



3<sup>ο</sup> Συνέδριο  
της Επιστημονικής Εταιρείας  
**ΜΙΚΡΟΒΙΟΚΟΣΜΟΣ**

3<sup>rd</sup> CONGRESS OF ΜΙΚΡΟΒΙΟΚΟΣΜΟΣ



16 - 18 Δεκεμβρίου 2010, Θεσσαλονίκη

16<sup>th</sup> - 18<sup>th</sup> December 2010, Thessaloniki

**ΠΡΑΚΤΙΚΑ**

**ABSTRACTS**

## Ο Μικρόκοσμος της Ζωής

### Βώκου Δέσποινα

Τομέας Οικολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Α.Π.Θ., Θεσσαλονίκη

Θα επιχειρήσω να ορίσω την έννοια μικρόβιο και το περιεχόμενό της και θα κάνω μια γενική επισκόπηση των μικροβίων και των σχέσεων του προτύπου ζωής και των χαρακτηριστικών τους με τον άνθρωπο και το περιβάλλον. Συγκεκριμένα, θα αναφερθώ σε μικρόβια υπεύθυνα για μερικά από τα χειρότερα δεινά που γνώρισε ποτέ η ανθρωπότητα, σε μικρόβια απλώς ενοχλητικά ή σε μικρόβια που άλλαξαν τον ρου της ιστορίας, σε μικρόβια της καθημερινότητας και σε εκείνα ακραίων περιβαλλόντων, σε αυτά που έφεραν επανάσταση στη βιολογική έρευνα ή που υποστηρίζουν την ύπαρξή μας και συμβάλλουν σήμερα στην υγεία και καλοζωία μας. Εστιάζοντας στην πιο κοινή εκδοχή των μικροβίων, στα βακτήρια, θα αναφερθώ στους οικολογικούς ρόλους τους στα διαφορετικά περιβάλλοντα, όπου υπήρξαν ή υπάρχουν και στις εκπλήξεις που μας επιφύλασσει συχνά αυτή η παρουσία τους και τα γνωρίσματά της. Τον χαρακτηρισμό 'μικρό' των μικροβίων ως προς τη διάρκεια της ατομικής ζωής τους και το μέγεθος της ύπαρξής τους, θα τον αντιδιαστείλω με τον χαρακτηρισμό 'τεράστιο' ως προς το χρόνο εμφάνισης και τη διάρκεια ύπαρξής τους στον πλανήτη, αλλά και ως προς το εύρος των μεταβολικών διεργασιών τους. Ακριβώς οι τελευταίες είναι που κάνουν το 'κυνήγι μικροβίων' διαχρονικό. Παλιά, αυτό κυρίως αφορούσε την εξόντωσή τους, σήμερα την αξιοποίηση των δυνατοτήτων τους προς όφελος του ανθρώπου, σε πεδία παλιά και νέα που καλύπτουν τεράστιο εύρος - γεωργική παραγωγή και παραγωγή εξατομικευμένων χημικών ενώσεων, αντιρρυπαντική τεχνολογία, προστασία των αρχαιοτήτων και της άλλης πολιτισμικής κληρονομιάς, παραγωγή ενέργειας, κ.α. Στο πλαίσιο αυτό, θα συνεισφέρω στοιχεία από τη δική μου περιπέτεια και αυτή των συνεργατών μου στο 'κυνήγι μικροβίων'. Αφορούν τα μικρόβια στην ατμόσφαιρα, κυρίως της Θεσσαλονίκης, και τη σχέση μικροβίων και αρωματικών φυτών.

## The Microcosm of Life

**Vokou Despoina**

Department of Ecology, School of Biology, Aristotle University, Thessaloniki, Greece

I will try to define the meaning of the word microbe and I will make an overview of microbes and of the relationship between their life patterns and features with man and the environment. In particular, I will refer to microbes that are responsible for some of the worst suffering that humanity has ever experienced, to microbes that are simply annoying or to those that changed the course of history, to microbes of our everyday life and to those of extreme environments, to those that brought revolution to biological research and its applications or to those that support our existence and contribute to our health and well-being. Focusing on bacteria, the commonest version of microbes, I will refer to their ecological roles in the different environments, where they exist or have existed, and to the surprises that this presence and its features brings to us. I will contrast the 'micro' of microbes regarding the duration and size of their individual life to the vastness of their antiquity and also to their capacities. In fact, because of their metabolic potential, our hunt for microbes is never-ending. In the past, this primarily aimed at the extermination of microbes; today it aims at the identification and exploitation of their capacities for our benefit. This search encompasses a wide range of fields both old and new covering a wide range: agriculture, and production of individual chemical substances, anti-pollution technology, protection of monuments and other products of human civilization, energy production, etc. In this framework, I will bring results from my own adventures and those of my coworkers' in this hunt for microbes, which deal with allergenic microbes in the air, particularly in the air of Thessaloniki, and also with the relationship between the microbe and aromatic plants.

## The impact of large scale genomics on culture collections and taxonomy

**Klenk H.-P.**

Head of Department of Microbiology  
DSMZ - German Collection of  
Microorganisms and Cell Cultures  
Inhoffenstraße 7 B, 38124 Braunschweig, Germany

When the genomic era began about 15 years ago the impact on culture collections was barely noticeable, because only few genomes were sequenced in the early days and often strains were selected for sequencing that were neither type material nor were they deposited in culture collections. The situation changed only during the last three years with large scale projects such as the *Genomic Encyclopaedia of Bacteria and Archaea* (GEBA), when larger sets of type strains were used for genome sequencing. Culture collections started to build DNA banks that serve as well as source for sequencing templates needed by the sequencing centres, as for scientist doing post-genomics follow-up lab work with strains that they often can barely grow in their labs. The tsunami of publicly available genome sequences that has now taken off provides to collections also an enormous opportunity to use this information as basis for systematic phenotyping of collection strain in order to improve and to optimize the growth conditions of their strains.

Culture collections are in many cases also the home of taxonomists. With currently only about 600 (7%) genome-sequenced type strains it is still too early to seriously talk about an universal genome-based taxonomical system for the prokaryotes, but this is certainly an attractive and meanwhile feasible aim for microbial taxonomists. However, for the discrimination of type strains of species the average nucleotide identity (ANI) and other genome-to-genome comparison methods already allow a digital DNA-DNA-Hybridization (DDH), which is about to replace the decades old labour intensive lab procedure requested for the formal description of almost all novel archaeal and bacterial species names.

Whole genome-based phylogenies inferred from alignments of millions of nucleotides or amino acids already proved to deliver excellent trees that surpass the quality that can be achieved by any single gene or multi locus sequence analysis. Example phylogenies with extreme halophiles, methanogens and the *Actinomycetales* will be presented to demonstrate the meanwhile achievable level of reliability for whole genome-based phylogenies.



## **The Microbial Earth Project**

**Kyrpides N.C.**

Genome Biology and Metagenomics Programs,  
DOE Joint Genome Institute, 2800 Mitchell Drive, Walnut Creek, CA 94598, USA

At the time of the completion of 1000 microbial genomes, the field is poised at a crossroads. The enabling technology which birthed the field and brought it to this point is fundamentally different from the one that is currently pushing it to the next phase. The future holds great promise for far-reaching advancements in microbiology as well as in diverse related sciences. To realize that potential will require meeting the challenges that have accompanied the rapid development of the underlying technology and the exponential growth of data. New technologies provide unprecedented opportunities, but also call for conceptual shifts. Experience gained in the first decade of genomics can guide the improved approaches now needed for the selection of genome sequencing projects and their funding, for genome annotation standards, as well as for data analysis and integration. I will discuss the current challenges in the field and present a vision of its future.

## **The Earth Microbiome Project (EMP)**

**Meyer F.**

Argonne, IL 60439, USA

Novel sequencing technology enables an organized attack on the bacteria and archaea on the planet with Terabases of data now available with a few instrument runs, Biology needs a new governing principle. We propose EMP, a systematic attack aiming increase our knowledge about the microorganisms surrounding us. EPM will provide a robust framework for many future metagenomic studies of many Biomes on Earth.

## Αντιβακτηριακή δράση εκχυλισμάτων από φυτά της ελληνικής χλωρίδας έναντι φυτοπαθογόνων βακτηρίων

**Αϊναλίδου Α.<sup>1</sup>, Λάζαρη Δ.<sup>2</sup>, Κωνσταντινίδου Ε.-Ι.<sup>1</sup> και Καραμανώλη Κ.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Εργαστήριο Γεωργικής Χημείας, Σχολή Γεωπονίας, ΑΠΘ, 54124 Θεσσαλονίκη, Ελλάδα,

<sup>2</sup>Εργαστήριο Φαρμακογνωσίας, Τμήμα Φαρμακευτικής, ΑΠΘ, 54124 Θεσσαλονίκη, Ελλάδα

Τα εκχυλίσματα επτά φυτικών ειδών (*Sideritis perfoliata* L. subsp. *perfoliata*, *Vicia panonica* Crantz, *Thymus longicaulis* C. Presl., *Fumaria* spp., *Anthemis* spp., *Alyssum chalcidicum* Janka και *Artemisia absinthium* L.) της Ελληνικής χλωρίδας ελέγχθηκαν ως προς την αντιβακτηριακή τους δράση έναντι των στελεχών *Agrobacterium tumefaciens*, *Erwinia amylovora* και *Pseudomonas syringae*. Από τις εργαστηριακές βιοδοκιμές ελέγχου, με την τεχνική αραίωσης σε υγρό υπόστρωμα, προέκυψε ότι μεγαλύτερη αντιβακτηριακή δράση είχαν τα πολικά εκχυλίσματα έναντι των βακτηρίων *E. amylovora* και *Ps. syringae*, ενώ το *A. tumefaciens* ήταν ανθεκτικό στα εκχυλίσματα αυτά. Δραστικότερο ήταν το εκχύλισμα μεθανόλης/νερού (MW) του *A. chalcidicum*, για το οποίο προσδιορίστηκε η ελάχιστη βακτηριοκτόνος συγκέντρωση (Minimum Bactericidal Concentration, MBC) και για τα δύο ευαίσθητα βακτήρια, ενώ παράλληλα εμπόδισε την ανάπτυξη ανθεκτικότητας σε αυτά. Αντιβακτηριακή δράση παρουσίασαν και εκχυλίσματα των φυτών *Fumaria* spp. και *Artemisia absinthium* για τα δύο βακτήρια. Το στέλεχος *A. tumefaciens* ήταν το ανθεκτικότερο μεταξύ των μερικών ελεγχόμενων βακτηρίων, αν και εκχυλίσματα του *A. absinthium* προκάλεσαν μερική αναστολή της ανάπτυξής του. Εξαιτίας της εντονότερης δραστηριοποίησής του, το MW εκχύλισμα του *A. chalcidicum*, υποβλήθηκε σε υγρή χρωματογραφία μέσης πίεσης με στήλη αντίστροφης φάσης C18. Από το διαχωρισμό προέκυψαν 308 κλάσματα, τα οποία στη συνέχεια συνενώθηκαν σε 29 ομάδες, ανάλογα με το χρόνο συγκράτησης των ουσιών τους. Από τις βιοδοκιμές αντιβακτηριακής δράσης των 29 ομάδων με την τεχνική της αυτοβιογραφίας, προέκυψε ότι δραστικές ήταν οι εννιά από αυτές έναντι των βακτηρίων *E. amylovora* και *P. syringae*. Εντονότερη ήταν η δράση της ομάδας ALY-B από την οποία, μετά από παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας, παραλήφθηκαν 4 ζώνες ουσιών (α, β, γ και δ) με διαφορετικό συντελεστής επιβράδυνσης (Rf). Έγινε επανάληψη βιοδοκιμών με διάχυση σε χάρτινους δίσκους. Αξιόλογη αναστολή της ανάπτυξης και των δύο βακτηρίων εμφάνισε η ζώνη α με Rf=0.05, ενώ καμία από τις ζώνες αυτές δεν ήταν δραστική έναντι του *A. tumefaciens*.



## Antibacterial activity of extracts from Greek plant species against plant pathogenic bacteria

**Analidou A.<sup>1</sup>, Lazari D.<sup>2</sup>, Constantinidou H.-I. A.<sup>1</sup> and Karamanli K.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Lab. Agricultural Chemistry, School of Agriculture, Aristotle University of Thessaloniki, 54124 Thessaloniki, Greece,

<sup>2</sup>Lab. of Pharmacognosy, School of Pharmacy, Aristotle University of Thessaloniki, 54124 Thessaloniki, Greece

Extracts from seven plant species of the Greek flora (*Sideritis perfoliata* L. subsp. *perfoliata*, *Vicia pannonica* Crantz, *Thymus longicaulis* C. Presl., *Fumaria* spp., *Anthemis* spp., *Alyssum chalcidicum* Janka καὶ *Artemisia absinthium* L.) were tested against the bacterial strains *Agrobacterium tumefaciens*, *Erwinia amylovora*, and *Pseudomonas syringae* using the broth dilution technique. Among the plant extracts, polar extracts were the most active against the bacterial strains *E. amylovora* and *P. syringae*, while *A. tumefaciens* was resistant. Most potent was the methanol-water 1:1 (MW) extract of *A. chalcidicum*, as indicated by the Minimum Bactericidal Concentration (MBC) values for this extract for both sensitive bacterial strains, with no resistance developing by either of them. Antibacterial activity was also exhibited by the *Fumaria* spp. and *Artemisia absinthium* extracts against *E. amylovora* and *P. syringae*. *Agrobacterium tumefaciens* was the most resistant among all tested bacteria, with only *A. absinthium* extracts inhibiting its growth. The MW extract of *A. chalcidicum*, which showed substantial antibacterial activity, was subjected to Medium Pressure Liquid Chromatography (MPLC) on Reverse Phase Silica C18 using water-methanol mixtures of decreasing polarity as eluents to yield 308 fractions. Fractions with compounds of the same retention factor (Rf) values on Thin Layer Chromatography (TLC) were successively combined to give 29 groups. Using bioautography, the antibacterial bioassays of 29 groups showed that nine of them were active against *E. amylovora* and *P. syringae*. Stronger activity was exhibited from group ALY-B, which was further fractionated by preparative TLC. Four zones (a, b, c and d) with different Rf were scraped and tested by disk diffusion technique for their antibacterial activity against *A. tumefaciens*, *E. amylovora* and *P. syringae*. Zone **a** (Rf value 0.05) showed remarkable activity against *E. amylovora* and *P. syringae*, but not against *A. tumefaciens*.

## Ποικιλότητα δυνητικά τοξικών βενθικών δικοφυκών στις νότιες ευρωπαϊκές ακτές

**Αλιγζάκη Κ.<sup>1</sup>, Battocchi C.<sup>2</sup>, Penna A.<sup>2</sup>, Rodríguez Hernández F.<sup>3</sup>, Αρσενάκης Μ.<sup>1</sup>  
και Fraga S.<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών Επιστημών, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο,  
54124 Θεσσαλονίκη, Ελλάδα,

<sup>2</sup>Dep. of Biomolecular Sciences, University of Urbino, Viale Trieste 296, 61121 Pesaro, Italy

<sup>3</sup>Centro Oceanográfico de Vigo, IEO (Instituto Español de Oceanografía),  
Subida a Radio Faro 50, 36390 Vigo, Spain

Οι καταγραφές των βενθικών δικοφυκών αυξάνονται ραγδαία τα τελευταία χρόνια ιδιαίτερα στις εύκρατες περιοχές. Είναι κοινά αποδεκτό ότι συχνά η αύξηση της ανίχνευσης μιας κατηγορίας οργανισμών μπορεί να είναι φαινομενική καθώς σχετίζεται κυρίως με την εντατική ερευνητική προσπάθεια προς τη συγκεκριμένη κατεύθυνση. Η αποτύπωση της ποικιλότητας, της γεωγραφικής κατανομής, ή ακόμα και της πιθανής επέκτασης του εύρους εξάπλωσης συγκεκριμένων ταχα μικροφυκών απαιτεί το συνδυασμό της κλασικής συστηματικής με βάση τα μορφομετρικά τους χαρακτηριστικά και των φυλογενετικών αναλύσεων. Για το σκοπό αυτό, βενθικά δικοφύκη από τα γένη *Gambierdiscus*, *Ostreopsis*, *Coolia* και *Prorocentrum* που συλλέχθηκαν από ακτές της Μεσογείου και των Κανάριων νήσων ταυτοποιήθηκαν με βάση φαινοτυπικούς χαρακτήρες και μοριακούς δείκτες.

Στα πλαίσια της συγκεκριμένης προσέγγισης ανιχνεύθηκαν τουλάχιστον δύο νέα είδη από το γένος *Gambierdiscus*, ένα στα Κανάρια νησιά και ένα στις ελληνικές ακτές, των οποίων η περιγραφή ως νέα είδη βρίσκεται υπό εξέλιξη. Επιπλέον, ανιχνεύθηκε ένας νέος γενότυπος *Ostreopsis* που απαντάται τόσο στη Μεσόγειο όσο και στο ΒΑ Ατλαντικό. Οι φυλογενετικές αναλύσεις στελεχών από τα γένη *Gambierdiscus*, *Ostreopsis* και *Coolia* αναδεικνύουν διακριτές ομάδες από περιγεγραμμένα και μη είδη. Ωστόσο, στην περίπτωση του γένους *Prorocentrum*, δεν έχει ακόμη αποδειχθεί εάν πρόκειται για μονοφυλετικό ή πολυφυλετικό γένος, καθώς οι διάφοροι μοριακοί δείκτες που έχουν χρησιμοποιηθεί έχουν οδηγήσει σε αντικρουόμενα αποτελέσματα, και παραμένει προς διερεύνηση αν οι δύο εξελικτικές γραμμές που προκύπτουν συνιστούν διαφορετικά γένη. Ταυτόχρονα, η ταξινομική του γένους είναι προβληματική εξαιτίας της συσσώρευσης λανθασμένων ταυτοποιήσεων ή συνωνύμων, της ανάδειξης πολλών νέων ειδών χωρίς τη χρήση κατάλληλων ταξινομικών χαρακτήρων, ενώ και η ποικιλομορφία στους συνήθεις μορφολογικούς χαρακτήρες εξακολουθεί να αποτελεί σημαντικό πρόβλημα.





## Diversity of potentially toxic benthic dinoflagellates in southern European coasts

**Aligizaki K.<sup>1</sup>, Battocchi C.<sup>2</sup>, Penna A.<sup>2</sup>, Rodríguez Hernández F.<sup>3</sup>, Arsenakis M.<sup>1</sup> and Fraga S.<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>School of Biology, Faculty of Sciences, Aristotle University, 54124 Thessaloniki, Greece,

<sup>2</sup>Dep. of Biomolecular Sciences, University of Urbino, Viale Trieste 296, 61121 Pesaro, Italy,

<sup>3</sup>Centro Oceanográfico de Vigo, IEO (Instituto Español de Oceanografía), Subida a Radio Faro 50, 36390 Vigo, Spain

In recent years benthic dinoflagellates records are growing in numbers; this increase is mostly apparent in temperate areas where until a decade ago studies on these dinoflagellates were rare. It is commonly recognized that enhanced records are not always representative due to directed intensive research in some specific fields. A more accurate estimation of the present diversity, the actual biogeographical distribution and the possible expansion range of some taxa, requires both morphotaxonomy and genetic analyses. In this context, benthic dinoflagellates of the genera *Gambierdiscus*, *Ostreopsis*, *Coolia* and *Prorocentrum* collected from the Mediterranean Sea and the Canary Islands were studied using phenotypical and phylogenetic characters.

This approach has resulted in the detection of at least two new *Gambierdiscus* species, currently being described, one from the Canaries and one from the Mediterranean Sea, as well as a new *Ostreopsis* genotype dispersed in both areas. Phylogenetic analyses of the genera *Gambierdiscus*, *Ostreopsis* and *Coolia* showed that the different groups correspond to distinct, described or undescribed, species. However, in the case of the genus *Prorocentrum*, its monophyletic or polyphyletic origin has not been yet elucidated, as different molecular markers have yielded contradictory results; it has yet to be determined whether the two genetic lineages can constitute separate genera. Furthermore, the taxonomy of this genus seems to have been hampered so far by the accumulation of misidentifications, the erection of too many species and the variability of the classical morphological characters used until recently.

## Ο ιός Adria, ένας νέος φλεβοϊός που ταυτοποιήθηκε σε παιδί με επεισόδιο πυρετικών σπασμών στη Βόρεια Ελλάδα

**Αναγνώστου Β.<sup>1</sup>, Παρδάλος Γ.<sup>2</sup>, Αθανασίου-Μεταξά Μ.<sup>2</sup> και Παπά Α.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Α' Εργαστήριο Μικροβιολογίας, Ιατρική Σχολή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

<sup>2</sup>Α' Παιδιατρική Κλινική, Ιπποκράτειο Νοσοκομείο Θεσσαλονίκης

Οι φλεβοϊοί (γένος *Phlebovirus*, οικογένεια *Bunyaviridae*), είναι RNA ιοί που μεταδίδονται στον άνθρωπο με φλεβοτόμους (σκνίπες) (*Phlebotomus* spp.). Στην ευρύτερη περιοχή της Μεσογείου, κυκλοφορούν κυρίως 3 φλεβοϊοί: ο ιός του πυρετού εκ φλεβοτόμου του τύπου της Νεάπολης (Sandfly Naples virus, SFNV), ο ιός του πυρετού εκ φλεβοτόμου του τύπου της Σικελίας (Sandfly Sicilian virus, SFSV), καθώς και ο ιός Τοσκάνια (Toscana virus, TOSV), που προκαλούν στον άνθρωπο ποικιλία κλινικών συνδρομών που διαβαθμίζονται από βραχεία αυτοπεριοριζόμενη πυρετική συνδρομή έως εγκεφαλίτιδα και μηνιγγοεγκεφαλίτιδα. Παρουσιάζεται η περίπτωση ταυτοποίησης ενός νέου φλεβοϊού σε παιδί 2,5 ετών που διακομίστηκε το Σεπτέμβριο του 2009 στην Παιδιατρική Κλινική του Ιπποκρατείου Νοσοκομείου Θεσσαλονίκης εξαιτίας ενός επεισοδίου πυρετικών σπασμών. Ο ασθενής εμφάνισε προσήλωση βλέμματος, περιστοματική κυάνωση, σπασμό του μαστήρα μυός, τονικοκλονικές συσπάσεις σώματος και άκρων και ακούσια απώλεια ούρων. Η κλινική εξέταση (συμπεριλαμβανομένης και της νευρολογικής εκτίμησης) ήταν κ.φ., ενώ εργαστηριακά βρέθηκε λευκοκυττάρωση (22,600/μl) με πολυμορφοπυρήνωση (85.7%). Ο ασθενής πήρε εξιτήριο δύο μέρες αργότερα, ελεύθερος συμπτωμάτων. Ακολούθησε εκχύλιση RNA από δείγμα ολικού αίματος του ασθενούς που ελήφθη κατά την ημέρα εισαγωγής του. Εφαρμόστηκε πρωτόκολλο εμφωλεασμένης αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης με αντίστροφη μεταγραφάση (RT-nested PCR) με εκκινητές ειδικούς για το γένος των φλεβοϊών, η οποία ήταν θετική. Η αλληλούχιση νουκλεοτιδίων του γονιδιώματος και η φυλογενετική ανάλυση κατέδειξε ως αιτιολογικό παράγοντα νέο φλεβοϊό, ο οποίος διαφέρει σημαντικά (>25%) από όλους τους γνωστούς φλεβοϊούς που έχουν συσχετισθεί με νόσο στον άνθρωπο. Παρόμοιος ιός, που είχε ονομαστεί Adria virus (ADRV), ταυτοποιήθηκε σε φλεβοτόμους που είχαν συλλεγεί στην Αλβανία. Στο φυλογενετικό δέντρο του L γονιδίου του ιού, ως πλέον συγγενής με τον ADRV καταφαίνεται ο ιός Arbia (77% ομολογία σε επίπεδο νουκλεοτιδίων). Ο αυξανόμενος αριθμός των νέων παθολογικών φλεβοϊών δείχνει τη σημασία τους για τη δημόσια υγεία και υποδηλώνει ότι οι φλεβοϊοί θα πρέπει να περιλαμβάνονται στη διαφορική διάγνωση των εμπύρετων λοιμώξεων και λοιμώξεων του ΚΝΣ κατά τους θερινούς μήνες, όταν οι φλεβοτόμοι είναι ενεργοί.



## Adria virus, a novel phlebovirus identified in a child with febrile seizures in northern Greece

**Anagnostou V.<sup>1</sup>, Pardalos G.<sup>2</sup>, Athanasiou-Metaxa M.<sup>2</sup> and Papa A.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>A<sup>1</sup> Dept. of Microbiology, Medical School, Aristotle University of Thessaloniki

<sup>2</sup>A<sup>1</sup> Paediatric Clinic, Hippokration Hospital of Thessaloniki

Phleboviruses (genus *Phlebovirus*, family *Bunyaviridae*) are arthropod-borne RNA viruses, transmitted to humans by sandflies. In the Mediterranean region circulate mainly 3 phleboviruses: Toscana virus (Toscana virus, TOSV), Sandfly fever Sicilian (Sandfly Sicilian virus, SFSV) and Naples (Sandfly Naples virus, SFNV) viruses, causing disease to humans ranging from a mild febrile syndrome to central nervous system infections.

In this study we present the case of a 2.5-year-old boy who was admitted to Hippokration Hospital in Thessaloniki, Northern Greece in September 2009, because of an episode of febrile seizures. The patient presented adherence of eye gaze, peroral cyanosis, masseter muscle spasm, tonic convulsions of the body and extremities and involuntary loss of urine. Clinical examination, including neurological evaluation, did not show any abnormality, while leucocytosis (22,600/ $\mu$ l) with 85.7% neutrophils was detected. The patient exited the hospital two days later, without any sequelae. RNA was extracted from patient's blood sample taken upon admission. RT-nested PCR with generic primers for phleboviruses was positive. Sequencing and phylogenetic analysis revealed that the causative agent was a phlebovirus, differing greatly (>25%) from all known phleboviruses associated with disease in humans. A similar virus, provisionally named Adria virus (ADRV) was detected in sandflies in Albania. In the L RNA segment phylogenetic tree, ADRV clusters together with Arbia virus (77% homology at the nucleotide level). The increasing number of new pathogenic phleboviruses suggests that they are of major public health importance, and that phleboviruses infections should be included in the differential diagnosis of summer febrile syndromes and central nervous system infections, especially during summer period when their phlebotomine vectors are active.

## **Επίδραση της φυσιολογίας του παθογόνου *Listeria monocytogenes* στη συμπεριφορά του κατά την παραγωγή και ωρίμαση Φέτας και Γραβιέρας**

**Αραπάκη Σ., Μπέλεση Χ.-Ε. και Σκανδάμης Π.Ν.**

Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων και Ποτών, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιερά οδός 75, 118 55, Αθήνα

Τα γαλακτοκομικά προϊόντα έχουν υψηλή επικινδυνότητα ως προς τον παθογόνο μικροοργανισμό *Listeria monocytogenes*, ο οποίος βρίσκεται ιδιαίτερα συχνά στο περιβάλλον της βιομηχανίας. Η φυσιολογία των κυττάρων και το στάδιο παραγωγής κατά το οποίο λαμβάνει χώρα η επιμόλυνση των τυριών διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στη δυνατότητα προσαρμογής του παθογόνου στην οξύτητα και αλατότητα των τυριών και ενδεχομένως αυξάνουν την επικινδυνότητα των τελικών προϊόντων. Εξετάσαμε την επίδραση: (α) του 'ιστορικού' των κυττάρων *L. monocytogenes* σε συνθήκες καταπόνησης και (β) του σταδίου επιμόλυνσης φέτας και γραβιέρας, με κύτταρα του ίδιου παθογόνου στη συμπεριφορά του κατά την παραγωγή και ωρίμανση των δύο τυριών. Για τη δημιουργία διαφορετικού 'ιστορικού' κυττάρων, ο παθογόνος επώαστηκε σε Ισοτονικό διάλυμα Maximum Recovery Diluent, TSBYE, πλήρες γάλα απλής παστερίωσης, Φέτα και Γραβιέρα (εμπορικές συσκευασίες). Τα παραπάνω υποστρώματα ενοφθαλμίστηκαν με μεμονωμένα στελέχη της *L. monocytogenes* από τυριά και επιφάνειες τυροκομείων και επώαστηκαν στους 20°C για 4 ημέρες. Επίσης έγινε εμβάπτιση επιφανειών (2 x 5 cm<sup>2</sup>) ανοξειδωτου χάλυβα στα παραπάνω υποστρώματα για προσκόλληση κυττάρων, προσομοιάζοντας έτσι συνθήκες σχηματισμού βιοϋμενίων σε βιομηχανικό εξοπλισμό που φέρει υπολείμματα τροφίμου. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα του μικροοργανισμού προσαρμοσμένα ή όχι σε σταδιακά μειούμενη οξύτητα. Επίπεδα 102-3 CFU/g, 12 διαφορετικών ειδών κυττάρων από πλανκτονική αύξηση ή βιοϋμένια εμβολιάστηκαν σε γάλα, πήγμα, και τελικό προϊόν Φέτας (100±10 g) και Γραβιέρας (150± 10 g) μετά την πρώτη τους ωρίμαση (18°C, 9-16 ημέρες) και πριν την μεταφορά τους στους 4°C για τη δεύτερη ωρίμαση. Όσο νωρίτερα ελάμβανε χώρα ο εμβολιασμός ως προς τα στάδια παραγωγής των τυριών (γάλα>πήγμα>τελικό προϊόν) τόσο μεγαλύτερη ήταν η επιβίωση του παθογόνου στο τελικό προϊόν, λόγω προσαρμογής και αύξησης του στα αρχικά στάδια. Επίσης, η προέλευση των κυττάρων επηρέασε σημαντικά την επιβίωσή τους με τα πλανκτονικά κύτταρα προερχόμενα από τυριά να εμφανίζουν υψηλότερη επιβίωση στο τελικό προϊόν. Τα παραπάνω υποδεικνύουν ότι η επικινδυνότητα των τυριών επηρεάζεται σημαντικά από την προέλευση των παθογόνων κυττάρων και κυρίως από το στάδιο επιμόλυνσης των προϊόντων.



## Effect of inoculum history on the survival and growth of *Listeria monocytogenes* in semi-hard and hard cheese

**Arapaki S., Belessi C.I. and Skandamis P.N.**

Laboratory of Food Quality and Hygiene, Agricultural University of Athens,  
Iera Odos 75, 118 55, Athens

*Listeria monocytogenes* is a foodborne pathogen of major concern for the dairy industry. Dairy products are commonly ready-to-eat products and the evaluation of their ability to support growth of the pathogen is crucial for risk assessment. The objective of the present study was to determine the behavior of *Listeria species* during storage of Graviera and Feta cheese. Graviera is a hard cheese (pH 5.7; aw 0.948), made of ewe's milk (or with up to 30% goat's milk), by addition of starters and reheating and ripened for 3 months. Feta is a white brine semi-hard popular Greek cheese (pH 4.5; aw 0.958), prepared from ewe's milk with starters and ripened for 2 months. Twelve *L. monocytogenes* inocula of different physiological states were inoculated in raw milk, in curd after cutting and in the final product in the middle of ripening. The 12 inocula preparations included planktonically grown cultures in maximum recovery diluent, Tryptic Soy Broth supplemented with 0.6% yeast extract, final products of feta and graviera cheese, as well as biofilm cutlures, prepared by immersing stainless steel coupons (2 x 5 cm<sup>2</sup>) in the same substrates and incubation for 4 days at 20°C. Furthermore, we used acid adapted and nonadapted cells by culturing in TSBYE with 1% glucose or without glucose, respectively. The earlier the contamination during manufacturing, the higher the survival of *L. monocytogenes* at the final product. TSBYE biofilms and milk planktonic cells survived longer than other inocula in both cheeses. Notably, in Graviera cheese, *L. monocytogenes* remained at low concentration (<2 log CFU/ml) for 82 days of storage at 4°C, whereas Feta cheese demonstrated a more detrimental effect on *L. monocytogenes* cells, as almost all inocula were below the detection limit by the 18<sup>th</sup> day of storage. The results suggest that the risk of soft and semi-hard cheeses due to contamination with *Listeria monocytogenes* strongly depends on the physiology of the pathogen, as well as the processing stage, where contamination occurs.

## Αναλύοντας τα επίπεδα μόλυνσης των φυσικών πληθυσμών των αφίδων με *Wolbachia*: δυσκολότερο από ότι φαίνεται...

**Αυγουστίνος Α.<sup>1</sup>, Διονυσοπούλου Ε.<sup>1</sup>, Παπαπαναγιώτου Α.<sup>2</sup>, Σκαρβελάκης Μ.<sup>1</sup>,  
Ντουντούμης Ε.<sup>1</sup>, Manzano Marin A.<sup>3</sup>, Moreira M.<sup>4</sup>, Khaden M.<sup>4</sup>, Latorre A.<sup>3</sup>,  
Τσιάμης Γ.<sup>1</sup> και Μπούρτζης Κ.<sup>1</sup>**

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

<sup>2</sup>Τμήμα Θερμοκηπιακών Καλλιέργειών και Ανθοκομίας, ΤΕΙ Μεσολογγίου,  
Μεσολόγγι, 30200, Ελλάδα,

<sup>3</sup>Department of Genetics, Universitat de Valencia, Valencia, Spain,

<sup>4</sup>Centro de Estudos da Macaronésia, ISOPlexis Banco de Germoplasma,  
Universidade da Madeira, Funchal, Portugal

Οι αφίδες αποτελούν σοβαρή απειλή για τα φυσικά και αγροτικά οικοσυστήματα, παρ' ότι είναι μια σχετικά μικρή ομάδα εντόμων. Υπάρχουν περίπου 4000 είδη παγκόσμια και μέχρι τώρα ~300 έχουν ταυτοποιηθεί στην Ελλάδα. Πολλές μελέτες δείχνουν ότι οι αφίδες λειτουργούν ως φορείς ιικών ασθενειών διαφόρων φυτών και παράλληλα εμφανίζουν ιδιαίτερα περίπλοκες σχέσεις με πληθώρα συμβιωτικών βακτηρίων. Ένα από τα κύρια ενδοσυμβιωτικά βακτήρια στα αρθρόποδα είναι το ακρωτεοβακτήριο *Wolbachia*, που εμπλέκεται σε πληθώρα βιολογικών διεργασιών και μπορεί να αποτελέσει ένα χρήσιμο εργαλείο για το βιολογικό έλεγχο επιβλαβών εντόμων. Η χρήση του βακτηρίου αυτού σε προγράμματα ελέγχου των πληθυσμών των αφίδων προϋποθέτει την ανίχνευση και τον γενετικό χαρακτηρισμό των στελεχών του.

Στην παρούσα μελέτη, περίπου 300 δείγματα φυσικών πληθυσμών αφίδων ελέγχθηκαν για την παρουσία του βακτηρίου της *Wolbachia*. Τα δείγματα αυτά προέρχονται από φυσικούς πληθυσμούς αφίδων της Ελλάδας, της Πορτογαλίας, της Ισπανίας, του Ιράν και του Ισραήλ και ο έλεγχος έγινε μέσω ενίσχυσης τμήματος του 16S rRNA γονιδίου. Τουλάχιστον 7% των δειγμάτων που εξετάστηκαν βρέθηκαν να έχουν το βακτήριο της *Wolbachia*. Η 16S rRNA φυλογενετική ανάλυση της *Wolbachia* από αφίδες θα συζητηθεί σε σχέση με τις "υπερομάδες" (A to K) που έχουν περιγραφεί ως τώρα. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει ότι ο χαρακτηρισμός των στελεχών με βάση τα γονίδια του συστήματος MLST (*gatB*, *coxA*, *hcpA*, *fbpA* and *ftsZ*) καθώς και του γονιδίου *wsp* παρουσιάζει δυσκολίες, γεγονός που μπορεί να αποδοθεί στα χαμηλά επίπεδα μόλυνσης των φυσικών πληθυσμών των αφίδων με *Wolbachia* και/ή στην υψηλή διαφοροποίηση που μπορεί να έχουν τα στελέχη *Wolbachia* των αφίδων από τα μέχρι τώρα χαρακτηρισμένα στελέχη.



## Shedding light to the current *Wolbachia* infection status of aphids: not an easy task...

**Augustinos A.<sup>1</sup>, Dionyssopoulou E.<sup>1</sup>, Papapanagiotou A.<sup>2</sup>, Scarvelakis M.<sup>1</sup>,  
Doudoumis E.<sup>1</sup>, Manzano Marin A.<sup>3</sup>, Moreira M.<sup>4</sup>, Khaden M.<sup>4</sup>, Latorre A.<sup>3</sup>,  
Tsiamis G.<sup>1</sup> and Bourtzis K.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Department of Environmental and Natural Resources Management, University of Ioannina,  
2 Seferi St., Agrinio 30100, Greece,

<sup>2</sup>Department of Greenhouse Crops and Floriculture, Technological Educational Institute  
of Messolonghi, Greece,

<sup>3</sup>Department of Genetics, Universitat de Valencia, Valencia, Spain,

<sup>4</sup>Centro de Estudos da Macaronésia, ISOPlexis Banco de Germoplasma,  
Universidade da Madeira, Funchal, Portugal

Aphids constitute a serious threat to natural and agricultural ecosystems, despite being a rather small group of insects. There are about 4000 species worldwide and currently ~300 species have been identified in Greece. Many studies show that aphids act as vectors for viral plant pathogens, and that they display complex interactions with their microbial fauna. One of the key symbionts in Arthropods is *Wolbachia*, an  $\alpha$ -Proteobacterium which is implicated in many important biological processes and is considered as a potential tool for biological control. Potential use of the bacterium in a biological control program for the population suppression of the aphids and/or the control of aphid-transmitted diseases requires the detection and genotyping of the *Wolbachia* strains present in natural populations.

In the present study, the presence of *Wolbachia* in approximately 300 specimens of natural populations of aphids from Greece, Spain, Portugal, Israel and Iran was examined using a 16S rRNA-based PCR assay. At least 7% of all samples tested were found to harbour *Wolbachia*. The 16S rRNA-based phylogenetic position of the aphid *Wolbachia* strains will be discussed in respect to the “supergroups” (A to K) described so far. Interestingly, *wsp* and MLST based characterization (*gatB*, *coxA*, *hcpA*, *fbpA* and *ftsZ*) could not be completed and this can be attributed to the low titre of the infection and/or to the high divergence of the aphid *Wolbachia* strains.

## Προσδιορισμός της διαφοράς στην έκφραση δυο ομολόγων γονιδίων διοξυγονάσης του 1-υδρόξυ-2-ναφθοϊκού στο *Arthrobacter phenanthrenivorans* με την τεχνική real-time PCR

**Βανδέρα, Ε.<sup>1</sup>, Καβακιώτης, Κ.<sup>1</sup>, Καλλιμάνης, Α.<sup>1</sup>, Κυρπίδης, Ν.Κ.<sup>2</sup>, Δραίνας, Κ.<sup>1</sup> και Κούκκου, Α.Ε.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Τομέας Οργανικής Χημείας και Βιοχημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα,

<sup>2</sup>DOE-Joint Genome Institute, Genome Biology Program, Walnut Creek, CA, USA

Οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, PAHs) είναι διαδεδομένοι ρυπαντές σε πολλά οικοσυστήματα και η μελέτη τους παρουσιάζει ενδιαφέρον λόγω της τοξικότητάς τους. Η αποδόμησή τους μέσω των μεταβολικών πορειών διαφόρων μικροοργανισμών αποτελεί τον καλύτερο τρόπο εξυγίανσης των ρυπασμένων οικοσυστημάτων. Σε προηγούμενη εργασία μας έχει αναφερθεί η απομόνωση και ο χαρακτηρισμός ενός νέου στελέχους του *Arthrobacter phenanthrenivorans* Sphε3 λόγω της ικανότητάς του να αναπτύσσεται παρουσία φαινανθρενίου ως μοναδική πηγή άνθρακα και ενέργειας (1). Κατά τον καταβολισμό του φαινανθρενίου σχηματίζεται το 1-υδρόξυ-2-ναφθοϊκό οξύ σαν ενδιάμεσο προϊόν, του οποίου ο αρωματικός δακτύλιος διασπάται από τη δράση της διοξυγονάσης του 1-υδρόξυ-2-ναφθοϊκού. Η συγκεκριμένη διοξυγονάση είναι μοναδική διότι έχει την ικανότητα να διασπά μονοϋδροξυλωμένο αρωματικό δακτύλιο. Στο γονιδίωμα του *A. phenanthrenivorans* έχουν βρεθεί δυο γονίδια διοξυγονάσης του 1-υδρόξυ-2-ναφθοϊκού που εμφανίζουν 90% ομολογία σε επίπεδο νουκλεοτιδίων και κωδικοποιούν δυο πρωτεΐνες 387 αμινοξέων. Ένα εξ'αυτών, το *diox1*, βρίσκεται σε ένα καταβολικό πλασμίδιο και το άλλο, *diox2*, στο χρωμόσωμα. Και το δυο γονίδια υποκλωνοποιήθηκαν στον φορέα pET29c (Novagen), ακολούθησε υπερέκφρασή τους σε κύτταρα *E. coli* BL21(DE3) και έγινε καθαρισμός των πρωτεϊνικών μορίων με χρωματογραφία στήλης αγκιστείας Ni+NTA. Τα δυο πρωτεϊνικά μόρια *Diox1* και *Diox2* εμφάνισαν δραστικότητα διοξυγονάσης του 1-υδρόξυ-2-ναφθοϊκού, με παρόμοιες καταλυτικές ιδιότητες. Με την χρήση της τεχνικής real-time PCR, έγινε ποσοτικοποίηση της σχετικής έκφρασης των μετάγραφων των δυο γονιδίων, όπου διαπιστώθηκε ότι η σχετική έκφραση του χρωμοσωμικού (*diox2*) γονιδίου ήταν σημαντικά αυξημένη σε σχέση με εκείνη του πλασμιδιακού του ομολόγου(*diox1*).

Στη συγκεκριμένη δουλειά μελετάται η ποσοτική διαφορά στην έκφραση δυο ομολόγων γονιδίων του *Arthrobacter phenanthrenivorans*. Η ύπαρξη δυο αντιγράφων της συγκεκριμένης διοξυγονάσης στο γονιδίωμα του Sphε3, καθιστά το στέλεχος πιο αποτελεσματικό στην βιοαποδόμηση των PAH και πιο προσαρμόσιμο στο ξενοβιοτικό περιβάλλον.

1. Kallimanis, A., Kavakiotis, K., Perisynakis, A., Spröer, C., Pukall, R., Drinas, C. and Koukku, A. I. (2009). *Int. J. Syst. Evol. Micr.* 59(2), 275-279.





## Differential expression of two 1-Hydroxy-2-Naphthoic Dioxygenase gene homologues in *Arthrobacter phenanthrenivorans* by quantitative real-time PCR

**Vandera, E.<sup>1</sup>, Kavakiotis, K.<sup>1</sup>, Kallimanis, A.<sup>1</sup>, Kyrpides, N.K.<sup>2</sup>, Drinas, C.<sup>1</sup> and Koukkou, A.I.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Sector of Organic Chemistry and Biochemistry, University of Ioannina, Ioannina,

<sup>2</sup>DOE-Joint Genome Institute, Genome Biology Program, Walnut Creek, CA, USA

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are widespread in various ecosystems and are pollutants of great concern due to their potential toxicity, mutagenicity and carcinogenicity. Microbial degradation represents the major mechanism responsible for the ecological recovery of PAH-contaminated sites.

In a previous work, we reported the isolation and characterization of a new species named *Arthrobacter phenanthrenivorans* Sphe3 with the ability to grow on phenanthrene as a sole source of carbon and energy (1). Phenanthrene catabolism involves the formation 1-hydroxy-2-naphthoic acid which is ring cleaved by a 1-H2NA dioxygenase. 1-H2NA dioxygenase is unique among ring cleaving dioxygenases because it can cleave a singly hydroxylated aromatic ring.

Two genes in the *A. phenanthrenivorans* genome, encoding for 1-H2NA dioxygenases with 90% homology at the nucleotide level, coding for two polypeptides of 387 amino acids, respectively have been identified. One of them, *diox1*, was located on a catabolic plasmid and the other, *diox2*, on the chromosome. Both genes were subcloned in the pET29c vector (Novagen), overexpressed in *E. coli* BL21(DE3) and purified to electrophoretic homogeneity through Ni+-NTA chromatography. Both purified protein fractions Diox1 and Diox2 exhibited 1-H2NA dioxygenase activity with similar catalytic properties. Using quantitative real-time PCR we were able to distinguish quantitative differences in the relative transcripts of the two genes encoding for 1-H2NA dioxygenases with the relative expression of the chromosomal (*diox2*) gene being significantly higher than that of its plasmid (*diox1*) homologue.

This work represents the first example of the differential expression of two 1-H2NA dioxygenase gene homologues in *Arthrobacter phenanthrenivorans*. Occurrence of two copies of 1-H2NA dioxygenase in Sphe3 renders this strain more advantageous in PAH biodegradation, and hence adaptative to the harsh xenophobic environment.

1. Kallimanis, A., Kavakiotis, K., Perisynakis, A., Spröer, C., Pukall, R., Drinas, C. and Koukkou, A. I. (2009). *Int. J. Syst. Evol. Micr.* 59(2), 275-279.

## Μετασχηματισμός ενός στελέχους *Streptococcus thermophilus* με κατάλληλο φορέα έκφρασης για τη μελέτη της περιοχής που είναι υπεύθυνη για την παραγωγή θερμοφιλίνης

**Βασιλειάδης Α.<sup>1</sup>, Ακτύπης Α.<sup>2</sup>, Χατζηλουκάς Ε.<sup>1</sup> και Αφένδρα Α.-Σ.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών & Τεχνολογιών,

<sup>2</sup>Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Επιστήμης & Τεχνολογίας Τροφίμων

Ο *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* είναι ένα οξυγαλακτικό βακτήριο που χρησιμοποιείται παραδοσιακά στην παραγωγή γιαουρτιού και μιας σειράς χαρακτηριστικών σκληρών τυριών. Το στέλεχος *S. thermophilus* ACA-DC0040 που έχει απομονωθεί από ελληνικό παραδοσιακό γιαούρτι παράγει μία βακτηριοσίνη, την θερμοφιλίνη T, ένα πεπτιδίο 2.5 kDa με αντιμικροβιακή δράση έναντι αρκετών οξυγαλακτικών βακτηρίων και βακτηρίων αλλοίωσης. Βάσει των ιδιοτήτων της μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως φυσικό συντηρητικό σε τρόφιμα που αποτελούν προϊόντα ζύμωσης.

Στα πλαίσια της μελέτης της περιοχής που φέρει το σύνολο των γονιδίων απαραίτητων για την επαγωγή, τη σύνθεση και την έκκριση της θερμοφιλίνης, απαιτείται η ανάπτυξη συστήματος μετασχηματισμού του εν λόγω στελέχους. Παρά το μεγάλο αριθμό διαθέσιμων μεθόδων μετασχηματισμού, υπάρχουν είδη και στελέχη στα οποία δεν επιτυγχάνεται εύκολα. Ειδικότερα για τα είδη του *Streptococcus*, έχει παρατηρηθεί ιδιαίτερη δυσκολία στα *S. salivarius* και *S. sobrinus*, ενώ στο δεύτερο εμφανίζεται σε πολλές περιπτώσεις μεγάλη διαφορά στην επιδεκτικότητα μεταξύ στελεχών του ίδιου είδους. Ένα επιπρόσθετο πρόβλημα αποτελεί ο κατάλληλος φορέας κλωνοποίησης λόγω του μικρού αριθμού φυσικών πλασμιδίων που έχουν βρεθεί σε στελέχη *S. thermophilus*.

Μετά την εφαρμογή και τροποποίηση αρκετών μεθόδων κατασκευάστηκαν επιδεκτικά κύτταρα του στελέχους ACA-DC0040 με πρωτόκολλο βασισμένο στην ανάπτυξη σε θρεπτικό υλικό παρουσία DL-θρεονίνης και χρησιμοποιήθηκαν στη συνέχεια για μετασχηματισμό μέσω ηλεκτροδιάτρησης με σχετικά περιορισμένη αποτελεσματικότητα. Χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο pTOPOcatpT38, ένα παράγωγο του φυσικού κρυπτικού πλασμιδίου pT38 του *S. thermophilus* ST2783, που περιέχει επιπλέον τμήμα του πλασμιδίου pCR2.1-TOPO για αντιγραφή, διατήρηση και επιλογή σε κύτταρα *E. coli*, καθώς και το γονίδιο cat του φυσικού πλασμιδίου pC194 του *Staphylococcus aureus* που προσφέρει ανθεκτικότητα στην χλωραμφενικόλη και έχει αποδειχθεί ενεργό σε στελέχη *S. thermophilus*. Το pTOPOcatpT38 αποδεικνύεται κατάλληλος φορέας κλωνοποίησης και έκφρασης στο *S. thermophilus* ACA-DC0040.



## Transformation of a *Streptococcus thermophilus* strain with an appropriate expression vector for the study of the region responsible for the production of thermophilin

**Vassiliadis A.<sup>1</sup>, Aktypis A.<sup>2</sup>, Hatziloukas E.<sup>1</sup> and Afendra A.-S.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>University of Ioannina, Department of Biological Applications and Technology,

<sup>2</sup>Agricultural University of Athens, Department of Food Science and Technology

*Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* is a lactic acid bacterium traditionally used in the manufacture of yogurt, as well as in a series of characteristic hard cheeses. *S. thermophilus* strain ACA-DC0040, isolated from traditional Greek yoghurt, produces a bacteriocin (thermophilin T) that is active against several LAB and food spoilage bacteria. Due to its properties it can be considered as a potential biopreservative.

In order to study of the region which carries all the necessary genes for the thermophilin induction, synthesis and accumulation, the development of a transformation system for this strain is required. Despite the large number of available transformation methods, there are species and strains where it cannot be achieved successfully. Especially for *Streptococcus* species, great difficulty has been observed in *S. salivarius* και *S. sobrinus*, while for the latter there is a big difference in competence between strains of the same species. An additional problem is the appropriate cloning vector due to the small number of natural plasmids found in *S. thermophilus* strains.

After the application and modification of several methods, competent ACA-DC0040 cells have been constructed by a protocol based on the growth in a broth containing DL-threonine and were subsequently used for transformation via electroporation with a relatively restricted efficiency. Plasmid pTOPOcatpT38 was used, a derivative of the natural cryptic plasmid pT38 of *S. thermophilus* ST2783, which additionally contains a fragment of pCR2.1-TOPO plasmid for replication, maintenance and selection in *E. coli* cells, as well as the cat gene of natural *Staphylococcus aureus* plasmid pC194 conferring chloramphenicol resistance and has been proved active in *S. thermophilus* strains. Plasmid pTOPOcatpT38 has been proven an appropriate cloning and expression vector in *S. thermophilus* ACA-DC0040.

## Χαρακτηρισμός αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων απομονωμένων από καλλιέργησιμα αγρωστώδη (κριθάρι, βρώμη, σιτάρι)

**Βενιεράκη Α., Δήμου Μ., Βεζύρη Ε., Κεφαλογιάννη Η., Αργύρης Ν., Λιάρα Γ.,  
Περγάλης Π., Χατζηπαυλίδης Ι. και Κατινάκης Π.**

Εργαστήριο Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας  
Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών  
Ιερά οδός 75, Βοτανικός, Αθήνα

Ελευθέρως διαβιούντα αζωτοδεσμευτικά βακτήρια που απομονώθηκαν από τη ριζόσφαιρα φυτών *Triticum aestivum*, *Hordeum vulgare* και *Avena sativa*, εκτιμήθηκαν ως προς την αζωτοδεσμευτική ικανότητά τους, την παραγωγή ινδολοξικού οξέος και την ικανότητά τους να διαλυτοποιούν φωσφορικά άλατα. Επελέγησαν 12 βακτήρια τα οποία επέδειξαν την υψηλότερη αζωτοδεσμευτική ικανότητα και αναλύθηκαν φυλογενετικά με βάση τις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των 16S rRNA, *dnaK* και *nifH* γονιδίων. Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα τα στελέχη αυτά ανήκουν στα είδη *Azospirillum brasilense*, *Azospirillum zeae* και *Pseudomonas stutzeri*. Επίσης, διερευνήθηκε η παρουσία του *ipdC* γονιδίου που εμπλέκεται στην βιοσύνθεση του ινδολοξικού οξέως. Η παρούσα εργασία παρουσιάζει για πρώτη φορά ενδείξεις για τη μοριακή γενετική αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων που διαβιούν στη ριζόσφαιρα των αγρωστώδων.



## Characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated from field-grown barley, oat and wheat

**Venieraki A., Dimou M., Vezyri E., Kefalogianni I., Argyris N., Liara G., Pergalis P., Chatzipavlidis I. and Katinakis P.**

Laboratory of General and Agricultural Microbiology  
Dept. of Agricultural Biotechnology, Agricultural University of Athens  
Iera Odos 75, Votanikos 11855, Athens, Greece

Diazotrophic bacteria isolated from the rhizosphere of *Triticum aestivum*, *Hordeum vulgare* and *Avena sativa*, were assessed for plant-growth promoting traits such as nitrogen fixation ability, indoleacetic acid production and phosphate solubilization. The phylogenetic position of 16S rRNA, *dnaK* and *nifH* gene sequences of twelve isolates, showing the higher nitrogenase activity, identified as being members of the species *Azospirillum brasilense*, *Azospirillum zeae* and *Pseudomonas stutzeri*. Furthermore, detection of genes (*ipdC*) involved in indole-3-acetic production was possible in six isolates belonging to *Azospirillum* sp. The work presented here provides the first molecular genetic evidence for the presence of culturable nitrogen-fixing *P. stutzeri* and *A. zeae* associated with field-grown *A. sativa* and *H. vulgare* in Greece.

## Αερομεταφερόμενα μικροφύκη και κυανοβακτήρια στην πόλη της Θεσσαλονίκης και επιδράσεις στην ανθρώπινη υγεία

Γενίτσαρης Σ.<sup>1</sup>, Μουστάκα-Γούνη Μ.<sup>1</sup>, Κορμάς Κ.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Θεσσαλονίκη 54124,

<sup>2</sup>Τμήμα Γεωπονίας, Ιχθυολογίας & Υδάτινου Περιβάλλοντος,  
Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας 38446

Οι δημοσιευμένες πληροφορίες για τα αερομεταφερόμενα μικροφύκη και τα κυανοβακτήρια, καθώς και τις επαγόμενες επιδράσεις τους στη δημόσια υγεία, είναι περιορισμένες. Στην ατμόσφαιρα της πόλης της Θεσσαλονίκης (καλοκαίρι 2007 – φθινόπωρο 2008) αναγνωρίστηκαν 63 είδη μικροφυκών και κυανοβακτηρίων. Τα γένη *Chlamydomonas*, *Chlorella*, *Lyngbya*, *Oscillatoria*, *Phormidium*, *Procoentrum* και *Scenedesmus* περιλαμβάνουν είδη γνωστά για την παραγωγή τοξινών ή/και την επαγωγή αλλεργικών αντιδράσεων. Είκοσι ένα από τα 63 είδη που βρέθηκαν στην ατμόσφαιρα της Θεσσαλονίκης στην πρώτη αυτή αεροβιολογική έρευνα στην πόλη, αναφέρονται για πρώτη φορά στη διεθνή βιβλιογραφία και αποτελούν το 6% των παγκοσμίως γνωστών αερομεταφερόμενων ειδών, υποστηρίζοντας την υπόθεση της ανεξερεύνητης αερο-μικροβιακής ποικιλότητας. Ανάμεσά τους οι θαλάσσιοι μικροοργανισμοί των γενών *Dictyocha*, *Leptocylindrus*, *Licmophora*, *Nitzschia* και *Procoentrum* πιθανώς είχαν αυτόχθονη προέλευση, καθώς παρατηρήθηκαν ταυτόχρονα στο φυτοπλαγκτό του Θερμαϊκού Κόλπου. Σε όλους τους μήνες του έτους, τουλάχιστον ένα γένος που περιλαμβάνει δυνητικά επιβλαβή είδη αναγνωρίστηκε ανάμεσα στους φωτοσυνθετικούς αερομεταφερόμενους μικροοργανισμούς. Το Δεκέμβριο του 2007 και τους μήνες Φεβρουάριο, Ιούνιο, Ιούλιο και Οκτώβριο του 2008 περισσότερο από το 50% της συνολικής αφθονίας των αερομεταφερόμενων μικροφυκών και κυανοβακτηρίων στην ατμόσφαιρα της Θεσσαλονίκης προέρχονταν από είδη που σχετίζονται με προβλήματα υγείας. Κατά τη διάρκεια μιας ημέρας με τη μέγιστη αφθονία αερομεταφερόμενων φωτοσυνθετικών μικροοργανισμών, ένας κάτοικος του κέντρου της πόλης μπορεί να εισπνεύσει τουλάχιστον 2500 δυνητικά επιβλαβή κύτταρα μικροοργανισμών. Προτείνεται να διερευνηθεί η σχέση μεταξύ της αφθονίας των αερομεταφερόμενων φωτοσυνθετικών μικροοργανισμών και εξάρσεων αναπνευστικών ή άλλων προβλημάτων υγείας των κατοίκων αστικών περιοχών που γειτνιάζουν με υδάτινα οικοσυστήματα τα οποία χαρακτηρίζονται από ανθίσεις επιβλαβών κυανοβακτηρίων και μικροφυκών.



## Airborne algae and cyanobacteria in the city of Thessaloniki and related health effects

Genitsaris S.<sup>1</sup>, Moustaka-Gouni M.<sup>1</sup>, Kormas K.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Botany, School of Biology, Aristotle University of Thessaloniki, GR-541 24 Thessaloniki, Greece,

<sup>2</sup>Department of Ichthyology & Aquatic Environment, School of Agricultural Sciences, University of Thessaly, GR-38446 Nea Ionia, Greece

Published information on airborne algae and cyanobacteria worldwide and the related human health effects is scarce. In the air of the city of Thessaloniki (summer 2007 - autumn 2008) we found 63 taxa of airborne algae and cyanobacteria. The genera *Chlamydomonas*, *Chlorella*, *Lyngbya*, *Prorocentrum*, *Phormidium*, *Oscillatoria* and *Scenedesmus* all include species known to produce toxins and/or induce allergic reactions. Twenty one out of 63 taxa found in the air of Thessaloniki in this first aerobiological attempt are reported for the first time and contributed 6% to the total number of globally known airborne taxa, supporting the hypothesis of undiscovered aero-microbial diversity. Among the 21 new reported airborne taxa the marine genera *Leptocylindrus*, *Licmophora*, *Nitzschia*, *Dictyocha* and *Prorocentrum* most probably had a local source, as they were simultaneously found in the nearby aquatic system of Thermaikos Gulf. In all months, at least one genus including potentially harmful members was present in the photosynthetic airborne microorganisms. In December 2007 and February, June, July and October 2008 more than 50% of the total airborne algal and cyanobacterial cells in the air of Thessaloniki comprised of members related to health problems. This means that during a day with the maximal measured abundance of airborne photosynthetic microorganisms a person could inhale at least 2500 potentially harmful microorganism cells per day. Studies on airborne algae and cyanobacteria and respiratory-related outbreaks or other related incidents in urban areas nearby to water bodies with harmful cyanobacterial and algal blooms are needed.

## **LeanGreenFood: Δίκτυο Αρχικής Εκπαίδευσης Marie Curie (FP7) σε νέες τεχνολογίες ενζυματικής επεξεργασίας συστατικών τροφίμων**

**Georgakopoulos D.G.<sup>1</sup>, Georgiou C.A.<sup>2</sup>, Janssen A.<sup>3</sup>, Mikkelsen J.<sup>4</sup>, Grunnert K.<sup>4</sup> and Olsen K.<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας,

<sup>2</sup>Γενικό Τμήμα, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών,

<sup>3</sup>Process Engineering Group, Wageningen University, Ολλανδία,

<sup>4</sup>Centre for Advanced Food Studies, Δανία

Στο δίκτυο LEANGREENFOOD θα χρησιμοποιηθούν νέες μορφές ενζύμων και ενζυματικών διεργασιών για εκχύλιση και επεξεργασία συστατικών των τροφίμων (άμυλο, πηκτίνη πρωτεΐνες), με στόχο τη μείωση της χρήσης επιβλαβών χημικών όπως του νιτρικού οξέος στη βιομηχανία της πηκτίνης και τη μείωση κατανάλωσης νερού και ενέργειας στην επεξεργασία αμύλου και πρωτεϊνών. Για τη βιομηχανία τροφίμων, η ανάπτυξη νέων συστημάτων παραγωγής με στόχο την προστασία του περιβάλλοντος και την αειφορία, σύμφωνα και με τις σχετικές απόψεις των καταναλωτών, είναι εξαιρετικά σημαντική και αναγκαία. Η βιομηχανία τροφίμων στοχεύει στη βέλτιστη χρήση φυσικών πόρων (νερό, ενέργεια), χημικών ενώσεων και συνθετικών προσθέτων τροφίμων για τη δημιουργία προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας από βιομάζα και γεωργικές πρώτες ύλες.

Η βιοτεχνολογία μπορεί να προσφέρει αυτές τις νέες στρατηγικές με την ανακάλυψη και τον σχεδιασμό νέων ενζύμων με εξειδικευμένη δράση προς ένα μόνο υπόστρωμα, σε συνθήκες υψηλής υδροστατικής πίεσης και συγκέντρωσης υποστρώματος. Στο πρόγραμμα LEANGREENFOOD θα εκπαιδευτούν νέοι επιστήμονες οι οποίοι θα ξανασχεδιάσουν τις καθιερωμένες διαδικασίες επεξεργασίας τροφίμων, θα αναπτύξουν νέες τεχνολογίες και θα γεφυρώσουν το χάσμα ανάμεσα στις βασικές βιοτεχνολογικές γνώσεις και τη βιομηχανική επεξεργασία τροφίμων.

Το LEANGREENFOOD περιλαμβάνει έξι πακέτα εργασίας: τα δύο πρώτα παρέχουν την αναγκαία εκπαίδευση σε 17 νέους ερευνητές. Τα πακέτα εργασίας 3 (μείωση χημικών), 4 (νέες αναλυτικές τεχνολογίες) και 5 (μείωση χρήσης νερού και ενέργειας) δημιουργούν ένα δυναμικό ερευνητικό περιβάλλον με οφέλη για τη βιομηχανία. Στο 6ο πακέτο εργασίας θα εκτιμηθεί η ανταπόκριση του μέσου καταναλωτή στις νέες τεχνολογίες επεξεργασίας τροφίμων σε μία συγκριτική μελέτη στην Ευρώπη και την Κίνα. Στα πλαίσια του προγράμματος προσφέρονται μαθήματα μεταπτυχιακού επιπέδου, ανοικτά ως προς τη συμμετοχή μεταπτυχιακών φοιτητών και υποψηφίων διδασκτόρων και εκτός δικτύου LEANGREENFOOD. Τον Ιούνιο του 2013 θα διεξαχθεί συνέδριο με τίτλο "Sustainable enzyme production", επίσης ανοικτό σε συμμετοχές εκτός δικτύου. Σχετικές πληροφορίες δημοσιεύονται στην ιστοσελίδα του προγράμματος: [www.leangreenfood.eu](http://www.leangreenfood.eu)



## **LeanGreenFood: A Marie Curie FP7 Initial Training Network in novel enzymatic processing of food ingredients**

**Georgakopoulos D.G.<sup>1</sup>, Georgiou C.A.<sup>2</sup>, Janssen A.<sup>3</sup>, Mikkelsen J.<sup>4</sup>, Grunnert K.<sup>4</sup> and Olsen K.<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>Department of Agricultural Biotechnology,

<sup>2</sup>Department of Science, Agricultural University of Athens,

<sup>3</sup>Process Engineering Group, Wageningen University, Netherlands,

<sup>4</sup>Centre for Advanced Food Studies, Denmark

The LEANGREENFOOD network will use enzymes to extract and modify food ingredients based on starch, pectin and proteins. This will reduce the emission of chemicals such as nitric acid in the pectin industry, and limit the water and energy use in starch and protein refinery processes. It is an imperative necessity for the food industry to develop new food production systems to meet global challenges related to environmental awareness, sustainability and consumer expectations. The challenges industry faces are better utilization of natural resources to create high-added value products from biomass/agricultural raw materials with less water consumption, reduced energy expenditure and limited use of chemical reagents and synthetic ingredients.

This can be accomplished by biotechnology where the access to novel, mono-component and more sophisticated enzymes will make a major contribution and provide new superior solutions for the food industry. The program will educate young scientists to rethink current, established food processes, to develop new technologies and fill in the gap between basic biochemical knowledge and industrial processes.

LEANGREENFOOD includes six work packages (WP): WP1, Scientific Training, and WP2, Complementary Training will deliver the necessary training of 17 young researchers, whereas three work packages WP3, Reduction of Chemicals, WP4, Novel Analytical Technologies, and WP5, Reduction of Energy and Water, will create a strong innovative research environment with powerful industrial impact. WP6 will integrate the newly developed industrial means with consumer perceptions to new analytical approaches in a comparative study of consumer attitudes in Europe and China. China is the most important growth economy today. The LEANGREENFOOD network offers graduate courses, open to participation of graduate students outside the network. A conference with title "Sustainable enzyme production" is planned for June 2013. For more information, please consult [www.leangreenfood.eu](http://www.leangreenfood.eu)

## Ποσοτικός προσδιορισμός της μεταφοράς των παθογόνων μικροοργανισμών *Salmonella enterica* ser. *Typhimurium* και *Escherichia coli* O157:H7 από επιφάνειες επεξεργασίας τροφίμων σε φιλέτα βόειου κρέατος

**Γκάνα Ε.<sup>1</sup>, Γρούντα Α.<sup>1</sup>, Χωριανόπουλος Ν.Γ.<sup>1</sup>, Σταματίου Α.<sup>1</sup>,  
Κουτσουμανής Κ.Π.<sup>2</sup>, Πανάγου Ε.Ζ.<sup>1</sup> και Νυχάς Γ.-Ι.Ε.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιερά Οδός 75, Αθήνα 11855, Ελλάδα,

<sup>2</sup>Εργαστήριο Μικροβιολογίας Τροφίμων και Υγιεινής, Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Τεχνολογίας, Γεωπονική Σχολή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Θεσσαλονίκη 54124, Ελλάδα

Η ασφάλεια και η υγιεινή του κρέατος είναι απαίτηση της νομοθεσίας, αλλά και κύριο μέλημα της βιομηχανίας τροφίμων και του καταναλωτή. Ένας από τους πιο σημαντικούς παράγοντες που συνεισφέρουν στην παραγωγή μη ασφαλών τροφίμων είναι η διασταυρούμενη επιμόλυνση που προκαλείται από κακούς χειρισμούς κατά τη διάρκεια επεξεργασίας τους. Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν ο προσδιορισμός της μεταφοράς παθογόνων μικροοργανισμών από τον εξοπλισμό επεξεργασίας τροφίμων, όπως από πάγκους κοπής διαφόρων υλικών σε νωπά φιλέτα βόειου κρέατος. Οι παθογόνοι μικροοργανισμοί που επιλέχθηκαν ήταν το βακτήριο *Salmonella enterica* ser. *Typhimurium* και *Escherichia coli* O157:H7 λόγω της ικανότητάς τους να προκαλούν τροφολιμώξη με γαστρεντερικά συμπτώματα. Η μετάδοση των βακτηρίων στον άνθρωπο γίνεται μέσω της κατανάλωσης πλημμελώς ψημένου κρέατος και μέσω της επιμόλυνσης των τροφίμων και του νερού με παθογόνους μικροοργανισμούς. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν επιφάνειες κοπής από ανοξείδωτο χάλυβα, πλαστικό και ξύλο, υλικά που απαντώνται συχνά τόσο σε οικιακό όσο και σε βιομηχανικό επίπεδο χειρισμού τροφίμων. Τα φιλέτα κρέατος ενοφθαλμίστηκαν με διαφορετικά επίπεδα επιμόλυνσης κι ήρθαν σε επαφή με τις επιφάνειες κοπής. Ακολούθησε διαδοχική επαφή με την επιμολυσμένη επιφάνεια συγκεκριμένου αριθμού μη ενοφθαλμισμένων φιλέτων. Από τα αποτελέσματα προέκυψε πως όλα τα μη ενοφθαλμισμένα φιλέτα επιμολύνθηκαν κι όπως αναμενόταν τα πρώτα φιλέτα είχαν υψηλότερους πληθυσμούς του εκάστοτε παθογόνου. Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των υλικών των επιφανειών κοπής, όσον αφορά στον αριθμό των ανά μονάδα σχηματιζόμενων αποικιών που μεταφέρονταν ανά φιλέτο. Το νωπό κρέας δεν θεωρείται υψηλού κινδύνου στην πρόκληση τροφιμογενών λοιμώξεων, ωστόσο, μπορεί να εξυπηρετεί ως έμμεση πηγή επιμόλυνσης διαμέσου της επαφής μέσω επιμολυσμένων επιφανειών.

Η εργασία χρηματοδοτήθηκε από το κοινοτικό έργο ProSafeBeef ([www.prosafebeef.eu](http://www.prosafebeef.eu)).



## Transfer of *Salmonella enterica* ser. Typhimurium and *Escherichia coli* O157:H7 from food processing surfaces to non-inoculated beef fillets

**Gkana E.<sup>1</sup>, Grounta A.<sup>1</sup>, Chorianopoulos N.G.<sup>1</sup>, Stamatiou A.<sup>1</sup>, Koutsoumanis K.P.<sup>2</sup>  
Panagou E.Z.<sup>1</sup> and Nychas G.-J.E.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Laboratory of Microbiology and Biotechnology of Foods, Department of Food Science and Technology, Agricultural University of Athens, Iera Odos 75, Athens 11855, Greece,

<sup>2</sup>Laboratory of Food Microbiology and Hygiene, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Aristotle University of Thessaloniki, Thessaloniki 54124, Greece

Meat safety is a challenge for legislation and also a main concern for the food industry and consumer. One of the most important contributing factors in the food processing industry is cross-contamination caused by inadequate handling during process. The aim of this study was to investigate the transfer of pathogens from food processing equipment (e.g. cutting boards) to beef fillets. *Salmonella enterica* ser. Typhimurium and *Escherichia coli* O157:H7 were selected as target microorganisms because of their ability to cause food poisoning disease with gastroenterical symptoms. The bacteria may be transmitted to humans by consumption of undercooked meats, or by faecal contamination of food and/or water. Stainless steel, plastic and wood cutting boards were used, as materials commonly present at domestic and industrial environments during food processing. Initially, beef fillets were inoculated with different inoculum levels of *Salmonella enterica* Typhimurium and *Escherichia coli* O157:H7 and got in touch with various cutting boards. Afterwards, a specific number of sequential non-inoculated beef fillets got in touch with the contaminated surfaces. The results demonstrated that all beef fillets were contaminated and as expected the first fillets had the highest contamination levels. No significant differences were found between the various cutting boards relative to the number of colony forming units that transferred to each beef fillet. Raw meat is not considered of high risk to cause foodborne illness, but could be a source of contamination to ready-to-eat food through indirect contact with surfaces.

**Acknowledgement:** This study was funded by ProSafeBeef integrated project ([www.prosafebeef.eu](http://www.prosafebeef.eu)) within the 6th Framework Programme of the EU.

## Μεταφορά του παθογόνου βακτηρίου *Salmonella ser. Typhimurium* από φιλέτα βόειου κρέατος σε τομάτες διαμέσου του οικιακού εξοπλισμού

**Γκάνα Ε., Πανάγου Ε.Ζ. και Νυχάς Γ.-Ι.Ε.**

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

Μια συχνή πρακτική σε οικιακό επίπεδο είναι η χρήση κοινών εργαλείων επεξεργασίας τροφίμων για νωπό κρέας και λαχανικά. Αυτό θα μπορούσε να οδηγήσει στη μεταφορά παθογόνων μικροοργανισμών διαμέσου του εξοπλισμού, δηλαδή στη διασταυρούμενη επιμόλυνση. Ένα μεγάλο ποσοστό των τροφιμογενών λοιμώξεων είναι γνωστό ότι προκαλείται από την αδυναμία των καταναλωτών να παρασκευάσουν τρόφιμα, τηρώντας τις συνθήκες υγιεινής. Η έρευνα αυτή διεξήχθη για να προσδιοριστεί η μεταφορά του παθογόνου βακτηρίου *Salmonella enterica ser. Typhimurium* από ενοφθαλμισμένα φιλέτα βόειου κρέατος σε φρέσες ντομάτες διαμέσου πλαστικής επιφάνειας κοπής και μαχαιριού από ανοξείδωτο χάλυβα. Χρησιμοποιήθηκαν 4 σενάρια καθαρισμού του εξοπλισμού: (α) κανένας χειρισμός, (β) χρήση κρύου νερού, (γ) χρήση κρύου νερού και σαπουνιού, και (δ) εφαρμογή εμπορικού σκευάσματος απολυμαντικού. Τα βόεια φιλέτα είχαν πληθυσμό 4,67 log CFU/cm<sup>2</sup> και στη τομάτα μεταφέρθηκαν 1,98 log CFU/cm<sup>2</sup> όταν δεν εφαρμόστηκε κανένας χειρισμός καθαρισμού. Οι πάγκοι κοπής και τα μαχαίρια είχαν πριν κοπεί η τομάτα 2,18 log CFU/cm<sup>2</sup> και 0,44 log CFU/cm<sup>2</sup> πληθυσμούς, αντίστοιχα. Όταν πραγματοποιήθηκε κάποιο είδος καθαρισμού, ο πληθυσμός των παθογόνων ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης, γι' αυτό ακολούθησε εμπλουτισμός και εκλεκτική απομόνωση του παθογόνου. Τα δείγματα από τις τομάτες και από τις επιφάνειες ήταν όλα θετικά, ενώ τα μαχαίρια είχαν μεγαλύτερο ποσοστό αρνητικών δειγμάτων. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης προκύπτει ότι το πλύσιμο ή η χρήση απολυμαντικών για τον καθαρισμό των οικιακών σκευών δεν προστατεύει αποτελεσματικά τα τρόφιμα από τη διασταυρούμενη επιμόλυνση αλλά ούτε και τους καταναλωτές από τις τροφιμογενείς λοιμώξεις. Έτσι, ξεχωριστοί πάγκοι κοπής και μαχαιριών θα έπρεπε να χρησιμοποιούνται για την επεξεργασία νωπών και έτοιμων προς κατανάλωση τροφίμων με σκοπό την αποφυγή διασταυρούμενων επιμολύνσεων.

Η εργασία χρηματοδοτήθηκε από το κοινωτικό έργο ProSafeBeef ([www.prosafebeef.eu](http://www.prosafebeef.eu)).



## Transfer of pathogen *Salmonella* ser. Typhimurium from beef fillets to tomatoes through kitchen equipment

**Gkana E., Panagou E.Z. and Nychas G.-J.E.**

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

A common practice in households is the use of the same utensils for both raw meat and vegetables. This practice may result in cross contamination since pathogens can be transferred to vegetables through kitchen equipment, indirectly. It is well known that, an important percentage of foodborne illness is caused by the failure of consumers to prepare food in a hygiene manner. The purpose of the current study was to examine the transfer of the pathogenic bacterium *Salmonella enterica* ser. Typhimurium from inoculated beef fillets to tomato through high-density polyethylene cutting board surface and stainless steel knife. Four scenarios of disinfection were investigated, depending on the treatment: (a) no treatment, (b) cold water, (c) cold water and soap, and (d) commercial disinfectant spray. Beef fillet population was at 4.67 log CFU/cm<sup>2</sup>, whereas 1.98 log CFU/cm<sup>2</sup> was transferred to tomato for the no disinfection scenario. Cutting boards and knives were before and after cutting tomato 2.18 log CFU/cm<sup>2</sup> and 0.44 log CFU/cm<sup>2</sup>, respectively. When cleaning was applied the number of pathogens was below the detection limit and thus Rappaport-Vassiliadis Broth was used for the enrichment and selective isolation. All samples of tomatoes and surface swabs were positive, while most of knife swabs were negative. These data suggested that washing or using spray disinfectants for cleaning kitchen equipment might not be sufficient to avoid cross contamination. Therefore, separately cutting boards and knives should be used for processing raw meat and ready-to-eat foods in order to enhance food safety.

**Acknowledgement:** This study was funded by ProSafeBeef integrated project ([www.prosafebeef.eu](http://www.prosafebeef.eu)) within the 6th Framework Programme of the EU.

## Διερεύνηση της διασποράς αντοχής σε βακτήρια δείκτες *Enterococcus* spp. που απομονώθηκαν από μονάδες βιολογικού καθαρισμού αστικών και ζωικών λυμάτων

Γραντισιώτης Μ.<sup>1</sup>, Ζδράγκας Α.<sup>2</sup>, Πιπεράκη Ε.<sup>4</sup>, Σπανάκος Γ.<sup>4</sup> και Πετρίδου Ε.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Institute of Groundwater Ecology Helmholtz Zentrum München - German Research Center for Environmental Health, Ingolstädter Landstr. 1, 85764 Neuherberg, Germany,

<sup>2</sup>ΕΘΙΑΓΕ, Ινστιτούτο Κτηνιατρικών Ερευνών Θεσσαλονίκης, Θέρμη 57001, Θεσσαλονίκη.

<sup>3</sup>Εργαστήριο Μικροβιολογίας, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ, Μικράς Ασίας 75, 115-27, Αθήνα.

<sup>4</sup>Εθνική Σχολή Δημόσιας Υγείας, Τμήμα Παρασιτολογίας, Εντομολογίας και Τροπικών νόσων, Λεωφ. Αλεξάνδρας 196, Αθήνα.

<sup>5</sup>Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Λοιμωδών Νοσημάτων, Κτηνιατρική Σχολή Α.Π.Θ., 54124 Θεσσαλονίκη.

Η αποτελεσματικότητα πέντε μονάδων βιολογικού καθαρισμού από δύο νομούς της Βόρειας Ελλάδας, ελέγχθηκε δύο φορές σε διάστημα ενός μήνα, με τη μέθοδο της καταμέτρησης των βακτηρίων δεικτών *E.coli* και *Enterococcus* spp. Δύο μονάδες ήταν ζωικών και τρεις αστικών λυμάτων. Όλα τα δείγματα βρέθηκαν εκτός ορίων.

Συνολικά απομονώθηκαν τριανταοχτώ (38) ανθεκτικά στελέχη στη βανκομυκίνη και στη σιπροφλοξασίνη (19 και 19). Εικοσιπέντε (25) στελέχη ταυτοποιήθηκαν με multiplex PCR ως *E.faecium*. Από αυτά τα 11 ήταν VRE και τα 14 CRE. Η παρουσία των υπεύθυνων γονιδίων για την αντοχή στη βανκομυκίνη (*vanA* και *vanB*) δεν επιβεβαιώθηκε με PCR σε τέσσερα από τα 11 βανκομυκίνη ανθεκτικά στελέχη *E.faecium*, πιθανόν λόγω μετάλλαξης στο *vanA* (ή *vanB*) γονίδιο. Εννιά στελέχη VRE και πέντε CRE ήταν ανθεκτικά σε υψηλά επίπεδα αμινογλυκοσίδων. Σε όλα τα στελέχη επιβεβαιώθηκε με PCR η παρουσία των *aacA-aphD* γονιδίων. Αναφορικά με την ευαισθησία των VRE στελεχών στη σιπροφλοξασίνη, 14 στελέχη βρέθηκαν ανθεκτικά, ενώ 4 βρέθηκαν ανθεκτικά στο ναλιδιξικό οξύ. Τέλος, από τα CRE μόνο 4 βρέθηκαν ανθεκτικά στη βανκομυκίνη.

Η μοριακή τυποποίηση με PFGE αποκάλυψε 4 διαφορετικές γραμμές. Υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι τα ανθρώπινης προέλευσης στελέχη VRE και CRE ανήκουν σε δύο εντελώς διαφορετικές γραμμές. Στα ζωικά στελέχη ενώ έχουμε μία μόνο γραμμή, αυτή διαιρείται σε δύο. Ενώ δεν αποκλείεται το ενδεχόμενο να υπάρχουν δύο εντελώς διαφορετικές γραμμές μία για VRE και μία CRE.



## Investigation of the distribution of drug resistance in indicator bacteria *Enterococcus* spp. isolated from urban and farm sewage works

**Granitsiotis S.M., Zdragas A., Piperaki E., Spanakos G. and Petridou E.**

The efficiency of five wastewater treatment plants from two different districts of Northern Greece were examined twice within a month, by enumeration of indicator bacteria *E.coli* and *Enterococcus* spp. Three were urban and two were farm origin while all found to be out of the acceptance limits.

In total, thirty-eight vancomycin and ciprofloxacin resistant strains of *Enterococcus* spp. (nineteen and nineteen equally shared) were isolated. Twenty-five isolates were identified by multiplex PCR as *E.faecium*, while eleven were VRE and fourteen were CRE. The presence of the known genes responsible for vancomycin resistance (*vanA* or *vanB*) was not possible to be verified, on four out of the eleven VR *E.faecium*, possibly due to a mutation to *vanA* (or *vanB*) gene. Nine VRE strains were found resistant to aminoglycosides in high level while seven CRE strains were found also resistant. The *aacA-aphD* gene was detected in all isolates. Regarding the susceptibility of the VRE strains on ciprofloxacin, fourteen strains were resistant. Another four were resistant to Nalidixic acid. Finally, regarding the CRE strains, only four were resistant to vancomycin.

The molecular typing with PFGE revealed four different lineages. There is strong evidence that there are two complete different lineages regarding the VRE and CRE of human origin. In the animal origin strains even if there is only one main lineage, it is divided in two sub-lineages. It is possible that there are actually two lineages one for VRE and one for CRE.

## Μελέτη της διασταυρούμενης επιμόλυνσης φιλέτων μόσχου από βιοϋμενικά κύτταρα των παθογόνων βακτηρίων *E. coli* O157:H7 και *Salmonella enterica* ser. Typhimurium

**Γρούντα Α.<sup>1</sup>, Γκάνα Ε.<sup>1</sup>, Χωριανόπουλος Ν.Γ.<sup>1</sup>, Ηλιόπουλος Β.<sup>1</sup>,  
Κουτσουμανής Κ.Π.<sup>2</sup>, Πανάγου Ε.Ζ.<sup>1</sup> και Νυχάς Γ.-Ι.Ε.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιερά Οδός 75, Αθήνα 11855.

<sup>2</sup>Εργαστήριο Μικροβιολογίας Τροφίμων και Υγιεινής, Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Τεχνολογίας, Γεωπονική Σχολή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Θεσσαλονίκη 54124

Σκοπό της παρούσας εργασίας αποτέλεσε η μελέτη της διασταυρούμενης επιμόλυνσης φιλέτων μόσχου λόγω σχηματισμένου βιοϋμενίου σε μεταλλική επιφάνεια (stainless steel) από τα τροφιμογενή παθογόνα βακτήρια *E. coli* O157:H7 και *Salmonella enterica* ser. Typhimurium. Για την ανάπτυξη βιοϋμενίου στην επιφάνεια από το παθογόνο βακτήριο *E. coli* O157:H7 χρησιμοποιήθηκαν τα στελέχη NCTC 12079, NCTC 13125, NCTC 13127. Για την ανάπτυξη βιοϋμενίου στην επιφάνεια από το παθογόνο βακτήριο *Salmonella enterica* ser. Typhimurium χρησιμοποιήθηκαν τα στελέχη DT193, 4/74, JH3298. Οι μικροοργανισμοί προέρχονται από την τράπεζα μικροοργανισμών του εργαστηρίου μικροβιολογίας και βιοτεχνολογίας τροφίμων του Γ.Π.Α. Από την επιμολυσμένη επιφάνεια πέρασαν διαδοχικά 6 δείγματα και πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία σε καθένα από αυτά ώστε να μετρηθεί ο πληθυσμός που αποκολλάται από το βιοϋμένιο και επιμολύνει τα φιλέτα μόσχου. Ο βαθμός επιμόλυνσης εξετάστηκε ως προς τρεις διαφορετικούς χρόνους επαφής φιλέτου-επιφάνειας (1, 5 και 15 min) και η ίδια διαδικασία επαναλήφθηκε 6 φορές (2 διαφορετικές παρτίδες κρέατος με 3 επαναλήψεις η καθεμία). Επίσης, το κάθε δείγμα αναλύθηκε με την τεχνική της Ηλεκτροφόρησης Πηκτής Εναλλασσομένου Πεδίου (Pulsed Field Gel Electrophoresis, PFGE) ώστε να διαπιστωθεί πώς μεταβάλλεται η σύσταση του βιοϋμενίου ως προς τα στελέχη που το συνιστούν από το πρώτο έως και το τελευταίο δείγμα. Ανεξάρτητα του χρόνου επαφής του φιλέτου πάνω στην επιμολυσμένη επιφάνεια και οι δύο παθογόνοι μικροοργανισμοί επιμόλυναν όλα τα δείγματα από το πρώτο μέχρι και το τελευταίο. Ειδικότερα, παρατηρήθηκε πως καθώς αυξανόταν ο χρόνος επαφής φιλέτου-επιφάνειας, οι παθογόνοι μικροοργανισμοί βρίσκονταν σε υψηλότερους πληθυσμούς στα πρώτα δείγματα ενώ παρατηρήθηκε τάση μείωσης του πληθυσμού τους με το πέρασμα των δειγμάτων. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης με την τεχνική της PFGE έδειξαν πως όλα τα στελέχη συμμετείχαν στο σχηματισμό του βιοϋμενίου, καθώς ανιχνεύονταν σε όλα σχεδόν τα δείγματα μέχρι και το τελευταίο, τόσο για το παθογόνο *E. coli* O157:H7, όσο και για το βακτήριο *Salmonella enterica* ser. Typhimurium.

Η εργασία χρηματοδοτήθηκε από το κοινοτικό έργο ProSafeBeef ([www.prosafebeef.eu](http://www.prosafebeef.eu)).





## Transfer of *E. coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* ser. Typhimurium biofilm cells to non-inoculated beef fillets

**Grounta A.<sup>1</sup>, Gkana E.<sup>1</sup>, Chorianopoulos N.G.<sup>1</sup>, Heliopoulos V.<sup>1</sup>,  
Koutsoumanis K.P.<sup>2</sup>, Panagou E.Z.<sup>1</sup> and Nychas G.-J.E.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Laboratory of Microbiology and Biotechnology of Foods, Department of Food Science, Technology and Human Nutrition, Agricultural University of Athens, Iera Odos 75, Athens 11855, Greece,

<sup>2</sup>Laboratory of Food Microbiology and Hygiene, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Aristotle University of Thessaloniki, Thessaloniki 54124, Greece

The present study was performed to evaluate the transfer of *E. coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* ser. Typhimurium biofilm cells to non-inoculated beef fillets. Three different strains were used for the biofilm formation on stainless steel surfaces from each pathogen; *E. coli* O157:H7 NCTC 12079, NCTC 13125, NCTC 13127 and *Salmonella enterica* ser. Typhimurium DT193, 4/74, JH3298. Six sequential non-inoculated beef fillets got in touch with the contaminated surface for three different times of contact (1, 5 and 15 min) and the same procedure was followed for six replicates (2 samples with 3 replications each). All samples were microbiologically analyzed to determine the level of the pathogen cells that were transferred from the biofilm onto the samples. Moreover, each sample was further analyzed by Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) to determine the strain formulation of biofilm and the strain that contaminates the samples. At all times of contact, both pathogens contaminated all sequential non-inoculated samples from the first to the sixth. Moreover, the pathogens population decreased gradually with the passage of the non-inoculated samples onto the surfaces. PFGE analysis showed that all strains of both bacteria participated in the biofilm formulation, as well as contaminated almost all of the non-inoculated samples.

**Acknowledgement:** This study was funded by ProSafeBeef integrated project ([www.prosafebeef.eu](http://www.prosafebeef.eu)) within the 6th Framework Programme of the EU.

**Βιοχημικός χαρακτηρισμός δύο μελών της FKBP οικογένειας πρωτεϊνών του *Azotobacter vinelandii* και μελέτες αλληλεπίδρασης αυτών με τη μικρή υπομονάδα της συνθετάσης του καρβάμυλο-φωσφορικού οξέος**

**Δήμου Μ., Ζωγράφου Χ., Βενιεράκη Α. και Κατινάκης Π.**

Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών,  
Ιερά Οδός 75, 11855, Βοτανικός, Αθήνα

Οι πεπτιδουλ-πρόλυλ *cis/trans* ισομεράσες (EC: 5.2.1.8) καταλύουν την *cis/trans* ισομερίωση πεπτιδουλ-πρόλυλ δεσμών ενώ μπορούν να βοηθούν και στο σωστό δίπλωμα πολυπεπτιδίων. Υπάρχουν τουλάχιστον τρεις διαφορετικές οικογένειες, οι κυκλοφιλίνες, οι πρωτεΐνες που δεσμεύουν το FK-506 (FKBPs) και οι παρβουλίνες. Αυτές οι οικογένειες πρωτεϊνών αν και δε σχετίζονται δομικά, διακρίνονται από το ότι παρεμποδίζονται από την κυκλοσπορίνη Α, το FK-506 και την 5-υδρόξυ-1, 4-ναφθοκινόνη, αντίστοιχα. Στην παρούσα εργασία περιγράφεται η έκφραση και η απομόνωση δύο ανασυνδυασμένων FKBP, των AvFKBA1 και AvFKBA2, από το αζωτοδεσμευτικό βακτήριο του εδάφους *Azotobacter vinelandii* και εξετάζονται οι βιοχημικές τους ιδιότητες. Προκειμένου να διαπιστωθεί εάν οι δύο πρωτεΐνες διαθέτουν ενεργότητα πεπτιδουλ-πρόλυλ *cis/trans* ισομεράσης, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος που βασίζεται στη χυμοθρυψίνη και εξαρτάται από τη *cis/trans* ισομερίωση πεπτιδουλ-πρόλυλ δεσμών συνθετικών τετραπεπτιδίων. Επιπλέον, με τη χρήση της μεθόδου θερμικής συσσωμάτωσης της συνθάσης του κιτρικού οξέος, προέκυψε ότι η AvFKBA2 διαθέτει και ενεργότητα τσαπερόνης. Με χρήση μεθόδων βιοπληροφορικής διαπιστώθηκε ότι η μικρή υπομονάδα της συνθετάσης του καρβάμυλο-φωσφορικού οξέος, *AncarA*, ενδεχομένως αλληλεπιδρά με τις δύο FKBP. Η φυσική τους αλληλεπίδραση επιβεβαιώθηκε με μελέτες συνέκφρασης σε κύτταρα *Escherichia coli*. Η παρουσία της *AncarA* προκαλεί μείωση της μετρούμενης ενεργότητας πεπτιδουλ-πρόλυλ *cis/trans* ισομεράσης των AvFKBA1 και AvFKBA2, γεγονός που επιβεβαιώνει την κάθε αλληλεπίδραση. Με χρήση ποσοτικού RT-PCR πραγματικού χρόνου, προέκυψε ότι τόσο τα AvFKBA1 και AvFKBA2 γονίδια όσο και το *AncarA* συνεκφράζονται σε διάφορες συνθήκες ανάπτυξης και καλλιέργειας.



## **Biochemical characterization of two FKBP family members from *Azotobacter vinelandii* and interaction studies with the small subunit of carbamoyl phosphate synthetase**

**Dimou M., Zografou C., Venieraki A. and Katinakis P.**

Department of Agricultural Biotechnology, Agricultural University of Athens,  
Iera Odos 75, 11855, Botanikos, Athens

Peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerases (PPlases, EC: 5.2.1.8) catalyze this interconversion of peptidyl-prolyl bonds while they can also act on polypeptides, as folding helper enzymes. At least three distinct families of the enzyme exist, cyclophilins, FK-506 binding proteins (FKBPs) and parvulins. These families are structurally unrelated and can be distinguished by being inhibited by cyclosporin A, FK-506 and 5-hydroxy-1, 4-naphthoquinone, respectively. Two recombinant FKBPs from the soil nitrogen-fixing bacterium *Azotobacter vinelandii*, designated as AvFKBA1 and AvFKBA2, have been purified and their peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerase activity against Suc-Ala-Xaa-Pro-Phe-pNA synthetic peptides has been characterized. AvFKBA2 but not AvFKBA1, displays chaperone function, as well, in the citrate synthase thermal aggregation assay. Using a combination of bioinformatic approaches, we identified the small subunit of carbamoyl phosphate synthetase, AvcarA, as a probable interacting partner of AvFKBA1 and AvFKBA2 and we demonstrate their physical interaction by co-expression studies. A decrease in AvFKBA1 or AvFKBA2 PPlase activity, in the presence of AvcarA, further confirms each interaction. Using real-time quantitative RT-PCR, we demonstrate that Avfkba1 and Avfkba2 are co-expressed with AvcarA under the same growth conditions.

## Μετατρέποντας απόβλητο ψημένο ελαιόλαδο σε προστιθέμενης αξίας προϊόντα με τη χρήση μυκήτων του γένους *Aspergillus*

Δήμου Α.<sup>1</sup>, Φάκας Σ.<sup>1</sup>, Διαμαντοπούλου Π.<sup>2</sup>, Φιλιπούσης Α.<sup>2</sup>,  
Γαλιώτου-Παναγιώτου Μ.<sup>1</sup>, Κωμαίτης Μ.<sup>1</sup>, Αγγελής Γ.<sup>2</sup> και Παπανικολάου Σ.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ελλάδα,

<sup>2</sup>Εθνικό Ίδρυμα αγροτικής Έρευνας, Εργαστήριο Εδώδιμων Μυκήτων,  
Άγιοι Ανάργυροι, Αθήνα, Ελλάδα,

<sup>3</sup>Τμήμα Βιολογίας, Τομέας Γενετικής, Βιολογίας Κυττάρου & Ανάπτυξης,  
Πανεπιστήμιο Πατρών, Ελλάδα

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η βιοχημική συμπεριφορά στελεχών μυκήτων του γένους *Aspergillus* καλλιεργούμενων σε απόβλητο (τηγανισμένο) ελαιόλαδο χρησιμοποιούμενο ως μόνη πηγή άνθρακα. Οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν σε αναδευόμενες φιάλες, με αρχική συγκέντρωση του απόβλητου λίπους 15 g/L, σε περιοριστικές σε άνθρακα συνθήκες. Σχεδόν σε κάθε περίπτωση, μεγάλη παραγωγή βιομάζας παρατηρήθηκε (συντελεστής παραγόμενης βιομάζας προς αναλωθέν λίπος ~1.0 g/g). Στις περισσότερες από τις περιπτώσεις οι μικροοργανισμοί παρήγαγαν βιομάζα η οποία περιείχε ενδοκυτταρικά λιπίδια σε υψηλά ποσά. Οι μεγαλύτερες ποσότητες λιπιδίων παράχθηκαν από το στέλεχος *Aspergillus* sp. ATHUM 3482 (64% κ.β. λίπος επί ξηράς ουσίας, απόλυτη τιμή ενδοκυτταρικού λίπους 7.7 g/L). Αρκετά υψηλές ενεργότητες εξωκυτταρικής λιπάσης ανιχνεύτηκαν στα υπό δοκιμή στελέχη. Το στέλεχος *A. niger* NRRL 363 παρήγαγε τη μεγαλύτερη ποσότητα λιπάσης, η οποία αντιστοιχούσε σε 645 U/mL. Κατά τη στάσιμη φάση του αυξητικού κύκλου, όλοι οι μικροοργανισμοί ανακατανάλωσαν σε μεγάλο ποσοστό τα προηγούμενως συσσωρευθέντα λιπίδια τους. Ανάλυση σε λιπαρά οξέα τόσο του κυτταρικού όσο και του παραμένοντος μη-αναλωθέντος λίπους, έδειξε σχετικά αξιοσημείωτες διαφορές σε σχέση με την αρχική σύσταση του λιπαρού υποστρώματος. Σε ορισμένες περιπτώσεις, στα ενδοκυτταρικά λιπίδια ανιχνεύτηκαν λιπαρά οξέα (π.χ. C20:0) τα οποία δεν βρίσκονταν στο αρχικό υπόστρωμα. Τέλος, όλες οι καλλιέργειες συνοδεύτηκαν από μια σχετική συσσώρευση οξαλικού οξέος στο μέσο καλλιέργειας (μέχρι 5.0 g/L).



## Converting waste cooking olive oil into added-value compounds with the aid of *Aspergillus* fungi

Dimou A.<sup>1</sup>, Fakas S.<sup>1</sup>, Diamantopoulou P.<sup>2</sup>, Philippoussis A.<sup>2</sup>,  
Galiotou-Panayotou M.<sup>1</sup>, Komaitis M.<sup>1</sup>, Aggelis G.<sup>3</sup> and Papanikolaou S.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Food Science and Technology, Agricultural University of Athens, Athens, Greece,

<sup>2</sup>National Agricultural Research Foundation, Laboratory of Edible Fungi,  
Agii Anargyri, Athens, Greece,

<sup>3</sup>Unit of Microbiology, Department of Biology, Division of Genetics, Cell and Development Biology,  
University of Patras, Patras, Greece

The aim of the present study was to assess the potential of valorization of waste cooking olive oil by fermentations carried out by fungi of the genus *Aspergillus* in order to produce biomass rich in lipids and extra-cellular lipase. Trials were performed in carbon-limited shake-flask experiments, with initial substrate fat concentration at 15 g/L. High quantities of biomass were produced (biomass yield of ~1.0 g of total biomass produced per g of fat consumed or even more) in all trials. Cellular lipids were accumulated in notable quantities in almost all cultures indicating that addition of external fatty materials clearly favored the process of lipid accumulation by the above-mentioned fungi. The strain *Aspergillus* sp. ATHUM 3482 accumulated lipid up to 64.0% (wt/wt) in dry fungal mass (that corresponded to lipid quantity 7.7 g/L). Lipase production was strain and fermentation time dependent, with a maximum activity of 645 U/mL being obtained for the strain *A. niger* NRRL 363. Storage lipid significantly decreased at the stationary growth phase, due to exhaustion of substrate fat from the medium. Analysis of both cellular and residual lipids indicated differences (in some cases remarkable) in the fatty acid composition as compared with the initial substrate fat utilized, suggesting selective incorporation and dissimilation of the fatty acids by the microorganisms tested. In some cases, fatty acids that they did not exist in the substrate (like C20:0) were found in the cellular lipids in non-negligible concentrations. Cultures of the waste cooking oil by *Aspergillus* fungi were accompanied by some production of oxalic acid (up to 5.0 g/L) into the medium.

## Επίδραση της ανάδευσης στη παραγωγή βιομάζας, πολυσακχαριτών και λιπιδίων κατά την αύξηση στελεχών φαρμακευτικών εδωδιμων μυκήτων σε υγρές καλλιέργειες

Διαμαντοπούλου Π.<sup>1</sup>, Φιλιπούσης Α.<sup>1</sup>, Παπανικολάου Σ.<sup>2</sup>, Αγγελής Γ.3  
και Κωμαίτης Μ.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Εθνικό Ίδρυμα Αγροτικής Έρευνας, Ι.Γ.Ε.Μ.Κ., Εργαστήριο Εδωδιμων Μυκήτων, Άγιοι Ανάργυροι, Αθήνα,

<sup>2</sup>Εργαστήριο Μικροβιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Τομέας Γενετικής Βιολογίας κυττάρου και Ανάπτυξης, Πανεπιστήμιο Πατρών, Πάτρα,

<sup>3</sup>Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα

Μελετήθηκε η παραγωγή βιομάζας και μεταβολικών προϊόντων (εξωπολυσακχαριτών και ενδοκυτταρικών λιπιδίων) κατά την αύξηση στελεχών εδωδιμων και φαρμακευτικών μυκήτων σε καλλιέργειες επί υποστρώματος που περιείχε γλυκόζη 30 g/l, πεπτόνη 3,0 g/l και εκχύλισμα ζύμης 3,0 g/l. Τα δεδομένα της κινητικής αύξησης υποδεικνύουν ότι η παραγωγή βιομάζας στους μύκητες *Morchella elata* και *Ganoderma applanatum* ευνοήθηκε σε στατικές (μη-αναδευόμενες) καλλιέργειες, ενώ αντίθετα οι μύκητες *Pleurotus pulmonarius*, *Flammulina velutipes*, *Lentinula edodes* και *Volvariella volvacea* αυξήθηκαν καλύτερα σε αναδευόμενες καλλιέργειες. Η μέγιστη απόδοση βιομάζας ( $\approx 8,0$  g/l) καταγράφηκε από τον *G. applanatum* μετά από 16 ημέρες επώαση σε στατικές καλλιέργειες ενώ παρόμοιες αποδόσεις ελήφθησαν από τον *V. volvacea* σε αναδευόμενες καλλιέργειες. Και στις δυο περιπτώσεις καταναλώθηκαν περίπου 10 g/l γλυκόζη. Τα στελέχη *L. edodes*, *F. velutipes* και *P. pulmonarius* παρήγαγαν σημαντικές ποσότητες εξωπολυσακχαριτών (0,38 - 0,70 g/l) μετά από 12 ημέρες επώασης, οι οποίοι αποδομούνται μετά από παρατεταμένη επώαση (μείωση 40% κατά μέσο όρο). Θετική ήταν η επίδραση της ανάδευσης στη παραχθείσα ποσότητα εξωπολυσακχαριτών ιδιαίτερα στους μύκητες *P. pulmonarius*, *F. velutipes*, *L. edodes* και *V. volvacea*. Το ποσοστό λίπους επί ξηράς ουσίας μυκηλίου κυμάνθηκε μεταξύ των τιμών 6,9% (*M. elata*) και 23,0% (*P. pulmonarius*) τη 12<sup>η</sup> ημέρα και 3,8% (*V. volvacea*) και 20,0% (*P. pulmonarius*, *L. edodes*) τη 16<sup>η</sup> ημέρα της αύξησης, ενώ οι μεγαλύτερες ποσότητες λίπους παράχθηκαν στους περισσότερους μύκητες στις αναδευόμενες καλλιέργειες. Σε πολλές περιπτώσεις οι μύκητες αποδομούν το κυτταρικό λίπος κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας, αφού τη 16<sup>η</sup> ημέρα το ποσοστό λίπους ήταν σημαντικά μικρότερο, ιδιαίτερα στις μη κινούμενες καλλιέργειες. Εξάιρεση αποτελούν οι *M. elata* και *L. edodes* που, υπό τις συγκεκριμένες συνθήκες αύξησης, φάνηκε ότι δεν χρησιμοποιούν τα κυτταρικά λιπίδια ως πηγή άνθρακα.



## Effect of agitation on biomass, exopolysaccharide and lipid production by medicinal mushroom species grown in submerged cultures

Diamantopoulou P.<sup>1</sup>, Philippoussis A.<sup>1</sup>, Papanikolaou S.<sup>2</sup>, Aggelis G.<sup>3</sup>,  
and Komaitis M.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>National Agricultural Research Foundation, I.A.M.C., Laboratory of Edible Fungi,  
Agii Anargyri, Athens, Greece,

<sup>2</sup>Laboratory of Microbiology, Department of Biology, Division of Genetics,  
Cell and Development Biology, University of Patras, Patras, Greece,

<sup>3</sup>Department of Food Science and Technology, Agricultural University of Athens,  
Athens, Greece

The production of biomass and metabolic compounds (exopolysaccharides and intracellular lipids) of six edible and medicinal fungi during their growth on substrate composed of glucose 30 g/l, peptone 3.0 g/l and yeast extract 3.0 g/l was studied. Kinetic data showed that biomass production of strains *Morchella elata* and *Ganoderma applanatum* was favoured in static (non-agitated) cultures, whereas *Pleurotus pulmonarius*, *Flammulina velutipes*, *Lentinula edodes* and *Volvariella volvacea* strains were better grown in agitated cultures. Maximum biomass production ( $\approx 8.0$  g/l) was recorded in *G. applanatum* after 16 days of incubation in static cultures whereas similar values were taken by *V. volvacea* in agitated cultures. In both instances, glucose at about 10 g/l was consumed. *L. edodes*, *F. velutipes* and *P. pulmonarius* strains produced significant quantities of exopolysaccharides (ranging between 0.38 and 0.70 g/l after 12 days incubation). It is noted that in longer incubation time (16 days) significant amounts of exopolysaccharides were degraded (reduction of exopolysaccharide quantities to around 40%). Agitation affected positively exopolysaccharides production particularly of *P. pulmonarius*, *F. velutipes*, *L. edodes* and *V. volvacea* strains. Lipid content (% wt/wt, in dry fungal mass) ranged between 6.9% (*M. elata*) and 23.0% (*P. pulmonarius*) the 12<sup>th</sup> day and 3.8% (*V. volvacea*) and 20.0% (*P. pulmonarius*, *L. edodes*) the 16<sup>th</sup> day of growth, whereas the greatest quantities of lipids (% wt/wt) were produced, in most of the trials, in agitated cultures. In many cases, cellular lipid turnover occurred, since at the 16<sup>th</sup> day of culture, lipid percentage was significantly smaller particularly in the non-agitated cultures. Exceptions comprise *M. elata* and *L. edodes* that under these specific growth conditions seemed not to degrade their cellular lipids.

