



4^ο Συνέδριο



**Της Επιστημονικής Εταιρείας
Μικροβιόκοσμος: Αόρατη Πηγή Ζωής**



Εις μνήμην του Καθηγητή Κώστα Δραΐνα

Πρόγραμμα Συνεδρίου

Παρασκευή 21-10-2011, Συνεδριακό Κέντρο Κάρολος Παπούλιας

14.00-16.00 Εγγραφή συνέδρων, ανάρτηση Posters

Ενότητα: **Μικροβιακές Αλληλεπιδράσεις**

Προεδρείο: Γεωργακόπουλος Δ.Γ., Χατζηλουκάς Ε.

16.00-16.15 Η φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης CagA του *H.pylori* σε θέσεις EPIYA, συμβάλει μέσω ενεργοποίησης TAK1 και NF-κB, στην ενεργοποίηση και έκκριση της ιντερλευκίνης-8 από τα γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα

Παπαδάκος Κ.¹, Martinez Β.¹, Χατζηλουκάς Ε.², Μεντής Α.¹, Σγούρας Δ.¹

¹ Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ, Εργαστήριο Ιατρικής Μικροβιολογίας, Αθήνα

² Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Ιωάννινα

16.15-16.30 Ρόλοι της β υπομονάδας της πρωτεΐνης G και της SNF1 κινάσης κατά την αλληλεπίδραση του μύκητα *Verticillium dahliae* με το φυτό – ξενιστή

Τζίμα Α.¹, Παπλωματάς Ε.Ι.¹, Τσιτσιγιάννης Δ.Ι.¹, Kang S.²

¹ Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

² Department of Plant Pathology, The Pennsylvania State University, USA

16.30-16.45 Γενετικός προσδιορισμός της ανταγωνιστικής δράσης του βακτηρίου *Pseudomonas fluorescens* Χ κατά φυτοπαθογόνων μυκήτων

Κρεμμύδας Γ., Γεωργακόπουλος Δ.Γ.

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας

16.45-17.15 **Κεντρική ομιλία της ενότητας**

Διοργανισμική μεταφορά μικροβιακών πρωτεϊνών: Μοριακή βιολογία και βιοτεχνολογικές εφαρμογές

Ταμπακάκη Α.

Εργαστήριο Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας, Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

17.15-18.30 **Διάλειμμα-καφές, επίσκεψη Posters**

18.30-19.00 **Επίσημη έναρξη του Συνεδρίου – Χαιρετισμοί**

Προεδρείο: Κυριακίδης Δ.Α., Σκούρας Ζ.

19.00-19.45 **Κεντρική ομιλία**

20 χρόνια μελέτες της RNase P στο μικροβίοσμο

Δραΐνας Δ.

Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πατρών

19.45-20.30 **Κεντρική ομιλία**

Το μιτοχονδριακό DNA (mtDNA) και η πυρηνική ριβοσωμική επανάληψη (rDNA) αποτελούν δύο διαφορετικές εξελικτικές γραμμές οι οποίες συνδυαζόμενες δίνουν άριστα αποτελέσματα στη γενετική διαφοροποίηση, ταξινόμηση και φυλογένεση των Ασκομυκήτων

Τύπας Μ. Α.

Τομέας Γενετικής και Βιοτεχνολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

20.30 **Δεξίωση υποδοχής**

Σάββατο 22-10-2011, Συνεδριακό Κέντρο Κάρολος Παπούλιας

Ενότητα: **Μικροοργανισμοί ως μοντέλα βασικής έρευνας**

Προεδρείο: Σταθόπουλος Κ., Φριλίγγος Ε.

9.30-10.00 **Κεντρική ομιλία της ενότητας**

Οργάνωση πρωτεϊνικών μικροχώρων στην κυτταροπλασματική μεμβράνη μυκήτων και οι πιθανοί βιολογικοί ρόλοι τους: κινάσες και εισοσωμικές πρωτεΐνες στον ασκομύκητα *Aspergillus nidulans*

Σοφianoπούλου Β.
Εργαστήριο Μοριακής Γενετικής Μικροοργανισμών, Ινστιτούτο Βιολογίας, Ε.ΚΕ.Φ.Ε. Δημόκριτος

10.00-10.15 Ολιγομερισμός του μεταφορέα UapA και ο ρόλος του στην ενδοκυτταρική διακίνηση και λειτουργία του στον *Aspergillus nidulans*

Καραχάλιου Μ., Διαλλινάς Γ.

Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Βιολογίας, Αθήνα

10.15-10.30 Ο ρόλος του διαμεμβρανικού τμήματος TM3 στον μεταφορέα ξανθίνης XanQ του *E. coli*

Καρενά Α., Φριλίγγος Ε.

Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων Ιατρική Σχολή

10.30-10.45 Η tRNA συνοδός πρωτεΐνη La (Lupus antigen) από τον μυξομήκητα *Dictyostelium discoideum* έχει κοινά βιοχημικά χαρακτηριστικά με την ομόλογη πρωτεΐνη από τον άνθρωπο

Αποστολίδη Μ., Τουμπέκη Χ., Δραΐνας Δ., Σταθόπουλος Κ.

Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πατρών

10.45-11.00 Χαρακτηρισμός της ριβονουκλεάσης Ρ (RNase P) από το αιθανολοπααραγωγό βακτήριο *Zyotomonas mobilis*
Τουμπέκη Χ.¹, Σταματοπούλου Β.¹, Μπίκου Μ.¹, Βουρεκάς Α.¹, Τσιτλαΐδου Μ.¹, Τζακος Α.Γ.², Αφένδρα Α.-Σ.³, Δραΐνας Κ.², Δραΐνας Δ.¹

¹ Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πατρών

² Τομέας Οργανικής Χημείας και Βιοχημείας, Τμήμα Χημείας

³ Εργαστήριο Γενετικής, Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

11.00-11.15 Μοριακή και βιοχημική ανάλυση της αλληλεπίδρασης δύο μελών της FKBP οικογένειας πρωτεΐνων του *Azotobacter vinelandii* με τη μικρή υπομονάδα της συνθετάσης του καρβάμυλο-φωσφορικού οξέος

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

Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

11.15-11.30 Ανάλυση του κινασώματος των φωσφοϊνοσιτιδίων στα βλεφαριδιωτά *Tetrahymena thermophila* και *Paramecium tetraurelia* παρέχει νέα δεδομένα για την εξέλιξη της σηματοδότησης μέσω των ΡΙ3-κινασών και των ΡΙΡ κινασών
Λεονταρίτης Γ.¹, Γαλανοπούλου Ν.²

¹ Τμήμα Φαρμακολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα

² Εργαστήριο Βιοχημείας, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Αθηνών

11.30-12.00 **Διάλειμμα-καφές, επίσκεψη Posters**

Προεδρείο: Αφένδρα Α.Σ., Τσιάμης Γ

12.00-12.45 **Κεντρική ομιλία**
Modular genetic structure of plasmid pMV158
Espinosa M., del Solar G., Lorenzo-Díaz F., Ruiz-Masó J.A., Fernández López C., López-Aguilar C., Rubio-Lepe T.S.
Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC. Ramiro de Maeztu, Madrid, Spain

Ενότητα: **Γονιδιωματική/Μεταγονιδιωματική**

Προεδρείο: Τσιάμης Γ., Παπαδοπούλου Χ.

12.45-13.15 **Κεντρική ομιλία της ενότητας**
Μεταγωγή σήματος και προσαρμοστικοί μηχανισμοί στα βακτήρια: Το AtoSC σύστημα δύο συστατικών
Κυριακίδης Δ.Α.

Εργαστήριο Βιοχημείας, Τμήμα Χημείας, ΑΠΘ

13.15-13.30 Μελέτη της SOS ρύθμισης στο αιθανολοπααραγωγό βακτήριο *Zyotomonas mobilis*

Σαββάκης Γ., Παππά Κ.Μ.

Τομέας Γενετικής και Βιοτεχνολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών Επιστημών, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

13.30-13.45 Serching for and culturing the unculturables
Moreels D., George I. F., Agathos S. N.

¹ Laboratoire de Génie Biologique, Earth & Life Institute (ELI), Université Catholique de Louvain, Louvain-la-Neuve, Belgium

² Ecologie des Systèmes Aquatiques, Université Libre de Bruxelles, Bruxelles, Belgium

³ Laboratoire de Biologie Marine, Université Libre de Bruxelles, Bruxelles, Belgium

13.45-14.00 Ανάλυση μιτοχονδριακών γονιδιωμάτων: σχεδιασμός και εφαρμογή οικουμενικών εκκινητών ολιγονουκλεοτιδίων στο βασίλειο των μυκήτων

Ντερτιλή Μ., Τύπας Μ. Α., Κουβέλης Β. Ν.

Τομέας Γενετικής και Βιοτεχνολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών

14.00-16.00 **Μεσημεριανή διακοπή, επίσκεψη Posters**

Ενότητα: **Βιοτεχνολογικές εφαρμογές**

Προεδρείο: Παπαμιχαήλ Μ., Χατζηνικολάου Δ.Γ.

16.00-16.15 Επίδραση της ενζυμικής επεξεργασίας στην παραγωγή βιο-υδρογόνου και μεθανίου από το γλυκό σόργο
Αντωνοπούλου Γ.¹, Λυμπεράτος Γ.^{1,2}

¹ ΙΤΕ-ΕΙΧΗΜΥΘ, Πάτρα

² Σχολή Χημικών Μηχανικών, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο

16.15-16.30 Μελέτη της μετατροπής της ακάθαρτης γλυκερόλης σε 1,3-προπανοδιόλη, 2,3-βουτανοδιόλη και αιθανόλη από επιλεγμένα βακτηριακά στελέχη
Μετσοβίτη Μ., Παραμυθιώτης Σ., Δροσινός Ε.Χ., Γαλιώτου-Παναγιώτου Μ., Νυχάς Γ.-Ι., Παπανικολάου Σ.

Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

16.30-16.45 Διερεύνηση της δυνατότητας αξιοποίησης του μύκητα *Raecilomyces variotii* στην παραγωγή αιθανόλης από λιγνινοκυτταρινούχα υποστρώματα με διεργασία ενός σταδίου
Ζέρβα Α., Σταθοπούλου Π.Μ., Κατσίφας Ε.Α., Καραγκούνη Α.Δ. και Χατζηνικολάου Δ.Γ.

Ομάδα Μικροβιολογίας, Τομέας Βοτανικής, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθήνας

16.45-17.00 Βιοσύνθεση λιπιδίων με υψηλή περιεκτικότητα σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα από καλλιέργειες Ζυμομυκήτων σε γλυκερόλη
Μπέλλου Σ., Μουστόγιαννη Α. και Αγγελής Γ.

Εργαστήριο Μικροβιολογίας, Τομέας Γενετικής, Βιολογίας Κυπάρου και Ανάπτυξης, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών

17.00-17.15 Κινητική μελέτη της παραγωγής βιομάζας, κυτταρικών λιπιδίων και πολυσακχαριτών των εδωδιμων μυκήτων *Pleurotus pulmonarius* και *Flammulina velutipes*

Διαμαντοπούλου Π.¹, Παπανικολάου Σ.², Κωμαΐτης Μ.², Αγγελής Γ.³, Φιλίππου Α.¹

¹Εθνικό Ίδρυμα Αγροτικής Έρευνας, Ι.Τ.Ε.Γ.Ε.Π., Εργαστήριο Εδωδιμων Μυκήτων, Λυκόβρυση Αττικής, ²Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, ³Εργαστήριο Μικροβιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Τομέας Γενετικής Βιολογίας, κυττάρου και Ανάπτυξης, Πανεπιστήμιο Πατρών

17.15-17.45 Διάλειμμα-καφέ

Προεδρείο: Αγγελής Γ., Βαγενάς Δ.

17.45-18.15 Κεντρική ομιλία της ενότητας

Αλόφυτα — Μια νέα τάση στην φυτοαποκατάσταση περιβάλλοντος

Καλογεράκης Ν., Μανουσάκη Ε.

Τμήμα Μηχανικών Περιβάλλοντος, Πολυτεχνείο Κρήτης, Χανιά

18.15-18.30 Αποτελεσματικότητα διαφορετικών τύπων θρεπτικών στη βιοεξυίανση (landfarming) αμμώδους ακτής ρυπασμένης με πετρέλαιο

Νικολοπούλου, Μ.¹, Πασαδάκης Ν.², Καλογεράκης Ν.¹

¹Τμήμα Μηχανικών Περιβάλλοντος, Πολυτεχνείο Κρήτης, Χανιά

²Τμήμα Μηχανικών Ορυκτών Πόρων, Πολυτεχνείο Κρήτης, Χανιά

18.30-18.45 Διεγερτική δράση ενός νέου σκευάσματος πολυφαινόλων από υγρά απόβλητα ελαιουργείου στην ανάπτυξη και την παραγωγή γαλακτικού οξέος από γαλακτικά βακτήρια

Γιαβάσης Ι.¹, Τσαντέ Ε.¹, Γκουτσιδής Π.², Παπαθεοδώρου Κ.³, Πετρωτός Κ.²

¹Εργαστήριο Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας Τροφίμων, Τμήμα Τεχνολογίας Τροφίμων ΤΕΙ Λάρισας, Παράρτημα Καρδίτσας

²Εργαστήριο Γεωργικής Μηχανικής-Μηχανικής Τροφίμων, Τμήμα Μηχανικής Βιοσυστημάτων ΤΕΙ Λάρισας

³SHM-Hellas Dairy Products, Βελεστίνο, Βόλος

18.45-19.00 Κατασκευή βιοφωταυγών μικροβιακών βιοαισθητήρων για παρακολούθηση ενζυματικής επεξεργασίας συστατικών των τροφίμων

Lukasiak J.¹, Γεωργίου Κ. Α.², Olsen K.³, Γεωργακόπουλος Δ.Γ.¹

¹Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας

²Γενικό Τμήμα, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

³Center for Advanced Food Studies, University of Copenhagen, Δανία

19.00-20.30 Στρογγυλή τράπεζα – Βιοτεχνολογικές εφαρμογές Συντονιστής: Βαγενάς Δ.

Εισηγητές: Αγγελής Γ., Βαγενάς Δ., Ζερβάκης Γ., Καλογεράκης Ν., Καρπούζας Δ., Καταπόδης Π., Κούκκου Α.Ε., Ντούγιας Σ., Παπανικολάου Σ., Σταμάτης Χ.

Κυριακή 23-10-2011, Συνεδριακό Κέντρο Κάρολος Παπούλιας

Ενότητα: Μοριακή Μικροβιακή Οικολογία

Προεδρείο: Καραγιάννη Η., Μπούρτζης Κ.

9.30-10.00 Κεντρική ομιλία της ενότητας

Η επίδραση των γεωργικών φαρμάκων στην ποικιλότητα και λειτουργία των μικροοργανισμών του εδάφους: Αλήθειες, ψέματα και θέματα κανονισμών έγκρισης

Καρπούζας Δ.Γ.¹, Ρουσίδου Κ.¹, Παπαδοπούλου Ε.², Ομήρου Μ.³, Υψηλάντης Ι.⁴, Παπαδοπούλου Κ.Κ.¹, Οικαλιώτης Κ.⁵, Μενκίσσογλου-Σπυρούδη Ο.², Singh B.K.⁶, Puglisi E.⁷

¹Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Λάρισα

²ΑΠΘ, Σχολή Γεωπονίας, Εργαστήριο Γεωργικών Φαρμάκων, Θεσ/νίκη

³Ινστιτούτο Γεωργικών Ερευνών Κύπρου, Λευκωσία

⁴ΑΠΘ, Σχολή Γεωπονίας, Εργαστήριο Εδαφολογίας, Θεσ/νίκη

⁵Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Αξιοποίησης Φυσικών Πόρων και Γεωργικής Μηχανικής, Εργαστήριο Εδαφολογίας και Γεωργικής Χημείας, Αθήνα

⁶Centre for Plants and Environment, University of Western Sydney, Australia

⁷Istituto di Microbiologia, Università Cattolica del Sacro Cuore, Piacenza, Italy

10.00-10.15 Ανθίσεις νερού και επιπτώσεις στην οικολογική ποιότητα νερού της Λίμνης Παμβώτιδας

Κατσιάπη Μ.¹, Στεφανίδου Ν.², Καραγιάννη Η.², Κορμάς Κ.Α.³, Μουστάκα Μ.¹

¹Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

²Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών & Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

³Τμήμα Ιχθυολογίας & Υδάτινου Περιβάλλοντος, Γεωπονική Σχολή, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Βόλος

- 10.15-10.30** Μοριακή επιβεβαίωση του είδους *Planktothix rubescens* ως αιτίου έντονης ηπατοτοξικής έκρηξης στη λίμνη Ζηρού
Βαρέλη Κ.¹, Μπριασούλης Ε.², Πηλίδης Γ.¹, Σαΐνης Ι.³
¹ Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών
² Ιατρική Σχολή
³ Διεπιστημονικό Εργαστήριο Μοριακής Ογκολογίας, Βιοτράπεζα Καρκίνου, Παν/μιο Ιωαννίνων
- 10.30-10.45** Χαρακτηρισμός με μοριακές τεχνικές γαλακτικών βακτηρίων που απομονώθηκαν από ελληνικές ζυμούμενες επιτραπέζιες ελιές
Δουλιγέρη Α.¹, Πραματευτάκη Π.², Αργύρη Α.², Μπλάνα Β.¹, Πανάγου Ε.¹, Τάσσου Χ.²
¹ Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Επιστήμης & Τεχνολογίας Τροφίμων, Εργαστήριο Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας Τροφίμων, Αθήνα
² Εθνικό Ίδρυμα Αγροτικής Έρευνας, Ινστιτούτο Τεχνολογίας Γεωργικών Προϊόντων, Λυκόβρυση, Αττική
- 10.45-11.00** Μοριακός χαρακτηρισμός στελεχών μυκήτων απομονωμένων από σύστημα ενεργού υλός περιοδικής τροφοδοσίας και εναλλασσόμενου αερισμού
Κατζηκαμάρη Μ., Μελίδης Π., Ντούγιας Σ.
Εργαστήριο Διαχείρισης και Τεχνολογίας Υγρών Αποβλήτων, Τμήμα Μηχανικών Περιβάλλοντος, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης, Ξάνθη
- 11.00-11.15** Φυσιολογία και μοριακή ποικιλομορφία ομάδων βλαστητικής συμβατότητας του *Verticillium dahliae*
Παπαϊωάννου Ι.Α., Τύπας Μ.Α.
Τομέας Γενετικής & Βιοτεχνολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
- 11.15-12.00** Λήξη εργασιών συνεδρίου – Απονομή βραβείων
- 12.00** Επίσκεψη στο οινοποιείο ΓΚΛΙΝΑΒΟΣ στη Ζίτσα και ελαφρύ γεύμα



4^ο Συνέδριο



Της Επιστημονικής Εταιρείας
Μικροβιόκοσμος: Αόρατη Πηγή Ζωής



Εις μνήμην του Καθηγητή Κώστα Δραΐνα

Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Συνεδριακό Κέντρο «Κάρολος Παπούλιας»

21-23 Οκτωβρίου 2011

Βιβλίο Περιλήψεων

Υπό την αιγίδα του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Διοικητικό Συμβούλιο 2011-2012

Πρόεδρος:

Σκούρας Ζαχαρίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Αντιπρόεδρος:

Δραΐνας Κωνσταντίνος, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Γεν. Γραμματέας:

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

Ταμίας:

Κορμάς Κωνσταντίνος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Μέλη:

Κυρπίδης Νικόλαος, DOE-JGI, USA

Μπούρτζης Κωνσταντίνος, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Πολυμενάκου Παρασκευή, Ελληνικό Κέντρο Θαλασσίων Ερευνών

Επιστημονική & Οργανωτική Επιτροπή

Αννα-Ειρήνη Κούκκου (Πρόεδρος)
Ευστάθιος Φριλίγγος (Αντιπρόεδρος)
Άγγελος Περισυνάκης (Ταμίας)
Αμαλία -Σοφία Αφένδρα
Δημήτριος Βαγενάς
Έρα Καραγιάννη
Πέτρος Καταπόδης
Κωνσταντίνος Μπούρτζης
Χρυσάνθη Παπαδοπούλου
Εμμανουήλ Παπαμιχαήλ
Μαρία Παραπούλη
Χαράλαμπος Σταμάτης
Γεώργιος Τσιάμης
Ευστάθιος Χατζηλουκάς

Γραμματειακή Υποστήριξη

Ελπινίκη Βανδέρα
Αναστάσιος Βασιλειάδης
Αικατερίνη Γεωργοπούλου
Αλέξανδρος Δραΐνας
Αικατερίνη Καρενά-Ευσταθίου
Ελένη Κουρτίδου
Μαρία Μπότου
Αφροδίτη Σφακιανάκη
Παναγιώτα Τσαπουρνιώτη

Προλογικό σημείωμα

Οι μικροοργανισμοί αντιπροσωπεύουν το μεγαλύτερο κομμάτι της ζωής στη Γη και ταυτόχρονα αποτελούν μια αόρατη πηγή ζωής. Πρόκειται για τις πρώτες μορφές κυτταρικής ζωής στον πλανήτη μας, που παρουσιάζουν μια ανεκτίμητη πηγή οικολογικής, βιοχημικής και φυλογενετικής ποικιλομορφίας. Η σπουδαιότητά τους για το περιβάλλον και το κλίμα, τη γεωργία και τα τρόφιμα, την ενέργεια, τη βιοτεχνολογία και την υγεία γίνεται συνεχώς και πιο εμφανής σηματοδοτώντας μια αλματώδη πρόοδο σε όλο το φάσμα της Μικροβιολογίας.

Ιδιαίτερη πρόοδος έχει επιτευχθεί τα τελευταία χρόνια στο χώρο της Μικροβιακής Οικολογίας η οποία βασίζεται κυρίως στα τεχνολογικά άλματα που έχουν λάβει χώρα στους τομείς της Γονιδιωματικής και της Μεταγονιδιωματικής. Η μελέτη της δομής, της ποικιλότητας και της λειτουργίας των μικροβιακών κοινοτήτων, καθώς και Μικροοργανισμών-Μοντέλων, συμβάλλει τα μέγιστα στην κατανόηση της εξέλιξης και της βιωσιμότητας της ζωής στη Γη. Ταυτόχρονα, αποτελεί μια αστείρευτη πηγή λειτουργιών και προϊόντων με σημαντικές Βιοτεχνολογικές Εφαρμογές που θα σημάνει και τη μετάβασή μας στην νέα εποχή της ΒιοΟικονομίας. Το 4ο Συνέδριο της Επιστημονικής Εταιρείας «ΜΙΚΡΟΒΙΟΚΟΣΜΟΣ» εξετάζει όλο το φάσμα των πρόσφατων επιστημονικών εξελίξεων που έχουν επιτευχθεί στους παραπάνω τομείς.

Κύριος εμπνευστής της διοργάνωσης του 4^{ου} Συνεδρίου στο Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων υπήρξε ο Καθηγητής Κωνσταντίνος Δραΐνας, ένα από τα ιδρυτικά μέλη της Εταιρείας «ΜΙΚΡΟΒΙΟΚΟΣΜΟΣ». Διαρκές όραμά του ήταν η ανάπτυξη των επιστημονικών στόχων του Μικροβιόκοσμου σε άμεση συνάρτηση με το επιδιωκόμενο κοινωνικό όφελος. Παρά την απρόσμενη κοπή του νήματος της ζωής του στις 5 Ιουλίου 2011, το όραμα αυτό δεν παύει να σηματοδοτεί τη δραστηριότητα της Ελληνικής επιστημονικής κοινότητας. Η αφιέρωση του 4^{ου} συνεδρίου στη μνήμη του αποτελεί την ελάχιστη τιμή στο δάσκαλο, ερευνητή και πολύπλευρα δημιουργικό στη κοινωνική του πρακτική Καθηγητή Κωσταντίνο Δραΐνα.

