



2^ο Διεθνές Συνέδριο της Ελληνικής Εθνικής Πρωτοβουλίας

ΜικροΒιόΚοσμος

11 – 13 Δεκεμβρίου 2009

Ξενοδοχείο Caravel, Αθήνα

Επίσημοι Χορηγοί



ΕΛΚΕΘΕ ΚΡΗΤΗΣ

Χορηγοί Επικοινωνίας

City Press

ΠΑΝΕΛΛΗΝΙΑ ΚΥΡΙΑΚΙΤΙΚΗ ΕΦΗΜΕΡΙΑ ΜΑΖΕΜΕΤΑ ΔΩΡΕΑΝ
FREE e SUNDAY

Διοικητικό Συμβούλιο Μικροβιόκοσμου 2009-2010

Πρόεδρος

Κυρπίδης Νικόλαος, DOE-JGI, USA

Αντιπρόεδρος

Τύπας Μίλτος, Εθνικό Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Γεν. Γραμματέας

Μπούρτζης Κωνσταντίνος, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Ταμίας

Πολυμενάκου Παρασκευή, Ελληνικό Κέντρο Θαλασσίων Ερευνών

Μέλη

Δραϊνας Κωνσταντίνος, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Ουζούνης Χρήστος, King's College, UK & INA-EKETA

Σκούρας Ζαχαρίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Οργανωτική Επιτροπή Του Συνεδρίου

Πρόεδρος

Αμαλία Δ. Καραγκούνη – Κύρτσου

Αντιπρόεδρος και Γραμματέας

Δημήτρης Γ. Χατζηνικολάου

Β' Γραμματέας

Δέσποινα Λυμπεροπούλου

Ταμίας

Ευστάθιος Κατσίφας

Μέλη

Μηνάς Αρσενάκης

Γιώργος Κωτούλας

Βασίλειος Ρούσσης

Θεόδωρος Σωτηρούδης

Δημήτρης Βαγενάς

Γιώργος Ζερβάκης

Γραμματεία Συνεδρίου

Γραμματική Κανινή

Παναγιώτα Σταθοπούλου

ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ

ABSTRACTS

**ΠΡΟΣΚΕΚΛΗΜΕΝΟΙ
ΟΜΙΛΗΤΕΣ**

INVITED SPEAKERS

MICROBIOLOGY AND GENOMICS COMBINE FOR A DISTRACTIVE TECHNOLOGY TO ADDRESS GLOBAL CHALLENGES

Aristides A.N.Patrinos, Ph.D.

SyntheticGenomics, Inc.

11149 North Torrey Pines Road, LaJolla, CA 92037

Email: APatrinos@SyntheticGenomics.com

The genomics revolution has fired up microbiology in many significant ways. From realizing the incredible diversity of the microbial world to deciphering the intricate pathways of microbial life we are entering a brave new world where opportunities for disruptive technologies abound. Synthetic genomics is one such technology that will have important applications, including energy production, climate change mitigation, environmental remediation, as well as several possible medical uses. As with every new disruptive technology there is always a potential dark side and we need to deal with that eventuality head-on and ensure that proper safeguards are set up and risks are minimized.

THE CONTRIBUTION OF MICROBIAL DIVERSITY TO THE KNOWLEDGE BASED BIOECONOMY

Ioannis Economidis

European Commission, Brussels, Belgium

Email: Ioannis.Economidis@ec.europa.eu

One of the ten distinctive research themes of the Seventh Framework Programme of the European Community for Research, Technological Development and Demonstration Activities (2007-2013) is the Knowledge-Based Bioeconomy. Bioeconomy (KBBE) includes all industries and economic sectors that produce, manage and otherwise exploit biological resources (e.g. agriculture, food, forestry, fisheries and other bio-based industries). In any of these fields Microorganisms are playing key roles. The molecular knowledge and understanding of the ecology and diversity of the microorganisms in these sectors transforms empirical practices to knowledge-based exploitation of ecosystems contributing to a viable Bioeconomy. It is expected that KBBE will play an important role in a global economy, where knowledge is the best way to increase productivity and competitiveness and improve our quality of life, while protecting our environment and social model.

USE OF “OMICS” TO EXPLORE THE HUMAN GUT MICROBIOME

Janet K. Jansson

Department of Ecology, Earth Sciences Division

Lawrence Berkeley National Laboratory

1 Cyclotron Road, MS 70A-3317D, Berkeley, CA 94720

Email: jrjansson@lbl.gov

The human gut is one of the most densely colonized microbial habitats on earth. The collective microbiota, or microbiome, is responsible for many beneficial processes in the gastrointestinal tract. However, disturbance due to disease or antibiotic therapy can have detrimental impacts on the human host. The objectives of our research were to investigate the composition and function of the gut microbiota in healthy and perturbed states using different omics approaches. We found that antibiotic therapy can have long-term impacts on the composition and antibiotic resistance of the gut microbiota. In another study we focused on a set of twins with IBD (Crohn’s disease and ulcerative colitis). Although the microbiomes of healthy twins were similar, those with disease were markedly different. This difference was also reflected in the metagenomes, metaproteomes and metabolomes of fecal samples collected from the same twin pairs. Thousands of proteins and metabolites were screened for biomarkers that correlated to disease as well as to the gene content in the samples. In another recent study we found that the gut microbiome could be transplanted from a healthy donor to a patient with severe Clostridium difficile associated disease, bringing new insight about the importance of the gut microbiota for human health. In conclusion the gut microbiome composition and function is dependent on some external factors, such as antibiotic therapy, and can also be influenced by disease. These studies indicate several potential biomarkers for diagnosis of IBD diseases and point to therapeutic applications of the gut microbiota.

1^η Θεματική Ενότητα

ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑ

MICROBIAL ECOLOGY

1.1. Ασθένειες φυτών που προκαλούνται από φυτοπλάσματα στην Ελλάδα

Βέλλιος Ε.^{1*}, Λιολιοπούλου Φ.¹ & Π.Η. Κυριακοπούλου²

¹ Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Τμήμα Γεωπονίας, Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας

²Διονυσίου Αεροπαγίτου 15, Μαρούσι, Αθήνα

*Email: evellios@agr.uth.gr

Τα φυτοπλάσματα είναι Gram+ προκαρυωτικοί οργανισμοί που στερούνται κυτταρικού τοιχώματος και διαβιούν παρασιτικά στον ηθμό των φυτών. Ανήκουν στην κλάση *Mollicutes* μαζί με τα μυκοπλάσματα, ουρεαπλάσματα, αχολεπλάσματα και σπειροπλάσματα. Τα φυτοπλάσματα προκαλούν σημαντικές ασθένειες σε πολλά είδη καλλιεργούμενων και αυτοφυών φυτών (προσβάλλοντα περισσότερα από 700 είδη φυτών που ανήκουν σε περίπου 100 οικογένειες). Η μετάδοσή τους γίνεται με μυζητικά έντομα (ημίπτερα γνωστά ως πηδητικά τζιτζικάκια) στα οποία μπορούν και πολλαπλασιάζονται. Μέχρι σήμερα δεν είναι δυνατή η καλλιέργειά τους σε τεχνητά θρεπτικά υποστρώματα. Τα συμπτώματα που προκαλούν στους ξενιστές αν και είναι χαρακτηριστικά δεν είναι παθογνωμονικά και δε μπορεί να γίνει ο διαχωρισμός των φυτοπλασμάτων με βάση αυτά. Αυτοί είναι και οι κυριότεροι λόγοι που η διάγνωση και ταξινομική κατάταξη των φυτοπαθογόνων αυτών γίνεται με μοριακές μεθόδους (PCR, RFLPs), βασιζόμενη στη φυλογενετική κατάταξή τους βάσει της περιοχής 16SrDNA. Έχουν χαρακτηριστεί έως τώρα 23 πιθανά είδη (*Candidatus Phytoplasma* species) που αντιστοιχούν με την παλαιότερη κατάταξή τους σε ομάδες (Groups) των οποίων το μέγεθος του γενωματικού DNA ποικίλει από 530 έως 1350 kbp.

Στην παρούσα εργασία θα παρουσιαστεί το αντικείμενο έρευνας της ομάδας μας που είναι η διάγνωση και ο χαρακτηρισμός των φυτοπλασμάτων στη χώρα μας που προκαλούν ασθένειες όπως γιγαντοφθαλμία και stolbur της τομάτας (Group I και XII), καθώς και ευρωπαϊκός ίκτερος των πυρηνοκάρπων (Group X).

1.1. Plant Diseases caused by phytoplasmas in Greece

Vellios E.^{1*}, Lioliopoulou F.¹ & P.E. Kyriakopoulou²

¹ University of Thessaly, School of Agricultural Sciences, Department of Agriculture Crop Production and Rural Environment, Laboratory of Plant Pathology

² Dionysiou Aeropagitou 15, Marousi, Athens

*Email: evellios@agr.uth.gr

Phytoplasmas are Gram + prokaryotes that lack cell wall and inhabit the phloem of plants. They are classified in the class *Mollicutes*, along with mycoplasmas, ureaplasmas, acholeplasmas, and spiroplasmas. Phytoplasmas cause important diseases in a number of cultivated and wild plants (belonging to approximately 700 species in about 100 families). They are transmitted by sap-sucking insect-vectors known as planthoppers and leafhoppers (Hemiptera), in which phytoplasmas can propagate. Until today they have not been cultivated *in vitro*. Furthermore, the symptoms that are caused in the diseased plants, though characteristic, cannot lead to an accurate identification and classification. These are the main reasons that molecular characterization of conserved genes (16Sr RNA gene sequences) is currently used for the diagnosis and the classification of phytoplasmas. The classification scheme used today is based on RFLP patterns of PCR-amplified 16SrDNA sequences. So far, 23 different *Candidatus* Phytoplasma species have been characterized; the size of their genomic DNA varies from 530 till 1350 kbp.

The subject of the present work is the diagnosis and the molecular characterization of phytoplasmas that infect major plant crops in Greece, such as tomatoe causing diseases known as big bud and stolbur) and stone fruits (causing European Stone Fruit Yellows).

1.2. Ετερογένεια των εσωτερικών μεταγραφόμενων περιοχών (ITS1 και ITS2) αζωτοδεσμευτικών στελέχων *Pseudomonas stutzeri* απομονωμένων από τη ριζόσφαιρα φυτών σιταριού

Βενιεράκη Α.¹, Δήμου Μ.¹, Βεζύρη Ε.¹, Κατινάκη Π-Α.¹, Χατζηπαυλίδης Ι.² & Π. Κατινάκης^{1*}

¹Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας

²Εργαστήριο Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας

Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιερά οδός 75,
Βοτανικός, Αθήνα

Αζωτοδεσμευτικά βακτηριακά στελέχη έχουν απομονωθεί από τη ριζόσφαιρα καλλιεργούμενων φυτών σιταριού από διάφορες περιοχές της Ελλάδας τα οποία χαρακτηρίσθηκαν ως *Pseudomonas stutzeri* βασιζόμενοι στην ανάλυση των 16S rRNA και *nifH* γονιδίων. Επιλέχθηκαν 8 στελέχη αζωτοδεσμευτικών *P. stutzeri* των οποίων αναλύθηκε η ενδοριβοσωμική περιοχή 16S-23S (ITS1) και 23S rRNA-5S rRNA (ITS2). Ομοίως αναλύθηκαν οι περιοχές αυτές από το τυπικό στέλεχος *P. stutzeri* A15 -αρχικά ονομαζόμενο *Alkaligenes faecalis* A15- που απομονώθηκε από ρύζι στην Κίνα και από το στέλεχος CMT.9.A που έχει απομονωθεί από τη ριζόσφαιρα σόργου στη Γερμανία. Η ενίσχυση με PCR του ITS1 τμήματος των βακτηριακών στελέχων έδωσε δύο προϊόντα ενίσχυσης από τα στελέχη απομονωμένα από το σόργο και το ρύζι ενώ στα Ελληνικά στελέχη που απομονώθηκαν από σιτάρι παρουσίασε μόνο ένα προϊόν ενίσχυσης. Τα στελέχη *P. stutzeri* A15 και CMT.9.A περιέχουν δύο ITS1 τμήματα 591bp και 615bp αντίστοιχα, ενώ τα ελληνικά στελέχη φέρουν ένα ITS1 τμήμα 591bp. Παρόμοιο πρότυπο παρουσιάζεται στην ανάλυση των ITS2 τμημάτων των στελέχων που μελετήθηκαν.

1.2. Inter- and intracistronic heterogeneity of ITS1 και ITS2 Internal Transcribed Spacer regions among diazotrophic *Pseudomonas stutzeri* strains isolated from the rhizosphere of wheat

Venieraki A.¹, Dimou M.¹, Vezyri E.¹, Katinaki P-A.¹, Chatzipavlidis I.² & P. Katinakis^{1*}

¹Laboratory of Molecular Biology,

²Laboratory of General and Agricultural Microbiology

Dept. of Agricultural Biotechnology, Agricultural University of Athens,
Iera Odos 75, Athens

Several diazotrophic *Pseudomonas* strains have been isolated from the rhizosphere of wheat cultivated in different regions of Greece and characterized as *Pseudomonas stutzeri* based on the nucleotide sequences of 16S rRNA and *nifH* genes. The intracistronic and intercistronic 16S-23S Internal Transcribed Spacer regions (ITS1) and the 23S rRNA-5S rRNA genes (ITS2) were investigated in 8 isolates of diazotrophic *P. stutzeri* isolated from wheat, *P. stutzeri* A15 formerly known as *Alkaligenes faecalis* A15 which was originated from paddy rice in China and strain CMT.9.A which was isolated from the rhizosphere of *Sorghum* in Germany. PCR amplification of ITS1 generated two bands from strains isolated from sorghum and rice and one band from strains isolated from wheat. Sequence analysis of the amplified fragments revealed that ITS1 fragments contained genes for tRNA^{Ile} and tRNA^{Ala} is common in all strains. The *P. stutzeri* A15 and CMT.9.A strains contained one additional larger ITS1 which were distinct from each other with respect to length and nucleotide sequences. Similar patterns were also observed for ITS2.

1.3. Αερομεταφερόμενοι μικροευκαρυώτες σε αστικό περιβάλλον: ποικιλότητα, διαδοχή και ο ρόλος τους σε εφήμερα τροφικά πλέγματα

Γενίτσαρης Σ.¹, Μουστάκα-Γούνη Μ.^{1*}, Κορμάς Κ.² & Ν. Καλογεράκης³

¹Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Θεσσαλονίκη 54124

²Τμήμα Γεωπονίας, Ιχθυολογίας & Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας 38446

³Τμήμα Μηχανικών Περιβάλλοντος, Πολυτεχνείο Κρήτης, Χανιά 73100

*Email: mmustaka@bio.auth.gr

Η μορφολογική και φυλογενετική ποικιλότητα, αύξηση και διαδοχή των αερομεταφερόμενων μικροευκαρυωτών διερευνήθηκε στο αστικό περιβάλλον της πόλης της Θεσσαλονίκης. Για το σκοπό αυτό, αερομεταφερόμενα σωματίδια συλλέχθηκαν στη διάρκεια τριών εποχών, το φθινόπωρο και το χειμώνα του 2007 και την άνοιξη του 2008. Οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν με δειγματολήπτη αέρα, ο οποίος ενεργά συνέλεγε αερομεταφερόμενα σωματίδια σε αποστειρωμένο νερό. Ταυτόχρονα, παθητικά μεταφερόμενοι μικροοργανισμοί συλλέγονταν σε πειραματικές διατάξεις με αποστειρωμένο νερό, βρύσης και θαλασσινό. Η μορφολογική ανάλυση έγινε σε ανάστροφο μικροσκόπιο φθορισμού και η φυλογενετική με ανάλυση του 18S rRNA γονιδίου. Η κοινότητα των μικροευκαρυωτών περιελάμβανε αυτότροφους μικροοργανισμούς, κυρίως χλωροφύκη και ετερότροφους μικροοργανισμούς, όπως ετερότροφα νανομαστιγωτά, βλεφαριδωτά και αμοιβάδες καθώς και μύκητες. Πολλοί από αυτούς τους μικροευκαρυώτες έχουν καταγραφεί από αεροβιολογικές μελέτες σε άλλες περιοχές. 7 γένη μικροευκαρυωτών καταγράφηκαν ταυτόχρονα και σε παρακείμενα υδάτινα συστήματα. Οι αερομεταφερόμενοι μικροευκαρυώτες που παρατηρήθηκαν με τη μεγαλύτερη συχνότητα παρουσίασαν το μεγαλύτερο ρυθμό αύξησης και έφτασαν σε υψηλά επίπεδα αφθονίας σε 2-3 εβδομάδες στις πειραματικές διατάξεις. Ταυτόχρονα, σχημάτισαν ένα πολύπλοκο μικροβιακό τροφικό πλέγμα, το οποίο παρατηρήθηκε σε όλες τις εποχές. Οι κυρίαρχοι μικροευκαρυώτες, συνθετικά του τροφικού πλέγματος ήταν (1) τα χλωροφύκη *Haematococcus lacustris*, κοκκοειδή χλωροφύκη τύπου *Chlorella*, *Chlamydomonas* spp. και *Scenedesmus* cf. *obliquus*, (2) ετερότροφα νανομαστιγωτά όπως τα κοσμοπολίτικα είδη *Cafeteria minuta* και *Rynchomonas nasuta*, (3) τα βλεφαριδωτά *Pattersoniella vitiphila* και *Vorticella* sp. και (4) είδη του γένους *Amoeba*.

1.3. Airborne microeukaryotes in an urban environment: diversity, succession and their role in ephemeral food webs

Genitsaris S.¹, Moustaka-Gouni M.^{1*}, Kormas K.² & N. Kalogerakis³

Addresses: ¹Department of Botany, School of Biology, Aristotle University of Thessaloniki, GR-541 24 Thessaloniki, Greece

²Department of Ichthyology & Aquatic Environment, School of Agricultural Sciences, University of Thessaly, GR-384 46 Nea Ionia, Greece

³Department of Environmental Engineering, Technical University of Chania, GR-73100 Chania, Greece

*Email: mmustaka@bio.auth.gr

The airborne microeukaryotic morphological and phylogenetic diversity was investigated in the city of Thessaloniki, Greece. Airborne particles were collected during three seasons, autumn and winter 2007 and spring 2008. Samples were taken with an air sampler that actively collected airborne particles in sterile water. Simultaneously, passively dispersed microorganisms were collected in experimental containers with sterile tap and sterile sea water. Samples were examined using an inverted fluorescent microscope and with phylogenetic analysis of the 18S rRNA gene. The microeukaryotic community comprised of autotrophs, mainly Chlorophytes, heterotrophs, which included HNFs, Ciliophora and Amoebas as well as Fungi. Many of these microeukaryotes are commonly observed in aerobiological studies. 7 taxa were detected in simultaneous examination of samples of nearby aquatic systems. The most frequently observed airborne microeukaryotes reached high numbers within 2-3 weeks in the experimental containers forming a complex food web observed in all seasons. The key microbial components of the food web were (a) the Chlorophytes *Haematococcus lacustris*, a *Chlorella*-like taxon, *Chlamydomonas* spp. and *Scenedesmus* cf. *obliquus*, (b) members of HNFs like *Cafeteria minuta* and *Rynchomonas nasuta*, (c) the Ciliates *Pattersoniella vitiphila* and *Vorticella* sp. and (d) species belonging to the genus *Amoeba*.

1.4. Μικρόβια και Κλίμα

Δ.Γ. Γεωργακόπουλος

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας,

Ιερά Οδός 75, 118 55 Αθήνα

Email: dgeorga@hua.gr

Οι παγοπυρηνωτικοί μικροοργανισμοί αποτελούν κοινά μέλη της επιφυτικής μικροχλωρίδας των περισσότερων φυτών. Διαφεύγουν από τη φυτική επιφάνεια στην ατμόσφαιρα και έχουν βρεθεί ακόμα και σε υψόμετρα 70 km. Εξαιτίας της παγοπυρηνωτικής τους ικανότητας και των μεγάλων πληθυσμών που αναπτύσσονται επιφυτικά, έχει προταθεί ότι ίσως παίζουν κάποιο ρόλο στη διαμόρφωση του κλίματος μέσω του σχηματισμού υετού στα νέφη. Για να διαπιστωθεί η σημασία της διαδικασίας αυτής στη φύση, έχει ξεκινήσει μία διεπιστημονική συνεργασία με ερευνητές της Φυσικής της Ατμόσφαιρας. Σε μία σειρά πειραμάτων, όπου παγοπυρηνωτικά βακτήρια ψεκάστηκαν στον τεχνητό θάλαμο νεφών του ινστιτούτου FZK/AIDA (Καρλσρούη, Γερμανία), απεδείχθη ότι το *Pseudomonas syringae* σχημάτισε πάγο σε τεχνητά νέφη. Για να εκτιμηθεί όμως ο ρόλος των παγοπυρηνωτικών βακτηρίων και όλων των βιολογικών πυρήνων πάγου στη διαμόρφωση του κλίματος, χρειάζονται δεδομένα για τους πραγματικούς τους αριθμούς στην ατμόσφαιρα. Ένα κατάλληλο εργαλείο απόκτησης τέτοιων δεδομένων είναι ο θάλαμος διάχυσης αέρα συνεχούς ροής (CFDC) του Colorado State University (ΗΠΑ). Πρόκειται για τεχνητό θάλαμο νεφών με διάχυση αέρα σε θερμοκρασιακές κλίσεις, όπου επιτυγχάνεται ο επιλεκτικός διαχωρισμός ατμοσφαιρικών σωματιδίων που δρουν ως πυρήνες πάγου. Ο θάλαμος χρησιμοποιείται από το έδαφος ή από αεροσκάφος και δοκιμάστηκε ως προς την επιλεκτική απομόνωση και χαρακτηρισμό παγοπυρηνωτικών βακτηρίων από την ατμόσφαιρα. Σε προκαταρτικά πειράματα, αιώρημα του *Ps. syringae* ψεκάστηκε στο εσωτερικό του θαλάμου και σχημάτισε και πάλι πάγο, αντίθετα με το μη-παγοπυρηνωτικό *Escherichia coli*. Επίσης επιτεύχθηκε ο διαχωρισμός του *Ps. syringae* από το *E. coli*, όταν τα δύο είδη δοκιμάστηκαν ταυτόχρονα σε μίγμα. Αυτά αποδείχθηκαν με την απομόνωση κρυστάλλων πάγου από τον θάλαμο σε δισκίο ΗΔΕ, την απομόνωση ολικού DNA από τους κρυστάλλους και την ανίχνευση με PCR των γονιδίων *inaZ* (*Ps. syringae*) και *xopF1* (*E. coli*) και 16SrRNA και για τα δύο είδη. Εκτιμήθηκε ότι το θεωρητικό κατώφλι ανίχνευσης βακτηρίων στο δισκίο είναι 8 κύτταρα. Σε τρία πειράματα δειγματοληψίας αέρα (φθινόπωρο 2008) δεν ανιχνεύθηκαν παγοπυρηνωτικά βακτήρια. Συνεκτιμώντας ότι το κατώφλι ανίχνευσης είναι 8 βακτήρια, φαίνεται ότι υπήρχαν λιγότερα από 0,03-0,04 παγοπυρηνωτικά βακτήρια ανά λίτρο αέρα στα δείγματα αυτά. Οι αριθμοί αυτοί είναι μία πρώτη χαμηλή εκτίμηση, μέχρι να ποσοτικοποιηθεί η ικανότητα απομόνωσης βακτηριακών και βιολογικών πυρήνων πάγου με τη μέθοδο αυτή.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η συνεργασία του ΔΓΓ με το FZK (Γερμανία) χρηματοδοτήθηκε από την ΓΓΕΤ και το ΓΠΑ. Η συνεργασία με το CSU (ΗΠΑ) χρηματοδοτήθηκε από το Ίδρυμα Fulbright.

1.4. Microbes and Climate

D. Georgakopoulos

Agricultural University of Athens, Faculty of Biotechnology, Iera Odos 75, 118 55
Athens, Greece

Email: dgeorgia@hua.gr

Ice nucleation active (INA) microorganisms are common constituents of the epiphytic microflora on most plants. They disseminate in the atmosphere and have been found in altitudes as high as 70 km. By virtue of their ice nucleation activity, they have been proposed as potential players in climate forcing via the formation of precipitation in clouds. To determine the significance of this process in nature, an interdisciplinary collaboration with scientists in atmospheric physics has been initiated. In a series of experiments with INA bacteria injected in the FZK/AIDA cloud chamber in Karlsruhe, Germany, it was shown that *Pseudomonas syringae* can initiate precipitation via ice nucleation in artificial clouds. However, it is necessary to estimate the real numbers of INA microorganisms and biogenic ice nuclei in the atmosphere, in order to estimate their full potential in climate forcing. The Colorado State University (USA) continuous flow diffusion chamber (CFDC) is a thermal gradient diffusion chamber that achieves the selective segregation of particles in the air that can act as ice nuclei. The CFDC can be operated near the ground or from an aircraft. It was tested as a tool to selectively isolate and characterize INA bacteria from the atmosphere. In a series of preliminary experiments, a suspension of *P. syringae* was injected in the chamber and again it formed precipitation in simulated cloud conditions, whereas *Escherichia coli* did not. Moreover, the CFDC effectively separated INA *P. syringae* from non-INA *E. coli* when the two were co-injected. These were confirmed by collecting ice crystals from the chamber on a TEM grid, extracting total DNA from the grid and identifying the two bacteria by detecting the *inaZ* gene (for *P. syringae*), the *xopF1* gene (for *E. coli*) and the 16SrRNA genes for both species. A theoretical detection limit of only 8 cells on the grid was estimated. However, no INA bacteria were detected in three ambient air samples taken in fall 2008. This implies that there were fewer than 0,03-0,04 bacterial ice nuclei L⁻¹ of air in these samples. These should be viewed as low estimates, until collection efficiencies of this method are determined.

ACKNOWLEDGEMENTS

The collaboration of DG with FZK (Germany) was funded by GSRT and AUA. The collaboration of DG with CSU (USA) was funded by the Fulbright Foundation.

1.5. Αλληλεπίδραση δενδρόμορφων μυκορριζικών στελεχών με τον ενδοσυμβιωτικό μύκητα *Fusarium solani* στέλεχος FsK σε ρίζες τομάτας

Γεωργιάδου Δ., Πούλιος Σ., Υψηλάντης Ι., Καρπούζας Δ. & Κ.Κ. Παπαδοπούλου

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πλούτωνος 26 & Αιόλου, 41221, Λάρισα

Email: daphnegeobiot@yahoo.gr

Ένα μη παθογόνο, ενδοφυτικό στέλεχος μύκητα, *Fusarium solani* K, που απομονώθηκε από ρίζες φυτών τομάτας που αναπτύχθηκαν σε επισχετικό compost, είναι ικανό να προάγει την ανάπτυξη του φυτού και να επιφέρει αντοχή ενάντια σε παθογόνα του ριζικού συστήματος και του φυλλώματος. Στην παρούσα μελέτη εξετάσθηκε η αλληλεπίδραση μεταξύ του παραπάνω ωφέλιμου μύκητα με ένα δενδρόμορφο μυκορριζικό στέλεχος μύκητα, *Glomus* sp., στις ρίζες φυτών τομάτας (*Solanum lycopersicum*). Οι ρίζες των φυτών τομάτας μιλούνθηκαν με το προστατευτικό και το μυκορριζικό στέλεχος ταυτόχρονα ή διαδοχικά. Η ικανότητα αποικισμού του κάθε μύκητα εκτιμήθηκε ποσοτικά. Επίσης, εξετάσθηκαν πιθανές αλλαγές, λόγω της ταυτόχρονης παρουσίας του στελέχους FsK, στο πρότυπο ανάπτυξης των μορφολογικών δομών του μυκορριζικού μύκητα.

1.5. Interaction of arbuscular mycorrhizal fungi with the endosymbiotic fungus *Fusarium solani* strain FsK in tomato roots

Georgiadou D., Poulios S., Ypsilantis I., Karpouzas D. & K.K. Papadopoulou

University of Thessaly, Department of Biochemistry & Biotechnology, Larisa 41221,
Greece

Email: daphnegeobiot@yahoo.gr

A non-pathogenic endophytic fungal strain, *Fusarium solani* K, isolated from root tissues of tomato plants grown on a suppressive compost, is able to promote plant growth and confer resistance against root and foliar pathogens. In this study, the interaction between this plant beneficial fungus and an arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus* sp., was investigated in tomato roots (*Solanum lycopersicum*). Tomato roots were co-inoculated with the biocontrol strain FsK and the AM fungus, with the inoculants being applied simultaneously or in succession. Root colonization ability of each fungal species was quantitatively assessed. Possible alterations to the pattern of mycorrhizal structures formed by the AM fungus, as influenced by the presence of FsK, were also examined.

1.6. Χαρακτηρισμός της βακτηριακής ποικιλότητας απόβλητων των ορυχείων χρυσού Χαλκιδικής.

Διακοπαναγιώτης Ζ., Λόρτου Ο., Σεριστατίδου Ε., Μπούρτζης Κ. & Γ. Τσιάμης

Τμήμα Διαχείρισης Περιβάλλοντος και Φυσικών Πόρων, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων,
Σεφέρη 2, Αγρίνιο, Τ.Κ. 30100, Ελλάδα

Email: gtsiamis@cc.uoi.gr

Τα όξινα απόβλητα ορυχείου (acid mine drainage) που παράγονται από ενεργά ή/και εγκαταλελειμμένα ορυχεία έχουν σημαντικές επιπτώσεις στην οικολογία των λεκανών απορροής καθώς αποτελούν πηγή μόλυνσης των επιφανειακών και υπόγειων υδάτων. Οξεόφιλοι μικροοργανισμοί παίζουν σημαντικό ρόλο στην αποκατάσταση και διατήρηση βιομηχανικών συστημάτων που επεξεργάζονται όξινα απόβλητα ορυχείου. Στην παρούσα μελέτη χαρακτηρίσαμε τις βακτηριακές κοινότητες ενός εγκαταλελειμμένου ορυχείου χρυσού στο Στρατώνι Χαλκιδικής χρησιμοποιώντας 16S rRNA βιβλιοθήκες και μικροσυστοιχίες DNA υψηλής πυκνότητας (PhyloChip, Affymetrix SA).

Δείγματα νερού συλλέχθηκαν το Νοέμβριο του 2008 από τη στοά 410 ($N^{\circ} 40^{\circ} 31' 43''$, $E 23^{\circ} 46' 23''$) με pH 2.4 και χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή και ανάλυση μιας 16S rRNA βακτηριακής βιβλιοθήκης.

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης έδειξαν: (α) την παρουσία βακτηριακών πληθυσμών συγγενικών με *Alicyclobacillus* sp., *Ferrovum myxofaciens*, *Acidithiobacillus ferrooxidans* και με μη καλλιεργήσιμων β - και γ -Proteobacteria και (β) την ύπαρξη νέων φυλογενετικών ομάδων ταξινομικών ομάδων. Η ανάλυση με μικροσυστοιχίες φανέρωσε μια σημαντικά μεγαλύτερη βακτηριακή ποικιλότητα με αντιπροσώπους από 24 διαφορετικά φύλα και 81 διαφορετικές τάξεις υπογραμμίζοντας τη δυναμική του PhyloChip σε μελέτες μικροβιακής οικολογίας και περιβαλλοντικής μικροβιολογίας.

1.6. Characterization of bacterial diversity in acid mine drainage (AMD) of a gold mine in Stratoni, Chalkidiki, Greece.

Diakopanagiotis Z., Lortou R., Seristatidou E., Bourtzis K. & G. Tsiamis

Department of Environmental and Natural Resources Management, University of Ioannina, 2 Seferi St., Agrinio, T.K. 30100, Greece

Email: gtsiamis@cc.uoi.gr

The acid mine drainage (AMD) produced by active and abandoned mines can have a significant influence on the ecology of the receiving waters. AMD is source of surface and ground water pollution and has resulted in serious ecological disasters. Acidophilic microorganisms play important roles in environmental and industrial systems, including the environmental problems of acid mine drainage and acid rock drainage. In this study, we characterized the bacterial communities from an abandoned gold mine in Stratoni, Chalkidiki, Greece using 16S rRNA libraries and DNA microarrays (PhyloChip Affymetrix SA).

Water samples were collected in November 2008 from mine 410 ($N^{\circ} 40^{\circ} 31' 43''$, $E 23^{\circ} 46' 23''$) with a pH of 2.4 and a bacterial 16S rRNA library was constructed in pGEM-T (Promega, USA) using the universal bacterial primers 27F and 1492R.

Analysis of the 16S rRNA library revealed the presence of bacterial populations related to *Alicyclobacillus* sp., *Ferrovum myxofaciens*, *Acidithiobacillus ferrooxidans* and uncultured β - and γ - Proteobacteria. Interestingly, new phylogenetic groups were identified. The PhyloChip analysis revealed a much greater bacterial diversity with representatives from 24 different Phyla and 81 different orders, underlining the great potential of PhyloChip in microbial ecology and environmental microbiology studies.

1.7. Βιογεωγραφία και ειδογένεση πληθυσμών μυκήτων του συμπλόκου είδους *Pleurotus eryngii*

Γ.Ι. Ζερβάκης

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας, Εργαστήριο
Γενικής & Γεωργικής Μικροβιολογίας, Ιερά Οδός 75, 11855 Αθήνα

Email: zervakis@hua.gr

Το σύμπλοκο είδος *Pleurotus eryngii* περιλαμβάνει μύκητες που σχηματίζουν εκλεκτά εδώδιμα μανιτάρια και αναπτύσσονται σε φυτά της οικογένειας *Apiaceae* (σκιανδανθή). Εκτενής δειγματοληπτική διαδικασία, η οποία κάλυψε το μεγαλύτερο τμήμα της παγκόσμιας γεωγραφικής κατανομής του είδους, οδήγησε στον εντοπισμό και απομόνωση περισσότερων των 80 στελέχων *P. eryngii* προερχόμενα από όλα σχεδόν τα γνωστά φυτά-ξενιστές (*Eryngium* spp, *Ferula* spp., *Ferulago galbanifera*, *Laserpitium latifolium*, *Eleaoselinum asclepium*, *E. gummiferum*, *Thapsia garganica*, *T. villosa*, *Smyrniopsis aucheri*, *Kellusia odoratissima* και *Cachrys ferulacea*) περιοχών της Ευρώπης και της Ασίας. Τα δείγματα αξιολογήθηκαν μέσω συζευκτικών δοκιμών γενετικής συμβατότητας σε συνδυασμό με μορφολογικούς και οικοφυσιολογικούς χαρακτήρες. Στη συνέχεια, όλοι οι πληθυσμοί εξετάστηκαν με χρήση τυχαία ενισχυμένου πολυμορφικού DNA (RAPD's) και με αλληλουχήση τμημάτων της πυρηνικής ριβοσωμικής επανάληψης (ITS 1 και ITS 2, IGS και του 5.8S rDNA γονιδίου). Αρχικά αποτελέσματα έρευνας που είναι σε εξέλιξη καταδεικνύουν την ύπαρξη πέντε ανεξάρτητων φυλογενετικών αθροισμάτων: *P. eryngii* sensu-stricto (το οποίο περιλαμβάνει στελέχη που αναπτύσσονται σε ένα μεγάλο εύρος φυτών ξενιστών της οικογένειας *Apiaceae* και διαχωρίζεται περαιτέρω σε αρκετούς 'οικοτύπους'-ποικιλίες), *P. fossulatus* (περιλαμβάνει στελέχη που αναπτύσσονται σε φυτά *Cachrys ferulacea* στη δυτική και κεντρική Ασία), *P. nebrodensis* (περιλαμβάνει στελέχη που αναπτύσσονται σε φυτά *C. ferulacea* στην Ευρώπη), καθώς και δύο νέα φυλογενετικά είδη που εμφανίζουν στενή συσχέτιση με διαφορετικούς ξενιστές, το ένα στη νότια Ευρώπη και το άλλο στην Ασία. Η εξειδικευμένη σχέση που αναπτύσσεται μεταξύ φυτού-ξενιστή και μύκητα φαίνεται πως παίζει πρωτεύοντα ρόλο στις διαδικασίες ειδογένεσης στο συγκεκριμένο σύμπλοκο είδος, σε αντιδιαστολή με ότι συμβαίνει στα υπόλοιπα είδη *Pleurotus* όπου η γεωγραφική προέλευση αποτελεί τον καθοριστικό παράγοντα σχηματισμού ειδών. Ενώ τα πειραματικά δεδομένα δείχνουν ισχυρές τάσεις διαφοροποίησης της γενετικής δομής των πληθυσμών σχεδόν αποκλειστικά με βάση το είδος του φυτού-ξενιστή (πειριπτώσεις *P. nebrodensis* sensu lato και *P. fossulatus*), δεν απουσιάζουν και μεμονωμένες εξαιρέσεις που μπορούν να ερμηνευτούν από την υπάρχουνσα δυνατότητα ανταλλαγής γενετικού υλικού -μέσω εγγενούς αναπαραγωγής- μεταξύ ορισμένων πληθυσμών από διαφορετικά φυτά-ξενιστές σε γεωγραφικά γειτνιάζουσες περιοχές (π.χ. *P. eryngii* στο Ιράν).

