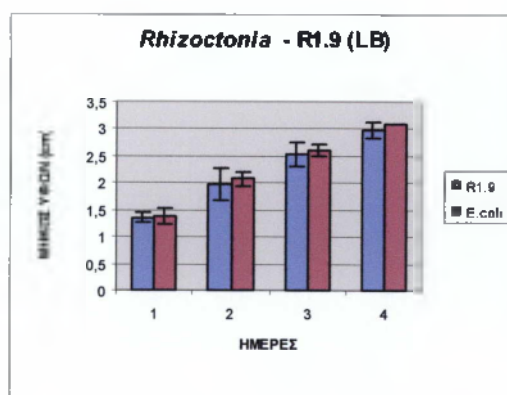
**ΒΑΚΤΗΡΙΟ R1.9**



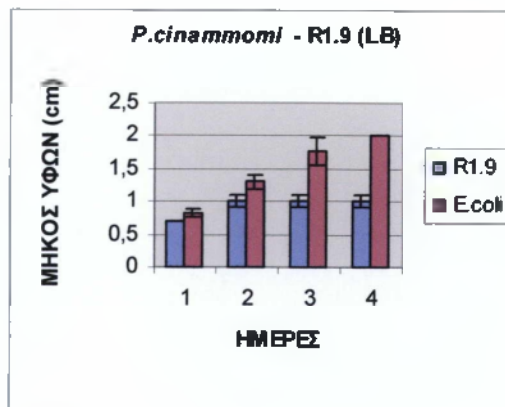
Εικ.26 : R1.9 – *Forl* (LB)



Εικ.27 : R1.9 – *Rhizoctonia* (LB)

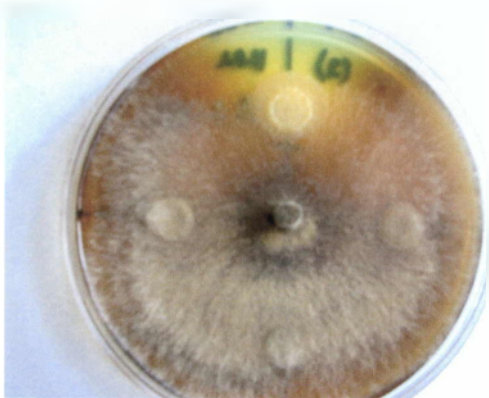


Εικ.28 : R1.9 – *P. cinammomi* (LB)

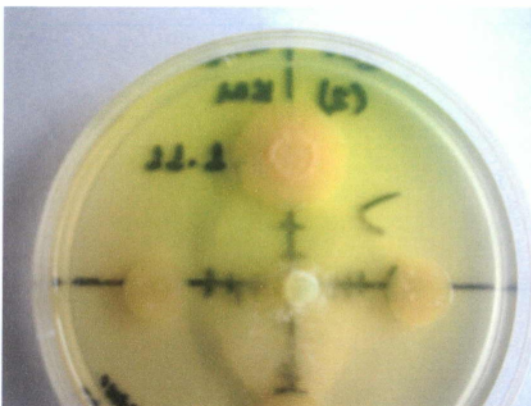
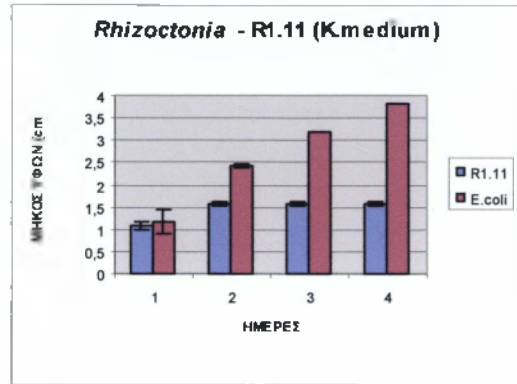




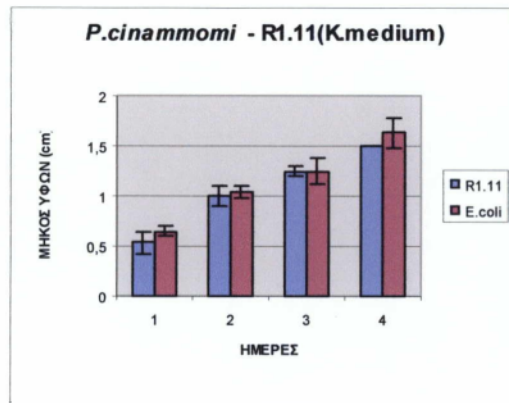
**ΒΑΚΤΗΡΙΟ R1.11**



Εικ.29 : R1.11 – *Rhizoctonia* (Kings)



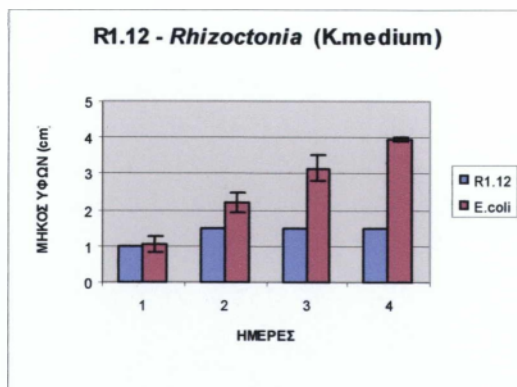
Εικ.30 : R1.11 – *P. cinammomi* (Kings)



**ΒΑΚΤΗΡΙΟ R1.12**



Εικ.31 : R1.12 – *Rhizoctonia* (Kings)

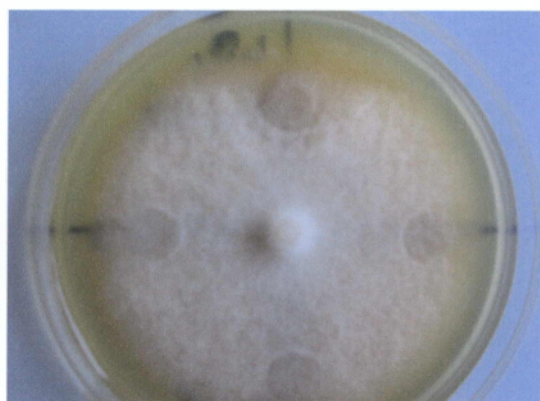
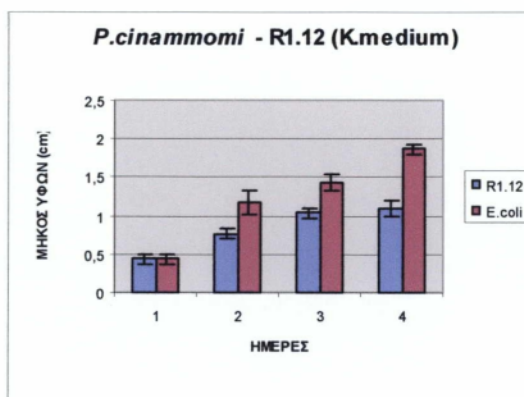
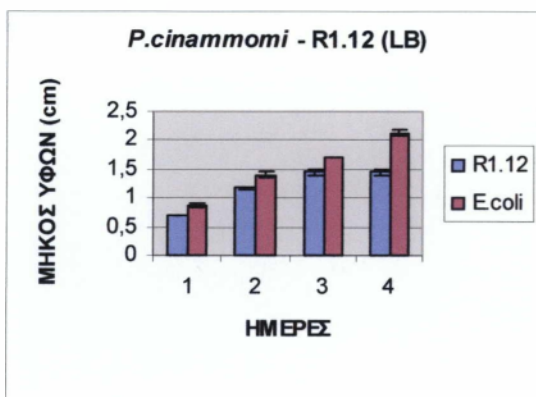




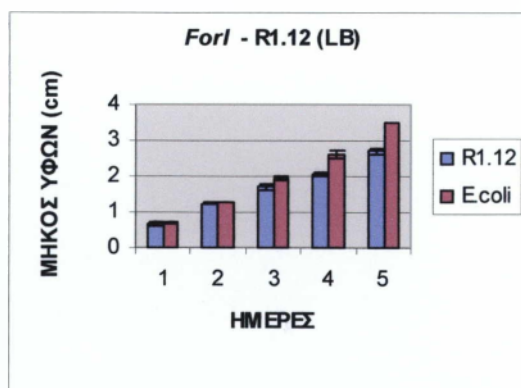
Εικ.32 : R1.12 – *P. cinammomi* (LB)

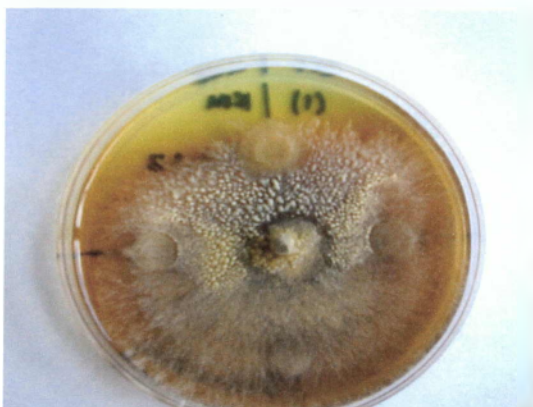
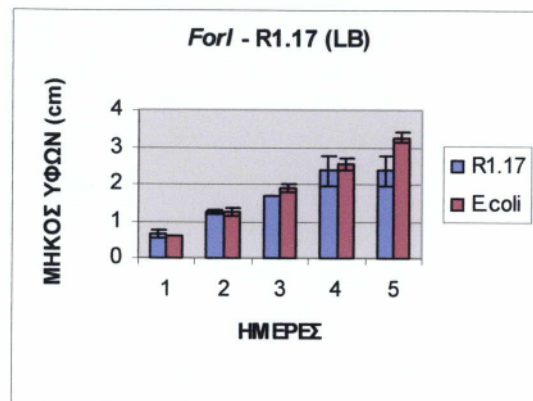
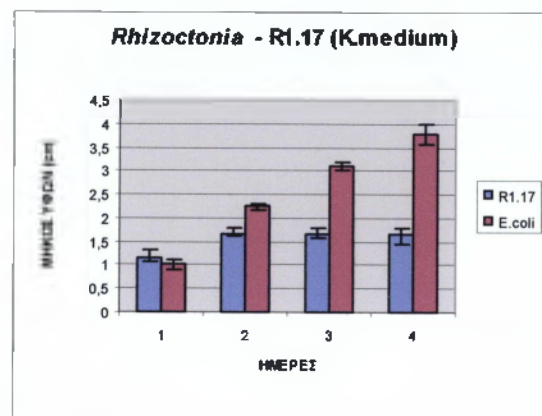


Εικ.33 : R1.12 – *P. cinammomi* (Kings)

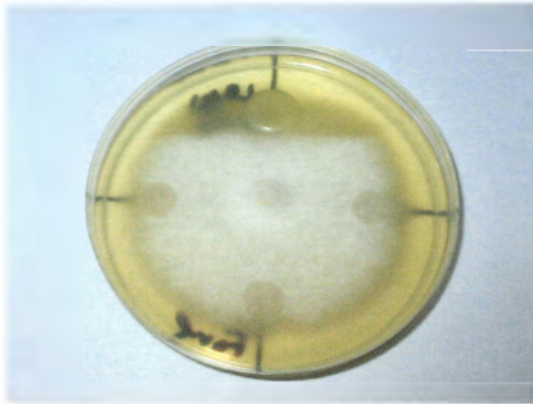


Εικ.34 : R1.12 – *Forl* (LB)

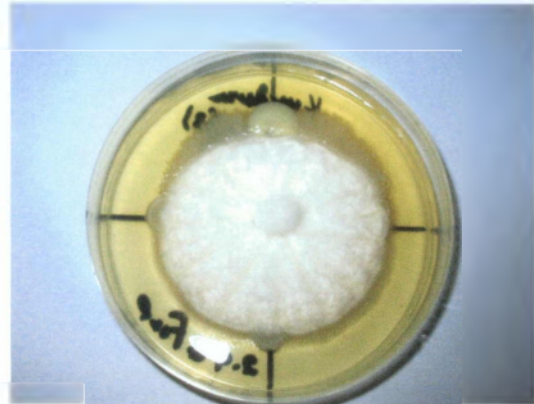


**ΒΑΚΤΗΡΙΟ R1.17**Εικ.35 : R1.17 – *Forl* (Kings)Εικ.36 : R1.17 – *Rhizoctonia* (Kings)

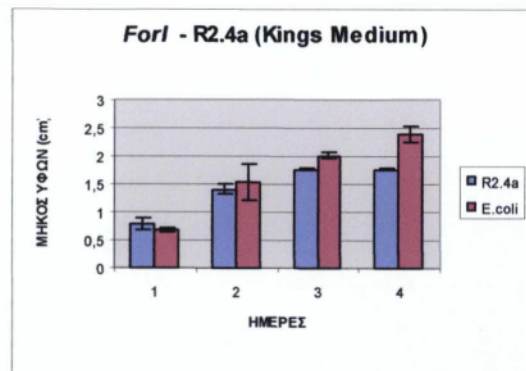
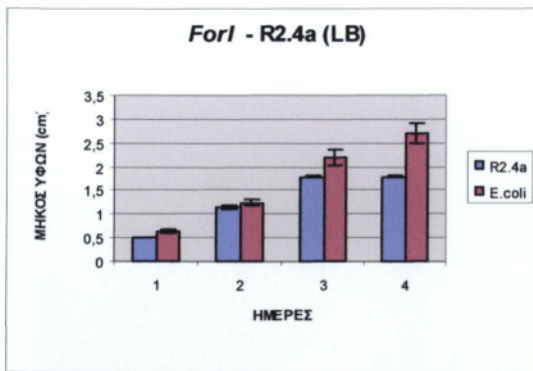
**ΒΑΚΤΗΡΙΟ R2.4a**



Εικ.37 : R2.4a – Forl (LB)



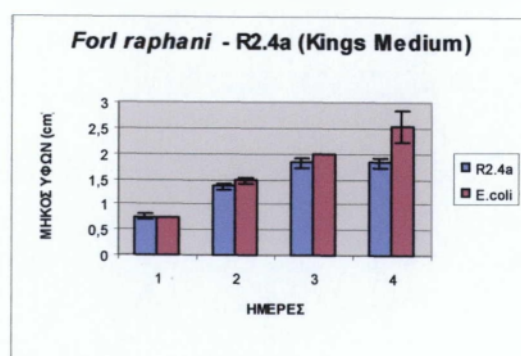
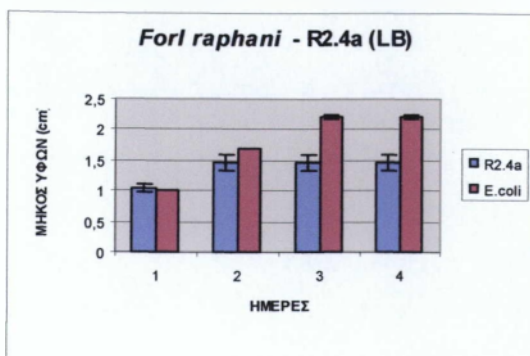
Εικ.38 : R2.4a – Forl (Kings)



Εικ.39 : R2.4a – Forl raphani (LB)



Εικ.40 : R2.4a – Forl raphani (Kings)