Η Οργανωτική Επιτροπή

ΠΡΟΣΚΕΚΛΗΜΕΝΟΙ ΟΜΙΛΗΤΕΣ

INVITED SPEAKERS

Modular genetic structure of plasmid pMV158

Espinosa M., del Solar G., Lorenzo-Díaz F., Ruiz-Masó J.A., Fernández López C., López-Aguilar C., and Rubio-Lepe T.S.

Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC. Ramiro de Maeztu, 9. E-28040 Madrid, Spain

The streptococcal promiscuous plasmid pMV158 has been studied in our laboratory for more than 20 years. The plasmid is constructed as a set of genetic modules that include various genes and loci devoted to its replication and control of replication, to transfer and also carries a tetracycline-resistance determinant. The positive element for replication is the initiator RepB protein, which is a hexamer of identical subunits and that may constitute a link between initiators of replication proteins from plasmids and bacteriophages and from those of some viruses. The replication control elements are devoted to keep a fixed plasmid copy number within a given host. These elements are two, which act at different levels: i) transcriptional repression, mediated by protein CopG which controls its own synthesis and that of the RepB initiator, and ii) post-translational control, mediated by a small antisense RNA that hybridizes with the ribosome binding site of RepB mRNA and prevents its translation. An important plasmid cassette is involved in plasmid mobilization between different hosts. This module is composed by the relaxase protein MobM and its cognate origin of plasmid transfer. Two more loci are constituted by lagging strand origins needed for the plasmid replication and its transfer.

20 χρόνια μελέτες της RNase P στο μικροβίοκοσμο**Δραΐνας Δ.**

Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πατρών

Η ριβονουκλεάση P (RNase P) είναι ένα σημαντικότατο ριβοένζυμο, υπεύθυνο για την ωρίμανση του 5' άκρου των πρόδρομων μορίων tRNA. Ανακαλύφθηκε στα μέσα της δεκαετίας του '80 και χαρακτηρίστηκε αρχικά στο *Escherichia coli*, όπου παρουσιάζει και την απλούστερη μορφή του ως ένα ολοένζυμο που αποτελείται από μια πρωτεϊνική υπομονάδα και μια υπομονάδα RNA υπεύθυνη για την κατάλυση. Από την εποχή εκείνη μέχρι σήμερα, το ένζυμο αυτό έχει χαρακτηριστεί σε ένα πλήθος μικροοργανισμών από όλα τα εξελικτικά φύλα και όλα τα φυλογενετικά βασίλεια (βακτήρια, αρχαία, ευκαρυώτες). Η συμβολή της ποικιλότητας του μικροβίοκοσμου στην μελέτη του συγκεκριμένου ενζύμου, καθώς και η διαθεσιμότητα πληθώρας μικροβιακών γονιδιωμάτων, έχουν αναδείξει την ιδιαιτερότητα που παρουσιάζει η σύστασή του αλλά και την ενζυμική του δραστηριότητα, η οποία εξαρτάται σε μέγιστο βαθμό από την φυσιολογία του μικροοργανισμού στον οποίο μελετάται. Τα τελευταία 20 χρόνια έχουμε επικεντρωθεί στην μελέτη του ενζύμου αυτού στο μικροοργανισμό *Dictyostelium discoideum*, ο οποίος είναι ένας μξομύκτης ερευνητικό μοντέλο διαφοροποίησης, καθώς και σε πρότυπα μικροβιακά συστήματα όπως το *Escherichia coli* και το *Zymomonas mobilis*. Η παρούσα ομιλία καλύπτει όλα τα μέχρι τώρα αποτελέσματα σχετικά με την σύσταση, δομή και λειτουργικότητα της ριβονουκλεάσης P στους οργανισμούς αυτούς, καθώς και τις εφαρμογές της τόσο ως εργαλείο απενεργοποίησης γονιδίων, όσο και ως μοριακό στόχο για την ανάπτυξη καινοτόμων φαρμακευτικών παραγόντων, αναδεικνύοντας τον εξέχοντα ρόλο του μικροβίοκοσμου ως ένα πολύτιμο ερευνητικό εργαλείο.

20 years studies of RNase P in the world of microorganisms**Drainas D.**

Department of Biochemistry School of Medicine, University of Patras

Ribonuclease P (RNase P) is an important ribozyme, responsible for the maturation of the 5' end of precursor tRNA molecules. It has been discovered in the mid 80s and was characterized initially in *Escherichia coli*, which presents the simplest form as a holoenzyme consisting of a protein subunit and an RNA subunit responsible for catalysis. From that time until now, this enzyme has been characterized in a number of organisms of all evolutionary sexes and all phylogenetic kingdoms (bacteria, archaea, eukaryotes). The contribution to the diversity of the world of microorganisms in the study of this enzyme and the availability of large number of microbial genomes, have highlighted the particularities of its composition and its enzymatic activity, which depends to a degree on the physiology of the microorganism being studied in. The last 20 years we have focused on the study of this enzyme in the microorganism *Dictyostelium discoideum*, which is a slime mold research model of differentiation, and as well as prototype microbial systems such as *Escherichia coli* and *Zymomonas mobilis*. This lecture covers all the results so far on the composition, structure and function of ribonuclease P in these organisms and its applications both as a tool in gene inactivation, and as a molecular target for the development of novel pharmaceutical agents, highlighting the prominent role of the world of microorganisms as a valuable research tool.

Το μιτοχονδριακό DNA (mtDNA) και η πυρηνική ριβοσωμική επανάληψη (rDNA) αποτελούν δύο διαφορετικές εξελικτικές γραμμές οι οποίες συνδυαζόμενες δίνουν άριστα αποτελέσματα στη γενετική διαφοροποίηση, ταξινόμηση και φυλογένεση των Ασκομυκήτων.

Τύπας Μ.Α.

Τομέας Γενετικής και Βιοτεχνολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

MtDNA and rDNA: Two different evolutionary lines combined for genetic differentiation, taxonomy and phylogeny in Ascomycetes

Τύπας Μ.Α.

Department of Genetics and Biotechnology, Faculty of Biology, National and Kapodistrian University of Athens

**ΠΡΟΣΚΕΚΛΗΜΕΝΟΙ ΟΜΙΛΗΤΕΣ
ΑΝΑ ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΕΝΟΤΗΤΑ**

**INVITED SPEAKERS
PER THEMATIC SESSION**

1. ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΗ & ΜΕΤΑΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΗ

Μεταγωγή σήματος και προσαρμοστικοί μηχανισμοί στα βακτήρια: Το AtoSC σύστημα δύο συστατικών**Κυριακίδης Δ.Α.***Εργαστήριο Βιοχημείας, Τμήμα Χημείας, ΑΠΘ, Θεσσαλονίκη*

Ο κύριος μηχανισμός της μετάδοσης σήματος, διαδεδομένος ιδιαίτερα στα βακτήρια, είναι η μετάδοση μέσω των συστημάτων δύο συστατικών και η φωσφομεταβίβαση, διαδικασίες που έχουν υιοθετήσει τη φωσφορυλίωση ως τον τρόπο μετάδοσης της πληροφορίας. Τα συστήματα μετάδοσης σήματος δύο συστατικών αποτελούν κεντρικά σημεία της κυτταρικής φυσιολογίας, ως αποτέλεσμα διαφοροποιήσεων του περιβάλλοντος. Το σύστημα AtoSC συμμετέχει σε πολλές κυτταρικές λειτουργίες, όπως είναι η βιοσύνθεση του πολυ-3-υδροξυβουτυρικού οξέος, η χημειώταξη κλπ. Ανάλυση της έκφρασης του γονιδιώματος της *E. coli* δείχνει ότι το AtoSC σύστημα δύο συστατικών συμμετέχει σε διάφορες κυτταρικές λειτουργίες. Ο ενεργοποιημένος λειτουργικός παράγοντας AtoC παίζει ρυθμιστικό ρόλο με το να συνδέεται στη περιοχή του προαγωγέα του *atoDAEB* ως, *cis*-ρυθμιστής του. Χρησιμοποιώντας υπολογιστική ανάλυση βρήκαμε επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες βάσεων *in silico* των σημείων σύνδεσης του AtoC στο γονιδίωμα της *E. coli* με Hypergeometric δοκιμές για Gene Ontology Term Overrepresentation. Η μελέτη αυτή έδειξε την πολυπλοκότητα της ρύθμισης της έκφρασης γονιδίων στα βακτήρια. Οι περαιτέρω βιοχημικές μελέτες σε μοριακό επίπεδο δείχνουν νέες λειτουργικότητες του AtoSC TCS που συμμετέχει σε μεταγωγή σήματος και σε μηχανισμούς συμβίωσης και παθογένειας των βακτηρίων.

1. GENOMICS / METAGENOMICS

Signal transduction and adaptation mechanisms in bacteria: The AtoSC two component system**Kyriakidis D.A.***Laboratory of Biochemistry, Department of Chemistry, Aristotle University of Thessaloniki, Thessaloniki, GR-54124, Greece*

Bacterial proliferation and adaptation are governed by sophisticated signal transduction networks, including the versatile two-component systems (TCSs) that comprise sensor histidine kinases and response regulators and rely on phosphotransfer mechanisms to exert their modulatory function. The AtoSC TCS regulates fundamental cellular processes such as short-chain fatty acid metabolism, poly-(R)-3-hydroxybutyrate (cPHB) biosynthesis and chemotaxis in *Escherichia coli*. Transcriptome analyses indicated the involvement of the *E. coli* AtoSC two component system in various cellular activities. Thus, the activated response regulator AtoC may as well perform a cross-regulatory role, although we have recently reported a palindromic repeat within the *atoDAEB* promoter as the single, *cis*-regulatory AtoC binding site. We used a computational approach to address the presence of yet unidentified AtoC binding targets. The obtained motifs were used for subsequent *in silico E. coli* genome-wide screening, in order to detect matching putative AtoC binding sites. Towards correlating these motifs to gene functions, the list of qualified hits underwent a Hypergeometric Test for Gene Ontology Term overrepresentation. This study aims to endorse the significance of computational genome-wide approaches for the elucidation of complex patterns of bacterial cell regulation when experimental data are scarce, while tracing a number of putative AtoC targets attributes a pleiotropic role to this response regulator. The biochemical and molecular exploration of new cellular functions in which AtoSC TCS participates to the signalling mechanisms on the bacteria symbiotic and pathogenic behavior.

2. ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΟΙΚΟΛΟΓΙΑ

Η επίδραση των γεωργικών φαρμάκων στην ποικιλότητα και λειτουργία των μικροοργανισμών του εδάφους: Αλήθειες, ψέματα και θέματα κανονισμών έγκρισης

Καρπούζας Δ.Γ.¹, Ρουσίδου Κ.¹, Παπαδοπούλου Ε.², Ομήρου Μ.³, Υψηλάντης Ι.⁴, Παπαδοπούλου Κ.Κ.¹, Ουγαλιώτης Κ.⁵, Μενκίσσογλου-Σπυρούδη Ο.², Singh B.K.⁶, Puglisi E.⁷

¹Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Λάρισα, ²ΑΠΘ, Σχολή Γεωπονίας, Εργαστήριο Γεωργικών Φαρμάκων, Θεσ/νίκη, ³Ινστιτούτο Γεωργικών Ερευνών Κύπρου, Λευκωσία, ⁴ΑΠΘ, Σχολή Γεωπονίας, Εργαστήριο Εδαφολογίας, Θεσ/νίκη, ⁵Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Αξιοποίησης Φυτικών Πόρων και Γεωργικής Μηχανικής, Εργαστήριο Εδαφολογίας και Γεωργικής Χημείας, Αθήνα, ⁶Centre for Plants and Environment, University of Western Sydney, Australia, ⁷Istituto di Microbiologia, Università Cattolica del Sacro Cuore, Piacenza, Italy

Τα γεωργικά φάρμακα (γφ) αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι της σύγχρονης γεωργίας. Η τοξικότητα τους έναντι των μικροοργανισμών του εδάφους θα πρέπει να αξιολογείται ενδελεχώς εάν αναλογιστούμε τον βασικότατο ρόλο των τελευταίων στην λειτουργία του οικοσυστήματος. Σύμφωνα με την κοινοτική νομοθεσία, η τοξικότητα των γφ στους μικροοργανισμούς του εδάφους εκτιμάται με βάση τα τεστ ανοργανοποίησης C και N, τα οποία παρέχουν μια μόνο προκαταρκτική εκτίμηση της τοξικότητας. Η φύση των γ.φ. και οι συγκεντρώσεις τους στο περιβάλλον επηρεάζουν σε καθοριστικό βαθμό την τοξικότητα στους μικροοργανισμούς: Τα μυκητοκτόνα εμφανίζουν συνήθως υψηλότερη τοξικότητα έναντι των μικροοργανισμών του εδάφους, ενώ η εφαρμογή γφ στα πλαίσια της αγροτικής πρακτικής οδηγεί σε χαμηλά επίπεδα συγκεντρώσεων στο έδαφος. Μέχρι σήμερα, οι περισσότερες μελέτες έχουν εστιάσει στην αξιολόγηση των επιδράσεων συνθετικών γφ στους μικροοργανισμούς του εδάφους χρησιμοποιώντας επίπεδα συγκεντρώσεων κατά πολύ υψηλότερα των συνιστώμενων δόσεων, ενώ ελάχιστα είναι γνωστά για την τοξικότητα των βιολογικών γφ στους μικροοργανισμούς του εδάφους. Η επίδραση των γφ στην μικροβιακή κοινότητα του εδάφους έχει μελετηθεί στο εργαστήριο μας χρησιμοποιώντας εύρος τεχνικών όπως: α) βιοχημικές μετρήσεις που αναδεικνύουν πιθανές επιδράσεις σε επίπεδο λειτουργίας, β) ανεξάρτητες-καλλιέργειας μοριακές και βιοχημικές τεχνικές που αναδεικνύουν επιδράσεις στην ποικιλότητα των μικροοργανισμών (PLFA, DGGE, TRFLP), γ) μέτρηση της αποδόμησης των γφ που παρέχει πληροφορίες για την μείωση των επιπέδων συγκεντρώσεων των γφ στο έδαφος με τον χρόνο. Η χρήση μοριακών εργαλείων που βασίζονται σε RNA αντί DNA αποδίδουν με μεγαλύτερη ευκρίνεια την επίδραση των γφ στην μικροβιακή κοινότητα. Μοριακά εργαλεία υψηλής ανάλυσης όπως SIP και -ομική αναμένεται να βοηθήσουν σημαντικά στην διερεύνηση της τοξικότητας των γφ στους εδαφικούς μικροοργανισμούς. Οι μελέτες μας δείχνουν ότι η

εφαρμογή γφ στις συνιστώμενες δόσεις δεν οδηγεί σε αρνητικές επιδράσεις σε μικροοργανισμούς μη-στόχους. Συνολικά απαιτείται αναθεώρηση του πλαισίου αξιολόγησης της τοξικότητας των γφ στους εδαφικούς μικροοργανισμούς ώστε να περιλαμβάνει την εφαρμογή νέων μεθοδολογιών σε ρεαλιστικά πειραματικά πρωτόκολλα.

2. MOLECULAR MICROBIAL ECOLOGY

Pesticide effects on the structure and function of non-target soil microbes: Truths, lies and regulatory issues

Karpouzias D.G.¹, Rousidou C.¹, Papadopoulou E.², Omirou M.³, Ipsilantis I.⁴, Papadopoulou K.K.¹, Ehaliotis C.⁵, Menkissoglou-Spirodi U.², Singh B.K.⁶, Puglisi E.⁷

¹University of Thessaly, Department of Biochemistry and Biotechnology, Larissa, ²Aristotle University of Thessaloniki, School of Agriculture, Laboratory of Pesticide Science, Thessaloniki, ³Agricultural Research Institute of Cyprus, Nicosia, Cyprus ⁴Aristotle University of Thessaloniki, School of Agriculture, Laboratory of Soil Science, Thessaloniki, ⁵Agricultural University of Athens, Department of Natural Resources and Agricultural Engineering, Laboratory of Soils and Agricultural Chemistry, Athens, ⁶Centre for Plants and Environment, University of Western Sydney, Australia, ⁷Istituto di Microbiologia, Università Cattolica del Sacro Cuore, Piacenza, Italy

Pesticides constitute an integral part of conventional farming. Considering the key role of soil microbes on ecosystem functioning, assessing the effects of pesticides on them is of prime importance. EU legislation regarding pesticide soil microbial toxicity relies on simple C and N mineralization tests which do not provide a reliable toxicity assessment. Pesticides nature and their concentrations in the environment are two factors which affect their soil microbial toxicity: Fungicides usually exhibit a more prominent effect, while pesticide agricultural uses result in relatively low soil exposure rates. So far, studies have focused on the impact of synthetic pesticides onto soil microbes at artificially high rates, while little is known regarding the soil ecotoxicity of biological pesticides. We have studied the impact of biological vs synthetic pesticides at realistic application rates using a multidisciplinary approach including i) biochemical tools to determine functional effects ii) culture-independent tools to determine effects on the diversity of soil microbes (PLFAs, DGGE, TRFLP) and iii) Pesticide dissipation measurements which reveal the level of pesticide residues in soil on a temporal basis. RNA-based methods allow the identification of effects which are not otherwise visible. Higher resolution molecular tools like SIP and -omics will provide insights on pesticide soil microbial toxicity. Overall, pesticides, when used at recommended doses, are unlikely to have a persistent effect on soil microbes. Based on the current knowledge, a new regulatory framework including the use of new tools is needed for a realistic estimation of the impact of pesticides on non-target soil microbes.

3. ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

Αλόφυτα — Μια νέα τάση στην φυτοαποκατάσταση περιβάλλοντος

Καλογεράκης Ν. και Μανουσάκη Ε.*Τμήμα Μηχανικών Περιβάλλοντος, Πολυτεχνείο Κρήτης, Χανιά*

Τα αλόφυτα είναι εξαιρετικού ενδιαφέροντος στην φυτοαποκατάσταση περιβάλλοντος λόγω της ικανότητας των να μεγαλώνουν στην φύση υπό αντίξοες περιβαλλοντικές συνθήκες που χαρακτηρίζονται από την υψηλή συγκέντρωση τοξικών ιόντων (κυρίως Na^+ και Cl^-). Μια σειρά ερευνητικών εργασιών παρουσιάζει την δυνατότητα των φυτών αυτών να ανέχονται διαφορετικές περιβαλλοντικές πιέσεις συμπεριλαμβανομένης της παρουσίας βαρέων μετάλλων. Οι φυσιολογικοί μηχανισμοί υπεύθυνοι για την ανοχή στο αλάτι θεωρούνται ότι είναι οι ίδιοι που δίνουν την δυνατότητα ανοχής βαρέων μετάλλων στην ριζόσφαιρα. Μερικά αλόφυτα μπορούν και συσσωρεύουν αλάτι στους ιστούς. Επομένως, είναι λογικό να θεωρηθεί ότι τα αλόφυτα εκ φύσεως είναι σε καλύτερη θέση να αντιμετωπίσουν αντίξοες περιβαλλοντικές συνθήκες, συμπεριλαμβανομένων των βαρέων μετάλλων σε σχέση με τα συνήθη καλλιεργούμενα φυτά που χρησιμοποιούνται σε εφαρμογές φυτοαποκατάστασης. Συνεπώς τα αλόφυτα είναι ιδανικά φυτά για φυτοεκχύλιση και φυτοσταθεροποίηση βαρέων μετάλλων σε ρυπασμένα εδάφη, και ιδιαίτερα σε υποβαθμισμένα εδάφη υψηλής αλατότητας.

Μελέτες σε αλόφυτα στο εργαστήριο μας που εκκρίνουν την περίσσεια ιόντων Na^+ και Cl^- που έχουν προσλάβει, έχουν δείξει ότι η έκκριση δεν είναι μόνο για τα ιόντα αυτά αλλά και για πολλά άλλα τοξικά μέταλλα όπως κάδμιο, ψευδάργυρος, μόλυβδος ή χαλκός, τα οποία συσσωρεύονται εντός του φυτού και εν συνεχεία εκκρίνονται από αδένες στην επιφάνεια των φύλλων. Πρόκειται για μία «νέα» διεργασία φυτοαποκατάστασης την οποία έχουμε ονομάσει «φυτο-έκκριση». Τα αλόφυτα έχουν επίσης προταθεί για την αποκατάσταση υποβαθμισμένων εδαφών υψηλής αλατότητας με διαφορετικούς μηχανισμούς απομάκρυνσης των ιόντων Na^+ και Cl^- . Τέλος θα παρουσιαστεί η τρέχουσα έρευνα που διεξάγεται στο Πολυτεχνείο Κρήτης με την χρήση αλοφύτων η οποία καλύπτει διαφορετικές εφαρμογές όπως απομάκρυνση χρωμίου (VI^+) από τον ποταμό Ασωπό, την επεξεργασία αποβλήτων ελαιολιπιδίων, την βιοδιάσπαση στην ριζόσφαιρα ουσιών προτεραιότητας, την ανάπτυξη τεχνητών υγροβιότοπων, κ.α.

Λέξεις-κλειδιά: Αλόφυτα, φυτοεκχύλιση, ριζοδιάσπαση ρύπων

3. BIOTECHNOLOGICAL APPLICATIONS

Halophytes — An emerging trend in phytoremediation

Kalogerakis N. and Manousaki E.*Department of Environmental Engineering, Technical University of Crete, Chania, Greece,*

Halophytic plants are of special interest because these plants are naturally present in environments characterized by an excess of toxic ions, mainly sodium and chloride. Several studies have revealed that these plants may also tolerate other stresses including heavy metals based on the findings that tolerance to salt and to heavy metals may, at least partly, rely on common physiological mechanisms. In addition, it has been shown that salt-tolerant plants may also be able to accumulate metals. Therefore, halophytes have been suggested to be naturally better adapted to cope with environmental stresses, including heavy metals compared to salt-sensitive crop plants commonly chosen for phytoextraction purposes. Thus, potentially halophytes are ideal candidates for phytoextraction or phytostabilization of heavy metal polluted soils and particularly of heavy metal polluted soils affected by salinity. Some halophytes use excretion processes in order to remove the excess of salt ions from their sensitive tissues and in some cases these glandular structures are not always specific to Na^+ and Cl^- and other toxic elements such as cadmium, zinc, lead, or copper are accumulated and excreted by salt glands or trichomes on the surface of the leaves—a novel phytoremediation process called “phytoexcretion.” Moreover, the use of halophytes has also been proposed for soil desalination through salt accumulation in the plant tissue or dissolution of soil calcite in the rhizosphere to provide Ca^{2+} that can be exchanged with Na^+ at cation exchange sites. Several specific applications currently under investigation at the Technical University of Crete will be presented.