1.7. Biogeography and speciation of mushroom populations in the *Pleurotus eryngii* species-complex

G.I. Zervakis

Agricultural University of Athens, Department of Agricultural Biotechnology,
Laboratory of General and Agricultural Microbiology, Iera Odos 75, 11855 Athens,
Greece

Email: zervakis@hua.gr

The *Pleurotus eryngii* species-complex includes edible mushroom taxa of the northern hemisphere growing in association with plants of the family *Apiaceae* (umbellifers). As a result of an extensive sampling covering most part of the world distribution of this organism, more than 80 *P. eryngii* strains were isolated from the majority of the known host-plants (*Eryngium* spp, *Ferula* spp., *Ferulago galbanifera*, *Laserpitium latifolium*, *Eleoselinum asclepium*, *E. gummiferum*, *Thapsia garganica*, *T. villosa*, *Smyrniopsis aucheri*, *Kellusia odoratissima*, and *Cachrys ferulacea*) in Europe and Asia. Specimens were examined through the use of mating compatibility tests, which were combined with the outcome of anatomical and ecophysiological observations; all populations were further subjected to random amplified polymorphic DNA-PCR (RAPD) analysis, and by sequencing of the internally transcribed spacers (ITS 1 και ITS 2), of the intergenic spacers (IGS) and of the 5.8S rDNA gene. Preliminary results from ongoing research demonstrated the existence of five distinct phylogenetic entities: *P. eryngii* sensu-stricto (growing in association with a wide range of *Apiaceae* host-plants, and composed of several ecotypes-varieties), *P. fossulatus* (composed of isolates growing on *Cachrys ferulacea* in western and central Asia), *P. nebrodensis* (composed of isolates growing on *C. ferulacea* in Europe), and of two new additional lineages presenting strict association with different hosts in south Europe and in Asia. Host-specificity appears to play a key role in speciation processes within this particular group of fungi, as opposed to what is the case for most other *Pleurotus* species, where geographic origin is the determinant factor. In general, although strong patterns of host-dependent subdivision in the genetic structure of this complex (*P. nebrodensis* sensu lato and *P. fossulatus* cases) were evidenced, occasional deviation from this situation seems to occur as well; this could be mainly attributed to ongoing gene-flow -through sexual reproduction- between certain populations growing on different host-plants in neighbouring areas (e.g., *P. eryngii* in Iran).

1.8. Χαρακτηρισμός μικροβιακών κοινοτήτων από βιομηχανικά απόβλητα πλούσια σε Cr(VI).

Κατσαβέλη Κ., Τσιάμης Γ., Βαγενάς Δ. & Κ. Μπούρτζης

Τμήμα Διαχείρισης Περιβάλλοντος και Φυσικών Πόρων, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων,
Σεφέρη 2, Αγρίνιο, Τ.Κ. 30100, Ελλάδα

Email: akatsave@cc.uoi.gr

Το χρώμιο έχει αναγνωριστεί ως ένα από τα μέταλλα που παρουσιάζουν πολύ σοβαρές επιπτώσεις στο περιβάλλον. Απαντά στη φύση με διάφορα σθένη, όπως τρισθενές και εξασθενές, που είναι και οι πιο συνηθισμένες μορφές του χρωμίου. Το εξασθενές χρώμιο (CrVI) παρουσιάζει υψηλή διαλυτότητα, κινητικότητα και είναι εύκολα βιολογικά διαθέσιμο στο περιβάλλον, με αποτέλεσμα να είναι ιδιαίτερα επικίνδυνο. Αντίθετα, το τρισθενές χρώμιο Cr(III) σχηματίζει σύμπλοκα και καθιζάνει με τη μορφή υδροξειδίου.

Η τοξική μορφή του χρωμίου ελευθερώνεται στο περιβάλλον κυρίως με τα απόβλητα διαφόρων βιομηχανιών. Οι τεχνολογικές διεργασίες για την επεξεργασία των ρυπασμένων από χρώμιο περιοχών αφορούν κυρίως: (i) την απομάκρυνση του μεγαλύτερου μέρους των ρύπων εξασθενούς χρωμίου από την τοποθεσία, (ii) τη δέσμευση του χρωμίου ώστε να αποφευχθεί μεγαλύτερη διαφυγή του στο περιβάλλον και (iii) την αναγωγή του εξασθενούς χρωμίου σε τρισθενές που είναι λιγότερο τοξικό. Ιδιαίτερα σημαντική είναι η αναγωγή του τοξικού εξασθενούς χρωμίου από μικροοργανισμούς καθώς οι βιολογικές διαδικασίες αποτελούν συνήθως έναν οικονομικότερο, και φιλικότερο για το περιβάλλον, τρόπο αντιμετώπισης του προβλήματος. Στην παρούσα μελέτη χαρακτηρίσαμε τη μικροβιακή κοινότητα από: (α) δεξαμενές με 25% Cr(VI) (pH 1.5 και 55°C) και (β) υγρά απόβλητα, που προέρχονται από την Ελληνική Αεροπορική Βιομηχανία Α.Ε., χρησιμοποιώντας αφενός 16S rRNA γονιδιακές βιβλιοθήκες και αφετέρου μικροσυστοιχίες DNA (Phylochip).

Οι 16S rRNA γονιδιακές βιβλιοθήκες ανέδειξαν την ύπαρξη μιας περιορισμένης βακτηριακής κοινότητας στις δεξαμενές με 25% Cr(VI) που αποτελείται κυρίως από *Ralstonia sp.*. Ενδιαφέρον παρουσιάζει επίσης το γεγονός της ανίχνευσης του *Ralstonia sp.* και στη δεξαμενή συλλογής των στραγγισμάτων χρωμίου. Στην ίδια δεξαμενή ανιχνεύτηκαν πληθυσμοί των *Brevundimonas mediterranea*, *Afipia sp.* και *Bosea sp.*. Στη δεξαμενή αναγωγής του χρωμίου (CR) ανιχνεύτηκαν πληθυσμοί των *Acinetobacter sp.* και *Pseudomonas sp.* ενώ στη δεξαμενή συμπλοκοποίησης του Cr(III) (CP) αναγνωρίστηκαν *Acinetobacter sp.*, *Pedobacter sp.*, *Afipia sp.*, *Flavobacteria sp.*, βακτηρίων που ανάγονται σίδηρο καθώς και μη καλλιεργήσιμα είδη των *a-* and *β-* *Proteobacteria*. Η σύνθεση των μικροβιακών κοινοτήτων στις δεξαμενές CR και CP εξετάστηκε επίσης με τη χρήση υψηλής πυκνότητας μικροσυστοιχιών DNA (PhyloChip, Affymetrix SA).

1.8. Molecular characterization of the microbial diversity and community profiles from Cr(VI) contaminated industrial wastewater.

Katsavali K., Tsiamis G., Vayenas D. & K. Bourtzis

Department of Environmental and Natural Resources Management, University of Ioannina, 2 Seferi St., Agrinio, T.K. 30100, Greece

Email: akatsave@cc.uoi.gr

One of the worldwide metals that have been recognized as a great hazard in the environment is chromium (Cr). This metal is widely found in nature in different valence states as Cr(VI) to Cr(III) forms. Cr(VI) is highly soluble, mobile and biologically available in the ecosystems and therefore it is particularly toxic. On the other hand, Cr(III) forms complexes that precipitate as amorphous hydroxide.

The toxic form of Cr is released in the environment with wastewaters from different industries. The technologies for Cr clean-up from the contaminated sites mainly consist of: (i) removing the maximum Cr(VI)-contaminated parts from the site, (ii) immobilizing the chromium to prevent further leaching, and (iii) reducing the Cr(VI) to Cr(III) state which is not toxic. Microbial reduction of toxic Cr(VI) has practical importance in this respect because biological strategies provide cost-effective and eco-friendly technology. In this study, we characterized the microbial communities from: (a) tanks containing 25% Cr(VI) (pH 1.5 and 55°C) and (b) the wastewater treatment plant of the Hellenic Aerospace Industry S.A. using 16S rRNA gene libraries and DNA microarrays (PhyloChip).

Interestingly, the 16S rRNA gene libraries revealed the presence of a small but significant bacterial community in tanks with 25% Cr(VI) mainly consisting of *Ralstonia* sp.. Interestingly, the same *Ralstonia* sp. was traced down to the chromium drainage waste sample together with populations related to *Brevundimonas mediterranea*, *Afipia* and *Bosea* spp.. In the chromium reduction (CR) reservoir, the dominant populations that have been identified are closely related to *Acinetobacter* sp. and *Pseudomonas* sp. whereas in the reservoir that Cr(III) forms complexes and precipitate as amorphous hydroxide (CP) populations, closely related bacteria to *Acinetobacter* sp., *Pedobacter* sp., *Afipia* sp., *Flavobacteria* sp., iron-reducing bacteria and uncultured α - and β - *Proteobacteria* have been identified. The composition of the microbial communities present in the two reservoirs (CR and CP) was also investigated using a high density DNA microarray (PhyloChip, Affymetrix SA).

1.9. Είδη του γένους *Penicillium* στον αέρα εσωτερικών χώρων βιομηχανιών

Καψανάκη-Γκότση Ε. & Ι. Πυρρή

Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Βιολογίας, Τομέας Οικολογίας & Ταξινομικής

Πανεπιστημιούπολη, 157 84 Αθήνα

Email: ekapsan@biol.uoa.gr

Το γένος *Penicillium* είναι ένα από τα επικρατέστερα στην ατμόσφαιρα και μπορεί να αναπτυχθεί σε ποικιλία υποστρωμάτων εκτεθειμένων στον αέρα, ιδιαίτερα σε εσωτερικούς χώρους. Το πλήθος των δεδομένων σχετικά με την ποικιλότητα του γένους, οφείλεται στην κοσμοπολιτική του κατανομή και στην σημασία του σε ποικίλους τομείς οικονομικού ενδιαφέροντος για τον άνθρωπο. Όμως ελάχιστα δεδομένα είναι διαθέσιμα για την παρουσία του στο εσωτερικό βιομηχανικών εγκαταστάσεων, παρά την πιθανή διακινδύνευση σχετικά με την ποιότητα των προϊόντων.

Το γένος *Penicillium* είναι το δεύτερο κατά σειρά επικρατέστερο γένος στον αέρα της Αθήνας σε εξωτερικούς χώρους και συνήθως το επικρατέστερο σε εσωτερικούς, όπως έχει διαπιστωθεί από μακρόχρονες μελέτες στους αερομεταφερόμενους μύκητες. Η ποικιλότητα του γένους σε βιομηχανικό περιβάλλον, έχει μελετηθεί σε βιομηχανίες τροφίμων που λειτουργούν στην Περιφέρεια Αττικής. Για τη δειγματοληψία έχει χρησιμοποιηθεί φορητή σποριοπαγίδα Burkard για τρυβλία, σε διάφορες θέσεις των τομέων παραγωγής, συσκευασίας και διακίνησης των προϊόντων. Στελέχη του γένους *Penicillium* έχουν απομονωθεί και μελετηθεί σε καθαρή καλλιέργεια. Ιδιαίτερη έμφαση δίνεται σε ορισμένα από τα πιο κοινά είδη, συμπεριλαμβανομένων των ειδών *Penicillium chrysogenum*, *P. expansum*, *P. brevicompactum* και *P. digitatum*.

1.9. Species of *Penicillium* in the indoor air of industries

Kapsanaki-Gotsi E. & I. Pyrri

Department of Ecology and Systematics, Faculty of Biology, University of Athens,
Panepistimioupoli 157 84 Athens, Greece

Email: ekapsan@biol.uoa.gr

The genus *Penicillium* is one of the predominant genera in the atmosphere and it may grow on several substrates exposed to the air, especially in indoor environments. A wealth of knowledge on the diversity of this genus, is due to its cosmopolitan distribution and its economic importance for human affairs. However, only a few data are available for its occurrence in the interior of industrial settlements, despite its potential hazards for the quality of the products.

The genus *Penicillium* is the second most prevalent genus in the ambient air of Athens, Greece and it usually predominates indoors, as it has been found during long term studies on the airborne mycobiota. The diversity of this genus in the industrial environment, has been studied in food industries situated in the Prefecture of Attica. A portable Burkard sampler for agar plates has been used for sampling in several sites in the production, packaging and handling sectors. Several strains of *Penicillium* have been isolated and studied in pure culture. Some of the most common species are presented in detail, including *Penicillium chrysogenum*, *P. expansum*, *P. brevicompactum* and *P. digitatum*.

This research received support from the SYNTHESYS Project which is financed by the EU Research Infrastructure Action, under the FP6 "Structuring the European Research Area" Programme.

1.10. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ, ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΙΩΝ ΕΝΤΟΜΟΠΑΘΟΓΟΝΩΝ ΜΥΚΗΤΩΝ

Κόττα-Λοϊζου Ι.¹, Κόλλα Κ.², Χατζηλουκάς Ε.² & Μ.Α. Τύπας¹

¹Τομέας Γενετικής και Βιοτεχνολογίας, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ,
Πανεπιστημιούπολη, Ιλίσσια, Αθήνα 15701

²Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών,
Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Πανεπιστημιούπολη, Ε3, Ιωάννινα 45110

Email: iolykl@yahoo.gr

Οι εντομοπαθογόνοι μύκητες παρουσιάζουν εξαιρετικό ενδιαφέρον για τη μελέτη σχέσεων παρασίτου-ξενιστού και για τη δυνατότητα χρησιμοποίησής τους στη βιολογική καταπολέμηση βλαβερών εντόμων. Το γένος *Beauveria* είναι ιδιαίτερα εξαπλωμένο γεωγραφικά και ως προς το εύρος ξενιστών. Ενώ η παρουσία ιών σε φυτοπαθογόνους μύκητες είναι συχνό φαινόμενο, στους εντομοπαθογόνους μόνο σε τέσσερις περιπτώσεις έχουν εντοπιστεί ιοί με γονιδίωμα δίκλωνo RNA, σφαιρικό σωματίδιο και ασθενείς επιδράσεις στο φαινότυπο του ξενιστή τους.

Στην πληθυσμιακή μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε 108 στελέχη εντομοπαθογόνων μυκήτων, με ηλεκτροφορήσεις σε πηκτώματα αγαρόζης του συνόλου των νουκλεϊκών τους οξέων, προσδιορίστηκαν 22 στελέχη του είδους *Beauveria bassiana*, τα οποία περιείχαν μη χρωμοσωμικές ζώνες. Τα στελέχη αυτά ομαδοποιήθηκαν σύμφωνα με τα ηλεκτροφορητικά τους πρότυπα και διαπιστώθηκε ότι οι ομάδες σχετίζονται με τον ξενιστή, τη χώρα προέλευσης ή/και τη φυλογένετική τους θέση.

Πραγματοποιήθηκε έλεγχος της ποσοτικής και ποιοτικής μεταβολής των προτύπων αυτών συναρτήσει του χρόνου και βρέθηκε ότι υπάρχουν πολύ περισσότερα ικά νουκλεϊκά οξέα ανά μονάδα ξηρού βάρους μυκηλίου κατά τις πρώτες ημέρες ανάπτυξης της καλλιέργειας. Την ίδια χρονική περίοδο, εντοπίζονται ικά νουκλεϊκά οξέα και πρωτεΐνες στο υπερκείμενο της υγρής καλλιέργειας.

Με χρήση Ηλεκτρονικού Μικροσκοπίου διέλευσης εντοπίσθηκαν ικά σωματίδια εντός των υφών καθώς και στο υπερκείμενο υγρής καλλιέργειας αντιπροσωπευτικού στελέχους και προσδιορίστηκαν δύο πληθυσμοί σωματιδίων σφαιρικού σχήματος, με διάμετρο 100nm και 50nm αντίστοιχα, σε αναλογία 1:8 εντός του μυκηλίου.

Με τεχνικές απομόνωσης RNA σε μεγάλη κλίμακα, απομονώθηκε dsRNA του οποίου η φύση διαπιστώθηκε με δοκιμασίες DNaseI, RNaseA (σε συνθήκες υψηλής και χαμηλής αλατότητας) και RNaseIII. Οι ζώνες dsRNA τόσο μεμονωμένα όσο και συνολικά χρησιμοποιήθηκαν ως εκμαγεία για τη σύνθεση cDNA και τα προϊόντα κλωνοποιήθηκαν στον φορέα pUC118. Από μετασχηματισμένα κύτταρα *E. coli* απομονώθηκε DNA ανασυνδυασμένων κλώνων, προσδιορίστηκε η αλληλουχία των βάσεων των ενθέσεών τους και οι αναλύσεις έδειξαν ότι είχαν κλωνοποιηθεί μόνον τμήματα διαφορετικών μεγεθών του ικού μορίου και όχι ολόκληρο το μόριο. Ορισμένα εξ αυτών δείχγουν μεγάλο βαθμό ομοιότητας με άλλους dsRNA ιούς.

1.10. ISOLATION, MOLECULAR ANALYSIS AND STUDY OF VIRUSES IN ENTOMOPATHOGENIC FUNGI

Kotta-Loizou I.¹, Kolla C.², Hatziloukas E.² & M.A. Typas¹

¹Department of Genetics and Biotechnology, Faculty of Biology, NKUA, University Campus, Ilissia, Athens 15701, Greece

²Laboratory of Molecular Biology, Department of Biological Applications and Technologies, University of Ioannina, University Campus, E3, Ioannina 45110, Greece

Email: iolykl@yahoo.gr

Entomopathogenic fungi are of great scientific interest because they enable analysis of virus-host interactions and can be used as biocontrol agents. The deuteromycetous fungus *Beauveria* has a widespread geographical distribution and is an important pathogen of numerous insect species. Mycoviruses have been described mostly in phytopathogenic fungi and only in a few cases in entomopathogenic fungi. In the latter case, they are spherical virions, contain dsRNA genome and do not influence significantly the host phenotype.

In a population study, 108 isolates of entomopathogens from different geographic and host origins –mostly of the genus *Beauveria*- were examined for the presence of non-chromosomal DNA bands following electrophoretic separation of undigested nucleic acids. Twenty-two *B.bassiana* isolates were found to harbour such bands. No correlation between isolates' banding patterns and insect host, geographical origin or evolutionary relationships was detected.

A time-course study on the qualitative and quantitative differentiation of banding patterns revealed that the yield of nucleic acid is higher during the early developmental stages of the fungus. At the same time-point, viral nucleic acids and proteins were observed in the culture supernatant.

Transmission electron microscopy was used for the analysis of virus-like particles, both inside the mycelium and in the culture supernatant of a representative isolate. Two distinct groups of virus-like particles were detected, approximately 50nm and 100nm in size respectively, in a ratio of 1:8 inside the mycelium.

Large-scale dsRNA extraction standard methods were used and the samples from all 22 isolates were treated with DNaseI and RNaseA in high salt concentration with no effect. However, they were sensitive to RNaseIII and RNaseA in low salt concentrations, confirming that the isolated bands were composed of dsRNA. The dsRNA bands served as a template for cDNA synthesis and the products were cloned into the pUC118 vector. The recombinant plasmids were used to transform *E. coli* cells by electroporation, and 19 clones of different sizes were isolated and their sequences analysed. A number of these clones contain sequences with strong similarities to other dsRNA viruses.

1.11. Φυλογενετικός διαχωρισμός ειδών *Aspergillus* και *Penicillium* με πυρηνικά και μιτοχονδριακά γονίδια

Κριμιτζάς Α., Κουβέλης Β.Ν. & Μ.Α. Τύπας

Τομέας Γενετικής & Βιοτεχνολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών,
Πανεπιστημιούπολη, Αθήνα ΤΚ 157 01, Ελλάδα

E-mail: krimian@biol.uoa.gr

Τα γένη *Aspergillus* και *Penicillium* είναι από τα πολυπληθέστερα σε αριθμό ειδών, έχουν κοσμοπολίτικη κατανομή και κατέχουν σημαντικό ρόλο στη Βιοτεχνολογία, Ιατρική, περιβαλλοντική και διατροφική Μυκητολογία. Η μοριακή ανάλυση γενετικών τόπων (γονιδίων ή περιοχών) σε επίπεδο νονικλεοτιδικών ή αμινοξικών αλληλουχιών έχει δώσει πλήθος δεδομένων στην αναδιοργάνωση της ταξινομικής των παραπάνω γενών σε σχέση με μορφολογικούς ή βιοχημικούς χαρακτήρες. Ωστόσο, οι φυλογενετικές σχέσεις ορισμένων ομάδων εντός των γενών παραμένουν ασαφείς. Αναμφισβήτητα, η πυρηνική ριβοσωμική επανάληψη (rRNA gene complex) και γονίδια όπως της β-σωληνίνης (*benA*) και της υπομονάδας 2 της RNA πολυμεράσης II (*rpb2*) είναι ιδιαίτερα σημαντικά σε μελέτες φυλογενετικού διαχωρισμού μυκήτων. Το μιτοχονδριακό DNA επίσης χρησιμοποιείται σε γενετικές ταυτοποιήσεις-διαχωρισμούς λόγω της ταχύτερης εξέλιξης του σε σχέση με το χρωμοσωμικό DNA. Ένας συνδυασμός αλληλουχισης έξι πυρηνικών και μιτοχονδριακών γονιδίων χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά και για τα δύο γένη, τόσο για κάθε γονίδιο χωριστά, όσο και όλα μαζί ως μια μονάδα με σκοπό να ξεκαθαρίσουν οι φυλογενετικές σχέσεις των ειδών των δύο γενών. Συγκεκριμένα, 4 πυρηνικά (ITS, IGS, *benA*, *rpb2*) και δύο μιτοχονδριακά (*rns*, *cox1*) γονίδια/περιοχές αναλύθηκαν πλήρως για 36 και 61 στελέχη *Aspergillus* και *Penicillium* αντίστοιχα. Χρησιμοποιήθηκαν 3 διαφορετικές φυλογενετικές μέθοδοι [Γειτονικών Ζευγαριών (Neighbour-Joining), Μέγιστης Φειδωλότητας (Maximum Parsimony) και Bayesian inference]. Τα φυλογενετικά δένδρα που βασίστηκαν σε ανάλυση ενός γονιδίου/περιοχής διαχώρισαν και τοποθέτησαν τα είδη που εξετάστηκαν στους τομείς *Candidi*, *Clavati*, *Fumigati*, *Flavi*, *Nigri*, *Terrei* και *Usti* για τους Ασπέργιλλους και ομαδοποίήσαν στα υπογένη *Biverticillium*, *Penicillium*, *Aspergilloides* και *Furcatum* τα Πενισίλλια, δίνοντας ικανοποιητική υποστήριξη των τοπολογιών (bootstrap). Ωστόσο, δεν διευκρινίστηκαν όλες οι ταξινομικές αβεβαιότητες. Το δένδρο που προήλθε από όλα τα δεδομένα (6 γονίδια) ως μία οντότητα έδωσε μια βελτιωμένη φυλογενετική εικόνα και για τα δύο γένη, συγκρινόμενο με τα αντίστοιχα φυλογενετικά δένδρα κάθε γονιδίου μεμονωμένα. Επομένως, η συνδυασμένη χρήση πυρηνικών και μιτοχονδριακών γονιδίων/περιοχών, αναδεικνύει τη σημασία αξιοποίησης αλληλουχιών πολλών γενετικών τόπων ταυτόχρονα ως μια ενιαία βάση δεδομένων και είναι χρήσιμο και αξιόπιστο μοριακό εργαλείο για τη φυλογενετική ανάλυση των δύο γενών.

1.11. Phylogenetic discrimination of *Aspergillus* and *Penicillium* species with nuclear and mitochondrial genes

Krimitzas A., Kouvelis V.N., & M.A. Typas

Department of Genetics and Biotechnology, Faculty of Biology, University of Athens,
Panepistemiopolis, Athens TK15701, Greece

Email: krimian@biol.uoa.gr

Aspergillus and *Penicillium* are genera that contain large numbers of species, with cosmopolitan distribution, playing an important role in biotechnology, medical, environmental and food mycology. The development of molecular methods and in particular sequence analyses of several genes/regions has provided a large amount of data in the reorganization of *Aspergillus* and *Penicillium* taxonomy. Nevertheless, phylogenetic relationships among some groups and species delimitation remain unclear. Undoubtedly, the nuclear rRNA gene complex and genes like beta-tubulin (*benA*) and ribosomal RNA polymerase II subunit 2 (*rpb2*) have been the most popular molecules in studies aiming to clarify the taxonomic position of various fungi. Mitochondrial DNA also is increasingly being used to examine genetic diversity within populations because it evolves faster than nuclear DNA. A combined nuclear-mitochondrial based multi-locus gene sequencing approach was used for the first time for both genera and a simultaneous analysis of six genetic loci was performed, using data either from single genes or combined (all 6 genes) as a single unit, in order to clarify the phylogeny of the species within. In detail, four nuclear (i.e. ITS, IGS, *benA*, *rpb2*) and two mitochondrial (i.e. *rns* and *cox1*) regions were fully analysed for thirty seven and sixty one strains that belong to thirty two and forty one species of *Aspergilli* and *Penicillia*, respectively. Three different phylogenetic methods (Neighbour-Joining, Maximum Parsimony and Bayesian inference) were employed. Phylogenetic trees based on single gene datasets differentiated and placed the species examined in sections of *Candidi*, *Clavati*, *Fumigati*, *Flavi*, *Nigri*, *Terrei* and *Usti* for *Aspergilli* and groups within subgenera *Biverticillum*, *Penicillium*, *Aspergilloides* and *Furcatum* for *Penicillia*, all with good bootstrap support. However, a few uncertainties still remained in both genera. The concatenated sequences from all six genetic loci gave improved species phylogenetic resolution for both genera in comparison with single gene data. Thus, the combined use of sequences from nuclear and mitochondrial genes demonstrates the usefulness of concatenated datasets as a convenient molecular tool in phylogenetic studies of both genera.

1.12. Ποικιλότητα των Βακτηρίων και των Αρχαίων Προκαρυωτικών Οργανισμών σε Δεξαμενή Πόσιμου Νερού

Λυμπερόπούλου Δ.Σ.¹, Κορμάς Κ.Αρ.², Μουστάκα-Γούνη Μ.³ & Α. Δ. Καραγκούνη¹

¹Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Βιολογίας, Τομέας Βοτανικής, Ομάδα Μικροβιολογίας, 15781 Αθήνα

²Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, 38446 Νέα Ιωνία

³ Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Τμήμα Βιολογίας, Θεσσαλονίκη 54124

Email: dlymperop@biol.uoa.gr

Η δομή των κοινοτήτων των Βακτηρίων και των Αρχαίων στον Ταμιευτήρα του Μαραθώνα μελετήθηκε κατά τον Οκτώβριο του 2007 και τον Σεπτέμβριο του 2008, με τη χρήση 16s rDNA βιβλιοθηκών. Η κυριότερη βακτηριακή ομάδα που φαίνεται να επικρατεί είναι αυτή των Ακτινοβακτηρίων. Ως προς τα Πρωτεοβακτήρια φαίνεται να υπάρχει μία ομοιόμορφη κατανομή των βακτηρίων της λίμνης στις ομάδες των α- και β-Πρωτεοβακτηρίων και λιγότερο σε αυτή των γ-Πρωτεοβακτηρίων, αντιπρόσωποι της οποίας ανακύπτουν συνηθέστερα όταν εφαρμόζονται οι κλασσικές μέθοδοι καλλιέργειας, καθώς και των δ-Πρωτεοβακτηρίων. Εξίσου σημαντική ομάδα φαίνεται να είναι και αυτή των Bacteroidetes, ενώ επίσης ανέκυψαν και αντιπρόσωποι των Acidobacteria, των Cyanobacteria, των Chloroflexi, των Planctomycetes και της σχετικά πρόσφατα χαρακτηρισμένης ομάδας των Verrucomicrobia. Η στοχευμένη μελέτη της ομάδας των Κυανοβακτηρίων με εξειδικευμένα εκκινητικά μόρια αποκάλυψε επιπρόσθετη ποικιλότητα μέσα στην ομάδα αυτή. Όλοι οι φυλότυποι των Κυανοβακτηρίων ανήκαν στην τάξη Chroococcales. Οι πιο επικρατείς φυλότυποι σχετίστηκαν στενά με αντιπροσώπους του γένους *Gleocapsa*, καθώς και με το δυνητικά τοξικό είδος *Microcystis aeruginosa*. Οι πληθυσμοί των Αρχαίων της λίμνης αποτελούνταν από αντιπροσώπους τόσο των Crenarchaeota, όσο και των Euryarchaeota. Στην τελευταία ομάδα κυριάρχησαν φυλότυποι που σχετίστηκαν με τα Methanobacteriales και τα Methanosarcinales, καθώς και μία ομάδα φυλοτύπων με μη χαρακτηρισμένους συγγενείς. Τα Crenarchaeota ήταν πιο επικρατή και όλοι οι φυλότυποι παρουσίασαν ομοιότητες με αλληλουχίες μικροοργανισμών που δεν έχουν μέχρι σήμερα καλλιεργηθεί, αλλά έχουν ανακτηθεί από ανάλογα με το υπό εξέταση περιβάλλοντα ενδιαιτήματα. Δύο ομάδες αλληλουχιών παρουσίασαν μακρινές φυλογενετικές σχέσεις με καλλιεργήσιμους αντιπροσώπους των Thermoprotei και των Nitrosopumilales. Οι σπάνιοι φυλότυποι επικράτησαν στις βιβλιοθήκες των Αρχαίων, ενώ ο δείκτης ποικιλότητας Shannon H' παρουσίασε μικρότερη διακύμανση για τα Αρχαία (0.64 - 0.99) σε σχέση με τα Βακτήρια (0.21 - 0.92).

Η παρούσα μελέτη αποτελεί την πρώτη αναφορά στο περιεχόμενο του Ταμιευτήρα του Μαραθώνα σε φυλότυπους Βακτηρίων και Αρχαίων, με ιδιαίτερη έμφαση στην ομάδα των Κυανοβακτηρίων.

Λέξεις κλειδιά: Αρχαία, Κυανοβακτήρια, ποικιλότητα, αφθονία, φυλογένεση

1.12. Bacterial and Archaeal Diversity in a Large Freshwater Reservoir

Lympertopoulou D.S.¹, Kormas K.Ar.², Moustaka-Gouni M.³ & A.D. Karagouni¹

¹ University of Athens, Faculty of Biology, Department of Botany, Microbiology Group, 15781 Athens, Greece

² University of Thessaly, Department of Ichthyology & Aquatic Environment, 38446 Nea Ionia, Greece

³ Aristotle University of Thessaloniki, School of Biology, Department of Botany, 54124 Thessaloniki, Greece

Email: dlymperop@biol.uoa.gr

The structure of the bacterial and the archaeal community in a large drinking water reservoir (Marathonas, Greece) was investigated in October 2007 and September 2008, using 16S rDNA clone libraries. A highly diverse bacterial population was detected for each sampling site, with 16S rDNA clones related mainly to Actinobacteria, which seem to represent the dominant bacterial group in the reservoir, as well as to α -, β -, γ - and δ -Proteobacteria. The Bacteroidetes group also consists an important phylum detected in the lake, while representatives of Acidobacteria, Cyanobacteria, Chloroflexi, Planctomycetes and the recently characterized group of Verrucomicrobia were also retrieved. Targeting populations with specific primers revealed additional cyanobacterial diversity. All cyanobacterial phylotypes belonged to the order Chroococcales. Some of the most abundant phylotypes were closely related (>98%) to members of the genus *Gloeocapsa* and a potentially toxin-producing strain of *Microcystis aeruginosa*. The archaeal population of the lake was comprised of both Crenarchaeota and Euryarchaeota. The latter were dominated by phylotypes related to Methanobacteriales and Methanosarcinales and a group with no characterized matches. Crenarchaeota were more dominant and all phylotypes exhibited similarities to sequences of yet-uncultivated microorganisms retrieved from freshwater environments. Two groups of sequences were distantly related to Thermoprotei and Nitrosopumilales. Archaeal clone libraries were dominated by rare phylotypes, while the Shannon diversity index H' showed smaller variation for the Archaea (0.64 - 0.99) than for Bacteria (0.21 - 0.92).

To the best of our knowledge this study constitutes the first report on both bacterial and archaeal phylotypes of the Marathon drinking water Reservoir natural populations. Using cyanobacterial-specific 16S rDNA clone libraries, we also examined the diversity of Cyanobacteria focusing on phylotypes of toxin-producing species in the water column of four sampling sites and compared it during a one year interval.

Keywords: Archaea, cyanobacteria, diversity, richness, evenness, phylogeny, cluster analysis

1.13. ποχικές αλλαγές καθορίζουν τη διαδοχή των βακτηριακών κοινοτήτων του εντέρου της καραβίδας *Nephrops norvegicus*.

Μεζίτη Α.^{1,2}, Ramette A.², Μεντέ Ε.¹ & Κ. Κορμάς¹

¹Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος,
Φυτόκο, Τ.Κ. 38446, Βόλος, Ελλάδα

²Max Planck Institute for Marine Microbiology, Celsiusstrasse 1, 28359, Bremen,
Germany

Email: ameziti@uth.gr

Μελετήσαμε για πρώτη φορά τις αλλαγές στις εντερικές μικροβιακές κοινότητες της καραβίδας *Nephrops norvegicus*. Τα δείγματα συλλέχτηκαν σε μηνιαία βάση από τον Παγασητικό κόλπο και αναλύθηκαν με την χρήση μίας σειράς μοριακών εργαλείων όπως η αυτοματοποιημένη ανάλυση του ριβοσωμικού διαγονιδιακού χώρου (Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis (ARISA)), η κατασκευή 16S rRNA-ITS βιβλιοθηκών και ο επιτόπιος φθορίζων υβριδισμός (Fluorescence In Situ Hybridization (FISH)). Η πολυπαραγοντική ανάλυση (Multivariate analysis) της μικροποικιλότητας των εντερικών βακτηριακών κοινοτήτων έδειξε ένα εποχικό πρότυπο στις αλλαγές της δομής των κοινοτήτων, ενώ το φύλο και το μέγεθος δεν αποδείχτηκαν στατιστικά σημαντικοί παράγοντες. Αυτό υποδεικνύει ότι οι βακτηριακές κοινότητες επηρεάζονται από γνωστές αλλαγές στην παροχή τροφής που αντιστοιχούν στην κύρια εποχική αλλαγή στο οικοσύστημα της καραβίδας. Η ανάλυση της 16S rRNA γονιδιακής ποικιλότητας έδειξε την επικράτηση (>60%) συγκεκριμένων φυλοτύπων για καθέναν από τους μήνες που μελετήθηκαν. Στα δείγματα των Φεβρουαρίου, Μαΐου, Ιουλίου, Αυγούστου και Οκτωβρίου βρέθηκαν κυρίως φυλοτύποι συγγενείς με τα γένη *Pseudoalteromonas*, *Psychrobacter* και *Photobacterium* (γ -Proteobacteria). Στα δείγματα του Σεπτεμβρίου και του Δεκεμβρίου παρατηρήθηκε η επικράτηση φυλοτύπων με ακαλλιέργητους συγγενείς που έχουν εντοπιστεί στους πεπτικούς σωλήνες διαφόρων ζώων και δημιουργούν μία ξεχωριστή μονοφυλετική ομάδα μέσα στο φύλο των Mollicutes. Η παρουσία των γ -Proteobacteria και των ακαλλιέργητων Mollicutes στα δείγματα του Αυγούστου και του Σεπτεμβρίου αντίστοιχα επιβεβαιώθηκε με την χρήση της τεχνικής FISH. Οι πιθανές λειτουργίες των γ -Proteobacteria (π.χ. χιτινολυτική και λιπολυτική ικανότητα) που βρέθηκαν στους μήνες που μελετήθηκαν μπορούν να συνδεθούν με τη διαθεσιμότητα της τροφής σε αυτές τις εποχές του χρόνου. Η λειτουργία της ομάδας των εντερικών Mollicutes παραμένει ακόμα άγνωστη αλλά πιθανότατα έχει κάποιο ρόλο κλειδί στις λειτουργίες του εντέρου. Οι περισσότεροι από τους επικρατείς φυλοτύπους, επανεμφανίστηκαν σε διάφορους μήνες σε χαμηλότερες αφθονίες. Η επανεμφάνιση πολλών φυλοτύπων με διαφορετικές συχνότητες κατά τη διάρκεια του χρόνου υποδεικνύει την ύπαρξη διαφοροποιούμενων (από απόψη συχνοτήτων) εντερικών βακτηριακών κοινότητων ανάλογα με τη διαθεσιμότητα και την ποιότητα της τροφής.