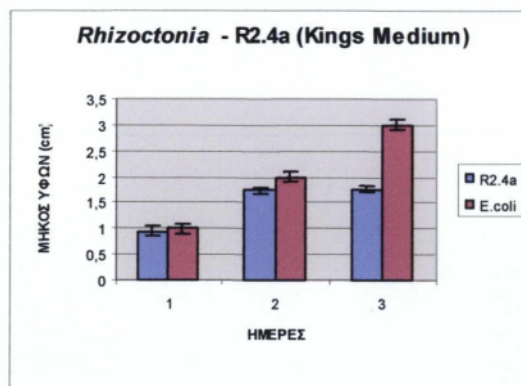
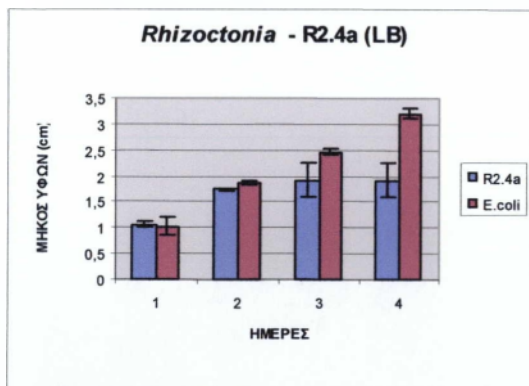




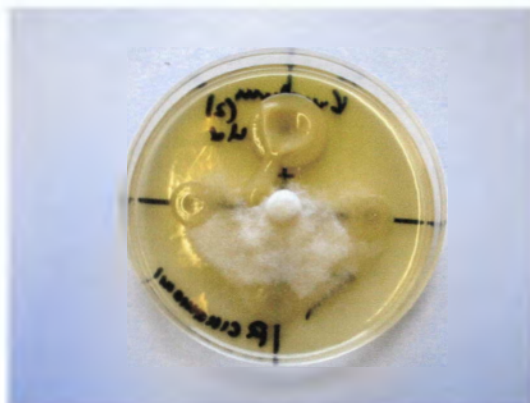
Εκ.41 : R2.4a – *Rhizoctonia* (LB)



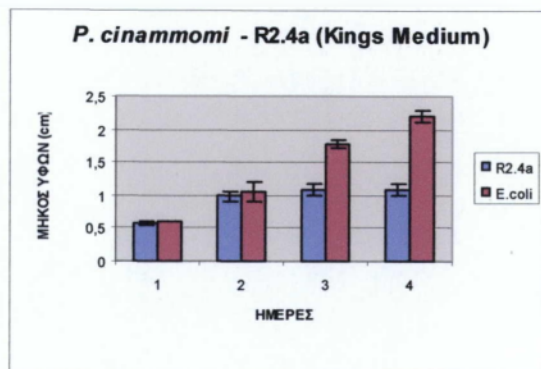
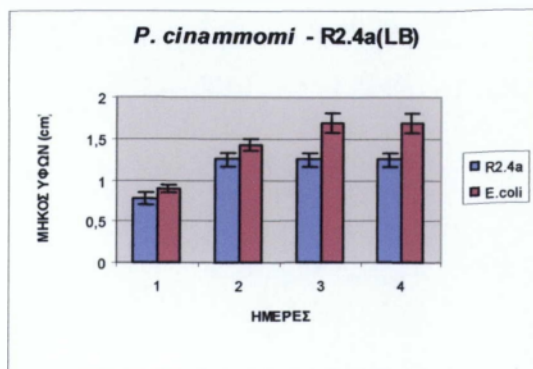
Εκ.42 : R2.4a – *Rhizoctonia* (Kings)



Εκ.43 : R2.4a- *P. cinammomi* (LB)

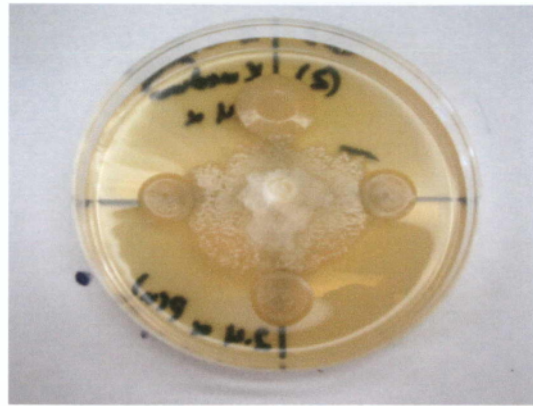


Εκ.44 : R2.4a – *P. cinammomi* (Kings)

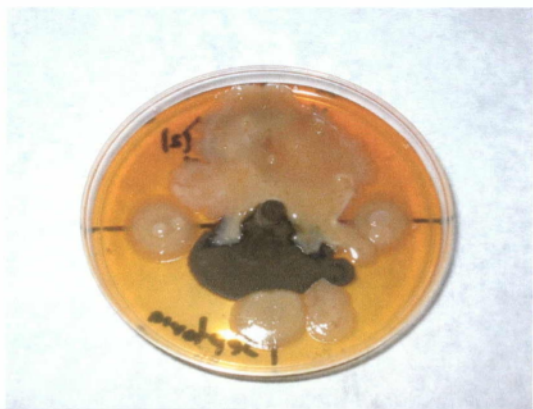
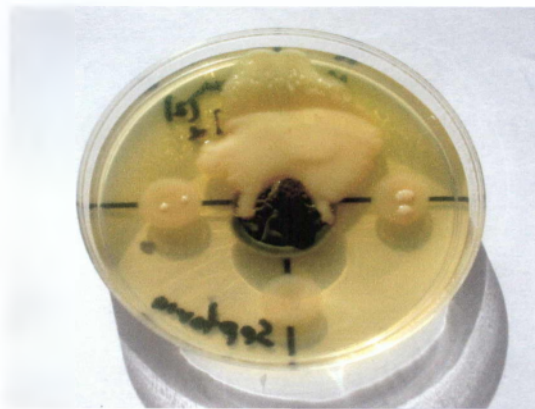
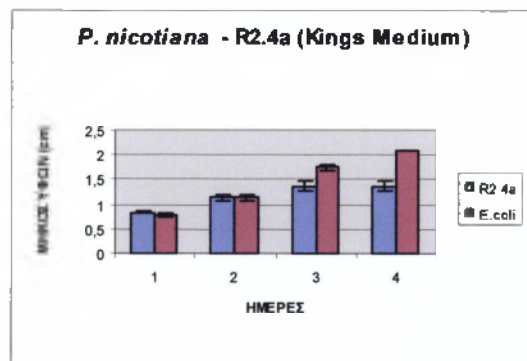
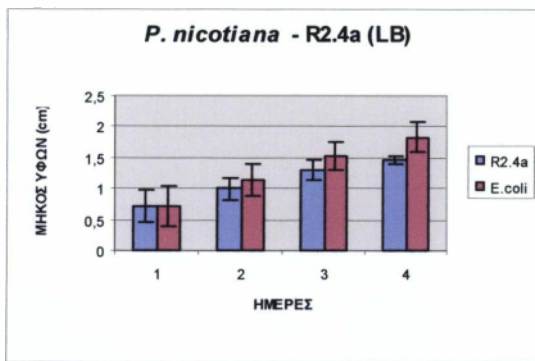




Εικ.45 : R2.4a- *P. nicotiana* (LB)



Εικ.46 : R2.4a – *P. nicotiana* (Kings)



Εικ.47 : R2.4a – *Septoria* (Kings)

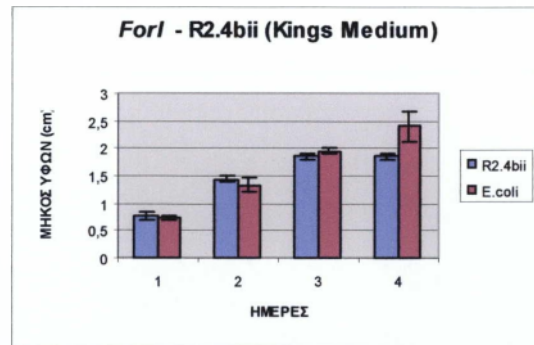
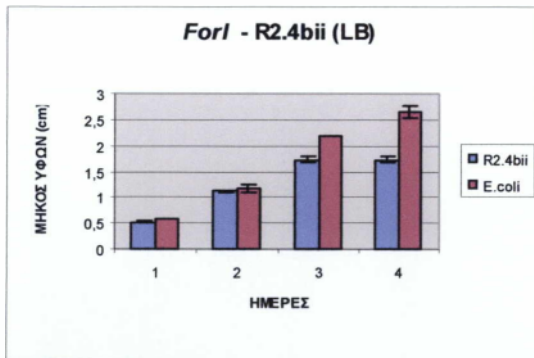
**ΒΑΚΤΗΡΙΟ R2.bii**



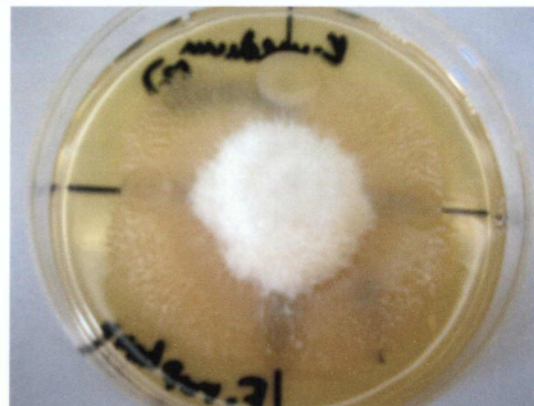
Εικ.48 : R2.4bii – *Forl* (LB)



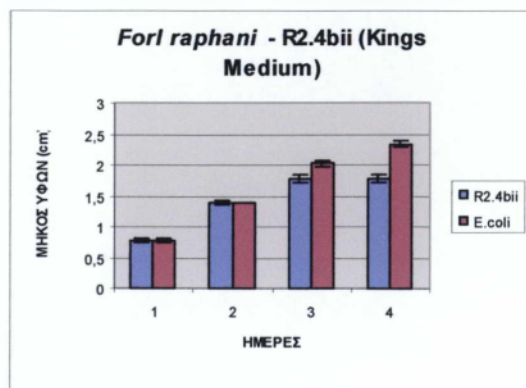
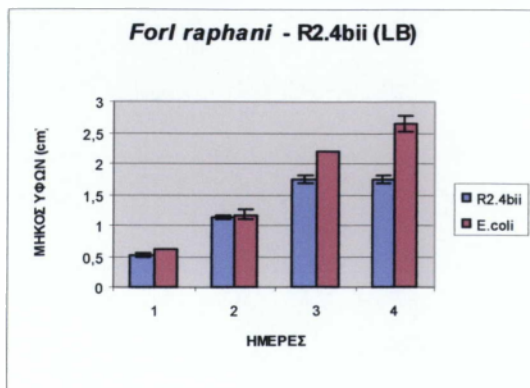
Εικ.49 : R2.4bii – *Forl* (Kings)

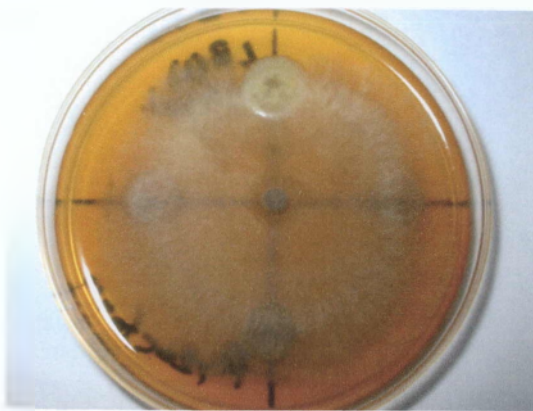


Εικ.50 : R2.4bii – *Forl raphani* (LB)



Εικ.51 : R2.4bii – *Forl raphani* (Kings)

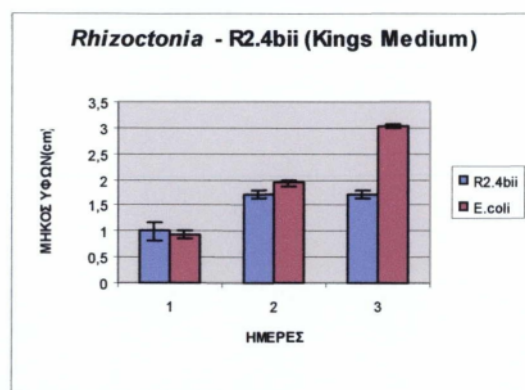
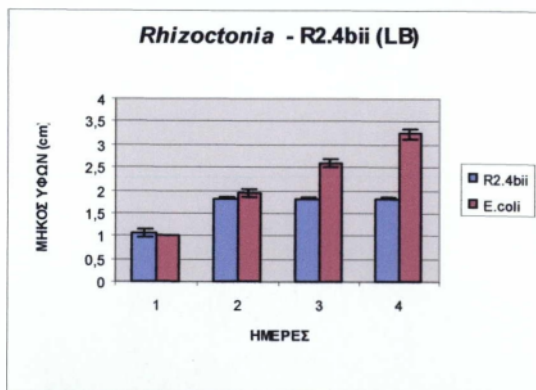




Εικ.52 : R2.4bii – *Rhizoctonia* (LB)



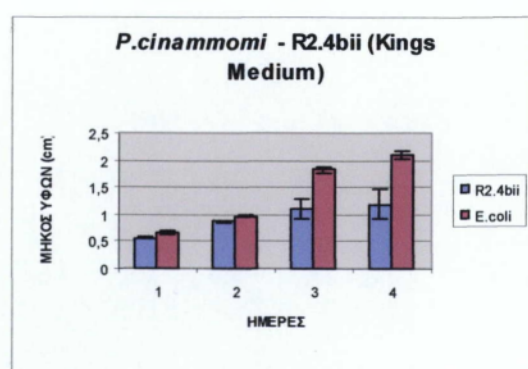
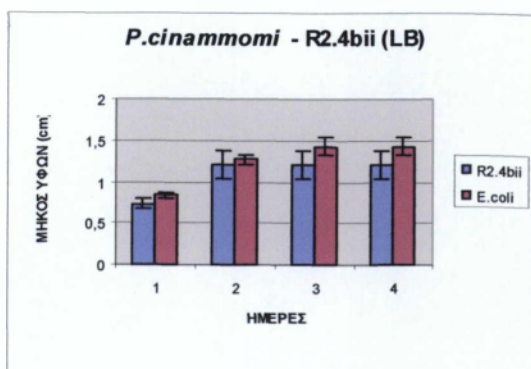
Εικ.53 : R2.4bii – *Rhizoctonia* (Kings)



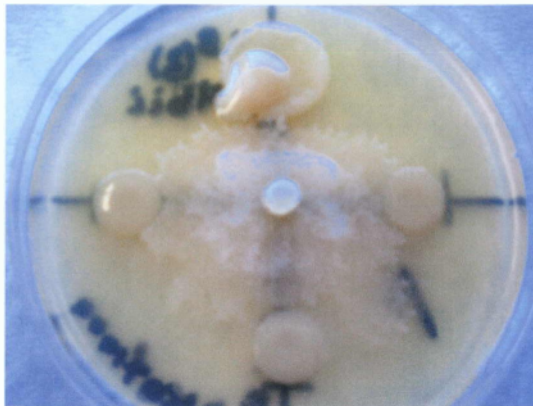
Εικ.54 : R2.4bii- *P. cinammomi* (LB)



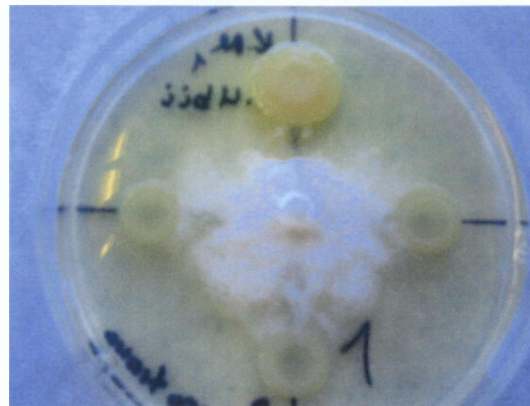
Εικ.55 : R2.4bii – *P. cinammomi* (Kings)