## Εκτίμηση της ανάπτυξης του βακτηρίου *Escherichia coli* O157:H7 σε βόειο κιμά κατά τη συντήρησή του στην Ελληνική ψυκτική αλυσίδα

**Κακαγιάννη Μ. και Κουτσουμανής Κ.**

Γεωπονική Σχολή, Τομέας Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων,  
Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Υγιεινής Τροφίμων Α.Π.Θ.

Το παθογόνο βακτήριο *Escherichia coli* O157:H7 αποτελεί έναν από τους βασικότερους κινδύνους του φρέσκου βόειου κρέατος και τις τελευταίες δεκαετίες έχει αναγνωρισθεί ως αίτιο σε ένα σημαντικό αριθμό τροφικών δηλητηριάσεων που σχετίζονται κυρίως με την κατανάλωση προϊόντων με βάση τον κιμά από βόειο κρέας. Τα τελευταία χρόνια, ο έλεγχος τόσο του συγκεκριμένου παθογόνου όσο και γενικότερα της ασφάλειας των τροφίμων εστιάζεται κυρίως στον προσδιορισμό επικινδυνότητας. Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η συλλογή δεδομένων και η δημιουργία και αξιολόγηση εργαλείων ποσοτικής μικροβιολογίας (μαθηματικά μοντέλα) για την εκτίμηση της ανάπτυξης του *Escherichia coli* O157:H7 σε βόειο κιμά κατά τη συντήρησή του σε συνθήκες της Ελληνικής ψυκτικής αλυσίδας ως μέρους μίας μελέτης προσδιορισμού επικινδυνότητας. Αναπτύχθηκε και αξιολογήθηκε ένα μαθηματικό μοντέλο πρόβλεψης της επίδρασης της θερμοκρασίας στην ανάπτυξη του *E. coli* O157:H7 σε κιμά από βόειο κρέας, με δεδομένα που παράχθηκαν αποκλειστικά από το τρόφιμο. Εξετάστηκε η συμπεριφορά του *E. coli* O157:H7 σε κιμά από βόειο κρέας σε στατικές (από 8 έως 47°C) και δυναμικές θερμοκρασίες ψύξης. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το μοντέλο που αναπτύχθηκε μπορεί να προβλέψει με ικανοποιητική ακρίβεια τη συμπεριφορά του *E. coli* O157:H7 σε κιμά από βόειο κρέας τόσο σε σταθερές όσο και σε μεταβαλλόμενες συνθήκες θερμοκρασίας συντήρησης που προσομοιάζουν την ψυκτική αλυσίδα. Πραγματοποιήθηκε μία καταγραφή της ψυκτικής αλυσίδας του κιμά από βόειο κρέας μέσω της εξέτασης 50 ψυγείων λιανικής πώλησης, 30 δειγμάτων κατά τη μεταφορά του κιμά από ψυγεία λιανικής πώλησης σε οικιακά ψυγεία και 160 ψυγείων οικιακής χρήσης. Τα παραπάνω δεδομένα χρησιμοποιήθηκαν σε συνδυασμό με το δυναμικό μαθηματικό μοντέλο που αναπτύχθηκε για την εκτίμηση της ανάπτυξης του *E. coli* O157:H7 σε βόειο κιμά κατά τη συντήρησή του σε συνθήκες της Ελληνικής ψυκτικής αλυσίδας. Η παραπάνω εκτίμηση πραγματοποιήθηκε με βάση μία στοχαστική προσέγγιση λαμβάνοντας υπόψη τη μεταβλητότητα των θερμοκρασιακών συνθηκών συντήρησης. Τα αποτελέσματα της μελέτης παρέχουν ποσοτικά στοιχεία για τη σημαντικότητα του κάθε σταδίου της ψυκτικής αλυσίδας (λιανική πώληση, μεταφορά και συντήρηση στο οικιακό ψυγείο) και αποτελούν τη βάση για τον προσδιορισμό επικινδυνότητας του *Escherichia coli* O157:H7 σε κιμά από βόειο κρέας στην Ελλάδα.





## Assessment of *Escherichia coli* O157:H7 growth in ground beef during strorage in the Greek chill chain

**Kakagianni M. and Koutsoumanis K.**

School of Agriculture, Department of Food Science and Technology,  
Laboratory of Microbiology and Food Hygiene A.U.TH.

*Escherichia coli* O157:H7 is one of the main risks of fresh beef and it has been recognized as the cause of a significant number of food poisoning outbreaks mainly related to the consumption of products based on ground beef. In the last decade, the control of the pathogen is based on the Risk Analysis concept. The objective of this study was to collect data and to develop and validate predictive microbiology tools (mathematical models) aiming to the evaluation of the growth of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef in the Greek chill chain as a part of a risk assessment study. A predictive mathematical model of the effect of temperature on growth of *E. coli* O157:H7 in ground beef was developed and validated based on data derived exclusively from the food. The behavior of *E. coli* O157:H7 was examined in ground beef under static and dynamic temperature conditions. The results showed, that the developed model can accurately predict with the behavior of *E. coli* O157:H7 in ground beef under both static and dynamic temperature conditions simulating the chill chain. A survey of the chill chain conditions of ground beef was carried out through examination of 50 retail refrigerators, 30 samples during transport of refrigerated beef from retail refrigerators in domestic refrigerators and 160 domestic refrigerators. These data were used in combination with the developed mathematical model to evaluate the growth of *E. coli* O157:H7 in ground beef during distribution and storage in the Greek chill chain. These data were used in combination with the developed mathematical model to evaluate the growth of *E. coli* O157:H7 in ground beef during distribution and storage in the Greek chill chain. The above assessment was based on a stochastic approach taking into account the variability of temperature storage conditions. The results provide quantitative data on the importance of each stage of the chill chain (retail, transportation and storage in domestic refrigerator) and can be used as the basis for the Risk Assessment of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef in Greece.

## Φυλλόσφαιρα: Ένα φιλόξενο περιβάλλον για επίφυτα βακτήρια;

**Καραμανώλη Κ.**

Εργαστήριο Γεωργικής Χημείας, Σχολή Γεωπονίας, ΑΠΘ, 54124 Θεσσαλονίκη

Τα βακτήρια είναι οι πιο διαδεδομένοι μικροοργανισμοί της φυλλόσφαιρας. Από τους παράγοντες που επηρεάζουν την εποίκιση τους στη φυλλική επιφάνεια, ο ρόλος των δευτερογενών μεταβολιτών που παράγουν τα φυτά δεν έχει πλήρως διερευνηθεί. Στην παρούσα παρουσίαση διερευνάται η δράση τερπενοειδών που παράγονται ως μίγματα αιθερίων ελαίων κυρίως από τα αρωματικά φυτά, καθώς και φαινολικών ενώσεων και άλλων μη πτητικών μιγμάτων.

Σε μελέτη τεσσάρων αρωματικών φυτών, λεβάντας (*Lavandula angustifolia*), δενδρολίβανου (*Rosmarinus officinalis*), φασκόμηλου (*Salvia fruticosa*), και ρίγανης (*Origanum vulgare* subsp. *hirtum*), που αναπτύσσονται στον αγρό σε διπλανές θέσεις, η εποίκιση επηρεάστηκε από την ποσότητα και την σύσταση των αιθερίων ελαίων. Από τα φυτά που εξετάστηκαν, η ρίγανη συνθέτει αιθέριο έλαιο με την ισχυρότερη αντιβακτηριακή δράση, η οποία κυρίως οφείλεται στα κύρια συστατικά του, τα πτητικά ισομερή καρβακρόλη και θυμόλη. Εικόνες από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο έδειξαν ότι η περιοχή των αδενωδών τριχιδίων μπορεί να εποικιστεί από στέλεχος του σαπροφυτικού εδαφικού βακτηρίου *Pseudomonas putida* αλλά όχι από στελέχη κοινών επίφυτων βακτηρίων *Pseudomonas syringae* και *Erwinia herbicola*.

Μεγάλη είναι η περιεκτικότητα των φυτών σε φαινολικές ουσίες και ιδιαίτερα σε τανίνες. Οι ουσίες αυτές μπορεί να έχουν αντιβακτηριακή δράση, όχι μόνο λόγω της κατακρήμνισης πρωτεϊνών που προκαλούν, αλλά και λόγω της δημιουργίας συμπλεγμάτων με ιόντα σιδήρου που επιφέρουν περιορισμό της διαθεσιμότητας του για τα βακτήρια. Φυτά με υψηλή περιεκτικότητα σε τανίνες, προκάλεσαν τη σύνθεση σιδηροφόρων στο στέλεχος B728a του βακτηρίου *Pseudomonas syringae* ενώ αντίστοιχα γενετικά τροποποιημένο στέλεχος χωρίς την ικανότητα παρασκευής σιδηροφόρων ανέπτυξε χαμηλότερους πληθυσμούς στα ίδια φυτά. Επιπλέον, ο έλεγχος επίδρασης φυτικών εκχυλισμάτων στην εκδήλωση διακυτταρικής επικοινωνίας γνωστή και ως αίσθηση απαρτίας (Quorum Sensing, QS) μεταξύ των βακτηριακών κυττάρων έδειξε ότι τα εκχυλίσματα 17 φυτών από τα 52 που εξετάστηκαν είχαν επίδραση στην εκδήλωση συμπεριφορών εξαρτώμενες από την παραγωγή ακυλομοσερινο-λακτονών (AHLs) που αποτελούν το χημικό σήμα για QS, σε τουλάχιστον ένα από τα βακτήρια δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν.



## Phyllosphere: A hospitable environment for epiphytic bacteria?

**Karamanoli K.**

Lab. Agricultural Chemistry, School of Agriculture, Aristotle University of Thessaloniki,  
54124 Thessaloniki, Greece

Bacteria are by far the most abundant inhabitants of the phyllosphere. Among the factors that modulate bacterial colonization of aerial plant parts, the contribution of secondary metabolites released from plants has not yet elucidated. In the current presentation, the role of volatiles, mostly terpenoids and non-volatiles such as polyphenolic compounds are discussed. Bacteria on the phyllosphere of four aromatic plants, lavender (*Lavandula angustifolia*), rosemary (*Rosmarinus officinalis*), Greek sage (*Salvia fruticosa*), and Greek oregano (*Origanum vulgare* subsp. *hirtum*), all growing in neighboring sites, were differently distributed. Colonization was especially related to the quantity of the essential oils in their foliage and the chemistry of their major constituents. Oregano essential oil and its main constituent, carvacrol were the most potent against the tested bacteria. SEM pictures from the vicinity of glandular trichomes indicate that it can be colonized by the saprotroph soil bacterium *Pseudomonas putida*, but not by common epiphytes such as *Pseudomonas syringae* and *Erwinia herbicola*.

Higher plants produce high quantities of phenolic compounds, and especially tannins. Antibacterial activity of these compounds can attributed not only to their ability to bind proteins, but also to their property to chelate iron, reducing its bioavailability to plant-associated bacteria. Both stimulation of siderophore production in *Pseudomonas syringae* strain B728a and inhibition of growth of an isogenic mutant deficient in siderophore production were associated with plants harboring high levels of total phenolics and tannins on their leaf surface. Additionally plant extracts were tested for their interference with bacterial quorum sensing (QS). Leaf washings of 17 of 52 plant species tested stimulated or inhibited AHL-dependent traits in at least one of the bacterial reporter strains used.

## Μοριακός χαρακτηρισμός της μικροβιακής ποικιλότητας σε βιομηχανικά απόβλητα με εξασθενές χρώμιο Cr(VI)

**Κατσαβέλη Κ., Βαγενάς Δ., Τσιάμης Γ. και Μπούρτζης Κ..**

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

Το εξασθενές χρώμιο Cr(VI) αποτελεί την πιο οξειδωμένη μορφή χρωμίου και χρησιμοποιείται ευρύτατα στη βιομηχανία. Η κυρίαρχη μορφή του εξασθενούς χρωμίου στη φύση είναι το χρωμικό ιόν και αποτελεί τον κύριο τοξικό παράγοντα των βιομηχανιών που χρησιμοποιούν χρώμιο. Το εξασθενές χρώμιο είναι ευδιάλυτο στο νερό, ιδιαίτερα τοξικό και μεταλλαξιγόνο για τους περισσότερους οργανισμούς και καρκινογόνο για τον άνθρωπο. Αντίθετα, το τρισθενές χρώμιο Cr(III) είναι σημαντικό στοιχείο της διατροφής του ανθρώπου και των ζώων, σχετικά αδιάλυτο στο νερό και λιγότερο τοξικό από το εξασθενές χρώμιο. Συνήθως τα βιομηχανικά απόβλητα που περιέχουν χρώμιο υφίστανται φυσικοχημική επεξεργασία για την απομάκρυνση του Cr(VI) η οποία είναι αφενός δαπανηρή και αφετέρου η ιλύς που δημιουργείται αποτελεί πιθανή πηγή περιβαλλοντικής ρύπανσης.

Στην παρούσα εργασία χαρακτηρίσαμε το μικροβιακό πληθυσμό στα στάδια λειτουργίας στην Ελληνική Αεροπορική Βιομηχανία. Η μελέτη βασίστηκε σε: (α) βιβλιοθήκες 16S rRNA και (β) μικροσυστοιχίες PhyloChip. Μελετήσαμε 4 δείγματα: ένα δείγμα (CB) από ακραίο περιβάλλον με 25% Cr(VI) (pH 1.5 @ 55°C), και τρία δείγματα CD (pH 6.8 @ 9°C), CPR (pH 6.5 @ 9°C, και CP (pH 9.6 @ 9°C) από διαφορετικά στάδια επεξεργασίας των λυμάτων εξασθενούς χρωμίου. Η στατιστική ανάλυση (Uni-Frac) των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από τη μελέτη των βιβλιοθηκών του γονιδίου 16S rRNA έδειξε ότι οι μικροβιακές κοινότητες των τεσσάρων δειγμάτων διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους. Η ανάλυση με το *PhyloChip* επιβεβαίωσε τις οικογένειες που ανιχνεύτηκαν με τις βιβλιοθήκες του γονιδίου 16S rRNA και επιπλέον ανίχνευσε πολύ περισσότερες ταξινομικές ομάδες. Αξίζει να σημειωθεί ότι μόνο δύο γένη (*Pedobacter* και *Rhodofarax*) τα οποία ανιχνεύτηκαν με τις βιβλιοθήκες του γονιδίου 16S rRNA δεν ανιχνεύτηκαν με τη μικροσυστοιχία PhyloChip. Διαγράμματα Venn, βασισμένα στα δεδομένα των βιβλιοθηκών του γονιδίου 16S rRNA, έδειξαν ότι υπάρχει μόνο ένας κοινός φυλότυπος μεταξύ των τεσσάρων δειγμάτων. Η ανάλυση PhyloChip έδειξε ότι 181 λειτουργικά ταξινομικές ομάδες είναι κοινές στα δείγματα που μελετήθηκαν και με βιβλιοθήκες του γονιδίου 16S rRNA και με τη μικροσυστοιχία PhyloChip.



## Culture-independent analysis of microbial diversity in chromium contaminated industrial wastes

**Katsaveli K., Vagenas D., Tsiamis G. and Bourtzis K.**

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

One of the worldwide metals that have been recognized as a great hazard in the environment is chromium (Cr). Chromate is the prevalent species of Cr(VI) in natural environments and is the major pollutant from Cr-related industries. Cr(VI) is water-soluble, highly toxic and mutagenic to most organisms and carcinogenic for humans. In contrast, Cr(III) is essential for human and animal nutrition, relatively water-insoluble and less toxic than Cr(VI). Typically, Cr(VI)-consisting industrial effluents are treated by physicochemical approaches. These approaches are generally costly while the resultant metal containing sludge is a potential source of environmental pollution.

In this study, an in depth analysis of the microbial communities present in the Hellenic Aerospace Industry S.A. was achieved using 16S rRNA gene libraries and a high density DNA microarray, PhyloChip. The samples analyzed were an industrial sample from an extreme environment (CB) containing 25% Cr(VI) (pH 1.5 and 55°C) and three samples CD (pH 6.8 @ 9°C), CPR (pH 6.5 @ 9°C, και CP (pH 9.6 @ 9°C), from different stages of the wastewater Cr(VI) reduction treatment plant. Statistical analysis (UniFrac) based on 16S rRNA libraries data showed that the four sampling sites differ in the composition of bacterial communities significantly from each other. PhyloChip analysis confirmed the presence of all families detected by 16S rRNA libraries and additionally captured many more taxa. On the other hand from all the samples analyzed, only 2 genera (*Pedobacter* and *Rhodoferax*) were detected by 16S rRNA libraries and were not detected by the PhyloChip. Venn diagrams based on the 16S rRNA libraries indicate that the four samples share only one OTU while the PhyloChip revealed a much higher number. In detail, 181 OTUs were common between the samples tested with 16S rRNA libraries and PhyloChip.

## Μεταβαλλόμενη οσμωρυθμιζόμενη έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν τη συνθετάση των κυκλοπροπανοϊκών λιπαρών οξέων στο μέτριο αλόφιλο βακτήριο *Chromohalobacter salexigens*

**Κατσιφα Α.<sup>1</sup>, Παραπούλη Μ.<sup>1</sup>, Λαμπρακοπούλου Γ.<sup>2</sup>, Argandona M.<sup>3</sup>,  
Reina-Bueno M.<sup>3</sup>, Αφένδρα Α.-Σ.<sup>2</sup>, Vargas C.<sup>3</sup>, Δραΐνας Κ.<sup>1</sup>, Nieto J.3  
και Κούκκου Α.Ε.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Εργαστήριο Βιοχημείας, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, 45110 Ιωάννινα,

<sup>2</sup>Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, 45110 Ιωάννινα.

<sup>3</sup>Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Pharmacy, University of Seville, 41012 Seville, Spain

Το *Chromohalobacter salexigens* είναι ένα αλόφιλο βακτήριο, το οποίο εξαιτίας της εξαιρετικής αλατοανθεκτικότητάς του, θεωρείται μικροοργανισμός πρότυπο για τη μελέτη της οσμωπροσαρμογής στους προκαρυωτικούς μικροοργανισμούς. Απαιτεί τουλάχιστον 0.5M NaCl για την ανάπτυξή του, ενώ είναι ικανό να αναπτύσσεται σε συγκεντρώσεις άλατος έως και 3M NaCl. Σε προηγούμενη εργασία, παρατηρήσαμε αύξηση του ποσοστού των κυκλοπροπανοϊκών λιπαρών οξέων (CFA) στα φωσφολιπίδια της μεμβράνης του *C. salexigens* ως απόκριση στην αυξημένη αλατότητα. Επιπρόσθετα, στο γονιδίωμα του *C. salexigens* βρέθηκαν δύο πιθανά ομόλογα γονίδια *cfa* (*cfa1*, *cfa2*) που κωδικοποιούν τη *cfa* συνθετάση. Η *cfa* συνθετάση καταλύει τη μεταφορά μιας μεθυλομάδας από το δότη *S-adenosylmethionine* (SAM) σε ακόρεστα λιπαρά οξέα.

Προκειμένου να διευκρινιστεί ο ρόλος της αλατότητας στη μεταγραφική ρύθμιση της σύνθεσης των CFA, δημιουργήθηκαν δύο μεταγραφικές συντήξεις ανάμεσα στους πιθανούς προαγωγούς των γονιδίων *cfa*, που περιείχαν τις -35 και -10 περιοχές και στο πλασμίδιο pHS457. Συγκεκριμένα, οι περιοχές των πιθανών προαγωγών κλωνοποιήθηκαν ανοδικά του γονιδίου *gfp*, το οποίο κωδικοποιεί την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη, στο πλασμίδιο pHS457. Τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια (pHS457\_Ptcfa1 και pHS457\_Ptcfa2) μεταφέρθηκαν με σύζευξη από κύτταρα δότη DH5α τόσο στο φυσικό τύπο του *C. salexigens* DSM3043, όσο και στα αλατοευαίσθητα μεταλλαγμένα στελέχη CHR62 και CHR63. Η δραστηριότητα του προαγωγού προσδιορίστηκε με μέτρηση του φθορισμού των μετασυζευγμένων κυττάρων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις άλατος στο θρεπτικό μέσο. Οι τιμές φθορισμού έδειξαν ότι οι υπό μελέτη περιοχές παρουσίαζαν δραστηριότητα προαγωγού. Η έκφραση του *cfa1* προαγωγού ήταν αλατοεξαρτώμενη, ενώ η έκφραση του *cfa2* προαγωγού δεν επηρεαζόταν από τη συγκέντρωση άλατος.

Η παρούσα εργασία αποτελεί την πρώτη αναφορά εμπλοκής δύο γονιδίων στη σύνθεση των CFA στο *C. salexigens*. Τα αποτελέσματα ενισχύουν την άποψη ότι ο *cfa1* προαγωγός είναι υπεύθυνος για τη σύνθεση των CFA σε υψηλή αλατότητα, ενώ ότι ο *cfa2* προαγωγός εκφράζεται συνεχώς.



## Differential osmoregulated expression of genes encoding cyclopropane fatty acid synthase in the moderately halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens*

**Katsifa A.<sup>1</sup>, Parapouli M.<sup>1</sup>, Lamprakopoulou G.<sup>2</sup>, Argandoña M.<sup>3</sup>,  
Reina-Bueno M.<sup>3</sup>, Afendra A.-S.<sup>2</sup>, Vargas C.<sup>3</sup>, Drinas C.<sup>1</sup>, Nieto J.<sup>3</sup>  
and Koukkou A.I.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Laboratory of Biochemistry, Department of Chemistry, University of Ioannina,  
45110 Ioannina, Greece,

<sup>2</sup>Department of Biological Applications and Technology, University of Ioannina,  
45110 Ioannina, Greece,

<sup>3</sup>Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Pharmacy,  
University of Seville, 41012 Seville, Spain.

*Chromohalobacter salexigens* is a halophilic bacterium with a broad range of salt tolerance. It requires at least 0.5 M NaCl for growth, and can tolerate up to 3 M NaCl, being considered as a model microorganism to study prokaryotic osmoadaptation. In a previous work, we showed that under high salinity conditions *C. salexigens* membrane lipids contained a higher percentage of cyclopropanic fatty acids (CFA). Furthermore, within the *C. salexigens* genome sequence we found two putative *cfa* gene homologues (*cfa1*, *cfa2*) coding for cyclopropane fatty acid synthase. Cfa synthase catalyses the transfer of a methyl group from *S-adenosylmethionine* (SAM) to unsaturated fatty acids.

To determine the role of salt concentration to the transcriptional regulation of CFA synthesis, we created two transcriptional fusions between the regions of the two putative *cfa* genes containing –35 and –10 promoter elements and the pHS457 plasmid. More specifically, we cloned the putative promoter regions upstream of the promoterless *gfp* gene, encoding the green fluorescent protein, in the pHS457 plasmid. The recombinant plasmids (pHS457\_Ptcfa1 and pHS457\_Ptcfa2) were transferred by conjugation from DH5α donors to *C. salexigens* wild type strain DSM3043 as well as in the salt-sensitive mutants CHR62 and CHR63. Promoter activity was determined by measuring fluorescence of the transconjugant cells in presence of various salt concentrations in their growth medium. The data revealed that these two regions possessed promoter activity. Expression of *cfa1* promoter was salt-dependent, whereas expression of *cfa2* promoter was not directly affected by salt concentration.

This work represents the first example of the involvement of two genes for CFA synthesis in *C. salexigens*. It seems that *cfa1* promoter is responsible for CFA synthesis under high salinity, whereas *cfa2* promoter most likely is expressed constitutively.

## Έλεγχος προβιοτικών ιδιοτήτων μπιφιδοβακτηρίων προερχόμενα από βρεφική εντερική μικροχλωρίδα

Κιρτζαλίδου Α. Ι.<sup>1</sup>, Ντάκου Α.<sup>1</sup>, Μήτσου Ε. Κ.<sup>1</sup>, Χαλάτση Κ.<sup>1</sup>, Οικονόμου Ι.<sup>1</sup>, Κώτσου Μ.<sup>1</sup> και Κυριακού Α.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας - Διατροφής, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο, Καλλιθέα, Ελλάδα

Τα μπιφιδοβακτήρια αποτελούν μέλη της εντερικής μικροχλωρίδας του ανθρώπου και ανιχνεύονται σε ιδιαίτερα μεγάλες ποσότητες στο παχύ έντερο των νεογνών που θηλάζουν. Έχουν θεωρηθεί ως γενικά ασφαλείς μικροοργανισμοί ως προς την κατανάλωσή τους σε τρόφιμα και αρκετά στελέχη τους χρησιμοποιούνται για τον εμπλουτισμό τροφίμων ή ως συμπληρώματα διατροφής (προβιοτικά). Στη παρούσα μελέτη στελέχη μπιφιδοβακτηρίων απομονώθηκαν από την εντερική μικροχλωρίδα νεογνών και εξετάστηκαν *in vitro* για πιθανές προβιοτικές ιδιότητες. Δείγματα κοπράνων από υγιή τελειόμηνα νεογνά συλλέχθηκαν την 4<sup>η</sup>, 30<sup>η</sup> και 90<sup>η</sup> μέρα ζωής. Είκοσι δύο στελέχη μπιφιδοβακτηρίων απομονώθηκαν, ταυτοποιήθηκαν και εξετάστηκαν ως προς την ανθεκτικότητά τους σε οξέα και τα χολικά άλατα, την ικανότητα προσκόλλησης σε επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου (Caco-2), την ευαισθησία τους σε αντιμικροβιακούς παράγοντες και την αντιμικροβιακή τους δράση ενάντια σε εντερικά παθογόνα. Η ταυτοποίησή τους έγινε στην αρχή με τη βοήθεια κλασικών τεχνικών (μορφολογικά χαρακτηριστικά), αλλά στη συνέχεια μέσω μοριακών τεχνικών σε επίπεδο γένους και σε κάποια και είδους. Η πλειοψηφία των στελεχών έδειξε ευαισθησία στην αμπικιλίνη, στην αμοξυκιλλίνη/κλαβουλανικό οξύ, στην ερυθρομυκίνη, στη κεφαλοθίνη, στη χλωραμφενικόλη, στη κλινδαμυκίνη και στη νιτροφουραντόνη. Δύο από τα 22 στελέχη ήταν ανθεκτικά είτε στη βανκομυκίνη, είτε στη βακιτρακίνη ή στη τετρακυκλίνη. Τρία στελέχη ήταν ανθεκτικά στη μετρονιδαζόλη, ενώ ένα στο σεφοξιτίνη. Σχεδόν όλα τα στελέχη ήταν ανθεκτικά στα χολικά άλατα. Στον έλεγχο ανοχής στα οξέα, το 90,9% των απομονώσεων επέζησε σε pH 3 για 3 ώρες, όλα τα στελέχη ήταν ανθεκτικά στο pH 2 για 1,5 ώρα, ενώ το 68,2% των στελεχών επιβίωσε σε pH 2 μετά από τρεις ώρες επώασης. Περίπου το 30% των στελεχών έχει την ικανότητα να προσκολλάται στα Caco-2 επιθηλιακά κύτταρα του παχέος εντέρου. Τρία στελέχη εμφάνισαν αντιμικροβιακή δράση σε εντερικά παθογόνα. Συμπερασματικά τουλάχιστον δύο στελέχη (*B. longum* και *B. adolescentis*) πληρούν τα *in vitro* προβιοτικά κριτήρια και είναι πιθανά υποψήφια για *in vivo* εξέταση.





## Screening for bifidobacteria with probiotic properties in the infant gut microbiota

Kirtzalidou E. I.<sup>1</sup>, Ntakou A.<sup>1</sup>, Mitsou E.K.<sup>1</sup>, Halatsi K.<sup>1</sup>, Oikonomou I. <sup>1</sup>,  
Kotsou M.<sup>1</sup> and Kyriacou A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Dietetics and Nutritional Science, Harokopio University,  
Kallithea, Greece

Based on their naturally high numbers in the human gastrointestinal tract soon after birth and the growing history of their safe consumption in fermented products and dietary supplements, bifidobacteria enjoy 'generally regarded as safe' (GRAS) status. In this study, *Bifidobacterium* strains were isolated from infant faeces and were examined *in vitro* for potential probiotic properties. Faecal specimens from healthy, full-term infants were collected at 4, 30 and 90 days after delivery. Twenty-two *Bifidobacterium* strains were examined for acid and bile tolerance, adhesion to Caco-2 cells, antibiotic susceptibility and antimicrobial activity against selected enteric pathogens. The isolated strains were identified up to genus and some of them to the species level using molecular techniques. The great majority of the isolated bifidobacteria were susceptible to ampicillin, amoxicillin/clavulanic acid, erythromycin, cephalothin, chloramphenicol, clindamycin and nitrofurantoin. Two out of 22 strains were resistant to vancomycin, bacitracin or tetracycline. Three strains were resistant to metronidazole, while one isolate was resistant to cefoxitin. Almost all the strains exhibited significant tolerance to bile salts. Bifidobacteria were further tested for resistance to low pH conditions (pH2 and 3). Interestingly, 90.9% of the tested bifidobacteria remained unaffected at pH 3 after three hours of incubation, all strains were found resistant at pH 2 after 1.5 hours of incubation and only 68.2% of the strains remained viable after three hours of incubation. Approximately 30% of the strains were able to adhere to Caco-2 cells. Three strains were capable to inhibit one to three intestinal pathogens. In conclusion, at least two isolates (*B. longum* and *B. adolescentis*) fulfilled the *in vitro* probiotic criteria and are good candidates for further *in vivo* evaluation.

## Υπερέκφραση και απομόνωση των ενζύμων MTS and MTH από την πορεία βιοσύνθεσης τρεχαλόζης *TreY/Z* του *Brevibacterium lactofermentum* ATCC 21799

Κόλλια Κ., Δόκαλης Α., Φιλίππου Μ., Βασιλειάδης Α. και Αφένδρα Α.-Σ.

Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών & Τεχνολογιών

Η τρεχαλόζη συντίθεται από οργανισμούς ικανούς να επιβιώνουν σε συνθήκες πλήρους αφυδάτωσης και χρησιμοποιείται από αυτούς για την προστασία των κυτταρικών μεμβρανών και ενζύμων. Αυτές οι ιδιότητες την καθιστούν πολύτιμη σε φαρμακευτικές και ιατρικές εφαρμογές. Τα κορυνοειδή βακτήρια συνθέτουν τρεχαλόζη τόσο ως συστατικό του κυτταρικού τους τοιχώματος, όσο και μεταβολίτη καταπόνησης, μέσω τριών βιοσυνθετικών πορειών. Στην παρούσα εργασία επιχειρήθηκε η μελέτη της βιοσυνθετικής πορείας *TreY/Z* της τρεχαλόζης του *Brevibacterium lactofermentum* ATCC 21799 (τροποποιημένο για παραγωγή λυσίνης) η οποία περιλαμβάνει την ισομερίωση μαλτοδεξτρινών από τη συνθάση της μαλτοολιγοσουλτρεχαλόζης (MTS) προς μαλτοολιγοσουλτρεχαλόζη, από την οποία το μόριο της τρεχαλόζης αποκόπεται στη συνέχεια μέσω της τρεχαλοϋδρολάσης της μαλτοολιγοσουλτρεχαλόζης (MTH).

Τα δυνητικά γονίδια *treY* και *treZ* του *B. l.* ATCC 21799 ενισχύθηκαν, κλωνοποιήθηκαν, και προσδιορίστηκε η νουκλεοτιδική τους αλληλουχία, η οποία (πλήρης για το πιθανό *treZ*) κατέδειξε υψηλή ομολογία με γονίδια συνθάσης της μαλτοολιγοσουλτρεχαλόζης και τρεχαλοϋδρολάσης της μαλτοολιγοσουλτρεχαλόζης. Οι περιοχές αυτές ενισχύθηκαν περαιτέρω κατάλληλα και κλωνοποιήθηκαν ξεχωριστά στο φορέα υπερέκφρασης pET29c με σκοπό το σχηματισμό ενός προϊόντος σύντηξης με 6 ιστιδίνες στο αμινοτελικό άκρο του για τον καθαρισμό των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών. Σε πειράματα υπερέκφρασης μικρής κλίμακας εμφανίσθηκαν σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμίδιου πρωτεϊνικές ζώνες στο αναμενόμενο μέγεθος, οι οποίες επιπροσθέτως παρουσίασαν μικρή διαλυτότητα. Περαιτέρω ανάλυση περιλαμβάνει τον καθαρισμό των ανασυνδυασμένων ενζύμων μετά από επαγωγή σε χαμηλή θερμοκρασία ανάπτυξης, τον προσδιορισμό της ενζυμικής τους ενεργότητας και την ανίχνευση της τρεχαλόζης.



## Overexpression and isolation of *Brevibacterium lactofermentum* ATCC 21799 enzymes MTS and MTH of the trehalose biosynthetic pathway TreYZ

**Kollia K., Dokalis A., Philippou M., Vassiliadis A. and Afendra A.-S.**

University of Ioannina, Department of Biological Applications & Technologies

Trehalose is synthesized by organisms capable to survive in complete dehydration, where it is used by them for the protection of cell membranes and enzymes. These properties make it valuable in pharmaceutical and medical applications. Coryneform bacteria synthesize trehalose as a component of their cell wall and a stress metabolite by three different biosynthetic pathways. In this work, the trehalose biosynthetic pathway TreYZ of the lysine-producer *Brevibacterium lactofermentum* ATCC 21799 was approached. This includes the isomerization of maltodextrins by the maltooligosyltrehalose synthase (MTS) to maltooligosyltrehalose, of which the trehalose molecule is subsequently cleaved by maltooligosyltrehalose trehalohydrolase (MTH).

The putative *treY* and *treZ* genes of *B. l.* ATCC 21799 were amplified, cloned and sequenced. Their nucleotide sequence (complete for the putative *treZ*) showed high homology with genes encoding for maltooligosyl-trehalose synthase and maltooligosyl-trehalose trehalohydrolase, respectively. These regions were subsequently amplified accordingly and cloned individually in the overexpression vector pET29c to generate a fusion product with a C-terminal His-Tag sequence for purification of the recombinant proteins. Small-scale overexpression experiments exhibited protein bands of expected size on SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, which subsequently showed low solubility. Further analysis includes the purification of the recombinant enzymes after induction at low growth temperature, the determination of their enzymatic activity and the detection of trehalose.

## Απόκριση της δομής και της λειτουργίας της εδαφικής μικροβιακής κοινότητας σε αβιοτική και βιοτική καταπόνηση

**Κορδάτος Χ.<sup>1</sup>, Μονοκρούσος Ν.<sup>1</sup>, Μενκίσσολου Ο.<sup>2</sup>, Διαμαντόπουλος Ι.<sup>1</sup>,  
Στάμου Γ.Π.<sup>1</sup> και Παπαθεοδώρου Ε.Μ.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Τομέας Οικολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης,

<sup>2</sup>Τομέας Φυτοπροστασίας, Τμήμα Γεωπονίας,  
Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Σύμφωνα με τον Whisenat (1999) σε συστήματα με περιορισμένη διαθεσιμότητα πόρων, όπως τα Μεσογειακού Τύπου οικοσυστήματα, η επίδραση των αβιοτικών στοιχείων αναμένεται ως περισσότερο καθοριστική από αυτή των βιοτικών. Για τον έλεγχο της παραπάνω υπόθεσης διερευνήθηκε η επίδραση δύο τύπων καταπόνησης στη δομή και λειτουργία της εδαφικής μικροβιακής κοινότητας. Η αβιοτική καταπόνηση περιελάμβανε την προσθήκη νερού στο έδαφος σε εβδομαδιαία βάση ενώ η αβιοτική αναφέρεται στη λίπανση του εδάφους με κοπριά. Δύο επίπεδα παροχής νερού (50% και 150% της μέσης μηνιαίας βροχόπτωσης) και δύο επίπεδα λίπανσης (με και χωρίς κοπριά) εφαρμόστηκαν. Δείγματα συλλέχθηκαν σε δύο χρονικές στιγμές (Μάρτιο και Ιούνιο). Η διερεύνηση της δομής και της λειτουργίας της μικροβιακής κοινότητας έγινε με τη μέθοδο των φωσφολιπιδίων (PLFA) και των πλακιδίων Biolog, αντίστοιχα.

Το νερό και η λίπανση επιδρούν τον Μάρτιο συνδυαστικά στη συνολική μικροβιακή βιομάζα καθώς και στη δομή της μικροβιακής κοινότητας ενώ τον Ιούνιο ως σημαντική καταγράφεται μόνο η επίδραση του νερού. Τον Μάρτιο η βιομάζα όλων σχεδόν των ομάδων των μικροβίων εμφανίζεται αυξημένη στους ακραίους χειρισμούς (λίγο νερό-χωρίς κοπριά και πολύ νερό-με κοπριά) ενώ τον Ιούνιο υψηλότερες τιμές καταγράφηκαν στις επιφάνειες με την αυξημένη παροχή νερού. Το σύνολο των PLFA αυξάνεται σημαντικά από Μάρτιο σε Ιούνιο, με επικράτηση των Gr+ βακτηρίων τον Ιούνιο. Τέλος, οι μήκητες είναι η μόνη ομάδα μικροβίων που εξαρτάται αντιστρόφως ανάλογα από την λίπανση. Φαίνεται ότι όσον αφορά στη δομή της μικροβιακής κοινότητας, ο αβιοτικός παράγοντας είναι ο πιο σημαντικός καθώς είτε επιδρά συνδυαστικά με τον βιοτικό είτε λειτουργεί αποκλειστικά από μόνος του.

Σε αντίθεση με τις δομικές παραμέτρους, οι παράμετροι που περιγράφουν την λειτουργία της κοινότητας (μέγιστη τιμή κατανάλωσης υποστρωμάτων, ταχύτητα κατανάλωσης και λειτουργική ποικιλότητα) δεν επηρεάστηκαν σημαντικά από τους χειρισμούς σε καμία από τις δύο δειγματοληπτικές περιόδους, επιβεβαιώνοντας την άποψη περί πλεονασμού των μικροοργανισμών όταν πρόκειται για μη εξειδικευμένες εδαφικές διεργασίες. Επιπρόσθετα, η λειτουργία της βιοκοινότητας εμφάνισε έντονο χρονικό πρότυπο.



## The response of the structure and the function of the soil microbial community to biotic and abiotic disturbance

**Kordatos C.<sup>1</sup>, Monokrousos N.<sup>1</sup>, Menkisoglou O.<sup>2</sup>, Diamantopoulos J.<sup>1</sup>,  
Stamou G.P.<sup>1</sup> and Papatheodorou E.M.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Department of Ecology, School of Biology, AUTH,

<sup>2</sup>Department of Plant Protection, School of Agriculture, AUTH

According to Whisenat (1999) in healthier and high resource wildlands the communities of soil inhabitants tend to be regulated more by biotic variables compare to low- resource lands where the control is exerted mainly by abiotic variables. To explore the validity of these suggestions an experimental setup focusing on the effects of different amounts of water supply (abiotic variable) and manure application (biotic variable) on the structure and function of soil microbial community was established in a Mediterranean abandoned field, since Mediterranean soils are considered as low-resource lands. Two levels of water supply (50% and 150% of the mean monthly precipitation) and two levels of fertilization (no manure, with manure) were established. The water was supplied on a weekly basis for a six month period while fertilization was applied at once. Two samplings were conducted (March and June) and the samples were analyzed for structural and functional diversity by PLFA (phospholipid fatty acid) and Biolog techniques, respectively.

The combined effect of water and fertilization affected significant the total microbial biomass and the structure of the community in March whereas in June only the effect of water supply was significant. The biomass of the majority of the microbial groups exhibited the highest values in the two extreme treatments (50% water-no manure, 150% water-with manure) in March while in June highest values were recorded in plots with the higher water supply. The fungal biomarkers were affected negatively by fertilization. Concerning the temporal changes, the PLFA<sub>tot</sub> increased from March to June. It seems that for the structure of the microbial community our initial hypothesis is confirmed since the abiotic variable influenced significant the structure in both samplings.

Contrary to structural parameters, the parameters that describe the function of the community (maximum absorbance value, rate of substrates' consumption, functional diversity) were unaffected by the treatments in both samplings. Also, the functional parameters exhibited strong temporal changes.

## Επανεκτιμώντας την προκαρυωτική ποικιλότητα με τη χρήση των πολλαπλών αντιγράφων του 16S rRNA γονιδίου

**Κορμάς Κ.Α.**

Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας & Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών,  
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, 384 46 Νέα Ιωνία

Η χρήση της ποικιλότητας και των σχετικών αφθονιών των αλληλουχιών του γονιδίου 16S rRNA αποτελεί μια από τις πλέον αναγνωρισμένες μη-καλλιεργητικές προσεγγίσεις για την εκτίμηση της ποικιλότητας των μικροοργανισμικών ειδών σε πολύπλοκες βιοκοινότητες. Η γενική παραδοχή αυτής της μεθόδου είναι ότι σε μία βιβλιοθήκη κλώνων, κάθε μια αλληλουχία 16S rDNA αντιστοιχεί σε ένα άτομο ενός είδους/στελέχους. Ωστόσο, είναι γνωστό ότι πολλοί προκαρυωτικοί μικροοργανισμοί διαθέτουν περισσότερα από ένα αντίγραφα του γονιδίου αυτού. Στην εργασία αυτή προσδιορίστηκε ο αριθμός των αντιγράφων του 16S rDNA από τα διαθέσιμα, ολοκληρωμένα γονιδιώματα από τη βάση δεδομένων Microbial Genomes του National Center for Biotechnology Information, USA. Συνολικά, χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα από 95 γονιδιώματα των Archaea, ενώ από τα Bacteria διερευνήθηκαν 485 των Proteobacteria, τα οποία είναι ένα από τα αφθονότερα και ποικίλα φύλα των προκαρυωτών καθώς 46 γονιδιώματα των Cyanobacteria, ως η σημαντικότερη ομάδα φωτοσυνθετικών προκαρυωτών στο υδάτινο περιβάλλον. Στα Archaea, τα δύο σημαντικότερα φύλα, Crenarchaeota και Euryarchaeota, εμφάνισαν μέση τιμή  $1 \pm 0,00$  και  $1,8 \pm 0,94$  αντίγραφα του γονιδίου, αντιστοίχως. Τα Cyanobacteria εμφάνισαν παρόμοια τιμή με αυτήν των Euryarchaeota ( $1,8 \pm 0,83$ ) αλλά στα Proteobacteria παρατηρήθηκε μεγάλη διακύμανση. Έτσι, για τα πέντε σημαντικότερα υπό-φύλα των  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ - και  $\epsilon$ -Proteobacteria, ο αριθμός των αντιγράφων του 16S rDNA ήταν  $2,1 \pm 1,27$ ,  $3,7 \pm 1,67$ ,  $5,8 \pm 2,83$ ,  $3,0 \pm 1,47$  και  $2,8 \pm 0,82$ . Χρησιμοποιώντας την περίπτωση των Proteobacteria, επαναυπολογίστηκε ο δείκτης ποικιλότητας H του Shannon διορθώνοντας τις σχετικές αφθονίες των φυλοτύπων από 37 βιβλιοθήκες κλώνων 16S rDNA από έξι διαφορετικά φυσικά περιβάλλοντα, σύμφωνα με τις παραπάνω τιμές. Βρέθηκε ότι ο δείκτης H λαμβάνει σημαντικώς διαφορετικές τιμές σε δείγματα όπου η σχετική αφθονία των Proteobacteria κυμαίνεται μεταξύ 50 και 75% του συνολικού αριθμού των φυλοτύπων. Η ανάλυση συνεχίζεται συμπεριλαμβάνοντας δεδομένα και από τα υπόλοιπα φύλα των Bacteria.

## Reassessment of prokaryotic diversity based on multiple 16S rRNA gene copy number

**Kormas K.A.**

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

The use of the 16S rRNA gene diversity and its relative abundance in a natural sample, consists one of the most recognized and informative method for the estimation of biological diversity in complex microbial communities. The major assumption in this method is that in a 16S rDNA clone library, each one of the sequences corresponds to one cell of a species/strain. However, it is known that several prokaryotes have multiple 16S rRNA gene copy numbers. In the current work, the number of 16S rDNAs was determined from completed genomes retrieved from the Microbial Genomes of the National Center for Biotechnology Information, USA. In particular, 95, 485 and 46 genomes of Archaea, Proteobacteria and Cyanobacteria were checked. The two most important phyla of the Archaea, the Crenarchaeota and the Euryarchaeota, had on average  $1 \pm 0,00$  and  $1,8 \pm 0,94$  copies, respectively. Cyanobacteria showed a similar to the Euryarchaeota value ( $1,8 \pm 0,83$ ) but the Proteobacteria exhibited large variation. For the five sub-phyla of the Proteobacteria, namely the  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ - and  $\epsilon$ -Proteobacteria, the gene copy number was  $2,1 \pm 1,27$ ,  $3,7 \pm 1,67$ ,  $5,8 \pm 2,83$ ,  $3,0 \pm 1,47$  and  $2,8 \pm 0,82$ . In order to test whether such high numbers of gene copies affect the estimation of prokaryotic biodiversity, the Shannon diversity index in 37 clone libraries from six natural samples was recalculated after correcting the relative abundance of each Proteobacteria phylotype with the above average values. It was found that at least in the cases where Proteobacteria consist 50-75% of the clone library, and for such cases it is suggested to use the corrected abundances for biodiversity estimations.

## Πιθανοί μηχανισμοί με τους οποίους το στέλεχος S3/K ανάγει το Cr(VI) σε Cr(III)

**Κοτταρά Α., Κοντάνα Α., Παντζαρτζή Χ, Σκούρας Ζ. και Γιάγκου Μ.**

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

Ο βιομετασχηματισμός του Cr(VI) σε Cr(III) με βακτήρια ανθεκτικά στο χρώμιο και ταυτόχρονα ικανά να το ανάγουν προσφέρει μια οικονομική και οικολογική προσέγγιση για την αποτοξικοποίηση λυμάτων που περιέχουν Cr(VI). Έχουν απομονωθεί διάφοροι μικροοργανισμοί που διαθέτουν μηχανισμούς ανθεκτικότητας και ικανότητα αναγωγής του Cr(VI) σε Cr(III). Στην εργασία αυτή διερευνήθηκαν οι πιθανοί μηχανισμοί ανθεκτικότητας του βακτηριακού στελέχους S3/K που είναι ανθεκτικό σε υψηλές συγκεντρώσεις Cr(VI) και ταυτόχρονα το ανάγει σε Cr(III). Η ανάπτυξη του S3/K παρουσία Cr(VI) συνοδεύεται από τη σύνθεση ισχυρού κυτταρικού τοιχώματος που καθυστερεί την παθητική μεταφορά ιόντων. Η ανάπτυξη του S3/K σε θρεπτικό υλικό Nutrient Broth ή συνθετικό λύμα παρουσία Cr(VI) εξαρτάται από την παρουσία 12,5-400 mg/L σιδήρου. Έτσι, το S3/K κατατάσσεται στην ομάδα των σιδηροβακτηρίων και πιθανά τα γονίδια που συμμετέχουν στην ομοίωση στο σίδηρο να χρησιμοποιούνται επίσης για την ομοίωση στο Cr(VI). Έχει βρεθεί, επίσης, ότι σε άλλα βακτήρια ότι η ανοχή στο Cr(VI) και η αναγωγή του σε Cr(III) οφείλεται σε γονίδια που βρίσκονται τόσο στο χρωμοσωμικό όσο και στο πλασμιδιακό DNA. Παρά το γεγονός ότι το στέλεχος S3/K δεν διαθέτει πλασμιδιακό DNA, ανιχνεύθηκαν και απομονώθηκαν τα γονίδια *chrC* και *chrA* που σε άλλα βακτήρια βρίσκονται στο πλασμιδιακό DNA. Η απομόνωση των γονιδίων *chrC* και *chrA* επιβεβαίωσε την ύπαρξη δυο ακόμα μηχανισμών ανοχής/αποτοξικοποίησης του στελέχους S3/K ενάντια στο Cr(VI) και συγκεκριμένα το μηχανισμό ενάντια στο οξειδωτικό στρες που προκαλεί το Cr(VI) και το μηχανισμό μεταφοράς των ιόντων Cr(VI) εξωκυτταρικά μέσω πρωτεϊνών μεταφοράς. Επιπρόσθετα, μετά από ενζυμική αντίδραση τόσο του κυτταρικού εκχυλίσματος όσο και του εκχυλίσματος των κυτταρικών τοιχωμάτων του S3/K με 1,5 mg/L Cr(VI) παρατηρήθηκε ότι στα εκχυλίσματα περιέχεται ένζυμο(a), που δεν εξαρτάται από το NADH και συμμετέχει στην αναγωγή του Cr(VI) σε Cr(III). Όλα τα παραπάνω δείχνουν ότι το στέλεχος S3/K διαθέτει τουλάχιστον 4 μηχανισμούς ανοχής στο Cr(VI) και ταυτόχρονα μηχανισμούς όπου ένζυμοι ανάγουν στο κυτταρικό τοίχωμα και στο κυτόπλασμα το Cr(VI) σε Cr(III).





## Potential mechanisms through which strain S3/K reduces Cr(VI) to Cr(III)

**Kottara A., Kontana A., Pantzartzi C., Scouras Z. and Yiangou M.**

Dept. of Genetics, Development & Molecular Biology, School of Biology, AUTH

Biotransformation of Cr(VI) to less-toxic Cr(III) by chromate-resistant and reducing bacteria has offered an ecological and economical option for chromate detoxification and bioremediation. Several microorganisms exhibiting mechanisms of resistance and capacity to reduce Cr(VI) to Cr(III), have been isolated. In this study we determined the mechanisms by which the bacterial strain S3/K exhibits resistance to Cr(VI) and capacity to reduce it to Cr(III). Growth of S3/K in the presence of Cr(VI) depends on the addition of FeCl<sub>3</sub> in the culture medium suggesting that S3/K belongs to the group of iron oxidizing bacteria. Therefore gene products involved in iron homeostasis may also participate in Cr(VI) detoxification. In the presence of Cr(VI) S3/K strain compose a strong cellular wall that inhibits passive ion transfer. Resistance to Cr(VI) is also achieved by chrC and chrA gene products exhibiting capacity to ameliorate oxidative stress and the extracellular transport of Cr(VI) through chaperones respectively. Moreover, S3/K strain cellular extracts or cell wall fragment exhibit *in vitro* enzymatic capacity to reduce Cr(VI) to the less-toxic Cr(III) form. Thus, S3/K strain exhibits capacity to tolerate at 500 mg/L Cr(VI) by exhibiting 4 detoxification-tolerance mechanisms as well as chromium reducing enzymes located both in cytoplasm and cell wall.

## Τα πλήρη γονιδιώματα τριών στελεχών του αιθανολοπαραγωγού βακτηρίου *Zymomonas mobilis*: διαπιστώσεις σε επίπεδο συγκριτικής γονιδιωματικής

Κουβέλης Β.Ν.<sup>1</sup>, Saunders E.<sup>2</sup>, Brettin T.S.<sup>2</sup>, Detter C.<sup>2</sup>, Han C.<sup>2</sup>, Davenport K.<sup>2</sup>,  
Tapia R.<sup>2</sup>, Bruce D.<sup>3</sup>, Κυρπίδης Ν.<sup>3</sup>, Τύπας Μ.Α.<sup>1</sup> και Παπά Κ.Μ.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Τομέας Γενετικής & Βιοτεχνολογίας, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ, Αθήνα,

<sup>2</sup>DOE Joint Genome Institute, Bioscience Division, LANL, Los Alamos NM, USA;

<sup>3</sup>DOE Joint Genome Institute, Walnut Creek CA, USA.