1.13. Seasonal changes impact the succession of gut bacterial communities in the Norway lobster *Nephrops norvegicus*

Meziti A. ^{1,2}, Ramette A. ², Mente E. ¹ & K. Kormas¹

¹University of Thessaly, Department of Ichthyology and Aquatic Environment,
Fytoko, 38446, Volos, Greece

²Max Planck Institute for Marine Microbiology, Celsiusstrasse 1, 28359, Bremen,
Germany

Email: ameziti@uth.gr

We studied for the first time the gut bacterial communities' shifts between Norway lobster (*Nephrops norvegicus*) individuals. Samples were collected from Pagasitikos Gulf on a monthly basis and were analyzed using a suite of molecular tools consisting of Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis (ARISA), 16S rRNA-ITS clone libraries and Fluorescence In Situ Hybridization (FISH). Multivariate analyses of the microdiversity of the gut bacterial communities revealed a weak seasonal trend in the changes in community structure, whereas animal sex and size were not found as significant factors. This suggests that bacterial communities were influenced by known temporal changes in food supply, which correspond to the main seasonal variability of the *N. norvegicus* ecosystem. The 16S rRNA gene diversity analysis showed dominance (>60%) of certain phylotypes for each month studied. February, May, July, August and October samples were rich in sequences related to those of the γ -proteobacterial genera *Pseudoalteromonas*, *Psychrobacter* and *Photobacterium*. September and December samples were dominated by phylotypes affiliated with uncultured representatives of Mollicutes associated with the intestinal tracts of different animals. FISH further confirmed the presence of γ -Proteobacteria in August and uncultured Mollicutes in September samples. The potential functions of the γ -Proteobacteria detected in the months studied (e.g. chitinolytic and lipolytic activity) could be related to the food availability in these seasons of the year. The function of gut Mollicutes group still remains unknown but possibly has a key role in intestinal processes. Most of the dominant phylotypes were reoccurring in various months in lower abundances. The reoccurrence of many phylotypes in different frequencies during the year suggests the existence of diversifying (in terms of phylotypes' relative abundances) gut bacterial communities according to food availability and quality.

1.14. Έλεγχος για την παρουσία ανθεκτικών βακτηριακών στελεχών σε αντιβιοτικά, στην εντερική μικροχλωρίδα υγιών τελειόμηνων νεογνών

Μήτσου Ε.¹, Κιρτζαλίδου Α.¹, Πραματευτάκη Π.² & **Α. Κυριακού¹**

¹Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας-Διατροφής, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο, Ελ. Βενιζέλου 70,
Τ.Κ. 17671, Καλλιθέα, Ελλάδα

²Ινστιτούτο Οίνου Αθηνών, Εθνικό Ίδρυμα Αγροτικής Έρευνας (ΕΘ.Ι.ΑΓ.Ε.), Σοφοκλή
Βενιζέλου 1, Τ.Κ. 14123, Λυκόβρυση, Ελλάδα

Email: mkyriacou@hua.gr

Η διαρκώς αυξανόμενη χρήση των αντιβιοτικών για θεραπευτικούς και μη-θεραπευτικούς σκοπούς (γεωργία, κτηνοτροφία, ιχθυοκαλλιέργειες) έχει οδηγήσει στη κλιμάκωση του φαινομένου της ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά και κατά συνέπεια στην απώλεια του βασικότερου όπλου της κλινικής πρακτικής κατά των παθογόνων. Η φυσιολογική εντερική μικροχλωρίδα πολύ συχνά βρίσκεται υπό την εξελικτική πίεση αντιμικροβιακών παραγόντων γεγονός που μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία δεξαμενής γονιδίων ανθεκτικότητας, τα οποία μέσω της οριζόντιας μεταφοράς γενετικού υλικού δυνητικά μπορεί να μεταφερθούν σε παθογόνους μικροοργανισμούς. Στόχος της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση της ευαισθησίας στα αντιβιοτικά και της παρουσίας επιλεγμένων γονιδίων ανθεκτικότητας σε απομονώσεις βακτηριακών στελεχών από τα κόπρανα 35 υγιών, τελειόμηνων νεογνών. Συνολικά απομονώθηκαν 148 Gram-θετικοί, και ως προς την καταλάση-αρνητικοί κόκκοι, οι οποίοι εξετάστηκαν ως προς την ευαισθησία τους σε 12 διαφορετικά αντιβιοτικά με τη τεχνική διάχυσης δισκών (disk diffusion). Η ταυτοποίηση των απομονώσεων του γένουν *Enterococcus* spp., με την ταυτόχρονη ανίχνευση γονιδίων ανθεκτικότητας στη βανκομυκίνη, πραγματοποιήθηκε μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης. Αντίστοιχα έγινε έλεγχος για την παρουσία γονιδίων ανθεκτικότητας στην τετρακυκλίνη και την ερυθρομυκίνη. Τα αποτελέσματα της ταυτοποίησης υπέδειξαν το *E. faecalis* ως το επικρατέστερο είδος (80 στελέχη), ακολουθόμενο από τα *E. faecium*, *E. casseliflavus* ή *E. flavescentis* και *E. gallinarum*. Υψηλά ποσοστά ανθεκτικών στελεχών παρατηρήθηκαν στη περίπτωση της τετρακυκλίνης (39.9%), ερυθρομυκίνης (35.1%), βανκομυκίνης (19.6%) και των αναστολέων της σύνθεσης νουκλεϊκών οξέων. Η μοριακή ανάλυση υπέδειξε 23 από τα 52 ανθεκτικά στην ερυθρομυκίνη στελέχη, ως φορείς του γονιδίου *ermB* και 29 από τα 59 ανθεκτικά στη τετρακυκλίνη στελέχη, ως φορείς γονιδίων *tet*, με πιο συχνά απαντώμενο το *tet(L)*. Στη περίπτωση της βανκομυκίνης παρατηρήθηκε μόνο ενδογενής ανθεκτικότητα (*vanC1* και *vanC2/C3*) στα απομονωμένα στελέχη. Βάσει των αποτελεσμάτων, συμπεραίνουμε μια ευρεία εξάπλωση της επίκτητης ανθεκτικότητας στη τετρακυκλίνη και στην ερυθρομυκίνη σε στελέχη κόκκων απομονωμένα από τα κόπρανα υγιών βρεφών.

Λέξεις Κλειδιά: εντερική μικροχλωρίδα, ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά, εντερόκοκκοι

1.14. Antibiotic resistance in faecal microbiota of Greek healthy infants

Mitsou E.¹, Kirtzalidou E.¹, Pramateftaki P.² & A. Kyriacou¹

¹ Dept. of Dietetics and Nutritional Science, Harokopio University, 70 El. Venizelou Str., 17671 Kallithea, Greece

² Wine Institute of Athens, National Agricultural Research Foundation (N.A.G.RE.F.), 1 Sofokli Venizelou Str., 14123 Lykovrissi, Greece

Email: mkyriacou@hua.gr

Increasing use of antibiotics for the treatment of infectious diseases and also for non therapeutic reasons (agriculture, animal husbandry and aquaculture) has led to the increasing incidence of antibiotic resistance and the ineffectiveness of antimicrobial treatment. Commensal intestinal bacteria are very often exposed to the selective pressure of antimicrobial agents and may constitute a reservoir of antibiotic resistance determinants that can be transferred to pathogens. The present study aimed to investigate the antibiotic susceptibility profile and the presence of selected resistance genes in cocci isolated from the faecal microbiota of 35 healthy, full-term neonates. A total of 148 gram-positive, catalase-negative cocci were isolated and tested for susceptibility to 12 different antibiotics by disk-diffusion technique. Multiplex PCR analysis was performed for the identification of *Enterococcus* spp. isolates and the simultaneous detection of vancomycin-resistance genes. PCR-based methodology was used also for identification of tetracycline and erythromycin resistance determinants. Identification results indicated *E. faecalis* as the predominant species (80 strains), followed by *E. faecium*, *E. casseliflavus* or *E. flavescentis* and *E. gallinarum*. High prevalence of resistance to tetracycline (39.9%), erythromycin (35.1%), vancomycin (19.6%) and to nucleic acid synthesis inhibitors was detected. PCR data revealed 23 out of 52 erythromycin-resistant isolates carrying the *ermB* gene and 29 out of 59 tetracycline-resistant strains carrying *tet* genes, with *tet(L)* determinant being the most frequently detected. Only intrinsic vancomycin resistance (*vanC1* and *vanC2/C3*) was reported among tested isolates. In conclusion, erythromycin and tetracycline acquired resistant traits are wide spread among faecal cocci isolates from Greek, healthy infants.

Keywords: faecal microbiota, antibiotic resistance, enterococci

1.15. *Bacillus halochares* sp. nov., ένα νέο αλόφιλο βακτήριο από τις αλυκές Μεσολογγίου

Παππά Α.¹, Sánchez-Porro C.², Λαζούρα Π.¹, Καλλιμάνης Α.¹, Περισυνάκης Α.¹, Ventosa A.², Δραΐνας Κ.¹ & Α.Ε. Κούκκου¹

¹Τομέας Οργανικής Χημείας και Βιοχημείας, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ελλάδα

²Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Pharmacy, University of Sevilla, 41012 Sevilla, Spain

Email: akukku@cc.uoi.gr

Οι αλόφιλοι οργανισμοί –οργανισμοί που αγαπούν το αλάτι και ευδοκιμούν σε υπεραλατούχα περιβάλλοντα- περιλαμβάνουν κυρίως προκαρυωτικούς και ευκαρυωτικούς μικροοργανισμούς με την ικανότητα εξισορρόπησης της οσμωτικής πίεσης του περιβάλλοντος και αντοχής στη μετουσιωτική επίδραση του άλατος. Πρόσφατα μάλιστα έχει αναφερθεί, ότι σε περιβάλλοντα με συγκέντρωση άλατος πολύ κοντά στο κορεσμό, ευδοκιμούν ακραίοι αλόφιλοι μικροοργανισμοί που δεν ανήκουν στα αλοαρχαία. Σε μια προσπάθεια καταγραφής της ποικιλότητας των αλόφιλων μικροοργανισμών επιλέχτηκαν για δειγματοληψία οι θαλλασογενείς αλυκές του Μεσολογγίου. Μεταξύ των κυρίαρχων μελών της ομάδας των αλοαρχαίων (*Haloterrigena*, *Haloferax* and *Halobacterium*), απομονώθηκε ένα αλόφιλο βακτήριο που ανήκει στο γένος *Bacillus*. Ο μικροοργανισμός αυτός είναι κινητικός, θετικός κατά gram αερόβιος, σχήματος ράβδου, αναπτύσσεται σε συγκεντρώσεις NaCl από 1.0 έως 4.0 M, με βέλτιστη ανάπτυξη σε 2.5 M NaCl και δεν σχηματίζει ενδοσπόρια. Επίσης το στέλεχος MSS4 έδειξε βέλτιστη ανάπτυξη σε θερμοκρασία 37 °C και pH 8.0. Η περιεκτικότητα του DNA σε G+C ήταν 47.2 mol %. Τα πολικά λιπίδια αποτελούνται από διφωσφατιδυλογλυκερόλη, φωσφατιδυλογλυκερόλη, φωσφατιδικό οξύ και φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη ενώ τα κύρια λιπαρά του οξέα αποτελούνται από anteiso-C_{15:0}, C_{18:0}, C_{16:0} και anteiso-C_{17:0} (αντιπροσωπεύοντας το 84.7 % των ολικών). Η κύρια ισοπρενική κινόνη του στελέχους MSS4 είναι η MK-7 ενώ η πεπτιδογλυκάνη του κυτταρικού τοιχώματος περιέχει meso-διαμιοπιμελινικό οξύ. Η ανάλυση της αλληλουχίας του 16S rRNA έδειξε ότι το νέο στέλεχος είχε ομοιότητα 96.1 % με τα *Bacillus qingdaonensis* CM1^T και *Bacillus aidingensis* 17-5^T, 95.5% με το *Bacillus salarius* BH169^T καθώς επίσης χαμηλότερη ομοιότητα με άλλα είδη του γένους *Bacillus*. Τα αποτελέσματα αυτά αιτιολογούν την ένταξη του στελέχους MSS4 ως νέο είδος του γένους *Bacillus* και προτείνεται το όνομα *Bacillus halochares* sp. nov. Η ονομασία με την οποία έχει κατατεθεί το στέλεχος είναι MSS4 (=LMG 24571^T=DSM 21373^T).

1.15. *Bacillus halochares* sp. nov., a new halophilic bacterium isolated from the solar salterns of Mesolongi, Greece

Pappa A.¹, Sánchez-Porro C.², Lazoura P.¹, Kallimanis A.¹, Perisynakis A.¹, Ventosa A.², Drainas C.¹ & **A.I. Koukkou¹**

¹Sector of Organic Chemistry and Biochemistry, Department of Chemistry,
University of Ioannina 45110 Ioannina, Greece

²Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Pharmacy, University of
Sevilla, 41012 Sevilla, Spain

Email: akukku@cc.uoi.gr

Halophiles - salt-loving organisms that inhabit hypersaline environments - include mainly prokaryotic and eukaryotic microorganisms with the capacity to balance the osmotic pressure of the environment and resist the denaturing effects of salts. Indications that extremely halophilic microorganisms other than the haloarchaea may thrive in environments with salt concentration close to saturation were provided recently. In an attempt to evaluate the diversity of halophilic microorganisms in Greek solar salterns, the Mesolongi thalassohaline saltworks were chosen. Among the dominant members of the haloarchaea group (*Haloterrigena*, *Haloferax* and *Halobacterium*), a halophilic bacterium, belonging to the genus *Bacillus* was isolated. The microorganism, a motile, Gram positive, aerobic rod, proliferated at salinities ranging 1.0 to 4.0 M NaCl, with an optimal growth at 2.5 M NaCl. Endospores were not observed. Strain MSS4^T showed an optimal growth at 37 °C and pH 8.0. The G+C content of its DNA was 47.2 mol %. The polar lipid pattern of strain MSS4^T consisted of diphosphatidylglycerol, phosphatidylglycerol, phosphatidic acid and phosphatidylethanolamine. It possessed anteiso-C_{15:0}, C_{18:0}, C_{16:0} and anteiso-C_{17:0} as the major fatty acids (altogether representing 84.7 % of total). The predominant isoprenoid quinone of strain MSS4^T was MK-7. The cell-wall peptidoglycan contained meso-diaminopimelic acid. The 16S rRNA sequence analysis showed that the new isolate has 96.1 % similarity with *Bacillus qingdaonensis* CM1^T and *Bacillus aidingensis* 17-5^T, 95.5% with *Bacillus salarius* BH169^T and lower similarity values with other *Bacillus* species. These results justify strain MSS4^T as a new species within the genus *Bacillus*, for which the name *Bacillus halochares* sp. nov. is proposed. The type strain is MSS4^T (=LMG 24571^T=DSM 21373^T).

1.16. ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑ ΣΤΗ ΛΙΜΝΗ ΟΡΕΣΤΙΑΔΑ

Σαρτσίδης Α.¹, Δροσοπούλου Ε.¹, Γρηγορίου Μ.², Μαρδίρης Θ.², Γιάγκου Μ.¹,
Μπούρτζης Κ.³, Τσιάμης Γ.³ Κυρπίδης Ν.⁴ & Ζ.Γ. Σκούρας¹

¹Τομέας Γενετικής Ανάπτυξης και Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας,
Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο, Θεσσαλονίκη

² Κέντρο Περιβαλλοντικής Εκπαίδευσης (ΚΠΕ) Καστοριάς

³Τμήμα Διαχείρισης Περιβάλλοντος και Φυσικών Πόρων, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων,
Αγρίνιο

⁴JGI, DOE, USA

Η λίμνη Ορεστιάδα βρίσκεται στη βορειοδυτική Ελλάδα, στο νομό Καστοριάς. Είναι μια πολυμικτική λίμνη με έκταση 28 km² και μέγιστο βάθος 9 m. Αποτελεί ένα υπερεύτροφο οικοσύστημα λόγω της παρουσίας υψηλών συγκεντρώσεων θρεπτικών συστατικών που καταλήγουν στη λίμνη από τις παρακείμενες γεωργικές εκτάσεις. Ο υπερεύτροφος χαρακτήρας, σε συνδυασμό με την παρουσία της πόλης της Καστοριάς στις όχθες της καθιστούν την λίμνη ένα ιδιαίτερα ενδιαφέρον οικοσύστημα για τον προσδιορισμό της μικροβιακής ποικιλότητας και τη συσχέτισή της με φυσικούς και ανθρωπογενείς περιβαλλοντικούς παράγοντες.

Στο πλαίσιο της Πρωτοβουλίας ΜΙΚΡΟΒΙΟΚΟΣΜΟΣ έχει ξεκινήσει μια προσπάθεια για τον προσδιορισμό της μικροβιακής ποικιλότητας στη λίμνη της Καστοριάς. Κατά τη διάρκεια του 2009 πραγματοποιήθηκαν εποχιακές δειγματοληψίες επιφανειακού νερού και ιζήματος από τεσσερα σημεία της λίμνης. Μετρήθηκαν επί τόπου διάφορες φυσικοχημικές παράμετροι (θερμοκρασία, pH, συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου κ.α.) και προσδιορίστηκαν φασματοφωτομετρικά οι συγκεντρώσεις φωσφορικών και αζωτούχων ενώσεων και χλωροφύλλης α (Chla). Με τη χρήση παγκόσμιων εκκινητών για τα Bacteria (27F, 1391R) και για τα Archaea (4F, 1492R), ενισχύθηκαν τμήματα των γονιδίων 16S rRNA και κατασκευάστηκαν βιβλιοθήκες 16S για δείγματα ιζήματος. Μετά από ανάλυση της αλληλουχίας σε 34 κλώνους βακτηρίων και σε 36 κλώνους Archaea και επεξεργασία των αποτελεσμάτων με εργαλεία πληροφορικής, στο δείγμα ιζήματος που αναλύθηκε, ανιχνεύτηκαν: α) 10 διαφορετικά φύλα βακτηρίων (Verrucomicrobia, Actinobacteria, Flavobacteria, Acidobacteria, Fusobacteria, Planctomycetes, Firmicutes, Cyanobacteria, Gemmatimonadetes και όλα τα υπο-φύλα (α- έως ε-) των Proteobacteria, με τα τελευταία να εμφανίζονται σε μεγαλύτερη συχνότητα), και β) στελέχη Archaea που ανήκουν στα φύλα Euryarchaeota και Crenarchaeota, με εντονότερη παρουσία (90%) των τάξεων Methanomicrobiales και Methanosaarcinales. Η μελέτη βρίσκεται σε εξέλιξη με ανάλυση περισσοτέρων κλώνων και εφαρμογή τεχνικών ARISA και DGGE για περαιτέρω σύγκριση της μικροβιακής ποικιλότητας.

1.16. MICROBIAL DIVERSITY IN ORESTIADA LAKE

Sartsidis A.¹, Drosopoulou E.¹, Grigoriou M.², Mardiris T.², Yiangu M.¹, Bourtzis K.³, Tsiamis G.³, Kyrpides N.⁴ & Z.G. Scouras¹

¹Department of Genetics, Development and Molecular Biology, School of Biology, Aristotle University, Thessaloniki

² Environmental Education Center (EEC) of Kastoria

³ Department of Environmental and Natural Resources Management, University of Ioannina, Agrinio

⁴JGI, DOE, USA

Orestiada Lake is located in the north-west Greece, in the prefecture of Kastoria. It is a polymictic lake with 28 km² surface area and 9 m maximum depth. The excessive use of fertilizers in the surrounding area and the presence of Kastoria city on the coast have an important effect on the lake ecosystem which is characterized as eutrophic. In this context, the study of the microbial community of the lake, as well as the correlation of the observed diversity with physical or anthropogenic parameters presents particular interest.

Within the Hellenic Initiative MikroBioKosmos, a study of the microbial diversity of Orestiada Lake has initiated. During 2009, seasonal samplings of both surface water and sediment have been performed at selected stations. Physicochemical parameters (temperature, pH, dissolved oxygen concentration etc.) have been measured *in situ* and the concentrations of anorganic nutrients and chlorophyll a have been determined spectrophotometrically. Universal primers for Bacteria (27F, 1391R) and Archaea (4F, 1492R) have been used to amplify part of the 16S rRNA gene, and 16S clone libraries have been constructed from sediment samples. So far, 34 bacterial and 36 archaeal clones have been sequenced and bioinformatically analyzed. The above analysis revealed the presence of several bacterial strains belonging to 10 phyla: Verrucomicrobia, Actinobacteria, Flavobacteria, Acidobacteria, Fusobacteria, Planctomycetes, Firmicutes, Cyanobacteria, Gemmatimonadetes and the five sub-phyla of Proteobacteria which were the most abundant. Furthermore, Archaea belonging to two phyla (Euryarchaeota and Crenarchaeota), have been detected with strains of Methanomicrobiales and Methanosaecinales being by far the most frequent (90%). The study is continued by the analysis of a larger number of clones and the application of additional molecular approaches (e.g. ARISA, DGGE).

1.17. Υπολογιστική μελέτη της μεταβολικής ποικιλομορφίας του *E. coli*

Τζαμαλή Ε.^{1,2}, Ποϊράζη Π.³, Τόλλης Ι.^{1,2} & M. Reczko⁴

¹Τμήμα επιστήμης υπολογιστών, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ελλάδα, ²Ινστιτούτο Πληροφορικής, Τιρυμα Τεχνολογίας και Έρευνας, Ελλάδα, ³Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας, Τιρυμα Τεχνολογίας και Έρευνας, Ελλάδα και ⁴Ερευνητικό κέντρο βιοϊατρικών επιστημών "Αλέξανδρος Φλέμινγκ", Βάρκιζα, Ελλάδα

Email: tzamali@csd.uoc.gr

Οικολογικοί και εξελικτικοί λόγοι οδηγούν τα βιολογικά συστήματα στην γένεση και διατήρηση της πολυμορφίας και τα βακτήρια δεν αποτελούν εξαίρεση ακόμα και όταν αναπτύσσονται σε πολύ απλά, ομογενή περιβάλλοντα μίας πηγής ενέργειας και περιορισμένης ποσότητας. Οι υποκείμενοι, ακριβείς μηχανισμοί αποτελούν ένα δύσκολο πρόβλημα με μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον. Πιθανώς η πολυμορφία διατηρείται σε έναν τέτοιο πληθυσμό λόγω των μεταβολικών αλληλεπιδράσεων που λαμβάνουν χώρα και επιτρέπουν την ανταλλαγή σημαντικών θρεπτικών συστατικών, παράγωγων του μεταβολισμού.

Αυτή η μελέτη διερευνά υπολογιστικά τη μεταβολική ποικιλομορφία του *E. coli* που προκύπτει από μονές διαγραφές γονιδίων-εμπλεκόμενων στον μεταβολισμό, προσδιορίζει τις πιθανές κυτταρικές κοινωνίες που αποτελούνται από κύτταρα με διαφορετικές μεταβολικές δυνατότητες και εξετάζει τις μεταβολικές αλληλεπιδράσεις στις κοινωνίες αυτές με στόχο να κατανοηθεί πως ένα σύστημα ποικιλόμορφων ανταγωνιστών δυναμικά αξιοποιεί το εκάστοτε περιβάλλον. Συγκεκριμένα, μία γραφική αναπαράσταση προτείνεται όπου οι κόμβοι αντιστοιχούν στα γενετικά τροποποιημένα κύτταρα και ακμές προσάπτονται στα κύτταρα με διαφορετικό φαινότυπο, προκειμένου να αποδώσει την μεταβολική ποικιλομορφία και να επιτρέψει την αποδοτική εύρεση όλων των κοινωνιών, κάθε πιθανού μεγέθους μελών που μπορεί να εμφανιστούν στο σύστημα. Ο γράφος και οι ιδιότητες του αποτυπώνουν όλη την ενδεχόμενη μεταβολική ποικιλομορφία αλλά και την ευρωστία του συστήματος *E. coli* όταν μονές διαγραφές γονιδίων επιτρέπονται. Ανάλυση σε 10 διαφορετικές πηγές άνθρακα ανέδειξε ένα υποσύνολο γενετικά τροποποιημένων κυττάρων που συστηματικά παρουσίαζαν διαφορετικό μεταβολικό φαινότυπο από όλα τα άλλα κύτταρα και που κυρίως ευθύνεται για τη μεταβολική ποικιλομορφία που μπορεί να εμφανίσει το σύστημα. Οι μεταβολικές δυνατότητες του κάθε γενετικά τροποποιημένου κυττάρου προσδιορίζονται χρησιμοποιώντας το δυναμικό μεταβολικό μοντέλο (dynamic Flux Balance Analysis) που περιγράφει την ανάπτυξη μονόκλωνων πληθυσμών. Η μέθοδος επεκτείνεται σε αυτή την εργασία προκειμένου να συμπεριλάβει την ανάπτυξη διαφορετικών κυττάρων στο ίδιο μέσο ανάπτυξης και επομένως να μελετήσει τη δυναμική συμπεριφορά ανάπτυξης των κοινωνιών. Κοινωνίες, που λόγω ανταλλαγής ενδιάμεσων αλλά πολύτιμων θρεπτικών συστατικών του μεταβολισμού, αποδίδουν ως σύστημα καλύτερα από τους αντίστοιχους μονόκλωνους πληθυσμούς κυττάρων προσδιορίστηκαν.

1.17. Computational study of the metabolic diversity of the bacterium *E. coli*

Tzamali E.^{1,2}, Poirazi P.³, Tollis I.G.^{1,2} & M. Reczko⁴

¹Computer Science Department, University of Crete, Greece, ²Institute of Computer Science of the Foundation for Research and Technology-Hellas (FORTH), ³Institute of Molecular Biology and Biotechnology (FORTH) and ⁴Biomedical Sciences Research Center "Alexander Fleming", Varkiza, Greece

Email: tzamali@csd.uoc.gr

Ecological and evolutionary forces drive systems to stable polymorphism and bacterial systems do not comprise an exception even when they grow in a simple, homogeneous environment of a single-limited resource. The underlying mechanisms still comprise an open issue with a long debate. Bacterial diversity may maintain in a population due to the metabolic interactions that take place among mutants which allow the exchange of essential for (efficient) living products of metabolism.

This study computationally explores the metabolic diversity of *E. coli* that derives from single-gene deletions, identifies the potentially emerged bacterial communities that consist of different strains and investigates the metabolic interactions within the bacterial communities in an attempt to understand how a multi-competitor system utilizes the metabolic opportunities of the environment as they appear. A graph representation is proposed in order to reflect the metabolic diversity and allow the efficient identification of all, any size potential bacterial communities. The nodes of the graph represent the genetically different mutants and edges are assigned only between metabolically different mutants. All the information about the potential metabolic diversity and redundancy of a bacterial cell population system that is genetically perturbed can be captured in the graph and its properties. Analysis on 10 different carbon sources revealed a set of environmental-invariant mutants that consistently show different metabolic phenotypes than the rest mutants and are mainly responsible for the capabilities of a cell population to generate metabolic diversity. The functional properties of the bacterial communities are explored as well. The dynamic Flux Balance Analysis model was extended to incorporate metabolic interactions between many competitors growing in a mutual environment. It is shown that competitive mutants by interacting with each other can balance in an efficient outcome-better than the outcome of single competitors when the completion of resources takes place.

1.18. Απομόνωση και Χαρακτηρισμός Βακτηρίων που Παράγουν Πρωτεάσες και Αμυλάσες από τον Πεπτικό Σωλήνα του Λαβρακίου (*Dicentrarchus labrax* L.)

Τόσκα Ε., Μπιρμπίλης Χ., Γεωργίου Σ., Μόσιαλος Δ., Μαμούρης Ζ. & Κ.Α. Μούτου

Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Πλούτωνος 26,
41221 Λάρισα, Ελλάδα

Email: kmoutou@bio.uth.gr & mosial@bio.uth.gr

Είναι γνωστό ότι η εντερική μικροχλωρίδα συμβάλλει σημαντικά στο φραγμό του βλενογόνου, στη ρύθμιση του εντερικού pH, στην παραγωγή βιταμινών και λιπαρών οξέων, στο μεταβολισμό των χολικών οξέων και στην παραγωγή υδρολυτικών ενζύμων που δρουν συμπληρωματικά με τα πεπτικά ενζύμα του οργανισμού. Οι στόχοι της παρούσας μελέτης ήταν α) η απομόνωση των βακτηριακών στελεχών που παράγουν πρωτεάσες και αμυλάσες από το έντερο του λαβρακιού, β) ο προσδιορισμός της πρωτεολυτικής και αμυλολυτικής δραστηριότητας τους με εξειδικευμένα υποστρώματα και διατροφικά συστατικά και γ) ο χαρακτηρισμός τους βάση της ανάλυσης του γονιδίου 16S rRNA.

Τα βακτήρια απομονώθηκαν από τη στιβάδα του βλενογόνου του πρόσθιου εντέρου λαβρακιών, προερχόμενα από μια μονάδα ιχθυοκαλλιέργειας. Διαδοχικές αραιώσεις του εντερικού περιεχομένου επιστρώθηκαν σε τρυβλία Petri, που περιείχαν Tryptone Soy Agar, και επωάστηκαν στους 15°C. Τα βακτηριακά στελέχη που απομονώθηκαν καλλιεργήθηκαν σε ελάχιστο θρεπτικό μέσο, το οποίο περιέχει 0,2% αποβουτυρωμένο γάλα. Απομονώθηκαν επτά στελέχη με σημαντικά διαφορετική πρωτεολυτική δραστικότητα με υπόστρωμα την αιμοσφαιρίνη, σε εύρος από 1,025 σε 4,539 U/mg πρωτεΐνης. Η ικανότητα των βακτηριακών πρωτεασών να διασπούν διατροφικές πρωτεΐνες προσδιορίστηκε *in vitro* με τη μέθοδο pH-stat (Alarcon et al., *J. Sci. Food Agr.* 82: 697-704, 2002). Προκειμένου να προσομοιαστούν οι διακυμάνσεις που παρατηρούνται στον πεπτικό σωλήνα *in vivo* χρησιμοποιήθηκε μια τροφή που περιείχε ιχθυάλευρο ως αποκλειστική πηγή πρωτεΐνών σε εύρος 0,5-50,0 mg πρωτεΐνης/U πρωτεάσης. Τα βακτηριακά στελέχη σημείωσαν σημαντικά διαφορετικούς ρυθμούς υδρόλυσης διατροφικών πρωτεϊνών και σε μερικές περιπτώσεις ήταν συγκρίσιμοι με εκείνους που εμφάνισαν πεπτικά ενζυμικά εικχυλίσματα, που απομονώθηκαν από το λαβράκι.

Τα στελέχη που απομονώθηκαν επέδειξαν και διαφορική αμυλολυτική δραστηριότητα σε σακχαριτικά υποστρώματα με διαφορετικούς τύπους γλυκοζιτικών δεσμών (άμυλο, ραφινόζη, λακτόζη, μαννόζη, σακχαρόζη, γλυκογόνο) καθώς και πρώτες ύλες και ιχθυοτροφές πλούσιες σε υδατάνθρακες.

Η ανάλυση της αλληλουχίας του γονιδίου 16S rRNA έδειξε ότι οι παραγωγοί των πρωτεασών ανήκουν στα Gram-θετικά (*Bacillus*) και στα Gram-αρνητικά (*Photobacterium*) βακτήρια.

1.18. Isolation and Characterization of Bacteria with Proteolytic and Amylolytic Activity from the Digestive Tract of European Sea Bass (*Dicentrarchus labrax* L.)

Toska E., Birbilis C., Georgiou S., Mossialos D., Mamuris Z. & K.A. Moutou

Department of Biochemistry & Biotechnology, University of Thessaly, 26 Ploutonos street, 41221 Larissa, Greece

E-mail: kmoutou@bio.uth.gr & mosial@bio.uth.gr

Intestinal microflora is known to contribute significantly in the development of mucosal barrier, the regulation of intestinal pH, the production of vitamins and short-chain fatty acids, the metabolism of the bile acids and the production of extracellular hydrolytic enzymes that act complementary to organism's digestive enzymes enhancing nutrient utilization. The aims of the present study were a) the isolation of bacterial strains from the intestine of European sea bass, b) the determination of their proteolytic and amylolytic capacity against specific substrates and fish dietary ingredients, and c) their characterization based on 16S rRNA gene analysis.

Bacteria were isolated from the mucosal layer of the anterior intestine of sea bass obtained from a commercial farm. Serial dilutions of intestinal content were spread on Petri dishes containing Tryptone Soy Agar and incubated at 15 °C. Isolated bacterial strains were grown on minimal culture medium containing 0.2% skim milk and culture supernatant was assayed for enzyme activity.

Seven strains were isolated that exhibited significantly different proteolytic activity against haemoglobin, varying from 1.025 to 4.539 U/mg protein. The capacity of bacterial protease to act on dietary proteins was assessed *in vitro* according to Alarcon et al. (*J. Sci. Food Agr.* 82: 697-704, 2002). An experimental diet containing only fish meal as protein source was used and serial feed /enzyme quantity ratios, ranging from 0.5 to 50.0 mg protein/U protease activity, were tested in order to simulate variations occurring in the digestive tract *in vivo*. Bacterial strains exhibited significantly different dietary protein hydrolysis rates and in some cases they were comparable to those exhibited by digestive enzyme extracts isolated from sea bass.

In addition, the strains isolated exhibited differential amylolytic activity against saccharides with different types of glycosidic bonds (starch, raffinose, lactose, maltose, sucrose, glycogen) as well as raw materials and fish feeds rich in carbohydrates.

Sequence analysis of bacterial 16S rRNA gene revealed that protease producers belong to both Gram-positive (*Bacillus*) and Gram-negative (*Photobacterium*) bacteria.

1.19. Προκαταρκτική μελέτη της ποικιλότητας των μακρομυκήτων στο Λύκαιον Όρος

Τριανταφύλλου Μ., Δεληβοριάς Π., Γκόνου-Ζάγκου Ζ. & Καψανάκη-Γκότση Ε.

Τομέας Οικολογίας και Ταξινομικής, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών,
Πανεπιστημιούπολη, 157 84 Αθήνα

Email: marintriant@gmail.com

Το Λύκαιον Όρος βρίσκεται στα σύνορα των νομών Αρκαδίας και Μεσσηνίας με υψόμετρο 1421 μ. Στην παρούσα εργασία παρουσιάζονται τα προκαταρκτικά αποτελέσματα της μελέτης της ποικιλότητας των μακρομυκήτων σε περιοχές του Λυκαίου όρους. Κατά τη διάρκεια τεσσάρων διαδοχικών ετών, από τον Οκτώβριο του 2006 έως και τον Νοέμβριο του 2009, συλλέχτηκαν 500 περίπου δείγματα από τέσσερεις θέσεις συλλογής στις ανατολικές παρυφές του Λυκαίου όρους. Οι τρεις από τις θέσεις αυτές βρίσκονται σε υψόμετρο περίπου 400 μ., όπου στη βλάστηση κυριαρχούν φυλλοβόλα είδη *Quercus*, ενώ η τέταρτη θέση βρίσκεται σε υψόμετρο 700 μ., όπου απαντάται συστάδα *Castanea sativa* που περιβάλλεται από το δρυοδάσος. Προς το παρόν έχει μελετηθεί ένα μέρος των δειγμάτων, τα οποία κατανέμονται σε 40 γένη, κυρίως *Amanita*, *Armillaria*, *Cantharellus*, *Lactarius*, *Lepiota*, *Lycoperdon*, *Macrolepiota*, *Mycena*, *Phellinus*, *Scleroderma*, *Tremella* των Βασιδιομυκήτων και *Helvella*, *Humaria*, *Otidea* των Ασκομυκήτων.

1.19. Preliminary study of the diversity of macromycetes from Mt. Lykaion

Triantafyllou M., Delivorias P., Gonou-Zagou Z. & Kapsanaki-Gotsi E.

Department of Ecology and Systematics, Faculty of Biology, University of Athens,
Panepistimioupoli 157 84 Athens

Email: marintriant@gmail.com

Mt. Lykaion is located in the borders of Arkadia and Messinia and its altitude is 1421 m. In this work, preliminary results of the diversity of macromycetes from selected sites in the area of Mt. Lykaion are presented. During four successive years, from October 2006 to November 2009, about 500 samples were collected from four collection sites in the eastern slopes of Mt. Lykaion. Three of the collection sites, at an altitude of about 400 m, are found in a *Quercus* forest, whereas the fourth site, at an altitude of 700 m, is located in a small stand of *Castanea sativa* surrounded by the oak forest.

The specimens which have already been studied, belong to 40 genera, mainly *Amanita*, *Armillaria*, *Cantharellus*, *Lactarius*, *Lepiota*, *Lycoperdon*, *Macrolepiota*, *Mycena*, *Phellinus*, *Scleroderma*, *Tremella* from the Basidiomycetes and *Helvella*, *Humaria*, *Otidea* from the Ascomycetes.