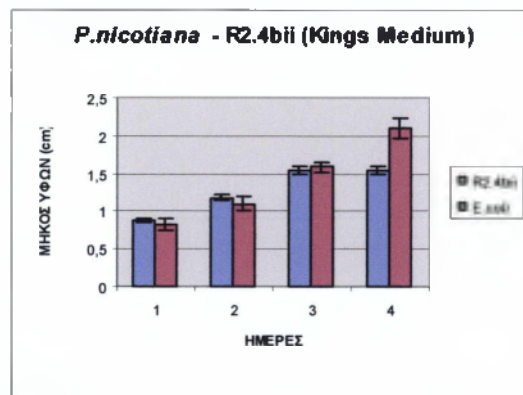
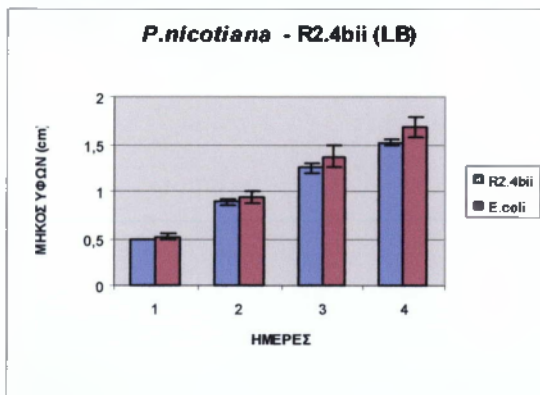




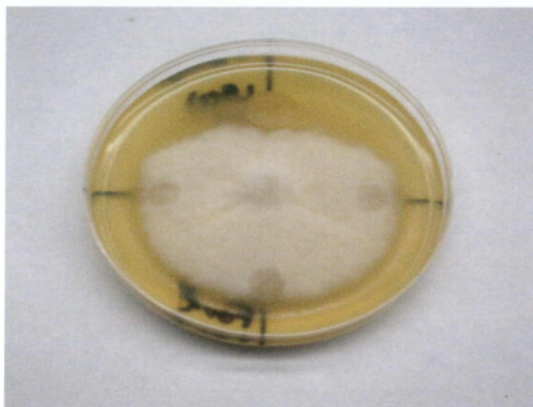
Εικ.56 : R2.4bii - *P. nicotiana* (LB)



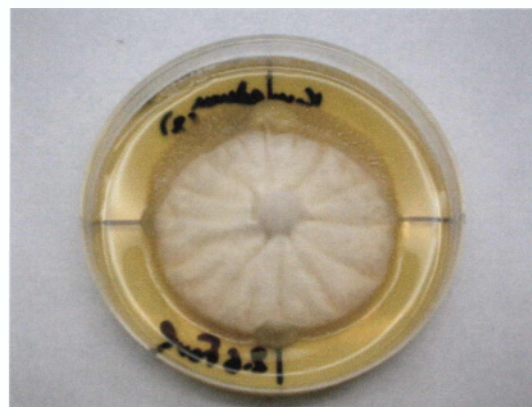
Εικ.57 : R2.4bii - *P. nicotiana* (Kings)



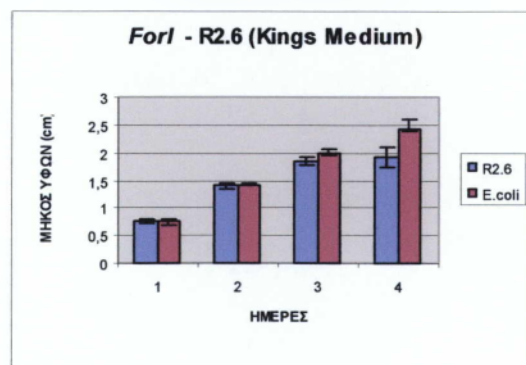
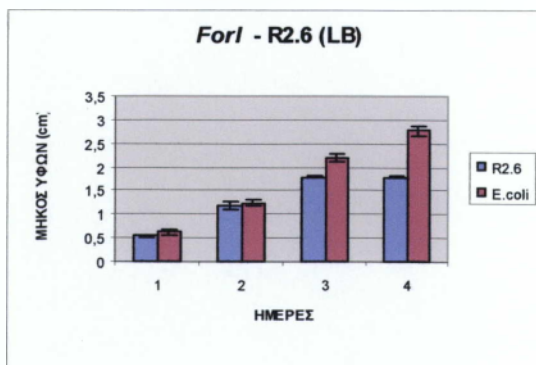
### ΒΑΚΤΗΡΙΟ R2.6

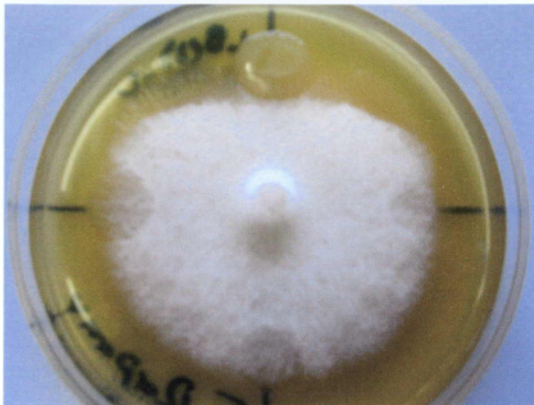


Εικ.58 : R2.6 - *Forl* (LB)



Εικ.59 : R2.6 - *Forl* (Kings)

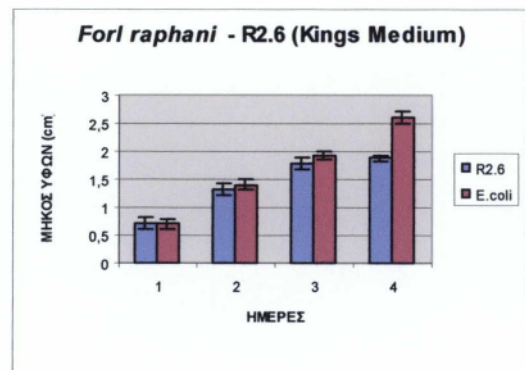
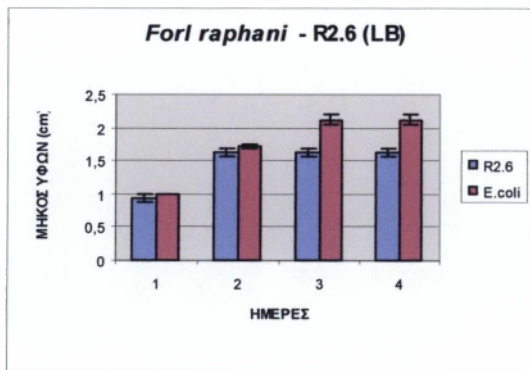




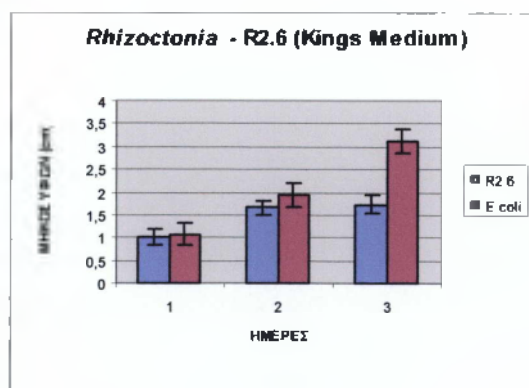
Εικ.60 : R2.6 – *Forl raphani* (LB)



Εικ.61 : R2.6 – *Forl raphani* (Kings)



Εικ.62 : R2.6 – *Rhizoctonia* (Kings)

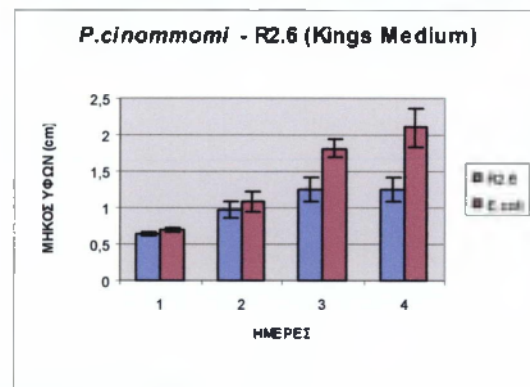
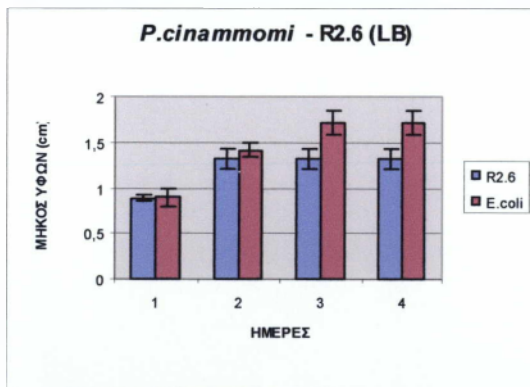




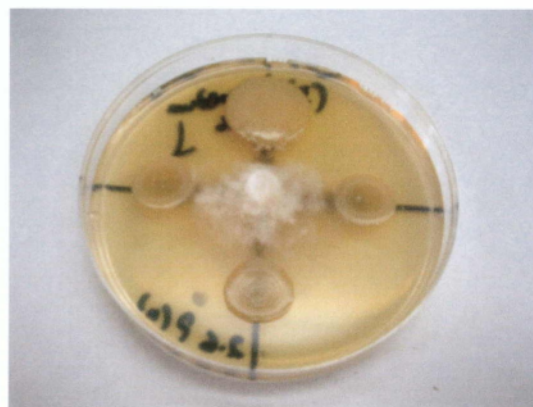
Εικ.63 : R2.6 - *P.cinammomi* (LB)



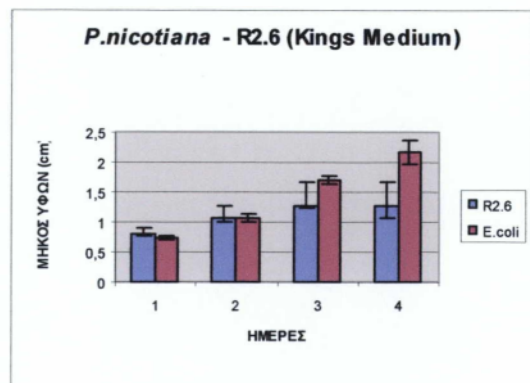
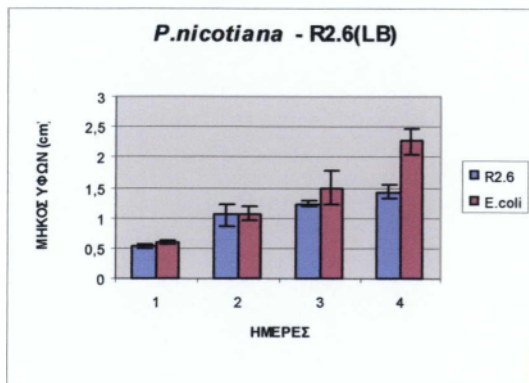
Εικ.64 : R2.6 - *P.cinammomi* (Kings)



Εικ.65 : R2.6 - *P.nicotiana* (LB)



Εικ.66 : R2.6 - *P.nicotiana* (Kings)



## 2.1.2 ΕΝΔΟΦΥΤΙΚΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ

Από τα 16 στελέχη που απομονώσαμε από τις ρίζες των φυτών τα 7 στελέχη προέρχονται από το Κα1 2 ενώ τα υπόλοιπα 9 από το Κα1 3. Η συγκεκριμένη εργασία δεν πραγματοποιήθηκε για το Κα1 1 οπότε από το κομπόστ αυτό δεν έχουμε κανένα ενδοφυτικό βακτήριο. Στους πίνακες 5 και 6 συνοψίζονται γενικά τα αποτελέσματα που πήραμε από τον εργαστηριακό έλεγχο των βακτηρίων. Αναλυτικά τα αποτελέσματα φαίνονται στις φωτογραφίες και στα γραφήματα.

ΠΙΝΑΚΑΣ 5 : ΕΝΔΟΦΥΤΙΚΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ ΑΠΟ Κα1 2

Βακτήρια	Παθογόνοι Μύκητες		
	<i>Forl</i>	<i>P.cinammomi</i>	<i>Rhizoctonia</i>
	LB	LB	LB
E2.1	+	-	+
E2.2	+	+	-
E2.3	+	+	+
E2.4	+	+	+
E2.5	+	+	+
E2.6	-	-	-
E2.7	+	+	-

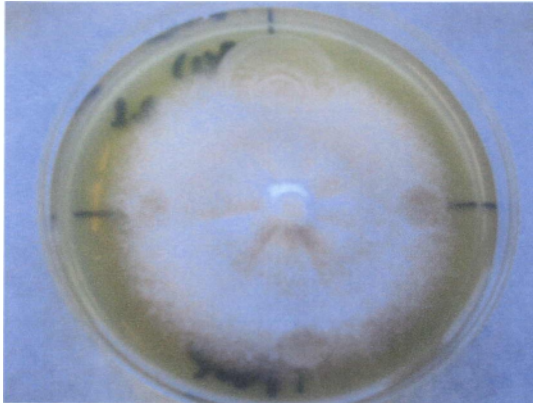
ΠΙΝΑΚΑΣ 6 : ΕΝΔΟΦΥΤΙΚΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ ΑΠΟ Κα1 3

Βακτήρια	Παθογόνοι Μύκητες		
	<i>Forl</i>	<i>P.cinammomi</i>	<i>Rhizoctonia</i>
	LB	LB	LB
E3.1	+	+	+
E3.2	-	-	-
E3.3	-	-	-
E3.4	+	+	+
E3.5	-	-	-
E3.6	-	-	-
E3.7	-	-	-
E3.8	-	-	-
E3.9	-	-	-

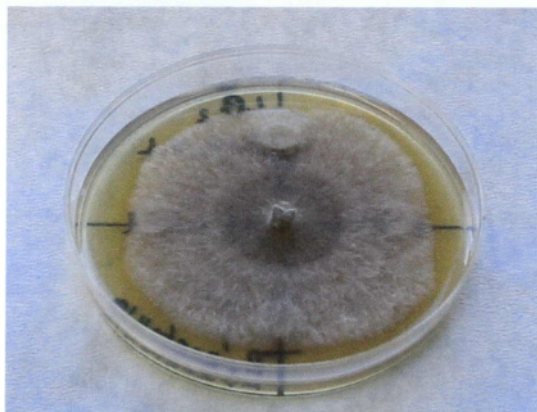
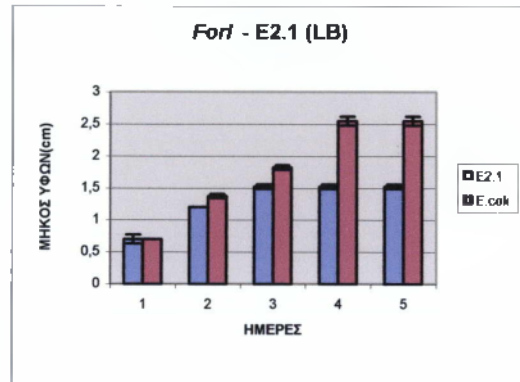
Παρατηρώντας προσεκτικά τους δυο παραπάνω πίνακες βλέπουμε ότι και από το Kal 2 και από το Kal 3 απομονώσαμε περίπου τον ίδιο αριθμό βακτηρίων. Όσον αφορά την αναστολή στην ανάπτυξη των παθογόνων μυκήτων που προκάλεσαν τα συγκεκριμένα βακτήρια, παρατηρούμε ότι τα ενδοφυτικά βακτήρια που προήλθαν από το Kal 2 παρουσιάζονται με πολύ ισχυρότερη ανασταλτική δράση ενάντια των φυτοπαθογόνων σε *in vitro* δοκιμές από τα βακτήρια του Kal 3.