Keywords: Halophytes, phytoextraction, rhizodegradation of contaminants

4. ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΕΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ

Διοργανισμική μεταφορά μικροβιακών πρωτεϊνών: Μοριακή βιολογία και βιοτεχνολογικές εφαρμογές**Ταμπακάκη Α.Π.***Εργαστήριο Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας, Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, e-mail: tampakaki@aua.gr*

Οι αλληλεπιδράσεις μικροοργανισμών-ξενιστών είναι εξαιρετικά πολύπλοκες και αμοιβαίες αλληλεπιδράσεις πραγματοποιούνται σε κυτταρικό, ιστοειδικό, οργανισμικό και πληθυσμιακό επίπεδο. Ένα μικρό μόνο μέρος αυτών των αλληλεπιδράσεων οδηγεί σε επιτυχή εκδήλωση ασθένειας, καθώς η πλειονότητα των φυτικών ειδών είναι ανθεκτική στην προσβολή από όλες τις απομονώσεις ενός μικροβιακού είδους. Η έκβαση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ μικροβιακών παθογόνων και φυτών εξαρτάται από την αποτελεσματικότητα των συστημάτων επιτήρησης των φυτών. Διαφορετικά παθογόνα έχουν υιοθετήσει διάφορες στρατηγικές για να παρακάμψουν τις αποκρίσεις άμυνας των φυτών. Μια κοινή στρατηγική παθογένειας στα περισσότερα μικροβιακά φυτοπαθογόνα αποτελεί η διοργανισμική μεταφορά πρωτεϊνών. Στα αρνητικά κατά Gram βακτηριακά φυτοπαθογόνα, εξειδικευμένα εκκριτικά συστήματα (Τύπου III, IV και VI) μεταφέρουν πρωτεΐνες στο εσωτερικό των φυτικών κυττάρων. Οι πρωτεΐνες αυτές ονομάζονται “τελεστές” και η λειτουργία τους είναι ο έλεγχος της εγγενούς άμυνας των φυτών. Η πρόοδος στην κατανόηση της λειτουργίας των τελεστών και των φυτικών κυτταρικών στόχων τους έχει οδηγήσει σε ένα ενοποιημένο μοντέλο που περιγράφει τις αλληλεπιδράσεις των (ημι)βιότροφων παθογόνων με τα φυτά. Η γονιδιωματική έχει διευκολύνει σημαντικά την ταυτοποίηση πολυάριθμων γονιδίων που κωδικοποιούν τελεστές από τα γονιδιώματα παθογόνων και συμβιωτικών βακτηρίων. Σημαντικός σταθμός στην κατανόηση των αλληλεπιδράσεων φυτών-παθογόνων ήταν η ανακάλυψη τελεστών που δρουν ως μεταγραφικοί παράγοντες (TALEs), μια νέα κατηγορία πρωτεϊνών που δεσμεύονται στο DNA. Η αποκρυπτογράφηση του κώδικα που καθορίζει την εξειδίκευση στην αναγνώριση του DNA των τελεστών TAL έχει ανοίξει το δρόμο σε διάφορες βιολογικές και βιοτεχνολογικές εφαρμογές. Τα τελευταία 5 χρόνια, η βιοπληροφορική και η λειτουργική γονιδιωματική έχουν επηρεάσει σημαντικά το πεδίο των τελεστών από μύκητες τόσο με την ταυτοποίηση ενός μεγάλου αριθμού τελεστών σε ωομύκητες όσο και με την ανακάλυψη ενός ιδιότυπου μηχανισμού μεταφοράς τελεστών σε φυτικά κύτταρα. Στο μέλλον, η εφαρμογή προσεγγίσεων της βιολογίας συστημάτων αναμένεται να συνδράμει στην κατανόηση της πολυπλοκότητας των μοριακών αλληλεπιδράσεων που διέπει τις αλληλεπιδράσεις φυτών-μικροοργανισμών και θα ενισχύσει στην αξιοποίηση της γνώσης αυτής για καινοτόμες εφαρμογές στη γεωργία, βιολογία και βιοτεχνολογία.

4. MICROBIAL INTERACTIONS

Inter-kingdom transfer of microbial proteins: Molecular biology and biotechnological applications**Tampakaki A.P.***Laboratory of General and Agricultural Microbiology, Department of Agricultural Biotechnology, Agricultural University of Athens
e-mail: tampakaki@aua.gr*

Host-microbe interactions are highly complex and mutual interactions occur at cellular, tissue, organismal and population level. Only a small fraction of plant-microbe interactions lead to successful disease development, as the majority of plant species are resistant to invasion by all isolates of any given microbial species. The outcome of the interactions between microbial pathogens and plants depends on the effectiveness of the surveillance system of the plant species. Different phytopathogens have adopted various tactics to overcome the plant defense responses. A common virulence strategy in most microbial plant pathogens is the interkingdom transfer of effector proteins. In Gram negative bacterial phytopathogens specialized secretion systems (Type III, IV and VI) deliver proteins inside the plant cells. These proteins are called effectors and their function is to manipulate plant innate immunity. Advances in our understanding of effector function and their plant targets have yielded a unified model describing the interactions of (hemi)biotrophic pathogens with plants. Genomics have greatly facilitated the identification of numerous effector genes from the genomes of bacterial pathogens and symbionts. A major leap forward in our understanding of plant-pathogen interactions was the discovery of transcription activator like effectors (TALEs), a novel class of DNA-binding proteins. Deciphering the code of DNA recognition specificity of TAL effectors has opened the door to several biological and biotechnological applications. In the last 5 years, bioinformatics and functional genomics have impacted the field of fungal effector biology with the identification of large effector repertoires in oomycete pathogens as well as with the discovery of an intriguing mechanism for effector translocation into plant cells. In the future, the use of systems biology approaches is expected to advance our understanding the complexity of molecular interactions underlying plant-microbe interactions and will boost the exploitation of that knowledge for breakthrough applications in agriculture, biology and biotechnology.

5. ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ ΩΣ ΜΟΝΤΕΛΑ ΒΑΣΙΚΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ

Οργάνωση πρωτεϊνικών μικροχώρων στην κυτταροπλασματική μεμβράνη μυκήτων και οι πιθανοί βιολογικοί ρόλοι τους: κινάσες και εισοσωμικές πρωτεΐνες στον ασκομύκητα *Aspergillus nidulans*

Σοφianoπούλου Β.

Εργαστήριο Μοριακής Γενετικής Μικροοργανισμών, Ινστιτούτο Βιολογίας, Ε.ΚΕ.Φ.Ε. Δημόκριτος

Οι «σχεδίες λιπιδίων» είναι μεμβρανικές μικροπεριοχές των κυττάρων των θηλαστικών που είναι σημαντικές για τη μεμβρανική κυκλοφορία. Η ύπαρξη αυτών των περιοχών στο *Saccharomyces cerevisiae* υποστηρίχθηκε από το στικτό πρότυπο κατανομής διαμεμβρανικών πρωτεϊνών στην περιφέρεια του κυττάρου, όπως του συμμεταφορέα αργινίνης/πρωτονίων Can1 και της Ρ-τύπου αντλίας πρωτονίων, Pma1p. Οι παρατηρήσεις αυτές οδήγησαν στην αναγνώριση των MCC (Membrane Compartment of Can1) και MCP (Membrane Compartment of Pma1) μικροχώρων στην κυτταροπλασματική μεμβράνη των κυττάρων της ζύμης. Πρόσφατα, εννέα διαμεμβρανικές πρωτεΐνες ταυτοποιήθηκαν ως παράγοντες των MCC μικροχώρων και δείχθηκε ότι δύο από αυτές -Sur7 και Nce102- έχουν δομικό ρόλο στην οργάνωση τους. Το καρβοξυτελικό τμήμα της Nce102 καθορίζει τη δομή και λειτουργία όχι μόνο των MCC αλλά και των *εισοσωμάτων* γενικότερα. Τα εισοσώματα είναι πρωτεϊνικά σύμπλοκα που αποτελούνται κυρίως από τις κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες Pil1 και Lsp1 και τη διαμεμβρανική Sur7. Οι περιοχές MCC και οι εισοσωμικές πρωτεΐνες είναι συντηρημένες στους μύκητες και έχουν συσχετισθεί με τη ρύθμιση της ενδοκύτωσης, τη σηματοδότηση των σφιγγολιπιδίων, τη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος, την οργάνωση της κυτταροπλασματικής μεμβράνης και τον κυτταρικό κύκλο. Πρόσφατα αναγνωρίσαμε στο μύκητα *Aspergillus nidulans* (και σε όλα τα μέλη του υποφύλου Pezizomycotina) δύο ομόλογες πρωτεΐνες των Pil1/Lsp1, την PilA και PilB, οι οποίες προέρχονται από ένα γεγονός διπλασιασμού ανεξάρτητο από εκείνο του υποφύλου Saccharomycotina. Στα είδη των aspergilli υπάρχουν αρκετές όμοιες με τη Sur7 πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένου και του ορθόλογου Sur7 (SurG για τον *A. nidulans*). Στην παρούσα ομιλία θα παρουσιάσουμε αποτελέσματα που αφορούν την υποκυτταρική κατανομή των εισοσωμικών πρωτεϊνών σε διαφορετικά στάδια ανάπτυξης του φυλετικού και αφυλετικού κύκλου ζωής του μύκητα και θα συζητήσουμε τις πιθανές επιπτώσεις της οργάνωσής τους στην ενδοκύτωση διαμεμβρανικών μεταφορέων, στην πορεία εξέλιξης του κυτταρικού κύκλου και στην παθογένεια των μυκήτων

5. MODEL MICROORGANISMS IN BASIC RESEARCH

Molecular organization of plasma membrane microdomains in fungi and their implication in fundamental cellular processes and pathogenicity

Sophianoopoulou V.

Laboratory of Microbial Molecular Genetics, Institute of Biology, NCSR Demokritos

The last two decades evidence has been accumulating that membranes exhibit locally specific features and are thus laterally compartmented. Although details of this compartmentation remain under discussion, the partitioning of the membrane lipids and proteins in lateral domains is in principle agreed upon. The plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae* contains large microdomains enriched in ergosterol, which houses at least nine integral proteins, the so called MCC (Membrane Compartment of Can1) MCP or MCP (Membrane Compartment of Pma1) domains. The domains adopt a characteristic structure of furrow-like invaginations typically seen in freeze-fracture pictures of fungal cells. Being stable for the time comparable with the cell cycle duration, they might be considered as fixed islands -"rafts" in an otherwise fluid yeast plasma membrane. The formation and maintenance of these domains depends on the transmembrane protein Nce102 and the cytosolic protein Pil1. The latest is responsible for the formation of cytosolic protein complexes, the *eisosomes*, in the vicinity of MCC patches. Eisosomes are composed of two soluble proteins Pil1p and Lsp1p, which colocalise with the tetraspanning membrane protein Sur7p. MCC and eisosomal proteins are conserved in fungi and have been linked among others to plasma membrane organization and cell cycle progression. We have recently identified in the ascomycete *Aspergillus nidulans* (and in all members of the subphylum Pezizomycotina) two homologues of Pil1/Lsp1, PilA and PilB and one strict orthologue of Sur7, SurG. In the present talk will present the subcellular distribution of the three core eisosomal proteins at different developmental stages of both the sexual and asexual cycles of the fungus (conidiospores, conidiophores, hyphae and ascospores) and will discuss possible implications of their organization in transporter endocytosis, cell cycle progression and fungal pathogenicity.

1. ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΗ & ΜΕΤΑΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΗ

1. GENOMICS / METAGENOMICS

1.1 Searching for and culturing the unculturables

Moreels D.¹, George I.F.^{2,3} and Agathos S.N.¹

¹ *Laboratoire de Génie Biologique, Earth & Life Institute (ELI), Université Catholique de Louvain, Place Croix du Sud 2/19, 1348 Louvain-la-Neuve, Belgium*

² *Ecologie des Systèmes Aquatiques, Université Libre de Bruxelles, Bd du Triomphe, 1050 Bruxelles, Belgium*

³ *Laboratoire de Biologie Marine, Université Libre de Bruxelles, 50 Av F.D. Roosevelt, 1050 Bruxelles, Belgium*

Most bacteria in nature have so far escaped isolation by culturing, a phenomenon called 'the great plate count anomaly'. Although assumed to be active in the environment, most bacteria may stay uncultured (and thus non-isolated) due to laboratory cultivation procedures incompatible with their ecology. Surveys based on 16S rRNA gene sequences have revealed the widespread occurrence of *Acidobacteria* in various ecosystems and especially in soils, where they represent the second most abundant phylum after *Proteobacteria*. The ubiquity of *Acidobacteria* suggests that they serve important functions in the environment, which however remain largely unknown because of the great difficulty to grow such fastidious bacteria in the laboratory. *Acidobacteria* isolates have been described from only 5 of the 26 known subdivisions of this phylum, the majority originating from *acidic* environments and belonging to subdivision 1. One of the goals of our laboratory is to design new, efficient culturing techniques for *Acidobacteria* in a bid to 'domesticate' them. We have recently succeeded in isolating eighteen novel *Acidobacteria* strains from three *alkaline* soils using simple dilute media and long incubation times. Plate wash PCR DGGE revealed that the diversity of ultimately culturable *Acidobacteria* generally increased with increasing incubation times, and that the major group represented in the DGGE patterns was the broad, as-yet uncultured subdivision 6. Two of the newly isolated strains represented novel subdivision 3 species, two represented novel subdivision 4 species, and eleven belonged to subdivision 6. Strains from the different subdivisions had different optimal nutrient concentrations, with subdivision 6 strains growing better on the most dilute media. Thus, we report for the first time the isolation of culturable subdivision 6 *Acidobacteria*. In addition, the latter strains grew much faster in the presence of an "accidental" contaminant identified as *Brevibacillus brevis*. Experiments were performed to identify the nature of this beneficial relationship.

Keywords: unculturable bacteria, *Acidobacteria*, soil microbial diversity

1.2 Συσχέτιση των προτύπων μεθυλίωσης του ρετροτρανσποζονίου HERV-K10 και των γονιδίων DLK1/MEG3 σε δείγματα από προεμφυτευτική γενετική διάγνωση

Δημητριάδου Ε.¹, Νουτσόπουλος Δ.², Βλαΐκου Μ.Α.¹, Μάντζιου Σ.¹, Traeger-Synodinos J.³, Καναβάκης Ε.³, Τζαβάρας Θ.¹, Σύρρου Μ.¹
¹ Εργαστήριο Γενικής Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιατρική Σχολή, Ιωάννινα

² Εργαστήριο Κυτταρικής και Μοριακής Νευροανοσολογίας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών & Τεχνολογιών, Ιωάννινα

³ Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής, Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιατρική Σχολή, Αθήνα

Τα ρετροτρανσποζόνια HERV θεωρούνται "απομεινάρια" ρετροϊικών μολύνσεων, που κατέστησαν ενδογενή, και αποτελούν το 8.3% του ανθρώπινου γονιδιώματος. Τα HERV-K αποτελούν την εξελικτικά νεότερη και ενεργότερη οικογένεια ρετροτρανσποζονίων και τα μέλη της εκφράζονται σε λεμφοκύτταρα, καρκινικά και γαμετικά κύτταρα. Η έκφρασή τους είναι αυστηρά ελεγχόμενη και η αποσιώπησή τους πραγματοποιείται κυρίως μέσω μεθυλίωσης DNA. Έχει προταθεί ότι η γονιδιωματική αποτύπωση ανέκλυψε ως υποπροϊόν της μεθυλίωσης DNA, ώστε να αποσιωπάται εξωγενές DNA όπως τα ρετροτρανσποζόνια.

Μελετήσαμε το πρότυπο μεθυλίωσης DNA του ρετροτρανσποζονίου HERV-K10 και των γονιδίων με αποτύπωση DLK1/MEG3, p57^{KIP2} και IGF2/H19 σε δείγματα χοριακών λαχνών και αίματος ομφαλίου δύο ομάδων παιδιών α) που γεννήθηκαν μετά από *in vitro* γονιμοποίηση και προεμφυτευτική γενετική διάγνωση (PGD) και β) παιδιών που προήλθαν από φυσιολογική σύλληψη (μάρτυρες). Ανάλυση με MS-PCR για το HERV-K10 έδειξε ότι τα δείγματα-μάρτυρες ήταν στην πλειοψηφία τους μεθυλιωμένα, όπως αναμενόταν. Αντίθετα, στατιστικά σημαντική μείωση της μεθυλίωσης παρατηρήθηκε στα δείγματα PGD σε σύγκριση με το μάρτυρα. Ανάλυση νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των DLK1/MEG3, p57^{KIP2} και IGF2/H19 με εργαλεία βιοπληροφορικής έδειξε ότι φέρουν υψηλή, χαμηλή και μηδενική περιεκτικότητα σε ρετροτρανσποζόνια, αντίστοιχα. Ακολούθως, αναλύθηκε με MS-PCR η συστοιχία γονιδίων DLK1/MEG3. Στα δείγματα-μάρτυρες ανιχνεύθηκε το αναμενόμενο πρότυπο, δηλαδή παρουσία μεθυλιωμένου και μη μεθυλιωμένου αλληλομόρφου, ενώ στα δείγματα PGD παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αλλαγή των προτύπων μεθυλίωσης σε σύγκριση με το μάρτυρα. Τέλος, η ανάλυση με MS-PCR για τα γονίδια p57^{KIP2} και IGF2/H19 δεν έδειξε μεταβολή των προτύπων μεθυλίωσης. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα αυτά φαίνεται ότι θα μπορούσε να συσχετιστεί η μεταβολή των προτύπων μεθυλίωσης του ρετροτρανσποζονίου HERV-K10 με εκείνη γονιδίων με γονιδιωματική αποτύπωση που βρίσκονται σε περιοχές πλούσιες σε ρετροτρανσποζόνια. Συνολικά, συζητείται ο ρόλος των ρετροτρανσποζονίων στην ρύθμιση της γονιδιωματικής αποτύπωσης.

1.2 Correlation between HERV-K10 retrotransposon and DLK1/MEG3 imprinted gene methylation patterns in pre-implantation genetic diagnosis samples

Dimitriadou E.¹, Noutsopoulos D.², Vlaikou M.A.¹, Mantziou S.¹, Traeger-Synodinos J.³, Kanavakis E.³, Tzavaras T.¹, Syrrou M.¹

¹ Laboratory of General Biology, University of Ioannina, Medical School, Ioannina

² Laboratory of Cellular and Molecular Neuroimmunology, University of Ioannina, Department of Biological Applications and Technology, Ioannina

³ Laboratory of Medical Genetics, University of Athens, Medical School, Athens.

HERV retrotransposons are considered as "relics" of retroviral infections, which underwent endogenization, and constitute 8.3% of the human genome. HERV-K family is the evolutionary youngest and more active family and its members are expressed in lymphocytes, cancer and germ cells. Their expression is tightly controlled and mainly silenced by DNA methylation. Genomic imprinting (GI) by DNA methylation is an epigenetic mechanism that results in mono-allelic expression of imprinted genes. According to a hypothesis, GI is considered as an evolutionary host defense system mechanism for silencing exogenous DNA, such as retrotransposons.

We have studied DNA methylation patterns of HERV-K10 retrotransposon and DLK1/MEG3, p57^{KIP2} and IGF2/H19 imprinted genes using methylation-specific PCR (MS-PCR) in chorionic villi and cord blood samples from: a) children conceived after preimplantation genetic diagnosis (PGD) and b) matched naturally conceived (NC) controls. DNA methylation pattern analysis of HERV-K10 using MS-PCR revealed methylation in the majority of control samples, in agreement with the expected pattern. In contrast, a statistically significant alteration of HERV-K10 methylation pattern was detected in PGD samples compared to controls. Nucleotide sequence analysis of DLK1/MEG3, p57^{KIP2} and IGF2/H19 genes using bioinformatics uncovered their high, low and null retrotransposon content, respectively. MS-PCR analysis of DLK1/MEG3 showed that PGD samples demonstrated a statistically significant altered methylation pattern compared to controls, while p57^{KIP2} and IGF2/H19 showed no differences.

Our results suggest that altered HERV-K10 methylation is correlated to imprinting alterations in a retrotransposon-rich genomic region, and that retrotransposons may play a role in the regulation of imprinting.

Keywords: HERV retrotransposon, DNA methylation, genomic imprinting

1.3 Ανάλυση μιτοχονδριακών γονιδιωμάτων: σχεδιασμός και εφαρμογή οικουμενικών εκκινητικών ολιγονουκλεοτιδίων στο βασίλειο των μυκήτων

Ντερτιλή Μ., Τύπας Μ.Α., Κουβέλης Β.Ν.

Τομέας Γενετικής και Βιοτεχνολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών, Πανεπιστημιούπολη 15701 Αθήνα, e-mail kouvelis@biol.uoa.gr

Τα μιτοχονδριακά γονιδιώματα (mtDNAs) παρέχουν πληροφορίες στη γενετική, ταξινομική, εξελικτική και φυλογενετική μελέτη των μυκήτων σύμφωνα με τα σύγχρονα δεδομένα. Το ενδιαφέρον του mtDNA εστιάζεται στη συνύπαρξη της συντηρητικότητας των λειτουργιών του, με τη διαφορετικότητα της δομής (γονιδιακή οργάνωση, εσώνια) στα διάφορα μυκητιακά είδη. Τα mtDNAs των μυκήτων έχουν ποικιλόμορφο μέγεθος (11 - 120 kb) και φέρουν συνήθως γονίδια που κωδικοποιούν: (α) 14 πρωτεΐνες για την αναπνοή και παραγωγή ATP, (β) 2 rRNA και (γ) 25 κατά μέσο όρο tRNAs. Η μέθοδος εμπλουτισμού αλυσιδωτής αντίδρασης (PCR) παρέχει δεδομένα ποικιλομορφίας, ταυτοποίησης και διάγνωσης των μυκήτων, υποδεικνύει δε τις φυλογενετικές τους σχέσεις με χρήση κατάλληλων εκκινητών. Για το σχεδιασμό των οικουμενικών εκκινητών χρησιμοποιήθηκαν τα μέχρι σήμερα γνωστά μιτοχονδριακά γονιδιώματα (82), τα οποία έχουν καταταθεί στις γονιδιακές τράπεζες, και mtDNAs που αναλύθηκαν στο εργαστήριό μας από τις αλληλουχίες μη ολοκληρωμένων γονιδιωμάτων μυκήτων (20), με την ακόλουθη κατανομή: Ασχομύκητες (78), Βασιδιομύκητες (10), Ζυγομύκητες (3), Χυτριομύκητες (9) και Γκλομερομύκητες (2). Μελετήθηκε η συνταινικότητα τους και σε περιπτώσεις γονιδίων με μικρό μέγεθος αξιοποιήθηκαν οι διαγονιδιακές περιοχές. Οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των γονιδίων χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή φυλογενετικών δέντρων που αναδεικνύουν τις εξελικτικές σχέσεις αυτών καθεαυτών των γονιδίων αλλά και των οργανισμών που τα φέρουν. Οι εκκινητές δοκιμάστηκαν σε αντιπροσωπευτικά στελέχη μυκήτων από διάφορες τάξεις, προκειμένου να διαπιστωθεί η καθολικότητά τους. Τα μέχρι σήμερα δεδομένα υποδεικνύουν ότι οι καταλληλότεροι αφορούν τα γονίδια που κωδικοποιούν για την υπομονάδα 3 της κυτοχρωμικής οξειδάσης (*cox3*), του αποκυτοχρώματος b (*cob*), την υπομονάδα 1 της NADH αφυδρογονάσης (*nad1*), την υπομονάδα 5 της NADH αφυδρογονάσης (*nad5*) και τη μικρή ριβοσωμική rRNA μιτοχονδριακή υπομονάδα (*rns*). Επομένως, με τη χρήση των εκκινητών αυτών είναι δυνατή η ταχύτατη και ενδεδειγμένη μελέτη άγνωστων μέχρι σήμερα μιτοχονδριακών γονιδιωμάτων από είδη μυκήτων, αυξάνοντας τα δεδομένα για καλύτερες συγκριτικές μελέτες.

