



5^ο Συνέδριο της Επιστημονικής Εταιρείας ΜΙΚΡΟΒΙΟΚΟΣΜΟΣ

Ο ΜΙΚΡΟΒΙΟΚΟΣΜΟΣ
ΣΤΗΝ ΤΡΟΦΙΚΗ ΑΛΥΣΙΔΑ
ΑΠΟ ΤΗ ΒΙΟΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑ
ΣΤΙΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

Πρακτικά συνεδρίου

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών
13 - 15 Δεκεμβρίου 2012

Επιστημονική και Οργανωτική Επιτροπή

Γεώργιος Ι. Νυχάς	Πρόεδρος, ΓΠΑ
Εφη Τσακαλίδου	Αντιπρόεδρος, ΓΠΑ
Ελευθέριος Δροσινός	Ταμίας, ΓΠΑ

Μέλη

Α. Ακτύπης	ΓΠΑ
Π. Αντωνίου	ΓΠΑ
Δ. Γεωργακόπουλος	ΓΠΑ
Ε. Δροσινός	ΓΠΑ
Γ. Ζερβάκης	ΓΠΑ
Π. Κατινάκης	ΓΠΑ
Α. Κουτίνας	ΓΠΑ
Κ. Μουντζούρης	ΓΠΑ
Κ. Οιχαλιώτης	ΓΠΑ
Ε. Πανάγου	ΓΠΑ
Κ. Παπαδημητρίου	ΓΠΑ
Σ. Παπανικολάου	ΓΠΑ
Ε. Παπλωματάς	ΓΠΑ
Π. Σκανδάμης	ΓΠΑ
Ν. Ταμπακάκη	ΓΠΑ
Σ. Τζάμος	ΓΠΑ
Δ. Τσιτσιγιάννης	ΓΠΑ
Ι. Χατζηπαυλίδης	ΓΠΑ
Π. Πολυμενάκου	ΕΛΚΕΘΕ, ΗΡΑΚΛΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ (ΜΙΚΡΟΒΙΟΚΟΣΜΟΣ)
Ζ. Σκούρας	ΑΠΘ, ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ (ΜΙΚΡΟΒΙΟΚΟΣΜΟΣ)
Κ. Μπούρτζης	ΠΙ, ΙΩΑΝΝΙΝΑ-ΑΓΡΙΝΙΟ (ΜΙΚΡΟΒΙΟΚΟΣΜΟΣ)
Χ. Ουζούνης	ΙΝΑ-ΕΚΕΤΑ, ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ (ΜΙΚΡΟΒΙΟΚΟΣΜΟΣ)
Ν. Κυρπίδης	DOE-JGI, USA (ΜΙΚΡΟΒΙΟΚΟΣΜΟΣ)
Κ. Κορμάς	ΠΘ, ΒΟΛΟΣ ΘΕΣΣΑΛΙΑ (ΜΙΚΡΟΒΙΟΚΟΣΜΟΣ)
Δ. Καρπούζας	ΠΘ, ΒΟΛΟΣ ΘΕΣΣΑΛΙΑ (ΜΙΚΡΟΒΙΟΚΟΣΜΟΣ)

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ

Πέμπτη 13 Δεκεμβρίου 2012

13:30 – 14:00 Καλωσόρισμα - Χαιρετισμοί

Συνεδρία I

ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΩΝ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΩΝ
ΤΩΝ ΜΕΛΩΝ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΒΙΟΚΟΣΜΟΥΑνταγωνιστικά ερευνητικά προγράμματα χρηματοδοτούμενα από
πηγές της Ευρωπαϊκής Επιτροπής

14:00 – 14:15	<p>7th FP - Ερευνητικά Κοινοτικά έργα του Οργανισμού ΔΗΜΗΤΡΑ (ΕΘΙΑΓΕ)</p> <p>1^ο PROBIOLIVES: Ζύμωση επιτραπέζιων ελιών με επιλεγμένα στελέχη προβιοτικών γαλακτικών βακτηρίων. Για ένα νέο λειτουργικό τρόφιμο.</p> <p>2^ο WildWine: Multi-strain indigenous yeast and bacterial starters for ‘wild-ferment’ wine production</p> <p><i>Δρ. Χρυσούλα Τάσσου & Δρ. Ασπασία Νησιώτου</i></p>
14:15 – 14:30	<p>7th FP - Ερευνητικά Κοινοτικά έργα του Εργαστηρίου Ποιοτικού Ελέγχου Τροφίμων & Ποτών του ΓΠΑ</p> <p>1^ο QUAFACTY: Comprehensive approach to enhance quality and safety of ready to eat fresh products</p> <p>2^ο SOPHY: Development of a SOftware tool for Prediction of ready-to-eat food product sHelf life, quality and safety</p> <p>3^ο PROMISE: PROtection of cOnsumers by MIconicrobial risk mitigation through combating Segregation of Expertise</p> <p><i>Αν. Καθ. Ε. Χ. Δροσινός & Επ. Καθ. Π. Ν. Σκανδάμης</i></p> <p><u>Integrated projects:</u></p> <p>1^ο BIOTRACER: Improved BIO-TRACEability of unintended microorganisms and their substances in food and feed chains</p> <p><i>Επ. Καθ. Π. Ν. Σκανδάμης & Καθ. Γ.-Ι. Ε. Νυχάς</i></p> <p>2^ο PathogenCombat: Control and prevention of emerging and future pathogens at cellular and molecular level throughout the food chain</p> <p><i>Αν. Καθ. Ε. Χ. Δροσινός & Καθ. Ε. Τσακαλίδου</i></p>
14:30 – 14:45	<p>7th FP - Ερευνητικά Κοινοτικά έργα του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας τροφίμων</p> <p>1^ο ProSafeBeef: Improving the Quality and Safety of Beef and Beef Products for the Consumer in Production and Processing</p> <p>2^ο Symbiosis-EU: Scientific sYnergisM of nano-Bio-Info-cOgni Science for an Integrated system to monitor meat quality and Safety during production, storage, and distribution in the European Union</p> <p><i>Επικ. Καθ. Ε. Ζ. Πανάγου & Καθ. Γ.-Ι. Ε. Νυχάς</i></p>

14:45 - 15:00	<p>7th FP - Ερευνητικά Κοινοτικά έργα του Εργαστηρίου Μηχανικής Τροφίμων - Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας Τροφίμων</p> <p>1^ο PROPANERGY: Integrated bioconversion of glycerine into value-added products and biogas at pilot plant scale</p> <p>2^ο BRIGIT: New tailor-made biopolymers produced from lignocellulosic sugars waste for highly demanding fire-resistant applications</p> <p><i>Επικ. Καθ. Σ. Παπανικολάου & Λέκτορας Α. Κουτίνας</i></p>
15:00 – 15:15	<p>7th FP - Ερευνητικά Κοινοτικά έργα του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας</p> <p>1^ο ECOFUN-MICROBIODIV: Development and implementation of innovative tools to estimate the ecotoxicological impact of low dose pesticide application in agriculture on soil functional microbial diversity</p> <p>2^ο LOVE TO HATE: Pesticides – Felicity or curse for the soil microbes, Marie Curie</p> <p><i>Επικ. Καθηγητής Δημήτριος Καρπούζας</i></p>
15:15-15:45	<p>Ερευνητικά Κοινοτικά έργα της ερευνητικής ομάδας «Μοριακή Γενετική και Μικροβιολογία: από γονίδια και γονιδιώματα σε οργανισμούς και εφαρμογές» του Πανεπιστημίου Δυτικής Ελλάδας</p> <p>1^ο MicrobeGR: Supporting environmental microbiology and biotechnology research potential in Western Greece</p> <p>2^ο BIODESERT: Biotechnology from desert microbial extremophiles for supporting agriculture research potential in Tunisia and Southern Europe</p> <p>3^ο SCG-ETOLIKO: Unraveling the unique microbial diversity of the Etoliko lagoon in Western Greece through a single cell genomics approach</p> <p><i>Λέκτορας Γ. Τσιάμης & Καθ. Κ. Μπούρτζης</i></p>

**Ανταγωνιστικά ερευνητικά προγράμματα χρηματοδοτούμενα από
Εθνικές & Ευρωπαϊκές πηγές - ΘΑΛΗΣ & ΑΡΙΣΤΕΙΑ**

	<p>4^ο ΣΥΜΒΙΟΜΙΚΗ: Συμβιωτικά βακτήρια και Ομικές τεχνολογίες στην προοπτική νέων, φιλικών προς το περιβάλλον, μεθόδων ελέγχου επιβλαβών εντόμων: το παράδειγμα της Μεσογειακής μύγας</p> <p><i>Καθ. Κ. Μπούρτζης & Λέκτορας Γ. Τσιάμης</i></p>
15:45 – 16:00	<p>1^ο LABGEN: Αλληλούχηση και Χαρακτηρισμός των Γονιδιωμάτων των Οξυγαλακτικών Βακτηρίων <i>Streptococcus macedonicus</i>, <i>Streptococcus thermophilus</i>, <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> και <i>Lactobacillus acidiphiscis</i>. Φυσιολογικές, Εξελικτικές και Τεχνολογικές Προεκτάσεις</p> <p>2^ο BIOYMENIA: Βιολογική ολιστική προσέγγιση της δυναμικής Μορφής Επιβίωσης παθογόνων βακτηριακών σχηματισμών</p> <p><i>(1^ο) Καθ. Ε. Τσακαλίδου, (2^ο) Καθ. Γ.-Ι. Ε. Νυχάς & Επικ. Καθ. Π. Ν. Σκανδάμης</i></p>

16:00 – 16:15	EVOTRANS Διαμεμβρανική μεταφορά: σχέσης δομής – λειτουργίας και εξέλιξης <i>Καθ. Ε. Φριλίγγος</i>
16:15 – 16:30	SALTYMYC : Συμβολή των Μυκορριζών στην Αειφορικότητα Οριακών Μεσογειακών Οικοσυστημάτων – Ανάπτυξη Μυκορριζικών Εμβολίων <i>Επικ. Καθ. Κ. Οιγαλιώτης</i>
16:30 – 16:45	DeMMONFoQus Ανάπτυξη, μαθηματική περιγραφή και άριστος σχεδιασμός καινοτόμων μη θερμικών τεχνολογιών για την επεξεργασία, συσκευασία, διακίνηση και αποθήκευση τροφίμων βελτιωμένης ποιότητας και ασφάλειας <i>Καθ. Π. Ταούκης</i>
16:45 – 17:00	ΑΡΙΣΤΕΙΑ 1^ο FungalPrognosis : Σχεδιασμός και ανάπτυξη καινοτόμων εργαλείων για την ανίχνευση ωχρατοξινογόνων μυκήτων σε οινοποιήσιμα και επιτραπέζια σταφύλια 2^ο iMeatSense : Προσδιορισμός της ποιότητας του κρέατος μέσω ευφυούς συστήματος βασισμένο σε πολλαπλούς αισθητήρες <i>Επικ. Καθ. Ε. Ζ. Πανάγου & Καθ. Γ.-Ι. Ε. Νυχάς</i>

17:00 – 17:30	Καφές & Τσάι
----------------------	-------------------------

17:30 – 18:00	Κεντρική Ομιλία “Life and Death in Biofilms” <i>Prof. Hans-Kurt Fleming, Biofilm Center, Faculty of Chemistry, University of Duisburg-Essen, Germany</i>
---------------	--

Παρασκευή 14 Δεκεμβρίου 2012

Συνεδρία II	ΤΡΟΦΙΜΑ Προεδρείο: Κ. Κουτσομανής & Κ. Παπαδημητρίου
--------------------	---

08:30 – 09:00	Κεντρική Ομιλία “The drug makes the bug: insights from <i>Listeria</i>” <i>Prof. Sophia Kathariou, North Carolina State University, US</i>
09:00 – 09:20	Βιοποικιλότητα στελεχών <i>Listeria monocytogenes</i> και <i>Escherichia coli</i> O157:H7 που απομονώθηκαν από δείγματα φρέσκων λαχανικών <i>Α. Χατζηλούκα, Α. Κατσάρου, Σ. Παραμυθιώτης, Ε. Χ. Δροσινός, ΓΠΑ</i>
09:20 – 09:40	Έλεγχος του παθογόνου <i>Escherichia coli</i> O157:H7 σε έτοιμες κομμένες σαλάτες λαχανικών με εμπορικά & φυσικά αντιμικροβιακά σκευάσματα <i>Σ. Ποιμενίδου, Β. Μπικούλη, Π. Σκανδαμης, ΓΠΑ</i>

09:40 – 10:00	Έλεγχος του <i>L. monocytogenes</i> σε λουκάνικα Φρανκφούρτης και ζαμπόν με εδωδιμες αντιμικροβιακές μεμβράνες και αναθέρμανση σε μικροκύματα <i>A. Καπετανάκου, Δ. Καρυώτης, Π. Σκανδάμης, ΓΠΑ</i>
10:00 – 10:20	Επιπολασμός των μικροοργανισμών <i>L. monocytogenes</i> και <i>E. coli</i> O157:H7 σε δείγματα ρόκας (<i>Eruca sativa</i>), αγγουριού (<i>Cucumis sativus</i>) και φράουλας (<i>Fragaria ananassa</i>) <i>A. Χατζηλούκα, Κ. Σ. Μαντζουράνη, Β. Κούμπου, Σ. Παραμυθιώτης, Μ. Ματαράγκας, Ε. Χ. Δροσινός, ΓΠΑ</i>
10:20 – 10:40	Αναστολή της ανάπτυξης μικροοργανισμών της ελιάς από μονοκαλλιέργειες και συγκαλλιέργειες στελεχών του γένους <i>Lactobacillus</i> <i>A. Δουλγεράκη, Α. Πρόιου, Γ.-Ι. Νυχάς, Ε. Πανάγου, ΓΠΑ</i>
10:40 – 11:10	Καφές & Τσάι Αναρτημένες Εργασίες (Τρόφιμα – Ενέργεια – Τεχνολογίες)
11:10 – 11:30	Ανίχνευση αντιμικροβιακών ουσιών σε βακτήρια της εντερικής μικροχλωρίδας υγιών νεογνών <i>A. Τσάπατου, Ε. Μήτσου, Μ. Κώτσου, Π. Πραματευτάκη, Α. Κυριακού, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο</i>
11:30 – 11:50	Προβιοτικά γαλακτικά βακτήρια ως εκκινητές στη ζύμωση των ελιών και η επιβίωσή τους κατά την αποθήκευση του τελικού προϊόντος <i>A. Αργύρη, Ε. Λύρα, Α. Νησιώτου, Π. Πραματευτάκη, Χ. Τάσσου, ΕΓΟ «ΔΗΜΗΤΡΑ»</i>
11:50 – 12:10	Γονοτυπικός πλούτος και οινολογικό δυναμικό άγριων πληθυσμών <i>Saccharomyces cerevisiae</i> από γλεύκη Αγιωργίτικου της ζώνης ΠΟΠ Νεμέας <i>Ε. Διαμαντέα, Γ. Μπανίλας, Χ. Τάσσου, Α. Νησιώτου, ΕΓΟ «ΔΗΜΗΤΡΑ»</i>
12:10 – 12:30	Γενετικός και μοριακός χαρακτηρισμός και αξιολόγηση ελληνικών μη-τοξικογόνων απομονώσεων του γένους <i>Aspergillus</i> για την επιλογή τους ως παράγοντες βιολογικής αντιμετώπισης των αφλατοξινών <i>Μ. Γεωργιάδου, Σ. Π. Αγορίτσης, Κ. Βήχου, Γ. Βαρδουνιώτης, Σ. Γιαννιώτης, Ε. Παπλωματάς, Ρ. J. Cotty και Δ. Ι. Τσιτσιγιάννης, ΓΠΑ</i>
12:30 – 12:50	Επίδραση των θρεπτικών στοιχείων και επιφανειοδραστικών ουσιών στο σχηματισμό βιοϋμενίου από στελέχη του <i>Bacillus cereus</i> <i>Α. Αντωνόπουλος, J. Wijman, T. Abee, TEI Καλαμάτας</i>
12:50 – 14:30	Ελαφρύ Γεύμα Αναρτημένες Εργασίες (Τρόφιμα – Ενέργεια – Τεχνολογίες)

Συνεδρία III	ΤΡΟΦΙΜΑ Προεδρείο: Α. Νησιώτου & Μ. Ματαράγκας
---------------------	---

14:30 – 14:50	Μικροβιολογική ποιότητα και αλλοίωση ιχθύων ελληνικών υδατοκαλλιεργειών <i>Ι. Μποζιάρης, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας</i>
14:50 – 15:10	Διερεύνηση ποικιλότητας αλλοιωγόνων μικροοργανισμών σε φιλέτα και ολόκληρη τσιπούρα στους 0°C με ανάλυση γονιδίου 16S rRNA <i>Φ. Παρλαπάνη, Κ. Κορμάς, Ι. Μποζιάρης, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας</i>
15:10 – 15:30	Υπερανθεκτικότητα των παθογόνων <i>L. monocytogenes</i> και <i>Salmonella</i> sp. σε αντιβιοτικά και μετέπειτα επιβίωσή τους σε συνθήκες καταπόνησης <i>Μανιός Σ., Ζώης Ι., Καμιντζής Γ.Η., Σκανδάμης Π., ΓΠΑ</i>
15:30 – 15:50	Σχέση μεταξύ βλάστησης και μυκηλιακής αύξησης μεμονωμένων σπορίων μυκήτων <i>Μ. Γουγουλή, Κ. Κουτσομανής, ΑΠΘ</i>
15:50 – 16:10	Ο μεγάλος κηρόσκορος <i>Galleria mellonella</i> ως ξενιστής μοντέλο για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης μεταξύ επιλεγμένων γαλακτικών βακτηρίων και παθογόνων <i>Γρούντα Α., Νυχάς Γ.-Ι., Πανάγου Ε.Ζ., Μυλωνάκης Ε., ΓΠΑ</i>

16:10 – 16:40	Καφές & Τσάι Αναρτημένες Εργασίες (Τρόφιμα – Ενέργεια – Τεχνολογίες)
----------------------	---

Συνεδρία IV	ΕΝΕΡΓΕΙΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΕΣ Προεδρείο: Α. Καραγκούνη & Π. Πολυμενάκου
--------------------	---

16:40 – 17:00	Μικροβιακή Οικολογία και Γονιδιωματική του Ενός Κυττάρου στη λιμνοθάλασσα του Αιτωλικού <i>Τσιάμης Γ., Α. Χαμαλάκη, C. Rinke, N. Κυρπίδης, T. Woyke, Κ. Μπούρτζης, Πανεπιστήμιο Δυτικής Ελλάδας</i>
17:00 – 17:20	Απομόνωση και ταυτοποίηση ενός νέου πολυκετίδιου από ενδοφυτικό ακτινοβακτήριο ροδοφύκους <i>Rab E., Ε. Ιωάννου, Δ. Κέκος, Β. Ρούσσης, ΕΚΠΑ</i>
17:20 – 17:40	Αξιοποίηση της τεχνολογίας FLAsH για να μελετηθεί η μεταφορά CagA πρωτεΐνης του <i>Helicobacter pylori</i> μέσω του τύπου IV εκκριτικού συστήματος <i>Παπαδάκος Κ., Σουγλέρη Ι., Χατζηλουκάς Ε, Μεντής Α, Σγούρας, Δ., Ε.Ι. Παστέρ</i>
17:40 – 18:00	Μικροβιακοί βιοαισθητήρες προσδιορισμού μονοσακχαριτών σε αραβινοξυλάνες <i>Lukasiak J., Γεωργίου Κ., Karsten Olsen, Δ. Γεωργακόπουλος, ΓΠΑ</i>

Σάββατο 15 Δεκεμβρίου 2012

Συνεδρία V	ΤΡΟΦΙΜΑ Προεδρείο: Μ. Τύπας & Π. Σκανδάμης
-------------------	--

08:30 – 09:00	Κεντρική Ομιλία “Milk fermented by <i>Propionibacterium freudenreichii</i> induces apoptosis of digestive cancer cells: a new tool to fight cancer development?” <i>Dr. Gwénaél Jan, INRA, UMR1253 Science et Technologie du Lait et de l'Œuf, AGROCAMPUS OUEST, Rennes, France</i>
09:00 – 09:20	Συγκριτική γονιδιωματική του <i>Streptococcus macedonicus</i> ACA-DC 198 με συγγενικά του είδη που ανήκουν στο σύμπλεγμα <i>Streptococcus bovis</i> / <i>Streptococcus equinus</i> <i>K. Παπαδημητρίου, P. Αναστασίου, M. Γεωργαλάκη, S.Ferreira, P. Suprly, N. Παπανδρέου, B. Pot, E. Τσακαλίδου, ΓΠΑ</i>
09:20 – 09:40	Η Μασεδοβισίνη του <i>Streptococcus macedonicus</i> ACA-DC 198 υποδεικνύει την ύπαρξη μίας νέας υποομάδας λαντιβιοτικών μέσα στην ομάδα της Λακτισίνης 481 <i>M. Γεωργαλάκη, K. Παπαδημητρίου, P. Αναστασίου, B. Pot, G. Van Driessche, B. Devreese, E. Τσακαλίδου, ΓΠΑ</i>
09:40 – 10:00	Ανάλυση της μικροχλωρίδας σε συσκευασία γάλακτος τεχνολογίας ESL από πέντε εταιρείες της ελληνικής αγοράς <i>A. Γκίκας, K. Καλαντζή, E. Μπελετσιώτης, ΔΕΛΤΑ Τρόφιμα ΑΕ</i>
10:00 – 10:20	Φαινοτυπική, τεχνολογική και γενοτυπική παραλλακτικότητα λακτοβακίλλων που απομονώθηκαν από ώριμη ΠΟΠ Γραβιέρα Κρήτης, η οποία παρασκευάστηκε σε δύο τυροκομεία <i>Π. Τσαφρακίδου, Σ. Παυλίδου, Δ. Μποζούδη, M. Χατζηκαμάρη, E. Λιτοπούλου – Τζανετάκη, ΑΠΘ</i>
10:20 – 10:40	Γραβιέρα Κρήτης και Γραβιέρα Νάξου: μικροβιολογικά και φυσικοχημικά χαρακτηριστικά διαφοροποίησης <i>A. Μποζούδη, Σ. Παυλίδου, S. Torriani, E. Λιτοπούλου–Τζανετάκη, ΑΠΘ</i>

10:40 – 11:10	Καφές & Τσάι Αναρτημένες Εργασίες (Περιβάλλον – Γεωργία - Πολιτισμός)
---------------	---

Συνεδρία VI	ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ Προεδρείο: Δ. Καρπούζας & Κ. Ουγαλιώτης
--------------------	--

11:10 – 11:30	Εξερευνώντας το μέγεθος της μικροβιακής ποικιλότητας σε διαφορετικά βαθιά θαλάσσια περιβάλλοντα (λεκάνες, πρανή, υποθαλάσσια βουνά) και υποθαλάσσια ηφαίστεια της Ανατολικής Μεσογείου με τη μέθοδο της πυροαλληλούχισης <i>Πολυμενάκου Π. Ν., Χρηστάκης Χ.Α., Λαμπαδαρίου Ν., Νομικού Π., Carey S., Bell Croff K., Κυρπίδης Ν., Μανδαλάκης Μ., Σεβαστού Κ., Σαρροπούλου Ε., Ούλας Α., Λυκούσης Β., Τσελεπίδης Α., ΕΛΚΕΘΕ</i>
---------------	--

11:30 – 11:50	Αποτελεσματικότητα της αυτόχθονης βιοενίσχυσης στην αντιμετώπιση θαλάσσιων πετρελαιοκηλίδων <i>Νικολοπούλου Μ., Eickenbusch P., Πασαδάκης Ν., Βενιέρη Δ., Καλογεράκης Ν., Πολυτεχνείο Κρήτης</i>
11:50 – 12:10	Συγκρίνοντας την πυροαλληλούχιση και τις 16S rRNA βιβλιοθήκες σε ένα σύστημα με χαμηλή βακτηριακή ποικιλότητα <i>Μεζίτη Α., Κ. Α. Κορμάς, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας</i>
12:10 – 12:30	Μελέτη της ποικιλότητας νιτροδωποιητικών μικροοργανισμών σε Μεσογειακά χερσαία οικοσυστήματα <i>Μπεκρής Φ., Σ. Πυρίντσος, Πανεπιστήμιο Κρήτης</i>
12:30 – 12:50	Η δομή των μικροβιακών κοινοτήτων στην οξεοποιητική βαθμίδα συστήματος αναερόβιας χώνευσης υγρών αποβλήτων τυροκομικής μονάδας <i>Ντούγιας Σ., Δ. Σουλτάνη, Π. Μελίδης, ΔΠΘ</i>

12:50 – 14:30	Ελαφρύ Γεύμα Αναρτημένες Εργασίες (Περιβάλλον – Γεωργία - Πολιτισμός)
---------------	--

Συνεδρία VII	ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ Προεδρείο: Ν. Καλογεράκης & Γ. Τσιάμης
---------------------	--

14:30 – 14:50	Το εκτομυκορριζικό γένος <i>Lactarius</i> Pers. στην Ελλάδα - Νέα στοιχεία για τη δομή του ταξινομικού τμήματος <i>Olentis</i> <i>Τριανταφύλλου Μ., Η.Πολέμης, Ζ. Γκόνου-Ζάγκου, Δ. Δήμου, Π. Δεληβοριάς, Γ. Ζερβάκης, ΓΠΑ</i>
14:50 – 15:10	Οι πεπτιδουλ-πρόλυλ <i>cis/trans</i> ισομεράσεις ως νέοι ρυθμιστές της κινητικότητας των βακτηρίων και της ικανότητας σχηματισμού βιοϋμενίων <i>Δήμου Μ., Ζωγράφου Χ., Σκαγιά Α., Βεζύρη Ε., Βενιεράκη Α., Κατινάκης Π., ΓΠΑ</i>
15:10 – 15:30	Διερεύνηση του κύκλου του άνθρακα και του αζώτου σε εδάφη που έχουν δεχθεί Υγρά Απόβλητα Ελαιουργείου <i>Τσικνιά Μ., Τζανακάκης Β., Οικονομίδης Δ., Παρανυχιανάκης Ν., Νικολαΐδης Ν., Πολυτεχνείο Κρήτης</i>
15:30 – 15:50	Συγκριτική πρωτεομική ανάλυση στο <i>Arthrobacter phenanthrenivorans</i> κατά την ανάπτυξή του σε διαφορετικά υποστρώματα άνθρακα <i>Βανδέρα Ε., Σαμιωτάκη Μ., Παραπούλη Μ., Παναγιώτου Γ., Κούκκου Α.Ι.</i>
15:50 – 16:10	Λειτουργικός χαρακτηρισμός της αντλίας εκροής <i>ttgABC</i> της οικογένειας RND στο εντομοπαθογόνο βακτήριο <i>Pseudomonas entomophila</i> <i>Νικολούλη Κ., Δ. Μόσιαλος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας</i>

16:10 – 16:40	Καφές & Τσάι Αναρτημένες Εργασίες (Περιβάλλον – Γεωργία - Πολιτισμός)
---------------	--

Συνεδρία VIII	ΓΕΩΡΓΙΑ Προεδρείο: Π. Αντωνίου & Ι. Χατζηπαυλίδης
----------------------	--

16:40 – 17:00	Αξιοποίηση μορφολογικών και μοριακών δεδομένων για τον προσδιορισμό ειδών του μυκητόφιλου γένους <i>Cladobotryum</i> στην Ελλάδα <i>Μίλις Ν., Α. Σταύρου, Ι. Καραγιάννης, Ζ. Γκόνου, Β. Κουβέλης, ΕΚΠΑ</i>
17:00 – 17:20	Φυλογενετική μελέτη και διάγνωση των VCGs του μύκητα <i>Verticillium dahliae</i> μέσω ανάλυσης της διαγονιδιακής περιοχής IGS της πυρηνικής ριβοσωμικής επανάληψης <i>Ι. Α. Παπαϊωάννου, Χ. Δ. Δημοπούλου, Μ. Α. Τύπας</i>
17:20 – 17:40	Μελέτη του σχηματισμού βιοϋμενίων σε φυσικά και μεταλλαγμένα στελέχη του αιθανολοπαραγωγού βακτηρίου <i>Zygomonas mobilis</i> <i>Ταμπακοπούλου Β. Ο., Α. Δαμουλάκη, Α. Μ. Παππά, ΕΚΠΑ</i>
17:40 – 18:00	Διερευνώντας το μοριακό φαινοτυπικό φάσμα ριζοβιακών πρωτεϊνών-τελεστών στο σακχαρομύκητα <i>Φωτιάδης Χ., Α. Ταμπακάκη, ΓΠΑ</i>

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Εναρκτήριες Ομιλίες

Life and Death in Biofilms	1
Milk fermented by <i>Propionibacterium freudenreichii</i> induces apoptosis of digestive cancer cells: a new tool to fight cancer development?.....	2
The drug makes the bug: insights from <i>Listeria</i>	3

Τρόφιμα

Εκτίμηση της βιομάζας ειδών του γένους <i>Morchella</i> σε καλλιέργειες στερεής κατάστασης: επίδραση της ηλικίας και της μορφολογικής κατάστασης του μυκηλίου στην περιεκτικότητά του σε γλυκοζαμίνη	8
Παραγωγή βακτηριοσινών από οξυγαλακτικά βακτήρια απομονωμένα από τρόφιμα έναντι παθογόνων στελεχών της στοματικής κοιλότητας	24
Εκτίμηση των μεταβολών της σύστασης των κυττάρων του <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> MG1363 σε συνθήκες στρες με την εφαρμογή φασματοσκοπίας FT-IR.....	26
Χρήση FT-IR για τη μελέτη της αντιμικροβιακής ικανότητας των <i>Melissa officinalis</i> L. και <i>Crocus sativus</i> L. έναντι παθογόνων στελεχών της στοματικής κοιλότητας.....	28
Μικροβιολογικά χαρακτηριστικά όξινων προϊόντων γάλακτος παρασκευασμένα από μικροδιηθημένο αγελαδινό γάλα.....	44
Συντήρηση αχλαδιών σε νερό παρουσία σπόρων <i>Sinapis arvensis</i> : μια ελληνική Παράδοση	46
Φαινοτυπική, τεχνολογική και γενοτυπική παραλλακτικότητα λακτοβακίλλων που απομονώθηκαν από ώριμη ΠΟΠ Γραβιέρα Κρήτης, η οποία παρασκευάστηκε σε δύο τυροκομεία	48
WILDWINE: Multi-strain indigenous Yeast and Bacterial starters for ‘Wild-ferment’ Wine production (FP7-SME-2012 project).....	56

PROBIOLIVES: Ζύμωση επιτραπέζιων ελιών με επιλεγμένα στελέχη προβιοτικών γαλακτικών βακτηρίων. Για ένα νέο λειτουργικό τρόφιμο (FP7-SME-2008- 2 project).....	58
Στελέχη <i>Lactobacillus</i> διασπών τις γλοιαδίνες και βελτιώνουν την εντεροπάθεια που επάγεται από τη γλουτένη σε ζωικό μοντέλο	64
Γραβιέρα Κρήτης και Γραβιέρα Νάξου: μικροβιολογικά και φυσικοχημικά χαρακτηριστικά διαφοροποίησης.....	66
Η ανακάλυψη της Μασεδοβισίνης που παράγεται από το <i>Streptococcus macedonicus</i> ACA-DC 198 υποδεικνύει την ύπαρξη μίας νέας υποομάδας λαντιβιοτικών μέσα στην ομάδα της Λακτισίνης 481.....	70
Συγκριτική ανάλυση του pSMA198 του <i>Streptococcus macedonicus</i> ACA-DC 198, του πρώτου πλασμιδίου που βρέθηκε στους στρεπτόκοκκους και ανήκει στην οικογένεια των ρεπλικονίων pCI305/pWV02 που αντιγράφονται μέσω του μηχανισμού θ.....	72
Η αλληλουχία του γονιδιώματος του <i>Streptococcus macedonicus</i> ACA-DC 198 που απομονώθηκε από το περιβάλλον του γάλακτος.....	74
Συγκριτική γονιδιωματική του <i>Streptococcus macedonicus</i> ACA-DC 198 με συγγενικά του είδη που ανήκουν στο σύμπλεγμα <i>Streptococcus bovis</i> / <i>Streptococcus equines</i>	76
Προβιοτικά γαλακτικά βακτήρια ως εκκινητές στη ζύμωση των ελιών και η επιβίωσή τους κατά την αποθήκευση του τελικού προϊόντος.....	78
Ανίχνευση αντιμικροβιακών ουσιών σε βακτήρια της εντερικής μικροχλωρίδας υγιών νεογνών	84
Βιολογική αντιμετώπιση του τοξικογόνου μύκητα <i>Aspergillus flavus</i> και των αφλατοξινών που παράγει σε κελυφωτά φιστίκια «Αιγίνης».....	88
Επίδραση των θρεπτικών στοιχείων και επιφανειοδραστικών ουσιών στο σχηματισμό βιοϋμενίου από στελέχη του <i>Bacillus cereus</i>	90

Σχηματισμός βιοϋμενίου από στελέχη του <i>Bacillus cereus</i> υπό αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες.....	92
Ανάλυση της μικροχλωρίδας σε συσκευασίες γάλακτος τεχνολογίας ESL από πέντε εταιρίες της ελληνικής αγοράς.....	94
Βιοποικιλότητα στελεχών <i>Listeria monocytogenes</i> και <i>Escherichia coli</i> O157:H7 που απομονώθηκαν από δείγματα φρέσκων λαχανικών	102
Μελέτη της παραδοσιακής ζύμωσης ανώριμων ανθοκεφαλών του φυτού <i>Cynara cardunculus</i>	104
Ανίχνευση αλληλουχιών-δεικτών γενετικής τροποποίησης σε γαλακτοκομικά προϊόντα...	106
Επίδραση θειώδους ανυδρίτη στην δυναμική του αυτόχθονου πληθυσμού των ζυμών κατά την αυθόρμητη ερυθρή οиноποίηση <i>Vitis vinifera</i> cultivar Agiorgitiko	108
Δυναμική μικροβιακών πληθυσμών κατά την αυθόρμητη ζύμωση νεαρών βλαστών του φυτού <i>Asparagus officinalis</i>	110
Μικροβιολογική ποιότητα τουρσιών και ικανότητα επιβίωσης των παθογόνων <i>Salmonella Typhimurium</i> και <i>Listeria monocytogenes</i>	112
Επιπολασμός των μικροοργανισμών <i>L. monocytogenes</i> και <i>E. coli</i> O157:H7 σε δείγματα ρόκας (<i>Eruca sativa</i>), αγγουριού (<i>Cucumis sativus</i>) και φράουλας (<i>Fragaria ananassa</i>)...	114
Μελέτη της παραδοσιακής ζύμωσης τομάτας αρχόμενου βαθμού ωριμότητας.....	116
Ανίχνευση παθογόνων μικροοργανισμών στον Χαλβά Φαρσάλων	122
Γονοτυπικός πλούτος και οινολογικό δυναμικό άγριων πληθυσμών <i>Saccharomyces cerevisiae</i> από γλεύκη Αγιωργίτικου της ζώνης ΠΟΠ Νεμέας.....	126

Γενετικός και μοριακός χαρακτηρισμός και αξιολόγηση ελληνικών μη-τοξικογόνων απομονώσεων του γένους <i>Aspergillus</i> για την επιλογή τους ως παράγοντες βιολογικής αντιμετώπισης των αφλατοξινών	130
Μελέτη της ανάπτυξης του παθογόνου στελέχους <i>Staphylococcus aureus</i> σε υγρό θρεπτικό μέσο και εκχυλίσμα μαρουλιού και ρόκας.....	132
Μελέτη της επίδρασης αιθέριου ελαίου ρίγανης στην δυναμική του γένους <i>Brochothrix</i> κατά την συντήρηση βόειου κιμά σε συνθήκες ψύξης.....	134
Αναστολή της ανάπτυξης μικροοργανισμών της ελιάς από μονοκαλλιέργειες και συγκαλλιέργειες στελεχών του γένους <i>Lactobacillus</i>	136
Μικροβιολογική ποιότητα και αλλοίωση ιχθύων ελληνικών υδατοκαλλιεργειών.....	146
Συνδυαστική χρήση αντιμικροβιακών εδώδιμων μεμβρανών και μαρινάδων για την αδρανοποίηση <i>Salmonella</i> spp, <i>Escherichia coli</i> 0157:H7 και <i>Listeria monocytogenes</i> κατά το ψήσιμο χοιρινού κρέατος.....	148
Παρακολούθηση της τύχης βιουμενίου <i>Listeria monocytogenes</i> με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης	150
Διερεύνηση ποικιλότητας αλλοιογόνων μικροοργανισμών σε φιλέτα και ολόκληρη τσιπούρα στους 0°C με ανάλυση γονιδίου 16S rRNA	152
Υπερανθεκτικότητα των παθογόνων <i>L. monocytogenes</i> και <i>Salmonella</i> sp. σε αντιβιοτικά και μετέπειτα επιβίωσή τους σε συνθήκες καταπόνησης.....	162
Ενιαίο μοντέλο πρόρρησης για τον προσδιορισμό του χρόνου ζωής όξινων ορεκτικών σε συνδυασμό με φυσικοχημικές και μικροβιακές μεταβολές.....	164
Προσκόλληση του <i>Lactobacillus pentosus</i> στην επιφάνεια της ελιάς σε διαφορετικές συνθήκες οξύτητας και αλατότητας της άλμης.....	166

Μελέτη της μικροβιολογικής ποιότητας του «Ξύγαλου Σητείας», ενός προϊόντος «Προστατευμένης Ονομασίας Περιοέλευσης», της Κρήτης, Ελλάδος.....	180
Επίδραση του <i>Lactobacillus rennini</i> ACA-DC 565 ως συμπληρωματική καλλιέργεια στα φυσικοχημικά, μικροβιολογικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τυριού Φέτα.....	182
Ενεργή αντιμικροβιακή συσκευασία χοιρινού κρέατος σε τροποποιημένες ατμόσφαιρες με την χρήση αλκοολούχων αποσταγμάτων	196
Έλεγχος του <i>Listeria monocytogenes</i> σε λουκάνικα Φρανκφούρτης και ζαμπόν με εδώδιμες αντιμικροβιακές μεμβράνες και αναθέρμανση σε μικροκύματα.....	200
Έλεγχος του παθογόνου <i>Escherichia coli</i> O157:H7 σε έτοιμες κομμένες σαλάτες λαχανικών με εμπορικά & φυσικά αντιμικροβιακά σκευάσματα	202
Μελέτη της ικανότητας σχηματισμού βιουμενίου διαφόρων στελεχών του παθογόνου βακτηρίου <i>Salmonella enterica</i> σε διαφορετικές συνθήκες, θερμοκρασίας, pH και σύστασης θρεπτικού μέσου ανάπτυξης.....	204
Μόρια σήματα επικοινωνίας (AHLs και AI-2): η παρουσία τους σε βόειο κιμά κατά τη συντήρηση του κάτω από διαφορετικές συνθήκες (θερμοκρασίας και συσκευασίας)	206
Σχέση μεταξύ βλάστησης και μυκηλιακής αύξησης μεμονωμένων σπορίων μυκήτων.....	214
Αντιοξειδωτική δράση, ολικά φαινολικά συστατικά και τοξικότητα επιλεγμένων φαρμακευτικών και αρωματικών φυτών	216
Ο μεγάλος κηρόσκορος <i>Galleria mellonella</i> ως ξενιστής μοντέλο για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης μεταξύ επιλεγμένων γαλακτικών βακτηρίων και παθογόνων.....	218
Μελέτη της κινητικής συμπεριφοράς του <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> σε υγρό εργαστηριακό θρεπτικό υπόστρωμα.....	230
Πιλοτική ζύμωση φυσικώς ώριμων ελιών σε χαμηλή θερμοκρασία με χρήση νέων γαλακτικών βακτηρίων.....	232

Γεωργία

Εκχύλιση, χημική σύσταση και αντιμυκητιακή δράση των αιθερίων ελαίων ενάντια σε μύκητες <i>Rhizopus oligosporus</i> και <i>Penicillium simplicissimum</i>	18
Αξιοποίηση μορφολογικών και μοριακών δεδομένων για τον προσδιορισμό ειδών του μυκητόφιλου γένους <i>Cladobotryum</i> στην Ελλάδα	30
Εσώνια τύπου-I στο πυρηνικό γονίδιο SSU του μύκητα <i>Verticillium dahliae</i> : κατανομή, ποικιλομορφία μεταξύ ριβωσωμικών επαναλήψεων και φυλογενετικές ενδείξεις.....	38
Φυλογενετική μελέτη και διάγνωση των VCGs του μύκητα <i>Verticillium dahliae</i> μέσω ανάλυσης της διαγονιδιακής περιοχής IGS της πυρηνικής ριβωσωμικής επανάληψης.....	40
Η ομαδική κίνηση αυτοχθόνων στελεχών <i>Pseudomonas</i> είναι υπεύθυνη για την αποτελεσματική αναχαίτιση της ανάπτυξης φυτοπαθογόνων μυκήτων.....	52
Μελέτη του σχηματισμού βιοϋμενίων σε φυσικά και μεταλλαγμένα στελέχη του αιθανολοπαραγωγού βακτηρίου <i>Zymomonas mobilis</i>	54
Βιολογική δράση υδατικών εκχυλισμάτων αρωματικών φυτών σε φυτοπαθογόνους και εντομοπαθογόνους μύκητες.....	60
Εκκριτικό σύστημα τύπου III, <i>Bradyrhizobium japonicum</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , Διερευνώντας το μοριακό φαινοτυπικό φάσμα ριζοβιακών πρωτεϊνών-τελεστών στο σακχαρομύκητα	62
NorD, μια πρωτεΐνη-τελεστής του <i>Bradyrhizobium japonicum</i> προκαλεί κυτταρικό θάνατο στο σακχαρομύκητα	98
Παραγωγή εδώδιμων μανιταριών από λιγνοκυτταρινούχα υπολείμματα – Αξιολόγηση της διαδικασίας καλλιέργειας και των τελικών προϊόντων	154
Ενδομυκορριζικά εμβόλια. Εφαρμόζουμε τα σωστά κριτήρια επιλογής στελεχών;	194

Διερεύνηση του ρόλου του συζευγμένου με την G πρωτεΐνη φερομονικού υποδοχέα <i>VdSteA</i> στην παθογένεια και βιολογία του φυτοπαθογόνου μύκητα <i>Verticillium dahliae</i>	220
Μοριακή και φυτοπαθολογική διερεύνηση του ρόλου του ρυθμιστικού γονιδίου του δευτερογενούς μεταβολισμού <i>AcLaeA</i> στο μυκοτοξικογόνο μύκητα <i>Aspergillus carbonarius</i>	222
Μελέτη του ρόλου του ρυθμιστικού γονιδίου του δευτερογενούς μεταβολισμού <i>VdLaeA</i> στην παθογένεια και βιολογία του φυτοπαθογόνου μύκητα <i>Verticillium dahliae</i>	224
Απενεργοποίηση του γονιδίου <i>VdVeA</i> (Velvet A) στο μύκητα <i>Verticillium dahliae</i> και διερεύνηση του ρόλου του στη φυσιολογία και παθογένεια του μύκητα.....	226
Ενέργεια	
Αυξημένη παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης και αιθανόλης κατά την αύξηση ενός νέου απομονωμένου στελέχους του είδους <i>Klebsiella oxytoca</i> σε απόβλητη γλυκερόλη	20
Συνδιαστική παραγωγή βιοϋδρογόνου και πολυ-υδροξυαλκανοϊκών εστέρων από βιομηχανική γλυκερόλη	124
Παραγωγή βιοκαυσίμων από απόβλητα βιομηχανίας τροφίμων.....	186
Γονιδιωματική ανάλυση του <i>Zymomonas mobilis</i> subsp. <i>mobilis</i> ATCC 29191: συγκριτικές, δοκιμές και λειτουργικές παρατηρήσεις.....	228
Περιβάλλον	
Εξερευνώντας το μέγεθος της μικροβιακής ποικιλότητας σε διαφορετικά βαθιά θαλάσσια περιβάλλοντα (λεκάνες, πρηνή, υποθαλάσσια βουνά) και υποθαλάσσια ηφαιστεια της Ανατολικής Μεσογείου με τη μέθοδο της πυροαλληλούχισης	4
Διαδοχή κι επικράτηση πλαγκτικών Archaea μετά από πειραματική ανάμιξη επιφανειακού νερού από ανατολική, δυτική Μεσόγειο Θάλασσα και Ατλαντικό Ωκεανό	10
Αποτελεσματικότητα της αυτόχθονης βιοενίσχυσης στην αντιμετώπιση θαλάσσιων πετρελαιοκηλίδων	12

Συγκρίνοντας την πυροαλληλούχιση και τις 16S rRNA βιβλιοθήκες σε ένα σύστημα με χαμηλή βακτηριακή ποικιλότητα	14
Λειτουργικός χαρακτηρισμός της αντλίας εκροής ttgABC της οικογένειας RND στο εντομοπαθογόνο βακτήριο <i>Pseudomonas entomophila</i>	16
Μελέτη της ποικιλότητας νιτροδωποιητικών μικροοργανισμών σε Μεσογειακά χερσαία οικοσυστήματα.....	22
Παραγωγή βιοτασιενεργών ουσιών από θαλάσσια βακτήρια που αποικοδομούν τα πετρελαιοειδή.....	32
Προσκόλληση του βακτηριακού στελέχους S3/K σε υποστρώματα και σημαντική αύξηση της ικανότητάς του να ανάγει το Cr(VI) σε Cr(III).....	34
Αξιοποίηση του κραμβάλευρου ως πρώτη ύλη για την τέλεση της προπανοδιολικής ζύμωσης	36
Επιλογή των <i>Sphingomonas</i> & <i>Cypriavidus</i> ενδοφυτικών βακτηρίων του αλλόφυτου <i>Tamarix parviflora</i> για βιοενίσχυση της ριζοαποδόμησης.....	50
Επίδραση αναλγητικών φαρμάκων στην αύξηση του βακτηριοπλαγκτού λιμναίων και θαλάσσιων οικοσυστημάτων.....	68
Η δομή των μικροβιακών κοινοτήτων στην οξειδοποιητική βαθμίδα συστήματος αναερόβιας χώνευσης υγρών αποβλήτων τυροκομικής μονάδας.....	82
Διερεύνηση της βακτηριακής ποικιλότητας σε σύστημα συνεχούς ροής που επιτελεί εκτεταμένη βιολογική αφαίρεση φωσφόρου.....	86
Επίδραση του μυκητοκτόνου Ridomil Gold 48 EC στην μικροχλωρίδα του εδάφους.....	96
Πρόσθετα ευρήματα από το σπήλαιο Νταβέλη (Πεντελικό όρος, Αττική) που εδραιώνουν την υπόσταση του πρόσφατα καθιερωθέντος μονοτυπικού γένους <i>Oculatella</i> Zammit, Billi & Albertano 2012 (Cyanobacteria, Pseudanabaenaceae).....	100

Είναι οι δενδρόμορφοι μυκορριζικοί μύκητες ευαίσθητοι στα γεωργικά φάρμακα; η περίπτωση του ζιζανιοκτόνου nicosulfuron	118
Απομόνωση, χαρακτηρισμός και γονιδιωματική ανάλυση του στελέχους <i>Pseudomonas putida</i> OPP26 που αποδομεί ταχύτατα των μυκητοκτόνο 2-phenylphenol.....	120
Ανάπτυξη μαθηματικού μοντέλου για τη βιολογική αναγωγή Cr(VI) σε αντιδραστικές αιωρούμενης ανάπτυξης και σταθερής κλίνης.....	128
Η μικροβιακή ζωή στην αρκτική ζώνη.....	138
Χαρακτηρισμός της ενδοσυμβιωτικής κοινότητας στα μυρμήγκια <i>Cataglyphis</i> της ερήμου.....	142
Χαρακτηρισμός της βιοποικιλότητας των αρχαίων από αλατούχες περιοχές της νότιας Τυνησίας.....	144
Το εκτομυκορριζικό γένος <i>Lactarius</i> Pers. στην Ελλάδα - Νέα στοιχεία για τη δομή του ταξινομικού τμήματος <i>Olentis</i>	156
Νέα δεδομένα για το βακτήριο <i>Olivibacter sitiensis</i> - Ανάλυση γονιδιώματος.....	158
Οι πεπτιδουλ-πρόλυλ <i>cis/trans</i> ισομεράσες ως νέοι ρυθμιστές της κινητικότητας των βακτηρίων και της ικανότητας σχηματισμού βιοϋμενίων	160
Διερεύνηση του κύκλου του άνθρακα και του αζώτου σε εδάφη που έχουν δεχθεί Υγρά Απόβλητα Ελαιουργείου	168
Δομή της εδαφικής μικροβιακής κοινότητας σε σχέση με το κλίμα και τις χρήσεις γης στην λεκάνη απορροής του ποταμού Κοιλιάρη	170
Αξιολόγηση διαφορετικών αλγόριθμων ανάλυσης μικροβιακών κοινοτήτων σε πραγματικά δεδομένα πυροαλληλούχισης λιμνοθαλάσσιων ιζημάτων	172
Ηπατοτοξίνες Κυανοβακτηρίων στη Θάλασσα: Η περίπτωση του Αμβρακικού κόλπου....	174

Γενετική και φαινοτυπική ποικιλομορφία αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων που απομονώθηκαν από τη ριζόσφαιρα σιτηρών καλλιεργούμενων στον πειραματικό αγρό του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών	184
Διερεύνηση της εντομοπαθογένειας του βακτηρίου <i>Pseudomonas entomophila</i> σε έντομα οικονομικής σημασίας της Μεσογείου: Αρχικά αποτελέσματα.....	188
Η μικροβιακή ποικιλότητα στο ηφαιστειακό σύμπλεγμα της Σαντορίνης.....	190
Πρωτεωμική μελέτη του βακτηρίου <i>Pseudomonas Putida</i> F1 κατά την βιοαποδόμηση του βενζοϊκού άλατος	192
Απομάκρυνση βαρέων μετάλλων από το στέλεχος <i>Mycobacterium gilvum</i> Spyr1 σε υγρές καλλιέργειες	198
Μελέτη του οπερονίου αποδόμησης του φθαλικού οξέος στο στέλεχος <i>Arthrobacter phenanthrenivorans</i> Sphe3.....	210
Συγκριτική πρωτεομική ανάλυση στο <i>Arthrobacter phenanthrenivorans</i> κατά την ανάπτυξή του σε διαφορετικά υποστρώματα άνθρακα.....	212
Τεχνολογίες	
Η αμινοάκυλο-tRNA συνθετάση της γλυκίνης (GlyRS) των παθογόνων <i>Staphylococcus aureus</i> και <i>Staphylococcus epidermidis</i> ως πιθανός μοριακός στόχος νέων φαρμάκων.....	6
Αξιοποίηση της τεχνολογίας FLAsH για να μελετηθεί η μεταφορά CagA πρωτεΐνης του <i>Helicobacter pylori</i> μέσω του τύπου IV εκκριτικού συστήματος.....	42
Μικροβιακή Οικολογία και Γονιδιωματική του Ενός Κυττάρου στη λιμνοθάλασσα του Αιτωλικού.....	140
Απομόνωση και ταυτοποίηση ενός νέου πολυκετίδιου από ενδοφυτικό ακτινοβακτήριο ροδοφύκου.....	176

Μικροβιακή Ποικιλότητα Νερού Υψηλής Καθαρότητας σε Φαρμακοβιομηχανία 178

Μικροβιακοί βιοαισθητήρες προσδιορισμού μονοσακχαριτών σε αραβινοξυλάνες..... 208

Πολιτισμός – Κοινωνία

Βιοαλλοίωση και in situ προστασία ξύλινων ναυαγίων στο Μεσογειακό θαλάσσιο οικοσύστημα : Το πρόγραμμα MERMAID..... 80

Keylecture: Life and Death in Biofilms

Hans-Curt Flemming, Biofilm Centre, University of Duisburg-Essen, Germany

The common form of life of microorganisms takes place in aggregates, such as films at interfaces, flocs, sludges, granules or others, all of them usually called biofilms. In biofilms, the cells are embedded in a matrix of extracellular polymeric substances (EPS) which allow for the formation of microconsortia, gradients in the concentrations of oxygen, substrates, products as well as of pH-value and redox potential. A wide variety of habitats supports high biodiversity and makes biofilms the most successful (and oldest) form of life. In biofilms, photosynthesis evolved as well as biodegradation of organic materials; they are the carriers of the self-purification potential of soils, sediments and water. They are also sites of fierce competition which originated evolutionally the concept of infection. In terms of human health, biofilms can contain pathogens, and there they are much better protected against disinfectants and biocides. As a stress response, they can enter a viable-but-nonculturable (VBNC) state, in which they are alive but cannot be detected by standard cultivation methods. These are reasons for the potential of biofilms as persistent sources of contamination. Understanding the biofilm life style helps to live with biofilms rather than to try to eliminate them with doubtful success.

Keylecture: Milk fermented by *Propionibacterium freudenreichii* induces apoptosis of digestive cancer cells: a new tool to fight cancer development?

Gwénaél JAN, INRA, UMR1253 Science et Technologie du Lait et de l'Œuf, AGROCAMPUS OUEST, F-35042 Rennes, France

Dairy propionibacteria are isolated from various ecological niches, including soil, grass, silage, rumen, raw milk (although they grow poorly in milk) and dairy plants, showing great adaptability and robustness. Used as ripening starters in Swiss type cheeses, these food grade bacteria are described as nutraceutical producers and they release into the external medium short chain fatty acids (SCFA), folic acid, cobalamin and the bifidogenic 1,4-dihydroxy-2-naphthoic acid (DHNA). These compounds are known to play a pivotal role in the modulation of intestinal physiology through diet.

Starting from this, we developed a new fermented milk. Taking advantage of milk fractions, high and stable populations of *P. freudenreichii* were reached in this product. Fermented milk induced cell death in a variety of cell lines, including gastric and colon cancer cells. Cellular and molecular characterization of the induced lethal pathway revealed cell cycle arrest, drop in intracellular ATP, depolarization of cancer cells mitochondria, translocation of key proteins involved in apoptosis, processing of caspases and fragmentation of the nucleus, as a result of SCFA effect. Interestingly, the new fermented milk was shown to potentialize the cytotoxic effect of molecules used in cancer chemotherapy. In accordance, it modulated expression of key apoptotic proteins.

In vivo, the fermented milk was evaluated in piglets. Daily oral gavage led to high colic *P. freudenreichii* populations, to modulation of the intestinal microbiota and modulation of intestinal cytokines. Promotion of piglets' growth also revealed general probiotic effect of fermented milk. Considering that propionibacteria were metabolically active in the intestine, we further investigated their impact on colon carcinogenesis (induced by dimethylhydrazine, DMH) in human microbiota-associated rats. Consumption of selected strains of propionibacteria resulted in enhanced apoptotic depletion of DMH damaged epithelial cells, yet had no effect on neither proliferation nor apoptosis in healthy rats.

These results open new perspectives in the field of colon cancer cells prevention and/or treatment. The synergy with pro-apoptotic chemotherapy molecules suggests that such a fermented product may be proposed as a food supplement to potentialize therapeutic treatments.

Keywords: propionate, mitochondria, caspase, probiotic, nutraceutic

Read more:

1. Cousin, F. J., S. M. Deutsch, A. Perez Chaia, B. Foligné, and G. Jan. 2012. Interactions between probiotic dairy propionibacteria and the intestinal epithelium. *Curr. Immunol. Rev.* 8:216-226.
2. Cousin, F. J., S. Jouan-Lanhout, M. T. Dimanche-Boitrel, L. Corcos, and G. Jan. 2012. Milk Fermented by Propionibacterium freudenreichii Induces Apoptosis of HGT-1 Human Gastric Cancer Cells. *PLoS. ONE.* 7:e31892.
3. Cousin, F. J., S. Louesdon, M. B. Maillard, S. Parayre, H. Falentin, S. M. Deutsch, G. Boudry, and G. Jan. 2012. The first dairy product exclusively fermented by Propionibacterium freudenreichii: a new vector to study probiotic potentialities in vivo. *Food Microbiol.* 32:135-146.
4. Cousin, F. J., B. Foligne, S. M. Deutsch, S. Massart, S. Parayre, Y. Le Loir, G. Boudry, and G. Jan. 2012. Assessment of the probiotic potential of a dairy product fermented by Propionibacterium freudenreichii in piglets. *J. Agric. Food Chem.* 60:7917-7927.
5. Lan, A., D. Lagadic-Gossmann, C. Lemaire, C. Brenner, and G. Jan. 2007. Acidic extracellular pH shifts colorectal cancer cell death from apoptosis to necrosis upon exposure to propionate and acetate, major end-products of the human probiotic propionibacteria. *Apoptosis.* 12:573-591.
6. Lan, A., A. Bruneau, M. Bensaada, C. Philippe, P. Bellaud, S. Rabot, and G. Jan. 2008. Increased induction of apoptosis by Propionibacterium freudenreichii TL133 in colonic mucosal crypts of human microbiota-associated rats treated with 1,2-dimethylhydrazine. *Br. J Nutr.* 100:1251-1259.
7. Jan, G., A. S. Belzacq, D. Haouzi, A. Rouault, D. Metivier, G. Kroemer, and C. Brenner. 2002. Propionibacteria induce apoptosis of colorectal carcinoma cells via short-chain fatty acids acting on mitochondria. *Cell Death Differ.* 9:179-188.

Keylecture: The drug makes the bug: insights from Listeria

Prof. Sophia Kathariou, North Carolina State University, US

Εξερευνώντας το μέγεθος της μικροβιακής ποικιλότητας σε διαφορετικά βαθιά θαλάσσια περιβάλλοντα (λεκάνες, πρηνή, υποθαλάσσια βουνά) και υποθαλάσσια ηφαίστεια της Ανατολικής Μεσογείου με τη μέθοδο της πυροαλληλούχισης

Πολυμενάκου Π.Ν.^{1,*}, Χρηστάκης Χ.Α.^{1,2}, Λαμπαδαρίου Ν.³, Νομικού Π.², Carey S.⁴, Bell Croff K.⁴, Κυρπίδης Ν.⁵, Μανδαλάκης Μ.^{1,6}, Σεβαστού Κ.³, Σαρροπούλου Ε.¹, Ούλας Α.¹, Λυκούσης Β.³, Τσελεπίδης Α.⁷

¹Ελληνικό Κέντρο Θαλασσιών Ερευνών, Ινστιτούτο Θαλάσσιας Βιολογίας, Βιοτεχνολογίας και Υδατοκαλλιεργειών, Γούρνες Πεδιάδος, Ηράκλειο Κρήτης, Ελλάδα

²Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 15784 Ζωγράφου, Αθήνα, Ελλάδα

³Ελληνικό Κέντρο Θαλασσιών Ερευνών, Ινστιτούτο Ωκεανογραφίας, Ηράκλειο Κρήτης και Αθήνα, Ελλάδα

⁴Graduate School of Oceanography, University of Rhode Island, Narragansett, USA

⁵Joint Genome Institute, Department of Energy, Walnut Creek, CA, USA

⁶Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Χημείας, Ηράκλειο Κρήτης, Ελλάδα

⁷Πανεπιστήμιο Πειραιά, Τμήμα Ναυτιλιακών Σπουδών, Πειραιάς, Ελλάδα

Η Ανατολική Μεσόγειος θεωρείται ως ένα από τα πιο oligοτροφικά θαλάσσια περιβάλλοντα στον κόσμο. Με την πρόσφατη τεχνολογική εξέλιξη της μεθόδου της πυροαλληλούχισης, η οποία επιτρέπει την παραγωγή απίστευτα μεγάλης πληροφορίας αλληλουχιών για τα υπό μελέτη περιβάλλοντα, δίνεται πλέον η δυνατότητα της πλήρους μελέτης περιβαλλόντων που χαρακτηρίζονται από ιδιαίτερα υψηλές τιμές βιοποικιλότητας. Στην παρούσα εργασία, συνολικά 44 δείγματα ιζημάτων καθώς και δειγμάτων από μικροβιακούς τάπητες συλλέχθηκαν στα πλαίσια μιας σειράς ωκεανογραφικών αποστολών που πραγματοποιήθηκαν στην Ανατολική Μεσόγειο την χρονική περίοδο 2006-2011: αποστολή Meteor που πραγματοποιήθηκε το διάστημα Δεκέμβριος 2006 μέχρι Ιανουάριος 2007 στη λεκάνη της Ρόδου, στο υποθαλάσσιο βουνό του Αναξιμένη, στην λεκάνη της Ιεράπετρας και στην περιοχή Pliny Plain; αποστολή Biofun/Med που πραγματοποιήθηκε τον Ιούνιο του 2009 στην λεκάνη της Ιεράπετρας; αποστολή Maria S. Merian που πραγματοποιήθηκε τον Ιανουάριο του 2010 στο υποθαλάσσιο βουνό του Ερατοσθένη; αποστολή Redeco τον Μάιο του 2011 που πραγματοποιήθηκε στην υφαλοκρηπίδα νότια της Κρήτης και στο Κρητικό πέλαγος και η ωκεανογραφική αποστολή Nautilus που πραγματοποιήθηκε τον Σεπτέμβριο του 2011 στο υποθαλάσσιο ηφαιστειακό σύμπλεγμα Κολούμπο (ηφαίστειο), Σαντορίνη (καλδέρα) και Χριστιανά (κόννοι). Μετά την εκχύλιση DNA από δείγματα που είχαν διατηρηθεί στην κατάψυξη, ο πολλαπλασιασμός των γονιδίων του 16S rRNA πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR) με τη χρήση των εκκινητών 802f και 1027r. Οι συγκεκριμένοι εκκινητές ενισχύουν τον πολλαπλασιασμό τμήματος του γονιδίου που εντοπίζεται στην υπερμεταβλητή περιοχή V5-V6 του 16S ριβοσωμικού RNA με τη μέθοδο της πυροαλληλούχισης. Η τεχνολογία πυροαλληλούχισης 454 είναι διαθέσιμη στα εργαστήρια του ΕΛΚΕΘΕ στο παράρτημα που βρίσκεται στο Ηράκλειο της Κρήτης. Τα πρώτα αποτελέσματα υποδηλώνουν την παρουσία μικροβιακών κοινωνικών ιδιαίτερα υψηλής ποικιλότητας. Τουλάχιστον 17,500 διαφορετικές ταξινομικές μονάδες (operational taxonomic units) έχουν μέχρι στιγμής προσδιοριστεί.

The magnitude of microbial diversity in different deep-sea sites (basins, slopes, seamounts) and submarine volcanoes around the Eastern Mediterranean Sea using pyrosequencing analysis

Polymenakou P.N.^{1,*}, Christakis C.A.^{1,2}, Lampadariou N.³, Nomikou P.², Carey S.⁴, Bell Croff K.⁴, Kyrpidis N.⁵, Mandalakis M.^{1,6}, Sevastou K.³, Sarropoulou E.¹, Oulas A.¹, Lykousis V.³, Tselepides A.⁷

¹*Hellenic Centre for Marine Research, Institute of Marine Biology, Biotechnology and Aquaculture, Gournes PEDIADOS, Heraklion Crete, Greece*

²*National and Kapodistrian University of Athens, 15784 Zographou, Athens, Greece*

³*Hellenic Centre for Marine Research, Institute of Oceanography, Heraklion Crete and Athens, Greece*

⁴*Graduate School of Oceanography, University of Rhode Island, Narragansett, USA*

⁵*Joint Genome Institute, Department of Energy, Walnut Creek, CA, USA*

⁶*University of Crete, Department of Chemistry, Heraklion Crete, Greece*

⁷*University of Piraeus, Department of Maritime Studies, Piraeus, Greece*

The deep eastern basin of the Mediterranean Sea is considered to be one of the world's most oligotrophic areas in the world. State of the art pyrosequencing technology, which is able to generate thousand of sequences from each sampling site, would provide great insight into the magnitude of the biodiversity within these highly diverse environments. In the present study, a total of 44 sediment and microbial mat samples have been collected within the framework of various sampling campaigns that took place in the period 2006-2011: Meteor cruise in December 2006 to January 2007 in Rhodes basin, Anaximenes seamount, Ierapetra basin and Pliny Plain, Biofun/Med cruise in June 2009 in Ierapetra basin, Maria S. Merian cruise in January 2010 in Eratosthenes Seamount, Redeco cruise in May 2011 in Southern Cretan Margin and the Cretan Sea and the Nautilus sampling cruise in September 2011 in the submarine Kolumbo volcano, Santorini caldera and Christiana domes. Following bulk DNA extraction from frozen samples, the 16S rRNA genes were amplified by polymerase chain reaction (PCR) using both universal eubacterial and archeobacterial primers 802f and 1027r. Microbial communities were analyzed by targeted the hyper-variable V5-V6 regions of the 16S ribosomal RNA gene in barcoded pyrosequencing. 454-pyrosequencing technology is available in the labs of the Hellenic Centre for Marine Research (Crete Department). The first results have revealed the existence of a highly diverse microbial community inhabiting the aforementioned environments. At least 17,500 different operational taxonomic units have been identified so far.

Η αμινοάκυλο-tRNA συνθετάση της γλυκίνης (GlyRS) των παθογόνων *Staphylococcus aureus* και *Staphylococcus epidermidis* ως πιθανός μοριακός στόχος νέων φαρμάκων

Ψυχολογιά Δ., Αποστολίδη Μ. και Σταθόπουλος Κ.

Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πατρών

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε συγκριτική μελέτη της δράσης της αμινοάκυλο-tRNA συνθετάσης της γλυκίνης (GlyRS) από τα παθογόνα βακτήρια *Staphylococcus aureus* και *Staphylococcus epidermidis*. Και τα δύο ένζυμα είναι υπεύθυνα για την αμινοακυλίωση των μορίων tRNA_{Gly}, ανήκουν δομικά στη κλάση II των συνθετασών και έχουν ετεροδιμερή μορφή (α₂). Στον άνθρωπο, μεταλλάξεις στην GlyRS σχετίζονται με σοβαρές νευροπάθειες, και μυοπάθειες. Πραγματοποιήθηκε μοριακή κλωνοποίηση του γονιδίου *glyS* από το *S. epidermidis* σε φορέα έκφρασης (pet20b), με ακόλουθη παραγωγή, απομόνωση και καθαρισμό με χρωματογραφία συγγένειας της αντίστοιχης ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης. Ακολούθως προσδιορίστηκε η ενεργότητα και η εξειδίκευση της GlyRS, με μέτρηση των κινητικών σταθερών K_m και V_{max} , σε αντιδράσεις οι οποίες πραγματοποιήθηκαν παρουσία ραδιενεργά σημασμένης [¹⁴C]γλυκίνης. Ως υποστρώματα εξετάστηκαν το ολικό tRNA του *S. epidermidis* και τρία διαφορετικά *in vitro* μετάγραφα tRNA_{Gly} του *S. aureus*. Από τα μόρια tRNA_{Gly} του *S. aureus*, το P1tRNA_{Gly(GCC)} και το NP2tRNA_{Gly(UCC)} συμμετέχουν στη πρωτεϊνοσύνθεση και στο μονοπάτι σχηματισμού των πενταγλυκινικών γεφυρών της πεπτιδογλυκάνης, αντίστοιχα, ενώ το NEWtRNA_{Gly(UCC)}, φαίνεται ότι συμμετέχει και αυτό στην εξωριβοσωμική πρωτεϊνοσύνθεση. *In silico* ανάλυση της τριτοταγούς δομής της GlyRS έδειξε ότι υπάρχει μεγάλη ομολογία του ενζύμου μεταξύ διαφορετικών στελεχών του είδους *Staphylococcus s.p.* Οι τιμές που υπολογίστηκαν τόσο στο ολικό tRNA όσο και στο NP2tRNA_{Gly(UCC)}, σε αντιδιαστολή με αυτές στα δύο άλλα μόρια, δείχνουν προτίμηση του ενζύμου για το κάθε υπόστρωμα ανάλογα με την προέλευση των υποστρωμάτων αλλά και την παρουσία σε αυτά συγκεκριμένων νουκλεοτιδίων σε αντίστοιχες θέσεις. Παρατηρήθηκε αυξημένη ενεργότητα της GlyRS παρουσία υποστρωμάτων άλλων στελεχών που παρουσιάζουν μεγάλη συγγένεια, κάτι που έχει συσχετισθεί με αλλαγές νουκλεοτιδικών βάσεων των D- και T- θηλιών των μορίων. Μελλοντικός στόχος είναι η αποσαφήνιση της δράσης της GlyRS, όπως επίσης και του μονοπατιού ρύθμισής της, καθώς επιτελεί δυο διαφορετικές λειτουργίες στο κύτταρο, με απώτερο σκοπό την μελέτη νέων εξειδικευμένων φαρμακευτικών παραγόντων.

Glycyl-tRNA synthetase (GlyRS) from the pathogens *Staphylococcus aureus* και *Staphylococcus epidermidis* as potential molecular target for novel drugs

Psychogiou D., Apostolidi M. and Stathopoulos C.

Department of Biochemistry, School of Medicine, University of Patras

We performed comparative studies of the glycyl-tRNA synthetase (GlyRS) activity from the pathogens *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. Both enzymes are responsible for the aminoacylation of tRNA^{Gly} molecules, they belong structurally in Class II synthetases and they exist as homodimers (α_2). In human, GlyRS mutations have been correlated with heavy neuropathies and myopathies. We cloned the corresponding *glyS* gene from *Staphylococcus epidermidis* and we subsequently produced and purified the recombinant enzyme through affinity chromatography. We measured the activity and specificity levels of GlyRS and we calculated the kinetic constants K_m and V_{max} , in the presence of radioactive labeled [¹⁴C]glycine. As substrates, we used total tRNA from *S. epidermidis* and three different tRNA^{Gly} *in vitro* transcripts from *S. aureus*. We have shown previously that from the transcripts reported herein, P1tRNA^{Gly}(GCC) participate in ribosomal protein synthesis, while NP2tRNA^{Gly}(UCC) and NEWtRNA^{Gly}(UCC) participate in exoribosomal protein synthesis which forms pentaglycine bridges in the bacterial cell wall. *In silico* analysis based on the available GlyRS crystal structure shows high homology among the enzymes from all staphylococcal species. However, the two enzymes exhibit different activity levels depending on the origin and identity of the tRNA substrates used. We noticed high enzymatic activity in the presence of substrates from different strains, an observation attributed to nucleotide substitutions in the D- and T- loops of the tRNAs. Our future goal is to decipher the mode of GlyRS action which represents a promising molecular target for novel and specific drugs, since it mediates two essential cellular pathways.

Keywords: GlyRS, tRNA, *Staphylococcus*

Εκτίμηση της βιομάζας ειδών του γένους *Morchella* σε καλλιέργειες στερεής κατάστασης: επίδραση της ηλικίας και της μορφολογικής κατάστασης του μυκηλίου στην περιεκτικότητά του σε γλυκοζαμίνη

Παπαδάκη Α.^{1,3}, Διαμαντοπούλου Π.¹, Ρούσσος Σ.², Παπανικολάου Σ.³ & Φιλίππουσης Α.¹

¹Ελληνικός Γεωργικός Οργανισμός - ΔΗΜΗΤΡΑ, Ινστιτούτο Τεχνολογίας Γεωργικών Προϊόντων (ΙΤΕΓΕΠ), Εργαστήριο Εδώδιμων Μυκήτων (ΕΕΜ), Σοφοκλή Βενιζέλου 1, 14123, Λυκόβρυση, Αθήνα, Ελλάδα, aphilippoussis@nagref.gr

²IRD – UMR, Institut Méditerranéen de Biodiversité et d'Écologie marine et continentale (IMBE), Aix-Marseille Université; Campus Sciences St Jérôme - Service 421, F-13397 Marseille cedex 20 - France

³Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Επιστήμης & Τεχνολογίας Τροφίμων, Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων, Ιερά Οδός 75, 11855, Αθήνα, Ελλάδα

Σκοπός της μελέτης ήταν η διερεύνηση των φυσιολογικών διαφορών μεταξύ δύο ειδών *Morchella*, του ανοικτόχρωμου *M. esculenta* AMRL 52 και του σκουρόχρωμου *M. Elata* AMRL 63, ως προς την ταχύτητα αύξησης, τον ρυθμό παραγωγής βιομάζας, την περιεκτικότητα του μυκηλίου σε χιτίνη (γλυκοζαμίνη), τον σχηματισμό των σκληρωτίων, καθώς και την αξιοποίηση αμυλούχων υλικών καλλιέργειας. Η παραγωγή βιομάζας κυμάνθηκε στα ίδια επίπεδα (10.08-10.64 g/l) και για τα δύο στελέχη, κατά την διάρκεια των 21 ημερών της υγρής καλλιέργειας σε PDB (20 g/l γλυκόζη), καταναλώνοντας την κύρια πηγή άνθρακα σε πολύ μεγάλο ποσοστό (~100%) μέσα σε 2 εβδομάδες. Ωστόσο, μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε χιτίνη εμφάνισε το σκουρόχρωμο είδος (2.96%) συγκριτικά με το ανοικτόχρωμο (2.62%), ενώ η υψηλότερη περιεκτικότητα σε γλυκοζαμίνη σημειώθηκε κατά την 14η ημέρα ανάπτυξης. Κατά την καλλιέργεια στερεής κατάστασης σε PDA, χρησιμοποιήθηκε διαφανής μεμβράνη (PET) για να διαχωριστεί η βιομάζα από το υπόστρωμα. Το σκουρόχρωμο είδος σημείωσε τον μέγιστο ρυθμό ανάπτυξης (20.56 mm/ημέρα), ενώ η παρουσία της μεμβράνης είχε ανασχετική επίδραση (~70-80%) στην ταχύτητα αύξησης και των δύο ειδών. Με το σχηματισμό και την ωρίμανση των σκληρωτιακών μονάδων και στα δύο είδη *Morchella*, στις καλλιέργειες ηλικίας 21-35 ημερών, αυξήθηκε η συγκέντρωση της χιτίνης και των ολικών σακχάρων του μυκηλίου. Ακόμη, οι σχέσεις γλυκοζαμίνης προς βιομάζα χρησιμοποιήθηκαν για την έμμεση εκτίμηση της βιομάζας των δύο στελεχών *Morchella* σε ακόλουθες καλλιέργειες στερεής κατάστασης σε φυσικά αμυλο-κυτταρινούχα υποστρώματα, όπως: κόκκοι σιταριού (WG), φλούδες πατάτας (PP) και μείγμα αυτών (WG-PP) σε αναλογία 1:1. Μεγαλύτερη ταχύτητα αύξησης (9,05 mm/ημέρα) παρουσίασε ο *M. elata* στο υπόστρωμα WG και μέγιστη απόδοση βιομάζας στο WG-PP (407 mg/g). Ο *M. esculenta* παρουσίασε την μέγιστη απόδοσή του σε βιομάζα (215.5 mg/g) στο υπόστρωμα PP. Τα αποτελέσματα είναι ενθαρρυντικά για την παραγωγή βιομάζας των μυκήτων *Morchella* με θρεπτικές και βιοδραστικές ιδιότητες, μέσω της αποτελεσματικής βιομετατροπής υπολειμμάτων πατάτας και άλλων αμυλούχων αποβλήτων.

Λέξεις-κλειδιά: *Morchella*, μυκήλιο, γλυκοζαμίνη

Biomass estimation of *Morchella* species in solid-state cultures: effect of mycelia age and morphological state on glucosamine content

Papadaki A.^{1,3}, Diamantopoulou P.¹, Roussos S.², Papanikolaou S.³ & Philippoussis A.¹

¹Hellenic Agricultural Organization - DEMETER, Institute of Technology of Agricultural Products (ITAP), Laboratory of Edible Fungi (LEF), Sof. Venizelou 1, 14123, Likovrisi Athens, Greece, aphilippoussis@nagref.gr

²IRD – UMR, Institut Méditerranéen de Biodiversité et d'Écologie marine et continentale (IMBE), Aix-Marseille Université; Campus Sciences St Jérôme - Service 421, F-13397Marseille cedex 20 - France

³Agricultural University of Athens, Department of Food Science & Technology, Laboratory of Food Microbiology & Biotechnology, Iera Odos 75, 11855 Athens, Greece

The aim of the study was to investigate the physiological differences between yellow (*Morchella esculenta* AMRL 52) and black (*Morchella elata* AMRL 63) morel mushroom species, regarding mycelium growth rate (K_r), biomass production and chitin (glucosamine) content of the mycelium during growth and sclerotia formation, as well as utilization of starch-based media. Although during submerged fermentation for 21 days, in PDB (20 g/l glucose), both morel strains furnished equal biomass yields (10.08 - 10.64 g/l), the chitin content of black morel was higher (2.96%) than the yellow (2.62%). The 14-days-old mycelium presented the higher glucosamine content. In a following Petri culture on PDA, cellophane disks (PET) were used to separate the mycelium mass from the substrate. *M. elata* presented the greater linear growth rate (20.56 mm/day), while growth on PDA+PET was remarkably suppressed (~70-80%) by the presence of membrane. The formation of sclerotia, in older PDA cultures (21-35 days) of both *Morchella* species, proved to increase mycelium chitin and total sugars content. Moreover, the equations of glucosamine vs. biomass were used for indirect biomass estimation of both strains on solid starch-cellulosic substrates such as wheat grains (WG), potato peels (PP) and a mixture 1:1 of them (WG-PP). *M. elata* furnished the greater growth rate (9.05 mm/day) on WG and the maximum biomass yield (407 mg/g) on WG-PP. The maximum yield of *M. esculenta* (215.5 mg/g) was detected on PP. The results are encouraging for efficient bioconversion of potato and other starchy industrial wastes to morel biomass with nutritional and bioactive value.

Διαδοχή και επικράτηση πλαγκτικών Archaea μετά από πειραματική ανάμιξη επιφανειακού νερού από ανατολική, δυτική Μεσόγειο Θάλασσα και Ατλαντικό Ωκεανό

Καραγιάννη Η.1, Κωνσταντίνος Αρ. Κορμάς Κ.2, Γενίτσαρης Σ.3, Μουστάκα-Γούνη Μ.3

1 Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών & Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, 45 110 Ιωάννινα

2 Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, 38446, Βόλος

3 Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, 521 24 Θεσσαλονίκη

Στηριζόμενοι στην υπόθεση «Everything is everywhere *but* the environment selects», μελετήσαμε τη δυναμική των πλαγκτικών Archaea κατά τη διάρκεια πειραματικής ανάμιξης. Συνολικά εξετάστηκαν τρία δείγματα: δύο από τη Μεσόγειο Θάλασσα (Banyuls-sur-mer [B] και Παγασητικός Κόλπος [P]) κι ένα από το δυτικό Ατλαντικό Ωκεανό (Woods Hole, MA, USA [W]). Κάθε ένα από αυτά τα δείγματα εμβολιάστηκε στο ίδιο θρεπτικό μέσο αύξησης, αποτελούμενο από αποστειρωμένο, ελεύθερο σωματιδίων επιφανειακό νερό από το σταθμό Β. Για κάθε δείγμα δημιουργήθηκε κλειστή καλλιέργεια όγκου 20 l εις τριπλούν. Η επώαση έγινε στους 180C στο σκοτάδι μέχρι τη χρονική στιγμή που η αφθονία των προκαρυωτικών κυττάρων έφτασε στη στατική φάση (μέγιστο 21 ημέρες). Η ποικιλότητα των Archaea εκτιμήθηκε μέσω πυροαλληλούχισης του γονιδίου 16S rRNA κατά τις ημέρες 0, 5 και 17 από τον εμβολιασμό. Συνολικά αναλύθηκαν 2691-32114 αναγνώσεις ανά δείγμα ανά δειγματοληψία και βρέθηκαν 19, 24 και 43 OUT (operational taxonomical units) στα δείγματα Β, Ρ και W (97% ομοιότητα). Από αυτά, πέντε OTU απαντήθηκαν και στα τρία δείγματα ενώ από τα αρχικά εμβόλια, 6, 5 και 1 OTU βρέθηκε επίσης και στα αντίστοιχα δείγματα τη 17η ημέρα. Η αφθονία ειδών αυξήθηκε 3-10 φορές από την ημέρα 0 σε σχέση με τα εμβόλια αλλά μειώθηκε μέχρι και 10 φορές τις ημέρες 5 και 17. Ωστόσο, το ποσοστό των κοινών OTUs έφτασε μέχρι και 36.5% τις ημέρες 5 και 17. Η μελέτη αυτή έδειξε ότι θαλάσσια Archaea που βρίσκονται σε πολύ απομακρυσμένες περιοχές μεταξύ τους μπορούν να αυξηθούν κάτω από τις ίδιες περιβαλλοντικές συνθήκες, καθιστώντας τους πραγματικά κοσμοπολίτικους μικροοργανισμούς των ωκεανών.

Succession and dominance of planktic Archaea after experimental mixing of surface water from the eastern, western Mediterranean Sea and the Atlantic Ocean

Karayanni H.¹, Kormas K.A.², Genitsaris S.³, Moustaka-Gouni M.³

¹ Dept. of Biological Applications & Technology, University of Ioannina, 45 110 Ioannina Greece

² Dept. of Ichthyology & Aquatic Environment, Faculty of Agricultural Sciences, University of Thessaly, 38 446 Volos Greece

³ Dept. of Botany, School of Biology, Aristotle University of Thessaloniki, 521 24 Thessaloniki Greece

We investigated the dynamics of the archaeoplankton during a mixing experiment. Three coastal sea water samples, from two mediterranean sites (Banyuls [B], France and Pagasitikos [P], Greece, Gulfs) and from the Atlantic Ocean (Woods Hole, [W], USA) were inoculated in the same growth medium consisting of unamended particle free sterile water the coast of Banyuls. Triplicate 20l batch cultures were run for each of the three inocula, incubated at 180C in darkness until no further prokaryotic cell growth was observed (max. 21 days). 16S rRNA gene diversity was assessed by pyrosequencing analysis at days 0, 5 and 17. We analysed 2691 – 32114 tags per replicate per sampling point. Archaeal tags (97% similarity) in B, P and W inocula were 19, 24 and 43, respectively, with five being common. A total of 6, 5 and 1 tags from the inocula also occurred at d17 in the B, P and W treatment, respectively. Species richness increased 3-10 times at d0 compared to the inocula but decreased up to 10 times at d5 and d17, but shared tags increased up to 36.5% at d5 and d17. We showed that marine Archaea from distant sites grow under the same environmental conditions, rendering them true cosmopolitans.

Αποτελεσματικότητα της αυτόχθονης βιοενίσχυσης στην αντιμετώπιση θαλασσιών πετρελαιοκηλίδων

Νικολοπούλου, Μ.¹, Eickenbusch P.³, Πασαδάκης Ν.², Βενιέρη Δ.¹ και Καλογεράκης Ν.¹

¹Τμήμα Μηχανικών Περιβάλλοντος, Πολυτεχνείο Κρήτης, Πολυτεχνειούπολη, 73100 Χανιά

²Τμήμα Μηχανικών Ορυκτών Πόρων, Πολυτεχνείο Κρήτης, Πολυτεχνειούπολη, 73100 Χανιά

³Σχολή Χημείας, Πανεπιστήμιο Duisburg-Essen, Germany

Η βιοεξυγίανση μέσω της βιοενίσχυσης (προσθήκη βακτηρίων που αποδομούν το πετρέλαιο) και της βιοδιεγερσης (προσθήκη θρεπτικών N&P) αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη στρατηγική στην αντιμετώπιση πετρελαιοκηλίδων μετά την χρήση συμβατικών μεθόδων άμεσης αντιμετώπισης (π.χ., πλωτά φράγματα - μηχανική συλλογή). Εντούτοις η βιοενίσχυση ως μέθοδος βιοεξυγίανσης είναι αρκετά αμφιλεγόμενη ως προς την αποτελεσματικότητα της δεδομένου ότι η προσθήκη μόνο θρεπτικών (βιοδιέγερση) είχε μεγαλύτερη επίδραση στην βιοαποδόμηση του πετρελαίου από ότι η προσθήκη μικροβιακών προιόντων που ουσιαστικά εξαρτώνται άμεσα από τις περιβαλλοντικές συνθήκες. Ολοένα και περισσότερες έρευνες καταδεικνύουν ότι ο καλύτερος τρόπος να ξεπεραστούν οι παραπάνω περιορισμοί είναι η αποκλειστική χρήση μικροοργανισμών αυτόχθονων με την περιοχή που θα αποκατασταθεί (έδαφος, αμμουδιά, νερό), μια προσέγγιση που προτείνεται ως βιοενίσχυση με αυτόχθονες μικροοργανισμούς-autochthonous bioaugmentation (ABA).

Σε αυτήν την μελέτη εξετάστηκε η αποτελεσματικότητα της αυτόχθονης βιοενίσχυσης (ABA) για την επιτυχή εξυγίανση ρυπασμένου θαλάσσιου περιβάλλοντος. Οι αποδομητές πετρελαίου εμπλουτίστηκαν και απομονώθηκαν από θαλάσσια δείγματα νερού που συλλέχθηκαν από την περιοχή του κόλπου της Ελευσίνας κοντά στα διυλιστήρια των Ελληνικών Πετρελαίων (ΕΛΠΕ), μια περιοχή που εκτίθεται σε χρόνια ρύπανση από πετρελαιοειδή. Η ήδη προσαρμοσμένη ομάδα αποδομητών πετρελαίου εξετάστηκε ξεχωριστά ή σε συνδυασμό με ανόργανα θρεπτικά και παρουσία ή μη βιογενών επιφανειοδραστικών ενώσεων biosurfactants (π.χ., rhamnolipids) μέσα στις 30 μέρες διάρκειας του πειράματος. Ο συνδυασμός θρεπτικών με τις βιογενείς επιφανειοδραστικές ενώσεις έδειξε μεγάλη αποδόμηση τόσο σε κανονικά αλκάνια όσο και σε πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες, ενώ παράλληλα είχε την μεγαλύτερη ανάπτυξη αποδομητών πετρελαίου σε διάρκεια μόλις 15 ημερών από την αρχή του πειράματος. Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, η χρήση παραγόντων βιοδιέγερσης σε συνδυασμό με φυσικά προσαρμοσμένους αυτόχθονες αποδομητές πετρελαϊκών υδρογονανθράκων απεδείχθη η πιο αποτελεσματική επεξεργασία και μπορεί να αποτελέσει μια πολλά υποσχόμενη στρατηγική στο μέλλον ιδίως όταν συνδυαστεί με λιποφιλικά θρεπτικά αντι των ανόργανων. Μια τέτοια προσέγγιση γίνεται πιο επιτακτική κυρίως όταν μια πετρελαιοκηλίδα πλησιάζει απειλητικά την ακτή και απαιτείται γρήγορη και άμεση αποδόμηση των πετρελαϊκών υδρογονανθράκων.

Λέξεις κλειδιά: πετρελαιοκηλίδες, αυτόχθονη βιοενίσχυση, ανόργανα θρεπτικά, βιογενείς επιφανειοδραστικές ενώσεις.