Περισσότερες παρατηρήσεις και λεπτομέρειες υπάρχουν στις παρακάτω φωτογραφίες (Εικ. 67 έως Εικ. 87) στις οποίες, ομοίως με τις προηγούμενες, φαίνεται ξεκάθαρα η αναστολή που προκαλούν τα ενδοφυτικά βακτήρια στην ανάπτυξη των παθογόνων μυκήτων. Επίσης στα γραφήματα απεικονίζεται η σύγκριση του μήκους των υφών (cm) του παθογόνου μύκητα, στη περιοχή ανάπτυξης των απομονωμένων βακτηρίων, σε σχέση με το μήκος των υφών που έχει ο μύκητας στη περιοχή ανάπτυξης του εντεροβακτηρίου *E.coli*, μέρα με τη μέρα.

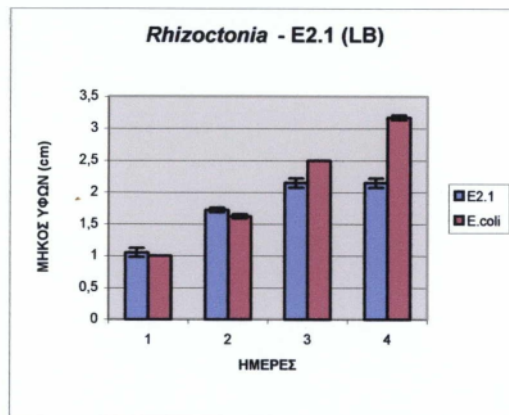
## ΒΑΚΤΗΡΙΟ E2.1

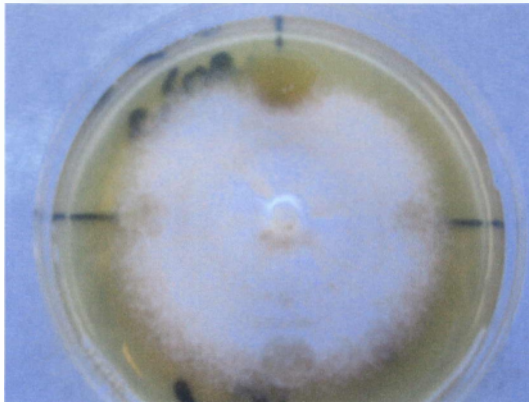


Εικ.67 : E2.1 – Forl

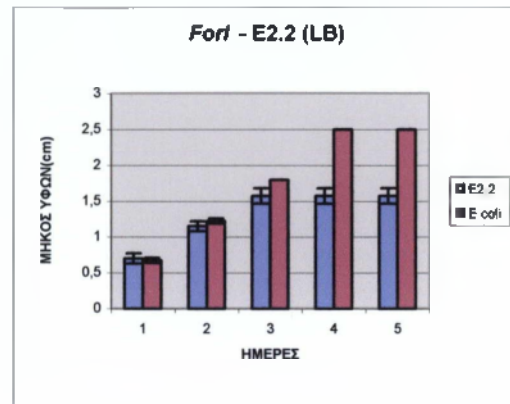


Εικ.68 : E2.1 – Rhizoctonia



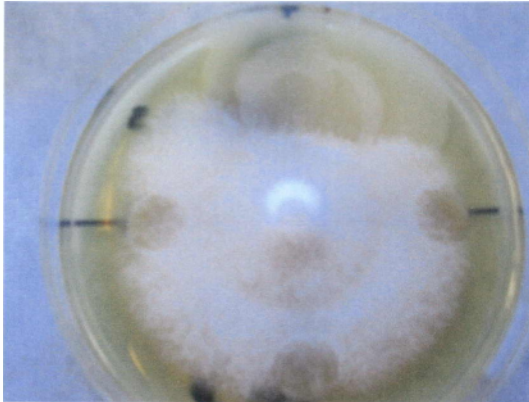
**ΒΑΚΤΗΡΙΟ E2.2**

Εικ.69 : E2.2 – Forl

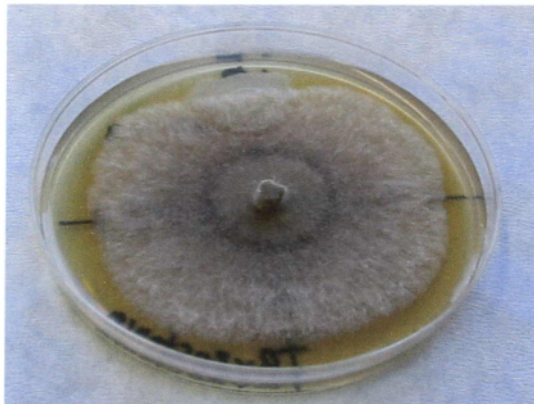
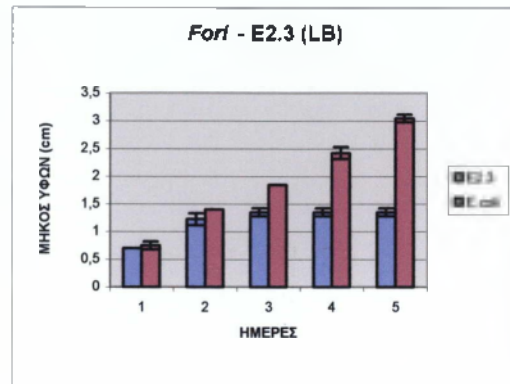


Εικ.70 : E2.2 – P.cinammomi

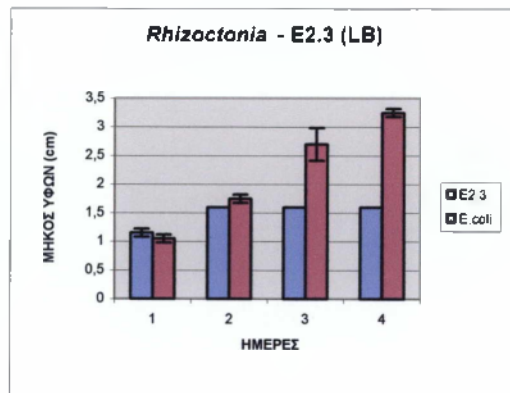
**ΒΑΚΤΗΡΙΟ E2.3**



Εικ.71 : E2.3 – Forl



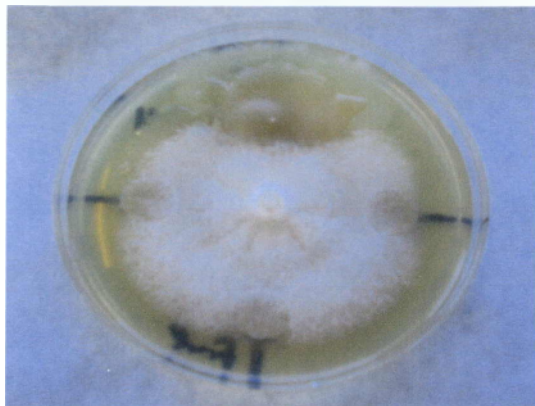
Εικ.72 : E2.3 – Rhizoctonia (LB)



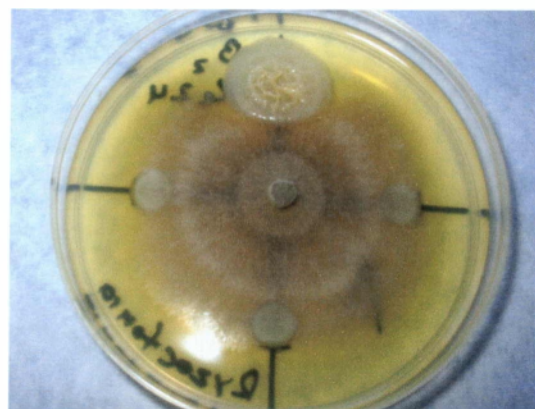
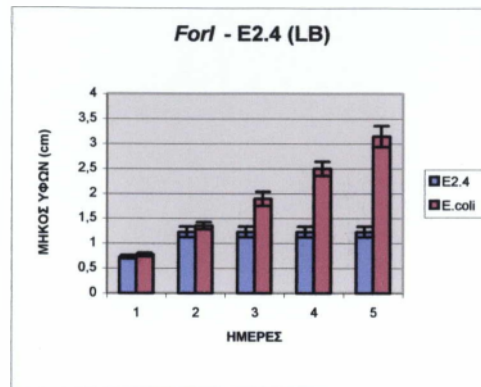
Εικ.73 : E2.3 – P.cinammomi (LB)



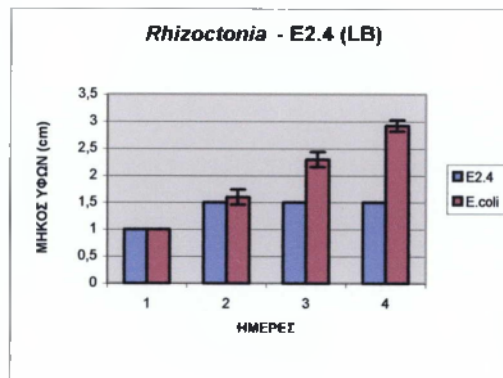
**ΒΑΚΤΗΡΙΟ E2.4**



Εικ.74 : E2.4 – Forl (LB)

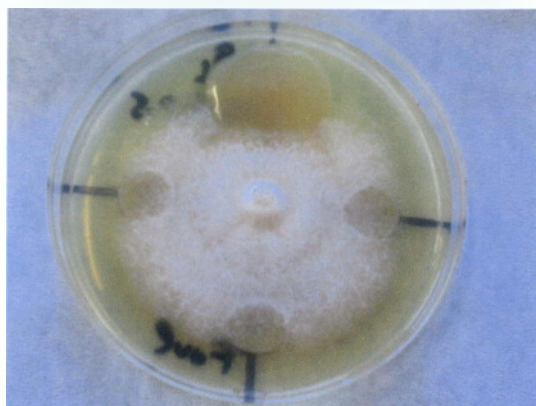


Εικ.75 : E2.4 – Rhizoctonia (LB)

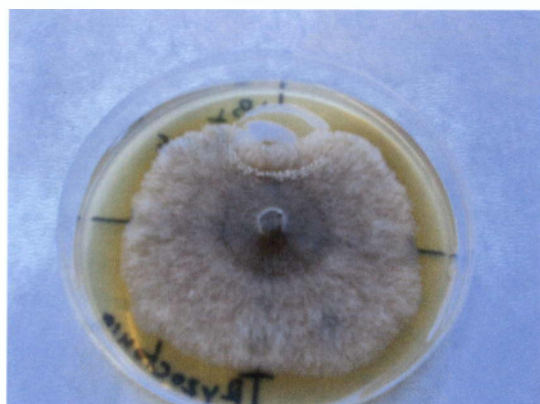
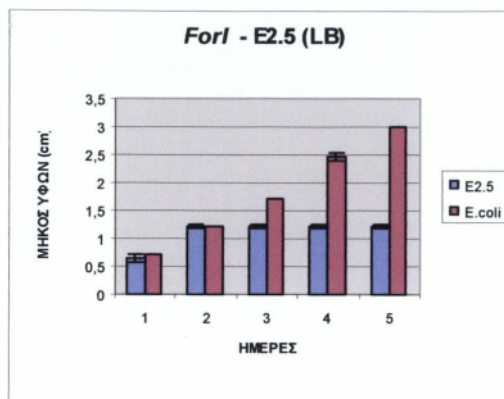


Εικ.76 : E2.4 – P.cinammomi (LB)

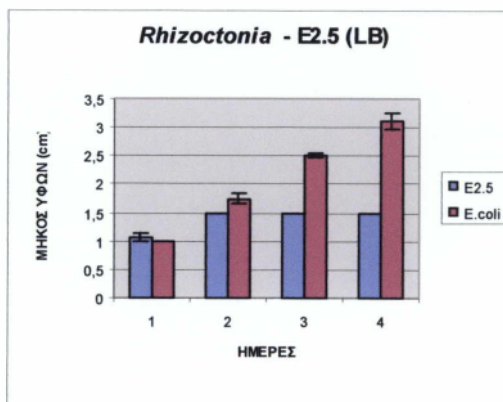
### ΒΑΚΤΗΡΙΟ E2.5



Εικ.77 : E2.5 – Forl (LB)

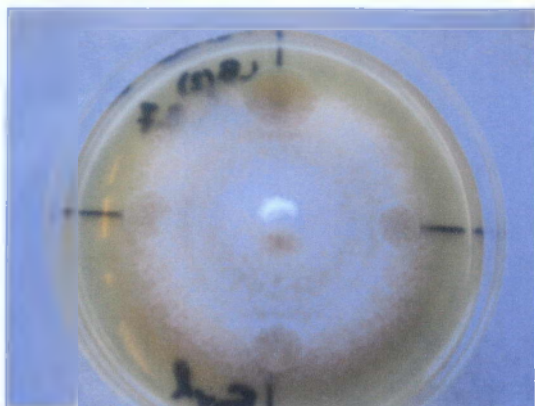


Εικ.78 : E2.5 – Rhizoctonia (LB)

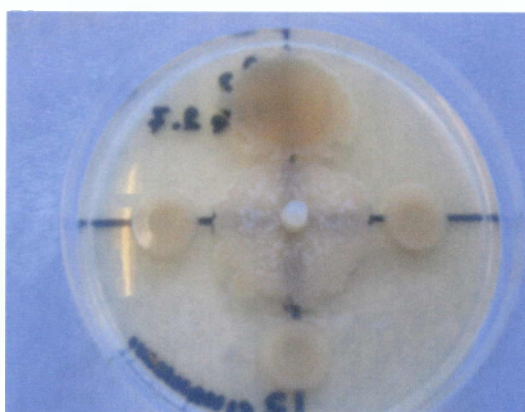
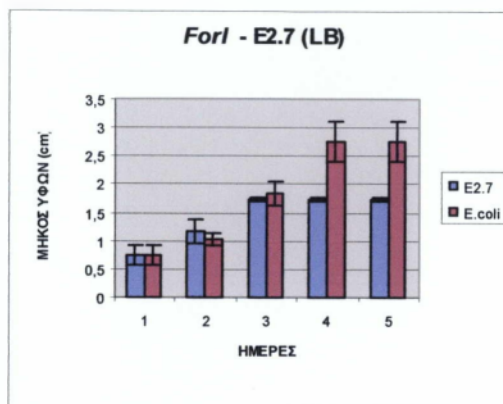


Εικ.79 : E2.5 – P.cinammomi (LB)

### ΒΑΚΤΗΡΙΟ E2.7



Εικ.80 : E2.7 – Forl (LB)

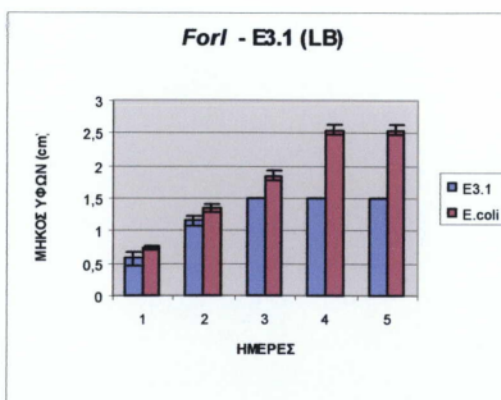


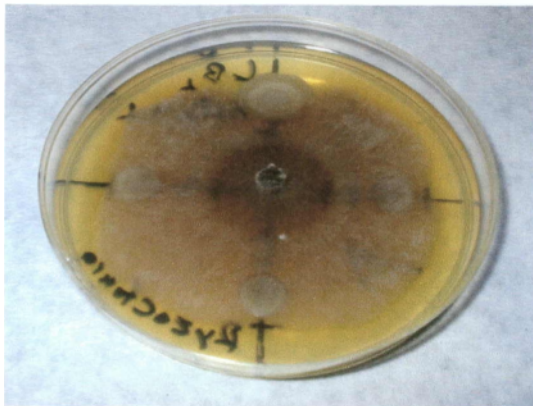
Εικ.81 : E2.7 – P.cinammomi (LB)