Λέξεις-κλειδιά: Μιτοχονδριακό γονιδίωμα, μύκητες, οικουμενικά εκκινητικά ολιγονουκλεοτίδια

1.3 Analysing mitochondrial genomes: designing and using universal primers within the kingdom of fungi

Ntertili M., Typas M.A., Kouvelis V.N.

Department of Genetics and Biotechnology, Faculty of Biology, University of Athens, Panemistiopolis, Athens 15701, Greece, e-mail: kouvelis@biol.uoa.gr

The mitochondrial genomes (mtDNAs) provide information for genetic, taxonomic, evolutionary and phylogenetic fungal studies. MtDNAs combine their functional gene conservation with diversity in structure (gene order, introns). Fungal mt DNAs present size variability (11 - 120 kbs) but usually contain 14 protein-coding genes related to oxidative phosphorylation and ATP production, 2 rRNA and 25 tRNA genes. With the use of appropriate primers PCR products provide information on the diversity, identification and diagnosis of fungi. To design universal primers for mt genes, all publicly known (82) mtDNAs (e.g. in GenBank) were used together with 20 additional mt genomes, collected from fungal genome projects. Their distribution within the fungal subphyla varied [Ascomycetes (78), Basidiomycetes (10), Zygomycetes (3), Chytridiomycetes (9) and Glomeromycetes (2)]. Synteny was studied and primers for the amplification of intergenic regions were designed. The nucleotide alignments of each mitochondrial gene were used for the construction of phylogenetic trees which accentuate the evolutionary relationships of the genes *per se*, or even better, of the organisms they carry them. Primers have been tested with DNA template isolated from representative species of the most important orders, in order to evaluate their universality within the kingdom. So far, the best results have been obtained with primers for the genes cytochrome oxidase subunit III (*cox3*), apocytochrome b (*cob*), NADH dehydrogenase subunit 1 (*nad1*), NADH dehydrogenase subunit 5 (*nad5*) and small ribosomal rRNA mitochondrial subunit (*rns*). Therefore, the designed primers offer a fast and reliable tool to study unknown fungal mt genomes and use these genes in better comparative/phylogenetic studies.

Keywords: Mitochondrial genome, Fungi, Universal primers

1.4 Μελέτη της SOS ρύθμισης στο αιθανολοπαραγωγό βακτήριο *Zymomonas mobilis*

Σαββάκης Γ. και Παππά Κ.Μ.

Τομέας Γενετικής και Βιοτεχνολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών Επιστημών, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Πανεπιστημιούπολη, Ιλίσσια, Αθήνα 15701

Το *Zymomonas mobilis* είναι α-πρωτεοβακτήριο με μεγάλες δυνατότητες για βιομηχανική παραγωγή αιθανόλης. Η ανθεκτικότητά του σε συνθήκες στρες προσελκύει το ενδιαφέρον, καθώς άπτεται της προσαρμογής του σε συχνά αντίξοα βιοκαταλυτικά περιβάλλοντα. Γονίδια που επάγονται σε συνθήκες στρες σε οργανισμούς όπως το *E. coli* περιλαμβάνουν γονίδια επιδιόρθωσης του DNA και ρυθμίζονται συντονισμένα. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το SOS σύστημα, που ελέγχεται από τις πρωτεΐνες RecA/LexA και αριθμεί δεκάδες συμμεταγραφόμενων γονιδίων.

Στην παρούσα εργασία, έγινε *in silico* αναζήτηση SOS γονιδίων, ορθόλογων ως προς αυτά των εντεροβακτηρίων και μελετημένων α-πρωτεοβακτηρίων, στα αλληλουχημένα γονιδιώματα δύο στελεχών του *Z. mobilis* (ATCC31821/ZM4 και NCIMB11163 - κωδικοί GenBank AE008692 και CP001722, αντίστοιχα). Τα υποψήφια SOS γονίδια του *Z. mobilis* εντοπίστηκαν μέσω της τρέχουσας επισημείωσής τους και μέσω στοιχίσεων BLAST. Επί πλέον, διερευνήθηκε η συντονισμένη ρύθμιση των γονιδίων με βάση τη συντήρηση της αλληλουχίας πρόσδεσης της LexA ανοδικά αυτών (SOS-box α-πρωτεοβακτηρίων G(T/A)(T/A)CN₇G(T/A)(T/A)C), με χρήση προγράμματος γλώσσας C που αναπτύχθηκε στο εργαστήριο και του FITOM (<http://compbio.umbc.-edu/9466/>), ενώ η αναζήτηση συναινετικών SOS-box αλληλουχιών επεκτάθηκε σε ολόκληρα τα γονιδιώματα των στελεχών. Τέλος, εντοπίστηκαν συντηρητικά μοτίβα στις RecA και LexA του *Z. mobilis*, με χρήση στοιχίσεων ClustalW και βιοχημικών δεδομένων που βασίζονται στο *E. coli*.

Η συντήρηση των *Z. mobilis* RecA και LexA υποδεικνύει τον ενεργό τους ρόλο στη ρύθμιση του SOS συστήματος στον οργανισμό. Στα γονιδιώματα των ZM4 και NCIMB11163 εντοπίστηκαν περίπου 40 πιθανά επιδιορθωτικά γονίδια, 8 από τα οποία φέρουν απόλυτα συντηρημένο, ή με μια νουκλεοτιδική διαφορά, SOS-box (συμπεριλαμβανομένων των *recA* και *lexA*), και αρκετά με δύο ή περισσότερες νουκλεοτιδικές διαφορές. Αξιοσημείωτο υπήρξε ότι SOS μοτίβα με καμία ή μία διαφορά εντοπίστηκαν και ανοδικά περίπου 70 μη επιδιορθωτικών γονιδίων (μεταβολισμού, σύνθεσης δομών ή πρωτεϊνών, ανθεκτικότητας σε οργανικούς παράγοντες και μεταγραφικής ρύθμισης), γεγονός που υποδεικνύει ότι η SOS- ρύθμιση στο *Z. mobilis* είναι πιθανόν ευρύτερη απ' ό,τι αναμενόταν.

1.4 Study of SOS regulation in the bioethanol-producer *Zymomonas mobilis*

Savvakis G. and Pappas K.M.

Department of Genetics and Biotechnology, Faculty of Biology, School of Sciences, University of Athens, Panepistimiopolis, Ilissia, Athens 15701, Greece

Zymomonas mobilis is an α-proteobacterium with a great potential for industrial bioethanol production. Its tolerance to stress is of particular interest, since it entails adapting to and performing in challenging bioprocessing environments. Genes induced by stress include DNA-repair genes and are often coordinately expressed. A major example is given by the SOS regulon of *E. coli*, which is governed by the RecA/LexA proteins and comprises of dozens of co-transcribed genes.

In this work, an *in silico* analysis was employed to identify genes orthologous to that of enterobacterial or α-proteobacterial SOS systems, in two different *Z. mobilis* strain genomes (ATCC31821/ZM4 and NCIMB 11163; GenBank acc. No. AE008692 and CP001722), via use of latest gene-calling designations and BLAST similarity searches. Moreover, indications for coordinate regulation were sought, based on the conservation of the α-proteobacterial LexA-binding SOS-box [G(T/A)(T/A)CN₇G(T/A)(T/A)C] that lies upstream from regulon members. For this, a C language program developed in our lab and FITOM (<http://compbio.umbc.-edu/9466/>) were used to search for SOS-box conservation upstream from expected SOS genes and in whole genomes. Lastly, conserved motif search in the *Z. mobilis* RecA and LexA proteins was carried out by ClustalW alignments, relying on previous biochemical data offered by the *E. coli* counterparts.

The *Z. mobilis* RecA and LexA proteins seem functionally conserved, which indicates their possible implication in SOS regulation for this bacterium. Approximately 40 DNA-repair gene candidates were found in each examined genome, at least 8 of which bearing SOS boxes with no (*recA* and *lexA*) or one consensus mismatch, and a considerable number with two or more mismatches. An interesting finding of whole-genome scans was that SOS-box motifs with zero to one base substitution precede approximately 70 genes irrelevant to DNA repair (genes for metabolism, protein synthesis, tolerance to organic agents or transcriptional regulation), which indicates that the SOS regulon of *Z. mobilis* may be broader than thought.

2. ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΟΙΚΟΛΟΓΙΑ

2. MOLECULAR MICROBIAL ECOLOGY

2.1 Βακτηριακή ποικιλότητα του εντόμου *Cydia pomonella* (Καρπόκαψα)

Nikonova O.¹, Noll N.², Χατζή I.¹, Νικολούλη Κ.¹, Λιβιεράτος I.², Μπούρτζης Κ.³, Τσιάμης Γ.³ και Μόσιαλος Δ.¹

¹ Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα

² Μεσογειακό Αγρονομικό Ινστιτούτο Χανίων, Χανιά

³ Τμήμα Διαχείρισης Περιβάλλοντος και Φυσικών Πόρων, Πανεπιστήμιο Δυτικής Ελλάδας, Αργίνιο

Η καρπόκαψα αποτελεί έναν ιδιαίτερα διαδεδομένο εχθρό των γιγαρτόκαρπων που προκαλεί σημαντικές οικονομικές ζημιές. Στην παρούσα μελέτη η ποικιλότητα καλλιεργούμενων βακτηρίων φυσικών πληθυσμών καρπόκαψας μελετήθηκε σε 2 στάδια ανάπτυξης του εντόμου (Ενήλικο και Προνύμφη) σε 2 είδη ξενιστών (Μήλο και Αχλάδι) και σε 2 τύπους αγρών (Βιολογικό και Συμβατικό). Το 16S rRNA γονίδιο βακτηριακών αποικιών που αναπτύχθηκαν στο θρεπτικό υπόστρωμα Tryptone Soy Agar ενισχύθηκε και τα προϊόντα αλληλουχίστηκαν. Ανάλυση των αλληλουχιών κατέδειξε την παρουσία Gram-θετικών και Gram-αρνητικών βακτηρίων με επικρατέστερο το εντεροβακτήριο *Pantoea vagans* (προηγούμενο όνομα *Pantoea agglomerans*) το οποίο απομονώθηκε από ενήλικα άτομα και προνύμφες που παρασιτούν τόσο στο μήλο όσο και στο αχλάδι. Με μικρότερη συχνότητα ανιχνεύθηκαν επίσης τα βακτήρια *Microbacterium* sp., *Solibacillus* sp., *Pseudoclavibacter helvolus*, *Acinetobacter* sp., *Enterobacter* sp., *Enterococcus casseliflavus* και *Paenibacillus provencensis*. Στη συνέχεια απομονώθηκε ολικό DNA ενήλικων ατόμων καρπόκαψας από βιολογικό και συμβατικό αγρό μήλου και με τη χρήση συντηρημένων εκκινητών ενισχύθηκε το βακτηριακό γονίδιο 16S rRNA. Τα προϊόντα της ενίσχυσης όλων των δειγμάτων κλωνοποιήθηκαν για την κατασκευή 16S rRNA βιβλιοθηκών. Ανάλυση της αλληλουχίας μικρού αριθμού κλώνων των βιβλιοθηκών (31 για το βιολογικό και 35 για το συμβατικό αγρό) έδειξε διαφοροποίηση της βακτηριακής ποικιλότητας καθώς στα άτομα του βιολογικού αγρού επικρατούν *Pseudomonas* sp. ενώ στα άτομα του συμβατικού *Halotalea* sp. Η μελέτη βρίσκεται σε εξέλιξη με ανάλυση περισσότερων κλώνων των βιβλιοθηκών. Η μελέτη της βακτηριακής ποικιλότητας των εντόμων αποτελεί αντικείμενο έντονης ερευνητικής δραστηριότητας λόγω της σημασίας της για την βιολογία και φυσιολογία των εντόμων ξενιστών. Στόχος μας μετά την αρχική περιγραφή της βακτηριακής ποικιλότητας αποτελεί η διερεύνηση του ρόλου των βακτηρίων στη φυσιολογία και στην προσαρμογή της καρπόκαψας σε διαφορετικά περιβάλλοντα (πχ διαφορετικό ξενιστή ή χρήση εντομοκτόνων).

Λέξεις-κλειδιά: *Cydia pomonella*, 16S rRNA γονίδιο, βακτηριακή ποικιλότητα

2.1 Bacterial diversity in *Cydia pomonella* (codling moth)

Nikonova O.¹, Noll N.², Chatzi I.¹, Nikolouli K.¹, Livieratos I.², Bourtzis K.³, Tsiamis G.³ and Mossialos D.¹

¹ Department of Biochemistry and Biotechnology, University of Thessaly, Larissa, Greece

² Mediterranean Agronomic Institute of Chania, Crete, Greece

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

Codling moth is an insect which infests fruits such as apple and pear leading to significant crop loss. In this study diversity of cultured bacteria in natural populations of codling moth was studied in 2 developmental stages (adult and larvae) in 2 host species (apple and pear) and 2 types of crop fields defined as biological (insecticide-free) and conventional (use of insecticides). Bacterial isolates grown on Tryptone Soy Agar were characterized by amplifying the 16S rRNA gene. Analysis of sequenced PCR products revealed the presence of Gram-positive and Gram-negative bacteria. The most prominent bacterial species was *Pantoea vagans* (formerly known *Pantoea agglomerans*) which was isolated from adult and larvae infesting apple as well as pear. Other less frequently detected bacteria include *Microbacterium* sp., *Solibacillus* sp., *Pseudoclavibacter helvolus*, *Acinetobacter* sp., *Enterobacter* sp., *Enterococcus casseliflavus* and *Paenibacillus provencensis*. Total DNA of adult codling moths infesting biological and conventional apple fields was extracted and used as template to amplify the bacterial 16S rRNA gene. All PCR products were cloned in order to construct 16S rRNA libraries. Sequence analysis of a small number of clones derived from libraries (31 from biological and 35 from conventional field) has shown *Pseudomonas* sp. to be prominent in adults derived from biological apple fields while *Halotalea* sp. was prominent in adults from conventional apple fields. Analysis of more library clones is underway. Once the description of bacterial diversity shall be completed, the bacterial effects on codling moth regarding physiology and environmental adaptation (e.g. host preference or response to insecticides) will be investigated.

2.2 Μοριακή επιβεβαίωση του είδους *Planktothrix rubescens* ως αιτίου έντονης ηπατοτοξικής έκρηξης στη λίμνη Ζηρού.

Βαρέλη Κ.¹, Μπριασούλης Ε.², Πηλίδης Γ.¹, Σαΐνης Ι.³

¹ Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Παν/μιο Ιωαννίνων

² Ιατρική Σχολή, Παν/μιο Ιωαννίνων

³ Διεπιστημονικό Εργαστήριο Μοριακής Ογκολογίας, Βιοτράπεζα Καρκίνου, Παν/μιο Ιωαννίνων

Πληθυσμιακές εκρήξεις κυανοβακτηρίων συμβαίνουν πολύ συχνά στα υδάτινα οικοσυστήματα παγκοσμίως προκαλώντας ανησυχία τόσο για την υγεία του ανθρώπινου πληθυσμού όσο και για την γενικότερη οικολογική ισορροπία των εν λόγω οικοσυστημάτων. Στα υδάτινα Μεσογειακά οικοσυστήματα οι εκρήξεις κυανοβακτηρίων αφορούν συνήθως στα γένη *Microcystis*, *Anabaena*, και *Aphanizomenon* ενώ το γένος *Planktothrix* απαντάται σε εκρήξεις βαθέων λιμνών της βόρειας Ευρώπης καθώς και υποαλπικών λιμνών ολιγοτροφικού έως μεσοτροφικού χαρακτήρα. Στα πλαίσια μιας μελέτης χαρακτηρισμού των ειδών κυανοβακτηρίων που απαντώνται στις λίμνες της Δ. Ελλάδας, μελετήθηκε και η ποικιλότητα των κυανοβακτηρίων στη λίμνη του Ζηρού με τη χρήση μοριακών τεχνικών (Ιανουάριος 2006- Μάρτιος 2007). Κατά τη διάρκεια της μελέτης παρατηρήθηκε στη λίμνη του Ζηρού μια εντυπωσιακή έκρηξη κυανοβακτηρίων η οποία αποδόθηκε, τόσο με μικροσκοπική παρατήρηση όσο και με λεπτομερή μοριακό χαρακτηρισμό, στο είδος *Planktothrix rubescens*. Η παρουσία του είδους *Planktothrix rubescens* στη λίμνη από το Νοέμβριο του 2006, σε συνδυασμό με μια φτωχή σε ποικιλότητα χλωρίδα κυανοβακτηρίων, κατέληξε τελικά στο σχηματισμό μιας επιφανειακής έκρηξης μεγάλου πάχους και έκτασης το Μάρτιο του 2007 (3.1×10^8 cells/l, microcystin concentration 199 µg/l). Λεπτομερής μοριακός χαρακτηρισμός της κυανοβακτηριακής κοινότητας πραγματοποιήθηκε μετά από ανάλυση, με τη χρήση DGGE, των φραγμάτων της περιοχής μεταξύ του 16S και 23S rDNA των κυανοβακτηρίων της λίμνης. Η μοριακή ανάλυση έδειξε ότι το στέλεχος του *Planktothrix rubescens* από τη λίμνη του Ζηρού ομοιάζει με ένα στέλεχος το οποίο ευθύνεται για παρόμοιες εκρήξεις στη λίμνη Klinckenberg της Ολλανδίας. Η σημασία της παρατήρησης, ενισχύεται από το γεγονός ότι οι τιμές μικροκυστίνης που μετρήθηκαν στη λίμνη κατά τη διάρκεια της έκρηξης είναι από τις υψηλότερες παγκοσμίως.

2.2 Molecular confirmation of *Planktothrix rubescens* as the cause of intense, microcystin synthesizing cyanobacterial bloom in Lake Ziros.

Vareli K.¹, Briasoulis E.², Pilidis G.¹, Sainis I.³

¹ Department of Biological applications and Technologies, University of Ioannina

² Medical School, University of Ioannina

³ Interscience Molecular Oncology Lab., Human Cancer Biobank, University of Ioannina

Cyanobacterial blooms occur increasingly often and raise ecological concerns worldwide. In Mediterranean freshwater ecosystems algal blooms are commonly attributed to *Microcystis*, *Anabaena*, and *Aphanizomenon* genera while *Planktothrix* is the most common bloom forming cyanobacterium in deep Northern and prealpine European oligotrophic to mesotrophic lakes. In the framework of an undertaken study of cyanobacterial diversity in Lake Ziros throughout a 15-month period (January 2006– March 2007) by using molecular methods. Surprisingly, a severe cyanobacterial bloom occurred during the study period, which upon microscopic examination and detailed molecular characterization found to be caused by *Planktothrix rubescens* species. The appearance of *P. rubescens* from November 2006 coincided with poor cyanobacterial diversity and resulted in a thick epilimnetic bloom in March 2007 (3.1×10^8 cells/l and microcystin concentration 199 µg/l). Genotype composition of the total cyanobacterial community of the lake was analyzed by using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) profiling of the intergenic transcribed spacer region of the rnn operon (rRNA-ITS). A *P. rubescens* strain closely related to Kpr strain from Lake Klinckenberg, The Netherlands, was found to dominate. The importance of this observation is expanded by the fact that microcystin concentrations recorded in Lake Ziros were the highest measured ever in Greek aquatic ecosystems examined so far and also found amongst the highest recorded worldwide.

2.3 Μορφολογικός και μοριακός προσδιορισμός του *Inonotus levis*: ένας νέος, για την Ευρώπη, παθογόνος μύκητας

Γκόνου-Ζάγκου Ζ.¹, Κουβέλης Β.Ν.², Κριμιτζάς Α.², Φλούδας Δ.¹, Τύπας Μ.Α.²

¹ Τομέας Οικολογίας και Ταξινόμησης, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών, Πανεπιστημιούπολη 15784 Αθήνα

² Τομέας Γενετικής και Βιοτεχνολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών, Πανεπιστημιούπολη 15701 Αθήνα, e-mail: kouvelis@biol.uoa.gr

Ο βασιδιόμυκητας *Inonotus levis* είναι ένα είδος που πρόσφατα καταγράφηκε στην Ευρώπη για πρώτη φορά, με παθογόνο δράση σε λεύκες αστικών, ημιαστικών και αγροτικών περιοχών στην Ελλάδα. Το *I. levis* παρατηρήθηκε για πρώτη φορά πριν 6 χρόνια σε πολλές περιοχές της Αθήνας, παρασιτώντας σε *Populus nigra* ή *P. x Canadensis*, όπου προκαλούσε μαρασμό και τελικά θάνατο στα δένδρα. Έκτοτε, ο μύκητας εξαπλώθηκε από την Πελοπόννησο μέχρι τη Δυτική Μακεδονία. Τα εισβάλλοντα είδη μυκήτων και οι προερχόμενες από αυτά ασθένειες αποτελούν σοβαρές απειλές για τα αυτόχθονα Ευρωπαϊκά δασικά οικοσυστήματα, όπως και για τα μη γηγενή καλλιεργημένα δένδρα που είναι σημαντικά σε δασικές και αστικές περιοχές. Το *I. levis* ανήκει σε ένα από τα μεγαλύτερα γένη της οικογένειας *Hymenochaetaceae*, και ειδικότερα στην ομάδα *Inocutis*, η οποία χαρακτηρίζεται από την απουσία παχύτοιχων άγονων κυττάρων στο υμένιο και το σχηματισμό κοκκώδους μυκηλιακού πυρήνα. Πολυάριθμα βασιδιοκάρπια συλλέχθηκαν από διαφορετικές περιοχές της Ελλάδας και πολλές καθαρές καλλιέργειες απομονώθηκαν από τα φρέσκα δείγματα. Οι μακροσκοπικοί και μικροσκοπικοί χαρακτήρες των βασιδιοκαρπίων όπως και εκείνοι των καλλιεργειών αναλύθηκαν και περιγράφηκαν εκτενώς. Ο προσδιορισμός του *Inonotus levis* επαληθεύθηκε με συγκριτική μελέτη του τυπικού δείγματος από το Τουρκμενιστάν καθώς και δειγμάτων από τη Κίνα, το Ουζμπεκιστάν και την Αίγυπτο. Επιπρόσθετα, οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες της ITS1-5.8S-ITS2 περιοχής του πυρηνικού rRNA γονιδιού συμπλέγματος και το γονίδιο της μιτοχονδριακής μικρής ριβοσωμικής RNA υπομονάδας (*rns*) επιβεβαίωσαν την ταξινόμηση των στελεχών και αναλύθηκαν περαιτέρω για πιθανή ενδο-ειδική ποικιλομορφία. Τα αποτελέσματα από τη μορφολογική και μοριακή μελέτη συνδυάστηκαν για πρώτη φορά κατά την ταξινόμηση και φυλογενετική εξέταση των Ελληνικών στελεχών του είδους *I. levis*, παρέχοντας χρήσιμα συμπεράσματα.