Το *Zymomonas mobilis* είναι αιθανολοπαραγωγό α-πρωτεοβακτήριο που εμπλέκεται σε παραγωγή βιοαιθανόλης. Προκειμένου να αποκτηθεί βαθιά και ουσιαστική γνώση της βιολογίας του οργανισμού, έξι διαφορετικά στελέχη που ανήκουν στα δύο βασικά υποείδη του (subsp. *mobilis* και *romaceae*), απομονωμένα από διάφορα μέρη του κόσμου, βρίσκονται υπό ανάλυση στα US DOE-JGI και ΕΚΠΑ. Οι πλήρεις αλληλουχίες των στελεχών *Z. mobilis* subsp. *mobilis* NCIMB 11163 και ATCC 10988 (λεκτότυπος υποείδους) και *Z. mobilis* subsp. *romaceae* ATCC 29192 (λεκτότυπος υποείδους), παρουσιάζονται στην παρούσα εργασία στο σύνολό τους (χρωμοσωμικό και πλασμιδιακό γονιδίωμα), και συγκρίνονται μεταξύ τους αλλά και με το στέλεχος αναφοράς *Z. mobilis* subsp. *mobilis* ATCC 31821 ZM4. Το τελευταίο είναι το βιομηχανικό *Z. mobilis* στέλεχος που ως επί το πλείστον χρησιμοποιείται στις ΗΠΑ, και του οποίου το γονιδίωμα πρόσφατα επαναλληλουχήθηκε και επισημειώθηκε χάρη σε κοινή προσπάθεια των US DOE-JGI/US DOE-ORNL και ΕΚΠΑ. Το χρωμόσωμα του NCIMB 11163 είναι ομόλογο και συνταινικό με αυτό του ZM4, με εξαίρεση περιοχή δύο γονιδιωματικών νησίδων υψηλής ετερολογίας και σύστασης σε G/C, μία από τις οποίες φέρει πλήρες συνεργίωμα συζευκτικής μεταφοράς. Αντίθετα, το στέλεχος ATCC 10988 εμφανίζει γονιδίωμα «ρευστό» και αναδιοργανωμένο: αποτελείται από επτά replicons - ένα χρωμόσωμα και έξι πλασμίδια - και φέρει πολλαπλά αντίγραφα μεταθετών στοιχείων. Τέλος, το ATCC 29192 αποκλίνει από τα υποείδη *mobilis* σε συνολικό επίπεδο ομολογίας της αλληλουχίας του καθώς και σε αριθμό διαφορετικών γονιδίων - γεγονός αναμενόμενο με βάση τη φαινοτυπική του διαφοροποίηση και τη διακριτή του ταξινόμηση. Καταληκτικά, τα υπό μελέτη στελέχη του *Z. mobilis*, αν και του ίδιου είδους, παρουσιάζουν αξιοσημείωτες διαφορές. Η ολοκλήρωση της αλληλούχησης και επεξεργασίας των γονιδιωμάτων όλων των στελεχών θα επιτρέψει μελέτες συγκριτικής/λειτουργικής γονιδιωματικής, ενώ σε επίπεδο εφαρμογών θα συνεισφέρει άμεσα στη δημιουργία βέλτιστου αιθανολοπαραγωγού στελέχους.



## The complete genomes of three ethanol-producing *Zymomonas mobilis* strains: insights in comparative genomics

**Kouvelis V.N.<sup>1</sup>, Saunders E.<sup>2</sup>, Brettin T.S.<sup>2</sup>, Detter C.<sup>2</sup>, Han C.<sup>2</sup>, Davenport K.<sup>2</sup>,  
Tapia R.<sup>2</sup>, Bruce D.<sup>3</sup>, Kyripides N.C.<sup>3</sup>, Typas M.A.<sup>1</sup> and Pappas K.M.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Department of Genetics & Biotechnology, Faculty of Biology, NKUA, Athens, Greece;

<sup>2</sup>DOE Joint Genome Institute, Bioscience Division, LANL, Los Alamos NM, USA;

<sup>3</sup>DOE Joint Genome Institute, Walnut Creek CA, USA.

*Zymomonas mobilis* is an ethanologenic  $\alpha$ -proteobacterium implicated in bioethanol production. In order to gain fundamental insights into the biology of this organism, six different strains belonging to two of its most-known subspecies (subsp. *mobilis* and *pomaceae*), isolated from various parts of the globe, are under current analysis at the US DOE-JGI and the NKUA. The finished and annotated genome sequences of the *Z. mobilis* subsp. *mobilis* strains NCIMB11163 and ATCC10988 (subsp. lectotype), and of the *Z. mobilis* subsp. *pomaceae* strain ATCC29192 (subsp. lectotype), are here presented in their entirety (chromosomal and plasmid content) and are compared to each other and to reference strain ATCC31821 ZM4. The latter is the US industrial strain that was recently resequenced and reannotated via a joint effort between the DOE-JGI/ DOE-ORNL and the NKUA. The chromosomal genome of NCIMB11163 proved to be homologous and syntenic to that of ZM4, with the exception of two unique high-G/C islands, one of which bears a complete conjugal transfer operon. Contrarily, ATCC10988 appears to have a most fluid and rearranged genome: it consists of 7 replicons - a single chromosome and six plasmid species - and harbors multiple insertion elements. Lastly, ATCC29192 is the most deviant in total sequence homology and contains a considerable number of unique genes, which complies well with its overall phenotypic difference and distinct classification. Overall, the so far examined *Z. mobilis* strains exhibit marked differences in their genomes, a finding quite interesting since they belong to the same species. By completion, the on-going sequencing endeavor on *Z. mobilis* will offer a sound basis for comparative and functional genomics analysis, knowledge of which will directly contribute to synthetic biology aims and the built of an optimal ethanol-producing strain.

## Ατομική συμπεριφορά μικροβιακών κυττάρων: Η μετάβαση από την κλασική στη στατιστική μικροβιολογία

**Κουτσουμανής Κ. και Λιανού Α.**

Γεωπονική Σχολή, Τομέας Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων,  
Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Υγιεινής Τροφίμων Α.Π.Θ.

Η κλασική μικροβιολογία περιγράφει την συμπεριφορά μικροβιακών πληθυσμών στο σύνολο τους, χωρίς να λαμβάνει υπόψη τα μεμονωμένα κύτταρα. Παρόλα αυτά, στην πραγματικότητα, η παρουσία των μικροοργανισμών, και ιδιαίτερα των παθογόνων, στη φύση (τρόφιμα, περιβάλλον, οργανισμούς) παρατηρείται σε πολύ χαμηλά επίπεδα της τάξης των μερικών ή και του ενός κυττάρου. Η μελέτη λοιπόν της συμπεριφοράς μεμονωμένων κυττάρων έχει μεγάλη πρακτική σημασία. Στην παρούσα μελέτη αναπτύξαμε μια μέθοδο μικροσκοπίας με στόχο την καταγραφή της αποικιακής αύξησης μεμονωμένων κυττάρων. Στα πλαίσια της μελέτης καταγράφηκε η κινητική συμπεριφορά πληθυσμών της *Salmonella* Typhimurium προερχόμενων από μεμονωμένα κύτταρα στους 25°C σε tryptone soy agar. Μετά την καταμέτρηση των κυττάρων, τα δεδομένα μετατράπηκαν στις αντίστοιχες καμπύλες αύξησης, με τις τελευταίες να απεικονίζουν τον ακριβή αριθμό των κυττάρων σε κάθε αποικία με την πρόοδο του χρόνου, και με κάθε ξεχωριστή αποικία να προέρχεται από ένα μεμονωμένο κύτταρο. Οι καμπύλες αύξησης προσαρμόστηκαν στη συνέχεια σε ένα πρωτογενές μοντέλο με στόχο τον προσδιορισμό του χρόνου φάσης προσαρμογής καθώς και του ρυθμού ανάπτυξης. Διαφορετικές δοκιμές προσαρμογής της ίδιας αποικίας έδειξαν ότι ο εκτιμώμενος χρόνος φάσης προσαρμογής δεν επηρεάζεται από τον τελικό αριθμό κυττάρων της αποικίας, ενώ ο εκτιμώμενος ρυθμός ανάπτυξης σταθεροποιείται όταν ο τελικός αριθμός κυττάρων εντός της αποικίας φτάνει τα 20-25. Ο χρόνος φάσης προσαρμογής της αποικιακής αύξησης μεμονωμένων κυττάρων κυμάνθηκε από 0 έως 4,1 h (μέση τιμή: 1,5 h) με συντελεστή παραλλακτικότητας 47,4%. Ο ρυθμός ανάπτυξης (μέση τιμή: 0,78 h<sup>-1</sup>) έδειξε μικρότερη αλλά εξίσου σημαντική παραλλακτικότητα με συντελεστή παραλλακτικότητας 18,2%. Δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση μεταξύ του χρόνου φάσης προσαρμογής και του ρυθμού αύξησης, υποδεικνύοντας μια παραλλακτικότητα της φυσιολογικής κατάστασης ( $h_0$ =χρόνος φάσης προσαρμογής × ρυθμός ανάπτυξης) μεμονωμένων κυττάρων. Η μέση τιμή της παραμέτρου  $h_0$  ήταν 1,24 με συντελεστή παραλλακτικότητας 57,2%. Η μέθοδος η οποία παρουσιάζεται στην παρούσα μελέτη καθιστά δυνατή την καταγραφή και μοντελοποίηση της αποικιακής αύξησης μεμονωμένων κυττάρων προσομοιάζοντας τη βακτηριακή αύξηση. Πέραν του καθαρά επιστημονικού ενδιαφέροντος σχετικά με την κατανόηση της συμπεριφοράς μεμονωμένων κυττάρων, τα δεδομένα της συγκεκριμένης μελέτης μπορεί να είναι ιδιαίτερα χρήσιμα σε προαγεγνιστούς προσδιορισμού επικινδυνότητας. Με βάση αυτά τα δεδομένα, παρουσιάζονται προσομοιάσεις μικροβιακής αύξησης, υποδεικνύοντας τη σημασία της συμπεριφοράς μεμονωμένων κυττάρων για τη στοχαστική μοντελοποίηση και τον προσδιορισμό έκθεσης σε μικροβιακούς κινδύνους.



## Behaviour of single microbial cells: From classical to statistical microbiology

**Koutsoumanis K. and Lianou A.**

Laboratory of Food Microbiology and Hygiene, Department of Food Science and Technology,  
School of Agriculture, Aristotle University of Thessaloniki

Classical microbiology describes the behaviour of microbial populations as a whole, without considering single cells. However, in reality, microorganisms, and particularly foodborne pathogens, are present in nature (foods, environment, and living organisms) at very low levels (few cells or even one cell). Therefore, the study of the behavior of single microbial cells is of great practical significance. In the present study we developed a time-lapse microscopy method aiming at monitoring the colonial growth of single cells. In the context of this study, the growth kinetic behaviour of populations of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium originating from single cells was monitored at 25°C on tryptone soy agar. After cell counting, data were transformed into the respective growth curves, with the latter illustrating the exact number of bacterial cells in each colony as a function of time, and with each colony originating from a single cell. The growth curves were then fitted to a primary model in order for the growth parameters (i.e. lag phase and growth rate) to be determined. Different fitting trials corresponding to the same bacterial colony demonstrated that the estimated lag phase is not affected by the final number of cells in the colony, while the estimated growth rate appeared to be stabilized when the final cell number in the colony reaches 20-25. The estimated lag phase of single cell colonial growth ranged from 0 to 4.1 h (mean value: 1.5 h) with a coefficient of variation of 47.4%. The estimated growth rate (mean value: 0.78 h<sup>-1</sup>) showed less but still considerable variability with a coefficient of variation of 18.2%. No correlation was observed between the lag phase and the growth rate, indicating the existence of a corresponding variability in the physiological state ( $h_0 = \text{lag phase} \times \text{growth rate}$ ) of single cells. The mean value of  $h_0$  was 1.24 with a coefficient of variation of 57.2%. The method described in the present study allows for the evaluation and modeling of single cell colonial growth, simulating bacterial growth on solid foods. Besides the scientific interest in understanding the behavior of single cells, the data collected in this study may be very useful in microbial risk assessment. Based on these data, simulations of microbial growth are presented, illustrating the importance of single cell behavior in stochastic modeling and assessment of exposure to microbial hazards.

## Εφαρμογή ενός πολυφασματικού συστήματος ανάλυσης εικόνας στην πρόβλεψη της μικροβιακής αλλοίωσης του κρέατος

**Κυριακοπούλου Α.Β., Μπλάνα Β., Σταματίου Α.Π., 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

Οι οπτικές ιδιότητες μπορεί να δώσουν χρήσιμες πληροφορίες για την ποιότητα ενός τροφίμου και είναι δυνατόν να αποτελέσουν σημαντικό εν δυνάμει δείκτη ποιότητας. Για το λόγο αυτό, η ανάλυση εικόνας (image analysis) θα μπορούσε να αποτελέσει ένα σύγχρονο, απλό και αξιόπιστο εργαλείο στον προσδιορισμό της ποιότητας των τροφίμων. Κύριο πλεονέκτημα της μεθόδου είναι η δυνατότητα λήψης φασματικών δεδομένων με αποτέλεσμα την άμεση συσχέτιση της οπτικής πληροφορίας με τις χημικές μεταβολές στην επιφάνεια του τροφίμου. Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η διερεύνηση της δυνατότητας συσχέτισης φασματικών δεδομένων που ελήφθησαν από σύστημα ανάλυσης εικόνας (VideometerLab) με τη μεταβολή του μικροβιακού πληθυσμού στην επιφάνεια φιλέτων βοείου κρέατος κατά τη συντήρηση σε διαφορετικές θερμοκρασίες. Για το σκοπό αυτό, φιλέτα μόσχου συντηρήθηκαν σε αερόβια συσκευασία και τροποποιημένη ατμόσφαιρα σε θερμοκρασίες 0, 5, 10 και 15°C μέχρι την αλλοίωση των δειγμάτων. Κατά τη διάρκεια της συντήρησης ελήφθησαν εικόνες των δειγμάτων ενώ παράλληλα πραγματοποιήθηκαν μικροβιολογικές αναλύσεις για την απαρίθμηση της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας. Στη συνέχεια, επιχειρήθηκε η ανάπτυξη και επικύρωση μοντέλων με στόχο την πρόβλεψη του μικροβιακού πληθυσμού απευθείας από τα φασματικά δεδομένα. Τα μοντέλα αναπτύχθηκαν με αλγόριθμο Διανυσματικών Μηχανών Υποστήριξης (Support Vector Machines, SVM). Για την αξιολόγηση της επίδοσης των μοντέλων στην πρόβλεψη του μικροβιακού πληθυσμού χρησιμοποιήθηκαν οι δείκτες μεροληψίας (Bias factor, *Bf*) και ακρίβειας (Accuracy factor, *Af*). Τα πειραματικά δεδομένα διαχωρίστηκαν σε δυο ομάδες, εκ των οποίων η πρώτη χρησιμοποιήθηκε για την εκπαίδευση (training) και η δεύτερη για την επικύρωση (testing) του μοντέλου. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι στην αερόβια συσκευασία το μοντέλο παρουσίασε τάση υπερεκτίμησης του πληθυσμού της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας (*Bf* 0,989). Επίσης, η τιμή του δείκτη ακρίβειας (*Af*) έδειξε ότι η μέση απόκλιση των προβλέψεων από τις παρατηρήσεις ήταν 13,1%. Οι αντίστοιχες τιμές για τη συσκευασία της τροποποιημένης ατμόσφαιρας ήταν 0,957 και 1.140 για τους δείκτες *Bf* και *Af*, αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η μέθοδος ανάλυσης της εικόνας μπορεί να αποτελέσει ταχεία και εύχρηστη μέθοδο εκτίμησης της αλλοίωσης του κρέατος.

Η εργασία χρηματοδοτήθηκε από το κοινοτικό έργο SYMSIOSIS EU ([www.symbiosis-eu.net](http://www.symbiosis-eu.net))

## Potential of multi-spectral imaging in meat spoilage determination

**Kyriakopoulou A.B., Blana B., Stamatiou A.P., 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

Visual properties could provide useful information in the determination of food quality and thus they could become an important quality indicator. Colour is among the most important factors playing a significant role in the evaluation of meat quality. Multi-spectral imaging is a novel technique that could be employed to assess the composition of surface chemistry of foods during storage and thus extract intrinsic chemical information concerning water, fat, protein or other hydrogen-bonded constituents. In this work, a correlation was attempted between spectral data from an image analysis system (VideometerLab) and changes in total viable counts on the surface of beef fillets during storage at different temperatures. To this end, beef fillets were stored aerobically and in modified atmospheres (40%CO<sub>2</sub>-30%O<sub>2</sub>-30%N<sub>2</sub>) at four different temperatures (0, 5, 10, and 15°C) and microbiological analysis in terms of total viable counts (TVC) was performed in parallel with image acquisition for a total period of 500 hours until spoilage was evident in the samples. Spectral data were correlated with total viable counts through the development of Support Vector Machine (SVM) models in order to predict the microbiological counts directly from the acquired images. Model performance was determined through the calculation of bias and accuracy factors. Results showed that SVM were able to predict satisfactorily microbial counts in meat samples. Specifically, in both packaging types, predictions were in the fail-safe area (*Bf* values 0,989 and 0,957 for aerobic and modified atmosphere packaging, respectively), whereas the average deviation between predicted and observed counts was 13-14%. The obtained results are very promising, indicating that multi-spectral imaging could become a rapid, non-invasive and reliable tool in the determination of food quality.

**Acknowledgement:** This study was funded by SYMBIOSIS - EU ([www.symbiosis-eu.net](http://www.symbiosis-eu.net)) project within the 7th Framework Programme of the EU.

## Μελέτη σχηματισμού βιο-υμενίων από τροφιμογενή παθογόνα και χρήσιμα βακτήρια πάνω σε πρότυπες επιφάνειες ανοξείδωτου χάλυβα, υπό διάφορες συνθήκες μικτής καλλιέργειας, και δοκιμές απολύμανσης

Κωστάκη Μ.<sup>1</sup>, Γκισούρης Ε.<sup>2</sup>, Χωριανόπουλος Ν.<sup>1</sup>, Πανάγου Ε.Ζ.<sup>1</sup> και Νυχάς Γ.-Ι.Ε.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων, Ιερά Οδός 75, 11855, Αθήνα,

<sup>2</sup>Πανεπιστήμιο Αιγαίου, Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής, Μύρινα, 81400, Λήμνος

Ο σχηματισμός βιο-υμενίων είναι ένα φυσικό φαινόμενο το οποίο συμβαίνει σχεδόν οπουδήποτε υπάρχουν σε εγγύτητα μικροοργανισμοί και επιφάνειες. Η προσκόλληση παθογόνων βακτηρίων πάνω σ' επιφάνειες του εξοπλισμού μιας βιομηχανίας τροφίμων και η επακόλουθη δημιουργία βιο-υμενίων είναι ανεπιθύμητη, καθώς ενδεχόμενη αποκόλληση των κυττάρων από τη βιο-υμενική δομή μπορεί να οδηγήσει σε μόλυνση των τροφίμων και κατά συνέπεια πρόκληση τροφιμογενών λοιμώξεων. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η ικανότητα 9 βακτηριακών στελεχών να σχηματίζουν βιο-υμένια, πάνω σε πρότυπες επιφάνειες ανοξείδωτου χάλυβα. Τα στελέχη αυτά ανήκαν στα τροφιμογενή παθογόνα *Listeria monocytogenes* και *Salmonella enterica*, καθώς και στο ασφαλές *Lactobacillus sakei*, στελέχη του οποίου χρησιμοποιούνται σήμερα για την παραγωγή ζυμούμενων προϊόντων κρέατος. Επλέχθηκαν 3 στελέχη για κάθε είδος. Αρχικά, τα κύτταρα αφέθηκαν να δημιουργήσουν βιο-υμένια, στους 15°C και στους 30°C, υπό διάφορες συνθήκες μικτής καλλιέργειας (δηλαδή είτε 3 στελέχη του ίδιου είδους μαζί, είτε 6 στελέχη 2 διαφορετικών ειδών μαζί), δεδομένου πως πιστεύεται πως οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μικροοργανισμών επηρεάζουν τόσο την ικανότητα σχηματισμού βιο-υμενίων, όσο και την αντιμικροβιακή τους ανθεκτικότητα. Εντούτοις, τα παρόντα αποτελέσματα δεν φανέρωσαν αξιοσημείωτες διαφορές στους πληθυσμούς των βιο-υμενικών κυττάρων για κάθε βακτηριακό είδος ξεχωριστά, μεταξύ των διαφορετικών καλλιεργητικών συνθηκών. Στη συνέχεια, μελετήθηκε η απολυμαντική δράση τριών κοινών αντιμικροβιακών ενώσεων (τεταρτοταγές αμμωνιακό άλας του βενζολίου 50 ppm, χλωρίνη 10 ppm και υπεροξικό οξύ 10 ppm), εναντίον των βιο-υμενικών κυττάρων. Υπό τις παρούσες συνθήκες, η *L. monocytogenes* παρουσίασε μεγαλύτερη ανθεκτικότητα και στα 3 απολυμαντικά σε σχέση με τα υπόλοιπα 2 βακτηριακά είδη. Δεν υπήρξαν σημαντικές διαφορές όσον αφορά την αντιμικροβιακή ανθεκτικότητα και των τριών βακτηριακών ειδών ξεχωριστά, μεταξύ των διαφορετικών καλλιεργητικών συνθηκών. Η παρούσα εργασία προσφέρει σημαντική πληροφόρηση σχετικά με τις δυνατότητες σχηματισμού και καταπολέμησης βακτηριακών βιο-υμενίων, υπό συνθήκες που προσομοιάζουν χώρους παραγωγής και επεξεργασίας τροφίμων.

Η εργασία χρηματοδοτήθηκε από το κοινωτικό έργο ProSafeBeef ([www.prosafebeef.eu](http://www.prosafebeef.eu)).





## Study of biofilm formation by foodborne pathogenic and useful bacteria on model stainless steel surfaces, under various mixed-culture conditions, and disinfection studies

**Kostaki M.<sup>1</sup>, Giaouris E.<sup>2</sup>, Choriantopoulos N.<sup>1</sup>, Panagou E.Z.<sup>1</sup> and Nychas G.-J.E.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Agricultural University of Athens, Department of Food Science and Technology, Laboratory of Microbiology and Biotechnology of Foods, Iera Odos 75, 11855, Athens,

<sup>2</sup>University of Aegean, Department of Food Science and Nutrition, Myrina, 81400, Lemnos

Biofilm formation is a natural phenomenon which happens almost wherever microorganisms and surfaces exist in close proximity. Attachment of pathogenic bacteria onto food-processing equipment surfaces and subsequent biofilm formation is undesirable, since the detachment of cells from the biofilm structure can lead to cross-contamination of food products and thus cause foodborne diseases. In the present study, the ability of 9 bacterial strains to form biofilms, onto model stainless steel surfaces, was studied. These strains belonged to the foodborne pathogens *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica*, as well as to the useful *Lactobacillus sakei*, which is nowadays used for the production of fermented meat products. 3 strains were selected for each species. Initially, cells were left to form biofilms, at 15°C and 30°C, under various mixed-culture conditions (*that is either 3 strains of same species together, or 6 strains of 2 different species together*), given that it is believed that microbial interactions influence both biofilm forming ability, as well as antimicrobial resistance. However, present results did not reveal any significant differences at the levels of biofilm populations for each bacterial species separately, among the different culture conditions. Afterwards, the disinfection ability of three common antimicrobial compounds (benzalkonium chloride 50 ppm, chlorine 10 ppm and peracetic acid 10 ppm), against biofilm cells, was studied. Under current conditions, *L. monocytogenes* presented higher resistance to the 3 disinfectants compared to the other 2 bacterial species. Not important differences, with regard to antimicrobial resistance of the three bacterial species separately, were revealed among the different culture conditions. Present study offers important knowledge on the abilities to form and eliminate bacterial biofilms, under conditions simulating real food processing environments.

**Acknowledgement:** This study was funded by ProSafeBeef integrated project ([www.prosafebeef.eu](http://www.prosafebeef.eu)) within the 6th Framework Programme of the EU.

## Ενδιαφέροντα Κυανοβακτήρια (*Oscillatoriales*: *Phormidiaceae*, *Ammatoideaceae*) από το Σπήλαιο Φράγγχι (Αργολίδα, Ελλάδα): Ταξινόμηση με Κλασσική και Μοριακή Προσέγγιση

Λαμπρινού Β.<sup>1</sup>, Σκαράκη Κ.<sup>2</sup> και Πανταζίδου Α.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Σχολή Θετικών Επιστημών,

Τμήμα Βιολογίας, Τομέας Οικολογίας και Ταξινόμησης, Πανεπιστημιούπολη Αθήνα 15784

<sup>2</sup>Ελληνικό Κέντρο Θαλασσίων Ερευνών, Ινστιτούτο Θαλάσσιας Βιολογίας και Γενετικής, Γούρνες Πεδιάδος, Ηράκλειο 71500, Κρήτη

Τα κυανοβακτήρια είναι φωτοσυνθετικοί προκαρυωτικοί μικροοργανισμοί. Συνιστούν την κυρίαρχη ομάδα φωτοαυτότροφης μικροχλωρίδας στα σταθερά, χαμηλού φωτισμού περιβάλλοντα των σπηλαίων. Μέχρι σήμερα, η γνώση της βιοποικιλότητας και της συστηματικής των κυανοβακτηρίων που ενοικούν στα σπήλαια, βασιζόταν κυρίως σε μικροσκοπική παρατήρηση των μορφολογικών χαρακτήρων φυσικού και καλλιεργημένου υλικού. Φαινοτυπικά, γενοτυπικά, οικοτυπικά και φυλογενετικά δεδομένα παρέχουν επιπρόσθετες, σημαντικές πληροφορίες που εμπλουτίζουν τη γνώση μας επί της συστηματικής τους.

Η παρούσα εργασία πραγματεύεται την πολυφασική ταξινόμηση δύο διακριτών πληθυσμών κυανοβακτηρίων της τάξης των *Oscillatoriales* που παρουσιάζουν ενδιαφέρον από το σπήλαιο Φράγγχι. Η πολυφασική προσέγγιση αφορά τόσο στη παρατήρηση φαινοτυπικών χαρακτήρων σε φωτονικό και ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, όσο και σε μοριακά δεδομένα που βασίζονται σε αλληλούχιση του 16S rRNA γονιδίου καθώς και στις περιβαλλοντικές παραμέτρους. Οι χαρακτηρισές που παραδοσιακά χρησιμοποιούνται για την ταξινόμηση σε επίπεδο γένους στα *Oscillatoriales* είναι: η παρουσία και τα χαρακτηριστικά της θήκης, η μορφή του νήματος και του τριχώματος, η παρουσία/απουσία ψευδούς διακλάδωσης, το χρώμα και η μορφή των κυττάρων καθώς και το ενδιαίτημα. Ωστόσο, τα γένη των *Oscillatoriales* εμφανίζουν ετερογένεια και δεν είναι με σαφήνεια διακριτά μεταξύ τους. Σύμφωνα με την κλασική προσέγγιση, στο υπό μελέτη υλικό, ο ένας από τους δύο μορφότυπους παρουσιάζει ομοιότητες με τα γένη *Phormidium* και *Pseudophormidium* των *Phormidiaceae*. Εντούτοις, η χαρακτηριστική μαύρη θήκη (χρωστική-gloeocapsine), γνώρισμα που διατηρείται και στις καλλιέργειες, δεν μας επιτρέπει την με βεβαιότητα ταυτοποίησή του σε κάποια από τα υπάρχοντα είδη. Ο δεύτερος μορφότυπος, παρουσιάζει αρκετά γνωρίσματα ώστε επί του παρόντος να ονοματίζεται ως *Ammatoidea normanii* (*Ammatoideaceae*).

Σύμφωνα με την αλληλούχιση μέρους του 16S rRNA γονιδίου ο πρώτος μορφότυπος παρουσιάζει ομοιότητα >98% με αλληλουχίες ψυχροαθεκτικών κυανοβακτηρίων από την Ανταρκτική και από οικότυπους της κρύας βίοςφαιρας.

Τα αποτελέσματα μας συσχετίζονται με τις περιβαλλοντικές παραμέτρους (PAR, T, RH) συμβάλλοντας στη κατανόηση αυτών των ελάχιστα γνωστών οργανισμών από το ιδιαίτερο οικοσύστημα των σπηλαίων.



## Interesting Cyanobacteria (*Oscillatoriales*: Phormidiaceae, Ammatoideaceae) from Franchti Cave (Argolida, Greece): Taxonomy based on Classical and Molecular Approach

**Lamprinou V.<sup>1</sup>, Skaraki K.<sup>2</sup> and Pantazidou A.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>National and Kapodistrian University of Athens, Faculty of Biology, Department of Ecology and Systematics, Panepistimiopolis, Athens 15784, Greece;

<sup>2</sup>Hellenic Centre for Marine Research, Institute of Marine Biology and Genetics, Gournes Pediados, Heraklion 71500, Crete, Greece.

Cyanobacteria are photosynthetic prokaryotes, comprising the dominant microflora component of phototrophic microorganisms, adapted at the stable and low light environments of cave ecosystem. Up to the present, the knowledge on the biodiversity and the taxonomy of cyanobacteria inhabiting caves was mostly based on morphological characteristics detected on natural and cultured material under light and electron microscopy. The integration of phenotypic, genotypic, ecotypic and phylogenetic data provides additional information essential for their taxonomy.

The present study deals with a polyphasic approach on the taxonomy of two interesting filamentous cyanobacteria from Franchti karst cave, based on phenotypic morphology (fresh and cultured material) under LM and SEM and molecular data on 16S rRNA sequencing as well as environmental parameters. The criteria traditionally prescribed for classification of genera in *Oscillatoriales* relied on the presence and the type of sheath, the appearance of filament and trichomes, the presence/absence of false branching, the colour of cells and the habitat; however, the genera in *Oscillatoriales* are heterogenous and not clearly definable.

Based on classical approach the one morphotype maintain the blackish sheath (pigmentation-gloeocapsine) in cultures and exhibits similarity with the genera *Phormidium*, and *Pseudophormidium* (Phormidiaceae). However, the morphological characteristics do not allow as identifying with certainty the morphotype, under specific taxa. The latter is classified provisionally as *Ammatoidea normanii* (Ammatoideaceae). Based on 16S rRNA partial sequencing, the first morphotype is found to be > 98% similar to sequences of psychrotolerant cyanobacteria from Antarctica and ecotypes from cold biosphere.

Data from classical microscopy (LM, SEM) as well as data from molecular analysis are discussed in relation to environmental parameters (PAR, T, RH) in order to improve our knowledge on the taxonomy of the little known cyanobacteria from caves' ecosystem.

## Πολυακόρεστα λιπαρά οξέα σε νέο-απομονωθέντα και τυπικά στελέχη μικροφυκών καλλιεργούμενα σε εργαστηριακή και βιομηχανική κλίμακα

**Μακρή Α.<sup>1</sup>, Μπέλλου Σ.<sup>1</sup>, Μπίρκου Μ.<sup>1</sup>, Παπατρέχας Κ.<sup>1</sup>, Δολαψάκης Ν.Π.<sup>2</sup>, Μπόκας Δ.<sup>3</sup>, Παπανικολάου Σ.<sup>4</sup> και Αγγελής Γ.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Εργαστήριο Μικροβιολογίας, Τομέας Γενετικής, Βιολογίας Κυττάρου και Ανάπτυξης, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών,

<sup>2</sup>Τομέας Οικολογίας και Ταξινόμησης, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών,

<sup>3</sup>ΠΛΑΓΚΤΟΝ Α.Ε., Αγ. Μαρίνης 11, Αγρίνιο,

<sup>4</sup>Εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιερά οδός 75

Τα μικροφύκη χρησιμοποιούνται σε πολυάριθμες βιομηχανικές εφαρμογές όπως στη βιομηχανία τροφίμων και καλλυντικών. Ωστόσο, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η ικανότητά τους να βιοσυνθέτουν προϊόντα υψηλής προστιθέμενης αξίας όπως πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFAs). Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη της λιπιδιακής σύστασης σε PUFAs, σε 16 στελέχη μικροφυκών τα οποία απομονώθηκαν από το υδάτινο περιβάλλον της Ελλάδας και σε 2 στελέχη μικροφυκών (*Tetraselmis* sp. HCMR και *Nannochloropsis oculata* CCAP 849/1) που χρησιμοποιούνται στις υδατοκαλλιέργειες.

Τα στελέχη καλλιεργήθηκαν σε βιοαντιδραστήρες εργαστηριακής και βιομηχανικής κλίμακας και τα λιπίδια τους εκχειλίστηκαν και αναλύθηκαν με τη βοήθεια αέριας χρωματογραφίας. Το υψηλότερο ποσοστό λιπιδίων (εκφρασμένων ως μεθυλεστέρες λιπαρών οξέων) εντοπίστηκε στο στέλεχος *Prorocentrum triestinum* (3.69% w/w) ενώ το χαμηλότερο ποσοστό εντοπίστηκε στο στέλεχος *Prymnesium parvum* (0.47% w/w). Αρκετά από τα νέο-απομονωθέντα στελέχη δύνανται να παράγουν λιπίδια πλούσια σε εικοσιπεντανοϊκό (EPA) και εικοσιδυοεξανοϊκό (DHA) οξύ. Συγκεκριμένα, τα λιπίδια των στελεχών *Amphidinium* sp., *Prymnesium parvum*, *Prorocentrum minimum* και *Prorocentrum triestinum* χαρακτηρίζονται από υψηλό ποσοστό DHA (26.33, 11.18, 20.87 και 21.97% w/w, αντίστοιχα) ενώ τα λιπίδια του στελέχους *Asterionella* sp. (?) χαρακτηρίζονται από υψηλό ποσοστό EPA (26.43% w/w). Τα στελέχη *Tetraselmis* sp. και *N. oculata* συσώρευσαν λιπίδια σε ποσοστό 2.33 και 2.44 % w/w, αντίστοιχα. Τα λιπίδια αυτά περιείχαν υψηλότερα ποσοστά ουδετέρων λιπιδίων, γλυκολιπιδίων και σφιγγολιπιδίων ενώ τα φωσφολιπίδια ανιχνεύθηκαν σε χαμηλότερα ποσοστά. Επιπλέον, τα λιπίδια του *Tetraselmis* sp. χαρακτηρίζονται από την παρουσία EPA, το οποίο εντοπίζεται κυρίως στο κλάσμα των φωσφολιπιδίων, και αραχιδελαιϊκού οξέος το οποίο βρέθηκε εξίσου κατανεμημένο σε όλα τα λιπιδιακά κλάσματα, ενώ τα ανωτέρω λιπαρά οξέα απουσιάζουν από τα λιπίδια του *N. oculata*.



## Occurrence of polyunsaturated fatty acids in new isolates and type strains of microalgae grown in laboratory and industrial scale bioreactors

**Makri A.<sup>1</sup>, Bellou S.<sup>1</sup>, Birkou M.<sup>1</sup>, Papatrehas K.<sup>1</sup>, Dolapsakis N.P.<sup>2</sup>, Bokas D.<sup>3</sup>, Papanikolaou S.<sup>4</sup> and Aggelis G.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Unit of Microbiology, Department of Biology, University of Patras,

<sup>2</sup>Section of Ecology & Systematics, Department of Biology, University of Athens,

<sup>3</sup>PLAGTON S.A., 11 Ag. Marinis, Agrinio,

<sup>4</sup>Laboratory of Food Microbiology and Biotechnology, Department of Food Science and Technology, Agricultural University of Athens, 75 Iera Odos

Numerous commercial applications of micro-algae are currently in progress, as their biomass is used in food industry and in cosmetology. Additionally, micro-algae are cultivated as a source of various highly valuable molecules, such as polyunsaturated fatty acids (PUFAs). The aim of this study was to identify new strains of micro-algae isolated from aquatic environments of Greece suitable for production of PUFAs, and to compare their fatty acid composition to two type strains (named *Tetraselmis* sp. HCMR and *Nannochloropsis oculata* CCAP849/1) which are used in aquaculture.

The strains were cultivated in laboratory and industrial scale bioreactors and their lipids were extracted and quantified using Gas Chromatography. The highest percentage of lipids (expressed as fatty acid methyl esters) produced by 16 new isolates was found in *Prorocentrum triestinum* (3.69% w/w) while the lowest in *Prymnesium parvum* (0.47% w/w). Several strains produced lipids rich in eicosapentaenoic (EPA) and docosahexaenoic (DHA) acids. For instance, DHA was found in high percentages in lipids of *Amphidinium* sp. (26.33% w/w), *Prymnesium parvum* (11.18% w/w), *Prorocentrum minimum* (20.87% w/w) and *Prorocentrum triestinum* (21.97% w/w), while lipids produced by *Asterionella* sp. (?) contained EPA in high concentration (26.43% w/w). The total lipid content of the two type strains amounted to 2.33 and 2.44% w/w, for *Tetraselmis* sp. and *N. oculata*, respectively. These lipids contained higher amounts of neutral lipids and glycolipids plus sphingolipids, than phospholipids. Also, lipids of *Tetraselmis* sp. were characterized by the presence of EPA (that was located mainly in phospholipids), and octadecatetraenoic acid (that was equally distributed among lipid fractions), while these fatty acids were completely absent in *N. oculata* lipids.

## Ο ρόλος της παραλλακτικότητας μεμονωμένων κυττάρων *Listeria monocytogenes* και *Salmonella Typhimurium* στην ασφάλεια κομμένων σαλατών

Μανιός Σ., Κωνσταντινίδης Ν. και Σκανδάμης Π.Ν.

Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων και Ποτών, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιερά οδός 75, 118 55, Αθήνα.

Η κατανάλωση των έτοιμων κομμένων σαλατών έχει αυξηθεί δραματικά τα τελευταία χρόνια. Ωστόσο, τα συγκεκριμένα τρόφιμα έχουν συνδεθεί με πολλαπλές εξάρσεις τροφικών δηλητηριάσεων, εξαιτίας της παρουσίας παθογόνων βακτηρίων, όπως *Salmonella*, *Escherichia coli* O157:H7 και *Listeria monocytogenes*. Η επιμόλυνση της πρωτογενούς παραγωγής με κοπρανώδη υπολείμματα στο χωράφι και η διεργασία του τεμαχισμού στη βιομηχανία θεωρούνται οι κυρίαρχες αιτίες υποβάθμισης της ασφάλειάς τους και της επιβίωσης/αύξησης παθογόνων μικροοργανισμών. Ιδιαίτερα μετά τον τεμαχισμό τους, τα προϊόντα αυτά αποτελούν ένα πολύπλοκο οικοσύστημα, το οποίο απαρτίζεται από φυτικούς ιστούς, υποστομάτιους χώρους, εκχυλίσματα θρεπτικών συστατικών, κ.ά. Συνεπώς, η μικροβιακή αύξηση επηρεάζεται από το μικροπεριβάλλον στο οποίο βρίσκεται κάθε κύτταρο και όσο μικρότερος είναι ο μικροβιακός πληθυσμός τόσο μεγαλύτερη η παραλλακτικότητα στην επιβίωση και αύξησή του. Υιοθετήσαμε μία «στοχαστική» προσέγγιση αύξησης 2 παθογόνων μικροοργανισμών (*Salmonella Typhimurium* και *Listeria monocytogenes*) σε πολλαπλά δείγματα σαλατών μαρουλιού και λαχάνου, τα οποία ενοφθαλμίστηκαν με 1-3 ή 1000 κύτταρα ανά 10 γραμμάρια δείγματος και συντηρήθηκαν σε θερμοκρασίες 8-10°C. Επιπλέον, προκειμένου να χαρακτηρίσουμε το ρόλο της ενδογενούς χλωρίδας στη συμπεριφορά των παθογόνων, το ίδιο πείραμα πραγματοποιήθηκε και σε αποστειρωμένα εκχυλίσματα των ίδιων τροφίμων, με άγαρ (στερεά) ή χωρίς άγαρ (υγρά). Το μαρούλι αποδείχθηκε ότι υποστηρίζει αύξηση και των 2 παθογόνων, ανεξαρτήτως αρχικού πληθυσμού. Το λάχανο δεν υποστήριξε την αύξηση της Σαλμονέλλας αλλά υποστηρίζει την αύξηση της Λιστέριας. Ωστόσο, αύξηση της Λιστέριας δεν παρατηρήθηκε στα αποστειρωμένα εκχυλίσματα λαχάνου υπονοώντας πιθανόν ευεργετικό ρόλο της ενδογενούς χλωρίδας στην αύξηση του παθογόνου. Η αύξηση της Σαλμονέλλας ήταν οριακή (1 log) στους 8°C, ενώ ξεπερνούσε τα 3 log στους 10°C, υπογραμμίζοντας τον κρίσιμο ρόλο της οριακής διαφοράς των 2 βαθμών στην ασφάλεια των προϊόντων. Είναι αξιοσημείωτο ότι η αύξηση του υψηλού αρχικού πληθυσμού περιορίστηκε στους 2 log, ενώ των μεμονωμένων κυττάρων κυμαίνονταν από καθόλου έως 3 λογαριθμικούς κύκλους. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα ορισμένα από τα δείγματα που εμβολιάστηκαν με *L. monocytogenes* να υπερβαίνουν το κριτήριο των 100 CFU/g και άλλα όχι. Στο μαρούλι, η παρουσία της χλωρίδας περιορίσε την αύξηση των παθογόνων, αντίθετα από το λάχανο. Για αξιόπιστη εκτίμηση της επικινδυνότητας των κομμένων σαλατών πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η παραλλακτικότητα στο δυναμικό αύξησης μεμονωμένων μικροβιακών κυττάρων.



## **Assessing the safety of ready-to-eat salads considering the individual cell variability of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Typhimurium**

**Manios S., Konstantinidis N. and Skandamis P.N.**

Laboratory of Food Quality and Hygiene, Agricultural University of Athens,  
Iera Odos 75, 118 55, Athens

The production, sale and consumption of uncooked leafy vegetables, available as pre-cut and ready-to-eat (RTE; minimally processed by washing, slicing or shredding and packaging) salads, have undergone substantial increases world wide. Nonetheless, they have been associated with frequent outbreaks, due to the presence of bacterial pathogens, such as *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7. Cutting of leafy greens results in a complicated microenvironment consisting of liquid, semi-liquid and solid phase. Thus, the behaviour of individual cells is variable and so is the overall assessment of the safety of these products. We adopted a stochastic approach in the growth of *L. monocytogenes* and *Salmonella* Typhimurium on shredded lettuce and cabbage. Both foods as well as their sterile extract supplemented (solid) or not (liquid) with agar, were inoculated with 1-3 cells or 1000 cells per 10 g of sample and stored at 8-10°C. Lettuce supported abundant growth of both pathogens, especially of *L. monocytogenes*. Cabbage did not allow growth of *Salmonella* but did allow growth of *L. monocytogenes*, whereas its sterile extracts totally inhibited *L. monocytogenes*. The growth of *Salmonella* was marginal at 8°C and exceeded 3 log at 10°C. Notably, the observed increase for the high inoculum was limited to 2 log, whereas that of single cells ranged from 0 to 3 log. This resulted in *L. monocytogenes* exceeding the microbiological criterion of 100 CFU/g in some of the samples in lettuce salad, the presence of endogenous flora was inhibitory for the pathogens, as opposed to the flora of cabbage. The results suggest that reliable risk assessment for RTE salads requires consideration of the variability of very low populations.

## Κατασκευή και ανάλυση του ενδομοριακού δικτύου συνεξέλιξης της καψιδιακής πρωτεΐνης ιών του γένους *Potyvirus*

**Μανουσόπουλος Γ.**

Ινστιτούτο Προστασίας Φυτών Πατρών, ΝΕΟ & Αμερικής, 260 04, Πάτρα

Πολυμορφικές θέσεις σε μεταβαλλόμενες περιοχές σε στοιχισμένες αλληλουχίες πρωτεϊνών (ΣΑΠ) πιθανόν να περιέχουν πληροφορίες σχετικά με τη συνεξέλιξη αμινοξέων, παρέχοντας χρήσιμα στοιχεία σχετικά με την δομή και την εξέλιξη των πρωτεϊνών. Σε αυτή την εργασία εξετάζονται οι συσχετίσεις μεταξύ πολυμορφικών θέσεων σε ΣΑΠ ιών του γένους *Potyvirus* με σκοπό την κατασκευή του σχετικού ενδομοριακού δικτύου. Η τοπολογία και άλλα χαρακτηριστικά του δικτύου διερευνώνται περαιτέρω χρησιμοποιώντας νέες τεχνικές που αναπτύχθηκαν τελευταία στο πεδίο αυτό.

Όλες οι πολυμορφικές περιοχές στις ΣΑΠ 64 ειδών του γένους *Potyvirus*, αναγνωρίστηκαν και οι πιθανές συσχετίσεις μεταξύ τους εξετάστηκαν κατά ζεύγη σε όλους τους δυνατούς συνδυασμούς με τρεις ακριβείς δοκιμές ανεξαρτησίας, σε πίνακες συνάφειας. Το 0.69% των ζευγών είχαν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις ( $p < 0.001$ ). Οι περισσότερες θέσεις είχαν συσχετίσεις με μία ή περισσότερες άλλες θέσεις σχηματίζοντας ένα μη τυχαίοποιημένο δίκτυο αλληλεξαρτήσεων στο οποίο ένας μικρός αριθμός κόμβων (θέσεων) συσσωρεύει το μεγαλύτερο πλήθος των συσχετίσεων. Περαιτέρω ανάλυση έδειξε ότι μερικοί από τους πιο 'συνδεδεμένους' κόμβους στο δίκτυο είναι είτε θέσεις που έχουν αναγνωρισθεί πρωτίτερα ως λειτουργικές, είτε θέσεις που βρίσκονται δίπλα σε άλλες λειτουργικές θέσεις.

Ανάλυση με εξομοίωση για των υπολογισμό της παραμέτρου  $\pi$  (πιθανότητα επιτυχίας) της διωνυμικής κατανομής πιθανοτήτων σχετικά με την σύμπτωση τυχαία επιλεγμένων θέσεων με γνωστές λειτουργικές ή την εύρεση τυχαία επιλεγμένων θέσεων δίπλα σε γνωστές λειτουργικές, υπέδειξε ότι η παρατηρηθείσα συσχέτιση λειτουργικότητας-συνδεσιμότητας δεν μπορεί να αποδοθεί μόνο στην τύχη, υπονοώντας κάποια βιολογική ιδιότητα.

Περαιτέρω ανάλυση για τον εντοπισμό πυκνότερων περιοχών συνδεσιμότητας στο δίκτυο απέκαλυψε τέσσερις κοινότητες προσδιορισμένες από τρεις 3-κ κλίκες και μία κοινότητα προσδιορισμένη από μια 6-κ κλίκα στη χαμηλότερη και υψηλότερη ανάλυση, αντίστοιχα. Μερικές από τις θέσεις με ίδια λειτουργικότητα βρέθηκαν στην ίδια κοινότητα υποδεικνύοντας έναν παρόμοιο λειτουργικό ρόλο για τα υπόλοιπα μέλη της κοινότητας.

Η εργασία αυτή επεκτείνει την μελέτη των βιολογικών δικτύων από το διαμοριακό στο ενδομοριακό επίπεδο, παρέχει ένα χρήσιμο εργαλείο για την κατασκευή και ανάλυση ενδομοριακών δικτύων, και θέτει τις βάσεις για την εφαρμογή πανίσχυρων τεχνικών ανάλυσης σε ενδοπρωτεϊνικά δίκτυα για την παροχή πληροφοριών χρήσιμων στην κατανόηση της δομής και της εξέλιξης των πρωτεϊνών.



## Construction and analysis of the intramolecular coevolution network of the *potyvirus* coat protein

**Manoussopoulos I.N.**

Plant Protection Institute of Patras, Lab. Of Virology, NEO & Amerikis, 26004, Patras, Greece.

Polymorphic amino acid sites in the variable regions of protein alignments may contain information about amino acid coevolution, with potential implications for protein structure and function. Here, association between polymorphic sites is examined in the whole-length alignment of the truncated coat protein of *Potyvirus* (plant virus) species by a novel statistical approach for investigating coevolution between such sites and for constructing the relevant intramolecular network. This network is further studied and analyzed using recently developed network analysis techniques.

All polymorphic positions in the aligned coat protein sequences of 64 *potyvirus* species were identified and the potential associations between variable positions were examined in pair-wise contingency tables by three permutation (exact) tests of independence. About 0.69% of the pairs had highly significant associations ( $p < 0.001$ ). Most positions were associated with one or more other sites, resulting in a non-random network in which a handful of nodes dominated most associations. Further analysis indicated that some of the highly connected sites have been previously identified as functional and that others were located near known functional positions. Simulation analysis for calculating the  $\pi$  parameter of the binomial distribution of occurrence of randomly selected positions near, or at the same place with functional ones, suggested that this coincidence cannot be attributed to chance alone, implying a possible correlation between connectivity and functionality. An analysis for unveiling densely connected patterns in the network revealed four communities defined by 3k-cliques and one community defined by 6k-cliques at the lowest and highest resolution, respectively. Some of the functional positions with similar biological actions were clustered into the same community, implying a possible biological role for at least some of the positions of unknown function within a community.

This work extends the study of biological networks from the inter- to intramolecular level, provides a useful tool for constructing and analyzing intramolecular networks, and sets the basis for the application of powerful graph techniques at the intra-protein level for getting useful information about protein function and evolution.

**Μοντελοποίηση της κατεύθυνσης και του εύρους μεταβολών στην οξύτητα και την ενεργότητα ύδατος εντός και εκτός της μεσεπιφάνειας αύξησης του παθογόνου *Listeria monocytogenes* στην προσαρμοστικότητα και μετέπειτα αύξηση αυτού**

**Μπέλεση Χ.-Ε., Le Marc Y., Γουναδάκη Α.Σ., Δροσινός Ε.Χ., Baranyi J.  
και Σκανδάμης Π.Ν.**

Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων και Ποτών,  
Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιερά οδός 75, 118 55, Αθήνα

Κατά την επεξεργασία, μεταφορά και παρασκευή των τροφίμων, διαφορετικά σενάρια διασταυρούμενης επιμόλυνσης, δύναται να λάβουν χώρα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα οι μικροοργανισμοί να εκτίθενται σε μεταβαλλόμενες περιβαλλοντικές συνθήκες. Οι συνθήκες και το περιβάλλον από όπου προέρχεται και καταλήγει ο μικροοργανισμός, επηρεάζουν τη διάρκεια της φάσης προσαρμογής, και το ρυθμό ανάπτυξής του. Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η διερεύνηση του επιπλέον έργου που απαιτείται για την προσαρμογή και έναρξη αύξησης του παθογόνου *Listeria monocytogenes*, ως αποτέλεσμα των αλλαγών στο περιβάλλον του. Κύτταρα του παθογόνου μεταφέρονταν από περιβάλλον χαμηλής σε περιβάλλον υψηλότερης οξύτητας και αλατότητας και το αντίστροφο, κοντά στα όρια ανάπτυξης του μικροοργανισμού, σε σταθερή θερμοκρασία (10°C). Πραγματοποιήθηκαν 36 αλλαγές σε TSBYE με pH: 7.2-5.1 (σε  $a_w$  0.995) και 16 αλλαγές σε TSBYE με αλατότητα: 0.5-10.5 % (σε pH 7.2). Επιπλέον πραγματοποιήθηκαν αλλαγές από περιβάλλον που δεν υποστηρίζει ανάπτυξη του παθογόνου (pH 4.7, 12.5% αλάτι) σε όλες τις παραπάνω συνθήκες ανάπτυξης, την 1<sup>η</sup>, 5<sup>η</sup> και 10<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης στους 10°C. Η επίδραση των περιβαλλοντικών αλλαγών πειράφηκε μαθηματικά μέσω της εξάρτησης της παραμέτρου  $h_0$ , που εκπροσωπεί το «απαιτούμενο έργο που πρέπει να παραχθεί για την έναρξη εκθετικής αύξησης», ως προς την τάξη μεγέθους της αλλαγής και την αντιξοότητα του νέου περιβάλλοντος. Για μεταφορά του μικροοργανισμού από απαγορευτικές για αύξηση συνθήκες σε συνθήκες που επιτρέπουν την αύξηση του μικροβίου, η φάση προσαρμογής του επηρεάζονταν από το χρονικό διάστημα παραμονής του μικροοργανισμού σε συνθήκες που δεν υποστηρίζουν την αύξησή του. Οι προβλέψεις πληθυσμιακής πυκνότητας του *L. monocytogenes* από μοντέλα που δεν ελάμβαναν υπόψη το τελευταίο φαινόμενο, εμφανίζονταν σημαντικά υψηλότερες από την πραγματική τιμή στο γάλα. Συνεπώς το παρόν μοντέλο αποδείχτηκε ικανό να περιγράψει τις επιδράσεις των αλλαγών στις όξινες και ωσμωτικές συνθήκες περιβάλλοντος στην αύξηση του παθογόνου, είτε οι εν λόγω αλλαγές γίνονται μεταξύ συνθηκών που υποστηρίζουν την αύξηση ή όχι.