1.20. Βιβλιοθήκες 16S rRNA και pyrosequencing αναδεικνύουν νέες υποψήφιες βακτηριακές κατηγορίες από το ίζημα της λιμνοθάλασσας του Αιτωλικού.

Τσιάμης Γ.¹, Χαμαλάκη Α.¹, Γιάνη Α.¹, Ζαχαρίας Ι.¹, Κεχαγιάς Γ.¹, Κυρπίδης Ν.²,
Hugenholtz P.², Andersen G.³ & K. Μπούρτζης¹

¹Τμήμα Διαχείρισης Περιβάλλοντος και Φυσικών Πόρων, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων,
Σεφέρη 2, Αγρίνιο, Τ.Κ. 30100, Ελλάδα

²Department of Energy, Joint Genome Institute, Genome Biology Program, 2800
Mitchell Drive, Walnut Creek, CA, USA

³Lawrence Berkeley National Laboratory, Center for Environmental Biotechnology, 1
Cyclotron Road, Mail Stop 70A-3317, Berkeley, CA 94720, USA

Email: gtsiamis@cc.uoi.gr

Μερομικτικές λίμνες/λιμνοθάλασσες είναι μικρά και καλά δαμορφωμένα οικοσυστήματα. Η ολιστική μελέτη τέτοιων οικοσυστημάτων πρέπει να περιλαμβάνει, μεταξύ άλλων, αφενός τη μελέτη της δομής των αναεροβικών μικροβιακών κοινοτήτων και αφετέρου τη χαρτογράφηση της μικροβιακής ποικιλότητας. Τέτοιες ολιστικές προσεγγίσεις συνεισφέρουν στην καλύτερη κατανόηση του κύκλου του άνθρακα, του κύκλου του θείου καθώς και της παραγωγής μεθανίου. Ένα τέτοιο μερομικτικό οικοσύστημα είναι η λιμνοθάλασσα του Αιτωλικού στη Δυτική Ελλάδα που παρουσιάζει αλοκλινές και, ταυτόχρονα, μεθάνιο και υψηλές συγκεντρώσεις H₂S (1240μM). Η παρούσα μελέτη εστιάστηκε στη μελέτη των προκαρυωτικών κοινοτήτων που βρίσκονται στο ίζημα της λιμνοθάλασσας του Αιτωλικού.

Δείγμα από το ίζημα του Αιτωλικού συλλέχτηκε το Φεβρουάριο 2008 και η δομή των μικροβιακών κοινοτήτων εξετάστηκε με: (α) 16S rRNA γονιδιακές βιβλιοθήκες για βακτήρια και αρχαία και (β) 16S rRNA pyrotagging.

Η ανάλυση 365 και 280 κλώνων, από τη βιβλιοθήκη των βακτηρίων και των αρχαίων αντίστοιχα, αποκάλυψε την παρουσία νέων μοναδικών αλληλουχιών στη λιμνοθάλασσα του Αιτωλικού. Πιο συγκεκριμένα, το 8.3% των βακτηριακών κλώνων παρουσιάζουν ομολογία μικρότερη του 88% με οποιαδήποτε άλλη γνωστή αλληλουχία στη βάση δεδομένων. Για τα αρχαία, αυτό το ποσοστό αυξάνεται στο 10%. Φυλογενετική ανάλυση των αλληλουχιών αποκάλυψε την ύπαρξη δύο νέων βακτηριακών κατηγοριών (candidate division) καθώς και μιας νέας κατηγορίας αρχαίων. Η χρησιμοποίηση αλληλουχιών από 16S pyrotagging επιβεβαίωσαν τα παραπάνω αποτελέσματα και ανέδειξαν την πιθανή παρουσία ακόμη μιας νέας βακτηριακής κατηγορίας.

Η παρούσα μελέτη συγκέντρωσε δεδομένα τα οποία συνηγορούν ότι στη λιμνοθάλασσα του Αιτωλικού απαντά μια ιδιαίτερη προκαρυωτική ποικιλότητα η οποία και μελετάται περαιτέρω με αναεροβικές καλλιέργειες και με νέες τεχνολογίες αιχμής, όπως η γονιδιωματική ενός κυττάρου (single cell genomics).

1.20. Novel bacterial lineages as detected by 16S rRNA libraries and 16S rRNA pyrosequencing from the sediment of Etoliko lagoon in Western Greece.

Tsiamis G.¹, Chamalaki A.¹, Gianni A.¹, Zacharias I.¹, Kehayias G.¹, Kyrpides N.², Hugenholtz P.², Andersen G.³ & K. Bourtzis¹

¹Department of Environmental and Natural Resources Management, University of Ioannina, 2 Seferi St., Agrinio, T.K. 30100, Greece

²Department of Energy, Joint Genome Institute, Genome Biology Program, 2800 Mitchell Drive, Walnut Creek, CA, USA

³Lawrence Berkeley National Laboratory, Center for Environmental Biotechnology, 1 Cyclotron Road, Mail Stop 70A-3317, Berkeley, CA 94720, USA

Email: gtsiamis@cc.uoi.gr

Permanent anoxic basins are of great interest to microbial ecologists. Meromictic lakes are small and well-defined ecosystems and they can be useful for studying anaerobic microbial community structure and diversity and providing information on global carbon cycling and biogeochemical processes, such as the sulphur cycle and the production of methane. One such meromictic ecosystem is the Etoliko lagoon, located in Western Greece, which also has a halocline. The current study aims at the understanding of the prokaryotic community at the sediment of the Etoliko lagoon, one with methane and probably the highest concentration of H₂S (1240μM) in Greece.

Sediment of the Etoliko lagoon was collected during February 2008. The structure of microbial communities was examined using: (a) 16S rRNA gene libraries (bacterial and archaeal) and (b) 16S rRNA pyrotagging.

Analysis of 365 and 280 clones, from a bacterial and an archaeal 16S rRNA gene library respectively, revealed the presence of unique sequences present in the Etoliko lagoon. More specifically, 8.3% of the bacterial clones sequenced share less than 88% homology with any known 16S rRNA gene sequences in the databases. For archaea, the percentage rises to 10%. Phylogenetic analysis revealed the presence of two new bacterial candidate divisions and one new archaeal candidate division. 16S rRNA pyrotagging confirmed the above results and indicated the presence of another new bacterial candidate division.

The present study described an exciting and unique prokaryotic diversity at the Etoliko lagoon that is currently further being investigated with anaerobic cultures and single cell genomic approaches.

1.21. Χαρακτηρισμός των βακτηριακών κοινοτήτων της λιμνοθάλασσας του Αιτωλικού.

Χαμαλάκη Α.¹, Τσιάμης Γ.¹, Διακοπαναγιώτης Ζ.¹, Γιάνη Α.¹, Ζαχαρίας Ι.¹, Κεχαγιάς Γ.¹, Κυρπίδης Ν.², Hugenholz P.², Andersen G.³ & K. Μπούρτζης¹

¹Τμήμα Διαχείρισης Περιβάλλοντος και Φυσικών Πόρων, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων,
Σεφέρη 2, Αγρίνιο, Τ.Κ. 30100, Ελλάδα

²Department of Energy, Joint Genome Institute, Genome Biology Program, 2800
Mitchell Drive, Walnut Creek, CA, USA

³Lawrence Berkeley National Laboratory, Center for Environmental Biotechnology, 1
Cyclotron Road, Mail Stop 70A-3317, Berkeley, CA 94720, USA

Email: ahamalak@cc.uoi.gr

Στις λιμνοθάλασσες και τα θαλάσσια οικοσυστήματα, η υψηλή αλατότητα και η διαβάθμιση της θερμοκρασίας συχνά οδηγούν στη διαστρωμάτωση της υδάτινης στήλης. Σε τέτοια οικοσυστήματα, το χημειοκλινές χαρακτηρίζεται από έντονη ανακύκλωση ενώσεων του θείου. Τα οικοσυστήματα με έντονη διαστρωμάτωση παρουσιάζουν μια ποικιλία οικολογικών θώκων, οι οποίοι είναι συνήθως μικρού μεγέθους, με ιδιαίτερα υψηλή μικροβιακή ποικιλότητα.

Ένα τέτοιο οικοσύστημα με έντονη διαστρωμάτωση αποτελεί και η λιμνοθάλασσα του Αιτωλικού, στη Δυτική Ελλάδα. Η παρούσα μελέτη έχει ως σκοπό τον χαρακτηρισμό της βακτηριακής ποικιλότητας, με απότερο στόχο την κατανόηση του ρόλου της στη διαστρωμάτωση της υδάτινης στήλης της λιμνοθάλασσας του Αιτωλικού.

Δείγματα νερού από τα 0, 15 και 25μ, τα οποία αποτελούν την επιφάνεια, το αλοκλινές και τον πυθμένα αντίστοιχα, συλλέχτηκαν μαζί με ίζημα από τη λιμνοθάλασσα του Αιτωλικού κατά τη διάρκεια ενός έτους (Ιούλιος 2007 - Απρίλιος 2008). Η βακτηριακή ποικιλότητα των παραπάνω δειγμάτων εξετάστηκε με τη μέθοδο της ARISA καθώς και με βιβλιοθήκες του γονιδίου 16S rRNA.

Η ανάλυση της ARISA έδειξε ότι τα δείγματα των ιζημάτων παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη βακτηριακή ποικιλότητα σύμφωνα με τις αντίστοιχες τιμές των δεικτών ποικιλότητας Simpson και Shannon. Η φυλογενετική ανάλυση των 16S rRNA βιβλιοθηκών αποκάλυψε ότι υπάρχει μια εμφανής διαστρωμάτωση στην κατακόρυφη υδάτινη στήλη της λιμνοθάλασσας του Αιτωλικού, με λίγα κοινά OTUs (operational taxonomic units) μεταξύ των δειγματοληπτικών σημείων της επιφάνειας, του αλοκλινούς, του πυθμένα και του ιζήματος. Στα δείγματα του πυθμένα και του αλοκλινούς αναγνωρίστηκαν νέες ταξινομικές ομάδες.

1.21. Characterization of the bacterial diversity in the Etoliko lagoon.

Chamalaki A.¹, Tsiamis G.¹, Diakopanagiotis Z.¹, Gianni A.¹, Zacharias I.¹, Kehayias G.¹, Kyrpides N.², Hugenholtz P.², Andersen G.³ & K. Bourtzis¹

¹Department of Environmental and Natural Resources Management, University of Ioannina, 2 Seferi St., Agrinio, T.K. 30100, Greece

²Department of Energy, Joint Genome Institute, Genome Biology Program, 2800 Mitchell Drive, Walnut Creek, CA, USA

³Lawrence Berkeley National Laboratory, Center for Environmental Biotechnology, 1 Cyclotron Road, Mail Stop 70A-3317, Berkeley, CA 94720, USA

Email: ahamalak@cc.uoi.gr

In lagoons and certain marine environments, high percentage of salinity and temperature gradients can prevent mixing leading to stratification of the water column. In such stratified ecosystems, the chemocline is characterized by an intense cycling of sulfur compounds. As a result, these stratified ecosystems offer a variety of ecological niches, usually on a small spatial scale. As a consequence, these ecosystems can harbor a highly diverse microbial community. One such stratified ecosystem is the Etoliko lagoon, located in Western Greece. The current work aims at: (a) the characterization of the bacterial diversity and (b) the understanding of the role of the bacterial communities in the stratified water column of the Etoliko lagoon.

Water samples at 5, 15 and 25m intervals, that correspond to surface, halocline and benthic water were collected together with sediment from the Etoliko lagoon within one year period (July 2007 - April 2008). The bacterial diversity of the above samples was examined using ARISA and 16S rRNA gene libraries.

ARISA analysis indicated that the sediment samples are those with the highest bacterial diversity according to the Simpson and Shannon's diversity indices. 16S rRNA library phylogenetic analysis revealed that there is a clear stratification in the water column of the Etoliko lagoon with limited overlapping of operational taxonomic units (OTU) between the bacterial communities of the surface, halocline, benthic water and sediment. Interestingly, new taxonomic lineages were identified in benthic water and halocline.

1.22. Απομόνωση και χαρακτηρισμός βακτηρίων που έχουν την δυνατότητα να αποδομούν τα εντομοκτόνων - νηματωδοκτόνα oxamyl και fenamiphos

Χανίκα Ε.¹, Τζωρτζακάκης Μ.² & Δ.Γ.Καρπούζας¹

¹Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πλούτωνος 26
και Αιόλου, Λάρισα 41221

²Εθνικό Ιδρυμα Αγροτικής Έρευνας, Ινστιτούτο Προστασίας Φυτών, Ηράκλειο
71110, Κρήτη

Email: dkarpouzas@bio.uth.gr

Η μικροβιακή διάσπαση αποτελεί την κύρια διεργασία αποδόμησης- αποτοξικοποίησης οργανοφωσφορικών και καρβαμιδικών εντομοκτόνων-νηματωδοκτόνων εδάφους. Πρόσφατες μελέτες οδήγησαν στην απομόνωση δύο βακτηριακών στελεχών που είχαν την δυνατότητα να διασπούν το οργανοφωσφορικό νηματωδοκτόνο fenamiphos (Megaraj et al., 2003; Caceres et al., 2009) ενώ δεν υπάρχουν αντίστοιχες αναφορές για το καρβαμιδικό oxamyl. Στην παρούσα εργασία περιγράφεται η απομόνωση, ταυτοποίηση και χαρακτηρισμός αποδομητικών βακτηρίων για τα εντομοκτόνα-νηματωδοκτόνα oxamyl και fenamiphos. Τα βακτήρια απομονώθηκαν από έδαφος από αγρό μπανανοκαλλιέργειας στην Κρήτη όπου η επαναλαμβανόμενη εφαρμογή των oxamyl - fenamiphos είχε οδηγήσει στην ταχύτατη μικροβιακή τους διάσπαση με παράλληλη μείωση της νηματωδοκτόνου δράσης. Η τεχνική του εμπλουτισμού καλλιεργειών σε εκλεκτικό υπόστρωμα Mineral Salts Medium Nitrogen (MSMN) όπου τα oxamyl και fenamiphos (10 mg L^{-1}) αποτελούσαν τη μοναδική πηγή C ή σε υπόστρωμα εκχυλίσματος εδάφους (SEM) χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση των βακτηρίων. Η διαδικασία εμπλουτισμού οδήγησε στην απομόνωση τεσσάρων αμιγών καλλιεργειών που είχαν την δυνατότητα να αποδομούν πλήρως το oxamyl εντός 48 ωρών. Αντίστοιχα, απομονώθηκαν δύο αμιγής καλλιέργειες που αποδομούσαν το fenamiphos. Άλληλούχιση του 16S rRNA γονιδίου των αποδομητικών βακτηριών του oxamyl έδειξαν υψηλή ομολογία (>99%) με βακτηριακά στελέχη των ειδών *Pseudomonas* sp., *Pseudomonas putida* και *Pseudomonas jinjuensis* αντίστοιχα. Από την άλλη μεριά, τα βακτήρια που αποδομούσαν το fenamiphos παρουσίασαν υψηλή ομολογία με το 16S rRNA γονίδιο βακτηριακών στελεχών των ειδών *Acinetobacter rhizosphaerae* και *Pseudomonas putida*. Περαιτέρω μελέτες έδειξαν ότι τα *A. rhizosphaerae* και *P. putida* υδρολύουν το fenamiphos προς fenamiphos-phenol οδηγώντας σε πλήρη αποτοξικοποίηση εντός 48 ωρών. Ανάλυση της βακτηριακής κοινότητας στο έδαφος από το οποίο απομονώθηκαν τα βακτήρια καθώς και στις καλλιέργειες εμπλουτισμού με την μέθοδο DGGE σε συνδυασμό με βιβλιοθήκες κλώνων έδειξαν ότι τα βακτήρια που απομονώθηκαν αποτελούσαν μέλη της βακτηριακής κοινότητας του εδάφους και ενισχύθηκαν κατά την διάρκεια των διαφόρων σταδίων εμπλουτισμού. Πειράματα σε εξέλιξη θα μελετήσουν την ικανότητα των απομονωθέντων βακτηρίων να διασπούν άλλα οργανοφωσφορικά ή καρβαμιδικά καθώς και το σύστημα γονιδίων/ενζύμων που ελέγχουν την διάσπαση των ανωτέρων γεωργικών φαρμάκων.

- 1.Megharaj et al 2003. Hydrolysis of fenamiphos and its oxidation products by a soil bacterium in pure culture, soil and water. Appl. Microbiol. Biotechnol 61: 252-256
- 2.Caceres et al. 2009. Hydrolysis of fenamiphos and its toxic oxidation products by Microbacterium sp. in pure culture and groundwater. Biores. Technol. 100: 2732-2736

1.22. Isolation and characterization of bacteria, capable of the degradation of the two insecticides-nematicides oxamyl and fenamiphos

Chanika E.¹, Tzortzakakis, E.² & D.G. Karpouzas¹

¹University of Thessaly, Department of Biochemistry & Biotechnology, Ploutonos 26
and Aiolou Str., 41221 Larisa

²National Agricultural Research Foundation of Greece, Plant Protection Institute,
Laboratory of Nematology, 71110 Herakleion, Crete

Email: dkarpouzas@bio.uth.gr

Microbial degradation constitutes the most important processes for the dissipation of organophosphorus and carbamate insecticides-nematicides in soil. Only recently studies reported the isolation of two bacteria able to rapidly degrade the organophosphorus nematicide fenamiphos, while no such studies are available so far for the carbamate nematicide oxamyl (Megharaj et al., 2003; Caceres et al., 2009). This study reports the isolation and characterization of fenamiphos and oxamyl-degrading bacteria which were isolated from a soil originated from a banana field site in Crete with extensive history of annual applications of fenamiphos and oxamyl. An enrichment culture technique in a selective media like Mineral Salts Media Nitrogen (MSMN) where oxamyl or fenamiphos (10 mg L^{-1}) was the sole C source as well as in soil extract media (SEM) was used for the isolation of pesticide degrading microorganisms. Enrichment led to the isolation of four oxamyl- and two fenamiphos-bacterial cultures which were able to completely degraded the two nematicides in 48 h. Sequencing of the 16S rRNA gene of the four oxamyl-degrading isolates showed highest homology (> 99%) to different *Pseudomonas* strains (*P. putida*, *P. jinjuensis*) while the two fenamiphos-degrading strains showed highest homology (>99%) strains of *Acinetobacter rhizosphaerae* and *P. putida*. Further metabolic studies showed that fenamiphos-degrading bacteria hydrolyzed fenamiphos to its phenolic derivative, fenamiphos-phenol, which is does not posses any nematicidal activity. Further analysis of the structure of the bacterial community in the original soil as well as in the different enrichment cultures using DGGE and cloning showed that the isolated bacteria were present in the original soil and became dominant during the enrichment procedure. On going studies will explore the ability of the isolated bacteria to further degrade other structurally similar organophosphorus and carbamate insecticides and they attempt to isolate and characterize gene/enzyme systems controlling degradation by the isolated bacteria.

1. Megharaj et al 2003. Hydrolysis of fenamiphos and its oxidation products by a soil bacterium in pure culture, soil and water. Appl. Microbiol. Biotechnol 61: 252-256
2. Caceres et al. 2009. Hydrolysis of fenamiphos and its toxic oxidation products by *Microbacterium* sp. in pure culture and groundwater. Biores. Technol. 100: 2732-2736

1.23. Μελέτη της Βακτηριακής Χλωρίδας στη *Cyndia pomonella* (Καρπόκαψα)

Χατζή Ι., Μαργαριτόπουλος Ι. & Δ.Μόσιαλος

Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας Τ.Κ. 41221 Λάρισα

Email: mosial@bio.uth.gr

Σκοπός: Να μελετήσουμε την βακτηριακή χλωρίδα φυσικών πληθυσμών του εντόμου *Cyndia pomonella*.

Μέθοδοι και αποτελέσματα : Η βακτηριακή χλωρίδα μελετήθηκε σε 2 στάδια ανάπτυξης του εντόμου (Ενήλικο και Προνύμφη) σε 2 είδη ξενιστών (Μήλο και Αχλάδι) και σε 2 τύπους αγρών (Βιολογικό και Συμβατικό). Το σώμα των εντόμων ομογενοποιήθηκε σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα (TSB) και με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων επιστρώθηκαν τρυβλία Petri που περιείχαν στερεό θρεπτικό υπόστρωμα (TSA). Ακολούθησε απομόνωση χρωμοσωματικού DNA από βακτηριακές αποικίες και εφαρμόστηκε η τεχνική PCR (Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης) στοχεύοντας στην ενίσχυση βακτηριακού γονιδίου 16S rRNA. Τα προϊόντα της PCR στάλθηκαν για αλληλούχιση και εν συνεχείᾳ οι αλληλουχίες αναλύθηκαν με εργαλεία βιοπληροφορικής.

Τα βακτηριακά είδη που ταυτοποιήθηκαν ανάλογα με το αναπτυξιακό στάδιο, το είδος ξενιστή και τον τύπο καλλιέργειας καθώς και οι μεταξύ τους φυλογενετικές σχέσεις θα παρουσιαστούν στην αναρτημένη ανακοίνωση αναλυτικά.

Σημασία της μελέτης : Η καρπόκαψα αποτελεί έναν ιδιαίτερα διαδεδομένο εχθρό των γιγαρτόκαρπων προκαλώντας σημαντικές οικονομικές καταστροφές. Η μελέτη της βακτηριακής χλωρίδας των εντόμων αποτελεί αντικείμενο έντονης ερευνητικής δραστηριότητας λόγω της σημασίας της για την βιολογία και φυσιολογία των εντόμων ξενιστών. Η παρούσα μελέτη είναι η πρώτη όσον αφορά τη βακτηριακή χλωρίδα της καρπόκαψας.

Λέξεις κλειδιά: καρπόκαψα, βακτηριακή χλωρίδα, 16S rRNA

1.23. Bacterial Flora of *Cyndia pomonella* (Codling Moth)

Chatzi I., Margaritopoulos I. & D. Mossialos

Department of Biochemistry & Biotechnology, University of Thessaly, GR-41221
Larissa, Greece

E-mail : mosial@bio.uth.gr

Aim: To study the bacterial flora in natural populations of the insect *Cydia pomonella*.

Methods and results: The bacterial flora was studied in 2 stages of insect development (adult and larvae) in 2 host species (apple and pear) and 2 types of crop fields (biological and conventional). Insects were homogenised in liquid nutrient medium (TSB). Serial dilutions were prepared and spreaded on Petri dishes containing solid nutrient medium (TSA). Chromosomal DNA was isolated from bacterial colonies grown on solid medium and Polymerase Chain Reaction (PCR) was applied targeting bacterial 16S rRNA. The PCR products were sequenced and the sequences were analyzed using bioinformatics tools.

The bacterial species which were identified according to insect growth stage, host species, crop type and their phylogeny will be presented in the poster.

Significance of the study: Intensive scientific research takes place regarding the bacterial flora of agriculturally important insects due to its importance to biology and physiology of insect hosts. To our best knowledge this is the first study regarding the bacterial flora of codling moth.

Keywords: codling moth, bacterial flora, 16S rRNA

2^η Θεματική Ενότητα

ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΗ -

ΜΕΤΑΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΗ

GENOMICS - METAGENOMICS

2.1. Αλληλεπιδράσεις *in vivo* και *in vitro* μεταξύ των MbeA και MbeC: δύο σημαντικές πρωτεΐνες για τη συζευκτική κινητοποίηση του πλασμιδίου ColE1

Βαρσάκη A.¹, Lamb H.K.², Moncalián G.³, Ελευθεριάδου Ο¹, Βανδέρα E.¹, de la Cruz F.³, Hawkins A.R.² & K. Δραϊνας¹

¹Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, 45110 Ιωάννινα.

²Institute of Cell and Molecular Biosciences, Newcastle University, Medical School, Catherine Cookson Building, Framlington Place, Newcastle upon Tyne, NE2 4HH, UK.

³Departamento de Biología Molecular, Universidad de Cantabria, 39011 Santander, Spain

Email: cdrainas@cc.uoi.gr

Η συζευκτική κινητοποίηση πλασμιδίων συμβάλει σημαντικά στην εξέλιξη των γονιδιωμάτων μικροοργανισμών. Οι πρωτεΐνες MbeA και MbeC κωδικεύονται από το πλασμίδιο ColE1 και έχουν σημαντικό ρόλο στη συζευκτική του κινητοποίηση. Η MbeA αλληλεπιδρά εξειδικευμένα με μονόκλων DNA της περιοχής oriT του ColE1 και καταλύει αντιδράσεις σχάσης και μεταφοράς μονής αλυσίδας (1), ενώ η MbeC δεσμεύεται ειδικά σε δίκλων DNA που περιέχει τη θέση oriT του ColE1. Με βάση την τριτοταγή της δομή είναι δυνατόν να προβλεφθεί ότι η MbeC μπορεί να αλληλεπιδρά με άλλες πρωτεΐνες (2). Για να επιβεβαιώσουμε αυτή την υπόθεση μελετήσαμε τις πιθανές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των MbeC και MbeA, *in vivo* και *in vitro*. Οι *in vivo* έλεγχοι πραγματοποιήθηκαν με ένα βακτηριακό σύστημα δύο υβριδίων, το οποίο στηρίζεται στη λειτουργική συμπληρωματικότητα μεταξύ δύο τμημάτων του ενζύμου αδενυλική κυκλάση υπεύθυνου για την ανασύσταση μιας σηματοδοτικής πορείας cAMP στο στέλεχος *E. coli* *cyaA*. Συμπληρωματικότητα παρατηρήθηκε μόνο όταν η MbeC αλληλεπιδρούσε μέσω της καρβόξυ-τελικής της περιοχής με την αμινο-τελική περιοχή της MbeA όπως είχαμε προβλέψει. Ο έλεγχος των αλληλεπιδράσεων *in vitro* πραγματοποιήθηκε με θερμιδομετρία ισοθερμικής τιτλοδότησης (ITC). Τα πειράματα ITC έδειξαν ότι οι δύο πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν εξωθερμικά με μία στοιχειομετρία 1:1 (ένα σημείο αλληλεπίδρασης) και K_D περίπου 21 μM . Τα πειράματα ITC επίσης έδειξαν ότι μονόκλων DNA της περιοχής nic της oriT του ColE1 αλληλεπιδρά εξωθερμικά με MbeA και στοιχειομετρία 1:1 με K_D περίπου 152 nM . Το K_D μειώνεται τρεις φορές παρουσία πρωτεΐνης MbeC σε ποσότητα κορεσμού. Τα αποτελέσματά μας υποστηρίζουν ότι οι πρωτεΐνες MbeA και MbeC αλληλεπιδρούν άμεσα *in vivo* προάγοντας τη συζευκτική κινητοποίηση του ColE1.

Λέξεις κλειδιά: conjugal mobilization, plasmid ColE1, *E. coli*

1. Varsaki, A., Lucas, M., Afendra, A., Drainas, C. And de la Cruz, F. (2003), Mol. Microbiol. 48:481-493
2. Varsaki, A., Moncalian, G., Garcllan-Barcia, M.P., Drainas, C. and de la Cruz, F. (2009) Journal of Bacteriology, 191: 1446-1455

2.1. *In vivo* and *in vitro* interactions between MbeA and MbeC: two proteins key to ColE1 plasmid conjugal mobilisation

Varsaki A.¹, Lamb H.K.², Moncalián G.³, Eleftheriadou O¹, Vandera E.¹, de la Cruz F.³, Hawkins A.R.² & C. Drainas¹

¹Department of Chemistry, University of Ioannina, 45100, Greece.

²Institute of Cell and Molecular Biosciences, Newcastle University, Medical School, Catherine Cookson Building, Framlington Place, Newcastle upon Tyne, NE2 4HH, UK.

³Departamento de Biología Molecular, Universidad de Cantabria, 39011 Santander, Spain

Email: cdrainas@cc.uoi.gr

Conjugal mobilization of plasmids has a significant contribution to microbial genome evolution. MbeA and MbeC proteins are encoded by ColE1 and play key roles in conjugative mobilisation of this plasmid. MbeA interacts specifically with ColE1-oriT ssDNA and catalyses single strand DNA cleavage and strand transfer (1), whereas MbeC binds specifically to dsDNA containing the oriT site of ColE1. Due to the predicted tertiary structure of MbeC, the assumption that it might interact with some other protein has been proposed (2). To test this hypothesis we studied the possible interactions of MbeC with MbeA, *in vivo* and *in vitro*. For the *in vivo* test, we applied a two-hybrid bacterial system based on the functional complementation between two fragments of an adenylate cyclase to reconstitute a cAMP signalling cascade in a *cyaA* deficient *E. coli* strain. We obtained successful complementation only when MbeC was interacting via its C-terminal domain with the N-terminal domain of MbeA, as hypothesised previously. *In vitro* interactions were tested by isothermal titration calorimetry (ITC). These experiments showed that the two proteins interacted exothermically with a 1:1 stoichiometry (implying a single site of interaction), and a K_D of approximately 21 μM. ITC experiments also showed that single stranded ColE1 nic DNA interacted exothermically with MbeA with a 1:1 stoichiometry and a K_D of 152 nM. This K_D was reduced 3-fold in the presence of saturating amounts of MbeC. Our results support the hypothesis that MbeA and MbeC interact directly *in vivo* to promote conjugative mobilisation.

Keywords: conjugal mobilization, plasmid ColE1, *E. coli*

1. Varsaki, A., Lucas, M., Afendra, A., Drainas, C. And de la Cruz, F. (2003), Mol. Microbiol. 48:481-493
2. Varsaki, A., Moncalian, G., Garcllan-Barcia, M.P., Drainas, C. and de la Cruz, F. (2009) Journal of Bacteriology, 191: 1446-1455

2.2. Λειτουργικός χαρακτηρισμός της περιπλασμικής κυκλοφιλίνης του *Azotobacter vinelandii*

Δήμου Μ., Βενιεράκη Α. & Π. Κατινάκης

Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιερά Οδός 75, 11855, Αθήνα

Email: mdimougr@yahoo.com

Το *Azotobacter vinelandii* είναι ένα αζωτοδεσμευτικό βακτήριο του εδάφους, το οποίο σχετίζεται με το γένος *Pseudomonas* και του οποίου η πλήρης αλληλούχιση του γενώματος έχει ολοκληρωθεί πρόσφατα. Βάσει ομοιογίας, βρέθηκε ότι διαθέτει δύο μέλη της οικογένειας των κυκλοφιλινών, το ένα από τα οποία παρουσιάζει κυτταροπλασματική τοποθέτηση και το άλλο περιπλασμική. Όλες οι κυκλοφιλίνες διαθέτουν μια κοινή περιοχή ομοιογίας και ανήκουν στις πεπτίδυλ-πρόλυλ *cis/trans* ισομεράσες (EC: 5.2.1.8). Τα ένζυμα αυτά καταλύουν την *cis/trans* ισομερίωση πεπτίδυλ-πρόλυλ δεσμών ενώ μπορούν να βοηθούν και στο σωστό δίπλωμα πολυπεπτιδίων. Αν και πολλές από τις ευκαρυωτικές κυκλοφιλίνες έχουν μελετηθεί εκτενώς, πολύ λίγες είναι οι περιπτώσεις λειτουργικού χαρακτηρισμού προκαρυωτικών ενζύμων. Σε αυτήν τη μελέτη, περιγράφουμε την έκφραση και την απομόνωση της ανασυνδυασμένης περιπλασμικής κυκλοφιλίνης από το *Azotobacter vinelandii* στο *Escherichia coli* και εξετάζουμε τις βιοχημικές της ιδιότητες. Προκειμένου να ελέγξουμε αν η περιπλασμική κυκλοφιλίνη διαθέτει ενεργότητα πεπτίδυλ-πρόλυλ *cis/trans* ισομεράσης, χρησιμοποιήσαμε τη μέθοδο προσδιορισμού ενζυμικής ενεργότητας που βασίζεται στη χυμοθρυψίνη και εξαρτάται από τη *cis/trans* ισομερίωση πεπτίδυλ-πρόλυλ δεσμών συνθετικών τετραπεπτιδίων. Επιπλέον και προκειμένου να εξετάσουμε τη πιθανή ενεργότητα τσαπερόνης της περιπλασμικής κυκλοφιλίνης, χρησιμοποιήσαμε τη μέθοδο θερμικής συσσωμάτωσης της συνθάσης του κιτρικού οξέος. Τα αποτελέσματά μας δείχνουν πως η περιπλασμική κυκλοφιλίνη του *Azotobacter vinelandii* διαθέτει ενεργότητα πεπτίδυλ-πρόλυλ *cis/trans* ισομεράσης αλλά δε φαίνεται να δρα ως τσαπερόνη.

2.2. Functional characterization of the *Azotobacter vinelandii* periplasmic cyclophilin

Dimou M., Venieraki A. & P. Katinakis

Laboratory of Molecular Biology, Department of Agricultural Biotechnology,
Agricultural University of Athens, Iera Odos 75, 11855, Athens

Email: mdimougr@yahoo.com

Azotobacter vinelandii is a soil nitrogen-fixing bacterium related to the *Pseudomonas* genus, whose complete genome sequence has recently been reported. Homology searches indicated that it possesses two members of the cyclophilin family, one with a cytoplasmic and one with a periplasmic localization. All cyclophilins share a common domain and belong to the peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerases (EC: 5.2.1.8). These enzymes catalyze the interconversion of peptidyl-prolyl bonds while; they can also act on polypeptides, as folding helper enzymes. Although many of the eukaryotic cyclophilins have been studied extensively, few examples of functional characterization of these enzymes exist in prokaryotes. In this study, we describe the expression and purification of the recombinant periplasmic cyclophilin from *Azotobacter vinelandii* in *Escherichia coli* and analyze its biochemical properties *in vitro*. To test whether the periplasmic cyclophilin has peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerase activity, we used a chymotrypsin-coupled peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerase assay, which is rate-limited by the *cis/trans* isomerisation of the peptidyl-prolyl bond of synthetic tetrapeptides. Further, in order to examine the possible chaperone activity of the periplasmic cyclophilin, we used the citrate synthase thermal aggregation assay. Our results show that the *Azotobacter vinelandii* periplasmic cyclophilin possesses peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerase activity but does not seem to be a chaperone.

2.3. Μελέτη της δραστικότητας του προαγωγού του γονιδίου της cfa συνθάσης στο *Chromohalobacter salexigens*

Κατσίφα Α.,¹ Παραπούλη Μ.,¹ Argandona M.,³ Reina-Bueno M.,³ Αφένδρα Α.-Σ.,² Vargas C.,³ Δραΐνας Κ.,¹ Nieto J.³ & A.E. Κούκκου^{1*}

Τομέας Οργανικής Χημείας και Βιοχημείας, Τμήμα Χημείας,¹ Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών,² Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, 45110 Ιωάννινα, Ελλάδα

Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Pharmacy, University of Seville, 41012 Seville, Spain³

Email: agkatsifa@yahoo.com

Το *Chromohalobacter salexigens* είναι ένα αλόφιλο βακτήριο το οποίο εξαιτίας της εξαιρετικής αλατοανθεκτικότητάς του, θεωρείται μικροοργανισμός πρότυπο για τη μελέτη των περίπλοκων μηχανισμών αντίστασης στο οσμωτικό στρες στα προκαρυωτικά. Σε προηγούμενη εργασία, παρατηρήσαμε αύξηση του ποσοστού των κυκλοπροπανοϊκών λιπαρών οξέων (CFA) στα φωσφολιπίδια της μεμβράνης του *C. salexigens* ως απόκριση στις αυξημένες συγκεντρώσεις άλατος. Επιπρόσθετα, στο γονιδίωμα του *C. salexigens* βρέθηκαν δύο γονίδια *cfa* (*cfa1*, *cfa2*), των οποίων τα προϊόντα έδειξαν συντηρημένη δομή συνθάσης των CFA. Η *cfa* συνθάση καταλύει τη μεταφορά μιας μεθυλομάδας από το δότη *S*-adenosylmethionine (SAM) σε ακόρεστα λιπαρά οξέα. Επίσης, παρατηρήθηκε αύξηση της δραστικότητας της κυκλοπροπανοϊκής συνθάσης με την αύξηση της συγκέντρωσης άλατος. Προκειμένου να διευκρινιστεί εάν αυτή η αύξηση ρυθμίζεται σε μεταγραφικό επίπεδο, πραγματοποιήθηκε κλωνοποίηση του πιθανού προαγωγού του γονιδίου *cfa2*, που περιείχε τις -35 και -10 περιοχές, ανοδικά του γονιδίου *gfp*, το οποίο κωδικοποιεί μια πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη, στο πλασμίδιο pHSG457. Η μεταγραφική αυτή σύντηξη μεταφέρθηκε με σύζευξη από κύτταρα δότη DH5α τόσο στο φυσικό τύπο του *C. salexigens* DSM3043 όσο και στα ευαίσθητα στο άλας μεταλλαγμένα στελέχη CHR62 και CHR63. Η μέτρηση του φθορισμού σε διαφορετικές συγκεντρώσεις άλατος στο θρεπτικό μέσο, έδειξε ότι η περιοχή του πιθανού προαγωγού παρουσιάζει δραστικότητα προαγωγού και ότι η έκφρασή του δεν επηρεάζεται από τη συγκέντρωση άλατος. Τα αποτελέσματα αυτά ενισχύουν την άποψη ότι ο *cfa2* προαγωγός στο *C. salexigens* εκφράζεται συνεχώς.