Λέξεις-κλειδιά: αλλόχθονας και μολυσματικός μύκητας, Βασιδιομύκητες, ITS1-5.8S-ITS2, μιτοχονδριακή μικρή ριβοσωμική υπομονάδα

2.3 Morphological and molecular characterisation of *Inonotus levis*: a new fungal invasive pathogen from Europe

Gonou-Zagou Z.¹, Kouvelis V.N.², Krimitzas A.², Floudas D.¹, Typas M.A.²

¹ Department of Ecology & Systematics, Faculty of Biology, University of Athens, GR-15784 Athens, Greece

² Department of Genetics and Biotechnology, Faculty of Biology, University of Athens, Panemistopolis, Athens 15701, Greece
e-mail: kouvelis@biol.uoa.gr

The basidiomycete *Inonotus levis* is newly recorded in Europe occurring as invading pathogen in planted species of poplar trees in urban, suburban and rural regions in Greece. *I. levis* was first detected 6 years ago in many sites of Athens, attacking *Populus nigra* or *P. x canadensis* and causing gradually their decline and finally their death. Since that time, the fungus has spread from Peloponnese to western Macedonia. Invasive fungal species and emergent fungal diseases are serious threats for European native forest ecosystems, as well as for non-native trees that are important in forestry or urban settings. *I. levis* belongs to one of the largest genera of the family *Hymenochaetaceae*, and specifically to the *Inocutis* group, which is characterized by the absence of setae and the formation of nuclear core. Numerous basidiocarps have been sampled from different areas of Greece and many pure cultures have been obtained from them. The macroscopic and microscopic characters of the basidiocarps and their isolates have been extensively described. The species identification was verified from comparative studies with type material from Turkmenistan, and specimens from China, Uzbekistan, Iran and Egypt. In addition, the nucleotide sequences of the nuclear rRNA gene complex ITS1-5.8S-ITS2 region and the mitochondrial small ribosomal RNA subunit *rns*- gene confirmed their taxonomic position and sequences were analysed further, for species variability. Morphological and molecular results were combined for the first time in the examination of the taxonomic and phylogenetic status of the Greek *I. levis* leading to useful conclusions.

2.4 Χαρακτηρισμός με μοριακές τεχνικές γαλακτικών βακτηρίων που απομονώθηκαν από ελληνικές ζυμούμενες επιτραπέζιες ελιές

Δουλγεράκη Α.¹, Πραματευτάκη Π.², Αργύρη Α.², Μπλάνα Β.¹, Πανάγου Ε.¹, Τάσσου Χ.²

¹ Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Επιστήμης & Τεχνολογίας Τροφίμων, Εργαστήριο Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας Τροφίμων, Ιερά Οδός 75, Βοτανικός 11855, Αθήνα

² Εθνικό Ίδρυμα Αγροτικής Έρευνας, Ινστιτούτο Τεχνολογίας Γεωργικών Προϊόντων, Σοφ. Βενιζέλου 1, Λυκόβρυση, 141 23, Αττική

Σε αυτή τη μελέτη, 145 γαλακτικά βακτήρια απομονώθηκαν από ζυμούμενες ελιές και άλμη και χαρακτηρίστηκαν σε επίπεδο στελέχους με την εφαρμογή μοριακών τεχνικών. Συγκεκριμένα, για τη διαφοροποίηση των απομονώσεων σε επίπεδο στελέχους, τα θραύσματα που προέκυψαν από την πέψη του συνόλου του γονιδιώματος με το ένζυμο περιορισμού *ApaI* αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση εναλασσόμενου πεδίου (Pulsed-Field Gel Electrophoresis, PFGE). Η διαφοροποίηση των ειδών βασίστηκε είτε στην αποδιατακτική βαθμιδατή ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, PCR-DGGE) ή στην ανάλυση του ενισχυμένου γονιδίου 16S rRNA μετά από πέψη με ένζυμο περιορισμό (PCR-ARDRA) και ακόλουθη αλληλούχιση των διαφορετικών προϊόντων. Για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων σε επίπεδο είδους, έλαβε χώρα ενίσχυση των γονιδίων *recA* ή *tuf* με τους κατάλληλους εκκινητές ανά περίπτωση. Μεταξύ των 145 γαλακτικών βακτηρίων που απομονώθηκαν, βρέθηκαν 71 διαφορετικά στελέχη. Τα 17 στελέχη ταυτοποιήθηκαν ως *Leuconostoc mesenteroides*, 51 ομαδοποιήθηκαν ως *Lactobacillus plantarum* group (συμπεριλαμβανομένων 13 *Lb. plantarum*, 37 *Lb. pentosus*, 1 *Lb. paraplantarum*), 2 ως *Lb. casei* group (συμπεριλαμβανομένων *Lb. casei*, *Lb. paracasei*), και 1 ως *Ln. pseudomesenteroides*.

Λέξεις-κλειδιά: Γαλακτικά βακτήρια, επιτραπέζιες ελιές, PFGE, PCR-DGGE, PCR-ADRA

Η έρευνα που οδήγησε σε αυτά τα αποτελέσματα χρηματοδοτήθηκε από το 7^ο Πρόγραμμα Πλαίσιο της Ευρωπαϊκής Ένωσης (FP7/2007-2013), πρόγραμμα n° 243471 - PROBIOLIVES.

2.4 Molecular characterization of lactic acid bacteria isolated from fermented greek table olives

Doulgeraki A.¹, Pramateftaki P.², Argyri A.², Blana V.¹, Panagou E.¹, Tassou C.²

¹ Agricultural University of Athens, Food Science & Technology Department, Laboratory of Food Microbiology & Biotechnology, Iera Odos 75, Votanikos, 11855, Athens

² National Agricultural Research Foundation, Institute of Technology of Agricultura Products, Sof. Venizelou 1, Lycovrissi, 141 23, Attiki

A total of 145 lactic acid bacteria isolates have been recovered from olives and brine and characterized at strain level with the application of molecular tools. Specifically, Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) of *ApaI* macrorestriction fragments was based either on Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (PCR-DGGE) or on restriction analysis of the amplified 16S rRNA gene (PCR-ARDRA) and subsequent sequence analysis of different PCR products. In the cases when acquired data were insufficient to resolve the species level of the bacteria isolates specific multiplex PCR assays targeting the *recA* or *tuf* genes were employed. Out of 145 lactic acid bacteria isolates, 71 different strains were recovered from olive and brine samples.

17 strains were assigned to *Leuconostoc mesenteroides*, 51 were grouped in *Lactobacillus plantarum* group (including 13 *Lb. plantarum*, 37 *Lb. pentosus*, 1 *Lb. paraplantarum*), 2 to *Lb. casei* group (including *Lb. casei*, *Lb. paracasei*), and 1 to *Ln. pseudomesenteroides*.

Keywords: fermented table olives, Pulsed Field Gel Electrophoresis, PCR-DGGE, PCR-ARDRA

The research leading to these results has received funding from the European Union's Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013), Research for SME Associations (FP7-SME-2008-2) under grant agreement n° 243471-PROBIOLIVES

2.5 Εξετάζοντας τη μέθοδο CARD-FISH για τη μελέτη της διαφορικής θήρευσης Bacteria και Archaea σε μεσόκοσμους θαλασσινού νερού

Καραγιάννη Η.¹, Μεζίτη Α.², Κορμάς Αρ.Κ.²

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

² Τμήμα Γεωπονίας, Ιχθυολογίας & Υδάτινου Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, 38 446 Βόλος

Τα Bacteria αποτελούν μία βασική συνιστώσα της βιομάζας των υδάτινων οικοσυστημάτων. Ωστόσο, η πρόοδος που υπάρχει σήμερα στον τομέα της μικροβιακής οικολογίας έδειξε ότι τα πλαγκτικά Archaea αποτελούν, επίσης μία σημαντική συνιστώσα της προκαρυωτικής κοινότητας με κύριο ρόλο στους βιογεωχημικούς κύκλους. Αν και σήμερα γνωρίζουμε ότι τα ετερότροφα νανομαστιγωτά αποτελούν τους κύριους θηρευτές προκαρυωτών στα υδάτινα οικοσυστήματα το φαινόμενο της θήρευσης δεν έχει μελετηθεί αρκετά. Στην εργασία αυτή εξετάσαμε τη χρήση μοριακών τεχνικών ως συμπληρωματικών εργαλείων για τη μελέτη των μηχανισμών που ελέγχουν τη θήρευση προκαρυωτών από τα ετερότροφα νανομαστιγωτά. Συγκεκριμένα, εξετάστηκε η μέθοδος CARD-FISH (Catalyzed Reporter Deposition-Fluorescence In Situ Hybridization) και οι ολιγονουκλεοτιδικοί ιχνηθέτες EUBI-III και ARC915 σε διαφορετικές συγκεντρώσεις λείας και θηρευτή. Βρέθηκε ότι τόσο τα Bacteria όσο και τα Archaea μπορούν να υβριδοποιηθούν μέσα στα πεπτικά κενοτόπια των πρωτίστων γεγονός που υποδεικνύει ότι η μέθοδος CARD-FISH μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη της επιλεκτικής θήρευσης Bacteria και Archaea από τα ετερότροφα νανομαστιγωτά σε θαλάσσια οικοσυστήματα.

Λέξεις-κλειδιά: Ετερότροφα νανομαστιγωτά, Βακτήρια, Αρχαία, Θήρευση, CARD-FISH

2.5 Testing catalyzed reporter deposition for the study of the differential grazing of Bacteria and Archaea in experimental seawater mesocosms

Karayanni H.^{1*}, Meziti A.², Kormas Ar.K.²

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

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

*hkaray@cc.uoi.gr

Bacteria represent a major component of biomass in aquatic systems. However, the latest advances in the field of microbial ecology have shown that planktic Archaea can constitute, spatially or temporarily, an important component of the prokaryotic community and are considered among the critical players in the ocean's biogeochemical cycles as well. The study of predation by heterotrophic nanoflagellates (HNF) and other protists in aquatic ecosystems still remains an under-investigated field of research. In this study we examined the use of molecular techniques as complementary tools for the study of mechanisms that control heterotrophic nanoflagellate predation on prokaryotes. A CARD-FISH (Catalyzed Reporter Deposition- Fluorescence In Situ Hybridization) protocol and the oligonucleotide probes EUBI-III and ARC915 were tested in different prey and predator abundance. We found that both Bacteria and Archaea were hybridized in the food vacuoles of protists indicating that CARD-FISH can be applied for the investigation of food selection by HNF in marine environments.

Keywords: Heterotrophic nanoflagellates, Bacteria, Archaea, Grazing, CARD-FISH

2.6 Επίδραση του propanil και diazinon στο πρωτόζωο υδάτινων οικοσυστημάτων *Tetrahymena pyriformis*: Ένα μοντέλο ελέγχου τοξικότητας.

Καραγιαννόπουλος Μ., Γκότζου Ε., Λέκκα Μ.Ε.

Εργαστήριο Βιοχημείας, Τμήμα Χημείας, Σχολή Θετικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, 45 110, Ιωάννινα, Ελλάδα

Το propanil είναι ένα ζιζανιοκτόνο επαφής που χρησιμοποιείται μετά τη βλάστηση στο ρύζι. Ανήκει στην κατηγορία των ανιλιδών και είναι ένας φωτοσυνθετικός αναστολέας ο οποίος αναστέλλει το φωτοσύστημα II στους χλωροπλάστες. Από την άλλη πλευρά, το diazinon είναι ένα ευρέως φάσματος οργανοφωσφορικό εντομοκτόνο και νηματοδοκτόνο και χρησιμοποιείται για να ελέγχει ένα ευρύ φάσμα των παρασίτων στις καλλιέργειες. Η τοξική επίδραση του diazinon σχετίζεται με την αναστολή της ακετυλοχολινεστεράσης, ενός ενζύμου που απαιτείται για τη σωστή λειτουργία του νευρικού συστήματος. Και τα δύο φυτοφάρμακα μπορεί να καταλήξουν σε επιφανειακά ύδατα με δυνητικό κίνδυνο για τους υδρόβιους οργανισμούς, όπως το βλεφαριδοφόρο πρωτόζωο των γλυκών νερών, *Tetrahymena*, που απαντάται σε όλα τα υδάτινα οικοσυστήματα. Η *Tetrahymena pyriformis* είναι ένα σταγονοειδούς σχήματος, μονοκύτταρο, μη παθογόνο πρωτόζωο μήκους περίπου 50 μm. Το στέλεχος *pyriformis* έχει καθιερωθεί ως κατάλληλο μοντέλο σε τοξικολογικές μελέτες. Αξενικές καλλιέργειες του στελέχους αναπτύχθηκαν κάτω από διαφορετικές συγκεντρώσεις propanil και diazinon αντίστοιχα (1, 10 και 50 ppm). Η κατεργασία με 1 ppm είτε από τη μία είτε από την άλλη ένωση δεν είχε καμία επίδραση στη βιωσιμότητα των κυττάρων. Ωστόσο, μια σημαντική μείωση της βιωσιμότητας παρατηρήθηκε μετά την κατεργασία με 10 ppm. Στα 50 ppm, παρατηρήθηκε μαζικός θάνατος των κυττάρων. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των πρωτεϊνών είναι η ηλεκτροφόρηση διπλής διάστασης (2-DE). Η μέθοδος αυτή οδήγησε στην ανάλυση πολλών πρωτεϊνικών σημείων που εντοπίζονται με τη χρήση του λογισμικού Melanie II. Οι παραγόμενες πρωτεΐνες μπορεί και να σχετίζονται με το σύστημα αποτοξικοποίησης της *Tetrahymena* και μπορούν να χρησιμεύσουν ως βιοδείκτες για την εκτίμηση της τοξικότητας των φυτοφαρμάκων.

2.6 Effects of propanil and diazinon on the protozoan of aquatic ecosystems *Tetrahymena pyriformis*: A toxicological control model.

Karagiannopoulos M., Gkatzou E., Lekka M.E.

Biochemistry Laboratory, Chemistry Department, School of Sciences, University of Ioannina, 451 10 Ioannina, Greece

Propanil is a selective contact herbicide, recommended for post-emergence use in rice. It belongs to the class of anilides and is a photosynthetic inhibitor which inhibits photosystem II in chloroplasts. On the other hand, diazinon is a broad spectrum organophosphorus insecticide and nematicide used to control a diverse array of pests in crops. Diazinon's toxic effect is related to inhibition of acetylcholinesterase, an enzyme necessary for proper nervous system function. Both pesticides may end up in surface waters with potential risk for aquatic organisms, such as the freshwater ciliate *Tetrahymena*, a ubiquitous protozoan present in all aquatic ecosystems. *Tetrahymena pyriformis* is a teardrop-shaped, unicellular, non-pathogenic protozoan about 50 μm long. Strain *pyriformis* has been established as appropriate model in toxicological studies. Axenic cultures of the strain was grown under different concentrations of propanil and diazinon, respectively (1, 10 and 50 ppm). Treatment with 1 ppm from either compounds had no effect on the viability of the cells. However, a significantly reduction of cell viability was observed after treatment with 10 ppm of each. At 50 ppm, massive cell death was observed. Two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) was used for protein analysis. The method led to the analysis of several protein spots which are detected by using Melanie II software. The induced proteins can be related to detoxification system of *Tetrahymena* and may serve as biomarkers to assess toxicity of the pesticides.

Keywords: *Tetrahymena pyriformis*, Propanil, Diazinon

2.7 Ανθίσεις νερού και επιπτώσεις στην οικολογική ποιότητα νερού της Λίμνης Παμβώτιδας

Κατσιάπη Μ.¹, Στεφανίδου Ν.², Καραγιάννη Η.², Κορμάς Κ.Α.³, Μουστάκα Μ.^{1*}

¹ Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, 541 24, Θεσσαλονίκη

² Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών & Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, 451 10, Ιωάννινα

³ Τμήμα Ιχθυολογίας & Υδάτινου Περιβάλλοντος, Γεωπονική Σχολή, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, 383 34 Ν. Ιωνία Βόλος

Η υπέρμετρη αύξηση των κυανοβακτηρίων στο φυτοπλαγκτό υδάτινων σωμάτων οδηγεί στο σχηματισμό ανθίσεων νερού. Οι ανθίσεις νερού είναι το σύνηθες σύμπτωμα του ευτροφισμού και υποβάθμισης της ποιότητας νερού των λιμνών και αποτελούν συχνό φαινόμενο στις Μεσογειακές λίμνες, όπου ευνοούνται από την άνομβρη παρατεταμένη θερμή περίοδο. Στην αστική Λίμνη Παμβώτιδα, διερευνήθηκε το φαινόμενο άνθισης νερού κατά τη διάρκεια της θερμής περιόδου 2007-2011 καθώς και οι επιπτώσεις στην οικολογική ποιότητα νερού της λίμνης σύμφωνα με την Οδηγία Πλαίσιο για τα Νερά 2000/60/ΕΚ. Κατά την περίοδο έρευνας, οι ανθίσεις νερού με υψηλές τιμές βιομάζας φυτοπλαγκτού και κυρίως τα γνωστά τοξικά κυανοβακτήρια *Anabaena flos-aquae*, *Aphanizomenon flos-aquae* και είδη του γένους *Microcystis*, καθώς και ο εντοπισμός του γονιδίου *mcyA*-υπεύθυνου για την παραγωγή της κυανοτοξίνης μικροκυστίνης-καταδεικνύουν την ελλιπή οικολογική ποιότητα νερού στη λίμνη. Ακόμη, τα επίπεδα βιομάζας των κυανοβακτηρίων ξεπέρασαν τα ανώτερα όρια του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας για ασφαλή χρήση νερού σε υδάτινα σώματα που χρησιμοποιούνται για αναψυχή.

Λέξεις-κλειδιά: άνθιση νερού, κυανοβακτήρια, οικολογική ποιότητα νερού

2.7 Water blooms and their implications in the ecological water quality of Lake Pamvotis

Katsiapi M.¹, Stefanidou N.², Karayanni H.², Kormas K.A.³, Moustaka M.^{1*}

¹ School of Biology, Aristotle University of Thessaloniki, GR-541 24

² Department of Biological Applications & Technology, University of Ioannina, GR-451 10

³ Department of Ichthyology & Aquatic Environment, University of Thessaly, GR-383 34

*mmustaka@bio.auth.gr

The excessive growth of planktic cyanobacteria and their accumulation at the surface of lakes is known as 'water bloom'. Water bloom formation is the most evident symptom of eutrophicated lakes, indicative of a poor ecological water quality. In the Mediterranean region water blooms are a frequent phenomenon in eutrophic water bodies as they are favored by the extended warm period and the low precipitation. In the urban Lake Pamvotis, we investigated the occurrence of water bloom phenomena during the warm period of 2007-2011 and their implications in the lake's ecological water quality according to the Water Framework Directive 2000/60/EU. During the study period i) the development of extended water blooms with high biomass and dominated by known toxin-producing species such as *Anabaena flos-aquae*, *Aphanizomenon flos-aquae* and species of *Microcystis* and ii) the presence of the microcystin-producing gene *mcyA* indicated a poor ecological water quality. Cyanobacterial biomass exceeded the upper thresholds for safe water use recommended by Water Health Organization for recreational waters.

Keywords: water blooms, cyanobacteria, ecological water quality

2.8 Σύγκριση βακτηριακών κοινοτήτων σε ενυδρεία εκτροφής διακοσμητικών ψαριών και караβίδων

Μεζίτη Α.¹, Βλάχος Ν.², Παχιάδακη Μ.Γ.¹, Χώτος Γ.Ν.², Μεντέ Ε.¹, Κορμάς Κ.Αρ.¹

¹ Τμήμα Ιχθυολογίας Γεωπονίας & Υδάτινου Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, 384 46, Βόλος

² Τμήμα Υδατοκαλλιέργειών & Αλιευτικής Διαχείρισης, Σχολή Τεχνολογίας Γεωπονίας, Τ.Ε.Ι. Μεσολογγίου, Νέα Κτίρια, 30200, Μεσολόγγι

Στην παρούσα εργασία συγκρίθηκε η βακτηριακή ποικιλότητα και αφθονία σε ενυδρεία εκτροφής διακοσμητικών ψαριών του είδους *Archocentrus nigrofasciatus* (νερό βρύσης, θ=20°C) και караβίδων του είδους *Nephrops norvegicus* (αλμυρό νερό, θ=12 °C). Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν στην αρχή, στη μέση (30 ημέρες) και στο τέλος (60 ημέρες) των εκτροφών των καλλωπιστικών ψαριών και στην αρχή, τη μέση και το τέλος των εκτροφών των караβίδων. Η βακτηριακή ποικιλότητα αναλύθηκε με τη χρήση της 16S rRNA προσέγγισης και η βακτηριακή αφθονία μετρήθηκε με τη μέθοδο DAPI. Στο γλυκό νερό η βακτηριακή αφθονία έφτασε στα 2,9*10⁶ κύτταρα/ml στις 60 ημέρες, ενώ στο αλμυρό νερό έφτασε στη διπλάσια συγκέντρωση (5,75*10⁶ κύτταρα/ml) μέσα σε μόλις 20 ημέρες. Αυτές οι τιμές κυμαίνονται κοντά στις μέσες τιμές που ισχύουν για το γλυκό και το θαλασσινό νερό. Η βακτηριακή ποικιλότητα ήταν χαμηλότερη στα δείγματα του θαλασσινού νερού. Στο δείγμα των 20 ημερών εντοπίστηκαν μόλις 14 διαφορετικοί φυλότυποι ενώ στο δείγμα των 30 ημερών του γλυκού νερού εντοπίστηκαν 33. Αντίστοιχη ήταν και η παρουσία επικρατών φυλότυπων. Τα δείγματα του αλμυρού νερού εμφάνισαν επικρατείς φυλότυπους με συχνότητες 23,52%-47,7% από την πρώτη δειγματοληψία ενώ στο γλυκό νερό μόνο στις 60 ημέρες εμφανίστηκε ένας επικρατής φυλότυπος με συχνότητα 26,6% υποδεικνύοντας μία πιο εξειδικευμένη κοινότητα. Αυτές οι αλλαγές στη βακτηριακή αφθονία και ποικιλότητα οφείλονται σε «κάτωθεν» (bottom-up) έλεγχο, εφόσον η παρουσία θηρευτών στα ενυδρεία ήταν αμελητέα. Για αυτό το λόγο, η μεγαλύτερη συγκέντρωση διαλυμένης οργανικής ύλης που αρχικά υπήρχε στο θαλασσινό νερό, πιθανώς εξηγεί και τη γρηγορότερη εμφάνιση σταθερότερων βακτηριακών κοινοτήτων στο νερό των δεξαμενών των караβίδων. Από τη συγκριτική αυτή μελέτη φάνηκαν οι αυξομειώσεις στις συχνότητες διαφορετικών φυλότυπων μέσα στο χρόνο δείχνοντας πως σπάνιοι φυλότυποι σε κάποια δείγματα μπορούν να γίνουν επικρατείς. Αν και δεν γνωρίζουμε αν όλοι οι σπάνιοι φυλότυποι ήταν μεταβολικά ενεργοί η παρουσία τους στο σύνολο θεωρήθηκε σημαντική για τη λειτουργία των συστημάτων.

Λέξεις-κλειδιά: βακτηριακή ποικιλότητα, ενυδρεία, σύγκριση αλμυρού/γλυκού νερού

2.8 Comparison between bacterial communities of ornamental fish and Norway lobsters' aquaria

Meziti A.¹, Vlachos N.², Pachiadaki M.G.¹, Hotos G.N.², Mente E.¹, Kormas K.Ar.¹

¹ Department of Ichthyology & Aquatic Environment, School of Agricultural Sciences, University of Thessaly, 384 46 Nea Ionia, Greece

² Department of Aquaculture & Fisheries Management, Faculty of Agricultural Technology, TEI of Messolngi, Nea Ktiria, 302 00 Messolonghi, Greece

In this study water bacterial diversity and abundance was compared between aquaria of ornamental fish (*Archocentrus nigrofasciatus*, tap water, T=20°C) and Norway lobsters (*Nephrops norvegicus*, seawater, T=12°C). Water from the aquaria was sampled at the beginning, the middle (30 days) and the end (60 days) of ornamental fish rearing and at the beginning, the middle and at the end of *Nephrops* rearing. Bacterial diversity was studied using the 16S rRNA approach, while bacterial counts were performed using DAPI. In freshwater bacterial abundance reached 2,9*10⁶ cells/ml at 60 days while at seawater it was almost double (5,75*10⁶ cells/ml) the 20th day. These concentrations are close to the known average for freshwater and seawater. Bacterial diversity was lower at the seawater samples. The 20th day sample had only 14 different phylotypes while the 30th day freshwater sample had 33. Seawater samples showed dominant phylotypes (23,5%-47,7%) from the first sampling while in freshwater only after 60 days a dominant phylotype (26,6%) was detected. These changes in bacterial abundance and diversity reflect a bottom-up control of the bacterial population since the presence of bacterial grazers in the aquaria was negligible. The highest seawater dissolved organic matter concentration possibly explains the fastest appearance of more stable bacterial communities in *Nephrops* tanks. This comparative study showed the fluctuations of different phylotypes overtime, pointing how rare phylotypes in some samples are dominant in others. Although it is unknown whether all rare phylotypes were metabolically active their presence overall is considered important for the systems' functioning.