This work was funded by FP-7 PROJECT No. 266473 “Unravelling and exploiting Mediterranean Sea microbial diversity and ecology for xenobiotics’ and pollutants’ clean up” – ULIXES

Evaluation of autochthonous bioaugmentation to combat marine oil-spills

Nikolopoulou M.¹, Eickenbusch P.³, Pasadakis N.², Venieri D.¹ and Kalogerakis N.¹

¹*Department of Environmental Engineering*

²*Department of Mineral Resources Engineering*

Technical University of Crete, Polytechnioupolis, 73100 Chania, Greece

³*Faculty of Chemistry, University Duisburg-Essen, Germany*

Bioremediation through bioaugmentation (addition of oil-degrading bacteria) and/or biostimulation (addition of nutrients N&P) constitutes a promising strategy for combatting oil spills following first response actions. However, bioaugmentation is one of the most controversial issues in bioremediation since nutrient addition alone has been found to have a greater effect on oil biodegradation than the addition of microbial products that are highly dependent on environmental conditions. There is increasing evidence that the best way to overcome the above barriers is to exclusively use microorganisms indigenous to the sites (soil, sand, and water) to be decontaminated, an approach termed “autochthonous bioaugmentation” (ABA).

In this study we examined the effectiveness of an ABA strategy for the successful remediation of polluted marine environments. A consortium of hydrocarbon degraders was enriched from seawater samples taken from Elefsina Bay near the Hellenic Petroleum Refinery; a site exposed to chronic crude oil pollution. Pre-adapted consortium was tested alone or in combination with inorganic nutrients in the presence (or not) of biosurfactants (rhamnolipids) within a 30 day long experiments. Treatment with fertilizers in the presence of biosurfactants exhibited the highest alkane and PAH degradation and showed highest growth over a period of almost 15 days. Considering the above, the use of biostimulation additives in combination with naturally pre-adapted hydrocarbon degrading consortia has proved to be the most effective treatment and it is a promising strategy in the future accidents especially when combined with lipophilic fertilizers instead of inorganic nutrients. Such an approach becomes more pertinent when an oil spill reaches near the shoreline and immediate hydrocarbon degradation is needed.

Keywords: oil spills, autochthonous bioaugmentation, inorganic nutrients, biosurfactants.

This work was funded by FP-7 PROJECT No. 266473 “Unravelling and exploiting Mediterranean Sea microbial diversity and ecology for xenobiotics’ and pollutants’ clean up” – U

Συγκρίνοντας την πυροαλληλούχιση και τις 16S rRNA βιβλιοθήκες σε ένα σύστημα με χαμηλή βακτηριακή ποικιλότητα.

Μεζίτη Α., Κορμάς Κ. Αρ.

Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, 38446, Βόλος

Η ανάπτυξη των μοριακών μεθόδων για τη μελέτη της φυλογένεσης των μικροοργανισμών προώθησε την εξέλιξη της μικροβιακής οικολογίας. Οι 16S rRNA βιβλιοθήκες χρησιμοποιήθηκαν ευρέως την τελευταία 20ετία σε πλήθος δειγμάτων αλλά σχεδόν πάντα ένα μεγάλο μέρος της μικροβιακής ποικιλότητας παρέμενε ανεξερεύνητο. Με την ανάπτυξη των τεχνικών αλληλούχισης νέας γενιάς επιτεύχθηκε η διερεύνηση της μικροβιακής ποικιλότητας σε μεγαλύτερο βάθος με τη χρήση μεθόδων όπως η πυροαλληλούχιση. Ακόμα όμως δεν έχουν πραγματοποιηθεί μελέτες σύγκρισης της χρησιμότητας κάθε τεχνικής ανάλογα με το δείγμα και το στόχο της έρευνας. Σε αυτή τη μελέτη συγκρίθηκαν αποτελέσματα από 16S-ITS βιβλιοθήκες και από πυροαλληλούχιση 454 σε δύο δείγματα από το έντερο καραβίδων *Nephrops norvegicus* (Se3 και D1) που συλλέχθηκαν στα πλαίσια εποχικής μελέτης της βακτηριακής ποικιλότητας. Ο αριθμός των αλληλουχιών που αναλύθηκαν με την πυροαλληλούχιση ήταν πολύ υψηλότερος (> 12000) απ'ότι με τις βιβλιοθήκες (53-92). Αντίστοιχα η βακτηριακή ποικιλότητα ήταν υψηλότερη στα αποτελέσματα της πυροαλληλούχισης. Συνολικά με την τεχνική της πυροαλληλούχισης, ανιχνεύτηκαν 182 (Se3) και 173 (D1) φυλότυποι (97% ομοιότητα), ενώ με τις 16S-ITS βιβλιοθήκες ανιχνεύτηκαν 6 (Se3) και 8 (D1) φυλότυποι. Η κάλυψη (Coverage) της ανάλυσης των δειγμάτων δεν παρουσίασε μεγάλες διαφορές ανάμεσα στις δύο μεθόδους αφού κινήθηκε σε όλα τα δείγματα πάνω από το 96%. Αυτό οφείλεται στην ύπαρξη επικρατών (>80%) φυλότυπων στις βιβλιοθήκες, χαρακτηρίζοντας ως πολύ ικανοποιητική τη μελέτη της βακτηριακής ποικιλότητας. Επιπρόσθετα όλοι οι φυλότυποι των βιβλιοθηκών βρέθηκαν και με την πυροαλληλούχιση, ενώ στο δείγμα Se3 εντοπίστηκαν και με την αντίστοιχη κατανομή συχνότητας. Φαίνεται λοιπόν ότι για δείγματα που αναμένεται η παρουσία εξειδικευμένων βακτηριακών κοινοτήτων, οι βιβλιοθήκες παραμένουν ένα ισχυρό εργαλείο στη μελέτη της ποικιλότητας. Παρολαυτά δεν μπορεί να αγνοηθεί ο εντοπισμός επικρατών αλληλουχιών σε βιβλιοθήκες άλλων εποχών οι οποίες ανιχνεύτηκαν σε χαμηλές συχνότητες στα αποτελέσματα πυροαλληλούχισης των Se3 και D1, δείχνοντας τη μεγάλη χρησιμότητα της πυροαλληλούχισης σε μελέτες διαδοχής των βακτηριακών κοινοτήτων.

Λέξεις κλειδιά: 16S rRNA βιβλιοθήκες, πυροαλληλούχιση, σύγκριση

Comparing pyrosequencing and 16S rRNA clone libraries in a system with low bacterial diversity.

Meziti A., Kormas K.Ar.

Department of Ichthyology and Aquatic environment, University of Thessaly, 38446, Volos, Greece.

The development of molecular methods for the study of microbial diversity has promoted the evolution of microbial ecology. During the last 20 years 16S rRNA clone libraries have been widely used for the study of diversity but most of the times a big part of it remained undetected. With the development of next generation gene sequencing technologies (e.g. pyrosequencing) a deepest investigation of microbial diversity was succeeded. However no studies have been performed comparing the importance of these two methods according to the target of a study. In this study we compared the results from 16S-ITS clone libraries and 454-pyrosequencing in two samples from the gut of the Norway lobster *Nephrops norvegicus* (Se3 and D1), collected in the frame of seasonal studies of gut bacterial diversity. The number of sequences analyzed with pyrosequencing was much higher (>1200) than the ones studied with clone libraries (53-92). Similarly bacterial diversity was higher in the pyrosequencing results. Overall with the use of pyrosequencing, 182 (Se3) and 173 phylotypes (97% similarity) were detected while with the clone libraries only 6 (Se3) and 8 (D1). Coverage values did not show big difference between the two methods since they were higher than 96%. This is probably due to the presence of dominant sequences (>80%) in the clone libraries, characterizing as very satisfactory the study of the bacterial diversity. Moreover all libraries' phylotypes were also detected with pyrosequencing while in Se3 they also showed similar frequencies' distribution. It seems that for samples where low diversity values are expected libraries remain a powerful tool for diversity studies. However the presence of dominant phylotypes in other seasonal samples and their concurrence with lower frequencies in the pyrosequencing results cannot be ignored, showing the importance of next generation sequencing technologies when studying the succession of bacterial communities.

Key words: 16S rRNA clone libraries, pyrosequencing, comparison

Λειτουργικός χαρακτηρισμός της αντλίας εκροής *ttgABC* της οικογένειας RND στο εντομοπαθογόνο βακτήριο *Pseudomonas entomophila*

Νικολούλη Κ. και Μόσιαλος Δ.*

Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα

*Email: mosial@bio.uth.gr

Το βακτήριο *Pseudomonas entomophila* ανήκει στα γ-πρωτεοβακτήρια και έχει την ικανότητα να μολύνει και να σκοτώνει έντομα. Παρά το γεγονός ότι πρόκειται για περιβαλλοντικό και όχι κλινικό στέλεχος παρατηρήσαμε πως εμφανίζει ενδογενή ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά. Στο γονιδίωμα της *Pseudomonas entomophila* εντοπίσαμε με εργαλεία βιοπληροφορικής γονίδια που ανήκουν στην οικογένεια RND (resistancenodulation-cell-division), τα οποία κωδικοποιούν για αντλίες εκροής. Πιο συγκεκριμένα το οπερόνιο *ttgABC*, το οποίο έχει επίσης εντοπιστεί και μελετηθεί και στο στενά συγγενικό είδος *Pseudomonas putida*, είναι γνωστό πως κωδικοποιεί για μια αντλία που είναι υπεύθυνη για την εκροή αντιβιοτικών όπως η αμικιλίνη και η χλωραμφαινικόλη. Η ανθεκτικότητα της *Pseudomonas entomophila* εξετάστηκε για τα αντιβιοτικά αμικιλίνη, χλωραμφαινικόλη, καναμυκίνη, στρεπτομυκίνη, τετρακυκλίνη και ιμιπενέμη και εμφάνισε υψηλές τιμές MIC (minimum inhibitory concentration) που έφταναν τα 1300μg/ml για την αμικιλίνη, τα 150μg/ml για την χλωραμφαινικόλη, τα 20μg/ml για την καναμυκίνη και τα 100μg/ml για την στρεπτομυκίνη. Οι τιμές MIC για την τετρακυκλίνη και την ιμιπενέμη ήταν χαμηλότερες (4μg/ml και <1μg/ml, αντίστοιχα). Η επώαση του αγρίου τύπου με CCCP (*m*chlorophenylhydrazone), το οποίο αναστέλλει την πρωτονιενεργητική δύναμη στην οποία στηρίζεται η λειτουργία της αντλίας εκροής, είχε σαν αποτέλεσμα την μείωση των τιμών MIC. Για να επαληθευθεί πως η παρατηρούμενη ανθεκτικότητα οφείλεται στη δράση της συγκεκριμένης αντλίας κατασκευάστηκε ένα μεταλλαγμένο στέλεχος (*Pe*Δ4361) στο οποίο το γονίδιο *ttgB* διασπάστηκε. Μετά την επώαση του μεταλλάγματος *Pe*Δ4361 με τα αντιβιοτικά παρατηρήθηκε πως οι τιμές MIC μειώθηκαν σημαντικά για την αμικιλίνη, την χλωραμφαινικόλη και την καναμυκίνη (600μg/ml, 100μg/ml και 5μg/ml αντίστοιχα) ενώ για την στρεπτομυκίνη παρέμεινε στα 100μg/ml. Τα παραπάνω αποτελέσματα καταδεικνύουν την ύπαρξη αντλιών εκροής ικανών να αποβάλλουν μεγάλες συγκεντρώσεις αμικιλίνης, χλωραμφαινικόλης, καναμυκίνης και στρεπτομυκίνης σε ένα περιβαλλοντικό βακτηριακό στέλεχος το οποίο δεν έχει έρθει σε επαφή με αντιβιοτικά στο φυσικό του περιβάλλον. Επιπλέον η υψηλή ενδογενής ανθεκτικότητα που εμφανίζει η *Pseudomonas entomophila* στην αμικιλίνη προσφέρει ένα χρήσιμο εργαλείο για τον γενετικό χειρισμό της σε πειράματα επιλογής έναντι άλλων βακτηριακών στελεχών.

Λέξεις κλειδιά: *Pseudomonas entomophila*, ενδογενής ανθεκτικότητα, αντλία εκροής

Functional characterization of the *ttgABC* efflux pump of the RND family in the entomopathogenic bacterium *Pseudomonas entomophila*

Nikolouli K. and Mossialos D.*

Department of Biochemistry and Biotechnology, University of Thessaly, Larissa, Greece

**Email: mosial@bio.uth.gr*

Pseudomonas entomophila belongs to the class of gamma-proteobacteria and it can infect and kill insects. Despite the fact that it is an environmental and not a clinical strain we observed that it exhibits intrinsic resistance in several antibiotics. Mining the genome of *Pseudomonas entomophila* we identified genes of the RND (resistance-nodulation-cell-division) family which encode for efflux pumps. Specifically the *ttgABC* operon which has also been identified to the closely related *Pseudomonas putida*, encodes for an efflux pump which extrudes several antibiotics including ampicillin and chloramphenicol. The intrinsic antibiotic resistance of *Pseudomonas entomophila* was tested for ampicillin, chloramphenicol, anamycin, streptomycin, tetracycline and imipenem. The MICs (minimum inhibitory concentration) which attained high values were 1300µg/ml for ampicillin, 150µg/ml for chloramphenicol, 20µg/ml for kanamycin and 100µg/ml for streptomycin. The MIC values for tetracycline and imipenem were much lower (4µg/ml and <1µg/ml respectively). Incubating the wild type strain with CCCP (carbonyl cyanide-m-chlorophenylhydrazine) which inhibits the proton-motive force associated with active efflux mechanism, resulted in significant decrease of MICs. In order to confirm that the observed resistance was due to the *ttgABC* efflux pump we constructed a mutant strain (*Pe*Δ4361) disrupting the *ttgB* gene. Incubating the *Pe*Δ4361 strain with antibiotics we noticed significant decrease in MICs for ampicillin, chloramphenicol and kanamycin (600µg/ml, 100µg/ml and 5µg/ml respectively) while the MIC for streptomycin remained at 100µg/ml. The above results demonstrate the existence of efflux pumps which extrude high concentrations of ampicillin, chloramphenicol, kanamycin and streptomycin in an environmental bacterial strain which presumably has never been exposed to antibiotics in its natural niche. In addition the high intrinsic resistance of *Pseudomonas entomophila* in ampicillin can be a functional tool for its counter-selection against other bacterial strains during genetic manipulations

Εκχύλιση, χημική σύσταση και αντιμυκητιακή δράση των αιθέριων ελαίων ενάντια σε μύκητες *Rhizopus oligosporus* και *Penicillium simplicissimum*

Φιλιπούση P. ^{1,2}, Greff S. ², Laffont - Schwob I. ², Salducci M.-D. ², Antoniou P. ¹, Roussos S.²

¹ Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής, Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας, Ιερά Οδός 75, 11855, Αθήνα, Ελλάδα

² IMBE, UMR CNRS/IRD, Institut Méditerranéen de Biodiversité et d'Écologie marine et continentale (IMBE), Aix-Marseille Université, Campus Sciences St Jérôme - Service 421, F-13397 Marseille cedex 20, France

Σε αυτήν την εργασία μελετήθηκε η χημική σύσταση καθώς και η αντιμυκητιακή δραστηριότητα των αιθέριων ελαίων των αρωματικών φυτών *Coridothymus capitatus* (Θυμαρι), *Origanum Vulgare* (Ρίγανη), *Helichrysum italicum* (Immortelle της Κορσικής), *Salvia officinalis* (Φασκόμηλο) και άλλων φυτών με προέλευση την Ελλάδα (Σύρος, Εύβοια), Κορσική και Μασσαλία Γαλλίας, ενάντια στους μύκητες *Rhizopus oligosporus* και *Penicillium simplicissimum*. Η εξαγωγή των αιθέριων ελαίων πραγματοποιήθηκε με υδροαπόσταξη και τα έλαια αραιώθηκαν σε πεντάνιο και αναλύθηκαν σε GC/MS. Ακόμη εξετάστηκε και η δράση των αιθέριων ελαίων των *Myristica fragrans* (μοσχοκάρυδο), *Zingiber officinalis*, *Vetiveria zizanioides*, *Cananga odorata*, *Eugenia caryophyllus* (γαρύφαλλο) και *Cymbopogon nardus* (κιτρονέλλα). Τα αποτελέσματα καλλιέργειας των μυκήτων σε τρυβλία Petri Ø 5 cm με 5 ml PDA, με παρουσία ή απουσία αιθερίων ελαίων (συγκεντρώσεις 0, 2, 5 10, 20 μl/τρυβλίο), έδειξαν ότι μεταξύ των αιθερίων ελαίων που δοκιμάστηκαν μόνο τα έλαια της ρίγανης και του θυμαριού έχουν μια πολύ ισχυρή μυκητοκτόνο και σποριοκτόνο δράση ενάντια στους *R. oligosporus* και *P. simplicissimum* σε όλες τις συγκεντρώσεις. Το αιθέριο έλαιο των φύλλων του γαρύφαλλου έδειξε επίσης μια μυκοστατική και μυκητοκτόνο δράση στις υψηλές συγκεντρώσεις 10 και 20 μl/τρυβλίο. Η μυκητοκτόνος δράση μπορεί να αποδοθεί στην υψηλή συγκέντρωση της καρβακρόλης στα έλαια της ρίγανης (67%) και του θυμαριού (72%) που έχουν προέλευση την Ελλάδα. Ακόμη η ανάλυση έδειξε υψηλές συγκεντρώσεις και άλλων ουσιών σε φυτά που μελετήθηκαν όπως στα *Helichrysum italicum* Κορσικής 32,3% neryl οξικό άλας, *Salvia officinalis* Ελλάδας 55.3% ευκαλυπτόλη, *Salvia officinalis* Μασσαλίας 42.7% ευκαλυπτόλη. Τα αποτελέσματα αυτά είναι ενθαρρυντικά για την βιολογική καταπολέμηση των φυτοπαθογόνων μυκήτων με τη χρήση αιθέριων ελαίων των αρωματικών φυτών ρίγανης και θυμαριού για υποκατάσταση των χημικών φυτοφαρμάκων.

Λέξεις κλειδιά: αρωματικά φυτά, αιθέρια έλαια, μυκητοκτόνος δράση

Isolation, chemical composition and antifungal activity of essential oils against *Rhizopus oligosporus* and *Penicillium simplicissimum*.

Filippousi R. ^{1,2}, Greff S. ², Laffont - Schwob I. ², Salducci M.-D. ², Antoniou P. ¹, Roussos S.²

¹ Agricultural University of Athens, Department of Science of Plant Production, Laboratory of Phytopathology, Iera odos 75, 11855, Athens, Greece

² IMBE, UMR CNRS/IRD, Institut Méditerranéen de Biodiversité et d'Écologie marine et continentale (IMBE), Aix-Marseille Université, Campus Sciences St Jérôme - Service 421, F-13397 Marseille cedex 20, France

The aim of this work was to study the composition and the antifungal activities of essential oils of various plant species against the plant pathogenic fungi *Rhizopus oligosporus* and *Penicillium simplicissimum*. The antimicrobial activities of the essential oils of some Mediterranean aromatic plant species i.e. *Coridothymus capitatus* L. (Conehead Thyme), *Origanum vulgare* L. (Origanum), *Helichrysum italicum* (Curry-plant), *Salvia officinalis* L. (Sage) from Greece (Syros, Evia) and from France, were compared to those of some tropical plant species i.e. *Myristica fragrans* (Nutmeg), *Zingiber officinalis* (Ginger), *Vetiveria zizanioides* (Vetiver), *Cananga odorata*. (Ylang-Ylang), *Eugenia caryophyllus* (Spreng.) and *Cymbopogon nardus* (Citronella grass). The isolation of essential oils was realised by hydrodistillation and analyzed by GC/MS. The results obtained on fungal cultures in Petri dishes filled with potato dextrose agar medium, with the presence or absence of essential oils (concentrations 0, 2, 5, 10, 20 ml/dish), showed that amongst the tested essential oils only the oils of Origanum and Conehead thyme presented very strong fungicidal and sporocidal activities against *R. oligosporus* and *P. simplicissimum* at all the tested concentrations. The essential oils of *E. caryophyllus* showed also fungistatic and fungicidal activities, but only at high concentrations i.e. 10 and 20 ml/dish. These strong fungicidal activities can be attributed to the high concentration of carvacrol in the oils of Origanum (67%) and Conehead thyme (72%). Moreover, this analytical work revealed that the major compounds in *H. italicum* from Corsica, *S. officinalis* from Greece and from France, were 32,3% neryl acetate, 55.3% and 42.7% eucalyptol, respectively. The obtained results are encouraging for the biological control of fungal plant pathogens through the use of essential oils of the Mediterranean aromatic plant species such as Origanum and Conehead thyme as an environmental substitute of chemical pesticides.

Αυξημένη παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης και αιθανόλης κατά την αύξηση ενός νέου απομονωμένου στελέχους του είδους *Klebsiella oxytoca* σε απόβλητη γλυκερόλη

Μετσοβίτη Μ, Παρασκευαΐδη Κ., Κουτίνας Α, Παπανικολάου Σ*

Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ελλάδα

*Συγγραφέας επικοινωνίας, e-mail: spananik@aua.gr

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση της δυνατότητας αξιοποίησης της προερχόμενης από τη διεργασία παραγωγής βιοντήζελ απόβλητης γλυκερόλης σε προϊόντα υψηλής προστιθέμενης αξίας χρήσιμα για τη βιομηχανία τροφίμων και πλαστικών, όπως η 1,3-προπανοδιόλη (PDO) και η αιθανόλη (EtOH), μέσω του στελέχους *Klebsiella oxytoca* FMCC-197. Σε πρώτη φάση, το στέλεχος καλλιεργήθηκε σε αναερόβιες φιάλες χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα ακάθαρτη γλυκερόλη προερχόμενη από 3 διαφορετικές βιομηχανίες παραγωγής βιοντήζελ, και περίπου ταυτόσημα κινητικά δεδομένα ελήφθησαν για τα 3 διαφορετικά υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν. Κατόπιν, το στέλεχος καλλιεργήθηκε σε αυξανόμενες αρχικές συγκεντρώσεις γλυκερόλης σε αναδευόμενες αναερόβιες φιάλες, και όσο αυξανόταν η αρχική συγκέντρωση του υποστρώματος, τόσο αυξανόταν ο χρόνος της ζύμωσης και το ποσοστό της μη-καταναλωθείσας γλυκερόλης, πιθανώς λόγω του μη-σταθερού pH στο μέσο καλλιέργειας. Σε επόμενο στάδιο πραγματοποιήθηκαν πειράματα σε βιοαντιδραστήρα με σταθερό pH (αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 40 g/L), και δείχτηκε ότι η έμφυση N₂ επηρέασε τη βιοδιεργασία, καθόσον χωρίς έμφυση ο μεταβολισμός κατευθύνθηκε προς την παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης (PDO_{max}=12.6 g/L, συντελεστής απόδοσης ως προς την αναλωθείσα γλυκερόλη 36.2% wt/wt) ενώ η έμφυση N₂ ώθησε την παραγωγή αιθανόλης (EtOH_{max}=10.5 g/L, συντελεστής απόδοσης 32.6% wt/wt). Έτσι, σε πειράματα τα οποία πραγματοποιήθηκαν σε βιοαντιδραστήρα χωρίς έμφυση N₂ και με αυξανόμενες αρχικές συγκεντρώσεις υποστρώματος, επιτεύχθηκε μέγιστη συγκέντρωση PDO 41.3 g/L με αντίστοιχο συντελεστή απόδοσης ~47%, για αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης ~120 g/L. Σε υποστρώματα με ακόμη μεγαλύτερη συγκέντρωση γλυκερόλης (150 and 170 g/L), παρατηρήθηκε μικροβιακή αύξηση αλλά η συγκέντρωση PDO μειώθηκε. Σε ημι-συνεχές τροφοδοτούμενο σύστημα καλλιέργειας, 126 g/L γλυκερόλης μετατράπηκαν σε 50.1 g/L PDO (αρκετά ικανοποιητική τιμή) και 25.2 g/L EtOH (τιμή από τις υψηλότερες της βιβλιογραφίας για τέτοιου τύπου βιοδιεργασία). Τέλος, πραγματοποιήθηκε κλειστή ζύμωση σε απολύτως αναποστειρωτές συνθήκες, με το αποτέλεσμα να είναι σχεδόν όμοιο αυτού της ασηπτικής διεργασίας.

Λέξεις κλειδιά: βιοντήζελ, 1,3-προπανοδιόλη, αιθανόλη

Ευχαριστίες: Η παρούσα εργασία χρηματοδοτήθηκε από την Ευρωπαϊκή Ένωση (FP7 Program “Propanergy – Integrated bioconversion of glycerine into value-added products and biogas at pilot plant scale”, Grant number: 212671).

Enhanced production of 1,3-propanediol and ethanol by a newly isolated *Klebsiella oxytoca* strain growing on biodiesel-derived waste glycerolMetsoviti M, Paraskevaïdi K, Koutinas A, Papanikolaou S**Department of Food Science and Technology, Agricultural University of Athens, Athens, Greece**Corresponding author, e-mail: spapanik@aua.gr

The production of 1,3-propanediol (PDO) and ethanol (EtOH) was studied during cultivations of *Klebsiella oxytoca* FMCC-197 on biodiesel-derived glycerol. Cultivations on anaerobic flasks with low initial glycerol concentration imposed (~20 g/L) and glycerol feedstocks deriving from 3 different origins demonstrated the potentiality of the conversion, while small differences as regards the spectrum of final fermentation products was observed, for all feedstocks tested. Thereafter, flask cultures at increased initial glycerol concentrations showed that the more substrate concentration increased, the more fermentation time was extended and substrate assimilation was incomplete, presumably due to unstable medium pH. Bioreactor trials at constant pH and initial glycerol concentration of 40 g/L showed that when nitrogen was sparged, the metabolism was shifted towards EtOH synthesis (EtOH_{max}=10.5 g/L, yield per glycerol consumed 32.6% wt/wt), while with no nitrogen sparging, PDO was predominantly produced (PDO_{max}=12.6 g/L, yield =36.2% wt/wt). During batch bioreactor fermentations conducted at increasing glycerol concentrations, PDO_{max} at 41.3 g/L and yield ~47%, wt/wt, was achieved at initial glycerol at ~120 g/L. At even higher initial glycerol media (150 and 170 g/L), growth was not ceased, but PDO production declined. During fed-batch fermentation, 126 g/L of glycerol were converted into 50.1 g/L of 1,3-propanediol (a quite satisfactory value) and 25.2 g/L of ethanol (conversion yield ~20% wt/wt). EtOH_{max} value achieved was close to the highest ones achieved in the international literature. A batch-bioreactor culture was performed under non-sterilized conditions and PDO production achieved was almost equivalent to the sterilized process.

Keywords: biodiesel, 1,3-propanediol, ethanol**Acknowledgements:** Financial support has been provided by the European Union (FP7 Program “Propanergy – Integrated bioconversion of glycerine into value-added products and biogas at pilot plant scale”, Grant number: 212671).

Μελέτη της ποικιλότητας νιτροδωποιητικών μικροοργανισμών σε Μεσογειακά χερσαία οικοσυστήματα

Μπεκρής Φ.¹, Πυρίντσος Σ.^{1,2}

¹Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Βιολογίας, Εργαστήριο Οικολογίας Φυτών και Διαχείρισης Χερσαίων Οικοσυστημάτων, Τ.Θ. 2208, 71409 Ηράκλειο

²Πανεπιστήμιο Κρήτης, Βοτανικός Κήπος, Πανεπιστημιούπολη Γάλλου, 74100 Ρέθυμνο

Οι μικροοργανισμοί του εδάφους έχουν σημαντικό ρόλο στη δομή και λειτουργία των χερσαίων οικοσυστημάτων. Ειδικότερα η συμβολή τους στη διαθεσιμότητα της οργανικής ύλης στο έδαφος, καθώς και στους κύκλους των θρεπτικών στοιχείων, όπως ο κύκλος του αζώτου, θεωρείται ιδιαίτερα σημαντική και αναντικατάστατη. Η οξείδωση της αμμωνίας σε νιτρώδη ιόντα (NO₂⁻) αποτελεί το πρώτο στάδιο της νιτροποίησης, μιας διεργασίας σημαντικής στον κύκλο του αζώτου που ως αποτέλεσμα έχει τον σχηματισμό νιτρικών ιόντων (NO₃⁻) στο έδαφος από τους μικροοργανισμούς. Οι μικροοργανισμοί που είναι υπεύθυνοι για την αερόβια οξείδωση της αμμωνίας καλούνται νιτροδωποιητικοί μικροοργανισμοί (AOM, Ammonia-Oxidizing Microorganisms), των οποίων αντιπρόσωποι απαντώνται τόσο στην επικράτεια των ευβακτηρίων όσο και των αρχαίων. Η μελέτη της γενετικής ποικιλότητας των AOM στα μεσογειακά οικοσυστήματα καθώς και των προτύπων κατανομής και αφθονίας δεν έχει μελετηθεί εκτενώς, κάτι στο οποίο επιχειρεί να συμβάλει η παρούσα εργασία. Συγκεκριμένα, σκοπός της εργασίας αυτής είναι μέσω της χρήσης των τεχνικών T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Polymorphism) και Real-Time PCR, και στοχεύοντας στο ενεργό κέντρο του ενζύμου της μονοξυγενάσης της αμμωνίας (*amoA*), αρχικά να γίνει μια πρώτη ποιοτική και ποσοτική εκτίμηση για τους AOM στα μεσογειακά να διερευνηθούν πιθανές συσχετίσεις. Τα μεσογειακά χερσαία οικοσυστήματα που εξετάστηκαν εντοπίζονται στην Κρήτη και περιλαμβάνουν τους τύπους οικοτόπων κατά NATURA 2000: φρύγανα από *Sarcopoterium spinosum* (*Sarcopoterium spinosum phrygana*), Δάση Ελιάς-Χαρουπιάς (*Oleo-Caretonion forests*), Δάση Σφενδάμου-Κυπαρίσσου (*Acero-Cupression forests*), Ορεινά και Μεσογειακά χέρσα εδάφη με ακανθώδεις θάμνους (*Oromediterranean phrygana*), Ελληνικά δάση πρίνου (*Dehesas*) και Μεσογειακά δάση κωνοφόρων (*Mediterranean Pine forests*). Από τα αποτελέσματα προέκυψαν χωρικές διαφοροποιήσεις στην ποικιλότητα των AOM και αναδείχθηκε το πρότυπο μεταβολών που ακολουθείται σε σχέση με τους περιβαλλοντικούς παράγοντες.

Λέξεις κλειδιά: T-RFLP, Μεσογειακά χερσαία οικοσυστήματα, γενετική ποικιλότητα

Diversity of ammonia-oxidizing microorganisms (AOM) in Mediterranean terrestrial ecosystems

Bekris F.¹, Pirintsos S.^{1,2}

¹University of Crete, Department of Biology, Plant Ecology-Terrestrial Ecosystem Management Laboratory, P.O. 2208, 71409 Heraklion

²University of Crete, Botanical Garden, Gallos Campus, 74100 Rethymno

Soil microorganisms have an essential role in both structure and function of terrestrial ecosystems. Moreover, their contribution in the availability of soil organic matter as well as in the cycles of nutrients such as nitrogen, is considered particularly important and irreplaceable. Ammonia oxidation in nitrite ions (NO₂⁻) consists the first step of nitrification, a process of great importance for the cycle of nitrogen resulting in the formation of nitrate ions (NO₃⁻) by microorganisms. Microorganisms that are responsible for the aerobic oxidation of ammonia (ammonia-oxidizing microorganisms, AOM) belong to the domains of eubacteria and archaea. This study aims to contribute to a better understanding of the genetic diversity and abundance-distribution patterns of AOM, issues that have not yet been extensively studied. Specifically, after an initial qualitative and quantitative assessment of AOM in Mediterranean ecosystems through the use of T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Polymorphism) and Real-Time PCR techniques, focusing on the active site of the ammonia monooxygenase enzyme (*amoA*), possible associations with the woody vegetation and the environmental parameters such as soil nutrients, pH and altitude were assessed. The studied ecosystems were located in Crete and the included habitat types according to the NATURA 2000 habitat classification were: *Sarcopoterium spinosum* phrygana, *Oleo-Ceratonion* forests, *Acero-Cupression* forests, Oromediterranean phrygana with heaths and gorse, Greek briar woods (Dehesas) and Mediterranean Pine forests. The resulting spatial differentiation in genetic diversity, along with the revealed relationships with the studied environmental factors provides insights into the role of AOM in the Mediterranean ecosystems.

Keywords: T-RFLP, Mediterranean terrestrial ecosystems, genetic diversity

Παραγωγή βακτηριοσινών από οξυγαλακτικά βακτήρια απομονωμένα από τρόφιμα έναντι παθογόνων στελεχών της στοματικής κοιλότητας

Ζουμποπούλου Γ.1, Πεπελάση Ε.2, Παπαϊωάννου Β.3, Γεωργαλάκη Μ.1, Μαραγκουδάκης Π.Α.1, Ταραντίλης Π.4, Πολυσιού Μ.4, Τσακαλίδου Ε.1, και Παπαδημητρίου Κ.1

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

²Εργαστήριο Περιοδοντολογίας, Οδοντιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Θηβών 2, 11527 Αθήνα, Ελλάδα

³Εργαστήριο Προληπτικής και Κοινωνικής Οδοντιατρικής, Οδοντιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Θηβών 2, 11527 Αθήνα, Ελλάδα

⁴Εργαστήριο Χημείας, Γενικό Τμήμα, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιερά Οδός 75, 11855 Αθήνα, Ελλάδα

Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκαν 236 στελέχη οξυγαλακτικών βακτηρίων, απομονωμένα από τρόφιμα, ως προς την παραγωγή βακτηριοσινών έναντι παθογόνων ή ευκαιριακών παθογόνων βακτηρίων της στοματικής κοιλότητας. Κανένα από τα εξεταζόμενα στελέχη δεν ήταν ικανό να παρεμποδίσει κάποιο από τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια εκτός από ένα στέλεχος *Lactococcus lactis* και δύο στελέχη *Enterococcus faecium*, τα οποία ήταν ενεργά έναντι του στελέχους *Porphyromonas gingivalis*, αλλά αυτό το αποτέλεσμα δεν συσχετίστηκε με την ύπαρξη ενώσεων πρωτεϊνικής φύσης. Από τα 236 εξεταζόμενα στελέχη ως προς την παραγωγή βακτηριοσινών, μόνο το στέλεχος *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198 κατάφερε να αναστείλει την ανάπτυξη των *Streptococcus oralis*, *Streptococcus sanguinis* και *Streptococcus gordonii*, ενώ τα στελέχη *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179 και *Lactobacillus plantarum* ACA-DC 269 παρήγαγαν βακτηριοσίνες μόνο έναντι του στελέχους *Streptococcus oralis*. Η σπανιότητα της παραγωγής ενεργών βακτηριοσινών από οξυγαλακτικά βακτήρια απομονωμένα από τρόφιμα έναντι οξυγαλακτικών βακτηρίων του στόματος ήταν εξαιρετικά απροσδόκητη δεδομένης της υψηλής συχνότητας τέτοιων ενώσεων από βακτήρια απομονωμένα από τη στοματική κοιλότητα. Αυτές οι παρατηρήσεις δείχνουν ότι μπορεί οι βακτηριοσίνες που παράγονται μέσα σε ένα συγκεκριμένο οικολογικό περιβάλλον να έχουν εξελιχθεί ως προς την παραγωγή αντιμικροβιακής δράσης έναντι ειδών στελεχών που υπάρχουν στο συγκεκριμένο οικολογικό περιβάλλον (π.χ. το περιβάλλον του στόματος σε σχέση με το περιβάλλον των τροφίμων). Εντούτοις, η δραστηριότητα των αντιμικροβιακών ενώσεων του *S. macedonicus* ACA-DC 198 έναντι των τριών στρεπτόκοκκων του στόματος ήταν υψηλή. Η φασματοσκοπία υπέρυθρου με μετασχηματισμό Fourier (FT-IR) σε συνδυασμό με την ανάλυση των κύριων συνιστωσών έδειξε ότι η έκθεση των κυττάρων-στόχων στις ενώσεις αυτές είχε ως αποτέλεσμα σημαντικές αλλαγές των βασικών δομικών συστατικών των κυττάρων. Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι οι βακτηριοσίνες που παράγονται από στελέχη οξυγαλακτικών βακτηρίων απομονωμένων από τρόφιμα έναντι στελεχών συγγενών γενών της στοματικής κοιλότητας μπορεί να είναι σπάνιες, αλλά αξίζει να διερευνηθούν περαιτέρω λόγω της ισχυρής αντιμικροβιακής τους δράσης.

Λέξεις κλειδιά: Οξυγαλακτικά βακτήρια; βακτηριοσίνες; FT-IR

Incidence of bacteriocins produced by food related lactic acid bacteria active towards oral pathogens

Zoumpopoulou G.¹, Pepelassi E.², Papaioannou W.³, Georgalaki M.¹, Maragkoudakis P.A.¹, Tarantilis P.⁴, Polissiou M.⁴, Tsakalidou E.¹, and Papadimitriou K.¹

¹Laboratory of Dairy Research, Department of Food Science and Technology, Agricultural University of Athens, Iera Odos 75, 11855 Athens, Greece

²Department of Periodontology, School of Dentistry, National and Kapodistrian University of Athens, 2 Thivon Str., 11527 Athens, Greece

³Department of Preventive and Community Dentistry, School of Dentistry, National and Kapodistrian University of Athens, 2 Thivon Str., 11527 Athens, Greece

⁴Laboratory of Chemistry, Department of Science, Agricultural University of Athens, Iera Odos 75, 11855 Athens, Greece

Abstract

In the present study we investigated the incidence of bacteriocins produced by 236 lactic acid Bacteria (LAB) food isolates that would be active against pathogenic or opportunistic pathogenic oral bacteria. None of the food LAB strains was able to inhibit any of the Gramnegative strains except one *Lactococcus lactis* and two *Enterococcus faecium* strains that inhibited *Porphyromonas gingivalis*, but this effect was not correlated to proteinaceous compounds. Interestingly, out of the 236 potential bacteriocin-producers, only *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198 was able to inhibit the growth of *Streptococcus oralis*, *Streptococcus sanguinis* and *Streptococcus gordonii*, while *Lactobacillus fermentum* ACADC 179 and *Lactobacillus plantarum* ACA-DC 269 produced bacteriocins solely against *Streptococcus oralis*. This rarity of active bacteriocins against oral LAB pathogens produced by food-related LAB was highly unexpected given the high frequency of such bacteriocins identified in oral LAB isolates. These observations may indicate that bacteriocins produced within an ecological niche may have primarily evolved to target species/strains present in the particular ecological niche and not another (e.g. the oral vs. the food environment). Nevertheless, when tested in killing assays, the potency of the antimicrobial substances of *S. macedonicus* ACA-DC 198 against the three oral streptococci was high. Fourier-transform infrared spectroscopy combined with principal component analysis revealed that exposure of the target cells to the antimicrobial compounds caused major alterations of key cellular constituents. Our findings indicate that bacteriocins produced by food-related LAB against oral LAB may be rare, but deserve to be further investigated, since, when discovered, they can be effective antimicrobials.

Keywords: Lactic acid bacteria; bacteriocins; FT-IR

Εκτίμηση των μεταβολών της σύστασης των κυττάρων του *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363 σε συνθήκες στρες με την εφαρμογή φασματοσκοπίας FT-IR

Κάζου Μ.1, Ζουμποπούλου Γ.1, Ταραντίλης Π.2, Πολυσίου Μ.2, Τσακαλίδου Ε.1, και Παπαδημητρίου Κ.1

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

*2*Εργαστήριο Χημείας, Γενικό Τμήμα, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιερά Οδός 75, 11855 Αθήνα, Ελλάδα

Στελέχη του είδους *Lactococcus lactis* χρησιμοποιούνται ευρέως ως εναρκτήριες καλλιέργειες στην παρασκευή τυριών και άλλων τροφίμων ζύμωσης. Λόγο του κρίσιμου ρόλου του σε βιομετασχηματισμούς στη βιομηχανία τροφίμων, ο *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363 αποτελεί μικροοργανισμό μοντέλο για τα οξυγαλακτικά βακτήρια. Στην παρούσα μελέτη, ο *L. lactis* MG1363 υποβλήθηκε σε συνθήκες στρες προκειμένου να επιτευχθεί ο φαινοτυπικός χαρακτηρισμός των προσαρμοσμένων στο στρες κυττάρων του. Τα περιβαλλοντικά στρες που εφαρμόστηκαν ήταν το όξινο (pH 5.5) και το ωσμωτικό (παρουσία 2% w/v NaCl) στρες, καθώς επίσης και εφαρμογή μεγαλύτερης (45°C) ή μικρότερης (20°C) θερμοκρασίας επώασης από τη βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης του μικροοργανισμού. Επιπροσθέτως μελετήθηκαν και οι συνθήκες έλλειψης θρεπτικών συστατικών (διαλύματα χωρίς γλυκόζη). Η φασματοσκοπία υπέρυθρου με μετασχηματισμό Fourier (FT-IR) χρησιμοποιήθηκε με σκοπό τη διερεύνηση των μεταβολών στα βασικά δομικά συστατικά των προσαρμοσμένων στο στρες κυττάρων του *L. Lactis*. Η ανάλυση των κύριων συνιστωσών των μετασχηματισμένων ως προς τη δεύτερη παράγωγο φασμάτων έδειξε σημαντικές ομαδοποιήσεις των κυττάρων βάσει των συνθηκών στρες που υποβλήθηκαν. Πιο συγκεκριμένα, τα κύτταρα του *L. lactis* ύστερα από όξινο στρες διαχωρίστηκαν από όλες τις υπόλοιπες ομάδες στην περιοχή του φάσματος που διαμορφώνεται από τις απορροφήσεις των συστατικών του κυτταρικού τοιχώματος. Τα ίδια κύτταρα μαζί με αυτά που προέκυψαν ύστερα από επώαση στους 45°C ομαδοποιήθηκαν στην περιοχή που απορροφούν τα λιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης. Στις χαρακτηριστικές περιοχές του φάσματος που διαμορφώνονται κυρίως από την απορρόφηση των πρωτεϊνών ομαδοποιήθηκαν τα κύτταρα του *L. lactis* ύστερα από όξινο στρες και επώαση στους 20°C, καθώς επίσης και αυτά που προέκυψαν ύστερα από ωσμωτικό στρες και επώαση στους 45°C. Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδεικνύουν κοινούς αλλά και διαφορετικούς μηχανισμούς προσαρμογής των βακτηρίων κάτω από διαφορετικές συνθήκες στρες. Περεταίρω μελέτη θα επιτρέψει την καλύτερη κατανόηση της φυσιολογίας του στρες του *L. lactis*.

Λέξεις κλειδιά: *Lactococcus lactis*; προσαρμογή σε στρες; FT-IR

Changes in *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363 cellular composition during stress adaptation as revealed by FT-IR spectroscopy

Kazou M.¹, Zoumpopoulou G.¹, Tarantilis P.², Polissiou M.², Tsakalidou E.¹ and Papadimitriou K.¹

¹Laboratory of Dairy Research, Department of Food Science and Technology, Agricultural University of Athens, Iera Odos 75, 11855 Athens, Greece

²Laboratory of Chemistry, Department of Science, Agricultural University of Athens, Iera Odos 75, 11855 Athens, Greece

Lactococcus lactis is commonly used as a starter culture for the manufacture of cheese, fermented milks, and wine products. Based on its crucial role in food biotransformations, *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363 is considered to be the model organism of lactic acid bacteria. In our study, *L. lactis* MG1363 was subjected to various stressful conditions in order to accomplish the phenotypic characterization of the adapted *L. lactis* cells. A number of environmental stresses were tested including acid (pH 5.5), osmotic (2% w/v NaCl), heat (45°C), and cold (20°C) stress, as well as starvation (media without carbohydrate source). Fourier transformed infrared spectroscopy (FT-IR) was applied in order to evaluate the changes in the cellular composition of *L. lactis* adapted cells. Principal component analysis of the second derivative transformed spectra revealed different groups of *L. lactis* cells corresponding to each stressful condition applied in the study for all characteristic spectral regions. In particular, cells subjected to acid stress were totally separated from all other groups in the spectral region correlated to cell wall constituents, as well as in the one correlated to cell membrane lipids along with the heated cells. In addition, in the spectral regions influenced mostly by the proteins, cells after acid and low temperature stresses were grouped together. This was also the case for cells after osmotic and high temperature stresses. These observations may indicate both common and distinct self-protection mechanisms employed by the bacterium under different stressful conditions that need to be further investigated in order to shed new light in the stress physiology of *L. lactis*.

Keywords: *Lactococcus lactis*; stress responses; FT-IR

Χρήση FT-IR για τη μελέτη της αντιμικροβιακής ικανότητας των *Melissa officinalis* L. και *Crocus sativus* L. έναντι παθογόνων στελεχών της στοματικής κοιλότητας

Αναστασάκη Ε.1, Ζουμποπούλου Γ.2, Παπαδημητρίου Κ.2, Ταραντίλης Π.1, Πολυσιού Μ.1 και Τσακαλίδου Ε.2

1Εργαστήριο Χημείας, Γενικό Τμήμα, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιερά Οδός 75, 11855, Αθήνα, Ελλάδα

2Εργαστήριο Γαλακτοκομίας, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιερά Οδός 75, 11855, Αθήνα, Ελλάδα

Οι περιοδοντικές παθήσεις και η οδοντική τερηδόνα είναι κοινές πολυπαραγοντικές διαταραχές της ανθρώπινης στοματικής κοιλότητας και συνδέονται άμεσα με την ανάπτυξη της οδοντικής πλάκας. Η τελευταία αποτελείται από την εν γένει μικροβιακή χλωρίδα του στόματος, η οποία συσσωρεύεται στις επιφάνειες των δοντιών και είναι η κύρια αιτία καταστροφής τους. Αρκετοί αντισηπτικοί παράγοντες χρησιμοποιούνται ευρέως για την αναστολή της βακτηριακής αυτής ανάπτυξης. Εντούτοις, αυτές οι ουσίες έχουν κάποιες φορές αντίθετες επιπτώσεις προκαλώντας ναυτίες εμετούς, και διάρροιες. Στην παρούσα μελέτη, εκχυλίσματα των φυτών μελισσόχορτου (*Melissa officinalis* L.) και κρόκου (*Crocus sativus* L.) ελέγχθηκαν ως εν δυνάμει φυσικοί αντιμικροβιακοί παράγοντες. Στα φυτά εφαρμόστηκε διαδοχική εκχύλιση με πετρελαϊκό αιθέρα, εξάνιο, διαιθυλαιθέρα και μεθανόλη. Όλα τα εκχυλίσματα εξετάστηκαν έναντι των *Str. gordonii* LMG 14518T, *Str. mutans* LMG 14558T, *Str. oralis* LMG 14532T, *Str. salivarius* LMG 11489T, *Str. sanguinis* DSM 20068, *Str. sobrinus* LMG 14641T με τη μέθοδο διάχυσης στο άγαρ (well diffusion assay). Τα εκχυλίσματα με διαιθυλαιθέρα και μεθανόλη και των δύο φυτών παρουσίασαν την υψηλότερη βακτηριοκτόνο δράση έναντι όλων των βακτηρίων που εξετάστηκαν, ακολουθούμενα από τα εκχυλίσματα του πετρελαϊκού αιθέρα και του εξανίου. Στη συνέχεια, εφαρμόστηκε φασματοσκοπία υπέρυθρου με μετασχηματισμό Fourier (FT-IR) προκειμένου να αξιολογηθούν οι αλλαγές στα δομικά συστατικά των κύτταρων *Str. mutans*, *Str. oralis* και *Str. sobrinus* ύστερα από επώασή τους με το μεθανολικό εκχύλισμα και των δύο φυτών. Τα φάσματα IR των βακτηρίων περιέχουν πληροφορίες για τη σύσταση του κυτταρικού τοιχώματος και της κυτταρικής μεμβράνης (στρώση φωσφολιπιδίων, πεπτιδογλυκάνες, και λιποπολυσακχαρίτες), και του κυτταροπλάσματος (λιπαρά οξέα, πρωτεΐνες, πολυσακχαρίτες, και νουκλεϊνικά οξέα). Η ανάλυση των κύριων συνιστωσών της δεύτερης παραγωγού των φασμάτων αποκάλυψε διαφοροποιήσεις μεταξύ των επωασμένων με τα μεθανολικά εκχυλίσματα κυττάρων των στρεπτοκόκκων και του μάρτυρα. Οι διαφορές που παρατηρήθηκαν ήταν σημαντικές σε όλες τις χαρακτηριστικές περιοχές του φάσματος, των οποίων οι απορροφήσεις συσχετίζονται με τα παραπάνω βιοδομικά συστατικά.

Λέξεις κλειδιά: φυτικά εκχυλίσματα; αντιμικροβιακή ικανότητα; FT-IR

Antimicrobial activity of *Melissa officinalis* L. and *Crocus sativus* L. against oral pathogens. Detection of cellular structural changes by FT-IR.

Anastasaki E.¹, Zoumpopoulou G.², Papadimitriou K.², Tarantilis P.¹, Polissiou M.¹ and Tsakalidou E.²

¹Laboratory of Chemistry, Department of Science, Agricultural University of Athens, 75 Iera Odos Street, 11855, Athens, Greece

²Laboratory of Dairy Research, Department of Food Science and Technology, Agricultural University of Athens, 75 Iera Odos Street, 11855, Athens, Greece

Periodontal diseases and dental caries are common oral disorders in human population with a multifactorial etiology closely related with the development of dental plaque. The latter is composed of native oral microbiota and accumulated on teeth surfaces. Several antiseptic agents are used widely to inhibit bacterial growth. However, these substances have adverse effects. In the current study, *Melissa officinalis* L. and *Crocus sativus* L. extracts were tested as potential natural antimicrobial agents. Plants were subjected to sequential extraction with petroleum ether, hexane, diethyl ether and methanol. All extracts were tested against *Str. gordonii* LMG 14518T, *Str. mutans* LMG 14558T, *Str. oralis* LMG 14532T, *Str. Salivarius* LMG 11489T, *Str. sanguinis* DSM 20068 and *Str. sobrinus* LMG 14641T by the well diffusion assay. Diethyl ether and methanol extracts of both plants induced the highest bactericidal effect against all tested bacteria, followed by petroleum ether and hexane extracts. Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) was applied in order to evaluate the changes in the cellular composition of *Str. mutans*, *Str. oralis* and *Str. sobrinus* cells after their exposure to methanolic extracts of both plants. IR spectra of bacteria reflect the biochemical composition of the cell wall and membrane (phospholipid bilayer, peptidoglycan, and lipopolysaccharides), and the cellular cytoplasm (fatty acids, proteins, polysaccharides, and nucleic acids). Principal component analysis of the second derivative transformed spectra revealed structural changes among cells treated with the extracts or the control sample. The significant differences were observed in characteristic spectral regions correlated to the above cellular structural components.

Keywords: plant extracts; antimicrobial activity; FT-IR

Αξιοποίηση μορφολογικών και μοριακών δεδομένων για τον προσδιορισμό ειδών του μυκητόφιλου γένους *Cladobotryum* στην Ελλάδα

Μίλιτς Ν. 2, Σταύρου Α. 1, Καραγιάννης Ι. 2, Γκόνου-Ζάγκου Ζ. 2, Κουβέλης Β. Ν. 1

*1*Τομέας Γενετικής και Βιοτεχνολογίας, *2*Τομέας Οικολογίας και Ταξινομικής, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Πανεπιστημιούπολη 157 01 Αθήνα

Ο μυκητόφιλος ασκομύκητας *Cladobotryum* (Hydrocreales, Hydrocreaceae) αναπτύσσεται σχεδόν αποκλειστικά σε καρποφόρους βασιδιομυκήτων καλλιεργημένων και άγριων, εδάδιμων και μη. Το γένος περιλαμβάνει 66 έγκυρα είδη, τα περισσότερα από τα οποία έχουν καταγραφεί σε τροπικές περιοχές. Στην Ελλάδα με την παρούσα εργασία, διαπιστώθηκε η παρουσία έξι διακριτών ειδών και μιας ομάδας στελεχών της οποίας η ταξινόμηση είναι ακόμη υπό μελέτη. Για τον προσδιορισμό των ειδών εντός του γένους επιλέχθηκε η αξιοποίηση τόσο των μακρο- και μικρο- μορφολογικών χαρακτήρων, όπως η ανάπτυξη, το χρώμα και η υφή της αποικίας, η παραγωγή μεταβολιτών σε συγκεκριμένα θρεπτικά υποστρώματα, το μέγεθος και το σχήμα των κονιδίων και κονιδιογόνων κυττάρων, όσο και των αλληλουχιών της ITS1-5.8S-ITS2 περιοχής της πυρηνικής ριβοσωμικής rRNA επανάληψης. Μελετήθηκαν είκοσι εννέα στελέχη μυκήτων, είκοσι δύο από τα οποία κατανεμήθηκαν, με βάση τις παραπάνω αναλύσεις, στα είδη *C. apiculatum*, *C. dendroides*, *C. fungicola*, *C. mycophilum*, *C. varium* και *C. verticillatum*. Το φυλογενετικό δένδρο, που προέκυψε από τη στοίχιση των αλληλουχιών της ITS περιοχής των στελεχών των παραπάνω ειδών και των κατατεθειμένων αλληλουχιών σε γονιδιακές τράπεζες των ειδών του *Cladobotryum*, ανέδειξε τη διαειδική διάκριση σε πλήρη ταύτιση με τις μορφολογικές αναλύσεις. Επτά στελέχη έδειξαν κοινά μορφολογικά στοιχεία με τα χαρακτηρισμένα είδη *C. tenue* και *C. rubrobrunnescens*, αλλά δεν μπόρεσαν να ταυτοποιηθούν πλήρως με κανένα από τα δύο. Η μοριακή ανάλυση, όπως φαίνεται σαφώς και στο φυλογενετικό δένδρο που προέκυψε, έδειξε να συμφωνεί με τα δεδομένα των μορφολογικών κριτηρίων. Η περαιτέρω μελέτη, τόσο σε επίπεδο μοριακό (περισσότερα γονίδια), όσο και σε μορφολογικό (αξιολόγηση διακύμανσης χαρακτήρων), κρίνεται απαραίτητη για την αποσαφήνιση της ταξινομικής θέσης των συγκεκριμένων στελεχών.

Implementation of morphological and molecular data for species determination within the mycetophilous genus *Cladobotryum* in Greece

Milic N. ², Stavrou A. ¹, Karagiannis I. ², Gonou-Zagou Z. ², Kouvelis V.N. ¹

¹Department of Genetics & Biotechnology,

²Department of Ecology & Systematics, Faculty of Biology, National & Kapodistrian University of Athens, Panepistimiopolis 15701 Athens

The mycetophilous ascomycete *Cladobotryum* (Hypocreales, Hypocreaceae) grows almost exclusively on the basidiocarps of both cultivated and wild mushrooms, edible or not. The genus comprises sixty-six species, with the majority of them recorded at tropical regions. In Greece, six distinct species and a group of isolates (still under investigation) were found. In order to determine the species classification of the strains examined, two approaches were employed: (a) the study of macro- and micro- morphological characters, like the growth, texture and colour of the colony, the production of metabolites in specific media, the shape and size of the conidia and conidiogenous cells and (b) sequencing of the ITS1-5.8S-ITS2 region of the nuclear ribosomal rRNA repeat. Twenty-nine strains were examined and twenty-two of them were classified in the species *C. apiculatum*, *C. dendroides*, *C. fungicola*, *C. mycophilum*, *C. varium* and *C. verticillatum*, according to the aforementioned approaches. The phylogenetic tree produced from the alignment of the ITS sequences and the respective sequences of the well characterized species of *Cladobotryum* already submitted to gene banks, showed their intra-species discrimination in full accordance to the morphological analyses. Seven strains revealed common morphological elements with the known species *C. tenue* and *C. rubrobrunnescens*, but they were not fully characterised as members of these two species. The molecular analysis, as the phylogenetic tree showed, indicated that the morphological based results were correct. For the elucidation of the taxonomic status of these seven isolates, further molecular (more genes) and morphological (evaluation of character variability) data is necessary.

Παραγωγή βιοτασιενεργών ουσιών από θαλάσσια βακτήρια που αποικοδομούν τα πετρελαιοειδή

Αντωνίου Ε., Κορκακάκη Ε., Καλογεράκης Ν.

Πολυτεχνείο Κρήτης / Τμήμα Μηχανικών Περιβάλλοντος, Χανιά

Στα πλαίσια του ευρωπαϊκού προγράμματος FP7 “ULIXES” (<http://www.ulixes.unimi.it/>) μελετήθηκε η παραγωγή βιοτασιενεργών ουσιών από θαλάσσια βακτήρια. Οι βιοτασιενεργές ουσίες, έχοντας υδρόφοβο και υδρόφιλο τμήμα, παρουσιάζουν την ιδιότητα να αυξάνουν την επιφάνεια των υδρόφοβων υποστρωμάτων και τη βιοδιαθεσιμότητα των πετρελαιοειδών, με αποτέλεσμα να επιταχύνεται η ανάπτυξη των βακτηρίων και ο ρυθμός βιοαποικοδόμησης. Παρόλο που οι διάφορες βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες έχουν κοινά αμφίφιλα χαρακτηριστικά, η βασική τους δομή κυμαίνεται σε ευρύ φάσμα. Τα γλυκολιπίδια είναι οι πιο ευρέως διαδεδομένες βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες, με πιο αντιπροσωπευτικό παράδειγμα τα ραμνολιπίδια και τα σοφορολιπίδια. Παράγονται κυρίως από μικροοργανισμούς παρόντες σε επιβαρυσμένες από πετρελαιοειδή περιοχές. Στην παρούσα εργασία μεικτή μικροβιακή κοινότητα που αποικοδομεί το πετρέλαιο, απομονώθηκε από δείγματα θαλασσινού νερού από τον κόλπο της Ελευσίνας, μέσω συνεχόμενων εμπλουτισμών, χρησιμοποιώντας αργό πετρέλαιο ως πηγή άνθρακα. Περαιτέρω απομόνωση πραγματοποιήθηκε προκειμένου να επιτευχθεί η απομόνωση των στελεχών που παράγουν βιοτασιενεργές ενώσεις (biosurfactant producers) και επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη τους μέσω του MATH (Microbial Adherence to Hydrocarbons) test. Η παραγωγή ραμνολιπιδίων και σοφορολιπιδίων μελετήθηκε συναρτήσει του χρόνου, των θρεπτικών (πηγή άνθρακα (πετρέλαιο, μελάσσα), προσθήκη αζώτου, φωσφόρου) και της θερμοκρασίας. Η επιβεβαίωση παραγωγής βιοτασιενεργών ουσιών έγινε μέσω χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (TLC), η απομόνωση μέσω χρωματογραφίας στήλης, ενώ ο χαρακτηρισμός με φασματοφωτομετρία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FT-IR) και με υγρή χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (LC-MS). Η παραγωγή βιοτασιενεργών ενώσεων κυμαίνεται μεταξύ 0.1-0.3 g/l (υγρής καλλιέργειας). Οι βέλτιστες συνθήκες παραγωγής παρατηρήθηκαν στις χαμηλότερες θερμοκρασίες (20o C), ενώ η αλλαγή στη πηγή άνθρακα από αργό πετρέλαιο σε μείγμα αργού πετρελαίου-μελάσας επιφέρει αύξηση μόνο στην βακτηριακή ανάπτυξη και όχι στην παραγωγή του επιθυμητού προϊόντος.

Λέξεις κλειδιά: biosurfactants, biodegradation, marine bacteria / βιοτασιενεργές ενώσεις, βιοαποικοδόμηση, θαλάσσια βακτήρια

Biosurfactant production from hydrocarbon degrading marine bacterial community

Antoniou E., Korkakaki E., Kalogerakis N.

Technical University of Crete / Dept. of Environmental Engineering, Chania

Within the European project FP7 "ULIXES" (<http://www.ulixes.unimi.it/>) biosurfactant production from marine hydrocarbon-degrading bacteria is investigated. Biosurfactants (BS) consist of both hydrophobic and hydrophilic moieties that lower the surface tension increasing the bioavailability of water-insoluble substrates, thereby enhancing the growth of bacteria and the rate of crude oil biodegradation. BS are complex surfactant molecules, with different structures, comprising of glycolipids (rhamnolipids and sophorolipids), lipopeptides, and fatty acids. Their most common origin is marine bacterial isolates grown on contaminated areas. In this project a complex microbial marine community was isolated from Elefsina Gulf sea-water samples, through successive enrichments using crude oil as sole carbon source (hydrocarbon degraders). Further isolation leads to biosurfactant producing consortia, screened through MATH (Microbial Adherence to Hydrocarbons) test, and used for biosurfactant production. Experiments took place at different temperatures with addition of nutrients (nitrogen, phosphorous) and carbon sources (crude oil & molasses) in order to optimize the process. Each type of biosurfactant is detected by Thin Layer Chromatography (TLC) and purified by silica gel column chromatography. The isolated BS are characterized by Fourier Transform Infra-Red spectroscopy (FT-IR) and Liquid Chromatography coupled with Mass Spectroscopy (LC-MS). Biosurfactant production varies between 0.1-0.3 g/l (inoculum). The optimal production conditions are observed at lower temperatures (20oC). Carbon source replacement from sole crude oil to a mixture of crude oil with molasses increases the bacterial growth, while biosurfactant production remains constant.

Προσκόλληση του βακτηριακού στελέχους S3/K σε υποστρώματα και σημαντική αύξηση της ικανότητάς του να ανάγει το Cr(VI) σε Cr(III)

Σάκουλα Δ.¹, Τίκα Ε.¹, Παντζαρτζή Χ.¹, Σαμαράς Π.², Σκούρας Ζ.¹, Γιάγκου Μ.¹,

¹Τομέας Γενετικής, Ανάπτυξης & Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, ΑΠΘ, Θεσσαλονίκη.

²Τμήμα Τεχνολογίας Τροφίμων, Τ.Ε.Ι. Θεσσαλονίκης, Θεσσαλονίκη.

Το εξασθενές χρώμιο αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους ρυπαντές του φυσικού περιβάλλοντος. Το βακτηριακό στέλεχος S3/K απομονώθηκε από την ενεργό ιλύ μονάδας επεξεργασίας αστικών λυμάτων και αναπτύσσεται σε υψηλές συγκεντρώσεις εξασθενούς χρωμίου. Γενετικές, μοριακές και βιοχημικές αναλύσεις δείχνουν ότι αυτή η ικανότητα οφείλεται σε μηχανισμούς ανθεκτικότητας-αποτοξικοποίησης ενάντια στο Cr(VI) όπως: (α) η σύνθεση ισχυρού κυτταρικού τοιχώματος, (β) η παραγωγή ενζύμων που ανάγουν το Cr(VI) σε Cr(III), (ενζυμική δραστηριότητα σε μεμβρανικά και κυτταρικά εκχυλίσματα-ανίχνευση του γονιδίου *yieF*), (γ) η παραγωγή πρωτεϊνών για εξωκυτταρική μεταφορά του χρωμίου, (ανίχνευση του γονιδίου *chrA*), (δ) προστασία ενάντια στο οξειδωτικό stress (ανίχνευση γονιδίου *chrC*), (ε) επιδιόρθωση του γενετικού υλικού (ανίχνευση του γονιδίου *recA*) και (στ) ομοιόσταση στο σίδηρο [(αναγωγή του Cr(VI) μόνο παρουσία Fe(III)]. Η αύξηση στη συγκέντρωση ανοχής του S3/K στο Cr(VI) έγινε με ακινητοποίησή του (α) σε στήλες με πληρωτικό υλικό από διαφορετικά υλικά, όπου αποδοτικότερο αποδείχθηκε το πριονίδι από *Populus alba* (Λεύκη) και (β) σε στήλες από ρινίσματα σιδήρου διαταγμένων σε μαγνητικό πεδίο. Η ανάπτυξη του μικροοργανισμού στο πριονίδι είχε ως αποτέλεσμα τη σταδιακή προσαρμογή και αύξηση των επιπέδων ανοχής από 125 σε 500 mg/l Cr(VI) με παράλληλη ολική αναγωγή του Cr(VI) σε χρονικό διάστημα 72 ωρών, καθώς και αύξηση του MIC από 500 σε 3000 mg/l Cr(VI). Η αύξηση αυτή οφείλεται στο γεγονός ότι η καθαρή λιγνίνη απορροφά το Cr(VI) [2600 mg/g λιγνίνης] μειώνοντας την ολική ποσότητα του Cr(VI), ενώ η καθαρή κυτταρίνη επιταχύνει την αναγωγή του Cr(VI). Ο σχηματισμός βιοϋμενίων του S3/K σε ρινίσματα σιδήρου ακινητοποιημένα σε μαγνητικό πεδίο αυξάνει τα επίπεδα αναγωγής ακόμη περισσότερο στη συγκέντρωση των 500 mg/l Cr(VI) σε 144 ώρες. Συμπερασματικά, κρίνεται απαραίτητη η περαιτέρω διερεύνηση του μικροοργανισμού καθώς παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον ως πιθανό μέσο για τη διαχείριση και βιοαπορρύπανση λυμάτων επιβαρημένων με Cr(VI).

Λέξεις κλειδιά: ΕΞΑΣΘΕΝΕΣ ΧΡΩΜΙΟ, ΒΙΟΑΠΟΡΡΥΠΑΝΣΗ, ΑΠΟΤΟΞΙΚΟΠΟΙΗΣΗ

Η παρούσα έρευνα έχει συγχρηματοδοτηθεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο - ΕΚΤ) και από εθνικούς πόρους μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» του Εθνικού Στρατηγικού Πλαισίου Αναφοράς (ΕΣΠΑ) – Ερευνητικό Χρηματοδοτούμενο Έργο: ΘΑΛΗΣ. Επένδυση στην κοινωνία της γνώσης μέσω του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου.

Adhesion of the bacterial strain S3/K to substrates and significant increase of its capacity to reduce Cr(VI) to Cr(III).

Sakoula D.¹, Tika E.¹, Pantzartzi C.¹, Samaras P.², Skouras Z.¹, Yiangou M.¹,

¹*Dept. Genetics, Dev. & Mol. Biol., Sch. Biol., Aristotle Univ. of Thessaloniki, Thessaloniki*

²*Dept. Food Techn., Technological Educational Institute of Thessaloniki, Thessaloniki*

Cr(VI) is a major pollutant of the environment. The bacterial strain S3/K isolated from activated sludge wastewater treatment plant grows to high concentrations of Cr(VI). Genetic, molecular and biochemical analyses on S3/K revealed detoxification-resistance mechanisms against Cr(VI). These mechanisms involve: (a) composition of a strong cell wall, (b) production of Cr (VI) reducing enzymes (enzymatic activity in cell wall and membrane extracts-detection of gene *yieF*), (c) production of transporter proteins (detection of gene *chrA*), (d) protection against oxidative stress (detecting gene *chrC*) (e) DNA repair (detection of gene *recA*) and (f) in iron homeostasis [(reduction of Cr(VI) only in the presence of Fe (III)]. Increased tolerance of S3/K strain to Cr(VI) was achieved by immobilization into columns containing (a) various filling materials, with sawdust of *Populus alba* exhibiting the highest reduction efficiency (b) iron powder in a magnetic field. S3/K growth in the sawdustcolumn resulted in gradual adjustment, increase of its tolerance levels from 125 up to 500 mg/l Cr(VI) as well as increase of its MIC from 500 to 3000 mg/l Cr(VI), while total reduction of Cr(VI) was achieved in 72 hours. The observed increase was due to Cr(VI) amount decrease by net lignin absorption [2600 mg/g lignin], while cellulose accelerates the Cr(VI) reduction. Formation of S3/K biofilms in immobilized iron powder further increased the rate of reduction up to 500 mg/l Cr(VI) in 144 hours. It is of particular interest to further investigate S3/K potential use for managing and bioremediation of wastewater contaminated with Cr(VI).

Keywords: HEXAVALENT CHROMIUM, BIODECONTAMINATION, DETOXIFICATION

This research has been co-financed by the European Union (European Social Fund – ESF) and Greek national funds through the Operational Program "Education and Lifelong Learning" of the National Strategic Reference Framework (NSRF) – Research

Αξιοποίηση του κραμβάλευρου ως πρώτη ύλη για την τέλεση της προπανοδιολικής ζύμωσης

Χατζηφράγκου Α., Παπανικολάου Σ., Κουτίνας Α.

Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Το κραμβάλευρο (στερεό υπόλειμμα από την παραλαβή του ελαίου από την ελαιοκράμβη) και η ακάθαρτη γλυκερόλη αποτελούν κύρια παραπροϊόντα της διαδικασίας παραγωγής βιοντήζελ. Η μεν γλυκερόλη δύναται να αξιοποιηθεί μέσω της βιοτεχνολογικής οδού ως πηγή άνθρακα για την τέλεση βιοδιεργασιών, το δε κραμβάλευρο έχει υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη και ιχνοστοιχεία. Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε η δυνατότητα της αξιοποίησης των εν λόγω παραπροϊόντων για την παραγωγή θρεπτικού μέσου, κατάλληλου για μικροβιακές ζυμώσεις. Η επεξεργασία που πραγματοποιήθηκε περιλάμβανε την ενζυμική υδρόλυση των διαθέσιμων πρωτεϊνών του κραμβάλευρου, με πρωτεολυτικά ένζυμα του μύκητα *Aspergillus oryzae* κατά την αύξησή του σε υπόστρωμα ελαιοκράμβης, υπό συνθήκες ζύμωσης στερεάς κατάστασης. Αξιολογήθηκε η επίδραση της θερμοκρασίας και του χρόνου διάρκειας της ενζυμικής υδρόλυσης στην πρωτεολυτική ικανότητα του μύκητα, με βάση την απόδοση του σε άζωτο (FAN). Από την κινητική των υδρολύσεων διαπιστώθηκε ότι η βέλτιστη θερμοκρασία υδρόλυσης αντιστοιχούσε στην θερμοκρασία των 45 °C, ενώ η μέγιστη παραγωγή αζώτου έλαβε χώρα μετά από 22 ώρες. Εν συνεχεία, το παραληφθέν υδρόλυμα, αποτελώντας πλέον ταυτόχρονα πηγή θρεπτικών συστατικών και υγρό ζύμωσης, αναμίχθηκε με ακάθαρτη γλυκερόλη, με απώτερό στόχο την παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης από το υποχρεωτικά αναερόβιο βακτήριο *C. butyricum*. Για τον σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν καλλιέργειες σε βιοαντιδραστήρα διαλείποντος έργου (1-L), κατά τις οποίες μελετήθηκαν η επίδραση της σύστασης του υδρολύματος σε άζωτο, στην αύξηση του βακτηρίου και την παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης. Διαπιστώθηκε η καταλληλότητα του υδρολύματος του κραμβάλευρου ως πρώτη ύλη για την τέλεση της προπανοδιολικής ζύμωσης. Επιπρόσθετα, πραγματοποιήθηκε ημι-συνεχής καλλιέργεια του εν λόγω μικροοργανισμού σε υδρόλυμα κραμβάλευρου, κατά την οποία παρελήφθησαν 46.5 g/L 1,3-προπανοδιόλης. Ως εκ τούτου, βασιζόμενη στην έννοια των βιοδιυλιστηρίων, η εν λόγω μελέτη υπογραμμίζει την δυνατότητα της αξιοποίησης τόσο του κραμβάλευρου, όσο και της ακάθαρτης γλυκερόλης για την τέλεση μικροβιακών ζυμώσεων, προσθέτοντας αξία και στα δύο αυτά παραπροϊόντα.

Λέξεις κλειδιά: *C. butyricum*, 1,3-προπανοδιόλη, υδρόλυμα ελαιοκράμβης

Rapeseed meal valorization as a generic feedstock for 1,3-propanediol fermentation

Chatzifragkou A., Papanikolaou S., Koutinas A.

Department of Food Science and Technology, Agricultural University of Athens

Rapeseed meal (solid residue deriving from oil extraction) and crude glycerol represent the main byproducts of biodiesel production process. Crude glycerol valorization can be realized via the biotechnological route as carbon source in various bioprocesses, whereas rapeseed meal possesses high composition in protein and minerals. The present study investigated the feasibility of rapeseed and crude glycerol valorization as feedstocks for microbial fermentations. The process followed involved the enzymatic hydrolysis of the available proteins found in rapeseed meal, with the aid of proteolytic enzymes of the fungus *Aspergillus oryzae*, during its growth on rapeseed substrate at solid state fermentation. Attention was paid to the effect of temperature and duration of the hydrolysis on the proteolytic capability of the fungus, based on the yield of nitrogen (FAN). The hydrolysis kinetics revealed that the optimum hydrolysis temperature corresponded to 45 °C, while maximum nitrogen production took place after 22 h. Furthermore, the derived hydrolysate, comprising both nutrient source and fermentation liquid, was combined with crude glycerol for 1,3-propanediol production by the strict anaerobic bacterial strain *C. butyricum*. Batch-bioreactor trials (1-L) were realized, aiming to investigate the impact of hydrolysate composition in nitrogen upon bacterial growth and 1,3-propanediol production. Indeed, the suitability of rapeseed hydrolysate as feedstock for 1,3-propanediol fermentation was validated. Moreover, a fed-batch bioreactor trial was performed in which maximum 1,3-propanediol production reached 46.5 g/L. Therefore, based on the biorefinery concept, the present work underlines the potentiality of both rapeseed meal and crude glycerol valorization for microbial fermentations, by adding value to those byproducts.

Εσώνια τύπου-I στο πυρηνικό γονίδιο SSU του μύκητα *Verticillium dahliae*: κατανομή, ποικιλομορφία μεταξύ ριβοσωμικών επαναλήψεων και φυλογενετικές ενδείξεις

Παπαϊωάννου Ι.Α., Δημοπούλου Χ.Δ., Τύπας Μ.Α.

Τομέας Γενετικής & Βιοτεχνολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Πανεπιστημιούπολη 15701, Αθήνα

Τα εσώνια τύπου-I αποτελούν RNAs που καταλύουν την εκτομή τους μέσω ενός ιδιαίτερου μηχανισμού «συρραφής». Εντοπίζονται σε βακτήρια/βακτηριοφάγους και στο οργανιδιακό και πυρηνικό ριβοσωμικό DNA πρωτίστων, μυκήτων, φυτών και κατώτερων μεταζώων. Φυλογενετικές αναλύσεις υποδηλώνουν μεταβίβαση των εσωνίων από προγονικά είδη, ενώ η ασυνεχής κατανομή τους στους οργανισμούς αποδίδεται και σε συχνή οριζόντια μεταφορά. Στην παρούσα μελέτη εντοπίστηκε αρχικά ένα εσώνιο τύπου-I σε φυσικούς πληθυσμούς του *V. dahliae*, παρόμοιο του *V. longisporum*. Προσδιορίστηκε η αλληλουχία του και έγινε συγκριτική μελέτη των δευτεροταγών δομών των εσωνίων των δύο μυκήτων. Σχεδιάστηκαν ειδικοί εκκινητές και ακολούθησε ανάλυση 110 στελεχών του *V. dahliae* και συγγενικών ειδών για τον έλεγχο παρουσίας αντίστοιχων εσωνίων στο SSU. Στα περισσότερα στελέχη ανιχνεύθηκε ένας ή και οι δύο τύποι εσωνίων, ενώ διαπιστώθηκε ετερογένεια μεταξύ των ριβοσωμικών επαναλήψεων ως προς το περιεχόμενό τους σε εσώνια. Η εκτομή των εσωνίων από τα πρόδρομα ριβοσωμικά RNAs αποδείχθηκε με RT-PCR, ενώ προσδιορίστηκε ο αριθμός των αντιγράφων τους σε διάφορα στελέχη με qPCR πραγματικού χρόνου (real-time PCR). Τα αποτελέσματα: α) διευκρινίζουν τις φυλογενετικές σχέσεις μεταξύ των ειδών του *Verticillium*, β) αποδεικνύουν πως το rDNA ενός στελέχους του μύκητα μπορεί να εμφανίζει ετερογένεια ως προς την παρουσία εσωνίων τύπου-I, και γ) υποδηλώνει ότι η παρουσία τέτοιων εσωνίων συχνά διαφεύγει των συμβατικών πληθυσμιακών μελετών ενίσχυσης του γονιδίου SSU με PCR και επομένως σχετικά φυλογενετικά συμπεράσματα είναι πιθανώς ελλιπή ή και παραπλανητικά.

Η παρούσα έρευνα έχει συγχρηματοδοτηθεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο – ΕΚΤ) και από εθνικούς πόρους μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» του Εθνικού Στρατηγικού Πλαισίου Αναφοράς (ΕΣΠΑ) – Ερευνητικό Χρηματοδοτούμενο Έργο: Ηράκλειτος II. Επένδυση στην κοινωνία της γνώσης μέσω του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου.

Group-I introns in the nuclear SSU gene of *Verticillium dahliae*: distribution, inter-repeat variability and phylogenetic implications

Papaioannou I.A., Dimopoulou C.D., Typas M.A.

Department of Genetics & Biotechnology, Faculty of Biology, National and Kapodistrian University of Athens, Panepistimiopolis 15701, Athens, Greece

Group-I introns mediate their own cleavage through a distinct splicing pathway. They are found in bacteria/bacteriophages, organelle and nuclear rDNA of protists, fungi, plants and early branching metazoans. Intron vertical inheritance, losses, and frequent lateral transfer putatively account for their scattered distribution. A group-I intron has been identified in the SSU gene of the phytopathogenic fungus *V. longisporum*. Here, we report the presence of a highly similar group-I intron in *V. dahliae*. The intron was cloned and sequenced, its secondary structure predicted *in silico* and compared to the one of *V. longisporum*. A population of 110 isolates of *V. dahliae* and related species was PCR-screened with SSU- and/or intron-specific primer pairs, and the majority of strains were found to possess one or both of the intronic forms, while remarkable heterogeneity within the rDNA repeats was demonstrated. This variability was investigated quantitatively by real-time qPCR analysis. Intron cleavage from precursor ribosomal RNAs was confirmed by RT-PCR. Our results: a) provide evidence for phylogenetic relations among *Verticillium* species; b) prove that the rDNA is heterogeneous with regard to intron presence/absence, and c) imply that group-I introns may remain undetected by conventional SSU PCR screenings, which possibly renders any phylogenetic conclusions incomplete or even misleading.

This research has been co-financed by the European Union (European Social Fund – ESF) and Greek national funds through the Operational Program "Education and Lifelong Learning" of the National Strategic Reference Framework (NSRF) – Research Funding Program: Heracleitus II. Investing in knowledge society through the European Social Fund

Φυλογενετική μελέτη και διάγνωση των VCGs του μύκητα *Verticillium dahliae* μέσω ανάλυσης της διαγονιδιακής περιοχής IGS της πυρηνικής ριβοσωμικής επανάληψης

Παπαϊωάννου Ι.Α., Δημοπούλου Χ.Δ., Τύπας Μ.Α.

Τομέας Γενετικής & Βιοτεχνολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Πανεπιστημιούπολη 15701, Αθήνα

Ο αφυλετικός φυτοπαθογόνος μύκητας *Verticillium dahliae* έχει μεγάλο φάσμα ξενιστών, παγκόσμια εξάπλωση και μεγάλη οικονομική σημασία. Η κατανόηση της γενετικής ποικιλότητας και δομής των φυσικών του πληθυσμών είναι ζωτικής σημασίας για την καταπολέμηση του μύκητα. Η ανάλυση των Ομάδων Βλαστητικής Συμβατότητας (VCGs) έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για την πληθυσμιακή μελέτη του *V. dahliae*. Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε μία εκτεταμένη *in silico* μελέτη των γνωστών από τις βάσεις δεδομένων αλληλουχιών της IGS του *V. dahliae*. Εντοπίστηκε μία ιδιαίτερα ποικιλόμορφη περιοχή μεταξύ στελεχών του είδους, η οποία χαρακτηριζόταν από ποικίλο αριθμό επαναλήψεων συγκεκριμένων αλληλουχιών DNA, ελλείψεις/εισδοχές ποικίλου μεγέθους, καθώς και σημειακούς πολυμορφισμούς. Με βάση πολλαπλές στοιχίσεις αλληλουχιών αυτής της περιοχής σχεδιάστηκαν εκκινητές για την ενίσχυση με PCR της πολυμορφικής περιοχής από 60 στελέχη του *V. dahliae*, όλων των ομάδων VCGs. Όλα τα προϊόντα κλωνοποιήθηκαν και προσδιορίστηκαν οι αλληλουχίες τους, οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν για φυλογενετική ανάλυση (μέθοδος Maximum Likelihood). Τα αποτελέσματα, εν συντομία, υποδεικνύουν πως: α) η ανάλυση της περιοχής IGS αποτελεί άριστο εργαλείο για τη διάκριση του *V. dahliae* από συγγενικά φυτοπαθογόνα είδη του ίδιου γένους, β) η ομάδα VCG 1 του *V. dahliae* είναι γενετικά διακριτή από τις υπόλοιπες ομάδες VCGs, γ) οι υπο-ομάδες VCGs 2A και 4B ομαδοποιήθηκαν διακριτά από τις «αδελφές» τους υπο-ομάδες 2B και 4A – οι οποίες επίσης τοποθετήθηκαν μαζί –, υποδηλώνοντας πως οι ομάδες VCGs 2 και 4 είναι γενετικά ετερογενείς, δ) η ομάδα VCG 3 εντάσσεται στον υπο-κλάδο «2A/4B», και ε) η ομάδα VCG 6 είναι ετερογενής, ορισμένα στελέχη της οποίας σχετίζονται στενά με την υπο-ομάδα VCG 4A.

Η παρούσα έρευνα έχει συγχρηματοδοτηθεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο – ΕΚΤ) και από εθνικούς πόρους μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» του Εθνικού Στρατηγικού Πλαισίου Αναφοράς (ΕΣΠΑ) – Ερευνητικό Χρηματοδοτούμενο Έργο: Ηράκλειτος ΙΙ. Επένδυση στην κοινωνία της γνώσης μέσω του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου.

Population analysis of the intergenic spacer region of the nuclear rDNA of *Verticillium dahliae*: an excellent tool for VCG phylogenetic study and diagnostics

Papaioannou I.A., Dimopoulou C.D., Typas M.A.

Department of Genetics & Biotechnology, Faculty of Biology, National and Kapodistrian University of Athens, Panepistimiopolis 15701, Athens, Greece

Verticillium dahliae is an important fungal wilt pathogen of numerous plants worldwide, accounting for severe losses. Understanding genetic diversity of the fungus is essential for effective management strategies. Vegetative compatibility group (VCG) analysis has been traditionally used for examining fungal population structures. In this study, we performed an *in silico* database analysis of the nuclear rDNA intergenic spacer region (IGS) and identified a highly polymorphic subregion among *V. dahliae* isolates. This was largely due to different copy numbers of short repetitive DNA stretches, several variable indels and single-nucleotide polymorphisms. We designed PCR primers for the amplification of this IGS polymorphic subregion from 60 *V. dahliae* strains of all VCGs. Amplicons were cloned, sequenced, and used for phylogenetic analysis. Our results indicate that: a) IGS analysis is an excellent method for the discrimination of *V. dahliae* from related species; b) *V. dahliae* VCG 1 is genetically distinct from other VCGs; c) VCG subgroups 2A and 4B were clustered together and distinctly from their “sister” subgroups 2B and 4A – which were also grouped together –, proving VCGs 2 and 4 to be genetically heterogeneous, d) VCG 3 belongs to the “2A/4B” clade, and e) VCG 6 isolates are heterogeneous; some are clustered with subgroup 4A.

This research has been co-financed by the European Union (European Social Fund – ESF) and Greek national funds through the Operational Program "Education and Lifelong Learning" of the National Strategic Reference Framework (NSRF) – Research Funding Program: Heracleitus II. Investing in knowledge society through the European Social Fund

Αξιοποίηση της τεχνολογίας FLAsH για να μελετηθεί η μεταφορά CagA πρωτεΐνης του *Helicobacter pylori* μέσω του τύπου IV εκκριτικού συστήματος

Παπαδάκος Κ.¹, Σουγλέρη Ι.¹, Χατζηλουκάς Ε.², Μεντής Α.¹ και Σγούρας Δ.¹

¹Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ, Εργαστήριο Ιατρικής Μικροβιολογίας, Αθήνα,
²Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Ιωάννινα

Κατά τη διαδικασία της προσκόλλησης του *H. pylori* σε επιθηλιακά κύτταρα, η πρωτεΐνη CagA, συνδέεται με φωσφατιδυλοσερίνη στη κυτταρική μεμβράνη και μεταφέρεται ενδοκυττάρια μέσω ενός τύπου IV εκκριτικού συστήματος. Εντός του κυττάρου, η CagA φωσφορυλιώνεται ιεραρχικά, από κινάσες Src και Abl, σε επαναλαμβανόμενα μοτίβα EPIYA που εντοπίζονται στο καρβοξυ-τελικό άκρο της. Με αυτό τον τρόπο, δρα σαν αναστολέας ευκαρυωτικών κινασών, απορρυθμίζοντας την κυτταρική πολικότητα και την επιθηλιακή ακεραιότητα, αλληλεπιδρώντας με μόρια όπως SHP-2, Grb2, Crk / Crk-L, Csk, Met, PAR1, και ZO-1. Επιπλέον αυξάνει την μεταγραφική ενεργοποίηση των SRE, SRF, NF-κB και NFAT αποκτώντας έτσι όγκο-γεννητική δυναμική. Ο σκοπός αυτής της μελέτης ήταν η παραγωγή ισογενών στελεχών *H. pylori* που εξέφραζαν πρωτεΐνη CagA σεσημασμένη με πεπτιδιο τετρα-κυστεΐνης με απώτερο στόχο την οπτικοποίηση της μεταφοράς και του ενδοκυτταρικού εντοπισμού της, μετά από *in vitro* πειραματική μόλυνση γαστρικών επιθηλιακών κυττάρων. Με βάση το στέλεχος αναφοράς P12 παρήχθησαν μέσω φυσικού μετασχηματισμού και ομόλογου ανασυνδυασμού γονιδίων, μεταλλαγμένα ισογονιδιακά στελέχη που εξέφραζαν CagA με μεταβλητό αριθμό EPIYA μοτίβων και μη-φωσφορυλιώσιμων αναλόγων (EPIFA), σεσημασμένες στο καρβοξυ-τελικό άκρο με τετρα-κυστεΐνη. Τα μεταλλαγμένα στελέχη σε σύγκριση με το πατρικό στέλεχος P12 επέδειξαν τους ίδιους ρυθμούς πολλαπλασιασμού και πρόσφυσης στα γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα. Η έκφραση και η ικανότητα φωσφορυλίωσης της χιμαιρικής CagA διαπιστώθηκε για όλα τα μεταλλάγματα. Διαπιστώθηκε επαγωγή του φαινοτύπου επιμήκυνσης και διασποράς σε άμεση συνάρτηση με τον αριθμό των λειτουργικών EPIYA-C μοτίβων φωσφορυλίωσης. Η χρωστική FLAsH για συγκεντρώσεις από 2-10μM δεν επηρέασε την επιβίωση των μεταλλαγμένων στελεχών και ο φθορισμός της CagA αυξήθηκε αναλογικά προς τη συγκέντρωση του FLAsH. Ο Ενδοκυττάριος εντοπισμός της χιμαιρικής πρωτεΐνης CagA έγινε με συνεστιακή μικροσκοπία. Είναι η πρώτη αναφορά που η εν λόγω τεχνολογία σήμανσης μέσω του πεπτιδίου τετρα-κυστεΐνης χρησιμοποιείται για την οπτικοποίηση μιας πρωτεΐνης που μεταφέρεται μέσω ενός βακτηριακού συστήματος έκκρισης τύπου IV.