## **Modelling the effect of abrupt acid and osmotic shifts within the growth region and across the growth boundaries on the adaptation and growth of *Listeria monocytogenes***

**Belessi C.-I., Le Marc Y., Gounadaki A.S., Drosinos E.H., Baranyi J.  
and Skandamis P.N.**

Laboratory of Food Quality and Hygiene, Agricultural University of Athens,  
Iera Odos 75, 118 55, Athens

This study aims to model the effects of acid and osmotic shifts on the intermediate lag time of *Listeria monocytogenes* at 10°C in a growth medium. The data derived as follows: A *L. monocytogenes* cheese isolate was inoculated in tryptic soy broth supplemented with 0.6% yeast extract (TSBYE): (i) at six pH levels (5.1 to 7.2;  $a_w$  0.995), or four  $a_w$  levels (0.995 to 0.93; pH 7.2) and grown to early-stationary phase, or; (ii) habituated in TSBYE at pH 4.9 or  $a_w$  0.90 (12.5% NaCl) for 1, 5 and 10 days. *L. monocytogenes* was then shifted (102 CFU/ml) to each of the aforementioned growth permitting pH and  $a_w$  levels and incubated at 10°C. Reducing  $a_w$  or pH at different levels in the range of 0.995 to 0.93 and 7.2 to 5.1, respectively, decreased the maximum specific growth rate of *L. monocytogenes*. The lag time of the organism increased with all osmotic downshifts, as well as by the reduction of pH to 5.1. Conversely, any type of shift within pH 5.5-7.2 did not markedly affect the lag times of *L. monocytogenes*. The predictive ability of the model was assessed on new data in milk. The effects of shifts were modelled through the dependence of the parameter  $h_0$  ("work to be done" prior to growth) induced on the magnitude of the shift and/or the stringency of the new environmental conditions. For shifts across the boundary, the lag time was found to be affected by the length of time for which the microorganisms were kept at non-growth-supporting conditions. The predicted concentrations of *L. monocytogenes* in milk were overestimated when the effects of this shift were not taken into account. The model proved to be suitable to describe the effects of osmotic and acid shifts observed both within the growth domain and across the growth boundaries of *L. monocytogenes*.

## Κατανομή των λιπαρών οξέων στα λιπίδια επιλεγμένων στελεχών Ζυγομυκήτων καλλιεργούμενων σε γλυκερόλη

**Μπέλλου Σ., Μουστογιάννη Α. και Αγγελής Γ.**

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

Οι ελαιογόνοι Ζυγομύκητες έχουν την ικανότητα να συσσωρεύουν σημαντικές ποσότητες λιπιδίων, πλουσίων σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFAs) μεταβολίζοντας γλυκερόλη. Στο μυκήλιο όλων των στελεχών που μελετήθηκαν συσσωρεύτηκε μεγαλύτερη ποσότητα ουδέτερων λιπιδίων (NL) από ότι γλυκολιπιδίων, σφίγγολιπιδίων και φωσφολιπιδίων (P). Η βιοσύνθεση των P στους *Mortierella ramanniana*, *Mucor* sp. και *Cunninghamella echinulata* πραγματοποιήθηκε ενώ η διαδικασία συσσώρευσης των NL ήταν σε εξέλιξη. Η συγκέντρωση των PUFAs μειώθηκε σε όλα τα λιπιδιακά κλάσματα του *M. ramanniana* κατά τη διάρκεια της αύξησης. Αντίθετα, στην περίπτωση του *C. echinulata* τόσο η συγκέντρωση του λινελαϊκού όσο και του γ-λινολενικού οξέος (GLA) αυξήθηκε με το χρόνο σε όλα τα κλάσματα, και κυρίως στο κλάσμα των P. Τα λιπίδια του *Mucor* sp. ήταν πλούσια σε ελαϊκό οξύ και GLA, ενώ τα P του *Thamnidium elegans* παρόλο που ήταν πλούσια σε λινελαϊκό οξύ, αυτό δεν μετatrάπηκε σημαντικά σε GLA.

Δεδομένου ότι η κύρια λειτουργία των PUFAs στους Ζυγομύκητες σχετίζεται με τη συμμετοχή τους στις μυκηλιακές μεμβράνες θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι η βιοσύνθεση αυτών των λιπαρών οξέων σχετίζεται άμεσα με την μυκηλιακή αύξηση. Ωστόσο αυτό ισχύει μόνο για ορισμένες περιπτώσεις Ζυγομυκήτων όπως αυτή του *M. ramanniana*. Αντίθετα, υπό τις ίδιες πειραματικές συνθήκες, η βιοσύνθεση των PUFAs στην περίπτωση του *C. echinulata* συνεχίζεται ακόμη και μετά την ολοκλήρωση της αύξησης, υποδεικνύοντας ότι σε αυτό το είδος η βιοσύνθεση δεν σχετίζεται άμεσα με την πρωτογενή αύξηση.



## Distribution of fatty acids in lipids synthesized by Zygomycetes grown on glycerol

**Bellou S., Moustogianni A. and Aggelis G.**

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

Oleaginous Zygomycetes have the ability to accumulate large amounts of lipids rich in polyunsaturated fatty acids (PUFAs) that are of pharmaceutical and nutritional interest. In all investigated strains fungal mycelia contained higher amounts of neutral lipids (NL) than glycolipids plus sphingolipids (G+S) and phospholipids (P), while biosynthesis of P in *Mortierella ramanniana*, *Mucor* sp. and *Cunninghamella echinulata* occurred though NL accumulation process was in progress. PUFA concentration gradually decreased in all lipid fractions of *M. ramanniana* during growth. In contrast, in *C. echinulata* concentration of both linoleic acid and  $\gamma$ -linolenic acid (GLA) strongly increased with time in all lipids, especially in P. Lipids of *Mucor* sp. were enriched in both oleic acid and GLA, while P of *Thamnidium elegans* were enriched in linoleic acid, but this fatty acid was not efficiently converted to GLA.

Taking for granted that the main function of PUFAs in Zygomycetes is associated to their participation in mycelial membranes we could suppose that biosynthesis of these fatty acids is strongly associated to mycelial growth. However, this is accurate only for some Zygomycetes, such as *M. ramanniana*. On the contrary, under the experimental conditions used in this work, PUFAs biosynthesis in *C. echinulata* persists after growth cessation, suggesting that in this species biosynthesis is not a strictly growth-associated process.

## Κινητικές αύξησης και μελέτη λιπιδίων του μικροφύκου *Nannochloropsis oculata* και του τροχοζώου *Brachionus plicatilis*

**Μπίρκου Μ.<sup>1,2</sup>, Μπόκας Δ.<sup>2</sup> και Αγγελής Γ.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Εργαστήριο Μικροβιολογίας, Τομέας Γενετικής, Βιολογίας Κυττάρου και Ανάπτυξης, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών, Πάτρα, 265 04-GR  
<sup>2</sup>Plagton S.A., Γρίβα 17, Αργάνιο 301 00-GR

Τα μικροφύκη καλλιεργούνται σε εμπορική κλίμακα ως πηγή πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, β-καροτενίου κ.ά. προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας. Αποτελούν επίσης σημαντικά πρόσθετα ή αποκλειστική πηγή τροφής πολλών υδρόβιων ζώων (τροχοζώων) τα οποία στη συνέχεια χρησιμοποιούνται στη διατροφή των ιχθύων. Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε καλλιέργεια του *Nannochloropsis oculata* σε βιοαντιδραστήρες βιομηχανικής κλίμακας (300 l) σε συνθήκες αυτοτροφικής αύξησης (απουσία οργανικής πηγής άνθρακα). Οι μέγιστες τιμές πυκνότητας κυττάρων ( $=1,45 \times 10^6$  κύτταρα/ml) και συγκέντρωσης βιομάζας ( $=220$  mg/L) επιτεύχθηκαν μετά από 70 h καλλιέργειας. Τα λιπίδια του μικροφύκου αποτελούνταν από 50 % ουδέτερα λιπίδια, 35 % φωσφολιπίδια και 15 % σφιγγολιπίδια+γλυκολιπίδια που περιείχαν παλμιτικό (24,9 %), παλμιτολεϊκό (14,9 %), στεατικό (6,3 %), ελαϊκό (28,4 %), λινελαϊκό (12,3 %) και α-λινολενικό οξύ (22,8 %), ενώ δεν ανιχνεύθηκαν εικοσιπεντανοϊκό οξύ (EPA) και εικοσιδυοεξανοϊκό οξύ (DHA).

Τροχοζωα του είδους *Brachionus plicatilis* διατρεφόμενα με κύτταρα του *N. oculata* παρήγαγαν λιπίδια αποτελούμενα από παλμιτικό (12,9 %), παλμιτελαϊκό (20,2 %), στεατικό (7,6 %), ελαϊκό (26,2 %), λινελαϊκό (15,7 %) και α-λινολενικό οξύ (7,8 %). Όταν χρησιμοποιήθηκε στη διατροφή τους ζύμη αρτοποιίας τα λιπίδιά τους περιείχαν παλμιτικό (12,1 %), παλμιτελαϊκό (24,3 %), στεατικό (8,2 %), ελαϊκό (30,3 %), λινελαϊκό (14,5 %) και α-λινολενικό (4,5 %). Μετά την παραμονή τους σε εμπλουτιστικό μέσο που περιείχε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα τα λιπίδια τους περιείχαν παλμιτικό (17,9 %), παλμιτελαϊκό (6,7 %), στεατικό (4,1 %), ελαϊκό (17,4 %), λινελαϊκό οξύ (15,1 %), α-λινολενικό (3,6 %), EPA (3,8 %) και DHA (20,0 %).



## Kinetics of growth and lipid composition of microalgae *Nannochloropsis oculata* and rotifers *Brachionus plicatilis*

**Birkou M.<sup>1,2</sup>, Bokas D.<sup>2</sup> and Aggelis G.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Unit of Microbiology, Division of Genetics, Cell and Development Biology, Department of Biology; University of Patras 265 04-GR

<sup>2</sup>Plagton S.A., Griva 17, Agrinio 301 00-GR

Microalgae are nowadays commercially cultivated as a source of polyunsaturated fatty acids, beta-carotene and other high-added value products. They are also an important feed and feed additive for many aquatic animals (i.e. rotifers) which, in turn, are used as live food in larvae feed.

In this study *Nannochloropsis oculata* was cultivated in industrial scale bioreactors (300 l) under autotrophic culture conditions (in the absence of organic matter). The maximum cell density ( $=1.45 \times 10^6$  cells/ml) and biomass ( $=220$  mg/ L) values achieved after 70 h cultivation. Microalgae's lipids consisted of 50 % neutral lipids, 35 % phospholipids and 15 % glycolipids plus sphingolipids, containing palmitic (24,9 %), palmitoleic (14,9 %), stearic (6,3 %), oleic (28,4 %), linoleic (12,3 %),  $\alpha$ -linolenic acid (22,8 %), while eicosapentaenoic and (EPA) and docosahexaenoic acids (DHA) were not detected.

Rotifers, *Brachionus plicatilis* fed with *N. oculata* cells produced lipids consisted of palmitic (12,9 %), palmitoleic (20,2 %), stearic (7,6 %), oleic (26,2 %), linoleic (15,7 %) and  $\alpha$ -linolenic acid (7,9 %). Using baker's yeast as feed, lipids of rotifers consisted of palmitic (12,1 %), palmitoleic (24,3 %), stearic (8,2 %), oleic (30,3 %), linoleic (14,5 %) and  $\alpha$ -linolenic acid (4,5 %). When rotifers remained in an enrichment medium containing polyunsaturated fatty acids their lipids consisted of palmitic (17,9 %), palmitoleic (6,7 %), stearic (4,1 %), oleic (17,4 %), linoleic (17,4 %),  $\alpha$ -linolenic acid (3,6 %), EPA (3,8 %) and DHA (20,0 %).

## Επίδραση της παρουσίας μορίων-σημάτων επικοινωνίας μικροβιακής προέλευσης στην ανάπτυξη αλλοιογόνων μικροοργανισμών

**Μπλάνα Β.Α.<sup>1,2</sup>, Γκίκα Π.<sup>1</sup>, Πανάγου Ε.Ζ.<sup>1</sup> και Νυχάς Γ.-Ι.Ε.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Εργ. Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας Τροφίμων, Τμήμα Επιστήμης & Τεχνολογίας Τροφίμων, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιερά οδός 75, Αθήνα 11855,

<sup>2</sup>Applied Mycology Group, Cranfield Health, Cranfield University, Bedford MK43 0AL, UK

Στην παρούσα μελέτη, ελέγχθηκε η επίδραση των μορίων-σημάτων επικοινωνίας (αυτεπαγωγείς τύπου 1/AI-1 και 2/AI-2) μικροβιακής προέλευσης στην αύξηση των αλλοιογόνων βακτηρίων *Pseudomonas fluorescens* 395 και *Serratia liquefaciens* VK75. Για την παραλαβή των μορίων-σημάτων επικοινωνίας χρησιμοποιήθηκαν τα βακτηριακά στελέχη *Hafnia alvei* 718 και *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium 4/74, τα οποία παράγουν τα μόρια AI-1 και AI-2, αντίστοιχα. Ως αρνητικοί μάρτυρες αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν εκχυλίσματα από ενεργά αναπυσσόμενη καλλιέργεια του τροποποιημένου στελέχους *Hafnia alvei* 718 hall, το οποίο δεν παράγει μόρια AI-1, ενώ το υπερκείμενο της καλλιέργειας του στελέχους *Salmonella* Typhimurium αποστειρώθηκε (121°C για 15 λεπτά) έτσι ώστε να αδρανοποιηθούν τα μόρια AI-2. Η παρουσία και η απουσία των μορίων-σημάτων επικοινωνίας στα υπερκείμενα επιβεβαιώθηκε με τη χρήση των στελεχών αναφοράς *Agrobacterium tumefaciens* A136, το οποίο ανιχνεύει τα μόρια AI-1, και *Vibrio harveyi* BAA-1117, το οποίο ανιχνεύει τα μόρια AI-2, ενώ ο προσδιορισμός του μεταβολικού προφίλ των στείνων υπερκειμένων προσδιορίστηκε με την μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής αποδόσεως (HPLC). Η παρουσία μορίων-σημάτων επικοινωνίας επηρέασε με διαφορετικό τρόπο τις κινητικές παραμέτρους των υπό εξέταση στελεχών, ειδικότερα τη διάρκεια της φάσης προσαρμογής ( $\lambda$ ) καθώς και το μέγιστο ειδικό ρυθμό αύξησης ( $\mu_{max}$ ). Συγκεκριμένα, η παρουσία μορίων AI-1 συνέβαλε στην αύξηση τόσο της διάρκειας της φάσης προσαρμογής, όσο και του ρυθμού αύξησης του στελέχους *Ps. fluorescens*, ενώ το στέλεχος *S. liquefaciens* επηρεάστηκε μερικώς σε σύγκριση με τον αρνητικό μάρτυρα αναφοράς. Τέλος, η παρουσία χαμηλής συγκέντρωσης μορίων AI-2 μείωσε τη διάρκεια της φάσης προσαρμογής αλλά και τον ρυθμό αύξησης των δύο αλλοιογόνων στελεχών, ενώ η παρουσία υψηλής συγκέντρωσης των αντίστοιχων μορίων διατήρησε σταθερό τον κυτταρικό πληθυσμό τους. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν την πιθανή συμμετοχή των μορίων-σημάτων επικοινωνίας στην ρύθμιση της μικροβιακής οικολογίας.

Η εργασία χρηματοδοτήθηκε από το κοινωτικό έργο ProSafeBeef ([www.prosafebeef.eu](http://www.prosafebeef.eu)).





## Effect of microbial quorum sensing signal molecules on the growth of spoilage bacteria

**Blana V.A.<sup>1,2</sup>, Gkika P.<sup>1</sup>, Panagou E.Z.<sup>1</sup> and Nychas G.-J.E.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Laboratory of Microbiology and Biotechnology of Foods, Department of Food Science and Technology, Agricultural University of Athens, Iera Odos 75, Athens 11855, Greece.

<sup>2</sup>Applied Mycology Group, Cranfield Health, Cranfield University, Bedford MK43 0AL, UK

The aim of the present study was to evaluate the effect of microbial quorum sensing signaling molecules (autoinducers 1/AI-1 and 2/AI-2) on the growth kinetic parameters of the spoilage bacteria *Pseudomonas fluorescens* 395 and *Serratia liquefaciens* VK75. For the production of the signaling molecules the bacterial strains *Hafnia alvei* 718 and *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium 4/74 were used, that are capable of producing AI-1 and AI-2 molecules, respectively. Cell-free extracts from the AI-1 lacking mutant *H. alvei* 718 and heat inactivated culture extract from AI-2 producer *Salmonella* Typhimurium served as negative controls. The presence of signaling molecules in culture extracts was confirmed using the biosensor strains *Agrobacterium tumefaciens* A136 and *Vibrio harveyi* BAA-1117, which detect AI-1 and AI-2 molecules, respectively. The metabolic profile of the culture extracts containing these signal molecules was determined using High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The addition of microbial signaling molecules (AI-1 and AI-2) affected differently the estimated growth kinetic parameters (i.e., lag phase and maximum specific growth rate) of the spoilage bacteria, *P. fluorescens* and *S. liquefaciens*. More specifically, the presence of AI-1 resulted in both growth rate and lag phase duration increase of *P. fluorescens*, whereas *S. liquefaciens* was partly influenced (only the duration of lag phase), compared to the negative control. On the other hand, the addition of low concentration of AI-2 resulted in growth rate and lag-phase reduction in both spoilage bacteria, while no significant growth was observed using higher concentration of AI-2, compared to the negative control. These data indicate the involvement of signaling molecules in modulating the bacterial ecology.

**Acknowledgement:** This study was funded by ProSafeBeef integrated project ([www.prosafebeef.eu](http://www.prosafebeef.eu)) within the 6th Framework Programme of the EU.

## Ανίχνευση και μοριακός χαρακτηρισμός του ενδοσυμβιωτικού βακτηρίου *Wolbachia* σε φυσικούς και εργαστηριακούς πληθυσμούς του γένους *Glossina* (μύγες τσετσέ)

**Ντουντούμης Β.<sup>1</sup>, Τσιάμης Γ.<sup>1</sup>, Brelsfoard C.<sup>2</sup>, Wamwiri F.<sup>3</sup>, Νταλαπέρας Σ.<sup>1</sup>, Adly A.-A.<sup>4</sup>, Serap A.<sup>2</sup> και Μπούρτζης Κ.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Τμήμα Διαχείρισης Περιβάλλοντος και Φυσικών Πόρων, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Σεφέρη 2, 30100 Αγρίνιο, Ελλάδα,

<sup>2</sup>Yale School of Public Health, Epidemiology and Public Health, New Haven, Connecticut, USA,

<sup>3</sup>Kenya Agricultural Research Institute, Trypanosomiasis Research Centre, P.O. Box 362-00902, Kikuyu, Kenya,

<sup>4</sup>Insect Pest Control Laboratory, Joint FAO/IAEA Programme of Nuclear Techniques in Food and Agriculture, Vienna, Austria

Η *Wolbachia* είναι ένα υποχρεωτικά ενδοκυττάριο και μητρικά κληρονομούμενο συμβιωτικό βακτήριο που απαντά στα αρθρόποδα και τους νηματώδεις και ανήκει στην α-υποομάδα των Πρωτεοβακτηρίων. Η ευρεία διάδοσή του στα έντομα και η ικανότητά του να επάγει αναπαραγωγικές ανωμαλίες όπως κυτταροπλασματική ασυμβατότητα, παρθενογένεση, θηλυκοποίηση και θανάτωση αρσενικών ατόμων, έχει προσελκύσει το ερευνητικό ενδιαφέρον αφενός για το ρόλου που έχει στη βιολογία, την οικολογία και την εξέλιξη των εντόμων και αφετέρου για την αξιοποίησή του σε εφαρμογές βιολογικής καταπολέμησης επιβλαβών οργανισμών.

Το γένος *Glossina* περιλαμβάνει είδη τσετσέ που είναι φορείς της τρυπανοσωμίας στην Αφρική, η οποία προκαλεί την ασθένεια του ύπνου στον άνθρωπο και την αντίστοιχη στα ζώα, γνωστή ως nagana. Ενδεχόμενη χρήση του βακτηρίου *Wolbachia* σε μεθόδους βιολογικής καταπολέμησης της μύγας τσετσέ προϋποθέτει την ανίχνευση και τον πλήρη γενετικό χαρακτηρισμό των στελεχών του. Στην παρούσα εργασία επιχειρήσαμε την ανίχνευση του βακτηρίου *Wolbachia* σε φυσικούς και εργαστηριακούς πληθυσμούς ειδών τσετσέ. Συνολικά μελετήσαμε 9 εργαστηριακούς πληθυσμούς καθώς και 3703 δείγματα φυσικών πληθυσμών προερχόμενα από 11 χώρες της Αφρικής από εννέα διαφορετικά είδη του γένους *Glossina*. Η γενετική ταυτοποίηση των βακτηριακών στελεχών που ανιχνεύτηκαν βασίστηκε στην αλληλούχιση του 16S rRNA γονιδίου, του γονιδίου *wsp* και στο σύστημα πολλαπλών γενετικών τόπων (MLST – multi locus sequence typing) που αποτελείται από πέντε συντηρημένα γονίδια (*gatB*, *coxA*, *hcpA*, *fbpA* και *ftsZ*). Το συμβιωτικό βακτήριο *Wolbachia* ανιχνεύτηκε στο 30% των δειγμάτων, κυρίως στα είδη *Glossina morsitans morsitans*, *Glossina morsitans centralis* και *Glossina austeni*. Τα στελέχη *Wolbachia* ταυτοποιήθηκαν γενετικά με το σύστημα MLST σε τουλάχιστον επτά αντιπροσωπευτικά δείγματα φυσικών και εργαστηριακών πληθυσμών της μύγας τσετσέ.



## Identification and molecular characterization of the endosymbiotic bacterium *Wolbachia* in natural and lab populations of *Glossina* flies (tse-tse)

**Doudoumis V.<sup>1</sup>, Tsiamis G.<sup>1</sup>, Brelsfoard C.<sup>2</sup>, Wamwiri F.<sup>3</sup>, Dalaperas S.<sup>1</sup>, Adly A.-A.<sup>4</sup>, Serap A.<sup>5</sup> and Bourtzis K.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Department of Environmental and Natural Resources Management, University of Ioannina, 2 Seferi Street, 30100 Agrinio, Greece,

<sup>2</sup>Yale School of Public Health, Epidemiology and Public Health, New Haven, Connecticut, USA,

<sup>3</sup>Kenya Agricultural Research Institute, Trypanosomiasis Research Centre, P.O. Box 362-00902, Kikuyu, Kenya,

<sup>4</sup>Insect Pest Control Laboratory, Joint FAO/IAEA Programme of Nuclear Techniques in Food and Agriculture, Vienna, Austria. [oiuoi@iaea.org](mailto:oiuoi@iaea.org)

*Wolbachia* is a genus of endosymbiotic  $\alpha$ -Proteobacteria infecting a wide range of arthropods and filarial nematodes. The ability of the bacterium to cause numerous reproductive abnormalities like cytoplasmic incompatibility, parthenogenesis, feminization, and male killing has attracted research interest regarding its role in biology, ecology and the evolutionary processes of insects and its use in the biological control of harmful pests.

*Glossina* is the major vector of African trypanosomiasis the causative agent of the sleeping sickness in humans and the corresponding sickness in animals, known as nagana. Potential use of the bacterium in biological control programs for the population suppression of the tsetse flies requires the detection and genotyping of the respective *Wolbachia* strains. In this study 9 lab and 3703 samples from natural populations originating from 9 different species of *Glossina* and 11 countries from Africa have been examined. The genotyping of the *Wolbachia* strains was based on the 16S rRNA gene, the *wsp* gene and the MLST (Multi Locus Sequence Typing) system of five conserved genes (*gatB*, *coxA*, *hcpA*, *fbpA* and *ftsZ*). *Wolbachia* was identified in 30% of all samples tested and it was highly prevalent in *Glossina morsitans morsitans*, *Glossina morsitans centralis* and *Glossina austeni*. *Wolbachia* strains from seven representative samples from natural and lab population were further characterized by MLST.

## Βιοτεχνολογική παραγωγή ελαίου από γλυκό σόργο με τη χρήση του ελαιογόνου μύκητα *Mortierella isabellina* ATHUM 2935

**Οικονόμου Χ.Ν.<sup>1</sup>, Αγγελής Γ.<sup>2</sup>, Παύλου Σ.<sup>3,4</sup> και Βαγενάς Δ.Β.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Τμήμα Διαχείρισης Περιβάλλοντος & Φυσικών Πόρων, Πανεπιστήμιο Δυτικής Ελλάδας, Αγρίνιο, Σεφέρη 2, 30100,

<sup>2</sup>Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών, Πανεπιστημιούπολη 26500 Πάτρα,

<sup>3,4</sup>Τμήμα Χημικών Μηχανικών, Πανεπιστήμιο Πατρών, Πανεπιστημιούπολη 26500 Πάτρα & Ερευνητικό Ινστιτούτο Χημικής Μηχανικής και Χημικών Διεργασιών Υψηλής Θερμοκρασίας (ΙΤΕ/ΕΙΧΗΜΥΘ), Οδός Σταδίου, Πλατάνι, Τ.Θ. 1414, 26504 Πάτρα

Διάφορα είδη μικροοργανισμών χρησιμοποιούνται ευρέως τα τελευταία χρόνια για την παραγωγή μικροβιακού ελαίου πλούσιου σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα. Οι μικροοργανισμοί αυτοί καλούνται ελαιογόνοι καθώς εμφανίζουν την ικανότητα να συσσωρεύουν περισσότερο από 25% λιπίδια (έλαιο) στη μικροβιακή τους μάζα. Οι ελαιογόνοι μικροοργανισμοί αποτελούν μια ελκυστική ιδέα για την παραγωγή βιοηθάνης, κυρίως για δυνατότητα αξιοποίησης αρκετών παραπροϊόντων της βιομηχανίας τροφίμων και αγροτοβιομηχανικών παραπροϊόντων.

Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η παραγωγή ελαίου από εκχύλισμα γλυκού σόργου χρησιμοποιώντας τον ελαιογόνο μύκητα *Mortierella isabellina* ATHUM 2935. Ο συγκεκριμένος μύκητας έχει χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή μικροβιακού ελαίου σε ποικίλα υποστρώματα και εμφανίζει την ικανότητα να συσσωρεύει υψηλά ποσά ελαίου στην κυτταρική του μάζα. Το γλυκό σόργο (ενεργειακό φυτό) επιλέχθηκε σαν υπόστρωμα για την ανάπτυξη του μύκητα, κυρίως λόγω της μεγάλης περιεκτικότητας του στελέχους του σε ζυμώσιμα σάκχαρα. Στην παρούσα μελέτη κρίθηκε απαραίτητη η εκχύλιση των συστατικών του γλυκού σόργου, με σκοπό την παραλαβή των σακχάρων που εμπεριέχονται σε αυτό.

Τα σάκχαρα που περιέχονται στο εκχύλισμα σόργου, αξιοποιούνται από τα κύτταρα σαν πηγή ενέργειας και άνθρακα. Στους ελαιογόνους μικροοργανισμούς, σε συνθήκες έλλειψης αζώτου, η ποσότητα σακχάρων μετατρέπεται μέσα στα κύτταρα σε έλαιο.

Στην παρούσα εργασία, διεξήχθησαν πειράματα κινητικής σε υγρή καλλιέργεια για την μελέτη της συμπεριφοράς του ελαιογόνου μύκητα. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε φιάλες Erlenmeyer των 250 ml. Σε κάθε φιάλη τοποθετούνταν εκχύλισμα σόργου υπό ασηπτικές συνθήκες, ενώ ο εμβολιασμός του υποστρώματος πραγματοποιούνταν με διάλυμα σπορίων μύκητα. Από τα πειράματα κινητικής που πραγματοποιήθηκαν, παρατηρήθηκε ότι η απόδοση σε έλαιο ανέρχονταν περίπου στο 50% της βιομάζας του μύκητα. Το αποτέλεσμα αυτό κρίθηκε ιδιαίτερα ικανοποιητικό, καθώς είναι η μέγιστη απόδοση που μπορεί να επιτευχθεί με τον συγκεκριμένο μύκητα σε υγρή καλλιέργεια.



## **Biotechnological production of oil from sweet sorghum using the oleaginous fungus *Mortierella isabellina* ATHUM 2935**

**Economou C.N.<sup>1</sup>, Aggelis G.<sup>2</sup>, Pavlou S.<sup>3,4</sup> and Vayenas D.V.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Department of Environmental and Natural Resources Management,  
University of Western Greece, G. Seferi 2, 30100 Agrinio,

<sup>2</sup>Division of Genetics, Cell & Development Biology, Department of Biology,  
University of Patras, 26504 Patras,

<sup>3,4</sup>Department of Chemical Engineering, University of Patras, 26504 Patras  
& Institute of Chemical Engineering and High Temperature Chemical Processes, 26504 Patras

Various strains of oleaginous microorganisms have been widely used for the production of microbial oil rich in polyunsaturated fatty acids. Oleaginous microorganisms have the ability to accumulate more than 25% lipids (oil) in their microbial mass. These microorganisms constitute an attractive idea for the biodiesel production, mainly for the possibility of utilization of many food industry by-products and agro-industrial by-products.

The aim of this research is the study of oil production in extract of sweet sorghum using the oleaginous fungus *Mortierella isabellina* ATHUM 2935.

This fungus has been used in variety of substrates for the microbial oil production, since it can accumulate high amounts of lipids in cell mass. Sweet sorghum (energy crop) was selected as substrate for the fungus growth, mainly due to its high fermentable sugars content. In this study it was necessary to extract the components of sweet sorghum, in order to receive the sugars contained in it.

The sugars contained in extract of sweet sorghum, used by cells as carbon and energy source. In oleaginous microorganisms under nitrogen limited conditions sugars assimilated by the cells and is converted into oil.

In this research, kinetic experiments were conducted, in order to study the behaviour of the fungus to sweet sorghum extract in liquid cultures. Kinetic experiments were performed in 250 ml Erlenmeyer flasks, under aseptic conditions, while the substrate inoculation was performed with fungal spores suspended in water. From the kinetic experiments that carried out, it was observed that oil yield amounted about 50% of the fungus biomass. This result was very satisfactory, as is the maximum efficiency can be achieved by this fungus in liquid culture.

## Η κατάσταση της βιοπληροφορικής στην παγκόσμια σκηνή

**Ουζούνης Χ.**

Η βιοπληροφορική έχει αναπτυχθεί γρήγορα και έχει επεκταθεί σε όλους τους τομείς της βιολογικής έρευνας. Αυτή η επέκταση έχει δημιουργήσει έναν παγκόσμιο στόβο, μετασχηματίζοντας μια μικρή ερευνητική περιοχή σε ένα εγχείρημα δισεκατομμυρίων δολλαρίων. Βρισκόμαστε αντιμέτωποι τώρα με το γεγονός ότι υπάρχουν χιλιάδες ερευνητές που ασχολούνται με την υπολογιστική βιολογία, ωθούμενοι και υποστηριζόμενοι από την ευρύτερη βιομηχανία της γενωμικής τεχνολογίας. Οι αριθμοί υπολογίζονται στην περιοχή των 100,000 επαγγελματιών. Η πλειοψηφία αυτής της κοινότητας δραστηριοποιείται στον αναπτυσσόμενο κόσμο, με τις ΗΠΑ ως ηγέτη. Ο κορεσμός της αγοράς εργασίας έρευνας και ανάπτυξης εκτιμάται να βρίσκεται στην άνω περιοχή αυτής της κατανομής (πχ περίπου 100 επιστήμονες ανά εκατομμύριο πληθυσμού). Οι μεγαλύτερες χώρες με σημαντικούς τομείς βιοτεχνολογίας έχουν 30 η περισσότερους επιστήμονες ανά εκατομμύριο, ενώ οι μικρότερες χώρες (πχ Ισπανία, Νέα Ζηλανδία) έχουν λιγότερο από 30 επιστήμονες ανά εκατομμύριο. Όσον αφορά την Ελλάδα, δεν αναμένεται να ξεπεραστεί ο ενδεικτικός αριθμός των 100 (η 10 ανά εκατομμύριο) πέραν του διπλασίου, πλησιάζοντας έτσι την Ισπανία. Η οριακή τιμή των 30 επιστημόνων ανά εκατομμύριο μεταφράζεται σε περίπου 300 διδάκτορες για την Ελλάδα (δηλ. 20 ομάδες). Υπό αυτή την έννοια, αυτή η κοινότητα στην Ελλάδα δεν θα μπορούσε να υπερ-διπλασιάσει τα μέλη της σύντομα, εντούτοις οι δραστηριότητές της μπορεί και πρέπει να επεκταθούν σε βάθος, ποιότητα και ένταση. Πράγματι, εάν λάβουμε υπόψιν όχι μόνον τους αριθμούς των επιστημόνων σαν δείκτη δραστηριότητας αλλά την κατάταξη του ΑΕΠ κατά κεφαλήν (διορθωμένο ως προς την αγοραστική δύναμη) ως εκτίμηση τού εθνικού πλούτου καθώς και τον εθνικό δείκτη Η στο πεδίο ως εκτίμηση του ερευνητικού αντίκτυπου, τότε η εικόνα διαφοροποιείται. Το γινόμενο αυτών των αριθμών ορίζεται ως ο “δείκτης καθήκοντος για το ερευνητικό πεδίο” (RFDI για συντομία). Με μέσο όρο δείγματος το 1273, ο δείκτης RFDI σε χώρες όπως η Κίνα, η Αγγλία (UK), η Γερμανία, η Ιαπωνία, η Βραζιλία, η Γαλλία, η Ιταλία και οι ΗΠΑ είναι πάνω από το μέσο όρο, με αυτήν την σειρά. Κάτω του μέσου, με υψηλή τιμή του δείκτη RFDI είναι η Ισπανία, ο Καναδάς, το Μεξικό και η Ταϊλάνδη. Περισσότερη εργασία απαιτείται για άλλες αναπτυσσόμενες χώρες για να φθάσουν σε τιμές >900, π.χ. οι Αυστραλία/Νέα Ζηλανδία, Ελλάδα/Κύπρος και η Σιγκαπούρη. Τα συμπεράσματα και οι γενικές επιπτώσεις συζητούνται.

## The state of Bioinformatics on the world stage

Ouzounis C.

Bioinformatics has developed rapidly and expanded into all areas of biological research. This expansion has created a global arena, transforming a cottage research industry into a multibillion dollar business. We are now faced with the fact that there are thousands of researchers practicing computational biology, driven and supported by the wider genomics industries. The numbers are in the area of >100,000 practitioners. The majority of this community is active in the developed world, with the USA being the leader. The saturation of the research and development markets appears to be the upper end of the scale (e.g. around 100 scientists per million population). The larger countries with significant biotechnology sectors have 30 or more scientists per million, while the smaller countries (e.g. Spain, New Zealand) have less than 30 scientists per million. Regarding Greece, one would not expect to surpass the indicative number of 100 (or 10 per million) by more than a factor of two, i.e. approach Spain. The cutoff value of 30 scientists per million translates to around 300 PhD scientists for Greece (i.e. 20 teams). In that sense, this community in Greece might not more than double its members any time soon, however its activities can and should expand in depth, quality and intensity. Indeed, if one takes into account not only the numbers of scientists as an index of activity but the GDP per capita (PPP) rank as an estimate of national wealth plus the national h-index in the field as an estimate of research impact, then the picture gets different. The product of these numbers is defined as the 'research field-duty index' (RFDI for short). With a sample average of 1273, the RFDI for countries such as China, England (UK), Germany, Japan, Brazil, France, Italy and the USA are above average, in this order. Below average with a high FDI value are Spain, Canada, Mexico and Thailand. More work is required for other developed countries to reach a value of >900, e.g. Australia/New Zealand, Greece/Cyprus and Singapore. Conclusions and general implications are discussed.

## Έλεγχος της ανάπτυξης της *Listeria welsimeri* 15008 στο γιαούρτι με την 'in situ' παραγωγή βακτηριοσίνης από το στέλεχος *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0040

Παναγοπούλου Ε.<sup>1</sup>, Ακτύπης Α.<sup>1</sup> και Δροσινός Ε.<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup>Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιερά Οδός 75, 11855 Αθήνα

Το βακτηριοσινογόνο 'άγριο' στέλεχος (*Bac*<sup>+</sup>) *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0040, που έχει απομονωθεί από παραδοσιακό γιαούρτι, χρησιμοποιήθηκε στην παρασκευή γιαούρτης με σκοπό να εκτιμηθεί η εν δυνάμει ανασταλτική του δράση κατά του στελέχους της *Listeria welsimeri* 15008. Ανασυσταμένο άπαχο γάλα ενοφθαλμίστηκε με καλλιέργεια γιαούρτης αποτελούμενη από το βακτηριοσινογόνο στρεπτόκοκκο και το *Lactobacillus bulgaricus* ACA-DC 0084 σε αναλογία 1:1 και με πληθυσμό της *Listeria welsimeri* 15008  $10^2$  (cfu.ml<sup>-1</sup>) και  $10^4$  (cfu.ml<sup>-1</sup>) αντίστοιχα. Κατά την παρασκευή και την διατήρηση της γιαούρτης στους 4°C για διάστημα 20 ημερών μετρήθηκαν οι πληθυσμοί της *Listeria* και των μικροοργανισμών ζύμωσης, η παραγόμενη 'in situ' βακτηριοσίνη και η κινητική της, όσο και η πορεία του pH και της οξύτητας της γιαούρτης.

Κατά την παρασκευή της γιαούρτης η ενεργότητα της παραγόμενης βακτηριοσίνης έφτασε σε επίπεδο 2.560 (AU.ml<sup>-1</sup>) στη 2<sup>η</sup> ώρα της ζύμωσης (pH 5.78) και στη συνέχεια μειώθηκε σε 160 (AU.ml<sup>-1</sup>) στο τέλος αυτής (pH 4.8), όπου διατηρήθηκε σταθερή καθ' όλη τη διάρκεια συντήρησης στους 4°C. Στο γιαούρτι με το χαμηλό ενοφθάλμισμα λιστέριας ( $10^2$  cfu.ml<sup>-1</sup>), η *Listeria* δεν επέζησε μετά από 24 ώρες συντήρησης και δεν ανιχνεύθηκε καθ' όλη τη διάρκεια της αποθήκευσης 20 ημερών σε θερμοκρασία ψύξης (4°C). Το παθογόνο επέζησε, εντούτοις, καθ' όλο το διάστημα συντήρησης των 20 ημερών σε δείγματα γιαούρτης που παρήχθησαν χωρίς το βακτηριοσινογόνο στέλεχος (μάρτυρας).

Αντίθετα, στο γιαούρτι με το υψηλό ενοφθάλμισμα λιστέριας ( $10^4$  cfu.ml<sup>-1</sup>) το παθογόνο επέζησε και τις 20 ημέρες συντήρησης τόσο στο μάρτυρα όσο και στη γιαούρτη με τη βακτηριοσίνη, αν και το προφίλ ενεργότητας της βακτηριοσίνης ήταν το ίδιο όπως παραπάνω.





## Biocontrol of *Listeria welshimeri* in yoghurt by 'in situ' bacteriocin production from *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0040

Panagopoulou E.<sup>1</sup>, Aktypis A.<sup>1</sup> and Drosinos E.<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup>Laboratory of Food Quality Control and Hygiene, Food Science and Technology  
Dpt., Agricultural University of Athens, Iera Odos 75, 11855 Athens

Bacteriocin-producing (*Bac*<sup>+</sup>) *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0040 isolated from traditional yoghurt was used in the preparation of yoghurt to assess its potential inhibitory activity against *Listeria welshimeri* 15008. Skim milk was inoculated with ca 10<sup>2</sup> and 10<sup>4</sup> cfu/ml *Listeria welshimeri* and fermented with a mixed thermophilic culture consisting of the streptococci (*Bac*<sup>+</sup>) organism and *Lactobacillus bulgaricus* ACA-DC 0084 in a ratio 1:1. Numbers of *Listeria* and fermented bacteria were monitored during fermentation and storage of yoghurt at refrigeration temperature (c. 4°C) for up to 20 days. During the fermentation and yoghurt storage the activity of 'in situ' bacteriocin production, the kinetics of thermophilic culture, pH and acidity was monitored as well. During yogurt manufacturing the bacteriocin activity was reached at 2560 AU.ml<sup>-1</sup> in the 2<sup>nd</sup> hour of fermentation (pH 5.78) and decreased to 160 AU.ml<sup>-1</sup> at the end of fermentation (pH 4.8), where maintained on this level during the storage period. In yogurt with the low *Listeria* inocula (ca 10<sup>2</sup> cfu.ml<sup>-1</sup>), no *Listeria* survived at 24 hours during storage at refrigeration temperature (ca 4°C). The pathogen survived, however, 20 days of storage at the same temperature in control samples (without produced bacteriocin). On the contrary, in yogurt with the high *Listeria* inocula (ca 10<sup>4</sup> cfu.ml<sup>-1</sup>) the pathogen survived 20 days of storage, although the profile of bacteriocin activity was the same as above.

## Επιδημία οφειλόμενη στον ιό του Δυτικού Νείλου στην Ελλάδα

**Παπά Α.**

Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Αρμποιών, Α' Εργαστήριο Μικροβιολογίας Ιατρικής Σχολής, ΑΠΘ

Μία μεγάλη επιδημία οφειλόμενη στον ιό του Δυτικού Νείλου παρατηρήθηκε στην Ελλάδα το καλοκαίρι του 2010. Περιστατικά της νόσου παρατηρήθηκαν σε 11 νομούς, τα περισσότερα στους νομούς Πέλλας και Ημαθίας. Ο ιός του Δ. Νείλου προκαλεί στον άνθρωπο ήπιες ή ασυμπτωματικές λοιμώξεις, αλλά σε μερικές περιπτώσεις προσβάλλεται το κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ) και εμφανίζεται εγκεφαλίτιδα ή μηνιγγίτιδα. Στην παρούσα επιδημία διαγνώστηκαν εργαστηριακά 191 περιστατικά με προσβολή ΚΝΣ (88% ως εγκεφαλίτιδα). Απεβίωσαν 35 ασθενείς, ηλικίας μεγαλύτερης των 70 ετών. Η επίπτωση της νευρολογικής νόσου ήταν 17,52 και 7,29 κρούσματα ανά 100.000 αγροτικού και αστικού πληθυσμού, αντίστοιχα. Εκτός των νευρολογικών περιστατικών, μεγάλος αριθμός ασθενών προσήλθε στα εξωτερικά ιατρεία των νοσοκομείων και κέντρων υγείας με εμπύρετη νόσο, συχνά συνοδευόμενη με κηλιδοβλατιδώδες εξάνθημα. Από τον μοριακό έλεγχο των κουνουπιών που συλλέχθηκαν στις περιοχές που παρουσιάστηκαν τα περιστατικά, βρέθηκε ότι το στέλεχος του ιού του Δ. Νείλου ανήκε στην ομάδα 2, η οποία έως πρόσφατα εθεωρείτο μη παθογόνος για τον άνθρωπο. Αλληλούχιση νουκλεοτιδίων ολόκληρου του γονιδιωματός του ιού έδειξε ότι το πλησιέστερο γενετικά στέλεχος είναι αυτό που είχε ανιχνευτεί στην Ουγγαρία και Αυστρία (σε πουλιά και σε ήπια περιστατικά σε ανθρώπους), από το οποίο διαφέρει σε 44 νουκλεοτίδια. Μία μετάλλαξη στο γονίδιο NS3, η H249P, η οποία σχετίζεται με παθογονικότητα σε στελέχη της ομάδας 1, πιθανώς να είναι η αιτία της αυξημένης παθογονικότητας του ελληνικού στελέχους. Ταυτόσημη αλληλουχία νουκλεοτιδίων ανιχνεύτηκε και σε δύο αιμοδότες, οι οποίοι βρέθηκαν θετικοί για τον ιό με τη μέθοδο ID-NAT. Είναι πολύ πιθανό αυτό το στέλεχος να αποτελέσει κίνδυνο και στο μέλλον για τη Δημόσια Υγεία της Ελλάδας, αλλά και άλλων χωρών.



## West Nile virus outbreak in Greece

**Papa A.**

National Reference Centre for Arboviruses, A<sup>1</sup> Department of Microbiology, Medical School, AUTH

A large outbreak caused by West Nile virus (WNV) occurred in summer 2010 in Greece. Cases were observed in 9 prefectures, with most of them in Pella and Imathia prefectures. WNV causes to humans a mild or asymptomatic infection; however, in a few cases central nervous system (CNS) is affected and the disease presents as encephalitis or meningitis. During the current outbreak, a number of 191 neurological cases were laboratory diagnosed (88% of them were encephalitis cases). Thirty-five patients, older than 70 years, died. The incidence of the neurological disease was 17.52 and 7.29 cases per 100,000 citizens of rural and urban areas, respectively. Apart the neurological cases, many patients presented with a febrile disease, usually accompanied by maculopapular exanthema. Molecular testing of mosquitoes collected at the sites where the cases were observed, showed that the strain belonged to WNV lineage 2, which until recently was considered not or low pathogenic to humans. Whole genome nucleotide sequencing showed that the genetically closest WNV strain was that detected in Hungary and Austria (in birds and in mild human cases), differing from it by 44 nucleotides. One mutation in NS3 gene, H249P, which has been related with pathogenicity in lineage 1 strains, might be the cause of the increased pathogenicity of the Greek strain. Identical sequences were recovered from two blood donors, who were detected WNV-positive by ID-NAT. This strain might be of great Public Health threat for Greece and other countries in the near future.

## Έλεγχος κουνουπιών κατά την διάρκεια επιδημίας του ιού του Δυτικού Νείλου στην Ελλάδα, 2010

Παπά Α.<sup>1</sup>, Ξανθοπούλου Κ.<sup>1</sup>, Gewehr S.<sup>2</sup>, Μουρελάτος Σ.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Α' Εργαστήριο Μικροβιολογίας, Ιατρική Σχολή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Θεσσαλονίκη

<sup>2</sup>Οικοανάπτυξη, Α.Ε., Θεσσαλονίκη

Μία μεγάλη επιδημία εγκεφαλίτιδας οφειλόμενη στον ιό του Δυτικού Νείλου (γένος *Flavivirus*, οικογένεια *Flaviviridae*) παρατηρήθηκε στη Βόρεια Ελλάδα τη θερινή περίοδο του 2010. Ο ιός του Δ. Νείλου μεταδίδεται με νύγμα μολυσμένων με τον ιό κουνουπιών, ενώ ο κύριος ξενιστής του είναι τα πτηνά τα οποία και συμμετέχουν στην γεωγραφική εξάπλωσή του. Επίκεντρο της επιδημίας ήταν η ευρεία περιοχή του Δέλτα του ποταμού Αξιού, που είναι σημαντικός σταθμός μεταναστευτικών πουλιών, αλλά και κατάλληλο οικοσύστημα για τα κουνούπια. Σκοπός της μελέτης ήταν η συλλογή κουνουπιών από τις περιοχές όπου παρατηρήθηκαν τα περιστατικά εγκεφαλίτιδας και η εξέταση αυτών ως προς την παρουσία γενετικού υλικού ιού του Δ. Νείλου.

Κατά την διάρκεια της επιδημίας συλλέχθηκαν με παγίδες CO<sub>2</sub> 3524 κουνούπια. Μετά την μορφολογική ταξινόμηση βρέθηκε ότι 91.7% ανήκαν στο γένος *Culex*, 6.4% στο γένος *Aedes* και 1.9% στο γένος *Anopheles*. Τα κουνούπια ομαδοποιήθηκαν σε 136 ομάδες ανά περιοχή συλλογής, ημερομηνία και γένος. Εφαρμόστηκαν δύο διαφορετικές PCR χρησιμοποιώντας δύο ζεύγη εκκινητών: ένα ζεύγος θεωρητικά ικανό να ανιχνεύσει όλους τους φλαβιούς, και ένα δεύτερο ζεύγος ειδικό για τον ιό του Δ. Νείλου.

Θετικές βρέθηκαν δύο ομάδες κουνουπιών του είδους *Culex pipiens*. Η πρώτη είχε συλλεγεί στο χωριό Νέα Σάντα του Νομού Κιλκίς, και η δεύτερη στο χωριό Γυψοχώρι του Νομού Πέλλας. Ανέυρεση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των προϊόντων της PCR και φυλογενετική ανάλυση έδειξε ότι τα δύο στελέχη ήταν ταυτόσημα και ανήκαν στον ιό του Δ. Νείλου ομάδας (lineage) 2, παρόμοια με στελέχη που είχαν ανιχνευτεί στην Ουγγαρία και τη Νότια Αφρική. Πιθανολογείται ότι τα μεταναστευτικά πτηνά διαδραμάτισαν σημαντικό ρόλο στην εισαγωγή του ιού στην Ελλάδα, ενώ οι αυξημένες βροχοπτώσεις και οι υψηλές θερμοκρασίες κατά την διάρκεια του καλοκαιριού συνετέλεσαν στον υπέρμετρο πολλαπλασιασμό των μολυσμένων κουνουπιών.

Συμπεραίνεται ότι στελέχη ιού του Δ. Νείλου ομάδας (lineage) 2 με μεγάλη παθογόνο δράση έχουν κάνει την εμφάνισή τους στην Ευρώπη και προκαλούν επιδημίες, οπότε απαιτείται αυξημένη επαγρύπνηση και έλεγχος των κουνουπιών.



## Testing of mosquitoes during the human outbreak of West Nile virus infections in Greece 2010

Papa A.<sup>1</sup>, Xanthopoulou K.<sup>1</sup>, Gewehr S.<sup>2</sup> and Mourelatos S.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>A<sup>1</sup> Department of Microbiology, Medical School, Aristotle University of Thessaloniki, Thessaloniki, Greece

<sup>2</sup>Eco-Development, S.A., Thessaloniki, Greece

A large encephalitis outbreak due to West Nile virus (WNV) (genus *Flavivirus*, family *Flaviviridae*) occurred in Northern Greece in the summer of 2010. WNV is transmitted by the bite of infected mosquitoes, while main hosts are the birds which participate in the geographical spread of the virus. The focus of the outbreak was the wide district of Axios River Delta, a rest point for migratory birds, but also a suitable habitat for mosquitoes. The aim of this study was to collect mosquitoes from the sites where the encephalitis cases were observed and to examine them for the presence of WNV.

During the outbreak 3524 mosquitoes were collected by CO<sub>2</sub> traps. According to morphological classification, 91.7% of mosquitoes belonged to the genus *Culex*, 6.4% to the genus *Aedes* and 1.9% to the genus *Anopheles*. The mosquitoes were grouped into 136 pools according to the collection site, date and genus. Two different PCRs were performed using two sets of primers: one set theoretically able to detect all flaviviruses, and a second set specific for WNV.

Two pools of *Culex pipiens* mosquitoes were found positive. The first pool was collected in Nea Santa, a village in Kilkis prefecture, and the second pool from Gypsochori, a village in Pella prefecture. Sequencing of the PCR products and phylogenetic analysis showed that the two strains were identical and they belonged to WNV lineage 2, they were also similar with strains detected in Hungary and South Africa. It is speculated that migratory birds played a major role on the virus introduction in Greece, while increased rainfall and high temperatures during the summer contributed to the excessive proliferation of infected mosquitoes.