2.9 Ποικιλότητα προκαρυωτών σε βιοαλλοιωμένο ξύλο του παλαιοντολογικού δάσους Bukkabrany: Αρχικά αποτελέσματα

Νικολούλη Κ.¹, Πούρνου Α.² και Μόσιαλος Δ.^{1*}

¹ Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα

² Τμήμα Συντήρησης Αρχαιοτήτων και Έργων Τέχνης, Α.Τ.Ε.Ι Αθήνας, Αθήνα

*Email: mosial@bio.uth.gr

Το αρχαιότερο παλαιοντολογικό δάσος του κόσμου βρίσκεται στο Bukkabrany της Ουγγαρίας. Πριν από περίπου 7 εκατομμύρια χρόνια το επίπεδο της υφάλμυρης λίμνης Pannon ανέβηκε και μέρος της καλύφθηκε με σταδιακή ιζηματοπόθεση μέσω των δέλτα παρακείμενων ποταμών δημιουργώντας ένα ανοξικό περιβάλλον ώστε να διατηρηθεί το οργανικό τμήμα κορμών δέντρων ως τις μέρες μας. Δείγμα ξύλου προερχόμενο από τέτοιους κορμούς εξετάστηκε με οπτική και ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης και διαπιστώθηκε η βιοαλλοίωση του. Στη συνέχεια απομονώθηκε από το δείγμα ολικό DNA και με την χρήση παγκόσμιων εκκινητών τόσο για Βακτήρια όσο και για Αρχαία ενισχύθηκε τμήμα του γονιδίου 16S rRNA μέσω PCR. Τα προϊόντα της PCR χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή 16S rRNA βιβλιοθηκών. Ανάλυση της αλληλουχίας κλώνων των βιβλιοθηκών έδειξε μία σημαντική ποικιλότητα Βακτηρίων. Μεθυλότροφα βακτήρια (*Methylothenera* και *Methylophilus*) αποτελούν την κυρίαρχη ομάδα βακτηρίων (24/82 κλώνους). Ενδοφυτικά βακτήρια του γένους *Herbaspirillum* (12/82 κλώνους) καθώς και βακτήρια του γένους *Rhizobium* (4/82 κλώνους) και *Devosia* (1/82 κλώνους) πιθανόν να αποτελούσαν μέρος της φυσιολογικής βακτηριακής χλωρίδας του δέντρου. Τα υπόλοιπα γένη που ανιχνεύτηκαν (*Polaromonas*, *Curvibacter*, *Erythromicrobium*, *Nocosphingobium*, *Rhodofera*, *Algoriphagus*, *Asticcacaulis*, *Sulfuricella*) βρίσκονται κυρίως σε ιζήματα και πηγές γλυκού νερού και πιθανόν να αντανακλούν την μεταβολή της βακτηριακής χλωρίδας του ξύλου και του περιβάλλοντος του μετά την άνοδο της λίμνης Pannon. Επίσης για πρώτη φορά ανιχνεύτηκαν Αρχαία σε δείγμα ξύλου. Τα αρχαία που ανιχνεύτηκαν ανήκουν στο φύλο Crenarchaeota και εμφανίζουν την μεγαλύτερη σχέση με *Thermoprotei* και στο φύλο Euryarchaeota σχετιζόμενα με τα μεθανιογόνα *Methanococcales*. Το ερώτημα που εγείρεται για πρώτη φορά είναι εάν τα Αρχαία συμβάλλουν στην βιοαλλοίωση του ξύλου και ποια είναι η αλληλεπίδραση τους με τις βακτηριακές κοινότητες που εποικίζουν το ξύλο.

Λέξεις-κλειδιά: Παλαιοντολογικό Δάσος, Ποικιλότητα προκαρυωτών, Βιοαλλοίωση ξύλου, Βιβλιοθήκες 16S rRNA

2.9 Prokaryotic diversity in biodeteriorated wood coming from the paleontological forest Bukkabrany: Preliminary data

Nikolouli K.¹, Pournou A.² and Mossialos D.^{1*}

¹ Department of Biochemistry and Biotechnology, University of Thessaly, Larissa, Greece

² Department of Conservation of Antiquities and Works of Art, Technological Educational Institute of Athens, Athens, Greece

*Email: mosial@bio.uth.gr

The oldest standing palco-forest in the world is located at Bukkabrany, Hungary. A sudden rise in the water level of the brackish Lake Pannon, some 7 million years ago and the rapid sedimentation of sands from river delta that followed, covered the landscape and produced an anoxic burial environment, preserving the unmineralised trunks to the present day. Examination of wood coming from such trunks using optical and scanning electron microscopy revealed extended wood biodeterioration. Total wood DNA derived from the biodeteriorated sample was extracted and then it was used as PCR template to amplify 16S rRNA gene of prokaryotes (Bacteria and Archaea) by using universal primers. PCR products were cloned in order to construct 16S rRNA libraries. Sequence analysis of clones derived from libraries has shown significant bacterial diversity. Methylophilic bacteria (*Methylothenera* and *Methylophilus*) are the dominant group of detected bacteria (24/82 clones). Endophytic *Herbaspirillum* (12/82 clones), as well as *Rhizobium* and *Devosia* (4/82 and 1/82 clones respectively) might be part of the normal bacterial flora that could be found in the tree. The rest of bacteria which have been detected (*Polaromonas*, *Curvibacter*, *Erythromicrobium*, *Nocosphingobium*, *Rhodofera*, *Algoriphagus*, *Asticcacaulis*, *Sulfuricella*) are commonly isolated from water habitats, possibly reflecting the shift of bacterial flora that occurred in the wood and its close environment after the rise of Lake Pannon. Moreover Archaea were detected in wood for the first time. Detected Archaea belong to Crenarchaeota related to Thermoprotei and Euryarchaeota related to *Methanococcales*. These findings raise for the first time the question of possible contribution of Archaea in wood biodeterioration as well as possible interactions of Archaea with bacterial communities which colonise wood.

2.10 Φυσιολογία και μοριακά ποικιλομορφία Ομάδων Βλαστητικής Συμβατότητας του *Verticillium dahliae*

Παπαϊωάννου Ι.Α., Τύπας Μ.Α.

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

Ο εδαφογενής φυτοπαθογόνος μύκητας *Verticillium dahliae* προκαλεί αδρομύκωση σε περισσότερους από 200 ξενιστές διεθνώς. Η ανεπαρκής κατανόηση της πληθυσμιακής δομής του παθογόνου έχει αποτελέσει τροχοπέδη στην ανάπτυξη και την εφαρμογή αποτελεσματικών διαχειριστικών πρακτικών με στόχο τον έλεγχό του. Η κατάταξη απομονώσεων του μύκητα σε Ομάδες Βλαστητικής Συμβατότητας (VCGs), με βάση την επιδεκτικότητα τους στη μεταξύ τους σύντηξη των υφών προς δημιουργία βιώσιμων ετεροκαρύων, έχει καθιερωθεί την τελευταία εικοσαετία ως ένα ισχυρό εργαλείο για τη μελέτη της γενετικής ποικιλότητας και δομής μεταξύ πληθυσμών του μύκητα. Στην παρούσα εργασία μελετήσαμε την κατάταξη σε ομάδες VCGs ενός εκτεταμένου ελληνικού πληθυσμού του *V. dahliae*, εμπλουτισμένου με διεθνή στελέχη ελέγχου. Παρατηρήθηκε ιδιαίτερα μεγάλη συχνότητα αντιδράσεων «διασύνδεσης», οι οποίες εκφράζονταν με την ανάπτυξη σε ποικίλο βαθμό μυκηλιακών υφών ή μικροσκληρωτίων στο κοινό μέτωπο στελεχών που ανήκαν σε διαφορετικές ομάδες VCGs. Προκειμένου να διαλευκανθεί κατά πόσον τέτοιες «ασθενείς» αλληλεπιδράσεις διαταράσσουν τη γενικώς αποδεκτή γενετική απομόνωση μεταξύ των ομάδων VCGs, χαρακτηρίσαμε τη μοριακή ποικιλομορφία τόσο μεταξύ όσο και εντός των ομάδων VCGs, με τον συνδυασμό της μελέτης πολυμορφισμών RFLP της περιοχής ITS, του προσδιορισμού αλληλουχιών IGS, αναλύσεων πολυμορφισμού AFLPs και εφαρμογής μίας σειράς πληροφοριακών μοριακών δεικτών βασιζόμενων στην PCR. Τα αποτελέσματά μας υποδεικνύουν πως οι πληθυσμοί του *V. dahliae* εμφανίζουν σχετικά αυστηρή κλωνική δομή, ενώ η γενετική απομόνωση χαρακτηρίζει υπο-ομάδες των VCGs και όχι τις ευρύτερες ομάδες, όπως ήταν στο παρελθόν ευρέως αποδεκτό. Η γενική φύση των συχνά παραπλανητικών δευτερευουσών αλληλεπιδράσεων που παρατηρήθηκαν θα μπορούσε να αποδοθεί στον σχηματισμό ετεροπλασμάτων, σε παροδική ετεροκαρύωση ή σε ατελείς/καθυστερημένες, καταστροφικές για το κύτταρο, αντιδράσεις ασυμβατότητας.

Λέξεις-κλειδιά: VCGs, πληθυσμιακή δομή, μοριακή ποικιλομορφία

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

2.10 Physiology and molecular variability within and among *Verticillium dahliae* Vegetative Compatibility Groups

Papaioannou I.A., Typas M.A.

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

Verticillium dahliae is an ascomycete causing vascular wilt diseases in a broad range of plant species worldwide. Inadequate understanding of its population structure has hindered efficient management of the pathogen. Assignment of isolates to Vegetative Compatibility Groups (VCGs), based on the competence of individuals to undergo hyphal anastomosis to the establishment of heterokaryons, has been widely adopted over the past 20 years, as a powerful tool for examining genetic diversity and structure among fungal populations. In this work, we studied the VCGs distribution of an international *V. dahliae* population. A markedly high incidence of “bridging” interactions, expressed with a varying extent of complementation along the mycelial interface of strains of different VCGs, was observed. In order to examine whether such “weak” interactions hamper the generally accepted genetic isolation of VCGs, we characterized inter- and intra-VCG molecular variability with ITS-RFLP, IGS sequencing, AFLP analysis and a set of PCR markers. Our results indicate that *V. dahliae* populations are highly structured and clonal, and that VCG subgroups instead of VCGs should be regarded as genetically isolated clonal sub-populations, contrary to what was previously believed. The genetic nature of secondary interactions, putatively attributed to the formation of heteroplasmons, transitory heterokaryosis or incomplete/late cytoplasmic killing reactions, is discussed.

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

2.11 Η επίδραση της βροχόπτωσης στη μικροβιακή κοινότητα σε θαλάσσια ύδατα και άμμο της παραλίας Βάρκιζας-Αττική

Παράσχος Γ., Κατσιφάς Ε., Καραγκούνη Α.Α.

Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Βιολογίας, Τομέας Βοτανικής, Ομάδα Μικροβιολογίας, 157-01, Πανεπιστημιούπολη, Αθήνα, Ελλάδα

Email: akar@biol.uoa.gr

Η μικροβιακή κοινότητα του νερού αλλάζει δραστικά μετά από βροχοπτώσεις και αυτό μπορεί να επιφέρει πιθανούς κινδύνους για τη δημόσια υγεία. Τα περιττωματικά βακτήρια χρησιμοποιούνται ως δείκτες για τον ποιοτικό έλεγχο των θαλασσιών υδάτων, καθώς έχει αποδειχθεί ότι σχετίζονται με ασθένειες που προκαλούνται με την κολύμβηση. Η παραλία της Βάρκιζας (22 χλμ νότια της Αθήνας) επελέγη για την παρούσα μελέτη λόγω του μεγάλου αριθμού λουομένων που συγκεντρώνει ετησίως, της γειννίας με την Αθήνα και του βραβείου 'Γαλάζια σημαία' που έχει κερδίσει. Η μελέτη αυτή είναι μια πρώτη αξιολόγηση των μικροβιακών δεικτών και των παθογόνων βακτηρίων στην παραλία της Βάρκιζας, καθώς και των επιπτώσεων της βροχόπτωσης στη μικροβιακή κοινότητα. Τα δείγματα συλλέχθηκαν τον Ιούλιο του 2010, τον Φεβρουάριο του 2011 και τον Ιούλιο του 2011 από βάθος περίπου 30 εκατοστών σε συνθήκες ξηρασίας και 24 ώρες μετά τη βροχόπτωση. Τα δείγματα της άμμου συλλέχθηκαν πάνω από το επίπεδο της θάλασσας. Τρία διαφορετικά σημεία της παραλίας επιλέχθηκαν για τη συλλογή των δειγμάτων. Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για καλλιέργεια των βακτηρίων αρχικά διηθήθηκαν, ενώ στη συνέχεια τα φίλτρα τοποθετήθηκαν σε εκλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα και επωάστηκαν σύμφωνα με τυποποιημένα διεθνή πρωτόκολλα. Τα δείγματα για ανάλυση νουκλεϊκών οξέων διηθήθηκαν και έγινε απομόνωση DNA. Οι βακτηριακές συγκεντρώσεις υπολογίστηκαν σε αποικίες (CFU) ανά 100 ml νερού ή αποικίες (CFU) ανά γραμμάριο ξηρής άμμου. Οι ειδικοί εκκινητές PCR για το 16S rDNA ήταν οι F984GC και R1378, ενώ τα προϊόντα της PCR διαχωρίστηκαν σε πήκτωμα ακρυλαμίδης με κλίση αποδιατακτικού παράγοντα (DGGE). Τα παραπάνω αποτελέσματα, αξιολογήθηκαν σύμφωνα με ειδικές περιβαλλοντικές συνθήκες.

Λέξεις-κλειδιά: θαλάσσια ύδατα, βροχόπτωση, παθογόνα

2.11 The effect of precipitation on the microbial community in marine waters and sand at the beach of Varkiza-Attica

Paraschas G., Katsifas E., Karagouni A.D.

National and Kapodistrian University of Athens, Faculty of Biology, Department of Botany, Microbiology Group, 157-01, Panepistimiopolis, Athens, Greece

Email: akar@biol.uoa.gr

The microbial water quality of beaches drastically changes after rainstorms and this may have potential risks for public health. Faecal indicator bacteria are being used to monitor the water quality of marine beaches as they have been shown to correlate with swimming related diseases. The beach of Varkiza (22 km south of Athens) was selected for this study due to the large number of bathers which gathers annually, its proximity to Athens and its 'Blue Flag' award. This study is an initial evaluation of the presence of indicator microbes and pathogens at the recreational marine beach of Varkiza and the effects of rainfall in microbial community. Samples were collected in July 2010, in February 2011 and in July 2011 from knee-deep water both in dry weather and 24 h after the rainfall. Sand samples were collected above the high water mark. Three different sites of the beach were used for water and sand collection. The samples for bacterial culture analysis were filtered and the filters were placed on selective media and incubated according to standard membrane filtration protocols. Samples for nucleic acid analysis were filtered and used for DNA extraction. Concentrations of bacteria were calculated in terms of colony forming units (CFU) per 100 ml of water or CFU per gram of dry sand. The specific PCR primers used for 16S rDNA were F984GC and R1378 and the PCR products were separated by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). The above results were evaluated according to specific environmental conditions.

Keywords: marine habitat, precipitation, pathogens .

2.12 Βακτήρια μηλογαλακτικής ζύμωσης και βιογενείς αμίνες στους Ελληνικούς οίνους

Πραματεφτάκη Π., Μετάφα Μ., Καραπέτρου Γ., Μαρμαράς Γ.

Ινστιτούτο Οίνου, Εθνικό Ίδρυμα Αγροτικής Έρευνας, Σ. Βενιζέλου 1, 14123 Λυκόβρυση-Αττικής

Η μηλογαλακτική ζύμωση (ΜΓΖ) αναφέρεται στη βιοχημική μετατροπή του L-μηλικού οξέος σε L-γαλακτικό οξύ που συμβαίνει συνήθως μετά την αλκοολική ζύμωση (ΑΖ) κατά τη διάρκεια της οινοποίησης των ερυθρών κυρίως οίνων. Πραγματοποιείται από τα γαλακτικά βακτήρια και τα οφέλη είναι η μείωση της οξύτητας, η βελτίωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών των οίνων και η αυξημένη μικροβιακή σταθερότητα μετά την εμφιάλωση. Στο θερμό κλίμα της χώρας μας η ΜΓΖ έχει τύχει περιορισμένης προσοχής. Παρά το γεγονός ότι τα τελευταία χρόνια γίνεται περισσότερη προσπάθεια για τον έλεγχο των ΜΓΖ με τη χρησιμοποίηση εμπορικών βακτηριακών σκευασμάτων σε πολλές περιπτώσεις η κατανάλωση του μηλικού οξέος από τα γαλακτικά βακτήρια αρχίζει αυθόρμητα μετά την αλκοολική ζύμωση. Μοριακές τεχνικές (PFGE, PCR, DNA sequencing) και ανάλυση με υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC) χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη της ποικιλότητας των αυτοχθόνων γαλακτικών βακτηρίων που αναπτύχθηκαν κατά τη διάρκεια αυθόρμητων ΜΓΖ ελληνικών ερυθρών οίνων καθώς και για την αξιολόγηση των δυνατοτήτων τους να παράγουν βλαβερές βιογενείς αμίνες. Η μελέτη της ποικιλότητας των αυτοχθόνων στελεχών του είδους *Oenococcus oeni* κατέδειξε ότι σε κάθε σχεδόν οινοποιείο είναι εγκατεστημένη μία ορισμένη τοπική βακτηριακή χλωρίδα η οποία εμφανίζει ισχυρή επικράτηση στις αυθόρμητες ΜΓΖ. Ο βαθμός ανίχνευσης εμπορικών βακτηριακών στελεχών μεταξύ των αυτοχθόνων βακτηρίων αυξάνεται με την αυξημένη χρήση τους χωρίς όμως να περιορίζεται η βιοποικιλότητα των φυσικών πληθυσμών. Για την πλειονότητα των οίνων η πραγματοποίηση αυθόρμητης ΜΓΖ είχε ως αποτέλεσμα αμελητέες αλλαγές στα επίπεδα των επτά βιογενών αμινών που μελετήθηκαν, με εξαίρεση την πουτρεσκίνη. Παρουσιάζουμε δεδομένα που αποδεικνύουν ότι ένας πολύ περιορισμένος αριθμός αυτοχθόνων στελεχών του είδους *O. oeni* είναι ικανά να συμβάλλουν στην συσσώρευση πουτρεσκίνης στους ελληνικούς ερυθρούς οίνους. Αντίθετα, όλα τα ελληνικά βακτηριακά στελέχη που μελετήθηκαν βρέθηκαν ανίκανα να παράγουν ισταμίνη & τυραμίνη σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της ανίχνευσης των δύο αυτών ΒΑ στους οίνους.

Λέξεις-κλειδιά: μηλογαλακτική ζύμωση, γαλακτικά βακτήρια, βιογενείς αμίνες

2.12 Malolactic bacteria and biogenic amines in Greek red wines

Pramateftaki P.V., Metafa M., Karapetrou G., Marmaras G.

Wine Institute of Athens, National Agricultural Research Foundation, S. Venizelou 1, Lykovrissi 14123, Greece

In wines, malolactic fermentation (MLF) refers to the biochemical decarboxylation of L- malic acid to L-lactic acid that occurs after alcoholic fermentation and it is implemented by lactic acid bacteria. Although in recent years much effort is placed towards the control of MLF in most cases spontaneous malic acid consumption is commencing following alcoholic fermentation. Molecular techniques and HPLC analysis were used to study the genetic polymorphism of autochthonous LAB developing during spontaneous MLF of Greek red wines and for the assessment of their potential to produce harmful biogenic amines. Native *Oenococcus oeni* isolates appeared very much adapted to specific winery conditions since the majority of spontaneous MLF were driven mostly or exclusively by a single strain of *O. oeni* and this strong dominance was reversible affected by the frequency of bacterial starters used in wineries. Native *O. oeni* strains showed only limited dispersion since cluster analysis uncovered only few common genotypes among indigenous isolates from different wineries. The genotype of the most frequently used malolactic starter was detected in higher frequencies among autochthonous isolates without nevertheless compromising the biodiversity of natural microflora residing in wineries but rather becoming a part of it. For the majority of the wine samples studied, MLF implementation and storage in bottles resulted in negligible changes on the levels of the six BA histamine, tyramine, methylamine, ethylamine, isobutylamine, phenylethylamine. However, we provide evidence that autochthonous *O. oeni* isolates can contribute to putrescine accumulation in Greek red wines but still the specific trait behaves as strain-specific with a limited dispersion.

2.13 Γενετική και φαινοτυπική ποικιλομορφία ριζοβίων απομονωμένων από φυμάτια αυτοφυών φυτών *Medicago marina* συλλεγμένων από αμμοθίνες Ελληνικών νησιών

Σκαγιά Α., Βενιεράκη Α., Βεζύρη Ε., Δήμου Μ., Κεφαλογιάννη Η., Θανάπουλος Ρ., Χατζηπαυλίδης Ι., Γεωργακόπουλος Δ. και Κατινάκης Π*.

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

Το γένος *Medicago* L ανήκει στην οικογένεια Fabaceae και περιλαμβάνει περίπου 83 είδη συμπεριλαμβανομένου της *M. sativa* (alfalfa) και του ψυχανθούς-μοντέλου *M. truncatula*. Ο τόπος καταγωγής του *Medicago* ήταν τα βόρεια παράλια της Μεσογείου αν και προηγούμενες μελέτες την τοποθετούν στην περιοχή του Καυκάσου. Τα περισσότερα είδη απαντώνται στη λεκάνη της Μεσογείου, τα Ανατολικά Βαλκάνια, την Αραβική Χερσόνησο, Ιράκ και Κεντρική και Ανατολική Ασία. Στην Ελλάδα, τα είδη *Medicago* βρίσκονται φυσικώς κατανεμημένα και ευρέως απαντώμενα στη φυσική χλωρίδα, μετρώντας 7 πολυετή και 25 ετήσια είδη. Η *Medicago marina* είναι ευρέως εξαπλωμένη σε πολλά παραλιακά ενδιαιτήματα στην Ελλάδα και άλλες Μεσογειακές χώρες. Αν και η *M. marina* είναι τόσο εξαπλωμένη στη λεκάνη της Μεσογείου, ελάχιστες εργασίες έχουν πραγματοποιηθεί όσον αφορά στα συμβιωτικά τους ριζόβια. Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε η γενετική ποικιλομορφία των ριζοβίων που συμβιώνουν στα φυμάτια αυτοφυών φυτών *M. marina*, τα οποία συλλέχθηκαν από παραλιακές αμμοθίνες της Ελλάδας. Τα στελέχη αυτά προσδιορίστηκαν μοριακά βάση της ανάλυσης των γονιδίων 16S rRNA, ITS1, *nifH*, *nodC* όπως επίσης και βάση των προτύπων από τη χρήση REP-PCR. Επιπροσθέτως, μελετήθηκε η ανεκτικότητα των στελεχών στην αλατότητα και τη θερμοκρασία, όπως επίσης και η ικανότητά τους για συλλογική κίνηση σε επιφάνειες.