### ΒΑΚΤΗΡΙΟ E3.1

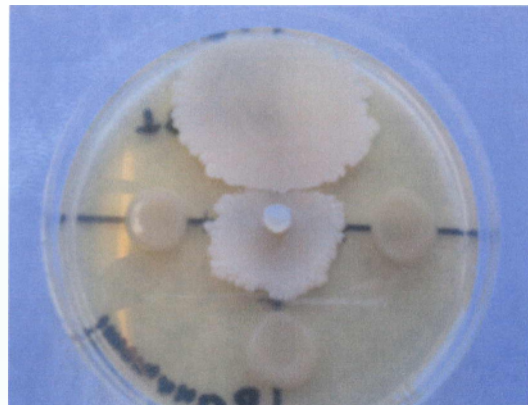
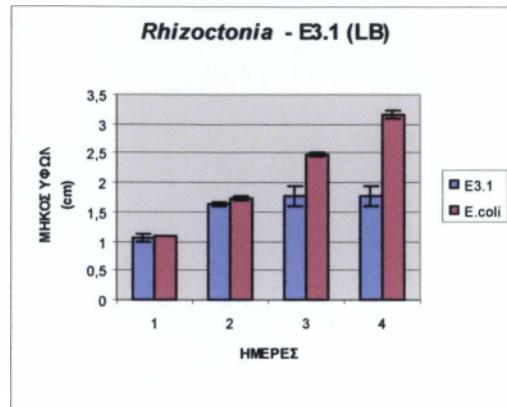


Εικ.82 : E3.1 – Forl (LB)



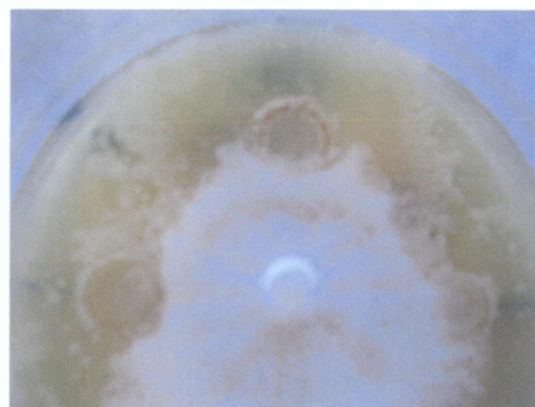
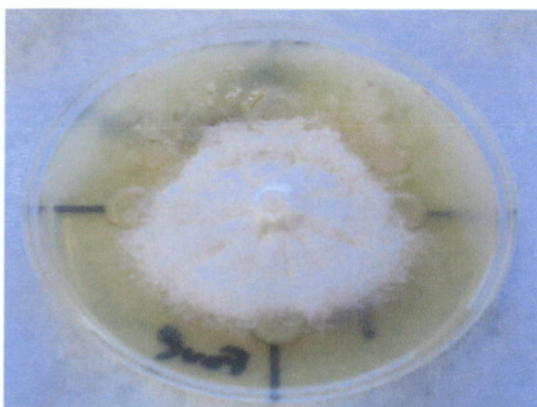


Εικ.83 : E3.1 – *Rhizoctonia* (LB)

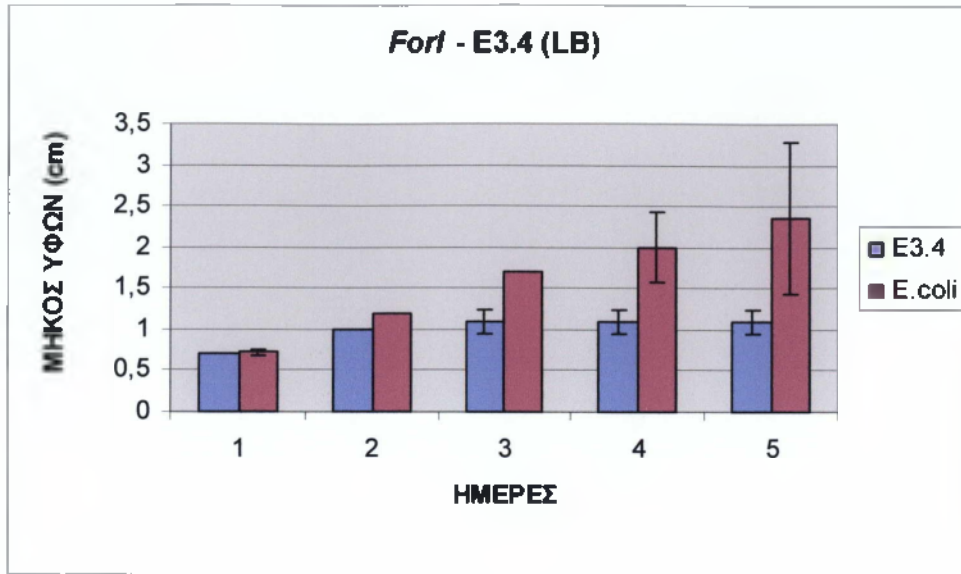


Εικ.84 : E3.1 – *P.cinammomi* (LB)

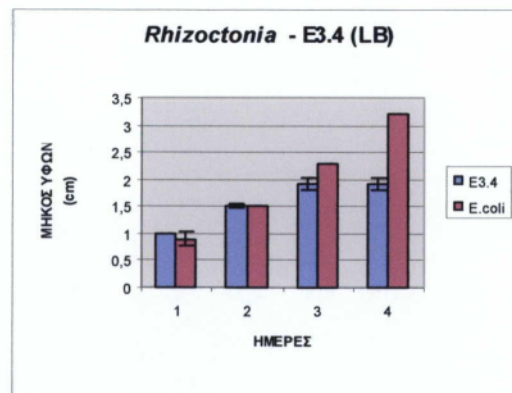
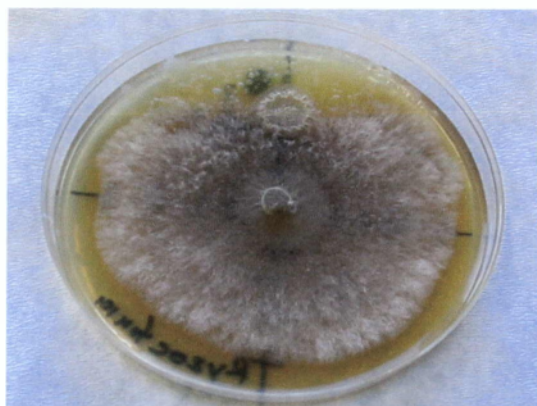
**ΒΑΚΤΗΡΙΟ E3.4**



Εικ.85 : E3.4 – *Forl* (LB)



Εικ.86 : E3.4 – *P.cinammomi* (LB)



Εικ.87 : E3.4 – *Rhizoctonia* (LB)

## 2.1.3 ΜΥΚΗΤΕΣ

Από τους 8 μύκητες που απομονώσαμε οι δυο προέρχονται από το Κα1, οι πέντε από το Κα1 2 και ο ένας από το Κα1 3. Στους πίνακες 7 και 8 αναγράφονται τα αποτελέσματα των πειραμάτων και των δυο επεμβάσεων που έγιναν με τους απομονωμένους μύκητες. Αναλυτικά τα αποτελέσματα της 1<sup>ης</sup> επέμβασης δίνονται με φωτογραφίες και της 2<sup>ης</sup> επέμβασης με γραφήματα.

**ΠΙΝΑΚΑΣ 7 : ΜΥΚΗΤΕΣ ΑΠΟ Κα1 ΚΑΙ Κα1 2  
1<sup>η</sup> επέμβαση**

Μύκητες από κομπόστ	Παθογόνοι Μύκητες	
	<i>Forl</i>	<i>P.cinammomi</i>
	PDA	PDA
F1.1	-	-
F 1.2	-	+
F2.7	-	-
F2.8	-	-
F2.9	+	+
F2.10	-	+
F 2.11	-	-
F3.5	-	-

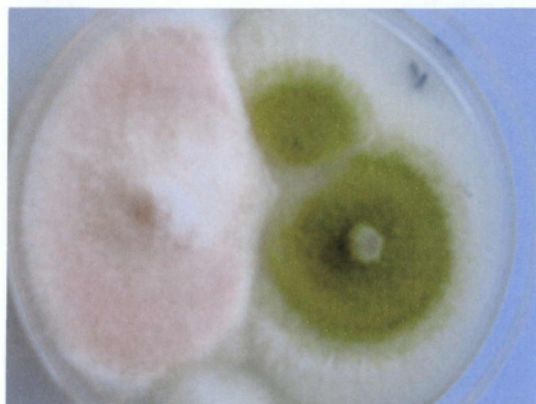
**ΠΙΝΑΚΑΣ 8 : ΜΥΚΗΤΕΣ ΑΠΟ Κα1 ΚΑΙ Κα1 2  
2<sup>η</sup> επέμβαση**

Μύκητες από κομπόστ	Παθογόνοι Μύκητες	
	<i>Forl</i>	<i>P.cinammomi</i>
	PDA	PDA
F 1.2	+	+
F2.7	+	-
F2.8	-	-
F2.9	+	+
F2.10	+	-

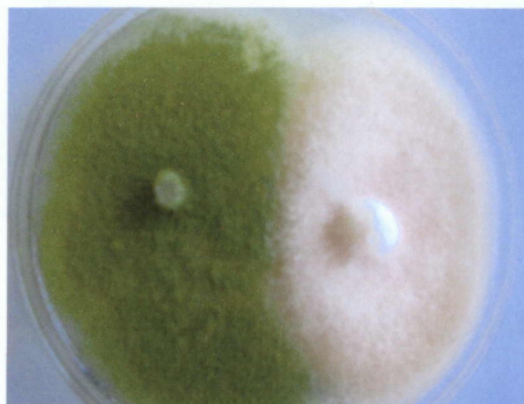
Από τους παραπάνω πίνακες παρατηρούμε ότι από το κομπόστ Kal 2 έχουμε κάνει τις περισσότερες απομονώσεις μυκήτων και είχαμε και τα καλύτερα αποτελέσματα συγκριτικά με τα άλλα δυο κομπόστ.

Παρακάτω παρατίθενται φωτογραφίες (Εικ. 88 έως Εικ. 97) στις οποίες φαίνεται η αναστολή της ανάπτυξης του παθογόνου μύκητα, που δημιουργείται από τους μύκητες που απομονώσαμε από τα κομπόστ. Επίσης στα γραφήματα που ακολουθούν γίνεται σύγκριση του μήκους των υφών του παθογόνου μύκητα, που αναπτύσσεται πάνω σε εξαντλημένο υπόστρωμα απομονωμένων μυκήτων, με το μήκος που έχουν οι υφές του παθογόνου μύκητα ο οποίος αναπτύσσεται πάνω σε φυσιολογικό θρεπτικό υπόστρωμα PDA, από μέρα σε μέρα.

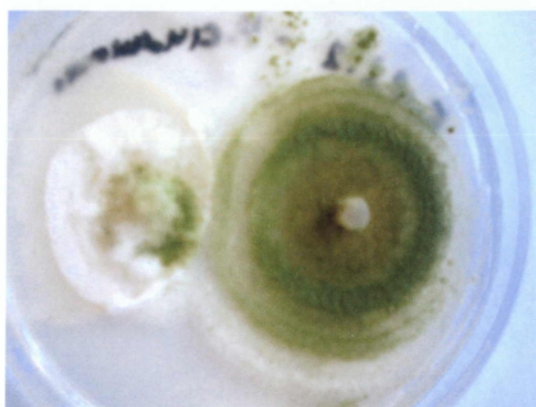
### ΜΥΚΗΤΑΣ F1.2



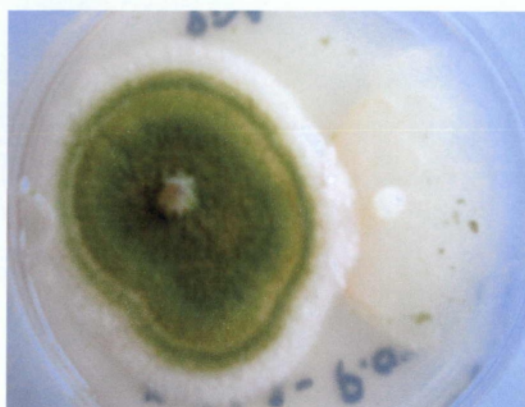
Εικ. 88 : *Forl* – F1.2 (PDA)



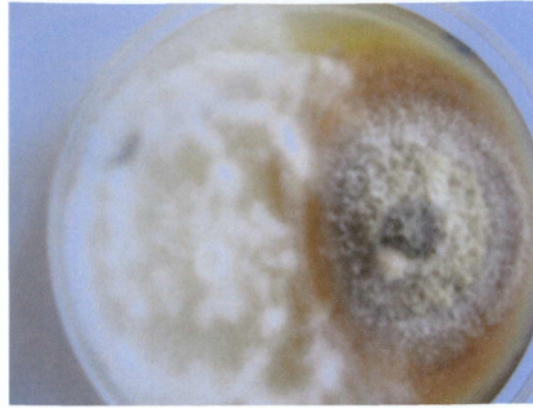
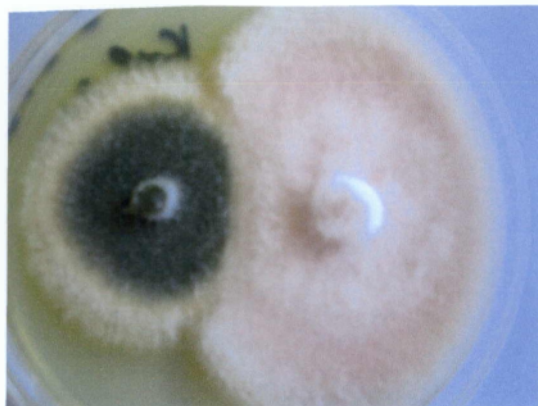
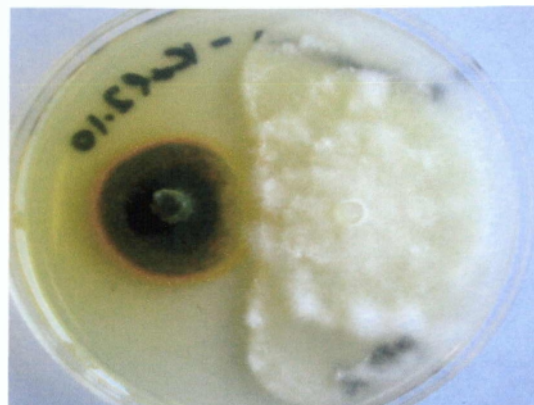
Εικ.89 : F1.2 – *Forl* (PDA)



Εικ.90 : *P.cinammomi* – F 1.2 (PDA)