Λέξεις κλειδιά: *Helicobacter pylori*, FLAsH, Type IV Secretion System,

Utilizing the FLAsH technology to study the translocation of *Helicobacter pylori* CagA effector protein through the bacterial type IV secretion system

Papadakos K.¹, Sougleri I.¹, Hatziloukas E.², Mentis A.¹, Sgouras D.¹.

¹*Institut Pasteur Hellénique, Laboratory of Medical Microbiology, Athens,*

²*University of Ioannina, Department of Biological Applications and Technology, Ioannina*

In the process of adhesion of *Helicobacter pylori* to epithelial cells, the bacterial effector protein CagA, binds to phosphatidylserine residues on the cellular membrane and is translocated via a Type IV secretion system. Once inside the cell, it is phosphorylated hierarchically, by Src and Abl kinases, on repeating carboxyl-terminal EPIYA motifs and can act as a eukaryotic protein kinase inhibitor, deregulating cellular polarity and epithelial integrity, by interacting with molecules such as SHP-2, Grb2, Crk/Crk-L, Csk, Met, PAR1, and ZO-1, but also conferring oncogenic potential by eliciting transcriptional activation of SRE, SRF, NF-κB and NFAT. The aim of this study was to visualize translocation and subsequent intracellular localization of CagA protein, following in vitro experimental *H. pylori* infection of gastric epithelial cell lines. Based on the parental P12 reference strain we generated through natural transformation and homologous gene recombination, isogenic *H. pylori* mutant strains expressing CagA protein harboring variable numbers of terminal EPIYA and phosphorylation-defective EPIFA motifs, tagged at the carboxyl-terminus with tetracysteine residues. All mutants were validated in terms of growth rates, rates of adhesion to gastric epithelial cells, expression and phosphorylation properties of chimeric CagA. FLAsH compound in the range of 2-10μM did not affect survival of mutants and fluorescence of CagA was increased proportionally to the concentration of FLAsH. Intracellular localization of chimeric CagA protein was effectively observed by confocal microscopy and this is the first report of a tetracysteine tagged bacterial effector protein through a type IV secretion system.

Μικροβιολογικά χαρακτηριστικά όξινων προϊόντων γάλακτος παρασκευασμένα από μικροδιηθημένο αγελαδινό γάλα

Βιταλιώτη Κ., Ζωίδου Ε. και Μοσχοπούλου Α.

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Επιστήμης & Τεχνολογίας Τροφίμων, Αθήνα.

Το μικροδιηθημένο ή μικροφιλτραρισμένο γάλα, συγκρινόμενο με το νωπό γάλα από το οποίο έχει προέλθει, περιέχει πολύ λιγότερους μικροοργανισμούς και καθόλου σωματικά κύτταρα. Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να μελετηθεί η ανάπτυξη καλλιέργειας γιαουρτιού σε μικροδιηθημένο γάλα. Για το λόγο αυτό παρασκευάστηκαν δύο τύποι όξινων προϊόντων γάλακτος, ένα παραδοσιακό ελληνικό γιαούρτι και ένα άπαχο ρευστό γιαούρτι, χρησιμοποιώντας νωπό αγελαδινό γάλα ως μάρτυρα (τα προϊόντα σημάνθηκαν ως CGY και CLY αντίστοιχα) και μικροδιηθημένο αγελαδινό γάλα (τα προϊόντα σημάνθηκαν ως MFGY και MFLY αντίστοιχα). Συνολικά έγιναν τρεις πειραματικές επαναλήψεις και τα προϊόντα αναλύθηκαν ως προς το pH, το μικροβιακό πληθυσμό και τη ζύμωση των σακχάρων στις 1, 7 και 15 ημέρες διατήρησης τους. Όσον αφορά την πτώση του pH, αυτή ήταν παρόμοια μεταξύ του μάρτυρα και του προϊόντος από μικροδιηθημένο γάλα και για τους δύο τύπους προϊόντων καθ' όλη τη διάρκεια διατήρησής τους. Στο παραδοσιακό γιαούρτι, ο μέσος πληθυσμός των θερμοφίλων γαλακτόκοκκων κυμάνθηκε μεταξύ 9.03 και 9.14 $\log_{10}\text{cfu/g}$ και δεν διέφερε σημαντικά ($P>0.05$) μεταξύ των δύο τύπων γάλακτος καθ' όλη τη διάρκεια διατήρησής τους. Ο μέσος πληθυσμός των θερμοφίλων γαλακτοβακίλλων επίσης δεν διέφερε σημαντικά και κυμάνθηκε μεταξύ 7.77 και 8.15 $\log_{10}\text{cfu/g}$. Στο άπαχο ρευστό γιαούρτι, οι θερμοφιλοι γαλακτόκοκκοι κυμάνθηκαν μεταξύ 8.75 και 9.54 $\log_{10}\text{cfu/ml}$ κατά μέσον όρο, ενώ οι θερμοφιλοι γαλακτοβάκιλλοι μεταξύ 6.70 και 7.57 $\log_{10}\text{cfu/ml}$, χωρίς σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο προϊόντων. Κολοβακτηριοειδή καθώς και ζύμες και μύκητες δεν ανιχνεύθηκαν σε κανένα προϊόν καθ' όλη τη διάρκεια διατήρησής τους. Επίσης, η ζύμωση της λακτόζης και περαιτέρω η ζύμωση της γλυκόζης και γαλακτόζης δεν φάνηκε να επηρεάζεται από τον τύπο του γάλακτος και στα δύο προϊόντα. Συμπερασματικά, η χρήση μικροδιηθημένου γάλακτος στην παρασκευή όξινων προϊόντων γάλακτος δεν φαίνεται να επηρεάζει την ανάπτυξη των μικροοργανισμών καλλιέργειας γιαουρτιού καθώς αυτοί αναπτύσσονται τελικά στα επιθυμητά για το προϊόν επίπεδα.

Λέξεις κλειδιά: Yogurt starter cultures, microfiltration, yoghurt

Microbial characteristics of fermented milk products made with microfiltered bovine milk

Vitalioti K., Zoidou E. and Moschopoulou E.

Agricultural University of Athens, Department of Food Science & Technology, Athens

Microfiltered milk has very little microbial load and lacks somatic cells, compared to raw milk. The aim of this study was to monitor the growth of yoghurt starter cultures in such milk. Two types of products, traditional Greek yoghurt (GY) and fat free liquid yoghurt (LY) were manufactured using bovine raw milk as control (marked as CGY and CLY respectively) and bovine microfiltered milk (marked as MFGY and MFLY respectively). Three trials were carried out and pH, microbial counts as well as sugar fermentation were determined for each product at 1, 7 and 15 days of cold storage. Regarding pH decrease, it was similar between CGY and MFGY as well as between CLY and MFLY throughout storage. The mean thermophilic lactococci counts in CGY did not differ significantly ($P>0.05$) from those in MFGY and ranged from 9.03 to 9.14 log₁₀cfu/g throughout storage. The mean thermophilic lactobacilli counts did not also differ and ranged from 7.77 to 8.15 log₁₀cfu/g throughout storage. In liquid yoghurt, mean thermophilic lactococci were found to range from 8.75 to 9.54 log₁₀cfu/ml, while mean thermophilic lactobacilli from 6.70 to 7.57 log₁₀cfu/ml, without significant difference ($P>0.05$) between CLY and MFLY. No coliforms or yeasts and moulds were found in any product throughout storage. Also, lactose fermentation and furthermore glucose and galactose fermentation were not affected significantly ($P>0.05$) by the type of milk in both products. Concluding, it seems that the use of microfiltered milk in manufacturing fermented milk products does not affect the growth of yoghurt starter cultures as they finally can reach the desired counts for such product

Συντήρηση αγλαδιών σε νερό παρουσία σπόρων *Sinapis arvensis*: μια ελληνική Παράδοση

Παπατσαρούχα Ε.,¹ Παυλίδου Σ.,² Χατζηκαμάρη Μ.,² Λαζαρίδου Α.,³ Torriani S.,⁴ Γερασόπουλος Δ.,¹ Λιτοπούλου-Τζανετάκη, Ε.²

¹ Εργαστήριο Επεξεργασίας και Μηχανικής Τροφίμων, Γεωπονική Σχολή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, 54124 Θεσσαλονίκη

² Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Υγιεινής Τροφίμων, Γεωπονική Σχολή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, 54124 Θεσσαλονίκη

³ Εργαστήριο Χημείας και Βιοχημείας Τροφίμων, Γεωπονική Σχολή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, 54124 Θεσσαλονίκη

⁴ Τμήμα Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Βερόνας, Strada le Grazie 15, 37134, Βερόνα

Στην παρούσα έρευνα, μελετήθηκαν οι μικροβιολογικές και φυσικοχημικές μεταβολές κατά τη συντήρηση αγλαδιών σε νερό παρουσία σπόρων *Sinapis arvensis* (PWS FL) σύμφωνα με τον ελληνικό παραδοσιακό τρόπο παρασκευής. "ς μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν αγλάδια σε νερό (PW FL). Η ανάπτυξη των γαλακτικών βακτηρίων (LAB) που προέρχονταν από την επιφάνεια των αγλαδιών ενισχύθηκε παρουσία σπόρων σιναπιού, τα *Enterobacteriaceae* και τα Gram αρνητικά βακτήρια μειώθηκαν όπως και το pH ($P < 0.05$) στο PWS FL. Τα LAB επικράτησαν των υπόλοιπων μικροβιακών ομάδων στο υγρό της ζύμωσης (FLs) και στα δύο συστήματα που μελετήθηκαν. Τα 49 στελέχη LAB, που απομονώθηκαν από μία δοκιμή ζύμωσης, ταυτοποιήθηκαν με την SDS-PAGE των πρωτεϊνών του όλου κυττάρου ως *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*, ενώ τα αποτυπώματα της RAPD-PCR και η αλληλουχία τμήματος του 16S rRNA επιλεγμένων στελεχών δεν ήταν ικανά να διαχωρίσουν τα στελέχη σε επίπεδο υποείδους. Τα αγλάδια που διατηρήθηκαν σε PWS FL είχαν υψηλότερη τιτλοδοτούμενη ή πτητική οξύτητα, φαινολικά συστατικά και αντιοξειδωτική ικανότητα, χαμηλότερο pH και συνεκτικότητα από το μάρτυρα. Όλες οι φυσικοχημικές παράμετροι των FLs αυξήθηκαν εκτός του pH το οποίο μειώθηκε. Παράλληλα με τον υψηλό πληθυσμό των LAB στο PWS FL υψηλότερα ήταν και τα επίπεδα του κιτρικού, γαλακτικού και οξικού οξέος τα οποία ήταν υψηλότερα από του μάρτυρα. Το οξαλικό οξύ και παρόμοιες άγνωστες ουσίες, βρέθηκαν σε υψηλότερα επίπεδα στο PWS FL απ' ότι στο μάρτυρα. Οι ουσίες αυτές ενισχύουν πιθανά την ανάπτυξη των LAB και συμβάλλουν μερικώς στην μείωση των *Enterobacteriaceae*. Η οργανοληπτική δοκιμή έδειξε ότι τα αγλάδια που συντηρήθηκαν σε PWS FL ήταν υψηλότερης γενικής αποδοχής από τον μάρτυρα και κρατούσαν τις περισσότερες από τις επιθυμητές τους ιδιότητες.

Λέξεις κλειδιά: Ζύμωση αγλαδιών, *Leuconostoc mesenteroides*, επίδραση σπόρων σιναπιού

Preservation of pears in water in the presence of *Sinapis arvensis* seeds: a Greek Tradition

Papatsaroucha E.,¹ Pavlidou S.,² Hatzikamari M.,² Lazaridou A.,³ Torriani S.,⁴ Gerasopoulos D.,¹ Litopoulou-Tzanetaki, E.²

¹ Laboratory of Food Engineering and Processing, Faculty of Agriculture, Aristotle University of Thessaloniki, 54124, Thessaloniki, Greece

² Laboratory of Food Microbiology and Hygiene, Faculty of Agriculture, Aristotle University of Thessaloniki, 54124, Thessaloniki, Greece

³ Laboratory of Food Chemistry and Biochemistry, Faculty of Agriculture, Aristotle University of Thessaloniki, 54124, Thessaloniki, Greece

⁴ Department of Biotechnology, University of Verona, Verona, Strada le Grazie 15, 37134 Verona, Italy

In this research, the microbiological and physicochemical changes during preservation of pears in water in the presence of *Sinapis arvensis* seeds (PWS FL) according to the traditional Greek home food manufacture were studied. Pears preserved in water served as control (PW FL). The growth of lactic acid bacteria (LAB) coming from the pear surface was enhanced in the presence of sinapis seeds, while *Enterobacteriaceae* and Gram-negative bacteria declined coincidentally with the lower ($P<0.05$) pH of the PWS FL. LAB predominated over the other microbial groups in the fermentation liquids (FLs) of both systems. All the 49 LAB isolates from one fermentation experiment were identified as *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* by the SDS-PAGE of whole-cell proteins, while RAPD-PCR fingerprinting and partial 16S rRNA sequence determination of selected isolates did not discriminate them at the subspecies level. Fruit preserved in PWS FL had higher titratable or volatile acidity, phenolic compounds or antioxidant capacity as well as lower pH and firmness than the control fruit. All physicochemical parameters of the FLs increased except of the pH which decreased. Coincidentally with higher population of LAB in PWS FL the levels of citric, lactic and acetic acid were higher than in control. Oxalic acid and related unknown substances were found at higher levels in PWS FL than the control and may be the agent(s) enhancing the growth of LAB and/or contributing partially to the decline of *Enterobacteriaceae*. The organoleptic test showed that fruit preserved in PWS FL had better overall acceptance than the control, and that it retained most of the positive traits.

Φαινοτυπική, τεχνολογική και γενοτυπική παραλλακτικότητα λακτοβακίλλων που απομονώθηκαν από ώριμη ΠΟΠ Γραβιέρα Κρήτης, η οποία παρασκευάστηκε σε δύο τυροκομεία.

Τσαφρακίδου Π., Παυλίδου Σ., Μποζούδη ΄., Χατζηκαμάρη Μ., Λιτοπούλου-Τζανετάκη Ε.

Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Υγιεινής Τροφίμων, Γεωπονική Σχολή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, 54124 Θεσσαλονίκη

Πενήντα τέσσερα στελέχη λακτοβακίλλων που απομονώθηκαν από ώριμη ΠΟΠ Γραβιέρα Κρήτης, η οποία παρασκευάστηκε σε δύο τυροκομεία, ταυτοποιήθηκαν σε επίπεδο είδους με την SDS-PAGE των πρωτεϊνών του όλου κυττάρου ως *Lb. brevis* (28/54), *Lb. Paracasei* subsp. *paracasei* (18/54), *Lb. curvatus* (3/54) and *Lb. casei* (3/54), ενώ δύο από τις απομονώσεις δεν ταυτοποιήθηκαν. Τα τυριά των δύο τυροκομείων διαφοροποιούνταν ως προς τα είδη που επικρατούσαν. Οι απομονώσεις *Lb. brevis* και *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* χαρακτηρίστηκαν σε επίπεδο στελέχους με τις γενοτυπικές μεθόδους RAPD-PCR και PFGE, με την τελευταία να αποδεικνύεται πιο ικανή στον χαρακτηρισμό στελεχών. Παρατηρήθηκε διασπορά στελεχών και στα δύο τυροκομεία. Γενικότερα, οι απομονώσεις που ταυτοποιήθηκαν ως *Lb. brevis* είχαν μικρότερη ικανότητα οξίνισης σε σύγκριση με αυτήτων προαιρετικά ετεροζυμωτικών λακτοβακίλλων. Διαπιστώθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($P < 0.05$) μεταξύ των στελεχών σε ότι αφορά την ικανότητα οξίνισης και τη πρωτεολυτική τους ικανότητα. Επιπροσθέτως, η πλειοψηφία των απομονώσεων (83.3%) επέδειξε μεγαλύτερη δραστηριότητα lys aminopeptidase από ότι glu aminopeptidase ή proiminopeptidase. Τα στελέχη διαφοροποιήθηκαν σε τρεις ομάδες, ανάλογα με την ποσότητα των αμινοξέων που συσσωρεύτηκε σε γάλα μετά από 6, 16, 24 ώρες και 7 ημέρες. Επιλεγμένα στελέχη μπορούν να θεωρηθούν κατάλληλα ως πρόσθετες καλλιέργειες για την παρασκευή των τυριών.

Λέξεις κλειδιά: Λακτοβάκιλλοι, ικανότητα οξίνισης, πρωτεολυτική ικανότητα

Phenotypic, technological and genotypic diversity of lactobacilli isolated from mature graviera kritis, pdo cheese, made at two dairies.

Tsafrakidou P., Pavlidou S., Bozoudi D., Hatzikamari M. and Litopoulou – Tzanetaki E.

Laboratory of Food Microbiology and Hygiene, Faculty of Agriculture, Aristotle University of Thessaloniki, 54124 Thessaloniki

A total of 54 lactobacilli, isolates from mature Graviera Kritis cheese made at two dairies, were identified at species level by the SDS-PAGE of whole-cell proteins as *Lb. brevis* (28/54), *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* (18/54), *Lb. curvatus* (3/54) and *Lb. casei* (3/54), while two remained unclassified. The species composition differed according to the dairy. The *Lb. brevis* and *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* strains were typed by RAPD-PCR analysis as well as PFGE and the latter method has been proved the most powerful for strain typing. Dispersion of the same strains in the two dairies was also noticed. In general, *Lb. brevis* isolates were weaker acidifiers than the facultative heterofermentative. There was a significant ($P < 0.05$) variation between the strains in respect of their acidification and proteolytic activity. In addition, the majority of the isolates (83.3%) exhibited lys aminopeptidase activity bigger than either glu aminpeptidase or pro iminopeptidase. Moreover, the strains were allocated into three different groups, according to the amount of amino acids accumulating in milk after 6, 16, 24 h and 7 days. Selected strains seem to be promising candidates as adjuncts.

Επιλογή των *Sphingomonas* & *Cypriavidus* ενδοφυτικών βακτηρίων του αλλόφυτου *Tamarix parviflora* για βιοενίσχυση της ριζοαποδόμησης

Συρανίδου Ε.1, Χριστοφιλόπουλος Σ.1, Weyens N.2, Βενιέρη Δ.1, Vangronsveld J.2 & Καλογεράκης Ν.1

1 Τμήμα Μηχανικών Περιβάλλοντος, Πολυτεχνείο Κρήτης, Χανιά, Ελλάδα

2 Centre for Environmental Sciences, Hasselt University, Diepenbeek, Belgium

Η φυτοαποκατάσταση, η χρήση δηλαδή των φυτών και των σχετιζόμενων με αυτό μικροοργανισμών όσον αφορά την απομάκρυνση ή τη διάσπαση ρύπων, είναι μία πολλά υποσχόμενη τεχνολογία στην αποκατάσταση τόσο ανόργανων όσο και οργανικών ρύπων του εδάφους. Το ενδιαφέρον για την εκμετάλλευση και την αξιοποίηση χαρακτηριστικών των ενδοφυτικών βακτηρίων ολοένα και αυξάνεται καθώς δίνει νέες προοπτικές στην *in situ* φυτοαποκατάσταση των οργανικών ρύπων.

Στα πλαίσια του ευρωπαϊκού προγράμματος MINOTAURUS, μία πρότυπη μονάδα που προσομοιώνει τη ριζοαποικοδόμηση (Rhizodegradation Sequence Batch Reactor Type A) σχεδιάστηκε. Η Δισφαινόλη Α (2,2-δισ-(4-υδροξυφαινολ)-προπάνιο), ένας σημαντικός ρύπος που παράγεται από τη βιομηχανία και ενδοκρινικός αναστολέας, προστέθηκε στη μονάδα με αρχικές συγκεντρώσεις 1 και 10 μg/L, αφού αρχικά είχαν τοποθετηθεί δύο αλλόφυτα του είδους *Tamarix parviflora*.

Η εργασία είχε ως στόχους να αποτιμηθεί η ποικιλότητα των ενδοφυτικών βακτηρίων, να συγκριθεί η συνεισφορά των απομονωμένων στελεχών που ανήκουν στα γένη *Sphingomonas* και *Cypriavidus* στην αποικοδόμηση της δισφαινόλης και η ανεύρεση των στελεχών που παράγουν σιδηροφορείς. Τα βακτήρια απομονώθηκαν από τις ρίζες, τους βλαστούς και τα φύλλα και χαρακτηρίστηκαν γενοτυπικά με την αλληλούχιση του 16S rRNA γονιδίου και με τη μέθοδο BOX-PCR. Τα απομονωμένα στελέχη χαρακτηρίστηκαν, επιπλέον, φαινοτυπικά ως προς την ανοχή τους στη δισφαινόλη, την ανεκτικότητα τους σε βαρέα μέταλλα και την παραγωγή σιδηροφορέων.

Η βακτηριακή κοινότητα που σχετίζεται με το αλλόφυτο *T. parviflora* είναι εμπλουτισμένη με στελέχη ανθεκτικά στη δισφαινόλη. Όσον αφορά αυτά του γένους *Sphingomonas*, έδειξαν περισσότερο από 20% ικανότητα διάσπασης της δισφαινόλης ενώ αυτά που ανήκουν στο γένος *Cypriavidus* έδειξαν διαφορετική ικανότητα διάσπασης που εξαρτάται από το θρεπτικό μέσα στο οποίο καλλιεργούνταν. Τα ευρήματα αυτά υποστηρίζουν πως τα αυτόχθονα στελέχη του *Sphingomonas*, μπορούν να χρησιμοποιηθούν στο μέλλον σε μεθόδους φυτοεξυγίανσης που συμπεριλαμβάνουν τη βιοενίσχυση.

Λέξεις κλειδιά: Ενδοφυτικά βακτήρια, διάσπαση δισφαινόλης, φυτοεξυγίανση

Selection of *Sphingomonas* & *Cypriaavidus* endophytic isolates from the halophytic plant *Tamarix parviflora* for bioaugmentation purposes

Syranidou E.¹, Christofilopoulos S.¹, Weyens N.², Venieri D.¹, Vangronsveld J.² & Kalogerakis N.¹

¹ Department of Environmental Engineering, Technical University of Crete, Chania, Greece

² Centre for Environmental Sciences, Hasselt University, Diepenbeek, Belgium

Phytoremediation comprises the use of plants and their associated microorganisms to remove or degrade contaminants. It is a promising technology for the remediation of both inorganic and organic soil contaminants. There is an increasing interest in utilizing and exploiting endophytic bacteria traits in order to enhance *in situ* phytoremediation of organic pollutants. Within the framework of MINOTAURUS project, the Rhizodegradation Sequence Batch Reactor (Rhizo SBR) Type A was designed. It was artificially polluted with Bisphenol A (BPA, 2,2-bis-(4-hydroxyphenyl)-propane) which is an industrially important compound and an endocrine disruptor, at initial concentrations of 1 and 10 µg/L, after the plantation of the halophytic plant *Tamarix parviflora*.

The objectives of this study were to assess the bacterial endophytic diversity, compare *Sphingomonas* and *Cypriaavidus* isolates' contribution in BPA degradation and identify those strains that are siderophore-producers. Cultivable endophytic bacteria were isolated from root, stem and leaf and were genotypically characterized by 16S rRNA gene sequencing and BOX-PCR genomic DNA fingerprinting. The isolates were further phenotypically characterized by their BPA tolerance, heavy metal resistance and siderophore production.

The bacterial community associated with *T. parviflora* is strongly enriched with BPA tolerant strains. All *Sphingomonas* strains showed more than 20% BPA degradation capacity in short-time experiments while *Cypriaavidus* strains showed different rates of BPA degradation when they were cultured in different medium. These findings demonstrate that the indigenous *Sphingomonas* endophytic isolates may be implemented in a phytoremediation-bioaugmentation strategy.

Η ομαδική κίνηση αυτοχθόνων στελεχών *Pseudomonas* είναι υπεύθυνη για την αποτελεσματική αναχαίτιση της ανάπτυξης φυτοπαθογόνων μυκήτων

Βενιεράκη Α1, Παπαμελετίου Κ1., Δήμου Μ1., Βεζύρη Ε1., Αντωνίου Π2. και Κατινάκης Π1.

*1Εργαστήριο Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας, Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας,
2Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας, Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής Γεωπονικό
Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιερά Οδός 75, 11855, Αθήνα*

Στελέχη του γένους *Pseudomonas* απομονώθηκαν από έδαφος ριζόσφαιρας τοματοφύτων, προερχόμενο από θερμοκηπιακή καλλιέργεια όπου είχε εφαρμοστεί ηλιοαπολύμανση του εδάφους και εν συνεχεία ελέγχθηκαν *in vitro* ως προς την ανταγωνιστική δράση τους εναντίον φυτοπαθογόνων μυκήτων, όπου παρουσίασαν ιδιαίτερη ανταγωνιστική δράση. Βάση της ανάλυσης του 16S rRNA γονιδίου που πραγματοποιήθηκε επιβεβαιώθηκε ότι ανήκουν σε είδη του γένους *Pseudomonas*. Διερευνήθηκε η δυνατότητα ομαδικής κίνησής τους σε επιφάνειες (swarming motility), ιδιότητα οι οποία φαίνεται να ευθύνεται μεταξύ άλλων για την αξιοσημείωτη αναχαίτιση των φυτοπαθογόνων μυκήτων.

Surface motility in *Pseudomonas* biocontrol strains is required for efficient biological containment of plant pathogenic fungi

Venieraki A.¹, Papameletiou K.¹, Dimou M.¹, Vezyri E.¹, Antoniou P.² and Katinakis P.¹

¹Laboratory of General and Agricultural Microbiology, Dept. of Agricultural Biotechnology,
²Laboratory of Plant Pathology, Dept. of Crop Science, Agricultural University of Athens
Iera Odos 75, Votanikos 11855, Athens, Greece

Native *Pseudomonas* spp. isolates were obtained from the tomato rhizosphere of solarized soil in greenhouses and characterized for their potential to inhibit the growth of plant pathogenic fungi. These strains exhibit antagonism towards the root-pathogenic microfungi at *in vitro* experiments. A phylogenetic analysis based on 16S rRNA gene sequences confirmed that our isolates with high biocontrol potential belonged to the genus *Pseudomonas*. Their swarming motility seems to be responsible for their ability to efficiently contain root-pathogenic microfungi and under these growth conditions the bacteria can lay siege to the fungi.

Μελέτη του σχηματισμού βιοϋμενίων σε φυσικά και μεταλλαγμένα στελέχη του αιθανολοπαραγωγού βακτηρίου *Zyotomonas mobilis*

Ταμπακοπούλου Β., Δαμουλάκη Α. και Παππά Κ.Μ.

Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Βιολογίας, Τομέας Γενετικής και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστημιόπολη, Αθήνα 15701 E-mail: valtabak@gmail.com, ktarras@biol.uoa.gr

Τα βιοϋμένια αποτελούν ανώτερες δομές πυκνών βακτηριακών πληθυσμών και συγκροτούνται κατόπιν διακυτταρικής επικοινωνίας, συνεργασίας και διαφοροποίησης των κυττάρων που τις απαρτίζουν. Τα βιοϋμενιακά κύτταρα διαφέρουν από τα ομόλογα πλαγκτονικά ως προς τη φυσιολογία τους, και αυτό είναι αποτέλεσμα συνολικών αλλαγών στη ρύθμιση και έκφραση μεγάλου αριθμού γονιδίων. Στην παρούσα εργασία διερευνήθηκε ο σχηματισμός βιοϋμενίων στο *Zyotomonas mobilis*, ένα βιοτεχνολογικής σημασίας βακτήριο που βρίσκει εφαρμογές στην παραγωγή βιοαιθανόλης. Ο βιοϋμενιακός χαρακτήρας στο συγκεκριμένο οργανισμό ενδιαφέρει, καθώς έχει φανεί πως η παραγωγή αιθανόλης αυξάνεται σημαντικά σε εκκριτικές (flocculent) καλλιέργειες, ενώ σε αμιγή βιοϋμενιακή κατάσταση αυξάνεται επί πλέον και η ανθεκτικότητα του βακτηρίου έναντι τοξικών ουσιών. Στη συγκεκριμένη εργασία μελετήθηκε η αυθόρμητη και επαγόμενη μέσω MNNG-μεταλλαξογένεσης εμφάνιση εκκριτικού φαινότυπου, και αντιστοίχως η βιοϋμενιακή συμπεριφορά των βιομηχανικών στελεχών *Z. mobilis* CP4 και ZM4. Αναλυτικότερα, σε microtiter-τύπου τρυβλία επιλέχθηκαν διαφοροποιημένοι φαινότυποι ως προς πρότυπα κυτταρικής κατακρήμνισης και συσσωμάτωσης, και αφέθηκαν να δημιουργήσουν βιοϋμένια, τα οποία εν συνεχεία παρατηρήθηκαν με μικροσκόπηση αντίθεσης φάσεων. Για συγκεκριμένους φαινότυπους ταυτίστηκε η μακροσκοπική εικόνα με τη βιοϋμενιακή υπερπαραγωγή, γεγονός που υποδεικνύει ότι η προκείμενη πειραματική προσέγγιση επιτρέπει τη high-throughput ανάλυση μεγάλου αριθμού αποικιών. Επί πλέον, διαπιστώθηκε η πολλαπλάσια δυνατότητα του *Z. mobilis* ZM4 να μεταπίπτει σε εκκριτικό σε σχέση με το *Z. mobilis* CP4. Για να διερευνηθεί το τελευταίο, πραγματοποιήθηκε *in silico* ανάλυση στις αλληλουχίες των χρωμοσωμικών και πλασμιδιακών γονιδιωμάτων των δύο στελεχών για τον εντοπισμό γονιδίων μοναδικών για έκαστο στέλεχος, όπως και γονιδίων που εν γένει ευθύνονται για εκκριτικότητα, συσσωμάτωση και σχηματισμό βιοϋμενίων.

Study of biofilm formation in wild type strains and mutant derivatives of the ethanologenic bacterium *Zymomonas mobilis*

Tampakopoulou V., Damoulaki A. and Pappas K.M.

National and Kapodistrian University of Athens, Faculty of Biology, Department of Genetics and Biotechnology, Panepistimiopolis, Ilissia, Athens 15701. E-mail: valtabak@gmail.com, kmpappas@biol.uoa.gr

Biofilms are complex high-order structures of dense bacterial populations. They are elicited by developmental changes of bacteria comprising them that involve cell-cell communication, aggregation and differentiation. Bacterial cells within a biofilm exhibit profound physiological changes compared to same cells in planktonic state, which owe to genome-wide differences in gene expression. In the present study, we examined biofilm formation in *Zymomonas mobilis*, a bacterium largely considered for bioethanol production. Interest in the particular trait was instigated by previous findings relating flocculent *Z. mobilis* cultures with increased ethanol production, as also biofilm-forming *Z. mobilis* with enhanced tolerance to toxic antimicrobial compounds. In this work, we studied the inherent or MNNG-induced ability of industrial *Z. mobilis* strains CP4 and ZM4 to exhibit altered secretory behavior and, accordingly, biofilm formation. To this end, phenotypes deviant in cell precipitation, aggregation or floc-formation were selected in multi-well screenings and allowed to develop biofilms. The latter were visualized by phase-contrast microscopy. For specific phenotypes, an immediate relation between macroscopic appearance and increased biofilm formation was apparent, which hints towards the usefulness of this approach towards high-throughput examination of large numbers of colonies. It is notable that *Z. mobilis* ZM4 appeared far more prone to yielding secretory derivatives than kin strain CP4. To investigate this difference, an *in silico* analysis was performed on the chromosomal and plasmid genomes of ZM4 and CP4 in order to identify genes unique for either strain, as also to trace genes generally associated with flocculation, aggregation or biofilm formation.

WILDWINE: Multi-strain indigenous Yeast and Bacterial starters for ‘Wild-ferment’ Wine production (FP7-SME-2012 project)

Τάσσου Χ., Νησιώτου Α., Χωριανόπουλος Ν.

Ελληνικός Γεωργικός Οργανισμός «ΔΗΜΗΤΡΑ», Ινστιτούτο Τεχνολογίας Γεωργικών Προϊόντων & Οίνου, Σοφ.Βενιζέλου 1, Λυκόβρυση, 141 23, Αττική

Η ιδέα του έργου βασίζεται στο γεγονός ότι τα γηγενή ή «άγρια» στελέχη ζυμών και βακτηρίων αποτελούν μέρος του οικοσυστήματος κάθε περιοχής και μπορούν να βελτιώσουν και να διαφοροποιήσουν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του κρασιού. Υπάρχει όμως μια τεράστια μικροβιακή βιοποικιλότητα στους διάφορους αμπελώνες και δεν είναι όλα τα «άγρια» στελέχη ικανά να δώσουν ποιοτικά κρασιά. Αυτός είναι και ο λόγος που η σύγχρονη βιομηχανική οινοποίηση βασίζεται στη χρήση ορισμένων εμπορικών στελεχών για τη διεξαγωγή της ζύμωσης. Με αυτόν τον τρόπο εξασφαλίζεται μεν μια ομαλή και επαναλήψιμη ζύμωση, ωστόσο, η γενικευμένη χρήση των εμπορικών καλλιεργειών έχει οδηγήσει στην παραγωγή κρασιών με παρόμοιο αναλυτικό και οργανοληπτικό χαρακτήρα, αποστερημένων από την πρωτοτυπία, την πολυπλοκότητα ή την ιδιαιτερότητα που μπορεί να προσδώσει μια «άγρια» ζύμωση. Αντίθετα, η εφαρμογή μιγμάτων από επιλεγμένα ενδογενή στελέχη μπορεί να εξασφαλίσει την παραγωγή ενός προϊόντος «άγριας» ζύμωσης με έντονο τοπικό χαρακτήρα παράλληλα με τον έλεγχο της διαδικασίας για την παραγωγή ενός ασφαλούς οίνου σταθερής ποιότητας. Το “WILDWINE” (άγριο κρασί) είναι ένα έργο που υποστηρίζεται από την Ευρωπαϊκή Κοινότητα (FP7-SME-2012), έχει χρονική διάρκεια τριών ετών (2012-2015) και συνολική χρηματοδότηση 1.166.000 €. Στο έργο, που συντονίζει η Δρ. Χρυσούλα Τάσσου, συμμετέχουν μεγάλα πανεπιστήμια της Ιταλίας, της Γαλλίας και της Ισπανίας καθώς και σημαντικοί Συνεταιρισμοί Οίνου και Εταιρείες των παραπάνω χωρών. Σύμφωνα με την επιστημονικά υπεύθυνη του έργου Δρ. Α. Νησιώτου, στόχος είναι η απομόνωση, η μελέτη και η αξιοποίηση κατάλληλων για οινοποίηση άγριων ζυμών και βακτηρίων από κάθε περιοχή. Οι μικροοργανισμοί αυτοί θα επιτρέψουν την παραγωγή καινοτόμων κρασιών με σταθερή και υψηλή ποιότητα και κυρίως με έντονο το γεωγραφικό τους αποτύπωμα. Τα κρασιά «άγριας» κατευθυνόμενης ζύμωσης καλύπτουν τις σύγχρονες απαιτήσεις των καταναλωτών για οργανικά, ασφαλή κρασιά με ιδιαίτερο τοπικό χαρακτήρα και αναμένεται να βελτιώσουν την ανταγωνιστικότητα των συμμετεχόντων χωρών στη διεθνή αγορά.

Λέξεις κλειδιά: Οίνος, «άγρια» ζύμωση, ζύμες, non-Sacharomyces

WILDWINE: Multi-strain indigenous Yeast and Bacterial starters for ‘Wild-ferment’ Wine production (FP7-SME-2012 project)

Tassou C.C., Nisiotou A., Chorianopoulos N.

Hellenic Agricultural Organisation “DEMETER”, Institute of Technology of Agricultural Products & Wine, Sof. Venizelou 1, Lycovrissi, 141 23, Attiki

Aforetime, wines were produced by the resident grape/winery microbiota. Currently commercial *Saccharomyces cerevisiae* and *Oenococcus oeni* starter cultures are widely used to ensure a manageable process. Despite advantages, this may lead to sensory resemblance of wines from diverse origins, whereas exotic starters may fail to take over fermentation. Nowadays, the competitive nature of global wine market urges for the production of premium wines with regional character. Consumers also call for allergen-free wines made according to natural and organic procedures. To this end, the use of indigenous *S. cerevisiae* or non-*Saccharomyces* (wild) yeasts is a tool to create wine complexity and authenticity, while selected lactic acid bacteria (LAB) may effectively control malolactic fermentation and thereby eliminate biogenic amines (BA). The innovative scope of this project is to combine native *S. cerevisiae* with wild species and native *O. oeni* with other LAB in the development of peculiar yeast and bacterial blend starters, respectively. These formulations will be carefully designed to fulfill all the essential and desirable winemaking properties to serve as starters in induced wild fermentations for the production of specialty organic or conventional wines. For this purpose, the biodiversity of key EU viticultural areas will be thoroughly screened to identify strains of enological importance as per their phenotypic characters and genetic traits. Their eligibility will be validated in plant-scale fermentations and wines will be evaluated by sensory analysis and consumer acceptance testing. Outcomes will enable (a) ‘wild ferment’ technology in winemaking, (b) production of innovative, safe terroir wines and (c) meeting rules on organic wine production and BA content. By these means, the project will assist the SME-AGs from leading wine producing EU countries (France, Greece, Italy, Spain) to enhance marketing abilities towards a more competitive and sustainable wine industry. The project is funded by the EU (FP7/2007-2013), under grant agreement n^ο 315065-WILDWINE.

PROBIOLIVES: Ζύμωση επιτραπέζιων ελιών με επιλεγμένα στελέχη προβιοτικών γαλακτικών βακτηρίων. Για ένα νέο λειτουργικό τρόφιμο (FP7-SME-2008- 2 project)

Τάσσου Χ.1, Πανάγου Ε.2, Τσακαλίδου Ε.3, Νυχάς Γ.Ι.2

1Ελληνικός Γεωργικός Οργανισμός «ΔΗΜΗΤΡΑ», Ινστιτούτο Τεχνολογίας Γεωργικών Προϊόντων, Σοφ.Βενιζέλου 1, Λυκόβρυση, 141 23, Αττική

2Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Επιστήμης & Τεχνολογίας Τροφίμων, Εργαστήριο Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας Τροφίμων, Ιερά Οδός 75, Βοτανικός, 11855, Αθήνα

3Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Επιστήμης & Τεχνολογίας Τροφίμων, Εργαστήριο Γαλακτοκομίας, Ιερά Οδός 75, Βοτανικός, 11855, Αθήνα

Η ιδέα του έργου είναι να παρέχει στις Ενώσεις των Μικρομεσαίων Επιχειρήσεων και στα μέλη τους εργαλεία για βελτίωση του τεχνολογικού τους επιπέδου, της ανταγωνιστικότητάς τους και των εσόδων τους από την παραγωγή ελιών, ζυμωμένων με προβιοτικά βακτήρια, κατά προτίμηση απομονωμένων από την μικροχλωρίδα των ελιών. Ο στόχος είναι η παραγωγή ενός λειτουργικού προϊόντος, που να περιέχει προβιοτικά βακτήρια σε επαρκείς ποσότητες που να βελτιώνουν την υγεία του καταναλωτή, χωρίς να αλλοιώνουν τα ποιοτικά χαρακτηριστικά των ζυμωμένων ελιών. Το αντικείμενο του έργου περιλαμβάνει: απομόνωση και χαρακτηρισμό προβιοτικών γαλακτικών βακτηρίων από τις ελιές, χρήση τους ως εκκινητές σε ελεγχόμενες ζυμώσεις μικρής κλίμακας, εκτίμηση του shelf life του τελικού προϊόντος, modelling της κινητικής των ζυμώσεων, ανάλυση επικινδυνότητας και μελέτη αποδοχής από τον καταναλωτή και τέλος εφαρμογή των επιλεγμένων προβιοτικών ως εκκινητές από τη βιομηχανία. Διάφορα στελέχη έχουν απομονωθεί σε κάθε μια από τις χώρες που συμμετέχουν (Ελλάδα, Ιταλία, Ισπανία, Πορτογαλία, Τυνησία) και έχει γίνει επιλογή ενός αριθμού με βάση προβιοτικές ιδιότητες σε *in vitro* tests. Αυτά τα στελέχη χρησιμοποιήθηκαν με επιτυχία σε μικρής κλίμακας ζυμώσεις που παρακολούθηθηκαν με μικροβιολογικές και φυσικοχημικές αναλύσεις ενώ PFGE tests έδειξαν υψηλά ποσοστά επιβίωσης των στελεχών αυτών στο τέλος των ζυμώσεων. Το πρόγραμμα χρηματοδοτείται από το 7ο Πρόγραμμα Πλαίσιο της Ευρωπαϊκής Ένωσης (FP7/2007-2013), πρόγραμμα n° 243471- PROBIOLIVES.

Λέξεις κλειδιά: Προβιοτικά, Γαλακτικά βακτήρια, επιτραπέζιες ελιές,

PROBIOLIVES: Table olive fermentation with selected strains of probiotic lactic acid bacteria. Towards a new functional food (FP7-SME-2008- 2 project)

Tassou C.C.¹, Panagou E.², Tsakalidou E.³, Nychas G.J.²

¹Hellenic Agricultural Organisation “DEMETER”, Institute of Technology of Agricultural Products, Sof. Venizelou 1, Lycovrissi, 141 23, Attiki

²Agricultural University of Athens, Food Science & Technology Department, Laboratory of Food Microbiology & Biotechnology, Iera Odos 75, Votanikos, 11855, Athens

³Agricultural University of Athens, Food Science & Technology Department, Laboratory of Dairy Science, Iera Odos 75, Votanikos, 11855, Athens

The concept of this project is to provide to the SME Associations and their members SMEs with tools to increase their technological level, competitiveness and profits by the production of olives, fermented with probiotic bacteria, preferably isolated among the lactic acid bacteria (LAB) colonizing the olives. The goal is the production of a functional product, containing probiotic bacteria in adequate amounts to improve consumer’s health, without altering the quality characteristics of fermented olives. The project’s objectives included: isolation and characterization of probiotic lactic acid bacteria from the autochthonous olive microbiota, application of the selected probiotic lactic acid bacteria as starter cultures in small-scale controlled fermentations, evaluation of shelf life of the probiotic olives under different storage conditions, modelling the fermentation kinetics and survival during storage of the probiotic lactic acid bacteria, risk assessment and consumer acceptance studies, application of the selected probiotic bacteria as starter cultures in medium or large-scale controlled fermentations by the participating companies. Different strains of LAB have been isolated in each participating country (Greece, Italy, Spain, Portugal, Tunisia) and a number of them selected according to their probiotic properties as assessed with *in vitro* tests. These PROBIOTIC strains have been used as starters in olive fermentations. The fermentations have been monitored successfully with microbiological and physicochemical analyses performed at regular intervals and PFGE tests showed a high viability of the strains at the end of the fermentation. The project is funded by the EU (FP7/2007-2013), under grant agreement n° 243471-PROBIOLIVES.

Βιολογική δράση υδατικών εκχυλισμάτων αρωματικών φυτών σε φυτοπαθογόνους και εντομοπαθογόνους μύκητες

Σκώττη Ε.^a, Αναστασάκη Ε.^a, Κουντούρη Σ.Δ.^b, Μπουχάγιερ Π.^c, Τσιτσιγιάννης Δ.Ι.^b, Ταραντίλης Π.Α.^{a,*}, Πολυσίου Μ.^a

^aΕργαστήριο Χημείας, Γενικό Τμήμα, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιερά Οδός 75, 11855 Αθήνα

^bΕργαστήριο Φυτοπαθολογίας, Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιερά Οδός 75, 11855 Αθήνα

^c Τμήμα Τεχνολογίας Βιολογικής Γεωργίας και Τροφίμων, Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Ιονίων Νήσων, Τέρμα Λεωφόρου Βεργωτή, 28100 Αργοστόλι

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η αξιολόγηση της βιολογικής δράσης των υδατικών εκχυλισμάτων πέντε αρωματικών φυτών της οικογένειας *Lamiaceae* (*Melissa officinalis*, *Hyssopus officinalis*, *Origanum dictamnus*, *Origanum vulgare*, *Salvia officinalis*) και του *Crocus sativus* έναντι τριών ειδών φυτοπαθογόνων μυκήτων (*Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata* and *Aspergillus flavus*), και του εντομοπαθογόνου μύκητα *Beauveria bassiana* που χρησιμοποιείται ως βιολογικό εντομοκτόνο από τη βιολογική γεωργία. Όλα τα φυτικά εκχυλίσματα (*Lamiaceae*: 10g/100ml, *Crocus sativus*: 0.1g/100ml) παρουσιάστηκαν βιολογικά ενεργά έναντι όλων των μυκήτων που δοκιμάστηκαν ενισχύοντας ή παρεμποδίζοντας τόσο την κονιδιογένεση όσο και την ανάπτυξη του μυκηλίου. Στην περίπτωση του *Fusarium oxysporum*, περισσότερο ενεργό εμφανίστηκε το εκχύλισμα του *Origanum vulgare*, καθώς τετραπλασιάστηκε η παραγωγή κονιδίων σε σχέση με το μάρτυρα. Αντίστοιχη δράση εμφάνισε το εκχύλισμα της *Salvia officinalis* στην *Alternaria alternata* και το εκχύλισμα του *Origanum dictamnus* στη *Beauveria bassiana* και τον *Aspergillus flavus*. Η βιολογική δράση των προαναφερόμενων υδατικών εκχυλισμάτων, στις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν, έναντι των μυκήτων που δοκιμάστηκαν ενδεχόμενα οφείλεται στα υδατοδιαλυτά συστατικά, τα οποία μεταξύ των άλλων συστατικών περιέχουν και σάκχαρα. Δε βρέθηκε συσχέτιση ανάμεσα στη βιολογική δράση και την αντιοξειδωτική δράση ή το ολικό φαινολικό περιεχόμενο. Μέχρι σήμερα έχει αξιολογηθεί η βιολογική δράση του αιθερίου ελαίου διαφόρων ειδών *Lamiaceae*, και σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις βρέθηκε να έχει μυκητοκτόνο δράση. Συνεπώς, είναι απαραίτητη η περαιτέρω διερεύνηση της συνέργειας των υδατοδιαλυτών συστατικών και του αιθερίου ελαίου των φυτικών ειδών που εξετάστηκαν, καθώς επίσης και της διερεύνησης της επίδρασης της παρατηρούμενης βιολογικής δράσης σε σηματοδοτικά μονοπάτια γονιδίων που ρυθμίζουν την ανάπτυξη των υφών και την κονιδιογένεση των εξετασθέντων ειδών μυκήτων σε μοριακό επίπεδο.

Λέξεις κλειδιά: Φυτοπαθογόνοι μύκητες, βιολογική δράση, υδατικά εκχυλίσματα

Biological activity of aromatic plants aqueous extracts against plant pathogenic and entomopathogenic fungi

Skotti E.^a, Anastasaki E.^a, Koundouri S.D.^b, Bouchagier P.^c, Tsitsigiannis D.I.^b, Tarantilis P.A.^a,*, Polissiou M.^a

^aLaboratory of Chemistry, Department of Science, Agricultural University of Athens, Iera Odos 75, 11855 Athens, Greece

^bLaboratory of Phytopathology, Department of Crop Science, Agricultural University of Athens, Iera Odos 75, 11855 Athens, Greece

^cDepartment of Organic Farming and Food Science, Technological Educational Institution of Ionian Islands, Terma Leoforou Vergoti, 28100 Argostoli, Greece

Abstract

The aim of this work was to evaluate the biological activity of five *Lamiaceae* species (*Melissa officinalis*, *Hyssopus officinalis*, *Origanum dictamnus*, *Origanum vulgare*, *Salvia officinalis*) and *Crocus sativus* aqueous extracts against three plant pathogenic fungi (*Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata* and *Aspergillus flavus*) and an entomopathogenic fungal species (*Beauveria bassiana*) used as a biological insecticide in organic farming. All plant extracts (*Lamiaceae*: 10g/100ml, *Crocus sativus*: 0.1g/100ml) were active against all fungal species contributing to enhancement or inhibition of conidia production and mycelium radial growth. In *Fusarium oxysporum*, more active was the *Origanum vulgare* extract as conidia germination was enhanced almost four times more compared to control. *Salvia officinalis* extract showed similar activity to *Alternaria alternata*, and *Origanum dictamnus* to *Beauveria bassiana* and *Aspergillus flavus*. The biological activity of *Lamiaceae* and *Crocus sativus* aqueous extracts, at the concentrations tested, against the above fungal species may be due to the water soluble substances, which among other compounds containing sugars. Correlation was not found between either antioxidant and biological activity or total phenolic compounds and antioxidant activity. To date the essential oil biological activity of several *Lamiaceae* species has been mainly evaluated, and was almost always found as antifungal. Thus, further investigation is needed on the synergism of water soluble substances and essential oil of plant species examined, as well as on the influence of the observed biological activity in gene signaling pathways that regulate hyphal growth and sporulation of the examined fungal species at the molecular level.

Keywords: Plant pathogenic fungi, biological activity, aqueous extracts

Εκκριτικό σύστημα τύπου III, *Bradyrhizobium japonicum*, *Saccharomyces cerevisiae*, Διερευνώντας το μοριακό φαινοτυπικό φάσμα ριζοβιακών πρωτεϊνών-τελεστών στο σακχαρομύκητα

Φωτιάδης Χ. και Ταμπακάκη Α.*

Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας, Εργ. Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιερά Οδός 75, 11855, Αθήνα, * tampakaki@aia.gr

Το *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 είναι ένα αρνητικό κατά Gram βακτήριο εδάφους, που αφομοιώνει το ατμοσφαιρικό άζωτο κατά τη διάρκεια της συμβίωσης με ορισμένα ψυχανθή (π.χ. σόγια). Αν και η γενετική βάση σχηματισμού φυματίων έχει εκτενώς μελετηθεί, πρόσφατα ευρήματα υποδεικνύουν ότι το εκκριτικό σύστημα τύπου III (T3SS) παίζει κάποιο ρόλο στη συμβίωση. Παρόμοια με παθογόνα αρνητικά κατά Gram βακτήρια, τα T3SS σε συμβιωτικά βακτήρια μεταφέρουν στα κύτταρα-ξενιστές ένας πλήθος πρωτεϊνών (T3SEs) που διαταράσσουν ευκαρυωτικές κυτταρικές λειτουργίες. Η ταυτοποίηση αυτών των πρωτεϊνών καθώς και των στόχων τους είναι σημαντική για την κατανόηση της συμβιωτικής διαδικασίας. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι πολλές μεταφερόμενες πρωτεΐνες από παθογόνα φυτών και ζώων αναστέλλουν την ανάπτυξη της ζύμης, επειδή οι πρωτεΐνες αυτές συνήθως στοχεύουν θεμελιώδεις κυτταρικές διαδικασίες οι οποίες είναι συντηρημένες σε όλους τους ευκαρυώτες. Έτσι, η ζύμη, *Saccharomyces cerevisiae*, έχει καθιερωθεί ως ένα εργαλείο για την έρευνα των βακτηριακών T3Es.

Στην παρούσα μελέτη, υπερεκφράστηκαν 21 πιθανές πρωτεΐνες-τελεστές από το *Bradyrhizobium japonicum* στη ζύμη. Προηγούμενες μελέτες μας είχαν δείξει ότι 2 από τις 21 πρωτεΐνες προκαλούσαν αναστολή ανάπτυξης της ζύμης κάτω από φυσιολογικές συνθήκες. Για να ανακαλύψουμε νέες ενδείξεις για τις λειτουργίες των υπολοίπων, πραγματοποιήσαμε τη λειτουργική βιοδοκιμή ζύμης παρουσία τεσσάρων καλά χαρακτηρισμένων παραγόντων καταπόνησης της ζύμης: άλατος, nocodazole, σορβιτόλης, καφεΐνης και tunicamycin. Η ανάπτυξη της ζύμης κάτω από συνθήκες καταπόνησης αυξάνει την ευαισθησία της στις πρωτεΐνες-τελεστές και βοηθά στην ταυτοποίηση πρωτεϊνών-τελεστών που στοχεύουν ένα συντηρημένο μονοπάτι το οποίο φυσιολογικά δεν περιορίζει την ανάπτυξη της ζύμης. Τα πρότυπα ανάπτυξης κυττάρων ζύμης που εκφράζουν τις βακτηριακές πρωτεΐνες σε καθένα από τους παράγοντες καταπόνησης παρουσιάζονται και παρέχονται ενδείξεις για τις κυτταρικές διαδικασίες που στοχεύονται από τις πρωτεΐνες.

**type III secretion system, *Bradyrhizobium japonicum*, *Saccharomyces cerevisiae*,
Exploring the molecular phenotypic spectrum of rhizobial type III effectors in yeast**

Fotiadis C. and Tampakaki A.*

*Agricultural University of Athens, Department of Agricultural Biotechnology, Lab. of General & Agricultural Microbiology, Iera Odos 75, 118 55, Athens * tampakaki@aua.gr*

Bradyrhizobium japonicum USDA110 is a Gram-negative soil bacterium capable of fixing atmospheric nitrogen in symbiosis with specific leguminous plants (e.g. *Glycine max*). Although the genetic basis of nodulation has been extensively studied, recent findings indicate that the type III secretion system (T3SS) plays a role in symbiosis. Similarly to Gram-negative pathogenic bacteria, the T3SSs in symbiotic bacteria translocate into host cells a suite of effector proteins (T3SEs) that manipulate eukaryotic cellular processes. Identification of these translocated proteins and their targets are essential to understanding symbiosis. Previous studies have shown that many T3Es from plant and animal pathogens inhibits yeast growth because these proteins often target fundamental cellular processes that are conserved among all eukaryotes. Thus, the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, has been established as a tool to investigate bacterial T3Es.

In the present study, we overexpressed 21 putative T3S effectors from *Bradyrhizobium japonicum* in yeast. Our previous studies had shown that two out of 21 T3S effectors tested caused yeast growth inhibition under normal growth conditions. To discover new clues to the functions of the rest, we performed the yeast functional assay in the presence of four well characterized yeast stressors: salt, nocodazole, sorbitol, caffeine and tunicamycin. The growth of yeast under stress conditions increases yeast sensitivity to effectors and aids in the identification of effectors which target a pathway that is conserved but is not normally rate-limiting for yeast growth. The growth patterns of yeast expressing the bacterial proteins to individual stressors are presented and insights are provided into cellular processes targeted by the proteins.

Στελέχη *Lactobacillus* διασπούν τις γλοιαδίνες και βελτιώνουν την εντεροπάθεια που επάγεται από τη γλουτένη σε ζωικό μοντέλο

Γερακόπουλος Β.1, Κοτζαμανίδης Χ.1, Τουράκη Μ.1, Λιτοπούλου-Τζανετάκη Ε.2, Γιάγκου Μ.1

1 Τομέας Γενετικής, Ανάπτυξης και Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, ΑΠΘ

2 Εργαστήριο Μικροβιολογίας & Υγιεινής Τροφίμων, Τμήμα Γεωπονίας, ΑΠΘ

Η κοιλιοκάκη, ή σύνδρομο δυσαπορρόφησης γλουτένης, είναι ένα αυτοάνοσο νόσημα και χαρακτηρίζεται από φλεγμονή στο βλεννογόνο του λεπτού εντέρου σε γενετικά προδιατεθειμένα άτομα. Η φλεγμονή επάγεται από μία οικογένεια πρωτεϊνών της γλουτένης που ονομάζονται γλοιαδίνες και περιέχονται σε δημητριακά, όπως το σιτάρι, κριθάρι κ.α. Στην παθογένεια της κοιλιοκάκης εμπλέκεται, η Th1 κυτταρική ανοσοαπόκριση καθώς και αυτοαντισώματα ενάντια στη γλοιαδίνη και στην τρανσγλουταμίνωση. Δεν υπάρχει συγκεκριμένο θεραπευτικό πρωτόκολλο και η νόσος αντιμετωπίζεται μόνο με διατροφή ελεύθερη από γλοιαδίνη και αρχαίες ποικιλίες σιτηρών. Σε προηγούμενα πειράματά μας αναπτύξαμε το πρώτο ζωικό πειραματικό μοντέλο κοιλιοκάκης σε ποντίκια. Η ανάπτυξη ποντικών ανοχικών στη γλουτένη (G-) και στη συνέχεια η μεταφορά τους σε δίαιτα με γλουτένη (G+) οδηγεί σε ατροφία των λαχνών του εντέρου, αυξημένο τίτλο αυτοαντισωμάτων ενάντια στη γλοιαδίνη και στην τρανσγλουταμίνωση στον ορό καθώς και αυξημένο αριθμό κυττάρων που παράγουν κυτοκίνες και IgA αντισώματα στο έντερο, κλινικά συμπτώματα της κοιλιοκάκης στον άνθρωπο. Το πιθανό προβιοτικό στέλεχος ΚΚ1 του *Saccharomyces boulardii* αποδομεί το α κλάσμα της γλοιαδίνης σίτου και με την ανοσοτροποποιητική δράση που ασκεί βελτιώνει τα κλινικά συμπτώματα της εντεροπάθειας σε ποντίκια. Διερευνήθηκε κατά πόσο η αγωγή των G+ ποντικών με πιθανά-προβιοτικά στελέχη *Lactobacillus* μπορεί να περιορίσει τα κλινικά συμπτώματα της εντεροπάθειας. Τόσο με ανάλυση κατά Western όσο και με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) βρέθηκε ότι τα στελέχη DC423, 2035 και DC411 αποδομούσαν το α και το γ κλάσμα της γλοιαδίνης, ενώ το στέλεχος DC421 αποδομούσε το γ κλάσμα. Η χορήγηση των στελεχών DC421 και 2035 σε G- ποντίκια μειώνει την παραγωγή TNFα στο έντερο ενώ η αγωγή των G+ ποντικών με τα στελέχη DC411, DC421, DC423 και 2035 έχει ως αποτέλεσμα τη βελτίωση τόσο των ιστοπαθολογικών συμπτωμάτων της εντεροπάθειας από γλουτένη όσο και ανοσοτροποποίηση όπως η αλλαγή του προτύπου παραγωγής κυτοκινών (TNFα, IFNγ, IL-10, IL-15) και IgA, αντισωμάτων στον εντερικό βλεννογόνο.

Λέξεις κλειδιά: Nutrition, Probiotics, Celiac Disease, Gliadins

Certain *Lactobacillus* strains degrade wheat flour gliadins and ameliorate enteropathy induced by gluten in a mouse animal model

Gerakopoulos V.¹,Kotzamanidis C.¹,Touraki M.¹,Litopoulou-Tzanetakis E.², Yiangou M.¹

¹Dept. Genet., Dev. & Mol. Biol., Sch. Biol., Aristotle Univ. Thes/niki

²Lab. Of Microbiology & Food Hygiene, Sch. Agric., Aristotle Univ. Thes/niki

Celiac disease (CD), is an autoimmune disease characterized by small bowel inflammatory disorder in genetically predisposed individuals. The inflammation is induced by gliadins (family of gluten), found in cereals. CD pathogenesis implicates the Th1 immune response, as well as autoantibodies against gliadin and tissue transglutaminase. So far, there is no specific therapeutic protocol for CD. We recently developed the first experimental animal model of CD in mice. The nutrition of mice with a gluten-free diet (G-) following their return in glutencontaining diet, leads to villous atrophy, increased title of anti-gliadin and antitransglutaminase auto-antibodies in serum and increased cytokine and IgA production in the intestine : all those are clinical manifestations of CD. The potential probiotic immunomodulatory strain KK1 of *Saccharomyces boulardii* degrades the α fragment of wheat gliadin and ameliorates the symptoms of enteropathy. We examined whether the treatment of G+ mice with potential probiotic *Lactobacillus* strains can ameliorate the clinicalmanifestaqtions of enteropathy. Western blotting and High Performance Liquid Chromatography (HPLC) analysis revealed that strains DC423, 2035 and DC411 degradedthe α and γ fragments of gliadin, whereas strain DC421 degraded only the γ fragment. Treatment of G- mice with strains DC421 and 2035 had resulted in a decrease in the production of TNF α in the intestine, whereas treatment of G+ mice with strains DC411, DC421, DC423 and 2035 resulted in the amelioration of CD histopathology. Furthermore,mice treated with the above strains demonstrated immunomodulatory activity concerning thecytokine (TNF α , IFN γ , IL-10 and IL-15) and IgA production in the intestine.

Λέξεις κλειδιά: Nutrition, Probiotics, Celiac Disease, Gliadins

Γραβιέρα Κρήτης και Γραβιέρα Νάξου: μικροβιολογικά και φυσικοχημικά χαρακτηριστικά διαφοροποίησης

Μποζούδη Δ.,¹ Παυλίδου Σ.,¹ Torriani S.,² Λιτοπούλου-Τζανετάκη Ε.¹

¹ Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Υγιεινής Τροφίμων, Γεωπονική Σχολή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, 54124 Θεσσαλονίκη

² Τμήμα Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Βερόνας, Strada le Grazie 15, 37134, Βερόνα

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διαφοροποίηση της Γραβιέρας Νάξου από τη Γραβιέρα Κρήτης με βάση τα μικροβιολογικά και φυσικοχημικά χαρακτηριστικά τους. Πραγματοποιήθηκαν τρεις παραδοσιακές τυροκομήσεις (από νωπό αγελαδινό + 10% πρόβειο και πρόβειο γάλα, αντίστοιχα) σε κάθε περιοχή και αναλύθηκαν φρέσκα και ώριμα τυριά. Τα φρέσκα τυριά είχαν παρόμοιες μικροχλωρίδες σε ότι αφορά τα *Enterobacteriaceae*, coliforms, σταφυλοκόκκους και λακτοκόκκους, ενώ στα ώριμα διαπιστώθηκε μείωση για όλες της μικροβιακές ομάδες των τυριών και των δύο περιοχών με εξαίρεση τις ζύμες στη Γραβιέρα Κρήτης, οι οποίες αυξήθηκαν κατά 1.27 log₁₀cfu/g. Στα ώριμα τυριά επικρατούσαν τα γαλακτικά βακτήρια (LAB), ενώ τα *Enterobacteriaceae* και coliforms βρέθηκαν σε χαμηλά επίπεδα. Απομονώθηκαν συνολικά 105 στελέχη LAB από φρέσκα τυριά, τα οποία ταυτοποιήθηκαν με την SDS-PAGE των πρωτεϊνών του όλου κυττάρου. Στα τυριά από τη Νάξο επικρατούσαν οι εντερόκοκκοι (*Ent. faecalis* και *Ent. faecium*) και οι υποχρεωτικά ετεροζυμωτικοί λακτοβάκιλλοι (*Lb. brevis* και *Lb. fermentum*) ενώ στα τυριά της Κρήτης κυριαρχούσαν οι λακτόκοκκοι (*Lc. lactis* subsp. *lactis*) και τα *Leuconostoc* αποτελούσαν σημαντικό τμήμα των NSLAB. Τα προφίλ του συνόλου των μικροβιακών πληθυσμών (PCR-DGGE) έδειξαν χαρακτηριστικές διαφοροποιήσεις τόσο μεταξύ των δύο τύπων Γραβιέρας όσο και μεταξύ των φρέσκων και ώριμων τυριών. Τα προφίλ των γαλακτικών βακτηρίων ήταν σχεδόν όμοια μεταξύ τους σε ότι αφορά τις ζώνες που ιχνηλατήθηκαν αλλά όχι και στην έντασή τους (διαφορετικοί πληθυσμοί). Οι απομονώσεις από Νάξο είχαν μικρότερη ικανότητα οξίνισης από εκείνες της Κρήτης και συνέβαλαν πιθανά στο υψηλότερο pH της Γραβιέρας Νάξου. Σε ότι αφορά την ικανότητα πρωτεόλυσης, η πλειονότητα των απομονώσεων από τα τυριά Νάξου παρουσίασε εντονότερη πρωτεολυτική δράση από εκείνες της Κρήτης οι οποίες όμως έδειξαν καλύτερη ικανότητα αναχαίτισης σε παθογόνους και αλλοιογόνους μικροοργανισμούς. Τόσο η β-CN όσο και η αs-CN των τυριών της Κρήτης, υδρολύονταν σε σημαντικά μεγαλύτερο ποσοστό απ' ότι της Νάξου και το ποσό των αμινοξέων ήταν αισθητά μεγαλύτερο.

Λέξεις κλειδιά: Γραβιέρα Κρήτης - Νάξου, LAB, PCR-DGGE

Graviera Kritis and Graviera Naxou: differences on microbiological and physicochemical characteristics

Bozoudi D.,¹ Pavlidou S.,¹ Torriani S.,² Litopoulou-Tzanetaki E.¹

¹ *Laboratory of Food Microbiology and Hygiene, Faculty of Agriculture, Aristotle University of Thessaloniki, 54124, Thessaloniki*

² *Department of Biotechnology, University of Verona, Verona, Strada le Grazie 15, 37134 Verona*

The purpose of the present investigation was to study the microbiological and physicochemical characteristics in three traditional (from raw milk) manufactures of Graviera cheese made in each Naxos and Kriti, respectively, in order to differentiate the two types of cheese. The numbers of *Enterobacteriaceae*, coliforms, *staphylococci* and *lactococci* present in fresh cheeses were reduced in mature, except for yeasts in cheese of Kriti. Lactic acid bacteria (LAB) predominated in mature cheeses and *Enterobacteriaceae* and coliforms were measured at low levels. Totally, 105 LAB isolates were obtained from fresh cheeses and were then identified by the SDS-PAGE of whole-cell proteins. In Graviera Naxou *enterococci* and obligately heterofermentative *lactobacilli* predominated, while in Kriti's cheese *lactococci* predominated and *leuconostocs* constituted a significant part. The profile of microflora by PCR-DGGE suggested differences in the cheeses of the two areas as well as between fresh and mature cheeses. The profiles of LAB were similar but not their populations. LAB isolates from Naxos's cheese were weaker acidifiers than Kriti's, exhibited higher proteolytic activity, but they were less antagonistic against undesirable bacteria than Kriti's. Graviera Kritis had a lower mean pH. In addition, degradation of both β -CN and α s-CN and aminoacid accumulation in the cheese were stronger in Graviera Kriti's.

Επίδραση αναλγητικών φαρμάκων στην αύξηση του βακτηριοπλαγκτού λιμναίων και θαλάσσιων οικοσυστημάτων

Ματσίγγκο Χ.Σ.¹, Χριστοφή Α. ², Σούτζιου Χ.1, Κορμάς Κ.Α.2, Καραγιάννη Ή.1

¹ Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών & Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, 451 10, Ιωάννινα

² Τμήμα Ιχθυολογίας & Υδάτινου Περιβάλλοντος, Γεωπονική Σχολή, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, 383 34 Ν. Ιωνία Βόλος

Στην παρούσα εργασία εξετάστηκε η αύξηση φυσικών πληθυσμών υδρόβιων ετερότροφων βακτηρίων παρουσία δύο αναλγητικών φαρμάκων ευρείας χρήσης, των acetaminophen και acetylsalicylic acid. Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκαν πειράματα σε μικρόκοσμους με νερό από τη Λίμνη Παμβώτιδα (Ιωάννινα) και τον Παγασητικό Κόλπο (Βόλος) και μελετήθηκε η βακτηριακή αύξηση με τις μεθόδους της μικροσκοπίας επιφθορισμού και/ή της φωτομέτρησης. Βρέθηκε ότι acetaminophen ενισχύει την αύξηση του βακτηριοπλαγκτού της Λίμνης Παμβώτιδας, ενώ αναστέλει την αύξηση του βακτηριοπλαγκτού του Παγασητικού Κόλπου. Παράλληλα, μέτρηση του ρυθμού της βακτηριακής αναπνοής σε μικρόκοσμους της Λίμνης Παμβώτιδας έδειξε αύξηση αυτού παρουσία acetaminophen συγκριτικά με το δείγμα ελέγχου (χωρίς φάρμακο). Αντιθέτως, το acetylsalicylic acid μετά από μια λανθάνουσα φάση και στα δύο διαφορετικά περιβάλλοντα, ενισχύει την βακτηριακή αύξηση στους θαλάσσιους πληθυσμούς και αναστέλει την αύξηση στους πληθυσμούς της λίμνης. Οι ρυθμοί αύξησης στο θαλασσινό νερό ήταν 0,07h⁻¹ για το δείγμα ελέγχου, 0,10h⁻¹ παρουσία acetylsalicylic acid και 0,06h⁻¹ παρουσία acetaminophen. Οι αντίστοιχοι ρυθμοί αύξησης στη λίμνη ήταν 0,09h⁻¹, 0,07h⁻¹ και 0,17h⁻¹. Οι μέγιστες αφθονίες στη θάλασσα εμφανίστηκαν στο δείγμα ελέγχου και το acetylsalicylic acid, ενώ στη λίμνη στο δείγμα ελέγχου και το acetaminophen. Και στα δύο διαφορετικά περιβάλλοντα τα μέγιστα ήταν της τάξης του 10⁶ cells/ml. Τα αποτελέσματα έδειξαν μια διαφορετική απόκριση του βακτηριοπλαγκτού λιμναίων και θαλάσσιων οικοσυστημάτων στην παρουσία διαφορετικών φαρμακευτικών ουσιών.

Λέξεις κλειδιά: Βακτηριοπλαγκτό, Βακτηριακή Αύξηση, Φαρμακευτικές ουσίες

Impact of analgesic drugs on the growth of freshwater and marine bacterioplankton

Matsingo H.S.¹, Xristofi A.², Soutziou Ch.¹, Kormas K. Ar.², Karayanni H.¹

¹ *Dept of Biological Applications & Technology, University of Ioannina ,45 110 Ioannina, Greece*

² *Dept of Ichthyology & Aquatic Environment, Faculty of Agricultural Sciences, University of Thessaly, 383 34 N. Ionia Volos, Greece*

In this study, we examined the growth of natural populations of aquatic heterotrophic bacteria in the presence of two widely used analgesic drugs, acetaminophen and acetylsalicylic acid. For this, microcosm experiments using water samples from Lake Pamvotis (Ioannina, GR) and Pagasitikos Gulf (Volos, GR) were performed and bacterial growth was studied by epifluorescence microscopy and/or photometry. We found that acetaminophen enhances freshwater bacterioplankton growth but inhibits the growth of marine bacteria. In addition, bacterial respiration experiments in Lake Pamvotis microcosms showed an increase in respiration rates in the presence of acetaminophen compared to the control (without pharmaceuticals). On the contrary, acetylsalicylic acid enhances the growth of marine populations and inhibits the growth of freshwater bacteria. A lag phase was observed in the presence of acetylsalicylic acid for both freshwater and marine populations. Growth rates of marine bacteria were 0,07h⁻¹ in the control, 0,10h⁻¹ in the presence of acetylsalicylic acid and 0,06h⁻¹ in the presence of acetaminophen. Growth rates in lake water were 0,09h⁻¹, 0,07h⁻¹ and 0,17h⁻¹ respectively. For marine bacteria, maximum abundance was measured in 'control' and 'acetylsalicylic acid' microcosms, while for freshwater bacteria in 'control' and 'acetaminophen'. In both environments, maxima were of the order of 10⁶cells/ml. Our results showed a different response of freshwater and marine bacterioplankton in the presence of different pharmaceuticals in the environment.

Keywords: Bacterioplankton, Bacterial Growth, Pharmaceuticals

Η ανακάλυψη της Μασεδοβισίνης που παράγεται από το *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198 υποδεικνύει την ύπαρξη μίας νέας υποομάδας λαντιβιοτικών μέσα στην ομάδα της Λακτισίνης 481

Γεωργαλάκη Μ.¹, Παπαδημητρίου Κ.¹, Αναστασίου Ρ.¹, Pot Β.^{2,3,4,5}, Van Driessche Ζ.⁶, Devreese Β.⁶ και Τσακαλίδου Ε.¹

¹Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, Εργαστήριο Γαλακτοκομίας, Αθήνα, Ελλάδα

²Institut Pasteur de Lille, Center for Infection and Immunity of Lille (CHIL), Lille, France

³Inserm U1019, Lille, France

⁴CNRS UMR8204, Lille, France

⁵Universite Lille de Nord France, Lille, France

⁶Ghent University, Laboratory for Protein Biochemistry and Biomolecular Engineering, Ghent, Belgium

Ο *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198 βρέθηκε να παράγει - επιπλέον της Μασεδοσίνης - ένα δεύτερο λαντιβιοτικό που ονομάστηκε Μασεδοβισίνη. Η Μασεδοβισίνη καθαρίστηκε και με ανάλυση φασματομετρία μάζας προσδιορίστηκε ένα πεπτίδιο 3.4 kDa. Η μερική ανάλυση της αλληλουχίας του αμινοτελικού άκρου και η διαδοχική φασματομετρία μάζας αποκάλυψαν ότι η Μασεδοβισίνη είναι ταυτόσημη με τη Μποβισίνη HJ50 και τη Θερμοφιλίνη 1277 που παράγονται από τους *Streptococcus bovis* και *Streptococcus thermophilus*, αντίστοιχα. Η Μασεδοβισίνη αναστέλλει ένα ευρύ φάσμα οξυγαλακτικών βακτηρίων, αλλοιωγόνων μικροοργανισμών (π.χ. *Clostridium* spp.) και στοματικών στρεπτόκοκκων. Στη συνέχεια προσδιορίσαμε το ρεγουλόνιο που είναι υπεύθυνο για τη βιοσύνθεση της Μασεδοβισίνης. Παρόλο που τα ρεγουλόνια της Μασεδοβισίνης, της Θερμοφιλίνης 1277 και της Μποβισίνης HJ50 ήταν σχεδόν ταυτόσημα σε επίπεδο νουκλεοτιδίων, παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στο σχολιασμό τους. Παρόμοια μόρια με τη Μποβισίνη HJ50 βρέθηκαν να κωδικοποιούνται από τους *Streptococcus suis* SC84 και D12, τον *Enterococcus columbae* PLCH2, το *Clostridium perfringens* JGS1721 και διάφορα είδη που ανήκουν στο γένος *Bacillus*. Όλα αυτά τα λαντιβιοτικά παρουσίασαν ένα σημαντικό ποσοστό συντηρημένων αμινοξέων, τα οποία μπορεί να παίζουν ρόλο στη βιοσύνθεση και την ενεργότητα των μορίων, συμπεριλαμβανομένων των χαρακτηριστικών καταλοίπων Thr και Cys που απαιτούνται για το σχηματισμό δύο θειοαιθερικών δεσμών (Thr8 και Cys13, Cys32 και Thr10) και ενός δισουλφιδικού δεσμού (Cys21 και Cys29). Τα ευρήματά μας υποστηρίζουν ότι το ώριμο πεπτίδιο παρουσιάζει ένα γραμμικό αμινοτελικό άκρο και ένα σφαιρικό καρβοξυτελικό άκρο, παρόμοια με εκείνα της Λακτισίνης 481. [στόσο, ο επιπλέον δισουλφιδικός δεσμός είναι μοναδικός για τη Μασεδοβισίνη και τα συγγενικά της πεπτίδια που σχηματίζουν μια ξεχωριστή υποομάδα μέσα στην ομάδα της Λακτισίνης 481 εξαιτίας της ιδιότητας αυτής. Τέλος, η φυλογενετική ανάλυση έδειξε τη διασπορά της Μασεδοβισίνης και των παρόμοιων με αυτή μορίων μέσω οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων.

Λέξεις κλειδιά: Λαντιβιοτικά, Μασεδοβισίνη, *Streptococcus macedonicus*

The discovery of Macedovicin produced by *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198 points towards the existence of a novel subgroup of lantibiotics within the lactacin 481 group

Georgalaki M.¹, Papadimitriou K.¹, Anastasiou R.¹, Pot B.^{2,3,4,5}, Van Driessche G.⁶, Devreese B.⁶ and Tsakalidou E.¹

¹*Agricultural University of Athens, Department of Food Science and Technology, Laboratory of Dairy Research, Athens, Greece*

²*Institut Pasteur de Lille, Center for Infection and Immunity of Lille (CIIL), Lille, France*

³*Inserm U1019, Lille, France*

⁴*CNRS UMR8204, Lille, France*

⁵*Universite Lille de Nord France, Lille, France*

⁶*Ghent University, Laboratory for Protein Biochemistry and Biomolecular Engineering, Ghent, Belgium*

Streptococcus macedonicus ACA-DC 198 was found to produce a second lantibiotic named macedovicin in addition to macedocin. Macedovicin was purified to homogeneity and mass spectrometric analysis identified a peptide of 3.4 kDa. Partial N-terminal sequence analysis and tandem mass spectrometry revealed that macedovicin was identical to bovicin HJ50 and thermophilin 1277 produced by *Streptococcus bovis* and *Streptococcus thermophilus*, respectively. Macedovicin inhibits a broad spectrum of lactic acid bacteria, several food spoilage species (e.g. *Clostridium* spp.) and oral streptococci. We determined the complete biosynthetic gene cluster of macedovicin. Even though the gene clusters of macedovicin, thermophilin 1277 and bovicin HJ50 were almost identical at the nucleotide level, there were important differences in their predicted genes and proteins. Bovicin HJ50-like lantibiotics were also found to be encoded by *Streptococcus suis* strains SC84 and D12, *Enterococcus columbae* PLCH2, *Clostridium perfringens* JGS1721 and several *Bacillus* strains. All these lantibiotics contained a number of conserved amino acids that may be important for their biosynthesis and activity, including characteristic Thr and Cys residues necessary for the generation of two thioether bridges (Thr8 and Cys13, Thr10 and Cys32) and a disulfide bond (Cys21 and Cys29). Our findings support that the mature peptide has a linear N-terminus and a globular C-terminus, similar to that of the lactacin 481 type of lantibiotics. However, the additional disulfide bond is unique for the macedovicin and its related peptides, forming a separate subgroup within the lactacin 481 group. Furthermore, phylogenetic analysis supported the dispersion of the macedovicin-like molecules by horizontal gene transfer.

Συγκριτική ανάλυση του pSMA198 του *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198, του πρώτου πλασμιδίου που βρέθηκε στους στρεπτόκοκκους και ανήκει στην οικογένεια των ρεπλικονίων pCI305/pWV02 που αντιγράφονται μέσω του μηχανισμού θ

Πλάκας Θ.1,2, Αναστασίου Ρ.1, Γεωργαλάκη Μ.1, Αστερή Ι.Α.1, Ferreira S.3, Supply Ρ.3,4, Παπανδρέου Ν.2, Ροτ Β.4, Τσακαλίδου Ε.1 και Παπαδημητρίου Κ.1

1Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, Εργαστήριο Γαλακτοκομίας, Αθήνα, Ελλάδα

2Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Βιολογίας, Τομέας Κυτταρικής Βιολογίας και Βιοφυσικής, Αθήνα, Ελλάδα

3Genoscreen, Genomic Platform and R&D, Campus de l'Institut Pasteur, Lille, France,

4Institut Pasteur de Lille, Center for Infection and Immunity of Lille (CHIL), Lille, France

Στην παρούσα εργασία αναλύουμε το pSMA198, το πρώτο πλασμίδιο που απομονώθηκε από το *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198, και διερευνούμε την πιθανή προέλευσή του. Με βάση το προφίλ της ομοιότητας της πρωτεΐνης που είναι υπεύθυνη για την έναρξη αντιγραφής του πλασμιδίου (Rep) και του σημείου έναρξης της αντιγραφής (*ori*), το pSMA198 βρέθηκε να είναι ένα νέο μέλος της οικογένειας των πλασμιδίων pCI305/pWV02. Η οικογένεια pCI305/pWV02 αποτελείται από πλασμίδια με περιορισμένο εύρος ξενιστών που βρίσκονται κυρίως σε είδη του γένους *Lactococcus*. Η συγκριτική ανάλυση του pSMA198 αποκάλυψε υψηλό βαθμό ομοιότητας με το πλασμίδιο pSK11b ως προς το σκελετό αντιγραφής, το pVF22 ως προς το σκελετό κινητοποίησης και το pIL5 ως προς το μεγαλύτερο μήκος του. Τα τρία αυτά πλασμίδια έχουν απομονωθεί από στελέχη του *Lactococcus lactis* που προέρχονται από το γάλα ή προϊόντά του. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι ο *S. macedonicus* απέκτησε το pSMA198 από τον *L. lactis* στο περιβάλλον των γαλακτοκομικών προϊόντων. Τόσο το pSMA198 όσο και το χρωμόσωμα του *S. macedonicus* εμφανίζουν ένα μεγάλο ποσοστό ψευδογονιδίων, υποστηρίζοντας την κοινή τους εξέλιξη μέσω διαδικασιών αποσύνθεσης γονιδίων. Επιπλέον, βρέθηκαν περιοχές στο χρωμόσωμα που μπορεί να έχουν προέλθει από το pSMA198, ενισχύοντας την πιθανότητα μιας μακράς συνύπαρξης των δύο ρεπλικονίων. Τέλος, το pSMA198 βρέθηκε σε στελέχη του *S. macedonicus* που με την ηλεκτροφόρηση παλλόμενου πεδίου διαχωρίζονται σε πέντε διαφορετικούς γονότυπους, δείχνοντας ότι η απόκτηση του pSMA198 δεν είναι πρόσφατη. Τα ευρήματα της ανάλυσης του pSMA198 υποδηλώνουν την εξοικείωση του *S. Macedonicus* ACA-DC 198 στο περιβάλλον των γαλακτοκομικών προϊόντων.

Λέξεις κλειδιά: Πλασμίδιο, pSMA198, *Streptococcus macedonicus*

Comparative analysis of pSMA198 found in *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198, the first streptococcal plasmid of the pCI305/pWV02 family of theta-replicating replicons

Plakas T.^{1,2}, Anastasiou R.¹, Georgalaki M.¹, Asteri I.A.¹, Ferreira S.³, Supply P.^{3,4}, Papandreou N.C.², Pot B.⁴, Tsakalidou E.¹ and Papadimitriou K.¹

¹*Agricultural University of Athens, Department of Food Science and Technology, Laboratory of Dairy Research, Athens, Greece*

²*University of Athens, Faculty of Biology, Department of Cell Biology and Biophysics, Athens, Greece*

³*Genoscreen, Genomic Platform and R&D, Campus de l'Institut Pasteur, Lille, France,*

⁴*Institut Pasteur de Lille, Center for Infection and Immunity of Lille (CHIL), Lille, France*

Here we analyze pSMA198, the first plasmid isolated from *Streptococcus macedonicus* ACADC 198, and we attempt to clarify the route of its original acquisition. Based on the similarity profiles of the plasmid's replication initiation protein (Rep) and its origin of replication (*ori*), pSMA198 was found to be a novel member of the pCI305/pWV02 family of theta-replicating plasmids. The pCI305/pWV02 family consists of plasmids of narrow host range that are mainly found in lactococcal species. Comparative analysis of the pSMA198 revealed a high degree of similarity with plasmids pSK11b, pVF22 and pIL5 over its replication backbone, its mobilization backbone and most of its length, respectively. All these three plasmids have been isolated from *Lactococcus lactis* strains deriving from milk or its products supporting that *S. macedonicus* acquired pSMA198 from the latter species and that this acquisition took place in the dairy environment. Both pSMA198 and the chromosome of *S. macedonicus* exhibit a high degree of pseudogenes, indicating that they must have evolved under the same gene decay processes. Furthermore, we were able to determine chromosomal regions that may have originated from pSMA198, also supporting a long co-existence of the two replicons. In addition, pSMA198 is carried by *S. macedonicus* strains segregated in five different genotypes by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), showing that pSMA198's acquisition is not a recent event. We propose that our overall analysis of pSMA198 points towards the habituation of *S. macedonicus* ACA-DC 198 to the dairy environment.

Η αλληλουχία του γονιδιώματος του *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198 που απομονώθηκε από το περιβάλλον του γάλακτος

Παπαδημητρίου Κ.¹, Παπανδρέου Ν.², Ferreira S.³, Supply P.^{3,4}, Pot B.⁴, Τσακαλίδου Ε.¹

¹Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, Εργαστήριο Γαλακτοκομίας, Αθήνα, Ελλάδα

²Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Βιολογίας, Τομέας Κυτταρικής Βιολογίας και Βιοφυσικής, Αθήνα, Ελλάδα

³Genoscreen, Genomic Platform and R&D, Campus de l'Institut Pasteur, Lille, France,

⁴Institut Pasteur de Lille, Center for Infection and Immunity of Lille (CIIL), Lille, France

Μεταξύ των στρεπτόκοκκων, μόνο ο *Streptococcus thermophilus* θεωρείται μη παθογόνος λόγω της προσαρμογής του στο περιβάλλον του γάλακτος. Ο *Streptococcus macedonicus* είναι επίσης ένα ενδιαφέρον είδος στρεπτόκοκκου αφού η πιο συχνή πηγή απομόνωσής του είναι τα τρόφιμα ζύμωσης, κυρίως γαλακτοκομικής προέλευσης. Η αλληλούχηση του γονιδιώματος του *S. macedonicus* ACA-DC 198 πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας ένα συνδυασμό δύο μεθόδων αλληλούχησης (454 GS-FLX pyrosequencing και HiSeq2000 Illumina). Κατά την υβριδική συναρμολόγηση των δεδομένων (>200x επικάλυψη) προέκυψαν ένα συνεχόμενο χρωμοσωμικό ικρίωμα 2,130,034 bp και ένα πλασμίδιο 12,728 bp. Η συναρμολόγηση του γονιδιώματος του *S. macedonicus* επιβεβαιώθηκε μέσω ενός οπτικού χάρτη με το περιοριστικό ένζυμο NheI. Ο σχολιασμός των αλληλουχιών πραγματοποιήθηκε με τα λογισμικά BaSys και RAST και ακόλουθησε μη αυτοματοποιημένη επιμέλεια με το λογισμικό Kodon. Οι τελικές διορθώσεις έγιναν μετά από την εκτίμηση της ποιότητας του σχολιασμού που προηγήθηκε χρησιμοποιώντας το GenePRIMP. Στο χρωμόσωμα βρέθηκαν 2,192 γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, εκ των οποίων τα 192 χαρακτηρίστηκαν ως πιθανά ψευδογονίδια, υποδεικνύοντας μία συνεχιζόμενη διαδικασία αποσύνθεσης του γονιδιώματος. Αυτή η υπόθεση υποστηρίζεται επίσης από το γεγονός ότι το μέγεθος του γονιδιώματος του *S. macedonicus* είναι μικρότερο κατά περίπου 220 kb από το αντίστοιχο μέγεθος του *Streptococcus gallolyticus*, παρά το υψηλό ποσοστό γονιδιακής συνταινίας μεταξύ των δύο ειδών. Μια τέτοια μειωτική εξελικτική πορεία είναι συχνή στα οξυγαλακτικά βακτήρια τα οποία έχουν προσαρμοστεί στο περιβάλλον των τροφίμων. Η παραπάνω διαδικασία στην περίπτωση του *S. thermophilus* συνοδεύεται επίσης και από απώλεια στοιχείων παθογένειας. Με την υπολογιστική μας ανάλυση προσπαθούμε να ανακαλύψουμε εάν ο *S. macedonicus* έχει χαρακτηριστικά τα οποία μπορούν να υποστηρίξουν την προσαρμογή του στο περιβάλλον του γάλακτος σε επίπεδο γονιδιώματος.