Λέξεις κλειδιά: *Chromohalobacter salexigens*, CL, CFA λιπαρά οξέα

2.3. Promoter Activity Studies of a *cfa* Synthase Gene in *Chromohalobacter salexigens*

Katsifa A.¹, Parapouli M.¹ Argandoña M.³, Reina-Bueno M.³, Afendra A.-S.², Vargas C.³, Drainas C.¹, Nieto J.³ & A.I Koukkou ^{1*}

*Sector of Organic Chemistry and Biochemistry, Department of Chemistry,¹
Department of Biological Applications and Technology², University of Ioannina,
45110 Ioannina, Greece*

*Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Pharmacy, University of
Seville, 41012 Seville, Spain³*

Email: agkatsifa@yahoo.com

Chromohalobacter salexigens is a halophilic bacterium which exhibits extreme tolerance to salinity, being considered as a model microorganism to study the intricate circuits controlling stress response in prokaryotes. In a previous work, we discovered that under high salinity conditions *C. salexigens* membrane lipids contained a higher percentage of cyclopropanic fatty acids (CFA). Furthermore, within the *C. salexigens* genome sequence we found two *cfa* genes (*cfa1*, *cfa2*), whose products showed a conserved motif of cfa synthase. Cyclopropane fatty acid synthase (cfa) catalyses the transfer of a methyl group from S-adenosylmethionine (SAM) to unsaturated fatty acids. Cfa synthase activity was also found to be elevated when the cells were grown in presence of high salt concentrations. To determine whether this elevation occurred at the transcriptional level, we cloned the region of the putative *cfa2* gene containing -35 and -10 promoter elements upstream of the promoterless *gfp* gene, encoding a green fluorescent protein, in the pHSG457 plasmid. The created transcriptional fusion (pHS457_Ptcfa) was conjugally transferred from DH5α donors to *C. salexigens* wild type strain DSM3043 as well as into the salt-sensitive mutants CHR62 and CHR63. Measurement of fluorescence was monitored in presence of various salt concentrations into growth medium. The data showed that this region possessed real promoter activity, whereas its expression was not directly affected by salt concentration. These results demonstrate that the *cfa2* promoter of *C. salexigens* DSM3043 most likely is expressed constitutively.

Keywords: *Chromohalobacter salexigens*, CFA fatty acids

Acknowledgments: This work was financially supported by the Greece-Spain Joint Research Programmes 2005-2007.

2.4. Μεταγονιδιωματική εξερεύνηση των υδροθερμικών πηγών του υποθαλασσίου ηφαιστείου Κολούμπο (Σαντορίνη, Ελλάδα)

Πολυμενάκου Π.¹, Κυρπίδης Ν.², Μανδαλάκης Μ.¹ & Σ. Αλεξανδρή¹

¹ Ελληνικό Κέντρο Θαλασσίων Ερευνών, Ηράκλειο Κρήτης & Ανάβυσσος Αττικής, Ελλάδα

² Joint Genome Institute, Department of Energy, California, USA

Email: polymen@her.hcmr.gr

Η σχετικά πρόσφατη έκρηξη του ηφαιστείου της Σαντορίνης στην Ελλάδα (πριν περίπου 3600 χρόνια) αποτέλεσε ένα από τα μεγαλύτερα ηφαιστειακά γεγονότα στην διάρκεια των ιστορικών χρόνων. Η ηφαιστειακή περιοχή της Σαντορίνης εκτείνεται σε μήκος κατά 20 χλμ με βορειοανατολική κατεύθυνση αποτελούμενη σε σειρά από τουλάχιστον 20 υποθαλασσίους κώνους. Ο μεγαλύτερος από αυτούς τους κρατήρες είναι το Κολούμπο, ένας κώνος διαμέτρου τριών χιλιομέτρων με έναν μεγάλο κρατήρα 1500 μέτρων που βρίσκεται σε βάθος από την επιφάνεια της θάλασσας 505 μέτρων. Κατά την διάρκεια μιας πρόσφατης ωκεανογραφικής αποστολής (του Ελληνικού Κέντρου Θαλασσίων Ερευνών σε συνεργασία με το Πανεπιστήμιο του Rhode Island) ανακαλύφθηκε στον πυθμένα του κρατήρα μια εκτεταμένη περιοχή πλούσια σε υδροθερμικές πηγές [Sigurdsson et al. 2006]. Στην περιοχή αυτή ανακαλύφθηκε ένας μεγάλος αριθμός υδροθερμικών πηγών και καμινάδων με θερμοκρασίες που κυμαίνονταν από 70°C έως και 220°C. Οι καμινάδες υψηλής θερμοκρασίας καλύπτονταν από βακτηριακές αποικίες διαφόρων χρωμάτων όπως λευκού, γκρί και κόκκινου. Επίσης, μεγάλες επιφάνειες του πυθμένα καλύπτοντας από μικροβιακές αποικίες γνωστές ως «μικροβιακά χαλιά» κόκκινου, λευκού, και πορτοκαλί χρώματος. Οι εντυπωσιακές αυτές περιοχές μπορούν να αποτελέσουν στόχο για εξερεύνηση των μικροβιακών κοινωνιών τους με βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον. Για το λόγο αυτό, διάφορα δείγματα από αυτές τις περιοχές συλλέχθηκαν με σκοπό την μεταγονιδιωματική εξερεύνηση των συγκεκριμένων ενδιαιτημάτων.

2.4. Metagenomic exploration of the newly discovered hydrothermal vent sites in the submarine Kolumbo volcano (Santorini, Greece)

Polymenakou P.¹, Kyrpides N.², Mandalakis M.¹ & S. Alexandri¹

¹ Hellenic Centre for Marine Research, Heraklion Crete & Anavyssos Attika, Greece

² Joint Genome Institute, Department of Energy, California, USA

Email: polymen@her.hcmr.gr

The most recent major explosive eruption of the Santorini volcano in Greece (around 3600 years before present) was one of the largest volcanic events known in historical time. The Santorini volcanic field extends 20 km to the northeast as a line of more than 20 submarine cones. The largest of these submarine craters is Kolumbo, a three-km-diameter cone with a 1500 m wide crater at a depth of 505 m below sea level. During a recent marine survey (of the Hellenic Centre for Marine Research in collaboration with the Rhode Island University), a widespread hydrothermal vent field was discovered on the floor of the Kolumbo crater [Sigurdsson et al. 2006]. High temperature venting with fluid temperatures up to 220°C from vent chimneys as well as lower-temperature chimneys and vents (with fluids up to 70°C) were discovered. The exterior of most chimneys is covered with white, grey, and reddish filamentous bacteria. Large areas on the floor of the Kolumbo volcano are covered by reddish bacteria, white and reddish orange bacterial mats that can be characterized as promising targets of high microbial colonisation and hence biotechnological interest. Thus, samples of red and white-grey bacterial mats have been collected for the metagenomic exploration of these newly discovered habitats.

Sigurdsson, H., Carey, S., Alexandri, M., Vougioukalakis, G., Croff, K., Roman, C., Sakellariou, D., Nomikou, P. et al. 2006. Marine investigations of Greece's Santorini volcanic field. *EOS* 87: 337-342

2.5. Στοχευμένη ισοτοπική ανάλυση ρυπαντών (CSIA) ως ένα νέο, ισχυρό περιβαλλοντικό εργαλείο για την παρακολούθηση της βιοαποδόμησης οργανικών ρυπαντών στα εδάφη: το πρόγραμμα isoSoil

Πολυμενάκου Π.¹, Μανδαλάκης Μ.¹ & isoSoil Scientific Party²

¹ Ελληνικό Κέντρο Θαλασσών Ερευνών, Ηράκλειο Κρήτης, Ελλάδα

² Stockholm University, ALS Laboraroty Group AB, Eidgenössische Technische Hochschule Zürich, Masaryk University, Earth Tech CZ s.r.o., Technical University of Lodz, University of Bristol, FQS Poland Sp. z.o.o., Makolab SA, IVI Swedish Environmental Research Institute

Email: polymen@her.hcmr.gr, mandalakis@her.hcmr.gr

Τα παραδοσιακά προγράμματα παρακολούθησης της επαναφοράς περιβαλλοντικών συστημάτων, τα οποία βασίζονται στη χωρική μέτρηση των συγκεντρώσεων των ρυπαντών και των μεταβολιτών τους με την πάροδο του χρόνου, παρέχουν συνήθως ασαφείς εκτιμήσεις λόγω της αδυναμίας τους να διακρίνουν την πραγματική αποδόμηση των ρυπαντών από άλλες διεργασίες που λαμβάνουν χώρα ταυτόχρονα, όπως η ανάμιξη πολλαπλών πηγών ρύπανσης, η διασπορά (αραίωση) και άλλες διεργασίες ανακατανομής. Ο σκοπός του ευρωπαϊκού προγράμματος isoSoil είναι να καθιερώσει τη στοχευμένη ισοτοπική ανάλυση ρυπαντών (CSIA) ως ένα νέο, φιλικό προς το χρήστη και ισχυρό εργαλείο τόσο για την παρακολούθηση της βιοαποδόμησης όσο και για την εκτίμηση των πηγών εκπομπής οργανικών ρυπαντών στα εδάφη. Η πολυσύνθετη κοινοπραξία του isoSoil, η οποία περιλαμβάνει παγκοσμίως πρωτοπόρες ερευνητικές ομάδες στη CSIA, εταιρίες παροχής υπηρεσιών εστιασμένες στις χημικές αναλύσεις ρυπαντών και στην παρακολούθηση επαναφοράς περιβαλλοντικών συστημάτων, καθώς και έμπειρες επιχειρήσεις στη δημιουργία εφαρμογών-προγραμματισμού, θα επιτρέψει α) την εφαρμογή/διερεύνηση πολλαπλών ισοτοπικών συστημάτων ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^2\text{H}/^1\text{H}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ και $^{37}\text{Cl}/^{35}\text{Cl}$) των ρυπαντών για βελτιωμένο χαρακτηρισμό και παρακολούθηση συγκεκριμένων περιοχών ως προς τη βιοτική και αβιοτική αποδόμηση, β) την εφαρμογή ισοτοπικής ταυτοποίησης ($^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^2\text{H}/^1\text{H}$, $^{37}\text{Cl}/^{35}\text{Cl}$ και $^{81}\text{Br}/^{79}\text{Br}$) για την εκτίμηση τη ρύπανσης που προέρχεται από περιφερειακές και τοπικές πηγές (περιβαλλοντική ιατροδικαστική) και γ) την ανάπτυξη και ανάδειξη διαδικτυακά εμπορικά διαθέσιμων εφαρμογών που θα υποβοηθούν τις υπηρεσίες διαχείρισης εδαφών στη δειγματοληψία και την ερμηνεία των αποτελεσμάτων CSIA. Η εφαρμογή της CSIA παρέχει ένα τεκμηριωμένο και βελτιωμένο εργαλείο για την εκτίμηση και την παρακολούθηση των 3.5 εκατομμυρίων ρυπασμένων εδαφικών περιοχών στην Ευρωπαϊκή Ένωση. Η εφαρμογή της ανάλυσης πολλαπλών ισοτόπων παρέχει αυξημένη δυνατότητα για τη διάκριση της πραγματικής αποδόμησης ρυπαντών από άλλες περιβαλλοντικές διεργασίες που συμβαίνουν ταυτόχρονα.

2.5. Contaminant-specific isotope analyses as sharp environmental-forensics tools for site characterisation, monitoring and source apportionment of pollutants in soil: the isoSoil project

Polymenakou P.¹, Mandalakis M.¹ & isoSoil Scientific Party²

¹Hellenic Centre for Marine Research, Heraklion Crete, Greece

² Stockholm University, ALS Laboraroty Group AB, Eidgenössische Technische Hochschule Zürich, Masaryk University, Earth Tech CZ s.r.o., Technical University of Lodz, University of Bristol, FQS Poland Sp. z.o.o., Makolab SA, IVI Swedish Environmental Research Institute

Email: polymen@her.hcmr.gr, mandalakis@her.hcmr.gr

Conventional remediation-monitoring programmes, i.e. analysis of contaminant and metabolite concentrations over time and space, often provide inconclusive assessments due to inability to resolve among mixing of several contaminant sources, degradation, dispersion and other redistribution processes. The isoSoil objective is to firmly establish concentration-independent contaminant-specific isotope analysis (CSIA) as a novel, user-friendly and powerful tool for both degradation monitoring and source apportionment of organic contaminants in soil. The balanced isoSoil consortium with world-leading CSIA research groups, progressive remediation-focused and analytical services companies and experienced software enterprises will enable a) applications of multiple CSIA systems ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{2}\text{H}/^{1}\text{H}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ and $^{37}\text{Cl}/^{35}\text{Cl}$) for improved site-specific characterization and monitoring of microbial and abiotic degradation, b) applications of CSIA “isotopic fingerprinting” ($^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{2}\text{H}/^{1}\text{H}$, $^{37}\text{Cl}/^{35}\text{Cl}$, and $^{81}\text{Br}/^{79}\text{Br}$) for source apportionment of both regional diffuse and locally mixed contamination scenarios (i.e., environmental forensics) and, c) emphasis on development and demonstration of web-based commercial software to aid soil managers in sampling and interpretation of CSIA results. The CSIA concept provides a well-defined and improved tool to for assessment and monitoring of the 3.5 mill contaminated soil sites in EU. Application of multi-element CSIA enables enhanced power to resolve between the many co-occurring processes.

2.6. Mapping of geographical and environmental parameters for metagenomics projects.

Li-Yuan Hung¹, Tsoka S.¹, Kyrpides N.C.² & C.A. Ouzounis¹

¹Centre for Bioinformatics, School of Physical Sciences & Engineering, King's College London, Strand WC2R 2LS, London UK

²Genome Biology Program, DoE Joint Genome Institute, 2800 Mitchell Drive, Walnut Creek, CA 94598, USA

Email: christos.ouzounis@me.com

One of the most fundamental problems in the analysis of metagenomics datasets is the lack of recorded knowledge about the number and types of species represented in the sequenced samples. To estimate the number of species, the environmental niche of origin needs to be correlated with species complexity as a first step towards the delineation of sample biodiversity. Niches can be characterized by a set of parameters that describe specific environments and samples. We report the integration of available data for the analysis of metagenomics projects by recording environmental parameters and capturing species complexity using signature genes. Using a comprehensive list of published metagenomics projects, it is possible to integrate disparate data from geographical locations, physicochemical properties and environmental ontologies that describe environmental metadata, and using those effectively for a more complete characterization of metagenomics projects, coupling them with genomic features such as GC content and species complexity. We also provide a Metagenomics KML layer for Google Earth users.

2.7. Grand Challenge Genomic and Metagenomic efforts at the DOE-JGI and beyond

Nikos C. Kyrpides

Genome Biology Program, DoE Joint Genome Institute, 2800 Mitchell Drive, Walnut Creek, CA 94598, USA

Email: NCKyrpides@lbl.gov

At the time of the completion of 1000 microbial genomes (November 2009), it is worth noting that the enabling technology which birthed the field and brought it to this point is fundamentally different from the one that is currently pushing it to the next phase.

The significant improvement in the speed, efficiency and cost of the sequencing technology over the last few years is mediating a major transition in Genomics from small-scale, single PI driven projects, to large scale, multi-institutional and eventually to grand challenge efforts. One such large scale effort is the Genomic Encyclopedia of Bacteria and Archaea (GEBA) project, which was initiated by the DOE-JGI on 2007 with the goal of sequencing representative microorganisms from the phylogenetically diverse branches of the Tree of Life. Up to this point, approximately 250 organisms have been selected for sequencing and over 100 of those have been sequenced. A parallel project (GEBA-RNB) focuses on a specific phylogenetic lineage, and was launched the last few months by the DOE-JGI in collaboration with the Beijing Genomics Institute (BGI). This project aims to provide the genomic sequences of 200-300 Root-Nodule-Bacteria, isolated from diverse geographic locations around the world.

Such large scale efforts aim to provide a rapid characterization of the microbial tree of life and improve our understanding of the large genetic and biochemical diversity available therein. However, when placed within the perspective of the immense phylogenetic diversity of the microbial life it becomes evident that much bigger efforts are needed to achieve these goals. To accomplish this, an international consortium is currently planning the launch of a grand challenge project to sequence the type strains of all the cultured and properly described prokaryotic microorganisms (approximately 15,000 species), within the next 5 years. Although based on our current knowledge less than 1% of microbes have been cultured, it is anticipated that this effort will provide the foundation of the framework to study and understand microbial life and its diversity.

3^η Θεματική Ενότητα

**ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΕΣ
ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ**

**BIOTECHNOLOGICAL
APPLICATIONS**

3.1. Ομόλογος Μετασχηματισμός του *Fusarium oxysporum* με Στόχο την Αύξηση της Παραγωγής Αιθανόλης

Ανασοντζής Γ.Ε., Σταθοπούλου Π.Μ., Αμίλλης Σ., Καραγκούνη Α.Δ., Διαλλινάς Γ.
& Δ.Γ. Χατζηνικολάου

Εργαστήριο Μικροβιολογίας, Τομέας Βοτανικής, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και
Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 15781 Αθήνα.

Email: G_Anasontzis@biol.uoa.gr

Λόγω της συνεχώς αυξανόμενης τιμής του πετρελαίου, η χρήση της αιθανόλης, ως ένα εναλλακτικό οικολογικό καύσιμο, αρχίζει να αποτελεί μια ελκυστική προοπτική για τη βιομηχανία της ενέργειας στην Ευρώπη. Η βιομετατροπή της φυτικής βιομάζας σε αιθανόλη χρησιμοποιείται ήδη εκτενώς για το σκοπό αυτό, τόσο στη Βραζιλία, όσο και στις Η.Π.Α. Στην πρώτη περίπτωση, γίνεται εκμετάλλευση της υψηλής συγκέντρωσης της σακχαρόζης στο ζαχαροκάλαμο, ενώ στη δεύτερη, το άμυλο του καλαμποκιού υδρολύεται σε ολιγοσακχαρίτες πριν την πραγματοποίηση της ζύμωσης. Παρόλα αυτά, η αλλαγή χρήσης πολλών καλλιεργειών, τα προϊόντα των οποίων παραδοσιακά προορίζονται προς ανθρώπινη κατανάλωση, έχει θέσει ένα ηθικό δίλλημα που αφορά την παραγωγή και τη διάδοση της βιοαιθανόλης για τις ολοένα αυξανόμενες ανάγκες του τομέα των μεταφορών.

Οι λιγνινοκυτταρινούχες ενώσεις που περιέχονται στα απόβλητα των αγροτικών και δασικών δραστηριοτήτων, της βιομηχανίας χάρτου, καθώς και άλλων βιομηχανιών, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μια άφθονη και χαμηλού κόστους πηγή σακχάρων, για την παραγωγή αιθανόλης. Ο μύκητας *Fusarium oxysporum* είναι ανάμεσα στα λίγα ήδη που έχουν τη δυνατότητα να ζυμώνουν την κυτταρίνη και την ημικυτταρίνη προς αιθανόλη σε διεργασία ενός σταδίου. Σε προηγούμενες έρευνες με το εργαστηριακό στέλεχος F3 του *F. oxysporum*, παρατηρήθηκε συσσώρευση της 1,6-P-γλυκόζης σε αερόβιες και αναερόβιες καλλιέργειες με γλυκόζη ως πηγή άνθρακα. Επίσης, σε αερόβιες και αναερόβιες καλλιέργειες με ξυλόζη ως πηγή άνθρακα, παρατηρήθηκε συσσώρευση της σεδοεπτουλόζης-7-P, η οποία ανήκει στο μεταβολικό μονοπάτι των φωσφορικών πεντοζών. Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδεικνύουν ενδεχομένως τα χαμηλά επίπεδα έκφρασης των ενζύμων φωσφογλυκομούταση (PGM) και τρανσαλδολάση (TAL), αντίστοιχα. Αυξημένη έκφραση των εν λόγω ενζύμων θα μπορούσε να οδηγήσει στην αύξηση της παραγωγικότητας της συνολικής διεργασίας σε αιθανόλη.

Σε αυτή την εργασία, επετεύχθη η υπερέκφραση της PGM και της TAL του *F. oxysporum* υπό τη ρύθμιση του υποκινητή συνεχούς έκφρασης του *gpdA* του *A. nidulans*. Δώδεκα μετασχηματισμένα στελέχη απομονώθηκαν να εκφράζουν το ένα ή και τα δύο ένζυμα. Η αποτελεσματικότητα του μετασχηματισμού επιβεβαιώθηκε με ανάλυση κατά Southern και northern και βιοχημικές δοκιμές για το κάθε ένζυμο. Η ενεργότητα των δύο ενζύμων ήταν υψηλότερη από αυτή του φυσικού στελέχους μέχρι 4 και 5 φορές για της PGM και την TAL αντίστοιχα, σε αερόβιες συνθήκες με γλυκόζη ως πηγή άνθρακα. Τα μετασχηματισμένα στελέχη κατηγοριοποιήθηκαν σύμφωνα με τα παραπάνω χαρακτηριστικά και προσδιορίστηκε η απόδοσή τους στην παραγωγή αιθανόλης.

3.1. Metabolic Engineering of *Fusarium oxysporum* Towards Higher Ethanol Productivities

Anasontzis G.E., Stathopoulou P.M., Amilis S., Karagouni A.D., Diallinas G. & D.G. Hatzinikolaou

Microbiology Group, Botany Department, School of Biology, National and Kapodistrian University of Athens, University Campus, 157 81, Zografou, Athens, GREECE

Email: G_Anasontzis@biol.uoa.gr

Due to the continuously anodic prices of oil, the use of ethanol, as an alternative ecological transportation fuel, begins to attract the energy industry in Europe. The bio conversion of plant biomass into ethanol has already been used for the same purpose widely in Brazil, where the high synthesis of sucrose by the abundant tropical sugar cane is utilized, and the U.S., where the starch obtained by the corn is hydrolyzed before the yeast fermentation takes place. However, the change of many agricultures, traditionally used for human consumption, for other species, whose biomass can be converted to alcohol, has posed an ethical dilemma for the production and broad utilization of bioethanol to satisfy the always increasing demands of the transportations.

Lignocellulosic compounds, present in agricultural and forestry residues and paper and industrial wastes, could be used as a low cost and abundant sugar source for fermentation into ethanol. *Fusarium oxysporum* is among the few species that have been reported to bear the ability to ferment cellulose and hemicelluloses to ethanol, in a one step process. In previous studies with the laboratory strain F3 of *F. oxysporum*, the high levels of accumulated glucose-1,6-P, with glucose as carbon source and the high levels of Sedoheptulose-7-P, in the Pentose Phosphate Pathway, with xylose as carbon source, in aerobic and anaerobic conditions, indicated the probable low activity of the phosphoglucomutase (PGM) and transaldolase (TAL) enzymes respectively. Higher expression of these enzymes could lead to higher ethanol production, under anaerobic conditions.

In this study, we succeeded in overexpressing the PGM and TAL of *F. oxysporum* under the regulation of the constitutive promoter of *gpdA* of *Aspergillus nidulans*. Twelve transformants were isolated expressing either or both the enzymes. The effectiveness of the transformation was certified with Southern and northern blot analysis and biochemical assays for the respective enzymes. PGM and TAL activity surpassed those of the wild type strain by up to 4 and 5 times respectively, in aerobic cultures with glucose as carbon source. The transformants were categorized based on their aforementioned characteristics and their ethanol production performance were tested compared to the wild type in anaerobic glucose batch cultures.

3.2 Μελέτη της έκφρασης της περιοχής *blp* για την παραγωγή θερμοφιλίνης από το οξυγαλακτικό βακτήριο *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0040

Βασιλειάδης Α.¹, Ακτύπης Α.², Χατζηλουκάς Ε.¹ & Α.-Σ. Αφένδρα¹

¹Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών & Τεχνολογιών.

²Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Επιστήμης & Τεχνολογίας Τροφίμων

Email: vasiliadisanastasios@hotmail.com

Ο *Streptococcus thermophilus* είναι ένα οξυγαλακτικό βακτήριο που χρησιμοποιείται παραδοσιακά στην παραγωγή γιαουρτιού και μιας σειράς χαρακτηριστικών σκληρών τυριών. Το στέλεχος *S. thermophilus* ACA-DC0040 που έχει απομονωθεί από ελληνικό παραδοσιακό γιαούρτι παράγει μία βακτηριοσίνη (θερμοφιλίνη T) με αντιμικροβιακή δράση έναντι αρκετών οξυγαλακτικών βακτηρίων και βακτηρίων αλλοιώσης. Βάσει των ιδιοτήτων της μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως φυσικό συντηρητικό σε τρόφιμα που αποτελούν προϊόντα ζύμωσης. Ο σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η διερεύνηση της έκφρασης των πιθανών γονιδίων που εμπλέκονται στην παραγωγή της θερμοφιλίνης.

Έχει εντοπισθεί μία περιοχή στο γονιδίωμα του *S. thermophilus* ACA-DC0040 μεγέθους περίπου 12.7 kb, η οποία φέρεται ως υπεύθυνη για την επαγωγή, τη σύνθεση και την έκκριση της θερμοφιλίνης T. Βάσει εργαλείων βιοπληροφορικής προσδιορίστηκαν επί της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας τα πιθανά αναγνωστικά πλαίσια και τα γονίδια που αντιστοιχούν σε αυτά. Η οργάνωσή της είναι παρόμοια με την περιοχή *blp* του *Streptococcus thermophilus* LMG18311, το οποίο όμως δεν παράγει βακτηριοσίνη λόγω πιθανών μεταλλαγών σε συγκεκριμένα γονίδια αυτής.

Το *S. thermophilus* ACA-DC0040 καλλιεργήθηκε με προσθήκη καθαρού υπερκείμενου υγρής καλλιέργειας *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CNRZ117 που επάγει την παραγωγή της θερμοφιλίνης T. Απομονώθηκε ολικό RNA, από το οποίο ενισχύθηκε το mRNA των πιθανών γονιδίων μέσω RT-PCR και κατάλληλα σχεδιασμένων εκκινητών. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι συμμεταγράφονται τα αναγνωστικά πλαίσια που αντιστοιχούν α) στα γονίδια βιοσύνθεσης του μεταφορέα ABC (*blpA*), της βιοηθητικής πρωτεΐνης μεταφοράς (*blpB*) και του πεπτίδιου επαγωγής (*blpC*), β) στα δομικά γονίδια της βακτηριοσίνης και των πιθανών πεπτιδίων ανοσίας και γ) σε γονίδια, τα προϊόντα των οποίων είναι υπεύθυνα για την τροποποίηση της βακτηριοσίνης έναντι διευρυμένου φάσματος βακτηρίων. Δεν παρατηρήθηκε μεταγραφή των πλαισίων που αντιστοιχούν στα γονίδια του ρυθμιστικού συστήματος αίσθησης απαρτίας (*blpH*, *blpR*). Τα παραπάνω βρίσκονται σε συμφωνία με όμοια αποτελέσματα για την παραγωγή βακτηριοσίνης στο *S. thermophilus* LMD9 και πρόκειται να μελετηθούν περαιτέρω με ανάλυση northern.

3.2. Study on the expression of *blp* region for thermophilin production by the lactic acid bacterium *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0040.

Vassiliadis A.¹, Aktypis A.², Hatziloukas E.¹ & A. – S. Afendras¹

¹*University of Ioannina, Department of Biological Applications and Technology*

²*Agricultural University of Athens, Department of Food Science and Technology*

Email: vasiliadisanastasios@hotmail.com

Streptococcus thermophilus is a lactic acid bacterium traditionally used in the manufacture of yogurt and so-called hard “cooked” cheeses. *S. thermophilus* strain ACA-DC0040, isolated from traditional Greek yoghurt, produces a bacteriocin (thermophilin T) that is active against several LAB and food spoilage bacteria. Due to its properties it can be considered as a potential biopreservative. The aim of this study is the investigation of the expression of the putative genes involved in the thermophilin production.

A region of about 12.7 kb has been located in the *S. thermophilus* ACA-DC0040 genome which is supposed to be responsible for the induction, the synthesis and the secretion of thermophilin T. Based on bioinformatic tools, the putative reading frames on the nucleotide sequence and the corresponding genes have been determined. The organization is similar to the *blp* region of *Streptococcus thermophilus* LMG18311, which, however, does not produce bacteriocin due to possible mutations on certain genes.

S. thermophilus ACA-DC0040 was grown with the addition of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CNRZ117 liquid culture clear supernatant, which induces the thermophilin production. Total RNA was isolated, of which the mRNA of the putative genes was amplified by RT-PCR and appropriate primers. The results showed that the cotranscribed reading frames corresponded to a) ABC transporter biosynthetic gene (*blpA*), helper carrier protein gene (*blpB*) κα1 inducer peptide gene (*blpC*), b) bacteriocin biosynthetic peptide(s) and putative immunity protein(s) genes and c) genes, whose products are responsible for the bacteriocine modification against a wide range of bacteria. Transcription of the frames corresponding to quorum sensing regulatory system genes (*blpH*, *blpR*) was not observed. These results are in agreement with similar ones obtained for the bacteriocin production in *S. thermophilus* LMD9 and will be further studied by northern analysis.

3.3. Μελέτη συμμεταφοράς του είδους *Pseudomonas putida* και σωματιδίων καολινίτη σε κορεσμένα πορώδη μέσα

Βασιλειάδου Ι.Α. & Κ.Β. Χρυσικόπουλος

Εργαστήριο Τεχνολογίας του Περιβάλλοντος, Τμήμα Πολιτικών Μηχανικών,
Πανεπιστήμιο Πατρών, 26500 Πάτρα

Email: ivasiliadou@upatras.gr

Ενας μεγάλος αριθμός από επιβλαβή σωματίδια, συμπεριλαμβανομένων και των βιοκολλοειδών (π.χ. βακτήρια και ιοί), συναντώνται πολύ συχνά κάτω από την επιφάνεια του εδάφους, όχι μόνο αιωρούμενα στην υγρή φάση, αλλά και προσροφημένα σε άλλα κολλοειδή σωματίδια (π.χ. άργιλος, χουμικές ενώσεις). Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της μεταφοράς του βακτηριακού είδους *Pseudomonas putida* σε πορώδες μέσο, παρουσία κολλοειδών σωματιδίων καολινίτη. Αρχικά, πραγματοποιήθηκαν πειράματα για κάθε ένα είδος σωματιδίων ξεχωριστά σε στήλη με πληρωτικό υλικό γυάλινες σφαίρες, υπό διαφορετική ενδοπορώδη ταχύτητα νερού, για να καθοριστούν τα χαρακτηριστικά της μεταφοράς τους. Τέλος, εκτελέστηκαν πειράματα σε στήλη για τη μελέτη της συμμεταφοράς του είδους *Ps. putida* και των σωματιδίων καολινίτη, όταν αυτά εισέρχονται ταυτόχρονα στο πορώδες μέσο. Παρατηρήθηκε ότι η παρουσία του καολινίτη εμποδίζει τη μεταφορά των βακτηρίων και μειώνει την επανάκτηση της μάζας τους, λόγω της προσρόφησης των βακτηρίων στον καολινίτη που έχει προσκολληθεί στο πορώδες μέσο. Η κατανόηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ διαφορετικών κολλοειδών σωματιδίων μπορεί να φανεί χρήσιμη στην εφαρμογή ενός σχεδίου βιο-αποκατάστασης υπόγειων υδάτων.

3.3. Co-transport of *Pseudomonas putida* and kaolinite colloid particles through water saturated porous media

Vasiliadou I.A. & C.V. Chrysikopoulos

Environmental Engineering Laboratory, Civil Engineering Department, University of Patras, Patras 26500, Greece

E-mail: ivasiliadou@upatras.gr

Numerous contaminants, including biocolloids (e.g. bacteria and viruses), are frequently present and mobile in the subsurface not only suspended in the aqueous phase, but also sorbed onto other mobile colloid particles (e.g. clays, humic substances). The present study focuses on the transport of bacteria species *Pseudomonas putida* in porous media in the presence of suspended kaolinite colloid particles. Initial transport experiments were performed, under various flow conditions in water saturated columns packed with glass beads, with bacteria and kaolinite alone in order to better understand their individual transport characteristics. Finally, *Pseudomonas putida* and kaolinite colloid particles were injected simultaneously into the packed column in order to investigate their co-transport behavior. The flowthrough experimental data suggest that the presence of clay particles inhibit the transport and reduce the mass recovery of bacteria, due to bacteria attachment onto kaolinite particles, which were retained by the solid matrix. The results of this study may be useful in the restoration of contaminated aquifer systems.

3.4. Έλεγχος της Κυτταρινολυτικής και Ξυλανολυτικής Δράσης σε Θερμόφιλα Βακτηριακά Στελέχη του Ηφαιστειακού Συμπλέγματος της Σαντορίνης

Γαλανοπούλου Α.Π., Σταθοπούλου Π.Μ., Ανασοντζής Γ.Ε., Καραγκούνη Α.Δ. &
Δ.Γ. Χατζηνικολάου

Ομάδα Μικροβιολογίας, Τομέας Βοτανικής, Τμήμα Βιολογίας ΕΚΠΑ,
Πανεπιστημιούπολη, 157 84 Ζωγράφου, Αττική.

E-mail: xatzdim@biol.uoa.gr

Η κυτταρίνη και η ξυλάνη απαντούν στο κυτταρικό τοίχωμα των φυτικών κυττάρων. Ως κύριο συστατικό του ξύλου αγγειοσπέρμων και γυμνοσπέρμων, αποτελούν τις πλέον άφθονες ανανεώσιμες πηγές άνθρακα. Οι κυτταρινάσες και οι ξυλανάσες, ένζυμα υπεύθυνα για τη διάσπαση των παραπάνω πολυσακχαριτών, συγκεντρώνουν το βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον και βρίσκουν εφαρμογές σε διάφορους τομείς της βιομηχανίας (τρόφιμα, οινοποιία, ζυθοποιία, ζωοτροφές, βιομηχανία χαρτιού, κλωστοϋφαντουργία και απορρυπαντικά) της γεωργίας και της βασικής έρευνας. Σκοπός της παρούσας εργασίας, είναι ο έλεγχος της κυτταρινολυτικής και ξυλανολυτικής δράσης σε 102 βακτηριακά στελέχη τα οποία συνιστούν τράπεζα βακτηριακών στελεχών του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας (Τμήμα Βιολογίας – ΕΚΠΑ). Τα στελέχη αυτά συλλέχθηκαν από επιλεγμένες οικοθέσεις του ηφαιστειακού συμπλέγματος της Σαντορίνης και παρουσιάζουν θερμόφιλη συμπεριφορά και φυλογενετική συγγένεια με τα γένη *Bacillus* και *Geobacillus*. Η ενζυμική ενεργότητα των παραπάνω στελεχών προσδιορίστηκε με δύο διαφορετικές μεθόδους: Αρχικά έγινε ποιοτική εκτίμηση της κυτταρινολυτικής και ξυλανολυτικής ικανότητας των βακτηριακών στελεχών σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα μέσω εξειδικευμένης χρωματικής αντίδρασης. Τα αποτελέσματα της παραπάνω διαδικασίας έδειξαν πώς το 70 % των βακτηρίων παρουσιάζει εξωκυτταρική ξυλανολυτική ικανότητα, ενώ το 7 % παρουσιάζει ταυτόχρονη εξωκυτταρική ξυλανολυτική και κυτταρινολυτική ικανότητα. Κανένα στέλεχος δεν παρουσίασε μόνο κυτταρινολυτική δράση. Για το δεύτερο στάδιο της εργασίας επιλέχθηκαν 15 στελέχη, τα οποία αναπτύχθηκαν σε υγρές καλλιέργειες με χρήση διαφορετικών πηγών άνθρακα (κελλοβιόζη, κυτταρίνη, ξυλόζη, ξυλάνη και θρυμματισμένος σπάδικας καλαμποκιού). Προσδιορίστηκαν βιοχημικά η εξωκυτταρική κυτταρινολυτική και ξυλανολυτική δράση αλλά και η ενεργότητα της β-γλυκοσιδάσης και β-ξυλοσιδάσης των επιλεγμένων στελεχών ύστερα από ανάπτυξη σε κάθε μία από τις προαναφερόμενες πηγές άνθρακα. Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων κατέδειξε ανίχνευση μόνο κυτταρινολυτικής ή/ και ξυλανολυτικής εξωκυτταρικής δράσης, ενώ κανένα στέλεχος δεν παρουσίασε εξωκυτταρική δράση β-γλυκοζιδάσης ή β-ξυλοζιδάσης. Μελετήθηκε, επίσης η επαγωγική δράση του κάθε υποστρώματος και η χρονική εξέλιξη της ενζυμικής παραγωγής και έκκρισης. Τέλος, επιλέχθηκαν 4 στελέχη τα οποία παρουσίασαν την υψηλότερη ενζυμική δράση για περαιτέρω μελέτη και πιθανή αξιοποίηση τους σε βιοτεχνολογικές εφαρμογές.