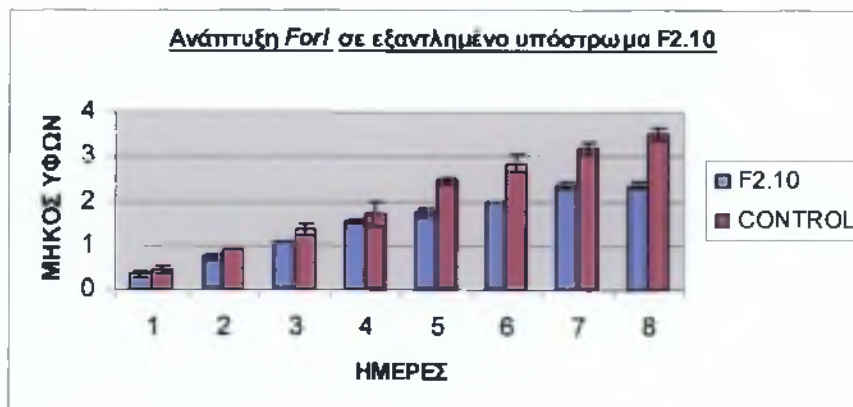
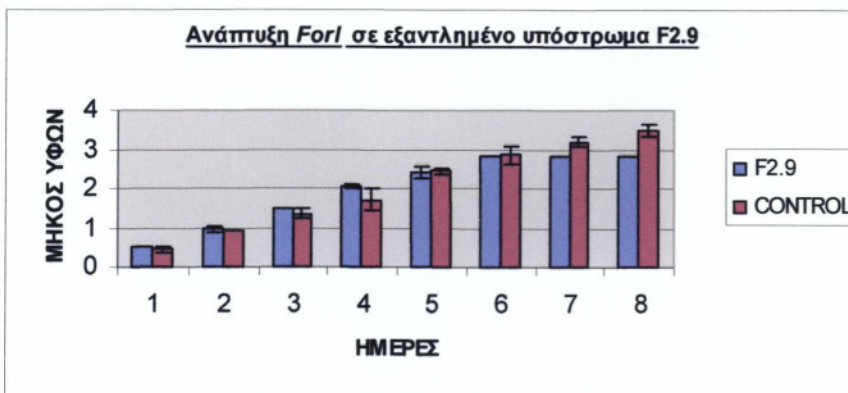
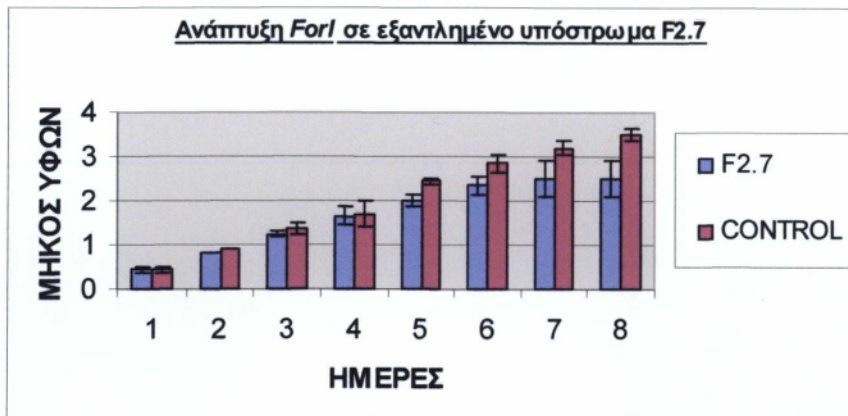
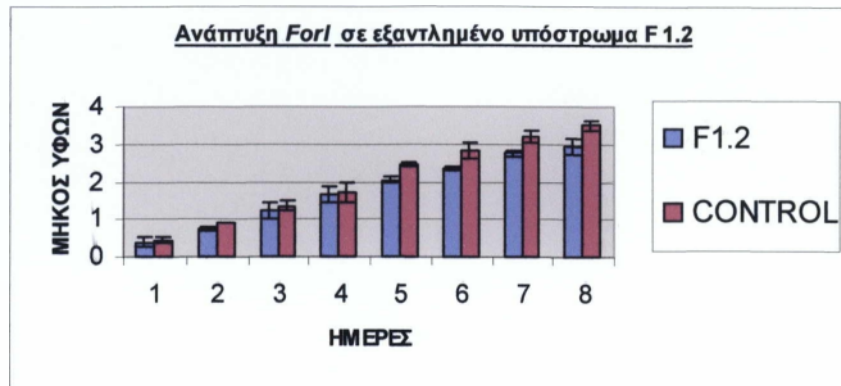


Εικ.91 : F 1.2 – *P.cinammomi* (PDA)

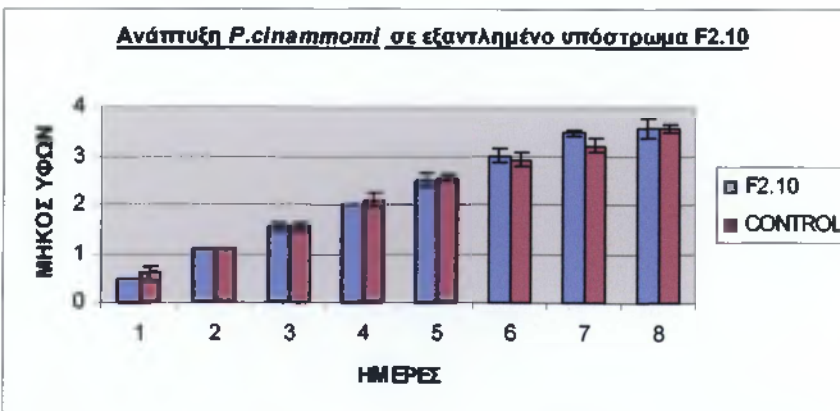
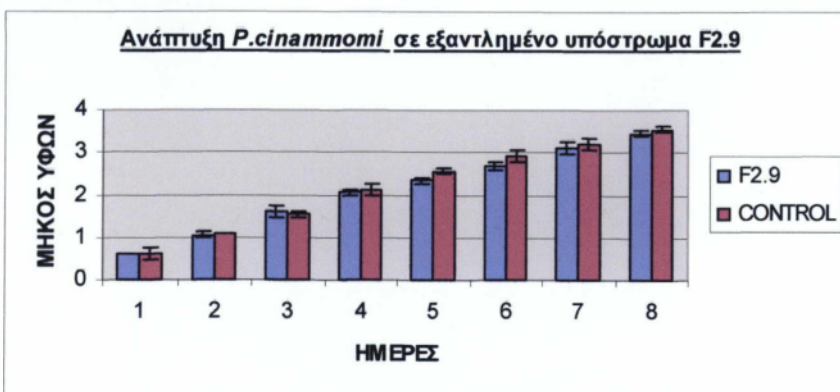
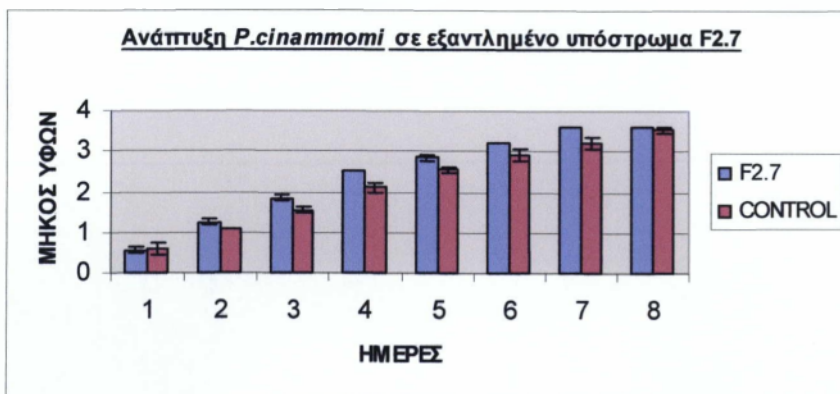
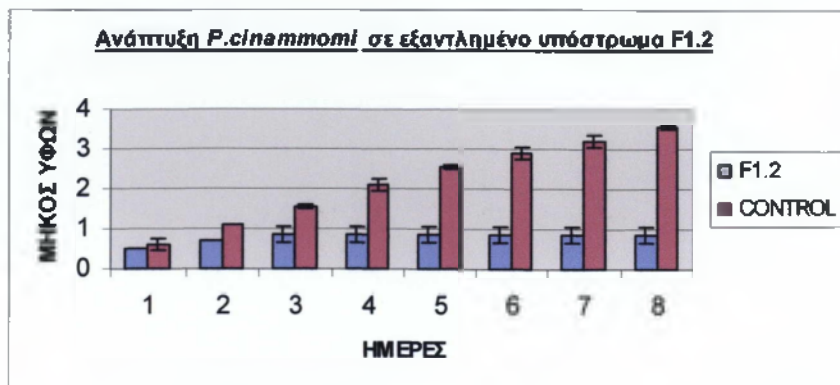
**ΜΥΚΗΤΑΣ F2.7**Εικ. 92 : *Forl* – F2.7 (PDA)Εικ.93 : *P.cinammomi* – F2.7 (PDA)**ΜΥΚΗΤΑΣ F2.9**Εικ. 94 : F2.9 - *Forl* (PDA)Εικ.95 : F 2.9 – *P.cinammomi* (PDA)**ΜΥΚΗΤΑΣ F2.10**Εικ. 96 : F2.10 - *Forl* (PDA)Εικ. 97 : F 2.10 – *P.cinammomi* (PDA)



### ΓΡΑΦΗΜΑΤΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ *Forl* ΣΕ ΕΞΑΝΤΛΗΜΕΝΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ ΜΥΚΗΤΩΝ ΑΠΟ Kal 1 & Kal 2



### ΓΡΑΦΗΜΑΤΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ *P.cinnamomi* ΣΕ ΕΞΑΝΤΛΗΜΕΝΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ ΜΥΚΗΤΩΝ ΑΠΟ Kal 1 & Kal 2



## 2.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΝΖΥΜΙΚΩΝ ΔΟΚΙΜΩΝ

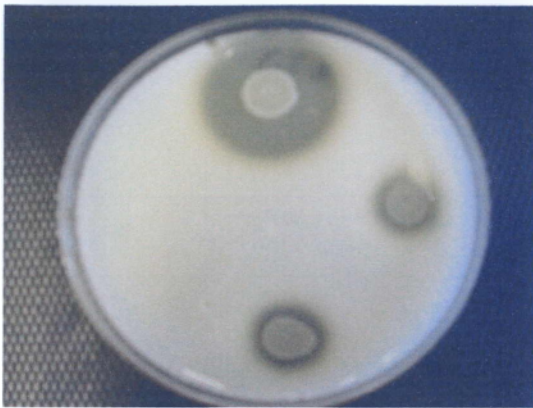
Στις ενζυμικές δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο, χρησιμοποιήσαμε ορισμένα μόνο βακτηριακά στελέχη. Στον παρακάτω πίνακα 9 συνοψίζονται τα αποτελέσματα που μας έδωσαν ορισμένα ριζοσφαιρικά βακτήρια από τα Kal 1 και Kal 2 και ορισμένα ενδοφυτικά από τα Kal 2 και Kal 3. Με το συν (+) συμβολίζεται η ικανότητα παραγωγής εξωκυτταρικής λιπάσης ή πρωτεάσης ενώ με το πλην (-) συμβολίζεται η ανικανότητα παραγωγής των συγκεκριμένων ενζύμων. Η πολλαπλή εμφάνιση του συμβόλου συν (+) δείχνει εντονότερη παραγωγή ενζύμων από τα αντίστοιχα βακτήρια.

**ΠΙΝΑΚΑΣ 9 : ΒΑΚΤΗΡΙΑ ΣΕ TWEEN 80 ΚΑΙ SKIM MILK**

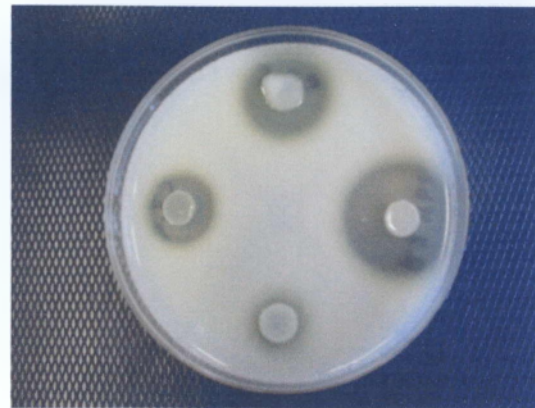
Βακτήρια	Θρεπτικά Υλικά	
	ΛΙΠΑΣΕΣ (Tween 80)	ΠΡΩΤΕΑΣΕΣ (Skim Milk)
R1.2	++	+
R1.3	-	-
R1.4	++	++++
R1.8	++	/
R1.11	++	/
R1.12	-	/
R1.15	+++	++++
R1.17	-	/
R2.4a	+++	++++
R2.4bii	++++	++++
R2.6	+++	++++
E2.1	-	+
E2.2	+	-
E2.3	+++	+++
E2.4	++++	+
E2.5	++++	++
E2.7	+	+
E3.1	++++	+
E3.3	++	++
E3.4	++++	+++
E3.6	-	++
E3.8	++++	++++

Όπως παρατηρούμε στον πίνακα 9 από τα βακτήρια της ριζόσφαιρας που δοκιμάστηκαν, τα προερχόμενα από το Kal 2 έδωσαν πολύ θεαματικά αποτελέσματα συγκριτικά με τη πλειοψηφία των βακτηρίων που προέρχονται από το Kal 1. Όσο αναφορά τα ενδοφυτικά που προέρχονται από τα Kal 2 και Kal 3 τα αποτελέσματα του πειράματος είναι περίπου ίδια, συνολικά και για τα δυο κομπόστ. Παρακάτω παρατίθεται φωτογραφικό υλικό για τη καλύτερη και αναλυτικότερη κατανόηση των αποτελεσμάτων. Τα βακτήρια αναγράφονται στις φωτογραφίες (Εικ. 98 έως Εικ. 108) σύμφωνα με τη φορά των δεικτών του ρολογιού (δεξιόστροφα).