Λέξεις κλειδιά: Γονιδίωμα, *Streptococcus macedonicus*, γάλα

Complete genome sequence of the dairy isolate *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198

Papadimitriou K.¹, Papandreou N.C.², Ferreira S.³, Supply P.^{3,4}, Pot B.⁴ and Tsakalidou E.¹

¹*Agricultural University of Athens, Department of Food Science and Technology, Laboratory of Dairy Research, Athens, Greece*

²*University of Athens, Faculty of Biology, Department of Cell Biology and Biophysics, Athens, Greece*

³*Genoscreen, Genomic Platform and R&D, Campus de l'Institut Pasteur, Lille, France,*

⁴*Institut Pasteur de Lille, Center for Infection and Immunity of Lille (CIIL), Lille, France*

Within the *Streptococcus* genus, only *Streptococcus thermophilus* is considered to be nonpathogenic due to its adaptation to the milk environment. *Streptococcus macedonicus* is also an intriguing streptococcal species since its most frequent source of isolation to date is fermented foods, mainly of dairy origin. Sequencing of *S. macedonicus* ACA-DC 198 genome was performed using a combination of 454 GS-FLX pyrosequencing and HiSeq2000 Illumina sequencing. The hybrid assembly between 454 and HiSeq2000 data (>200x coverage) resulted in one continuous genomic scaffold of 2,130,034 bp and a plasmid of 2,728 bp. The genome assembly was validated against a NheI optical map of the *S. macedonicus* genome. Sequences were annotated with the BaSys and the RAST pipelines and manually curated using Kodon. Final corrections were made based on the quality assessment of the annotation using GenePRIMP. We found 2,192 protein-coding genes on the chromosome, 192 of which were identified as potential pseudogenes, indicating an ongoing genome decay process. This hypothesis is also supported by the approximately 220 kb smaller genome size of *S. macedonicus* compared to the *S. gallolyticus* genomes, despite the high level of gene synteny between the two species. Such a reductive evolutionary process is common for lactic acid bacteria domesticated to the food environment, which in the case of *S. thermophilus* was also accompanied by the loss of pathogenicity traits. With our *in silico* analysis we attempt to investigate whether *S. macedonicus* shows traits that would support its adaptation to the dairy environment at the genomic level.

Συγκριτική γονιδιωματική του *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198 με συγγενικά του είδη που ανήκουν στο σύμπλεγμα *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus*

Παπαδημητρίου Κ.1, Αναστασίου Ρ.1, Γεωργαλάκη Μ.1, Ferreira S.2, Supply P.2,3, Παπανδρέου Ν.4, Pot Β.3 και Τσακαλίδου Ε.1

1Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, Εργαστήριο Γαλακτοκομίας, Αθήνα, Ελλάδα

2Genoscreen, Genomic Platform and R&D, Campus de l'Institut Pasteur, Lille, France,

3Institut Pasteur de Lille, Center for Infection and Immunity of Lille (CIIL), Lille, France

4Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Βιολογίας, Τομέας Κυτταρικής Βιολογίας και Βιοφυσικής, Αθήνα, Ελλάδα

Εκτός από το *Streptococcus thermophilus* υπάρχουν και άλλοι στρεπτόκοκκοι που αναπτύσσονται στο γάλα και ανήκουν στο σύμπλεγμα *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* (SBSEC). Ο *Streptococcus macedonicus*, ο οποίος είναι μέλος του SBSEC έχει προταθεί ότι είναι προσαρμοσμένος στο γάλα και μη παθογόνος. Παρ'όλα αυτά, ο *S.macedonicus* έχει φυλογενετική συγγένεια με το *Streptococcus gallolyticus* και το *Streptococcus pasteurianus* (γνωστών ως *S. bovis* βιότυπος I και II.2, αντίστοιχα), οι οποίοι θεωρούνται παθογόνοι και έχουν συνδεθεί με περιπτώσεις ενδοκαρδίτιδας και καρκίνου του εντέρου στον άνθρωπο. Συγκριτική ανάλυση του γονιδιώματος του *S. macedonicus* με τα πλήρη γονιδιώματα στρεπτόκοκκων συγγενικών σε αυτόν (συμπεριλαμβανομένου του *Streptococcus infantarius*, ο οποίος έχει επίσης απομονωθεί από γαλακτοκομικά προϊόντα) έδειξε ότι ένα σημαντικό μέρος του γονιδιώματος και η οργάνωσή του είναι συντηρημένα. Λείξαμε ότι συγκρινόμενος με τον *S. gallolyticus* ο *S. macedonicus* χαρακτηρίζεται από μειωμένη ικανότητα επιβίωσης στην γαστρεντερική οδό των μηρυκαστικών, αφού απουσιάζουν από το γονιδιώμα του σημαντικά γονίδια που εμπλέκονται στο μεταβολισμό σύνθετων υδατανθράκων φυτικής προέλευσης, καθώς και γονίδια που σχετίζονται με την αποτοξίνωση του περιβάλλοντος αυτού. Ο *S. macedonicus* παρουσιάζει έλλειψη και σε μερικά στοιχεία παθογένειας που εντοπίζονται στον *S. gallolyticus*. Για παράδειγμα, από τα τρία οπερόνια (*pil1*, *pil2*, *pil3*) που σχετίζονται με την προσκόλληση του *S. gallolyticus* στην εξωκυττάρια μήτρα, ο *S. macedonicus* φέρει μόνο το ένα (δηλαδή το *pil3*). Γεγονότα απόκτησης γονιδίων είναι εμφανή στο γονιδίωμα του *S. macedonicus*, προερχόμενα κάποιες φορές από βακτήρια που απαντώνται στο γάλα. Χαρακτηριστική είναι η περίπτωση απόκτησης του πλασμιδίου των λακτόκοκκων pSMA198 από τον *S. macedonicus*. Η λειτουργική ανάλυση του γονιδιώματος του *S. macedonicus* είναι απαραίτητη για την περαιτέρω αξιολόγησή του τόσο σε επίπεδο παθογένειας όσο και τεχνολογίας.

Λέξεις κλειδιά: Συγκριτική γονιδιωματική, *Streptococcus macedonicus*, παθογένεια, γάλα

Comparative genomics of *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198 against related species within the *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* complex

Papadimitriou K.¹, Anastasiou R.¹, Georgalaki M.¹, Ferreira S.³, Supply P.^{3,4}, Papandreou N.C.², Pot B.⁴ and Tsakalidou E.¹

¹*Agricultural University of Athens, Department of Food Science and Technology, Laboratory of Dairy Research, Athens, Greece*

²*University of Athens, Faculty of Biology, Department of Cell Biology and Biophysics, Athens, Greece*

³*Genoscreen, Genomic Platform and R&D, Campus de l'Institut Pasteur, Lille, France,*

⁴*Institut Pasteur de Lille, Center for Infection and Immunity of Lille (CHIL), Lille, France*

Apart from *Streptococcus thermophilus* other streptococci that can be found growing in milk belong to the *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* complex (SBSEC). Interestingly, *Streptococcus macedonicus*, which is a member of SBSEC, has been suggested to be adapted to milk and to be nonpathogenic. However, the species is phylogenetically related to *Streptococcus gallolyticus* and *Streptococcus pasteurianus* (formerly known as *S. bovis* biotypes I and II.², respectively), which in turn are considered pathogenic, since they have been implicated in endocarditis and colon cancer in humans. Comparative analysis of the *S. macedonicus* genome with the complete genomes of its related streptococci (including that of *S. infantarius*, which is also a dairy isolate) indicated that a significant portion of the genomic organization has been conserved overall. Following a gene presence/absence strategy, we determined that *S. macedonicus* shows a reduced capacity to reside in the gastrointestinal tract of ruminants when compared to *S. gallolyticus* since it misses important genes for metabolizing complex carbohydrates of plant origin and for detoxifying this environment. *S. macedonicus* also lacks several pathogenicity traits found in *S. gallolyticus*. For example from the three pilus gene clusters (*pil1*, *pil2*, *pil3*), which may mediate the binding of *S. gallolyticus* to the extracellular matrix, *S. macedonicus* carries only one (i.e. the *pil3*). Gene gain events are also evident in the *S. macedonicus* genome sometimes originating from dairy bacteria, like the acquisition of the lactococcal plasmid pSMA198. Functional analysis of the *S. macedonicus* genome is necessary to further assess its pathogenic and technological potential.

Προβιοτικά γαλακτικά βακτήρια ως εκκινητές στη ζύμωση των ελιών και η επιβίωσή τους κατά την αποθήκευση του τελικού προϊόντος

Αργύρη Α., Λύρα Ε., Νησιώτου Α., Πραματευντάκη Π., Τάσσου Χ.

Ελληνικός Γεωργικός Οργανισμός «ΔΗΜΗΤΡΑ», Ινστιτούτο Τεχνολογίας Γεωργικών Προϊόντων & Οίνου, Σοφ.Βενιζέλου 1, Λυκόβρυση, 141 23, Αττική

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η χρήση εν δυνάμει προβιοτικών γαλακτικών βακτηρίων ως εκκινητών στη ζύμωση των πράσινων ελιών. Χρησιμοποιήθηκαν τρία (3) στελέχη, τα *Lactobacillus pentosus* E97, *Lb. plantarum* E10 και *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* E93, που είχαν απομονωθεί από ελιές και χαρακτηρίστηκαν ως εν δυνάμει προβιοτικά με *in vitro* tests, καθώς και το γνωστό προβιοτικό στέλεχος *Lb. casei* Shirota. Πράσινες ελιές ποικιλίας Χαλκιδική ζυμώθηκαν με την Ισπανική μέθοδο σε άλμη 10% (w/v) αφού εμβολιάστηκαν ή όχι με τα παραπάνω στελέχη. Στη διάρκεια της ζύμωσης έγιναν μικροβιολογικές (γαλακτικά-LAB, ζύμες/μύκητες, *Enterobacteriaceae*), φυσικοχημικές (pH, οξύτητα, αλάτι, οργανικά οξέα) και οργανοληπτικές αναλύσεις. Μετά το τέλος της ζύμωσης οι ελιές αποθηκεύτηκαν σε μορφή πάστας, στους 20°C για 50 ημέρες. Η επιβίωση των εμβολιασμένων στελεχών ελέγχθηκε με Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE). Ο αρχικός πληθυσμός των γαλακτικών στις ελιές στην αρχή της ζύμωσης ήταν 5.7-5.8 log cfu/g. Για τον μάρτυρα (αυθόρμητη ζύμωση) ο αρχικός πληθυσμός ήταν στο όριο ανίχνευσης της μεθόδου. Στο τέλος της ζύμωσης ο πληθυσμός ήταν σε όλες τις περιπτώσεις πάνω από 6 log στη σάρκα των ελιών. Κατά την αποθήκευση της πάστας τα γαλακτικά αυξήθηκαν περίπου 2 log σε όλες τις περιπτώσεις, ξεπερνώντας τους 8 log cfu/g. Τα αποτελέσματα της PFGE έδειξαν ότι στη διάρκεια και στο τέλος της ζύμωσης, τα εμβολιασμένα στελέχη που μπορούσαν να επικρατήσουν καλύτερα σε σχέση με τη αυτόχθονη χλωρίδα ήταν τα στελέχη *Lb. pentosus* E97 και *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* E93. Αυτά τα στελέχη έδειξαν καλύτερη επιβίωση και στην επακόλουθη αποθήκευση του προϊόντος ως πάστα ελιάς.

Το πρόγραμμα χρηματοδοτείται από το 7ο Πρόγραμμα Πλαίσιο της Ευρωπαϊκής Ένωσης (FP7/2007-2013), πρόγραμμα n° 243471- PROBIOLIVES.

Λέξεις κλειδιά: Προβιοτικά, Γαλακτικά βακτήρια, επιτραπέζιες ελιές, ζύμωση

Probiotic lactic acid bacteria as starters in olive fermentation and their survival during storage

Argyri A., Lyra E., Nisiotou A., Pramateftaki P., Tassou C.

Hellenic Agricultural Organisation “DEMETER”, Institute of Technology of Agricultural Products & Wine, Sof. Venizelou 1, Lycovrissi, 141 23, Attiki

The purpose of this study was to evaluate the performance of lactic acid bacteria (LAB) with probiotic potential as starters in green olive fermentation. Three (3) LAB strains, namely *Lactobacillus pentosus* E97, *Lb. plantarum* E10 and *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* E93, isolated from olives and characterised in vitro as potential probiotics, along with the known probiotic strain *Lb. casei* Shirota were employed in the fermentations. Green table olives cv. Halkidiki were harvested, washed, debittered according to the Spanish style fermentation process, immersed in brines (10% (w/v) and inoculated or not with the aforementioned LAB strains. Microbiological (lactic acid bacteria-LAB, yeasts/ moulds, *Enterobacteriaceae*), physicochemical (pH, acidity, salt content, organic acid concentration) and sensory analyses were conducted throughout the fermentation process. After the end of the fermentation process the olives were ground to olive paste and stored at 20°C for 50 days. The survival and the variability of the LAB strains were assessed by Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE). The initial population of the inoculated strains of lactic acid bacteria was 5.7-5.8 log cfu/g in olive fruits. For control samples (spontaneous fermentation) the initial population of LAB was below or at the detection limit of the method. At the end of the fermentation the LAB population was >6 log cycles in olive flesh in all cases. During the storage of olive paste the LAB increased approximately 2 log cycles in all cases, exceeding the 8 log cfu/g. The PFGE results showed that during and at the end of the fermentation, the inoculated strains that could dominate better over the native microbiota were the strains *Lb. pentosus* E97 and *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* E93. These strains showed also better survival in the consequent storage of fermented olives as olive paste product.

This study was funded by the EU project PROBIOLIVES (FP7-SME-2008-2-243471).

Βιοαλλοίωση και in situ προστασία ξύλινων ναυαγίων στο Μεσογειακό θαλάσσιο οικοσύστημα: Το πρόγραμμα MERMAID

Πούρνου Α.

Τμήμα Συντήρησης Αρχαιοτήτων και Έργων Τέχνης, ΤΕΙ Αθήνας, Αγ. Σπυρίδωνος, Αιγάλεω, 12210, Αθήνα.

Η βιοαλλοίωση του ξύλου στο θαλάσσιο οικοσύστημα εμφανίζεται τόσο στο πελαγικό όσο και στο βενθικό περιβάλλον. Οι παθογόνοι οργανισμοί στη στήλη του νερού της Μεσόγειου ανήκουν κυρίως στα μαλάκια και στα αρθρόποδα και έχουν τη δυνατότητα σε μικρό χρονικό διάστημα να προκαλέσουν την ολική καταστροφή ενός ξύλινου ναυαγίου. Σε αντίθεση, το ξύλο που είναι θαμμένο στο ίζημα, αποδομείται κυρίως από μύκητες και βακτήρια, των οποίων η προσβολή εξελίσσεται συγκριτικά με πιο αργό ρυθμό και σε μικρότερο εύρος. Συχνά, λόγω κυρίως ανθρωπογενών παρεμβάσεων και σπανιότερα λόγω υδροδυναμικών φαινομένων, το ξύλο των ναυαγίων βρίσκεται εκτός ιζήματος και καθίσταται άμεσα ένα ευπρόσβλητο υπόστρωμα το οποίο εάν δεν επιστρέψει σύντομα στο βενθικό περιβάλλον ταφής που το διατήρησε ως σήμερα, κινδυνεύει να χαθεί ολοκληρωτικά.

Το πρόγραμμα MERMAID ερευνά δύο καινοτόμες μεθόδους για τη *in situ* προστασία ξύλινων ναυαγίων σε υψηλής βίο-επικινδυνότητας θαλάσσια περιβάλλοντα όπως αυτό της Ανατολικής Μεσογείου. Η πρώτη μέθοδος αφορά χαμηλής υδροδυναμικής περιοχές και εξετάζει τη χρήση γεωφασμάτων για την κάλυψη της ξυλείας, τα οποία λειτουργούν ως φυσικά φράγματα στην εποίκιση μαλακίων και αρθροπόδων αλλά και ως υποστρώματα ιζηματοπόθεσης. Η δεύτερη αφορά υψηλής υδροδυναμικής περιοχές και μελετά ένα καινοτόμο σύστημα εγκιβωτισμού του ξύλου μέσα στο ίζημα, το οποίο δημιουργεί ένα σταθερό ανοξικό περιβάλλον ταφής εξασφαλίζοντας τη μακροχρόνια διατήρησή του. Οι εν λόγω μέθοδοι εφαρμόζονται πιλοτικά σε δυο ξύλινα ναυάγια, στη Ζάκυνθο και στη Ρόδο, που χρονολογούνται στον 16ο και 13ο αιώνα αντίστοιχα.

Το πρόγραμμα MERMAID υλοποιείται από το Τμήμα Συντήρησης Αρχαιοτήτων και Έργων Τέχνης του ΤΕΙ Αθήνας σε συνεργασία με τα Ινστιτούτα " _κεανογραφίας" και "Θαλάσσιας Βιολογίας, Βιοτεχνολογίας και Υδατοκαλλιεργειών" του Ελληνικού Κέντρου Θαλασσίων Ερευνών και με το "Τμήμα Ιστορίας, Αρχαιολογίας και Ηιαχείρισης Πολιτισμικών Αγαθών" του Πανεπιστήμιου Πελοποννήσου, στο πλαίσιο ΘΑΛΗΣ και συγχρηματοδοτείται από εθνικούς πόρους και την Ευρωπαϊκή Ένωση.

Λέξεις κλειδιά: ξύλινα, ναυάγια, in situ

Biodeterioration and *in situ* protection of wooden shipwrecks in the Mediterranean marine ecosystem: The MERMAID project

Pournou A.

Department of Conservation of Antiquities and Works of Art, T.E.I. of Athens, Ag. Spyridonos, Aegaleo, 12210 Athens

Biodeterioration of wood in the marine environment may occur within both pelagic and benthic zone. Wood pathogens in the water column of the Mediterranean Sea belong mainly to arthropods and molluscs which are capable for the total breakdown of wood in a relatively short period of time. In contrast, under more disoxic conditions such as in sediments, wood is primarily degraded by fungi and bacteria; however this decay progresses with a slower rate and to a lesser extent.

Buried wooden shipwrecks are often exposed due to sediment movement which is commonly caused by human interventions and occasionally by natural hydrodynamic phenomena. Wood above the sediment becomes instantly a vulnerable substrate and if it doesn't return to its predisturbance burial conditions that preserved it up to the present, it can be lost completely. The MERMAID project study two innovative methods for the *in situ* protection of wooden shipwrecks exposed in high biodeterioration risk environments, such as the Eastern Mediterranean. The first method involves low energy marine areas and examines the efficacy of geotextiles to act as physical barriers against wood borer's colonization and as a sediment entrapment substrate. The second one regards high energy areas and investigates the development of an encasement system that will create a stable anaerobic micro environment ensuring its long term preservation. Methods will be applied on two wooden shipwrecks found in Zakynthos and Rhodes islands which are dated to the 16th and 13th century respectively.

This project is implemented under the program THALES, by the T.E.I. of Athens, Dept. of "Conservation of Antiquities and Works of Art", in collaboration with HCMR Institutes of "Oceanography" and "Marine Biology, Biotechnology and Aquaculture" and the "History, Archaeology and Cultural Resources Management" Dept. of the University of Peloponnese, and is co-funded by Greek national resources and the European Union.

Η δομή των μικροβιακών κοινοτήτων στην οξεοποιητική βαθμίδα συστήματος αναερόβιας χώνευσης υγρών αποβλήτων τυροκομικής μονάδας

Ντούγιας Σ., Σουλτάνη Δ. και Μελίδης Π.

Εργαστήριο Διαχείρισης και Τεχνολογίας Υγρών Αποβλήτων, Τμήμα Μηχανικών Περιβάλλοντος, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης, Βασ. Σοφίας 12, 67100 Ξάνθη (email: sntougia@env.duth.gr)

Η βελτιστοποίηση των οξεοποιητικών διεργασιών που επιτελούνται κατά την αναερόβια επεξεργασία υγρών αποβλήτων γαλακτοβιομηχανίας συμβάλλει τόσο στην αποτελεσματική μείωση του υψηλού οργανικού τους φορτίου όσο και στην ενεργειακή αξιοποίηση τους. Στο πλαίσιο αυτό, πραγματοποιήθηκε διερεύνηση της δομής των μικροβιακών κοινοτήτων με καλλιεργητικές και μη-καλλιεργητικές τεχνικές, αποκαλύπτοντας τόσο τις κυρίαρχες μικροβιακές ομάδες όσο και τον πληθυσμό γαλακτικών βακτηρίων στο μεικτό υγρό οξεοποιητικής βαθμίδας διβάθμιου συστήματος αναερόβιας χώνευσης υγρών αποβλήτων τυροκομικής μονάδας. Κατά την απομόνωση στελεχών μικροοργανισμών σε θρεπτικό υπόστρωμα MRS, διαπιστώθηκε, μετά από μικροσκοπική παρατήρηση και αλληλούχιση του γονιδίου 16S rRNA, ότι 5 στελέχη, σε πλήθος 45 απομονώσεων, ήταν ζύμες, ενώ τα υπόλοιπα ήταν *Lactobacillus* και *Bifidobacteria* spp. Μετά από κατάταξη των απομονωμένων στελεχών σε λειτουργικές ταξινομικές μονάδες, βρέθηκε ότι τα μέλη της μεγαλύτερης λειτουργικής ταξινομικής μονάδας συσχετίζονταν φυλογενετικά με το είδος *Lactobacillus hilgardii*. Τα 5 στελέχη ζυμών παρουσίασαν υψηλή φυλογενετική συσχέτιση με τα είδη *Kazachstania unispora* και *Dekkera anomala*. Διερεύνηση του ζυμωτικού μεταβολισμού απέδειξε ότι τα στελέχη ζυμών προκαλούσαν αλκοολική ζύμωση της γλυκόζης αλλά όχι της λακτόζης, ενώ τα στελέχη που σχετίζονταν με το είδος *Lactobacillus hilgardii* ζύμωναν τόσο γλυκόζη όσο και λακτόζη. Με την κατασκευή βιβλιοθήκης κλώνων και την εφαρμογή της μεθόδου FISH (Fluorescein In situ Hybridization) διαπιστώθηκε ότι ο κυρίαρχος μικροοργανισμός στο μεικτό υγρό της οξεοποιητικής βαθμίδας ήταν το βακτήριο *Selenomonas laticifex* (*Veillonellaceae*, *Selenomonadales*, *Negativicutes*, *Firmicutes*), το οποίο παρουσιάζει ένα ιδιαίτερο ζυμωτικό μεταβολισμό αφού προκύπτει γαλακτικό, οξικό και προπιονικό από τη ζύμωση των σακχάρων. Συμπερασματικά, στο μεικτό υγρό της οξεοποιητικής βαθμίδας κυριαρχούσαν στελέχη του γένους *Selenomonas*, ακολουθούμενα από ετεροζυμωτικά γαλακτικά βακτήρια, *Bifidobacterium* spp. και ζύμες (που επιτελούσαν αλκοολική ζύμωση), γεγονός που εξηγεί την υψηλή συγκέντρωση γαλακτικού οξέος στην οξεοποιητική βαθμίδα. Η εύρεση ενός καινούργιου *Bifidobacterium* sp., που παρουσίασε φυλογενετική ομοιότητα μικρότερη του 97% με το είδος *Bifidobacterium minimum*, καθιστά τα υγρά απόβλητα γαλακτοβιομηχανίας ενδιαίτημα νέων προβιοτικών μικροοργανισμών.

Λέξεις κλειδιά: *Selenomonas laticifex*, *Lactobacillus*, *Bifidobacteria*

Microbial community structure in the acidogenic reactor of a two-stage anaerobic digestion system, treating cheese-whey wastewater

Ntougias S., Soultani D. and Melidis P.

Laboratory of Wastewater Management & Treatment Technologies, Department of Environmental Engineering, Democritus University of Thrace, Vas. Sofias 12, 67100 Xanthi, Greece (e-mail: sntougia@env.duth.gr)

The optimization of acidogenesis during anaerobic treatment of dairy wastewaters can increase organic load removal efficiency and energy recovery. Both culture-dependent and independent techniques were applied to identify the microbial community structure and the lactic acid population in the acidogenic reactor of a two-stage anaerobic digestion system, treating cheese-whey wastewater. A total of 45 strains were isolated using MRS as the growth medium. All the above strains belonged to *Lactobacillus* και *Bifidobacteria* spp., apart from 5 yeast strains which were phylogenetically related to *Kazachstania unispora* and *Dekkera anomala*. The majority of bacterial strains isolated were associated with *Lactobacillus hilgardii*. Yeast strains could ferment glucose (to ethanol), but not lactose, although *Lactobacillus hilgardii* strains could ferment both glucose and lactose (to lactate and ethanol). Based on 16S rRNA gene-library construction and FISH (Fluorescein In situ Hybridization) analysis, the dominant microorganism in the mixed liquor of the acidogenic reactor was *Selenomonas laticifex* (Veillonellaceae, Selenomonadales, Negativicutes, Firmicutes), which follows a special fermentative metabolism since lactate, acetate and propionate are the fermentation-end products. *Selenomonas* spp., followed by heterofermentative *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp. and alcoholic yeasts constituted the main microbiota in the acidogenic reactor, a microbial community structure which can explain the high lactic acid concentration determined during acidogenesis. A novel *Bifidobacterium* sp. was identified, showing similarity in 16S rRNA gene less than 97% with *Bifidobacterium minimum*, indicating thus that dairy wastewaters are sources of novel probiotics.

Keywords: *Selenomonas laticifex*, *Lactobacillus*, *Bifidobacteria*

Ανίχνευση αντιμικροβιακών ουσιών σε βακτήρια της εντερικής μικροχλωρίδας υγιών νεογνών

Τσάπατου Α.¹, Μήτσου Ε.Κ.², Κώτσου Μ.Γ.², Πραματευτάκη Π.³, Κυριακού Α.²

¹Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Βιολογίας, Τομέας Βοτανικής, ΠΜΣ «Μικροβιακή Βιοτεχνολογία», Αθήνα

²Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο, Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας-Διατροφής, Αθήνα

³Ινστιτούτο Οίνου, Εθνικό Ίδρυμα Αγροτικών Ερευνών (ΕΘ.Ι.ΑΓ.Ε.), Λυκόβρυση

Η γαστρεντερική οδός είναι ένα πολύπλοκο οικοσύστημα, το οποίο μπορεί να γίνει δεξαμενή τόσο ωφέλιμων, όσο και επιβλαβών βακτηρίων. Στις δύσκολες ισορροπίες που αναπτύσσονται θεωρείται ότι τα βακτήρια του γένους *Lactobacillus* και *Bifidobacterium* επηρεάζουν θετικά την υγεία του ξενιστή. Τα τελευταία χρόνια υπάρχει ένα αυξανόμενο ενδιαφέρον στη μελέτη των αντιμικροβιακών πεπτιδίων (βακτηριοσίνες) που παράγονται από οξυγαλακτικά βακτήρια λόγω της εν δυνάμει χρήσης τους για τη βελτίωση της ασφάλειας των προϊόντων διατροφής. Η παρούσα εργασία είχε ως σκοπό τη διερεύνηση της παραγωγής αντιμικροβιακών ουσιών και συγκεκριμένα βακτηριοσινών από βακτηριακά στελέχη απομονωμένα από κόπρανα υγιών, τελειόμηνων νεογνών. Η ανίχνευση αντιμικροβιακής δράσης έγινε με τη χρήση των μεθόδων διάχυσης σε άγαρ (agar spot και agar well diffusion). Συνολικά εξετάστηκαν 50 στελέχη του γένους *Lactobacillus* και 22 του γένους *Bifidobacterium* ως προς 12 Gram θετικούς μικροοργανισμούς δείκτες: *Enterococcus faecalis* ATCC 51299, *Enterococcus hirae* UP 5855, *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC 25923, *Listeria monocytogenes* DSM 12464, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* DSMZ 20081, *Lactobacillus casei* DSMZ 20011, *Lactobacillus rhamnosus* WAV, *Bifidobacterium bifidum* DSM 20456, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* DSMZ 10140, *Clostridium perfringens* και *Clostridium difficile* ATCC 9689. Από αυτά τα στελέχη μόνο ένα εμφάνισε αντιμικροβιακή δράση στο *Lactobacillus delbrueckii* DSMZ 20081 και με τις δύο μεθοδολογίες, το οποίο και ταυτοποιήθηκε ως *Lactobacillus gasseri* με αλληλούχιση του 16S rDNA γονιδίου. Στη συνέχεια έγινε διαπίστωση της φύσης της αντιμικροβιακής ουσίας με την επίδραση υδρολυτικών ενζύμων (πρωτεάση, λιπάση, α-αμυλάση) και καταλάσης. Ακολούθησε έλεγχος της αντιμικροβιακής δράσης σε διάφορες τιμές pH (2-10) και θερμοκρασίας (-80°C, -20°C, 4°C, 60°C, 80°C, 100°C, 121°C), αλλά και παρουσία διαφόρων αντιδραστηρίων (Tween® 20, Tween® 80, Triton X-100, SDS, EDTA, NaCl). Από τη μελέτη αυτή προέκυψε ότι η αντιμικροβιακή δράση του *Lactobacillus gasseri* οφείλεται σε μόριο πρωτεϊνικής φύσης (βακτηριοσίνη), με περιορισμένο φάσμα δράσης, σταθερό σε διακυμάνσεις pH και ιδιαίτερα θερμοανθεκτικό.

Λέξεις κλειδιά: βακτηριοσίνες, εντερική μικροχλωρίδα, αντιμικροβιακή δράση

Detection of bacterial antimicrobial compounds from faecal microbiota of healthy neonates

Tsapatou A.¹, Mitsou E.K.², Kotsou M.G.², Pramateftaki P.³, Kyriacou A.²

¹National and Kapodistrian University of Athens, Faculty of Biology, Department of Botany, Postgraduate Study Programme (PSP) 'Microbial Biotechnology', Athens

²Harokopio University, Department of Nutrition and Dietetics, Athens

³Wine Institute of Athens, National Agricultural Research Foundation (N.A.G.R.E.F.), Lykovrissi

The intestinal tract is a complex ecosystem, that harbors both beneficial (e.g. lactobacilli, bifidobacteria) and harmful bacteria. Recently, there is an increasing interest for the study of antimicrobial peptides produced by lactic acid bacteria, due to their potential use as food additives for safety reasons. The present study aimed to investigate the production of antimicrobial compounds, particularly bacteriocins, from bacterial strains isolated from the faecal microbiota of healthy, full-term neonates. A total of 50 *Lactobacillus spp.* strains and 22 *Bifidobacterium spp.* strains were tested for the production of antimicrobial compounds by the "agar spot test" and the "agar well diffusion assay" against 12 Gram – positive indicator strains: *Enterococcus faecalis* ATCC 51299, *Enterococcus hirae* UP 5855, *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC 25923, *Listeria monocytogenes* DSM 12464, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* DSMZ 20081, *Lactobacillus casei* DSMZ 20011, *Lactobacillus rhamnosus* WAV, *Bifidobacterium bifidum* DSM 20456, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* DSMZ 10140, *Clostridium perfringens* and *Clostridium difficile* ATCC 9689. Only one isolate, identified as *Lactobacillus gasseri* by 16S rDNA sequence amplification, exhibited antimicrobial activity against *Lactobacillus delbrueckii* DSMZ 20081 by both assays. Effects of hydrolytic enzymes (protease, α -amylase, lipase), catalase, pH (2-10), temperature (-80°C, -20°C, 4°C, 60°C, 80°C, 100°C, 121°C) and reagents (Tween® 20, Tween® 80, Triton X-100, SDS, EDTA, NaCl) on antibacterial activity were examined. Bacteriocin from *Lactobacillus gasseri* had a narrow spectrum of activity and was extremely stable at pH and temperature ranges

Keywords: bacteriocins, faecal microbiota, antimicrobial activity

Διερεύνηση της βακτηριακής ποικιλότητας σε σύστημα συνεχούς ροής που επιτελεί εκτεταμένη βιολογική αφαίρεση φωσφόρου

Καπαγιαννίδης Α., Ναβροζίδου Ε., Παυλινέρη Ν. και Ντούγιας Σ.

Εργαστήριο Διαχείρισης και Τεχνολογίας Υγρών Αποβλήτων, Τμήμα Μηχανικών Περιβάλλοντος, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης, Βασ. Σοφίας 12, 67100 Ξάνθη (email: sntougia@env.duth.gr)

Η εκτεταμένη βιολογική αφαίρεση φωσφόρου συνιστά μία καθιερωμένη και αποτελεσματική μέθοδο για αφαίρεση φωσφόρου από υγρά απόβλητα, αποφεύγοντας τη χρήση χημικών. Παρόλο που οι γενικές αρχές που χαρακτηρίζουν το μεταβολισμό βακτηρίων που σχετίζονται με την εκτεταμένη βιολογική αφαίρεση φωσφόρου έχουν ήδη περιγραφεί σε αρκετές έρευνες, η διερεύνηση της μικροβιακής ποικιλότητας και των πληθυσμιακών μεταβολών σε τεχνικά συστήματα εκτεταμένης βιολογικής αφαίρεσης φωσφόρου συνεχούς ροής παραμένει στο επίκεντρο της επιστημονικής έρευνας. Για τη διεκπαιρέωση της παρούσας εργασίας, σχεδιάστηκε και λειτούργησε ένα σύστημα εκτεταμένης βιολογικής αφαίρεσης φωσφόρου, με εναλλαγή αναερόβιων-αερόβιων συνθηκών, για την επεξεργασία συνθετικού αποβλήτου. Μετά από 70 ημέρες λειτουργίας για ένα μέσο υδραυλικό χρόνο παραμονής της τάξης των 8 h, η βιομάζα εμπλουτίστηκε με πολυ-P βακτήρια (poly-P bacteria ή Polyphosphate Accumulating Organisms-PAOs). Ο εμπλουτισμός της βιομάζας πιστοποιήθηκε με εφαρμογή του φθορίζοντος *in situ* υβριδισμού (fluorescence *in situ* hybridization- FISH). Ο ειδικός ρυθμός αφομοίωσης φωσφόρου διαμορφώθηκε στα 6 – 7 mg PO₄-3-P g⁻¹ VSS h⁻¹ για έναν λόγο P/O ίσο με 1.1-1.2 και για μία αντίστοιχη κατανάλωση οξικού οξέος στην εισροή ίση με 300 mg COD/L. Το περιεχόμενο της βιομάζας σε φώσφορο σχεδόν διπλασιάστηκε συγκριτικά με την αρχικό εμβόλιο, ενώ ο προσδιορισμός ενδοκυτταρικών πολυμερών (πολυ-υδροξυαλκανοϊκά και γλυκογόνο) έδειξαν καλή συσχέτιση με το σταδιακό εγκλιματισμό της βιομάζας στο σύστημα εκτεταμένης βιολογικής αφαίρεσης φωσφόρου. Ο βακτηριακός πληθυσμός αποτελούταν κυρίως από στελέχη του γένους *Aeromonas*, ακολουθούμενα από μέλη των γενών *Brevundimonas*, *Caldilinea*, *Oligotropha*, *Pseudoxanthomonas* και *Teriimonas*. Επιπρόσθετα, στο μικτό υγρό ανιχνεύτηκαν βακτήρια της τάξεως *Rhodocyclades*, γεγονός που επίσης πιστοποιεί την παρουσία των PAOs.

Λέξεις κλειδιά: εκτεταμένη βιολογική αφαίρεση φωσφόρου, πολυ-P βακτήρια, *Rhodocyclades*

Revealing bacterial diversity in a continuous-flow EBPR system

Kapagiannidis A., Navrozidou E., Pavlineri N. and Ntougias S.

Laboratory of Wastewater Management & Treatment Technologies, Department of Environmental Engineering, Democritus University of Thrace, Vas. Sofias 12, 67100 Xanthi, Greece (e-mail: sntougia@env.duth.gr)

Enhanced Biological Phosphate Removal (EBPR) is a well established biological method for efficient removal of phosphate in wastewater treatment plants. Although the basic outlines of the bacterial metabolism related to EBPR have been already described in several studies, the investigation of the microbial diversity and population dynamics in continuous-flow EBPR systems still stands in the centre of scientific research. In this study, an anaerobic-aerobic lab-scale plant has been operated for efficient phosphorus removal from synthetic wastewater. After 70 days of operation, at a mean hydraulic residence time of 8 h, biomass was enriched with Phosphate Accumulating Organisms (PAOs), as confirmed by fluorescence *in situ* hybridization (FISH) on biomass samples. The specific phosphorus uptake rate reached 6 – 7 mg PO₄-3-P g⁻¹ VSS h⁻¹ for a corresponding P/O ratio equal to 1.1-1.2, at the expense of 300 mg/L COD as acetate contained in the synthetic wastewater. Biomass polyphosphate content almost doubled compared to the inoculum, while further analysis of intracellular polymers (i.e. poly-hydroxyalkanoates and glycogen) correlated well with the gradual biomass acclimatization to EBPR conditions. Bacterial diversity consisted mainly of *Aeromonas* spp., followed by members of the genera *Brevundimonas*, *Caldilinea*, *Oligotropha*, *Pseudoxanthomonas* and *Teriimonas*. In addition, *Rhodocyclus*-like bacteria were identified in the mixed liquor of the aerobic bioreactor, indicating thus a PAOs-enriched biomass.

Keywords: Enhanced Biological Phosphate Removal (EBPR), Phosphate Accumulating Organisms (PAOs), *Rhodocyclus*-like bacteria

Βιολογική αντιμετώπιση του τοξικογόνου μύκητα *Aspergillus flavus* και των αφλατοξινών που παράγει σε κελυφωτά φιστίκια «Αιγίνης»

Αντωνόπουλος Δ. Φ.^{1,2}, Γεωργιάδου Μ.³, Αγορίτσης Σ.Π.¹, Γιαννιώτης Σ.³, Τσιτσιγιάννης Δ.Ι.^{1*}

¹Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιερά Οδός 75, 118 55, Αθήνα

²Εργαστήριο Φυτοπροστασίας, Σχολή Τεχνολογίας Γεωπονίας, ΤΕΙ Καλαμάτας, Αντικάλamos, Καλαμάτας, 24100

³Εργαστήριο Μηχανικής Τροφίμων, Επεξεργασίας και Συντήρησης Γεωργικών Προϊόντων, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιερά Οδός 75, 118 55, Αθήνα *Email: dimtsi@aua.gr

Μια από τις μεγαλύτερες απειλές για την ασφάλεια και ποιότητα των τροφίμων είναι οι μυκοτοξίνες, ιδιαίτερα τοξικοί και καρκινογόνοι παραγόμενοι μεταβολίτες χαμηλού μοριακού βάρους. Η αφλατοξίνη που παράγεται από το μύκητα *Aspergillus flavus* αποτελεί μία από τις πλέον καρκινογόνες μυκοτοξίνες και έχει εντοπιστεί σε υψηλές συγκεντρώσεις στην Ελλάδα, μεταξύ άλλων, και σε κελυφωτά φιστίκια. Ο στόχος αυτής της μελέτης ήταν η αξιολόγηση συλλογής 18 απομονώσεων ζυμών και 4 μη τοξικογόνων στελεχών *A. flavus*, που απομονώθηκαν από πειραματικούς φιστικεώνες, για την αντιμετώπιση του *A. flavus* και των αφλατοξινών του. Οι ζύμες MR7 (*Candida sp.*) και FR6 (*Aureobasidium pullulans*) αξιολογήθηκαν σε *in vitro* πειράματα κατά του αφλατοξικογόνου παθογόνου *A. flavus*, στέλεχος Δ1.3 AF2, και κρίθηκαν ως οι αποτελεσματικότερες, γιατί οδήγησαν σε σημαντική μείωση της ανάπτυξης του παθογόνου κατά 40-50% και σε περίπου 1000 φορές ελάττωση της ικανότητας κονιδιογένεσής του, σε σχέση με το μάρτυρα, επί της ψύχας κελυφωτών φιστικιών «Αιγίνης». Η επίδραση των συγκεκριμένων ζυμών στην παραγωγή της αφλατοξίνης υπολογίσθηκε με HPLC και οδήγησε σε σημαντική μείωση της εν λόγω παραγωγής κατά 89% (FR6) και 85% (MR7), αντίστοιχα, σε σχέση με το μάρτυρα. Επίσης, κατά την αξιολόγηση των μη-τοξικογόνων στελεχών *A. flavus* που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως βιολογικοί παράγοντες καταπολέμησης της ασθένειας σε φιστικεώνες, τα μη τοξικογόνα στελέχη AF38, AF51 και AF57 μείωσαν σημαντικά τις παραγόμενες αφλατοξίνες (μέτρηση με HPLC) AFB1, B2 και G1 του στελέχους Δ1.3 AF2 κατά 41%, 48% και 69% αντίστοιχα, ενώ το στέλεχος AF45 δεν είχε καμία επίδραση σε σχέση με το μάρτυρα. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης συμβάλλουν στην ανάπτυξη σύγχρονων μεθόδων βιολογικής αντιμετώπισης, φιλικές προς το περιβάλλον, με απώτερο σκοπό την προσέγγιση λύσεων αντιμετώπισης του προβλήματος των μυκοτοξινών των κελυφωτών φιστικιών και προστασίας του καταναλωτή από τις μυκοτοξίνες.

Biological control of the toxigenic fungus *Aspergillus flavus* and aflatoxins produced in shelled pistachio nuts cv. “Eginis”

Antonopoulos D.F.^{1,2}, Georgiadou M.³, Agoritsis S.P.¹, Gianniotis S.³, Tsitsigiannis D.I.¹ *

¹ *Laboratory of Plant Pathology, Agricultural University of Athens, Iera Odos Str. 75, 118 55, Athens, Hellas*

² *Laboratory of Crop Protection, School of Agricultural Technology, TEI of Kalamata, Antikalamos, Kalamata, 24100, Hellas*

³ *Laboratory of Food Process Engineering, Agricultural University of Athens, Iera Odos Str. 75, 118 55, Athens, Hellas* *Email: dimtsi@aua.gr

One of the most significant threats for food quality and safety are the mycotoxins, particularly toxic and carcinogenic low molecular weight metabolites. Aflatoxins produced by the fungus *Aspergillus flavus* are highly carcinogenic mycotoxins that several times have been detected at high concentration levels in pistachio nuts in Greece. In this study, eighteen yeast isolates and four non-toxicogenic strains of *A. flavus*, isolated from experimental pistachio orchards, were evaluated for the management of *A. flavus* and aflatoxins. The yeast isolates MR7 (*Candida sp.*) and FR6 (*Aureobasidium pullulans*) were selected as the most effective against the aflatoxigenic pathogen *A. flavus*, strain Δ1.3 AF2, because they led to a 40-50% reduction of *Aspergillus* growth and to a significant reduction in conidiogenesis by approximately 1000 times, in comparison to the control. These 2 yeast strains were further tested on shelled pistachio nuts cv. “Eginis” for their role in aflatoxin production (assessed by HPLC) and led to a significant decrease by 89% (FR6) and 85% (MR7), respectively, in comparison to the control. Evaluation of the non-toxicogenic *A. flavus* strains as biological control agents of the disease and mycotoxin in pistachio orchards, AF38, AF51 and AF57 reduced significantly the production of the aflatoxins (assessed by HPLC) AFB1, B2 and G1 of the Δ1.3 AF2 strain by 41%, 48% and 69%, respectively, whereas AF45 strain did not show any effect in comparison to the control. The results of this study contribute to the development of environmentally friendly methods of biological management of mycotoxins in pistachio nuts.

Επίδραση των θρεπτικών στοιχείων και επιφανειοδραστικών ουσιών στο σχηματισμό βιοϋμενίου από στελέχη του *Bacillus cereus*

Αντωνόπουλος Δ.Φ.^{1,2,*}, Wijman J.¹ και Abee T.¹

¹ Εργαστήριο Μικροβιολογίας Τροφίμων, Wageningen University and Research Centre, Wageningen, Ολλανδία

² Εργαστήριο Φυτοπροστασίας, Σχολή Τεχνολογίας Γεωπονίας, ΤΕΙ Καλαμάτας, Αντικάλαμος, 24100 * Email: antdim75@yahoo.com

Το βακτήριο *Bacillus cereus* αποτελεί σύνηθες τοξικογόνο παθογόνο στα τρόφιμα επιμολύνοντας ιδιαίτερα τα γαλακτοκομικά προϊόντα και σχηματίζοντας βιοϋμένια (biofilms) στις βιομηχανικές εγκαταστάσεις. Επιπρόσθετα, οι επιφανειοδραστικές ουσίες παράγονται από πολλά είδη βακτηρίων και, μεταξύ άλλων, μειώνουν την επιφανειακή τάση. Εξετάστηκε η ικανότητα δέκα στελεχών του *B. cereus* να σχηματίζουν βιοϋμένιο σε ειδικά πλαίσια πολυστυρενίου για 24 ή 48 ώρες επώασης στους 30^o C σε τρία θρεπτικά υλικά (LB, Y1, EPS). Όλα τα στελέχη σχημάτισαν βιοϋμένιο κυρίως μεταξύ αέριας και υγρής φάσης, αλλά κάθε στέλεχος επέδειξε διαφορετική συμπεριφορά στο σχηματισμό βιοϋμενίου σε κάθε θρεπτικό υλικό και χρόνο επώασης. Επιπλέον, καμία επίδραση της σουρφακτίνης (0,1 mg mL⁻¹) δεν παρατηρήθηκε επί του σχηματισμού βιοϋμενίου από το *B. cereus*, εκτός των στελεχών PAL3 στο LB και ATCC14579 στο EPS (μεγαλύτερος σχηματισμός βιοϋμενίου). Για τα PAL3, ATCC14579 και ATCC10987 (όλο το γένωμα είναι διαθέσιμο για τα δύο τελευταία στελέχη) εξετάστηκε η ανάπτυξη (OD 600nm) και σχηματισμός βιοϋμενίου (OD 595nm) σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις σουρφακτίνης (0,1, 0,3 και 0,5 mg mL⁻¹) στις ανωτέρω συνθήκες καλλιέργειας. Ο σχηματισμός βιοϋμενίου από το στέλεχος ATCC14579 στο EPS με 0,1 mg σουρφακτίνη mL⁻¹ ήταν αρκετά μεγαλύτερος σε σχέση με υψηλότερες συγκεντρώσεις της σουρφακτίνης ή απουσία σουρφακτίνης. Η παρούσα τεχνική εκτίμησης του σχηματισμού βιοϋμενίου προσφέρει τη δυνατότητα τάχιστα ποσοτικοποίησης της μάζας του βιοϋμενίου. Ο σχηματισμός βιοϋμενίου μεταξύ αέριας και υγρής φάσεως απεδείχθη ότι εξαρτάται από το βακτηριακό στέλεχος, θρεπτικά στοιχεία και χρόνο επώασης, ενώ η παραγωγή του επιφανειοδραστικού παράγοντα φαίνεται ότι απαιτείται για το σχηματισμό βιοϋμενίου και πιθανότατα εξαρτάται από το βακτηριακό στέλεχος, τα διαθέσιμα θρεπτικά στοιχεία και τη συγκέντρωση σουρφακτίνης.

The effect of nutrients and biosurfactans in biofilm formation by *Bacillus cereus* strains

Antonopoulos D.F.^{1,2,*}, Wijman J.¹ and Abee T.¹

¹ *Laboratory of Food Microbiology, Wageningen University and Research Centre, Wageningen, The Netherlands*

² *Laboratory of Crop Protection, School of Agricultural Technology, TEI of Kalamata, Antikalamos, 24100, Hellas * Email: antdim75@yahoo.com*

Bacillus cereus is a common food toxigenic pathogen, since it contaminates dairy products and forms biofilm in food industry. In addition, biosurfactants are produced by many bacteria and they are able to reduce surface tension. The ability of ten *B. cereus* strains to form biofilm in polystyrene plates for 24 or 48 hours of incubation time at 30⁰ C in three different media (LB, Y1, EPS) was tested. All strains formed biofilm mainly at the air-liquid interface, but each strain showed different pattern of biofilm formation in each medium and incubation time. Furthermore, the effect of surfactin on *B. cereus* biofilm formation was examined and no effect of the presence of surfactin was observed, except for the strains PAL3 in LB and ATCC14579 in EPS in which biofilm formation was higher. The biofilm formation (OD 595 nm) and bacterial growth (OD 600 nm) of the strains PAL3, ATCC14579 and ATCC10987 (for the two latter strains, the full genome is available) in three surfactin's concentrations (0.1, 0.3 and 0.5 mg mL⁻¹) was investigated to the aforementioned conditions. For ATCC14579, biofilm formation in EPS at 0.1 mg surfactin mL⁻¹ was much more than at higher concentrations of surfactin or without surfactin. Biofilm mass quantification could be carried out via this method quickly. Air-liquid biofilm formation was shown to be dependent on strain, nutrients and incubation time, whilst surfactin involvement on biofilm formation potentially is required and it seems to be strain and medium dependent, as well as dependent on surfactin's concentration level.

Σχηματισμός βιοϋμενίου από στελέχη του *Bacillus cereus* υπό αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες

Αντωνόπουλος Δ.Φ.^{1,2,*}, Wijman J.¹ και Abee T.¹

¹ Εργαστήριο Μικροβιολογίας Τροφίμων, Wageningen University and Research Centre, Wageningen, Ολλανδία

² Εργαστήριο Φυτοπροστασίας, Σχολή Τεχνολογίας Γεωπονίας, ΤΕΙ Καλαμάτας, Αντικάλαμος, 24100 * Email: antdim75@yahoo.com

Το βακτήριο *Bacillus cereus* προκαλεί προβλήματα στις γαλακτοβιομηχανίες μέσω της επιμόλυνσης του γάλακτος και σχηματισμού βιοϋμενίων (biofilms). Τα βιοϋμένια είναι δύσκολο να αντιμετωπισθούν και απελευθερώνουν πλαγκτονικά (planktonic) κύτταρα (ακόμα και σπόρια στην περίπτωση του *B. cereus*) μολύνοντας πάλι τα παραγόμενα τρόφιμα στις βιομηχανικές εγκαταστάσεις. Επίσης, στελέχη του *B. cereus* δύνανται να μετακινούνται με τα μαστίγια τους (swimming & swarming), κινήσεις κρίσιμες για την εύρεση θρεπτικών στοιχείων, ταχείας προσκόλλησης σε μία επιφάνεια και τάχιστης μόλυνσης. Δέκα στελέχη του *B. cereus* εξετάστηκαν ως προς την ικανότητά τους να σχηματίζουν βιοϋμένιο σε ειδικά πλαίσια πολυστυρενίου με θρεπτικό υλικό LB, Y1 ή EPS υπό αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες. Η εκτίμηση των πλαγκτονικών κυττάρων (OD_{600nm}) και σχηματισμού βιοϋμενίου

(OD_{595nm}), αντίστοιχα, επιτεύχθηκε μετά από 24 και 48 ώρες επώασης στους 30⁰ C. Όλα τα στελέχη του *B. cereus* σε όλα τα υπό εξέταση θρεπτικά υλικά αναπτύχθηκαν κατά 50-75% λιγότερο στις αναερόβιες συνθήκες σε σχέση με τις αερόβιες συνθήκες. Επιπροσθέτως, ο σχηματισμός βιοϋμενίου μετά από 48 ώρες επώασης (χωρίς ανανέωση του θρεπτικού υλικού) μειώθηκε υπό αναερόβιες συνθήκες, εκτός του PAL22 στο υλικό EPS. Στο πείραμα ελέγχου της κινητικότητας των στελεχών του *B. cereus*, μετρήθηκε η διάμετρος κάθε αποικίας σε τέσσερα διαφορετικά θρεπτικά υλικά (LB, NB, Y1, EPS) υπό αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες, αντίστοιχα. Η κινητικότητα όλων των βακτηριακών στελεχών μειώθηκε υπό αναερόβιες συνθήκες σε σχέση με τις αερόβιες. Συμπερασματικά, όταν το επίπεδο διαθέσιμου οξυγόνου είναι χαμηλό πιθανότατα να αποτελεί ένα κρίσιμο παράγοντα κτήσης μικρότερου βαθμού βιοϋμενίου από το *B. cereus*. Επιπλέον, τα μαστίγια πιθανότατα απουσιάζουν ή δεν είναι ενεργά υπό αναερόβιες συνθήκες, έτσι ώστε η ανάπτυξη βιοϋμενίου να είναι μικρότερη.

Biofilm formation of *Bacillus cereus* strains under aerobic and anaerobic conditions

Antonopoulos D.F.^{1,2,*}, Wijman J.¹ and Abee T.¹

¹ *Laboratory of Food Microbiology, Wageningen University and Research Centre, Wageningen, The Netherlands*

² *Laboratory of Crop Protection, School of Agricultural Technology, TEI of Kalamata, Antikalamos, 24100, Hellas * Email: antdim75@yahoo.com*

Bacillus cereus causes many problems to dairy industry by contaminating milk and forming biofilms. Biofilms are difficult to eradicate and can release planktonic cells (or even spores in the case of *B. cereus*) again to re-infect the production in food processing environments. Furthermore, certain strains of *B. cereus* can move by two distinct forms of flagellum-driven motility, called swimming and swarming. These movements may be crucial for finding nutrients, capturing a surface as fast as possible and for fast infection. Ten strains of *B. cereus* were tested for their ability to form biofilm in polystyrene plates in the LB, Y1 or EPS media under aerobic and anaerobic conditions. Estimation of the planktonic cells (OD_{600nm}) and biofilm formed (OD_{595nm}^0), respectively, was achieved after 24 and 48 hours of incubation at 30 °C. All *B. cereus* strains grow 50-75% less under anaerobic in all tested media than aerobic conditions. Additionally, biofilm formation after 48 hours of incubation (without refreshing the medium) was reduced under anaerobic conditions, except for the strain PAL22 in EPS. In a motility experiment, the diameter of the bacterial colony was measured in four different media (LB, NB, Y1, EPS) under aerobic and anaerobic conditions, respectively. The motility of all strains of *B. cereus* was reduced under anaerobic conditions in comparison to aerobic. In conclusion, when the oxygen level is limited possibly could be a reason of getting less biofilm by *B. cereus*. Moreover, flagella seem to be absent or inactive under anaerobic conditions, so that biofilm development is less.

Ανάλυση της μικροχλωρίδας σε συσκευασίες γάλακτος τεχνολογίας ESL από πέντε εταιρίες της ελληνικής αγοράς

Γκίκας Δ., Καλαντζή Κ. και Μπελετσιώτης Ε.

Δέλτα Τρόφιμα Α.Ε., Διεύθυνση Διασφάλισης Ποιότητας, Τμήμα Μοριακής Μικροβιολογίας, Αθήνα

Το γάλα τεχνολογίας ESL καταλαμβάνει το 27% του μεριδίου γάλακτος στην ελληνική αγορά. Στην παρούσα μελέτη αναλύθηκαν 480 συσκευασίες γάλακτος πέντε διαφορετικών εταιριών. Πενήντα συσκευασίες από την κάθε εταιρία τοποθετήθηκαν στους 10οC και εξετάστηκαν μικροβιολογικά μετά τη λήξη του χρόνου ζωής τους. Οι υπόλοιπες 250 συσκευασίες υποβλήθηκαν σε θερμική καταπόνηση, στους 30οC για 48 ώρες και ακολούθησε μικροβιολογική ανάλυση. Και στις δύο δοκιμασίες εντοπίστηκαν φιάλες με μικροβιολογική ανάπτυξη που κυμαίνονταν μεταξύ 1log10 και 8log10 cfu/ml. Αποικίες επιλέχθηκαν, ανακαλλιεργήθηκαν και ταυτοποιήθηκαν με αλληλούχηση τμήματος της 16S rDNA επανάληψης. Οι μικροοργανισμοί, ύστερα από την ταυτοποίηση, κατηγοριοποιήθηκαν σε τρεις κύριες ομάδες. Στην πρώτη ομάδα ανήκαν σποριογόνα θερμοάντοχα Gram θετικά βακτήρια των γενών *Bacillus*, *Brevibacillus* και *Raenibacillus* που μπορούν να επιβιώσουν της θερμικής κατεργασίας. Η δεύτερη ομάδα περιελάμβανε Gram αρνητικούς μικροοργανισμούς, που ανήκαν κυρίως στα γένη *Acinetobacter*, *Chryseobacterium*. Η τελευταία ομάδα μικροοργανισμών αποτελούνταν από Gram θετικά βακτήρια, που ανήκαν στα γένη *Staphylococcus* sp. και *Micrococcus* sp. Βακτήρια που ανήκαν σε διάφορα είδη και ομάδες χρησιμοποιήθηκαν για τεχνητές επιμολύνσεις σε συσκευασίες ESL. Μελετήθηκε η δυνατότητα ανάπτυξης των μικροοργανισμών αυτών στις θερμοκρασίες 8οC και 10οC για 25 ημέρες. Σε ορισμένες περιπτώσεις, οι μικροοργανισμοί έφθασαν σε πληθυσμούς 8log10 cfu/ml, σε περίοδο 4-10 ημερών, στους 10οC. Σε επόμενο στάδιο μελετήθηκε η μικροβιολογική ποιότητα 316 συσκευασιών γάλακτος χρησιμοποιώντας παράλληλα την κλασική μικροβιολογική τεχνική, σύμφωνα με το ISO 4833 και τη χρήση κυτταρομετρίας ροής. Στο 96.2% των συσκευασιών ESL γάλακτος, που τοποθετήθηκαν στους 30οC για 24 ώρες, ύστερα από ταυτόχρονη ανάλυση με τις δύο τεχνικές, δεν παρατηρήθηκε βακτηριακή ανάπτυξη. Στο 3.8% των δειγμάτων, απομονώθηκαν μικροοργανισμοί που ανήκαν σε σποριογόνους Gram θετικούς και σε Gram αρνητικά βακτήρια. Οι δύο τεχνικές έδωσαν ποσοστά ομολογίας αποτελεσμάτων 95.6%.

Λέξεις Κλειδιά: ESL γάλα, Μικροβιακή χλωρίδα γάλακτος, Κυτταρομετρία ροής

Analyses of microflora in ESL milk retail packages from the Greek market

Ghikas D., Kalantzi K., Beletsiotis E.

DELTA Foods S.A., Quality Assurance Div., Molecular Microbiology Dept., Athens

In the present study, the microflora of 480 retail ESL packages from five Greek brand names was analyzed. Fifty samples from each brand were stored at 10oC and analyzed at the end of the product shelf life, while the other 250 samples were analyzed applying a stress test model, after incubation for 2 days at 30oC. Both methods of analyses resulted to samples with microbiological growth, with counts ranging between 1log10 and 8log10 cfu/ml. Bacteria were identified, applying 16S rDNA sequencing and categorized into three main groups. The first group included spore forming thermoresistant bacteria of the genera *Bacillus*, *Brevibacillus* and *Paenibacillus*. The second group consisted of Gram negative bacteria, belonging mainly to genera *Acinetobacter*, *Chryseobacterium*. In the last group, Gram positive bacteria were identified, with representatives from *Staphylococcus* sp. and *Micrococcus* species. A number of bacterial species, belonging in different groups, were used for artificial inoculation of ESL milk samples. The microbial growth was monitored at 8oC and 10oC, for 25 days in order to estimate the spoilage potential of these species in different temperatures. The threshold of 10⁸ cfu/ml for certain bacterial species was achieved, in a period of 4-10 days storage at 10oC. Flow cytometry and classical microbiological methods were used in parallel to evaluate the microbiological quality of 316 ESL milk retail packages. After 24h incubation at 30oC, 96.2% of the samples showed no bacterial growth. Microorganisms, isolated from the 3.8% of the samples, were identified as spore formers and Gram negative bacteria.

Επίδραση του μυκητοκτόνου Ridomil Gold 48 EC στην μικροχλωρίδα του εδάφους

Παπαβασιλείου Μ., Φλουρή Φ.

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Εργαστήριο Γεωργικής Φαρμακολογίας, Αθήνα

Τα φυτοφάρμακα χρησιμοποιούνται ευρέως ως ένας τρόπος ελέγχου των εχθρών και των ασθενειών των φυτών. Λόγω των ξενοβιοτικών χαρακτηριστικών τους τα φυτοφάρμακα μπορούν να επηρεάσουν αρνητικά τους ωφέλιμους μικροοργανισμούς καθώς και τις διαδικασίες βιομετατροπής των θρεπτικών στοιχείων που αυτοί επιτελούν. Διεξήχθη εργαστηριακό πείραμα για να μελετηθούν οι αλλαγές που μπορεί να επέλθουν στην μικροχλωρίδα του εδάφους από μία μόνο εφαρμογή της δραστικής ουσίας metalaxyl-m σε μορφή σκευάσματος (Ridomil Gold 48 EC).

Εδαφικά δείγματα στα οποία εφαρμόστηκαν τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις με το μυκητοκτόνο (10ppm, 100ppm και 1000ppm) εξετάστηκαν 18 μήνες μετά την εφαρμογή αυτού. Σε αυτά τα δείγματα μετρήθηκε η συνολική βακτηριακή μικροχλωρίδα με την μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων και του πλέον πιθανού αριθμού (MPN). Το μεταβολικό προφίλ της αύξησης του βακτηριακού πληθυσμού σε 31 διαφορετικές πηγές άνθρακα επίσης, καταγράφηκε σε eco-microplates της Biolog. Η επίδραση του metalaxyl-m (100ppm και 1000ppm) στην ανάπτυξη του μικροβιακού πληθυσμού του μάρτυρα και του εδάφους που είχε δεχθεί 1000ppm metalaxyl μελετήθηκε σε τρία διαφορετικά υποστρώματα.

Παρατηρήθηκε μια μόνο μικρή αύξηση στον μικροβιακό πληθυσμό των δειγμάτων που είχαν δεχθεί το Ridomil σε σχέση με τον μάρτυρα που όμως δεν είναι στατιστικά σημαντική. Ο τρόπος ανάπτυξης στα Biolog eco microplates ήταν παρόμοιος μεταξύ των δειγμάτων για τις περισσότερες από τις 31 πηγές άνθρακα. Στην περίπτωση των πηγών α-Cytodextrin, Itatonic Acid, Phenylethyl-amine, Putrescine and α-Ketobutyric Acid δεν παρατηρήθηκε καμία ανάπτυξη στο χόμα του μάρτυρα ενώ το αντίθετο συνέβη στα δείγματα χόματος που είχαν δεχθεί το Ridomil. Ο μικροβιακός πληθυσμός και για τις δύο εφαρμογές (Χόμα μάρτυρα και 1000ppm metalaxyl) παρεμποδίστηκε από την παρουσία του metalaxyl σε φτωχά θρεπτικά υποστρώματα, αντίθετως σε υπόστρωμα με Nutrient Broth καμία παρεμπόδιση δεν παρατηρήθηκε. Επίσης, δεν υπήρξε καμία ένδειξη για χρήση του metalaxyl ως πηγή άνθρακα.

Λέξεις κλειδιά: Ridomil-Gold 48 EC, metalaxyl-m, μικροχλωρίδα του εδάφους

Effects of the fungicide Ridomil Gold 48 EC on the soil microflora

Papavasileiou M., Flouri F.

Agricultural University of Athens, Laboratory of Pesticides Management, Athens

Pesticides are extensively used in agriculture as a part of pest control strategies. Owing to their xenobiotic characteristics, pesticides may adversely affect of beneficial soil microorganisms and their associated nutrient biotransformation in the soil. A laboratory experiment was conducted to study the changes in soil microflora resulting from a single application of a metalaxyl-based fungicide applied as an EC formulation (Ridomil Gold 48 EC).

Soil samples treated with three different concentrations of the fungicide (10ppm, 100ppm and 1000ppm) were analyzed 18 months after the treatment. In these samples the total bacterial flora was measured by the dilution plates and most probable number (MPN) method. The metabolic profile of microbial population growth on 31 different carbon sources was also monitored using Biolog eco-microplates. The effect of metalaxyl-m (100ppm and 1000ppm) on microbial growth of control and 1000ppm metalaxyl treated soil samples was studied in three different growth media.

Only a small increase, not statistically significant, of the microbial population of Ridomil treated samples was observed compared to the control. Growth patterns in Biolog ecoplates were similar among treatments for most of the 31 carbon sources. In the case of α -Cytodextrin, Itatonic Acid, Phenylethyl-amine, Putrescine and α -Ketobutyric Acid no growth was observed for the control soil sample, in contrast to Ridomil treated soil. Microbial populations from both treatments (control and 1000ppm metalaxyl) were inhibited by the presence of metalaxyl in poor nutrient media whereas in Nutrient Broth no inhibition was observed. There was no indication for the use of metalaxyl as a carbon source.

NorD, μια πρωτεΐνη-τελεστής του *Bradyrhizobium japonicum* προκαλεί κυτταρικό θάνατο στο σακχαρομόκητα

Φωτιάδης Χ. και Ταμπακάκη Α.*

Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας, Εργ. Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιερά Οδός 75, 11855, Αθήνα, * tampakaki@aia.gr

Το βακτήριο *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 χρησιμοποιεί το εκκριτικό σύστημα τύπου III (T3SS) για να μεταφέρει πρωτεΐνες-τελεστές στα κύτταρα φυτών σόγιας στη διάρκεια της συμβιωτικής διαδικασίας. Οι πρωτεΐνες αυτές ονομάζονται Nops (nodulation outer proteins), επηρεάζουν τη συμβίωση θετικά ή αρνητικά ανάλογα με τον ξενιστή. Περισσότερες από 30 πρωτεΐνες-τελεστές έχουν ταυτοποιηθεί σε *B. japonicum*, όμως η λειτουργία τους παραμένει άγνωστη. Επειδή οι περισσότερες πρωτεΐνες-τελεστές που απαντούν σε ζωικά και φυτικά παθογόνα βακτήρια επηρεάζουν συντηρημένα ευκαρυωτικά μονοπάτια σηματοδότησης, χρησιμοποιήσαμε ένα γενετικό σύστημα στο σακχαρομόκητα για να αποκτήσουμε γνώση του λειτουργικού ρόλου των πρωτεϊνών-τελεστών του *B. japonicum*. Μέχρι σήμερα, το σύστημα της ζύμης δεν έχει χρησιμοποιηθεί για τη διερεύνηση των λειτουργιών ριζοβιακών πρωτεϊνών-τελεστών.

Στην παρούσα εργασία, υπερεκφράστηκαν 20 πιθανές πρωτεΐνες-τελεστές στο σακχαρομόκητα και εξετάστηκαν οι συνέπειες τους στην ανάπτυξη και βιωσιμότητά του σακχαρομόκητα κάτω από διαφορετικές συνθήκες. Μεταξύ των πρωτεϊνών που ελέγχθησαν, δύο εμφάνισαν έντονη αναστολή ανάπτυξης στη ζύμη. Περαιτέρω μελέτες πραγματοποιήθηκαν για να εξεταστεί η αναστολή ανάπτυξης που προκαλείται από τις πρωτεΐνες αυτές. Ειδικότερα, καθορίστηκε ότι η αναστολή ανάπτυξης που προκαλείται από μια εκ των δύο πρωτεϊνών (NorD) οφείλεται σε παύση της ανάπτυξης και ότι η πρωτεΐνη αυτή προκαλεί επιπλέον αναστολή της κυτταρικής αναπνοής στη ζύμη. Η πρωτεΐνη NorD είναι ομόλογη με άλλες δύο πρωτεΐνες από το *B. japonicum*, ενώ ομόλογα υπάρχουν σε *Mesorhizobium loti* και *Xanthomonas* spp. Η NorD προβλέπεται να κωδικοποιεί μια πρωτεάση κυστεΐνης με εξειδίκευση σε υποστρώματα SUMO.

Λέξεις κλειδιά: Εκκριτικό σύστημα τύπου III, *Bradyrhizobium japonicum*, *Saccharomyces cerevisiae*

type III secretion system, *Bradyrhizobium japonicum*, *Saccharomyces cerevisiae* NopD, a type III effector protein of *Bradyrhizobium japonicum* causes yeast cell death

Fotiadis C. and Tampakaki A.*

*Agricultural University of Athens, Department of Agricultural Biotechnology, Lab. of General & Agricultural Microbiology, Iera Odos 75, 118 55, Athens, * tampakaki@aua.gr*

The bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 uses the type III secretion system (T3SS) to inject effector proteins into cells of soybean plants during symbiosis. These proteins are called nodulation outer proteins (Nop), influence symbiosis positively or negatively depending on the host. More than 30 T3SS effectors have been identified in *B. japonicum*; however, their function remains unknown. Since most of the T3S effectors found in animal and plant pathogenic bacteria affect conserved eukaryotic signaling pathways, we employed a yeast genetic system to gain insight into the functional role of T3S effectors of *B. japonicum*. So far, this system has not yet been used to explore the functions of the rhizobial effectors.

In the present study, we overexpressed 20 putative T3S effector in yeast and examined their consequences of induced expression of these proteins on the growth and viability of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* under different conditions. Among the effectors tested were two with strong growth inhibition phenotypes in yeast. Further studies were conducted to explore the growth-inhibiting activity of these effectors. Specifically, we demonstrated that the growth inhibition caused by one of the two effectors (NopD) was due to yeast growth arrest and that this effector also resulted in inhibition of yeast respiration. NopD is homologous with two other proteins from *B. japonicum*, while homologs are also present in *Mesorhizobium loti* and *Xanthomonas* spp. NopD is predicted to encode a cysteine protease with SUMO substrate specificity.

Πρόσθετα ευρήματα από το σπήλαιο Νταβέλη (Πεντελικό όρος, Αττική) που εδραιώνουν την υπόσταση του πρόσφατα καθιερωθέντος μονοτυπικού γένους *Oculatella* Zammit, Billi & Albertano 2012 (Cyanobacteria, Pseudanabaenaceae)

Χριστοδούλου Μ.1, Παρμακέλης Α.1, Μελετίου-Χρήστου Μ-Σ.2, Οικονόμου-Αμίλλη Α.1, Πανταζίδου Α.1

¹Τομέας Οικολογίας και Ταξινόμικης, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ,

² Τομέας Βοτανικής, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Τα κυανοβακτήρια είναι φωτοσυνθετικοί προκαρυωτικοί μικροοργανισμοί, με παγκόσμια εξάπλωση (ευρύοικοι) και συχνή παρουσία σε ακραία ενδιαιτήματα, όπως τα σπήλαια. Κάθε σπήλαιο αποτελεί ένα σχετικά κλειστό και σταθερό οικοσύστημα όπου η προοδευτική μείωση έως απουσία φυσικού φωτισμού ελέγχει την ανάπτυξη των φωτοσυνθετικών μικροοργανισμών. Εξαιτίας των ιδιαίτερων περιβαλλοντικών συνθηκών που επικρατούν στα ολιγοτροφικά οικοσυστήματα των σπηλαίων (και άλλων υπόγειων οικοσυστημάτων), πολλά νέα γένη και είδη κυανοβακτηρίων έχουν καθιερωθεί παγκοσμίως. Για τη παρούσα μελέτη έγινε συλλογή υλικού από το σπήλαιο Νταβέλη (Πεντελικό όρος, Αττική) εποχικώς κατά τη χρονική περίοδο 2010-2011. Επελέγησαν 4 δειγματοληπτικές θέσεις με κριτήριο τη δομή και τον χρωματισμό των κυανοβακτηριακών αναπτύξεων, καθώς και την απόσταση αυτών από την είσοδο. Ταυτόχρονα μετρήθηκαν οι αβιοτικές παράμετροι: φωτοσυνθετικώς ενεργή ακτινοβολία (PAR), θερμοκρασία (T) και σχετική υγρασία (RH). Μέρος του συλλεγέντος υλικού διατηρήθηκε σε υδατικό διάλυμα φορμόλης (2,5%) και μέρος καλλιεργήθηκε σε θρεπτικό διάλυμα (BG11), ενώ ταυτόχρονα αποσπάστηκε μέρος του υποστρώματος για τη μελέτη της χημικής σύστασης του μητρικού πετρώματος (XRD). Η μικροσκοπική παρατήρηση φυσικού και καλλιεργημένου υλικού απεκάλυψε την παρουσία 44 κυανοβακτηρίων μεταξύ των οποίων ένας ενδιαφέρων μορφότυπος (οικ. Pseudanabaenaceae) με έντονη παρουσία φυκοερυθρίνης στα κύτταρα και πολυάριθμα μικροσκοπικά κοκκία στο επάκριο κύτταρο, γνωρίσματα που δεν επέτρεψαν την ταυτοποίηση με κάποιο γνωστό από τη βιβλιογραφία είδος. Ο μορφότυπος απομονώθηκε σε αξενική μονοκαλλιέργεια και μελετήθηκε με οπτική και ηλεκτρονική μικροσκοπία (LM, SEM, TEM). Η μελέτη ολόκληρου του 16S rRNAγονιδίου έδειξε 99% ομοιότητα με το στέλεχος *Leptolyngbya* sp. VRUC135 (GenBank-X84809), το οποίο αναγνωρίζεται ως το 'τυπικό είδος' (*O. subterranea*) του πρόσφατως καθιερωθέντος μονοτυπικού γένους *Oculatella* Zammit, Billi & Albertano 2012. Επιπροσθέτως έγινε ποσοτικός προσδιορισμός των ολικών λιπιδίων και ανάλυση της σύστασης αυτών σε λιπαρά οξέα με αέρια χρωματογραφία, ενώ υπό εξέλιξη είναι περαιτέρω αναλύσεις των λιπιδίων. Τα νέα ευρήματα εδραιώνουν την υπόσταση του νέου γένους *Oculatella* και παρέχουν πληροφορίες για τη λιπιδική του σύσταση.

Further findings from cave Daveli (mountain Pentelikon, Attica) enhancing the establishment of the new genus *Oculatella* Zammit, Billi & Albertano 2012 (Cyanobacteria, Pseudanabaenaceae)

Christodoulou M.¹, Parmakelis A.¹, Meletiou-Christou M-S.², Economou-Amilli A.¹, Pantazidou A.¹.

¹ Faculty of Biology, Department of Ecology and Systematics, NKUA,

² Faculty of Biology, Department of Botany, NKUA

Caves represent a relatively closed and stable ecosystem where the progressive reduction of natural light controls the growth of photosynthetic microorganisms. Due to the specific environmental conditions prevailing in the oligotrophic environments of caves, several new cyanobacterial taxa have already been established worldwide. Cyanobacterial assemblages were collected from the limestone cave Daveli (mountain Pentelikon, Attica) during an annual survey (2010-2011). Four sampling sites were selected from the cave entrance inwards, and the main abiotic parameters (PAR, T, RH) were measured at each site. The collected material was partly fixed with formaldehyde solution 2.5% and partly kept alive for culturing (BG11 liquid medium). XRD analysis was applied for analyzing the chemical composition of the limestone substrate. Microscopic observation revealed the presence of 44 taxa of Cyanobacteria including a filamentous morphotype (fam. Pseudanabaenaceae) with high amount of phycoerythrin in the cells and several microscopic granules in the apical cell, features not allowing a safe identification. This morphotype was isolated in axenic cultures and studied under LM, SEM, TEM. The 16S rRNA gene analysis revealed 99% similarity with *Leptolyngbya* sp. VRUC135 (GenBank-X84809), a strain now recognized as the type-species (*O. subterranea*) of the newly established genus *Oculatella* Zammit, Billi & Albertano 2012. Furthermore, samples were analyzed for quantification of total lipids and determination of fatty acids composition by gas chromatography. These new findings corroborate the establishment of the new genus *Oculatella* and provide information on the lipid composition of the type species.

Βιοποικιλότητα στελεχών *Listeria monocytogenes* και *Escherichia coli* O157:H7 που απομονώθηκαν από δείγματα φρέσκων λαχανικών

Χατζηλούκα Α., Κατσάρου Α., Παραμυθιώτης Σ., Δροσινός Ε.Χ.

Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων και Ποτών, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Η έρευνα πραγματοποιήθηκε με σκοπό τη μελέτη της βιοποικιλότητας των μικροοργανισμών *Listeria monocytogenes* και *Escherichia coli* O157:H7 που απομονώθηκαν από δείγματα ρόκας (*Eruca sativa*), αγγουριού (*Cucumis sativus*) και φράουλας (*Fragaria ananassa*), καθώς και την ανίχνευση γονιδίων που συνδέονται με λοιμοτοξικότητα. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε μελέτη γονοτυπικής ποικιλομορφίας και γονιδίων λοιμοτοξικότητας και για τους δύο μικροοργανισμούς. Επιπλέον, για τον μικροοργανισμό *L. monocytogenes* πραγματοποιήθηκε και ορολογική τυποποίηση των απομονώσεων με πολλαπλή PCR (mPCR), ενώ γονίδια στόχοι ήταν τα *lmo0737*, *ORF2110*, *lmo1118* και *ORF2110* για την κατάταξη των στελεχών σε έναν από τους ορότυπους 1/2a, 1/2b, 1/2c και 4b. Η μελέτη της γονοτυπικής ποικιλομορφίας βασίστηκε στις τεχνικές RAPD-PCR και *ger*-PCR. Η πρώτη πραγματοποιήθηκε με χρήση των εκκινητών HLWL85, M13 και UBC155 και η δεύτερη με χρήση του εκκινητή (GTG)₅. Τέλος, για την ανίχνευση των παθογόνων γονιδίων πραγματοποιήθηκε εξειδικευμένη PCR. Από την ορολογική τυποποίηση του μικροοργανισμού *L. monocytogenes* διαπιστώθηκε ότι το σύνολο των στελεχών ανήκε στην ορολογική ομάδα 4b. Με τις τεχνικές RAPD και *ger*-PCR διαχωρίστηκαν τα στελέχη των μικροοργανισμών που απομονώθηκαν, συνεισφέροντας με αυτόν τον τρόπο στη διερεύνηση της γενετικής παραλλακτικότητας των μικροοργανισμών. Συγκεκριμένα, τα στελέχη που απομονώθηκαν τόσο για τον *L. monocytogenes* όσο και για τον *E. coli* O157:H7 ήταν διαφορετικά μεταξύ τους, ακόμα κι αν προέρχονταν από το ίδιο δείγμα. Τέλος, η μελέτη γονιδίων λοιμοτοξικότητας στον μικροοργανισμό *L. monocytogenes* οδήγησε σε ανίχνευση ορισμένων μόνο γονιδίων (π.χ. *plcB*, *plcA*, *actA*, *hlyA*). Ομοίως, στον μικροοργανισμό *E. coli* O157:H7 ανιχνεύτηκαν τα γονίδια (*stx2*, *eae*) καθώς και παραλλαγές τους (*eael*), ενώ άλλα γονίδια δεν εντοπίστηκαν (π.χ. *stx1*).

Biodiversity of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 strains isolated from fresh vegetables

Hadjilouka A., Katsarou A., Paramithiotis S., Drosinos E.H.

Laboratory of Food Quality Control and Hygiene, Department of Food Science and Technology, Agricultural University of Athens.

The aim of the present study was to assess the biodiversity of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 strains isolated from rocket (*Eruca sativa*), cucumber (*Cucumis sativus*) and strawberry (*Fragaria ananassa*) samples, as well as the detection of virulence-associated genes. Furthermore, *L. monocytogenes* isolates were serotyped by targeting *lmo0737*, *ORF2110*, *lmo1118* and *ORF2110* by multiplex PCR. Genotypic diversity was assessed by RAPD-PCR using M13, UBC155 and HLWL85 as primers and by rep-PCR using (GTG)₅ as primer. It has been exhibited that all *L. monocytogenes* strains belonged to 4b serotype. Genotyping was very effective as it managed to differentiate all isolates, even if they originated from the same sample. Finally, many virulence associated genes such as *plcB*, *plcA*, *actA*, *hlyA* regarding *L. monocytogenes* and *stx2*, *eae* and some of their variants regarding *E. coli* O157:H7 have been detected.

Μελέτη της παραδοσιακής ζύμωσης ανώριμων ανθοκεφαλών του φυτού *Cynara cardunculus*

Βρέλλη1 Α., Παραμυθιώτης1 Σ., Δουλγεράκη2 Α.Ι., Νυχάς2 Γ.Ι.Ε., Δροσινός1 Ε.Χ.

1Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων και Ποτών, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

2Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της αυθόρμητης ζύμωσης ανώριμων ανθοκεφαλών του φυτού *Cynara cardunculus* (αγκινάρα) με βάση μια παραδοσιακή μέθοδο που ακολουθείται στη νότια Ελλάδα. Οι ανώριμες ανθοκεφαλές καθαρίστηκαν από τα εξωτερικά φύλλα, τεμαχίστηκαν, εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα άλμης (8%) με χυμό λεμονιού και αφού ζεματίστηκαν τοποθετήθηκαν σε βάζα ώστε να πραγματοποιηθεί η ζύμωση σε θερμοκρασία δωματίου. Η εξέλιξη της ζύμωσης μελετήθηκε μέσω της μεταβολής της τιμής του pH, της ολικής ογκομετρούμενης οξύτητας και της ποσοτικής και ποιοτικής σύστασης της μικροχλωρίδας. Χρησιμοποιήθηκαν κλασικές μικροβιολογικές τεχνικές για την αρίθμηση του μικροβιακού πληθυσμού αλλά και τεχνικές που δε βασίζονται στην καλλιέργεια των μικροοργανισμών (DGGE). Η ταυτοποίηση της επικρατούσας μικροχλωρίδας πραγματοποιήθηκε αρχικά με ομαδοποίηση με SDS-PAGE των ολικών κυτταρικών πρωτεϊνών, RAPD-PCR και *ger*-PCR και στη συνέχεια με αλληλούχιση του 26S ριβοσωμικού DNA αντιπροσωπευτικού αριθμού στελεχών. Η τιμή του pH και της ολικής ογκομετρούμενης οξύτητας (mL NaOH 0.1N) μεταβλήθηκε από 3.4 και 4.25 στην αρχή της ζύμωσης σε 4.5 και 5.9 στο τέλος της ζύμωσης (26η ημέρα), αντίστοιχα. Όπως προέκυψε από τις μικροβιολογικές αναλύσεις, η ζύμωση πραγματοποιήθηκε από στελέχη του είδους *Hanseniaspora uvarum*, των οποίων ο πληθυσμός αυξήθηκε από 4.2 log cfu mL⁻¹ σε 6.7 log cfu mL⁻¹.

Study of the traditional fermentation of *Cynara cardunculus* unripe flowers

Vrelli¹ A., Paramithiotis¹ S., Doulgeraki² A.I., Nychas² G.J.E., Drosinos¹ E.H.

¹*Laboratory of Food Quality Control and Hygiene, Department of Food Science and Technology, Agricultural University of Athens.*

²*Laboratory of Microbiology and Biotechnology of Foods, Department of Food Science and Technology, Agricultural University of Athens.*

The aim of the present study was to assess the *Cynara cardunculus* unripe flowers spontaneous fermentation that was based on a traditional procedure originating from southern Greece. Unripe flowers were peeled, cut and submerged in a brine solution (8%) containing lemon juice. Then, after treatment with boiling water, they were placed in room temperature for fermentation to occur. Fermentation was monitored by measuring pH and total titratable acidity (TTA) values as well as by qualitative and quantitative assessment of the microbiota. The latter was performed by classical microbiological techniques as well as culture-independent ones (DGGE). Clustering was performed by SDS-PAGE of whole cell proteins, RAPD-PCR and rep-PCR and identification by sequencing of the 26S-rRNA gene. The initial pH and TTA (mL NaOH 0.1N) values were 3.4 and 4.25 whereas at the final day of fermentation (26th day) they were 4.5 and 5.9, respectively. Yeasts prevailed the fermentation; their population increased from 4.2 log cfu mL⁻¹ to 6.7 log cfu mL⁻¹ and dominated the yeast population.

Ανίχνευση αλληλουχιών-δεικτών γενετικής τροποποίησης σε γαλακτοκομικά προϊόντα

Παραμυθιώτης Σ., Αδράκται Ν., Σιγάλας Κ., Δροσινός Ε.Χ., Προεστός Χ.

¹ Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων και Ποτών, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

² Εργαστήριο Χημείας Τροφίμων, Τμήμα Χημείας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η ανίχνευση αλληλουχιών-δεικτών γενετικής τροποποίησης σε γαλακτοκομικά προϊόντα που διατίθενται στην ελληνική αγορά. Συνολικά εξετάστηκαν 133 δείγματα, εκ των οποίων 31 δείγματα γιαούρτης και 27 δείγματα γάλακτος διαφόρου λιποπεριεκτικότητας καθώς και 75 δείγματα διαφόρων ειδών τυριών. Η μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκε περιελάμβανε τον εντοπισμό του 35S προαγωγέα του ιού του μωσαϊκού του κουνουπιδιού (*Brassica oleracea* L.) (P35S), της ληκτικής αλληλουχίας του γονιδίου της συνθέσεως της νοπαλίνης του *Agrobacterium tumefaciens* (T-nos), της περιοχής συνένωσης μεταξύ του πεπτιδίου διαμερισματοποίησης στους χλωροπλάστες (*ctp2*) του γονιδίου *epsps* του *Arabidopsis thaliana* και του γονιδίου *epsps* από το *A. tumefaciens* στέλεχος CP4, του γονιδίου *bar* από το *Streptomyces hygrosopicus* και του γονιδίου *pat* από το *S. viridochromogenes* μέσω εξειδικευμένης αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR). Η ανίχνευση ενός ή περισσότερων αλληλουχιών-δεικτών θα ήταν ενδεικτική επιμόλυνσης του προϊόντος με γενετικό υλικό από ζωοτροφές, για την παρασκευή των οποίων είχαν χρησιμοποιηθεί και γενετικά τροποποιημένες πρώτες ύλες. Μετά την εξέταση των δειγμάτων δεν διαπιστώθηκε η παρουσία κάποιας από τις αλληλουχίες-δείκτες γενετικής τροποποίησης.

Detection of GMO screening elements in dairy products

Paramithiotis¹ S., Adrakta¹ N., Sigala² K., Drosinos¹ E.H., Proestos² H.