3.4. Evaluation of Cellulolytic and Xylanolytic Activities from Thermophilic Bacterial Strains Isolated from the Volcano Island of Santorini, Greece

Galanopoulou A.P., Stathopoulou P.M., Anasontzis G.E., Karagouni A.D. & D.G. Hatznikolaou

Microbiology Group, Department of Botany, Faculty of Biology, National and Kapodistrian University of Athens, 157 84 Zografou, Attica Greece.

E-mail: xatzdim@biol.uoa.gr

Cellulose and xylane, the main components of plant biomass, are considered as the most abundant, renewable carbon sources. Extensive research on cellulases and xylanases, the enzymes responsible for the degradation of these polysaccharides, has brought out their biotechnological potential in various commercial applications, including food, beverage, textile and detergent industries. The aim of the present work was the evaluation of the cellulolytic and xylanolytic activities of 102 thermophilic bacterial strains, isolated from the volcanic island of Santorini, Greece. All strains are characterized by their phylogenetical resemblance to *Bacillus* and *Geobacillus* species. The bacterial enzymatic activity was assessed both qualitatively (solid state plate assays) and quantitatively (submerged cultures supernatant). The results from the plate assays using specific chromogenous reagents revealed that 70% of the strains exhibited extracellular xylanolytic action, while 7% presented both xylanolytic and cellulolytic activities. None of the examined bacterial strains showed single cellulolytic activity. 15 strains were further selected based on their relative enzymatic efficiencies in plate cultures, and they were grown in liquid media using different carbon sources (cellobiose, cellulose, xylose, xylane and corn cob). The time course of cellulose, xylanase, β -glucosidase and β -xylosidase activity was examined in all culture supernatants. All stains exhibited significant cellulolytic and/or xylanolytic extracellular activities on most of the examined substrates. We were not able to detect any direct correlation between the solid state and submerged enzyme activities. In addition, neither β -glycosidic nor β -xylosidic activity could be detected in any of the culture supernatants. Four strains with the highest enzymatic activity were selected for further research and potential exploitation in biotechnological applications.

3.5. Παραγωγή επιφανειοδραστικών παραγόντων από ζύμες καλλιεργούμενες σε γλυκερόλη

Γιαννόπουλος Α., Μακρή Α. & Γ. Αγγελής

Εργαστήριο Μικροβιολογίας, Τομέας Γενετικής, Βιολογίας Κυττάρου και Ανάπτυξης, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών, Πάτρα, 265 04-GR

E-mail: George.Aggelis@upatras.gr

Οι βιοεπιφανειοδραστικοί παράγοντες είναι ουσίες που παράγονται από μικροοργανισμούς. Μετά τη βιοσύνθεσή τους εξέρχονται από το μικροβιακό κύτταρο και είτε παραμένουν προσκολλημένες στην επιφάνειά του, είτε εκκρίνονται στο εξωκυτταρικό περιβάλλον. Οι ενώσεις αυτές συντίθενται μέσω δύο μεταβολικών οδών, αυτή των υδρογονανθράκων που οδηγεί σε σύνθεση των υδρόφοβων τμημάτων και αυτή των υδατανθράκων που οδηγεί σε σύνθεση των υδρόφιλων τμημάτων. Λόγω του αμφίφιλου χαρακτήρα τους έχουν την ικανότητα να σχηματίζουν γαλακτώματα και να μειώνουν την επιφανειακή και διεπιφανειακή τάση του μέσου. Η δομή και η γαλακτωματοποιητική ικανότητα των βιοεπιφανειοδραστικών παραγόντων εξαρτώνται όχι μόνο από το στέλεχος, αλλά και από τις συνθήκες καλλιέργειας.

Στην παρούσα έρευνα εξετάζεται η ικανότητα παραγωγής βιοεπιφανειοδραστικών παραγόντων από διάφορα στελέχη ζυμών καλλιεργούμενων σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα γλυκερόλη. Οι *Cryptococcus curvatus*, *Pichia ciferrii*, *Candida diddensiae*, *C. guilliermondi* και *C. tropicalis* είναι μερικές από τις ζύμες που χρησιμοποιήθηκαν. Καλλιεργήθηκαν σε κωνικές φιάλες Erlenmeyer 250 cc, σε T=28° C σε θρεπτικό υλικό με μοναδική πηγή άνθρακα και ενέργειας γλυκερόλη, και μελετήθηκε η επίδραση μερικών παραμέτρων (όπως της συγκέντρωσης του διαλυμένου οξυγόνου, του pH, διαφόρων περιοριστικών για την αύξηση παραγόντων, του λόγου C/N στο μέσο καλλιέργειας κλπ) στην αύξηση, τη συσσώρευση αποθεματικού λίπους και στη σύνθεση επιφανειοδραστικών παραγόντων. Ενδεικτικά, αναφέρεται πως τα στελέχη *C. curvatus*, *C. tropicalis* και *C. diddensiae* παρουσιάζουν γαλακτωματοποιητική δραστηριότητα της τάξης των 3,28 U/g DW, 1,16 U/g DW και 3,02 U/g DW, αντίστοιχα, ύστερα από 96 h καλλιέργειας, ενώ συσσωρεύουν περίπου 7% λιπίδια στην κυτταρική μάζα.

Λέξεις κλειδιά: Βιοεπιφανειοδραστικοί παράγοντες, γλυκερόλη, ζύμες, *Cryptococcus curvatus*.

3.5. Production of biosurfactants from yeasts cultivated on glycerol

Giannopoulos A., Makri A. & G. Aggelis

Unit of Microbiology, Division of Genetics, Cell and Development Biology,
Department of Biology, University of Patras, 26504, Patras-GR

E-mail: George.Aggelis@upatras.gr

Biosurfactants are compounds produced on microbial cell surfaces or excreted extracellularly. Two primary metabolic pathways, namely, hydrocarbon and carbohydrate, are involved in the synthesis of their hydrophobic and hydrophilic moieties, respectively. Due to their amphipathic character, they are able to form emulsions and also, aggregate at interfaces, causing a reduction in surface and interfacial tensions. The chemical composition and emulsifying activity of biosurfactants depend not only on the producer strain but also on the culture conditions.

In the present study, we evaluate the potency of various yeast strains to synthesize surfactants using glycerol as carbon substrate. *Cryptococcus curvatus*, *Pichia ciferrii*, *Candida diddensiae*, *C. guilliermondi* and *C. tropicalis* are among the tested yeasts. They were cultivated in 250 cc erlenmeyer flasks, at T=28° C in a medium contained glycerol as the sole carbon and energy source, and the effect of several parameters (such as T, dissolved oxygen, pH, nutritional limitations, C/N ratio etc) on the growth, reserve lipid accumulation and biosurfactant synthesis, were studied. Indicatively, we report that *C. curvatus*, *C. tropicalis* and *C. diddensiae* present emulsifying activities of 3.28 U/g DW, 1.16 U/g DW and 3.02 U/g DW, respectively, after 96 h of incubation, while about 7% of lipids were accumulated in their cells.

Keywords: Biosurfactants, glycerol, yeasts, *Cryptococcus curvatus*.

3.6. Μικροβιολογική ποιότητα φρέσκου μαλακού τυριού τύπου 'γαλοτύρι' παρασκευασμένο από αγελαδινό μικροδιηθημένο γάλα

Zώτου A.¹, Νίκας E.², Ακτύπης A.¹, Μοσχοπούλου A.¹ & I. Κανδαράκης¹

¹ Εργαστήριο Γαλακτοκομίας, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων,
Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιερά Οδός 75, 11855 Αθήνα

² Τμήμα Ζωικής Παραγωγής και Υδατοκαλλιεργειών, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο
Αθηνών, Ιερά Οδός 75, 11855 Αθήνα

Email: aktyp@hua.gr

Στην εργασία αυτή παρασκευάσθηκε φρέσκο τυρί από μικροδιηθημένο αγελαδινό γάλα (τυρί M) με σκοπό να μελετηθούν τα μικροβιολογικά του χαρακτηριστικά του σε σύγκριση με το τυρί που παρασκευάζεται από παστεριωμένο γάλα (τυρί Π). Η ολική μεσόφιλη χλωρίδα του μικροδιηθημένου γάλακτος που χρησιμοποιήθηκε (5×10^2 cfu/ml) ήταν σημαντικά χαμηλότερη αυτής του παστεριωμένου γάλακτος (2.7×10^3 cfu/ml), ενώ υπήρξε πλήρης απουσία κολοβακτηριοειδών και ζυμών έναντι του παστεριωμένου όπου η παρουσία ζυμών ήταν αισθητή (5.8×10^2 cfu/ml). Όσον αφορά στους παθογόνους μικροοργανισμούς, και στα δύο επεξεργασμένα γάλατα που χρησιμοποιήθηκαν δεν ανιχνεύτηκαν *Listeria* spp., *Salmonella* spp. και *Staphylococcus aureus* σε αντίθεση με το αρχικό νωπό γάλα όπου η παρουσία *Listeria monocytogenes* και *S. aureus* ήταν ανιχνεύσιμη. Ως εκ τούτου, οι ίδιοι μικροοργανισμοί απουσίαζαν παντελώς και από τα δύο παραγόμενα φρέσκα τυριά τα οποία μελετήθηκαν μέχρι τις 15 ημέρες της διατήρησής τους στον 4°C. Οι πληθυσμοί της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας και των θερμόφιλων οξυγαλακτικών κόκκων δεν διέφεραν μεταξύ των δύο τυριών από την 1^η και μέχρι τις 15 ημέρες διατήρησής τους. Αντίθετα, στις 15 ημέρες, ο πληθυσμός των μη εναρκτήριων οξυγαλακτικών μικροοργανισμών (NSLAB) ήταν υψηλότερος κατά μία λογαριθμική μονάδα (4.4 cfu/g) στο τυρί M από ότι στο τυρί Π (3.11 cfu/g), παρόλο που οι πληθυσμοί την 1^η ημέρα ήταν παρόμοιοι. Επίσης, στις 15 ημέρες ο πληθυσμός των μεσόφιλων οξυγαλακτικών κόκκων διέφερε κατά μία λογαριθμική μονάδα μεταξύ των τυριών και συγκεκριμένα ήταν 6.8 cfu/g και 7.9 cfu/g στο τυρί M και Π αντίστοιχα. Όσον αφορά τους γαλακτοβακίλους, αυτοί ήταν αρχικά 3.2 cfu/g και 5.22 cfu/g στα τυριά Π και M αντίστοιχα, ενώ μετά την 7^η ημέρα ήταν περίπου 3.5 cfu/g και στα δύο τυριά. Τέλος, μετά την 7^η ημέρα η ύπαρξη ζυμών και μικήτων και στα δύο τυριά ήταν υψηλή (5.6 cfu/g), γεγονός το οποίο αποδόθηκε στην έλλειψη προσθήκης συντηρητικών. Συμπερασματικά, η μικροβιολογική ποιότητα φρέσκου τυριού δεν φαίνεται να επηρεάζεται σημαντικά από τη χρήση μικροδιηθημένου γάλακτος.

3.6. Microbiological quality of fresh ‘Galotyri type’ cheese made from microfiltrated bovine milk

Zotou A.¹, Nikas E.², Aktypis A.¹, Moschopoulou E.¹ & I. Kandarakis¹

¹ Dairy Laboratory, Food Science and Technology Dpt., Agricultural University of Athens, Iera Odos 75, 11855 Athens

² Animal Science and Aquaculture Dpt., Agricultural University of Athens, Iera Odos 75, 11855 Athens

Email: aktyp@hua.gr

In this study soft fresh cheese was prepared from fresh cows’ milk processed by the microfiltration technique aiming to study the microbiological characteristics of this cheese (cheese M), in relation with those of cheeses produced by pasteurized cows’ milk (cheese P). The total mesophilic microflora of microfiltrated milk (5×10^2 cfu/ml) was significant lower than that of the pasteurized milk (2.7×10^3 cfu/ml) and coliforms and yeasts were totally absent comparing with that in pasteurized milk, where yeasts counts were 5.8×10^2 cgu/ml. In both, microfiltrated and pasteurized milk, pathogen microorganisms such as *Listeria*, *Salmonella* spp. and *Staphylococcus aureus* were not detected, although *Listeria monocytogenes* and *S. aureus* had been detected in raw milk. Consequently, these microorganisms were totally absent in the two cheeses during their preservation for 15 days of at 4 °C. The counts of total mesophilic microflora and thermophilic lactococci did not differ between the two cheeses throughout the keeping period. In contrast, the counts of Non Starter Lactic Acid Bacteria (NSLAB) in cheese M (4.4 cfu/g) at the 15 days was one log unit higher than in cheese P (3.11 cfu/g), although the initial counts were similar at the 1st day. In addition, at the 15 days, the counts of mesophilic lactococci in cheese M and P were 6.8 cfu/g and 7.9 cfu/g respectively. Regarding lactobacilli counts, initially they were 3.2 cfu/g and 5.22 cfu/g in cheese M and P respectively, while after the 7th day, they were in both cheeses about 3.5 cfu/g. Finally, after the 7th day yeasts and moulds counts were high (5.6 cfu/g) in both cheeses and this fact was attributed to lack of preservatives. Concluding, it seems that the microbiological quality of a fresh lactic acid cheese does not affected significantly by the use of microfiltrated milk.

3.7. Μελέτη των βιοχημικών χαρακτηριστικών αντιμυκητιακών μεταβολιτών που παράγονται από ενδογενή στελέχη Στρεπτομυκήτων

Κανινή Γ., Σταθοπούλου Μ. Π., Χατζηνικολάου Δ. & Α.Δ. Καραγκούνη

Εργαστήριο Μικροβιολογίας, Τομέας Βοτανικής, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών, 15784 Αθήνα

Email: gkanini@biol.uoa.gr

Στελέχη Στρεπτομυκήτων απομονωμένα από διαφορετικά ενδιαιτήματα της Ελλάδας, με ιδιαίτερα οικοφυσιολογικά χαρακτηριστικά, επιλέχθηκαν με κριτήριο την αντιμυκητιακή τους ικανότητα έναντι του κοινού φυτοπαθογόνου μύκητα *Rhizoctonia solani*. Η αντιμυκητιακή τους ικανότητα εξετάστηκε με πειράματα ανταγωνισμού *in vitro* που τροποποιήθηκαν κατάλληλα για τη συγκεκριμένη εργασία. Επιπλέον, εξετάστηκε η επίδραση διαφορετικών περιβαλλοντικών συνθηκών, όπως οι πηγές άνθρακα και αζώτου, η θερμοκρασία και το pH, ώστε να επιλεγούν οι συνθήκες που επάγουν την μέγιστη αντιμυκητιακή δράση των Στρεπτομυκήτων. Χρησιμοποιώντας τα στελέχη που επέδειξαν την μέγιστη αντιμυκητιακή ικανότητα σε συγκεκριμένες συνθήκες η μελέτη κατευθύνθηκε προς τον βιοχημικό και φυσιολογικό χαρακτηρισμό του φαινομένου. Εκχυλίσματα στερεών καλλιεργειών Στρεπτομυκήτων συλλέχθηκαν, συμπυκνώθηκαν και κλασματώθηκαν με χρωματογραφία μοριακής διήθησης. Τα κλάσματα που εμφάνισαν αντιμυκητιακή δράση χρησιμοποιήθηκαν για περαιτέρω μελέτη.

3.7. Investigation of the biochemical nature of antifungal metabolites produced from Greek indigenous Streptomyces

Kanini G., Stathopoulou M. P., Hatzinikolaou D.G. & A.D. Karagouni

Laboratory of Microbiology, Sector of Botany, Department of Biology, University of Athens, 15784 Zografou, Attica, GREECE

Email: gkanini@biol.uoa.gr

Streptomyces isolates from diverse Greek habitats with specific ecophysiological characteristics were selected for their antifungal activity against the common phytopathogenic fungi *Rhizoctonia solani*. Antifungal activity was examined by an *in vitro* antagonistic bioassay specifically developed for this particular study. The influence of different environmental conditions, such as medium composition, temperature and pH, on the expression of the antifungal activity was thoroughly examined. Using the *Streptomyces* isolates that showed the highest antifungal activity under most environmental conditions, we initiated an effort towards the elucidation of the biochemical and physiological nature of the antagonistic activity. Extracts from solid streptomycete cultures under antagonistic conditions were concentrated and fractionated. Certain fractions that revealed significant antifungal activity were further studied.

3.8. Το χρωμοφόρο φυκοκυανοχολεΐνη από Σπειρουλίνα ως ένας πιθανός φωτοευαισθητοποιητής για φωτοδυναμική θεραπεία. Αλληλεπίδραση με βιομόρια

Κουκουράκη Π.Σ.^{*}, Σοφικίτη Α.^{*}, Σωτηρούδης Θ.Γ. & Φ.Ν. Κολίσης

Ινστιτούτο Βιολογικών Ερευνών και Βιοτεχνολογίας, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών, Λεωφ.
Βασ. Κωνσταντίνου 48, Αθήνα 11635

Email: tsotir@iee.gr

Η σπειρουλίνα (*Spirulina*) είναι ένα μικροσκοπικό νηματώδες κυανοπράσινο μικροφύκος που σήμερα ονομάζεται Αρθροσπέιρα (*Arthrospira*) και ανήκει στα κυανοβακτήρια. Έχει μακρά ιστορία ως ένα ασφαλές μη-τοξικό διατροφικό προϊόν και το πρόσφατο ενδιαφέρον για πιθανές θετικές επιδράσεις της στην υγεία οφείλεται κυρίως στην χημική της σύσταση, αφού ορισμένα κύρια βιοδραστικά συστατικά της, όπως η πρωτεΐνη φυκοκυανίνη και το χρωμοφόρο φυκοκυανοχολεΐνη, το γλινολενικό οξύ και ορισμένοι πολυσακχαρίτες, έχουν ευεργετικά αποτελέσματα στη υγεία του καταναλωτή.

Πρόσφατες ερευνητικές μας δραστηριότητες έχουν εστιαστεί στην μελέτη βιοχημικών δράσεων της φυκοκυανίνης και της φυκοκυανοχολεΐνης (PCB) (η PCB αποτελεί το ανοικτής αλυσίδας τετραπυρρολικό χρωμοφόρο της φυκοκυανίνης), με στόχο την εκτίμηση της πιθανής τους χρήσης στην φωτοδυναμική θεραπεία (PDT). Η PDT αποτελεί μία πολλά υποσχόμενη θεραπευτική μεθοδολογία για ορισμένες ασθένειες και κυρίως του καρκίνου στην οποία, φως, O₂, και ένα φάρμακο με ιδιότητες φωτοευαισθητοποιητή συνδυάζονται για την δημιουργία θεραπευτικού αποτελέσματος. Στην περίπτωση αυτή, ο τρόπος παροχής και το φάσμα οπτικής απορρόφησης του φωτοευαισθητοποιητή είναι παράγοντες ύψιστης σημασίας¹.

Εξετάσαμε την αλληλεπίδραση της PCB, που απομονώθηκε από φυκοκυανίνη Σπειρουλίνας, με διάφορα βιομόρια. Αποδείχθηκε ότι το χρωμοφόρο αυτό: (i) Είναι αναστολέας καταλυτικών δράσεων λιπάσης και αλκαλικής φωσφατάσης, (ii) Τροποποιεί ομοιοπολικά βιολογικά μακρομόρια, όπως πρωτεΐνες, ανιοντικοί πολυσακχαρίτες και DNA, (iii) Αλληλεπιδρά ισχυρά με ανιοντικά, κατιοντικά και μη-ιοντικά αμφίφιλα μόρια, (iv) Παρουσιάζει χρονοεξαρτώμενες UV-Vis φασματοσκοπικές μεταβολές σε ρυθμιστικά διαλύματα αλκαλικού pH. Ορισμένες από τις φασματοσκοπικές μεταβολές που παρατηρήθηκαν στα παραπάνω πειράματα είναι δυνατόν να οφείλονται σε τροποποίηση ενός πυρρολικού δακτυλίου της PCB ανάλογη με αυτήν που παρατηρήθηκε κατά τον σχηματισμό προϊόντων προσθήκης της PCB με ιμιδαζόλιο ή μερκαπτοαιθανόλη². Τα αποτελέσματα αυτά είναι δυνατόν να βοηθήσουν στην ανάπτυξη ειδικών παραγώγων της PCB για να χρησιμοποιηθούν στην PDT.

Οι Π.Σ.Κουκουράκη και Α.Σοφικίτη συνεισέφεραν εξ ίσου στην εργασία αυτή

¹Nyman, S & Hyyninen, P.V. (2004) *J.PhotochemPhotobiol. B*, 73,1

²Tu, J.-M. et al. (2009) *JACS* 131,5399

3.8. Phycocyanobilin Chromophore from *Spirulina* as a potential Photosensitizer for Photodynamic Therapy. Interactions with Biomolecules

Koukouraki P.S.* , Sofikiti A.* , Sotiroudis T.G. & F.N. Kolisis

Institute of Biological Research and Biotechnology, National Hellenic Research Foundation, 48 Vassileos Constantinou Avenue, Athens 116 35, Greece

Email: tsotir@eie.gr

Spirulina, now named *Arthrospira*, is a microscopic and filamentous cyanobacterium, belonging to blue-green algae. It has a long history of use as a safe food lacking toxicity. Recent interest on potential health effects of *Spirulina* is mainly due to its chemical composition. In this respect, some major bioactive components of *Spirulina* seem to play significant role in these health beneficial effects: the protein phycocyanin, γ -linolenic acid and various polysaccharide preparations.

Research activities of our Institute have been recently focused on biochemical actions of phycocyanin and phycocyanobilin (PCB), the open chain tetrapyrrole chromophore of phycocyanin, in order to evaluate their potential use in photodynamic therapy (PDT). PDT is a promising new treatment modality for several diseases, most notably cancer. In PDT, light, O_2 , and a photosensitizing drug are combined to produce a selective therapeutic effect where the mode of photosensitizer drug delivery and its absorption spectrum are of paramount importance¹.

We have examined the interaction of PCB, isolated from purified *Spirulina* phycocyanin, with a variety of biomolecules. We have found that this chromophore: (i) It is an efficient inhibitor of both lipase and alkaline phosphatase activities, (ii) It covalently modifies biological macromolecules, including proteins, anionic polysaccharides and DNA, (iii) It strongly interacts with anionic, cationic and non-ionic amphiphiles, (iv) It shows time-dependent UV-Vis spectral changes in alkaline pH buffers. Some of the absorption spectral changes of PCB observed in the above experiments may be due to a modification of a pyrrole PCB ring analogous to that observed with the formation of imidazole or mercaptoethanol-PCB adducts². These results may help the development of specific PCB derivatives for use in PDT.

*P.S.Koukouraki and A. Sofikiti contributed equally to this work

¹Nyman, S & Hynninen, P.V. (2004) *J.PhotochemPhotobiol. B*, 73,1

²Tu, J.-M. et al. (2009) *JACS* 131,5399

3.9. Λιγνιλολυτικά Ένζυμα Βασιδιομυκήτων της Ελλάδας

Κουλουμπής Σ.Χ.¹, Καψανάκη-Γκότση Ε.¹, Γκόνου-Ζάγκου Ζ.¹ & Δ.Γ.
Χατζηνικολάου²

¹Τομ. Οικολογίας και Ταξινομικής, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών,
Πανεπιστημιούπολη, 157 84 Αθήνα

²Τομ. Βοτανικής, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών, Πανεπιστημιούπολη,
157 84 Αθήνα

Email: skoulbiol@gmail.com

Οι Βασιδιομύκητες παρουσιάζουν σημαντικό οικολογικό και βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον, λόγω της ικανότητάς τους να αποσυνθέτουν μια μεγάλη ποικιλία οργανικών ενώσεων που έχουν δομή παρόμοια με της λιγνίνης. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της παραγωγής και της συνεργιστικής δράσης ποικίλων εξωκυτταρικών ενζύμων, σημαντικότερα εκ των οποίων είναι οι λακκάσες (Lac), οι υπεροξειδάσες της λιγνίνης (LiP) και οι υπεροξειδάσες του μαγγανίου (MnP).

Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η ανίχνευση και η παραγωγή της Lac, MnP και LiP σε 12 στελέχη Βασιδιομυκήτων, προερχόμενα από ελληνικά φυσικά οικοσυστήματα. Τα στελέχη είχαν ήδη αξιολογηθεί για τη λιγνιλολυτική τους δράση με τη χρήση της χρωστικής Poly R-478 και είχαν επιλεγεί μεταξύ στελεχών της Συλλογής Καλλιεργειών Μυκήτων ATHUM του Πανεπιστημίου Αθηνών.

Πραγματοποιήθηκαν στερεές καλλιέργειες σε τρυβλία Petri, με διαφορετικά θρεπτικά υλικά και με την προσθήκη χρωμογόνων υποστρωμάτων για τα συγκεκριμένα ένζυμα. Η παρουσία διαφορετικών χρωματικών ζωνών στο υπόστρωμα γύρω από τις αποικίες, ήταν ενδεικτική για την παραγωγή διαφορετικών ενζύμων. Η Lac ανιχνεύθηκε και στα 12 στελέχη, η MnP σε 8 στελέχη και η Lip σε 2 στελέχη.

Η ικανότητα παραγωγής λιγνιλολυτικών ενζύμων μελετήθηκε και σε υγρές καλλιέργειες με θρεπτικό υλικό πίτυρο σίτου 2% κ.ό. ως πηγή άνθρακα και ενέργειας. Πολύ υψηλή ενεργότητα Lac μετρήθηκε στο υπερκείμενο 11 εκ των 12 στελεχών. Ενεργότητα της MnP ανιχνεύτηκε σε 8 στελέχη, ενώ η ενεργότητα της LiP μόνο σε 2 στελέχη.

Τα αποτελέσματα αυτά ενισχύουν τις ενδείξεις για τη σημαντική λιγνιλολυτική ικανότητα των μελετηθέντων στελεχών Βασιδιομυκήτων.

3.9. Ligninolytic Enzymes of Basidiomycetes from Greece

Kouloumpis S.¹, Kapsanaki-Gotsi E¹, Gonou-Zagou Z¹ & D.G. Hatzinikolaou²

¹Department of Ecology and Systematics, Faculty of Biology, University of Athens,
Panepistimioupoli, GR-157 84 Athens

²Department of Botany, Faculty of Biology, University of Athens, Panepistimioupoli,
GR-157 84 Athens

E-mail: skoulbiol@gmail.com

Basidiomycetes have a great ecological and biotechnological potential because of their ability to decompose a variety of organic compounds with a similar structure to lignin. This is accomplished through the production and synergistic action of several extracellular enzymes, the most important of which are laccases (Lac), lignin peroxidases (LiP) and manganese peroxidases (MnP).

The aim of the present work was the detection and evaluation of Lac, MnP and LiP activities in 12 strains of Basidiomycetes, isolated from Greek natural ecosystems. The strains had already been evaluated for their ligninolytic activity by the use of the dye Poly R-478 and had been selected among several strains of the ATHUM Culture Collection of Fungi.

Solid cultures of the strains were grown in Petri dishes using different media with the addition of specific chromogenic substrates. The plates were examined for the formation of color zones in the medium around the fungal colonies, indicating the production of the corresponding enzymes. Lac was detected in all 12 examined strains, MnP in 8 strains and Lip in 2 strains.

The ligninolytic potential of the strains was also examined in liquid cultures using a minimal salt medium supplemented with 2% w/v wheat bran as the sole carbon and energy source. Very high Lac activity was determined in the culture supernatants of the 11 out of the 12 strains, MnP activity was detected in 8 strains, whereas LiP activity in 2 strains.

These results clearly verify the indications concerning the high lignin degradation capability of the studied fungal strains.

3.10. Προβιοτικές ιδιότητες βακτηρίων και ζυμών και ανοσοτροποποιητική τους δράση στο ραχιαίο αεροθύλακα και στον εντερικό βλεννογόνο

Κουρελής Α.¹, Κοτζαμανίδης Χ.¹, Τέστα Θ.¹, Τζανετάκη-Λιτοπούλου Ε.²,
Τζανετάκης Ν.² & **Μ. Γιάγκου¹**

¹Τομέας Γενετικής, Ανάπτυξης & Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Α.Π.Θ.

²Εργαστήριο Υγιεινής τροφίμων, Τμήμα Γεωπονίας ΑΠΘ

Email: Yiangou@bio.auth.gr

Η ικανότητα μη παθογόνων μικροοργανισμών να αλληλεπιδρούν με τα επιθηλιακά κύτταρα και τα ανοσοκύτταρα του εντερικού βλεννογόνου, δίνει τη δυνατότητα χρησιμοποίησής τους ως προβιοτικά, ζωντανά εμβόλια ή φορείς μεταφοράς και έκφρασης γονιδίων. Τα προβιοτικά προάγουν την υγεία του ξενιστή μέσα από βακτηριακό ανταγωνισμό και ανοσοτροποποίηση, που οδηγεί σε μία κατάσταση «φυσιολογικής φλεγμονής» στο έντερο ώστε να αντιμετωπίσει λοιμώξεις, χρόνιες φλεγμονές ή αλλεργικές αντιδράσεις. Για το χαρακτηρισμό κάποιου μικροοργανισμού ως προβιοτικό απαιτούνται *in vitro* και *in vivo* έλεγχοι.

Προσδιορίστηκαν οι *in vitro* προβιοτικές ιδιότητες σε 35 στελέχη μικροοργανισμών *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Saccharomyces* από τυρί Φέτα και το γαστρεντερικό σωλήνα βρεφών. Στην πλειοψηφία τους ήταν ανθεκτικά σε χαμηλό pH και στα χολικά άλατα, είχαν αντιβακτηριακή δράση, μείωναν τη χοληστερόλη, προσκολλιόντουσαν σε εντεροκύτταρα Caco-2 ή διέγειραν τον πολλαπλασιασμό λεμφοκυττάρων, κριτήρια που τα καθιστούσαν ως πιθανά προβιοτικά. Ο μεγάλος αριθμός τους καθιστούσε δύσκολο τον προσδιορισμό των *in vivo* προβιοτικών ιδιοτήτων τους.

Χρησιμοποιήθηκε το μοντέλο του ραχιαίου αεροθύλακα για την εκτίμηση της ανοσοτροποποιητικής τους δράσης. Προσδιορίστηκε ότι από τα 35 στελέχη που ελέγχθηκαν, 9 παρουσίαζαν ανοσοενισχυτική δράση (χημειόταξη, φαγοκυττάρωση, παραγωγή κυτοκινών) στον αεροθύλακα. Η ενεργοποίηση των παραπάνω ανοσοαποκρίσεων γίνεται με στελεχοειδική αλληλεπίδραση των μικροοργανισμών με τα επιθηλιακά κύτταρα και τα ανοσοκύτταρα του αεροθύλακα. Τα ίδια στελέχη παρουσίασαν επίσης ανοσοτροποποιητική δράση στο λεπτό έντερο έπειτα από στοματική χορήγησή τους. Παρατηρήθηκε στελεχοειδικό πρότυπο επαγγωγής κυτοκινών μέσω συγκεκριμένων TLR υποδοχέων. Συγκεκριμένα στελέχη βελτιώνουν την εντεροπάθεια ποντικών που είναι ευάσθητα στη γλουτένη.

Συμπερασματικά, το μοντέλο του ραχιαίου αεροθύλακα είναι ένα αξιόπιστο σύστημα για τη γρήγορη επιλογή μικροοργανισμών με πιθανή προβιοτική δράση στον εντερικό βλεννογόνο.

3.10. Probiotic properties of bacterial and yeasts and their immunomodulatory activity in the dorsal air pouch and intestinal mucosa

Kourelis A.¹, Kotzamanidis C.¹, Testa T.¹, Tzanetakis N.², Litopoulou-Tzanetaki E.²
& Yiagou M.¹

¹Department of Genetics, Development & Mol. Biol., School of Biology, AUTH

²Laboratory of Food Microbiology & Hygiene, Faculty of Agriculture, AUTH.

Email: Yiagou@bio.auth.gr

Non-pathogenic microorganisms capable to interact with the intestinal mucosa epithelial and immune cells are ideal candidates for use as probiotics, live vaccines or gene carrier and expression vectors. Probiotics exert their health benefits through antibacterial and immunomodulatory activity, resulting in a state of “natural inflammation” in the intestine enabling the host to manage potential infections, chronic inflammations or allergies. *In vitro* as well as *in vivo* tests are required for probiotic characterization.

The *in vitro* probiotic properties of 35 *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Saccharomyces* strains isolated from Feta cheese and infants' gastrointestinal tract were determined. The majority of strains showed *in vitro* probiotic properties such as low pH and bile salt resistance, antibacterial activity, cholesterol reduction ability, Caco-2 adhesion or stimulation of lymphocytes. However, the determination of their *in vivo* probiotic properties would be labor due to the great number of strains.

The dorsal air pouch model was used to evaluate the immunomodulatory activity of 35 strains from which 9 showed immunostimulatory activity (chemotaxis, phagocytosis, cytokine production) after interaction with the air pouch epithelial and immune cells. The above strains also showed immunomodulatory activity in the small intestine after their oral administration. They induced a strain specific cytokine profile through specific TLRs. In addition, selected strains could diminish the symptoms of gluten-sensitive mice enteropathy.

In conclusion, the air pouch could be used as a reliable model for the rapid selection of microorganisms with probiotic activity in the intestinal mucosa.

3.11. Βιοσύνθεση GLA στο μύκητα *Mortierella isabellina* σε ζύμωση στερεάς κατάστασης

Μακρή Α., Μαυρομάτη Μ., Τσελεπή Μ., Φάκας Σ. & Γ. Αγγελής

Εργαστήριο Μικροβιολογίας, Τομέας Γενετικής, Βιολογίας Κυττάρου και Ανάπτυξης, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών, Πάτρα, 265 04 – GR

E-mail: George.Aggelis@upatras.gr

Τα έλαια μονοκύτταρων οργανισμών (SCOs) που περιέχουν πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFAs), όπως το γ-λινολενικό οξύ (GLA), χρησιμοποιούνται ευρέως στη βιομηχανία τροφίμων και φαρμάκων. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η σύσταση των λιπιδίων υφών διαφορετικής ηλικίας του *Mortierella isabellina* ATHUM 2935, σε μια προσπάθεια να συσχετιστεί η βιοσύνθεση του GLA με την αύξηση του μυκηλίου. Για το σκοπό αυτό ο μύκητας καλλιεργήθηκε σε θρεπτικό υλικό PDA όπου μυκηλιακές υφές διαφορετικής ηλικίας δύναται να αποκοπούν κατά μήκος του μυκηλίου και να αναλυθούν ξεχωριστά. Παράλληλα, ο μύκητας καλλιεργήθηκε επί παραπροϊόντων κονσερβοποιίας αχλαδιού, τα οποία παράγονται σε υψηλές ποσότητες στις Μεσογειακές χώρες, για την παραγωγή SCOs πλούσιων σε GLA.

Η σύσταση των λιπιδίων κατά μήκος των μυκηλιακών υφών του *M. isabellina* έδειξε ότι τα νεαρής ηλικίας μυκήλια περιέχουν υψηλά ποσοστά πολικών λιπιδίων (γλυκολιπιδίων, σφιγγολιπιδίων και φωσφολιπιδίων), ενώ τα μεγαλύτερης ηλικίας μυκήλια περιέχουν υψηλό ποσοστό ουδέτερων λιπιδίων. Το ποσοστό των PUFAs στα πολικά λιπίδια των νεαρών μυκηλίων ήταν περίπου 40% (w/w), ποσοστό που μειώθηκε κάτω από 30% (w/w) στα μεγαλύτερης ηλικίας μυκήλια. Αντίθετα, το ποσοστό των PUFAs που περιέχονταν στα ουδέτερα λιπίδια παρουσίασε διακυμάνσεις μεταξύ των διαφόρων ηλικιών. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι η βιοσύνθεση των PUFAs πραγματοποιείται κατά κύριο λόγο στα νεαρής ηλικίας και ταχέως αυξανόμενα μυκήλια, ενώ η βιοσύνθεσή τους μειώνεται στα ώριμα μυκήλια. Παρόμοιο προφίλ παρατηρήθηκε κατά τη διάρκεια ζύμωσης στερεάς κατάστασης επί παραπροϊόντων κονσερβοποιίας αχλαδιού όπου παρήχθησαν σημαντικές ποσότητες λιπιδίων (12% w/w επί ξηρής ζυμωμένης μάζας), που ήταν πλούσια σε GLA.