**ΒΑΚΤΗΡΙΑ ΣΕ ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ SKIM MILK**



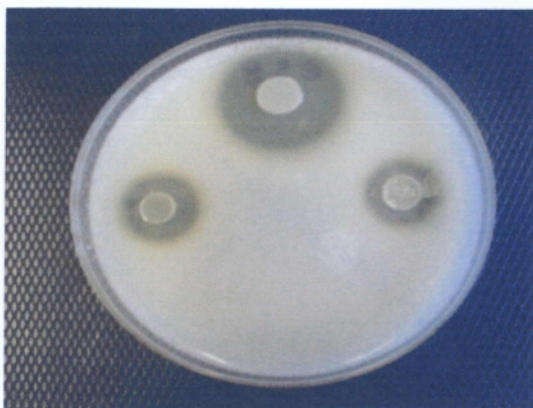
Εικ. 98 : E2.3 - E3.1 - E2.1 - E2.7



Εικ.99 : E2.5 - R2.4bii - E2.4 - E3.4



Εικ. 100 : R1.4 - R2.6 - R1.15 - R2.4a



Εικ. 101 : E3.8 - E3.6 - E2.2 - E3.3

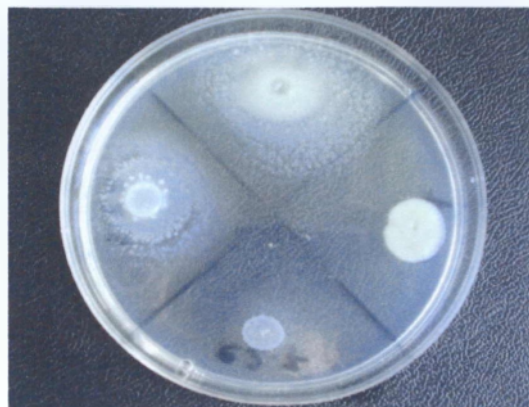


Εικ. 102: R1.2 - E2.3 - R1.3

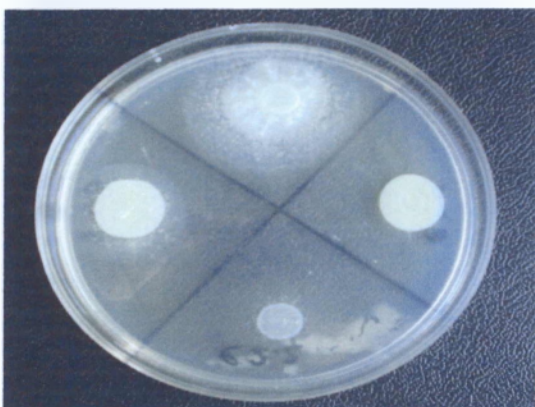
**ΒΑΚΤΗΡΙΑ ΣΕ ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΥΑΙΚΟ TWEEN 80**



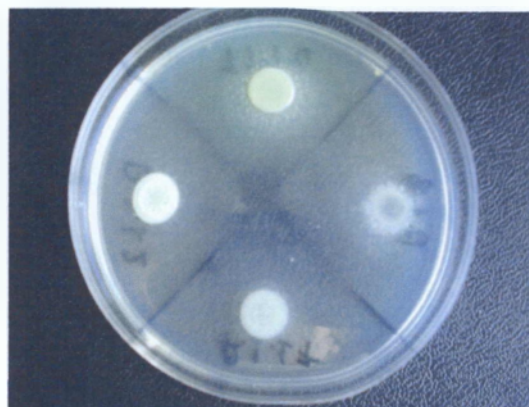
Εικ. 103 : E2.3 – R1.3 – R1.2



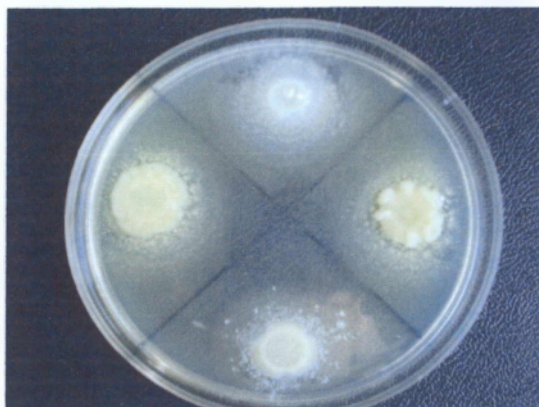
Εικ. 104 : E3.1 – E2.1 – E2.7 – E2.3



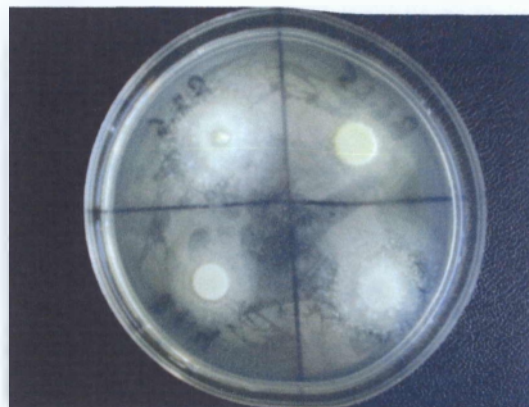
Εικ. 105 : E3.8 – E3.6 – E2.2 - E3.3



Εικ. 106 : R1.11 – R1.8 – R1.17 – R1.12



Εικ. 107 : R2.4bii – E2.4 – E3.4 – E2.5



Εικ. 108 : R2.6 – R1.15 – R2.4a – R1.4

## 2.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΜΠΥΛΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

Από την εργασία που εφαρμόσαμε, όπως περιγράφεται στη παράγραφο 1.7 του πειραματικού μέρους, καταφέραμε με τη βοήθεια του προγράμματος excel να βρούμε ένα τύπο που θα αντιπροσωπεύει το ρυθμό αύξησης του εκάστοτε βακτηρίου. Με την εφαρμογή των τύπων αυτών μπορούμε πολύ εύκολα να υπολογίζουμε κάθε φορά τον ακριβή αριθμό των βακτηριακών κυττάρων που περιέχεται σε συγκεκριμένη ποσότητα θρεπτικού υλικού.

Παρακάτω δίνονται τα αποτελέσματα του προγράμματος του υπολογιστή στον πίνακα 10 με τους τύπους των βακτηρίων. Στο τέλος της πτυχιακής εργασίας περιέχεται παράρτημα με τα αποτελέσματα της παλινδρόμησης, αναλυτικά για το κάθε ένα βακτηριακό στέλεχος.

**ΠΙΝΑΚΑΣ 10 : ΤΥΠΟΙ ΚΑΜΠΥΛΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ**

<u>ΒΑΚΤΗΡΙΑ</u>	<u>ΤΥΠΟΙ</u>	<u>ΑΡΑΙΩΣΕΙΣ</u>
R2.4a	$Y = 0,0023 X + 0,198$	$10^6$
R2.4bii	$Y = 0,0036 X + 0,022$	$10^6$
R2.6	$Y = 0,0037 X + 0,18908$	$10^6$
E2.1	$Y = 0,0235 X - 0,115$	$10^4$
E2.2	$Y = 0,0468 X + 0,299$	$10^6$
E2.3	$Y = 0,019 X + 0,083$	$10^5$
E2.4	$Y = 0,0021 X + 0,035$	$10^5$
E2.5	$Y = 0,0025 X - 0,1592$	$10^5$
E3.1	$Y = 0,0049 X + 0,00823$	$10^4$
E3.3	$Y = 0,124 X + 0,7215$	$10^4$
E3.6	$Y = 0,0059 X + 0,052$	$10^4$
E3.8	$Y = 0,0311 X - 1,25065$	$10^5$

Το  $Y$  αντιπροσωπεύει την τιμή OD που μας δείχνει το φωτόμετρο για το εκάστοτε βακτήριο. Ο άγνωστος  $X$  αντιπροσωπεύει τον αριθμό των βακτηριακών κυττάρων, πολλαπλασιασμένο με τη τιμή της αραιώσης που δίνεται στο πίνακα 10.

Έτσι σε πειράματα *in planta*, με σκοπό τον έλεγχο της ανταγωνιστικής δράσης που τυχόν ασκούν τα απομονωμένα βακτήρια σε πραγματικές συνθήκες, χρησιμοποιούμε τον συγκεκριμένο τύπο για να μολύνουμε τα φυτά. Στη μόλυνση αυτή επιβάλλεται η ποσότητα των κυττάρων που περιέχεται σε συγκεκριμένη ποσότητα θρεπτικού υλικού να είναι ακριβώς ίδια για όλες τις επαναλήψεις. Μόνο τότε παίρνουμε σωστά και συγκρίσιμα αποτελέσματα.

**ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ**

**ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ EXCEL**



**ΒΑΚΤΗΡΙΟ 2.4a**

ΑΞΟΝΕΣ	X	Y
	863	2,142
	416	1,593
	212	0,434

**ΈΞΟΔΟΣ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΟΣ**

<i>Στατιστικά παλινδρόμησης</i>	
Πολλαπλό R	0,914871
R Τετράγωνο	0,836988
Προσαρμοσμένο R Τετράγωνο	0,673977
Τυπικό σφάλμα	0,497879
Μέγεθος δείγματος	3

**ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ**

	βαθμοί ελευθερίας	SS	MS	F	Σημαντικότητα F
Παλινδρόμηση	1	1,272765	1,272765	5,13453	0,264585
Υπόλοιπο	1	0,247883	0,247883		
Σύνολο	2	1,520649			

	Συντελεστές	Τυπικό σφάλμα	t	τιμή-P	Κατώτερο 95%	Υψηλότερο 95%
Τεταγμένη επί την αρχή	0,198955	0,598963	0,332166	0,795836	-7,41156	7,80947
Μεταβλητή X 1	0,002396	0,001057	2,26595	0,264585	-0,01104	0,01588

**ΒΑΚΤΗΡΙΟ 2.4bii**

ΑΞΟΝΕΣ	X	Y
	576	1,976
	273	1,292
	165	0,334

**ΕΞΟΔΟΣ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΟΣ**

<i>Στατιστικά παλινδρόμησης</i>	
Πολλαπλό R	0,934689
R Τετράγωνο	0,873644
Προσαρμοσμένο R Τετράγωνο	0,747288
Τυπικό σφάλμα	0,414632
Μέγεθος δείγματος	3

**ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ**

	βαθμοί ελευθερίας	SS	MS	F	Σημαντικότητα F
Παλινδρόμηση	1	1,188675	1,188675	6,914141	0,231356
Υπόλοιπο	1	0,171919	0,171919		
Σύνολο	2	1,360595			

	Συντελεστές	Τυπικό σφάλμα	t	τιμή-P	Κατώτερο 95%	Υψηλότερο 95%
Τεταγμένη επί την αρχή	-0,02229	0,523086	-0,04261	0,972892	-6,6687	6,62415
Μεταβλητή X 1	0,003618	0,001376	2,629475	0,231356	-0,01387	0,02110

### ΒΑΚΤΗΡΙΟ 2.6

ΑΞΟΝΕΣ	X	Y
	502	2,004
	276	1,335
	49	0,314

#### ΎΞΟΔΟΣ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΟΣ

Στατιστικά παλινδρόμησης	
Πολλαπλό R	0,992998
R Τετράγωνο	0,986046
Προσαρμοσμένο R Τετράγωνο	0,972092
Τυπικό σφάλμα	0,14218
Μέγεθος δείγματος	3

#### ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ

	βαθμοί ελευθερίας	SS	MS	F	Σημαντικότητα F
Παλινδρόμηση	1	1,428485	1,428485	70,66386	0,075378
Υπόλοιπο	1	0,020215	0,020215		
Σύνολο	2	1,448701			

	Συντελεστές	Τυπικό σφάλμα	t	τιμή-P	Κατώτερο 95%	Υψηλότερο 95%
Τεταγμένη επί την αρχή	0,189085	0,147345	1,283288	0,421416	-1,6831	2,06126
Μεταβλητή X 1	0,003731	0,000444	8,40618	0,075378	-0,00191	0,00931

### ΒΑΚΤΗΡΙΟ Ε2.1

ΑΞΟΝΕΣ	X	Y
	27	0,699
	30	0,435
	9	0,07

#### ΕΞΟΔΟΣ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΟΣ

##### Στατιστικά παλινδρόμησης

Πολλαπλό R	0,845331
R Τετράγωνο	0,714585
Προσαρμοσμένο R	
Τετράγωνο	0,42917
Τυπικό σφάλμα	0,238634
Μέγεθος δείγματος	3

#### ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ

	βαθμοί ελευθερίας	SS	MS	F	Σημαντικότητα F
Παλινδρόμηση	1	0,142575	0,142575	2,503673	0,358806
Υπόλοιπο	1	0,056946	0,056946		
Σύνολο	2	0,199521			

	Συντελεστές	Τυπικό σφάλμα	t	τιμή-P	Κατώτερο 95%	Υψηλότερο 95%
Γεταγμένη επί την αρχή	-0,11584	0,354699	-0,32658	0,799045	-4,62269	4,3911
Μεταβλητή X 1	0,023508	0,014857	1,5823	0,358806	-0,16526	0,2122

### ΒΑΚΤΗΡΙΟ Ε2.2

ΑΞΟΝΕΣ	X	Y
	26	1,865
	28	1,291
	0	0,275

#### ΕΞΟΔΟΣ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΟΣ

Στατιστικά παλινδρόμησης	
Πολλαπλό R	0,909581
R Τετράγωνο	0,827337
Προσαρμοσμένο R Τετράγωνο	0,654675
Τυπικό σφάλμα	0,473156
Μέγεθος δείγματος	3

#### ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ

	βαθμοί ελευθερίας	SS	MS	F	Σημαντικότητα F
Παλινδρόμηση	1	1,072734	1,072734	4,79164	0,272806
Υπόλοιπο	1	0,223876	0,223876		
Σύνολο	2	1,296611			

	Συντελεστές	Τυπικό σφάλμα	t	τιμή-P	Κατώτερο 95%	Υψηλότερο 95%
Τεταγμένη επί την αρχή	0,299732	0,472509	0,634342	0,640126	-5,70404	6,300
Μεταβλητή X 1	0,046885	0,021419	2,188982	0,272806	-0,22526	0,31900

### ΒΑΚΤΗΡΙΟ Ε2.4

ΑΞΟΝΕΣ	X	Y
	847	2,037
	733	1,353
	92	0,267

#### ΈΞΟΔΟΣ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΟΣ

Στατιστικά παλινδρόμησης	
Πολλαπλό R	0,96824
R Τετράγωνο	0,937488
Προσαρμοσμένο R Τετράγωνο	0,874976
Τυπικό σφάλμα	0,315604
Μέγεθος δείγματος	3

#### ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ

	βαθμοί ελευθερίας	SS	MS	F	Σημαντικότητα F
Παλινδρόμηση	1	1,493778	1,493778	14,99691	0,160877
Υπόλοιπο	1	0,099606	0,099606		
Σύνολο	2	1,593384			

	Συντελεστές	Τυπικό σφάλμα	t	τιμή-P	Κατώτερο 95%	Υψηλότερο 95%
Τεταγμένη επί την αρχή	0,035558	0,355795	0,09994	0,936587	-4,48523	4,55634
Μεταβλητή X 1	0,002123	0,000548	3,872585	0,160877	-0,00484	0,00961

### ΒΑΚΤΗΡΙΟ Ε2.5

ΑΞΟΝΕΣ	X	Y
	722	2,031
	724	1,312
	178	0,29

#### ΈΞΟΔΟΣ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΟΣ

Στατιστικά παλινδρόμησης	
Πολλαπλό R	0,910365
R Τετράγωνο	0,828764
Προσαρμοσμένο R Τετράγωνο	0,657527
Τυπικό σφάλμα	0,511992
Μέγεθος δείγματος	3

#### ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ

	βαθμοί ελευθερίας	SS	MS	F	Σημαντικότητα F
Παλινδρόμηση	1	1,268706	1,268706	4,839881	0,271602
Υπόλοιπο	1	0,262136	0,262136		
Σύνολο	2	1,530842			

	Συντελεστές	Τυπικό σφάλμα	t	τιμή-P	Κατώτερο 95%	Υψηλότερο 95%
Τεταγμένη επί την αρχή	-0,15923	0,689424	-0,23096	0,855503	-8,91915	8,6006
Μεταβλητή X 1	0,002531	0,001151	2,199973	0,271602	-0,01209	0,017

**ΒΑΚΤΗΡΙΟ Ε3.1**

ΑΞΟΝΕΣ	X	Y
	208	0,122
	143	0,064
	32	0,03

**ΈΞΟΔΟΣ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΟΣ**

<i>Στατιστικά παλινδρόμησης</i>	
Πολλαπλό R	0,955556
R Τετράγωνο	0,913086
Προσαρμοσμένο R Τετράγωνο	0,826173
Τυπικό σφάλμα	0,019395
Μέγεθος δείγματος	3

**ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ**

	<i>βαθμοί ελευθερίας</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>Σημαντικότητα F</i>
Παλινδρόμηση	1	0,003952	0,003952	10,50567	0,190514
Υπόλοιπο	1	0,000376	0,000376		
Σύνολο	2	0,004328			

	<i>Συντελεστές</i>	<i>Τυπικό σφάλμα</i>	<i>t</i>	<i>τιμή-P</i>	<i>Κατώτερο 95%</i>	<i>Υψηλότερο 95%</i>
Τεταγμένη επί την αρχή	0,008234	0,022637	0,363735	0,77791	-0,27939	0,29586
Μεταβλητή X 1	0,000499	0,000154	3,241246	0,190514	-0,00146	0,00241



### ΒΑΚΤΗΡΙΟ Ε3.3

ΑΞΟΝΕΣ	X	Y
	11	1,96
	4	1,637
	1	0,552

#### ΕΞΟΔΟΣ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΟΣ

Στατιστικά παλινδρόμησης	
Πολλαπλό R	0,862904
R Τετράγωνο	0,744604
Προσαρμοσμένο R Τετράγωνο	0,489208
Τυπικό σφάλμα	0,527136
Μέγεθος δείγματος	3

#### ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ

	βαθμοί ελευθερίας	SS	MS	F	Σημαντικότητα F
Παλινδρόμηση	1	0,810133	0,810133	2,915485	0,337286
Υπόλοιπο	1	0,277873	0,277873		
Σύνολο	2	1,088006			

	Συντελεστές	Τυπικό σφάλμα	t	τιμή-P	Κατώτερο 95%	Υψηλότερο 95%
Τεταγμένη επί την αρχή	0,721532	0,492645	1,464608	0,381382	-5,53809	6,981
Μεταβλητή X 1	0,124025	0,072637	1,707479	0,337286	-0,79891	1,04691

### ΒΑΚΤΗΡΙΟ Ε 3.6

ΑΞΟΝΕΣ	X	Y
	36	0,251
	15	0,184
	2	0,039

#### ΈΞΟΔΟΣ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΟΣ

Στατιστικά παλινδρόμησης	
Πολλαπλό R	0,941302
R Τετράγωνο	0,886049
Προσαρμοσμένο R Τετράγωνο	0,772097
Τυπικό σφάλμα	0,051733
Μέγεθος δείγματος	3

#### ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ

	βαθμοί ελευθερίας	SS	MS	F	Σημαντικότητα F
Παλινδρόμηση	1	0,02081	0,02081	7,775678	0,219208
Υπόλοιπο	1	0,002676	0,002676		
Σύνολο	2	0,023486			

	Συντελεστές	Τυπικό σφάλμα	t	τιμή-P	Κατώτερο 95%	Υψηλότερο 95%
Τεταγμένη επί την αρχή	0,05296	0,048073	1,101659	0,46923	-0,55787	0,66378
Μεταβλητή X 1	0,005946	0,002132	2,78849	0,219208	-0,02115	0,03303

### ΒΑΚΤΗΡΙΟ Ε3.8

ΑΞΟΝΕΣ	X	Y
	90	1,554
	47	0,214

#### ΕΞΟΔΟΣ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΟΣ

Στατιστικά παλινδρόμησης	
Πολλαπλό R	1
R Τετράγωνο	1
Προσαρμοσμένο R Τετράγωνο	65535
Τυπικό σφάλμα	0
Μέγεθος δείγματος	2

#### ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ

	βαθμοί ελευθερίας	SS	MS	F	Σημαντικότητα F
Παλινδρόμηση	1	0,8978	0,8978	0	#ΑΡΙΘ!
Υπόλοιπο	0	9,25E-31	65535		
Σύνολο	1	0,8978			

	Συντελεστές	Τυπικό σφάλμα	t	τιμή-P	Κατώτερο 95%	Υψηλότερο 95%
Τεταγμένη επί την αρχή	-1,25065	0	65535	#ΑΡΙΘ!	-1,25065	-1,25065
Μεταβλητή X 1	0,031163	0	65535	#ΑΡΙΘ!	0,031163	0,031163

**ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

1. Aggboola A A., 1990. Organic matter and soil fertility management in the humid tropics of Africa. *IBSRAM Proceedings* 10:232-243.
2. Aggelides S.M. and Londra P.A., 2000. Effects of composts produced from town wastes and sewage sludge on the physical properties of a loamy and a clay soil. *Bioresource Technology* 71:253-259.
3. Akanbi W.B. and Togun A.O., 2002. The influence of maize-stoven compost and nitrogen fertilizer on growth, yield and nutrient uptake of amaranth. *Scientia Horticulturae* 93:1-8.
4. Ayoub A.T., 1999. Fertilizers and environment. Nutrient Cycling in Agroecosystems 55:117-121.
5. Baker R., 1968. Mechanisms of biological control of soil-borne pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 6:263-294.
6. Bazzoffi P., Pellegrini S., Rochini A., Morandi M. and Gasseli O., 1998. The effect of urban refuse compost and different tractor tyres on soil physical properties, soil erosion and maize yield. *Soil and Tillage Research* 48:275-286.
7. Ben – Yephet Y., Nelson EB, 1999. Differential suppression of damping – off caused by *Pythium aphanidermatum*, *P. irregulare* and *P. myriotylum* in composts at different temperatures. *Plant Disease* 83:356-360.
8. Βενιεράκη Α. Σ., 2002. Μελέτη της οικολογίας και των μηχανισμών δράσεως βακτηρίων της ριζόσφαιρας, ανταγωνιστικών εναντίων φυτοπαθογόνων μυκήτων και βακτηρίων. Διδακτορική διατριβή. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών. Τμήμα Φυτικής Παραγωγής.
9. Bochow H., Kogel K.H., Poehling M., Von Alten H., Wyss U., 2001. Mechanisms of interactions in the system of plant, parasite and beneficial organisms. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz-Journal of Plant Diseases and Protection* 108 : 626-629.
10. Boulter JI, Boland GJ, Trevors JT, 2002. Evaluation of composts for suppression of dollar spot (*Sclerotinia homoeocarpa*) of turfgrass. *Plant Disease* 86:405-410.
11. Cotxarrera L., Trillas-Gay M.I., Steinberg C., Aladouvette C., 2002. Use of sewage sludge compost and *Trichoderma asperellum* isolates to suppress *Fusarium* wilt of tomato. *Soil Biology and Biochemistry* 34:467-476.

12. Craft C.M., Nelson E.B., 1996. Microbial properties of composts that suppress damping-off and root rot of creeping bentgrass caused by *Pythium graminicola*. Applied and Environmental Microbiology 62:1550-1557.
13. Diab S.Hu. and D.M. Benson, 2003. Suppression of *Rhizoctonia solani* impatiens by enhanced microbial activity in composted swine waste amended potting mixes. Phytopathology. In press.
14. Edwards L., Burney J.R., Richter G. and Mac Rae A.H., 2000. Evaluation of compost and straw on soil-loss characteristics in erosion plots of potatoes in Prince Edward island, Canada. Agriculture Ecosystem and Environment 81 : 217-222.
15. Ehaliotis C., Cadish G. and Giller K.E., 1998. Substrate amendments can alter microbial dynamics and N availability from maize residues to subsequent crops. Soil Biology and Biochemistry 30:1281-1292.
16. Elad Y., Kapat A., 1999. The role of *Trichoderma harzianum* protease in the biocontrol of *Botrytis cinerea*. European Journal of Plant Pathology 105 : 177-189.
17. Fravel D., Olivain C., Alabouvette C., 2003. *Fusarium oxysporum* and its biocontrol. New Phytologist 157 : 493-502.
18. Fravel D.R., 1988. Role of antibiosis in the biocontrol of plants diseases. Annual Review of Phytopathology 26:75-91.
19. Gagnon B. and Simard R.R., 1999. Nitrogen and phosphorus release from on-farm and industrial composts. Canadian Journal of Soil Science 79 : 481-489.
20. Gerhardt R.A., 1997. A comparative analysis of the effects of organic and conventional farming systems on soil structure. Biol. Agric. Horticult. 14:139-157.
21. Haas D., Keel C. and Reimmann C., 2002. Signal transduction in plant-beneficial rhizobacteria with biocontrol properties. Antonie van Leeuwenhoek 81:385-395.
22. Hague I., Powel J.M. and Ehui S.K., 1995. Improved stock-livestock strategies for sustainable soil management in tropical Africa. In soil management : Experimental Basis for Sustainability and Environmental Quality (Lal R. and Stewart B.A.), CRC Press Florida, USA.
23. Hoitink HAJ and Boehm M.J., 1999. Biocontrol Within the Context of Soil Microbial Communities : A Substrate-Dependent Phenomenon. Annual Reviews of Phytopathology 37:427-46.

24. Hoitink HAJ, Fany PC, 1986. Basis for the control of soilborne plant pathogens with composts. *Annual Review of Phytopathology* 24:93-114.
25. Howie W.J., Cook R.J., Weller D.M., 1987. Effect of soil matrix potential and cell motility on wheat root colonization by *fluorescent pseudomonas* suppressive to take-all. *Phytopathology* 77:286-293.
26. Juo A.S.R., 1990. Maintenance and management of organic matter in tropical soils. In *Organic Matter Management and Tillage in Humic and Subhumid Africa* (Pushparajah E., Latham M. and Elliot C.R. IBSRAM Proceedings 10:199-212.
27. Καβρουλάκης Ν., Τριπολιτσιώτη Ν., Δαμασκηνού Α., Ντούγιας Σ., Οιχαλιώτης Κ., Ζερβάκης Γ. και Παπαδοπούλου Κ.Κ., 2004. Μικροβιακή χλωρίδα κομποστοποιημένων γεωργικών παραπροϊόντων με επισχετικές ιδιότητες εναντίων παθογόνων μυκήτων της τομάτας. 12<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Φυτοπαθολογικό Συνέδριο, Καστοριά.
28. Kapat A., Rakshit S.K., Panda T., 1996. Parameters optimization of chitin hydrolysis by *Trichoderma harzianum* chitinase under assay conditions. *Bioprocess Engineering* 14 : 275-279.
29. Kloepper J.W. and Schroth M.N., 1978. Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. *Proceeding of 4<sup>th</sup> Inter. Conf. Plant Bacteria*. Angers 879-882.
30. Kloepper J.W., Schroth M.N. and Miller T.D., 1980. Effects of rhizosphere colonization by plant growth-promoting rhizobacteria on potato plant development and yield. *Phytopathology* 70:1078-1082.
31. Kloepper J.W., Wei G. and Tuzun S., 1992. Rhizosphere population dynamics and interval colonization of cucumber by plant growth-promoting rhizobacteria which induce systemic resistance to *Colletotrichum orbiculare*. In : *Biological control of plant diseases*. Eds : Tjamos E.C., Papavizas G.C. and Cook R.J. Plenum Press, 185-191.
32. Kuc J., 1990. Compounds from plants that regulates or participate in disease resistance, in: *Bioactive Compounds from plants*. Ciba Foundation Symposium 154, J.Wiley and sons, Chichester. 213-224.
33. Lam S.T. and Gaffney T.D., 1993. Biological activities of bacteria used in plant pathogen control. In : *Biotechnology in plant disease control*. Ed : Chet I. Wiley-Liss, Inc.291.
34. Loper J.E., Suslow T.V. and Schroth M.N., 1984. Lognormal distribution of bacterial population in the rhizosphere. *Phytopathology* 74:1454-1460.

35. Lumsden R.D., Lewis J.A., Werner R.E., Millner P., 1981. Effect of sludge compost on selected soilborne diseases. *Phytopathology* 71:238.
36. Mandelbaum R., Hadar Y., 1990. Effects of available carbon source on microbial activity and suppression of *Phythium aphanidermatum* in compost and peat container media. *Phytopathology* 80:794-804.
37. Manios T., 2003. The composting potential of different solid wastes : experience from the island of Crete. *Environment International*, Article in Press.
38. Marschner H., 1995. Mineral nutrition of Higher Plants, Ed. 2 Academic Press, London.
39. Mazzola M., 2002. Mechanisms of natural soil suppressiveness to soilborne diseases. *Antonie van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* 81: 557-564.
40. Mc Kellar M.E. and Nelson E.B., 2003. Compost-induced suppression of *Pythium* damping-off is mediated by fatty-acid metabolizing seed-colonizing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 452-460.
41. Nelson E.B., Kuter G.A., Hoitink H.A.J., 1983. Effects of fungal antagonists and compost age on suppression of *Rhizoctonia* damping-off in container media amended with composted hardwood bark. *Phytopathology* 73:1457-1462.
42. Ntougias S., Ehaliotis C., Zervakis G.I., Katsaris P. and Papadopoulou K., 2003. Monitoring the composting process on different agricultural wastes and evaluation of the effects of the final products on plants. *Proceedings of the 8<sup>th</sup> International Conference on Environmental Science and Technology* (T.D. Lekkas, ed.) pp. 666-673, University of the Aegean and Global NEST, Lemnos, Greece.
43. Oka Y., Yermiyahu U., 2002. Suppressive effects of composts against the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* on tomato. *Nematology* 4:891-898.
44. Ouedraogo E., Mando A. and Zombre N.P., 2001. Use of composts to improve soil properties and crop productivity under low input agricultural system in West Africa. *Agriculture, Ecosystem and Environment* 84: 259-266.

45. Pieterse C.M.J. and Van Loon L.C., 2004. NPR 1 : the spider in the web of induced resistance signalling path ways. *Current Opinion in Plant Biology* 7: 456-464.
46. Raaijmakers J.M., Vlami M. and de Souza J.T., 2002. Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *Antonie van Leeuwenhoek* 81: 537-547.
47. Roberts D.P., Lohrke S.M., 2003. United States Department on Agriculture-Agricultural Research Service research programs in biological control of plant diseases. *Pest Manag. Sci.* 59:654-664.
48. Roldan A., Albaladejo J. and Thomas J.B., 1996. Aggregate stability changes in a semi-arid soil after treatment with different organic amendments. *Arid Soil Research Rehabil* 10:139-148.
49. Rovira A.D., 1991. Rhizosphere research 85 years of progress and frustration. *The rhizosphere and plant growth* Eds : Keister D.L. and Cregan P.B Kluwer Academic Publisher, 3-13.
50. Singh UP, Maurya S., Singh DP, 2003. Antifungal activity and induced resistance in pea by aqueous extract of vermicom post and for control of powdery mildew of pea and balsam. *Journal of Plant Diseases and Protection* 110:544-553.
51. Smith S.J., Hall J.E. and Hadley P., 1992. Composting sewage sludge waste in relation to their suitability for use as fertilizer materials for vegetable crop production. *Acta Horticulture* 302 : 203-215.
52. Soumare M., Tack F.M.G. and Verloo M.G., 2003. Effects of a municipal solid waste compost and mineral fertilization on plant growth in two tropical agricultural soils of Mali. *Bioresource Technology* 86:15-20.
53. Stintzi A., Browse J., 2000. The *Arabidopsis* male-sterile mutant opr 3, lacks the 12-oxophytodienoic acid reductase required for jasmonate synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 : 10625-10630.
54. Stotz HU, Pittendrigh BR, Kroymann J, Weniger K, Fritsche J, Bauke A, Mitcell-Olds T., 2000. Induced plant defence responses against chewing insects.Ethylene signaling reduces resistance of *Arabidopsis* against Egyptian cotton worm but not diamondback moth. *Plant Physiology* 124 : 1007-1017
55. Thomashow L.S. and Weller D.M., 1996. Current concepts in the use of introduced bacteria for biological diseases control :mechanisms and antifungal metabolites. *Plant-microbe interactions Vol 1.* Eds Stacy G., Keen N.T.



56. Tomati U., Galli E., Fiorelli F. and Pasetti L., 1996. Fertilizers from composting of olive-mill waste waters. *International Biodeterioration and Biodegradation* 155-162.
57. Trillas-Gay M.I., H.A.J. Hoitink and L.V. Madden, 1986. Nature of suppression of *Fusarium* wilt of radish in a container medium amended with composted hard wood bark. *Plant Dis.* 70 : 1023-1027.
58. Van Loon L.C., 1997. Induced resistance in plants and the role of pathogenesis – related proteins. *European Journal of Plant Pathology* 103:753-765.
59. Van Loon L.C., Bakker P.A.H.M. and Pieterse C.M.J., 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology* 30:453-483.
60. Weller M. David., 1988. Biological Control of Soilborne Plant Pathogens in the Rhizosphere with Bacteria. *Annual Reviews of Phytopathology* 26: 379-407.
61. Woomer P.L, Martin A., Albrecht A., Resk D.V.S. and Scharpenseel, 1994. The importance and management of soil organic matter in the tropics. Edited by Woomer P.L. and Swith M.J., pp. 47-80.