¹ *Laboratory of Food Quality Control and Hygiene, Department of Food Science and Technology, Agricultural University of Athens.*

² *Laboratory of Food Chemistry, Department of Chemistry, National and Kapodistrian University of Athens.*

The aim of the present study was to detect GMO screening elements in dairy products commercially available in Greece. A total of 133 samples were examined, including 31 yoghurt and 27 milk samples of varying fat content as well as 75 samples of various cheese types. The matrix approach was applied, including detection by specific PCR of the 35S cauliflower mosaic virus promoter (P35S), the nopaline synthase terminator by *Agrobacterium tumefaciens* (T-nos), the junction region between the chloroplast transit peptide 2 (CTP2) sequence from the *Arabidopsis thaliana epsps* gene and the *epsps* gene from *Agrobacterium tumefaciens* strain CP4, the *bar* gene by *Streptomyces hygrosopicus* and the *pat* gene by *Streptomyces viridochromogenes*. Detection of one or more of these screening elements could be due to contamination of the product with feed DNA that has been produced with the incorporation of genetically modified raw materials. No presence of the GMO screening elements in the dairy products examined has been verified.

Επίδραση θειώδους ανυδρίτη στην δυναμική του αυτόχθονου πληθυσμού των ζυμών κατά την αυθόρμητη ερυθρή οινοποίηση *Vitis vinifera cultivar Agiorgitiko*

Πατεράκη Χ., Παραμυθιώτης Σ., Δουλγεράκης Α.Ι., Καλλίθρακα Σ., Κοτσερίδης Γ., Δροσινός Ε.Χ.

¹ Εργαστήριο Μηχανικής Τροφίμων, Επεξεργασίας και Συντήρησης Γεωργικών Προϊόντων, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

² Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων και Ποτών, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

³ Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να μελετηθεί η επίδραση του θειώδους ανυδρίτη στην αυθόρμητη ερυθρή οινοποίηση με την χρήση σταφυλιών της ποικιλίας Αγιωργίτικο. Το γλεύκος κατανεμήθηκε σε 6 δοχεία 12 λίτρων και ακολούθησε η προσθήκη 80 mg/L μεταδιθειώδους καλίου στα 3 εξ' αυτών. Η εξέλιξη της ζύμωσης μελετήθηκε μέσω της μεταβολής της πυκνότητας, του ελεύθερου και ολικού θειώδους ανυδρίτη. Παράλληλα χρησιμοποιήθηκαν κλασικές μικροβιολογικές τεχνικές για την αρίθμηση του μικροβιακού πληθυσμού αλλά και τεχνικές που δε βασίζονται στην καλλιέργεια των μικροοργανισμών (DGGE). Η ταυτοποίηση της επικρατούσας μικροχλωρίδας πραγματοποιήθηκε αρχικά με ομαδοποίηση με SDS-PAGE των ολικών κυτταρικών πρωτεϊνών, RAPD-PCR και *ger*-PCR και στη συνέχεια με αλληλούχιση του 26S ριβοσωμικού DNA αντιπροσωπευτικού αριθμού στελεχών. Η τιμή του pH και η θερμοκρασία παρέμειναν σταθερές καθ' όλη τη διάρκεια της ζύμωσης στα επίπεδα του 3,4 και των 22°C, αντίστοιχα. Ο ελεύθερος και ο ολικός θειώδης ανυδρίτης ήταν 11,5 ppm και 29,4 ppm στην αρχή και 16,6 ppm και 38,4 ppm στο τέλος της ζύμωσης, αντίστοιχα. Η ολική ογκομετρούμενη οξύτητα κυμάνθηκε από 6 έως 9 (g τρυγικού οξέως ανά λίτρο οίνου). Όπως προέκυψε από τις αναλύσεις που στηρίχθηκαν σε τεχνικές με προηγούμενη καλλιέργεια των μικροοργανισμών, απουσία του θειώδους ανυδρίτη συμμετείχαν στη ζύμωση τα είδη *Saccharomyces cerevisiae*, *Hanseniaspora uvarum*, *Metschnikowia pulcherrima* και *Lanchancea thermotolerans* με τελική επικράτηση του είδους *S. cerevisiae*. Παρουσία του θειώδους ανυδρίτη non-*Saccharomyces* είδη παρατηρήθηκαν μόνο την πρώτη μέρα της ζύμωσης, ενώ από τη μέση έως το τέλος επικράτησε το είδος *S. cerevisiae*. Όσον αφορά στην ποικιλομορφία των στελεχών του είδους *S. cerevisiae*, ήταν μεγαλύτερη απουσία του θειώδους ανυδρίτη. Παράλληλα, με την PCR-DGGE διαπιστώθηκε η ύπαρξη μόνο των ειδών *S. cerevisiae* και *H. uvarum* απουσία θειώδους ανυδρίτη καθώς επίσης και την πρώτη μέρα της ζύμωσης παρουσία θειώδους ανυδρίτη και του είδους *S. cerevisiae* στις υπόλοιπες φάσεις της ζύμωσης.

Effect of sulfur dioxide in wild yeast population dynamics during spontaneous red wine fermentation from *Vitis vinifera* cultivar Agiorgitiko

Pateraki¹ C., Paramithiotis² S., Doulgerakis A.I., Kallithraka¹ S., Kotseridis¹ G., Drosinos² E.H.

¹ *Laboratory of Food Process Engineering, Department of Food Science and Technology, Agricultural University of Athens.*

² *Laboratory of Food Quality Control and Hygiene, Department of Food Science and Technology, Agricultural University of Athens.*

³ *Laboratory of Microbiology and Biotechnology of Foods, Department of Food Science and Technology, Agricultural University of Athens.*

In the present study the effect of sulfur dioxide in the microbial population dynamics during spontaneous red wine fermentation from the Greek cultivar Agiorgitiko was monitored. Fermentation was carried out in 12 litre bottles without and with 80 mg/L metabisulfite, in triplicate. Fermentation was monitored by measuring density, total and free sulfur dioxide, as well as by qualitative and quantitative assessment of the microbiota. The latter was performed by classical microbiological techniques as well as culture-independent ones (DGGE). In addition, clustering of the isolates was performed by SDS-PAGE of whole cell proteins, RAPD-PCR and rep-PCR and identification by sequencing of the 26S-rRNA gene. Initial pH and temperature remained stable at 3.4 and 22°C, respectively. Total and free sulfur dioxide was 11,5 ppm and 29,4 ppm in the beginning and 16,6 ppm and 38,4 ppm at the end of fermentation, respectively. Total titratable acidity (TTA) was observed between 6 and 9 (g tartaric acid/liter). In the absence of SO₂ *Saccharomyces cerevisiae*, *Hanseniaspora uvarum*, *Metschnikowia pulcherrima* and *Lanchancea thermotolerans* were detected during fermentation with *S. cerevisiae* dominating the yeast population. In SO₂ presence, non-*Saccharomyces* species were observed in the first day of fermentation, while *S. cerevisiae* dominated at last. Genotypic diversity of *S. cerevisiae* was larger in the absence of SO₂. PCR-DGGE demonstrated only *S. cerevisiae* and *H. uvarum* in the absence of SO₂ and also in the first day of the fermentation with SO₂, while *S. cerevisiae* prevailed in the rest sampling points of the fermentation with SO₂.

Δυναμική μικροβιακών πληθυσμών κατά την αυθόρμητη ζύμωση νεαρών βλαστών του φυτού *Asparagus officinalis*

Καραχασάνη¹ Α., Παραμυθιώτης² Σ., Δουλγεράκης Α.Ι., Νυχάζ² Γ.Ι.Ε., Δροσινός¹ Ε.Χ.

¹ Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων και Ποτών, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

² Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της αυθόρμητης ζύμωσης νεαρών βλαστών του φυτού *Asparagus officinalis* (σπαράγγι) με βάση μια παραδοσιακή μέθοδο που ακολουθείται στη βόρεια Ελλάδα. Οι νεαροί βλαστοί μετά την έκπλυσή τους με νερό, τεμαχίστηκαν και τοποθετήθηκαν σε διάλυμα άλμης (8%) σε θερμοκρασία δωματίου. Η εξέλιξη της ζύμωσης μελετήθηκε μέσω της μεταβολής της τιμής του pH, της ολικής ογκομετρούμενης οξύτητας και της ποσοτικής και ποιοτικής σύστασης της μικροχλωρίδας. Χρησιμοποιήθηκαν κλασικές μικροβιολογικές τεχνικές για την αρίθμηση του μικροβιακού πληθυσμού αλλά και τεχνικές που δε βασίζονται στην καλλιέργεια των μικροοργανισμών (DGGE). Η ταυτοποίηση της επικρατούσας μικροχλωρίδας πραγματοποιήθηκε αρχικά με ομαδοποίηση με SDS-PAGE των ολικών κυτταρικών πρωτεϊνών και ger-PCR και στη συνέχεια με αλληλούχιση του 16S ριβοσωμικού DNA αντιπροσωπευτικού αριθμού στελεχών. Η τιμή του pH και της ολικής ογκομετρούμενης οξύτητας (% γαλακτικό οξύ) μεταβλήθηκε από 6.85 και 0.04 στην αρχή της ζύμωσης σε 4.43 και 0.29 στο τέλος της ζύμωσης (31η ημέρα), αντίστοιχα. Όπως προέκυψε από τις μικροβιολογικές αναλύσεις, η ζύμωση πραγματοποιήθηκε από γαλακτικά βακτήρια, των οποίων ο πληθυσμός αυξήθηκε από 1.6 10⁴ cfu mL⁻¹ σε 3.7 10⁷ cfu mL⁻¹ με τελική επικράτηση των ειδών *Weissella cibaria* και *Weissella viridescens*.

Microbial population dynamics during spontaneous fermentation of *Asparagus officinalis* young sprouts

Karachasani¹ A., Paramithiotis¹ S., Doulgeraki² A.I., Nychas² G.J.E., Drosinos¹ E.H.

¹ *Laboratory of Food Quality Control and Hygiene, Department of Food Science and Technology, Agricultural University of Athens.*

² *Laboratory of Microbiology and Biotechnology of Foods, Department of Food Science and Technology, Agricultural University of Athens.*

The aim of the present study was to assess the *Asparagus officinalis* young sprouts spontaneous fermentation that was based on a traditional procedure originating from northern Greece. Young asparagus sprouts were cut, submerged in a brine solution (8%) and placed in room temperature for fermentation to occur. Fermentation was monitored by measuring pH and total titratable acidity (TTA) values as well as by qualitative and quantitative assessment of the microbiota. The latter was performed by classical microbiological techniques as well as culture-independent ones (DGGE). Clustering was performed by SDS-PAGE of whole cell proteins and rep-PCR and identification by sequencing of the 16S-rRNA gene. The initial pH and TTA (% lactic acid) values were 6.85 and 0.04 whereas at the final day of fermentation (31th day) they were 4.43 and 0.29, respectively. Lactic acid bacteria prevailed the fermentation; their population increased from 1.6 10⁴ cfu mL⁻¹ to 3.7 10⁷ cfu mL⁻¹ while *Weissella cibaria* and *Weissella viridescens* dominated the lactic acid bacteria population.

Μικροβιολογική ποιότητα τουρσιών και ικανότητα επιβίωσης των παθογόνων *Salmonella Typhimurium* και *Listeria monocytogenes*

Κανέλλου Γ., Παραμυθιώτης Σ., Ματαράγκας Μ., Δροσινός Ε.Χ.

Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων και Ποτών, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η αποτύπωση των φυσικοχημικών και μικροβιολογικών χαρακτηριστικών των τουρσιών σε άλμη, που διατίθενται στην ελληνική αγορά, συσκευασμένων ή μη, καθώς και η διερεύνηση της δυνατότητας επιβίωσης των παθογόνων μικροοργανισμών *Salmonella Typhimurium* και *Listeria monocytogenes* μετά από ενοφθαλμισμό με πληθυσμό 10² και 10⁴ cfu mL⁻¹ (challenge test) και συντήρηση σε θερμοκρασία 4°C. Η τιμή του pH και της ολικής ογκομετρούμενης οξύτητας (mL NaOH 0.1N) της άλμης και των στερεών συστατικών κυμάνθηκε από 3,21-4,21 και 3,23-4,23 και από 7,10-23,2 και 7,0-22.0, αντίστοιχα. Η % σύσταση σε NaCl κυμάνθηκε από 1,70-10,53 και 1,70-8,80, αντίστοιχα. Στην πλειοψηφία των δειγμάτων δεν ανιχνεύθηκαν μικροβιακοί πληθυσμοί, ενώ σε εκείνα που ανιχνεύθηκαν κυμάνθηκαν από 1.47-4.98 log cfu g⁻¹. Η τιμή του pH διαπιστώθηκε ότι ήταν η πιο σημαντική παράμετρος (hurdle) για την επιβίωση των παθογόνων μικροοργανισμών. Τέλος, και τα δύο στελέχη των παθογόνων μικροοργανισμών επιβίωσαν στα περισσότερα από τα προϊόντα που ενοφθαλμίστηκαν μετά από πέντε ημέρες συντήρησης σε θερμοκρασία 4°C.

Field study on the microbiological quality of pickles in brine and survival of *Salmonella* Typhimurium and *Listeria monocytogenes* during storage at 4°C

Kanellou G., Paramithiotis S., Mataragas M., Drosinos E.H.

Laboratory of Food Quality Control and Hygiene, Department of Food Science and Technology, Agricultural University of Athens.

The aim of this study was to assess the microbiological quality and the ability of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strains to survive during storage at 4°C of all available brand names of brined pickles and some in-bulk ones, in the district of Athens. None of the samples could be characterized as heavily contaminated. The microbial populations detected could be due to inadequacy of packaging, regarding the ones available in-bulk and improper thermal treatment in the case of the canned ones. Moreover, the ability of both pathogens to survive for 5 days at 4°C, in some products, has been exhibited.

Επιπολασμός των μικροοργανισμών *L. monocytogenes* και *E. coli* O157:H7 σε δείγματα ρόκας (*Eruca sativa*), αγγουριού (*Cucumis sativus*) και φράουλας (*Fragaria ananassa*)

Χατζηλούκα Α., Μαντζουράνη Κ.-Σ., Κούμπου Β., Παραμυθιώτης Σ., Ματαράγκας Μ., Δροσινός Ε.Χ.

Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων και Ποτών, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Η μελέτη πραγματοποιήθηκε με σκοπό τον υπολογισμό της συχνότητας εμφάνισης (επιπολασμού) των μικροοργανισμών *Listeria monocytogenes* και *Escherichia coli* O157:H7 σε έτοιμα προς κατανάλωση φρέσκα προϊόντα και συγκεκριμένα σε ρόκα, αγγούρια και φράουλες. Η ανίχνευση του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* πραγματοποιήθηκε βάσει του προτύπου ISO 11290-1:1996/ Amd 1:2004. Ως θρεπτικό υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε το ALOA, ενώ πραγματοποιήθηκε και παράλληλη χρήση του επιλεκτικού, χρωμογόνου θρεπτικού υποστρώματος RAPID[®] L.mono. Η επιβεβαίωση των ύποπτων δειγμάτων που ανιχνεύθηκαν από τα θρεπτικά υποστρώματα πραγματοποιήθηκε με βιοχημικές και μοριακές αναλύσεις. Οι βιοχημικές δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν ήταν οι δοκιμές κινητικότητας, αιμόλυσης και ζύμωσης σακχάρων, ενώ για την μοριακή ταυτοποίηση του μικροοργανισμού πραγματοποιήθηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR). Η ανίχνευση του μικροοργανισμού *Escherichia coli* O157:H7 πραγματοποιήθηκε βάσει του προτύπου ISO 16654:2001. Ως θρεπτικό υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε το CT-SMAC, ενώ πραγματοποιήθηκε και παράλληλη χρήση του επιλεκτικού, χρωμογόνου θρεπτικού υποστρώματος Fluorocult. Η επιβεβαίωση των ύποπτων δειγμάτων που ανιχνεύθηκαν από τα θρεπτικά υποστρώματα πραγματοποιήθηκε βιοχημικά και μοριακά. Η βιοχημική επιβεβαίωση πραγματοποιήθηκε μέσω του *E. coli* O157:H7 Latex Test και η μοριακή ταυτοποίηση μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR). Βάσει των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από τις βιοχημικές και μοριακές αναλύσεις, ο επιπολασμός του *Listeria monocytogenes* υπολογίστηκε στη ρόκα 7%, στα αγγούρια 6% και στις φράουλες 3,8%, ενώ ο επιπολασμός του *Escherichia coli* O157:H7, υπολογίστηκε στη ρόκα 7%, στα αγγούρια 3% και στις φράουλες 3.8%. Τέλος, μέσω υπολογισμού των παραμέτρων επίδοσης των θρεπτικών υποστρωμάτων συνίσταται η παράλληλη χρήση περισσότερων του ενός επιλεκτικών θρεπτικών υποστρωμάτων για την ανίχνευση των μικροοργανισμών.

Prevalence of *Listeria monocytogenes* and *E. coli* O157:H7 in rocket (*Eruca sativa*), cucumber (*Cucumis sativus*) and strawberry (*Fragaria ananassa*) samples

Hadjilouka A., Mantzourani K.-S., Koubou V., Paramithiotis S., Mataragas M., Drosinos E.H.

Laboratory of Food Quality Control and Hygiene, Department of Food Science and Technology, Agricultural University of Athens.

The aim of the present study was to determine the prevalence of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in ready to eat fresh products and specifically in rocket, cucumbers and strawberries. The detection of *Listeria monocytogenes* was based on ISO 11290-1:1996/ Amd 1:2004. The culture media that was used was ALOA with a concomitant use of the selective, chromogenic culture medium RAPID' L.mono. The confirmation of the suspect colonies was performed by biochemical tests and molecular analyses. The biochemical tests performed were motility tests, hemolysis tests as well as rhamnose and xylose fermentation. Finally, polymerase chain reaction (PCR) was held, for the molecular identification of the microorganism. The detection of *Escherichia coli* O157:H7 was performed according to ISO 16654:2001. The culture media used was CT-SMAC with a concomitant use of the selective, chromogenic culture medium Fluorocult. The confirmation of suspect colonies was performed by *E. coli* O157:H7 Latex Test and specific polymerase chain reaction (PCR). Based on the results of biochemical tests and molecular analyses, the prevalence of the microorganism *Listeria monocytogenes* was 7% in rocket, 6% in cucumbers and 3,8 % in strawberries, while the prevalence of the microorganism *Escherichia coli* O157: H7 was 7% in rocket, 3% in cucumbers and 3.8% in strawberries. Finally the concomitant use of more than one chromogenic media for accurate estimation of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 prevalence is necessary.

Μελέτη της παραδοσιακής ζύμωσης τομάτας αρχόμενου βαθμού ωριμότητας

Κουρέτας Κ., Παραμυθιώτης Σ., Δροσινός Ε.Χ.

Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων και Ποτών, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της αυθόρμητης ζύμωσης τομάτας αρχόμενου βαθμού ωριμότητας με βάση μια παραδοσιακή μέθοδο που ακολουθείται στη βόρεια Ελλάδα. Τομάτες διαφορετικού αρχόμενου βαθμού ωριμότητας μετά την έκπλυσή τους με νερό και την επιφανειακή τομή τους τοποθετήθηκαν σε διάλυμα άλμης (8%) σε θερμοκρασία δωματίου. Η εξέλιξη της ζύμωσης μελετήθηκε μέσω της μεταβολής της τιμής του pH, της ολικής ογκομετρούμενης οξύτητας και της ποσοτικής και ποιοτικής σύστασης της μικροχλωρίδας. Χρησιμοποιήθηκαν κλασικές μικροβιολογικές τεχνικές για την αρίθμηση του μικροβιακού πληθυσμού και η ταυτοποίηση της επικρατούσας μικροχλωρίδας πραγματοποιήθηκε αρχικά με ομαδοποίηση με RAPD-PCR και *ger*-PCR και στη συνέχεια με αλληλούχιση του 16S ριβοσωμικού DNA αντιπροσωπευτικού αριθμού στελεχών. Σημαντικές διαφορές στις αρχικές τιμές του pH και της ολικής ογκομετρούμενης οξύτητας (TTA-% γαλακτικό οξύ) διαπιστώθηκαν που αποδίδονται στην διαφοροποίηση του βαθμού ωριμότητας. Έτσι, μετά την εμβάπτιση στην άλμη, οι αρχικές τιμές pH και TTA ήταν 4.02 και 0.1, 4.57 και 0.04 καθώς και 5.17 και 0.03, οι οποίες στο τέλος της ζύμωσης (35η ημέρα) διαμορφώθηκαν σε 3.71 και 0.41, 3.94 και 0.41 καθώς και 3.48 και 0.42, αντίστοιχα. Σε όλες τις περιπτώσεις επικράτησαν τα γαλακτικά βακτήρια με το είδος *Leuconostoc mesenteroides* να επικρατεί της ζύμωσης στις δύο πρώτες περιπτώσεις ενώ στην τελευταία περίπτωση να συνοδεύεται από τα είδη *Leu. citreum* και *Lactobacillus casei/paracasei*.

Study of the traditional fermentation of unripe tomatoes

Kouretas K., Paramithiotis S., Drosinos E.H.

Laboratory of Food Quality Control and Hygiene, Department of Food Science and Technology, Agricultural University of Athens.

The aim of the present study was the assessment of spontaneous unripe tomatoes fermentation that was based on a traditional procedure originating from northern Greece. Unripe tomatoes were washed, submerged in a brine solution (8%) and placed in room temperature for fermentation to occur. Fermentation was monitored by measuring pH and total titratable acidity (TTA) values as well as by qualitative and quantitative assessment of the microbiota. The latter was performed by classical microbiological techniques. Clustering was performed by RAPD-PCR and rep-PCR and identification by sequencing of the 16S-rRNA gene. Significant differences in the initial pH and TTA (% lactic acid) have been assigned to the different degree of ripeness. Thus, the initial pH and TTA values were 4.02 and 0.1, 4.57 and 0.04 as well as 5.17 and 0.03, which at the end of fermentation (35th day) were 3.71 and 0.41, 3.94 and 0.41 as well as 3.48 and 0.42, respectively. Lactic acid bacteria drove the fermentation in all cases with *Leuconostoc mesenteroides* dominating the first two cases, whereas in the last it was accompanied by *Leu. citreum* and *Lactobacillus casei/paracasei*.

Είναι οι δενδρόμορφοι μυκορριζικοί μύκητες ευαίσθητοι στα γεωργικά φάρμακα; η περίπτωση του ζιζανιοκτόνου nicosulfuron

Παπαδοπούλου Ε.,^{1,7} Υψηλάντης Ι.,² Μενκίσογλου-Σπυρούδη Ο.,¹ Kandeler E,³ Petric I.,⁴ Djuric S.,⁵ Martin-Laurent F,⁶ Καρπούζας Δ.Γ.⁷

¹ Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Εργ. Εδαφολογίας, Θεσσαλονίκη

² Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Εργ. Γεωργικών Φαρμάκων, Θεσσαλονίκη, Ελλάδα

³ Institute of Soil Science and Land Evaluation, University of Hohenheim, 70599 Stuttgart, Germany

⁴ Rudjer Boskovic Institute, Division of Marine & Environmental Research, Zagreb, Croatia

⁵ University of Novi Sad, Faculty of Agriculture, Lab. of Microbiology, Novi Sad, Serbia

⁶ INRA, Laboratory of Soil and Environmental Microbiology, Dijon, France

⁷ Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Λάρισα

Οι δενδρόμορφοι μυκορριζικοί μύκητες (ΔΜΜ) σχηματίζουν συμβιωτικές σχέσεις με τα περισσότερα φυτά προσφέροντας σε αυτά βελτιωμένη απορρόφηση θρεπτικών στοιχείων και ανθεκτικότητα σε συνθήκες ξηρασίας. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η επίδραση του ζιζανιοκτόνου nicosulfuron στον μυκορριζικό αποικισμό καθώς και στην σύσταση της κοινότητας των ΔΜΜ στις ρίζες φυτών καλαμποκιού τόσο σε πείραμα αγρού όσο και σε πείραμα θερμοκηπίου. Στο πείραμα θερμοκηπίου η επαναλαμβανόμενη εφαρμογή (5 κύκλοι ανά 40 ημέρες) του nicosulfuron στο έδαφος σε 4 διαφορετικές δόσεις (0, x1, x10, x100 της συνιστώμενης) οδήγησε σε εμφάνιση φυτοτοξικότητας στις δύο υψηλότερες δόσεις (x10, x100 της συνιστώμενης) και σε σημαντική μείωση του μυκορριζικού αποικισμού στα φυτά που αναπτύχθηκαν σε έδαφος που έλαβε δόση x10. Αντίθετα, η συνιστώμενη δόση δεν προκάλεσε σημαντικές μεταβολές στον μυκορριζικό αποικισμό. Στο πείραμα αγρού, μια εφαρμογή του nicosulfuron σε δόσεις x0, x1, x2 και x5 η συνιστώμενη δεν προκάλεσε σημαντικές μεταβολές στον μυκορριζικό αποικισμό. Η επίδραση του nicosulfuron στην ποικιλότητα των ΔΜΜ μελετήθηκε με την μέθοδο DGGE. Στο πείραμα θερμοκηπίου, τα δεδομένα μοριακής αποτύπωσης έδειξαν ότι όσο υψηλότερη ήταν η δόση εφαρμογή του nicosulfuron τόσο πιο έντονες ήταν οι μεταβολές στην κοινότητα των ΔΜΜ. Έτσι η επαναλαμβανόμενη εφαρμογή της x10 δόσης οδήγησε σε σταδιακή σημαντική μείωση της ποικιλότητας των ΔΜΜ στις ρίζες των φυτών καλαμποκιού με τελικό αποτέλεσμα την δραματική μείωση της ποικιλότητας των ΔΜΜ μετά την 5^η εφαρμογή. Στο πείραμα αγρού, το nicosulfuron προκάλεσε μόνο μικρές μεταβολές στην κοινότητα των ΔΜΜ. Συγκεκριμένα μέλη της κοινότητας των ΔΜΜ εμφανίστηκαν να επηρεάζονται θετικά ή αρνητικά από την εφαρμογή του nicosulfuron και η δημιουργία βιβλιοθηκών κλώνων θα παρέχει πληροφορίες για την ταυτότητα τους.

Λέξεις κλειδιά: γεωργικά φάρμακα, δενδρόμορφοι μυκορριζικοί μύκητες

Ευχαριστίες: Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του ερευνητικού προγράμματος SEE.ERA.NETplus με ακρωνύμιο ECOFUN-MICROBIODIV και το οποίο χρηματοδοτήθηκε από την Ευρωπαϊκή Κοινότητα και το Γερμανικό Κέντρο Αεροδιαστημικής (DLR).

Are arbuscular mycorrhizal fungi responsive to pesticide applications? the case of the herbicide nicosulfuron

E. Papadopoulou,^{1,3} I. Ipsilantis,² U. Menkissoglu-Spiroudi,¹ E. Kandeler,⁴ I. Petric,⁵ S. Djuric,⁶ F. Martin-Laurent,⁷ D.G. Karpouzas³

¹ *University of Thessaly, Department of Biochemistry and Biotechnology, Larisa, Greece*

² *Aristotle University of Thessaloniki, Soil Science Laboratory, Thessaloniki, Greece*

³ *Aristotle University of Thessaloniki, Pesticide Science Laboratory, Thessaloniki, Greece*

⁴ *Institute of Soil Science and Land Evaluation, University of Hohenheim, 70599 Stuttgart, Germany*

⁵ *Rudjer Boskovic Institute, Division of Marine & Environmental Research, Zagreb, Croatia*

⁶ *University of Novi Sad, Faculty of Agriculture, Lab. of Microbiology, Novi Sad, Serbia*

⁷ *INRA, Laboratory of Soil and Environmental Microbiology, Dijon, France*

Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) form beneficial symbiotic relations with most plants and they are known to improve plant nutrition and ameliorate drought stress. We investigated the impact of a low-dose herbicide (nicosulfuron) on the colonization capacity and intraradical diversity of AMF at both laboratory and field scale. Estimation of the colonization levels in the roots of corn plants grown in soil samples exposed to five repeated applications (every 40 days) of nicosulfuron at 0, x1, x10 and x100 the recommended dose rate showed a phytotoxicity effect of the x10 and x100 dose rates on corn plants and a substantially reduced mycorrhizal colonization at the x10 dose rate, while no effect was induced by x1 dose. On the contrary, a single field application of nicosulfuron at rates of x1, x2 and x5 the recommended dose did not significantly impair the colonization capacity of AMF. The impact of nicosulfuron on the diversity of the AMF community was studied via DGGE. In the laboratory, the fingerprinting data suggested that the higher the nicosulfuron dose rate the more significant the changes in the structure of the AMF community. In particular, the repeated application of the x10 dose rate induced a gradual decrease in the diversity of AMF which turned into mycorrhizal eradication after the fifth nicosulfuron application. Field application of nicosulfuron induced mild changes in the AMF community. Certain members of the AMF community were either positively or negatively affected by nicosulfuron application and clone libraries are under way to identify these fungi

Acknowledgments: This work was performed within the frame of the SEE.ERA.NETplus project ECOFUN-MICROBIODIV funded by the European Commission and the German Aerospace Centre (DLR).

Απομόνωση, χαρακτηρισμός και γονιδιωματική ανάλυση του στελέχους *Pseudomonas putida* OPP26 που αποδομεί ταχύτατα των μυκητοκτόνο 2-phenylphenol

Perruchon C,¹ Πατσιούρα Β,¹ Βασιλειάδης Σ,² Puglisi E,² Trevisan M,² Καρπούζας Δ.Γ.¹

¹ Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Λάρισα

² Università Cattolica del Sacro Cuore, Piacenza, Italy

Το μυκητοκτόνο 2-phenylphenol (OPP) χρησιμοποιείται στα συσκευαστήρια φρούτων για την προστασία των φρούτων από μετασυλλεκτικές μυκητολογικές προσβολές κατά την αποθήκευση. Τα υγρά απόβλητα που προκύπτουν από την εφαρμογή του OPP περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις (100-1000 mg/l) του εν λόγω μυκητοκτόνου και η απευθείας απόρριψη τους στο περιβάλλον χωρίς προηγούμενη επεξεργασία αποτελεί σοβαρό περιβαλλοντικό κίνδυνο για τους φυσικούς πόρους της περιοχής. Η ΕΚ έδωσε έγκριση διάθεσης για το OPP υπό την προϋπόθεση ότι θα εγκατασταθούν στα συσκευαστήρια όπου χρησιμοποιείται συστήματα επεξεργασίας των αποβλήτων που παράγονται από την χρήση του. Παρόλα αυτά μέχρι σήμερα δεν υπάρχει κανένα αποτελεσματικό και οικονομικό σύστημα για την αποτοξικοποίηση των συγκεκριμένων αποβλήτων. Έτσι ο ευρύτερος στόχος μας ήταν μεταξύ άλλων η απομόνωση μικροοργανισμών που έχουν την ικανότητα να αποδομούν το OPP οι οποίοι μακροπρόθεσμα θα χρησιμοποιηθούν ως εμβόλια σε βιολογικά συστήματα επεξεργασίας των συγκεκριμένων αποβλήτων. Έδαφος από περιοχή της Λάρισας που χρησιμοποιείται ως χώρος απόρριψης υγρών αποβλήτων από παρακείμενο συσκευαστήριο φρούτων αποτέλεσε την πηγή απομόνωση βακτηρίων. Η μέθοδος εμπλουτισμένων καλλιεργειών οδήγησε στην απομόνωση ενός βακτηρίου που είχε την ικανότητα να αποδομεί ταχύτατα το OPP και να το χρησιμοποιεί σαν πηγή C. Αλληλούχιση του 16S rRNA γονιδίου οδήγησε στην ταυτοποίηση του στελέχους ως *Pseudomonas stutzeri*. Το συγκεκριμένο στέλεχος είχε την ικανότητα να αποδομεί 60 και 350 mg/L OPP σε 7 και 28 ημέρες αντίστοιχα. Επιπρόσθετα, αναλύσαμε το σύνολο του κυτταρικού γονιδιώματος του στελέχους (χρωμοσωμικού και πλασμιδιακού) με τη μέθοδο της τυφλής αλληλούχισης. Προκαταρκτική βιοπληροφορική ανάλυση του πρότυπου γονιδιώματος και συσχέτιση με γνωστά μεταβολικά μονοπάτια, προσέφερε ισχυρές ενδείξεις της παρουσίας πλούσιου ενζύμικου οπλοστασίου για τον πλήρη καταβολισμό αρωματικών οργανικών ρύπων (φαινόλες, διφαινύλιο, βενζοϊκό οξύ και κατεχόλη), καθώς και της παρουσίας των σχετικών πρωτεϊνών-μεταφορέων.

Λέξεις κλειδιά: 2-phenylphenol, μικροβιακή αποδόμηση, συσκευαστήρια φρούτων

Ευχαριστίες: Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε εν μέρει στα πλαίσια του ερευνητικού προγράμματος SNAC που χρηματοδοτείται από το Fondazione Cariplo.

Isolation, characterization and genomic analysis of a *P. stutzeri* strain OPP26 which is able to rapidly degrade the fungicide 2-phenylphenol

Perruchon C,¹ Πατσιούρα Β,¹ Βασιλειάδης Σ,² Puglisi E,² Trevisan M,² Καρπούζας Δ.Γ.1

¹ *University of Thessaly, Department of Biochemistry and Biotechnology, Larisa, Greece*

² *Universita Cattolica del Sacro Cuore, Piacenza, Italy*

The fungicide 2-phenylphenol (OPP) is used in postharvest treatment of fruits for the protection of fruits from fungal infestations during storage. The wastewaters produced its use contain high pesticide amounts (100-1000 mg/l) and their direct disposal into natural aquifers or in the sewage sludge systems raises serious concerns about the ecological integrity of natural resources. EC has granted authorization for OPP under the clause that effective treatment facilities to depurate the wastewaters produced by its use should be implemented in fruit-packaging plants. Currently there is no sustainable and efficient means of treating these wastewaters. Thus our aim is to isolate degrading microorganisms which could be used in depuration systems for the treatment of the wastewaters from the fruit packaging industry. A soil collected from a wastewater disposal site in Larissa was used as a source of degrading bacteria. Enrichment culture in selective media where OPP was the sole C source led to the isolation of an OPP-degrading strain identified via sequencing of its 16S rRNA gene as *Pseudomonas stutzeri* which was able to utilize OPP as a C source. The isolate was able to degrade up to 60 mg/L of OPP in 7 days and 350 mg/l in 28 days. Furthermore, we performed shotgun sequencing and assembly of the complete cell DNA content (chromosomal and plasmidic). The draft genome annotation and related pathway analysis suggested that the strain possess all the necessary enzymes to complete the degradation of several aromatic compounds including phenols, biphenyl, benzoate and catechol with associated transporters.

Acknowledgments: This work was partially supported within the frame of the SNAC project sponsored by the CARIPLO FOUNDATION.

Ανίχνευση παθογόνων μικροοργανισμών στον Χαλβά Φαρσάλων

Βαΐου, Μ., Σπανού, Α. & Γιαννούλη, Π.

Εργαστήριο Τεχνολογίας και Ελέγχου Ποιότητας και Ασφάλειας Τροφίμων, Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Βόλος

Ο "Χαλβάς Φαρσάλων" αποτελεί ένα παραδοσιακό προϊόν της περιοχής της Θεσσαλίας και είναι ημιδιαφανής, λιπαρός και έχει μια τραγανιστή κρούστα από καμένη ζάχαρη. Παρασκευάζεται με βασικά υλικά το άμυλο, το βούτυρο, το νερό και τη ζάχαρη και το ψήσιμό του πραγματοποιείται σε πολύ υψηλές θερμοκρασίες. Επειδή ο χαλβάς Φαρσάλων διατίθεται σε χώρους με υψηλό μικροβιακό φορτίο και σε θερμοκρασίες περιβάλλοντος αποτελεί εξαιρετικό υπόστρωμα επιμόλυνσεων. Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η ανίχνευση των εντεροπαθογόνων βακτηρίων *Salmonella* και *Staphylococcus aureus* στον χαλβά φαρσάλων με εφαρμογή της μοριακής μεθόδου PCR. Η *Salmonella* ανιχνεύθηκε χρησιμοποιώντας εκκινητές που στοχεύουν στην αλληλουχία *Its*. Μετά την εφαρμογή της PCR το ελάχιστο όριο πάνω από το οποίο μπορεί να γίνει επιτυχώς ανίχνευση του βακτηρίου *Salmonella* βρέθηκε ίσο με 104CFU/g χαλβά (105CFU/10g χαλβά). Επιτεύχθηκαν υψηλά επίπεδα ευαισθησίας της PCR (105 CFU/g) για το βακτήριο *S. aureus* τα οποία είναι ιδιαίτερης σημασίας, δεδομένου ότι τα επιτρεπτά όρια σε ορισμένα τρόφιμα κυμαίνονται από 10²-10³ CFU/g. Τα αποτελέσματα της μεθόδου συγκρίθηκαν με αποτελέσματα πειραμάτων μακροσκοπικού ελέγχου. Συγκεκριμένα, αναπτύχθηκαν αποικίες σε καλλιεργητικά θρεπτικά υλικά οι οποίες δεν παρουσίασαν μακροσκοπικά τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά της *Salmonella* και ακολούθησε η μελέτη τους με την PCR, η οποία έδωσε προϊόν στο αναμενόμενο μοριακό βάρος (312 bp). Παρόμοια μελέτη που να αφορά στην ανίχνευση της *Salmonella* και του *Staphylococcus aureus* σε τεχνητά μολυσμένο χαλβά Φαρσάλων δεν είναι γνωστή.

Λέξεις κλειδιά: Χαλβάς Φαρσάλων, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*

Detection of Pathogenic Bacteria in Halva Farsalon

Vaiou M., Spanou A. & Giannouli P.

Laboratory of Food Technology & Quality Control & Safety, Department of Agriculture Crop Production and Rural Environment, School of Agricultural Sciences, University of Thessaly, Volos, Greece.

Halvas Farsalon is a traditional dessert of the region of Thessaly which is semitransparent, fatty and with a crunchy top composed from burnt sugar. The basic ingredients of Halva are corn starch, butter, water and crystal sugar while for cooking needs very high temperatures. Due to the storage of halva usually at room temperature and its commercial display in feasts, Halvas gets easily under microbiological threats. The aim of this study was to detect the pathogenic bacteria *Salmonella* and *Staphylococcus aureus* in Halva Farsalon using the molecular technique of PCR. In order to detect the bacteria of *Salmonella* primers targeting the *Its* sequencing used. The minimum threshold of the concentration for the detection of *Salmonella* bacteria was achieved at 10⁴CFU/g Halva (10⁵CFU/10g Halva). High levels of sensitivity was achieved in the detection of the bacteria *S. Aureus* which are with particular important due to the permitted limits in certain foods ranging from 10² to 10³ CFU/g. The results of the molecular method were compared with the results of classic microbiology tests. Moreover, when the bacteria was grown up in growth media showed no macroscopic characteristics of the *Salmonella* but when the PCR method used gave a product at the expected molecular weight (312 bp). Similar study related to the detection of *Salmonella* and *Staphylococcus Aureus* in artificially contaminated Halva Farsalon is not known.

Keywords: Halvas Farsalon, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*

Συνδιαστική παραγωγή βιοϋδρογόνου και πολυ-υδροξυαλκανοϊκών εστέρων από βιομηχανική γλυκερόληΚΟΥΜΕΛΗΣ Ι. 1, ΔΟΥΝΑΒΗΣ Α. 1, ΝΤΑΙΚΟΥ Ι.1 ΚΑΙ ΛΥΜΠΕΡΑΤΟΣ Γ.,^{1,2}*1*ΙΤΕ/ΙΕΧΜΗ, 26504, ΠΑΤΡΑ*2*ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ, ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ, 15780, ΑΘΗΝΑ

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η διερεύνηση της δυνατότητας ταυτόχρονης παραγωγής βιοϋδρογόνου και πολυ-υδροξυαλκανοϊκών εστέρων (ΠΥΑ) από βιομηχανική γλυκερόλη, χρησιμοποιώντας συνεχές σύστημα δύο σταδίων. Το υδρογόνο είναι ένα αέριο βιοκαύσιμο μεγάλης ενεργειακής πυκνότητας που μπορεί να παραχθεί εύκολα από διάφορα οργανικά απόβλητα μέσω αναερόβιας ζύμωσης. Οι ΠΥΑ είναι ενδοκυτταρικά μικροβιακά πολυμερή με ιδιότητες παρόμοιες των πετροχημικών πλαστικών, και βρίσκουν ευρεία εφαρμογή στο τομέα συσκευασίας τροφίμων.

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας αναπτύχθηκαν δύο διαφορετικές διεργασίες βασισμένες στη χρήση μικτών μικροβιακών καλλιέργειών. Η παραγωγή βιοϋδρογόνου πραγματοποιήθηκε μέσω αναερόβιας ζύμωσης της βιομηχανικής γλυκερόλης με μικτές οξεογόνες καλλιέργειες σε συνεχή αντιδραστήρα στήλης ανοδικής ροής. Η απορροή του αντιδραστήρα προωθούνταν στη συνέχεια σε αντιδραστήρα διαλείποντος έργου περιοδικής λειτουργίας όπου πραγματοποιούνταν ο αερόβιος πολυμερισμός των ζυμωτικών προϊόντων προς παραγωγή ΠΥΑ, μέσω μικτών εμπλουτισμένων καλλιεργειών υπό.

Η απόδοση του οξεογόνου αντιδραστήρα, εκτιμήθηκε βάσει τριών κριτηρίων, δηλ. την απόδοση υδρογόνου, το μεγαλύτερο ποσοστό οξεοποίησης του υποστρώματος και την απομάκρυνση του οργανικού φορτίου. Η απόδοση υδρογόνου, φάνηκε να επηρεάζεται από το pH και την αρχική συγκέντρωση υποστρώματος. Η απόδοση του συστήματος παραγωγής ΠΥΑ υπολογίστηκε ως g ΠΥΑ/g VSS, και ως g ΠΥΑ/g COD καταναλισκόμενο. Η σύσταση του ζυμωτικού μίγματος φάνηκε να επηρεάζει σημαντικά τόσο τις αποδόσεις σε ΠΥΑ όσο και τα χαρακτηριστικά των παραγόμενων ΠΥΑ.

Combined biohydrogen and polyhydroxyalkanoates production from waste glycerolKOU MELIS I. ¹, DOUNAVIS A. ¹, NTAIKOU I.¹ AND LYBERATOS G.,^{1,2}¹FORTH/ICEHT, 26504, PATRAS²SCHOOL OF CHEMICAL ENGINEERING, NATIONAL TECHNICAL UNIVERSITY OF ATHENS, 15780, ATHENS

The aim of the present study was to investigate the feasibility of the combined biotransformation of waste glycerol to hydrogen and polyhydroxyalkanoates (PHAs) using a two stage continuous system. Hydrogen is a gaseous biofuel with high energy density that be produced via anaerobic fermentation of organic wastes, whereas PHAs is a type of intracellular microbial bioplastics that are widely used for food packaging.

Two different processes were developed using mixed microbial cultures. Biohydrogen production was based on the anaerobic fermentation of waste glycerol via mixed acidogenic cultures, in a continuous up-flow column bioreactor. The effluent of the reactor was then forwarded to a sequential batch reactor in which aerobic polymerization of the fermentation products towards PHAs was taking place, via enriched cultures under nitrogen limitation.

The performance of the acidogenic reactor was evaluated in terms of three main criteria i.e. the enhancement of hydrogen production, the higher acidification of the waste and the removal of organic load. Hydrogen production yield, measured as mol H₂/mol of consumed glycerol, was shown to be affected by pH and initial substrate concentration. The performance of the PHAs producing reactor was evaluated in terms of PHAs yield measured as g PHAs/g VSS and as g PHAs /g COD consumed. It was shown that the composition of initial substrate affected strongly not only the yields and rates of PHAs production but also the type of PHAs produced.

Γονοτυπικός πλούτος και οινολογικό δυναμικό άγριων πληθυσμών *Saccharomyces cerevisiae* από γλεύκη Αγιωργίτικου της ζώνης ΠΟΠ Νεμέας

Διαμαντέα Ε.1, Μπανίλας Γ.2, Τάσσου Χ.1, Νησιώτου Α.1

¹ Ελληνικός Γεωργικός Οργανισμός «ΔΗΜΗΤΡΑ», Ινστιτούτο Τεχνολογίας Γεωργικών Προϊόντων & Οίνου, Σ. Βενιζέλου 1, Λυκόβρυση, 141 23, Αττική

² ΤΕΙ Αθήνας, Τμήμα Οινολογίας & Τεχνολογίας Ποτών, Αγ. Σπυρίδωνος, 12210, Αιγάλεω, Αθήνα

Η εκτεταμένη χρήση εμπορικών εναρκτήριων καλλιεργειών *S. cerevisiae* στην οινοποίηση, αν και εξασφαλίζει μια επιτυχή αλκοολική ζύμωση, επισκιάζει την ενδογενή μικροχλωρίδα η οποία αναδεικνύει την ιδιαιτερότητα των οίνων που σχετίζεται με την περιοχή προέλευσης, το λεγόμενο «*terroir*». Πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι οι αμπελουργικές ζώνες μπορεί να κατέχουν γενετικά πολύ διαφορετικούς πληθυσμούς *S. cerevisiae*, παρόλο που η γνώση μας ως προς την οικολογία και τη δομή των πληθυσμών του είδους είναι περιορισμένη. Στην παρούσα εργασία διερευνήθηκε η βιοποικιλότητα του *S. cerevisiae* σε γλεύκη προερχόμενα από δεκαοχτώ αμπελώνες Αγιωργίτικου από όλη τη ζώνη ΠΟΠ Νεμέας. Τα στελέχη απομονώθηκαν από αυθόρμητες ζυμώσεις και ταυτοποιήθηκαν σε επίπεδο είδους με ανάλυση περιορισμού της 5.8S-ITS rDNA περιοχής. Οι απομονώσεις *S. cerevisiae* εξετάστηκαν περαιτέρω με ανάλυση ενζύμων περιορισμού του μιτοχονδριακού DNA και αντιστοιχήθηκαν σε περισσότερους από 80 διαφορετικούς γονότυπους προερχόμενους από διαφορετικούς αμπελώνες. Ενδεικτικά στελέχη από κάθε γονοτυπική ομάδα εξετάστηκαν στη συνέχεια ως προς βασικούς οινολογικούς χαρακτήρες με τεχνολογικό ενδιαφέρον. Η πλειονότητα των στελεχών παρουσίασαν υψηλή αντοχή στο θειώδη ανυδρίτη και την αιθανόλη, ενώ είχαν ελάχιστη δραστηριότητα β-γλυκοσιδάσης. Είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρον το γεγονός ότι σε ένα ποσοστό περίπου 30% των στελεχών παρατηρήθηκε μηδενική ή χαμηλή παραγωγή βιογενών αμινών ή υδροθείου σε συνδυασμό με ανθεκτικότητα σε τοξίνες του *S. cerevisiae*. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η περιοχή της Νεμέας αποτελεί μια ιδιαίτερα πλούσια δεξαμενή γονοτύπων *S. cerevisiae* με πολλά υποσχόμενο οινολογικό δυναμικό.

Λέξεις κλειδιά: Οίνος, αλκοολική ζύμωση, *Saccharomyces cerevisiae*

Genotypic richness and enological potential of wild *Saccharomyces cerevisiae* populations from Agiorgitiko musts of the Nemea PDO zone (Greece)

Diamantea E.1, Banilas G.2, Tassou C.1, Nisiotou A.¹

¹ *Hellenic Agricultural Organisation “DEMETER”, Institute of Technology of Agricultural Products & Wine, Sof. Venizelou 1, Lycovrissi, 141 23, Attiki*

² *Technological Educational Institute of Athens, Department of Enology & Beverage Technology, Ag. Spyridonos Str., 12210, Egaleo, Athens*

The extensive use of commercial *S. cerevisiae* starters in the winemaking process, although assures a successful alcoholic fermentation, obscures the native microbiota that enhances the typicality of wines associated with a specific *terroir*. Recent ecological surveys suggest that viticultural regions may possess highly genetically divergent wild *S. cerevisiae* populations, although our knowledge on the ecology and population structure of this species in nature is limited. In this study, *S. cerevisiae* biodiversity in grape musts from eighteen Agiorgitiko vineyards throughout the Nemea PDO zone was examined. Strains were isolated from spontaneously fermenting musts and species identification was performed by 5.8S-ITS rDNA restriction analysis. *S. cerevisiae* isolates were further discriminated by mtDNA restriction analysis, resulting into more than 80 distinct genotypes from diverse vineyards. Representatives were examined for major enological traits of technological importance. The majority of strains exhibited high SO₂ resistance and ethanol tolerance, while showed low β-glucosidase activity. Interestingly, about 30% of the strains were resistant to *S. cerevisiae* killer toxins and produced negligible amounts of biogenic amines or H₂S. Present results point to a surprisingly high genotyping richness of indigenous *S. cerevisiae* in the Nemea region, constituting a natural reservoir of strains with quite promising enological potential.

Ανάπτυξη μαθηματικού μοντέλου για τη βιολογική αναγωγή Cr(VI) σε αντιδραστήρες αιωρούμενης ανάπτυξης και σταθερής κλίνης

Τεκερλεκοπούλου Α.1, Τσιάμης Γ.1, Παύλου Σ.2,3, Μπούρτζης Κ.1, Βαγενάς Δ.1,2

1Τμήμα Διαχείρισης Περιβάλλοντος και Φυσικών Πόρων, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Γ. Σεφέρη 2, Τ.Κ. 30100, Αγρίνιο, Ελλάδα, Τηλ. 2641074204, E-mail: atekerle@cc.uoi.gr

2Ερευνητικό Ινστιτούτο Χημικής Μηχανικής και Χημικών Διεργασιών Υψηλής Θερμοκρασίας (ΙΤΕ/ΕΙΧΗΜΥΘ), Οδός Σταδίου, Πλατάνι, Τ.Θ. 1414, 26504 Πάτρα, Ελλάδα

3Τμήμα Χημικών Μηχανικών, Πανεπιστήμιο Πατρών, Πανεπιστημιούπολη 26500 Πάτρα.

Τρέχουσα Διεύθυνση: Τεκερλεκοπούλου Α., Τσιάμης Γ., Μπούρτζης Κ., και Βαγενάς Δ. Τμήμα Διαχείρισης Περιβάλλοντος και Φυσικών Πόρων, Πανεπιστήμιο Δυτικής Ελλάδας, Αγρίνιο

Στην παρούσα μελέτη, μελετήθηκε η βιολογική αναγωγή του Cr(VI) μέσω κατάλληλων μικροοργανισμών. Πραγματοποιήθηκαν πειράματα τόσο σε αντιδραστήρες αιωρούμενης ανάπτυξης όσο και σταθερής κλίνης, υπό διαλείπουσα λειτουργία. Για τον εμβολιασμό των αντιδραστήρων χρησιμοποιήθηκε βιομηχανική λάσπη από την Ελληνική Βιομηχανική Αεροπορία, χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα ζάχαρη.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκαν σειρές πειραμάτων για τη διεξοδική μελέτη της συμπεριφοράς μικτής καλλιέργειας και την καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών της αναγωγής του Cr(VI) σε αντιδραστήρες διαλείποντος έργου αιωρούμενης ανάπτυξης για αρχικές συγκεντρώσεις Cr(VI) 1.4 -110 mg/l. Ο μέγιστος ρυθμός αναγωγής Cr(VI) (2.0 mg/l·h) παρουσιάστηκε για αρχική συγκέντρωση 12.85 mg/l με ρυθμό παραγωγής βιομάζας 4.1 mg biomass/ l·h. Η μικροβιακή ανάλυση έδειξε ότι στους αντιδραστήρες επικρατούν βακτήρια και μύκητες. Στα βακτήρια κυρίαρχα στελέχη ήταν τα *Raoultella* sp., *Citrobacter* sp., *Klebsiella* sp., *Salmonella* sp., *Achromobacter* sp. και *Kerstersia* sp. Στους μύκητες το κυρίαρχο στέλεχος ήταν το *Pichia jadinii*. Επίσης, για τις ίδιες αρχικές συγκεντρώσεις διεξήχθησαν πειράματα της μικτής καλλιέργειας σε αντιδραστήρες σταθερής κλίνης με πλαστικό πληρωτικό υλικό. Με τη χρήση των αντιδραστήρων αυτών επιτεύχθηκαν υψηλοί ρυθμοί αναγωγής (2. mg/l·h) ακόμη και σε υψηλές αρχικές συγκεντρώσεις (109 mg/l).

Τέλος, αναπτύχθηκε μαθηματικό μοντέλο το οποίο περιγράφει τη διαδικασία αναγωγής του Cr(VI) λαμβάνοντας υπόψη το μοντέλο του Tsao and Hanson για την ενίσχυση της ανάπτυξης των μικροοργανισμών και το μοντέλο του Aiba and Shoda για την παρεμπόδιση της ανάπτυξης τους, λόγω υψηλής συγκέντρωσης χρωμίου. Στα πειράματα διαλείποντος έργου σταθερής κλίνης παρατηρήθηκε μικρότερη επίδραση της παρεμπόδισης λόγω υψηλής συγκέντρωσης χρωμίου, αυξάνοντας σημαντικά τη σταθερά παρεμπόδισης στην τιμή των 148.5 mg/l, σε σχέση με εκείνη των πειραμάτων αιωρούμενης ανάπτυξης που ήταν μόλις $K_i=8.219$ mg/l.

Η μελέτη της δυναμικής συμπεριφοράς των πληθυσμών που ανάγουν το εξασθενές χρώμιο, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως οδηγός στο σχεδιασμό και στην αξιολόγηση συνθηκών με σκοπό τη μέγιστη απόδοση των συστημάτων επεξεργασίας.

Λέξεις κλειδιά: εξασθενές χρώμιο, βιολογική αναγωγή, μαθηματικό μοντέλο

Modelling of biological Cr(VI) reduction in suspended and attached growth reactors

Tekerlekopoulou A.¹, Tsiamis G.¹, Pavlou S.^{2,3}, Bourtzis K.¹, Vayenas D.^{1,2}

¹Department of Environmental and Natural Resources Management, University Ioannina, Seferi 2, 30100 Agrinio, Greece, Tel: 2641074204, E-mail: atekerle@cc.uoi.gr

² Institute of Chemical Engineering and High Temperature Chemical Processes (FORTH/ICE-HT), Stadiou Str., Platani, P.O.Box 1414 GR-26504 Patras, Hellas

³ Department of Chemical Engineering, University of Patras, 26504 Patras, Greece

Present Address: Tekerlekopoulou A., Tsiamis G., Bourtzis K. and D.V Vayenas

Department of Environmental and Natural Resources Management, University of Western Greece, Agrinio, Greece

In the present study biological reduction of Cr(VI) was studied. Experiments in suspended growth and packed-bed reactors under batch operating mode were carried out. Reactors were inoculated with industrial sludge from the Hellenic Aerospace Industry by using sugar as substrate.

Initially, experiments in suspended growth batch reactors for Cr(VI) concentrations of 1.4-110 mg/l were carried out, to extensively study the behavior of a mixed culture. The maximum Cr(VI) reduction rate of 2 mg/l·h was achieved for initial concentration 12.85 mg/l with biomass production rate 4.1 mg biomass/l·h. Analysis of the microbial structure in the batch reactor culture indicated that the dominant bacterial communities were constituted by bacterial members of *Raoultella* sp., *Citrobacter* sp., *Klebsiella* sp., *Salmonella* sp., *Achromobacter* sp. and *Kerstersia* sp. while the dominant fungal strain was that of *Pichia jadinii*. Experiments using the same mixed culture were also carried out in packed-bed reactors with plastic support media. High removal rates were achieved (2.0 mg/l·h) even in high initial concentrations (109 mg/l).

A combination of the model of Tsao and Hanson for growth enhancement and the model of Aiba and Shoda for growth inhibition was used in order to describe and predict the process of Cr(VI) bio-reduction in suspended growth and packed-bed reactors. Kinetic constants of the equation obtained from both batch (or draw-fill) culture experiments. In the draw-fill experiments at the packed-bed reactor, Cr(VI) inhibitory effects were minimized increasing the inhibitory constant value K_i' at 148.5 mg/l, compared to suspended growth experiments which was $K_i=8.219$ mg/l.

The study of the dynamic behavior of populations that are responsible for Cr(VI) reduction can be used as guide in planning and assessment of operating conditions, in order to achieve the highest performance of these systems.

Keywords: hexavalent chromium, biological reduction, modeling

Γενετικός και μοριακός χαρακτηρισμός και αξιολόγηση ελληνικών μη-τοξικογόνων απομονώσεων του γένους *Aspergillus* για την επιλογή τους ως παράγοντες βιολογικής αντιμετώπισης των αφλατοξινών

Γεωργιάδου Μ.¹, Αγορίτσης Σ.Π.², Βήχου Κ.², Βαρδουνιώτης Γ.², Γιαννιώτης Σ.¹, Παπλωματάς Ε.², Cotty P.J.³ και Τσιτσιγιάννης Δ.Ι.²

¹Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, Εργαστήριο Μηχανικής Τροφίμων, Επεξεργασίας και Συντήρησης Γεωργικών Προϊόντων, Ιερά Οδός 75, 118 55 Αθήνα

²Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής, Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας, Ιερά Οδός 75, 118 55 Αθήνα

³Department of Plant Pathology, USDA, Agricultural Research Service, Tucson, AZ 85721, USA

Μία από τις αποτελεσματικότερες τεχνικές μείωσης των επιπέδων της αφλατοξίνης σε προσυλλεκτικό στάδιο είναι η εφαρμογή ενδημικών βιολογικών παραγόντων της περιοχής στον αγρό. Αυτή η τεχνική βασίζεται στην βαθμιαία υποκατάσταση και αποκλεισμό των τοξικογόνων μυκήτων *Aspergillus flavus* και *A. parasiticus* από μη-τοξικογόνους μικροοργανισμούς (βακτήρια, ζύμες, μη-τοξικογόνα στελέχη του ίδιου γένους με το παθογόνο-αίτιο) λόγω ανταγωνισμού. Στόχος της παρούσης μελέτης ήταν η αξιολόγηση 136 μη-τοξικογόνων στελεχών του γένους *Aspergillus*, τα οποία απομονώθηκαν από κελυφωτά φιστίκια ποικιλίας Αιγίνης από διάφορες περιοχές της Ελλάδας, με απώτερο σκοπό την επιλογή των καταλληλότερων στελεχών για εφαρμογή στον αγρό, ώστε να επιτευχθεί μείωση της αφλατοξίνης. Οι ελληνικές απομονώσεις χαρακτηρίστηκαν και ομαδοποιήθηκαν γενετικά με τη χρήση Απλών Επαναλαμβανόμενων Αλληλουχιών ή μικροδορυφορικών δεικτών (Simple Sequence Repeats – SSRs ή Microsatellites) χρησιμοποιώντας πολλαπλό σετ εκκινητών. Τα αποτελέσματα των SSRs έδειξαν ότι οι ελληνικές απομονώσεις ανήκουν σε 20 διαφορετικές φυλογενετικά ομάδες με το 65% του συνολικού αριθμού να ανήκει στην ίδια ομάδα. Στη συνέχεια, διερευνήθηκε η ύπαρξη διαγραφών (insertions-deletions) στο σύμπλεγμα γονιδίων της αφλατοξίνης και του κυκλοπιαζονικού οξέος με τη μέθοδο της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR) χρησιμοποιώντας πολλαπλό σετ εκκινητών. Σε 7 στελέχη βρέθηκαν διαγραφές τόσο στο σύμπλεγμα γονιδίων της αφλατοξίνης όσο και του κυκλοπιαζονικού οξέος. Η αποτελεσματικότητα αντιπροσωπευτικών στελεχών από κάθε φυλογενετική ομάδα, στη μείωση της αφλατοξίνης αξιολογήθηκε με *in vitro* δοκιμές ανταγωνισμού σε αποστειρωμένους σπόρους καλαμποκιού. Στις δοκιμές ανταγωνισμού 2 μη-τοξικογόνα στελέχη μείωσαν τη συνολική ποσότητα αφλατοξίνης κατά 80% σε σχέση με το μάρτυρα. Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι ορισμένα από αυτά τα στελέχη μπορούν να επιλεγούν ως παράγοντες βιολογικής αντιμετώπισης για τη μείωση αφλατοξίνης με επιτυχία σε διάφορες καλλιέργειες στην Ελλάδα.

Λέξεις κλειδιά: Αφλατοξίνες, βιολογική αντιμετώπιση, μη-τοξικογόνα στελέχη *Aspergillus*

Genetic and molecular characterization and evaluation of the Greek non-toxicogenic isolations of the fungi *Aspergillus* as potential biocontrol agents against aflatoxins

Georgiadou M.¹, Agoritsis S.P.², Vichou K.², Vardouniotis G.², Yanniotis S.¹, Paplomatas E.², Cotty P.J.³ and Tsitsigiannis D.I.²

¹*Agricultural University of Athens, Dept. of Food Science & Technology, Lab of Food Engineering, Iera Odos 75, 118 55 Athens*

²*Agricultural University of Athens, Dept. of Crop Science, Lab of Plant Pathology, Iera Odos 75, 118 55 Athens*

³*USDA, Agricultural Research Service, School of Plant Sciences, University of Arizona, Tucson, AZ 85721, USA*

One of the most efficient strategies to reduce the aflatoxin levels in several crops is the application of native biological control agents in the field. One of the mechanisms through which this technique reduces contamination is through competitive exclusion of the aflatoxin-producing fungi *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* by the application of non-toxicogenic microorganisms such as bacteria, yeasts or non-toxicogenic *Aspergillus* strains. The ultimate aim of the current research is to reduce aflatoxin contamination in the field by selecting and applying the most suitable non-toxicogenic strains of *Aspergillus*. For that purpose, 136 non-toxicogenic strains of the genus *Aspergillus*, that were isolated from pistachios of the typical Greek variety “Aegina” collected from several orchards, were DNA-characterized and grouped by Simple Sequence Repeat (SSR) pattern. Based on SSRs, the Greek strains were grouped in 20 different vegetative compatibility groups (VCGs), but 65% of the total number of isolates grouped to the same VCG. The aflatoxin and cyclopionic acid (CPA) gene clusters were examined for possible indels (insertions-deletions) with PCR. The results indicated indels in 7 *Aspergillus* strains in both gene clusters. The efficacy of representative strains from different VCGs in aflatoxin reduction was evaluated with *in vitro* competition tests in autoclaved maize kernels. Competition tests showed that 2 non-toxicogenic strains reduced aflatoxin content 80% compared to the controls inoculated with a toxicogenic strain alone. These results demonstrate that non-toxicogenic *Aspergillus* strains endemic to Greece have value as potential biocontrol agents for the prevention of aflatoxin contamination in susceptible crops grown in Greece.

Μελέτη της ανάπτυξης του παθογόνου στελέχους *Staphylococcus aureus* σε υγρό θρεπτικό μέσο και εκχύλισμα μαρουλιού και ρόκας

Δουλιγεράκη Α.Ι., Νυχάς Γ-Ι.Ε.

Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιερά Οδός 75, Αθήνα 11855, Ελλάδα.

Η κατανάλωση ωμών φυτικών ιστών, ενέχει τον κίνδυνο τροφοδηλητηριάσεων από παθογόνα στελέχη που ανιχνεύονται στην επιφάνεια τους λόγω διασταυρούμενης επιμόλυνσης. Ωστόσο, η ικανότητα παθογόνων στελεχών να αναπτύσσονται στην επιφάνεια φυτικών ιστών χρήζει περαιτέρω μελέτης και σε μεγαλύτερο βάθος. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η ικανότητα ανάπτυξης του παθογόνου στελέχους *Staphylococcus aureus* σε διάφορα θρεπτικά μέσα. Για το σκοπό αυτό, ένα θρεπτικό υπόστρωμα (Luria – Bertani broth, LB) και τα εκχύλισματά δύο φυτικών ιστών (μαρούλι, ρόκα) εμβολιάστηκαν με το στέλεχος *Staphylococcus aureus* (strain COL, MRSA) και τα δείγματα επώαστηκαν σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες (15, 20 και 30°C). Από τα αποτελέσματα κατά την επώαση στους 15°C, φάνηκε να καθυστερεί η ανάπτυξη του στελέχους σε εκχύλισμα ρόκας σε σχέση με το θρεπτικό υπόστρωμα LB. Καμία ανάπτυξη του στελέχους αυτού σε εκχύλισμα μαρουλιού δεν παρατηρήθηκε κατά την συντήρηση στην ίδια θερμοκρασία. Αντιθέτως, παρόμοιος ρυθμός ανάπτυξης παρατηρήθηκε για το στέλεχος στο θρεπτικό υπόστρωμα LB και στο εκχύλισμα ρόκας όταν αυτά επώαστηκαν στους 20 και 30°C. Από τα αποτελέσματα αυτά, φαίνεται ότι η ρόκα ενδέχεται να αποτελεί ένα φιλόξενο περιβάλλον για την ανάπτυξη του παθογόνου στελέχους σε αντίθεση με το μαρούλι. Περαιτέρω μελέτη απαιτείται για την ικανότητα του *Staphylococcus aureus* να αναπτύσσεται σε αυτά τα φυτικά εκχύλισματά ή φυτικούς ιστούς, καθώς και του ελέγχου της παθογένειας του κατά την ανάπτυξη του σε αυτά.

Λέξεις κλειδιά: *Staphylococcus aureus*, ρόκα, μαρούλι

Ευχαριστίες: Η εργασία χρηματοδοτήθηκε από την πράξη Θαλής: «Βιολογική ολιστική προσέγγιση της Δύναμικής Μορφής Επιβίωσης παθογόνων βακτηριακών σχηματισμών - BIOYMENIA», υλοποιείται στο πλαίσιο του Επιχειρησιακού Προγράμματος "Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση" (ΕΠΕΔΒΜ) και συγχρηματοδοτείται από το Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο (ΕΚΤ)."

Population dynamics of *Staphylococcus aureus* in liquid medium, lettuce and rocket extract

Doulgeraki A.I., Nychas G-J.E.

Laboratory of Microbiology and Biotechnology of Foods, Department of Food Science and Technology, Agricultural University of Athens, Iera Odos 75, Athens 11855, Greece

The consumption of raw plant tissues, have been associated with the risk of foodborne diseases due to cross contamination. However, the ability of pathogenic strains to survive on the surface of the plant tissues needs to be studied in deep. In the present study, the growth of *Staphylococcus aureus* on different growth media was studied. For this purpose, a growth medium (Luria – Bertani broth, LB) and two extracts from plants (lettuce and rocket), were inoculated with *Staphylococcus aureus* strain COL (MRSA). After the inoculation, the samples were incubated at three different temperatures (15, 20 and 30°C). A lower growth rate was observed when the strain was inoculated on rocket extract in comparison with LB broth for the samples incubated at 15°C. Additionally, no growth of the pathogen was observed on lettuce extract in the same incubation temperature. On the other hand, at 20 and 30°C similar growth rate was observed on LB broth and rocket extract. These results revealed that, the rocket might be a favorable environment for the growth of *Staphylococcus aureus*, in contrast with the lettuce. Further studies are needed to ensure the survival and growth of *Staphylococcus aureus* on plants extracts or plant tissues, as well as the study the potential of its pathogenicity during the growth on these media.

Acknowledgments: This work was found by *the action THALIS: “Biological Investigation Of the Forces that Influence the Life of pathogens having as Mission to Survive in various Lifestyles; BIOFILMS”*, falls under the *Operational Programme (OP) "Education and Lifelong Learning (EdLL)"* and is co-financed by the *European Social Fund (ESF) and National Resources*

Μελέτη της επίδρασης αιθέριου ελαίου ρίγανης στην δυναμική του γένους *Brochothrix* κατά την συντήρηση βόειου κιμά σε συνθήκες ψύξης

Δουλγεράκη Α.Ι., Τρυφίνοπούλου Π. και Νυχάς Γ.-Ι.Ε.

Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιερά Οδός 75, Αθήνα 11855, Ελλάδα.

Στην παρούσα εργασία, μελετήθηκε η επίδραση του αιθέριου ελαίου ρίγανης στο βακτήριο *Brochothrix*, το οποίο ανήκει στους κύριους αλλοιογόνους μικροοργανισμούς του κρέατος. Για το σκοπό αυτό, ένα σύνολο 88 στελεχών *Brochothrix*, απομονώθηκαν από βόειο κιμά κατά την συντήρησή του υπό αερόβιες συνθήκες, τροποποιημένη ατμόσφαιρα συσκευασίας με την παρουσία (MAP με VCEO) ή απουσία των πτητικών συστατικών αιθέριου ελαίου ρίγανης, σε θερμοκρασίες ψύξης (0 και 5 οC). Η διαφοροποίηση των απομονώσεων έγινε με σύγκριση των γενετικών αποτυπωμάτων όπως προέκυψαν από την τεχνική rep-PCR. Έξι διαφορετικές ομάδες (Α, Β, έως F) ανιχνεύθηκαν, οι οποίες ταυτοποιήθηκαν ότι ανήκουν στο είδος *Brochothrix thermosphacta* με βάση τον φαινοτυπικό χαρακτηρισμό τους. Στους 0οC, όλες οι ομάδες ανιχνεύθηκαν, ανεξάρτητα από την ατμόσφαιρα συσκευασίας. Αντιθέτως, μόνο 3 ομάδες (Α, Β και Ε) ανιχνεύθηκαν στους 5 οC. Επιπλέον, η πρώτη ομάδα (Α), φαίνεται ότι περιλαμβάνει στελέχη από όλες τις συνθήκες συντήρησης (33% των απομονώσεων). Ομοίως με παραπάνω, η δεύτερη ομάδα (ομάδα Β) περιλαμβάνει το 43% των συνολικών στελεχών που απομονώθηκαν, τα οποία προέρχονταν από όλες τις συνθήκες, εκτός από εκείνη που τα δείγματα συντηρήθηκαν υπό MAP με VCEO, στους 0 οC. Είναι σημαντικό να αναφέρουμε ότι η επιβεβαιωμένη επίδραση των συνθηκών MAP ενισχύθηκε από την παρουσία των VCEO της ρίγανης, με επιπτώσεις όχι μόνο στο ρυθμό ανάπτυξης ή τις τελικές αριθμήσεις του πληθυσμού, αλλά επίσης στην δυναμική των στελεχών του *Brochothrix thermosphacta*.

Λέξεις κλειδιά: *Brochothrix thermosphacta*, βόειος κιμάς, αιθέριο έλαιο ρίγανης

Ευχαριστίες: Η εργασία χρηματοδοτήθηκε από το κοινοτικό πρόγραμμα Symbiosis-EU (www.symbiosis-eu.net)

Monitoring of the effect of oregano essential oil on *Brochothrix thermosphacta* diversity during storage of minced beef at chill temperatures

Doulgeraki A.I., Tryfinopoulou P. and Nychas G.-J.E.

Laboratory of Microbiology and Biotechnology of Foods, Department of Food Science and Technology, Agricultural University of Athens, Iera Odos 75, Athens 11855, Greece.

In the present study, the effect of storage condition on the biodiversity of *Brochothrix*, which belongs to the main meat spoilage bacteria, was monitored. For this purpose, a total of 88 *Brochothrix* strains, were isolated from minced beef during storage under aerobic, modified atmosphere packaging conditions with the presence (MAP with VCEO) or absence of volatile compounds of oregano essential oil, at chilling temperatures (0 and 5 oC). The isolated strains subjected to rep-PCR fingerprinting for their differentiation. Six different groups (A, B, to F) were detected, which all of them belonged to *Brochothrix thermosphacta* based on the phenotypic characterization. At 0 oC, all groups were detected, regardless of the packaging condition. In contrast, at 5oC only 3 groups (A, B and E) were detected. Moreover, the first group (A) was appeared to include strains from all storage conditions (33% of the isolates). Similarly, the second group (group B) includes the 43% of the total studied strains, which originated from all the conditions, except the samples stored under MAP with VCEO, at 0oC. It is important to mention that the confirmed effect of the MAP conditions was enhanced by the presence of the oregano VCEO, with impact not only at the growth rate or the final counts of the population but also at the diversity of *Brochothrix thermosphacta* strains.

Acknowledgements: The authors acknowledge the Symbiosis-EU (www.symbiosis-eu.net) project

Αναστολή της ανάπτυξης μικροοργανισμών της ελιάς από μονοκαλλιέργειες και συγκαλλιέργειες στελεχών του γένους *Lactobacillus*

Δουλγεράκη Α.Ι., Πρόιου Α., Νυχάς Γ-Ι.Ε. και Πανάγου Ε.Ζ.

Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιερά Οδός 75, Αθήνα 11855, Ελλάδα.

Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε η ικανότητα αναστολής της ανάπτυξης μικροοργανισμών της αυθόρμητης ζύμωσης επιτραπέζιας ελιάς από μονοκαλλιέργειες και συγκαλλιέργειες στελεχών του γένους *Lactobacillus*. Για το σκοπό αυτό, 3 στελέχη *Lactobacillus plantarum* και 2 στελέχη *L. pentosus* που έχουν απομονωθεί από ζύμωση επιτραπέζιας ελιάς αναπτύχθηκαν σε διαφορετικά ποσοστά αλατότητας (0, 4, και 6 NaCl%) και συνθήκες pH (4,5 και 6,4). Στείρο υπερκείμενο από τις καλλιέργειες ενσωματώθηκε με τη μέθοδο διάχυσης σε άγαρ (well diffusion assay) σε τρυβλία όπου είχαν ενοφθαλμιστεί με διαφορετικά στελέχη παθογόνων (*Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*) και μη βακτηρίων (*L. pentosus*) καθώς και την ζύμη *Aureobasidium pullulans*.

Αναστολή στελεχών του βακτηρίου *L. pentosus* παρατηρήθηκε από υπερκείμενα καλλιέργειας *L. plantarum* που είχαν αναπτυχθεί σε θρεπτικό μέσο με 0% και 4% NaCl (σε τιμή pH 6,4). Η δε συγκαλλιέργεια των στελεχών *L. plantarum* και ενός στελέχους *L. pentosus* φάνηκε να ευνοεί την ικανότητα αναστολής της ανάπτυξης των στελεχών που χρησιμοποιήθηκαν σαν δείκτες. Καμία αναστολή ανάπτυξης δεν παρατηρήθηκε στην περίπτωση των παθογόνων βακτηρίων, ενώ η ανάπτυξη της ζύμης φάνηκε να αναστέλλεται σε μερικές περιπτώσεις. Από τα αποτελέσματα αυτά προκύπτει ότι η αναστολή ανάπτυξης εξαρτάται από το ποσοστό αλατότητας του θρεπτικού μέσου και τα διαφορετικά στελέχη *L. pentosus* που χρησιμοποιήθηκαν ως δείκτες. Η ενδεχόμενη χρήση αυτών των στελεχών σε μονοκαλλιέργειες είτε συγκαλλιέργειες για τον έλεγχο της μικροχλωρίδας κατά την ζύμωση και κατ' επέκταση της πορείας της ζύμωσης χρήζει περαιτέρω έρευνας.

Λέξεις κλειδιά: *Lactobacillus*, Ζύμωση ελιάς, έλεγχος μικροχλωρίδας

Ευχαριστίες: Η εργασία χρηματοδοτήθηκε από το κοινοτικό πρόγραμμα PROBIOLIVES (www.probiolives.eu).

Inhibition of the microbiota isolated from olives from *Lactobacillus plantarum* strains mono-cultures and co-cultures

Doulgeraki, A.I., Proiou A., Nychas G-J.E., Panagou E.Z.

Laboratory of Microbiology and Biotechnology of Foods, Department of Food Science and Technology, Agricultural University of Athens, Iera Odos 75, Athens 11855, Greece.

In the present study, the ability of *Lactobacillus* monocultures or co-cultures to inhibit the microbiota isolated from spontaneous table olive fermentation was monitored. For this purpose, 3 *Lactobacillus plantarum* and 2 *L. pentosus* strains (isolates from spontaneous table olive fermentation) were cultured on growth media with variant percentage of salinity (0, 4, and 6, NaCl) and acidity (pH=4,5 and 6,4). The filtered sterile supernatant of the bacterial cultures was tested with an agar well diffusion assay; the growth medium had been previously inoculated with different non pathogen (*L. pentosus*) and pathogen strains (*Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*), as well as a yeast (*Aureobasidium pullulans*).

The growth of *L. plantarum* on growth medium supplemented with 0% and 4% NaCl (pH 6,4), found to be able to inhibit the growth of several *L. pentosus* strains. In addition, the different co-cultures of *L. plantarum* strains with a *L. pentosus* strain found to enhance the ability of the strains to inhibit the indicator strains. No inhibition of pathogens was observed. In contrast, the growth *Aureobasidium pullulans* was inhibited in a few cases. From the above mentioned results, it seems that, the inhibition is affected by the level of salinity on the growth medium and the different *L. pentosus* indicator strains. Further studies are required to study, the potential use of monocultures or co-cultures of these strains to monitor the microbiota during fermentation and the fermentation process.

Acknowledgements: The authors acknowledge the PROBIOLIVES project (www.probiolives.eu).

Η μικροβιακή ζωή στην αρκτική ζώνη

Αποστόλος Σαπουνάς¹, Katarzyna Cichala-Kamrowska², Εύα Διονυσοπούλου¹, Αθηνά Χαμαλάκη¹, Zaneta Polkowska², Jacek Namieśnik², και Γιώργος Τσιάμης¹

¹ Τμήμα Διαχείρισης Περιβάλλοντος και Φυσικών Πόρων, Πανεπιστήμιο Δυτικής Ελλάδας, Αγρίνιο, 30100, Ελλάδα

² Τμήμα Αναλυτικής Χημείας, Σχολή Χημείας, University of Technology, 80-233 Gdańsk, Πολωνία

Το χιόνι αποτελεί ένα σημαντικό κλιματολογικό και οικολογικό σύστημα που καλύπτει το 35% της γήινης επιφάνειας. Τα οικοσυστήματα χιονιού είναι θρεπτικές και μικροβιακές δεξαμενές, με τον μικροβιακό παράγοντα να διαδραματίζει ένα σημαντικό ρόλο στην οικολογία του οικοσυστήματος. Γι' αυτό το λόγο τα τελευταία χρόνια υπάρχει ένα μεγάλο ενδιαφέρον για το χαρακτηρισμό της μικροβιακής ποικιλότητας στην αρκτική ζώνη. Σε μια τέτοια σημαντική περιοχή, το πρώτο που πρέπει να εξερευνηθεί προκειμένου να κατανοηθεί το οικοσύστημα του χιονιού είναι τα είδη των βακτηρίων που ζουν εκεί καθώς και οι σχέσεις μεταξύ των βακτηρίων αυτών και του περιβάλλοντος. Στην παρούσα μελέτη, ερευνήσαμε τόσο την αφθονία όσο και την ποικιλομορφία των βακτηρίων σε επτά σταθμούς δειγματοληψίας από το νησί Svalbard χρησιμοποιώντας τεχνικές μικροσυστοιχιών DNA υψηλής πυκνότητας (PhyloChip) και πυροαλληλούχισης.

Τα δείγματα χιονιού συλλέχθηκαν κατά τη διάρκεια του Σεπτεμβρίου του 2010 από τις λίμνες Fuglebekken (3 δείγματα), και Revnatnet (4 δείγματα) που βρίσκονται στο νησί Svalbard. Για τη 16S πυροαλληλούχιση ενισχύθηκε η περιοχή V5-V6 του 16S rRNA γονιδίου, ενώ για το PhyloChip χρησιμοποιήθηκε ολόκληρο το 16S rRNA. Η ανάλυσή μας δείχνει ότι υπάρχει μια μεγάλη βακτηριακή ποικιλομορφία. Πιο συγκεκριμένα, η ανάλυση PhyloChip δείχνει ότι περισσότερο από 32 φύλα είναι παρόντα με τις πιο κυρίαρχες τάξεις να είναι τα *Betaproteobacteria*, τα *Actinobacteria*, τα *Gammaproteobacteria*, τα *Alphaproteobacteria*, τα *Bacteroidetes* και τα *Firmicutes*. Σε μικρότερο βαθμό πιστοποιήθηκαν στελέχη από *Chloroflexi*, *Acidobacteria*, OP9, BRC1, TM7, WS5, OP10, OP3. Η ανάλυση των δεδομένων από την πυροαλληλούχιση των γονιδιακών βιβλιοθηκών του 16S rRNA βρίσκεται σε εξέλιξη. Τα αποτελέσματα των δύο διαδικασιών θα: α) συγκριθούν με τη βοήθεια του προγράμματος Unifrac, και β) θα χρησιμοποιηθούν για τη κατασκευή ενός πυρήνα μικροοργανισμών (core microbiome) του χιονιού.

Microbial life in the arctic zone

Apostolos Sapounas¹, Katarzyna Cichala-Kamrowska², Eva Dionyssopoulou¹, Athina Chamalaki¹, Zaneta Polkowska², Jacek Namieśnik², and George Tsiamis¹

¹ *Department of Environmental and Natural Resources Management, University of Western Greece, Agrinio, 30100, Greece*

² *Department of Analytical Chemistry, Chemical Faculty, Gdańsk University of Technology, 80-233 Gdańsk, Poland*

Snow is a significant climatic and ecological system that covers ca 35% of the Earth's surface permanently or for varying times during the year. Snow ecological systems are dynamic nutrient and microbial reservoirs, with the microbial factor playing an important role in snow ecology. For this reason microbial characterization from arctic zones have drawn more and more attention in recent years. Although, there are few studies on bacterial diversity from glacial ice, sea ice and polar snow none of these used high throughput technologies like the high-density DNA microarrays or pyrosequencing to access the microbial structure. In such a significant region, knowing what kind of bacteria dwell there, and what the relationships between the bacteria and the environment are, is the first step that needs to be explored in order to gain an understanding of the snow ecology system. In this study, we investigated the bacterial abundance and diversity from seven sampling station from the Island of Svalbard using a high-density microarray (PhyloChip) and 16S pyrotagging approach.

Snow samples were collected during September 2010 from the Lakes Fuglebekken (3 samples), and Revvatnet (4 samples) located in the Island of Svalbard. For the 16S pyrotagging the V5-V6 region of the 16S rRNA was amplified, while for the PhyloChip the whole 16S rRNA was used.

Our analysis indicates that there is an unprecedented bacterial diversity in the Island of Svalbard snow ecosystem. More specifically, PhyloChip analysis indicates that more than 32 Phyla are present with the most dominant taxa being the *Betaproteobacteria*, *Actinobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Alphaproteobacteria*, *Bacteroidetes* and *Firmicutes*. Members of *Chloroflexi*, *Acidobacteria*, OP9, BRC1, TM7, WS5, OP10, OP3 have been also identified but in a lesser degree. 16S pyrosequencing data are currently being analyzed and results from both approaches will be: (a) compared using UniFrac, and (b) will be used to construct a core snow microbiome.

Μικροβιακή Οικολογία και Γονιδιωματική του Ενός Κυττάρου στη λιμνοθάλασσα του Αιτωλικού

Γεώργιος Τσιάμης ¹, Αθηνά Χαμαλάκη¹, Chris Rinke², Νίκος Κυρπίδης ², Tanja Woyke², Κώστας Μπούρτζης^{1,3}

¹ Τμήμα Διαχείρισης Περιβάλλοντος και Φυσικών, Πανεπιστήμιο Δυτικής Ελλάδας, Αγρίνιο, Σεφέρη 2, 30100, Ελλάδα

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

³ Present address: Insect Pest Control Laboratory, Joint FAO/IAEA Programme of Nuclear Techniques in Food and Agriculture, Vienna, Austria

Οι μικροοργανισμοί που βρίσκονται στο περιβάλλον διακρίνονται για τη μεγάλη ποικιλότητα, τις πολυάριθμες μεταβολικές δραστηριότητες και προϊόντα τους, καθώς και για τις σημαντικές βιοτεχνολογικές εφαρμογές που έχουν. Αυτός ο πολύτιμος θησαυρός είναι ακόμα ανεκμετάλλευτος, καθώς το 99% των βακτηρίων και των αρχαίων δεν μπορεί να καλλιεργηθεί υπό τις σύγχρονες εργαστηριακές συνθήκες, και για το λόγο αυτό παραμένουν ανεξερεύνητες οι δυνατότητες τους. Οι σύγχρονες μοριακές τεχνικές ανατρέπουν τον τρόπο με τον οποίο μελετάτε πλέον η μικροβιακή ποικιλότητα. Μικροσυστοιχίες DNA υψηλής πυκνότητας, Μεταγονιδιωματική (metagenomics), και μόλις πρόσφατα η Γονιδιωματική του Ενός Κυττάρου (Single Cell Genomics) έχουν εφαρμοστεί αποτελεσματικά στον χαρακτηρισμό της μικροβιακής ποικιλότητας και την ανάδειξη νέων μικροβιακών κοινοτήτων. Στην εργασία αυτή χρησιμοποιήσαμε την γονιδιωματική του Ενός Κυττάρου για να μελετήσουμε την μικροβιακή και μεταβολική ποικιλότητα της Λιμνοθάλασσας του Αιτωλικού.

Η λιμνοθάλασσα του Αιτωλικού είναι μέρος του συμπλέγματος υδροτόπων της Δυτικής Ελλάδας, με πλούσια ποικιλότητα και περιλαμβάνει μια περιοχή 1,700 ha. Το οικοσύστημα της λιμνοθάλασσας του Αιτωλικού χαρακτηρίζεται από μια μεγάλη και μοναδική μικροβιακή ποικιλότητα και ο αρχικός χαρακτηρισμός της πραγματοποιήθηκε με την τεχνική της ARISA και της μικροσυστοιχίας DNA υψηλής πυκνότητας (Phylochip), η οποία επιτρέπει την ταυτοποίηση σχεδόν 9,000 ειδών ταυτόχρονα. Επιπλέον δεδομένα πυροαλληλούχησης του 16S rRNA γονιδίου αποκάλυψε μια μοναδική μικροβιακή ποικιλότητα με περισσότερους από 20 εκπροσώπους διαφορετικών Φύλων ή υποψήφιων νέων Φύλων. Για να μελετήσουμε περαιτέρω αυτή τη μοναδική ποικιλότητα εφαρμόστηκε η Γονιδιωματική του Ενός Κυττάρου.

Με αυτήν τη διαδικασία μας δόθηκε η δυνατότητα να ανακτήσουμε πληροφορίες από γονιδιώματα συνομοταξιών που μας ήταν εντελώς άγνωστες προηγουμένως, όπως αυτές των: BRC1, OP3, OP8, OP9, WS3, marine group A, KSB1, pMC2A15 καθώς και άλλων υποομάδων μη καλλιεργήσιμων μικροοργανισμών. Το μέγεθος των ενισχυμένων γονιδιωμάτων που αποκρυπτογραφήθηκαν (Single Amplified Genomes) κυμαίνεται μεταξύ 0.35 Mb - 2.4 Mb. Παράλληλα πάνω από 30,000 γονίδια έχουν χαρακτηριστεί τόσο από βακτήρια όσο και από αρχαία.