Λέξεις κλειδιά: GLA, SCOs, *Mortierella isabellina*, ζύμωση στερεάς κατάστασης

3.11. GLA synthesis in *Mortierella isabellina* in solid state fermentation

Makri A., Mavromati M., Tselepi M., Fakas S. & **G. Aggelis**

Unit of Microbiology, Division of Genetics; Cell and Development Biology,
Department of Biology; University of Patras; Patras; 265 04 – GR

Email: George.Aggelis@upatras.gr

Single cell oils (SCOs) containing polyunsaturated fatty acids (PUFAs), such as γ -linolenic acid (GLA), are widely used in food and pharmaceutical industry. In this study, we investigated lipid composition of hyphae of different age of *Mortierella isabellina* ATTHUM 2935, in an effort to establish a correlation between GLA synthesis and mycelial growth. For this purpose the fungus was cultivated on PDA medium, where hyphae of different age can be excised lengthwise the mycelium and analysed individually. On the side, we used *M. isabellina* to produce GLA-rich SCOS from pear pomace, an agro-industrial residue produced in large amounts in several Mediterranean countries.

Lipid composition lengthwise the mycelium of *M. isabellina* demonstrated that young mycelia were rich in polar lipids (glycolipids, sphingolipids and phospholipids), while neutral lipid content increased in aged mycelia. In young mycelia, each polar lipid fraction contained almost 40% (w/w) PUFAs, but this content decreased to less than 30% (w/w) in aged mycelia. On the other hand, PUFAs content in neutral lipids fluctuated slightly with age. These results indicate that PUFAs biosynthesis is favoured in young, fast growing mycelia, while it decreases significantly in aged mycelia. This trend was also observed when we grew *M. isabellina* on pear pomace. Pear pomace cultures yielded significant amounts of lipid, (which reached 12%, w/w in dry fermented mass), while the produced lipid was rich in GLA.

Keywords: GLA, SCOs, *Mortierella isabellina*, solid state fermentation

3.12. Βιοτεχνολογική μετατροπή βιομηχανικής γλυκερόλης σε έλαια μονοκύτταρων οργανισμών (SCOs)

Μακρή Α., Μπέλλου Σ., Μαστορίδου Μ., Μυστριώτη Π., Οντζαρο Γ. & Γ. Αγγελής

Εργαστήριο Μικροβιολογίας, Τομέας Γενετικής, Βιολογίας Κυττάρου και Ανάπτυξης, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών, Πάτρα, 265 04-GR

E-mail: George.Aggelis@upatras.gr

Η βιομηχανική γλυκερόλη, ως το κύριο παραπροϊόν της παραγωγής βιολογικού πετρελαίου (biodiesel) σε μεγάλη κλίμακα, αποτελεί πλέον ένα σημαντικό υπόστρωμα πολλών χημικών και βιοτεχνολογικών εφαρμογών. Η χρήση της ως υπόστρωμα αύξησης ελαιογόνων μικροοργανισμών και παραγωγής SCOS αποτελεί μια δυνητική μέθοδο αξιοποίησης της.

Στην παρούσα εργασία μύκητες του Φύλου Zygomycota (*Cunninghamella echinulata* ATHUM 4411, *Mortierella isabellina* MUCL 15102, *Mortierella ramanniana* MUCL 9235, *Mucor* sp. LGAM 365, *Zygorhynchus moelleri* MUCL 1430, *Thamnidium elegans* CCF-1465) και ζύμες των Φύλων Ascomycota (*Candida oleophila* ATCC 20177, *Zygosaccharomyces ruxii*) και Basidiomycota (*Rhodotorula* sp.) καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο με μοναδική πηγή άνθρακα και ενέργειας βιομηχανική γλυκερόλη και περιοριστικό για την αύξηση παράγοντα την πηγή αζώτου. Η ποσότητα της παραγόμενης βιομάζας ήταν ικανοποιητική για όλα τα στελέχη, ιδιαίτερα για τα *M. ramanniana* (7,26 g/l), *Th. elegans* (6,83 g/l) και *Rhodotorula* sp. (8,0 g/l), και συνοδεύονταν από υψηλά ποσοστά λιπιδίων - % w/w που έφταναν μέχρι 42 %, στους μύκητες (*Th. elegans*) και μέχρι 24 % στις ζύμες (*C. oleophila*). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γ-λινολενικό οξύ – GLA, λόγω των εφαρμογών του στη φαρμακευτική, που βρέθηκε σε αρκετά υψηλά ποσοστά στα έλαια μερικών στελεχών Ζυγομυκήτων (π.χ. *M. isabellina* 7 %, *M. ramanniana* 6 % επί των παραγόμενων λιπαρών οξέων). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι σε κάποια στελέχη (*Z. moelleri*) παρατηρήθηκε έκριση του GLA στο μέσο της καλλιέργειας, ιδιότητα που πιθανόν ανοίγει νέες προοπτικές στη βιοτεχνολογική παραγωγή GLA.

Λέξεις κλειδιά: βιομηχανική γλυκερόλη, SCOs, GLA, Zygomycota, Ascomycota, Basidiomycota

3.12. Biotechnological conversion of raw glycerol into Single Cell Oils (SCOs)

Makri A., Bellou S., Mastoridou M., Mystrioti P., Onjaro G. & G. Aggelis

Unit of Microbiology, Division of Genetics, Cell and Development Biology,
Department of Biology, University of Patras, Patras, 265 04 – GR

E-mail: George.Aggelis@upatras.gr

Raw glycerol, the main by-product of the biodiesel production process in large commercial scale, is a significant carbon source for many chemical and biotechnological applications. Its use as substrate for SCOs production by oleaginous microorganisms should be a potential method for its valorization.

In this study fungi of Phylum Zygomycota (*Cunninghamella echinulata* ATTHUM 4411, *Mortierella isabellina* MUCL 15102, *Mortierella ramanniana* MUCL 9235, *Mucor* sp. LGAM 365, *Zygorhynchus moelleri* MUCL 1430, *Thamnidium elegans* CCF-1465) and yeasts of Phyla Ascomycota (*Candida oleophila* ATCC 20177, *Zygosaccharomyces ruxii*) and Basidiomycota (*Rhodotorula* sp.) were cultivated on raw glycerol under nitrogen limited conditions. The amount of the produced biomass was satisfactory, especially in the case of *M. ramanniana* (7,26 g/l), *Th. elegans* (6,83 g/l) and *Rhodotorula* sp. (8,0 g/l), and was accompanied with high lipid percentage - % w/w reaching 42 %, for the fungi (*Th. elegans*) and 24 % for the yeasts (*C. oleophila*). γ -linolenic acid – GLA, an important fatty acid due to its pharmaceutical applications, was found in the lipids of some strains in remarkable percentage (i.e. *M. isabellina* 7 %; *M. ramanniana* 6 % on total fatty acids produced). It is of high importance to mention that some strains (*Z. moelleri*) excrete GLA in the culture medium, property that may open new perspectives in the biotechnological production of GLA.

Keywords: raw glycerol, SCOs, GLA, Zygomycota, Ascomycota, Basidiomycota

3.13. Βιοτεχνολογική προοπτική της ζύμης *Yarrowia lipolytica* καλλιεργούμενης σε γλυκερόλη

Μακρή Α., Φάκας Σ. & Γ. Αγγελής

Τομέας Γενετικής, Βιολογίας Κυττάρου και Ανάπτυξης, Τμήμα Βιολογίας,
Πανεπιστήμιο Πατρών, Πάτρα, 265 04-GR

Email: George.Aggelis@upatras.gr

Η βιομηχανική γλυκερόλη είναι σημαντικό παραπροϊόν της διεργασίας παραγωγής βιολογικού πετρελαίου (biodiesel) που εφαρμόζεται σήμερα σε μεγάλη κλίμακα. Λαμβάνοντας υπόψη τις τεράστιες ποσότητες που παράγεται και το χαμηλό κόστος της, καθίσταται επείγουσα η αναζήτηση εναλλακτικών τρόπων μετατροπής της σε προϊόντα υψηλής προστιθέμενης αξίας, όπως έλαια μονοκύτταρων οργανισμών (SCOs), κιτρικό οξύ (CA) και διάφορα άλλα προϊόντα. Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της βιοχημικής συμπεριφοράς της μη-συμβατικής ζύμης *Yarrowia lipolytica* καλλιεργούμενης επί γλυκερόλης.

Πραγματοποιήθηκαν επαναλαμβανόμενοι κύκλοι καλλιέργειας σε βιοαντιδραστήρα εργαστηριακής κλίμακας κατά τη διάρκεια των οποίων εξακριβώθηκε η ύπαρξη τριών διακριτών φάσεων αύξησης, με ιδιαίτερα μορφολογικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά: η φάση παραγωγής βιομάζας, η λιπογόνος φάση και η φάση παραγωγής CA. Την υψηλή ενεργότητα (45.53 ± 0.89 Units/mg DW) της NAD⁺ εξαρτώμενης ισοκιτρικής αφυδρογονάσης (NAD⁺-ICDH) κατά τη διάρκεια της φάσης παραγωγής βιομάζας διαδέχθηκε σημαντική πτώση της ενεργότητας της, επάγοντας τη λιπογένεση. Απρόσμενη αποδόμηση των αποθεματικών (ουδέτερων) λιπιδίων και σημαντική βιοσύνθεση γλυκολιπιδίων, σφιγγολιπιδίων και φωσφολιπιδίων παρατηρήθηκε κατά τη διάρκεια της φάσης παραγωγής CA, όπου η ενεργότητα της κινάσης της γλυκερόλης είχε μειωθεί σημαντικά ενώ η ενεργότητα της NAD⁺-ICDH είχε σχεδόν μηδενιστεί. Το ελαϊκό οξύ ήταν το κυριότερο λιπαρό οξύ ενώ η φωσφατιδυλχολίνη το κύριο φωσφολιπίδιο. Συμπερασματικά, η ζύμη *Y. lipolytica* μετατρέπει τη γλυκερόλη μέσω της μεταβολικής οδού της φωσφορυλίωσης της γλυκερόλης σε SCOs και CA, προϊόντα με υψηλό βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον.

Λέξεις κλειδιά: *Yarrowia lipolytica*, αφομοίωση γλυκερόλης, κιτρικό οξύ, SCOs

3.13. The biotechnological potential of *Yarrowia lipolytica* cultivated on glycerol

Makri A., Fakas S. & G. Aggelis

Unit of Microbiology, Division of Genetics, Cell and Development Biology,
Department of Biology, University of Patras, Patras, 265 04 – GR

Email: George.Aggelis@upatras.gr

Glycerol is an important renewable feedstock as it is the principle side-product of the bio-diesel production process, which is nowadays applied on a large commercial scale. Taking into consideration the huge quantities and the low-cost of this substrate it is of urgency to find alternative ways to convert glycerol into value-added products, such as single cell oils (SCOs), citric acid (CA) and various other products. The aim of this work was to investigate the biochemical behavior of the unconventional yeast *Yarrowia lipolytica* grown on glycerol.

The growth of *Y. lipolytica* on glycerol was studied in bioreactor repeated batch cultures and three distinct phases, namely biomass production phase, lipogenic phase and CA production phase were identified during growth cycle. In each phase, yeast cells were characterised by specific morphological and biochemical features. Though high activity (i.e. 45.53 ± 0.89 Units/mg DW) of NAD⁺ dependent isocitric dehydrogenase (NAD⁺-ICDH) was detected during biomass production phase, this activity was significantly decreased afterwards inducing lipogenesis. Surprisingly, storage (neutral) lipid turnover simultaneously occurred with CA production, and happened when glycerol kinase activity was considerably reduced and NAD⁺-ICDH activity was minimised. Remarkable biosynthesis of glycolipids, sphingolipids and phospholipids was observed in the CA production phase. Oleic acid was the major fatty acid in all lipid fractions and phosphatidylcholine was the main phospholipid. This study allows concluding that *Y. lipolytica* successfully converts glycerol via phosphorylation pathway into valuable biotechnological products, such as SCOs and CA.

Keywords: *Yarrowia lipolytica*; glycerol assimilation; citric acid; SCOs

3.14. Βιοαποικοδόμηση *p*-νιτροφαινόλης από το βακτήριο *Pseudomonas putida* DSM 12448: επίδραση της γλυκερόλης και του pH

Μανιάτη Π., Σουσάνογλου Α., Μαμμά Δ., Καλογερής Ε. & Δ. Κέκος*

Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας, Σχολή Χημικών Μηχανικών,

Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, 15780, Αθήνα

*Email: kekos@chemeng.ntua.gr

Οι μελέτες αποικοδόμησης των νιτροαρωματικών ενώσεων, συνήθως πραγματοποιούνται σε χαμηλές συγκεντρώσεις αυτών. Ο σχεδιασμός μιας αποτελεσματικής στρατηγικής βιοαποκατάστασης απαιτεί την αριστοποίηση των παραμέτρων της διεργασίας, στις οποίες περιλαμβάνονται η προσθήκη συμμεταβολιτών και οι φυσικο-χημικές παραμέτροι, προκειμένου ο μικροοργανισμός να αποικοδομεί υψηλές συγκεντρώσεις ρύπων με υψηλούς ρυθμούς αποικοδόμησης. Η παρούσα εργασία είχε ως στόχο τη μελέτη της επίδρασης της γλυκερόλης, η οποία χρησιμοποιείται ως συμμεταβολίτης, στη ικανότητα του βακτηρίου *Pseudomonas putida* DSM 12448 να αποικοδομεί την *p*-νιτροφαινόλη (*p*NP) και της επίδρασης του αρχικού pH καλλιέργειας.

Πολύ ευνοϊκή επίδραση στη βιοαποικοδομητική δράση του βακτηρίου είχε η παρουσία γλυκερόλης, η οποία μπορεί να αποτελέσει πηγή άνθρακα και ενέργειας για το συγκεκριμένο στέλεχος. Ειδικότερα η αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκερόλης (0-10 g/L) οδήγησε σε αύξηση της κυτταρικής μάζας από 49 mg·L⁻¹ (0 g/L) σε 723 mg·L⁻¹ (10 g/L), με ταυτόχρονη αύξηση του ρυθμού αποικοδόμησης της *p*NP. Σε όλες τις συγκεντρώσεις γλυκερόλης που εξετάστηκαν παρατηρήθηκε πλήρης αποικοδόμηση της *p*NP. Η τοξικότητα της *p*NP εξαρτάται ισχυρά από την τιμή pH. Η ρύθμιση του pH σε ελαφρά αλκαλικές (βέλτιστη τιμή pH 7.4) περιοχές μπορεί να βελτιώσει την αποτελεσματικότητα της διεργασίας μικροβιακής αποικοδόμησης νιτροαρωματικών ρύπων αυξάνοντας το ρυθμό μετατροπής τους. Με την εφαρμογή των συνθηκών της παρούσας εργασίας επιτεύχθηκε αποικοδόμηση της *p*NP σε υψηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος (πάνω από 600 mg·L⁻¹) με διατήρηση υψηλών ρυθμών αποικοδόμησης (πάνω από 10 mg·L⁻¹·h⁻¹).

Keywords: *p*-νιτροφαινόλη, *Pseudomonas putida*, γλυκερόλη

3.14. Biodegradation of *p*-nitrophenol by *Pseudomonas putida* DSM 12448: effect of glycerol and pH

Maniatı P., Sousanoglou A., Mamma D., Kalogeris E. & D. Kekos*

Biotechnology Laboratory, School of Chemical Engineering,

National Technical University of Athens, 15780, Athens

*Email: kekos@chemeng.ntua.gr

Degradation of nitro-aromatics is mostly studied at low concentrations. Naturally, no focus has yet been accorded to improve the rate of degradation at higher concentration, either as a function of nutritional supplements or physico-chemical parameters. Most of the reports have focused on the pathways catalysed by various microbes for nitro-aromatic degradation. Designing of an effective remediation strategy, however, demands not only the knowledge of degradative pathway(s), but also warrants optimized process parameters. Keeping in view these limitations, for developing a biotech strategy for *p*-nitrophenol (*p*NP) removal by the bacterial strain *Pseudomonas putida* DSM 12448, effect(s) of added glycerol and pH were evaluated at high concentrations of *p*NP (up to 650 mg L^{-1}), which are inhibitory to most of the organisms reported.

Increasing glycerol concentration (from 0 to 10 g L^{-1}), resulted in enhanced cell mass concentration from 42 mg DCW L^{-1} (0 g L^{-1} glycerol) to $732 \text{ mg DCW L}^{-1}$ (10 g L^{-1} glycerol), which implies that glycerol was used as an additional carbon and energy source by *P. putida* DSM 12448 during *p*NP degradation. Results proved that addition of glycerol enhanced the rate of *p*NP degradation, the stimulation was concentration dependent. *P. putida* DSM 12448 grew in a pH range from 6.5 to 7.9, with a marked optimum at pH 7.4. Toxicity increases with a decrease in pH and hence its degradation is totally inhibited in acidic pH, while alkaline pH reduces toxicity and hence accelerates its metabolism. Thus, there is a strong pH dependence of toxicity on the degradation of *p*NP. Application of optimal conditions resulted in degradation of high concentrations of *p*NP (up to 600 mg L^{-1}) while maintaining high degradation rates ($10 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$).

Keywords: *p*-nitrophenol, *Pseudomonas putida*, glycerol

3.15. *Pseudomonas entomophila* ένα νέο εντομοπαθογόνο βακτήριο: Παρόν και μέλλον

Μόσιαλος Δ.¹, Κοντού Μ.¹, Παπαγιαννούλης Α.¹, Williams H.D.² & B. Lemaitre³

¹Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας Τ.Κ. 41221
Λάρισα

²Department of Life Sciences, Imperial College London, London P.O SW7 2AZ, UK.

³The Global Health Institute, EPFL, Lausanne, P.O. 1015, Switzerland

Email: mosial@bio.uth.gr

Η *Pseudomonas entomophila* ταυτοποιήθηκε πρόσφατα ως η μοναδική Ψευδομονάδα που μολύνει με φυσικό τρόπο και σκοτώνει την *Drosophila melanogaster* (Vodovar *et al.* PNAS 2005; 102: 11414-19). Άλληλούχιση του γονιδιώματος (5.9-Mb) της *P. entomophila* αποκάλυψε πιθανούς μολυσματικούς παράγοντες που εμπλέκονται στην εντομοπαθογένεια αλλά πειραματική απόδειξη για τους περισσότερους δεν υπάρχει ακόμη (Vodovar *et al.*, Nature Biotech. 2006; 24: 673-679). Η πειραματική μόλυνση της *D. melanogaster* από την *P. entomophila* χρησιμοποιείται ως μοντέλο για την μελέτη σε βάθος των αλληλεπιδράσεων ξενιστή-παθογόνου. Πρόσφατα δείξαμε ότι η *P. entomophila* παράγει υδροκυάνιο *in vitro* τοποθετώντας την ανάμεσα στα λίγα βακτήρια που έχουν αυτή την ιδιότητα (Ryall *et al.* Lett. Appl. Microbiol. 2009; 49: 131-135). Κατασκευάσαμε μετάλλαγμα της *P. entomophila* που δεν παράγει υδροκυάνιο και μελετάμε τον ρόλο του υδροκυανίου στην παθογένεια *in vivo*. Επιπλέον χρησιμοποιούμε συγκριτική πρωτεομική για να ταυτοποιήσουμε πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην μόλυνση και παθογένεια της *P. entomophila*. Όσον αφορά την οικολογία και το εύρος ξενιστών της *P. entomophila* λίγα δεδομένα είναι διαθέσιμα προς το παρόν. Εκτός από την *D. melanogaster*, η *P. entomophila* είναι παθογόνο για το *Anopheles gambiae* (αδημοσίευτα αποτελέσματα) και την *Galleria mellonella* (Fedhila *et al.* J. Invertebr. Pathol. in press). Πρόσφατα αναπτύξαμε μία μέθοδο βασισμένη στην PCR για την ανίχνευση της *P. entomophila* σε περιβαλλοντικά δείγματα (Papagiannulis *et al.* Lett. Appl. Microbiol. in press). Η χρήση της μεθόδου μας θα διευκολύνει μελέτες που αποσκοπούν να ταυτοποιήσουν έντομα ξενιστές της *P. entomophila* καθώς και την διασπορά της σε διάφορα ενδιαιτήματα.

Η χρήση των χημικών εντομοκτόνων μειώνεται λόγω των περιβαλλοντικών κινδύνων και η αυξημένη χρήση βιοεντομοκτόνων οδηγεί αναπόφευκτα στην αντοχή των εντόμων. Περαιτέρω έρευνα όσον αφορά το εύρος ξενιστών, τους μηχανισμούς μολυσματικότητας και την αποτελεσματικότητα στο πεδίο είναι απαραίτητη πριν η *P. entomophila* θεωρηθεί δυνητικό βιοεντομοκτόνο. Όμως τα μέχρι τώρα δεδομένα είναι ενθαρρυντικά.

Αέξεις Κλειδιά: Αλληλεπιδράσεις ξενιστή-παθογόνου, Ψευδομονάδα, μολυσματικότητα, βιοεντομοκτόνο

3.15. *Pseudomonas entomophila* a novel entomopathogenic bacterium: Present research and future perspectives

Mossialos D.¹, Kontou M.¹, Papagiannoulis A.¹, Williams H.D.² & B. Lemaitre³

¹Department of Biochemistry & Biotechnology, University of Thessaly, GR-41221 Larissa, Greece

²Department of Life Sciences, Imperial College London, London P.O SW7 2AZ, UK.

³The Global Health Institute, EPFL, Lausanne, P.O. 1015, Switzerland

Email: mosial@bio.uth.gr

Pseudomonas entomophila was recently identified to be the only pseudomonad that naturally infects and induces lethality of *Drosophila melanogaster* (Vodovar *et al.*, PNAS 2005; 102:11414-19). Complete sequencing of the 5.9-Mb *P. entomophila* genome revealed putative virulence factors involved in entomopathogenicity but experimental evidence for most of them is still lacking (Vodovar *et al.*, Nature Biotech. 2006; 24: 673-679). Experimental infection of *D. melanogaster* by *P. entomophila* is currently exploited to study host-pathogen interactions in detail. Recently we demonstrated that *P. entomophila* produces HCN *in vitro* placing it among the few cyanogenic bacteria (Ryall *et al.* Lett. Appl. Microbiol. 2009; 49: 131-135). We constructed a *P. entomophila* mutant impaired in HCN production and currently we are investigating the *in vivo* role of HCN in entomopathogenicity. Moreover we currently use comparative proteomics to identify proteins involved in infection and pathogenicity exerted by *P. entomophila*. Regarding the ecology and insect host range of *P. entomophila* few data are available so far. Apart from *D. melanogaster* *P. entomophila* is virulent towards *Anopheles gambiae* (unpublished results) and *Galleria mellonella* (Fedhila *et al.* J. Invertebr. Pathol. in press). Recently we developed a PCR-based method to detect *P. entomophila* in environmental samples (Papagiannulis *et al.* Lett. Appl. Microbiol. in press). The use of our method will facilitate studies aiming to identify insect hosts of *P. entomophila* as well as its distribution in diverse habitats.

Use of chemical insecticides is in decline due to environmental hazards and the overuse of current bioinsecticides leads inevitably to growing insect resistance. Further research regarding insect host range, virulence mechanisms and killing efficiency in the field is essential before *P. entomophila* could be considered as a biopesticide but nevertheless current data are promising.

Keywords: host-pathogen interactions, *Pseudomonas*, virulence, bioinsecticide

3.16. Κατανομή των λιπαρών οξέων στα λιπίδια των Ζυγομυκήτων

Μπέλλου Σ., Μπίρκου Μ. & Γ. Αγγελής

Τομέας Γενετικής, Βιολογίας Κυττάρου και Ανάπτυξης, Τμήμα Βιολογίας,
Πανεπιστήμιο Πατρών, Πάτρα, 265 04-GR

Τηλ. & Fax: (+30) 2610969260; 2610997808

E-mail: George.Aggelis@upatras.gr

Η γλυκερόλη αποτελεί κατάλληλο υπόστρωμα αύξησης για πολλούς ελαιογόνους μικροοργανισμούς. Οι ελαιογόνοι Ζυγομύκητες *Thamnidium elegans*, *Mortierella ramanniana*, *Mucor* sp., *Zyghorynchus moelleri*, *Cunninghamella echinulata* παρήγαγαν σημαντικές ποσότητες πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFAs) μεταβολίζοντας γλυκερόλη. Αξιοσημείωτη ποσότητα ουδέτερων λιπιδίων (NL) συσσωρεύτηκε στη μυκήλιο μετά την εξάντληση της πηγής αζώτου από το μέσο καλλιέργειας, όπως στην περίπτωση των μυκήτων *Thamnidium elegans* και *Mortierella ramanniana* που έφτασε το 37% και 44% αντίστοιχα, ενώ σε άλλες περιπτώσεις (πχ. *Mucor* sp.) παρατηρήθηκε αποδόμηση του λίπους μετά την εξάντληση της γλυκερόλης από το μέσο καλλιέργειας. Το κλάσμα των γλυκο- και σφιγγο-λιπιδίων δεν παρουσίασε αξιοσημείωτες αλλαγές στην ποσοστιαία αναλογία του ενώ, τα φωσφολιπίδια συντέθηκαν κατά τη διάρκεια τη κυτταρικής αύξησης, είτε πριν την εξάντληση του αζώτου από το μέσο καλλιέργειας, είτε κατά την αποδόμηση του λίπους. Όσον αφορά τη σύσταση των λιπαρών οξέων, τα φωσφολιπίδια ήταν πλούσια σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα κατά τα πρώτα αναπτυξιακά στάδια αν και στη συνέχεια αυτά τα λιπαρά οξέα μετακινήθηκαν σε όλα τα λιπιδιακά κλάσματα. Ειδικότερα το γ-λινολενικό οξύ (GLA) παρουσίασε μείωση σε όλα τα λιπιδιακά κλάσματα κατά την αύξηση σε ορισμένες περιπτώσεις (πχ. *M. ramanniana*), ενώ σε άλλες η μείωση του GLA στο κλάσμα των ουδέτερων λιπιδίων συνοδεύτηκε από μικρή αύξηση της συγκέντρωσης του στα φωσφολιπίδια (πχ. *Mucor* sp.).

Συγκριτικές αναλύσεις λιπιδίων που πραγματοποιήθηκαν σε Ασκομύκητες (*Penicillium* sp., *Aspergillus niger*) απέδειξαν παρόμοια τάση όσον αφορά στη βιοσύνθεση των PUFAs και τη διανομή τους στα διάφορα λιπιδιακά κλάσματα. Έτσι, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι στους Ζυγομύκητες, και πιθανόν σε άλλους νηματοειδείς μύκητες η βιοσύνθεση των PUFAs συμβαίνει στο κλάσμα των φωσφολιπιδίων κατά τα πρώτα αναπτυξιακά στάδια και ακολουθείται από συσσώρευση ουδέτερων λιπιδίων στο μυκήλιο.

Λέξεις κλειδιά: Πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFAs), γλυκερόλη, Ζυγομύκητες, γ-λινολενικό οξύ (GLA)

3.16. Fatty acid distribution in lipids of Zygomycetes

Bellou S., Birkou M. & G. Aggelis

Unit of Microbiology, Division of Genetics; Cell and Development Biology,
Department of Biology; University of Patras; Patras; 265 04 – GR

E-mail: George.Aggelis@upatras.gr

Glycerol is a suitable substrate for many oleaginous microorganisms. The oleaginous Zygomycetes *Thamnidium elegans*, *Mortierella ramanniana*, *Mucor* sp., *Zyghorynchus moelleri* and *Cunninghamella echinulata* produced great amounts of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) by metabolizing glycerol. Significant quantity of neutral lipid (NL) was accumulated into the mycelium after the depletion of the nitrogen source, especially in the case of *Mortierella ramanniana* and *Thamnidium elegans*, where the accumulated lipid reached 44% and 37%, respectively, while in some cases (i.e. *Mucor* sp.) lipid turnover occurred after glycerol exhaustion in the growth medium. The glycolipids plus sphingolipids fraction did not show remarkable changes in proportion, while phospholipids were synthesized during biomass formation (before nitrogen depletion or during lipid turnover). As for fatty acid composition, phospholipids were enriched in PUFAs in the first growth steps, although these fatty acids were migrated in all lipid fractions, afterward. Specifically γ -linolenic acid (GLA) showed decrease in all lipid fractions during fungal growth (i.e. *M. ramanniana*), while in some cases (i.e. *Mucor* sp.) the decrease of GLA concentration in neutral lipids was accompanied by an increase in the polar fraction.

Comparative lipid analysis in Ascomycetes (*Penicillium* sp., *Aspergillus niger*) showed a similar trend for PUFAs (linoleic acid) synthesis and distribution in the various lipid fractions. It is therefore concluded that in Zygomycetes, and probably in others filamentous fungi, PUFAs synthesis occurred in the phospholipid fraction during primary metabolic growth, following by NL accumulation into the fungal mycelium.

Keywords: polyunsaturated fatty acids (PUFAs); glycerol; Zygomycetes; γ -linolenic acid (GLA)

3.17. Ενζυμική επεξεργασία του υπολείμματος βύνης με τη χρήση του πολυενζυμικού συστήματος του *Fusarium oxysporum*.

Ξηρός Χ., Μουκούλη Μ., Τόπακας Ε., Πάσχος Θ. & Π. Χριστακόπουλος

BIOtechMASS Unit, Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας, Σχολή Χημικών Μηχανικών,
Εθνικό Μετσόβειο Πολυτεχνείο, Ηρώων Πολυτεχνείου 9, Πολυτεχνειούπολη
Ζωγράφου, 15780, Αθήνα

Email: moukoul@chemeng.ntua.gr

Το υπόλειμμα βύνης είναι το βασικό παραπροϊόν της διεργασίας παραγωγής ζύθου. Σχηματίζεται μετά τα στάδια της ζυθεκχύλισης και του φιλτραρίσματος της βύνης του κριθαριού. Η παρουσία πολυσακχαριτών, πρωτεϊνών και φαινολικών οξέων σε σημαντικές ποσότητες, καθιστούν το υπόλειμμα βύνης ένα υποσχόμενο υλικό για πολλές βιομηχανικές διεργασίες. Στο παρελθόν έχει χρησιμοποιηθεί ως πρώτη ύλη για την παραγωγή αιθανόλης και ως πηγή φερουλικού οξέος. Η βιομετατροπή του τελευταίου μπορεί να οδηγήσει σε άλλα μόρια με βιολογική αξία, όπως είναι το στυρένιο, τα πολυμερή και τα παράγωγα του βανιλλικού οξέος. Το ενζυμικό εκχύλισμα από καλλιέργειες του μύκητα *Fusarium oxysporum* σε λιγνοκυτταρινούχα υποστρώματα, χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη αυτή για την ενζυμική μετατροπή του υπολείμματος βύνης.

Το ενζυμικό εκχύλισμα από τον *F.oxysporum* υδρόλυσε επιτυχώς την κυτταρίνη και την ημικυτταρίνη του υπολείμματος βύνης. Αρχικά προσδιορίστηκε η επίδραση της αλκαλικής προκατεργασίας του υλικού στην απελευθέρωση σακχάρων κατά την υδρόλυση. Μελετήθηκαν στη συνέχεια διάφοροι παράγοντες που επηρεάζουν την απόδοση και το ρυθμό της υδρόλυσης: η θερμοκρασία υδρόλυσης, η τιμή pH διεξαγωγής της αντίδρασης, η ενζυμική δόση, καθώς και η χρησιμοποιούμενη ποσότητα αρχικού ξηρού υλικού. Διερευνήθηκαν ακόμη, η παρεμπόδιση του ρυθμού και του βαθμού υδρόλυσης από διαφορετικές συγκεντρώσεις σακχάρων, καθώς και η επίδραση της προσθήκης επιφανειοδραστικών ουσιών στο μίγμα της αντίδρασης πριν την υδρόλυση.

Η προσθήκη καθαρής ξυλανάσης και εστεράσης του φερουλικού οξέος στο υπόλειμμα βύνης είχε σαν αποτέλεσμα τη μειωμένη παραγωγή ποσοτήτων φερουλικού οξέος συγκριτικά με τη δράση του ενζυμικού εκχυλίσματος από τον *F.oxysporum*. Η σημασία της παρουσίας πρωτεασών στο εκχύλισμα για την παραγωγή φερουλικού οξέος εκτιμήθηκε μετά από κατεργασία του υπολείμματος βύνης με αλκαλάση ή παπαΐνη πριν ακριβώς από την υδρόλυση από τα καθαρά ενζύμα. Η παρεμποδιστική δράση του φερουλικού οξέος που απελευθερώνεται κατά την ενζυμική διαδικασία, αποδείχθηκε χρησιμοποιώντας διάφορες αρχικές συγκεντρώσεις οξέος.

3.17. Enzymic processing of brewer's Spent Grain using *Fusarium oxysporum* multienzyme system

Xiros C., **Moukouli M.**, Topakas E., Paschos T. & P. Christakopoulos

BIOTechMASS Unit, Biotechnology Laboratory, Chemical Engineering Department, National Technical University of Athens, 9 Iroon Polytechniou St, Zografou Campus, 15780, Athens, Greece

Email: moukoul@chemeng.ntua.gr

Brewers spent grain (BSG) is the main by-product of the brewing process consisting of the solid residue remaining after mashing and lautering. The presence of polysaccharides, proteins and phenolic acids in significant quantities, make BSG a hopeful material for many industrial applications. Thus, it has been previously utilized as raw material for ethanol production and as a source of ferulic acid (FA). The latter can be used as feedstock for the biocatalytic conversion into other valuable molecules such as styrenes, polymers and vanillic acid derivatives. The fungus *Fusarium oxysporum* F3 can easily produce cellulolytic and hemicellulolytic enzymes when it is grown on lignocellulosic substrates.

In this study the crude enzyme extract from *F. oxysporum* has successfully hydrolyzed both cellulose and hemicellulose from BSG. Several factors affecting hydrolysis yield and hydrolysis rate were investigated and assessed. The effect of the pretreatment of the material on sugars release during hydrolysis reactions was determined. Various reaction temperatures and various initial pH values, were tested and the optimum conditions were determined. Different enzyme loadings and different initial dry matter contents were studied. The inhibitory effect of sugars in various concentrations on the reaction rate and on hydrolysis yield and as well the effect of the addition of surfactants in the reaction mixture prior to hydrolysis were also investigated.

When pure forms of xylanase and feruloyl esterase applied directly to the BSG released lower amounts of FA compared with the action of the crude enzyme extract of *F. oxysporum*. The significance of proteases present in the crude extract on FA release was evaluated by treatment of BSG with alkalase or papain prior to hydrolytic reactions. Inhibition effect of the released FA on the enzymic process performance was shown using various initial concentrations of FA.

3.18. Οι βακυλοϊοί στη βιοτεχνολογία

Πατμανίδη Α.¹ & Δ.Γ. Χατζηνικολάου²

¹Ινστιτούτο Βιοϊατρικής Έρευνας και Βιοτεχνολογίας, Σολομού 55, Αθήνα

²Ομάδα Μικροβιολογίας, Τομέας Βοτανικής, Πανεπιστήμιο Αθήνας,
Πανεπιστημιούπολη Ζωγράφου, 15784 Αθήνα

Από τους ιούς των εντόμων, οι βακυλοϊοί έχουν γίνει το αντικείμενο πολλών μελετών, κυρίως λόγω των εφαρμογών τους στη βιοτεχνολογία αλλά και ως εναλλακτική λύση για τον έλεγχο επιβλαβών εντόμων σε αγροτικές καλλιέργειες. Έχουν περάσει ήδη σχεδόν 30 χρόνια από τότε που έγινε η πρώτη αναφορά στη βιβλιογραφία για την παραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών σε κύτταρα εντόμων με την χρήση τροποποιημένων βακυλοϊών. Η καινούρια –τότε - τεχνολογία είχε γίνει δεκτή με ενθουσιασμό: υποσχόταν υψηλά επίπεδα πρωτεΐνης, ισοδύναμα με τα βακτηριακά συστήματα έκφρασης, καθώς και τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των κυττάρων από θηλαστικά. Παρ' ότι η εμπειρία στη μελέτη και εφαρμογή του συστήματος αυτού έδειξε ότι δεν ικανοποιούσε όλες αυτές τις προσδοκίες, περαιτέρω έρευνα και μελέτη των βακυλοϊών οδήγησε σε σημαντικές βελτιώσεις για την παραγωγή ετερόλογων πρωτεϊνών. Επιπλέον, συγκεκριμένες τροποποιήσεις του γονιδιώματος των ιών αυτών έκανε το όλο σύστημα πιο ευέλικτο και εύχρηστο, ώστε να μπορεί να χρησιμοποιηθεί από ερευνητές με βασικές γνώσεις μοριακής βιολογίας, χωρίς την εξειδικευμένη γνώση ιολογίας και ιολογικών μεθόδων. Τέλος, βακυλοϊοί αγρίου τύπου καθώς και προσεκτικά μεταλλαγμένοι βακυλοϊοί έχουν χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για τον έλεγχο επιβλαβών εντόμων σε πολλές περιπτώσεις.