Results of the present study show that highly pathogenic WNV lineage 2 strains have been introduced and established in Europe and cause epidemics, thus active surveillance and mosquito control programs are needed.

## Εφαρμογές της κυτταρομετρίας ροής στη Μικροβιολογία

**Παπαγεωργίου Κ.<sup>1</sup>, Παραπούλη Μ.<sup>2</sup>, Βαρθολομάτος Γ.<sup>3</sup> και Περισυνάκης Α.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών & Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, 45110 Ιωάννινα,

<sup>2</sup>Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, 45110 Ιωάννινα,

<sup>3</sup>Μονάδα Μοριακής Βιολογίας, Αιματολογικό εργαστήριο, Π.Γ.Ν. Ιωαννίνων, Ιωάννινα

Η Κυτταρομετρία Ροής είναι μια γρήγορη και ευαίσθητη μέθοδος που χρησιμοποιείται για τη μέτρηση αριθμού κυττάρων. Βρίσκει πολλές εφαρμογές στην Ιατρική όπως η διάγνωση διαφόρων ασθενειών. Πρόσφατα, συζητήθηκε ο ρόλος της στη Μικροβιολογία, ως μια εύχρηστη μέθοδος καταμέτρησης του αριθμού των κυττάρων διαφόρων μικροοργανισμών. Οι μέχρι τώρα τεχνικές είναι χρονοβόρες και δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε μη καλλιεργήσιμα στελέχη.

Η χρήση της Κυτταρομετρίας Ροής στην εύρεση του αριθμού των κυττάρων καλλιέργειας ζύμης και σύγκριση των αποτελεσμάτων με κλασικές τεχνικές, όπως η επίστρωση τρυβλίων μετά από κατάλληλες αραιώσεις (Colony Forming Units).

Απώτερος στόχος ήταν η δημιουργία μιας καμπύλης που θα συσχετίζει τον αριθμό των κυττάρων του μικροοργανισμού με την απορρόφηση τους (σε μονάδες Abs), η αύξηση της οποίας οφείλεται στην αύξηση της συγκέντρωσης του αριθμού των κυττάρων της καλλιέργειας.

Χρησιμοποιήθηκε καλλιέργεια του στελέχους *Saccharomyces cerevisiae* 188 από την οποία συλλέχθηκαν έξι διαφορετικά δείγματα σε συγκεκριμένα στάδια κατά την εκθετική φάση ανάπτυξης και μετρήθηκαν οι απορροφήσεις τους. Ακολούθησε μέτρηση του αριθμού των κυττάρων του εκάστοτε δείγματος με δυο μεθόδους: Κυτταρομετρία Ροής χρησιμοποιώντας συγκεκριμένο όγκο δείγματος, αλλά και επίστρωση τρυβλίων ύστερα από κατάλληλες αραιώσεις.

Κατασκευάστηκαν δυο καμπύλες ανάπτυξης οι οποίες συσχετίζουν την απορρόφηση κάθε δείγματος με τον αριθμό των κυττάρων τους όπως αυτός προέκυψε από τις δυο διαφορετικές μεθόδους μέτρησης.

Βάσει της σύγκρισης των δυο καμπυλών ανάπτυξης παρατηρούμε ότι τα αποτελέσματα της μιας είναι σχεδόν ίδια με αυτά της άλλης. Το γεγονός αυτό αποδεικνύει ότι η Κυτταρομετρία Ροής θα μπορούσε να αντικαταστήσει τη χρονοβόρα διαδικασία των δεκαδικών αραιώσεων και της επίστρωσης τρυβλίων (plating), όταν μοναδικός σκοπός είναι η εύρεση του αριθμού των κυττάρων. Είναι μια γρήγορη, εύχρηστη, αξιόπιστη και ακριβής μέθοδος, καθώς επίσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί και σε μη καλλιεργήσιμα στελέχη.



## Applications of Flow Cytometry in Microbiology

**Papageorgiou K.<sup>1</sup>, Parapouli M.<sup>2</sup>, Vartholomatos G.<sup>3</sup> and Perisynakis A.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Department of Biological Applications and Technologies, University of Ioannina, 45110 Ioannina,

<sup>2</sup>Department of Chemistry, University of Ioannina, 45110, Ioannina,

<sup>3</sup>Department of Haematology Laboratory, Unit of Molecular Biology, University Hospital, Ioannina

Flow Cytometry is a fast and sensitive method which is used to count number of cells. It is commonly applied in Medicine for the diagnosis of numerous diseases. In addition, it has been recently used in Microbiology in order to count the number of cells of various microorganisms because the techniques that are used until now are time-consuming and they cannot be applied to non culturable strains.

Within these frames, Flow Cytometry as well as Colony Forming Unit (a conventional method) were employed in order to count the cell number of a *Saccharomyces cerevisiae* culture and compare the results of these two different approaches.

For this purpose, six different samples were collected at specific times of the exponential phase and their optical densities (OD) were measured. The count of the number of cells of each sample was estimated through two methods: Flow Cytometry and plating on solid media plates. In follow, two different growth curves (one for each method) were made to compare the optical density of each sample with the number of cells. Results obtained by the flow cytometry method were consistent with those of the colony forming unit counts.

In conclusion it appears that Flow Cytometry could replace the time-consuming method of Colony Forming Unit when the purpose is only to find the number of cells. Furthermore, it is a quick, accurate and reliable method especially because it can also be used for non culturable strains.

## Κλωνική συσχέτιση και μελέτη αντιμικροβιακής αντοχής στελεχών *Salmonella enterica* ορότυπος Enteritidis που απομονώθηκαν από βοοειδή, κοτόπουλα και κρέας πουλερικών στην Ελλάδα

**Παπαδόπουλος Θ.<sup>1</sup>, Πετρίδου Ε.<sup>2</sup>, Αικατερινιάδου Α.<sup>1</sup>, Βαφέας Γ.<sup>1</sup>, Γιαντζή Β.<sup>1</sup>, και Ζδράγκας Α.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Ινστιτούτο Κτηνιατρικών Ερευνών Θεσσαλονίκης, Εθνικό Ίδρυμα Αγροτικής Έρευνας,

<sup>2</sup>Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Κτηνιατρική Σχολή

Η σαλμονέλλωση είναι ένα σοβαρό τροφιμογενές νόσημα που μεταδίδεται στον άνθρωπο μέσω της τροφικής αλυσίδας και κυρίως μέσω των προϊόντων πτηνοτροφίας. Ο ορότυπος enteritidis (SE) είναι ο πιο κοινός αιτιολογικός παράγοντας της σαλμονέλλωσης στον άνθρωπο. Η μοριακή επιδημιολογία και η αντοχή στα αντιβιοτικά στελεχών SE που προήλθαν από κοτόπουλα, βοοειδή και κρέας πουλερικών μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία. Συνολικά 44 στελέχη της SE (12 από βοοειδή, 15 από νεοσσούς μιας ημέρας, 8 από κοτόπουλα κρεοπαραγωγής αμέσως μετά τη σφαγή και 9 από το νωπά κοτόπουλα όπως πωλούνται στα κρεοπωλεία) συλλέχθηκαν μεταξύ των ετών 1992-2008 και εξετάστηκαν ως προς την αντοχή τους σε μια σειρά αντιβιοτικά καθώς και για την κλωνικότητά τους με τη μέθοδο ηλεκτροφόρησης σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο (PFGE). Τα περισσότερα στελέχη ήταν ευαίσθητα σε λιγότερο από 2 αντιβιοτικά, μόνο 4 στελέχη παρουσίασαν ανθεκτικότητα σε 6-8 αντιβιοτικά. Υψηλό επίπεδο αντοχής παρατηρήθηκε στην αμοξικιλίνη (46%) και στη στρεπτομυκίνη (23%) ενώ δεν παρατηρήθηκε σημαντική ανθεκτικότητα στα υπόλοιπα 8 αντιβιοτικά (3 - 13%). Η ανάλυση θραυσμάτων, που έγινε κατόπιν πέψης του DNA με το ένζυμο περιορισμού XbaI, διαχώρισε τα στελέχη σε 9 υπότυπους (1-9), με τον υπότυπο 6 να περιλαμβάνει 31 από 44 στελέχη. Παρατηρήθηκε πολύ υψηλό ποσοστό γενετικής ομοιότητας (86%) μεταξύ αυτών των 31 στελεχών γεγονός που επιβεβαιώνει την κλωνικότητα του συγκεκριμένου ορότυπου. Οι ομοιότητες στο γενετικό αποτύπωμα μεταξύ των στελεχών που προέρχονται από βοοειδή, κοτόπουλα, νωπό κρέας πουλερικών και νεοσσούς μιας ημέρας εμμέσως συνηγορεί υπέρ της διαχρονικής παρουσίας του συγκεκριμένου κλώνου. Επιπρόσθετες μελέτες, έτσι ώστε να διευρυνθούν οι γνώσεις μας σχετικά με τις δεξαμενές του μικροβίου, τους τρόπους μετάδοσης και άλλους παράγοντες που επέτρεψαν αυτόν τον κλώνο της SE να πολλαπλασιάζεται και να κυκλοφορεί στην Ελλάδα, είναι απαραίτητες.





## Clonal relationship and Antimicrobial susceptibility of *Salmonella enterica* Serotype Enteritidis among isolates from Cattle, Chickens and Poultry Meat in Greece

**Papadopoulos T.<sup>1</sup>, Petridou E.<sup>2</sup>, Ekateriniadou L.<sup>1</sup>, Vafeas G.<sup>1</sup>, Giantzi V.<sup>1</sup> and Zdragas A.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Veterinary Research Institute of Thessaloniki, National Agriculture Foundation,

<sup>2</sup>Aristotele's University of Thessaloniki, School of Veterinary Science

Salmonellosis is a well-documented disease known to occur in a wide range of foods, especially poultry products. *Salmonella enterica* serotype Enteritidis (SE) is the most common etiological agent of human salmonellosis. The molecular epidemiology and antimicrobial susceptibility of cattle, chickens and poultry meat isolates of SE were examined. A total of 44 isolates of SE ( 12 from cattle, 15 from one day old chickens, 8 from broiler meat on slaughter house, 9 from raw poultry meat sold in retail markets) were collected during 1992-2008 and examined by antimicrobial susceptibility testing and pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). Most isolates were susceptible to less than 2 antibiotics tested, only 4 isolates showed resistance to 6-8 antibiotics. High level antibiotic resistance occurred to amoxicillin (46%) and to streptomycin (23%), no significant antibiotic resistance was noticed in all other 8 antibiotics (3-13%). Profile of PFGE analysis, using XbaI digestion, separated isolates to 9 subtypes (1-9), subtype 6 was predominant and included 31 from 44 isolates. The overall similarity observed between these 31 isolates was very high (86%) which confirmed the clonal nature of this *Salmonella* serovar. Similar PFGE profiles among isolates from cattle, broilers, raw poultry meat and one day old chickens provided indirect evidence of SE transmission during 1992-2008. Continued studies to expand our knowledge about animal reservoirs of SE, the contaminated vehicles and other contributing factors that have allowed this clone of SE to proliferate and circulate in Greece are necessary.

## Καταβολισμός αμπικιλίνης από *Pseudomonas synxantha* και *Pseudomonas sp.* σε αστικά απόβλητα

**Παπαδοπούλου Γ., Κωνσταντίνου Μ., Τουράκη Μ. και Σιβροπούλου Α.**

Τομέας Γενετικής, Ανάπτυξης και Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας,  
Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Τα ανθιστάμενα στα αντιβιοτικά βακτήρια αποτελούν σημαντικό κίνδυνο για την δημόσια υγεία, ο οποίος μπορεί να αναχθεί σε σοβαρό πρόβλημα εάν τα ανθεκτικά στελέχη διαδοθούν στο περιβάλλον. Δεδομένου ότι τα αστικά απόβλητα ελευθερώνονται στο περιβάλλον μετά την κατεργασία τους, μελετήθηκε εάν υπάρχουν σ' αυτά ανθιστάμενα στα αντιβιοτικά εντεροβακτήρια. Δείγματα αστικών αποβλήτων συλλέχθηκαν από την περιοχή της Θεσσαλονίκης (Ελλάδα) και προσδιορίστηκε η ευαισθησία των βακτηρίων σε 9 αντιβιοτικά (αμπικιλίνη 50 μg/ml, κεφεπίμη, τετρακυκλίνη, καναμυκίνη 30 μg/ml, τριμεθοπρίμη/σουφαμεθοξαζόλη 1/5 μg/ml, ερυθρομυκίνη 15 μg/ml, ριφαμπικίνη, σιπροφλοξασίνη 5 μg/ml). Όλα τα εντεροβακτήρια ήταν ανθιστάμενα στην ερυθρομυκίνη, ευαίσθητα στην κεφεπίμη και έδειξαν διαφορετικό βαθμό ευαισθησίας στα υπόλοιπα αντιβιοτικά. Έντεκα ανθιστάμενα στα αντιβιοτικά βακτήρια απομονώθηκαν και διαπιστώθηκε ότι δύο, δέκα και έντεκα βακτήρια έδειξαν πολλαπλή-αντιβιοτική-αντοχή σε όλα τα αντιβιοτικά, σε τριμεθοπρίμη-σουφαμεθοξαζόλη και σε αμπικιλίνη-ερυθρομυκίνη-ριφαμπικίνη αντίστοιχα. Επιπλέον τα βακτήρια αυτά ελέγχθηκαν ως προς την ευαισθησία τους σε 1000 φορές υψηλότερες συγκεντρώσεις αντιβιοτικών και διαπιστώθηκε ότι δύο από αυτά ήταν ανθιστάμενα στα αντιβιοτικά αμπικιλίνη-ερυθρομυκίνη-τριμεθοπρίμη-σουφαμεθοξαζόλη. Επειδή τα δύο αυτά βακτήρια ήταν ανθιστάμενα σε εξαιρετικά υψηλές συγκεντρώσεις αντιβιοτικών, εξετάστηκε εάν χρησιμοποιούν τα αντιβιοτικά ως πηγή ενέργειας. Η σύγκριση της κινητικής ανάπτυξης των δύο βακτηρίων, σε θρεπτικό μέσο EMB-2 (EMB χωρίς λακτόζη) στην παρουσία ή την απουσία αμπικιλίνης έδειξε ότι η ανάπτυξη τους στην παρουσία αμπικιλίνης οδήγησε σε σημαντική αύξηση των βακτηριακών πληθυσμών συγκριτικά με τον μάρτυρα (EMB-2 χωρίς αμπικιλίνη). Προσδιορισμός της συγκέντρωσης αμπικιλίνης με HPLC στα δύο βακτήρια έδειξε 99% και 99.8% μείωση του αντιβιοτικού στο τέλος της επώασης, συγκριτικά με την αρχική συγκέντρωση της αμπικιλίνης, ενώ η μείωση του αντιβιοτικού στον μάρτυρα (EMB-2 χωρίς βακτήρια) ήταν αμελητέα. Φυλογενετική ανάλυση χρησιμοποιώντας τη σύγκριση της γονιδιακής ακολουθίας του 16s rRNA έδειξε ότι το ένα βακτήριο είναι *Pseudomonas synxantha* και το άλλο είναι ένα άγνωστο είδος *Pseudomonas*. Τα αποτελέσματα της παρούσης μελέτης έδειξαν ότι στα αστικά απόβλητα υπάρχουν βακτήρια που εμφανίζουν πολλαπλή-αντιβιοτική-αντοχή και καταβολίζουν την αμπικιλίνη.



## **Ampicillin catabolism from *Pseudomonas synxantha* and *Pseudomonas sp.* in urban sewage**

**Papadopoulou G., Konstantinou M., Touraki M. and Sivropoulou A.**

Section of Genetics, Development and Molecular Biology, School of Biology,  
Aristotle University of Thessaloniki

The antibiotic resistant strains represent a serious concern for the public health, which may become a severe problem if the resistant strains will be spread in the environment. Since the urban sewage is released in the environment after treatment, it was studied whether antibiotic resistant enterobacteria exist in them. Urban sewage samples were collected from the area of Thessaloniki (Greece) and the bacterial susceptibility against a panel of 9 antibiotics (ampicillin 50 µg/ml, cefepime, tetracycline, kanamycin 30 µg/ml, trimethoprim/sulfamethoxazole 1/5 µg/ml, erythromycin 15 µg/ml, rifampin and ciprofloxacin 5 µg/ml) was determined. All enterobacteria were resistant to erythromycin, sensitive to cefepime and exhibited variable degree of sensitivity against the rest of antibiotics. Eleven antibiotic resistant bacteria were isolated and it was determined that two, ten, and eleven bacteria exhibited multiple-antibiotic resistance in all antibiotics, in trimethoprim-sulfamethoxazole and in ampicillin-erythromycin-rifampin, respectively. These bacteria were further tested for their susceptibility to 1000 times higher concentrations of antibiotics and it was determined that two isolates were resistant to ampicillin-erythromycin-trimethoprim-sulfamethoxazole. Since these isolates, were resistant to extremely high concentration of antibiotics, it was examined whether they utilize the antibiotics as a carbon source. Comparison of the growth kinetics of both isolates in EMB-2 (EMB without lactose) in the presence or in the absence of ampicillin showed that their growth in the presence of ampicillin led to higher bacterial population comparatively with control (without ampicillin). Determination of ampicillin concentration by HPLC in both bacteria showed 99% and 99.8% reduction of ampicillin at the end of incubation period, comparatively with its initial concentration, while during the same incubation period, the reduction of ampicillin in the control (EMB-2 without bacteria) was negligible. Phylogenetic analysis by using 16s rRNA gene sequence comparison showed that one bacterium is *Pseudomonas synxantha* and the other is an unknown *Pseudomonas* species. The results of this study showed that in urban sewage, there are bacteria that display multiple-antibiotic-resistance and catabolize ampicillin.

## Οι λιποπολυσακχαρίτες της *Pseudomonas sp.* επάγουν οστεοκλαστογένεση

**Παπαδοπούλου Ε. και Σιβροπούλου Α.**

Εργαστήριο Γενικής Μικροβιολογίας, Τομέας Γενετικής, Ανάπτυξης και Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης.

Προηγούμενως δείξαμε ότι ένα βακτήριο που απομονώθηκε από ένα διάλυμα που προσομοιάζει τα υγρά του σώματος διαλυτοποιεί ανθρακικό ασβέστιο, προκαλεί δοσο-εξαρτώμενη αναστολή σχηματισμού υδροξυαπατίτη στην επιφάνεια δοκιμίων βιοϋάλου και προκαλεί 50% μείωση του βάρους των δοκιμών συγκριτικά με τον μάρτυρα. Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να διερευνηθεί η πιθανή εμπλοκή του βακτηρίου αυτού σε μολύνσεις σκληρών ιστών. Φυλογενετική ανάλυση χρησιμοποιώντας τη σύγκριση της ακολουθίας του 16s rRNA γονιδίου έδειξε ότι αυτό το βακτήριο είναι ένα άγνωστο είδος *Pseudomonas*. Η *Pseudomonas sp.* μπορεί να μολύνει πρόδρομους οστεοβλάστες. Στην συνέχεια ελέγχθηκε η πιθανή δράση των λιποπολυσακχαριτών (LPS), που απομονώθηκαν από την *Pseudomonas sp.* στην οστεοκλαστογένεση χρησιμοποιώντας κύτταρα μυελού των οστών ποντικών. Οι LPS δεν επηρέασαν τον πολλαπλασιασμό κυττάρων μυελού των οστών, κατά τη διάρκεια 7 ημερών έκθεσης, όπως διαπιστώθηκε με την μέθοδο MTS, χρησιμοποιώντας διαφορετικές συγκεντρώσεις (1 έως 50 µg/ml) LPS. Έκθεση των κυττάρων του μυελού των οστών σε LPS για 7 ημέρες, είχε ως αποτέλεσμα το σχηματισμό οστεοκλαστών με τρόπο εξαρτώμενο από τη συγκέντρωση. Η παρατηρούμενη διαφοροποίηση ήταν ειδική για την *Pseudomonas sp.*, αφού παρατηρήθηκε σημαντικά μικρότερο ποσοστό σχηματισμού οστεοκλαστών όταν χρησιμοποιήθηκαν LPS του βακτηρίου *E. coli*. Στη συνέχεια, προετοιμάστηκαν δείγματα βιοϋάλου, στα οποία ο σχηματισμός στρώματος υδροξυαπατίτη στην επιφάνειά τους εξακριβώθηκε με αναλύσεις XRD και FTIR. Ο σχηματισμός οστεοκλαστών διαμεσολαβούμενος από LPS της *Pseudomonas* επάνω στα δείγματα βιοϋάλου των οποίων η επιφάνεια έχει καλυφθεί με στρώμα υδροξυαπατίτη, έδειξε ότι οι οστεοκλάστες, σε αντίθεση με τον μάρτυρα, είχαν προσκολληθεί στον υδροξυαπατίτη και τον είχαν εγκολπώσει, όπως παρατηρήθηκε από φωτογραφίες SEM και ανάλυση EDS. Επιπλέον, ανιχνεύθηκε υψηλότερη συγκέντρωση φωσφόρου στο υπερκείμενο των δοκιμών βιοϋάλου συγκριτικά με το μάρτυρα, υποδεικνύοντας ότι οι οστεοκλάστες που σχηματίστηκαν είχαν την ικανότητα απορρόφησης υδροξυαπατίτη. Οι κυτοκίνες TNF-α, IL-6, IL-10 και IL-12 βρέθηκε ότι απελευθερώνονται από τα προγονικά κύτταρα των οστεοκλαστών κατά τη διαδικασία σχηματισμού οστεοκλαστών που μεσολαβείται από LPS της *Pseudomonas sp.*



## Lipopolysaccharides from *Pseudomonas sp.* induced osteoclastogenesis

**Papadopoulou E. and Sivropoulou A.**

Laboratory of General Microbiology, Section of Genetics, Development and Molecular Biology,  
School of Biology, Aristotle University of Thessaloniki.

Previously we reported the isolation of a bacterium from a solution simulating body fluid which was able to solubilize tricalcium phosphate, to cause dose-dependent inhibition of the formation of hydroxyapatite layer on the surface of bioglass specimens and to cause 50% reduction of specimen's weight comparatively to control. The purpose of the present study was to investigate the possible implication of this bacterium in hard tissue infections. Phylogenetic analysis by using 16s rRNA gene sequence comparison showed that this bacterium is a *Pseudomonas* unknown species. *Pseudomonas sp.* was able to infect osteoblast like cells. Next we examined the possible effect of isolated lipopolysaccharides (LPS) from *Pseudomonas sp.* on osteoclastogenesis using mouse bone marrow cells. LPS did not affect bone marrow cell proliferation during 7 days of exposure, as it was confirmed by MTS assay using different concentrations of LPS (1 to 50 µg/ml). Exposure of bone marrow cells to LPS for 7 days caused osteoclasts formation in concentration dependent manner. This effect was specific for *Pseudomonas sp.*, since considerable lower percentage of osteoclasts formation was observed when LPS from *E. coli* were used. Next, bioglass coated specimens were prepared in which the formation of hydroxyapatite layer on their surface was confirmed by XRD and FTIR analysis. *Pseudomonas* LPS-mediated osteoclast formation on hydroxyapatite-coated bioglass specimens showed that osteoclasts, in contrast to the control, were attached on hydroxyapatite and then they enclosed it, as it was observed by SEM photographs and determined by EDS analysis on the enclosed particles. Further, higher content of phosphorus was detected in the supernatant medium of bioglass specimens comparatively with control, indicating that osteoclasts were capable of hydroxyapatite resorption. The cytokines TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10 and IL-12 were found to be released by osteoclast precursors undergoing *Pseudomonas sp.* LPS-mediated osteoclast formation.

## Μελέτη παραμέτρων εκχύλισης που επηρεάζουν την ποσότητα και την σύσταση των λιπαρών οξέων των φωσφολιπιδίων μικροβιακής προέλευσης που εκχυλίζονται από το έδαφος

**Παπαδοπούλου Ε.Σ.<sup>1</sup>, Καρούζας Δ.Γ.<sup>2</sup> και Μενκίσογλου-Σπυρούδη Ο.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Σχολή Γεωπονίας,  
Εργαστήριο Γεωργικών Φαρμάκων, 54124 Θεσσαλονίκη,

<sup>2</sup>Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, 41221 Λάρισα

Η ανάλυση των λιπαρών οξέων των φωσφολιπιδίων (PLFAs) αποτελεί μια ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδο για τον προσδιορισμό του μεγέθους και της σύστασης της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους. Η εκχύλιση των PLFAs στηρίζεται στο τροποποιημένο πρωτόκολλο των Bligh και Dyer που περιλαμβάνει εκχύλιση με μίγμα οργανικού διαλύτη/μεθανόλης/ρυθμιστικού διαλύματος (1:2:0.8 ν:ν:ν). Η επιλογή οργανικού διαλύτη και η ρυθμιστικού διαλύματος διαφοροποιείται μεταξύ των διαφόρων μελετών στην βιβλιογραφία. Για τον λόγο μελετήθηκε η επίδραση α) του οργανικού διαλύτη (χλωροφόρμιο ή διχλωρομεθάνιο) β) του ρυθμιστικού διαλύματος (φωσφορικό pH 7.0 ή κιτρικό pH 4.0) και γ) της διάρκειας εκχύλισης (1 κύκλος εκχύλισης επί 2 ώρες ή 2 κύκλοι επί 2 ώρες) στην ποσότητα και την σύσταση των PLFAs μικροβιακής προέλευσης που εκχυλίζονται από το έδαφος. Η επίδραση των παραπάνω παραμέτρων μελετήθηκε σε ένα όξινο (pH 5.5) και σε ένα αλκαλικό έδαφος (pH 8.6). Οι μέγιστες συγκεντρώσεις PLFAs και στα δύο εδάφη μετρήθηκαν ύστερα από δύο κύκλους εκχύλισης με εκχυλιστικό μίγμα χλωροφορμίου/μεθανόλης/ρυθμιστικού διαλύματος κιτρικών. Ανάλυση των δεδομένων σχετικής αφθονίας των PLFAs με την μέθοδο των κυρίων συνιστωσών έδειξε ότι η επιλογή του μίγματος εκχύλισης επηρέασε σημαντικά μόνο την σύσταση των PLFAs που εκχυλίστηκαν κατά το δεύτερο κύκλο εκχύλισης. Τα PLFAs στην πλειοψηφία τους εκχυλίστηκαν σε μεγαλύτερο ποσοστό κατά τον πρώτο κύκλο εκχύλισης, εκτός από τα 18:2ω6,9 (δείκτης μυκήτων) και 22:0 (δείκτης ευκαρυωτικών μικροοργανισμών) που εκχυλίστηκαν σχεδόν εξίσου και στους δύο κύκλους εκχύλισης. Η επιλογή του οργανικού διαλύτη επηρέασε σημαντικά την σύσταση των PLFAs που εκχυλίστηκαν. Η εκχύλιση των περισσότερων PLFAs βελτιώθηκε σημαντικά με την χρήση χλωροφορμίου στο μίγμα εκχύλισης, ενώ μόνο τα λιπαρά οξέα 18:2ω6,9 και 22:0 ευνοήθηκαν από την παρουσία διχλωρομεθανίου. Η βελτιστοποιημένη μέθοδος εκχύλισης των PLFAs που παρουσιάζεται οδηγεί σε παραλαβή μέγιστων συγκεντρώσεων PLFAs και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον χαρακτηρισμό της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους ανεξαρτήτως pH.



## **Study of the extraction parameters that significantly influence the quantity and the composition of PLFAs extracted from soils**

**Papadopoulou E.S.<sup>1</sup>, Karpouzas D.G.<sup>2</sup> and Menkissoglu-Spiroudi U.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Aristotle University of Thessaloniki, School of Agriculture, Pesticide Science Laboratory, Thessaloniki 54124, Greece,

<sup>2</sup>University of Thessaly, Department of Biochemistry-Biotechnology, Ploutonos 26 & Aiolou Str., Larisa 41221, Greece

Phospholipid fatty acid (PLFA) analysis is a robust method which has been extensively used to obtain information for the size of the soil biomass but also for the structure of the soil microbial community. Extraction of PLFAs from soil samples is still based on the pioneering protocol of Bligh and Dyer and subsequent modifications resulted in the use of an extraction solvent including a mixture of solvent/methanol/buffer (1:2:0.8 v:v:v). The selection of solvent and buffer in this extraction mixture varies between studies. Therefore, we investigated the individual and combined effects of solvent (chloroform (CHL) vs. dichloromethane (DIC)), buffer (phosphate (Phos) pH 7.0 vs. citrate (Cit) pH 4.0), and extraction duration (2 h vs. 2 x 2h) on the quantity and composition of PLFAs extracted from an acidic (pH 5.5) and an alkaline (pH 8.6) soil. The combination of CHL: Cit and a 2 x 2-h extraction duration maximized PLFAs yields in both soils. Principal component analysis of the relative abundance data of the PLFAs showed that the choice of the extraction mixture did not significantly influence the profile of the PLFAs obtained by the first 2-h extraction, whereas it had a profound effect on the composition of PLFAs obtained by the second 2-h extraction. Most PLFAs were extracted during the first extraction step except for 18:2 $\omega$ 6,9 (fungal indicator) and 22:0 (eukaryotic microorganisms indicator) which were almost equally extracted by the two extractions cycles. The choice of organic solvent significantly influenced the composition of PLFAs extracted; the yield of most PLFAs increased with CHL except for 18:2 $\omega$ 6,9 and 22:0 which were favored by DIC. Overall, a 2 x 2h extraction with CHL:methanol: Cit as a single-phase extraction solvent is expected to provide maximized PLFAs yields representative of the soil microbial community.

## Ποσοτικός προσδιορισμός της μεταφοράς των παθογόνων μικροοργανισμών *Escherichia coli* O157H7 και *Listeria monocytogenes* scott A από μηχανή κιμά σε φιλέτα βοείου κρέατος

**Παπαδοπούλου Ο.<sup>1,2</sup>, Γκάνα Ε.<sup>1</sup>, Γρούντα Α.<sup>1</sup>, Χωριανόπουλος Ν.Γ.<sup>1</sup>,  
Κουτσουμανής Κ.Π.<sup>3</sup>, Πανάγου Ε.Ζ.<sup>1</sup> και Νυχάς Γ.-Ι.Ε.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιερά Οδός 75, Αθήνα 11855,

<sup>2</sup>Εθνικό Ίδρυμα Αγροτικής Έρευνας, Ινστιτούτο Τεχνολογίας Αγροτικών Προϊόντων, Σ. Βενιζέλου 1, 14123 Λυκόβρυση, Ελλάδα,

<sup>3</sup>Εργαστήριο Μικροβιολογίας Τροφίμων και Υγιεινής, Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Τεχνολογίας, Γεωπονική Σχολή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Θεσσαλονίκη 54124, Ελλάδα

Η διασταυρούμενη επιμόλυνση είναι ένας από τους κυριότερους παράγοντες που συντελεί στις τροφογενείς λοιμώξεις λόγω της μεταφοράς παθογόνων μικροοργανισμών στα τρόφιμα. Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν ο προσδιορισμός της μεταφοράς των παθογόνων βακτηρίων *Escherichia coli* O157H7 και *Listeria monocytogenes* scott A από τη μηχανή κιμά σε μη εμβολιασμένα φιλέτα βοείου κρέατος. Προηγούμενες μελέτες έδειξαν πως τα παθογόνα βακτήρια της μελέτης μπορούν να επιβιώσουν σε σπόγγους, μαγειρικά σκεύη, επιφάνειες κοπής και μηχανήματα επεξεργασίας τροφίμων για ώρες ή και μέρες. Στην παρούσα μελέτη, φιλέτα βοείου κρέατος εμβολιάστηκαν με τον κάθε παθογόνο μικροοργανισμό ξεχωριστά σε τρεις διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις ( $10^3$ ,  $10^5$ ,  $10^7$  CFU/g) και πέρασαν από τη μηχανή του κιμά. Στη συνέχεια, πέρασαν διαδοχικά από τη μηχανή του κιμά 6 μη εμβολιασμένα δείγματα φιλέτων και μελετήθηκε ο πληθυσμός του παθογόνου βακτηρίου που μεταφέρθηκε στα εν λόγω δείγματα κρέατος. Από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι όλα τα μη εμβολιασμένα φιλέτα επιμολύνθηκαν κατά την μετατροπή τους σε κιμά, για όλες τις συγκεντρώσεις του αρχικού εμβολίου. Τα πρώτα δείγματα κρέατος που πέρασαν από τη μηχανή του κιμά περιείχαν μεγαλύτερο αριθμό κυττάρων του παθογόνου μικροοργανισμού, ο οποίος σταδιακά μειωνόταν με το πέρασμα των διαδοχικών δειγμάτων. Η εκτεταμένη επιβίωση των βακτηρίων σε συνδυασμό με πιθανούς κακούς χειρισμούς κατά την παρασκευή και επεξεργασία των τροφίμων καθιστά απαραίτητη την περαιτέρω μελέτη και πρόβλεψη της μεταφοράς παθογόνων βακτηρίων.

Η εργασία χρηματοδοτήθηκε από το κοινοτικό έργο ProSafeBeef ([www.prosafebeef.eu](http://www.prosafebeef.eu))





## Transfer of *Escherichia coli* O157H7 and *Listeria monocytogenes* scott A to non-inoculated beef fillets through meat mincing machine

**Papadopoulou O.<sup>1,2</sup>, Gkana E.<sup>1</sup>, Grounta A.<sup>1</sup>, Chorianopoulos N.G.<sup>1</sup>,  
Koutsoumanis K.P.<sup>3</sup>, Panagou E.Z.<sup>1</sup> and Nychas G.-J.E.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Laboratory of Microbiology and Biotechnology of Foods, Department of Food Science, Technology and Human Nutrition, Agricultural University of Athens, Iera Odos 75, Athens 11855, Greece,

<sup>2</sup>National Agricultural Research Foundation, Institute of Technology of Agricultural Products, Sofokli Venizelou 1, Lycovrissi 14123, Greece,

<sup>3</sup>Laboratory of Food Microbiology and Hygiene, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Aristotle University of Thessaloniki, Thessaloniki 54124, Greece

Cross-contamination is one of the most important contributing factors in foodborne illnesses due to the transfer of pathogens to food products. The aim of the present study was to evaluate the transfer of *Escherichia coli* O157H7 and *Listeria monocytogenes* scott A through meat mincing machine. Several studies indicated that the pathogens may survive on sponges/clothes or/and utensils for hours or days after initial contact with the microorganisms. In the current study, beef fillets were inoculated with three different initial concentrations of the two pathogenic bacteria separately ( $10^3$ ,  $10^5$  and  $10^7$  CFU/g) and passed through meat mincing machine. Afterwards, 6 sequential non-inoculated beef fillets passed through meat mincing machine and the transfer of the pathogen population, was measured. Regarding the results, all of the non-inoculated beef fillets were contaminated with the pathogen. Moreover, the transfer of the pathogen population was highest at the first non-inoculated beef fillet, and was decreased progressively with the passage of sequential non-inoculated samples. The extensive survival of the bacteria in combination with bad handling practices makes necessary the study and prediction of the transfer of pathogenic bacteria.

**Acknowledgement:** This study was funded by ProSafeBeef integrated project ([www.prosafebeef.eu](http://www.prosafebeef.eu)) within the 6th Framework Programme of the EU.

## Ηλεκτρονική Μύτη: Μία ταχεία μέθοδος ελέγχου της αλλοίωσης φιλέτων βόειου κρέατος

**Παπαδοπούλου Ο.<sup>1,2</sup>, Τάσσου Χ.<sup>2</sup>, Schiavo L.<sup>3</sup>, Πανάγου Ε.Ζ.<sup>1</sup> και Νυχάς Γ.-Ι.Ε.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιερά Οδός 75, Αθήνα,

<sup>2</sup>Εθνικό Ίδρυμα Αγροτικής Έρευνας, Ινστιτούτο Τεχνολογίας Αγροτικών Προϊόντων, Σ. Βενιζέλου 1, 141-23 Λυκόβρυση,

<sup>3</sup>Biological Division, Technobiochip ScaRL, Via Prov.le per Pianura 5, 80078, Pozzuoli (Na), Italy

Η οσμή αποτελεί την σημαντικότερη ίσως παράμετρο για τον καθορισμό της οργανοληπτικής αξιολόγησης των τροφίμων και επομένως είναι εξαιρετικής σημασίας η μελέτη των πτητικών ουσιών ως δυνητικοί δείκτες αξιολόγησης της ποιότητας. Στην παρούσα μελέτη, φιλέτα βόειου κρέατος συντηρήθηκαν αερόβια σε θερμοκρασίες ψύξης (0, 4, και 8°C) για χρονικό διάστημα έως 434 ώρες μέχρι την αλλοίωση των δειγμάτων. Παράλληλα με τις μικροβιολογικές αναλύσεις (Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα), πραγματοποιήθηκε οργανοληπτικός έλεγχος για την κατηγοριοποίηση του κρέατος σε τρεις κλάσεις ποιότητας (φρέσκο, σχετικά φρέσκο και αλλοιωμένο), καθώς και προσδιορισμός του πτητικού προφίλ με χρήση ηλεκτρονικής μύτης. Η ηλεκτρονική μύτη που χρησιμοποιήθηκε ήταν τύπου Libra Nose (Technobiochip, Italy) εφοδιασμένη με 8 αισθητήρες (Ευρωπαϊκή Πατέντα [EP1505095]). Για τη μελέτη των πτητικών χαρακτηριστικών του δείγματος, 5 g φιλέτου τοποθετήθηκαν σε φιάλη χωρητικότητας 100 ml και παρέμειναν για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου (20°C) ώστε να υπάρξει κορεσμός του υπερκείμενου χώρου της φιάλης με τα πτητικά προϊόντα του δείγματος. Κατόπιν, τα πτητικά συστατικά αναλύθηκαν στην ηλεκτρονική μύτη και το σήμα απόκρισης των αισθητήρων καταγραφόταν συνεχώς σε υπολογιστή. Τα δεδομένα που συλλέχθηκαν από την ηλεκτρονική μύτη, υποβλήθηκαν σε Διαχωριστική Ανάλυση Παραγόντων (Factorial Discriminant Analysis, FDA) και σε ανάλυση με Κ-Κοντινότερους Γείτονες (K-Nearest Neighbours, KNN) ώστε να διερευνηθεί η δυνατότητα συσχέτισης της κατηγορίας ποιότητας του κρέατος με το πτητικό αποτύπωμα της ηλεκτρονικής μύτης. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η στατιστική ανάλυση με FDA παρουσίασε σωστή κατηγοριοποίηση σε ποσοστό 81% των δειγμάτων σε σχέση με τον οργανοληπτικό τους προφίλ. Αναλυτικότερα, το ποσοστό ορθής πρόβλεψης της κλάσης ποιότητας ήταν 72, 78, και 86% αντίστοιχα, για τα φρέσκα, σχετικά φρέσκα και αλλοιωμένα δείγματα. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την ανάλυση KNN έδωσαν παρόμοιες προβλέψεις. Από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι η ηλεκτρονική μύτη σε συνδυασμό με κατάλληλη χημειομετρική ανάλυση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την πρόβλεψη της ποιότητας του κρέατος. Κάθε πτητικό αποτύπωμα μπορεί να μετασχηματιστεί σε χρήσιμη πληροφορία σε σχέση με το βαθμό της αλλοίωσης, ώστε να είναι δυνατή η χρήση της ηλεκτρονικής μύτης από τη βιομηχανία τροφίμων ως εν δυνάμει ταχείας και εύχρηστης μεθόδου ποιότητας εκτίμησης της αλλοίωσης του κρέατος.

Η εργασία χρηματοδοτήθηκε από το κοινοτικό έργο SYMSIOSIS EU ([www.symbiosis-eu.net](http://www.symbiosis-eu.net))



## Electronic nose technique: A rapid method for monitoring beef fillets spoilage

**Papadopoulou O.S.<sup>1,2</sup>, Tassou C.C.<sup>2</sup>, Schiavo L.<sup>3</sup>, Panagou E.Z.<sup>1</sup> and Nychas G.-J.E.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Laboratory of Microbiology and Biotechnology of Foods, Department of Food Science and Technology, Agricultural University of Athens, Iera Odos 75, Athens, Greece, GR-11855,

<sup>2</sup>National Agricultural Research Foundation, Institute of Technology of Agricultural Products, Sofokli Venizelou 1, Lycovrissi, Greece, GR-14233,

<sup>3</sup>Biological Division, Technobiochip ScaRL, Via Prov.le per Pianura 5, 80078, Pozzuoli (Na), Italy

Odour is a major olfactory parameter determining the sensory quality of food commodities and it is therefore of interest to investigate whether volatile compounds could be considered as indicators of quality assessment.

In the present study, beef fillets were stored aerobically at three different temperatures (0, 4, and 8°C) and microbiological analysis in terms of total viable counts (TVC) was performed in parallel with e-nose measurements and sensory analysis for a total period of 434 hours until spoilage was evident in the samples.

An electronic gas sensor (e-nose) array system (Libra Nose, Technobiochip, Italy) implemented with an array of 8 non-selective sensors covered by a European patent [EP1505095] was used to generate a chemical fingerprint (pattern) of the volatile compounds of beef fillet samples during storage. Specifically, 5 g of beef were introduced inside a 100 ml volume glass jar and left at room temperature (20°C) for 60 min to enhance desorption of volatile and semi-volatile compounds from the meat into the gas phase. Subsequently, the headspace was pumped over the sensors of the electronic nose and the generated signal was continuously and in real time recorded.

The acquired volatile fingerprints of aroma profile were used in order to predict the sensory group of the meat sample during storage at chill temperatures. The volatile patterns collected from e-nose were subjected to Factorial Discriminant Analysis (FDA) and K-Nearest Neighbours (KNN) analysis in order to predict the quality of a sample that was pre-characterized as fresh (F), semi-fresh (SF) or spoiled (S) from a taste panel. Results showed that FDA and KNN analysis provided good discrimination of beef fillet samples regarding their spoilage status. Specifically, the overall correct classification for the three sensory classes for FDA was 81%, while classification for fresh, semi-fresh and spoiled samples was 72, 78, and 86%, respectively. Results of KNN analysis were quite similar. The use of e-nose technique in combination with chemometrics could be employed satisfactorily to acquire volatile fingerprints of aroma profile and predict the sensory group of the sample of beef fillet during storage at various temperatures. E-nose has a considerable potential for application in the food industry as a rapid and non-invasive method.

**Acknowledgement:** This study was funded by SYMBIOSIS - EU ([www.symbiosis-eu.net](http://www.symbiosis-eu.net)) project within the 7th Framework Programme of the EU.

## ***Verticillium*: ένας σεξουαλικά «προικισμένος» αφυλετικός μύκητας – γονιδιωματική, πληθυσμιακή και λειτουργική μελέτη**

**Παπαϊωάννου Ι.Α., Γεωργαλλή Μ. και Τύπας Μ.Α.**

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

Οι φυτοπαθογόνοι ασκομύκητες του γένους *Verticillium* θεωρούνται παραδοσιακά αφυλετικοί, καθώς ουδέποτε έχει παρατηρηθεί σε αυτούς φυλετική φάση αναπαραγωγής. Τα είδη του γένους *Verticillium* πολλαπλασιάζονται με μιτωτικές διεργασίες, μέσω βλασθητικής παραγωγής κονιδίων. Στην παρούσα εργασία αναφέρεται μία γονιδιωματική και πειραματική διερεύνηση της πιθανής ικανότητας του *Verticillium* να φέρει εις πέρας φυλετικές διεργασίες. Χρησιμοποιήθηκαν πολυάριθμοι ετερόλογοι εκκινητές για τη σάρωση μίας εκτεταμένης συλλογής στελεχών του *Verticillium* για ιδιόμορφα γονίδια που καθορίζουν το συζευκτικό τύπο (γονίδια συζευκτικού τύπου). Από κάθε στέλεχος ενισχύθηκε ένα προϊόν PCR, ενδεικτικό είτε για τον τύπο MAT1-2-1 (με μοτίβο HMG-box) είτε MAT1-1-1 (με μοτίβο alpha-box), γεγονός που υποδηλώνει πιθανή ετεροθαλική οργάνωση του μύκητα, με ισχυρή επικράτηση του τύπου MAT1-2 για το *V. dahliae*. Η ανάλυση RT-PCR έδειξε τη βλασθητική έκφραση αυτών των γονιδίων, ενώ η κλωνοποίηση και ο προσδιορισμός της αλληλουχίας αντιπροσωπευτικών προϊόντων ενίσχυσης αποκάλυψαν χαρακτηριστικούς σημειακούς πολυμορφισμούς εντός και μεταξύ των ομάδων VCGs (Vegetative Compatibility Groups) του είδους, πιθανά πληροφοριακούς σε μία προσπάθεια διαλεύκανσης της ενδο-ειδικής φυλογένεσης και πληθυσμιακής δομής. Η γονιδιωματική μελέτη αποκάλυψε την παρουσία στο γονιδίωμα του *Verticillium* όλων των υπόλοιπων γονιδίων που πιστεύεται ότι σχετίζονται με τη σύζευξη και τον φυλετικό κύκλο: πιθανούς προδρόμους και υποδοχείς φερομονών, σχετικούς μεταγραφικούς παράγοντες και συστατικά μονοπατιών μεταγωγής σήματος, όπως πρωτεΐνες G και MAP κινάσες. Εντοπίστηκε επίσης ομόλογο του γονιδίου *gid-1*, απαραίτητο για τον μηχανισμό RIP που εκδηλώνεται μόνον κατά τον φυλετικό κύκλο στη *Neurospora crassa*, και βρέθηκαν ενδείξεις για μεταλλαξογένεση τύπου RIP ενός ρετρομεταθετού στοιχείου τύπου LTR στο γονιδίωμα του *V. dahliae*. Όλα τα παραπάνω συνηγορούν στο συμπέρασμα πως το *Verticillium* είναι εξοπλισμένο με το πλήρες σεξουαλικό γονιδιακό δυναμικό. Επομένως, έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον η περαιτέρω διερεύνηση της πιθανότητας η φυλετικότητα να υφίσταται όντως στο *Verticillium* – άρα και η περιγραφή της, ή να μην είναι τίποτα παραπάνω από μία αρχαία, παροπλισμένη πλέον τακτική. Η κατασκευή και λειτουργική μελέτη ενός στελέχους αδρανοποίησης του MAT1-2-1 που βρίσκεται σε εξέλιξη αναμένεται να παράσχει σαφείς απαντήσεις προς αυτήν την κατεύθυνση.



## ***Verticillium*: a sexually gifted asexual fungus - genomic, population and functional inquiries**

***Papaioannou I.A., Georgalli M. and Typas M.A.***

Department of Genetics & Biotechnology, Faculty of Biology, University of Athens,  
Panepistimiopolis 15701, Athens

The plant pathogenic fungi of ascomycetous genus *Verticillium* have long been considered asexual, as their sexual form of reproduction has never been observed. *Verticillium* species are only known to reproduce via the vegetative production of mitotically derived conidia. We report here a genomic and experimental survey into the potential of *Verticillium* to accomplish sexual processes. Various heterologous primer pairs were used for the screening of a large collection of *Verticillium* strains for idiomorphic genes determining mating type (MATing Type genes). Every isolate produced a PCR amplicon indicative of either MAT1-2-1 (containing a HMG-box motif) or MAT1-1-1 (containing an alpha-box motif) locus, suggesting a potentially heterothallic organization of the fungus, with a strong bias toward MAT1-2 type for *V. dahliae*. RT-PCR analysis indicated the vegetative expression of mating type loci, while cloning and sequencing of representative amplicons confirmed our results and revealed characteristic inter- and intra-VCG (Vegetative Compatibility Group) single nucleotide polymorphisms, putatively informative in terms of clarification of intra-species phylogeny and population structure. Our genomic study revealed the presence of all the additional known mating and sexual development-associated gene machinery: putative pheromone precursors and receptors, related transcriptional regulators and signal transduction components such as G proteins and MAP kinases. We also identified a *rid-1* homolog, essential for the sexual phase-restrained RIP mechanism in *Neurospora crassa*, and found evidence for RIP-like mutation of an LTR-type retrotransposon element in *V. dahliae*. All these results suggest that *Verticillium* is equipped with full sexual gene potential. Therefore, it is important to further investigate whether sexuality exists in *Verticillium* somehow masked and thus not yet reported, or is just an evolutionary relic of an once functional but now disarmed/destroyed mechanism. The on-going construction and functional characterization of a MAT1-2-1 deletion mutant is expected to provide solid answers to this end.

## Διακυτταρική επικοινωνία βακτηρίων - φυτών και οι επιδράσεις της στον αριθμό αντιγράφων πλασμιδίων των *Rhizobiaceae*

Παπά Κ.Μ.

Τομέας Γενετικής και Βιοτεχνολογίας, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ,  
Πανεπιστημιούπολη, Ιλίσια, Αθήνα 15701

Τα περισσότερα μεγάλα μονοαντιγραφικά πλασμίδια και δευτερογενή χρωμοσώματα των *Rhizobiaceae* διαθέτουν αυτόνομα συστήματα αναδιπλασιασμού - καταμερισμού στα θυγατρικά κύτταρα, που ονομάζονται 'κασέτες' γονιδίων *repABC*. Στις κασέτες αυτές τα *repA* και *repB* είναι γονίδια καταμερισμού, το *repC* γονίδιο έναρξης της αντιγραφής, ενώ επίσης συμπεριλαμβάνονται *in cis* σημεία έναρξης της αντιγραφής, κεντρομερίδια και θέσεις μεταγραφικής ρύθμισης. Ευρήματα που βασίζονται κυρίως στα ογκογόνα πλασμίδια *Ti* του *Agrobacterium* θεμελιώνουν ένα μοντέλο αρνητικής ρύθμισης της έκφρασης του *repABC*, που ευθύνεται για το σταθερό, μοναδιαίο αριθμό αντιγράφων των μορίων όπου εδράζεται, αλλά καταδεικνύουν και φαινόμενα μεταγραφικής ενίσχυσης του *repABC*, κατόπιν απόκρισης σε διαβακτηριακά σήματα ή σήματα που ανταλλάσσονται ανάμεσα στα βακτήρια και το φυτό-ξενιστή. Αποτέλεσμα της μεταγραφικής ενίσχυσης του *repABC* είναι για το *Ti* πλασμίδιο τουλάχιστον, η αύξηση του αριθμού αντιγράφων του, η ενίσχυση όλου του μεταγραφώματός του, καθώς και η επακόλουθη αύξηση της ογκογένεσης που επιφέρει στο φυτό. Σε επίπεδο βακτηριακού πληθυσμού, σχετική με την ενίσχυση της γονιδιακής δεξαμενής του *Ti* είναι και η ενεργοποίηση της οριζόντιας μεταφοράς του σε γειτονικά βακτήρια, φαινόμενο που επίσης υπόκειται σε έλεγχο διακυτταρικών σημάτων και που χρόνια είναι γνωστό ότι χαρακτηρίζει πλασμίδια αγροβακτηρίων και ριζοβίων. Πρόσφατα ευρήματα καταδεικνύουν ότι από τη μεριά του φυτού εκλύονται ενώσεις που καταπολεμούν τα παραπάνω, παρεμποδίζοντας στην περίπτωση του αγροβακτηρίου τη διακυτταρική επικοινωνία, μειώνοντας τη μολυσματικότητα, αλλά και καταστέλλοντας την ίδια την υπερέκφραση του *Ti repABC*. Συνολικά τα άνω υποδεικνύουν ότι πλασμίδια των *Rhizobiaceae* εκτίθενται στις επιδράσεις διακυτταρικής επικοινωνίας ανάμεσα στα βακτήρια ή/και τους ξενιστές τους, φαινόμενο πρωτοφανές για μόρια που έως τώρα θεωρούνταν ότι διασφαλίζουν αστηρά τις λειτουργίες τους. Το γεγονός ότι η δόση και αναλογία ιδιαίτερων μερών των βακτηριακών γονιδιωμάτων μπορεί να διακυμαίνεται ως αποτέλεσμα ανταλλαγής σημάτων, θέτει ερωτηματικά ως προς την αξία της αποκλειστικής καταγραφής βακτηριακών πληθυσμών και εκτίμησης του ρόλου αυτών σε μικτές μικροβιακές κοινότητες ή συστήματα ξενιστών-παθογόνων. Αντιτάσσει ότι η δυναμική όχι μόνο των κυττάρων αλλά και των γονιδιωμάτων τους καθ' αυτών μπορεί να παίζει ρόλο στην εξέλιξη/πρόβλεψη βιολογικών φαινομένων.