Single cell genomics in microbial ecology: the Etoliko lagoon project

George Tsiamis¹, Athina Chamalaki¹, Chris Rinke², Nikos Kyrpides², Tanja Woyke², Kostas Bourtzis^{1,3}

¹ *Department of Environmental and Natural Resources Management, University of Western Greece, 2 Seferi str., Agrinio, Greece*

² *Department of Energy Joint Genome Institute, 2800 Mitchell Drive, Walnut Creek, USA*

³ *Present address: Insect Pest Control Laboratory, Joint FAO/IAEA Programme of Nuclear Techniques in Food and Agriculture, Vienna, Austria*

Environmental microbes are immensely diverse and have numerous metabolic activities and products that could have industrial applications. This treasured reservoir is largely untapped since more than 99% of bacteria and archaea cannot be cultured under current laboratory conditions, leaving their potential essentially unexploited. Molecular approaches are revolutionizing the way that the microbial diversity is studied. DNA microarrays, metagenomics, and the more recent developed Single Cell Genomics approach have been effectively applied for the characterization of the hidden microbial diversity and for obtaining novel microbial products. We have applied the Single Cell Genomic approach to further explore and characterize the unique microbial diversity of the Etoliko lagoon.

Etoliko lagoon is part of a complex wetland in Western Greece extremely rich in biodiversity that covers an area of 1,700 ha. It has an atypical orientation and has been formed tectonically. The ecosystem of the Etoliko lagoon harbors a unique and large microbial diversity established by characterizing the structure of the microbial communities using ARISA and a high-density oligonucleotide microarray (Phylochip) that permits simultaneous identification of almost 9,000 taxa. Sanger- as well as pyrosequencing-based 16S rRNA tag data revealed a unique microbial diversity with more than 20 highly divergent representatives from Phyla/Candidate divisions. To further exploit this unique diversity we deployed a single cell genomic approach. This approach enabled us to retrieve genomic information from previously inaccessible Phyla like BRC1, OP3, OP8, OP9, WS3, marine group A, KSB1, PMC2A15 and many more uncultured candidates. The size of the Single Amplified Genomes varies between 0.35 Mb-2.4Mb and more than 30,000 genes have been characterized so far from bacteria and archaea that up to now were unreachable. Methods for the analysis of single cells from environmental samples have matured and these approaches are ready to be employed for discoveries in basic research and biotechnology.

Χαρακτηρισμός της ενδοσυμβιωτικής κοινότητας στα μυρμήγκια *Cataglyphis* της ερήμου

Saidi M.^{1,2}, Ντουντούμης Β.², Hadda O.¹, Μπούρτζης Κ.², Τσιάμης Γ.²

¹ *Department of Biology, Laboratory of Microorganisms and Bio-molecules Actives, University of Tunis, 2092 Tunisia*

² *Τμήμα Διαχείρισης Περιβάλλοντος και Φυσικών Πόρων, Πανεπιστήμιο Δυτικής Ελλάδας, 30100 Αργίνιο, Ελλάδα*

³ *Insect Pest Control Laboratory, Joint FAO/IAEA Programme of Nuclear Techniques in Food and Agriculture, Vienna, Austria*

Τα μυρμήγκια της ερήμου του γένους *Cataglyphis* αποτελούν πλέον ένα σύστημα μοντέλο για τη μελέτη της πλοήγησης των ζώων, και ειδικότερα της οπτικά κοθοδηγούμενης συμπεριφοράς τους. Κατά την αναζήτηση τροφής χρησιμοποιούν ένα σύστημα ενσωμάτωσης-μονοπατιών που περιλαμβάνει μια « οπτική πυξίδα » και ένα « οδόμετρο » ως τα κύρια μέσα πλοήγησής τους. Επιπλέον μπορούν και ορειοθετούν σημαντικά σημεία στην πορεία τους για το καθορισμό θέσεων και διαδρομών. Είναι γνωστό ότι τα μυρμήγκια του γένους *Camponotus* έχουν αναπτύξει μιά στενή σχέση με το ενδοκυττάριο ενδοσυμβιωτικό βακτήριο *Blochmannia* (Gammaproteobacteria). Η λειτουργία αυτού του ενδοσυμβιωτικού βακτηρίου δεν έχει πλήρως διελευκανθεί αλλά μέσω της γονιδιωματικής ανάλυσης δύο ειδών πιστεύεται ότι ο ρόλος τους είναι η προμήθεια αζωτούχων διατροφικών συμπληρωμάτων. Ο ασυνήθιστος τρόπος ζωής των μυρμηγκιών της ερήμου μας ώθησε να εξερευνήσουμε και να χαρακτηρίσουμε το προφίλ της ενδοσυμβιωτικής κοινότητας. Για το λόγο αυτό χαρακτηρίσαμε το ενδοσυμβιωτικό προφίλ από δέκα πληθυσμούς της Τυνησίας. Για κάθε πληθυσμό τουλάχιστον δεκαπέντε άτομα αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας εξειδικευμένους εκκινητές για την ανίχνευση των βακτηρίων *Wolbachia*, *Arsenophonus*, *Blochmannia*, *Buchnera*, *Spiroplasma*, *Cardinium*, και *Rickettsia*. Η ανίχνευση του βακτηρίου της *Wolbachia* αποκάλυψε την παρουσία της μόνο σε έναν από τους δέκα πληθυσμούς που ελέγχθηκαν, με περίπου 20% των μυρμηγκιών να είναι μολυσμένα. Για τα στελέχη της *Wolbachia* πραγματοποιήθηκε χαρακτηρισμός με τη χρήση του *16S rRNA*, του γονιδίου *wsp* (*Wolbachia* Surface Protein) και των γονιδιακών μαρτύρων MLST (Multi Locus Sequence Typing). Ανίχνευση για την παρουσία του βακτηρίου *Arsenophonus* αποκάλυψε ότι τουλάχιστον ένας πληθυσμός είναι μολυσμένος με αυτό το ενδοσυμβιωτικό βακτήριο. Η ανίχνευση και ο χαρακτηρισμός των υπολοίπων ενδοσυμβιωτικών βακτηρίων είναι σε εξέλιξη.

Characterization of the endosymbiotic community profile in *Cataglyphis* desert ants

SAIDI Mona^{1,2}, Vangelis Doudoumis², Hadda Ouzari¹, Kostas Bourtzis^{2,3}, George Tsiamis²

¹ Department of Biology, Laboratory of Microorganisms and Bio-molecules Actives, University of Tunis, 2092 Tunisia

² Department of Environmental and Natural Resources Management, University of Western Greece, 30100 Agrinio, Greece

³ Insect Pest Control Laboratory, Joint FAO/IAEA Programme of Nuclear Techniques in Food and Agriculture, Vienna, Austria

Desert ants of the genus *Cataglyphis* have become model systems for the study of animal navigation in general, and visually guided behaviour in particular. While foraging they employ a path-integrating system including a skylight-based visual compass and a stride-integrating odometer as their main navigational means. In addition, they use landmarks to define places and routes. It is known that in the ants of the genus *Camponotus* an association with the intracellular endosymbiont *Blochmannia* (Gammaproteobacteria) has been established. The function of this endosymbiont has not been fully elucidated but through the analysis of two *Blochmannia* genomes it has been postulated that their role is to host's diet with nitrogen. The extraordinary life style of the *Cataglyphis* ants prompted us to investigate and elucidate the role of the endosymbiotic community. For this reason we started characterizing the endosymbiotic profile from at least ten populations from Tunisia.

For each population at least fifteen (15) individuals were screened using specific primers for *Wolbachia*, *Arsenophonus*, *Blochmannia*, *Buchnera*, *Spiroplasma*, *Cardinium*, and *Rickettsia*. *Wolbachia* screening revealed the presence to only one of the ten populations with approx. 20% of the ants harboring the bacterium in the infected population. *Wolbachia* infections were further characterized using the 16S rRNA, *wsp* (*Wolbachia* Surface Protein) gene and MLST (Multi Locus Sequence Typing) gene markers. *Arsenophonus* screening revealed that at least one population is harboring this endosymbiont. Screening of the other parasites is currently in progress.

Χαρακτηρισμός της βιοποικιλότητας των αρχαίων από αλατούχες περιοχές της νότιας Τυνησίας

Afef Najjari^{1,2,3}, Εύα Διονυσοπούλου³, Zeineb Ayari², Thouraya Sallami², Abdellatif Boudabbous¹, Κώστας Μπούρτζης^{3,4}, Ameer Cherif^{1,2}, Γιώργος Τσιάμης³

¹Laboratoire Microorganismes et Biomolécules Actives, Faculté des Sciences de Tunis, Université de Tunis El Manar, 2092, Tunis, Tunisia

²Institut Supérieur de Biotechnologie, Biotechnopole de Sidi Thabet, 2020, Sidi Thabet, Ariana, Tunisia

³Τμήμα Διαχείρισης Περιβάλλοντος και Φυσικών Πόρων, Πανεπιστήμιο Δυτικής Ελλάδας, Αγρίνιο, 30100, Ελλάδα

⁴Present address: Insect Pest Control Laboratory, Joint FAO/IAEA Programme of Nuclear Techniques in Food and Agriculture, Vienna, Austria

Σε υπεραλατούχα περιβάλλοντα όπως είναι οι δεξαμενές εξάτμισης θαλασσινού νερού, κορεσμένα αλατούχα νερά που βρίσκονται στην έρημο ή σε παράκτιες περιοχές, φυσικές και τεχνικές αλυκές όπως είναι η Νεκρά Θάλασσα και οι υπεραλμυρές λίμνες, επιβιώνουν τόσο αλοανεκτικοί όσο και αλόφιλοι μικροοργανισμοί που μπορούν να προσαρμόζονται σε ένα ευρύ φάσμα συγκέντρωσης αλατιού. Τα υπεραλατούχα περιβάλλοντα είναι γνωστά ως βιότοποι αλόφιλων και η μελέτη του μικροβιακού φορτίου αυτών των οικοσυστημάτων καθίσταται ιδιαίτερα αναγκαία εξαιτίας των πιθανών και δυναμικών εφαρμογών τους. Στην παρούσα εργασία μελετήσαμε τη φυλογενετική ποικιλομορφία των αλόφιλων αρχαίων και τη δομή της βιοκοινότητας σε πέντε διαφορετικές υπεραλατούχες περιοχές της νότιας Τυνησίας (σε άμμο από τις ερήμους, Sebkhah και Chott), χρησιμοποιώντας έναν συνδυασμό μεθόδων καλλιέργειας καθώς και μοριακών προσεγγίσεων.

Η απομόνωση των αλοαρχαίων πραγματοποιήθηκε σε τροποποιημένο θρεπτικό μέσο DSC-97 με τα τρυβλία να επωάζονται για 15 έως 40 ημέρες στους 30°C. Οι αποικίες που εμφάνισαν διαφορετικά μορφολογικά χαρακτηριστικά απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν. Απομονώθηκαν συνολικά 60 στελέχη αρχαίων και η ταυτοποίηση των στελεχών βασίστηκε στο 16S rRNA γονίδιο. Η φυλογενετική ανάλυση έδειξε ότι τα 60 στελέχη των αρχαίων ανήκουν σε εννέα διαφορετικά γένη, τα *Halorubrum*, *Haloarcula*, *Halogeometricum*, *Haloterrigena*, *Halostagnicola*, *Haloferax*, *Natrinema*, *Halovivax* και *Natrialba*. Τα *Halorubrum sp.* και *Haloarcula sp.* ανιχνεύθηκαν κυρίως στις αλατούχες περιοχές (Sebkhah και Chott), ενώ τα άλλα γένη ανιχνεύθηκαν σε δείγματα άμμου και εδάφους. Επίσης προκειμένου να αξιολογηθεί η ποικιλομορφία και η πολυπλοκότητα των βιοκοινοτήτων των αρχαίων που βρίσκονται σε αυτά τα υπεραλατούχα περιβάλλοντα, τα δείγματα αναλύθηκαν με μικροσυστοιχίες DNA υψηλής πυκνότητας (PhyloChip).

Archaeal Community Profile from arid saline systems of Southern Tunisia using cultivation-dependent and a high density DNA microarray

Afef Najjari^{1,2,3}, Eva Dionysopoulou³, Zeineb Ayari², Thouraya Sallami², Abdellatif Boudabbous¹, Kostas Bourtzis^{3,4}, Ameer Cherif^{1,2}, George Tsiamis³

¹Laboratoire Microorganismes et Biomolécules Actives, Faculté des Sciences de Tunis, Université de Tunis El Manar, 2092, Tunis, Tunisia

²Institut Supérieur de Biotechnologie, Biotechnopole de Sidi Thabet, 2020, Sidi Thabet, Ariana, Tunisia

³Department of Environmental and Natural Resources Management, University of Western Greece, 30100 Agrinio, Greece

⁴ Present address: Insect Pest Control Laboratory, Joint FAO/IAEA Programme of Nuclear Techniques in Food and Agriculture, Vienna, Austria

Hypersaline environments such as subterranean evaporate deposits of seawater, brines located in arid, coastal and deep-sea areas, naturally occurring and artificial solar salterns, like the Dead Sea and hypersaline lakes, are inhabited by both halotolerant and halophilic microorganisms which can adapt to a wide range of salt concentration. Hypersaline environments are well known as habitats for halophiles and an understanding of the microbial isolates in these ecosystems is highly desirable due to their potential applications. In this study we investigated the halophilic archaeal phylogenetic diversity and community structure in five distinct hypersaline systems from Southern Tunisia (desert sand, “Sebkha” and “Chott”), using a combination of culture-dependent and independent approaches.

Isolation of haloarchaea was performed on a modified DSC-97 medium and plates were incubated at 30°C for 15 to 40 days. All isolates appeared with different morphological properties were purified and conserved, leading to a collection of 60 archaeal strains. Strain identification was based on the 16S rRNA gene. Phylogenetic analysis indicated that the 60 archaeal strains were members of nine different genera, those of *Halorubrum*, *Haloarcula*, *Halogeometricum*, *Haloterrigena*, *Halostagnicola*, *Haloferax*, *Natrinema*, *Halovivax* and *Natrialba*. A clear correlation was found between the recovered archaeal genera and the origin of isolation. *Halorubrum* sp. and *Haloarcula* sp. occurred mainly in saline systems (chott and sebkha), whereas the other genera were encountered in sand and bulk soil samples. Culture independent approach using a high-density DNA microarray (PhyloChip) was also applied in order to assess the diversity and the complexity of the archaeal communities present in these hypersaline environments.

Keywords: saline, archaea, diversity, PhyloChip

Μικροβιολογική ποιότητα και αλλοίωση ιχθύων ελληνικών υδατοκαλλιέργειών

Μποζιάρης Ι. Σ.

Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας & Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Φυτόκο, 38446 Ν. Ιωνία Βόλος

Η Ελληνική Υδατοκαλλιέργεια παράγει το 50% περίπου της ποσότητας σε τσιπούρα και λαβράκι στην Ευρωπαϊκής Ένωση. Τα εξαγωγικά προϊόντα είναι ολόκληρα ψάρια συσκευασμένα εντός πάγου σε περιέκτες πολυστυρενίου καθώς και απεντερωμένα-απολεπισμένα ψάρια και φιλέτα ψαριών σε σκευασίες αέρα και τροποποιημένης ατμόσφαιρας στους 0-2°C. Ο κύριος μηχανισμός υποβάθμισης της ποιότητας είναι η μικροβιολογική δραστηριότητα με αποτέλεσμα την παραγωγή μεταβολιτών που επιδρούν αρνητικά στις οργανοληπτικές ιδιότητες που τελικά οδηγούν στην απόρριψη του προϊόντος. Υπεύθυνοι για την αλλοίωση αυτή είναι ένα κλάσμα του αρχικού μικροβιακού πληθυσμού, οι Ειδικοί Αλλοιωγόνοι Μικροοργανισμοί (ΕΑΜ).

Ο αρχικός μικροβιακός πληθυσμός αποτελείται (i) από μικροοργανισμούς που προέρχονται από το υδάτινο περιβάλλον, (ii) μικροοργανισμούς του πεπτικού σωλήνα (των οποίων η ποικιλότητα και αφθονία εξαρτάται από το είδος της δίαιτα και την πενία που υποβάλλονται τα ψάρια πριν την αλίευση) και τέλος (iii) από τις επιμολύνσεις κατά τα στάδια της αλίευσης, θανάτωσης, επεξεργασίας και συσκευασίας. Το κλάσμα του αρχικού μικροβιακού πληθυσμού το οποίο θα αποτελέσει τους ΕΑΜ και κατ' επέκταση το είδος των παραγόμενων μικροβιακών μεταβολιτών εξαρτώνται κυρίως από τις συνθήκες θερμοκρασίας και ατμόσφαιρας που επικρατούν κατά την αποθήκευση-διακίνηση-έκθεση των προϊόντων.

Στην εργασία αυτή παρουσιάζονται και συζητούνται τα ευρήματα σχετικά με την ποικιλότητα και αφθονία της αρχικής και αλλοιωγόνου μικροχλωρίδας καθώς και των παραγόμενων μεταβολιτών. Ειδικότερα, οι σύγχρονες μελέτες χρησιμοποιώντας μοριακές τεχνικές, όπως η ανάλυση του γονιδίου 16S rRNA, δίδουν μια πιο ολοκληρωμένη εικόνα της μικροβιακής ποικιλότητας και αφθονίας, ενώ ο προσδιορισμός των παραγόμενων μεταβολιτών με SPME GC-MS, συμπληρώνουν την εικόνα που έχουμε σχετικά με την αλλοίωση των προϊόντων της Ελληνικής Υδατοκαλλιέργειας.

Λέξεις κλειδιά: αλιεύματα, αλλοιωγόνος μικροβιακός πληθυσμός, 16S rRNA

Microbiological quality and spoilage of Greek aquacultured fish

Boziaris I. S.

Department of Ichthyology and Aquatic Environment, School of Agricultural Sciences, University of Thessaly, Fitoko street 38446, Nea Ionia, Volos, Greece

The Greek Aquaculture Industry covers approx. the 50% of the total European production in sea bream and sea bass. The exported products are whole sea bream and sea bass packed in polystyrene boxes filled with ice and whole gutted fish and fish fillets stored at 0-2°C aerobically or under Modified Atmosphere Packaging (MAP). The main spoilage mechanism is the production of microbial metabolites by a fraction of the initial microbiota, the Specific Spoilage Organisms (SSOs).

The initial microbial population of fish flesh is depended on (i) the micro-biota of the aquatic environment, (ii) gastrointestinal micro-biota, (which is directly affected by the diet and the starvation time prior to slaughter) and (iii) microbial contamination during harvesting, slaughtering, processing and packaging. The fraction of the initial microbiota which will give the dominant spoilage microbiota (SSOs) and subsequently the microbial metabolites is depended on temperature and atmospheric conditions during storage and distribution.

This study presents and discusses the findings regarding the microbial diversity and metabolites produced during storage and distribution of sea bream and sea bass. The modern studies using 16S rRNA gene analysis and SPME GC-MS determination of metabolites give a more complete view of microbial diversity and spoilage of those products.

Keywords : seafood, spoilage microbiota, 16S rRNA

Συνδυαστική χρήση αντιμικροβιακών εδώδιμων μεμβρανών και μαρινάδων για την αδρανοποίηση *Salmonella* spp, *Escherichia coli* O157:H7 και *Listeria monocytogenes* κατά το ψήσιμο χοιρινού κρέατος

Ζιλελίδου¹ Ε., Λύτου² Α., Σκανδάμης³ Π.

¹Υποψήφια διδάκτωρ, Τμ. Επιστήμης & Τεχνολογίας Τροφίμων, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

²Μεταπτυχιακή φοιτήτρια, Τμ.Επιστήμης & Τεχνολογίας Τροφίμων, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

³Επίκουρος καθηγητής (Υπεύθυνος Επικοινωνίας), Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων και Ποτών, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιερά οδός 75, 118 55, Αθήνα, Ελλάδα

Η χρήση εδώδιμων αντιμικροβιακών μεμβρανών στη συσκευασία του κρέατος σε συνδυασμό με μαρινάρισμα θα μπορούσε να ενισχύσει τη θερμική αδρανοποίηση παθογόνων μικροοργανισμών κατά το ψήσιμο. Στόχος της μελέτης ήταν η εκτίμηση της επίδρασης συνδυαστικής χρήσης εδώδιμης μεμβράνης αλγινικού νατρίου με αιθέριο έλαιο ρίγανης και εμφάπτισης σε μαρινάδες, στη θερμική αδρανοποίηση της *Salmonella*, του *E.coli* O157:H7 και της *Listeria monocytogenes* κατά το ψήσιμο χοιρινού κρέατος

Τεμάχια χοιρινού κρέατος (20 g) εμβολιάστηκαν (6-6.5 log cfu/g) με μίγμα 3 στελεχών *Salmonella*, *E.coli* O157:H7 ή *Listeria monocytogenes* και τυλίχθηκαν με εδώδιμη μεμβράνη αλγινικού νατρίου 3% κ.ο. με (EFO) ή χωρίς (EF) 1% κ.ο. αιθέριο έλαιο ρίγανης. Ατύλιχτα τεμάχια, χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες. Όλα τα δείγματα συντηρήθηκαν αεροβίως στους 4°C για 4 ημέρες. Ακολούθως, εμβάπτιστηκαν σε μαρινάδες οικιακής παρασκευής (με βάση τη μπύρα ή το πορτοκάλι) ή εμπορικές (λεμόνι ή κρασί) ή σε ισοτονικό διάλυμα Ringer για 24 ώρες στους 4°C. Την 5η ημέρα τα δείγματα ψήθηκαν στους 65°C (θερμοκρασία κέντρου). Οι πληθυσμοί της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας και των παθογόνων προσδιορίστηκαν μετά τον εμβολιασμό, τη συντήρηση, την εμφάπτιση στις μαρινάδες και το ψήσιμο.

Η εφαρμογή EF μεμονωμένα και η εμφάπτιση σε μαρινάδες, δεν επέφεραν σημαντικές μειώσεις στους βακτηριακούς πληθυσμούς ($p>0.05$). Η συνδυαστική χρήση EFO και μαρινάδων μείωσε την *L.monocytogenes* κατά ~1.5 log cfu/g και την *Salmonella* και *E.coli* O157:H7 κατά ~2.5 log cfu/g σε σχέση με τους μάρτυρες. Το ψήσιμο μείωσε τους πληθυσμούς των παθογόνων κατά 2-4 log cfu/g στους μάρτυρες ενώ η μεταχείριση με EFO και μαρινάδες ενίσχυσε τη θερμική αδρανοποίηση των μικροοργανισμών. Ο συνδυασμός EFO και μαρινάδας λεμονιού μείωσε τους πληθυσμούς της *Salmonella* και του *E. coli* O157:H7 κάτω από το όριο ανίχνευσης (0.7 log cfu/g) κατά το ψήσιμο.

Η συντήρηση του κρέατος με εδώδιμες αντιμικροβιακές μεμβράνες, σε συνδυασμό με μαρινάρισμα θα μπορούσε να αποτελέσει αποτελεσματική φυσική μέθοδο για την ενίσχυση της μικροβιακής ασφάλειας του κρέατος.

Λέξεις κλειδιά: ψήσιμο, εδώδιμες μεμβράνες, μαρινάδες

Combined use of antimicrobial edible films, marination and cooking for the inactivation of *Salmonella*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* on pork meat

Zilelidou E.¹, Lytou A.², Skandamis P.³

¹PhD candidate, Department of Food Science & Technology, Agricultural University of Athens

²Master student, Agriculturalist-Food Technologist, PhD candidate, Laboratory of Food Quality Control and Hygiene, Agricultural University of Athens

³Assistant Professor (corresponding author), Laboratory of Food Quality Control and Hygiene, Department of Food Science & Technology, Agricultural University of Athens, Iera Odos 75, 118 55, Athens, Greece (pskan@aua.gr)

The aim of the study was to evaluate the combined effect of alginate edible films with oregano essential oil and marination on thermal inactivation of *Salmonella*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* on pork meat.

Pork pieces (20 g) were inoculated (6.5-7.0 log cfu/g) with a 3-strain composite of *Salmonella*, *E. coli* O157:H7, or *L. monocytogenes*. Inoculated meat was coated with alginate (3% w/v) edible films without (EF) or with 1% w/v oregano essential oil (EFO). Controls were uncoated meat pieces. Samples were stored aerobically at 4°C for 4 days. Following storage, samples were immersed for 24 hours at 4°C in: home-made marinades based on beer or orange juice and commercial based on lemon juice or red wine. Samples were also held in Ringer solution. Marinated samples were oven-cooked to an internal temperature of 65°C. Total viable counts and pathogen levels were determined after inoculation, storage, marination and cooking.

EF alone and marination alone did not lead to significant reductions of bacterial populations ($p > 0.05$). Combination of EFO and marinades caused decrease of *L. monocytogenes* by ~1.5 log cfu/g and *Salmonella* and *E. coli* O157:H7 by ~2.5 log cfu/g compared to controls. Oven-cooking resulted in 2-4 log cfu/g reductions of pathogens on controls. Treatment with EFO and marinades enhanced thermal destruction of bacteria. EFO and lemon based marinade combination, reduced *Salmonella* and *E. coli* O157:H7 levels below the detection limit (0.7 log cfu/g) after cooking. Antimicrobial packaging of meat in edible films combined with marination could be a natural means to increase microbial meat safety.

Keywords: cooking, edible films, marination

Παρακολούθηση της τύχης βιουμενίου *Listeria monocytogenes* με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης

Παπαϊωάννου Ε., Βερίλλης Π., Κορμάς Κ., Μποζιάρης Ι. Σ.*

Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας & Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Φυτόκο, 38446 Ν. Ιωνία Βόλος

Στη μελέτη αυτή πραγματοποιήθηκε (i) παρακολούθηση των πληθυσμιακών μεταβολών με καλλιεργητικές τεχνικές και (ii) παρατήρηση της αρχιτεκτονικής δομής του βιουμενίου *Listeria monocytogenes* με Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης, κατά το στάδιο ανάπτυξης αλλά και καθαρισμού-απολύμανσης σε μεταλλικές επιφάνειες ανοξείδωτου χάλυβα τύπου AISI-304, $3 \times 0.8 \times 0.1$ cm. Το θρεπτικό μέσο ανάπτυξης ήταν αποστειρωμένος ζωμός ιχθύος και η θερμοκρασία 15°C, συνήθης μέση θερμοκρασία που επικρατεί στις εγκαταστάσεις επεξεργασίας αλευτικών προϊόντων. Τα καθαριστικά και απολυμαντικά ήταν τα Hyrofoam VF6 και Divosan SU 319/VT 8w αντίστοιχα.

Τα κύτταρα των βακτηρίων προσκολλούνται πολύ ικανοποιητικά στις μεταλλικές επιφάνειες. με αρχικό πληθυσμό περί τα 3 με 4 log cfu/cm², και εντός 3 ωρών μετά την προσκόλληση έχουν αρχίσει ήδη να διαιρούνται και να πολλαπλασιάζονται. Στις 72 ώρες (3 ημέρες) ο πληθυσμός έφθασε τους 5,5 log cfu/cm², με το εξωπολυσακχαριτικό στρώμα στο οποίο εσωκλείονται τα κύτταρα να έχει ήδη σχηματισθεί. Ο μέγιστος πληθυσμός ήταν της τάξης των 6 log cfu/cm² και επιτεύχθηκε μετά από 192 ώρες (8 ημέρες).

Μετά την εμβάπτιση των μεταλλικών επιφανειών στο καθαριστικό για 15 min, η πλειοψηφία των κυττάρων του βιουμενίου της *Listeria monocytogenes* αδρανοποιήθηκε (μείωση 3 λογαρίθμων), ενώ δεν παρατηρήθηκε καμία σημαντική οπτική αλλαγή στο βιουμένιο ή στα προσκολλημένα κύτταρα. Η επακόλουθη εμβάπτιση στο απολυμαντικό για 15 min, μείωσε περαιτέρω τον πληθυσμό κατά 1 λογάριθμο, χωρίς ωστόσο ο πληθυσμός να μειωθεί κάτω του ορίου ανίχνευσης. Μετά και την επίδραση του απολυμαντικού παρατηρήθηκε δομική καταστροφή στην πλειοψηφία των κυττάρων του βιουμενίου.

Λέξεις κλειδιά: βιουμένιο, *Listeria monocytogenes*, ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης

Monitoring of the fate of *Listeria monocytogenes* biofilm using Scanning Electron Microscopy

Papaioannou E., Berillis P., Kormas K., Boziaris I. S.*

Department of Ichthyology and Aquatic Environment, School of Agricultural Sciences, University of Thessaly, Fitoko street 38446, Nea Ionia, Volos, Greece

In this study, (i) population changes using culture media and (ii) monitoring of architectural structure of *Listeria monocytogenes* biofilm on stainless steel metal surfaces using Scanning Electron Microscope was conducted during biofilm growth and cleaning-disinfection. The growth medium was sterile fish juice and the incubation temperature 15°C. The chemicals used for cleaning and disinfection was Hypofoam VF6 and Divosan SU 319/VT 8w, respectively.

Bacterial cells attached on metal surfaces with initial population of about 3-4 log cfu/cm², while division and propagation took place within the first 3 h of cell attachment. After 72 h (3d) the population reached the level of 5.5 log cfu/cm², while the outer polysaccharide layer had already formed. Maximum population density of 6 log cfu/cm² was observed after 192h (8d).

Application of cleaning chemicals for 15 min, reduced *Listeria monocytogenes* population from 6 down to 3 log cfu/cm² without any significant optical change to be observed on biofilm structure. Subsequently application of disinfectant for 15 min reduced further the population by approx. 1 log cycle, without however the population to be reduced below detection limit. After disinfectant application structural damage was observed for the majority of attached cells.

Keywords : biofilm, *Listeria monocytogenes*, Scanning Electron Microscopy

Διερεύνηση ποικιλότητας αλλοιογόνων μικροοργανισμών σε φιλέτα και ολόκληρη τσιπούρα στους 0°C με ανάλυση γονιδίου 16S rRNA

Παρλαπάνη Φ. Φ., Κορμάς Αρ. Κ., Μποζιάρης Ι. Σ.*

Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας & Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Φυτόκο, 38446 Ν. Ιωνία Βόλος

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε χαρακτηρισμός-διερεύνηση των αλλοιογόνων μικροοργανισμών σε τσιπούρα με τη χρήση κλασσικών και μοριακών τεχνικών. Σκοπός ήταν η διερεύνηση της μικροβιακής ποικιλότητας των αλλοιογόνων μικροοργανισμών με μοριακές τεχνικές καθώς και η ανάδειξη άλλων μικροοργανισμών που είναι πιθανό να συνεισφέρουν στην αλλοίωση και διαφεύγουν από την κλασσική ταυτοποίηση.

Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν ολόκληρες τσιπούρες υδατοκαλλιέργειας σε πάγο και φιλέτα τσιπούρας συσκευασμένα σε αέρα και τροποποιημένη ατμόσφαιρα (CO₂/O₂/N₂:60/10/30) στους 0°C. Η Ολική Μικροβιακή Χλωρίδα (OMX) απομονώθηκε και απαριθμήθηκε σε TSA. Κατόπιν, πραγματοποιήθηκε ομαδοποίηση των αποικιών με βάση τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά. Η ταυτοποίηση των μικροοργανισμών έγινε με φαινοτυπικές δοκιμές και με ανάλυση του γονιδίου 16S rRNA. Για τους ολόκληρους ιχθύες η ανάλυση του γονιδίου 16S rRNA πραγματοποιήθηκε από DNA το οποίο απομονώθηκε απευθείας από τη σάρκα.

Η ανάλυση του γονιδίου 16S rRNA έδειξε ότι οι *Pseudomonas* spp. ήταν οι κυρίαρχοι αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί και στα τρία προϊόντα (ολόκληρο ψάρι σε πάγο, φιλέτο σε αέρα και MAP στους 0°C). Στα φιλέτα αποθηκευμένα σε αέρα, η αλλοιογόνος μικροχλωρίδα με κλασσικές τεχνικές βρέθηκε να αποτελείται από *Pseudomonas fluorescens* και *Shewanella putrefaciens*, ενώ με μοριακές από *Pseudomonas fragi* και *Shewanella morhuae*. Στις συνθήκες MAP, ως κυρίαρχοι αλλοιογόνοι ταυτοποιήθηκαν με κλασσικές τεχνικές οι *Pseudomonas fluorescens* και *Aeromonas salmonicida* ενώ με μοριακές οι *Pseudomonas veronii* and *Pseudomonas trivialis*. Στην ολόκληρη τσιπούρα με βάση τις φαινοτυπικές δοκιμές κυρίαρχοι ήταν οι *Pseudomonas fluorescens* και *Shewanella putrefaciens*, ενώ με απευθείας εξαγωγή DNA και κατόπιν κλωνοποίηση και αλληλούχηση φάνηκε ότι και ο *Aeromonas salmonicida* αποτελεί μέρος της κυρίαρχης μικροχλωρίδας αλλοίωσης.

Η χρήση μοριακών τεχνικών δίνει πληροφόρηση συμπληρωματική των κλασσικών. Επιπλέον, επιτυγχάνεται η ανεύρεση και άλλων μικροοργανισμών που είναι πιθανό να συνεισφέρουν στην αλλοίωση και διαφεύγουν από την κλασσική ταυτοποίηση.

Λέξεις κλειδιά: αλλοίωση, μικροβιακή ποικιλότητα, 16S rRNA

Microbial spoilage diversity of fillets and whole sea bream stored at 0°C determined by 16S rRNA gene analysis

Parlapani F. F., Kormas K. Ar. and Boziaris I. S.

Dept. of Ichthyology and Aquatic Environment, School of Agricultural Sciences, University of Thessaly, Fitokou street, 38446, N. Ionia, Volos, Greece

Culture independent techniques are used for studying seafood microbial ecology because of their ability to describe both cultivable and uncultivable bacteria within a population. Investigation of the microbial spoilage diversity of sea-bream using phenotypic and molecular techniques was carried out.

For the analysis whole sea-bream stored in ice and sea-bream fillets stored under air and MAP (CO₂: 60%, O₂: 10%, N₂: 30%) at 0°C were used. After TVC enumeration the colonies from TSA plates were grouped according to their morphological characteristics. Each colony was tested against a set of phenotypic characteristics and 16S rRNA genes sequencing analysis. From whole fish in ice 16S rRNA genes sequencing analysis flesh was performed by DNA totally extracted directly from fish flesh.

Pseudomonas was the predominant spoilage bacterium of all products. The phenotypic identification showed that the fillets stored in air were spoiled by *Pseudomonas fluorescens* and *Shewanella putrefaciens*, while the fillets under MAP were spoiled by *Pseudomonas fluorescens* and *Aeromonas salmonicida*. Using molecular approach the spoilage microbiota of fillets stored in air was dominated by *Pseudomonas fragi* and *Shewanella morhuae*, while *Pseudomonas veronii* and *Pseudomonas trivialis* were dominated in fillets under MAP. *Pseudomonas fluorescens* and *Shewanella putrefaciens* were the predominant microbiota of iced stored sea bream based on traditional approach, while *Aeromonas salmonicida* was recognized as co-dominant by using DNA extraction directly from fish flesh.

Combination of classical and molecular methodologies provides valuable complementary information regarding microbiological spoilage. Spoilage bacteria that escape the standard classical approaches can also be determined.

Keywords : spoilage, microbiota, 16S rRNA

Παραγωγή εδώδιμων μανιταριών από λιγνοκυτταρινούχα υπολείμματα – Αξιολόγηση της διαδικασίας καλλιέργειας και των τελικών προϊόντων

Κουτρώτσιος Γ.1, Μουντζούρης Κ.2, Χατζηπαυλίδης Ι.1 και Ζερβάκης Γ.Ι.1

1Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας, Εργαστήριο Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας, Ιερά Οδός 75, 11855 Αθήνα (e-mail: zervakis@aia.gr)

2Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής και Δοκοκαλλιέργειών, Εργαστήριο Φυσιολογίας Θρέψεως και Διατροφής, Ιερά Οδός 75, 11855 Αθήνα

Η καλλιέργεια των μανιταριών αποτελεί μια ελεγχόμενη ζύμωση στερεάς φάσης για τη μετατροπή φυτικών υπολειμμάτων σε εδώδιμη βιομάζα με αξιόλογα διατροφικά χαρακτηριστικά. Στην παρούσα εργασία διερευνήθηκε η καταλληλότητα εννέα διαφορετικών γεωργικών και δασικών παραπροϊόντων ως υποστρώματων για την καλλιέργεια των ειδών *Agrocybe cylindracea* και *Pleurotus ostreatus*. Επιπλέον, μελετήθηκε η χημική σύσταση των μανιταριών και του εξαντλημένου υποστρώματος σε σχέση με τις συνθήκες καλλιέργειας. Το *P. ostreatus* ολοκλήρωσε εντός 3-5 εβδομάδων τον αποικισμό των υποστρώματων, ενώ το *A. cylindracea* χρειάστηκε 5-6 εβδομάδες για τα περισσότερα υποστρώματα συμπεριλαμβανομένου και του άχυρου σιτηρών (μάρτυρας). Τα στέμφυλα οινοποιίας υποστήριξαν την υψηλότερη παραγωγή και για τα δύο είδη που μελετήθηκαν, ενώ αρκετά άλλα υποστρώματα απόδωσαν το ίδιο καλά με τον μάρτυρα (δηλ. 50-70% ν.β. μανιταριών ως προς το ξ.β. υποστρώματος). Επιπλέον, τα παραπροϊόντα ελαιουργείων έδωσαν ικανοποιητική -ποιοτικά και ποσοτικά- παραγωγή.

Η περιεκτικότητα των μανιταριών που αναλύθηκαν για διάφορα στοιχεία ή κατηγορίες ενώσεων (C, N, ολικά λιπίδια, ινώδεις ουσίες, ελεύθερες αζώτου εκχυλισματικές ουσίες κλπ.) γενικά δεν διέφερε σε σχέση με τιμές της βιβλιογραφίας. Εξαίρεση αποτέλεσε η σημαντικά υψηλότερη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες των μανιταριών που αναπτύχθηκαν σε κελύφη ξηρών καρπών (45% και 32% για τα *P. ostreatus* και *A. cylindracea* αντίστοιχα). Η σύσταση των μανιταριών *Pleurotus* επηρεάστηκε ιδιαίτερα από τη φύση των υποστρώματων που χρησιμοποιήθηκαν (σε αντίθεση με ότι διαπιστώθηκε για τις καρποφορίες *Agrocybe*), ενώ δεν καταγράφηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε συγκρίσεις μεταξύ των δύο ειδών όσον αφορά στην περιεκτικότητα τους σε οποιαδήποτε κατηγορία στοιχείων ή ενώσεων μελετήθηκαν. Επίσης, δεν παρατηρήθηκε κάποια συσχέτιση μεταξύ της σύστασης των μανιταριών και των υποστρώματων από τα οποία προήλθαν.

Αξιοσημείωτο ήταν το ότι σε πολλές περιπτώσεις τα εξαντλημένα υποστρώματα καλλιέργειας παρουσίασαν υψηλότερο πρωτεϊνικό περιεχόμενο και σημαντική μείωση των ινωδών ουσιών (ειδικά κυτταρίνης και ημικυτταρίνων) σε σχέση με το αρχικό υλικό, γεγονός που μπορεί να επιτρέψει την αξιοποίησή τους ως ζωοτροφή.

Λέξεις κλειδιά: καλλιέργεια *Agrocybe*, εδώδιμα μανιτάρια, εξαντλημένο υπόστρωμα *Pleurotus*

Ευχαριστίες: Η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του ερευνητικού έργου με τίτλο “Μεταγονιδιωματική ανάλυση λιγνολυτικών μικροοργανισμών - Βιομετατροπή παραπροϊόντων φυτικής προέλευσης σε προϊόντα υψηλής προστιθέμενης αξίας” (Πρόγραμμα ‘ΘΑΛΗΣ’).

Edible mushroom biomass generated from lignocellulosic residues - Evaluation of cultivation process and of end-products

Koutrotsios G.1, Mountzouris K.C.2, Chatzipavlidis I.1 and Zervakis G.I.1

1Agricultural University of Athens, Department of Agricultural Biotechnology, Laboratory of General and Agricultural Microbiology, Iera Odos 75, 11855 Athens, Greece (e-mail: zervakis@aua.gr)

2Agricultural University of Athens, Department of Nutritional, Physiology and Feeding, Iera Odos 75, 11855 Athens, Greece

Mushroom cultivation constitutes a controlled solid fermentation process aiming at converting plant residues into edible biomass with noteworthy nutritional characteristics. This work examined the suitability of nine different agricultural and forestry by-products to serve as substrates for the cultivation of *Agrocybe cylindracea* and *Pleurotus ostreatus* by evaluating several production-related parameters. In addition, the chemical composition of the mushrooms and of the spent substrate was studied in relation to various cultivation conditions. For most of the substrates tested, *P. ostreatus* was a faster colonizer than *A. cylindracea* by completing the incubation stage within 3-5 weeks in nuts-shells, palm leaves and grape-marc based cultivation media, whereas *A. cylindracea* required 5-6 weeks for most substrates incl. wheat-straw (control). The grape-marc substrate provided the highest mushroom yields for both species examined, followed by several other media that performed equally well with wheat straw (i.e. 50-70% mushrooms f.w. to substrate d.w.). In addition, olive by-products supported satisfactory mushroom productivity and quality.

In general, mushrooms content in various elements/compounds (C, N, total lipids, crude fibers, nitrogen-free extract, etc.) was in accordance with respective literature values. However, the protein content of mushrooms produced on nuts-shells based substrates was significantly higher (45% and 32% for *P. ostreatus* and *A. cylindracea* respectively). Furthermore, *Pleurotus* mushrooms composition was markedly affected by the nature of the cultivation media used (in contrast to what was observed for *Agrocybe* basidiomata), while no statistical significant differentiation was observed between the two species as regards their content in anyone of the compounds examined. No correlation was also detected between substrates and mushrooms composition.

Noteworthy was the fact that in many cases, spent mushroom substrates demonstrated higher protein content and a significant decrease in fibers (notably cellulose and hemicelluloses) in respect the initial material, which might render them suitable as animal feed.

Acknowledgments: This study was carried out in the frame of the research project entitled “Metagenomics of ligninolytic microorganisms – Bioconversion of plant by-products into high-added value products” (Thalis Programme).

Το εκτομυκορριζικό γένος *Lactarius* Pers. στην Ελλάδα - Νέα στοιχεία για τη δομή του ταξινομικού τμήματος *Olentes*

Τριανταφύλλου Μ.1, Πολέμης Η.1, Γκόνου-Ζάγκου Ζ.2, Δήμου Δ.Μ.1.3, Δεληβοριάς Π.2 και Ζερβάκης Γ.Ι.1

1Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας, Εργαστήριο Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας, Ιερά Οδός 75, 11855 Αθήνα (e-mail: zervakis@aia.gr)

2Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Βιολογίας, Τομέας Οικολογίας και Συστηματικής, 15784 Αθήνα

3Κορυτσάς 10, 15343 Αγία Παρασκευή, Αθήνα

Τα μέλη του εκτομυκορριζικού γένους *Lactarius* (Russulaceae, Basidiomycota) σχηματίζουν συμβιωτικές σχέσεις με ένα μεγάλο εύρος φυτικών ειδών και χαρακτηρίζονται από βασιδιόματα, τα οποία εκκρίνουν ένα γαλακτώδες υγρό όταν τραυματιστούν. Στην παρούσα εργασία εξετάστηκε το σύνολο σχεδόν του διαθέσιμου υλικού του γένους στην Ελλάδα, δηλαδή 149 δείγματα που είχαν αρχικά ταυτοποιηθεί σε 36 είδη *Lactarius*. Η αναλυτική διερεύνηση των μακροσκοπικών και μικροσκοπικών χαρακτήρων με χρήση σύνθετου οπτικού και DIC μικροσκοπίου καθώς και ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα της αλληλούχησης του τμήματος ITS1-5,8S-ITS2 rDNA σε επιλεγμένα τάξα αποκάλυψαν πως το υπό μελέτη υλικό αντιπροσωπεύει στην πραγματικότητα 32 είδη *Lactarius* (31 συν το *L. cf. flavidus*). Η προηγουμένως αναφερθείσα παρουσία στην Ελλάδα των *L. circellatus*, *L. evosmus*, *L. ilicis*, *L. leonis*, *L. musteus*, *L. scrobiculatus* και *L. torminosus* δεν επιβεβαιώθηκε από τα ευρήματα αυτής της εργασίας. Ένα δείγμα αρχικά κατατεθειμένο ως *L. insulsus* επαναπροσδιορίστηκε ως *L. zonarioides*. Επίσης καταγράφηκαν τέσσερα επιπλέον είδη, τα *L. mairei*, *L. intermedius*, *L. glaucescens* και *L. lacunarum*, από τα οποία τα δύο τελευταία αναφέρονται για πρώτη φορά στην Ελλάδα. Επιπροσθέτως, οι σχέσεις μεταξύ των *L. atlanticus*, *L. serifluus* και *L. subumbonatus* (τμήμα *Olentes*) διερευνήθηκαν για πρώτη φορά με αλληλούχηση της περιοχής ITS1-5,8S-ITS2 rDNA. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως τα *L. atlanticus* και *L. subumbonatus* αποτελούν δύο διακριτά φυλογενετικά είδη, τα οποία επικουρικά διαφοροποιούνται και από μακρομορφολογικά κριτήρια και τον τύπο του ενδαιτήματος. Με βάση αυτά τα δεδομένα, χαρακτήρες όπως το σχήμα και το ύψος της διακόσμησης στα βασιδιοσπόρια αποκτούν διαγνωστική αξία. Το μοναδικό διαθέσιμο δείγμα *L. serifluus* ήταν όμοιο μορφολογικά με το *L. subumbonatus*, ενώ επιπλέον ομαδοποιήθηκε στο ίδιο φυλογενετικό γκρουπ. Έτσι τα δύο τάξα ανήκουν πιθανότητα στο ίδιο είδος. Τέλος, τα αμερικανικά τάξα *L. fragilis* var. *rubidus* και *L. subserifluus* παρουσίασαν μεγάλη φυλογενετική ομοιότητα με τα *L. subumbonatus* και *L. atlanticus* αντίστοιχα.

Λέξεις κλειδιά: εκτομυκόρριζα, *Lactarius atlanticus* και *L. subumbonatus*, φυλογενετικό είδος και βασιδιομύκητες

Ευχαριστίες: Η παρούσα εργασία χρηματοδοτήθηκε εν μέρει από το έργο SALTMYC 380233 (Πρόγραμμα 'ΘΑΛΗΣ'). Ευχαριστούμε ιδιαίτερα τους συναδέλφους Κ. Φασσέα για τη βοήθεια του στην ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης και τους Σ. Διαμαντή, Ζ. Αθανασίου, Α.-Μ. Verbeken, G. Venturella και G. Lalli για τα δείγματα *Lactarius* που έθεσαν στη διάθεση μας.

The ectomycorrhizal genus *Lactarius* Pers. in Greece - New data on the infrastructure of the section *Olentes*

Triantafyllou M.¹, Polemis E.¹, Gonou-Zagou Z.², Dimou D.M.^{1,3}, Delivorias P.² and Zervakis G.I.¹

¹Agricultural University of Athens, Department of Agricultural Biotechnology, Laboratory of General and Agricultural Microbiology, Iera Odos 75, 11855 Athens, Greece (zervakis@aua.gr)

²University of Athens, Faculty of Biology, Department of Ecology and Systematics, 15784 Athens, Greece

³Korytsas 10, 15343 Agia Paraskevi, Greece

Members of the ectomycorrhizal genus *Lactarius* (Russulaceae, Basidiomycota) form symbiotic relationships with a wide range of plant species, and they are characterized by basidiomata that secrete a milky latex when injured. For the purposes of this study, nearly all available material identified as *Lactarius* in Greece was examined, i.e. 149 specimens originally assigned in 36 species. The detailed study of macroscopical and microscopical characteristics using compound optical, DIC and scanning electron microscopy in combination with the outcome of ITS1-5.8S-ITS2 rDNA sequencing for selected *Lactarius* taxa showed that the studied specimens represented in fact 32 species of *Lactarius* (31 spp. plus *L. cf. flavidus*). The reported presence in Greece of *L. circellatus*, *L. evosmus*, *L. ilicis*, *L. leonis*, *L. musteus*, *L. scrobiculatus* and *L. torminosus* could not be confirmed from the material studied. One specimen deposited as *L. insulsus* was re-identified as *L. zonarioides*. Moreover, four additional species were recorded, namely *L. mairei*, *L. intermedius*, *L. glaucescens* and *L. lacunarum* (the latter two are reported for the first time in Greece). In addition, the relationships among *L. atlanticus*, *L. serifluus* and *L. subumbonatus* (section *Olentes*) were investigated for the first time through sequencing of their ITS1-5.8S-ITS2 rDNA regions. Results demonstrated that *L. atlanticus* and *L. subumbonatus* are two distinct phylogenetic species, also distinguished by certain macromorphological criteria and host preference. Furthermore, basidiospores shape and height of spore ornamentation proved to be of diagnostic value. The only *L. serifluus* specimen available presented identical morphology to *L. subumbonatus* material; moreover, it was grouped together with *L. subumbonatus* specimens in the same phylogenetic cluster. Hence, these two taxa most possibly represent one single species. Finally, the American taxa *L. fragilis* var. *rubidus* and *L. subserifluus* showed relatively high phylogenetic affinity with *L. subumbonatus* and *L. atlanticus* respectively.

Acknowledgments: This work was partly supported by the SALTMYC 380233 project (Thalis Programme). We would like to thank our colleagues C. Fasseas for helping with SEM observations, and S. Diamandis, Z. Athanasiou, A.-M. Verbeken, G. Venturella and G. Lalli for providing *Lactarius* specimens.

Νέα δεδομένα για το βακτήριο *Olivibacter sitiensis* - Ανάλυση γονιδιώματος

Ντούγιας Σ.¹, Klenk H.-P.², Woyke T.³, Kyriades N.C.³ και Ζερβάκης Γ.Ι.⁴

¹Εργαστήριο Διαχείρισης και Τεχνολογίας Υγρών Αποβλήτων, Τμήμα Μηχανικών Περιβάλλοντος, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης, Βασ. Σοφίας 12, 67100 Ξάνθη

²Leibniz Institute DSMZ – German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig, Germany

³Department of Energy Joint Genome Institute, Genome Biology Program, 2800 Mitchell Drive, Walnut Creek, CA 94598, USA

⁴Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας, Εργαστήριο γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας, Ιερά Οδός 75, 11855 Αθήνα (zervakis@aua.gr)

Το βακτήριο *Olivibacter sitiensis* Ntougias et al. 2007 ανήκει στην οικογένεια *Sphingobacteriaceae* του φύλου *Bacteroidetes*. Το γένος *Olivibacter* αποτελείται από 5 είδη, δηλ. τα *O. sitiensis*, *O. soli*, *O. ginsengisoli*, *O. terrae* και *O. oleidegradans*, με το στέλεχος AW-6T (=DSM 17696T=CECT 7133T) να είναι το τυπικό στέλεχος και είδος του γένους. Τα μέλη του γένους είναι υποχρεωτικά αερόβια, ετερότροφα, Gram-αρνητικά, ραβδόμορφα βακτήρια και δεν διαθέτουν μαστίγια. Τα κυριότερα λιπαρά οξέα στη μεμβράνη του *O. sitiensis* είναι τα C16 : 1□7c και/ή iso-C15 :0 2-OH, iso-C15:0, iso-C17:0 3-OH και C16:0. Στην αναπνευστική αλυσίδα του ανιχνεύτηκε μενακινόνη-7. Το στέλεχος *O. sitiensis* AW-6T απομονώθηκε από ελαιοπυρηνόλυμα (δηλαδή από το ημιστερέο απόβλητο, που προκύπτει κατά την εξαγωγή ελαιολάδου από φυγοκεντρικά ελαιουργεία δύο φάσεων) στο οποίο είχε προστεθεί Ca(OH)₂ και προερχόταν από την περιοχή της Σητείας Κρήτης. Τα στελέχη του είδους *O. sitiensis* εμπλέκονται κυρίως στην αποδόμηση σύνθετων και δύσκολα διασπώμενων οργανικών ενώσεων. Άλλα μέλη του γένους *Olivibacter* έχουν απομονωθεί από ποικίλα ενδιαίτηματα, όπως από επιβαρυμένες με ρύπους θέσεις, προϊόντα αερόβιας ζύμωσης και παχύρρευστα απόβλητα. Στην παρούσα εργασία παρουσιάζονται τα γενετικά χαρακτηριστικά του στελέχους *O. sitiensis* AW-6T, τα οποία προσδιορίστηκαν μετά την αλληλούχηση του γονιδιώματος του. Η αλληλούχηση πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του προγράμματος “Genomic Encyclopedia for Bacteria and Archaea (GEBA)” του DOE Joint Genome Institute και το συγκεκριμένο στέλεχος είναι το πρώτο μέλος του γένους *Olivibacter* του οποίου το γονιδίωμα αλληλουχείται. Το μέγεθος του γονιδιώματος είναι 5.053.571 bp, αποτελείται από 110 «scaffolds» και το ποσοστό GC είναι 44,63%. Αναγνωρίστηκαν 4.565 γονίδια, από τα οποία τα 4.501 ήταν γονίδια που κωδικεύουν πρωτεΐνες, τα δε 64 ήταν μόρια RNA. Στα περισσότερα από τα γονίδια που κωδικεύουν πρωτεΐνες (68,5%) αποδόθηκε από μια υποθετική λειτουργία.

Λέξεις κλειδιά: *Olivibacter sitiensis*, γονιδίωμα, Genomic Encyclopedia for Bacteria and Archaea

***Olivibacter sitiensis* revisited – Data from genome sequence analysis**

Ntougias S.¹, Klenk H.-P.², Woyke T.³, Kyrpides N.C.³ and Zervakis G.I.⁴

¹*Laboratory of Wastewater Management & Treatment Technologies, Department of Environmental Engineering, Democritus University of Thrace, Vas. Sofias 12, 67100 Xanthi, Greece*

²*Leibniz Institute DSMZ – German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig, Germany*

³*Department of Energy Joint Genome Institute, Genome Biology Program, 2800 Mitchell Drive, Walnut Creek, CA 94598, USA*

⁴*Agricultural University of Athens, Department of Agricultural Biotechnology, Laboratory of General and Agricultural Microbiology, Iera Odos 75, 11855 Athens, Greece (zervakis@aua.gr)*

Olivibacter sitiensis Ntougias et al. 2007 is a member of the family *Sphingobacteriaceae*, phylum *Bacteroidetes*. The genus *Olivibacter* consists of five taxonomically-described species, i.e. *O. sitiensis*, *O. soli*, *O. ginsengisoli*, *O. terrae* and *O. oleidegradans*, with strain AW-6T (=DSM 17696T=CECT 7133T) being the type strain and species of the genus. All members of the genus are aerobic and heterotrophic, non-motile, Gram-negative rods. The main fatty acids detected in the cytoplasmic membrane of *O. sitiensis* are C16 : 1□7c and/or iso-C15 : 0 2-OH, iso-C15:0, iso-C17:0 3-OH and C16:0. Menaquinone-7 was identified in the respiratory chain of the type species of the genus *Olivibacter*. *O. sitiensis* AW-6T was isolated from alkaline alpeorujo, a viscous olive mill waste generated by a two-phase decanter system operating in the area of Sitia, Crete, Greece. *O. sitiensis* was reported to be involved in the degradation of complex recalcitrant compounds. Other members of the genus *Olivibacter* were isolated from several environmental sources, including contaminated sites, composts and viscous wastes. The genetic features of this microorganism, together with the high quality draft genome sequence, are presented herein. The organism was sequenced under the Genomic Encyclopedia for Bacteria and Archaea (GEBA) project at the DOE Joint Genome Institute and it is the first genome sequence of a species within the genus *Olivibacter*. The genome is 5,053,571 bp long and comprises 110 scaffolds with an average GC content of 44.63%. Of the 4,565 genes predicted, 4,501 were protein coding genes and 64 RNAs. Most protein coding genes (68.5%) were assigned to a putative function

Οι πεπτιδουλ-πρόλυλ *cis/trans* ισομεράσες ως νέοι ρυθμιστές της κινητικότητας των βακτηρίων και της ικανότητας σχηματισμού βιοϋμενίων

Δήμου Μ., Ζωγράφου Χ., Σκαγιά Α., Βεζύρη Ε., Βενιεράκη Α., Κατινάκης Π.

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

Η προλίνη, λόγω της πλευρικής αλυσίδας, μπορεί να διαθέτει τόσο τη *cis* όσο και την *trans* διαμόρφωση στον πεπτιδικό δεσμό, με αποτέλεσμα τη δημιουργία διακριτών και αλληλομετατρέπομενων πρωτεϊνικών δομών. Οι πεπτιδουλ-πρόλυλ *cis/trans* ισομεράσες (PPIases, EC: 5.2.1.8), επιταχύνοντας αυτήν την αλληλομετατροπή, ελέγχουν διάφορες κυτταρικές λειτουργίες όπως ο κυτταρικός κύκλος και η πρωτεϊνική ομοιόσταση ενώ μπορούν να συμμετέχουν και στο σωστό δίπλωμα των πρωτεϊνών. Οι βακτηριακές πεπτιδουλ-πρόλυλ *cis/trans* ισομεράσες αν και δεν είναι απαραίτητες για την ανάπτυξη σε εργαστηριακές συνθήκες, διαθέτουν σημαντικό ρόλο στην επιβίωση των βακτηρίων τόσο σε φυσιολογικά όσο και σε παθογενή περιβάλλοντα. Στην παρούσα μελέτη παρουσιάζουμε το φαινοτυπικό χαρακτηρισμό στελεχών *Escherichia coli*, τα οποία χαρακτηρίζονται από απαλοιφή ή υπερέκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν για πεπτιδουλ-πρόλυλ *cis/trans* ισομεράσες. Από τα αποτελέσματα προκύπτει πως κάποιες πεπτιδουλ-πρόλυλ *cis/trans* ισομεράσες επηρεάζουν αρνητικά την ικανότητα κολύμβησης των βακτηρίων καθώς και συγκεκριμένες μορφές κοινωνικής συμπεριφοράς όπως η ομαδική κίνηση σε επιφάνειες και η δημιουργία βιοϋμενίων. Τέλος, λόγω του ότι οι πεπτιδουλ-πρόλυλ *cis/trans* ισομεράσες αποτελούν τρεις οικογένειες πρωτεϊνών με συγκλίνουσα εξέλιξη, μελετήσαμε τη λειτουργική συμπληρωματικότητα κάθε μέλους αυτών των οικογενειών με τα υπόλοιπα μέλη και των τριών οικογενειών, στις παραπάνω συνθήκες.

Λέξεις κλειδιά: Peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerases; bacterial motility; biofilm

Peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerases as novel regulators of bacterial motility and biofilm formation

Dimou M, Zografou C, Skagia A, Vezyri E, Venieraki A, Katinakis P

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

Due to its cyclic side chain, proline can adopt both *cis* and *trans* conformations about its peptide bond, creating distinct and interconvertible backbone structures. Peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerases (PPIases, EC: 5.2.1.8), speeding this interconversion control the duration and amplitude of a variety of cellular processes such as cell-cycle and protein quality assessment and turnover while they can also act on polypeptides as folding helper enzymes. Bacterial PPIases although appear to be non essential for growth under laboratory conditions they have significant roles in survival in environmental and pathogenic niches. In the present study we phenotypically characterized *Escherichia coli* PPIase-deletion and over-expression strains and we show that some PPIases negatively affect swimming ability as well as specific forms of bacterial social behavior such as swarming motility and biofilm formation. Finally, since PPIases constitute three convergently evolved gene families, we clarified the functional redundancy of each protein with the rest members of all three families under these conditions.

Keywords: Peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerases; bacterial motility; biofilm

Υπερανθεκτικότητα των παθογόνων *L. monocytogenes* και *Salmonella* sp. σε αντιβιοτικά και μετέπειτα επιβίωσή τους σε συνθήκες καταπόνησης

Μανιός Σ. Γ., Ζώης Ι., Καμιντζής Γ., Σκανδάμης Π.Ν.

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου Τροφίμων και Ποτών, Ιερά οδός 75, 118 55, Αθήνα

Η ανεξέλεγκτη χρήση αντιβιοτικών ουσιών στα ζώα μπορεί να επιφέρει σταδιακή προσαρμογή παθογόνων μικροοργανισμών σε αυτά, καθιστώντας δυσκολότερη την αντιμετώπισή τους με τις κλασικές μεθόδους ελέγχου που χρησιμοποιούνται στην βιομηχανία τροφίμων. Σκοπός της έρευνας ήταν η μελέτη της ανθεκτικότητας στελεχών *Listeria monocytogenes* και *Salmonella* sp. σε συνθήκες θερμικής, όξινης και αλκαλικής καταπόνησης, μετά από προσαρμογή τους σε υψηλές συγκεντρώσεις τριών αντιβιοτικών. Με τη χρήση της μεθόδου διάχυσης δισκίων σε άγαρ, τριάντα στελέχη διαφορετικής προέλευσης από κάθε παθογόνο ταξινομήθηκαν μεταξύ τους ως προς την εγγενή ανθεκτικότητά τους σε 10 αντιβιοτικά (αμπικιλίνη, αμοξικιλίνη/κλαβουλανικό οξύ, σιπροφλοξασίνη, κεφοταξίμη, χλωραμφαινικόλη, ερυθρομυκίνη, γενταμικίνη, ριφαμπικίνη, στρεπτομυκίνη, τετρακυκλίνη). Εξ' αυτών, επιλέχθηκαν τρία αντιβιοτικά για *Salmonella* sp. (ριφαμπικίνη, στρεπτομυκίνη, αμπικιλίνη) και δύο για *L. monocytogenes* (ριφαμπικίνη, στρεπτομυκίνη), στα οποία παρουσιάστηκε η μεγαλύτερη διακύμανση στην ανθεκτικότητα. Ακολούθως επιλέχθηκαν ένα ευαίσθητο, ένα ενδιάμεσης ανθεκτικότητας και ένα ανθεκτικό στελέχος σε αυτά τα αντιβιοτικά και προσαρμόστηκαν σε σταδιακά αυξανόμενες συγκεντρώσεις του ίδιου αντιβιοτικού, έως ότου δεν υπήρξε εμφανής ανάπτυξη (υπερανθεκτικότητα). Ακολούθως, τα στελέχη αυτά εκτέθηκαν σε θερμοκρασία 60°C σε υδατόλουτρο εντός τριχοειδών σωλήνων, και όξινη (pH 3.5) ή αλκαλική (pH 10.5) καταπόνηση σε TSB. Η προέλευση των στελεχών δεν συσχετίστηκε με την εγγενή ανθεκτικότητα τους στα αντιβιοτικά, ωστόσο ήταν αξιοσημείωτη η διακύμανση στην ανθεκτικότητα αυτών. Η σταδιακή προσαρμογή των στελεχών των δύο παθογόνων σε υψηλές συγκεντρώσεις ριφαμπικίνης, ευαισθητοποίησε τα στελέχη ενάντια στις διαφορετικές καταπονήσεις στις οποίες εκτέθηκαν, σε σχέση με τις μητρικές καλλιέργειες. Τα υπερανθεκτικά στελέχη *Salmonella* sp. στην αμπικιλίνη ή την στρεπτομυκίνη, εμφάνισαν την ίδια ή μειωμένη ανθεκτικότητα σε όλες τις καταπονήσεις. Αντίθετα, παρατηρήθηκε αυξημένη οξεοανθεκτικότητα των υπερανθεκτικών στελεχών *L. monocytogenes* στην στρεπτομυκίνη. Η παρατεταμένη έκθεση του παθογόνου *L. monocytogenes* σε αντιβιοτικές ουσίες μπορεί να προκαλέσει ανάπτυξη μηχανισμών διασταυρούμενης προστασίας ενάντια σε συνθήκες οξύτητας, αυξάνοντας τον κίνδυνο επιβίωσής του σε τρόφιμα χαμηλού pH ή στα οξέα του στομάχου.

Λέξεις κλειδιά: Αντιβιοτικά, υπερανθεκτικότητα, *L. monocytogenes*, *Salmonella* sp.

Effect of antibiotic hyper-resistance on the survival of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* sp. after exposure to lethal heat, acid or alkaline conditions

Manios S. G., Zois I., Kamintzis G., Skandamis P. N.

Agricultural University of Athens, Department of Food Science and Technology, Laboratory of Food Quality Control and Hygiene, Iera odos 75, 118 55, Athens Greece

The objective of the study was to evaluate the thermo-, acid- and alkaline tolerance of different *L. monocytogenes* and *Salmonella* sp. strains with artificially induced resistance to high concentrations of three antibiotics. Using the disk diffusion method, thirty strains of each pathogen were ranked in accordance with their indigenous resistance to 10 antibiotics (AMP, AMC, CTX, C, CIP, CN, E, RD, S, TE). Three antibiotics (RD, S, AMP) for *Salmonella* sp. and two for *L. monocytogenes* (RD, S) were selected, based on the high variation of antibiotic resistance observed among the strains. A susceptible, an intermediate and a resistant strain to each of these antibiotics were adapted to gradually increasing concentrations of the antibiotics in order to obtain hyper-resistant (HR) strains. Then the HR strains were exposed to 60°C (using capillary tubes), in TSB with pH of 3.5 or TSB of pH 10.5. Although remarkable variation of intrinsic resistance to antibiotics was observed among the strains, the isolation origin could not be directly linked to this resistance. HR-RD strains of both pathogens showed increased sensitivity to all stresses. In addition, adaptation of *Salmonella* sp. strains to high concentrations of AMP or S did not affect or sensitized the cells against the lethal stresses. In contrast, HR-S strains of *L. monocytogenes* showed higher survival in pH 3.5, compared with parental cultures. Adaptation of *L. monocytogenes* to high concentrations of antibiotics may cause further cross-protection against acidic conditions which may be encountered during food manufacturing.

Keywords: Antibiotics, hyper-resistance, *L. monocytogenes*, *Salmonella* sp.

Ενιαίο μοντέλο πρόρρησης για τον προσδιορισμό του χρόνου ζωής όξινων ορεκτικών σε συνδυασμό με φυσικοχημικές και μικροβιακές μεταβολές

Μανιός Σ. Γ., Κετσάτης Σ., Σκανδάμης Π. Ν.

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου Τροφίμων και Ποτών, Ιερά οδός 75, 118 55, Αθήνα

Οι ελληνικές παραδοσιακές σαλάτες είναι όξινα ορεκτικά (pH 3.6-4.5) με χρόνο ζωής 2-3 μήνες υπό ψύξη. Ωστόσο, τα προϊόντα μπορεί να εκτεθούν σε υψηλές θερμοκρασίες ικανές να μειώσουν σημαντικά τον υπολειπόμενο χρόνο ζωής τους. Στόχοι της έρευνας ήταν: (α) η συσχέτιση του χρόνου ζωής, της παραλλακτικότητας των αλλοιογόνων οξυγαλακτικών βακτηρίων (OB) και των φυσικοχημικών μεταβολών κατά τη διάρκεια της συντήρησης τριών όξινων ορεκτικών και (β) ο σχεδιασμός ενός ενιαίου μοντέλου το οποίο προβλέπει τη αύξηση του κυρίαρχου αλλοιογόνου μικροοργανισμού όλων των ορεκτικών ως συνάρτηση του αρχικού pH, της αρχικής συγκέντρωσης του μέσου οξίνισης (οξικό οξύ) και της θερμοκρασίας. Δείγματα πιπεροσαλάτας (pH 3.95), μελιτζανοσαλάτας (pH 4.05) και φάβας (pH 4.11) συντηρήθηκαν υπό σταθερές θερμοκρασίες 4-25°C. Οι μεταβολές των μικροβιακών πληθυσμών, των οργανικών οξέων (HPLC) και των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών των προϊόντων προσδιορίστηκαν κατά την διάρκεια της συντήρησης τους. Παράλληλα, ομαδοποιήθηκαν (SDS-PAGE) και ταυτοποιήθηκαν (16S-rRNA) στελέχη των OB απομονωμένα από διαφορετικές θερμοκρασίες συντήρησης και προϊόντα. Για την ανάπτυξη του ενιαίου μοντέλου χρησιμοποιήθηκαν αρχικά το μοντέλο Baranyi για τον υπολογισμό των παραμέτρων της κινητικής αύξησης των OB και σε δεύτερο στάδιο ένα δευτερογενές πολυωνυμικό μοντέλο. Η επικύρωσή τους πραγματοποιήθηκε υπό πραγματικές συνθήκες συντήρησης, σε οικιακά ψυγεία. Προϊόντα με χαμηλό pH και υψηλότερη συγκέντρωση οξικού οξέος εμφάνισαν μεγαλύτερη μικροβιακή σταθερότητα. Στελέχη των μικροοργανισμών *Lactobacillus plantarum* και *Lactobacillus brevis* επικράτησαν της αλλοιογόνου μικροχλωρίδας σε όλα τα προϊόντα. Η μεταβολική δραστηριότητα αυτών (υποχρεωτικά ή προαιρετικά ετεροζυμωτικοί) προκάλεσε την αύξηση της συγκέντρωσης του γαλακτικού και του οξικού οξέος. Το ενιαίο μοντέλο προέβλεψε με ικανοποιητική ακρίβεια τους πληθυσμούς των OB που αναπτύχθηκαν στα προϊόντα κατά την συντήρηση σε οικιακά ψυγεία. Το μικροβιακό προφίλ των προϊόντων εμφάνισε μικρή παραλλακτικότητα και για το λόγο αυτό το ενιαίο μοντέλο είναι ικανό να παρέχει ακριβείς προβλέψεις για την εκτίμηση του χρόνου ζωής όλων των όξινων προϊόντων που ανήκουν στην κατηγορία αυτή.

Λέξεις κλειδιά: χρόνος ζωής, αλλοίωση, μοντελοποίηση, οξυγαλακτικά βακτήρια, όξινα ορεκτικά

Assessment of a unified predictive model for the shelf life of acidic emulsified foods in association with physicochemical and microbial changes during storage

Manios S. G., Ketsatis S., Skandamis P.N.

Agricultural University of Athens, Department of Food Science and Technology, Laboratory of Food Quality Control and Hygiene, Iera odos 75, 118 55, Athens Greece

We aimed (i) to characterize the microbial spoilage of three vegetable-based spreads of low pH (3.95-4.11) by correlating changes in microbial populations with sensory evaluation, physicochemical changes and changes in species diversity during isothermal storage and, (ii) to develop a unified model of microbial spoilage based on the initial concentration of acetic acid and the initial pH of similar products. Commercial samples of pepper-spread (PS), fava beans-spread (FS) and eggplant-spread (ES) were stored at 4-25°C and the growth rates of lactic acid bacteria (LAB) were modeled as a function of temperature and initial pH and undissociate acetic acid concentration of the products with a polynomial model. The model was field-validated under real chill chain conditions. Changes in pH, titratable acidity and organic acids concentration (HPLC) as well as sensory characteristics during storage were correlated with LAB populations to define the spoilage level. Isolated strains from each spread and storage temperature were grouped with SDS-PAGE and were identified with 16S-rRNA. Products with lower pH and/or higher acetic acid content showed higher microbial stability. Strains of *Lactobacillus plantarum* or *Lb. brevis* dominated the LAB association in all spreads, although their initial populations differed. These facultative or obligate heterofermentative bacteria contributed to lactic and acetic acid production. The developed model showed very good agreement with the observed data in PS and FS. The spoilage patterns of the tested products posed limited complexity and therefore, the unified model may provide accurate predictions for the assessment of the shelf-life of all acetic acid acidified spreads.

Keywords: shelf-life, spoilage, modeling, lactic acid bacteria, acid appetizer

Προσκόλληση του *Lactobacillus pentosus* στην επιφάνεια της ελιάς σε διαφορετικές συνθήκες οξύτητας και αλατότητας της άλμης

Γρούντα Α., Νυχάς Γ-Ι και Πανάγου Ε.Ζ..

Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιερά Οδός 75, Αθήνα 11855, Ελλάδα

Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε η ικανότητα προσκόλλησης του βακτηρίου *Lactobacillus pentosus* στην επιφάνεια του καρπού της ελιάς, ενώ παράλληλα έγινε σύγκριση μεταξύ μιας ενζυμικής και μη-ενζυμικής κατεργασίας για την αποκόλληση και απαρίθμηση των προσκολλημένων κυττάρων. Θερμικά επεξεργασμένες επιτραπέζιες ελιές μαυρισμένες με οξείδωση εμβαπτίστηκαν σε οχτώ διαφορετικά διαλύματα αποστειρωμένης άλμης, που ανταποκρίνονται στη συνήθη βιομηχανική πρακτική και ενοφθαλμίστηκαν με τον μικροοργανισμό *Lactobacillus pentosus* σε συγκέντρωση 5 log cfu/ml. Μια χαμηλή αλατοπεριεκτικότητα, 6% (β/ο) NaCl, και μια υψηλή αλατοπεριεκτικότητα, 10% (β/ο) NaCl, μελετήθηκαν ως αρχικές συγκεντρώσεις άλατος στην άλμη ενώ σε καθεμία περίπτωση μελετήθηκε και η προσθήκη 0,5% (β/ο) γλυκόζης ή 0,2% (ο/ο) γαλακτικού οξέος ή συνδυασμός των δύο περιπτώσεων. Τα δείγματα συντηρήθηκαν σε θερμοκρασία 20°C για διάστημα 28 ημερών. Σε τακτά χρονικά διαστήματα, η αποκόλληση των προσκολλημένων κυττάρων από την επιφάνεια της ελιάς για καταμέτρηση έγινε με μια ενζυμική (ενζυμική αποκόλληση) και μια μη-ενζυμική κατεργασία (μηχανική αποκόλληση). Ενδιαφέρον παρουσίασε το γεγονός πως κατά την ενζυμική κατεργασία ο πληθυσμός των αποκολλημένων κυττάρων βρέθηκε σε χαμηλότερους ή ίσους πληθυσμούς σε σχέση με την μη-ενζυμική. Οι διαφορετικές συνθήκες της άλμης φάνηκαν να επηρεάζουν σημαντικά την ικανότητα προσκόλλησης του μικροοργανισμού στον καρπό ιδιαίτερα στην αρχή της συντήρησης. Ο αρχικός πληθυσμός που προσκολλήθηκε στον καρπό κυμάνθηκε μεταξύ 2,7-5,4 log cfu/g ανάλογα με τις συνθήκες της άλμης. Οι συνθήκες 10% β/ο NaCl και 10% β/ο NaCl/0,5% β/ο γλυκόζη φάνηκε να καταπονούν τον μικροοργανισμό καθώς μετά τη 2η ημέρα συντήρησης ο πληθυσμός βρέθηκε κάτω του ορίου ανίχνευσης (<1 log cfu/g). Στην περίπτωση της άλμης χαμηλής αλατότητας, η οξίνιση με 0,2% ο/ο γαλακτικό οξύ και ο συνδυασμός 0,5% β/ο γλυκόζης και 0,2% ο/ο γαλακτικού οξέος ενίσχυσε την προσκόλληση και ανάπτυξη του *Lactobacillus pentosus* στον καρπό κατά τις πρώτες ημέρες αποθήκευσης ενώ επίσης ο συνδυασμός 0,5% β/ο γλυκόζης & 0,2% ο/ο γαλακτικού οξέος έδωσε ικανοποιητικά αποτελέσματα.

Λέξεις κλειδιά: Ελιά, *Lactobacillus pentosus*, προσκόλληση

Ευχαριστίες: Η παρούσα εργασία χρηματοδοτήθηκε από το ευρωπαϊκό πρόγραμμα PROBIOLIVES

Attachment of *Lactobacillus pentosus* on the olive surface under different sterile brine solutions

Grounta A., Nychas G-J. E, and Panagou E.Z.

Laboratory of Microbiology and Biotechnology of Foods, Department of Food Science and Technology, Agricultural University of Athens, Iera Odos 75, Athens 11855, Greece

In the present study, the ability of *Lactobacillus pentosus* to attach on the surface of olives was assayed. In parallel, an enzymatic and a non-enzymatic detachment treatment for the enumeration of the microorganism were compared. Black oxidized thermally processed table olives were submerged into eight different sterile brine solutions, commonly employed in industrial practice, which were inoculated with 5 log cfu/ml *Lactobacillus pentosus*. A low salt concentration, 6%(w/v)NaCl and a high salt concentration 10%(w/v NaCl)were used as initial salt concentrations in the brine. The brine was supplemented with 0.5%(w/v)glucose or 0.2%(v/v)lactic acid, or the combination of 0.5%(w/v)glucose and 0.2% (v/v) lactic acid. At regular time intervals, the cells of the microorganism were detached from the olive skin for enumeration by an enzymatic or a non- enzymatic treatment. The initial attachment of the microorganism on the olive surface varied between 2.7 to 5.4 log cfu/g depending on the brining treatment. The brining treatments of 10% w/v NaCl and 10% w/v NaCl & 0.5% w/v glucose seemed to stress the microorganism while after the 2nd day of storage the population was below the detection limit (<1 log cfu/g). In the case of low salt concentration the acidification with 0.2% v/v lactic acid and the combination of 0.5% w/v glucose & 0.2% v/v lactic acid favored the attachment and growth of *Lactobacillus pentosus* during the first days of storage while the combination of 0.5% (w/v) glucose & 0.2% (v/v) lactic acid in the high salt concentration gave good results as well.

Acknowledgements: The present study was funded by the European project PROBIOLIVES

Διερεύνηση του κύκλου του άνθρακα και του αζώτου σε εδάφη που έχουν δεχθεί Υγρά Απόβλητα Ελαιουργείου

Τσικνιά Μ.1, Τζανακάκης Β.1, Οικονομίδης Δ.1, Παρανυχιανάκης Ν.1, Νικολαΐδης Ν.1

1 Τμήμα Μηχανικών Περιβάλλοντος, Πολυτεχνείο Κρήτης, Χανιά

Η διαχείριση των υγρών αποβλήτων των ελαιουργείων αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα για της ελαιοπαραγωγές περιοχές. Σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας είναι να εκτιμηθεί η επίδραση του κατσίγαρου σε συγκεκριμένες χημικές και βιολογικές ιδιότητες του εδάφους, που αφορούν κυρίως διεργασίες του κύκλου του C και του N. Το πείραμα διεξήχθη κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες με τρεις δόσεις εφαρμογής κατσίγαρου (42, 84, και 168 m³/ha). Η εφαρμογή ενίσχυσε την εδαφική αναπνοή στα 42 και 84m³/ha, ενώ δεν παρατηρήθηκε κάτι ανάλογο για τα 168 m³/ha. Η συγκέντρωση του εδάφους σε φαινόλες, 10 μέρες μετά την εφαρμογή, μειώθηκε στο 50% και παρέμεινε σταθερή μέχρι το τέλος. Αυτή η μείωση δεν αποτυπώθηκε με την μέτρηση του αριθμού των αντιγράφων του γονιδίου της λακκάσης. Η συγκέντρωση του εδαφικού NH₄⁺-N αυξήθηκε με την εφαρμογή του κατσίγαρου ιδιαίτερα στα 84 και 168 m³/ha, χωρίς να παρατηρηθεί αύξηση της συγκέντρωσης του NO₃⁻-N, γεγονός που μπορεί να αποδοθεί σε παρεμπόδιση της νιτροποίησης. Η υπόθεση αυτή ενισχύεται περαιτέρω από την μέτρηση των αντιγράφων του γονιδίου *amoA* των αμμωνιο-οξειδοτικών Αρχαίων (AOA) και Βακτηρίων (AOB) 10 μέρες μετά την εφαρμογή. Στην συνέχεια όμως τα αντίγραφα του γονιδίου *amoA* και οι ρυθμοί δυνητικής νιτροποίησης πλησίασαν σε τιμές ίσες ή και μεγαλύτερες αυτών των εδαφών “μαρτύρων”, χωρίς όμως να αυξάνεται το εδαφικό NO₃⁻-N. Τα αντίγραφα των απονιτροποιητικών γονιδίων (*nirK*, *nirS*, *nosZ*) ακολούθησαν το μοτίβο αύξησης των *amoA* γεγονός που καταδεικνύει απώλειες N λόγω απονιτροποίησης. Τα αποτελέσματα της εργασίας αυτής δείχνουν ότι η εφαρμογή κατσίγαρου στο έδαφος, με ρυθμό έως και 84m³/ha, μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν μία αποτελεσματική μέθοδος διαχείρισης του κατσίγαρου με ευεργετικές συνέπειες στο έδαφος (αύξηση οργανικής ύλης και θρεπτικών). Περαιτέρω μελέτες χρειάζονται ώστε να διερευνηθεί ο μηχανισμός απομάκρυνσης των φαινολών, καθώς επίσης και να “ελεγχθούν” οι διεργασίες του κύκλου του N με σκοπό η ποσότητα του N που αποδεσμεύεται από τον κατσίγαρο, να καλύπτει τις ανάγκες της βλάστησης.

Carbon and nitrogen cycling in soils treated with olive mill wastewater

Tsiknia M.¹, Tzanakakis V.¹, Oikonomidis D.¹, Paranychianakis N.¹, Nikolaidis N.¹

¹ *Environmental Engineering, Technical University of Crete, Chania*

The management of olive mill wastewater (OMW) remains an important issue in olive-oil producing areas. An incubation study was carried out to evaluate the effect of OMW, applied at three rates (42, 84, and 168 m³/ha) on certain chemical and biological properties of soil, focusing mainly on C and N cycling. OMW stimulated soil respiration in a dose-response manner at application rates up to 85 m³/ha, but increasing application rate to 168 m³/ha did not result in an analogous increase in respiration. With regard to phenols content, a great reduction up to 50 % was observed within the first ten days after OMW application, but then phenols' content remained constant by the end of the experiment. Gene copy numbers of laccase gene were not correlated with this reduction. OMW application increased soil NH₄⁺-N content especially in doses 84 and 168 m³/ha. By contrast an opposite pattern was found for soil NO₃⁻-N implying an inhibition of nitrification process. Indeed data from archaeal (AOA) and bacterial ammonia oxidizers (AOB) *amoA* gene copy numbers confirm such an inhibition in the 10 days after OMW application. Then, *amoA* gene copy numbers and potential nitrification rates recovered to values similar or higher to those of control soils but NO₃⁻-N continued to be lower especially in the highest application rate. The increase in the *amoA* gene copy numbers during this period, accompanied by a similar increase in the denitrifying genes (*nirK*, *nirS*, *nosZ*), is attributed to N losses by denitrification. Our study suggests that application of OMW to soil at rates up to 84 m³/ha can be efficiently used as a mean for OMW management and can be beneficial for soils by increasing organic matter and nutrient content. Additional studies are required to shed light in the mechanisms involved in phenols removal, to quantify the N losses and to manipulate N cycling so as to couple plant N requirements to N release.

Keywords: OMW land application, nitrogen cycle, ammonia oxidizers

Δομή της εδαφικής μικροβιακής κοινότητας σε σχέση με το κλίμα και τις χρήσεις γης στην λεκάνη απορροής του ποταμού Κοιλιάρη

Τσικνιά Μ.1, Παρανυχιανάκης Ν.1, Μωραΐτης Δ.1, Νικολαΐδης Ν.1

1 Τμήμα Μηχανικών Περιβάλλοντος, Πολυτεχνείο Κρήτης, Χανιά

Οι μικροοργανισμοί κατέχουν ρόλο κλειδί τόσο στους βιογεωχημικούς κύκλους των θρεπτικών στοιχείων, όσο και στις λειτουργίες/διεργασίες των οικοσυστημάτων. Είναι κρίσιμη λοιπόν η κατανόηση των περιβαλλοντικών παραμέτρων που επηρεάζουν τα μοτίβα της χωρικής κατανομής των μικροβιακών κοινοτήτων με σκοπό να μπορέσουμε να προβλέψουμε τόσο το πώς θα ανταποκριθούν τα οικοσυστήματα στις παγκόσμιες κλιματικές αλλαγές και στην ανθρώπινη επέμβαση όσο και για ενισχυθεί η ανάπτυξη κατάλληλων εργαλείων που να προβλέπουν τις διεργασίες των μικροοργανισμών. Στην παρούσα εργασία, πραγματοποιήθηκαν εκτεταμένες δειγματοληψίες (51 σημεία) στην κρίσιμη εδαφική ζώνη (Critical Zone Observatory) της λεκάνης απορροής του ποταμού Κοιλιάρη (Χανιά, Κρήτη). Η επιλογή των σημείων έγινε με τέτοιο τρόπο ώστε να καλυφθούν όλα τα διαφορετικά χαρακτηριστικά (κλίμα, εδαφικές ιδιότητες, υδρολογία, χρήση γης) της λεκάνης απορροής. Πραγματοποιήθηκαν οι βασικές φυσικοχημικές αναλύσεις του εδάφους (κοκκομετρία, φαινομενική πυκνότητα, XRF, pH, EC, TOC, TN, NO₃-N και NH₄⁺-N), βιοχημικές αναλύσεις (δυναμικός ρυθμός νιτροποίησης -PNR) με σκοπό να διερευνηθεί η συσχέτισή τους με την κατανομή των μικροοργανισμών. Η δομή της εδαφικής μικροβιακής κοινότητας προσδιορίστηκε με την μέθοδο της qRT-PCR, χρησιμοποιώντας πρωτόκολλα για την ποσοτικοποίηση των ολικών Βακτηρίων, Αρχαίων και Μυκήτων, των *α-Proteobacteria*, *β-Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes* και *Acidobacteria*. Τα αποτελέσματά μας αναδεικνύουν μεγάλες διαφοροποιήσεις μεταξύ των μικροβιακών πληθυσμών σε σχέση με τις χρήσεις γης και των ιδιοτήτων του εδάφους, καθώς επίσης αναδεικνύονται και ισχυρές σχέσεις μεταξύ των διαφόρων μικροβιακών πληθυσμών.

Soil Microbial Community Structure Across Climatic and Land Use Gradients in Koiliaris Critical Zone Observatory (CZO)

Tsiknia M.¹, Paranychianakis N.¹, Moraetis D.¹ Nikolaidis N.¹

¹ *Environmental Engineering, Technical University of Crete, Chania*

Microorganisms drive nutrient biogeochemical cycles, ecosystems functioning and the delivered by them services. Understanding the environmental variables that drive the spatial distribution patterns of microbial communities is crucial to anticipate ecosystem responses to global changes, to human perturbation and to develop proper tools for predicting their functioning. In this study we carried out an extensive sampling campaign (51 points) across the Koiliaris CZO (Chania, Grete), organized in such a way to effectively capture the complex variability (climatic, soil properties, hydrology, land use) of the watershed. Analyses of soil physico-chemical properties (texture, bulk density, XRF, pH, EC, TOC, TN, NO₃-N, and NH₄⁺-N) and biochemical properties (Potential Nitrification Rate) were carried out to investigate their associations with microbial distribution patterns. Soil microbial community structure was assessed by using of taxon-specific q-PCR assays targeting the 16S rRNA gene for total bacteria, archaea and fungi, *α-Proteobacteria*, *β-Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, and *Acidobacteria*. Our findings revealed strong differences in the distribution of taxons in terms of land use and soil properties and strong relationships among them.