3.18. Baculoviruses in biotechnology

Patmanidi A.¹ & D.G. Hatzinikolaou²

¹Institute for Biomedical Research and Biotechnology, Solomou 55, Athens,
GREECE

²Laboratory of Microbiology, Sector of Botany, Department of Biology, University of
Athens, Zografou Campus, 15784 Athens, GREECE

The baculoviruses are perhaps the most studied arthropod-specific viruses mainly due to their use in biotechnology and pest management. It has been almost 30 years since the first reports on the expression of recombinant proteins in insect cells using modified baculovirus vectors. At the time, the new technology stimulated great interest as it appeared as a promising solution encompassing high levels of expression –as with the bacterial systems- and post-translational protein processing, comparable to that in mammalian cells. Although these expectations did not prove completely realistic, recent advances in the baculovirus-insect cell system greatly improved its efficacy for recombinant protein production. Furthermore, key modifications enabled researchers with basic training in molecular biology to use this system in their labs, without the requirement for specialised knowledge in baculovirus biology or virology. Finally, wild-type or carefully modified baculoviruses have successfully been used for the management of insect pests in numerous occasions.

3.19. Ανάλυση Κυρίων Συνιστώσων του μεταβολισμού του *Zymomonas mobilis*

Πιλάλης Ε.^{1*}, Χατζηιωάννου Α., Δραΐνας Κ.² & Φ. Κολίσης^{1**}

¹Ομάδα Μεταβολικής Μηχανικής και Βιοπληροφορική, Ινστιτούτο Βιολογικών Ερευνών και Βιοτεχνολογίας, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών, Βασ. Κωνσταντίνου 48, 11635, Αθήνα, Ελλάδα

²Εργαστήριο Βιοχημείας, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, 45110, Ιωάννινα, Ελλάδα.

Email: *epilalis@eie.gr , **kolisis@eie.gr

Η μοντελοποίηση μεταβολικών δικτύων βιολογικών συστημάτων περιλαμβάνει την ανάλυση και την πρόβλεψη των κατανομών των μεταβολικών ροών υπό διαφορετικές φυσιολογικές συνθήκες. Τα υπολογιστικά μοντέλα του κυτταρικού μεταβολισμού αποτελούν ένα απαραίτητο εργαλείο για τον σχεδιασμό στρατηγικών γενετικής τροποποίησης, με σκοπό την ανακατανομή των ροών του δικτύου προς την παραγωγή επιθυμητών τελικών προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας. Σε αυτή την εργασία παρουσιάζουμε ένα *in silico* μοντέλο του μεταβολισμού του *Zymomonas mobilis*, ένα αναερόβιο βακτήριο με το δυναμικό της βιοτεχνολογικής εφαρμογής της παραγωγής αιθανόλης από διάφορες πηγές άνθρακα. Οι μεταβολικές αντιδράσεις που περιλαμβάνει το μοντέλο εξήχθησαν από τη βιβλιογραφία, καθώς και από τις σχετικές βάσεις γονιδιακών και μεταβολικών δεδομένων. Το μοντέλο επικυρώθηκε με τη μέθοδο της γραμμικής βελτιστοποίησης (constrained-based Flux Balance Analysis) και αναλύθηκε περαιτέρω με Διάσπαση Ιδιαζουσών Τιμών (Singular Value Decomposition) του διανυσματικού χώρου των μεταβολικών ροών σταθερής κατάστασης. Με αυτόν τον τρόπο ο βασικός μεταβολισμός του βακτηρίου αναλύθηκε στις κύριες συνιστώσες του, δίνοντας τη δυνατότητα εκτίμησης του ρυθμιστικού ρόλου των μεταβολικών αντιδράσεων.

3.19. Principal Component Analysis of *Zymomonas mobilis* metabolism

Pilalis E.^{1*}, Chatzioannou A.¹, Drainas C.² & F. Kolisis¹

¹Metabolic Engineering and Bioinformatics Group, Institute of Biological Research and Biotechnology, National Hellenic Research Foundation, 48 Vas. Konstantinou Ave, 11635, Athens, Greece

²Laboratory of Biochemistry, Department of Chemistry, University of Ioannina, 45110, Ioannina, Greece.

Email: *epilalis@eie.gr, **kolisis@eie.gr

Metabolic network modeling of biological systems involves the analysis and prediction of metabolic flux distributions under diverse physiological conditions. In silico models of cellular metabolism have proven to be an indispensable tool for the design of genetic modification strategies, in order to redistribute the flux network towards desired end-products. In this work we reconstructed the metabolism of *Zymomonas mobilis*, which is an anaerobic bacterium with a potential biotechnological application of ethanol production from a range of carbon sources. The metabolic reactions were extracted from bibliography as well as from the relevant genomic and metabolic databases. In order to validate the model, we performed constraint-based Flux Balance Analysis, through application of linear optimization methods. We further exploited the model by performing principal component analysis, using Singular Value Decomposition of the steady-state flux space. Hence, the principal components of the central carbon metabolism were derived and the regulatory role of each metabolic reaction was assessed by measuring its contribution to the principal components of the network.

3.20. Κατασκευή $recA^-$ στελέχους στο αιθανολοπαραγωγό βακτήριο *Zymomonas mobilis* CP4

Σαββάκης Ι.¹, Μπελετσιώτης Ε.², Τύπας Μ.Α.¹ & Κ.Μ. Παππά¹

¹Τομέας Γενετικής και Βιοτεχνολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Ε.Κ.Π.Α.,
Πανεπιστημιούπολη, Ιλίσια, Αθήνα 15701

² Διεύθυνση Διασφάλισης Ποιότητας Προϊόντων - Τμήμα Μοριακής Βιολογίας,
Vivartia, Αγ. Στέφανος, Αττική 14565

Email: savvax@hotmail.com

Το αιθανολοπαραγωγό α-πρωτεοβακτήριο *Zymomonas mobilis* CP4 χρησιμοποιείται για μεγάλης κλίμακας παραγωγή βιοαιθανόλης. Στην εργασία αυτή κατασκευάστηκε στέλεχος του *Z. mobilis* CP4, μεταλλαγμένο ως προς το γονίδιο *recA*. Το *recA* ευθύνεται για τον ομόλογο γενετικό ανασυνδυασμό και για την επαγωγή του SOS συστήματος ανταπόκρισης του βακτηρίου σε συνθήκες στρεσ. Η κατασκευή ενός $recA^-$ στελέχους στο *Z. mobilis* ενδιαφέρει ιδιαίτερα, τόσο σε βασικό επίπεδο μελέτης της φυσιολογίας του οργανισμού και της γενετικής του, π.χ. στην εξακρίβωση του δικτύου των γονιδίων που απαρτίζουν το SOS σύστημα, όσο και σε εφαρμοσμένο επίπεδο χρήσης του στελέχους σε κατευθύνσεις γενετικής μηχανικής.

Το μεταλλαγμένο $recA^-$ στέλεχος του *Z. mobilis* CP4 (CP4 UA1) παράχθηκε μέσω αντικατάστασης του ενδογενούς *recA* γονιδίου με τεχνητά κατασκευασμένο, που φέρει ένθεση γονιδίου ανθεκτικότητας σε χλωραμφαινικόλη (*cat*). Για το σκοπό αυτό έγινε κατ' αρχήν ενίσχυση του *recA* μέσω PCR από το CP4, κλωνοποίηση του προϊόντος στο φορέα pCRII (πλασμίδιο pMT211) και *in vitro* ένθεση του γονιδίου *cat* εντός αυτού (πλασμίδιο pMT250). Το *cat* είχε προηγουμένως ενισχυθεί από φορέα pBR325 και κλωνοποιηθεί εντός μεταθετής κατασκευής (σύστημα EZ::TN Epicentre, πλασμίδιο pMT218). Η ένθεση του *cat* εντός του *recA* στο pMT250 βρέθηκε να είναι 157 βάσεις από την κωδική έναρξη του γονιδίου. Από την τελευταία κατασκευή απομονώθηκε τμήμα που έφερε το μεγαλύτερο μέρος του *recA::cat* και το οποίο κλωνοποιήθηκε εντός συζευκτικά παρακινούμενου φορέα (pVK1; pBluescript-oriT_P). Η τελική κατασκευή (πλασμίδιο pGS7), εισάχθηκε με επιτυχία σε *Z. mobilis* CP4 μέσω επιβοηθούμενης σύζευξης και μέσω ηλεκτροδιάστης. Μετασχηματισμένα στελέχη ανθεκτικά στη χλωραμφαινικόλη, ελέγχθηκαν για ευαισθησία σε UV ακτινοβολία, ενώ αυτά που εμφάνισαν τη μεγαλύτερη, μελετήθηκαν περαιτέρω. Η αντικατάσταση του ενδογενούς *recA* με το *recA::cat* επιβεβαιώθηκε μέσω PCR και υβριδισμών κατά Southern, ενώ φάνηκε να έχει λάβει χώρα μέσω διπλού επιχιασμού (allele exchange). Το στέλεχος που επιλέχθηκε ως πρότυπο CP4 $recA^-$, το CP4 UA1, εμφανίζει εξαιρετική ευαισθησία σε επίδραση UV ακτινοβολίας ως μεταλλοξογόνου παράγοντα, και απώλεια βιωσιμότητας με διαφορά έξι τάξεις μεγέθους για χρόνους ακτινοβόλησης 10 - 15 sec, σε σχέση με το φυσικό τύπο. Περαιτέρω μελέτη της σταθερότητας και των ιδιοτήτων αυτού του στελέχους ως προς τον ομόλογο ανασυνδυασμό είναι σε εξέλιξη.

3.20. Construction of a *recA*⁻ strain of the ethanol producing *Zymomonas mobilis* CP4

Savvakis I.¹, Beletsiotis E.², Typas M.A.¹ & K.M. Pappas¹

¹Department of Genetics and Biotechnology, Faculty of Biology, University of Athens, Ilissia, Athens 15701

² Quality Assurance Division - Molecular Biology Department, Vivartia, Ag. Stephanos, Attiki 14565

Email: savvax@hotmail.com

The ethanol producing α -proteobacterium *Zymomonas mobilis* CP4 is involved in large scale bioethanol production. In this work, a *recA*⁻ mutant of *Z. mobilis* CP4 was constructed. The *recA* gene governs homologous DNA recombination and induction of the SOS response. A *recA*⁻ mutant of *Z. mobilis* is of outmost interest, as it will foster physiological and genetic studies in the organism such as the elucidation of the SOS regulon and also offer an important tool towards genetic engineering ends.

The *Z. mobilis* CP4 *recA*⁻ strain (CP4 UA1) was constructed via allele exchange of the native gene with that of a copy bearing a chloramphenicol resistance cassette (*cat*) insertion.

Towards this, the *recA* gene was PCR-amplified from CP4, cloned into vector pCRII (plasmid pMT211) and used as substrate for transposon-mediated insertion of the *cat* gene. To carry out this, the *cat* gene was PCR-amplified from vector pBR325, cloned into vector pMOD™ (EZ::TN, Epicentre, plasmid pMT218) and the resulting *cat*-IS repeat cassette was allowed to transpose *in vitro* into pMT211. A pMT211 derivative bearing an appropriate *cat* insertion into the *recA* gene was isolated and found to harbour the insertion 157 bp from the *recA* translational start (plasmid pMT250). A fragment from pMT250, bearing the largest part of *recA*::*cat* was cloned into the mobilizable vector pVK1 (pBluescript-*oriT*_P) and was successfully introduced into *Z. mobilis* CP4 via TraP-mediated conjugation, as also via electroporation. Chloramphenicol resistant transformants were isolated and those exhibiting major susceptibility to UV irradiation were examined further. Allele exchange of the native gene with that bearing the *cat* cassette was confirmed via PCR and Southern hybridizations for several derivatives. Of these, the chosen prototypical *recA*⁻ CP4 derivative, strain CP4 UA1, exhibits six orders of magnitude viability drop compared to that of the wild type, under UV exposure for 10-15 sec. Its genetic stability and performance in homologous recombination assays is currently under further examination.

3.21. Κατασκευή απλών βακτηριακών βιοαισθητήρων ανθρώπινων ορμονών που βασίζονται σε τεχνητά αλλοστερικά ένζυμα

Σκρέτας Γ.Κ.* & D.W. Wood

Τμήμα Χημικών Μηχανικών, Princeton University, Princeton NJ., ΗΠΑ

*Παρούσα διεύθυνση: Ινστιτούτο Βιολογικών Ερευνών και Βιοτεχνολογίας, Εθνικό Ιδρυμα Ερευνών.

E-mail: gskretas@che.utexas.edu

Οι πυρηνικοί ορμονικοί υποδοχείς αποτελούν έναν από τους μεγαλύτερους πρωτεΐνικούς στόχους για την ανακάλυψη νέων φαρμάκων, καθώς η λειτουργία τους έχει συνδεθεί με ένα πλήθος σοβαρών ασθενειών, μεταξύ των οποίων και ορισμένες μορφές καρκίνου. Ο εντοπισμός νέων χημικών ενώσεων με την ικανότητα να ρυθμίζουν τη λειτουργία των υποδοχέων αυτών μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη αποτελεσματικών θεραπειών για σοβαρές παθήσεις. Οι *in vivo* βιοαισθητήρες με την ικανότητα να εντοπίζουν την πρόσδεση συναρμοτών αποτελούν εργαλεία που μπορούν να επιταχύνουν σημαντικά τον εντοπισμό βιοδραστικών ενώσεων, συνεισφέροντας έτσι στην ταχεία και φθηνή ανακάλυψη νέων φαρμάκων. Στην παρούσα εργασία αναπτύξαμε ένα νέο βιοαισθητήρα ορμονών πυρηνικών υποδοχέων σε βακτηριακά κύτταρα *Escherichia coli* κατασκευάζοντας μια πρωτεΐνική χίμαιρα που αποτελείται από τον ανθρώπινο υποδοχέα των οιστρογόνων και το μεταβολικό ένζυμο συνθετάση του θυμιδαλούς (*thymidylate synthase*, TS). Έκφραση της χίμαιρας αυτής σε βακτηριακά κύτταρα ανεπαρκή σε TS, είχε ως αποτέλεσμα την εμφάνιση φαινότυπων ανάπτυξης που εξαρτώνται από την παρουσία οιστρογόνου στο υπόστρωμα. Στη συνέχεια, αντικατάσταση του υποδοχέα των οιστρογόνων της πρωτεΐνικής χίμαιρας με τον ανθρώπινο υποδοχέα της ορμόνης του θυροειδούς είχε ως αποτέλεσμα την εμφάνιση θυρορμονο-εξαρτώμενου κυτταρικού πολλαπλασιασμού που δεν ανταποκρινόταν στην παρουσία οιστρογόνων. Ο βιοαισθητήρας αυτός στη συνέχεια εκτέθηκε σε μία βιβλιοθήκη οιστρογονικών και θυρορμονικών αναλόγων και παρατηρήθηκε ότι τα επίπεδα κυτταρικού πολλαπλασιασμού παρουσιάζουν πολύ καλή συσχέτιση με τη συγγένεια πρόσδεσης στον αντίστοιχο ορμονικό υποδοχέα. Κατά αξιοσημείωτο τρόπο, ο απλός αυτός βιοαισθητήρας επιδεικνύει την δυνατότητα να ξεχωρίζει μεταξύ της αγωνιστικής και της ανταγωνιστικής δράσης, καθώς συνδυασμοί οιστρογονικών αγωνιστών είχαν προσθετική επίδραση στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, ενώ οι αντιοιστρογονικές ενώσεις βρέθηκαν να καταστέλλουν τη δράση των ορμονικών αγωνιστών. Επιπλέον, η ικανότητα του συστήματος να συνεισφέρει στην ανακάλυψη νέων οιστρογονικών αναλόγων επικυρώθηκε με τη σάρωση μιας βιβλιοθήκης μικρών χημικών ενώσεων, η οποία οδήγησε στον εντοπισμό δύο δομικά νέων ρυθμιστών του υποδοχέα των οιστρογόνων και στην επακριβή πρόβλεψη του αγωνιστικού/ανταγωνιστικού χαρακτήρα βιοχαρακτήρα των ενώσεων αυτών σε ανθρώπινα κύτταρα. Η ικανότητα του εν λόγω βιοαισθητήρα να αναγνωρίζει την πρόσδεση συναρμοτών καθώς και το φαρμακολογικό χαρακτήρα αυτών προκύπτει εξαιτίας της αλλοστερικής επικοινωνίας μεταξύ των πρωτεΐνικών περιοχών που αποτελούν τη χίμαιρα, όπου διαφορετικές δομικές αλλαγές που επάγονται στον ορμονικό υποδοχέα κατά την πρόσδεση του συναρμοτή επικοινωνούνται κατάλληλα στην καταλυτική περιοχή του ενζύμου και μεταβάλλουν την καταλυτική του δράση. Το εν λόγω χίμαιρικό ένζυμο αποτελεί ένα από τα πρώτα παραδείγματα τεχνητών ενζύμων με την ικανότητα να αισθάνονται διαφορετικές διαμορφώσεις ενός υποδοχέα και είτε να ενεργοποιούνται, είτε να απενεργοποιούνται ανάλογα με τη φύση του προσδεδεμένου προσαρμοτή. Το περιγραφέν σύστημα αποτελεί μια πολύ απλή και ελκυστική τεχνική για το γρήγορο εντοπισμό ενώσεων με εν δυνάμει θεραπευτικές ιδιότητες.

3.21. Construction of simple bacterial hormone-sensing systems based on engineered allosteric enzymes

Skretas G* & D.W. Wood

Department of Chemical Engineering, Princeton University, Princeton NJ, USA

* Present address: Institute for Biological Research and Biotechnology, National Hellenic Research Foundation, Athens, Greece. E-mail: gskretas@che.utexas.edu

The nuclear hormone receptors comprise one of the largest classes of protein targets for drug discovery, as their function has been linked to a variety of serious diseases, including several forms of cancer. Identifying novel compounds with the ability to modulate the function of these targets could lead to the development of effective therapeutics. *In vivo* sensors of ligand binding have emerged as tools that can greatly accelerate the lead identification process, allowing new drugs to be discovered more rapidly and cheaply. In this work, a novel sensor of nuclear hormone binding has been developed in *Escherichia coli* by constructing a fusion of the ligand-binding domain of the human estrogen receptor with a thymidylate synthase enzyme (TS). Expression of this fusion protein in TS-deficient bacterial cells resulted in growth phenotypes that were dependent on the presence of estrogen. Subsequent replacement of the estrogen receptor with the ligand-binding domain of the human thyroid hormone receptor led to specific thyroid hormone-enhanced growth that was insensitive to estrogen. This biosensor was then challenged with a library of estrogen and thyroid hormone analogues, and it was observed that levels of cell growth correlate well with ligand-binding affinity. Remarkably, this simple biosensor was able to discriminate between agonistic and antagonistic activities, as combinations of estrogen agonists had an additive impact on cell growth, whereas known estrogen antagonists were found to neutralize agonist effects. Furthermore, the ability of this system to assist the discovery of new estrogen-mimicking compounds was validated by screening a small compound library, which led to the identification of two structurally novel estrogen receptor modulators and the accurate prediction of their agonistic/antagonistic biocharacter in human cells. The ability of our sensor to detect ligand binding and recognize pharmacologically critical properties arises from allosteric communication between the artificially combined protein domains, where different ligand-induced conformational changes in the receptor are transmitted to the catalytic domain and translated to distinct levels of enzymic efficiency. This is one of the first examples of an engineered enzyme with the ability to sense multiple receptor conformations and to be either activated or inactivated depending on the nature of the bound effector molecule. Our system constitutes a technique for facile selection of lead compounds with potential medical application.

3.22. Βιολογική απομάκρυνση εξασθενούς χρωμίου Cr(VI) με μικτές καλλιέργειες βακτηρίων και μυκήτων.

Τεκερλεκοπούλου Α., Τσιάμης Γ., Μπούρτζης Κ. & Δ. Βαγενάς

Τμήμα Διαχείρισης Περιβάλλοντος και Φυσικών Πόρων, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων,
Σεφέρη 2, Αγρίνιο, Τ.Κ. 30100, Ελλάδα

Email: atekerle@cc.uoi.gr

Το χρώμιο είναι ένα μεταλλικό στοιχείο που παρουσιάζει μεγάλο εύρος εφαρμογών σε πολλές βιομηχανικές δραστηριότητες. Το Cr(VI) είναι ευδιάλυτο, υψηλά τοξικό, καρκινογόνο και μεταλλαξιγόνο ενώ το Cr(III) ίζηματοποιείται, είναι αδιάλυτο και λιγότερο τοξικό στους οργανισμούς. Οι συμβατικές μέθοδοι επεξεργασίας του Cr(VI) είναι κυρίως φυσικοχημικές που παρουσιάζουν, ωστόσο, σημαντικά μειονεκτήματα σε σύγκριση με τους βιολογικούς τρόπους επεξεργασίας των λυμάτων όπως παραγωγή τοξικής λάσπης ή άλλων δευτερευόντων προϊόντων που απαιτούν επεξεργασία. Στην παρούσα μελέτη, πραγματοποιήθηκαν πειράματα σε αντιδραστήρες διαλείποντος έργου, εμβολιασμένων με βιομηχανική λάσπη από την Ελληνική Βιομηχανική Αεροπορία, χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα οξικό νάτριο και ζάχαρη. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκε: (α) η ικανότητα των αντιδραστήρων αυτών να ανάγουν το Cr(VI) σε Cr(III) και (β) η μικροβιακή τους σύσταση.

Μείωση του εξασθενούς χρωμίου παρατηρήθηκε τόσο στους αντιδραστήρες διαλείποντος έργου με ζάχαρη (S) όσο και με οξικό νάτριο (SA). Πειράματα για διάφορες αρχικές συγκεντρώσεις Cr(VI) και βιομάζας έδειξαν ότι επιτυγχάνονται μεγαλύτεροι ρυθμοί απομάκρυνσης Cr(VI) και παραγωγής βιομάζας στους αντιδραστήρες S σε σχέση με τους SA. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε μέχρι και διπλασιασμός του ρυθμού απομάκρυνσης Cr(VI) (από 0,057 σε 0,113 mg (Cr(VI))/mg βιομάζας· ημέρα) καθώς και αύξηση κατά 9.5 φορές της παραγωγής βιομάζας (από 302 σε 2835 mg/l) για αρχικές συγκεντρώσεις Cr(VI) και βιομάζας 13.4 και 170 mg/l αντίστοιχα.

Η μικροβιακή ανάλυση έδειξε ότι στους αντιδραστήρες SA επικρατούν βακτήρια, με κυρίαρχο στέλεχος το *Alcaligenes faecalis* subsp. *faecalis*. Στους αντιδραστήρες S έχουμε επικράτηση μυκήτων με δύο κυρίαρχα στελέχη, τα *Trichoderma viride* και *Pichia jadinii*.

Η παρούσα μελέτη ανέδειξε ότι: (α) το βακτηριακό στέλεχος *A. faecalis* subsp. *parafaecalis* παίζει σημαντικό ρόλο στην απομάκρυνση του Cr(VI), (β) η αλλαγή του υποστρώματος οδηγεί στην πλήρη κυριαρχία των μυκήτων έναντι των βακτηρίων και (γ) η μικτή καλλιέργεια των μυκήτων απομακρύνει το εξασθενές χρώμιο πιο αποτελεσματικά.

3.22. Biological removal of hexavalent chromium Cr(VI) by bacterial and fungal mixed cultures.

Tekerlekopoulou A., Tsiamis G., Bourtzis K. & D. Vayenas

Department of Environmental and Natural Resources Management, University of Ioannina, 2 Seferi St., Agrinio, T.K. 30100, Greece

Email: atekerle@cc.uoi.gr

Chromium is a metal element that presents a big breadth of applications in a lot of industrial activities. Cr(VI) is soluble, highly toxic, carcinogenic and mutagen while Cr(III) is precipitated, insoluble and less toxic in the organisms. The conventional treatment methods of Cr(VI) are mainly physicochemical. They however present important disadvantages, such as the production of toxic sludge or other secondary products that require treatment compared with biological methods used in treating waste products. In the present study, experiments in batch reactors were carried out by inoculating industrial sludge from the Hellenic Aerospace Industry S.A. and by using sodium acetate (SA) and sugar (S) as substrate. These experiments revealed (a) their ability to reduce Cr (VI) to Cr (III) and (b) their microbial constitution.

The reduction of hexavalent chromium was observed in both batch reactors with sugar (S) and acetic sodium (SA). Experiments with various initial concentrations of Cr(VI) and biomass showed that higher Cr(VI) removal rates and biomass production were achieved in (S) reactors compared to the SA. In particular, a doubling of Cr(VI) removal rate was observed (from 0,057 to 0,113 mg Cr(VI)/mg biomass day) as well as an increase of a 9.5-fold of biomass production (from 302 to 2835 mg / l) for initial Cr(VI) and biomass concentrations 13.4 and 170 mg/l respectively.

Microbial analysis revealed that bacteria prevail in SA reactors with the dominant strain (89% of clones) related to *Alcaligenes faecalis* subsp. *faecalis*. In (S) reactors, a predominance of fungi was observed with two dominant strains related to strains of *Trichoderma viride* and *Pichia jadini*. This study revealed that: (a) the bacterial strain that is related with *A. faecalis* subsp. *parafaecalis* has an important role in the removal of Cr (VI), (b) the substrate change leads to the complete dominance of mushrooms against the bacteria and (c) the mixed culture of mushrooms fungi can remove hexavalent chromium more effectively.

3.23. Μελέτες Βιομετατροπής Λιγνινοκυτταρινούχων Υπολειμμάτων σε Εδώδιμα Καρποσώματα και Διατροφοφαρμακευτικά Προϊόντα Μανιταριών

Φιλιππούσης Α.Ν. & Π. Α. Διαμαντοπούλου

Εθνικό Τδρυμα Αγροτικής Έρευνας, Ι.Γ.Ε.Μ.Κ., Εργαστήριο Εδώδιμων και Φαρμακευτικών Μυκήτων, Δημοκρατίας 61, 135 61 Αγ. Ανάργυροι, Αθήνα, Ελλάδα.
Τηλ: 2102611012

E-mail: iamc@ath.forthnet.gr

Η παραγωγή μανιταριών είναι μια επικερδής βιοτεχνολογική διαδικασία στην οποία εφαρμόζεται η μικροβιακή τεχνολογία για την βιομετατροπή λιγνινοκυτταρινούχων υπολειμμάτων σε προϊόντα υψηλής διατροφικής ή/και φαρμακευτικής αξίας (εδώδιμα μανιτάρια, μεταβολίτες και διατροφοφαρμακευτικά σκευάσματα). Το Εργαστήριο Εδώδιμων και Φαρμακευτικών Μυκήτων του ΕΘΙΑΓΕ, τα τελευταία χρόνια, στα πλαίσια ερευνητικών προγραμμάτων, ασχολείται εντατικά με την αξιοποίηση αγροβιομηχανικών υπολειμμάτων μέσω της καλλιέργειας μανιταριών για παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας. Συγκεκριμένα, τα ερευνητικά πεδία περιλαμβάνουν: (α) Μελέτες που αφορούν στη βιο-μετατρεψιμότητα (βιολογική αποδοτικότητα) των διαφόρων υπολειμμάτων-υποστρωμάτων σε καρποφορίες των σημαντικών εδώδιμων-φαρμακευτικών μανιταριών που ανήκουν στα γένη *Agaricus*, *Pleurotus* and *Lentinula*, (β) Τη πιλοτική καλλιέργεια νέων για τη χώρα μας ειδών μανιταριών (ανήκουν στα γένη *Agrocybe*, *Volvariella*, *Ganoderma*) με στόχο την εισαγωγή τους στην εμπορική καλλιέργεια της χώρας μας, (γ) Μελέτες παραγωγής μυκητιλιακής βιομάζας και χρήσιμων μεταβολιτών (ένζυμα, πολυσακχαρίτες) σε ζυμώσεις στερεάς κατάστασης γεωργικών υπολειμμάτων από τους προαναφερθέντες μακρομύκητες, και (δ) Διερεύνηση των θεραπευτικών δράσεων των φαρμακευτικών μανιταριών και των βιοδραστικών τους συστατικών με έμφαση στον βασιδιομύκητα *Lentinula edodes*.

3.23. Studies On Lignocellulosic Residues Biotransformation to Edible Fruit Bodies and Nutraceutical Mushroom Products

Philippoussis A.N. & P.A. Diamantopoulou

National Agricultural Research Foundation, I.A.M.C., Laboratory of Edible and Medicinal Fungi, 61 Demokratias St., 135 61 Ag. Anargyri, Athens, Greece. Tel: 2102611012

E-mail: iamc@ath.forthnet.gr)

Mushroom cultivation is a prominent biotechnological process in which microbial technology is applied for the bio-transformation of lignocellulosic residues into products of high nutritional or/and medicinal value (edible mushrooms, metabolites and nutraceutical products). The last decade, the laboratory of Edible and Medicinal Fungi of NAGREF, in the frame of research projects, does intensive research on the valorisation of agro-industrial residues through mushroom cultivation for the production of added-value products. More specific, research fields include: a) Studies that concern the bio-transformation (biological efficiency) of various residues-substrates into fruit-bodies of important edible and medicinal mushrooms that belong to the species *Agaricus*, *Pleurotus* and *Lentinula*, b) The pilot-scale cultivation of new for Greece mushroom species (genera *Agrocybe*, *Volvariella* and *Ganoderma*) aiming at their introduction in the commercial cultivation of our country, c) Studies in the production of mycelial biomass and valuable metabolites (enzymes, polysaccharides) during solid-state fermentation of agricultural residues from the above mentioned fungi, and d) Experimentation on curing actions of medicinal mushrooms and their bio-active ingredients, with emphasis on *Lentinula edodes*.

EYPETHPIO – INDEX

- | | | | |
|--------------------------------|------------------------|------------------------|---------|
| Andersen G..... | 50, 52 | Ακτύπης Α..... | 76, 84 |
| Argandona M..... | 64 | Αλεξανδρή Σ..... | 66 |
| de la Cruz F..... | 60 | Αμύλης Σ..... | 74 |
| Economidis I..... | 8 | Ανασοντζής Γ..... | 74, 80 |
| Hawkins R..... | 60 | Αφένδρα Σ..... | 64, 76 |
| Hugenholtz P. | 50, 52 | Βαγενάς Δ..... | 26, 116 |
| isoSoil Scientific Party | 68 | Βανδέρα Ε..... | 60 |
| Jansson J..... | 9 | Βαρσάκη Α..... | 60 |
| Κυρπίδης Ν..... | 43, 51, 53, 67, 70, 71 | Βασιλειάδης Α..... | 76 |
| Lamb K..... | 60 | Βασιλειάδου Ι..... | 78 |
| Lemaitre B. | 102 | Βεζήρη Ε..... | 14 |
| Li-Yuan Hung..... | 70 | Βέλλιος Ε..... | 12 |
| Moncalián G. | 60 | Βενιεράκη Α..... | 14, 62 |
| Nieto J. | 64 | Γαλανοπούλου Α..... | 80 |
| Onjaro G..... | 96, 97 | Γενίτσαρης Σ..... | 16 |
| Ouzounis C. | 70 | Γεωργακόπουλος Δ..... | 18 |
| Patrinos A. | 8 | Γεωργιάδου Δ..... | 20 |
| Ramette A. | 36 | Γεωργίου Σ..... | 46 |
| Reczko M..... | 44 | Γιάγκου Μ..... | 42, 92 |
| Reina-Bueno M..... | 64 | Γιάνη Α..... | 50, 52 |
| Sánchez-Porro C. | 40, 41 | Γιαννόπουλος Α..... | 82 |
| Tsoka S..... | 70 | Γκόνου-Ζάγκου Ζ..... | 48, 90 |
| Vargas C. | 64 | Γρηγορίου Μ..... | 42 |
| Ventosa A. | 40, 41 | Δεληβοριάς Π..... | 48 |
| Williams H..... | 102 | Δήμου Μ..... | 14, 62 |
| Wood D. | 114 | Διακοπαναγιώτης Ζ..... | 22, 52 |
| Αγγελής Γ..... | 82, 94, 96, 98, 104 | Διαλλινάς Γ..... | 74 |

Διαμαντοπούλου Π.	118
Δραΐνας Κ.	40, 60, 64, 110
Δροσοπούλου Ε.	42
Ελευθεριάδου Ο.	60
Ζαχαρίας Ι.	50, 52
Ζερβάκης Γ.	24
Ζώτου Α.	84
Καλλιμάνης Α.	40
Καλογεράκης Ν.	16
Καλογερής Ε.	100
Κανδαράκης Ι.	84
Κανινή Γ.	86
Καραγκούνη Α.	34, 74, 80, 86
Καρπούζας Δ.	20, 54
Κατινάκη Α.	14
Κατινάκης Π.	14, 62
Κατινάκης ¹	14
Κατσαβέλη Κ.	26
Κατσίφα Α.	64
Καψανάκη-Γκότση Ε.	28, 48, 90
Κέκος Δ.	100
Κεχαγιάς Γ.	50, 52
Κιρτζαλίδου Α.	38
Κολίσης Φ.	88, 110
Κόλλα Κ.	30
Κοντού Μ.	102
Κορμάς Κ.	16, 34, 36
Κοτζαμανίδης Χ.	92
Κόττα-Λοϊζου Ι.	30
Κουβέλης Ν.	32
Κούκκου Α.	40, 64
Κουκουράκη Π.	88
Κουλουμπής Σ.	90
Κουρελής Α.	92
Κριμιτζάς Α.	32
Κυριακοπούλου Π.	12
Κυριακού Α.	38
Κυρπίδης Ν.	42, 50, 52, 66
Λαζούρα Π.	40
Λιολιοπούλου Φ.	12
Λόρτου Ο.	22
Λυμπεροπούλου Δ.	34
Μακρή Α.	82, 94, 96, 98
Μαμμά Δ.	100
Μαμούρης Ζ.	46
Μανδαλάκης Μ.	66, 68
Μανιάτη Π.	100
Μαργαριτόπουλος Ι.	56
Μαρδίρης Θ.	42
Μαστορίδου Μ.	96
Μαυρομάτη Μ.	94
Μεζίτη Α.	36
Μεντέ Ε.	36
Μήτσου Ε.	38
Μόσιαλος Δ.	46, 56, 102
Μοσχοπούλου Α.	84

Μουκούλη Μ.	106	Σκούρας Ζ.	42
Μουστάκα-Γούνη Μ	16, 34	Σκρέτας Γ.	114
Μούτου Κ.	46	Σουσάνογλου Α.	100
Μπελετσιώτης Ε.	112	Σοφικίτη Α.	88
Μπέλλου Σ.	96, 104	Σταθοπούλου Π.	74, 80, 86
Μπίρκου Μ.	104	Σωτηρούδης Θ.	88
Μπιρμπίλης Χ.	46	Τεκερλεκοπούλου Α.	116
Μπούρτζης Κ.	22, 26, 42, 50, 52, 116	Τέστα Θ.	92
Μυστριώτη Π.	96	Τζαμαλή Ε.	44
Νίκας Ε.	84	Τζανετάκη-Λιτοπούλου Ε.	92
Ξηρός Χ.	106	Τζανετάκης Ν.	92
Παπαγιαννούλης Α.	102	Τζωρτζακάκης Μ.	54
Παπαδοπούλου Κ.	20	Τόλλης Ι.	44
Παππά Α.	40	Τόπακας Ε.	106
Παππά Κ.	112	Τόσκα Ε.	46
Παραπούλη Μ.	64	Τριανταφύλλου Μ.	48
Πάσχος Ο.	106	Τσελεπή Μ.	94
Πατμανίδη Α.	108	Τσιάμης Γ.	22, 26, 42, 50, 52, 116
Περισυνάκης Α.	40	Τύπας Μ.	30, 32, 112
Πιλάλης Ε.	110	Υψηλάντης Ι.	20
Ποϊράζη Π.	44	Φάκας Σ.	94, 98
Πολυμενάκου Π.	66, 68	Φιλιππούσης Α.	118
Πούλιος Σ.	20	Χαμαλάκη Α.	50, 52
Πραματευτάκη Π.	38	Χανίκα Ε.	54
Πυρρή Ι.	28	Χατζή Ι.	56
Σαββάκης Ι.	112	Χατζηιωάννου Α.	110
Σαρτσίδης Α.	42	Χατζηλουκάς Ε.	30, 76
Σεριστατίδου Ε.	22	Χατζηνικολάου Δ.	74, 80, 86, 90, 108

Χατζηπαυλίδης Ι.	14	Χρυσικόπουλος Κ.	78
Χριστακόπουλος Π.	106		