## Interbacterial or transkingdom signalling and plasmid copy-number in the *Rhizobiaceae*

**Pappas K.M.**

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

Most large unit-copy plasmids and secondary chromosomes of the *Rhizobiaceae* replicate and segregate to daughter cells via functionally autonomous genetic regions called *repABC* cassettes. In *repABC* cassettes, *repA* and *repB* are plasmid partitioning genes and *repC* encodes the replication initiator protein; included in these loci are also replication origins, partitioning centromeres and regulatory elements. Findings based on the *Agrobacterium* oncogenic Ti plasmids have recently provided a model regarding the constitutive expression of *repABC*, which acts in replicon copy-number control; they also convey the notable up-regulation of the Ti *repABC*, which is brought about by inter-bacterial or host-bacterial signaling. Transcriptional up-regulation of the Ti *repABC* after signaling induction is not without consequence and results in considerable amplification of the Ti plasmid copy-number. It also elevates the entire Ti transcriptome and confers a marked increase in *Agrobacterium*-mediated oncogenesis. In the bacterial population as a whole, a factor also contributing to the Ti gene-pool amplification is its horizontal transfer, which is again dependent on interbacterial signals, and is a long-known property of several agrobacterial and rhizobial plasmids. According to recent findings, plant defense compounds seem to counteract the aforementioned phenomena, and do so in at least *Agrobacterium* that has been tested, by inhibiting *repABC* expression, by interfering with cell-density perception and by ultimately quenching virulence. Altogether, the above suggest that plasmid genomes of the *Rhizobiaceae* are subjected to the bacterium-eukaryote and/or the interbacterial communication networks - a phenomenon quite unprecedented for replicons thought of as stringently controlled. That any given genomic component may exhibit signaling-dependent fluctuations in its molecular dosage, challenges the ways bacterial populations and their community or host-borne impact are assessed. It suggests that the dynamics of not only organisms but of genomes per se should be taken into account when attempting to describe, or even predict, community behaviors.

## Φυλογενετική ανάλυση πλαγκτικών κυανοβακτηρίων από λίμνες της Ελλάδας

**Παπάς Ν. και Γκέλης Σ.**

Τομέας Βοτανικής, Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης,  
Τ.Θ. 109, 541 24, Θεσσαλονίκη.

Η ποικιλότητα των κυανοβακτηρίων που απαρτίζουν τις ανθίσεις του νερού έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς προηγούμενες έρευνες στις λίμνες της Ελλάδας έχουν δείξει ότι μπορεί να συμβαίνουν παρατεταμένες πληθυσμιακές εκρήξεις κυανοβακτηρίων ακόμη και καθόλη τη διάρκεια του έτους. Σε αυτή την εργασία διερευνήθηκε η ποικιλότητα των κυανοβακτηρίων μέσω της ανάλυσης των φυλογενετικών σχέσεων. Οι φυλογενετικές σχέσεις εξήχθηκαν από τις υπάρχουσες αλληλουχίες στη GenBank του 16S rRNA γονιδίου κυανοβακτηρίων από υδάτινα συστήματα της Ελλάδας. Η πλειοψηφία των φυλοτύπων που βρέθηκαν ανήκουν στους κλάδους των *Microcystis*, *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis-Raphidiopsis*, *Limnothrix* και *Planktothrix* περιλαμβάνοντας την περισσότερη από την γνωστή ποικιλότητα που αναγνωρίζεται στα μορφολογικά είδη των ελληνικών λιμνών. Ωστόσο, η ποικιλότητα των κυανοβακτηρίων που σχηματίζουν ή συμμετέχουν στις ανθίσεις είναι σε κάποιο βαθμό άγνωστη καθώς η φυλογενετική ανάλυση αναδεικνύει την παρουσία 1) λιγότερο γνωστών κυανοβακτηρίων, 2) taxa που καταγράφονται για πρώτη φορά στις λίμνες της Ελλάδας και 3) πιθανούς νέους φυλότυπους.



## Phylogenetic analysis of planktic cyanobacteria in Greek lakes

**Pappas N. and Gkelis S.**

Department of Botany, School of Biology, Aristotle University of Thessaloniki,  
P.O Box 109, GR-541 24, Thessaloniki, Greece

The diversity of cyanobacteria comprising water blooms is brought into attention as previous studies in Greek lakes have shown that prolonged cyanobacterial blooms continuous throughout the year can occur, which are dominated by known toxic species. In this paper we investigated the diversity of cyanobacteria through the study of phylogenetic relationships. Phylogenetic relationships were inferred on the basis of the existing 16S rRNA gene sequences originating from freshwaters of Greece available in GenBank. The majority of the phylotypes found belonged to *Microcystis*, *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis-Raphidiopsis*, *Limnothrix* and *Planktothrix* clades, comprising most of the diversity previously recognized in cyanobacteria morphospecies in Greek lakes. However, the diversity of the cyanobacteria forming and participating in blooms is to some extent unknown since phylogenetic analysis indicates the presence of 1) lesser known cyanobacteria, 2) taxa recorded for the first time in Greek lakes, 3) possible new phylotypes.

**Μελέτη της έκφρασης γονιδίων που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση εστέρων σε δύο διαφορετικά στελέχη του είδους *Saccharomyces cerevisiae* κατά τη διάρκεια αλκοολικής ζύμωσης γλεύκους Ντεμπίνα μέσω ποσοτικής PCR (Q-PCR)**

**Παραπούλη Μ., Σφακιανάκη Α., Περιουνάκης Α. και Δραΐνας Κ.**

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

Κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης οι ζύμες συνθέτουν ένα σημαντικό αριθμό αρωματικών ενώσεων. Συγκεκριμένα έχει αναφερθεί ότι παράγουν πάνω από 400 διαφορετικές αρωματικές ενώσεις που περιλαμβάνουν αλκοόλες, οξέα, εστέρες, καρβονυλικές, αζωτούχες και θειούχες ενώσεις, σάκχαρα, φαινόλες κ.ά. Από τις παραπάνω ενώσεις, η σημαντικότερη κατηγορία προϊόντων μεταβολισμού των ζυμομυκήτων κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης είναι οι πηπτικοί εστέρες οι οποίοι αν και συναντώνται μόνο σε ίχνη στους οίνους, είναι οι βασικά υπεύθυνοι για το επιθυμητό φρουτώδες άρωμα του οίνου. Με βάση τα ανωτέρω, το αντικείμενο της παρούσας εργασίας συνίσταται σε μια ολοκληρωμένη μελέτη της έκφρασης πέντε γονιδίων, που είναι γνωστό ότι εμπλέκονται στη βιοσύνθεση των οξικών εστέρων και των αιθυλεστέρων των λιπαρών οξέων μεσαίας αλυσίδας (*atf1*, *atf2*, *eeb1*, *ehf1* και *iat1*), σε δύο διαφορετικά στελέχη του είδους *S. cerevisiae* κατά τη διάρκεια αλκοολικής ζύμωσης γλεύκους Ντεμπίνα μέσω ποσοτικής PCR (Q-PCR). Τα χρησιμοποιούμενα στελέχη ήταν τα Z622 (γηγενές) και VL1 (εμπορικό) τα οποία παράγουν οίνους με παρόμοιες συνολικές συγκεντρώσεις εστέρων (Parapouli *et. al.*, 2010). Για την εκπόνηση των πειραμάτων της Q-PCR απομονώθηκε ολικό RNA από κύτταρα των δύο στελεχών που συλλέχθηκαν σε συγκεκριμένες χρονικές στιγμές κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης [Εμβολιασμός (Ημέρα 0), Ημέρα 1, 7 και 15]. Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με τη μέθοδο της πρότυπης καμπύλης, το χρησιμοποιούμενο γονίδιο αναφοράς ήταν η β-ακτίνη ενώ η κανονικοποίηση των επιπέδων έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων στις διάφορες χρονικές στιγμές έγινε συναρτήσει των επιπέδων έκφρασής τους τη στιγμή του εμβολιασμού. Τα πειραματικά αποτελέσματα αποκάλυψαν ότι τα δύο στελέχη του είδους παρουσιάζουν παρόμοια εικόνα γονιδιακής έκφρασης, υποστηρίζοντας ότι η έκφραση των υπό μελέτη γονιδίων κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης είναι σταθερή και χαρακτηριστική για τα στελέχη του είδους *S. cerevisiae*.

Parapouli *et. al.*, 2010. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 37:85–93.



**Ester biosynthesis gene expression profiling in two different strains of *Saccharomyces cerevisiae* during Debina must fermentations employing RT-PCR (Q-PCR)**

**Parapouli M., Sfakianaki A., Perisynakis A. and Drainas C.**

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

It is well reported that wine flavour is formed by a variety of compounds, including alcohols, esters, organic acids, aldehydes, ketones and terpenes, most of which are produced by yeasts during must fermentation. Amongst them, the most important groups is the group of volatile esters since they are primarily responsible for the pleasant fruity aromas in wine. Wine esters are usually detected into extremely low concentrations, very close to their perception threshold limits and therefore the slightest variance into their concentration can have a profound effect in wine quality. In this study, we describe the use of real-time-polymerase chain reaction (RT-PCR) to monitor the expression levels of five enzymes (Atp1, Atp2, Eebp1, Ehtp1 and Iatp1) involved into volatile acetate esters and ethyl-esters of medium chain fatty acids biosynthesis in two different strains of *Saccharomyces cerevisiae* during Debina must fermentations. The strains used are Z622 (indigenous) and VL1 (commercial) proven to produce comparable wines in respect to their total concentration of esters with pleasant aromas (Parapouli *et al.*, 2010). Total RNA was isolated from cells collected at four different time points (inoculation time 0, day1, day 8, day 15) while the expression values of the genes under study were normalized to  $\beta$ -actin employing the standard curve method for the statistical analysis. The results suggested that both strains exhibit the same expression profile for the target genes tested, indicating that their activity during fermentation is species rather than strain depended.

Parapouli *et al.*, 2010. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 37:85–93

## Απομόνωση βακτηριακών κοινοτήτων που αποδομούν το μυκητοκτόνο thiabendazole - προοπτική χρήσης τους για την αποτοξικοποίηση υγρών αποβλήτων από συσκευαστήρια φρούτων

**Perruchon C., Καράς Π. και Καρούζας Δ.Γ.**

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

Η μετασυλλεκτική μεταχείριση φρούτων περιλαμβάνει την εφαρμογή μυκητοκτόνων όπως thiabendazole (TBZ), imazalil (IMZ), 2-phenylphenol (OPP) και αντιοξειδωτικών όπως το diphenylamine (DPA). Τα υγρά απόβλητα που προκύπτουν περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις (600-1000 mg/l) γεωργικών φαρμάκων και η απευθείας απόρριψή τους σε φυσικά υδροφόρα συστήματα ή στους βιολογικούς καθαρισμούς αστικών λυμάτων θα δημιουργήσει σημαντικά περιβαλλοντικά προβλήματα. Τα παραπάνω γεωργικά φάρμακα έχουν πάρει έγκριση χρήσης σε επίπεδο ΕΕ υπό την προϋπόθεση ότι *θα υπάρχει σε τοπικό επίπεδο σύστημα επεξεργασίας των υγρών αποβλήτων που προκύπτουν από την εφαρμογή τους*. Παρόλα αυτά μέχρι σήμερα δεν έχουν αναπτυχθεί αποτελεσματικά και βιώσιμα συστήματα επεξεργασίας τους. Ο ευρύτερος στόχος της έρευνας μας είναι η απομόνωση μικροοργανισμών που θα χρησιμοποιηθούν ως εμβόλια σε βιολογικά συστήματα επεξεργασίας των υγρών αποβλήτων από τα συσκευαστήρια φρούτων. Προηγούμενες μελέτες στο εργαστήριο μας έδειξαν ότι οι μύκητες λευκής σήψης *Trametes versicolor* και *Pleurotus ostreatus* αποδομούσαν ταχύτατα τα φαινολικά OPP and DPA, ενώ απέτυχαν να διασπάσουν τα TBZ και IMZ (Karas *et al.*, 2010). Για τον λόγο αυτό στοχεύσαμε αρχικά στην απομόνωση TBZ-αποδομητικών βακτηριών. Έδαφος από αγρό που χρησιμοποιούνταν για την απόρριψη αποβλήτων από συσκευαστήριο εσπεριδοειδών στην Κύπρο χρησιμοποιήθηκε ως πηγή για την απομόνωση βακτηριών. Εμπλουτισμός σε εκλεκτικά θρεπτικά μέσα όπου το TBZ αποτελούσε την μοναδική πηγή C (MSMN) ή C και N (MSM) οδήγησε στην απομόνωση δύο βακτηριακών κοινοτήτων που διασπούσαν το TBZ (20 mg/L) σε 4 και 7 ημέρες αντίστοιχα. Μοριακή αποτύπωση DGGE της κοινότητας που απομονώθηκε σε MSMN και δημιουργία βιβλιοθήκης κλώνων έδειξε ότι η συγκεκριμένη κοινότητα αποτελούνταν από εννέα βακτήρια. Από αυτά τα έξι παρουσίασαν χαμηλή ομολογία (< 97%) στο 16S rRNA γονίδιο τους με γνωστά ως σήμερα είδη, ενώ τα υπόλοιπα τρία μέλη ταυτοποιήθηκαν ως *Pseudomonas* sp. Εκχύλιση DNA/RNA από την βακτηριακή κοινότητα στο σημείο μέγιστου ρυθμού διάσπαση του μυκητοκτόνου και μοριακή αποτύπωση DGGE θα οδηγήσει στον εντοπισμό των βακτηριών που αποτελούν αποδομητές του TBZ.

**Ευχαριστίες:** Η Chiara Perruchon είναι υπότροφος του Ιδρύματος Κρατικών Υποτροφιών.



## Isolation of bacterial consortia rapidly degrading the fungicide thiabendazole - potential utilization for the depuration of wastewaters from fruit packaging plants

**Perruchon C., Karas P. and Karpouzias D.G.**

University of Thessaly, Department of Biochemistry and Biotechnology,  
Ploutonos 26 and Aiolou, 41221 Larisa, GREECE.

Postharvest treatment of fruits involves drenching or spraying with fungicides like thiabendazole (TBZ), imazalil (IMZ), 2-phenylphenol (OPP) and preservatives like diphenylamine (DPA). The wastewaters produced contain high pesticide amounts (600-1000 mg/l) and their direct disposal into natural aquifers or in the sewage sludge systems would have deleterious environmental consequences. All these pesticides were given authorization for use at the EU level under the clause *that an efficient treatment of the produced wastewaters should be operative at a local scale*. However, so far there is no sustainable and efficient means of treating these wastewaters. Our wider aim is to isolate microorganisms which could be used in depuration systems for the treatment of the wastewaters from the fruit packaging industry. Previous studies in our laboratory showed that the white rot fungi *Trametes versicolor* and *Pleurotus ostreatus* rapidly degraded the phenolics OPP and DPA, whereas they failed to degrade TBZ and IMZ (Karas et al., 2010). Therefore we first aimed to isolate TBZ-degrading bacteria. A soil collected from a wastewater disposal site in Cyprus was used as a source of degrading bacteria. Enrichment culture in selective media where TBZ was the sole source of C (MSMN) or C and N (MSM) led to the isolation of two bacterial consortia which were able to degrade TBZ (20 mg/L) within 4 and 7 days respectively. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) analysis of the consortium isolated from MSMN and subsequent cloning showed that it consisted of nine bacteria; six showed limited sequence homology (< 97%) to known bacterial species and the remaining three were identified as *Pseudomonas* sp. On-going DGGE profiling of the DNA and cDNA extracted from the TBZ-degrading consortium at the time of the max degradation rate is expected to indicate the bacterial members which are active TBZ degraders.

**Acknowledgements:** Chiara Perruchon is financially supported by the State Scholarship Foundation of Greece.

## Μεταγονιδιωματική εξερεύνηση των μικροβιακών κοινωνιών δύο υδροθερμικών πηγών του υποθαλασσίου ηφαιστείου Κολούμπο (Σαντορίνη, Ελλάδα):

### Πρώτα αποτελέσματα

**Πολυμενάκου Π.<sup>1</sup>, Κυρπίδης Ν.<sup>2</sup>, Μαυρομμάτης Κ.<sup>2</sup>, Ιβανονα Ν.<sup>2</sup>, Μανδαλάκης Μ.<sup>3</sup>  
και Αλεξανδρή Σ.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Ελληνικό Κέντρο Θαλασσίων Ερευνών, Ηράκλειο Κρήτης & Ανάβυσσος Αττικής, Ελλάδα,

<sup>2</sup>Joint Genome Institute, Department of Energy, California, USA,

<sup>3</sup>Northeastern University, The Barnett Institute, Boston, MA, USA

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



**Metagenomic exploration of the newly discovered hydrothermal vent sites in the submarine Kolumbo volcano (Santorini, Greece): Preliminary results**

**Polymenakou P.<sup>1</sup>, Kyrpides N.<sup>2</sup>, Mavrommatis K.<sup>2</sup>, Ivanova N.<sup>2</sup>, Mandalakis M.<sup>3</sup> and Alexandri S.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Hellenic Centre for Marine Research, Heraklion Crete & Anavyssos Attika, Greece,

<sup>2</sup>Joint Genome Institute, Department of Energy, California, USA,

<sup>3</sup>Northeastern University, The Barnett Institute, Boston, MA, USA

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

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

## Μικροβιακή αποδόμηση δινιτροτολουολίων (2,4- and 2,6-DNTs) σε μικτή καλλιέργεια εδάφους για τον προσδιορισμό της ισοτοπικής σύστασης

**Πολυμενάκου Π.Ν.<sup>1</sup>, Μανδαλάκης Μ.<sup>2</sup>, Wijker R.<sup>3</sup> και Hofstetter T.<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Ελληνικό Κέντρο Θαλασσίων Ερευνών, Ινστιτούτο Θαλάσσιας Βιολογίας και Γενετικής, Γούρνες Πεδιάδος, Ηράκλειο Κρήτης, Ελλάδα,

<sup>2</sup>Northeastern University, The Barnett Institute, Boston, MA, USA,

<sup>3</sup>EAWAG Aquatic Research, Dübendorf, Switzerland

Τέσσερα διαφορετικά δείγματα εδάφους συλλέχθηκαν από μια ιδιαίτερα ρυπασμένη περιοχή της Ελβετίας. Η επιλογή των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε ώστε να καλύπτει διαφορετικά επίπεδα ρύπανσης σε δινιτροτολουόλια (2,4- και 2,6-DNT) ενώ ένα δείγμα συλλέχθηκε από περιοχή με χαμηλή ρύπανση. Σε ένα πρώτο στάδιο, πραγματοποιήθηκαν εμπλουτισμένες καλλιέργειες με χρήση θρεπτικού υλικού Basal Salt Medium στο οποίο δεν είχαν προστεθεί νιτρικά άλατα. Στις καλλιέργειες από τα δείγματα εδάφους της περιοχής 3 (surface and bottom soil layers), η μικροβιακή αποδόμηση των ρύπων 2,4-DNT and 2,6-DNT ξεκίνησε σχεδόν αμέσως μετά την προσθήκη τους και ακολούθησε ταχύτατη μείωση τους κατά τη διάρκεια της επώασης. Το επιφανειακό στρώμα εδάφους στο οποίο παρατηρήθηκε ο υψηλότερος ρυθμός βιοαποδόμησης των δινιτροτολουολίων επιλέχθηκε για την πραγματοποίηση των πειραμάτων τα οποία αποσκοπούσαν στον προσδιορισμό των παραμέτρων ισοτοπικής σύστασης. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν δύο σειρές καλλιεργιών, στις οποίες προστέθηκαν οι ουσίες 2,4-DNT και 2,6-DNT αντίστοιχα, και τα δείγματα που προορίζονταν για τον προσδιορισμό της ισοτοπικής σύστασης συλλέχθηκαν σε διαφορετικά στάδια βιοαποδόμησης ώστε να καλύπτουν το φάσμα από 0 έως 100% βιοαποδόμησης. Όλες οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν υπό αερόβιες συνθήκες σε θερμοκρασία δωματίου. Οι συγκεντρώσεις των ρύπων καταγράφονταν με τη χρήση αερίου χρωματογράφου συνδεδεμένου με φασματόμετρο μαζών (GC-MS) και τα δείγματα συλλέγονταν στα διαφορετικά στάδια βιοαποδόμησης εφόσον «θυσιάζονταν» με τη προσθήκη συγκεντρωμένου διαλύματος HCl. Τα χρωματογραφήματα GC-MS που συλλέγονταν κατά τη διάρκεια της βιοαποδόμησης στις διαφορετικές καλλιέργειες έδειξαν την εμφάνιση δύο κορυφών που προσδιορίστηκαν ως πιθανοί μεταβολίτες για την περίπτωση της βιοαποδόμησης του ρύπου 2,4-DNT. Οι μεταβολίτες αυτοί φαίνεται να αντιστοιχούν στις ουσίες 4-άμινο-2-νιτροτολουόλιο και 2-άμινο-4-νιτροτολουόλιο. Αντίθετα με τα πειράματα 2,4-DNT, η ανάλυση των χρωματογραφημάτων GC-MS για τα πειράματα του ρύπου 2,6-DNT δεν κατέδειξε κανέναν πιθανό μεταβολίτη. Πιθανές αλλαγές στη μικροβιακή σύσταση των καλλιεργιών κατά τη διάρκεια της βιοαποδόμησης μελετήθηκαν με τη χρήση της τεχνικής terminal restriction fragment length polymorphism των 16S rRNA γονιδίων.





## Microbial degradation of dinitrotoluenes (2,4- and 2,6-DNTs) by mixed soil cultures for the determination of isotope fractionation

**Polymenakou P.N.<sup>1</sup>, Mandalakis M.<sup>2</sup>, Wijker R.<sup>3</sup> and Hofstetter T.<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Hellenic Centre for Marine Research, Institute of Marine Biology and Genetics, Gournes Pediados, Heraklion Crete, Greece,

<sup>2</sup>Northeastern University, The Barnett Institute, Boston, MA, USA,

<sup>3</sup>EAWAG Aquatic Research, Dübendorf, Switzerland

Four soil samples were collected from a highly contaminated area in Switzerland. The four spots were carefully selected to cover different levels of contamination by DNTs, while one of them was situated outside the presumed central area of contamination. In a first stage, an enrichment culture was developed for each soil sample using a Basal Salt Medium that did not contain nitrates. In cultures prepared with soil samples from both surface and bottom soil layers, the microbial degradation of 2,4-DNT and 2,6-DNT started shortly after onset of inoculation and thereafter the concentration of the compound dropped considerably with incubation time. Finally, the surface soil sample was selected in order to perform the aerobic biodegradation experiments of both 2,6-DNT and 2,4-DNT. In order to determine the isotope fractionation factor associated with the microbial degradation of DNTs, a series of reference biodegradation experiments were performed and samples corresponding to different extents of degradation were collected. For the implementation of these experiments a fresh culture of mixed DNT-degrading bacteria was prepared using the surface soil. All cultures were incubated at room temperature under aerobic conditions. The concentration of 2,4-DNT and 2,6-DNT was regularly monitored and the cultures were sacrificed at specific extents of degradation by the addition of concentrated HCl. The GC-MS chromatograms collected from the different cultures revealed the gradual appearance of two distinct peaks over the course of 2,4-DNT biodegradation. The first peak provided a 94.3% match with 4-amino-2-nitrotoluene, while the second peak was matched with 2-amino-4-nitrotoluene by 94.1%. In contrast to 2,4-DNT, the analysis of GC-MS chromatograms did not reveal the formation of any metabolites over the course of 2,6-DNT biodegradation. Microbial community shifts during DNTs biodegradation were studied by terminal restriction fragment length polymorphism of the 16S rRNA genes.

## Συχνότητα και κατανομή οροτύπων και του κλώνου JP2 του βακτηρίου *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* στον ελληνικό πληθυσμό

Σακελλάρη Δ.<sup>1</sup>, Κατσικάρη Α.<sup>2</sup>, Σλίνη Θ.<sup>3</sup>, Ιωαννίδης Ι.<sup>1</sup>, Κωνσταντινίδης Α.<sup>1</sup>, και Αρσενάκης Μ.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Εργαστήριο Προληπτικής Οδοντιατρικής, Περιοδοντολογίας και Εμφυτευμάτων, Οδοντιατρική Σχολή.

<sup>2</sup>Τομέας Γενετικής, Ανάπτυξης και Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Σ.Θ.Ε.

<sup>3</sup>Τμήμα Μηχανολόγων Μηχανικών, Πολυτεχνική Σχολή.  
Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Θεσσαλονίκη, 54124.

Η αιτιολογική σχέση μεταξύ του βακτηρίου *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, της επιθετικής περιοδοντίδας αλλά και πιθανώς άλλων μορφών περιοδοντικής νόσου, είναι γνωστή από την βιβλιογραφία. Αν και το γονιδίωμα όλων των γνωστών στελεχών περιέχει ολόκληρο το οπερόνιο της λευκοτοξίνης που περιλαμβάνει τα γονίδια ItxA, ItxB, ItxC και ItxD, έχουν αναφερθεί σημαντικές διαφορές στο επίπεδο της έκφρασης της λευκοτοξίνης ανάμεσα στα διαφορετικά στελέχη. Ο κλώνος JP2 που παρουσιάζει υψηλή τοξικότητα περιέχει ένα έλλειμμα 530 bp στην περιοχή του οπερονίου που οδηγεί σε αύξηση κατά 10-20 φορές της δράσης της λευκοτοξίνης. Σκοπός της παρούσης μελέτης ήταν η διερεύνηση της κατανομής των οροτύπων του *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* σε δείγματα υποουλικού βιοφίλμ από άτομα Ελληνικής καταγωγής. Το πληθυσμιακό δείγμα περιελάμβανε 228 άτομα. Από κάθε συμμετέχοντα συλλέχθηκε ένα υποουλικό δείγμα από την εγγύς επιφάνεια των τεσσάρων γομφίων. Τα δείγματα αναλύθηκαν με τη μέθοδο της Αλυσιδωτής Αντίδρασης της Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction- PCR) για 5 ορότυπους του *A. actinomycetemcomitans* και τον κλώνο JP2. Οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν σύμφωνα με την περιοδοντική τους κατάσταση (περιοδοντικός χωρίς προηγούμενη θεραπεία, περιοδοντικά υγιείς και θεραπευμένοι ασθενείς στη φάση διατήρησης του αποτελέσματος). Η σύγκριση μεταξύ των τριών ομάδων και σε κάθε ομάδα πραγματοποιήθηκε με την εφαρμογή μη παραμετρικών δοκιμασιών (Kruskal-Wallis, Pearson chi-square, z-test με Bonferroni διορθώσεις και Kramer's V test) σε επίπεδο σημαντικότητας  $p=0.05$ . Η συχνότητα ανίχνευσης του *A. actinomycetemcomitans* βρέθηκε στατιστικά υψηλότερη στους περιοδοντικούς ασθενείς χωρίς προηγούμενη θεραπεία (27.5%) σε σχέση με τις άλλες δύο ομάδες (11.7% για τους περιοδοντικά υγιείς και 10% για τους θεραπευμένους περιοδοντικούς ασθενείς). Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικά διαφορές σχετικά με την κατανομή των διαφορετικών οροτύπων μεταξύ των ομάδων (z-test με διορθώσεις Bonferroni  $p>0.05$ ). Ο ορότυπος c παρουσίασε μεγαλύτερη συχνότητα στην ομάδα των περιοδοντικών ασθενών. Ο υψηλά λευκοτοξικός κλώνος JP2, δεν ανιχνεύθηκε σε κανένα από τους συμμετέχοντες στην παρούσα μελέτη.



## Prevalence and distribution of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* serotypes and the JP2 clone in a Greek population

Sakellari D.<sup>1</sup>, Katsikari A.<sup>2</sup>, Slini T.<sup>3</sup>, Ioannidis I.<sup>1</sup>, Konstantinidis A.<sup>1</sup>  
and Arsenakis M.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Preventive Dentistry, Periodontology and Implant Biology, Dental School,

<sup>2</sup>Department of Genetics, Development and Molecular Biology,  
School of Biology,

<sup>3</sup>Department of Mechanical Engineering  
Aristotle University, Thessaloniki, 54124 Greece

The etiological relationship between *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, aggressive periodontitis and possibly other forms of periodontal disease has long been established in the literature. Although all strains have been shown to carry the complete leukotoxin gene operon, which consists of the *ltxA*, *ltxB*, *ltxC* and *ltxD* genes, significant differences in the level of leukotoxin expression have been demonstrated among them. The highly toxic clone JP2 demonstrates a 530-base deletion in the promoter region, which results in increased (10 to 20 times) leukotoxic activity. Aim of the present study was to investigate the distribution of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* serotypes and the prevalence of the highly leukotoxic JP2 clone in subgingival biofilm samples of Greek subjects. 228 subjects participated in the present study. Participants each contributed with one pooled subgingival sample from the mesiobuccal surface of the four first molars. Samples were analyzed using Polymerase Chain Reaction (PCR) for five serotypes of *A. actinomycetemcomitans* and the JP2 clone, using primers and conditions previously described. Subjects were stratified according to periodontal status (untreated periodontitis, non-periodontitis and periodontitis patients at supportive treatment). Comparisons between and within groups were performed by applying non-parametric tests (Kruskall-Wallis, Pearson chi-square, z-test with Bonferroni corrections and Kramer's V test) at  $p=0.05$  level. *A. actinomycetemcomitans* was detected statistically more frequently in untreated periodontitis patients (27.5%) compared to the other two groups (11.7% for non-periodontitis and 10% for periodontitis patients at supportive treatment). No statistical differences were observed concerning the distribution of different serotypes between groups (z-test with Bonferroni corrections  $p>0.05$ ). Serotype c was more prevalent within periodontally diseased patients. The highly leukotoxic clone JP2, was not detected in any of the investigated subjects.

## Παραγωγή βιοκαυσίμων από λιγνοκυτταρινούχα απόβλητα μέσω ζυμωτικών διεργασιών: επίδραση θερμοχημικής προεπεξεργασίας στην ενζυμική υδρόλυση και τις τελικές αποδόσεις προϊόντων

S. Siankevich , Γ. Αντωνοπούλου, Ι. Ντάικου και Γ. Λυμπεράτος

Εργαστήριο Βιοχημικής Μηχανικής & Τεχνολογίας Περιβάλλοντος,  
Τμήμα Χημικών Μηχανικών, Πανεπιστήμιο Πατρών, Πάτρα 26500  
I.T.E./ E.IXH.MY.Θ., Πλατάκι Πατρών, 26504

Ο όρος λιγνοκυτταρινούχα βιομάζα αναφέρεται στα κατάλοιπα και παραπροϊόντα των αγροτικών, δασικών και αγροβιομηχανικών δραστηριοτήτων που δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν περαιτέρω και χαρακτηρίζονται ως απόβλητα. Τα τελευταία χρόνια στην προσπάθεια ανεύρεσης εναλλακτικών μορφών ενέργειας, διερευνάται η δυνατότητα αξιοποίησης των λιγνοκυτταρινούχων αποβλήτων για την παραγωγή βιοκαυσίμων, όπως η βιοαιθανόλη, το βιοϋδρογόνο και το μεθάνιο. Τα βιοκαύσιμα αυτά είναι στην ουσία προϊόντα που προκύπτουν κατά την μικροβιακή βιομετατροπή των υδανθράκων που περιέχονται στην λιγνοκυτταρινούχα βιομάζα με την μορφή των πολυμερών κυτταρίνη και ημικυτταρίνη. Ένα από τα σημεία κλειδιά για την οικονομική βιωσιμότητα της μικροβιακής παραγωγής βιοκαυσίμων από λιγνοκυτταρίνη, είναι η κλασματοποίηση της μέσω κατάλληλων μεθόδων προεπεξεργασίας και υδρόλυσης.

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας διερευνήθηκε η επίδραση της θερμοχημικής προεπεξεργασίας στην σακχαροποίηση και βιομετατροπή λιγνοκυτταρινούχων αποβλήτων προς παραγωγή βιοαιθανόλης και μεθανίου. Χρησιμοποιήθηκαν δυο τύποι αποβλήτων, διαφορετικών χαρακτηριστικών και προέλευσης, τα στερεά απόβλητα τριφασικού ελαιοτριβείου και το άχυρο από ηλιάνθο. Τα απόβλητα υπέστησαν ταυτόχρονη χημική και θερμική προεπεξεργασία, με την χρήση ασθενών υδατικών διαλυμάτων  $H_2SO_4$  ή  $NaOH$  (0.5%, 1%, 1.5%), σε θερμοκρασία 121°C για 60 λεπτά, με οργανική φόρτιση 5% w/v. Αμέσως μετά την προεπεξεργασία υπολογίστηκε η άμεση σακχαροποίηση στα υδρόλυματα, ενώ το στερεό κλάσμα υποβλήθηκε σε περαιτέρω ενζυμική υδρόλυση προκειμένου για την διερεύνηση της επίδρασης στην ενζυμική αποδοσιμότητα. Επακολούθως, το σύνολο της προεπεξεργασμένης βιομάζας χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα για την παραγωγή βιο-αιθανόλης και μεθανίου μέσω της ζύμης *Pachysolen tannophylus* και μικτών μεθανογόνων πληθυσμών, αντίστοιχα. Αποδείχθηκε ότι η προεπεξεργασία αυξάνει κατά πολύ την σακχαροποίηση και για τα δυο απόβλητα, οδηγώντας επίσης σε αυξημένες αποδόσεις αιθανόλης. Ωστόσο η παραγωγή μεθανίου δεν φάνηκε να επηρεάζεται θετικά, αποτέλεσμα που αποδόθηκε στην απελευθέρωση παρεμποδιστικών προς την μεθανογένεση ενώσεων κατά την προεπεξεργασία.



## **Biofuels production from lignocellulosic wastes via fermentative processes: effect of thermochemical pretreatment on the enzymatic hydrolysis and the yields of final products**

**S. Siankevich , G. Antonopoulou, I.Ntaikou and G. Lyberatos**

Laboratory of Biochemical Engineering and Environmental Technology,  
Department of Chemical Engineering, University of Patras, Patra 26500  
FORTH/ ICE-HT, Platani, Patra, 26504

Lignocellulosic biomass is the residual by-product from agricultural, forestry and agro-industrial activities that cannot be further used and is thus characterized as waste. Lately the potential exploitation of such wastes for biofuels i.e bio-ethanol, methane and biohydrogen, has been investigated with very promising results. Such products are generated via microbial conversion of the carbohydrates contained in lignocellulose in the form of biopolymers i.e. cellulose and hemi-cellulose. Although promising technologies have been developed for the exploitation of lignocellulosic wastes, the main challenge for their commercialization is the reduction of the operating costs of conversion processes, primarily pre-treatment and hydrolysis.

The aim of the present study was to investigate the impact of thermochemical pre-treatment on the saccharification effect and the further bioconversion of lignocellulosic wastes towards bio-ethanol and methane. Two types of wastes with different characteristics and origin were selected i.e. olive oil mill solid residues and sunflower straw. The wastes were subjected to simultaneous chemical and thermal pre-treatment using either dilute H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> or dilute NaOH aqueous solutions (0.5%, 1%, 1.5%), at 121°C for 60 min. The organic load was 5% w/v. The direct saccharification effect was estimated, whereas the remaining solids were further hydrolysed enzymatically so as to estimate the effect of pre-treatment on their enzymatic digestibility. Subsequently, the pre-treated wastes were used as substrate for the ethanol or methane production using the yeast *Pachysolen tannophylus* or mixed methanogenic consortia, respectively. It was shown that in all cases pre-treatment enhanced by far the saccharification of both wastes, resulting thus in higher bio-ethanol yields. Methanogenesis however seemed to be negatively affected by pre-treatment, a result that was attributed to the liberation of inhibitory compounds.

## Οροεπιπολασμός του αιμορραγικού πυρετού Κριμαίας-Κονγκό στην Ελλάδα

**Σιδηρά Π.<sup>1</sup>, Μαλιέζου Ε.<sup>2</sup> και Παπά Α.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Α' Μικροβιολογικό Εργαστήριο Ιατρικής Σχολής Α.Π.Θ.,  
<sup>2</sup>ΚΕ.Ε.Λ.Π.ΝΟ., Αθήνα

Ο ιός του αιμορραγικού πυρετού Κριμαίας - Κονγκό (Crimean -Congo Hemorrhagic Fever Virus – CCHFV, γένος *Nairovirus*, οικογένεια Bunyaviridae) είναι αίτιο σοβαρής, οξείας εμπύρετης νόσου που συνοδεύεται από αιμορραγικές εκδηλώσεις με θνητότητα από 5-30%. Προκαλεί σποραδικά κρούσματα ή επιδημίες. Η μετάδοση του ιού στον άνθρωπο γίνεται με νύγμα κροτώνων, κυρίως του γένους *Hyalomma* ή μετά από άμεση επαφή των βλεννογόνων ή του δέρματος με αίμα, εκκρίματα ή ιστούς μολυσμένων ζώων ή ανθρώπων. Η νόσος ενδημεί στα Βαλκάνια, ενώ στην Ελλάδα η πρώτη και μοναδική έως σήμερα περίπτωση CCHF διαγνώσθηκε στα τέλη Ιουνίου του 2008 στο νομό Ροδόπης και είχε θανατηφόρο έκβαση. Σκοπός της μελέτης ήταν η διερεύνηση και ο καθορισμός του οροεπιπολασμού της νόσου σε διάφορες περιοχές της Ελλάδας.

Συλλέχθηκαν συνολικά 2844 δείγματα ορού ατόμων διαφόρων ηλικιών από 33 νομούς της Ελλάδος. Όλα τα άτομα που έλαβαν μέρος στη μελέτη συμπλήρωσαν εκτενές ερωτηματολόγιο όσον αφορά τον τόπο κατοικίας, την ηλικία, το επάγγελμα και άλλες ασχολίες και ιστορικό νύγματος κρότωνα. Τα δείγματα εξετάσθηκαν με ανοσοενζυμική μέθοδο ELISA για την ανίχνευση και τον προσδιορισμό του τίτλου ειδικών IgG αντισωμάτων έναντι του CCHFV.

Σε 106/2844 (3,72%, 0-27,5%) δείγματα ανιχνεύθηκαν IgG αντισώματα έναντι του CCHFV. Υψηλότερος επιπολασμός παρατηρήθηκε στους νομούς Γρεβενών (15.3%), Θεσπρωτίας (27.5%) και Φθιώτιδας (11.11%).

Από τα αποτελέσματα φάνηκε ότι στην Ελλάδα υπάρχουν ενδημικές εστίες του ιού, ενώ υπάρχει συσχέτιση της οροθετικότητας με το επάγγελμα, το φύλο, την ηλικία και ιστορικό νύγματος κρότωνα. Θεωρείται απαραίτητη μία περαιτέρω μελέτη των ενδημικών περιοχών, ενώ η νόσος θα πρέπει να συμπεριλαμβάνεται στη διαφορική διάγνωση εμπύρετης νόσου, ιδιαίτερα όταν συνυπάρχουν αιμορραγικές εκδηλώσεις.



## Seroprevalence of Crimean Congo hemorrhagic fever in Greece

Sidira P.<sup>1</sup>, Maltezou H.<sup>2</sup> and Papa A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>First Laboratory of Microbiology, Medical School of Aristotle University of Thessaloniki,

<sup>2</sup>Hellenic Center for Diseases Control and Prevention, Athens, Greece

Crimean Congo Hemorrhagic Fever virus (CCHFV, *Nairovirus* of the family Bunyaviridae) is the causative agent of severe disease characterised by fever and hemorrhagic manifestations, with a fatality rate of 5%-30%. It causes sporadic cases or outbreaks. The virus is transmitted to humans by the bite of ticks (mostly of the *Hyalomma* genus) or by direct contact with blood or tissues of infected humans or livestock. The disease is endemic in the Balkans, while the first and only case in Greece was diagnosed in June 2008 in the prefecture of Rodopi and it had a fatal outcome. The aim of the study was the estimation of seroprevalence in Greece.

A number of 2844 serum samples were collected from people of different ages, from 33 prefectures of Greece. All the people that took part in the study filled out a questionnaire regarding the place of living, the age, the sex, the occupation and other activities and the history of former tick bite. The samples were examined for the detection of IgG antibodies against CCHFV with ELISA method.

Specific IgG antibodies against CCHFV were detected in 106/2844 (3,72%, 0-27,5%) of the samples. Higher seroprevalence was detected in the prefectures of Grevena 15.3%, Thessprotia 27.5% and Fthiotida 11.11%.

It was found that there are endemic areas of CCHFV, while seropositivity is associated with several parameters such as occupation, sex, age and history of tick bite. Further investigations in the endemic areas are needed, while CCHF should be included in the differential diagnosis of febrile disease, especially if hemorrhagic manifestations are present.

## Αριστοποίηση των συνθηκών παραγωγής ξυλανολυτικών και κυτταρινολυτικών ενζύμων από θερμοφιλά βακτήρια του ηφαιστειακού συμπλέγματος της Σαντορίνης

Σταθοπούλου Π.Ε., Τσερκέζη Ε., Γαλανοπούλου Α., Καραγκούνη Α.Δ.  
και Χατζηνικολάου Δ.Γ.

Ομάδα Μικροβιολογίας, Τομέας Βοτανικής, Τμήμα Βιολογίας Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθήνας, Πανεπιστημιούπολη, 157 84 Ζωγράφου, Αττική

Οι κυτταρινάσες και οι ξυλανάσες αποτελούν μία ευρεία κατηγορία ενζύμων με βασική καταλυτική δράση την υδρόλυση των β-1,4-γλυκοσιδικών δεσμών που βρίσκονται στους δομικούς φυτικούς πολυσακχαρίτες, κυτταρίνη και ξυλάνη, με πλήθος εφαρμογών σε πολλούς τομείς με οικονομικό ενδιαφέρον. Τα τελευταία χρόνια, οι θερμοφιλοί μικροοργανισμοί συγκεντρώνουν το ενδιαφέρον ως πηγές νέων θερμοσταθερών υδρολυτικών ενζύμων, αυξάνοντας έτσι το ήδη ευρύ πεδίο εφαρμογών των τελευταίων. Στην παρούσα ερευνητική προσπάθεια αξιολογήθηκε αρχικά η κυτταρινολυτική και ξυλανολυτική ικανότητα ενός συνόλου βακτηρίων που είχαν απομονωθεί από διαφορετικές οικοθέσεις του ηφαιστείου της Σαντορίνης (Αιγαίο Πέλαγος). Με κριτήριο τα υψηλότερα επίπεδα έκκρισης κυτταρινάσης, ξυλανάσης, β-ξυλοσιδάσης και β-γλυκοσιδάσης επιλέχθηκαν 15 στελέχη όπου στο σύνολο τους εμφάνισαν φυλογενετική ομοιότητα με το γένος *Geobacillus*. Τα επιλεγμένα στελέχη αναπύχθηκαν σε υγρές καλλιέργειες διαφορετικών σύνθετων πηγών άνθρακα (κελλοβιόζη, κυτταρίνη, ξυλόζη, ξυλάνη, πίτυρο και θρυμματισμένος σπάδικας καλαμποκιού) και επιλέχθηκε εκ νέου ένα στέλεχος ικανό για ταυτόχρονη έκκριση και των 4 υπό μελέτη ενζύμων. Ακολούθησε αριστοποίηση του μέσου ανάπτυξης, διατηρώντας το πίτυρο ως βασικό υπόστρωμα και προσθέτοντας διαφορετικές συμπληρωματικές πηγές άνθρακα και αζώτου (ξυλάνη, άμυλο, CMC, καζεΐνη, τρυπτόνη και φωσφορικό αμμώνιο). Η μελέτη ολοκληρώθηκε με την αξιολόγηση της επίδρασης του αερισμού σε κλειστές καλλιέργειες βιοαντιδραστήρα 2L, χρησιμοποιώντας το αριστοποιημένο μέσο καλλιέργειας. Τα αποτελέσματα κατέδειξαν πως η υψηλή ενζυμική παραγωγή σχετίζεται με την υψηλή παροχή αέρα στη καλλιέργεια. Οι σχετικά υψηλές ενεργότητες ενζύμων που επιτεύχθηκαν στις αριστοποιημένες συνθήκες καλλιέργειας επιτρέπουν την έναρξη διαδικασίας απομόνωσης των σχετικών ενζύμων για τη μελέτη των βιοχημικών και φυσικοχημικών τους χαρακτηριστικών.





## **Optimization of fermentation conditions for the production of xylanolytic and cellulolytic enzymes from thermophilic bacteria isolated from Santorini volcano**

**Stathopoulou P.E., Tserkezi E., Galanopoulou A., Karagouni A.D.  
and Hatzinikolaou D.G.**

Microbiology Group, Department of Botany, Faculty of Biology, University of Athens,  
Zografou Campus, 157 84 Attica, GREECE

Cellulases and xylanases comprise two groups of enzymes whose primary function is to hydrolyse the  $\beta$ -1,4-glycosidic linkages found in cellulose and xylan, the two major structural plant polysaccharides. Both enzyme groups have been used over the last decades in a number of important industrial applications. In the recent years, thermophilic microorganisms have gained the attention from a number of scientific groups as a source of novel thermostable hydrolytic enzymes, in an effort to expand their applications' range. Within the above framework, we initially screened a total of 104 bacterial isolates (from volcanic habitats in the island of Santorini - Aegean Sea) for their ability to produce cellulase, xylanase,  $\beta$ -xylosidase and  $\beta$ -glucosidase. This process resulted in the selection of 15 isolates capable of producing the enzymes of interest. Phylogenetic analysis of these strains using its 16s rDNA sequence data showed high homology with the genus *Geobacillus*. The selected isolates were subsequently grown in liquid media using different carbon sources (cellobiose, cellulose, xylose, xylan, wheat bran and corn cob). This second screening, resulted in the selection of one isolate able to produce simultaneously all four studied enzymes. In order to optimize the growth medium for large scale production of these hydrolytic enzymes, the effect of different carbon and nitrogen sources, such as xylan, starch, CMC, casein, tryptone and ammonium phosphate, was evaluated as supplement to wheat bran in the basic growth medium. Finally, the effect of various aeration conditions on growth and enzyme production was investigated in 2 L batch bioreactor cultures using the optimized medium. The results revealed that enzyme production was almost proportional to the applied aeration levels. The relative high enzyme yields obtained, as a result of our optimization procedure, is expected to greatly facilitate further purification of the corresponding enzymes in order to study their biochemical and physicochemical characteristics.

## Εφαρμογή της ποσοτικής PCR για τη μελέτη των πληθυσμών των ειδών *Saccharomyces cerevisiae* και *Metschnikowia pulcherrima* var. *zitsae* κατά τη διάρκεια αλκοολικής ζύμωσης γλεύκους Ντεμπίνα

**Σφακιανάκη Α., Παραπούλη Μ., Δραΐνας Κ. και Περισουνάκης Α.**

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

Η αλκοολική ζύμωση του γλεύκους είναι μία πολύπλοκη βιοχημική διαδικασία στην οποία συμμετέχουν πολλά και διαφορετικά είδη μικροοργανισμών, τα οποία βρίσκονται σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ανάλογα πάντα με το περιβάλλον οινοποίησης. Βέβαια, η σημαντικότερη κατηγορία όσον αφορά τη βιοχημική αλληλεπίδραση με το γλεύκος για την παραγωγή του οίνου είναι οι ζύμες. Συνήθως είδη και στελέχη, τα οποία δεν ανήκουν στο γένος *Saccharomyces* (non-*Saccharomyces*) επικρατούν πληθυσμιακά στα αρχικά στάδια μιας αυθόρμητης οινοποίησης ενώ αντίθετα στα τελικά στάδια κυριαρχούν οι *Saccharomyces* πληθυσμοί. Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη των πληθυσμών των ειδών *Saccharomyces cerevisiae* και *Metschnikowia pulcherrima* var. *zitsae* κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης γλεύκους Ντεμπίνα (Ζίτσα, Ήπειρος) μέσω της RT-PCR (Q-PCR). Στα πλαίσια αυτά, αρχικά απομονώθηκαν δείγματα γονιδιωματικού DNA από κύτταρα που συλλέχθηκαν σε διάφορες χρονικές στιγμές κατά τη διάρκεια μιας αυθόρμητης και έξι ελεγχόμενων ζυμώσεων φιλτραρισμένου και μη φιλτραρισμένου γλεύκους Ντεμπίνα, οι οποίες είχαν εμβολιαστεί με ένα ή δύο στελέχη ζυμών (διαδοχικός εμβολιασμός). Επιπλέον, σχεδιάστηκαν συγκεκριμένοι εκκινητές ειδικοί για την εκλεκτική ενίσχυση τμήματος της ITS2 περιοχής του είδους *M. pulcherrima* var. *zitsae*. Ο σχεδιασμός των εκκινητών έγινε μετά από σύγκριση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών διαφόρων οινοποιητικών ειδών ζυμών που έχουν απομονωθεί από την περιοχή της Ζίτσας. Για την εκλεκτική ενίσχυση του είδους *S. cerevisiae* επιλέχθηκε ζεύγος εκκινητών από τη βιβλιογραφία. Για τον καθορισμό της αποτελεσματικότητας της τεχνικής, τα αποτελέσματα της Q-PCR συγκρίθηκαν με αυτά που προέκυψαν από την κλασική μέθοδο επίστρωσης σε τρυβλία (cfu). Τα πειραματικά αποτελέσματα απέδειξαν ότι η Q-PCR είναι μια γρήγορη και ευαίσθητη μέθοδος για την ακριβή καταμέτρηση πληθυσμών κυττάρων που ανήκουν σε συγκεκριμένα είδη ζυμών κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Η ευρεία χρήση της Q-PCR από τους οινοποιούς για την ανίχνευση διαφόρων ειδών ζυμών, ακόμα και αυτών που καταστρέφουν τον οίνο, θα τους βοηθήσει στη λήψη γρήγορων αποφάσεων που αφορούν στον έλεγχο της ζύμωσης και στην αποφυγή της καταστροφής των προϊόντων τους.



## **Application of Real-time quantitative PCR for the population screening of *Saccharomyces cerevisiae* and *Metschnikowia pulcherrima* var. *zitsae* during Debina must fermentations**

**Sfakianaki A., Parapouli M., Drainas C. and Perisynakis A.**

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

Must fermentation is a complex biochemical process, in which various yeast species are involved. While in the early stages of must fermentation non-*Saccharomyces* populations are the predominant species, in the final stage *Saccharomyces* are those who play the central role. In the present work we study the populations' dynamics of the species *Saccharomyces cerevisiae* and *Metschnikowia pulcherrima* var. *zitsae* during alcoholic fermentations of Debina must employing RT-PCR (QPCR). Specific primers were designed for selective quantification of both species, screening many different alignments of sequences of the target species with those of the most common indigenous wine yeast species in the area of Zitsa (Epirus, Greece). The technique was performed on DNA samples taken at various time points of one spontaneous and six controlled fermentations in filtered and non-filtered Debina must, inoculated with one or two yeast strains (sequential inoculation). To determine the effectiveness of the technique, the QPCR results were compared with those obtained by plating (cfu). QPCR method was proved rapid and sensitive for detecting and enumerating cells that belong to a specific yeast species during must fermentation. The design of new primers for other important wine yeast species, including the main spoilage yeasts in wine, will enable winemakers to make decisions to control fermentation and avoid spoilage of their products.