Keywords: microbial diversity; river basin; q-PCR

Αξιολόγηση διαφορετικών αλγόριθμων ανάλυσης μικροβιακών κοινοτήτων σε πραγματικά δεδομένα πυροαλληλούχισης λιμνοθαλάσσιων ιζημάτων

Παυλούδη Χ.^{1,2}, Ούλας Α.², Σαρροπούλου Ε.², Καρακάσης Ι.¹, Αρβανιτίδης Χ.²

¹ Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

² Ινστιτούτο Θαλάσσιας Βιολογίας, Βιοτεχνολογίας και Υδατοκαλλιεργειών, Ελληνικό Κέντρο Θαλασσιών Ερευνών, Κρήτη

Οι λιμνοθάλασσες είναι γενικά εμπλουτισμένα ενδιαιτήματα με πολύ ασταθείς περιβαλλοντικές συνθήκες, εξαιτίας του περιορισμού τους από την ανοιχτή θάλασσα και του μικρού βάθους τους. Οι συχνές μεταβολές των αβιοτικών παραμέτρων προκαλούν σημαντικές μεταβολές στην αφθονία και τη διανομή των οργανισμών· η συσχέτιση αυτή έχει μελετηθεί αρκετά όσον αφορά τους μακροπανιδικούς οργανισμούς, αλλά όχι επαρκώς για τους μικροοργανισμούς των λιμνοθαλασσών.

Τα τελευταία χρόνια είναι ιδιαίτερα διαδεδομένη η χρήση πυροαλληλούχισης για την προσέγγιση της μικροβιακής ποικιλότητας διαφόρων ενδιαιτημάτων. Ωστόσο, δεν υπάρχει μία καθιερωμένη μέθοδος επεξεργασίας των αλληλουχιών που προκύπτουν από τις πλατφόρμες αλληλούχισης νέας γενιάς.

Στόχος αυτής της μελέτης ήταν η διερεύνηση των προτύπων της βιοποικιλότητας των μικροοργανισμών με τη χρήση διαφορετικών αλγόριθμων ανάλυσης μικροβιακών κοινοτήτων, με ή χωρίς αφαίρεση σφαλμάτων, και η επακόλουθη αξιολόγηση των χρησιμοποιούμενων αλγόριθμων.

Για το σκοπό αυτό, συλλέχθηκαν δείγματα ιζήματος από πέντε λιμνοθάλασσες του Αμβρακικού κόλπου (Ιόνιο Πέλαγος)· σε κάθε λιμνοθάλασσα επιλέχθηκαν δύο σταθμοί με διαφορετικό βαθμό επικοινωνίας με τη θάλασσα. Ακολούθησε η εξαγωγή μικροβιακού γενετικού υλικού από το ανώτερο στρώμα του ιζήματος, από το οποίο, με αλληλούχιση νέας γενιάς (454 GS FLX Titanium Series, Roche), εκτιμήθηκε η αφθονία και η ποικιλότητα των προκαρυωτών, βάσει της περιοχής V5-V6 του γονιδίου 16S rRNA.

Περισσότερες από 180.000 αλληλουχίες ανακτήθηκαν από όλα τα δείγματα ιζήματος. Πρωταρχικά αποτελέσματα δείχνουν ότι το χωρικό πρότυπο κατανομής της μικροβιακής ποικιλότητας που προκύπτει από τη χρήση των αρχικών αλληλουχιών είναι πολύ διαφορετικό από αυτό που προκύπτει μετά από την επεξεργασία των αλληλουχιών για αφαίρεση σφαλμάτων αλληλούχισης και χημικών αλληλουχιών. Ακόμα, φαίνεται πως η χρήση των διαφορετικών αλγορίθμων μεταβάλλει το πρότυπο κατανομής της βιοποικιλότητας στις λιμνοθάλασσες υπό μελέτη.

Λέξεις κλειδιά: Μικροβιακή ποικιλότητα, Λιμνοθάλασσες, Πυροαλληλούχιση, Αλγόριθμοι αφαίρεσης θορύβου

Evaluation of various algorithms for microbial community analysis on a real dataset derived from pyrosequencing in lagoonal sediments

Pavloudi C.^{1,2}, Oulas A.², Sarropoulou E.², Karakassis I.¹, Arvanitidis C.²

¹ *Department of Biology, University of Crete*

² *Institute of Marine Biology, Biotechnology and Aquaculture, Hellenic Centre for Marine Research, Crete*

Lagoons are enriched habitats, with unstable environmental conditions caused by their constraint from the sea and their shallowness. The frequent fluctuations of the abiotic parameters cause severe changes in the abundance and distribution of organisms; while this relationship has been studied for macrofaunal organisms, only little is known about the lagoonal microbial diversity.

Pyrosequencing has quite commonly been used over the past few years for the assessment of the microbial diversity in various habitats. However, a standard processing method of the sequences derived from the next generation sequencing platforms does not exist.

The aim of the present study was to explore the multivariate biodiversity patterns of microorganisms with the use of different algorithms for microbial community analysis, with or without noise removal, and the subsequent evaluation of the used algorithms.

For this purpose, sediment samples were collected from five lagoons, located in Amvrakikos Gulf (Ionian Sea, Western Greece). Microbial DNA was extracted from the sediment upper layer and was further processed through deep sequencing of the V5-V6 region of the 16S rRNA gene (454 GS FLX Titanium Series, Roche). More than 180,000 sequenced reads were retrieved from the all the sediment samples. Preliminary results show that the spatial diversity pattern of the microorganisms deriving from the use of the original sequenced reads is by far different from the one deriving after the processing of the reads for removal of sequencing errors and chimeras. Furthermore, the use of different algorithms seems to alter the biodiversity pattern in the lagoons under study.

Keywords: Microbial diversity, Lagoons, Pyrosequencing, Noise removal algorithms

Ηπατοτοξίνες Κυανοβακτηρίων στη Θάλασσα: Η περίπτωση του Αμβρακικού κόλπου

Βαρέλη Κ.1, Τούκα Α.5, Jaeger W.2, Ζαχαριουδάκης Γ.7, Μέτσιος Α.6, Μπριασούλης Ε.4.5, Φριλίγγος Ε.3, Σαΐνης Ι.5.

1 Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων 45110 Ιωάννινα

2 Department of Clinical Pharmacy and Diagnostics, University of Vienna, A-1090 Vienna, Austria

3 Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων 45110 Ιωάννινα

4 Τμήμα Αιματολογίας, Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων, 45110 Ιωάννινα

5 Διεπιστημονικό Εργαστήριο Μοριακής Ογκολογίας, Βιοτρέπεζα Καρκίνου, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων 45110 Ιωάννινα

6 Εργαστήριο Φυσιολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων 45110 Ιωάννινα

7 Τομέας Βοτανικής, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών 15781 Αθήνα

Οι ανθίσεις κυανοβακτηρίων σε πολλά υδάτινα οικοσυστήματα γλυκών υδάτων είναι ένα παγκοσμίως αναγνωρισμένο πρόβλημα, καθώς έχει αποδειχθεί ότι το 60% περίπου αυτών των ανθίσεων είναι τοξικές. Οι πιο καλά μελετημένες τοξίνες κυανοβακτηρίων ανήκουν σε μια οικογένεια κυκλικών επταπεπτιδίων με ηπατοτοξική δράση και καλούνται μικροκυστίνες. Παρόλο που σε υδάτινα οικοσυστήματα γλυκών υδάτων αφθονούν οι αναφορές περιστατικών δηλητηριάσεων που οφείλονται στις εν λόγω τοξίνες, στο θαλάσσιο περιβάλλον οι αναφορές είναι σπάνιες και σποραδικές. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν οι συγκεντρώσεις μικροκυστίνης τόσο στο νερό όσο και στη σάρκα του εδώδιμου μυδιού *Mytilus galloprovincialis* στον Αμβρακικό κόλπο, μία από τις πιο παραγωγικές αλιευτικές περιοχές της Ελλάδας και υγροβιότοπο ιδιαίτερης σημασίας ο οποίος προστατεύεται με τη συνθήκη RAMSAR. Οι συγκεντρώσεις μικροκυστίνης στο νερό βρέθηκαν πολύ χαμηλές και κάτω από τα όρια που θέτει ο ΠΟΥ για την άσκηση δραστηριοτήτων αναψυχής. Αντίθετα, στη σάρκα των εδωδιμων μυδιών οι συγκεντρώσεις μικροκυστίνης υπερέβαιναν τα όρια ΠΟΥ (εύρος μετρήσεων: 141.5 ± 13.5 έως 45 ± 2 ng gr⁻¹ ww). Η κυανοβακτηριακή κοινότητα αναλύθηκε με αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση διαβάθμισης (DGGE) της περιοχής μεταξύ των γονιδίων 23S και 16S rRNA. Η αλληλούχιση των αντίστοιχων τμημάτων DNA απέδειξε ότι η κυανοβακτηριακή κοινότητα κυριαρχείται από τα ευρέως διαδεδομένα στους ωκεανούς είδη *Synechococcus* – *Synechocystis*. Γονίδια που πιθανόν εμπλέκονται στην παραγωγή της εν λόγω τοξίνης ενισχύθηκαν με PCR, απομονώθηκαν και χαρακτηρίστηκαν.

Λέξεις κλειδιά: Ηπατοτοξίνες, Κυανοβακτήρια, Αμβρακικός

Cyanobacterial hepatotoxins in the Sea: The case of Amvrakikos gulf

Vareli K.¹, Touka A.⁵, Jaeger W.², Zacharioudakis G.⁷, Metsios A.⁶, Briasoulis E.^{4,5}, Frilingos S.³, Sainis I.⁵.

¹ Department of Biological Applications and Technology, University of Ioannina, 45110 Ioannina, Greece

² Department of Clinical Pharmacy and Diagnostics, University of Vienna, A-1090 Vienna, Austria

³ Laboratory of Biological Chemistry, School of Medicine, University of Ioannina, 45110 Ioannina, Greece

⁴ Haematology Department, University Hospital of Ioannina, 45110 Ioannina, Greece

⁵ Interscience Molecular Oncology Laboratory, Human Cancer Biobank Center, University of Ioannina, 45110 Ioannina, Greece

⁶ Laboratory of Physiology, School of Medicine, University of Ioannina, 45110 Ioannina, Greece

⁷ Department of Botany, Faculty of Biology, University of Athens, Panepistimioupolis 15781, Athens, Greece.

Cyanobacterial blooms are a major uprising world problem of freshwater ecosystems that increasingly concerns public health since it has been shown that, on average, 60% of these cyanobacterial blooms are toxic. The most studied cyanobacterial toxins belong to a family of cyclic heptapeptide hepatotoxins called microcystins. Although intoxication of aquatic organisms involving microcystins has been amply documented in freshwater ecosystems worldwide, reports on such intoxications of marine organisms are limited. We investigated seasonal changes of microcystin concentrations both in water and in the edible species *Mytilus galloprovincialis* collected from Amvrakikos gulf, one of the most productive Greek "seafood" areas and a Mediterranean wetland of international significance according to Ramsar Convention. The microcystin concentrations in water were below the WHO upper limit for recreational activities. In contrast, we found that microcystin concentrations in *Mytilus galloprovincialis* mussels (ranging from 141.5 ± 13.5 to 45 ± 2 ng gr⁻¹ ww) exceeded the upper limit of the tolerable daily intake (TDI) of microcystin as determined by WHO. Genotype composition of the total cyanobacterial community of the gulf was analyzed with denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of the intergenic transcribed spacer region of the rnn operon (rRNA-ITS). The cyanobacterial community was found to be dominated almost exclusively by the cosmopolitan species *Synechococcus* - *Synechocystis*. The cyanobacterial genes involved in the production of microcystins were delineated with PCR using a range of both specific and degenerate molecular primers against microcystin synthetase gene cluster (mcyS).

Keywords: Hepatotoxins, Cyanobacteria, Amvrakikos

Απομόνωση και ταυτοποίηση ενός νέου πολυκετίδιου από ενδοφυτικό ακτινοβακτήριο ροδοφύκους

Rab E.,^{1,2} Ιωάννου E.,¹ Κέκος Δ.,² Ρούσσης Β.¹

¹Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Φαρμακευτικής, Τομέας Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων, Αθήνα

²Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, Τμήμα Χημικών Μηχανικών, Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας, Αθήνα

Οι θαλάσσιοι οργανισμοί, συμπεριλαμβανομένων και των βακτηρίων και μυκήτων θαλάσσιας προέλευσης, αποτελούν μία πλούσια πηγή φυσικών προϊόντων, πολλά από τα οποία επιδεικνύουν αντιβακτηριακή, αντιμυκητιακή, αντιπρωτοζωική, αντιιική, αντιφλεγμονώδη, κυτταροτοξική, αντιβιοεπιστρωτική, αντιτροφική, ιχθυοτοξική και/ή εντομοκτόνο δράση.

Στα πλαίσια των ερευνητικών μας δραστηριοτήτων για την απομόνωση νέων βιοδραστικών δευτερογενών μεταβολιτών από οργανισμούς των Ελληνικών θαλασσών, μελετήθηκε η χημική σύσταση ενός ενδοφυτικού ακτινοβακτηριακού στελέχους, το οποίο απομονώθηκε από τους ιστούς του ροδοφύκου *Laurencia glandulifera* που συλλέχθηκε στη περιοχή Ζούμπερι, νότια της Νέας Μάκρης στην Αττική.

Το ενδοφυτικό στέλεχος καλλιεργήθηκε σε κωνικές φιάλες με θρεπτικό μέσο με βάση το θαλασσινό νερό υπό ανάδευση στους 27 °C. Μετά τη παρέλευση μίας εβδομάδας, προστέθηκε ρητίνη Amberlite XAD-7 στις κωνικές φιάλες και συνέχισε η ανάδευση για 6 h. Στη συνέχεια, η ρητίνη διηθήθηκε, εκπλύθηκε με απιονισμένο νερό και εκχυλίστηκε με ακετόνη. Το ολικό εκχύλισμα το οποίο προέκυψε μετά την εξάτμιση του διαλύτη υπό κενό υποβλήθηκε σε μία σειρά χρωματογραφικών διαχωρισμών που έχει οδηγήσει έως σήμερα στην απομόνωση ενός νέου φυσικού προϊόντος και τριών ήδη γνωστών μεταβολιτών. Η ταυτοποίηση των μεταβολιτών βασίστηκε στην ανάλυση των φασματοσκοπικών τους δεδομένων (NMR, MS, IR, UV).

Οι μεταβολίτες που απομονώθηκαν ταυτοποιήθηκαν ως το υδροκιναμικό οξύ, η εντεροσίνη και η γουαΐλουπεμυκίνη D, καθώς και ένα νέο παράγωγο της τελευταίας. Οι εντεροσίνες και οι γουαΐλουπεμυκίνες είναι βακτηριοστατικά πολυκετίδια με δακτύλιο α-πυρόνης, ενώ το υδροκιναμικό οξύ θεωρείται ως ενδιάμεσο της βιοσύνθεσης τους.

Isolation and structure elucidation of a new polyketide from an endophytic actinobacterium of a red alga

Rab E.,^{1,2} Ioannou E.,¹ Kekos D.,² Roussis V.¹

¹National and Kapodistrian University of Athens, School of Pharmacy, Department of Pharmacognosy and Chemistry of Natural Products, Athens

²National Technical University of Athens, School of Chemical Engineering, Biotechnology Laboratory, Athens

Marine organisms, including marine-derived bacteria and fungi, represent a prolific source of structurally diverse natural products, many of which exhibit antibacterial, antifungal, antiprotozoal, antiviral, anti-inflammatory, cytotoxic, antifouling, antifeedant, ichthyotoxic, and/or insecticidal activities.

In search of new bioactive secondary metabolites from marine organisms found along the coastlines of Greece, we focused our attention on an endophytic actinobacterial strain isolated from the inner tissues of the red alga *Laurencia glandulifera*, collected in Zoumberi, south of Nea Makri, Attiki.

The endophyte was cultured in flasks containing a seawater-based medium and shaken at 230 rpm at 27 °C. After one week of cultivation, Amberlite XAD-7 resin was added to each flask and the slurry was shaken for 6 h. The resin was filtered through cheesecloth, washed with deionized water and extracted with acetone. Removal of the solvent under vacuum afforded the crude actinobacterial extract which was subjected to a multi-step fractionation procedure that has led so far to the isolation of one new natural product and three previously reported metabolites. The structure elucidation and the assignment of the relative configurations of the compounds were based on extensive analyses of their spectroscopic data (NMR, MS, IR, UV).

The isolated compounds were identified as hydrocinnamic acid, enterocin, wailupemycin D and a new derivative of the latter. The enterocins and the wailupemycins are bacteriostatic α -pyrone containing polyketides, whereas hydrocinnamic acid is considered as an intermediate in their biosynthesis.

Μικροβιακή Ποικιλότητα Νερού Υψηλής Καθαρότητας σε Φαρμακοβιομηχανία

Δέλλιου Α.-Α. Π., Κατσίφας Ε.Α., Σαββίδης Α. Λ., Καραγκούνη Α. Δ.

Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Βιολογίας, Τομέας Βοτανικής, Ομάδα Μικροβιολογίας, 157 81, Αθήνα

Τα τελευταία χρόνια μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί που αφορούν στη διερεύνηση της μικροβιακής ποικιλότητας που εντοπίζεται στα συστήματα παραγωγής νερού υψηλής καθαρότητας σε φαρμακοβιομηχανίες, σε βιομηχανίες ημιαγωγών, σε βιομηχανίες τροφίμων κλπ. Το ενδιαίτημα αυτό παρουσιάζει ομοιότητες με άλλα oligότροφα περιβάλλοντα όπως το πόσιμο νερό, ενώ ομάδες των μικροοργανισμών όπως τα υπερμικροβακτήρια, και βιώσιμα αλλά μη καλλιεργήσιμα βακτήρια (VBNC) αναφέρονται στη βιβλιογραφία ως ενδογενής πληθυσμός τέτοιου τύπου νερού.

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε μελέτη της μικροβιακής ποικιλότητας σε νερό υψηλής καθαρότητας (κεκαθαρμένο) από φαρμακοβιομηχανία, με χρήση κλασικών μικροβιολογικών τεχνικών και μοριακών μεθόδων (BOX-PCR, DGGE). Η μελέτη εστιάστηκε στην απομόνωση α) του κοπιότροφου και oligότροφου μεσόφιλου πληθυσμού, β) του ψυχρόφιλου πληθυσμού και γ) των διηθητών βακτηρίων μέσω των μεμβρανών διαμέτρου πόρων 0,2 μm. Επιλεγμένα στελέχη ταυτοποιήθηκαν μοριακά μέσω ενίσχυσης και αλληλούχισης του 16S rDNA γονιδίου τους.

Συνολικά απομονώθηκαν (σε 4 δειγματοληψίες) 1771 στελέχη τα οποία ομαδοποιήθηκαν σε 257 διαφορετικά πρότυπα με βάση τη μέθοδο της BOX-PCR. Τα αποτελέσματα της μοριακής ταυτοποίησης ανέδειξαν δύο διακριτούς πληθυσμούς που επικρατούν στο νερό υψηλής καθαρότητας: ο κοπιότροφος και ο oligότροφος πληθυσμός. Ο πρώτος αποτελείται από το φύλο Firmicutes και το γένος *Bacillus* με κυρίαρχα είδη τα *B. aquimaris*, *B. barbaricus*, *B. cibi* και *B. niabensis* ενώ το φύλο Actinobacteria συμμετέχει (γένη *Rhodococcus*, *Kocuria* και *Microbacterium*) σε μικρό ποσοστό. Ο oligότροφος πληθυσμός παρουσιάζει διαφορετική δομή με κυρίαρχο φύλο τα Proteobacteria και συγκεκριμένα την τάξη των Rhizobiales (γένη *Methylobacterium*, *Blastobacter*, *Bradyrhizobium* και *Shingomonas*). Άλλα γένη που ταυτοποιήθηκαν είναι τα *Brevibacillus*, *Ralstonia*, *Bulkhoderia*, *Acinetobacter* και *Paracoccus*. Η μέθοδος της DGGE έδειξε παρόμοιο πρότυπο ζωνών στις 4 δειγματοληψίες ενώ πρέπει να αναφερθεί η ύπαρξη ζωνών στα δείγματα που ελέγχθηκαν για την ύπαρξη διηθητών βακτηρίων. Τα αποτελέσματά μας συμβαδίζουν με τα βιβλιογραφικά δεδομένα και υποδηλώνουν την ύπαρξη VBNC κυττάρων.

Λέξεις κλειδιά: κεκαθαρμένο ύδωρ, VBNC βακτήρια, oligοτροφία

Microbiological Diversity in Pharmaceutical Purified Water

Delliou A.-A. P., Katsifas E.A., Savvides A. L., Karagouni A. D.

National and Kapodistrian University of Athens, Faculty of Biology, Department of Botany, Microbiology Group, 157-81, Athens.

During the last years, researchers have been investigating microbial diversity in purified and ultrapure water production systems in pharmaceutical, semiconductor, food and beverage industries. Studies in such oligotrophic aquatic ecosystems have shown the distribution of viable but non culturable bacteria (VBNC) or ultramicrocells. Furthermore, recent studies have concluded in the dominance of an endogenic community composed from Gram negative bacteria, mostly *Sphingomonas sp*, *Bradyrhizobium sp.*, *Ralstonia sp.* and *Pseudomonas sp.*.

The aim of this study was the investigation of microbial diversity in pharmaceutical purified water, using conventional culture dependent methods and molecular methods (DGGE, BOX-PCR) and was focalized in the detection and isolation of a) copiotrophic and oligotrophic mesophilic community, b) psychrophilic community, c) filterable bacteria that penetrate the filter membranes with 0,2 μm diameter pores. Selected strains were molecularly identified with amplification and sequencing of 16s rRNA gene.

During 4 sampling, 1771 isolates were clustered (using GelCompar II) in 257 different BOX patterns and the dominant strains were identified. Two discrete communities were noted. The first was the copiotrophic community, mostly composed from the phylum Firmicutes and particularly from the genus *Bacillus* with dominant species *B. aquimaris*, *B. barbaricus*, *B. cibi* and *B. niabensis*. The phylum Actinobacteria (genera *Rhodococcus*, *Kocuria* and *Microbacterium*) participate in the population but in much lower levels. On the contrary, the second discrete community was the oligotrophic which has complete different structure. The dominant bacteria were grouped in the phylum Proteobacteria and specifically in the class of Rhizobiales (genera *Methylobacterium*, *Blastobacter*, *Bradyrhizobium* and *Sphingomonas*). Other genera identified were *Brevibacillus*, *Ralstonia*, *Bulkhoderia*, *Acinetobacter* and *Paracoccus*. The use of DGGE, revealed similar fingerprint patterns throughout the samplings but the most noticeable result was the detection of bands in the samples screened for filterable bacteria. The results agree with recent findings of other studies, indicating the occurrence of VBNC and filterable bacteria.

Keywords: purified water, VBNC bacteria, oligotrophy

Μελέτη της μικροβιολογικής ποιότητας του «Ξύγαλου Σητείας», ενός προϊόντος «Προστατευμένης Ονομασίας Περιοέλευσης», της Κρήτης, Ελλάδος

Κομπολίτη Ν., Λαπιδάκης Ν., Κοκκινάκης Ε., Φραγκιαδάκης Γ.Α.

Technological Educational Institute (T.E.I.) of Crete, School of Health and Welfare Professions, Department of Nutrition and Dietetics, Siteia, Greece

Το Ξύγαλο Σητείας είναι ένα "Προστατευμένης Ονομασίας Προέλευσης" προϊόν οξίνισης του γάλακτος, που παράγεται από γάλα κατσικίσιο ή/και πρόβειο, με μέγιστη περιεκτικότητα σε υγρασία 75%, αλάτι 1,5%, λίπος επί ξηρού 33%-46% και ελάχιστη πρωτεΐνη 31,5%. Το γάλα ζυμώνεται με όξινες βακτηριακές καλλιέργειες και μικρές ποσότητες φυσικής πυτιάς, για 7-10 ημέρες στους 15-20°C, ενώ η ωρίμανση συνεχίζεται για περίπου ένα μήνα στους 10-15°C, αν το γάλα παστεριώθηκε αρχικά. Διαφορετικά, το προϊόν θα πρέπει να ψυχθεί (<4°C) για δύο μήνες, ώστε να εξασφαλιστεί ότι είναι απαλλαγμένο από ανεπιθύμητους μικροοργανισμούς. Το ξύγαλο ως ένα εξαιρετικό "hors d'oeuvre" προσφέρεται σε τοπικά εστιατόρια, ως πιάτο της Κρητικής διατροφής, αλλά και εξάγεται. Σε αυτή τη μελέτη, δείγματα Ξύγαλου συλλέχθηκαν από την τοπική αγορά και η μικροβιολογική αξιολόγηση της ποιότητας διεξήχθη με προσδιορισμό της μεσόφιλης αερόβιας χλωρίδας (mesophilic aerobic count, MAC), σε «Standard Count Plate» (PCA) άγαρ μετά από επώαση στους 32°C επί 48 ώρες και με καταμέτρηση κολοβακτηριδίων (συνολικά κολοβακτηρίδια, Total Coliforms ή TC) με τη μέθοδο BGB (Brilliant Green Bile broth) μετά από επώαση στους 37°C για 24 ώρες. Το εύρος MAC ήταν 2.4x10⁶-10⁷ CFU/g (Colony Forming Units per gram) στο PCA, μία μέτρηση που επηρεάζεται από τους διαφορετικούς χρόνους ωρίμανσης του προϊόντος. Από την άλλη πλευρά, η μέση τιμή MPN (Most Probable Number) του συνολικού δείγματος, ως TC/100 g, ήταν 9 CFU (ακρίβεια MPN 95%), με διακύμανση μεταξύ 1-36 CFU. Από όσο γνωρίζουμε, αυτή είναι μία από τις πρώτες μελέτες για τη μικροβιολογία του Ξύγαλου και μπορεί να συμβάλει στην παρακολούθηση της ποιότητας του.

Λέξεις κλειδιά: Ξύγαλο Σητείας, Μικροβιολογική, Ποιότητα

A study on the microbiological quality of “Xygalo Siteias”, a PDO product of Crete, Greece

Kombolitis N., Lapidakis N., Kokkinakis E., Fragkiadakis G.A.

Technological Educational Institute (T.E.I.) of Crete, School of Health and Welfare Professions, Department of Nutrition and Dietetics, Siteia, Greece

Xygalo Siteias is a “Protected Designation of Origin” product of milk acidification, produced from goat’s milk or/and sheep's milk; with maximum moisture content 75 %; salt 1.5 %; fat in dry matter 33 % to 46 %, and minimum protein content 31.5 %. The milk is fermented with acidic bacterial cultures and small amounts of natural rennet, for 7-10 days at 15-20°C, while ripening continues for about one month at 10-15°C if the milk was initially pasteurized; otherwise the product must be refrigerated <4 °C for two more months to ensure it’s free from undesirable microorganisms. Xygalo as an excellent “hors d’oeuvre” offered in local restaurants as a dish in line with the Cretan diet, but exported as well. In this study, Xygalo samples were collected by the local market and microbiological quality assessment was carried out by determining the mesophilic aerobic count (MAC) on Standard Plate Count Agar (PCA) agar after incubation at 32°C for 48h, and the Coliform bacteria (Total Coliforms or TC) numbers with the Brilliant Green Bile (BGB) broth method, after incubation at 37°C for 24h. The MAC range was 2.4x10⁶–10⁷ CFU/g (colony forming units per gram) on PCA, a count range influenced by the different ripening times of the product. On the other hand, the mean most probable number (MPN) of total coliforms/100 g sample was 9 CFU (MPN accuracy 95%), ranging between 1-36 CFU. To our knowledge, this is one of the first microbiological studies on xygalo, and may contribute to monitoring its quality.

Keywords: Xygalo Siteias, Microbiological, Quality

Επίδραση του *Lactobacillus rennini* ACA-DC 565 ως συμπληρωματική καλλιέργεια στα φυσικοχημικά, μικροβιολογικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τυριού Φέτα

Τσουμπρή Α., Γεωργάλα Α., Τσακαλίδου Ε. και Ακτύπης Α.

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, Εργαστήριο Γαλακτοκομίας, Αθήνα, Ελλάδα

Προκειμένου να διερευνηθεί η επίδραση του *Lactobacillus rennini* ACA-DC 565 στην παραγωγή Φέτας, έγιναν τυροκομήσεις με την χρήση τριών διαφορετικών οξυγαλακτικών εναρκτήριων καλλιεργειών: (Α) μόνο η μεικτή εναρκτήρια καλλιέργεια (μάρτυρας) *Lactococcus lactis* spp. *lactis* ACA-DC ??, *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 7 και *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* ACA-DC 84, (Β) η εναρκτήρια καλλιέργεια του Α σε συνδυασμό με τον *Lactobacillus rennini* ACA-DC 565, και (Γ) η εναρκτήρια καλλιέργεια του Α σε συνδυασμό με τον *Lactococcus lactis* spp. *cremoris* ACA-DC 52. Κατά τη διάρκεια της παρασκευής και ωρίμανσης των τυριών (1, 15, 30 και 60 ημέρες) έγιναν μικροβιολογικές και φυσικοχημικές αναλύσεις. Παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στους πληθυσμούς των θερμοφίλων γαλακτοβακίλλων καθώς και των NSLAB μεταξύ του τυριού Β και των άλλων δύο, Α και Γ. Οι διαφορές ως προς τις υπόλοιπες μικροβιακές ομάδες δεν ήταν σημαντικές. Ως προς τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των τυριών, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές με εξαίρεση την περιεκτικότητα σε υγρασία, η οποία στα τυριά Β και Γ ήταν σημαντικά μικρότερη σε σύγκριση με τον μάρτυρα Α. Η πλέον σημαντική επίδραση παρατηρήθηκε μετά από 15 ημέρες ωρίμανσης στην περίπτωση της πρωτεόλυσης, εκφρασμένης ως υδατοδιαλυτό άζωτο (% TCASN), η οποία στο τυρί Β βρέθηκε σημαντικά μεγαλύτερη με τιμή 0.40%, έναντι 0.27 και 0.24% για τα τυριά Α και Γ, αντίστοιχα. Τέλος, κατά την οργανοληπτική εκτίμηση των τυριών (ημέρα 60), το τυρί Β, με τον *Lb. rennini* ACA-DC 565 ως συμπληρωματική καλλιέργεια, έλαβε την υψηλότερη βαθμολογία, όσον αφορά το άρωμα-γεύση και την συνολική αποδοχή συγκριτικά με τα άλλα δύο τυριά.

Λέξεις κλειδιά: Φέτα; *Lactobacillus rennini* ACA-DC 565; Συμπληρωματική καλλιέργεια

Effect of *Lactobacillus rennini* ACA-DC 565 as adjunct on the microbiological, physicochemical and sensory characteristics of Feta cheese

Tsompri A., Georgala E. Tsakalidou E. and Aktypis A

Agricultural University of Athens, Department of Food Science and Technology, Laboratory of Dairy Research, Athens, Greece

In order to evaluate the effect of *Lactobacillus rennini* ACA-DC 565 as adjunct culture on Feta cheese production, we performed cheese making trials using the following combinations of starters: (A) the mixed culture (control) of *Lactococcus lactis* spp. *lactis* ACA-DC ??, *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 7 and *Lactobacillus. delbrueckii* spp. *bulgaricus* ACA-DC 84; (B) the starter A in combination with *Lactobacillus rennini* ACA-DC 565 as adjunct; and (C) the starter A in combination with *Lactococcus. lactis* spp *cremoris* ACA-DC 52 as adjunct. Microbiological and physicochemical analyses were performed throughout production and ripening (days 1, 15, 30, and 60). Statistically significant differences were observed for thermophilic lactobacilli and NSLAB between cheese B and the other two, A and C. The populations of the other microbiological groups examined were similar among all cheeses. No significant differences in physicochemical characteristics were observed, except of the moisture content being significantly lower in cheeses B and C was than in the control cheese A. The most pronounced effect was observed in the case of proteolysis (% TCA-SN) after 15 days, which in cheese B was higher (0.40%) than in cheeses A and C (0.27 and 0.24, respectively). Finally, during the sensory assessment the cheeses (day 60), cheese B prepared with the *Lb. rennini* as adjunct scored significantly higher than cheeses A and C.

Keywords: Feta cheese; *Lactobacillus rennini* ACA-DC 565; Adjunct culture

Γενετική και φαινοτυπική ποικιλομορφία αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων που απομονώθηκαν από τη ριζόσφαιρα σιτηρών καλλιεργούμενων στον πειραματικό αγρό του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών

ΚΕΦΑΛΟΓΙΑΝΝΗ ΗΩ, ΚΟΥΓΙΟΥΜΤΖΙΔΟΥ Α., ΤΖΙΩΡΤΖΗ Φ., ΓΙΟΒΑΝΗ Μ., ΒΕΝΙΕΡΑΚΗ Α., ΤΑΜΠΑΚΑΚΗ Α., ΚΑΤΙΝΑΚΗΣ Π. και ΧΑΤΖΗΠΑΥΛΙΔΗΣ Ι.

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

Τα μικροαερόφιλα, αζωτοδεσμευτικά βακτήρια του γένους *Azospirillum* (alphaproteobacteria), ανήκουν στους μικροοργανισμούς που προάγουν την αύξηση των φυτών, διαθέτουν έντονη κινητικότητα και βρίσκονται στο έδαφος ή στην περιοχή της ριζόσφαιρας. Ορισμένες από τις ιδιότητές τους, οι οποίες συμβάλουν στην προώθηση της ανάπτυξης των φυτών είναι: η παραγωγή ινδολοξικού οξέος (IAA), η ικανότητα διαλυτοποίησης του φωσφόρου και η αζωτοδέσμευση. Επιπλέον, τα βακτήρια αυτά έχουν την ικανότητα να κινούνται ομαδικά σε επιφάνειες (swarming and swimming motility). Στην παρούσα μελέτη, απομονώθηκαν από τη ριζόσφαιρα σιτηρών (*Zea mays*, *Secale cereal*, *Zea mays* και *Hordeum vulgare*) καλλιεργούμενων στον πειραματικό αγρό του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών τέσσερα αζωτοδεσμευτικά βακτήρια (Α, Β, 4a2, και Η2 αντίστοιχα) τα οποία διαπιστώθηκε ότι ανήκουν στο είδος *Azospirillum brasilense*. Στη συνέχεια εκτιμήθηκε, η απόδοση της αζωτοδεσμευτικής δραστηριότητας των βακτηρίων, η ικανότητα παραγωγής IAA καθώς και ο βαθμός διαλυτοποίησης του φωσφόρου. Επιπλέον διερευνήθηκε η επίδραση διαφορετικών περιβαλλοντικών συνθηκών (θερμοκρασία και αλατότητα) στην αύξηση και στη δυνατότητα ομαδικής κίνησης σε επιφάνειες (swarming and swimming motility). Σε υπό εξέλιξη πείραμα μελετάτε η επίδραση των συγκεκριμένων στελεχών σε φυτά υπό ελεγχόμενες συνθήκες ανάπτυξης.

Genetic and phenotypic diversity of N₂-fixing bacteria isolated from the rhizosphere of cereals grown in experimental field of Agricultural University of Athens

KEFALOGIANNI I., KOUGIOUMTZIDOU A., TZIORTZI F., GIOVANI M., VENIERAKI A., TAMPAKAKI A., KATINAKIS P. and CHATZIPAVLIDIS I.

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

The microaerophilic, diazotrophic, plant growth promoting rhizobacteria of the genus *Azospirillum* (alphaproteobacteria) are highly motile, soil and rhizosphere inhabitants. Some of the traits that contribute to their ability to promote plant growth are: indole acetic acid (IAA) synthesis, phosphorus solubilization and nitrogen fixation. Additionally, azospirilla are able either to swim (polar flagellum) or swarm (lateral flagella). Four diazotrophic bacteria designated as A, B, 4a2 and H2 were isolated from the rhizosphere of cereals (*Zea mays*, *Secale cereal*, *Zea mays* and *Hordeum vulgare* respectively) grown in the experimental field of Agricultural University of Athens and were characterized as *Azospirillum brasilense*. In addition their nitrogen fixation efficiency, IAA production and phosphorus solubilization capacity were assessed. Furthermore, it was examined the influence of different environmental conditions (temperature and salinity) on their growth, swarming and swimming behavior. These strains are currently evaluated for their influence on the plants under growth chamber conditions.

Παραγωγή βιοκαυσίμων από απόβλητα βιομηχανίας τροφίμων

ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΠΟΥΛΟΥ Μ.1 ΑΝΤΩΝΟΠΟΥΛΟΥ Γ.2 ΚΑΙ ΛΥΜΠΕΡΑΤΟΣ Γ.1,2

*1 ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ, ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ, 15780, ΑΘΗΝΑ**2ΙΤΕ-ΙΕΧΜΗ, ΟΔΟΣ ΣΤΑΔΙΟΥ, ΠΛΑΤΑΝΙ, Τ.Θ 1414, 26504, ΠΑΤΡΑ*

Η διαρκώς εντεινόμενη περιβαλλοντική κρίση, τα μειούμενα αποθέματα πετρελαίου και η συνειδητοποίηση της παγκόσμιας κοινής γνώμης για τις κλιματικές αλλαγές έχουν ως αποτέλεσμα την ανάγκη ανάπτυξης αειφόρων τεχνολογιών για την παραγωγή καυσίμων, χημικών, βιοϋλικών και τροφίμων. Καθοριστικό ρόλο για την επίτευξη της αειφόρου ανάπτυξης παίζει η αντικατάσταση μη ανανεώσιμων πρώτων υλών με ανανεώσιμες και η ανάπτυξη καινοτόμων τεχνολογιών που να επιτυγχάνουν ταυτόχρονη οικονομική βιωσιμότητα και ελαχιστοποίηση των περιβαλλοντικών επιπτώσεων. Τέτοιου είδους τεχνολογίες είναι τα διεθνώς ονομαζόμενα βιοδιυλιστήρια (biorefineries) τα οποία στοχεύουν στον συνδυασμό φυσικών, (θερμο)χημικών και βιολογικών μεθόδων επεξεργασίας βιομάζας για την αειφόρο παραγωγή βιοκαυσίμων, χημικών, βιοϋλικών και τροφίμων. Η ελληνική βιομηχανία τροφίμων αποτελεί τον μεγαλύτερο βιομηχανικό κλάδο και τα στερεά και υγρά απόβλητά της μπορούν να χαρακτηριστούν ως ανανεώσιμες πρώτες ύλες που θα μπορούσαν να στηρίξουν την δημιουργία ενός καινοτόμου και αειφόρου τομέα βιομηχανικής ανάπτυξης όπως είναι τα βιοδιυλιστήρια. Με αυτό τον τρόπο μπορεί να συνδυαστεί η παραγωγή και η επεξεργασία των βιομηχανικών τροφικών υπολειμμάτων με την παραγωγή ενέργειας μέσω της παραγωγής βιοκαυσίμων. Στην εργασία αυτή αξιολογείται η αξιοποίηση των αποβλήτων μιας μεγάλης ελληνικής βιομηχανίας προς την παραγωγή βιοκαυσίμων όπως είναι το βιοαέριο και το βιουδρογόνο. Ως υποστρώματα για την παραγωγή υδρογόνου και μεθανίου, χρησιμοποιήθηκαν τρία διαφορετικά ρεύματα αποβλήτων: στερεές βρεφικές τροφές σε διαφορετικές γεύσεις (απόβλητο Ι), εμπορικά σιρόπια (απόβλητο ΙΙ) και σοκολάτα (απόβλητο ΙΙΙ). Όλα τα υποστρώματα αποτελούν επιστροφές από την αγορά προς την βιομηχανία. Τα πειράματα έδειξαν πως τα παραπάνω απόβλητα αποτελούν υποσχόμενα υποστρώματα για τις συγκεκριμένες βιοδιεργασίες και μάλιστα το δυναμικό τους ως προς την παραγωγή υδρογόνου και μεθανίου είναι πολύ κοντά στο μέγιστο θεωρητικό.

Λέξεις κλειδιά: υδρογόνο, μεθάνιο, απόβλητα βιομηχανίας τροφίμων

Biofuels production from food-industry wastes

ALEXANDROPOULOU M.1 ANTONOPOULOU G.2 AND LYBERATOS G.1,2

*1 SCHOOL OF CHEMICAL ENGINEERING, NATIONAL TECHNICAL UNIVERSITY OF ATHENS, 15780, ATHENS**2 FORTH- ICEHT-STADIOU ST, PLATANI, P.O BOX 1414, 26504, PATRAS*

Increased scientific and commercial interest in the development of viable biorefining strategies converting renewable raw materials into biofuels, chemicals, biodegradable plastics, biomaterials and food is driven by environmental concerns, depleting petroleum resources, and public awareness. Sustainable development is strongly dependent upon the establishment of cost-competitive and environmentally benign technologies that convert renewable resources into the same or new products that are derived today through (petro) chemical processing. The solid and liquid waste streams from the food industry provide an ideal renewable resource for the development of novel and sustainable technologies. The Greek food industry constitutes the largest industrial sector in Greece and its waste streams could support the development of sustainable biorefineries. In this way, food production and processing could be achieved in conjunction with the production of biofuels. The aim of this study is the valorisation of the waste streams from a food industry in Greece, for the production of renewable energy sources (biogas, and biohydrogen) through sustainable technologies. Three different waste streams were used as feedstocks for hydrogen and methane production: out of date solid baby foods at different flavors (waste I), out of date liquid commercial sugar based syrups (waste II), out of date chocolate (waste III). All the feedstocks were characterized prior to use. The experiments showed that all the feedstocks are promising feedstocks for these bioprocesses and the hydrogen and methane obtained yields are close to the theoretical ones.

Διερεύνηση της εντομοπαθογένειας του βακτηρίου *Pseudomonas entomophila* σε έντομα οικονομικής σημασίας της Μεσογείου: Αρχικά αποτελέσματα

Νικολούλη Κ.1, Καλαϊτζάκη Α.2, Λιβιεράτος Ι.3 και Μόσιαλος Δ.1*

1Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα

2Ινστιτούτο Ελιάς και Υποτροπικών Φυτών Χανίων

3Μεσογειακό Αγρονομικό Ινστιτούτο Χανίων *Email: mosial@bio.uth.gr

Η *Pseudomonas entomophila* είναι ένα εντομοπαθογόνο βακτήριο που μπορεί να σκοτώσει την *Drosophila melanogaster* μετά από φυσική κατάποση. Το βακτήριο εμφανίζει παθογένεια τόσο στις προνύμφες όσο και στα ενήλικα άτομα της *Drosophila* πυροδοτώντας μια συστηματική ανοσολογική απόκριση. Η εντομοπαθογόνος δράση της *Pseudomonas entomophila* μελετήθηκε στα εξής έντομα οικονομικής σημασίας που προσβάλλουν καλλιέργειες στην περιοχή της Μεσογείου: *Tuta absoluta* (προνύμφες και ενήλικα) και *Ceratitis capitata* ενήλικα με τη χρήση βιολογικών δοκιμών. Για τις βιοδοκιμές χρησιμοποιήσαμε βακτηριακό ίζημα σε οπτική πυκνότητα 100 το οποίο αναμείξαμε με τροφή και μετρήσαμε τη θνησιμότητα των εντόμων για 5 ημέρες στους 28°C. Η *Tuta absoluta* εμφάνισε 100% θνησιμότητα στις 48 ώρες στις προνύμφες, ενώ στα ενήλικα άτομα δεν παρατηρήθηκε θνησιμότητα. Τα ενήλικα άτομα του *Ceratitis capitata* εμφάνισαν θνησιμότητα στις 48 ώρες που έφτασε το 100% στις 72 ώρες. Τα αρχικά αυτά αποτελέσματα των βιοδοκιμών δείχνουν πως η *Pseudomonas entomophila* εμφανίζει παθογένεια και σε έντομα οικονομικής σημασίας και την καθιστούν υποψήφια για μελλοντική χρήση της ως βιοεντομοκτόνο.

Λέξεις κλειδιά: *Pseudomonas entomophila*, *Tuta absoluta*, *Ceratitis capitata*

Investigation on the entomopathogenicity exerted by *P. entomophila* against agricultural important pests in the Mediterranean region: Preliminary results

Nikolouli K.¹, Kalaitzaki A.², Livieratos I.³ and Mossialos D.^{1*}

¹Department of Biochemistry and Biotechnology, University of Thessaly, Greece

²Institute for Olive Tree and Subtropical Plants of Chania

³Mediterranean Agronomic Institute of Chania *Email: mosial@bio.uth.gr

Pseudomonas entomophila is an entomopathogenic bacterium that can kill *Drosophila melanogaster* upon ingestion. *Pseudomonas entomophila* is pathogenic in *Drosophila* larvae and adults triggering a systemic immune response. Using biological assays we tested the level of entomopathogenicity against the following agricultural pests that provoke significant losses in economically important crops in the Mediterranean region: *Tuta absoluta* (larvae and adults) and *Ceratitis capitata* (adults). In order to perform the biological assays we used bacterial pellet in OD₆₀₀=100 which was mixed with proper food and the mortality was monitored for 5 days at 28°C. *Tuta absoluta* larvae showed 100% mortality in 48 hours, while in adults we did not observe any. *Ceratitis capitata* adults showed mortality in 48 hours which reached 100% in 72 hours. The above preliminary results show that *Pseudomonas entomophila* exerts pathogenicity in agricultural important pests and make it a candidate that could be possibly used as a biopesticide.

Η μικροβιακή ποικιλότητα στο ηφαιστειακό σύμπλεγμα της Σαντορίνης

Χρηστάκης Χ.Α.^{1,2}, Πολυμενάκου Π.Ν.^{1,*}, Νομικού Π.2, Bell Croff Κ.3, Μανδαλάκης Μ.1,4, Σαρροπούλου Ε.1, Ούλας Α.1, Carey S.3

¹Ελληνικό Κέντρο Θαλασσίων Ερευνών, Ινστιτούτο Θαλάσσιας Βιολογίας, Βιοτεχνολογίας και Υδατοκαλλιεργειών, Γούρνες Πεδιάδος, Ηράκλειο Κρήτης, Ελλάδα

²Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 15784 Ζωγράφου, Αθήνα, Ελλάδα

³Graduate School of Oceanography, University of Rhode Island, Narragansett, USA

⁴Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Χημείας, Ηράκλειο Κρήτης, Ελλάδα

Τα υδροθερμικά πεδία αποτελούν οικοτόπους με παγκόσμια διασπορά στο θαλάσσιο πυθμένα, που συνήθως σχετίζονται με τα κέντρα διεύρυνσης αλλά και σύγκλισης των μεσοωκεάνιων ραχών. Τα τελευταία 35 χρόνια, τα περιβάλλοντα των υδροθερμικών πεδίων αποτελούν πεδίο έρευνας και ένα πλήθος βακτηρίων και αρχαίων έχουν ανακαλυφθεί και μελετηθεί σε βάθος. Οι μελέτες αυτές έχουν επικεντρωθεί κυρίως στην εξερεύνηση των ιδιαιτεροτήτων του μεταβολισμού και της φυσιολογίας και της ευρύτατης φυλογενετική ποικιλότητας των μικροβιακών κοινωνιών που βρίσκονται σε αυτά τα περιβάλλοντα. Το ηφαιστειακό σύμπλεγμα της Σαντορίνης περιλαμβάνει μια σειρά από υδροθερμικά πεδία στο υποθαλάσσιο ηφαίστειο του Κολούμπο, στην καλντέρα της Σαντορίνης, και σε ηφαιστειακούς κώνους στην περιοχή των Χριστιανών. Το υδροθερμικό αυτό σύστημα είναι μέρος του υποθαλασσίου Ελληνικού Ηφαιστειακού τόξου και παρουσιάζει διαχεόμενες ροές υγρών και αερίων, ενδιάμεσες θερμοκρασίες (70oC-220oC) και θειούχα και θειικά υποστρώματα Tl και Sb. Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε η μελέτη της μικροβιακής ποικιλότητας με την ανάλυση DNA από περιβαλλοντικά δείγματα μικροβιακών ταπήτων, ιζημάτων, καθώς και μικροβιακού στρώματος που καλύπτει ενεργές και μη ενεργές ηφαιστειακές καμινάδες. Συγκεκριμένα, επικεντρωθήκαμε στην ανάγνωση της υπερμεταβλητής V5-V6 περιοχής του γονιδίου του 16S rRNA με την τεχνική υψηλής απόδοσης της πυροαλληλούχισης με χρήση του μηχανήματος 454 GS FLX Titanium Series (Roche). Οι αρχικές αλληλουχίες που παρήχθησαν, επεξεργάστηκαν με τον αλγόριθμο AmpliconNoise για την απομάκρυνση των σφαλμάτων της αλληλούχισης, της PCR και την απομάκρυνση των χιμαιρικών αλληλουχιών. Κατόπιν, οι ομαδοποιημένες, υψηλής ποιότητας αλληλουχίες, επεξεργάστηκαν με το λογισμικό QIIME, ενώ κατηγοριοποιήθηκαν σε λειτουργικά ταξινομικές ομάδες (OTUs) σύμφωνα με το Ribosomal Database Project (RDP). Συνολικά ανιχνεύθηκαν 6433 διαφορετικά OTUs, με επικρατέστερα δύο OTU στενά συνδεδεμένα με μη καλλιεργήσιμους κλώνους αρχαίων. Η υψηλότερη ποικιλότητα καταγράφηκε σε δύο καμινάδες από το ηφαίστειο του Κολούμπο και στο δείγμα μικροβιακού τάπητα που συλλέχθηκε από την καλντέρα της Σαντορίνης. Η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε το Σεπτέμβριο του 2011 με το εξερευνητικό σκάφος Ναυτίλος, ενώ οι εργαστηριακές και υπολογιστικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν στο Ελληνικό Κέντρο Θαλασσίων Ερευνών στο Ηράκλειο Κρήτης.

Microbial diversity in the Santorini volcanic complex

Christakis C.A.^{1,2}, Polymenakou P.N.^{1,*}, Nomikou P.², Bell Croff K.³, Mandalakis M.^{1,4}, Sarropoulou E.¹, Oulas A.¹, Carey S.⁴

¹*Hellenic Centre for Marine Research, Institute of Marine Biology, Biotechnology and Aquaculture, Gournes Pediados, Heraklion Crete, Greece*

²*National and Kapodistrian University of Athens, 15784 Zographou, Athens, Greece*

³*Graduate School of Oceanography, University of Rhode Island, Narragansett, USA*

⁴*University of Crete, Department of Chemistry, Heraklion Crete, Greece*

Hydrothermal fields are habitats with worldwide distribution in the seafloor, and are usually associated with mid-ocean ridges spreading centers. Hydrothermal field environments are being investigated in the last 35 years and numbers of bacteria and archaea, their unique metabolic and physiological properties and their vast phylogenetic diversity have been studied. The Santorini volcanic complex includes a series of hydrothermal vent fields that have been recently discovered in the submarine volcano of Kolumbo, in the Santorini caldera, and in the Christiana domes. This volcanic complex is part of the Hellenic Volcanic Arc and presents diffused gas and liquid venting, intermediate temperatures (70oC-220oC) and sulfide and sulfate compounds of Tl+Sb. In the present study, microbial diversity was investigated by DNA extraction from the sediments and microbial mat environmental samples. Then the hypervariable V5-V6 regions of the 16S rRNA gene was barcoded and sequenced with the state of the art high throughput technique of pyrosequencing by using the 454 GS FLX Titanium Series (Roche) machine. The primary sequences produced, were processed with the AmpliconNoise algorithm for the removal of sequencing and PCR errors and also the removal of chimeric sequences, while the clustered high quality sequences were further processed with the QIIME software package and then categorized into operational taxonomic units (OTUs), according to the Ribosomal Database Project (RDP). Data matrices were produced with OTU abundance values for four similarity levels (99%, 97%, 95%, 90%) and then the data were normalized and put into similarity data matrices. A total of 6433 OTUs were detected, where two unknown archaeal OTU were dominated, whereas two chimneys from the Kolumbo volcano and the Santorini caldera presented the highest diversity. Sampling was carried out in September 2011 with the exploration vessel Nautilus, whilst the laboratory and computer analyses were carried out in the Hellenic Centre of Marine Research in Heraklion of Crete.

Πρωτεωμική μελέτη του βακτηρίου *Pseudomonas Putida* F1 κατά την βιοαποδόμηση του βενζοϊκού άλατος

Μανδαλάκης Μ.^{1,2*}, Panikov N.¹, Dai S.¹, Karger B.L.¹

¹Barnett Institute, Northeastern University, Boston, MA 02115

²Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Χημείας, Ηράκλειο Κρήτης, Ελλάδα

Το *Pseudomonas putida* F1 είναι ένα gram-αρνητικό βακτήριο με υψηλό βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον στον τομέα του περιβάλλοντος επειδή είναι ικανό να βιοαποδομεί μια μεγάλη ποικιλία τοξικών αρωματικών ενώσεων με υψηλές ταχύτητες. Μέχρι σήμερα διάφορα στελέχη *Pseudomonas putida* έχουν μελετηθεί με τη βοήθεια της πρωτεωμικής ανάλυσης για την καλύτερη κατανόηση των αλλαγών που συμβαίνουν στην πρωτεϊνική σύστασή τους κατά τη βιοαποδόμηση οργανικών ρυπαντών και την αποσαφήνιση των καταβολικών μονοπατιών που ακολουθούν. Ωστόσο η πλειοψηφία αυτών των μελετών έχουν πραγματοποιηθεί με τη χρήση της συμβατικής τεχνικής δισδιάστατης ηλεκτροφόρησης (2-D PAGE) σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας. Αυτή πλέον αντικαθίσταται από πιο σύγχρονες shotgun τεχνικές που βασίζονται στη δισδιάστατη υγρή χρωματογραφία σε συνδυασμό με διαδοχική φασματομετρία μάζας (2D-LC-MS/MS), και οι οποίες επιτυγχάνουν την ανίχνευση, ποσοτικοποίηση πολύ μεγαλύτερου αριθμού πρωτεϊνών.

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε shotgun πρωτεωμική ανάλυση του *Pseudomonas putida* F1 και μελετήθηκαν οι αλλαγές που συμβαίνουν στο πρωτεϊνικό προφίλ κατά τη βιοαποδόμηση του βενζοϊκού άλατος. Η βιοαποδόμηση του κιτρικού άλατος χρησιμοποιήθηκε ως σημείο αναφοράς. Το στέλεχος καλλιεργήθηκε σε βιοαντιδραστήρα χρησιμοποιώντας το βενζοϊκό και το κιτρικό άλας ως μοναδική πηγή άνθρακα. Για την πλήρη ενεργοποίηση των κυττάρων πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές καλλιέργειες έπειτα από τις οποίες η ανάπτυξη του βακτηρίου ακολουθούσε εκθετική αύξηση χωρίς φάση προσαρμογής. Ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης των κυττάρων στο βενζοϊκό ($1.01 \pm 0.11 \text{ h}^{-1}$) και το κιτρικό άλας ($1.11 \pm 0.12 \text{ h}^{-1}$) ήταν παρόμοιοι. Η μεταβολή της πηγής άνθρακα από βενζοϊκό σε κιτρικό είχε σαν αποτέλεσμα την υπερέκφραση των 14 πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην μετατροπή του βενζοϊκού σε ηλεκτρύλο-CoA (succinyl-CoA), μέσω του μηχανισμού όρθο-διάσπασης της κατεχόλης, καθώς και δύο πρωτεϊνών που συμμετέχουν στον παράλληλο μηχανισμό όρθο- διάσπασης του π-υδρόξυ-βενζοϊκού οξέος (protocatechuate). Εκτός από τις πρωτεΐνες που εμπλέκονται άμεσα στη βιοαποδόμηση του βενζοϊκού, υπερέκφραση παρατηρήθηκε για άλλες πρωτεΐνες που σχετίζονται με την ενεργητική απέκκριση των βενζοϊκών από το κύτταρο, την ανάπτυξη κατάστασης κυτταρικού στρες και την βιοαποδόμηση άλλων αρωματικών ενώσεων.

Proteomic analysis of *Pseudomonas putida* F1 during benzoate biodegradation

Mandalakis M.^{1,2*}, Panikov N.¹, Dai S.¹, Karger B.L.¹

¹*Barnett Institute, Northeastern University, Boston, MA 02115*

²*University of Crete, Department of Chemistry, Heraklion Crete, Greece*

Pseudomonas putida F1 is a Gram-negative bacterium with high biotechnological interest due to its capability to degrade a large variety of toxic aromatic compounds at high rates. Up to now, several *Pseudomonas putida* strains have been investigated by proteomics approaches to better understand the changes taking place in their protein profile during pollutant biodegradation and to elucidate the adopted catabolic pathways. Though, the majority of published proteomic studies have employed conventional two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE) followed by mass spectrometry. Nowadays, 2D-PAGE is being replaced by modern shotgun proteomic methods, which involve 2-dimensional liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (2D-LC-MS/MS) and offer a much larger number of protein identification and quantifications.

In the present study, *Pseudomonas putida* F1 was subjected to shotgun proteomic analysis in order to investigate the changes occurring in its protein profile during benzoate degradation. For that purpose, the degradation of citrate was taken as a reference point. The bacterium was cultivated in a bioreactor using benzoate and citrate as a sole carbon source. A series of repetitive batch cultivations was necessary to attain the complete activation of bacterial cells, after which the growth profile obeyed a simple kinetic model with no lag-phase and exponential growth until full depletion of C-substrate. Specific growth rates of bacteria were similar on benzoate ($1.01 \pm 0.11 \text{ h}^{-1}$) and citrate ($1.11 \pm 0.12 \text{ h}^{-1}$). Switching from citrate to benzoate resulted in the upregulation of all 14 proteins implicated in the transformation of benzoate to succinyl-CoA via the catechol ortho-cleavage pathway, as well as of two proteins participating in the parallel protocatechuate ortho-cleavage pathway. Besides the enzymes directly involved in benzoate degradation, upregulation was also observed for other interesting proteins, such as a protein acting as an efflux pump for benzoate export, several stress-related proteins and proteins involved in the degradation of other aromatic compounds.

Ενδομυκορριζικά εμβόλια. Εφαρμόζουμε τα σωστά κριτήρια επιλογής στελεχών;

Ομήρου Μ.¹, Υψηλάντης Γ², Καρπούζας Δ.Γ.³, Ιωαννίδης Ι.Μ.¹, Παπαδοπούλου Κ.Κ.³, Οιχαλιώτης Κ.⁴

¹Ινστιτούτο Γεωργικών Ερευνών, Κλάδος Αγροβιοτεχνολογίας, Ταχ. Θυρ. 22016, Λευκωσία 1516, Κύπρος

²Εργαστήριο Εδαφολογίας, Γεωπονική Σχολή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Θεσσαλονίκη 54124

³Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πλούτωνος 26 και Αιόλου, Λάρισα 41221

⁴Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Φυσικών Πόρων και Γεωργικής Μηχανικής, Ιερά Οδός 75, Αθήνα 11855

Η εμπορική παραγωγή και διανομή ενδομυκορριζικών εμβολίων αυξάνεται διεθνώς. Τα αποτελέσματα μας συγκλίνουν σε τρία σημεία Α) Εμβόλια απομονωμένα από ξένα οικοσυστήματα, που δεν συγκοινωνούν με το οικοσύστημα εφαρμογής, θα πρέπει να αξιολογούνται και ως μικροβιακοί εισβολείς διότι μπορεί να ανταγωνιστούν γηγενή, δυναμικά ευεργετικά στελέχη. Β) Το υψηλό επίπεδο αποικισμού είναι σήμερα το βασικότερο κριτήριο για επιλογή εμπορικά αξιοποιήσιμων εμβολίων. Όμως ο βαθμός αποικισμού σπάνια σχετίζεται με την αποδοτικότητα των φυτών. Γ) Τα εμβόλια είναι συχνά μη-αποτελεσματικά όταν δεν συνυπάρχει στο αγροοικοσύστημα έλλειψη θρεπτικών στοιχείων, νερού ή άλλος περιορισμός της φυτικής ανάπτυξης.

Συγκεκριμένα: Πέντε γηγενή ενδομυκορριζικά εμβόλια, απομονωμένα από βιολογικές εκμεταλλεύσεις στην Ελλάδα, δοκιμάστηκαν σε πειράματα δοχείων ανάπτυξης και θερμοκηπίου με στόχο την αύξηση της ανάπτυξης / απόδοσης φυτών πιπεριάς. Ο αποικισμός των φυτών δεν συσχετιζόταν με βελτιωμένη απόδοση ή με πρόσληψη P, υποδεικνύοντας ότι ο αποικισμός δεν αποτελεί ασφαλές κριτήριο για την επιλογή εμβολίων. Αντιθέτως, ένα στέλεχος του *R. irregularis* που ήταν ιδιαίτερα μέτριος αποικιστής έδωσε συστηματικά τα καλύτερα αποτελέσματα απόδοσης στα φυτά. Σε άλλη πειραματική μελέτη, διερευνήσαμε υπό συνθήκες αγρού, την επίδραση ενός εμπορικού ενδομυκορριζικού στελεχούς στην απόδοση καλλιέργειας καρπούζιου υπό βέλτιστη και ελλιπή άρδευση. Ο εμβολιασμός των φυτών που καλλιεργήθηκαν υπό καταπόνηση ύδατος οδήγησε σε σημαντική αύξηση της απόδοσης τους (παραγωγή, δείκτης αξιοποίησης νερού άρδευσης, ολικός P και N στις ρίζες). Ωστόσο, μόνο ο P στις ρίζες αυξήθηκε με την εφαρμογή του εμβολίου, στα φυτά που καλλιεργήθηκαν υπό βέλτιστη άρδευση. Γηγενή ενδομυκορριζικά στελέχη είχαν αποικίσει τις ρίζες των φυτών (είδη *Glomus* και *Paraglomus*), αλλά ορισμένα από τα μέλη αυτής της τοπικής κοινότητας ενδομυκορριζών εμφανίστηκαν ευαίσθητα τόσο στην εισαγωγή του αλλόχθονος εμβολίου όσο και σε συνθήκες έλλειψης νερού (DGGE profiles). Ο εμβολιασμός οδήγησε σε αύξηση αποικισμού των φυτών (αριθμό αντιγράφων του γονιδίου, TaqMan real-time PCR) μόνο κάτω από συνθήκες υδατικής καταπόνησης.

Λέξεις κλειδιά: Ενδομυκορριζες, μικροβιακά εμβόλια, μικροβιακή οικολογία

AMF inocula: Are we targeting the right selection attributes?

Omirou M.¹, Ipsilantis I.², Karpouzas D.G.³, Ioannides I.M.¹, Papadopoulou K.K.³, Ehaliotis C.⁴

¹*Agricultural Research Institute, Department of Agrobiotechnology, Agricultural Research Institute P.O. Box 22016, 1516 Nicosia, Cyprus*

²*Soil Science Laboratory, Faculty of Agriculture, Aristotle University, 54124, Thessaloniki, Greece*

³*University of Thessaly, Department of Biochemistry and Biotechnology, Ploutonos 26 and Aiolou str., 41221 Larisa, Greece*

⁴*Agricultural University of Athens, Department of Natural Resources and Agricultural Engineering, 75 Iera Odos str., 11851 Athens, Greece.*

Commercial production and distribution of AMF inocula is increasing worldwide. Our recent results from pot, greenhouse and field experiments converge towards three points of caution: A) Effects of non-locally produced inocula should be evaluated at the level of microbial invaders, since inocula may out-compete local, potentially beneficial strains. B) High colonization efficiency is an essential selection attribute; however colonization extent is rarely related to plant benefit. C) Inocula are often non-effective in the lack of nutrient, water or other growth limitation.

Specifically: Five native AMF inocula previously isolated from organic farms in Greece were tested at pot and greenhouse scale on pepper plants. Colonization was in general not in line with improved yield or P uptake, indicating that this is not a safe criterion for inoculum selection. On the contrary, a poor colonizer (*R. irregularis*) consistently produced the best yield results. In another experimental trial we investigated the effects of a commercial AMF inoculum on watermelon performance under optimal and suboptimal watering. Inoculation of plants grown under water stress resulted in a significant increase in water use efficiency, fruit yield, shoot/root-P and root-N. However, only root-P responded to AM inoculation under non stress conditions. The native mycorrhizal population did colonize watermelon roots (*Glomus* and *Paraglomus* species), but some members of this colonizer community appeared sensitive to the introduction of the allochthonous inoculum and to water stress conditions (DGGE profiles). The allochthonous inoculum resulted in increased plant colonization (gene copy numbers, TaqMan real-time PCR) under water stress conditions only.

Keywords: Endomycorrhizae, microbial inocula, microbial ecology

Ενεργή αντιμικροβιακή συσκευασία χοιρινού κρέατος σε τροποποιημένες ατμόσφαιρες με την χρήση αλκοολούχων αποσταγμάτων

Καπετανάκου Α.Ε., Αγαθαγγέλου Ε.Ι., Φύτρος Α.Α., Μανιός Σ.Γ., Σκανδάμης Π.Ν.

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Επιστήμη και Τεχνολογία Τροφίμων, Ιερά οδός 75, 11855, Αθήνα

Σκοπός της μελέτης ήταν η εκτίμηση της επίδρασης πτητικών ουσιών προερχόμενων από αλκοολούχα αποστάγματα (ΑΑ) στο μικροβιακό, φυσικοχημικό και οργανοληπτικό προφίλ χοιρινού κρέατος συντηρούμενου σε τροποποιημένες ατμόσφαιρες (ΤΑ).

Τεμάχια χοιρινού κρέατος και σπόγγων κουζίνας τοποθετήθηκαν σε διχοτομημένα τρυβλία. Όγκοι (1 mL): νερού (μάρτυρας), 30% και 40% κ.ό. καθαρής αιθανόλης, ούισκι (40% αιθανόλη), κονιάκ (36% αιθανόλη), ρακή (39.6% αιθανόλη), τσίπουρου (41% αιθανόλη) και ούζου (40% αιθανόλη) προστέθηκαν στους σπόγγους κουζίνας. Τα δείγματα συντηρήθηκαν σε ΤΑ, 40%CO₂:30%O₂:30%N₂ (40/30/30) ή 80%O₂:20%CO₂ (80/20) και σε θερμοκρασίες, 4 και 10oC. Καταμετρήθηκαν οι πληθυσμοί της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας, του *Brochothrix thermosphacta* και των ψευδομονάδων, οξυγαλακτικών βακτηρίων, ζυμών-μυκήτων και εντεροβακτηρίων. Επίσης πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις του χρώματος και οργανοληπτικός έλεγχος (οσμή, εμφάνιση, γεύση). Οι φυσικοχημικές μεταβολές της γλυκόζης και των οργανικών οξέων προσδιορίστηκαν με HPLC.

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια κυριάρχησαν με (4oC) ή χωρίς τη συγκυριαρχία του *B. thermosphacta* (10oC). Στους 4°C, όταν οι πληθυσμοί των οξυγαλακτικών στους μάρτυρες ήταν 8.0 logCFU/g (20η ημέρα), τα συσκευασμένα δείγματα με ΑΑ παρουσίασαν πληθυσμούς: ούισκ<~>κονιάκ<~>ρακή<~>ούζο (4.6-4.9 logCFU/g)> 30%, 40% αιθανόλη και τσίπουρο (5.4-6.0 logCFU/g) αυξάνοντας τον χρόνο ζωής κατά 5-8 ημέρες, σε σχέση με τον μάρτυρα. Στους 10°C, η χρήση ΑΑ επέφερε επέκταση του χρόνου ζωής κατά 3-5 ημέρες. Τα ΑΑ διατήρησαν τα επίπεδα των ψευδομονάδων και *B.thermosphacta* 3.0-5.0 logCFU/g χαμηλότερα από τους μάρτυρες (8.5-9.0 logCFU/g) στο πέρας της συντήρησής τους. Στους 4oC, η συγκέντρωση γαλακτικού οξέος στους μάρτυρες μειώθηκε, ενώ στα δείγματα με ΑΑ αυξήθηκε πιθανόν λόγω της αναστολής των ψευδομονάδων. Στους 10oC, η συγκέντρωση γαλακτικού οξέος στα δείγματα με ΑΑ παρέμενε σταθερή, πιθανώς λόγω αναστολής του *B.thermosphacta*. Ανάμεσα στις δύο ΤΑ, στην 40/30/30 παρατηρήθηκαν υψηλότερες συγκεντρώσεις οξικού οξέος. Σε αντίθεση με τους 4oC (καμία μεταβολή), στους 10oC η συγκέντρωση της γλυκόζης μειώθηκε κατά την συντήρηση. Τα δείγματα στην 80/20 είχαν καλύτερο άρωμα, χρώμα, εμφάνιση και γεύση.

Η ενεργός συσκευασία με ΑΑ συνδυαστικά με ΤΑ μπορεί να αποτελέσει μια αποτελεσματική μέθοδο επιμήκυνσης του χρόνου ζωής του χοιρινού κρέατος.

Λέξεις κλειδιά: ενεργός συσκευασία, αλκοολούχα αποστάγματα, τροποποιημένες ατμόσφαιρες, αλλοίωση

Active packaging of pork meat under modified atmospheres using alcoholic distillates as antimicrobials

Kapetanakou, E.A., Agathagelou, E.I., Fytros, A.A., Manios, S.G., Skandamis, P.N.

Agricultural University of Athens, Food Science and Technology, Iera Odos 75, 11855, Athens

The study aimed to evaluate the effect of alcoholic distillates (AD) vapors on microbial, physicochemical, and sensory profile of pork meat stored in modified atmospheres (MAP). Pork pieces and kitchen cloths were placed into two compartments Petri-dishes. One mL of: water (control), 30% and 40% v/v alcohol, whiskey (40% alcohol), brandy (36% alcohol), raki (39.6% alcohol), tsipouro (41% alcohol), and ouzo (40% alcohol) were added to kitchen cloths. All samples were stored under 40%CO₂:30%O₂:30%N₂ (40/30/30) or 80%O₂:20%CO₂ (80/20) and at 4 and 10°C. Total viable counts, Pseudomonads, *Brochothrix thermosphacta*, lactic acid bacteria (LAB), yeasts and moulds, and *Enterobacteriaceae* were monitored, while colour, odour, and taste were also evaluated. Glucose and organic acids were determined by HPLC.

LAB were the specific spoilage organism with (4oC) or without co-dominance of *B.thermosphacta* (10oC). At 4°C, when LAB on controls reached 8.0 logCFU/g (on day 20), on treated samples, LAB followed the order: whiskey~brandy~raki~ouzo (4.6-4.9 logCFU/g)>30%, 40% alcohol, and tsipouro (5.4-6.0 logCFU/g). Shelf-life was extended 5-8 days at 4°C and 3-5 days at 10°C. ADs also inhibited Pseudomonads and *B.thermosphacta* (3.0-5.0 logCFU/g) compared to controls (8.5-9.0 logCFU/g). At 4oC, lactic acid concentration was decreased on controls during storage, while in samples with ADs increased, possibly due to Pseudomonads inhibition. At 10oC, lactic acid was stable in ADs-packaged sample, due to suppression of *B.thermosphacta* growth. Acetic acid highest levels were detected under 40/30/30. In contrast to 4oC, where glucose remained stable, at 10oC its levels were reduced during storage. Packaging under 80/20 resulted in better odour, colour and taste. Vapour phase of ADs combined with MAP may be an effective packaging method for extending shelf-life of pork meat.

Keywords: active packaging, alcoholic distillates, MAP, vapour, spoilage

Απομάκρυνση βαρέων μετάλλων από το στέλεχος *Mycobacterium gilvum* Sryg1 σε υγρές καλλιέργειες

Καραμπίκα Ε¹, Τσόγκας Γ², Βλεσσίδης Α², Κούκκου ΑΕ¹

¹Εργαστήριο Βιοχημείας, ²Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, 45110 Ιωάννινα

Ορισμένα βαρέα μέταλλα παίζουν σημαντικό ρόλο σε βιοχημικές λειτουργίες των οργανισμών συμμετέχοντας ως ιχνοστοιχεία. Σε μεγαλύτερες όμως συγκεντρώσεις οδηγούν σε τοξικά φαινόμενα. Οι μικροοργανισμοί έχουν αναπτύξει διάφορους μηχανισμούς ανθεκτικότητας σε μέταλλα και η χρήση τους για την βιοεξυγίανση του περιβάλλοντος έχει μεγάλο ενδιαφέρον.

Η πλήρης ανάλυση του γονιδιώματος του *Mycobacterium gilvum* Sryg1 το οποίο αποδομεί PAHs (Karabika et al. 2009), έδειξε ότι αποτελείται από ένα 5,547,747 bp κυκλικό χρωμόσωμα και δύο κυκλικά πλασμίδια, με μεγέθη 211,864 bp και 23,681 bp, αντίστοιχα. (Kallimanis et al. 2011). Η παρουσία των πλασμιδίων επιβεβαιώθηκε πειραματικά με τις τεχνικές Ηλεκτροφόρηση Παλμικού Πεδίου και αποτύπωσης κατά Southern.

Τόσο στο χρωμόσωμα όσο και στο μεγάλο πλασμίδιο εντοπίστηκαν γονίδια που κωδικεύουν πιθανούς μηχανισμούς ανθεκτικότητας σε μέταλλα. Για το σκοπό αυτό έγινε έλεγχος της ανθεκτικότητας του Sryg1 σε διάφορα μέταλλα και μεταλλοειδή: Zn(II), Ni(II), Cu(II), Co(II), Pb(II), Cr(VI), Cr(III), Cd(II), Mn (II), As(VI) and B(III). Λαμβάνοντας υπόψη την βιολογική σημασία κάθε μετάλλου, την περιβαλλοντική ρύπανση και την ελάχιστη συγκέντρωση αναστολής της ανάπτυξης του Sryg1, επιλέχθηκαν τα μέταλλα Cu(II), Pb(II) και Ni(II) για περαιτέρω μελέτη. Κύτταρα Sryg1 απομάκρυναν 55% Cu(II) (25 ppm), 35% Cu(II) (125 ppm), 20% Cu(II) (250 ppm), 60% Pb(II) (62.5 ppm) και 35% Pb(II) (500 ppm), ενώ από υγρή καλλιέργεια, στην οποία είχαν προστεθεί 75 ppm Cu(II) και 95 ppm Pb(II) παρατηρήθηκε απομάκρυνση των Cu(II) και Pb(II) κατά 22% και 25% αντίστοιχα. Δεν πραγματοποιήθηκε απομάκρυνση του Ni(II). Αξίζει να σημειωθεί ότι κύτταρα Sryg1 τα οποία είχαν αναπτυχθεί σε διαδοχικά αυξανόμενες συγκεντρώσεις Cu(II) (adapted) ενώ εμφάνισαν ανθεκτικότητα σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις Cu(II) παρουσίασαν μικρότερη ικανότητα απομάκρυνσής του από ότι κύτταρα Sryg1 τα οποία δεν είχαν προεπωαστεί παρουσία Cu(II) (non-adapted).

Λέξεις κλειδιά: *Mycobacterium gilvum*, βαρέα μέταλλα, πλασμίδια

Heavy metals removal by *Mycobacterium gilvum* Spyr1 in liquid cultures

Karabika E₁, Tsogas G₂, Vlessidis A₂, Koukkou A₁

¹Biochemistry Laboratory,

²Laboratory of Analytical Chemistry, Department of Chemistry, University of Ioannina, 45110, Ioannina, Greece

Although some heavy metals are essential micronutrients, they are toxic at high levels causing damage to environment and living organisms including human beings. The interest in bacterial heavy metal resistance is of practical significance, as bioaccumulation into microorganisms is the prominent process of heavy metals removal.

The genome of *Mycobacterium gilvum* strain Spyr1 which was previously isolated as a PAH degrading bacterium (Karabika et al. 2009), is composed of a 5,547,747 bp long circular chromosome and two circular plasmids, a larger and a smaller one with sizes of 211,864 and 23,681 bp, respectively (Kallimanis et al. 2011). The physical existence of plasmids was confirmed by Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) and Southern hybridization experiments.

Based on genome information, genes encoding metal resistance were identified both on chromosome and large plasmid. Spyr1 was tested for its ability to grow on heavy metals and metalloids such as Zn(II), Ni(II), Cu(II), Co(II), Pb(II), Cr(VI), Cr(III), Cd(II), Mn (II), As(VI) and B(III). Cu(II), Pb(II) and Ni(II) were chosen for further investigation based on minimal inhibitory concentration (MIC), heavy metal biological importance and environmental contamination. Spyr1 cells were able to remove 55% Cu(II) (25 ppm), 35% Cu(II) (125 ppm), 20% Cu(II) (250 ppm), 60% Pb(II) (62.5 ppm) and 35% Pb(II) (500 ppm) whereas, removal of 25% Cu(II) and 22% Pb(II) was demonstrated in a mixture of 75 ppm Cu(II) and 95 ppm Pb(II). No Ni(II) removal was observed. Although copper-acclimated cells showed increased Cu-tolerance, Cu-removal was significantly decreased compared to non copper-acclimated Spyr1 cells. Metal concentration was measured by Atomic Absorption Spectrophotometry (AAS).

Keywords: *Mycobacterium gilvum*, heavy metal resistance, plasmid

Έλεγχος του *Listeria monocytogenes* σε λουκάνικα Φρανκφούρτης και ζαμπόν με εδώδιμες αντιμικροβιακές μεμβράνες και αναθέρμανση σε μικροκύματα

Καπετανάκου Α.Ε., Καρυώτης Δ., Σκανδάμης Π.Ν.

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Επιστήμη και Τεχνολογία Τροφίμων, Ιερά οδός 75, 11855, Αθήνα

Σκοπός της μελέτης ήταν: α) η εκτίμηση της επίδρασης εδώδιμων μεμβρανών (EM) με αλκοολούχα αποστάγματα (AA) στην ανάπτυξη του *Listeria monocytogenes* σε φέτες ζαμπόν και λουκάνικα τύπου Φρανκφούρτης και β) η αξιολόγηση της συνδυαστικής δράσης των EM με AA με την αναθέρμανση των λουκάνικων σε μικροκύματα στην επιβίωση του παθογόνου. Τεμάχια λουκάνικων τύπου Φρανκφούρτης (δύο/συσκευασία) και φέτες ζαμπόν (τρία/συσκευασία) ενοφθαλμίστηκαν αντίστοιχα με 3 και 2 log CFU/cm², μίγματος στελεχών του *L.monocytogenes* (1/2a και 4b). Μεμβράνες αλγινικού νατρίου εμβαπτίστηκαν σε 40% κ.ό. αιθανόλη, ρακή (39.6% αιθανόλη), τσίπουρο (41% αιθανόλη) και ούζο (40% αιθανόλη) για 3 λεπτά. Λουκάνικα και ζαμπόν χωρίς EM και AA ή αιθανόλη και με EM χωρίς AA και αιθανόλη αποτέλεσαν τους μάρτυρες. Τα τεμάχια των λουκάνικων τοποθετήθηκαν ανάμεσα σε δύο EM, ενώ στο ζαμπόν οι EM τοποθετήθηκαν ανάμεσα στις φέτες και συντηρήθηκαν υπό κενό στους 4 και 10°C. Τα λουκάνικα αναθερμάνθηκαν σε μικροκύματα (1000 W/60 sec) για να αξιολογηθεί η επίδραση της συντήρησης με αντιμικροβιακές μεμβράνες στη θερμοανθεκτικότητα του *L.monocytogenes*.

Στους 4°C, όταν ο πληθυσμός του *L.monocytogenes* στα λουκάνικα-μάρτυρες ήταν 8.0 log CFU/g την 30η ημέρα, τα δείγματα παρουσίασαν πληθυσμούς: EM χωρίς AA και αιθανόλη (4.5 logCFU/cm²)>τσίπουρο>ρακή>ούζο (3.5-4.0 logCFU/cm²)>40% αιθανόλη (2.5-3.0 logCFU/cm²). Η ανάπτυξη του *L.monocytogenes* σε ζαμπόν συσκευασμένου με EM με AA ανεστάλη έως και 5.0 logCFU/cm² συγκριτικά με τους μάρτυρες (8.0 logCFU/cm²). Κατά την αναθέρμανση των λουκάνικων, παρατηρήθηκε αύξηση της θερμοανθεκτικότητας του *L.monocytogenes* κατά την συντήρηση στους 4°C σύμφωνα με την σειρά: ρακή (2.5 log CFU/cm²)>ούζο (2.0 log CFU/cm²)>τσίπουρο (1.5 log CFU/cm²), συγκριτικά με τους μάρτυρες που δεν παρατηρήθηκε μεταβολή. Στους 10°C, η θερμοανθεκτικότητα του παθογόνου παρέμεινε σταθερή σε όλα τα δείγματα με AA εκτός από την ρακή που παρουσίασε αύξηση κατά 2.5 logCFU/cm² στο τέλος της συντήρησης.

Παρόλο που η εφαρμογή EM με AA σε φέτες ζαμπόν και λουκάνικα τύπου Φρανκφούρτης μπορεί να αποτελέσει μία αποτελεσματική μέθοδο ελέγχου του *L.monocytogenes*, κατά την συνδυαστική εφαρμογή της με αναθέρμανση σε μικροκύματα δεν παρατηρήθηκε επιπρόσθετη αδρανοποίηση του παθογόνου στα λουκάνικα.

Λέξεις κλειδιά: εδώδιμες μεμβράνες, αλκοολούχα αποστάγματα, ζαμπόν, λουκάνικα Φρανκφούρτης, μικροκύματα, *L.monocytogenes*

Control of *Listeria monocytogenes* by applying alginate-based films with alcoholic distillates alone on ham slices or combined with microwave reheating on frankfurters

Kapetanakou, E.A., Karyotis, D., Skandamis, P.N.

Agricultural University of Athens, Food Science and Technology, Iera Odos 75, 11855, Athens

The study aimed to evaluate the efficacy of edible films (EF) with alcoholic distillates (AD) to control *Listeria monocytogenes* alone on ham slices or combined with microwave reheating on frankfurters.

Frankfurters (two/package) and ham slices (tree/package) were inoculated with 3 και 2 logCFU/cm², respectively, of 4-strain *L.monocytogenes* mixture (1/2a and 4b). EFs were immersed in 40% v/v alcohol, raki (39.6% alcohol), tsipouro (41% alcohol), and ouzo (40% alcohol) for 3 min. Frankfurters and ham without EF and with EF but without ADs and alcohol were used as controls. Frankfurters were placed between two EFs, while in ham slices packages, EFs were placed between slices. Samples were stored under vacuum at 4 and 10°C. Frankfurters were reheated on microwave (1000W/60 sec) to monitor the effect of storage in the presence of EM and ADs on thermotolerance of *L.monocytogenes*.

At 4°C, when *L.monocytogenes* on controls of frankfurters reached 8.0 logCFU/g (day 30), *L.monocytogenes* counts on treated samples were: EF without ADs and alcohol (4.5 logCFU/cm²)>tsipouro≈raki≈ouzo (3.5-4.0 logCFU/cm²)>40% alcohol (2.5-3.0 logCFU/cm²). EFs with ADs applied on hams caused stronger inhibition on *L.monocytogenes* compared to frankfurters. At 4°C, thermotolerance of *L.monocytogenes* on frankfurters increased during storage accordingly: raki (2.5 logCFU/cm²)>ouzo (2.0 logCFU/cm²)>tsipouro (1.5 logCFU/cm²), compared to controls, where no variation was observed. At 10°C, heat resistance of *L.monocytogenes* did not vary during storage due to ADs, except for raki which showed an increase (2.5 logCFU/cm²) at the end of storage.

Although the application of EFs with ADs on ham and frankfurters may be an effective method for controlling *L.monocytogenes*, the combination with microwave reheating was not an extra hurdle for pathogen inactivation.

Keywords: edible films, alcoholic distillates, ham, frankfurters, microwave, *L. monocytogenes*

Έλεγχος του παθογόνου *Escherichia coli* O157:H7 σε έτοιμες κομμένες σαλάτες λαχανικών με εμπορικά & φυσικά αντιμικροβιακά σκευάσματα

Ποιμενίδου Σ¹, Μπικούλη Β.², Νυχάς Γ., Σκανδάμης Π.⁴

¹Υποψήφια διδάκτωρ, Τμ. Επιστήμης & Τεχνολογίας Τροφίμων, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

²Προπτυχιακή φοιτήτρια, Τμ.Επιστήμης & Τεχνολογίας Τροφίμων, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

³Καθηγητής, Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων και Ποτών, Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

⁴Επίκουρος καθηγητής (Υπεύθυνος Επικοινωνίας), Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων και Ποτών, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιερά οδός 75, 118 55, Αθήνα, Ελλάδα

Η ευρεία κατανάλωση συσκευασμένων φρέσκων λαχανικών έχει συσχετισθεί με αύξηση κρουσμάτων τροφικών δηλητηριάσεων. Στόχος μελέτης ήταν η διερεύνηση αποτελεσματικότητας αντιμικροβιακών μεταχειρίσεων για τη μείωση του *Escherichia coli* O157:H7 σε σπανάκι και μαρούλι.

Τα λαχανικά εμβολιάστηκαν με μίγμα στελεχών (10^6 CFU/g, 1h, 5°C) και εμβαπτίστηκαν (2 ή 5 min, 25°C) σε νερό βρύσης, NaOCl (6-14%, 60 & 300ppm, pH 6.5), Citrox (C, 0.5%, pH 3.1), υδρόλυμα ρίγανης (YP, pH 5.4), υδρόλυμα σχίνου (pH 5.2), ξύδι (pH 3.0) και γαλακτικό οξύ (ΓΟ, 2%, pH 2.3), και διαδοχικά σε ΓΟ-C, C-ΓΟ, YP-C, C-YP. Ακολούθησε έκπλυση με κρύο νερό (30 sec) και επώαση σε συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας (5°C, 7 ημέρες). Πραγματοποιήθηκε αξιολόγηση οργανοληπτικών χαρακτηριστικών, χρώματος, μεταβολής αερίων ΤΑ και καταμέτρηση πληθυσμού *E. coli* O157:H7 (CT-SMAC) και ολικής μεσόφιλης χλωρίδας (OMX) (TSA) μετά το χειρισμό και μετά την επώαση.