## Ο πιθανός ρόλος των προβιοτικών στις υδατοκαλλιέργειες

**Τουράκη Μ.**

Εργαστήριο Γενικής Βιολογίας, Τομέας Γ.Α.Μ.Β., Τμήμα Βιολογίας, Σ.Θ.Ε., Α.Π.Θ.,  
54124 Θεσσαλονίκη

Ένα από τα κύρια προβλήματα των υδατοκαλλιεργειών είναι η ανάπτυξη μικροβιακών ασθενειών στους καλλιεργούμενους οργανισμούς με συνέπεια τεράστιο οικονομικό κόστος. Ο συνήθης τρόπος αντιμετώπισης είναι η χορήγηση αντιβιοτικών η οποία ενέχει τον κίνδυνο ρύπανσης του περιβάλλοντος και ανάπτυξης βακτηριακών στελεχών τα οποία παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στα χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά. Μία πιθανή εναλλακτική παρουσιάζει η χρήση προβιοτικών οργανισμών αντί των αντιβιοτικών. Στην παρούσα εργασία ερευνήθηκε η πιθανότητα χρήσης των προβιοτικών βακτηρίων *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus plantarum* και *Lactococcus lactis* ενάντια στο παθογόνο βακτήριο *Listonella (Vibrio) anguillarum* που προκαλεί τη δονακίωση σε καλλιεργούμενους ιχθείς. Μελετήθηκε επίσης η δυνατότητα ενσωμάτωσης προβιοτικών σε ναυτίλους *Artemia* που αποτελεί τη ζωντανή τροφή καλλιεργούμενων ιχθύων και τέλος η επίδραση της χορήγησης ναυτίλων εμπλουτισμένων με προβιοτικά σε ιχθύδια λαυρακιού τα οποία είχαν μολυνθεί με το παθογόνο *L. anguillarum*. Το προβιοτικό *Bacillus subtilis* παρότι παρουσίασε τοξικότητα για την *Artemia*, παρείχε προστασία έναντι του *Vibrio*, στους ναύτιλους που επιβίωναν. Το προβιοτικό *L. plantarum* δεν παρουσίασε τοξικότητα για την *Artemia* και βελτίωσε τα ποσοστά επιβίωσης μετά από μόλυνση με *Vibrio*. Το προβιοτικό *L. lactis* δεν παρουσίασε τοξικότητα για τους ναυτίλους αλλά ούτε για τα άτομα λαυρακιού, ενώ παρείχε προστασία στα ιχθύδια έναντι του παθογόνου *L. anguillarum* βελτιώνοντας εντυπωσιακά την επιβίωση τους μετά τη μόλυνση (80%) σε σχέση με το μάρτυρα (23.8%).

Βιοχημική μελέτη των υπερκειμένων καλλιεργειών των προβιοτικών *B. subtilis* και *L. lactis* έδειξε ότι η βακτηριοστατική δράση τους διατηρείται σε ακραίες τιμές pH αλλά και σε ακραίες θερμοκρασίες. Η βακτηριοστατική δράση διατηρήθηκε μετά από κατεργασία υπερκειμένου καλλιέργειας προβιοτικών με αμυλάση, λυσοζύμη, πρωτεϊνάση K και χυμοτυψίνη ενώ μείωση της βακτηριοστατικής δράσης παρατηρήθηκε μετά από κατεργασία με λιπάση και πεψίνη, πράγμα που υποδηλώνει τη λιποπρωτεϊνική φύση των βακτηριοστατικών ουσιών. Ακολούθησε απομόνωση των βακτηριοστατικών ουσιών από υπερκειμένο καλλιέργειας *B. subtilis* με πρωτόκολλο καθαρισμού που περιλαμβάνει καθίζηση σε θειικό αμμώνιο, χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής και εκχύλιση στερεής φάσης με διατήρηση της αντιμικροβιακής δράσης σε κάθε στάδιο. Τα μέχρι τώρα αποτελέσματα μας δείχνουν ότι τα προβιοτικά μπορούν να θεωρούν καλοί υποψήφιοι για χρήση στη θεραπεία καλλιεργούμενων ψαριών.



## The potential role of probiotics in aquaculture

**Touraki M.**

Lab. Gen Biology, Department of Genetics, Development and Molecular Biology, School of Biology, AUTH, 54124 Thessaloniki

One of the major problems in aquaculture is the development of microbial diseases which leads to considerable financial loss. The usual manner to confront this problem is the administration of antibiotics, which implicates the danger of environmental pollution and the development of bacterial strains, which are resistant to the antibiotics used. An alternative approach could be the use of probiotics. In the present work the possibility to use the probiotics *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus plantarum* and *Lactococcus lactis* against the fish pathogen *Listonella (Vibrio) anguillarum* that causes vibriosis in cultured fish, was investigated. Also the possibility of the incorporation of probiotics in *Artemia* nauplii that consist the live food of cultured fish and the effects of the administration of *Artemia* enriched with probiotics to seabass larvae challenged with *L. anguillarum*, was studied. Although *B. subtilis* presented toxicity against *Artemia* nauplii, it protected the surviving nauplii against vibriosis. *L. plantarum* did not present any toxicity to *Artemia* and improved survival rates after challenge with *Vibrio*. *L. lactis* did not present any toxicity to nauplii or to seabass larvae, while the offered marked protection to challenged fish larvae by increasing their survival following infection (80%) in comparison to control infected fish (23.8%).

Biochemical studies on the culture supernatants of *B. subtilis* and *L. lactis* showed that bactericidal activity is preserved in extreme pH values as well as in extreme temperatures. The bactericidal activity was preserved following treatment of the probiotic culture supernatant with either amylase, lysozyme, proteinase K, or chymotrypsin while a reduction in the bactericidal activity was observed following treatment with lipase and pepsin, which indicates the lipoproteic nature of the bactericidal substances. The isolation of the bactericidal substances from *B. subtilis* cultures was performed using a purification protocol employing protein precipitation in ammonium sulfate, ion exchange chromatography and solid phase extraction. The bactericidal activity was retained after each cleanup step. Our results indicate that probiotics may pose as promising candidates for use in therapy of cultured fish.

## Χρόνος εμφάνισης των IgG αντισωμάτων σε ασθενείς με λοίμωξη οφειλόμενη στον ιό του Δυτικού Νείλου

**Τσεργούλη Α., Τσιόκα Α., Γαβανά Ε. και Παπά Α.**

Α' Εργαστήριο Μικροβιολογίας, Ιατρική Σχολή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Μία μεγάλη επιδημία οφειλόμενη στον ιό του Δυτικού Νείλου παρατηρήθηκε κατά τους καλοκαιρινούς και φθινοπωρινούς μήνες του 2010 στην Κεντρική Μακεδονία. Σκοπός της παρούσας έρευνας ήταν η μελέτη του χρόνου εμφάνισης IgG αντισωμάτων σε ασθενείς με λοίμωξη οφειλόμενη στον ιό.

Συνολικά εξετάστηκαν 255 ασθενείς οι οποίοι είχαν προσβληθεί από τον ιό του Δ. Νείλου. Με βάση την κλινική εικόνα οι ασθενείς χωρίστηκαν σε τρεις ομάδες: η πρώτη περιλάμβανε 164 ασθενείς με συμπτώματα εγκεφαλίτιδας, η δεύτερη 22 ασθενείς με συμπτώματα άσηπτης μηνιγγίτιδας και η τρίτη 69 ασθενείς οι οποίοι δεν παρουσίασαν συμπτώματα από το κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ). Η ανίχνευση των αντισωμάτων πραγματοποιήθηκε με ELISA.

Το ποσοστό εμφάνισης των IgG αντισωμάτων ήταν υψηλότερο στους ασθενείς με μηνιγγίτιδα (77,3%) έναντι των ασθενών με εγκεφαλίτιδα (47,5%) και των ασθενών χωρίς συμμετοχή του ΚΝΣ (65,2%). Παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά όσο αφορά το χρόνο εμφάνισης των IgG αντισωμάτων στις τρεις ομάδες ασθενών: έως την 7η μέρα της νόσου αντισώματα ανιχνεύθηκαν σε 76,9% των ασθενών με μηνιγγίτιδα, σε 37,1% των ασθενών με εγκεφαλίτιδα και σε 56,7% των ασθενών χωρίς συμμετοχή του ΚΝΣ. Κατά την 8<sup>η</sup> ως 14<sup>η</sup> μέρα νόσου η εμφάνιση IgG αντισωμάτων δεν εμφάνισε σημαντική διαφοροποίηση στις τρεις ομάδες, καθώς τα ποσοστά ήταν 63,8%, 75% και 75% για τους ασθενείς με εγκεφαλίτιδα, μηνιγγίτιδα και χωρίς συμμετοχή του ΚΝΣ, αντίστοιχα. Μετά το πέρας των δύο εβδομάδων και έως 49 ημέρες μετά την έναρξη της νόσου, τα αντίστοιχα ποσοστά ήταν 75%, 100% και 75% IgG αντισώματα δεν ανιχνεύθηκαν σε 3 ασθενείς με εγκεφαλίτιδα (15<sup>η</sup>, 18<sup>η</sup> και 24<sup>η</sup> ημέρα νόσου) και σε 3 ασθενείς χωρίς συμμετοχή του ΚΝΣ (16<sup>η</sup>, 18<sup>η</sup> και 32<sup>η</sup> ημέρα νόσου).

Είναι γνωστό ότι η ανοσολογική απάντηση έναντι διαφόρων παθογόνων μικροοργανισμών επηρεάζεται από πλήθος παραγόντων όπως η ηλικία, το φύλο, τα υποκείμενα νοσήματα και η ανοσολογική επάρκεια. Σύμφωνα με την παρούσα μελέτη φαίνεται ότι ο χρόνος εμφάνισης των IgG αντισωμάτων έναντι του ιού του Δ. Νείλου διαφέρει ανάλογα με την κλινική μορφή της νόσου.



## Timing of the IgG antibodies in patients with West Nile virus infection

**Tsergouli A., Tsioka A., Gavana E and Papa A.**

A<sup>1</sup> Department of Microbiology, Medical School, Aristotle University of Thessaloniki, Thessaloniki, Greece

A large epidemic caused by the West Nile virus (WNV) was observed during the summer and autumn of 2010 in Central Macedonia. The aim of the present study was to investigate the time of appearance of IgG antibodies in patients with WNV infection.

A total of 255 WNV patients were examined, who were divided according to the clinical symptoms into three groups: the first group included 164 encephalitis patients, the second 22 aseptic meningitis patients and the third group included 69 patients without involvement of the central nervous system (CNS). Patients' samples were tested by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of specific WNV IgG antibodies.

IgG antibodies were present in higher percentage among meningitis patients (77.3%) than the encephalitis patients (47.5%) and patients without CNS involvement (65.2%). The time of detection of IgG antibodies differed significantly among the three groups as up to the 7th day of illness, antibodies were present in 76.9% meningitis patients, in 37.1% encephalitis patients and in 56.7% patients with no CNS involvement. The three groups did not differ significantly during the 8<sup>th</sup> - 14<sup>th</sup> day of onset, as IgG antibodies were detected in 63.8%, 75% and 75% in the patients with encephalitis, meningitis and without CNS symptoms respectively. After two weeks, and till the 49th day of onset, the percentages of the respective groups were 75%, 100% and 75%; IgG antibodies were not detected in 3 encephalitis patients (on 15<sup>th</sup>, 18<sup>th</sup> and 24<sup>th</sup> day of onset) and in 3 patients with no CNS involvement (on 16<sup>th</sup>, 18<sup>th</sup> and 32<sup>nd</sup> day of onset).

It is known that the immune response of patients against various pathogenic micro-organisms is influenced by a number of factors, as age, sex, underline diseases and immunosufficiency. Results of the present study suggest that the time of detection of WNV IgG antibodies differs greatly among patients with different clinical form of the disease.

## Η δομή των βακτηριακών κοινοτήτων αποβλήτων ελαιοτριβείου εξαρτάται από την ποικιλία της ελιάς

**Τσαίμης Γ.<sup>1</sup>, Τζαγκαράκη Γ.<sup>1</sup>, Χαμαλάκη Α.<sup>1</sup>, Ξυπεράς Ν.<sup>1</sup>, Andersen G.<sup>2</sup>, Κυρπίδης Ν.<sup>3</sup>, Βαγενάς Δ.<sup>1</sup> και Μπούρτζης Κ.<sup>1</sup>**

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

<sup>2</sup>Lawrence Berkeley National Laboratory, Center for Environmental Biotechnology, 1 Cyclotron Road, Mail Stop 70A-3317, Berkeley, CA 94720, USA,

<sup>3</sup>Department of Energy, Joint Genome Institute, Genome Biology Program, 2800 Mitchell Drive, Walnut Creek, CA, USA

Τα απόβλητα ελαιοτριβείων αποτελούν ένα σημαντικό περιβαλλοντικό πρόβλημα σε όλες τις ελαιοπαραγωγές χώρες καθώς σε σύντομο χρονικό διάστημα παράγονται τεράστιες ποσότητες αποβλήτων. Τα σύγχρονα ελαιοτριβεία χρησιμοποιούν σύστημα φυγοκέντρησης είτε δύο είτε τριών φάσεων. Στην Ελλάδα, το 80% των ελαιοτριβείων χρησιμοποιούν το σύστημα φυγοκέντρησης τριών φάσεων παράγοντας: (α) παρθένο ελαιόλαδο, (β) υγρά απόβλητα και (γ) ένα στερεό υπόλειμμα ελιάς ή ούζο. Η διαχείριση των υγρών αποβλήτων είναι ιδιαίτερα σημαντική και κρίσιμη αφενός λόγω της μεγάλης παραγόμενης ποσότητας και αφετέρου λόγω της υψηλής περιεκτικότητας τους σε οργανικό φορτίο και της χημικής τους σύνθεσης που τα καθιστά ανθεκτικά στην αποδόμηση. Αξίζει να σημειωθεί ότι μέχρι σήμερα δεν υπάρχει οικονομικά βιώσιμη μέθοδος για την επεξεργασία αυτών των αποβλήτων.

Η παρούσα μελέτη εστιάστηκε στο χαρακτηρισμό της βακτηριακής κοινότητας που απαντά στα υγρά απόβλητα που παράγονται σε ελαιοτριβείο τριών φάσεων από τρεις ποικιλίες ελαιόδεντρων (Καλαμών, Χονδροελιά και Λαδοελιά). Ο χαρακτηρισμός πραγματοποιήθηκε: (α) με κλασικές μεθόδους απομόνωσης και καλλιέργειας βακτηρίων σε θρεπτικά μέσα και (β) με μικροσυστοιχίες DNA (PhyloChip). Με την πρώτη προσέγγιση απομονώσαμε 232 βακτηριακά στελέχη από τις τρεις ποικιλίες ελιάς. Η φυλογενετική ανάλυση έδειξε ότι τα στελέχη αυτά προέρχονται από τις ομάδες *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *α-Proteobacteria*, *β-Proteobacteria*, *γ-Proteobacteria*, και *Bacteroidetes*. Η δεύτερη προσέγγιση, με τη χρησιμοποίηση των μικροσυστοιχιών PhyloChip, αποκάλυψε μια υψηλή βακτηριακή ποικιλομορφία με αντιπροσώπους από 18 Φύλα και 123 οικογένειες. Διαγράμματα Venn υποδεικνύουν ότι η δομή των βακτηριακών κοινοτήτων από τα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου είναι μοναδική για κάθε μία από τις τρεις ποικιλίες ελιάς που εξετάστηκαν με μόνο το 20% των λειτουργικών ταξινομικών ομάδων να είναι κοινές και στις τρεις ποικιλίες.





## Olive-mill wastewater bacterial communities are variety dependant

**Tsiamis G.<sup>1</sup>, Tzagkaraki G.<sup>1</sup>, Chamalaki A.<sup>1</sup>, Xipteras N.<sup>1</sup>, Andersen G.<sup>2</sup>,  
Kyrrpides N.<sup>3</sup>, Vayenas D.<sup>1</sup> and Bourtzis K.<sup>1</sup>**

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

<sup>2</sup>Lawrence Berkeley National Laboratory, Center for Environmental Biotechnology, 1 Cyclotron  
Road, Mail Stop 70A-3317, Berkeley, CA 94720, USA,

<sup>3</sup>Department of Energy, Joint Genome Institute, Genome Biology Program,  
2800 Mitchell Drive, Walnut Creek, CA, USA

Olive mill waste materials represent an important environmental problem in all olive-oil producing countries, where they are generated in huge quantities in short periods of time. Modern olive-mills use are based as a two or three phase centrifugation systems. In Greece 80% of the olive mills are based on three phase centrifugation systems producing: (a) pure olive oil, (b) olive-mill wastewater (OMWW) and (c) a solid cake-like called olive cake or orujo. The OMWW is considered to be the most critical waste, in terms of quantity and quality, and because its high organic load and chemical composition renders it resistant to degradation. It should be noted that no single method has proven superior enough to become widely adopted.

The current study aims at the characterization of the bacterial diversity from OMWW produced from three olive tree varieties (Kalamon, Xondroelia and Ladoelia) derived from olive-mill based on the three phase centrifugation system. The characterization was based on: (a) a culture-dependent approach and (b) a DNA microarray (PhyloChip).

With the culture-dependent approach, a total of 232 bacterial were characterized from the three cultivar specific OMWWs. All strains isolated were phylogenetically related, to 38 validly described species of Bacteria linked to *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *α-Proteobacteria*, *β-Proteobacteria*, *γ-Proteobacteria*, and *Bacteroidetes*. The microarray-based approach revealed significant bacterial diversity related to 123 families from 18 different phyla. Venn diagrams indicate that the structure of the OMWW bacterial communities is unique for each of the three olive-tree varieties examined with only 20% of the OTUs to be common in all three varieties.

## ***In vitro* αντι-φλεγμονώδεις δράσεις λιποειδικών μορίων του *Beauveria bassiana* έναντι του παράγοντα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων (PAF)**

**Τσούπρας Α.Β.<sup>1</sup>, Κουβέλης Β.Ν.<sup>2</sup>, Δημόπουλος Κ.Α.<sup>1</sup>, Παπά Κ.Μ.<sup>2</sup> και Τύπας Μ.Α.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Εργαστήριο Βιοχημείας, Τμήμα Χημείας,

<sup>2</sup>Τομέας Γενετικής και Βιοτεχνολογίας, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ, Ιλίσια, Αθήνα 15701

Ο μικροοργανισμός *Beauveria bassiana* αποτελεί έναν ευρέως διαδεδομένο εντομοπαθογόνο μύκητα με σύγχρονη χρήση παράγοντα βιολογικής καταπολέμησης στο πεδίο. Στον μύκητα αυτό έχουν ανιχνευθεί μόρια όπως τα μποβεριολιοειδή (beauveriolides) που παρουσιάζουν αντι-αθηρογόνο δράση. Στην επαγωγή της αθηρογένεσης και εν τέλει της αθηρωσκλήρωσης εμπλέκεται ο παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων (PAF) και οι αλληλεπιδράσεις με τον υποδοχέα του, ενώ αναστολείς του PAF επιδεικνύουν ισχυρή αντι-αθηρογόνο δράση. Σκοπό της παρούσας εργασίας αποτέλεσε η μελέτη στον μύκητα *B.bassiana* της ύπαρξης λιποειδικής φύσεως μορίων με αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες έναντι του PAF, που δηλώνουν πιθανή αντι-αθηρογόνο δράση. Πραγματοποιήθηκε εκχύλιση ολικών λιποειδών τόσο των κυττάρων όσο και του υπερκλειμένου καλλιέργειας αυτού του μύκητα και HPLC-διαχωρισμός, χρησιμοποιώντας ημιπροπαρασκευαστική στήλη C8 ανάστροφης φάσης. Η επίδραση των ολικών αλλά και των διαχωρισμένων λιποειδών των κυττάρων και του υπερκλειμένου έναντι του PAF μελετήθηκε *in vitro* μέσω βιολογικής δοκιμασίας με πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού. Τόσο τα ολικά λιποειδή των κυττάρων όσο και αυτά του μέσου ανέστειλαν ισχυρά, δοσοεξαρτώμενα και με έναν ανταγωνιστικό τρόπο την προκαλούμενη από τον PAF συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Μόνο τα ολικά λιποειδή των κυττάρων επέδειξαν και αγωνιστική δράση έναντι του PAF, όταν δοκιμάστηκαν σε υψηλότερες συγκεντρώσεις. Μέσω του HPLC-διαχωρισμού των εκχυλισμάτων ολικών λιποειδών των κυττάρων και του υπερκλειμένου, βρέθηκε ότι συγκεκριμένα μόρια που μοιράζονται παρόμοιους χρόνους έκλουσης, εμφανίζουν ισχυρή ανασταλτική δράση έναντι του PAF. Αυτό υποδηλώνει ότι μόρια του *B.bassiana* με αντι-PAF ιδιότητες εκκρίνονται και στο μέσο καλλιέργειας. Την ισχυρότερη ανασταλτική δράση εμφάνισαν τα πιο πολικής φύσεως λιποειδή σε κάθε περίπτωση. Εν τούτοις, παρατηρήθηκε ισχυρή αγωνιστική δράση μόνο σε ένα κλάσμα ουδετέρων λιποειδών και μόνο στην περίπτωση των κυττάρων, υποδηλώνοντας ότι υπάρχουν λιποειδή του μύκητα με βιολογική δράση που δεν εκκρίνονται στο μέσο καλλιέργειας. Καθώς ο PAF εμπλέκεται σε σημαντικές φλεγμονώδεις επιπλοκές όπως η αθηροσκλήρωση και ο καρκίνος, η ανίχνευση ισχυρών αναστολέων (ανταγωνιστών και αγωνιστών) του PAF σε κύτταρα *B.bassiana* αλλά και στο μέσο καλλιέργειας, προσδίδει νέες προοπτικές στις μελλοντικές χρήσεις του βιοτεχνολογικού αυτού μύκητα.



## ***In vitro* anti-inflammatory activities of *Beauveria bassiana* lipid molecules towards platelet activating factor (PAF)**

**Tsoupras A.B.<sup>1</sup>, Kouvelis V.N.<sup>2</sup>, Demopoulos C.N.<sup>1</sup>, Pappas K.M.<sup>2</sup> and Typas M.A.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Laboratory of Biochemistry, Faculty of Chemistry,

<sup>2</sup>Department of Genetics and Biotechnology, Faculty of Biology, NKUA, Ilissia, Athens 15701

*Beauveria bassiana* is a widely spread entomopathogenic fungus, currently used as a bio-control agent. Interestingly, classes of molecules with beneficial anti-atherogenic activities have been detected in this fungus, such as the beauveriolides. In general, the induction of atherogenesis/atherosclerosis is strongly mediated by the inflammatory mediator platelet activating factor (PAF) and its interactions with its specific receptor, while several PAF-inhibitors exhibit potent anti-atherogenic activities. Aim of this study has been to further examine the existence of putative anti-atherogenic lipid molecules in *B.bassiana*, exhibiting anti-inflammatory activities towards PAF. Total lipids from *B.bassiana* cells and culture supernatants were extracted and separated by HPLC, using a C8-reversed-phase semi-preparative column. The effect of cell pellet and supernatant lipids (total lipids and lipid fractions after separation in each case) towards PAF was evaluated *in vitro* by washed-rabbit-platelet biological assays. Both total lipids of *B.bassiana* cells and culture supernatants inhibited strongly, dose-dependently and through an antagonistic effect PAF-induced platelet aggregation. However, only total lipids from *B.bassiana* cells, when used at higher concentrations, exhibited further an agonistic effect towards PAF. HPLC separation of total lipid extracts from both cells and culture supernatants revealed that several lipid molecules sharing same retention times in each case exhibit a potent inhibitory effect against PAF-activities. This suggests that molecules with anti-PAF activities present in *B.bassiana* cells are also secreted in the culture medium. The strongest inhibitory effects were observed by the more polar lipids in both cases. However, only in the case of cell-derived lipids a strong agonistic effect towards PAF was observed in a lipid fraction carrying neutral lipids, suggesting that not all lipid molecules of this fungus with biological activities are secreted. Since PAF is implicated in significant inflammatory manifestations such as atherosclerosis and cancer, the detection of PAF-inhibitors or PAF-agonists in *B.bassiana* cells and culture supernatants, provide new perspectives in future uses of this biotechnological fungus.

## Ανάπτυξη και Αξιολόγηση Ενδογενών Δενδρόμορφων Μυκορριζικών Εμβολίων ως Βελτιωτικό Θρέψης της Πιπεριάς

**Υψηλάντης Ι.<sup>1</sup>, Αντωνιάδης Κ.<sup>1</sup>, Σαββανάκη Α.<sup>1</sup>, Καρπούζας Δ. Γ.<sup>1</sup>, Οιχαλιώτης Κ.<sup>2</sup> και Παπαδοπούλου Κ.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας, Πλούτωνος 26 και Αιόλου, 41221, Λάρισα,

<sup>2</sup>Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Αξιοποίησης Φυσικών Πόρων και Γεωργικής Μηχανικής, Ιερά Οδός 75, 11855, Αθήνα

Ο περιορισμός στη χρήση των λιπασμάτων έχει καταστήσει την χρήση των μυκορριζών για την θρέψη των φυτών μία οικονομικά υποσχόμενη λύση. Στην παρούσα εργασία περιγράφεται η απομόνωση δενδρόμορφων μυκορριζικών μυκήτων από βιολογικά αγροκτήματα της Μακεδονίας και Θεσσαλίας οι οποίοι αξιολογήθηκαν, τα εμβόλιά τους ή συνδυασμός τους, ως προς την αποτελεσματικότητά τους στην θρέψη, ανάπτυξη και παραγωγή της πιπεριάς σε φυτοδοχεία και σε έδαφος σε σύγκριση με μη εμβολιασμένο μάρτυρα και εμβόλιο-εμπορικό σκεύασμα. Οι ενδογενείς μυκορριζικοί μύκητες που αξιολογήθηκαν ταυτοποιήθηκαν με αλληλούχιση του 18S rRNA γονιδίου τους ως *Glomus intraradices* (MC3), *G. etunicatum* (MC4), *G. mosseae* (MC10), *G. mosseae* (MC 22) και μίγμα από *G. mosseae* /*G. etunicatum*. Στα φυτοδοχεία παρατηρήθηκε αύξηση της ανάπτυξης της πιπεριάς με εμβολιασμό με μυκορριζικούς μύκητες, και κάποιος από του μύκητες αύξησαν την συγκέντρωση P στους βλαστούς και τις ρίζες. Στο πείραμα αγρού παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της παραγωγής με περισσότερους και μεγαλύτερους καρπούς για τα εμβολιασμένα φυτά, και ιδιαίτερα με συγκεκριμένους, μεμονωμένους μύκητες όπως οι *G. intraradices* MC3 και *G. mosseae* MC10.



## Development and Evaluation of Native Mycorrhizal Inoculum to Improve Pepper Plant Nutrition

**Ipsilantis I.<sup>1</sup>, Antoniadis C.<sup>1</sup>, Sabbanaki A.<sup>1</sup>, Karpouzas D.G.<sup>1</sup>, Ehaliotis C.<sup>2</sup>  
and Papadopoulou K.K.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>University of Thessaly, Department of Biochemistry and Biotechnology,  
Ploutonos 26 and Aiolou str., Larisa 41221, Greece,

<sup>2</sup>Agricultural University of Athens, Department of Natural Resources  
and Agricultural Engineering, Iera Odos 75, 11851 Athens, Greece.

In agricultural systems of reduced inputs the use of mycorrhizae to improve plant nutrition is promising. Arbuscular mycorrhizal fungi were isolated from organic farms of Macedonia and Thessaly and their inocula, single or combinations, and were evaluated in pot and field studies for their effectiveness in improving pepper plant growth and production, against non-inoculated controls and commercial inoculum. The isolated mycorrhizal fungi were identified through sequencing of their 18S rRNA gene as *Glomus intraradices* (MC3), *G. etunicatum* (MC4), *G. mosseae* (MC10), *G. mosseae* (MC 22) and a mixture of *G. mosseae* /*G. etunicatum*. In the pot study there was no increase in pepper plant growth with mycorrhizal inoculum, however, some mycorrhizal fungi increased P concentration in roots and shoots. In the field study there was increased pepper production with more and bigger pepper fruits for the inoculated plants, particularly with specific single inocula like *G. intraradices* MC3 and *G. mosseae* MC10.

## Αλλαγές στη σύσταση βενθικών βακτηριακών κοινοτήτων κατά μήκος διαβάθμισης οργανικού εμπλουτισμού από ιχθυοκαλλιέργειες

**Φοδελιανάκης Σ., Παπαγεωργίου Ν., Καρακάσης Ι. και Λαδουκάκης Ε.**

Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Βασιλικά Βουτών, 71409 Ηράκλειο, Κρήτη

Αλλαγές στη σύσταση βακτηριακών βενθικών κοινοτήτων εξετάστηκαν μέσω ηλεκτροφόρησης σε διαβάθμιση αποδιατακτικών μέσων (DGGE) σε ιζήματα διαβαθμισμένα όσον αφορά τον οργανικό εμπλουτισμό από δυο ιχθυοκαλλιέργειες τσιπούρας (*Sparus aurata*) και λαβρακιού (*Dicentrarchus labrax*). Ο μέσος αριθμός βακτηριακών τάξεων βρέθηκε σημαντικά μεγαλύτερος σε απόσταση 5 μέτρων από τους κλωβούς σε σχέση με τα δείγματα ελέγχου. Οι nMDS αναλύσεις των μητρών παρουσίας/απουσίας των βακτηριακών τάξεων ομαδοποίησαν τα δείγματα ανάλογα με την προέλευσή τους κι όχι με τον βαθμό του οργανικού εμπλουτισμού. Κλωνοποίηση και αλληλούχιση από μπάντες DGGE που υπήρχαν μόνο στα οργανικά εμπλουτισμένα δείγματα έδειξαν την ύπαρξη διαφορετικών φυλογενετικών ομάδων στις δυο περιοχές. Συσχετίσεις του μέσου αριθμού βακτηριακών τάξεων με αβιοτικούς περιβαλλοντικούς παράγοντες έδειξαν έντονη γραμμική συσχέτιση του αριθμού αυτού με το ποσό του συνολικού, του ανόργανου φωσφόρου και της διαλυμένης σωματιδιακής ύλης του ιζήματος, ενώ αρνητική ήταν η συσχέτιση με τη μέση διάμετρο των κόκκων του ιζήματος. Τα αποτελέσματα της εργασίας αυτής υποστηρίζουν την υπόθεση των έντονα διαφορετικών βακτηριακών κοινοτήτων στο χώρο παρά αυτήν της πανταχού παρουσίας όλων των βακτηριακών τάξεων, στα βενθικά ιζήματα. Επίσης υποδεικνύεται ένα μοντέλο διαδοχής των μικροβιακών τάξεων παρόμοιο με αυτό των οικοτόνων για τη μακροπανίδα κάτω από συνθήκες διαβαθμισής διαφόρων τύπων περιβαλλοντικής ρύπανσης.



## **Changes in bacterial community composition across a benthic organic enrichment gradient induced by fish farms**

**Fodelianakis S., Papageorgiou N., Karakassis I. and Ladoukakis E.D.**

Department of Biology, University of Crete, Vassiliki Vouton, 71409 Iraklion, Crete

Bacterial community composition was investigated by means of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in a spatial organic enrichment gradient caused by fish farms of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and sea bream (*Sparus aurata*) in two different sites in Eastern Mediterranean (Greece). The mean bacterial OTU number in 5 meters distance from the cages was found to be significantly higher than the control. nMDS analysis of the presence/absence data using OTU matrixes showed that samples clustered according to their origin rather than to the level of impact from organic enrichment. Cloning and sequencing of novel DGGE bands of impacted sites also revealed different phylogenetic groups at the two sites. Correlations between the mean bacterial OTU number and abiotic factors measured for the same samples showed strong positive correlation of bacterial OTUs with total and inorganic phosphorus and labile organic matter, as well as negative correlation with the sediment's median grain size (MD). The results support the hypothesis of localized bacterial communities over a potential omnipresence of sediment bacterial taxa. Also, they indicate a succession pattern of microbial OTUs similar to that of ecotones for macrofauna in environmental pollution gradients.

## Βελτιώνοντας τη μικροβιολογική ασφάλεια σε μικρές μονάδες παραγωγής τοπικών τροφίμων

**Φραγκιαδάκης Γ.Α., Κυριακίδης Γ. και Μαρκάκη Α.**

Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα (Τ.Ε.Ι) Κρήτης, Τμήμα Διατροφής και Διαιτολογίας,  
723 00 Σητεία, Κρήτη, Ελλάδα

Η επιλογή της παραγωγής τροφίμων, της μεταποίησης και των συστημάτων εμπορίας που είναι κατάλληλα για μία συγκεκριμένη τοπική οικονομία είναι μια κρίσιμη διαδικασία. Τα τελευταία χρόνια στην Κρήτη, στην Ελλάδα, έγινε φανερό ότι η επιτυχής παραγωγή υψηλής ποιότητας τοπικών τροφίμων μπορεί να διεξαχθεί σε μικρή κλίμακα εγκαταστάσεις ακολουθώντας παραδοσιακές μεθόδους. Σε εύθετο χρόνο, οι μικρές συνεταιριστικές επιχειρήσεις χρηματοδοτήθηκαν από προγράμματα της Ευρωπαϊκής Ένωσης, για την παραγωγή τροφίμων (κυρίως παραδοσιακά ψητά ή τηγανητά αρτοσκευάσματα και γλυκά κουταλιού). Με βάση την εμπειρία μας, αυτές οι μικρές επιχειρήσεις μπορεί να αντιμετωπίσουν κάποια προβλήματα με αποκλίσεις στην ασφάλεια των τροφίμων και κενά στα συστήματα ποιότητας τροφίμων, π.χ. καταγραφές των «δυσμενών» μικροβιολογικών αποτελεσμάτων σε επιφάνειες στο τμήμα παραγωγής. Σε μια προσπάθεια να αποκαλύψουμε τους λόγους των προβλημάτων αυτών προβήκαμε σε σχετική εκτίμηση σε 10 από τις επιχειρήσεις αυτές και καταλήξαμε στα ακόλουθα συμπεράσματα. 1. Λόγω επένδυσης σχετικά μικρού κεφαλαίου, ο σχεδιασμός των κτιρίων και του εξοπλισμού με έμφαση στην υγιεινή δεν είναι ο βέλτιστος. 2. Η δημιουργία «υγιεινο-ζωνών» που να εφαρμόζεται αυστηρός έλεγχος της κίνησης των προσώπων και των υλικών μέσω των εγκαταστάσεων, προκειμένου να αποτρέπεται η μόλυνση και η εξάπλωσή της, είναι δύσκολη. 3. Ο σχεδιασμός των διαθέσιμων εσωτερικών χώρων, δεν διευκολύνει τις διαδικασίες υγιεινής και συντήρησης του εξοπλισμού επεξεργασίας. 4. Ο έλεγχος της θερμοκρασίας των χώρων και της υγρασίας, με στόχο να μειωθεί η ανάπτυξη μικροβίων, δεν είναι πάντα αποτελεσματική. 5. Οι χώροι αποθήκευσης πρώτων υλών είναι προσβάσιμοι από ανεπίδεκτο προσωπικό διανομής και δεν παρακολουθούνται συστηματικά. 6. Η απομάκρυνση των ακρήστων από τους χώρους μεταποίησης τροφίμων και συσκευασίας, τους καθιστά περισσότερο ευάλωτους σε κίνδυνο μόλυνσης. Από την άλλη πλευρά, παρατηρήθηκε ότι οι εργαζόμενοι, σε ορισμένες περιπτώσεις γυναίκες που είναι μέλη μιας μικρής ομάδας, είναι γενικά καλά εκπαιδευμένοι και πολύ ευσυνείδητοι επαγγελματίες, ενώ ταυτίζονται με το καλό όνομα και τα συμφέροντα των επιχειρήσεων.





## Improving the microbiological safety in small local-food producing units

**Fragkiadakis G.A., Kyriakidis G. and Markaki A.**

Technological Education Institute (TEI) of Crete, Department of Nutrition and Dietetics,  
723 00, Siteia, Crete, Greece

Selection of the food production, processing, and marketing systems suitable for a certain local economy is a critical process. The last years in Crete, Greece, became obvious that successful production of high quality local food may be carried out in small-scale premises following traditional methods. In due course, small cooperative enterprises were financed through European Union programs, to produce food (mainly traditional baked or fried pastries and sweet deserts). To our experience, these small enterprises may encounter with some food safety problems, deviations and gaps in their food quality systems, i.e. recordings of “bad” surface microbiological results in a production department. In an effort to uncover the reasons of these problems we carried out a relevant assessment in 10 such enterprises and came up with following conclusions. 1. Due to the relatively small capital invested, the hygienic design of buildings and equipment is not optimal. 2. The establishment of “hygienic zones” applying strict control of peoples and materials movement through the plant, in order to prevent contamination and its spread, is difficult. 3. The design of the available interior spaces does not facilitate sanitation procedures and maintenance of processing equipment. 4. The control of room temperature and humidity, aiming to diminish microbial growth, is not always efficient. 4. Ingredients storage areas are accessible by untrained deliverers and not monitored systematically. 5. Trash removal from the food processing and packing areas makes them vulnerable to contamination. On the other hand we observed that the employees, sometimes women members of a small cooperation, were generally well trained and very conscious on the job; they identified with the good name and interests of the enterprises.

## Χαρακτηρισμός της βακτηριακής ποικιλότητας της κατακόρυφης υδάτινης στήλης της Λιμνοθάλασσας του Αιτωλικού

**Χαμαλάκη Α.<sup>1</sup>, Τσιάμης Γ.<sup>1</sup>, Διακουμής Β.<sup>1</sup>, Διακοπαναγιώτης Ζ.<sup>1</sup>, Κυρπίδης Ν.<sup>2</sup>, Andersen G.<sup>3</sup> και Μπούρτζης Κ.<sup>1</sup>**

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

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

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

Η λιμνοθάλασσα του Αιτωλικού, συνολικής έκτασης 1.700 εκταρίων, έχει ασυνήθιστο σχηματισμό τεκτονικής προέλευσης και αποτελεί μέρος του συμπλέγματος των υγροτόπων της Δυτικής Ελλάδας με εξαιρετικά υψηλή ποικιλότητα. Στόχος της παρούσας μελέτης είναι ο χαρακτηρισμός της βακτηριακής ποικιλότητας στην κατακόρυφη στήλη (5, 15, 25μ και ίζημα) της λιμνοθάλασσας του Αιτωλικού χρησιμοποιώντας δύο προσεγγίσεις: (α) βιβλιοθήκες του γονιδίου 16S rRNA και (β) DNA μικροσυστοιχίες (PhyloChip).

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων με βάση τη τεχνική των μικροσυστοιχιών αποκάλυψε σημαντική βακτηριακή ποικιλότητα που σχετίζεται με 43 συνομοταξίες από τις 63 που υπάρχουν στο PhyloChip με αντιπροσώπους από 283 οικογένειες. Διαγράμματα Venn χρησιμοποιώντας δεδομένα από τις βιβλιοθήκες 16S rRNA και τις μικροσυστοιχίες PhyloChip υποδηλώνουν ότι η κατακόρυφη κατανομή των βακτηριακών κοινοτήτων της λιμνοθάλασσας του Αιτωλικού είναι μοναδική για καθένα από τα υπό εξέταση δείγματα. Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι η λιμνοθάλασσα του Αιτωλικού αποτελεί ένα πολύ ενδιαφέρον οικοσύστημα που το χαρακτηρίζει μια μοναδική και υψηλής ποικιλότητας βακτηριακή κοινότητα.



## Characterization of a unique vertical bacterial diversity from the Etoliko lagoon

**Chamalaki A.<sup>1</sup>, Tsiamis G.<sup>1</sup>, Diacoumis V.<sup>1</sup>, Diakopanagiotis Z.<sup>1</sup>, Kyrpides N.<sup>2</sup>, Andersen G.<sup>3</sup> and Bourtzis K.<sup>1</sup>**

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

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

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

Etoliko lagoon is part of a complex wetland in Western Greece extremely rich in biodiversity that covers an area of 1,700 ha with an atypical orientation that has been formed tectonically. The current study aims at a detailed characterization of the vertical distribution (5, 15, 25m and sediment) of the bacterial diversity from the Etoliko lagoon using: (a) 16S rRNA gene libraries and (b) a DNA microarray (PhyloChip).

The microarray-based approach revealed significant bacterial diversity related to 43 phyla out of the 63 present in the PhyloChip with members from 283 families. Analysis using Venn diagrams of the 16S rRNA gene libraries and the PhyloChip data indicate that the vertical distribution of the bacterial communities in the Etoliko lagoon is unique for each of the four samples examined. Based on the available data, it is clear that the Etoliko lagoon represents a very interesting environment housing a high and unique bacterial diversity.

## ***Pseudomonas putida* FEN1, το πρώτο άγριου τύπου βακτηριακό στέλεχος που έχει την ικανότητα να διασπά οργανοφωσφορικά και καρβαμιδικά εντομοκτόνα**

**Χανίκα Ε.<sup>1</sup>, Γεωργιάδου Δ.<sup>1</sup>, Καράς Π.<sup>1</sup>, Καρανάσιος Ε.<sup>2</sup> και Καρούζας Δ.Γ.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, 41221 Λάρισα,

<sup>2</sup>Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Γεωπονίας, Φυτικής Παραγωγής  
και Αγροτικού Περιβάλλοντος, 38446 Βόλος

Το fenamiphos (FEN) είναι ένα οργανοφωσφορικό (OP) γεωργικό φάρμακο που χρησιμοποιείται για τον έλεγχο των νηματωδών σε θερμοκηπιακές καλλιέργειες. Στο έδαφος το FEN οξειδώνεται σταδιακά προς σουλφοξειδιο (FSO) και σουλφόνη (FSO<sub>2</sub>) που παρουσιάζουν υψηλή νηματωδοκτόνη δράση και είναι τοξικά σε οργανισμούς μη-στόχους. Αντίθετα, το FEN αποδομείται ταχύτατα από τα βακτήρια σε εδάφη με ιστορικό χρήσης του νηματωδοκτόνου. Μέχρι σήμερα έχουν απομονωθεί μόνο δύο βακτηριακά στελέχη, *Brevibacterium* sp. (Megharaj et al., 2003) και *Microbacterium* sp (Caceres et al. 2009) που είχαν την ικανότητα να υδρολύουν τα FEN, FSO και FSO<sub>2</sub> στις αντίστοιχες φαινόλες που δεν μεταβολίζονται παραπέρα. Στην παρούσα εργασία περιγράφεται η απομόνωση δύο FEN-αποδομητικών βακτηρίων από έδαφος που συλλέχθηκε από αγρό στην Κρήτη με ιστορικό χρήσης FEN και oxamyl (καρβαμιδικό νηματωδοκτόνο). Με βάση την αλληλουχία του 16S rRNA γονιδίου τους τα βακτήρια ταυτοποιήθηκαν ως *Pseudomonas putida* και *Acinetobacter rhizosphaerae*. Τα δύο βακτήρια είχαν την ικανότητα να διασπούν το FEN προς fenamiphos phenol που μεταβολίζεται παραπέρα μόνο από το *P. putida* FEN1 παρεμποδίζοντας έτσι την συσσώρευση περιβαλλοντικά προβληματικών μεταβολιτών. Το ίδιο στέλεχος παρουσίασε υψηλή αποδομητική απέναντι σε υψηλές συγκεντρώσεις του FEN και των οξειδωμένων παραγώγων του όταν εμβολιάστηκε στο έδαφος. Το *P. putida* FEN1 είχε την ικανότητα να διασπά και άλλα OP που περιείχαν P-O-C δεσμούς στο μόριο τους (fention, chlorgrifyfos) αλλά και τα καρβαμιδικά oxamyl και carbofuran. Αυτό αποτελεί την πρώτη αναφορά άγριου βακτηριακού στελέχους που έχει την ικανότητα να διασπά και να αποτοξικοποιεί ταυτόχρονα OPs και καρβαμιδικά. Νέες μελέτες έδειξαν ότι το στέλεχος *P. putida* FEN1 κατείχε το γονίδιο *cehA* που είχε απομονωθεί από πλασμιδίο ενός carbaryl-αποδομητικού στελέχους *Rhizobium*. Μελέτες σε εξέλιξη στοχεύουν στην απομόνωση των γονιδίων που εμπλέκονται στον μεταβολισμό του FEN από το στέλεχος *P. putida* FEN1.

### **Βιβλιογραφία**

Caceres et al. 2009. *Biores. Technol.* 100, 2732-2736.

Megharaj et al. 2003. *Appl. Microbiol. Biotech.* 61, 252-256.



## ***Pseudomonas putida* FEN1, the first wild type strain degrading both organophosphate and carbamate neurotoxic insecticides**

**Chanika E.<sup>1</sup>, Georgiadou D.<sup>1</sup>, Karas P.<sup>1</sup>, Karanasios E.<sup>2</sup> and Karpouzias D.G.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>University of Thessaly, Department of Biochemistry and Biotechnology, 41221 Larissa,

<sup>2</sup>University of Thessaly, Department of Agriculture, Crop Production and Rural Environment, 38446 Volos

Fenamiphos (FEN) is an organophosphorus (OP) pesticide used for the control of nematodes in protected crops. In soil, FEN is gradually oxidized to its sulfoxide (FSO) and sulfone (FSO<sub>2</sub>) which also possess nematocidal activity and are equally toxic to non-target vertebrates. On the other hand, in soils with history of FEN the nematocidal is rapidly degraded by soil bacteria. So far only two FEN-degrading bacteria have been isolated, a *Brevibacterium* sp. (Megharaj et al., 2003) and a *Microbacterium* sp (Caceres et al. 2009). Both of these bacteria hydrolyzed FEN, FSO and FSO<sub>2</sub> to their corresponding phenols which were not further metabolized. We report the isolation of two FEN-degrading bacteria from a soil collected from a banana plantation in Crete with extensive history of FEN and oxamyl (carbamate nematocidal). Based on their 16S rRNA sequence the two bacteria were identified as *Pseudomonas putida* and *Acinetobacter rhizosphaerae*. Subsequent metabolism studies revealed both strains hydrolyzed FEN to fenamiphos phenol which was further transformed, only by *P. putida* FEN1 suggesting elimination of environmentally relevant metabolites. The same isolate exhibited high bioremediation potential against spillage-level concentrations of aged residues of FEN and its oxidized derivatives. Cross-feeding studies with other pesticides showed that *P. putida* FEN1 degraded OPs with a P-O-C linkage but also the carbamates oxamyl and carbofuran. This is the first report of a wild-type strain which was able to hydrolyze and detoxify both OPs and carbamates. Subsequent studies revealed that *P. putida* FEN1 carried a plasmid-encoded sequence 100% homologous to the *cehA* gene isolated from the plasmid of a carbaryl-degrading *Rhizobium* strain. Ongoing studies will aim to isolate the genes involved in the metabolism of FEN.

### **References**

- Caceres et al. 2009. *Biores. Technol.* 100, 2732-2736.  
Megharaj et al. 2003. *Appl. Microbiol. Biotech.* 61, 252-256.

## Επίδραση της εξωγενώς προστιθέμενης 1,3-προπανοδιόλης στην αύξηση και την βιοχημική απόκριση του *Clostridium butyricum* VPI 1718

**Χατζηφράγκου Α.<sup>1</sup>, Σαραβάνου Μ.-Ε.<sup>1</sup>, Γαλιώτου-Παναγιώτου Μ.<sup>1</sup>, Κωμαίτης Μ.<sup>1</sup>,  
Αγγελής Γ.<sup>2</sup> και Παπανικολάου Σ.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ελλάδα,

<sup>2</sup>Τμήμα Βιολογίας, Τομέας Γενετικής, Βιολογίας Κυττάρου & Ανάπτυξης,  
Πανεπιστήμιο Πατρών, Ελλάδα

Σκοπό της παρούσας μελέτης αποτέλεσε η διερεύνηση της παρεμποδιστικής δράσης της 1,3-προπανοδιόλης κατά την αύξηση του βακτηρίου *Clostridium butyricum* VPI 1718 σε υποστρώματα με βάση την βιομηχανική γλυκερόλη. Πραγματοποιήθηκε προσθήκη εξωγενώς διάφορων ποσοτήτων 1,3-προπανοδιόλης είτε πριν είτε μετά τον εμβολιασμό, προκειμένου να μελετηθεί η συμπεριφορά του μικροοργανισμού σε επίπεδο κυτταρικής αύξησης, κατανάλωσης υποστρώματος, αλλά και παραγωγής 1,3-προπανοδιόλης. Οι καλλιέργειες έλαβαν χώρα σε αναερόβιες φιάλες Duran και σε βιοαντιδραστήρα όγκου 1 L, με ενεργό όγκο ζύμωσης 800 mL και στις δύο περιπτώσεις. Αρχικά, πραγματοποιήθηκαν καλλιέργειες σε φιάλες Duran, με αρχική προσθήκη 1,3-προπανοδιόλης (1, 4, 10 και 15 g/L) πριν τον εμβολιασμό. Μέχρι τα 10 g/L, το στέλεχος παρουσίασε ικανοποιητική αύξηση, συνοδευόμενη από εξάντληση της γλυκερόλης και συντελεστή απόδοσης της παραγόμενης 1,3-προπανοδιόλης μεταξύ 0.52-0.59 g ανά g καταναλωθέντος υποστρώματος. Αντίθετα, η προσθήκη 15 g/L 1,3-προπανοδιόλης αποδείχτηκε πλήρως παρεμποδιστική για το στέλεχος. Εν συνεχεία, πραγματοποιήθηκαν καλλιέργειες με προσθήκη ποσοτήτων 1,3-προπανοδιόλης (10-70 g/L) κατά την εκθετική φάση της αύξησης του μικροοργανισμού. Το στέλεχος εμφάνισε καλή ανοχή ακόμη και στην προσθήκη 70 g/L 1,3-προπανοδιόλης, καταναλώνοντας την γλυκερόλη προκείμενου να καλύψει τις ανάγκες του σε ενέργεια για την διατήρηση της βιωσιμότητάς του. Ωστόσο, κατά την καλλιέργεια του μικροοργανισμού στον βιοαντιδραστήρα, ακόμα και όταν η συνολική συγκέντρωση 1,3-προπανοδιόλης (εξωγενώς προστιθέμενης και παραγόμενης) ξεπέρασε τα 70 g/L, το στέλεχος συνέχισε τόσο την κατανάλωση της γλυκερόλης, όσο και την παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δεικνύουν την αξιόλογη ανοχή του βακτηρίου *C. butyricum* VPI 1718 σε υψηλές ποσότητες 1,3-προπανοδιόλης.



## Effect of external 1,3-propanediol addition upon growth and biochemical response of *Clostridium butyricum* VPI 1718

**Chatzifragkou A.<sup>1</sup>, Saravanou M.E.<sup>1</sup>, Galiotou-Panayotou M.<sup>1</sup>, Komaitis M.<sup>1</sup>, Aggelis G.<sup>2</sup> and Papanikolaou S.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Department of Food Science and Technology, Agricultural University of Athens, Athens, Greece,

<sup>2</sup>Unit of Microbiology, Department of Biology, Division of Genetics, Cell and Development Biology, University of Patras, Patras, Greece

Aim of the present study was to investigate the inhibitory effect of 1,3-propanediol during growth of *Clostridium butyricum* VPI 1718 on raw glycerol. Experimental work has been carried out, by external addition of various amounts of 1,3-propanediol in the fermentation medium prior or after inoculation, with the objective to monitor the behavior of the strain in terms of growth physiology, carbon assimilation, as well as 1,3-propanediol formation. Cultivations were performed in anaerobic Duran bottles and also in a 1-L fermentor, with a working volume of 800 mL in both cases. In a first approach, the microorganism was cultivated in Duran bottles, with external addition of 1,3-propanediol (1, 4, 10 and 15 g/L) prior to inoculation. Up to 10 g/L, the strain exhibited sufficient growth, accompanied by substrate exhaustion and 1,3-propanediol production yield between 0.52-0.59 g per g of consumed glycerol. However, the addition of 15 g/L of 1,3-propanediol in the medium was proved totally inhibitory for the strain. Furthermore, cultivation of *C. butyricum* was done, with addition of various concentrations of 1,3-propanediol (10-70 g/L) at exponential growth phase. The strain was proved tolerant even in the case of 70 g/L of 1,3-propanediol addition, while carbon assimilation continued, in order for the strain to meet its energy of maintenance needs. Nevertheless, during batch cultivation of the strain in a bioreactor, the strain not only continued substrate consumption, but also 1,3-propanediol formation, at a time in which the overall amount of externally added and produced 1,3-propanediol overcame 70 g/L. These findings evidence the significant tolerance of the strain in question against high amounts of 1,3-propanediol.