Η πλύση με νερό μείωσε παθογόνο και OMX κατά <1 log CFU/g χωρίς βακτηριοστατική δράση κατά την επώαση, όπου η OMX αυξήθηκε κατά ~ 1.3 log CFU/g έπειτα από 7 ημέρες. Οι μεγαλύτερες μειώσεις *E. coli* O157:H7 που παρατηρήθηκαν ήταν 5.2 και 3.9 log CFU/g έπειτα από μεταχείριση με ξύδι σε σπανάκι και μαρούλι, αντίστοιχα, με ακόλουθο το ΓΟ με αντίστοιχες μειώσεις 2.0 και 3.7 log CFU/g. NaOCl και C μείωσαν τον παθογόνο ~ 1 log CFU/g. Κατά την επώαση, ΓΟ και Ξύδι μείωσαν περαιτέρω το παθογόνο αλλά όχι την OMX, που αυξήθηκε μετά το ΓΟ κατά 2.0 log CFU/g, και κατά ~ 1.5 log CFU/g μετά το C και NaOCl. Η συνδυαστική δράση C-ΓΟ μείωσε το *E. coli* O157:H7 κατά ~ 2.5 log CFU/g κατά την επώαση. Οι χρόνοι εφαρμογής επέδρασαν όμοια στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, ενώ η εμβάπτιση σε κρύο νερό συνέβαλε στη διατήρησή τους.

Τα αποτελέσματα υπέδειξαν ότι φυσικά αντιμικροβιακά μπορούν να αντικαταστήσουν τα χλωριούχα σκευάσματα στον έλεγχο του παθογόνου και την επιμήκυνση χρόνου ασφαλούς διατήρησης συσκευασμένων λαχανικών.

Λέξεις κλειδιά: *Escherichia coli* O157:H7, εξυγίανση, λαχανικά

Effect of conventional and natural sanitizers on the control of *Escherichia coli* O157:H7 on spinach and lettuce

Poimenidou S.¹, Mpikouli V.², Nychas G.³ and Skandamis P.⁴

¹PhD candidate, Department of Food Science & Technology, Agricultural University of Athens

²Bachelor student, Department of Food Science & Technology, Agricultural University of Athens

³Professor, Laboratory of Food Quality Control and Hygiene, Laboratory of Food Microbiology and Biotechnology, Agricultural University of Athens

⁴Assistant Professor (corresponding author), Laboratory of Food Quality Control and Hygiene, Department of Food Science & Technology, Agricultural University of Athens, Iera Odos 75, 118 55, Athens, Greece (pskan@aua.gr)

Fresh produce-associated outbreaks have been linked to increased consumption of fresh-cut salads. This study aimed to investigate the effectiveness of conventional and natural sanitizers on control of *E. coli* O157:H7.

Vegetables were inoculated with *E. coli* O157:H7 (10⁶ CFU/g, 1h, 5°C) and immersed (2 or 5 min, 25°C) in water, NaOCl (6-14%; 60 and 300ppm), Citrox (C) (0.5%), oregano hydrolysate (OH), vinegar and lactic acid (LA) (2%) solutions, and sequentially in LA-C, C-LA, OH-C, C-OH. Treated samples were immersed in ice-H₂O (30 sec) and stored at 5°C under MAP. Sensory evaluation, color, gas changes, levels of pathogen (CT-SMAC) and total viable counts - TVC (TSA) were determined after decontamination and 7 days.

Water reduced *E. coli* O157:H7 and TVC by <1 log CFU/g, while TVC increased by ~1.3 log CFU/g within 7 days. NaOCl and C treatments reduced pathogen by ~1 log CFU/g. The maximum observed reductions of *E. coli* O157:H7 were 5.2 and 3.9 log CFU/g after vinegar on spinach and lettuce, respectively, followed by LA, with respective reductions 2.0 and 3.7 log CFU/g. During storage, LA and vinegar further reduced pathogen but not TVC, which increased after LA by 2.0 log CFU/g and after C and NaOCl by ~1.5 log CFU/g. Combined treatment of C-LA resulted in 2.5 log CFU/g reductions of *E. coli* O157:H7 within 7 days.

The results suggest that chlorine solutions can be replaced by other more natural decontamination agents to control *E. coli* O157:H7 and shelf life extension of bagged vegetables.

Key words : *Escherichia coli* O157:H7, decontamination, fresh-produce

Μελέτη της ικανότητας σχηματισμού βιουμενίου διαφόρων στελεχών του παθογόνου βακτηρίου *Salmonella enterica* σε διαφορετικές συνθήκες, θερμοκρασίας, pH και σύστασης θρεπτικού μέσου ανάπτυξης

Μπλάνα Β. Α. και Νυχάς Γ.-Ι. Ε.

Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιερά Οδός 75, 11855, Αθήνα

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της ικανότητας προσκόλλησης και σχηματισμού βιουμενίου δεκατεσσάρων στελεχών του παθογόνου βακτηρίου *Salmonella enterica* κάτω από διαφορετικές συνθήκες, θερμοκρασίας (15 και 30°C), pH (5,5, 6,5 και 7,4) και σύστασης του θρεπτικού μέσου ανάπτυξης (πλήρης και ελλιπής σε θρεπτικά συστατικά). Συνθήκες που δύναται να προσομοιάσουν το περιβάλλον παραγωγής και επεξεργασίας τροφίμων. Τα βακτηριακά στελέχη που μελετήθηκαν έχουν απομονωθεί είτε από θηλαστικά, είτε και από τρόφιμα και επιφάνειες επεξεργασίας αυτών. Για το σχηματισμό βιουμενίου χρησιμοποιήθηκαν δύο επιφάνειες ευρέως χρησιμοποιούμενες στις βιομηχανίες επεξεργασίας τροφίμων, ανοξείδωτος χάλυβας και πολυστυρένιο. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε log CFU/cm² και απορρόφηση στα 575nm για την επιφάνεια του ανοξείδωτου χάλυβα και του πολυστυρενίου αντίστοιχα, βάση των μεθόδων προσδιορισμού βιουμενίου που εφαρμόστηκαν. Το σύνολο των στελεχών παρουσίασε υψηλά ποσοστά προσκόλλησης (60-70%) στην επιφάνεια του ανοξείδωτου χάλυβα. Ιδιαίτερα τα στελέχη *S. enterica* B73 και *S. Typhimurium* B62 παρουσίασαν το υψηλότερο ποσοστό προσκόλλησης, το οποίο ξεπέρασε το 70 και 73% αντίστοιχα. Τα βακτηριακά στελέχη *S. enterica* (B17, B19, B42, B52, B67 και B78) καθώς και δύο εκ των τεσσάρων στελεχών *S. Typhimurium* (B62 και B137) που μελετήθηκαν σχημάτισαν βιουμένιο στη επιφάνεια του ανοξείδωτου χάλυβα ο πληθυσμός του οποίου ξεπέρασε τους 6 log CFU/cm² μετά από παραμονή του για 96 και 120 ώρες αντίστοιχα, στους 15°C και σε θρεπτικό μέσο η αρχική τιμή pH του οποίου ήταν 6,5. Αντίθετα, η χαμηλή θερμοκρασία επώασης των 15°C σε συνδυασμό με τις σχετικά χαμηλές τιμές pH (5,5 και 6,5) του θρεπτικού μέσου επηρέασαν αρνητικά το σχηματισμό βιουμενίου στην επιφάνεια πολυστυρενίου. Στους 30°C, τιμές pH 6,5 και 7,4 και απουσία θρεπτικών συστατικών, παρατηρήθηκε σχηματισμός βιουμενίου με υψηλές τιμές απορρόφησης στα 575nm. Έξι στελέχη *S. enterica* (B17, 19, 42, 52, 64 και 67), το *S. Enteritidis* B56 καθώς και τα στελέχη *S. Typhimurium* B193 και B194, έδωσαν τις υψηλότερες τιμές απορρόφησης, οι οποίες υπερέβησαν το 1,5.

Λέξεις κλειδιά: βιουμένια, *Salmonella enterica*, τρόφιμα

Ευχαριστίες: Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια της πράξης Θαλής: «Βιολογική ολιστική προσέγγιση της δυναμικής μορφής επιβίωσης παθογόνων βακτηριακών σχηματισμών - ΒΙΟΥΜΕΝΙΑ», που υλοποιείται στο πλαίσιο του Επιχειρησιακού Προγράμματος "Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση" (ΕΠΕΔΒΜ) και συγχρηματοδοτείται από το Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο (ΕΚΤ).

Study of the ability of pathogenic bacteria *Salmonella enterica* to form biofilms under different environmental conditions, temperature, pH and growth medium composition

Blana V. A. and Nychas G.-J. E.

Laboratory of Microbiology and Biotechnology of Foods, Dept. of Food Science, Technology and Human Nutrition, Agricultural University of Athens, Iera Odos 75, Athens 11855, Greece

The ability of fourteen strains of the pathogenic bacterium *Salmonella enterica* to attach and form biofilms was studied under *in vitro* experimental conditions simulating food production and processing environments. Different environmental conditions, temperature (15 και 30°C), pH (5,5, 6,5 και 7,4) and growth medium composition, were tested. Bacterial strains isolated either from mammals or foods and industrial surfaces were used, whereas two materials extensively used throughout the food-processing industry, stainless steel and polystyrene, were used for the biofilm development. Results were expressed as log CFU/cm² and absorbance at 575nm for stainless steel and polystyrene surfaces, respectively. The majority of the strains tested, presented high rates of attachment (60-70%) on stainless steel surfaces. More precisely, the strains *S. enterica* B73 and *S. Typhimurium* B62 showed the greatest adherence, 70 and 73% respectively. The maximum population density (6 log CFU/cm²) of attached cells was observed by the strains *S. enteric* (B17, B19, B42, B52, B67 and B78) and *S. Typhimurium* (B62 and B137) after 96 and 120 hours of incubation at 15°C where the pH of the growth medium was 6,5. On the contrary, the low temperature 15°C in combination with the relatively low pH values (5,5 and 6,5) affected negatively the biofilm formation on the surface of polystyrene. At 30°C, pH values 6,5 and 7,4 and in the lack of nutrients, biofilm formation was observed with high absorbance at 575nm. Six strains *S. enterica* (B17, 19, 42, 52, 64 and 67), *S. Enteritidis* B56 and *S. Typhimurium* B193 and B194, gave the higher absorbance values, which exceeded 1.5.

Keywords: biofilms, *Salmonella enterica*, foods

Acknowledgments: *The present study was funded by the action THALIS: “Biological Investigation Of the Forces that Influence the Life of pathogens having as Mission to Survive in various Lifestyles; BIOFILMS”, which falls under the Operational Programme (OP) “Education and Lifelong Learning (EdLL)” and is co-financed by the European Social Fund (ESF) and National Resources.*

Μόρια σήματα επικοινωνίας (AHLs και AI-2): η παρουσία τους σε βόειο κιμά κατά τη συντήρησή του κάτω από διαφορετικές συνθήκες (θερμοκρασίας και συσκευασίας)

Μπλάνα Β. Α. και Νυχάς Γ.-Ι. Ε.

Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιερά Οδός 75, 11855, Αθήνα

Η παρουσία μορίων-σημάτων επικοινωνίας, ακυλιωμένων λακτονών της ομοσερίνης (acylated homoserine lactones, AHLs) και αυτεπαγωγέων τύπου-2, διαπιστώθηκε σε βόειο κιμά που συντηρήθηκε κάτω από διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας και συσκευασίας. Πραγματοποιήθηκε συσχέτιση της παρουσίας των μορίων αυτών με την εφήμερη αλλιοιογόνο χλωρίδα που συνθέτει την μικροβιακή οικολογία του προϊόντος. Η μικροβιακή σύνθεση του βόειου κιμά επηρεάστηκε έντονα από την συσκευασία, με συνέπεια να υπάρξει επίδραση στην παρουσία των μορίων-σημάτων επικοινωνίας κατά την συντήρησή του. Ανιχνεύθηκε η παρουσία μορίων AHLs σε δείγματα βόειου κιμά που συντηρήθηκε αερόβια και κάτω από τροποποιημένες ατμόσφαιρες όταν ο πληθυσμός των ψευδομονάδων και των εντεροβακτηρίων κυμάνθηκε μεταξύ 10^7 και 10^9 CFU/g. Αντίθετα, κατά τη συντήρησή του κάτω από τροποποιημένες ατμόσφαιρες και υπό την επίδραση των πτητικών συστατικών αιθέριου ελαίου ρίγανης, όπου υπήρξε παρεμπόδιση στην ανάπτυξη των εντεροβακτηρίων, δεν διαπιστώθηκε η παρουσία σημάτων επικοινωνίας. Παράλληλα, δεν παρατηρήθηκε δραστηριότητα μορίων τύπου-2 κατά τη συντήρησή του βόειου κιμά κάτω από οποιαδήποτε συνθήκη και μικροβιακή σύνθεση, πιθανότατα λόγω της παρουσίας σε αυτό ουσιών παρεμποδιστικής δράσης.

Λέξεις κλειδιά: σήματα επικοινωνίας, ακυλιωμένες λακτόνες της ομοσερίνης, αυτεπαγωγέας τύπου-2

Quorum sensing signal molecules (AHLs and AI-2): their presence in minced beef stored under various conditions (temperature and packaging)

Blana V. A. and Nychas G.-J. E.

Laboratory of Microbiology and Biotechnology of Foods, Dept. of Food Science, Technology and Human Nutrition, Agricultural University of Athens, Iera Odos 75, Athens 11855, Greece

Acylated homoserine lactones (AHLs) and autoinducer-2 (AI-2) signal molecules were found to be present in meat stored under different conditions (i.e., temperature and packaging), and correlated with the ephemeral spoilage organisms that comprise the microbial community generally associated with this product. The microbial association was strongly affected by the packaging condition, which consequently had an effect on quorum sensing signals detected throughout storage. The presence of AHL signal molecules was detected in minced beef samples stored aerobically and under modified atmospheres, when pseudomonads and *Enterobacteriaceae* populations ranged between 10^7 and 10^9 CFU/g, whereas in minced beef stored under modified atmospheres with the presence of volatile compounds of oregano essential oil where *Enterobacteriaceae* population was inhibited, no signals were detected. Additionally, no significant AI-2-activity was observed in the tested cell-free meat extracts (CFME) regardless of the indigenous bacterial populations. Chemical concentration of cellfree meat extracts determined by TLC separation indicated presence of *N*-(β -ketocaproyl)-homoserine lactone.

Keywords: signal molecules, acylated homoserine lactones, autoinducer-2

Μικροβιακοί βιοαισθητήρες προσδιορισμού μονοσακχαριτών σε αραβινοξυλάνες

Lukasiak J.^{1,2}, C.A. Georgiou³, K. Olsen² and D.G. Georgakopoulos¹

¹Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας,

²Department of Food Science, University of Copenhagen, Denmark,

³Γενικό Τμήμα, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Οι μικροβιακοί βιοαισθητήρες είναι αναλυτικές συσκευές αποτελούμενες από ένα στοιχείο βιολογικής αναγνώρισης (μικροοργανισμός) το οποίο περιέχει ένα στοιχείο παραγωγής και μετάδοσης σήματος (π.χ. βιοφωταύγεια), μετατρέποντας έτσι ένα βιοχημικό σήμα σε ένα εύκολα μετρήσιμο είδος απόκρισης. Εξαιτίας των μοριακών τους ιδιοτήτων μπορούν να σχεδιαστούν έτσι ώστε να χρησιμοποιηθούν σε διαφορετικές επιστημονικές εφαρμογές, όπως η βιομηχανία τροφίμων ή οι επιστήμες του περιβάλλοντος. Στη βιομηχανία τροφίμων, οι βιοαισθητήρες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανάλυση αραβινοξυλανών. Οι αραβινοξυλάνες αποτελούν συστατικό των φυτικών ινών σε είδη διατροφής και έχουν ενδιαφέρον ως συστατικό των «λειτουργικών» τροφίμων. Στόχος της παρούσης εργασίας είναι η ανάπτυξη βακτηριακών στελεχών ως εργαλείων εκτίμησης και μέτρησης της ποσότητας των μονοσακχάρων L-αραβινόζη και D-ξυλόζη σε αραβινοξυλάνες.

Αναπτύξαμε δύο ζεύγη βακτηριακών στελεχών, οι οποίοι αποκρίνονται στην L-αραβινόζη και D-ξυλόζη με δύο διαφορετικά σήματα ανταπόκρισης: βιοφωταύγεια δια της ομάδας γονιδίων lux του *Photobacterium luminescens* και παγοπυρήνωση δια του γονιδίου *inaZ* του *Pseudomonas syringae*. Χρησιμοποιήθηκαν επαγόμενοι υποκινητές από το *Escherichia coli* (*pxylA* για την D-ξυλόζη και *paraBAD* για την L-αραβινόζη) οι οποίοι κλωνοποιήθηκαν μπροστά από τα προαναφερθέντα γονίδια σημάτων ανταπόκρισης. Το βακτηριακό στέλεχος απόκρισης στην L-αραβινόζη με βιοφωταύγεια εμφανίζει απόλυτη εξειδίκευση στον μονοσακχαρίτη μετά από συγκεκριμένο χρόνο επαγωγής. Κατασκευάστηκε καμπύλη αναφοράς βάσει διαφόρων συγκεντρώσεων L-αραβινόζης και το στέλεχος δοκιμάστηκε στην ανάλυση δειγμάτων αραβινοξυλάνης με γνωστές συγκεντρώσεις L-αραβινόζης και D-ξυλόζης με επιτυχία. Η ίδια σειρά δοκιμών επαλήθευσε και την αξιοπιστία του βακτηριακού στελέχους παγοπυρήνωσης. Οι δοκιμές των βακτηριακών στελεχών απόκρισης στη D-ξυλόζη είναι σε εξέλιξη.

Ευχαριστίες: Η έρευνα που παρήγαγε τα παραπάνω αποτελέσματα χρηματοδοτήθηκε από το 7ο Πρόγραμμα της Ευρωπαϊκής Ένωσης [FP7/2007-2013] με τη σύμβαση χρηματοδότησης No 238084 του δικτύου EU-ITN LEANGREENFOOD.

Microbial biosensors for monosaccharide content analysis in arabinoxylans

Lukasiak J.^{1,2}, C.A. Georgiou³, K. Olsen² and D.G. Georgakopoulos¹

¹Faculty of Agricultural Biotechnology,

²Department of Food Science, University of Copenhagen, Denmark,

³Faculty of Science, Agricultural University of Athens, Greece

Microbial biosensors are analytical devices composed of a biological recognition element (microorganism) integrated to a signal transduction element (i.e. bioluminescence, fluorescence, etc), converting a biochemical signal into quantifiable response. Due to their molecular properties they can be diversely designed in order to be of use in various fields, from the food industry to environmental sciences. Microbial biosensors can be used in food processing applications for the analysis of arabinoxylans, which are components of dietary fibers and have potential as functional food ingredients. The aim of this study is to develop bacterial reporter strains capable to evaluate the content of L-arabinose and D-xylose monosaccharides in arabinoxylans.

We developed two pairs of bacterial sensor strains: they respond to L-arabinose and D-xylose using different signal transduction elements such as the *lux* cassette from *Photobacterium luminescens* for bioluminescence and the *inaZ* gene of *Pseudomonas syringae* for ice nucleation activity. This has been achieved by fusing inducible promoters of *Escherichia coli* (*pxylA* for D-xylose and *paraBAD* for L-arabinose) to the above signal transducers. The bioluminescent L-arabinose biosensor is specific and responds quantitatively to the inducer at the selected time of induction. A calibration curve using different concentrations of L-arabinose has been prepared, and the performance of the biosensor in the analysis of arabinoxylans samples with known L-arabinose and D-xylose content was assessed. The accompanying ice nucleation L-arabinose biosensor is also specific and responds quantitatively to the inducer.

The primary results of this study confirm the successful development of reporter strain targeting analysis of L-arabinose in arabinoxylans. The optimization and characterization of D-xylose biosensors is in progress.

Acknowledgments: The research leading to these results has received funding from the European Community's Seventh Framework Programme [FP7/2007-2013] under grant agreement n° 238084 as a part of the EU-ITN LEANGREENFOOD network project.

Μελέτη του οπερονίου αποδόμησης του φθαλικού οξέος στο στέλεχος *Arthrobacter phenanthrenivorans* Sphe3

Κουρτίδου Ε.1, Βανδέρα Ε.1, Αφένδρα Α.Σ.2, Δραΐνας Κ.1†, Κούκκου Α.Ε.1

1Εργαστήριο Βιοχημείας, Τμήμα Χημείας,

2Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα

Η ανάλυση του γονιδιώματος του *Arthrobacter phenanthrenivorans* Sphe3, το οποίο χρησιμοποιεί φαινανθρένιο καθώς και φθαλικό οξύ ως μοναδική πηγή άνθρακα και ενέργειας, έδειξε ότι αποτελείται από ένα 4.250kb κυκλικό χρωμόσωμα και δύο κυκλικά πλασμίδια, pASPH301 και pASPH302 μεγέθους 190kb και 94kb, αντίστοιχα (Stand Genomic Sci. 4:123-130). Ένα σύμπλεγμα οκτώ γονιδίων, που πιθανόν εμπλέκονται στην αποδόμηση του φθαλικού οξέος εμφανίζεται και στα δύο πλασμίδια με μεταξύ τους ομολογία 87%. Τα υποθετικά αυτά γονίδια κωδικεύουν τα απαραίτητα ένζυμα για την μετατροπή του φθαλικού οξέος σε πρωτοκατεχοϊκό οξύ: αφυδρογονάση του 3,4-διυδροξυ-3,4-διυδροφθαλικού οξέος, μεγάλη και μικρή υπομονάδα καθώς και υπομονάδα της φερρεδοξίνης και της φερρεδοξίνης ρεδοκτάσης της 3,4-διοξυγονάσης του φθαλικού, πρωτεΐνη άγνωστης λειτουργίας, αποκαρβοξυλάση του 3,4-διυδροξυφθαλικού οξέος και ένα μεταγραφικό ρυθμιστικό παράγοντα της οικογένειας IclR. Αν και από τα πειράματα ανίχνευσης mRNA μέσω RT-PCR βρέθηκε ότι όλα τα ανωτέρω γονίδια συμμεταγράφονται, από την *in silico* ανάλυση ανιχνεύθηκαν δυο περιοχές πιθανού υποκινητή, μία ανοδικά του συμπλέγματος των γονιδίων και μία ανοδικά του γονιδίου της μεγάλης υπομονάδας της 3,4-διοξυγονάσης του φθαλικού. Η περιοχή ανοδικά του συμπλέγματος των γονιδίων κλωνοποιήθηκε στον κατάλληλο για το γένος *Arthrobacter* φορέα pART2-*gfp*, οπότε προέκυψε το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pART2-P_{phth}-*gfp* το οποίο εισήχθη στα κύτταρα Sphe3 με τη μέθοδο της ηλεκτροδιάτρησης. Η δραστηριότητα του υποκινητή εξετάστηκε μέσω προσδιορισμού και σύγκρισης του φθορισμού κυττάρων από καλλιέργειες Sphe3/pART2-P_{phth}-*gfp* σε ελάχιστο θρεπτικό μέσο M9 παρουσία γλυκόζης και φθαλικού οξέος ως μοναδική πηγή άνθρακα και ενέργειας, χωρίς ωστόσο τα αποτελέσματα να επιβεβαιώνουν ότι η συγκεκριμένη περιοχή εμφανίζει δραστηριότητα υποκινητή.

Λέξεις Κλειδιά: *Arthrobacter phenanthrenivorans* Sphe3, οπερόνιο φθαλικού οξέος, προαγωγός

Analysis of *Arthrobacter phenanthrenivorans* Sphe3 phthalate degradation operon

Kourtidou E.¹, Vandera E.¹, Afendra A.S.², Drainas K.^{1†}, Koukkou A.I.¹

¹Laboratory of Biochemistry, Department of Chemistry,

²Department of Biological Applications and Technology, University of Ioannina, 45110 Ioannina, Greece

Total genome sequence of the *Arthrobacter phenanthrenivorans* Sphe3, which is able to utilize phenanthrene and phthalate as a sole carbon and energy source, revealed one 4.250kb circular chromosome and two circular plasmids, pASPHE301 and pASPHE302 of 190kb and 94kb, respectively (Stand Genomic Sci. 4:123-130). Each plasmid bears a cluster of eight putative phthalate degrading genes which share an 87% identity and encode the following necessary enzymes for the conversion of phthalate to protocatechuate: 3,4-dihydro-3,4-dihydroxyphthalate dehydrogenase, large and small subunit of phthalate 3,4-dioxygenase, protein of unknown function, ferredoxin and ferredoxin reductase subunit of phthalate 3,4-dioxygenase, 3,4-dihydroxyphthalate decarboxylase and a transcriptional regulator of the IclR family. RT-PCR experiments exhibit that all the above genes are co-transcribed as a single mRNA molecule. However, *in silico* analysis shows two regions that could possibly correspond to a promoter, one located upstream of the phthalate genes cluster and the other upstream of the large subunit of phthalate 3,4-dioxygenase gene. The first mentioned region was cloned into pART2-*gfp*, a vector especially constructed, for *Arthrobacter* species, resulting the pART2-Pphth-*gfp* clone, which subsequently was transferred into Sphe3 cells by electroporation. Promoter activity was determined by fluorescence measurement in Sphe3/pART2-Pphth-*gfp* cells grown on M9 medium in the presence of phthalate or glucose as a sole carbon and energy source. However, results do not confirm that this region exhibits promoter activity for phthalate degrading genes.

Keywords: *Arthrobacter phenanthrenivorans* Sphe3, phthalate operon, promoter

Συγκριτική πρωτεομική ανάλυση στο *Arthrobacter phenanthrenivorans* κατά την ανάπτυξή του σε διαφορετικά υποστρώματα άνθρακα

Βανδέρα, Ε.¹, Σαμιωτάκη, Μ.², Παραπούλη, Μ.¹, Παναγιώτου, Γ.² και Κούκκου, Α.Ι.¹

¹Τομέας Οργανικής Χημείας και Βιοχημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων ²Ερευνητικό Ινστιτούτο Βιοϊατρικών Επιστημών “Αλέξανδρος Φλέμινγκ”, Βάρη, Αθήνα

Η *in silico* ανάλυση του γονιδιώματός του *Arthrobacter phenanthrenivorans* Sphe3, ενός βακτηρίου με την ιδιότητα να καταβολίζει φαινανθρένιο, έχει καταδείξει την ύπαρξη γονιδίων που εμπλέκονται σε πορείες καταβολισμού του φαινανθρενίου. Προκειμένου να αποσαφηνίσουμε την πορεία καταβολισμού αλλά και να εξετάσουμε τις φυσιολογικές διεργασίες προσαρμογής των κυττάρων κατά την ανάπτυξή τους σε διαφορετικά υποστρώματα άνθρακα, συγκρίναμε το πρωτόωμα του Sphe3 κατά την ανάπτυξή του σε φαινανθρένιο, φθαλικό και γλυκόζη. Η εκτενής ταυτοποίηση και η ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε με την στρατηγική της “shotgun” πρωτεομικής. Η ανάλυση συνδύασε την υγρή χρωματογραφία υψηλών πιέσεων (ultra-HPLC) με την φασματομετρία μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας.

Η πρωτεομική ανάλυση επιβεβαιώνει ότι το Sphe3 καταβολίζει φαινανθρένιο μέσω της πορείας του ο-φθαλικού και πρωτοκατεχοϊκού, το οποίο στη συνέχεια διασπάται μέσω *ortho*- ή *meta*- σχάσης. Συνολικά, 777 πρωτεΐνες βρέθηκαν να διαφοροποιούνται ποσοτικά κατά την ανάπτυξη στα διαφορετικά υποστρώματα άνθρακα. Μεταξύ αυτών, όλα τα ένζυμα που εμπλέκονται στον καταβολισμό του φαινανθρενίου, καθώς και κάποιες ρυθμιστικές πρωτεΐνες που φαίνεται να ελέγχουν την έκφραση καταβολικών γονιδίων βρέθηκαν να παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση όταν τα κύτταρα αναπτύσσονται παρουσία των αρωματικών ενώσεων.

Τροποποιήσεις σε πορείες του βασικού μεταβολισμού, συγκρίνοντας την ανάπτυξη σε αρωματικά υποστρώματα σε σχέση με τη γλυκόζη, εντοπίζονται στην αυξημένη έκφραση του γονιδίου της ισοκιτρικής λύασης και ελάττωση στην έκφραση της ισοκιτρικής αφυδρογονάσης, κάτι που καταδεικνύει την χρήση της πορείας του γλυοξυλικού προκειμένου να αποφευχθούν τα βήματα της αποκαρβοξυλίωσης στο κύκλο του τρικαρβοξυλικού οξέος. Η αυξημένη έκφραση ΑΤΡασών κατά την ανάπτυξη στα υποστρώματα του φαινανθρενίου και του φθαλικού καταδεικνύει την προσπάθεια του κυττάρου να αντισταθμίσει τα χαμηλά επίπεδα ΑΤΡ. Όλα τα ανωτέρω αποδεικνύουν ότι κύτταρα που αναπτύσσονται σε αρωματικά υποστρώματα εμφανίζουν απόκριση πείνας άνθρακα.

Τέλος, οι πρωτεΐνες με αυξημένη έκφραση που σχετίζονται με διεργασίες μεταφοράς στο κύτταρο διαφέρουν μεταξύ των χρησιμοποιούμενων υποστρωμάτων κάτι που δείχνει ότι διαφορετικοί μηχανισμοί μεταφοράς χρησιμοποιούνται σε κάθε περίπτωση.

Λέξεις κλειδιά: *Arthrobacter phenanthrenivorans*, φαινανθρένιο, “shotgun” πρωτεομική ανάλυση

Ευχαριστίες: Η παρούσα έρευνα έχει συγχρηματοδοτηθεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο - ΕΚΤ) και από εθνικούς πόρους μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» του Εθνικού Στρατηγικού Πλαισίου Αναφοράς (ΕΣΠΑ) – Ερευνητικό Χρηματοδοτούμενο Έργο: Ηράκλειτος II. Επένδυση στην κοινωνία της γνώσης μέσω του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου.

Comparative proteomic analysis of *Arthrobacter phenanthrenivorans* grown on different carbon substrates

Vandera, E.¹, Samiotaki, M.², Parapouli, M.¹, Panayotou, G.² and Koukkou, A.-I.¹

¹*Sector of Organic Chemistry and Biochemistry, University of Ioannina,*

²*Biomedical Sciences Research Center "Alexander Fleming", Vari, Athens*

Arthrobacter phenanthrenivorans Sphe3 is a previously described species with the ability to degrade phenanthrene. Its genome analysis revealed the existence of genes involved in phenanthrene degradation pathway. In order to elucidate this pathway, as well as to examine the physiological adaptation processes occurring in the cells while utilizing different growth substrates, we compared the Sphe3 proteome during growth on glucose, phenanthrene and phthalate. For this purpose an in depth and quantitative „shotgun“ proteomics analysis was performed, using an ultra high pressure liquid chromatography combined with high resolution mass spectrometry. Proteomic analysis confirms that Sphe3 degrades phenanthrene to central intermediates via *o*-phthalate and protocatechuate, which is further degraded via *ortho*- or *meta*- cleavage. In total, 777 proteins were found to significantly change their abundance during growth on different carbon substrates. Among them, all the enzymes involved in the phenanthrene degradation pathway, as well as some transcriptional regulators controlling the expression of catabolic genes, were found to be up-regulated in the aromatic compound substrates but not in the glucose substrate. Alterations in central metabolic pathways upon growth on aromatic compounds compared to glucose are reflected in the up-regulation of isocitrate lyase and down-regulation of isocitrate dehydrogenase, indicating increased activity of the glyoxylate bypass in order to avoid the decarboxylation steps of the TCA cycle. An increase in the presence of ATPases upon growth on phenanthrene and phthalate corresponds to the effort of compensating for low ATP concentration. All these suggest a carbon starvation response of cells grown on aromatic compounds. Finally, up-regulated transport-associated proteins differ between the used substrates indicating that different uptake mechanisms for transport are utilized in each case.

Keywords: *Arthrobacter phenanthrenivorans*, phenanthrene, “shotgun” proteomics

Acknowledgments: *This research has been co-financed by the European Union (European Social Fund – ESF) and Greek national funds through the Operational Program "Education and Lifelong Learning" of the National Strategic Reference Framework (NSRF) - Research Funding Program: Heracleitus II. Investing in knowledge society through the European Social Fund.*

Σχέση μεταξύ βλάστησης και μυκηλιακής αύξησης μεμονωμένων σπορίων μυκήτων

Γουγουλή Μ., Κουτσουμανής Κ.Π.

Εργαστήριο Μικροβιολογίας Τροφίμων και Υγιεινής, Τομέας Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, Γεωπονική Σχολή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Θεσσαλονίκη 54124, Ελλάδα.

Η σχέση μεταξύ του χρόνου βλάστησης και του χρόνου φάσης προσαρμογής της μυκηλιακής ανάπτυξης μεμονωμένων σπορίων μυκήτων μελετήθηκε με συνδυασμό μικροσκοπικών και μακροσκοπικών τεχνικών. Η αύξηση ενός μεγάλου αριθμού μυκηλιακών αποικιών (100-200) του *Penicillium expansum* και *Asperigillus niger* που προέρχονται από μεμονωμένα σπόρια μελετήθηκε μακροσκοπικά κάτω από ισόθερμες συνθήκες οι οποίες κυμάνθηκαν από 0 έως 30°C και από 10 έως 41,5°C, αντίστοιχα. Στη συνέχεια, τα δεδομένα ακτινωτής αύξησης κάθε μυκηλιακής αποικίας προσαρμόστηκαν σε ένα γραμμικό μοντέλο για τον προσδιορισμό του χρόνου φάσης προσαρμογής. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως ο χρόνος φάσης προσαρμογής διέφερε σημαντικά μεταξύ των μεμονωμένων σπορίων. Οι αθροιστικές κατανομές συχνοτήτων των χρόνων φάσης προσαρμογής προσαρμόστηκαν στο τροποποιημένο μοντέλο Gompertz και συγκρίθηκαν με τις αντίστοιχες κατανομές των χρόνων βλάστησης, οι οποίοι προσδιορίστηκαν μικροσκοπικά. Παρατηρήθηκε πως οι κατανομές των χρόνων φάσης προσαρμογής παρουσίασαν μία σημαντική χρονική υστέρηση σε σχέση με τις κατανομές του χρόνου βλάστησης. Παράλληλα, μια αριθμητική σύγκριση πραγματοποιήθηκε μεταξύ των παραμέτρων των κατανομών λ_m και λ_g , οι οποίες αντικατοπτρίζουν το χρόνο που απαιτείται από τα σπόρια να ξεκινήσουν τη διαδικασία βλάστησης και να συμπληρώσουν το χρόνο φάσης προσαρμογής για ανάπτυξη, αντίστοιχα. Η σχετική διαφορά $\%(\lambda_m - \lambda_g)/\lambda_m$, με μέσες τιμές 72,5±5,1 και 60,7±2,1 για τους *P. expansum* και *A. niger*, αντίστοιχα, βρέθηκε να μην επηρεάζεται σημαντικά από τις εξεταζόμενες θερμοκρασίες. Προκειμένου να διερευνηθεί η πηγή της παραπάνω διαφοράς αναπτύχθηκε μια μικροσκοπική μέθοδος συνεχούς παρατήρησης παρέχοντας βίντεο με την συμπεριφορά των μεμονωμένων σπορίων μυκήτων από τη βλάστηση μέχρι το σχηματισμό μυκήλιων. Οι αποστάσεις των κορυφών των πρώτων υφών βλάστησης από το διογκωμένο σπόριο μετριούνταν σε κάθε εικόνα των βίντεο και αυτά τα δεδομένα εκφράστηκαν ως συνάρτηση του χρόνου. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι στα πρώτα στάδια της ανάπτυξης των μυκηλιακών υφών, οι διαστάσεις των μετρούμενων ακτίνων αυξάνουν εκθετικά, μέχρι ένα ορισμένο χρονικό διάστημα, κατά το οποίο η ανάπτυξη γίνεται γραμμική. Οι δύο φάσεις της ανάπτυξης των υφών μπορούν να εξηγήσουν τη διαφορά μεταξύ του χρόνου εκβλάστησης και του χρόνου φάσης προσαρμογής. Δεδομένου ότι ο χρόνος φάσης προσαρμογής εκτιμάται από την προέκταση της γραμμής παλινδρόμησης μόνο του γραμμικού μέρους του γραφήματος (μετρούμενες ακτίνες ως προς το χρόνο), η τιμή του είναι σημαντικά υψηλότερη από το χρόνο βλάστησης, t_G . Η σχέση του χρόνου βλάστησης και του χρόνου φάσης προσαρμογής μελετήθηκαν περαιτέρω συγκρίνοντας τη θερμοκρασιακή τους εξάρτηση με τη χρήση ενός δευτερογενούς μοντέλου. Οι προσδιοριζόμενες τιμές του δευτερογενούς μοντέλου (T_{min} , T_{opt} , T_{max}) για το $1/\lambda_g$ βρέθηκαν να είναι πολύ κοντά στις αντίστοιχες τιμές για $1/\lambda_m$, υποδεικνύοντας μια παρόμοια θερμοκρασιακή εξάρτηση.

Λέξεις κλειδιά: Μύκητες, βλάστηση, αύξηση

Relation between germination and mycelium growth of individual fungal spores

Gougouli M., Koutsoumanis K.P.

Laboratory of Food Microbiology and Hygiene, Department of Food Science and Technology, School of Agriculture, Aristotle University of Thessaloniki, Thessaloniki 54124, Greece.

The relation between germination time and lag time of mycelium growth of individual fungal spores was studied by combining microscopic and macroscopic techniques. The radial growth of a large number (100-200) of *Penicillium expansum* and *Asperigillus niger* mycelia originating from single spores was monitored macroscopically at isothermal conditions ranging from 0 to 30°C and 10 to 41.5°C, respectively. The radial growth curve for each mycelium was fitted to a linear model for the estimation of mycelium lag time. The results showed that the lag time varied significantly among single spores. The cumulative frequency distributions of the lag times were fitted to the modified Gompertz model and compared with the respective distributions for the germination time, which were obtained microscopically. The distributions of the measured mycelium lag time were found to be similar to the germination time distributions under the same conditions but shifted in time with the lag times showing a significant delay compared to germination times. A numerical comparison was also performed based on the distribution parameters λ_m and λ_g , which indicate the time required from the spores to start the germination process and the completion of the lag phase, respectively. The relative difference $\%(\lambda_m - \lambda_g)/\lambda_m$ was not found to be significantly affected by temperatures tested with mean value of 72.5 ± 5.1 and 60.7 ± 2.1 for *P. expansum* for *A. niger*, respectively. In order to investigate the source of the above difference, a time-lapse microscopy method was developed providing videos with the behavior of single fungal spore from germination until mycelium formation. The distances of the apexes of the first germ tubes emerged from the swollen spore were measured in each frame of the videos and these data were expressed as a function of time. The results showed that in the early hyphal development, the measured radii appear to increase exponentially, until a certain time, where growth becomes linear. The two phases of hyphal development can explain the difference between germination and lag time. Since the lag time is estimated from the extrapolation of the regression line of the linear part of the graph only, its value is significantly higher than the germination time, t_G . The relation of germination and lag time was further investigated by comparing their temperature dependence using the Cardinal Model with Inflection. The estimated values of the cardinal parameters (T_{min} , T_{opt} , T_{max}) for $1/\lambda_g$ were found to be very close to the respective values for $1/\lambda_m$, indicating a similar temperature dependence between them.

Αντιοξειδωτική δράση, ολικά φαινολικά συστατικά και τοξικότητα επιλεγμένων φαρμακευτικών και αρωματικών φυτών

Σκόττη Ε., Αναστασάκη Ε., Ταραντίλης Π.Α.*, Πολυσίου Μ.

Εργαστήριο Χημείας, Γενικό Τμήμα, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιερά Οδός 75, 11855 Αθήνα

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν η αντιοξειδωτική δράση, τα ολικά φαινολικά συστατικά, και η τοξικότητα επιλεγμένων αρωματικών φυτών τα οποία είτε καταναλώνονται ως αφενήματα είτε χρησιμοποιούνται ως πρόσθετα σε τρόφιμα. Από τα αρωματικά φυτά που μελετήθηκαν, το μελισσόχορτο (*Melissa officinalis*) έδωσε τις υψηλότερες τιμές ολικών φαινολικών συστατικών και αντιοξειδωτικής δράσης, ανεξάρτητα από τη διαδικασία εκχύλισης. Για όλα τα εκχυλίσματα προσδιορίστηκε η μέγιστη ξηρή μάζα που μπορεί να καταναλωθεί με ασφάλεια στη διατροφή, ως αυτή που δίνει τιμή παρεμπόδισης της φωταύγειας του *Vibrio fischeri* μικρότερη από 20%. Η θερμοκρασία και η διαδικασία εκχύλισης βρέθηκε να επηρεάζει όλες τις παραμέτρους που εξετάστηκαν. Η συνέργεια των υδατοδιαλυτών συστατικών με συστατικά του αιθερίου ελαίου των φυτών που μελετήθηκαν ήταν σημαντική μόνο στην εκτίμηση της τοξικότητας όπου ο μέγιστος δείκτης συνέργειας (SR = 4.2) παρατηρήθηκε στα εκχυλίσματα της ρίγανης (*Origanum vulgare*). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας η τοξικότητα των αρωματικών φυτών που μελετήθηκαν δε βρέθηκε να συσχετίζεται με τα ολικά φαινολικά συστατικά και την αντιοξειδωτική δράση, αλλά να επηρεάζεται από τη διαδικασία εκχύλισης και τη συνέργεια ή τον ανταγωνισμό μεταξύ υδατοδιαλυτών συστατικών και συστατικών του αιθερίου ελαίου στο εκχύλισμα. Η τοξικότητα των φυτικών εκχυλισμάτων χρειάζεται περεταίρω διερεύνηση προκειμένου η χρήση τους ως πηγή αντιοξειδωτικών ουσιών να γίνεται σε ασφαλή όρια για την ανθρώπινη υγεία. Πρόσθετα, ο προσδιορισμός της συνέργειας μεταξύ υδατοδιαλυτών συστατικών και συστατικών του αιθερίου ελαίου στα εκχυλίσματα μπορεί να οδηγήσει στην παραλαβή λιγότερο τοξικών φυτικών εκχυλισμάτων μέσω διαφοροποιήσεων στη διαδικασία εκχύλισης.

Λέξεις κλειδιά: Ολικά φαινολικά συστατικά, Αντιοξειδωτική δράση, Τοξικότητα, *Vibrio fischeri*,

Total phenolic compounds, antioxidant activity and toxicity of selected medicinal and aromatic Plants

Skotti E., Anastasaki E., Tarantilis P.A. *, Polissiou M.

Laboratory of Chemistry, Department of Science, Agricultural University of Athens, Iera Odos 75, 11855 Athens, Greece

In this study were investigated the total phenolic content, the antioxidant activity and the toxicity of selected medicinal aromatic plants that are being consumed as decoctions or used as food additives. Between the plants studied, the lemon balm (*Melissa officinalis*) showed the greater values in total phenolic content and antioxidant activity independently of the extraction procedure. For all extracts analyzed was determined the maximum mass per volume that can be safely used in human diet, as giving inhibition values in *Vibrio fischeri* less than 20%. Temperature and extraction procedure found to influence all the parameters examined. The interaction of soluble substances and the essential oil of the plants studied was remarkable only in the case of toxicity, where *Origanum vulgare* showed the maximum synergism (SR = 4.2). Our findings indicate that toxicity of medicinal plants extracts examined, is not correlated to their total phenolic content and antioxidant activity, but found to be linked with temperature, extraction procedure and the synergism or antagonism of essential oil the soluble substances in the extracts. Toxicity of herbal extracts deserves to be further investigated in order their use in diet as antioxidant sources, to be placed in safe limits for human health. Furthermore, determination of synergism between essential oil and soluble substances can lead to differentiation of extraction procedures towards the productions of less toxic herbal extracts.

Keywords: Total phenolic content, Antioxidant activity, Toxicity, *Vibrio fischeri*

Ο μεγάλος κηρόσκορος *Galleria mellonella* ως ξενιστής μοντέλο για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης μεταξύ επιλεγμένων γαλακτικών βακτηρίων και παθογόνων

Γρούντα Α.^{1,2}, Πανάγου Ε.Ζ.¹, Μυλωνάκης Ε₂, και Νυχάς Γ-Ι¹

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

²Rhode Island Hospital and The Miriam Hospital, Alpert Medical School and Brown University.

Κατά τις τελευταίες δεκαετίες είναι γνωστή η χρήση μη σπονδυλωτών οργανισμών ως εναλλακτική των θηλαστικών μοντέλων ξενιστών για τη μελέτη των μηχανισμών απόκρισης του ανοσοποιητικού συστήματος ενός ξενιστή έναντι παθογόνων μικροοργανισμών. Στην παρούσα μελέτη, έγινε μια προσπάθεια για την ανάπτυξη ενός συστήματος μοντέλου για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης μεταξύ επιλεγμένων γαλακτικών βακτηρίων και παθογόνων μικροοργανισμών, χρησιμοποιώντας προνύμφες του μεγάλου κηρόσκορου *Galleria mellonella*. Αρχικά, παρακολούθηθηκε η αντίδραση του ξενιστή κατά τη χορήγηση επιλεγμένων στελεχών γαλακτικών βακτηρίων (απομονωμένα από ζυμώσεις επιτραπέζιας ελιάς) με *in vitro* προβιοτικές ιδιότητες. Για να διαπιστωθεί πως τα στελέχη αυτά δεν είναι παθογόνα για το συγκεκριμένο ξενιστή, εξετάστηκαν συνολικά 9 στελέχη *Lactobacillus* sp. Το κάθε στέλεχος χορηγήθηκε σε 16 ξενιστές σε πληθυσμό 105 κύτταρα/προνύμφη. Ακολούθησε επώαση στους 37°C σε σκοτάδι και καθημερινά καταμετρούνταν ο αριθμός των νεκρών ξενιστών. Δεν φάνηκε κάποιο στέλεχος να παρουσιάζει παθογόνο δράση καθώς μέχρι το τέλος του πειράματος οι προνύμφες παρέμεναν ζωντανές. Στη συνέχεια, μελετήθηκε η επιβίωση των ξενιστών, στους οποίους είχε γίνει χορήγηση των ανωτέρω στελεχών, έναντι της παθογόνου δράσης της ζύμης *Cryptococcus neoformans* (wild-type) και του βακτηρίου *Enterococcus faecalis* (V583). Το κάθε παθογόνο χορηγήθηκε σε πληθυσμό που αποτελεί θανάσιμη δόση για τον ξενιστή σε διάστημα 4 ή 24h μετά τη χορήγηση των γαλακτικών βακτηρίων. Όλες οι πειραματικές διαδικασίες επανελήφθησαν δύο φορές σε ανεξάρτητες χρονικές στιγμές ενώ επίσης ελήφθησαν συνθήκες ελέγχου που περιελάμβαναν εμβολιασμούς μόνο με PBS ή παθογόνο ή PBS και παθογόνο. Ως προς το ποσοστό των ξενιστών που τελικά επιβιώνουν έναντι των παθογόνων λόγω χορήγησης γαλακτικών βακτηρίων, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές. Παρατηρήθηκε όμως διαφορετικός ρυθμός θανάτου που φαίνεται να συνδέεται στενά με το στέλεχος του γαλακτικού βακτηρίου που χορηγήθηκε, με το χρόνο χορήγησης πριν τη μόλυνση με το παθογόνο αλλά και το είδος του παθογόνου. Βάσει των προκαταρκτικών αυτών αποτελεσμάτων περαιτέρω έρευνα πρόκειται να γίνει για να διερευνηθούν οι μηχανισμοί άμυνας που πυροδοτούνται από τον ξενιστή κατά τη χορήγηση μικροοργανισμών με προβιοτικό χαρακτήρα.

Λέξεις κλειδιά: μοντέλα ξενιστές, *Galleria mellonella*, προβιοτικά

***Galleria mellonella* as a model system to study interaction between selected lactic acid bacteria strains and pathogens**

Grounta A^{1,2}., Nychas G-J.¹, Panagou E.Z.¹ and Mylonakis E.²

¹*Laboratory of Microbiology and Biotechnology of Foods, Department of Food Science and Technology, Agricultural University of Athens, Iera Odos 75, Athens 11855, Greece*

²*Rhode Island Hospital and The Miriam Hospital, Alpert Medical School and Brown University.*

Invertebrates have been used over the past decade as an alternative to mammal model hosts to better understand microbial pathogenesis and immune responses of the host. The greater wax moth *Galleria mellonella* is an emerging model host and has been used to assess virulence of various pathogens. In the present study, larvae of the greater wax moth *Galleria mellonella* were used in an attempt to develop a model system to study interaction between selected lactic acid bacteria strains with probiotic in vitro properties and pathogens. In total, nine strains of genus *Lactobacillus*, all previously isolated from table olive fermentations, were screened for non-pathogenic behavior on the host. Sixteen last instar larvae were injected with 10⁵ cells/larva directly into the hemocoel via the last left proleg. After injection, the larvae were incubated at 37°C in the dark and the number of dead individuals was scored daily. In the latter, since all strains exhibited non-pathogenic behavior on the host, larvae were infected with a pathogen 4 or 24h post lab administration. The pathogens tested were the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans* (wild type strain) and the opportunistic pathogenic lactic acid bacterium *Enterococcus faecalis* (V583 strain). The infection was performed by injecting the larvae via the last right proleg at a lethal dose. All experiments were performed twice at independent time intervals with appropriate control cases which included mock inoculations with PBS and pathogenic strains. As far as the prolongation of survival of the hosts is concerned, no statistically significant differences were observed. A different death rate however was observed, which seems to be strongly associated with the type of lab strain administered, the time of lab administration prior to infection and the type of the target pathogen. Further research will be conducted with special focus on the immune responses that lab administration triggers on *Galleria mellonella* host.

Διερεύνηση του ρόλου του συζευγμένου με την G πρωτεΐνη φερομονικού υποδοχέα VdSteA στην παθογένεια και βιολογία του φυτοπαθογόνου μύκητα *Verticillium dahliae*

Στριγγλής Ι.Α.^{1,2}, Καλαϊτζόγλου Ι.1, Παπλωματάς Ε.Ι.¹ και Τσιτσιγιάννης Δ.Ι.¹

¹Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής, Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας, Αθήνα

²Current Address: Utrecht University, Department of Biology, Plant Microbe Interactions, Utrecht, The Netherlands

Ο εδαφογενής φυτοπαθογόνος μύκητας *V. dahliae* προκαλεί αδρομυκώσεις σε μεγάλο εύρος ξενιστών και η ιδιαίτερη βιολογία του καθιστά δύσκολη την καταπολέμησή του με συμβατικές μεθόδους. Συνεπώς, καθίσταται αναγκαία η μελέτη γονιδίων που εμπλέκονται στις αλληλεπιδράσεις του μύκητα με τους ξενιστές του ώστε να διερευνηθούν οι μηχανισμοί παθογένεσης και μολυσματικότητάς του και να ανακαλυφθούν καινοτόμες μέθοδοι αντιμετώπισης της ασθένειας. Οι συζευγμένοι πρωτεϊνικοί υποδοχείς με τις G πρωτεΐνες (GPCRs) συνιστούν τη μεγαλύτερη οικογένεια διαμεμβρανικών υποδοχέων και παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της μορφογένεσης, στην άμυνα, στη σύζευξη, στη μόλυνση και στην παθογένεια πολλών οργανισμών. Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκαν πρωτεϊνικές αλληλουχίες μελετημένων GPCRs των μυκήτων *Aspergillus nidulans* και *Magnaporthe grisea* ώστε να ανιχνευτούν πιθανοί GPCRs στο μύκητα *V. dahliae*. Πραγματοποιήθηκε φυλογενετική ανάλυση στις αλληλουχίες του *V. dahliae* με τη μεγαλύτερη ομολογία με τους GPCRs του *A. nidulans* και του *M. grisea* και προέκυψαν επτά διαφορετικές ομάδες GPCRs που διέφεραν ως προς το είδος των ερεθισμάτων που αντιλαμβάνονται. Πραγματοποιήθηκε απενεργοποίηση μέσω *Agrobacterium* σε ένα φερομονικό GPCR (ονομάστηκε VdSteA) σε 2 άγριες φυλές του μύκητα (70V και 25V), ώστε να μελετηθεί περαιτέρω ο ρόλος του υποδοχέα στη μορφολογία και παθογένεια. Τα μεταλλαγμένα ΔVdSteA στελέχη των 70V και 25V παρουσίασαν μειωμένη παθογένεια σε φυτά μελιτζάνας, τομάτας και Αραβίδουνης και υψηλότερη βλαστικότητα κονιδίων σε σχέση με τα αντίστοιχα άγρια στελέχη. Τα ΔVdSteA στελέχη του 70V εμφάνισαν αυξημένο σχηματισμό μικροσκληρωτίων και παραγωγή κονιδίων σε σχέση με την αντίστοιχη άγρια φυλή.

Λέξεις κλειδιά: *Verticillium dahliae*, φερομονικός υποδοχέας, GPCR

The role of *VdSteA* G Protein coupled pheromone receptor in virulence and biology of the vascular wilt pathogen *Verticillium dahliae*

Stringlis I.A.^{1,2}, Kalaitzoglou I.¹, Paplomatas E.J.¹ and Tsitsigiannis D.I.¹

¹*Agricultural University of Athens, Department of Crop Science, Laboratory of Plant Pathology, Athens*

²*Current Address: Utrecht University, Department of Biology, Plant Microbe Interactions, Utrecht, The Netherlands*

V. dahliae is a soil-borne fungus causing wilt diseases in several hosts. The particular biology of this fungus complicates its treatment through conventional methods. Thus, the study of genes implicated in interactions of the fungus with its hosts is necessary to unravel the pathogenicity or virulence mechanisms and to discover putative novel methods to control the disease. G Protein-Coupled Receptors (GPCRs) represent the largest family of transmembrane receptors consisting of seven transmembrane domains. GPCRs are critical factors in regulating morphogenesis, defense, mating, infection and virulence in various organisms. Protein sequences of characterized GPCRs of the well-studied fungi *Aspergillus nidulans* and *Magnaporthe grisea* were used for alignment comparison with the genome of *V. dahliae* in order to detect potential GPCRs. After performing phylogenetic analysis, the sequences of *V. dahliae* that showed high homology to the GPCRs of *A. nidulans* and *M. grisea* were selected in order to sort out the receptors by their molecular relativity. Seven different groups of GPCRs emerged from the phylogenetic analysis, varying in sensing different environmental signals. *Agrobacterium* mediated disruption of a pheromone GPCR (named as *VdSteA*) in two wild type races, 70V and 25V of *V. dahliae* was performed in order to study the role of this receptor in virulence and morphology. 70V and 25V $\Delta VdSteA$ mutants displayed reduction in virulence in eggplants and tomato plants and 70V $\Delta VdSteA$ mutants exhibited increased microsclerotia formation and conidiation compared to their corresponding wild types. Both $\Delta VdSteA$ mutants exhibited higher conidial germination rates compared to the wild types.

Keywords: *Verticillium dahliae*, pheromone receptor, GPCR

Μοριακή και φυτοπαθολογική διερεύνηση του ρόλου του ρυθμιστικού γονιδίου του δευτερογενούς μεταβολισμού *AcLaeA* στο μυκοτοξικογόνο μύκητα *Aspergillus carbonarius*

Μ. Ηλιάδη και Δ.Ι. Τσιτσιγιάννης

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής, Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας, Αθήνα

Ο μύκητας *Aspergillus carbonarius*, θεωρείται ένας από τους κύριους μύκητες που είναι υπεύθυνος για την ασθένεια της όξινης σήψης και την παραγωγή της καρκινογόνου μυκοτοξίνης ωχρατοξίνης Α, στα σταφύλια. Πρόσφατα ανακαλύφθηκε ένα νέο γονίδιο το οποίο ονομάστηκε *laeA*, το οποίο αποτελεί κεντρικό ρυθμιστή του δευτερογενούς μεταβολισμού σε διάφορα είδη του γένους *Aspergillus* και *Fusarium*. Απενεργοποίηση του γονιδίου *laeA* οδηγεί σε διακοπή της βιοσύνθεσης των μυκοτοξινών. BLAST ανάλυση του γονιδιώματος του *A. carbonarius* με το γονίδιο *laeA* του *A. nidulans* οδήγησε στην παρουσία ενός ορθόλογου γονιδίου που ονομάστηκε *AcLaeA*. Σκοπός της συγκεκριμένης μελέτης είναι η διερεύνηση του ρόλου του ρυθμιστικού γονιδίου *AcLaeA* στη φυσιολογία, παθογένεια και παραγωγή της ωχρατοξίνης Α στα σταφύλια μέσω της διαγραφής του από το γονιδίωμα δύο αγρίων στελεχών του μύκητα *A. carbonarius*. Με τη μέθοδο της PCR και χρησιμοποιώντας εξειδικευμένους εκκινήτες, ενισχύθηκαν 2 περιοχές περίπου 1000 bp πριν από το κωδικόνιο έναρξης και λήξης αντίστοιχα του γονιδίου *AcLaeA* στο γονιδίωμα του μύκητα. Τα προϊόντα της PCR κλωνοποιήθηκαν στο φορέα pBluescript και στη συνέχεια μεταξύ των δύο περιοχών κλωνοποιήθηκε η κασέτα της γενετισίνης. Η κατασκευή απενεργοποίησης του *AcLaeA* μεταφέρθηκε στο δυαδικό φορέα pGKO2 και στη συνέχεια ενσωματώθηκε με τη χρήση του T1 πλασμιδίου του *Agrobacterium tumefaciens* σε δύο άγρια στελέχη του μύκητα *A. carbonarius*, μέσω διπλού γενετικού ανασυνδυασμού. Θα γίνει παρουσίαση της αξιολόγησης των μορφολογικών χαρακτηριστικών και των πειραμάτων παθογένειας σε ερυθρές και λευκές ποικιλίες σταφυλιού προκειμένου να αξιολογηθεί η μολυσματική ικανότητα των μετασχηματισμένων $\Delta AcLaeA$ στελεχών.

Λέξεις κλειδιά: *Aspergillus carbonarius*, δευτερογενής μεταβολισμός, *laeA*

Molecular and phytopathological investigation of the role of the regulatory gene of secondary metabolism *AcLaeA* in the mycotoxigenic fungus *Aspergillus carbonarius*

Iliadi M. and Tsitsigiannis D.I.

Agricultural University of Athens, Department of Crop Science, Laboratory of Plant Pathology, Athens

The fungus *Aspergillus carbonarius* is considered one of the main fungi responsible for the sour rot grape disease and producer of the carcinogenic mycotoxin ochratoxin A (OTA) in grapes. Recently a new gene called *laeA*, a global regulator of secondary metabolism, was discovered in several species of the genus *Aspergillus* and *Fusarium*. Deletion of the *laeA* gene leads to interruption of the mycotoxin biosynthesis. BLAST analysis of the genome of *A. carbonarius* with the *A. nidulans laeA* gene, resulted in the presence of an orthologous gene named as *AcLaeA*. The goal of this study was to delete the *AcLaeA* from the genome of two wild type strains of the mycotoxigenic fungus *A. carbonarius* and to investigate the role of this regulatory gene in physiology, pathogenesis and production of OTA in grapes. In order to delete the gene, two regions approximately 1000 bp before the start and after the stop codon of the *AcLaeA* gene respectively, were amplified from the genome of *A. carbonarius* using specific primers. The PCR products were cloned into pBluescript vector and then between the two regions, the geneticin cassette was further subcloned. The inactivation *AcLaeA* construct was transferred to the binary vector pGKO2 and then incorporated using the Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens* by double crossing over recombination in two different wild type strains of *A. carbonarius*. The evaluation of morphological characteristics and pathogenicity experiments in red and white grape varieties will be demonstrated in order to assess the virulence ability of the transformed Δ *AcLaeA* strains.

Keywords: *Aspergillus carbonarius*, secondary metabolism, *laeA*

Μελέτη του ρόλου του ρυθμιστικού γονιδίου του δευτερογενούς μεταβολισμού *VdLaeA* στην παθογένεια και βιολογία του φυτοπαθογόνου μύκητα *Verticillium dahliae*

Γιαννακοπούλου Α.Μ.^{1,2}, Γκατζούνη Α.Α.¹ και Τσιτσιγιάννης Δ.Ι.¹

¹Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής, Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας, Αθήνα

²Current Address: John Innes Centre - The Sainsbury Laboratory, Norwich, UK

Οι δευτερογενείς μεταβολίτες των μυκήτων είναι συστατικά με πολύπλευρο ρόλο που σχετίζονται με την παραγωγή τοξινών, τη σποροπαραγωγή, και τη σύνθεση ουσιών με ιδιαίτερο βιοτεχνολογικό και φαρμακευτικό ενδιαφέρον. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι ο φυτοπαθογόνος μύκητας *V. dahliae* παράγει φυτοτοξίνες και άλλα μόρια που επάγουν τον κυτταρικό θάνατο ή άλλες μορφές άμυνας του ξενιστή. Η ακριβής φύση όμως και ο ρόλος αυτών των συστατικών του *V. dahliae* παραμένει άγνωστος. Σε είδη μυκήτων *Aspergillus spp.* έχει βρεθεί ένας γενικός ρυθμιστής του δευτερογενούς μεταβολισμού, το γονίδιο *laeA*, το οποίο κωδικοποιεί μία πυρηνική πρωτεΐνη απαραίτητη για την έκφραση γονιδίων δευτερογενούς μεταβολισμού ενώ θεωρείται απαραίτητη η παρουσία του για την βιοσύνθεση μυκοτοξινών, αντιβιοτικών και μυκηλιακών χρωστικών. BLAST ανάλυση του γονιδιώματος του *V. dahliae* με το γονίδιο *laeA* του *A. nidulans* οδήγησε στην παρουσία ενός ορθόλογου γονιδίου που ονομάστηκε *VdLaeA*. Προκειμένου να αποσαφηνιστεί αν προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού παίζουν ρόλο στην παθογένεια και φυσιολογία του *V. dahliae*, πραγματοποιήθηκε η απενεργοποίηση του γονιδίου *VdLaeA* σε άγρια φυλή απομονωμένη από ραπανάκι. Σε δοκιμές παθογένειας βρέθηκε ότι τα μεταλλαγμένα στελέχη $\Delta VdlaeA$ προκαλούν τυπικά συμπτώματα της ασθένειας σε φυτά μελιτζάνας, τομάτας και *Arabidopsis thaliana*, ωστόσο στατιστικά μειωμένο ποσοστό ασθένειας συγκριτικά με το άγριο στέλεχος. Διαφοροποιήσεις παρατηρήθηκαν επίσης, ως προς ως προς το ρυθμό και τη μορφολογία της μυκηλιακής ανάπτυξης και το σχηματισμό μικροσκληρωτίων σε θρεπτικά υλικά. Η μελέτη του ρυθμιστικού γονιδίου *VdLaeA* μπορεί να συμβάλλει σημαντικά σε μια ευρύτερη κατανόηση των μοριακών μηχανισμών που επάγουν την παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών και ειδικότερα στην εξακρίβωση του ρόλου τους στην παθογένεια του *V. dahliae*.

Λέξεις κλειδιά: *Verticillium dahliae*, δευτερογενής μεταβολισμός, *VdLaeA*

Investigation of the role of the secondary metabolite gene *VdLaeA* in the virulence and biology of the phytopathogenic fungus *Verticillium dahliae*

Giannakopoulou A.M.^{1,2}, Gkatzouni A.A.¹ and Tsitsigiannis D.I.¹

¹*Agricultural University of Athens, Department of Crop Science, Laboratory of Phytopathology, Athens, Greece*

²*Current Address: John Innes Centre - The Sainsbury Laboratory, Norwich, UK*

Fungal secondary metabolites are compounds with high degree of specialization and possess various roles concerning toxin production, sporulation processes and biosynthesis of substances with special biotechnological and pharmaceutical interest. Previous studies have shown that the phytopathogenic fungus *V. dahliae* produces phytotoxins and other molecules that induce the process of programmed cell death or other forms of host resistance. The exact nature though, of these compounds in *V. dahliae* remains unknown. In *Aspergillus*, the global regulator of secondary metabolism *laeA* encodes a nuclear protein that is required for the expression of secondary metabolite genes while its presence is considered indispensable for mycotoxin, antibiotic and mycelial pigment biosynthesis. BLAST analysis of *V. dahlia* genome with the *laeA* gene of *A. nidulans* led to the discovery of a homologous gene that was named *VdlaeA*. *VdlaeA* was deleted in *V. dahliae* in order to clarify whether products of secondary metabolism play any role in virulence and physiology of this fungus. Pathogenicity experiments in the greenhouse revealed that the transformed $\Delta VdlaeA$ strains reduced significantly the disease levels in eggplants, tomatoes and *Arabidopsis thaliana* hosts. $\Delta VdlaeA$ strains were also altered in the rate and morphology of germinating conidia, in mycelial development and microsclerotia formation. The study of the regulatory gene *VdlaeA* can contribute to a broader understanding of the molecular mechanisms by which secondary metabolites are produced and more specifically to the investigation of its role in *V. dahlia* virulence.

Keywords: *Verticillium dahliae*, secondary metabolism, *VdLaeA*

Απενεργοποίηση του γονιδίου *VdVeA* (*Velvet A*) στο μύκητα *Verticillium dahliae* και διερεύνηση του ρόλου του στη φυσιολογία και παθογένεια του μύκητα

Αντωνιάδη Α. και Τσιτσιγιάννης Δ.Ι.

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής, Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας, Αθήνα

Η βιολογία του εδαφογενή μύκητα *Verticillium dahliae* και το σύνδρομο της αδρομύκωσης που προκαλεί στους ξενιστές, το καθιστά παθογόνο μεγάλης οικονομικής σημασίας για τη χώρα μας με απαραίτητη την ανεύρεση μίας κατάλληλης μεθόδου αντιμετώπισής του. Η αναποτελεσματικότητα των συμβατικών μεθόδων καταπολέμησης έχει οδηγήσει στη μοριακή διερεύνηση του παθογόνου. Μελέτες έχουν δείξει στο παρελθόν πως ο μύκητας *V. dahliae* παράγει φυτοτοξίνες και άλλα μόρια που επάγουν τον κυτταρικό θάνατο ή άλλες μορφές άμυνας του ξενιστή. Η ακριβής φύση και ρόλος αυτών των συστατικών παραμένει άγνωστος. Έχει βρεθεί πως σε διάφορα είδη του γένους *Fusarium* spp. Και *Aspergillus* spp. το γονίδιο *VeA* κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που αποτελεί ρυθμιστή του δευτερογενούς μεταβολισμού, προκαλεί διαφοροποίηση της ανάπτυξης του στελέχους σε σχέση με το φωτισμό, ελέγχει την αναπαραγωγή και παθογένεια των μυκήτων. Μαζί με την πρωτεΐνη *LaeA* σχηματίζει ένα πυρηνικό σύμπλοκο που ονομάζεται σύμπλοκο *Velvet* σε συνεργασία με μια τρίτη πρωτεΐνη, την *VelB*. Στόχος της μελέτης είναι η διαλεύκανση του ρόλου του ορθόλογου γονιδίου του *A. nidulans*, *VdVeA* στην παθογένεια και μορφολογία του μύκητα *V. dahliae*. Εφαρμόστηκε η στρατηγική της γονιδιακής αντικατάστασης με ενσωμάτωση στο δυαδικό φορέα *pGKO2*, 2 τμημάτων μεγέθους περίπου 1000 bp πριν από το κωδικόνιο έναρξης και μετά το κωδικόνιο λήξης αντίστοιχα και με την κασέτα της γενετισίνης ανάμεσα τους. Η κατασκευή απενεργοποίησης του *VdVeA* ενσωματώθηκε με τη χρήση του *Ti* πλασμιδίου του *Agrobacterium tumefaciens* σε διάφορες φυλές του *V. dahliae*, μέσω διπλού γενετικού ανασυνδυασμού. Η διερεύνηση του ρόλου της απενεργοποίησης του γονιδίου στη βιολογία και παθογένεια του μύκητα πραγματοποιείται μέσω *in vitro* πειραμάτων και δοκιμών παθογένειας σε διαφόρους ξενιστές.

Λέξεις κλειδιά: *Verticillium dahliae*, δευτερογενής μεταβολισμός, *VdVeA*

Inactivation of the gene *VdVeA* (Velvet A) in the fungus *Verticillium dahliae* and study of its role in physiology and pathogenicity of the fungus

Antoniadi A. and Tsitsigiannis D.I.

Agricultural University of Athens, Department of Crop Science, Laboratory of Plant Pathology, Athens

Verticillium dahliae is a soilborne plant pathogenic fungus causing wilt diseases and posing a significant threat for several annual and perennial crops worldwide. The inability of management methods to control *V. dahliae* has led to the investigation of molecular mechanisms that might regulate its virulence. Studies have previously shown that the fungus *V. dahliae* produces phytotoxins and other secondary metabolites that induce cell death or other forms of host defense. It has been found that in several species of *Fusarium* spp. and *Aspergillus* spp. the gene *veA* encodes a protein that can regulate the fungal secondary metabolism, induce differentiation of the fungal development in relation to light, and regulate reproduction and pathogenicity. Along with the VeA, a second protein called LaeA forms a nuclear complex called Velvet complex in association with another third protein, VelB. The aim of this study is to elucidate the role of the orthologous gene of *A. nidulans*, *VdVeA*, in virulence, morphology and physiology of the fungus *V. dahliae*. The strategy of gene replacement was applied by cloning two parts of approximately 1000 bp before the *VdVeA* “Start” and after the “Stop” codon, respectively. The geneticin cassette was subcloned in between and the entire construct was subcloned into binary vector pGKO2. The *VdVeA* inactivation construct was incorporated in various strains of *V. dahliae* using the Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*, via double crossing over recombination. The role of inactivation of the *VdVeA* gene in biology and pathogenicity of the fungus was explored by *in vitro* experiments and *in planta* virulence tests in *Arabidopsis thaliana*.

Keywords: *Verticillium dahliae*, secondary metabolism, *VdVeA*

Γονιδιωματική ανάλυση του *Zymomonas mobilis* subsp. *mobilis* ATCC 29191: συγκριτικές, δομικές και λειτουργικές παρατηρήσεις

Δεσινιώτης Α.* και Παππά Κ.Μ.

Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Βιολογίας, Τομέας Γενετικής και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστημιούπολη, Αθήνα 15701 *corresponding: a_desiniotis@hotmail.com

Το *Zymomonas mobilis* είναι α-πρωτεοβακτήριο που μελετάται για παραγωγή βιοκαυσίμων καθώς ζυμώνει σάκχαρα προς αιθανόλη σε σχεδόν ιδανικές αποδόσεις. Διαφορετικά στελέχη του *Z. mobilis* είναι υπό αλληλούχηση στο Ινστιτούτο Γονιδιωματικής - Υπουργείο Ενέργειας των ΗΠΑ (DOE-JGI), κατόπιν προγράμματος συνεργασίας με το ΕΚΠΑ (CSP_788284). Το πλέον πρόσφατα αλληλουχημένο στέλεχος είναι ο φαινοτυπικός κεντρότυπος του υποείδους *mobilis*, το στέλεχος ATCC 29191 (Desiniotis *et al.*, *J. Bacteriol.* 194; 5966-7). Το ATCC 29191 αποτελείται από ένα κυκλικό χρωμόσωμα μεγέθους 1.961.307 bp και τρία πλασμίδια μεγεθών 18.350 bp, 14.947 bp και 13.742 bp, αντίστοιχα. Ολόκληρο το γονιδίωμα έχει 1.765 προβλεπόμενα γονίδια πρωτεϊνών, 3 σύμπλοκα rRNA και 51 tRNA. Γονιδιωματική σύγκριση του ATCC 29191 με το βιομηχανικό στέλεχος αναφοράς ATCC 31821 (ZM4) ανέδειξε ότι το πρώτο είναι 95.057 bp μικρότερο, φέρει πάνω από 40 ειδικά γονίδια (ο αντίστοιχος αριθμός στο ZM4 είναι 120), και εμφανίζει γονιδιωματικές ανακατατάξεις, πολλές από τις οποίες οφείλονται στην εντυπωσιακή παρουσία 24 χρωμοσωμικών και 4 πλασμιδιακών μεταθετών στοιχείων. Τα παραπάνω στη συντριπτική τους πλειοψηφία είναι IS4-τύπου και διακρίνονται σε δύο υποοικογένειες συναρτήσεως των επικρατειών που απαρτίζουν την κωδική περιοχή της τραπεζοζύξης. Τα στελεχο-ειδικά και αχαρακτήριστα γονίδια του ATCC 29191 διερευνήθηκαν ενδελεχώς (curation) και αναζητήθηκαν σε όλα τα αλληλουχημένα στελέχη του *Z. mobilis*. Τα χαρακτηρισμένα στελεχο-ειδικά γονίδια, χρωμοσωμικά και πλασμιδιακά, περιλαμβάνουν γονίδια ανθεκτικότητας σε τελλούριο, και γονίδια μεταβολικά, ρυθμιστικά και βιοσύνθεσης/ανακατάταξης νουκλεϊκών οξέων. Το ATCC 29191 είναι το πλέον παραγωγικό στέλεχος ως προς την έκκριση λεβάνης (πολυφρουκτάνης)· κατόπιν αυτού αναλύθηκε το σύνολο των δομικών και ρυθμιστικών γονιδίων που παίζουν ρόλο στην πρόσληψη/υδρόλυση της σακχαρόζης και στον πολυμερισμό της φρουκτόζης.

Λέξεις κλειδιά: *Zymomonas mobilis*, συγκριτική γονιδιωματική ανάλυση, και παραγωγή βιοαιθανόλης

Genomic analysis of *Zymomonas mobilis* subsp. *mobilis* ATCC 29191: comparative, structural and functional insights

Desiniotis A.* and Pappas K.M.

University of Athens, Faculty of Biology, Department of Genetics & Biotechnology, Panepistimiopolis, Athens 15701 *corresponding: a_desiniotis@hotmail.com

Z. mobilis is an α -proteobacterium studied for biofuel production as it ferments sugars to ethanol, to almost perfect yields. Different strains of *Z. mobilis* are being sequenced at the US Department of Energy - Joint Genome Institute in collaboration with the UoA (CSP_788284). The most recently sequenced strain is the phenotypic centrotypic of the subspecies *mobilis*, strain ATCC 29191 (Desiniotis *et al.*, *J. Bacteriol.* 194; 5966-7). The genome of ATCC 29191 comprises a circular chromosome of 1.961.307-bp size, and three plasmids of 18.350-bp, 14.947-bp and 13.742-bp size, respectively. The entire genome has 1,765 protein-coding genes, 3 rRNA clusters and 51 tRNAs. Genomic comparisons between ATCC 29191 and reference strain ATCC 31821 (ZM4), revealed that the former is 95,057 bp smaller, bears over 40 strain-specific genes (compared to 120 for ZM4), and displays genomic rearrangements, many of which are due to an impressive number of 24 chromosome-borne and 4 plasmid-borne insertion elements. Almost all ISs belong to the IS4 family and are divided into two subfamilies, depending on the presence or absence of specific transposase domains. The strain-specific and hypothetical genes of ATCC 29191 were curated and sought in the genomes of all sequenced *Z. mobilis* strains. Among the characterized strain-specific genes, chromosomal or plasmid, included are genes coding for tellurium resistance, as also metabolic, regulatory or DNA biosynthesis/relocation genes. ATCC 29191 is reportedly the best *Z. mobilis* levan (polyfructan) producer; in this respect all structural and regulatory genes that contribute to sucrose uptake and hydrolysis, and fructose polymerization were determined.

Μελέτη της κινητικής συμπεριφοράς του *Alicyclobacillus acidoterrestris* σε υγρό εργαστηριακό θρεπτικό υπόστρωμα

Κακαγιάννη Μ. και Κουτσομανής Π. Κ.

Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Υγιεινής Τροφίμων, Τομέας Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, Γεωπονική Σχολή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Θεσσαλονίκη 54124, Ελλάδα

Τα τελευταία χρόνια, ο σπορογόνος θερμοφίλος και οξεόφιλος μικροοργανισμός *Alicyclobacillus acidoterrestris* θεωρείται ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα ποιότητας στη παραγωγή χυμών φρούτων. Ο έλεγχος του συγκεκριμένου μικροοργανισμού κρίνεται απαραίτητος, καθώς τα ενδοσπόρια του έχουν την ικανότητα να επιβιώνουν της θερμικής επεξεργασίας και να αναπτύσσονται στο όξινο περιβάλλον των χυμών. Η εκβλάστηση των σπορίων και η ανάπτυξη του μικροοργανισμού κατά τη διακίνηση και συντήρηση των χυμών μπορεί να προκαλέσει δυσάρεστη γεύση και οσμή, με ή χωρίς ιζήματα, ακόμη και αποχρωματισμό ή θολερότητά του, υποβαθμίζοντας σημαντικά τη ποιότητά τους.

Αντικείμενο της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασίας στη συμπεριφορά τεσσάρων στελεχών του *A. acidoterrestris* σε υγρό εργαστηριακό θρεπτικό υπόστρωμα. Αρχικά, εκτιμήθηκαν οι τιμές του μέγιστου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης (μ_{\max}) που αντιστοιχούν σε κάθε στέλεχος σε διαφορετικές θερμοκρασίες, με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων χρησιμοποιώντας το αυτοματοποιημένο σύστημα μέτρησης της οπτικής πυκνότητας Bioscreen C. Έπειτα, οι τιμές του μ_{\max} (h^{-1}) εκφράστηκαν ως συνάρτηση της θερμοκρασίας με τη χρήση ενός δευτερογενούς μοντέλου. Ανάλογα με το στέλεχος, οι προσδιοριζόμενες τιμές της ελάχιστης, άριστης και μέγιστης θερμοκρασίας για το μ (T_{\min} , T_{opt} , T_{\max}) κυμάνθηκαν από 18.4 έως 24.4°C, 47.9 έως 49.2°C και 55.8 έως 57.3°C, αντίστοιχα.

Τα μέχρι στιγμής αποτελέσματα της παρούσας έρευνας επέτρεψαν τον ποσοτικό προσδιορισμό της επίδρασης της θερμοκρασίας στο μ_{\max} , μέσω της χρήσης ενός δευτερογενούς μοντέλου. Το μοντέλο που αναπτύχθηκε παρέχει σημαντικές πληροφορίες που μπορούν να βοηθήσουν τη βιομηχανία τροφίμων στην ανάπτυξη δραστικών συστημάτων ελέγχου της παρουσίας του του *A. acidoterrestris* σε προϊόντα χυμών καθών και στην πρόβλεψη της διάρκειας ζωής.

Λέξεις κλειδιά: *Alicyclobacillus acidoterrestris*, χυμοί, αλλοίωση, ποσοτική μικροβιολογία

Study of the kinetic behavior of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in broth

Kakagianni M. and Koutsoumanis P. K.

Laboratory of Food Microbiology and Hygiene, Department of Food Science and Technology, School of Agriculture, Aristotle University of Thessaloniki, Thessaloniki 54124, Greece

In recent years, thermo–acidophilic endospore–former *Alicyclobacillus acidoterrestris* seem to be a major quality concern in fruit juice industry. The control of this microorganism is of great importance for the industry, as its endospores are able to survive during pasteurisation processes and grow in the acidic environment of fruit juice: Their presence and growth in pasteurized fruit juice can cause spoilage problems, such as an off-flavour or -odour, with or without sediment, even discolouration or cloudiness, affecting significantly the quality of pasteurized fruit juices and other acidic beverages.

The objective of the present study was to investigate the effect of temperature on the behaviour of four strains of *A. acidoterrestris* in broth. Initially, the values of the maximum specific growth rate (μ_{max}) corresponding to each strain at different temperatures were estimated by means of absorbance detection times of serially diluted cultures using the automated turbidimetric system Bioscreen C. Then, the values of μ_{max} were expressed as a function of temperature by using a secondary model. Depending on the strain, the estimated minimum, optimum and maximum temperature parameters for μ (T_{min} , T_{opt} , T_{max}) ranged from 18.4 to 24.4°C, 47.9 to 49.2°C and 55.8 to 57.3°C, respectively.

So far, the results of this study enabled the quantification of the effect of temperature on μ_{max} by using a secondary model. The developed model can be used by the food industry as an effective tool for the optimization of the quality control tests and the shelf life prediction of fruit juice products.

Πιλοτική ζύμωση φυσικώς ώριμων ελιών σε χαμηλή θερμοκρασία με χρήση νέων γαλακτικών βακτηρίων

Χυτήρη Α.1, Καλλιμάνης Α. 1, Περισυνάκης Α.2, Τασιούλα-Μάργαρη Μ.1*

¹Τμήμα Χημείας, Εργαστήριο Χημείας Τροφίμων, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, 45110, Ιωάννινα. *e mail:mtasioul@cc.uoi.gr

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

Περίληψη

Στην παρούσα εργασία έγινε απομόνωση 55 στελεχών γαλακτικών βακτηρίων σε τρυβλία MRS από διάφορα στάδια βιομηχανικών ζυμώσεων από διαφορετικές ποικιλίες ελιών (Πράσινες ελιές και φυσικώς ώριμες). Ο έλεγχος ανάπτυξης έγινε σε διαφορετικές θερμοκρασίες (11, 16, 24 and 37°C), συγκεντρώσεις NaCl (4, 6, 8, 10% w/v) και επίπεδα pH (3-6). Δύο στελέχη τα οποία χαρακτηρίστηκαν ως BL1 και TE4 και απομονώθηκαν από το τελικό στάδιο ζύμωσης φυσικώς ώριμων ελιών, επέδειξαν προσαρμοστικότητα σε σχετικά χαμηλές θερμοκρασίες (11°C) και σε συγκεντρώσεις άλατος της τάξης του 8% (w/v).

Σύμφωνα με ανάλυση αλληλουχίας 16S rDNA τα στελέχη αυτά ταυτοποιήθηκαν ως *Lactobacillus* (99% ομολογία με στελέχη των *L. plantarum*, και *L. pentosus*) και με βάση τις παραπάνω ιδιότητες χρησιμοποιήθηκαν ως καλλιέργειες εκκίνησης για την ζύμωση φυσικώς ώριμων ελιών (Ποικιλίες Καλαμών και Αμφίσσης) σε χαμηλή θερμοκρασία (15°C) και 6% NaCl (w/v).

Με σκοπό την διευκόλυνση διάχυσης υδατανθράκων και επίσπευση της διαδικασίας της ζύμωσης εφαρμόστηκε διάτρηση του καρπού της ελιάς (μικρές οπές κοντά στο στίμα) πριν την εμφύσηση στην άλμη. Η διαδικασία της ζύμωσης σε ελιές Αμφίσσης ολοκληρώθηκε σε 72 ημέρες περίπου. Αντιθέτως σε ελιές Καλαμών προσθήκη καλλιέργειας εκκίνησης είχε μικρή επίδραση. Το φαινολικό φορτίο σε άλμη Καλαμών ήταν υψηλότερο σε σύγκριση με άλμη από ελιές Αμφίσσης.

Μικροβιολογική ανάλυση σε άλμη Καλαμών και Αμφίσσης κατά την διάρκεια αυθόρμητης ζύμωσης έδειξε ότι οι ζυμομύκητες αποτελούν τον κύριο εκπρόσωπο μικροβιακής χλωρίδας (10^5 cfu/ml) σε ολόκληρη την διαδικασία, ενώ τα εντεροβακτήρια εξαφανίζονται μετά από 2 εβδομάδες περίπου. Ο πληθυσμός των γαλακτικών βακτηρίων σε άλμη Αμφίσσης αυξάνεται σταδιακά έως την μέγιστη τιμή (10^5 cfu/ml) μετά από 100 ημέρες ενώ σε άλμη Καλαμών τα γαλακτικά παραμένουν σε χαμηλά επίπεδα, έως την εξαφάνισή τους μετά από 90 ημέρες. Ο ρόλος των γαλακτικών βακτηρίων και των ζυμομυκήτων στην ζύμωση της ελιάς χρειάζεται επιπλέον μελέτη.

Λέξεις κλειδιά: Επιτραπέζιες Ελιές, Λακτοβάκιλλοι, Ζύμωση.

Pilot fermentation of black olives in low temperatures by using newly isolated lactic acid bacteria.

Chytiri A.¹, Kallimanis A.¹, Perisynakis A.², Tasioula-Margari M.^{1*}

¹Department of Chemistry, Sector of Industrial Chemistry and Food Chemistry, University of Ioannina, 45110, Ioannina, Greece. *email: mtasioul@cc.uoi.gr

²Department of Chemistry, Sector of Biochemistry, University of Ioannina, 45110, Ioannina, Greece

Abstract

In the present work, 55 lactic acid bacterial strains were isolated on MRS agar plates from different fermentation stages from various cultivars (Green olives and naturally black, taken from industrial scale fermentations). Growth rate monitoring was done in different temperatures (11, 16, 24 and 37°C), NaCl concentration (4, 6, 8, 10% w/v) and pH levels (3-6). Two strains, designated as BL1 and TE4 that isolated from the late fermentation phase of naturally black olives tanks, exhibited adaptation to lower temperature (16°C) and a Salt concentration of 8%). According to 16S rDNA analysis those strains classified as *Lactobacillus* species (99% similarity to *L. plantarum*, and *L. pentosus*). Strains BL1 and TE4, were used as a starter culture for the fermentation of naturally black table olives (Amfissis and Kalamon varieties) in low temperatures (15°C) and 6% NaCl (w/v). Olive piercing was applied in order to facilitate carbonhydrates diffusion and accelerate fermentation process. Fermentation process completed in about 72 days period of time in Amfissis brines. On the other hand, addition of starter cultures had little effect concerning fermentation process, in Kalamon brines. Phenolic compounds concentration in brines of Kalamon was higher than in Amfissis variety. Furthermore, microbiological analysis during spontaneous fermentation of Amfissis and Kalamon brines, showed that yeasts are prevailing during the whole fermentation process (10^5 cfu/ml) while enterobacteria diminished after one

to two weeks, depending on the cultivar. *Lactobacillus* strains population in Amfissis increased gradually until reaching a plateau (10^5 cfu/ml) after 100 days. LAB strains appeared in smaller levels in Kalamon brines until their final extinction after 90 days. The role of both, yeasts and LAB to the fermentation process needs further investigation.

This study was funded from project BIOOLEA, within the ETCP GREECE-ITALY

Keywords: Table Olives, *Lactobacillus*, Fermentation



HELLAMCO®

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ

www.hellamco.gr



Η πλέον ολοκληρωμένη σειρά:

- ▶ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟΥ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΥ
- ▶ ΑΝΑΛΩΣΙΜΩΝ ΑΝΑΛΥΤΙΚΩΝ ΟΡΓΑΝΩΝ
- ▶ ΥΠΗΡΕΣΙΩΝ ΤΕΧΝΙΚΗΣ & ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΗΣ ΥΠΟΣΤΗΡΙΞΗΣ

Με την επίσημη συνεργασία
των μεγαλύτερων κατασκευαστών:



Agilent Technologies

Authorized Distributor



PANalytical



METTLER TOLEDO