2.13 Genetic and phenotypic diversity and swarming ability of native rhizobium species isolated from nodules of *Medicago marina* growing in coastal sandy dunes of Greek islands.

Skagia A., Venieraki A., Vezyri E., Dimou M., Kefalogianni I., Thanopoulos R., Chatzipavlidis I., Georgakopoulos D. and Katinakis P*.
Laboratory of General and Agricultural Microbiology, Dept. of Agricultural Biotechnology, Agricultural University of Athens, Iera Odos 75, Votanikos 11855, Athens, Greece

The genus *Medicago* L belongs to Fabaceae family and contains about 83 species that include the forage legume *M. sativa* (alfalfa) and the legume model species *M. truncatula*. The area of origin of *Medicago* was the Northern coast of Mediterranean although previous studies placed it in Caucasus region. Most species are currently found in Mediterranean basin, the Eastern Balkans and the Arabian Peninsula, Iraq, and central and eastern Asia. In Greece, *Medicago* species are naturally distributed and widely represented in the native flora, counting seven perennial and twenty-seven annual species. *Medicago marina* is widespread in many coastal habitats in Greece and other Mediterranean countries. Although, *M. marina* is widespread in the Mediterranean basin, few studies are dealing with *M. marina*-nodulating rhizobia. In this study the genetic diversity of rhizobia species nodulating natural populations of *M. marina* grown in coastal sand dune systems in Greece was assessed using 16S rRNA, ITS1, *nifH* and *nodC* analysis as well as REP-PCR. Furthermore the salt and temperature tolerance along with the swimming and swarming properties of the isolated strains was assessed.

Keywords: *Sinorhizobium meliloti*, *Medicago marina*, swarming

2.14 Δυναμική μικροβιακών πληθυσμών και ποικιλότητα κατά τη συγκομποστοποίηση αγροτοβιομηχανικών υποπροϊόντων και υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων

Σκιαδά Β.¹, Κεφαλογιάννη Η.², Ευθυμίου Α.², Ξεξάκης Κ.², Βενιεράκη Α.², Βεζύρη Ε.², Δήμου Μ.², Γεωργακάκης Δ.¹, Κατινάκης Π.², & Χατζηπαυλίδης Ι.²

Εργαστήριο Γεωργικών Κατασκευών, Τμήμα Αξιοποίησης Φυσικών Πόρων και Γεωργικής Μηχανικής, Εργαστήριο Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας, Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιερά Οδός 75, 11855 Αθήνα

Η κομποστοποίηση είναι η αερόβια μικροβιολογική αποικοδόμηση και σταθεροποίηση των οργανικών υποστρωμάτων υπό συνθήκες που επιτρέπουν την ανάπτυξη υψηλών θερμοκρασιών, ως αποτέλεσμα της βιολογικά παραγόμενης θερμότητας. Η μικροβιακή ποικιλότητα και οι φυσικοχημικοί παράμετροι που την επηρεάζουν διερευνήθηκαν κατά τη διάρκεια κομποστοποίησης και συγκομποστοποίησης αγροτοβιομηχανικών υποπροϊόντων και υγρών απόβλητων ελαιοτριβείων. Δημιουργήθηκαν δύο σωροί. Στον πρώτο (σωρός 1) χρησιμοποιήθηκαν Υπολείμματα Εκκοκκιστηρίου Βάμβακος (ΥΕΒ), ενώ στον δεύτερο (σωρός 2) χρησιμοποιήθηκαν ΥΕΒ η διαβροχή των οποίων έγινε με Υγρά Απόβλητα Ελαιοτριβείου (ΥΑΕ). Οι φυσικοχημικοί παράμετροι που μελετήθηκαν ήταν η θερμοκρασία, η υγρασία, το pH, η ηλεκτρική αγωγιμότητα, το ολικό, το αμμωνιακό και το νιτρικό άζωτο. Η ολική ενεργή μικροβιακή χλωρίδα κατά τα διάφορα στάδια της κομποστοποίησης εκτιμήθηκε με την αναπνευστική δραστηριότητα (ηλεκτρολυτικό αναπνευσόμετρο). Η μικροβιακή διαδοχή, στις διαφορετικές φάσεις της κομποστοποίησης των δύο σωρών, αποτυπώθηκε με την εκτίμηση των πληθυσμών των ολικών βακτηρίων, των σποριογόνων βακτηρίων, των κυτταρινολυτικών μικροοργανισμών, των αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων, των μυκήτων και των ακτινομυκήτων. Ο σωρός 2 ανέπτυξε υψηλότερες θερμοκρασίες σε σχέση με το σωρό 1. Η μέγιστη θερμοκρασία παρατηρήθηκε την 4^η ημέρα της κομποστοποίησης και ήταν 52 και 59 °C για το σωρό 1 και 2 αντίστοιχα. Οι πληθυσμοί όλων των μικροβιακών ομάδων ήταν γενικά χαμηλότεροι στο σωρό 2 σε όλα τα στάδια της κομποστοποίησης. Εντούτοις, οι πληθυσμιακές διακυμάνσεις των μικροβιακών ομάδων είχαν παρόμοια εξέλιξη. Ακολούθησε προσδιορισμός των απομονωθέντων αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων, μυκήτων και κυτταρολυτικών βακτηρίων με μοριακές τεχνικές.

2.14 Microbial population dynamics and diversity during co-composting process of agro-industrial residues and Olive Mill Wastewaters

Skiada V.¹, Kefalogianni I.², Efthymiou A.², Xexakis K.², Venieraki A.², Vezyri E.², Dimou M.², Georgakakis P.¹, Katinakis P.² and Chatzipavlidis I.²

Agricultural University of Athens, ¹Department of Natural Resources and Reclamations, ²Department of Agricultural Biotechnology, Laboratory of General and Agricultural Microbiology, Iera Odos 75, 11855 Athens

The microbial diversity and physicochemical parameters (temperature, moisture, pH, electrical conductivity, total nitrogen, ammonium and nitrates), were studied at different stages of composting and co-composting processes of agro-industrial residues. Two different piles were obtained. The first (Pile 1) consisted of ginned cotton residues. For the second (Pile 2) ginned cotton residues were co-composted with Olive Mill Wastewaters (OMW). Total active microflora was evaluated by electrolytic respirometer during composting process. The microbial evolution during the different composting stages of the two Piles were assessed by estimating the changes of the population levels of bacteria (total, spore forming and nitrogen fixing), cellulolytic microorganisms, fungi and actinomycetes. Higher temperatures were measured in Pile 2 as comparing to Pile 1. Maximum temperature was observed at the 4th day of composting process for both Piles and reached 52 and 59°C for Pile 1 and 2 respectively. During the composting process, population levels were lower in Pile 2 than those in Pile 1. However, microbial population fluctuations were evolved in a similar way. The taxonomic position of the isolated nitrogen fixing bacteria, fungi and cellulolytic bacteria was assessed by molecular approaches.

2.15 Συμβολή του μονοκύτταρου φυτοπλακτονικού οργανισμού *Dunaliella tertiolecta* στο πεδίο της οικολογικής τοξικότητας των στραγγισμάτων

Τσαρπαλή Β., Κονταλή Μ. & Νταϊλιάνης Στ.

Τομέας Βιολογίας Ζώων, Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Πατρών, 26500, Πάτρα

Το μικροφύκος *Dunaliella tertiolecta* χρησιμοποιείται ευρύτατα σε τοξικολογικές μελέτες, λόγω του σημαντικού οικολογικού του ρόλου και της ευαισθησίας του. Στην παρούσα μελέτη διερευνώνται οι πιθανές επιπτώσεις των στραγγισμάτων που προέρχονται από χώρους υγειονομικής ταφής αποβλήτων (ΧΥΤΑ) στον συγκεκριμένο οργανισμό. Συγκεκριμένα, μετά από έκθεση του μικροφύκου σε διαφορετικές συγκεντρώσεις στραγγισματος (6,25% -12,5% -25% -50% -70% -100% v/v) για χρονικό διάστημα 24, 48, 72 και 96 h εξετάστηκαν α) ο αριθμός των κυττάρων, β) η εμφάνιση μορφολογικών αλλοιώσεων και γ) ο ρυθμός παρεμπόδισης της ανάπτυξης τους (IC50) σε σχέση με άτομα που δεν εκτέθηκαν στο στράγγισμα, σε κάθε περίπτωση. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση τόσο του ρυθμού αύξησης των κυττάρων όσο και του ρυθμού ανάπτυξης του μικροφύκου με το πέρασμα του χρόνου, καθώς και με τη συγκέντρωση του στραγγισματος στο οποίο εκτέθηκαν. Συγκεκριμένα, έκθεση του οργανισμού σε συγκεντρώσεις στραγγισματος μεγαλύτερες από 25% v/v έδειξαν σημαντική αύξηση του ρυθμού παρεμπόδισης ($IC_{50-96h}=35$ v/v). Παράλληλα, σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες του 70% v/v παρατηρήθηκε μείωση του ρυθμού αύξησης, λόγω λύσης των κυττάρων, η οποία οφείλεται στην καταστροφή της κυτταρικής μεμβράνης τους. Ο χρόνος έκθεσης στα στραγγίσματα φαίνεται πως έχει αρνητική επίδραση στον ρυθμό αύξησης, καθώς μειωνόταν ανά εικοσιτετράωρο ($IC_{50} 24h = 53.12$ v/v ενώ $IC_{50} 96h = 35,09$ v/v). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, ο μονοκύτταρος οργανισμός *D. tertiolecta* μπορεί να αποτελέσει ένα πολύ καλό δείκτη για τη μελέτη της τοξικής επίδρασης των στραγγισμάτων από ΧΥΤΑ, μιας και οι διαφορές στον τρόπο απόκρισης του οργανισμού συμβάλλουν στην καλύτερη κατανόηση της επίδρασης του τοξικού παράγοντα.

Λέξεις-κλειδιά: Μικροφύκος, στράγγισμα, τοξικότητα

2.15 Contribution of the unicellular alga *Dunaliella tertiolecta* on the field of ecotoxicology: investigation of landfill leachate toxicity

Tsarpali V., Kontali M. & Dailianis S.

Section of Animal Biology, Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Patras, 26500, Greece

The unicellular alga *Dunaliella tertiolecta* boasts an important ecologic role, thus representing a reliable organism for ecotoxicology. The selected organism respond to a wide range of xenobiotics and could easily cultivated under laboratory conditions. The aim of the present study was to investigate the toxic effects of landfill leachate on *Dunaliella tertiolecta*. According to the results of the present study, algae exposed for different periods of time (24, 48, 72 and 96h) to different concentrations of leachate (e.g. 6,25% -12,5% -25% -50% -70% -100% v/v), showed significant alterations in their growth rates. Specifically, algae analysed under the microscope, showed morphological abnormalities, as well as significantly increased levels of growth inhibition rate (IC50), with respect to the control culture. In fact, algae exposed to low leachate concentrations (6,25-12,5% v/v), revealed no observable effects, while higher concentrations (25% - 50%), showed increased levels of IC50 values (IC_{50} at 96h =35,09% v/v). Exposure of algae to concentrations higher than 70% v/v revealed significant levels of cell lysis, probably due to disturbances occurred in cellular structure and function. Moreover, growth rate of algae showed a time-dependent decrease (e.g IC_{50} at 24h = 53.12% v/v and IC_{50} at 96h= 35,09 % v/v). The results of the present study showed that the unicellular alga *Dunaliella tertiolecta* could provide a helpful tool in determining the effects of toxic compounds commonly found in the landfill leachates, thus possessing a reliable and sensitive organism-bioindicator of the aquatic environment.

2.16 Μοριακός χαρακτηρισμός στελεχών μυκήτων απομονωμένων από σύστημα ενεργού ιλύος περιοδικής τροφοδοσίας και εναλλασσόμενου αερισμού

Χατζηκαμάρη Μ., Μελίδης Π., Ντούγιας Σ.

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

Με δεδομένο ότι η οικολογία του πληθυσμού των μυκήτων σε συστήματα επεξεργασίας αστικών λυμάτων παραμένει σχεδόν ανεξερεύνητη, απομονώθηκαν στελέχη μυκήτων από σύστημα ενεργού ιλύος περιοδικής τροφοδοσίας και εναλλασσόμενου αερισμού που περαιτέρω χαρακτηρίστηκαν με τη χρήση μοριακών τεχνικών. Πραγματοποιήθηκε απαρίθμηση και απομόνωση των στελεχών μυκήτων με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων σε θρεπτικό υπόστρωμα PDA παρουσία χλωραμφαινικόλης. Για το χαρακτηρισμό των στελεχών μυκήτων πραγματοποιήθηκε εξαγωγή γενωμικού DNA, ενίσχυση του τμήματος ITS1 - 5.8S rDNA - ITS2 με τη βοήθεια της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης, προσθήκη ένθετου DNA σε πλασμιδιακό φορέα, μετασηματισμός ικανών κυττάρων *E. coli* και αλληλούχιση του τμήματος ITS1 - 5.8S rDNA - ITS2. Ακολούθησε φυλογενετική ανάλυση και κατασκευή φυλογενετικού δένδρου. Ο πληθυσμός των μυκήτων εκτιμήθηκε σε 3×10^3 cfu ανά ml μικτού υγρού μονάδας περιοδικής τροφοδοσίας και εναλλασσόμενου αερισμού. Η πλειονότητα των μικροοργανισμών ανήκαν στο γένος *Trichosporon*, τα δε υπόλοιπα στελέχη που χαρακτηρίστηκαν σχετίζονταν φυλογενετικά με στελέχη των γενών *Galactomyces*, *Humicola* και *Pseudallescheria*. Εκτός των απομονώσεων που σχετίζονταν φυλογενετικά με το γένος *Galactomyces* που απαντώνται συχνά σε φυτικά υπολείμματα, διαδικασίες διάσπασης μεγαλομοριακών οργανικών ενώσεων καθώς και σε δύσκολως βιοδιασπώμενα οργανικά υλικά, ανθρωπογενής θεωρείται η προέλευση των στελεχών που ανήκαν στα γένη *Trichosporon*, *Humicola* και *Pseudallescheria*. Τα γένη αυτά θεωρούνται εν δυνάμει παθογόνα του ανθρώπου, γεγονός που συνάδει με την προέλευση του επεξεργασμένου αποβλήτου (αστικό λύμα). Η παρούσα έρευνα αποτελεί την πρώτη διερεύνηση του πληθυσμού των μυκήτων σε συστήματα νιτροποίησης - απονιτροποίησης.

Λέξεις-κλειδιά: μύκητες, αστικό λύμα, σύστημα ενεργού ιλύος

2.16 Molecular characterization of fungi isolated from an intermittently aerated and fed activated sludge system

Chatzikamari M., Melidis P. and Ntougias S.

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

Considering that the population ecology of fungi in municipal sewage treatment systems remains almost unexplored, fungal strains were isolated from a bench-scale intermittently aerated and fed activated sludge system and were further characterized by molecular techniques. The isolation of fungi was performed by the plate count method, using PDA (supplemented with chloramphenicol) as the growth medium. Genomic DNA was extracted from each fungal isolate obtained and fungal identification was based on the sequencing of the ITS1 - 5.8S rRNA gene - ITS2 region. Multiple datasets of nucleotide sequences were further subjected to phylogenetic analysis. Fungal population was estimated to be 3×10^3 cfu per ml mixed liquor. The majority of microorganisms identified belonged to the genus *Trichosporon*, while the remaining fungal strains analyzed were associated with members of the genera *Galactomyces*, *Humicola* and *Pseudallescheria*. Members of the genus *Galactomyces* are commonly found in plant debris and decay processes of organic macromolecules and non-easily biodegradable organic materials, while members of the genera *Trichosporon*, *Humicola* and *Pseudallescheria* are potential human pathogens, and therefore their presence is favored in municipal wastewater. This is the first report on the fungal population in nitrification-denitrification activated sludge systems.

Keywords: fungi, municipal wastewater, activated sludge system

3. ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

3. BIOTECHNOLOGICAL APPLICATIONS

3.1 Κατασκευή βιοφωταυγών μικροβιακών βιοαισθητήρων για παρακολούθηση ενζυματικής επεξεργασίας συστατικών των τροφίμων

Lukasiak J.¹, Γεωργίου Κ. Α.², Olsen K.³, Γεωργακόπουλος Δ.Γ.¹

¹Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας, ²Γενικό Τμήμα, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών ³Center for Advanced Food Studies, University of Copenhagen, Δανία (dgeorga@aua.gr)

Οι μικροβιακοί βιοαισθητήρες είναι αναλυτικά εργαλεία αποτελούμενα από ένα βιολογικό στοιχείο αναγνώρισης (μικροοργανισμός) και ένα στοιχείο μεταβίβασης σήματος (βιοφωταύγεια) το οποίο μετατρέπει ένα βιοχημικό σήμα σε μετρήσιμη απόκριση. Στη βιομηχανία τροφίμων χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση της ασφάλειας τροφίμων ή της περιβαλλοντικής μόλυνσης. Χρησιμοποιούνται όμως ελάχιστα για την εκτίμηση συγκέντρωσης συγκεκριμένων ουσιών σε δείγματα τροφίμων. Στην παρούσα μελέτη περιγράφεται η ανάπτυξη βιοαισθητήρων που θα χρησιμοποιηθούν σε συσκευή για την online παρακολούθηση ενζυματικής διάσπασης της πηκτίνης με καταμέτρηση των παραγόμενων σακχάρων και γαλακτουρονικού οξέως. Χρησιμοποιήσαμε δύο προσεγγίσεις για την κατασκευή των βιοαισθητήρων: απόκριση σε συγκεκριμένες ουσίες είτε μέσω επαγωγής βιοφωταύγειας, είτε μέσω μείωσης βιοφωταύγειας. Οι βιοαισθητήρες επαγωγής κατασκευάστηκαν μετά από εισαγωγή επαγόμενου υποκινητή (*rhaB* για ραμνόζη, *xylA* για ξυλόζη) ανωφερικά του οπερονίου *lux* του *Vibrio fischeri*. Η απόκριση του βιοαισθητήρα βελτιώθηκε μέσω της αύξησης του μεγέθους του τμήματος DNA που έφερε τον υποκινητή. Η απόκριση των βιοαισθητήρων στις ουσίες-στόχους έφθασε το 200x σε αναλογία με τον μάρτυρα. Η εξειδίκευσή τους ως προς την απόκριση δοκιμάστηκε με 7 άλλους υδατάνθρακες που εμφανίζονται κατά την ενζυματική επεξεργασία της πηκτίνης. Οι βιοαισθητήρες είχαν την επιθυμητή εξειδίκευση και ποσοτική απόκριση σε διαφορετικές συγκεντρώσεις των στόχων. Κατασκευάστηκαν καμπύλες βαθμονόμησης για συγκεντρώσεις αναλυτών 1μM-10mM. Ο δεύτερος τύπος βιοαισθητήρων κατασκευάστηκε τοποθετώντας υποκινητή επαγόμενο από αραβινόζη (*araB*) μπροστά από το γονίδιο *ccdB* το οποίο επιφέρει τον θάνατο του *E. coli* όταν εκφράζεται. Κατόπιν, το πλασμίδιο αυτό εισήχθη σε τροποποιημένο *E. coli* που εκφράζει συνεχώς την βιοφωταύγεια, λόγω της ενσωμάτωσης της κασέτας *lux* στο γονίδιο 16S rRNA. Και ο βιοαισθητήρας αυτός αποκρίθηκε στην αραβινόζη ποσοτικά και εξειδικευμένα, με το μετρήσιμο σήμα να είναι αυτή τη φορά η μείωση της βιοφωταύγειας. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι οι βιοαισθητήρες βιοφωταύγειας αποτελούν χρήσιμα αναλυτικά εργαλεία για την ποσοτικοποίηση προϊόντων ενζυματικής διάσπασης της πηκτίνης.

Λέξεις-κλειδιά: μικροβιακοί βιοαισθητήρες, βιοφωταύγεια, διάσπαση πηκτίνης

Ευχαριστίες: η παρούσα έρευνα χρηματοδοτείται από το πρόγραμμα LEANGREENFOOD (Marie Curie/FP7/EU)

3.1 Development of bioluminescent microbial biosensors to monitor enzymatic processing of food ingredients.

Lukasiak J.¹, Georgiou C.A.², Olsen K.³, Georgakopoulos D.G.¹

¹Faculty of Agricultural Biotechnology, ²Faculty of Science, Agricultural University of Athens, Greece
³Center for Advanced Food Studies, University of Copenhagen, Δανία (dgeorga@aua.gr)

Microbial biosensors are analytical devices composed of a biological recognition element (microorganism) integrated to a signal transduction element (bioluminescence), converting a biochemical signal into quantifiable response. In food industry, they are utilized to monitor food safety or environmental pollution. However, they are hardly used to quantify particular compounds in food samples. This study focuses on development of biosensors to be integrated to an on-line technology monitoring the progress and products of enzymatic degradation of pectin, mainly liberation of neutral sugars and galacturonic acid. Two biosensing approaches were used: induction or decrease of bioluminescence after exposure to a target analyte. *E. coli* biosensors of the first type were constructed by fusing an inducible promoter (*rhaB* for rhamnose, *xylA* for xylose) to the promoterless *lux* operon of *Vibrio fischeri*. To improve response, promoter optimization was necessary. Positive response to target analytes was up to 200x, compared to the control. Biosensor specificity was tested against seven carbohydrates appearing during pectin degradation. Biosensors were target-specific and responded quantitatively to target concentration. Calibration curves were prepared for analyte concentrations of 1μM-10mM. The second type of biosensors was based on linkage of inducible promoter (*araB* for arabinose) to the *ccdB* lethal gene, similarly to the previous approach. Their response to the target analytes was validated and was similar to the response of the previous biosensors. Our results show that bioluminescent microbial biosensors are useful analytical tools for quantification of products obtained during enzymatic degradation of pectin.

Keywords: microbial biosensor, bioluminescence, pectin degradation

Acknowledgments: This study is funded by LEANGREENFOOD project (Marie Curie/FP7/EU).

3.2 Αντιβακτηριακή δράση Ελληνικών μελιών ενάντια στον *Staphylococcus aureus* και την *Pseudomonas aeruginosa* συγκρινόμενη με αυτή του μελιού Manuka

Ανθιμίδου Ε., Μπαγιάτης Β. και Μόσιαλος Δ.

Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα
email: mosial@uth.gr

Είναι γνωστό ότι το μέλι διαθέτει την ικανότητα επούλωσης πληγών και σημαντικές αντιβακτηριακές ιδιότητες. Οι ιδιότητες αυτές εξαρτώνται από τον τύπο του μελιού, την γεωγραφική θέση και κυρίως τα φυτά από τα οποία προέρχεται. Το μέλι Manuka προέρχεται από το ενδημικό φυτό *Leptospermum scoparium* της Νέας Ζηλανδίας και χρησιμοποιείται στην επούλωση πληγών και εγκαυμάτων καθώς διαθέτει ισχυρή αντιβακτηριακή δράση *in vitro* και *in vivo*. Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε η αντιβακτηριακή δράση 31 δειγμάτων Ελληνικών και Κυπριακών μελιών ενάντια στον *Staphylococcus aureus* και την *Pseudomonas aeruginosa*, δυο σημαντικά παθογόνα βακτήρια που εμφανίζουν ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά και συγκρίθηκε με αυτή του μελιού Manuka. Αρχικά χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος διάχυσης σε άγαρ (agar diffusion assay) όπου μετρήθηκε η ζώνη αναστολής των δυο παθογόνων βακτηρίων και συγκρίθηκε με την αντίστοιχη ζώνη αναστολής που προκαλεί το Manuka, χρησιμοποιώντας τεχνητό μέλι ως αρνητικό μάρτυρα (negative control). Στην συνέχεια με την μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων καθορίστηκε η Ελάχιστη Συγκέντρωση Αναστολής (MIC) για το κάθε μέλι συγκρινόμενη με αυτή του Manuka και για τα δύο παθογόνα βακτήρια. Επιπλέον διερευνήθηκε η συμβολή του H₂O₂ και αντιμικροβιακών πρωτεϊνών (πεπτιδίων) στην αντιβακτηριακή δράση των Ελληνικών μελιών με την χρήση καταλάσης και πρωτεΐνης K. Διαπιστώθηκε ότι 15 από τα 31 δείγματα μελιού εμφανίζουν στατιστικά σημαντικά (p-value ≤0.05) μεγαλύτερη ζώνη αναστολής για τον *Staphylococcus aureus* σε σχέση με το Manuka και η Ελάχιστη Συγκέντρωση Αναστολής (MIC) των 31 δειγμάτων κυμαίνεται από 3.125% -25% (v/v) ενώ για το Manuka η MIC καθορίστηκε στο 6.25 % (v/v). Αντίστοιχα 7 από 31 δείγματα μελιού εμφανίζουν στατιστικά σημαντικά (p-value ≤0.05) μεγαλύτερη ζώνη αναστολής για την *Pseudomonas aeruginosa* σε σχέση με το Manuka και η Ελάχιστη Συγκέντρωση Αναστολής (MIC) κυμαίνεται από 6.25% -25% ενώ για το Manuka η MIC καθορίστηκε στο 12.5 % (v/v). Η αντιμικροβιακή δράση των Ελληνικών μελιών αποδίδεται τόσο στο H₂O₂ που περιέχουν όσο και στην ύπαρξη αντιμικροβιακών πρωτεϊνών (πεπτιδίων) που χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης χωρίς να αποκλείεται η συμβολή άλλων αντιμικροβιακών ουσιών π.χ μεθυλγλυοξάλη.

Λέξεις-κλειδιά: αντιβακτηριακή δράση, βιοτεχνολογικές εφαρμογές, ελληνικό μέλι, Manuka, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*,

3.2 Antibacterial properties of Greek honeys against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* compared to Manuka honey

Anthimidou E., Bagiatis V. and Mossialos D.

Department of Biochemistry and Biotechnology, University of Thessaly, Larissa, Greece
email: mosial@uth.gr

It is known that honey demonstrates wound healing and antibacterial properties which are dependent on the type of honey, geographical location and plant source from which honey is derived. Manuka honey is derived from the endemic plant *Leptospermum scoparium* in New Zealand and it is widely used in medicine due to its strong antibacterial properties. In this study the antibacterial properties of 31 Greek and Cypriot honeys were examined against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* and were compared to Manuka honey. Initially agar well diffusion assay was used to assess antibacterial properties and to compare them to Manuka honey, using artificial honey as negative control. Afterwards using honey serial dilutions Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was determined for both pathogens and compared to Manuka honey. Moreover the role of hydrogen peroxide and antimicrobial proteins (peptides) in antibacterial properties was investigated using catalase and proteinase K. It is shown that 15 out of 31 Greek honeys demonstrated greater inhibition zone of *Staphylococcus aureus* compared to Manuka (p-value ≤0.05). MICs of Greek honeys ranged from 3.125% -25% (v/v) while MIC of Manuka was determined at 6.25% (v/v). Similarly, 7 out of 31 Greek honeys demonstrated greater inhibition zone of *Pseudomonas aeruginosa* compared to Manuka (p-value ≤0.05). MICs of Greek honeys ranged from 6.25% -25% (v/v) while MIC of Manuka was determined at 12.5% (v/v). Antibacterial properties of Greek honeys are attributed to hydrogen peroxide present in all honeys examined as well as antimicrobial proteins (peptides) present in some of them. Nevertheless other antibacterial substances such as methylglyoxal cannot be excluded.

3.3 Επίδραση της ενζυμικής επεξεργασίας στην παραγωγή βιο-υδρογόνου και μεθανίου από το γλυκό σόργο

Αντωνοπούλου Γ.¹ και Λυμπεράτος Γ.^{1,2}

¹ ΙΤΕ-ΕΙΧΗΜΥΘ, Οδός Σταδίου, Πλατάκι, Τ.Θ 1414, 26504, Πάτρα

² Σχολή Χημικών Μηχανικών, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, 15780, Αθήνα

Το ενεργειακό φυτό «γλυκό σόργο» παράγει υψηλά ποσοστά βιομάζας η οποία περιέχει μεγάλες ποσότητες άμεσα ζυμώσιμων διαλυτών σακχάρων αλλά και σύνθετων υδατανθράκων οι οποίοι μπορεί να ζυμωθούν μετά από υδρόλυση. Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να διερευνηθεί η δυνατότητα αξιοποίησης της βιομάζας του γλυκού σόργου προς την παραγωγή βιο-υδρογόνου και μεθανίου, μέσω μικτών μικροβιακών καλλιιεργειών αλλά και να αποτιμηθεί η επίδραση της ενζυμικής προεπεξεργασίας στις αποδόσεις υδρογόνου και μεθανίου. Ειδικά για την παραγωγή υδρογόνου, πραγματοποιήθηκαν προκαταρκτικά πειράματα στα οποία επιλέχθηκαν οι βέλτιστες συνθήκες λειτουργίας (αρχική συγκέντρωση υποστρώματος 1%TS και αρχική τιμή pH=6). Στη συνέχεια, αποτιμήθηκε το βιοχημικά μεθανογόνο δυναμικό αλλά το δυναμικό παραγωγής υδρογόνου από το φυτό, σε αντιδραστήρες διαλείποντος έργου, και ήταν ίσα με 350 LCH₄/kg σόργου και 29.8 LH₂/kg σόργου. Ενζυμική κατεργασία είτε μέσω του εμπορικού ενζύμου Celluclast 1.5L (κυτταρινάση από *Trichoderma reesei*, ATCC 26921) είτε μέσω του μίγματος Celluclast 1.5L and Novozyme 188 (Κελλοβίαση από το *Aspergillus niger*) σε αναλογία (3:1) πραγματοποιήθηκε και η επίδρασή της στη διαλυτοποίηση των υδατανθράκων του φυτού πραγματοποιήθηκε σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ενζύμων (20, 40, 60, 80, 100 και 150 FPU Celluclast 1.5L/gTS σόργου, αντίστοιχα). Τα πειράματα έδειξαν ότι με την επίδραση μόνο του Celluclast 1.5L, η συγκέντρωση των διαλυτών σακχάρων αυξήθηκε κατά 15% για όλες τις συγκεντρώσεις του ενζύμου και για το λόγο αυτό η χαμηλότερη συγκέντρωση των 20 /gTS σόργου επιλέχθηκε ως βέλτιστη, ενώ για το μίγμα των εμπορικών ενζύμων μεγαλύτερη αύξηση (25%) παρατηρήθηκε για συγκέντρωση ενζύμου 40 FPU /gTS. Η ενζυμική κατεργασία ευνόησε την παραγωγή του μεθανίου κατά 17% (408 L/kg σόργου) και του υδρογόνου κατά 58% (46.3 L/kg σόργου) όταν μόνο το Celluclast (20FPU /gTS) προστέθηκε και κατά περίπου 20% την παραγωγή μεθανίου (420 CH₄/kg) και κατά 68% την παραγωγή του υδρογόνου (50 L/kg σόργου) όταν το σόργο έτυχε προεπεξεργασίας από το μίγμα των ενζύμων.

Λέξεις-κλειδιά: βιο-υδρογόνο, μεθάνιο, γλυκό σόργο

3.3 The effect of enzymatic treatment on biohydrogen and methane production from sweet sorghum biomass

Antonopoulou G.¹ and Lyberatos G.^{1,2}

¹ FORTH- ICEHT-Stadiou st., Platani, P.O Box 1414, 26504, Patras

² School of Chemical Engineering, National Technical University of Athens, 15780, Athens

Sweet sorghum is a highly biomass productive crop, containing high concentrations of readily fermentable sugars and of polymeric carbohydrates that can be fermented after a hydrolysis process. The aim of this study was to explore the possibility of biohydrogen and methane production from sweet sorghum biomass using mixed microbial cultures and to assess the effect of enzymatic treatment on hydrogen and methane yields. Preliminary experiments were conducted and the initial conditions for hydrogen batch experiments were determined (initial substrate concentration: 1%TS of the whole plant and initial pH value: 6). The biochemical methane potential was 350 LCH₄/kg sorghum while the hydrogen yield was 29.8 LH₂/kg. The enzymatic pretreatment was performed either by the addition of the enzyme Celluclast 1.5L (Cellulase) or by the addition of the mixture of Celluclast 1.5L and Novozyme 188 (Cellobiase) at a ratio of (3:1) under different enzyme concentrations (20-150 FPU of Celluclast /gTS of sorghum biomass). With the addition of Celluclast 1.5L, the sugars concentration of sorghum biomass increased at the same extent (15% at all Celluclast concentrations), meaning that the lowest concentration of 20gFPU/gTS is preferable, while with the effect of the mixture of both enzymes, the increase in soluble carbohydrates concentration was higher (25%) at 40 FPU/g TS of sorghum biomass. The methane and hydrogen yields increased 17% (408LCH₄/kg sorghum) and 58% (46.3 LH₂/kg) when only Celluclast was added and the respective increase was approximately 20% (420 LCH₄/kg) and 68% (50 LH₂/kg) when the mixture of Celluclast and Novozyme was added.

3.4 Έλεγχος του προβιοτικού δυναμικού γαλακτικών βακτηρίων που απομονώθηκαν από ζυμούμενες επιτραπέζιες ελιές

Αργύρη Α.¹, Ζουμποπούλου Γ.², Δουλγεράκη Α.³, Μπλάνα Β.³, Δαμασκηνού Α.¹, Τσακαλίδου Ε.², Νυχάς Γ-Ι.³, Πανάγου Ε.³, Τάσσου Χ.¹

¹ Εθνικό Ίδρυμα Αγροτικής Έρευνας, Ινστιτούτο Τεχνολογίας Γεωργικών Προϊόντων, Σοφ.Βενιζέλου 1, Λυκόβρυση, 141 23, Αττική

² Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Επιστήμης & Τεχνολογίας Τροφίμων, Εργαστήριο Γαλακτοκομίας, Αθήνα

³ Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Επιστήμης & Τεχνολογίας Τροφίμων, Εργαστήριο Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας Τροφίμων, Αθήνα

Εβδομήντα ένα (71) στελέχη γαλακτικών βακτηρίων που απομονώθηκαν από ζυμούμενες ελιές των ποικιλιών Κονσερβολιά και Χαλκιδικής ελέγχθηκαν για το προβιοτικό δυναμικό τους, με μια σειρά από *in vitro* δοκιμές. Από αυτά, 17 είχαν ταυτοποιηθεί ως *Leuconostoc mesenteroides*, ένα ως *Ln. pseudomesenteroides*, 51 ομαδοποιήθηκαν ως *Lactobacillus plantarum* group (συμπεριλαμβανομένων 13 *Lb. plantarum*, 37 *Lb. pentosus*, και ενός *Lb. paraplantarum*) και δύο ως *Lb. casei* group (συμπεριλαμβανομένων *Lb. casei*, *Lb. paracasei*). Όλα τα στελέχη ελέγχθηκαν για την επιβίωσή τους σε συνθήκες που προσομοιάζουν τη γαστρεντερική οδό, τη παραγωγή βακτηριοσινών, την ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά και την αιμολυτική τους δράση. Δύο γνωστά προβιοτικά στελέχη, το *Lb. rhamnosus* GG (ATCC 53103) και *Lb. casei* Shirota (ACA-DC 6002), συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη ως στελέχη αναφοράς. Αναφορικά με την αντίσταση στο χαμηλό pH, το στέλεχος *Lb. pentosus* B281 και *Lb. plantarum* B282 εμφάνισαν τους μεγαλύτερους πληθυσμούς (μείωση μικρότερη του 1 log) μετά από 3 h έκθεση σε pH2.5. Επιπλέον δύο στελέχη *Lb. plantarum*, τρία στελέχη *Lb. pentosus* και δύο στελέχη *Lb. casei* group έδειξαν πανομοιότυπο προφίλ ανθεκτικότητας. Η πλειονότητα των στελεχών έδειξε ανθεκτικότητα στα χολικά άλατα μετά από 4 h έκθεση σε αυτά, διατηρώντας υψηλούς πληθυσμούς. Πέντε στελέχη *Lb. plantarum* και επτά *Lb. pentosus* έδειξαν μερική υδρόλυση των χολικών αλάτων. Κανένα από τα εξεταζόμενα στελέχη δεν εμφάνισε β-αιμολυτική δράση, με τα περισσότερα να είναι γ-αιμολυτικά (δηλ. καμία παρουσία υδρόλυσης), ενώ τέσσερα στελέχη *Lb. pentosus* έδειξαν α-αιμόλυση (εμφάνιση ζωνών πράσινων αποχρώσεων γύρω από τις αποικίες). Η ανθεκτικότητα έναντι στα αντιβιοτικά βανκομυκίνη, χλωραμφαινικόλη, πενικιλίνη, στρεπτομυκίνη, γενταμυκίνη, ερυθρομυκίνη, αμπικιλίνη και τετρακυκλίνη εμφάνισε ποικιλότητα. Κανένα από τα στελέχη δεν εμπόδισε την ανάπτυξη των παθογόνων στελεχών, όπως συνέβη και με τα στελέχη αναφοράς *Lb. casei* Shirota και *Lb. rhamnosus* GG.

Λέξεις-κλειδιά: προβιοτικά, γαλακτικά βακτήρια, επιτραπέζιες ελιές

Η έρευνα που οδήγησε σε αυτά τα αποτελέσματα χρηματοδοτήθηκε από το 7^ο Πρόγραμμα Πλαίσιο της Ευρωπαϊκής Ένωσης (FP7/2007-2013), πρόγραμμα n°243471-PROBIOLIVES

3.4 Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from fermented greek table olives

Argyri A.¹, Zoumpopoulou G.², Doulgeraki, A.³, Blana V.³, Damaskinou A.¹, Tsakalidou E.², Nychas G.J.³, Panagou E.³, Tassou C.¹

¹ National Agricultural Research Foundation, Institute of Technology of Agricultural Products, Sof. Venizelou 1, Lycovrissi, 141 23, Attiki

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

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

Seventy one lactic acid bacteria (isolated from Greek fermented olives) were screened for their probiotic potential, following a series of *in vitro* tests. Among them, the majority belonged to *Lb. plantarum* group (*Lb. plantarum*, *Lb. pentosus*, *Lb. paraplantarum*), and the rest had been identified as *Ln. mesenteroides*, *Ln. pseudomesenteroides*, *Lb. casei* and *Lb. paracasei*. All isolates were tested for their survival in simulated gastrointestinal tract conditions, production of bacteriocins, resistance to antibiotics and haemolytic activity. Two well recognized probiotics, *Lb. rhamnosus* GG (ATCC 53103) and *Lb. casei* Shirota (ACA-DC 6002), were included in the tests as reference strains. Regarding the resistance to low pH, *Lb. pentosus* B281 and *Lb. plantarum* B282 demonstrated the highest populations (less than 1 log reduction) after 3 h of exposure at pH 2.5. The majority of the tested strains were found to be resistant to bile salts even after 4 h of exposure, retaining high populations. Five *Lb. plantarum* and seven *Lb. pentosus* strains exhibited partial bile salt hydrolase activity. None of the examined strains exhibited β-haemolytic activity, with most of them being γ-haemolytic (i.e. no haemolysis), while four *Lb. pentosus* strains exhibited α-haemolysis (green-hued zones around colonies). Variable susceptibility of strains towards vancomycin, chloramphenicol, penicillin, streptomycin, gentamycin, kanamycin, erythromycin, ampicillin and tetracycline was observed. None of the tested strains inhibited the growth of the pathogenic target strains not even *Lb. casei* Shirota and *Lb. rhamnosus* GG.

Keywords: probiotic, lactic acid bacteria, fermented table olives

The research leading to these results has received funding from the EU (FP7/2007-2013), under grant agreement n° 243471-PROBIOLIVES.

3.5 Καταστολή υποστρώματος άνθρακα σε γονίδια που εμπλέκονται στην πορεία καταβολισμού φαινανθρενίου στο βακτήριο *Arthrobacter phenanthrenivorans* Sphe3

Βανδέρα Ε.¹, Κυρπίδης Ν.², Δραΐνας Κ.¹†, Κούκκου Α.Ε.¹

¹ Τομέας Οργανικής Χημείας & Βιοχημείας, Παν/μιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα

² Genome Biology Program, Department of Energy Joint Genome Institute, 2800 Mitchell Drive, Walnut Creek, CA, 94598, USA.

Σε προηγούμενη δουλειά μας έχει αναφερθεί η απομόνωση και ο χαρακτηρισμός ενός νέου στελέχους του *Arthrobacter phenanthrenivorans* Sphe3 λόγω της ικανότητας του να αναπτύσσεται παρουσία φαινανθρενίου ως μοναδική πηγή άνθρακα και ενέργειας. Η πλήρης ανάλυση του γονιδιώματος του στελέχους κατέδειξε την ύπαρξη δυο κυκλικών πλασμιδίων, pASPHE301 και pASPHE302 καθώς και ενός κυκλικού χρωμοσώματος, τα οποία περιέχουν γονίδια που εμπλέκονται στην αποδόμηση του φαινανθρενίου (Stand Genomic Sci. 4:123-130). Η αποδόμηση του φαινανθρενίου από αερόβια βακτήρια ξεκινά με την εισαγωγή δυο ατόμων O₂ στον αρωματικό δακτύλιο, αντίδραση που καταλύεται από διοξυγονάσες υδροξυλίωσης του βενζολικού δακτυλίου (RHOs) προς σχηματισμό *cis*-διϋδροδιολών, οι οποίες στη συνέχεια καταβολίζονται μέσω *ortho*- ή *meta*-σχάσης, η οποία καταλύεται από διοξυγονάσες σχάσης του αρωματικού δακτυλίου. Εντοπίσαμε διάφορα γονίδια πιθανών διοξυγονασών υδροξυλίωσης και σχάσης του αρωματικού πυρήνα στο γονιδίωμα του στελέχους Sphe3. Τα επίπεδα έκφρασης των ανωτέρω γονιδίων μελετήθηκαν σε κύτταρα που αναπτύχθηκαν σε ελάχιστο θρεπτικό μέσο M9 παρουσία φαινανθρενίου, ή γλυκόζης, ή φαινανθρενίου και γλυκόζης σαν μοναδικές πηγές άνθρακα και ενέργειας με τη χρήση της τεχνικής της ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφάσης πραγματικού χρόνου (Real-Time qPCR). Το ιδιοσωστατικό γονίδιο της γυράσης (*gyrB*) χρησιμοποιήθηκε σαν γονίδιο αναφοράς. Επαγωγή όλων των γονιδίων παρατηρήθηκε παρουσία φαινανθρενίου. Παρουσία γλυκόζης, ή φαινανθρενίου και γλυκόζης παρατηρήθηκε ελάχιστη έκφραση των αντίστοιχων γονιδίων δείχνοντας ότι υπόκεινται σε καταστολή υποστρώματος άνθρακα. Η μελέτη της έκφρασης καταβολικών γονιδίων σε μεταγραφικό επίπεδο θα βοηθήσει σημαντικά στην κατανόηση των μοριακών μηχανισμών μέσω των οποίων οι μικροοργανισμοί προσαρμόζονται στο περιβάλλον παρουσία ξενοβιοτικών ουσιών, με απώτερο στόχο την εφαρμογή πιο αποτελεσματικών μεθόδων βιοαποκατάστασης.

Το ερευνητικό έργο συγχρηματοδοτήθηκε από την Ευρωπαϊκή Ένωση - Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο (ΕΚΤ) & Εθνικούς Πόρους, στα πλαίσια του προγράμματος με τίτλο «ΗΡΑΚΛΕΙΤΟΣ II» το οποίο εντάσσεται στο Ε.Π. Ε.Δ.Β.Μ του Υπουργείου Παιδείας Διά Βίου Μάθησης και Θρησκευμάτων.

† Η εργασία αυτή είναι αφιερωμένη στη μνήμη του Καθηγητή Δραΐνα Κωνσταντίνου

3.5 Carbon catabolite repression of genes involved in the phenanthrene degradation pathway in strain *Arthrobacter phenanthrenivorans* Sphe3

Vandera E.¹, Kyripides N.C.², Drainas C.¹†, Koukku A.I.¹

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

² Genome Biology Program, Department of Energy Joint Genome Institute, 2800 Mitchell Drive, Walnut Creek, CA, 94598, USA

We have previously reported the isolation and characterization of a new strain named *Arthrobacter phenanthrenivorans* Sphe3 with the ability to grow on phenanthrene as the sole source of carbon and energy. The whole genome sequence showed that strain Sphe3 consists of two circular plasmids pASPHE301 and pASPHE302, as well as a circular chromosome containing genes that are likely involved in phenanthrene degradation. The initial reaction of phenanthrene degradation by aerobic bacteria is generally initiated by the introduction of both atoms of O₂ to the aromatic ring which is catalysed by aromatic ring hydroxylating dioxygenases (RHOs) forming *cis*-dihydrodiols which follow a further catabolic pattern through *ortho*- or *meta*-cleavage catalysed by ring-cleavage dioxygenases. We identified diverse putative RHOs genes as well ring-cleavage dioxygenases genes in the genome of Sphe3. The transcription level of these genes was studied in cells grown in minimal medium M9 in the presence of phenanthrene, or glucose, or glucose plus phenanthrene as sole carbon and energy sources using real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (Real-Time qPCR). The housekeeping gene *gyrB* was used as a reference gene. Upregulation of all genes in the presence of phenanthrene was observed. In the presence of glucose or glucose plus phenanthrene only minimal transcription was detected which suggests that the genes are subject to carbon catabolite repression. Monitoring the expression of catabolic genes at the transcriptional level will help us to understand the molecular mechanisms through which microorganisms are adapted to harsh environments in the presence of xenobiotic compounds with the aim of applying effective bioremediation processes.

Keywords: *Arthrobacter phenanthrenivorans*, phenanthrene, dioxygenases, RT-PCR

The research Project is co-funded by the European Union - European Social Fund (ESF) & National Sources, in the framework of the program "HRAKLEITOS II" of the "Operational Program Education and Life Long Learning" of the Hellenic Ministry of Education, Life Long Learning and religious affairs.

† In memory of professor Constantin Drainas who so unexpectedly lost his life in a car accident on July 5th, 2011.

3.6 Απομόνωση και χαρακτηρισμός ενός φυσικού πλασμίδιου του στελέχους *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0040.

Βασιλειάδης Α., Αφένδρα Α.-Σ.

Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών & Τεχνολογιών, Ιωάννινα

Ο *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0040 (Συλλογή ΓΠΑ) ανήκει στα οξυγαλακτικά βακτήρια, έχει απομονωθεί από ελληνικό παραδοσιακό γιαούρτι και αποτελεί εξαιρετικά ενδιαφέρον στέλεχος προς μελέτη, διότι: (α) προσδίδει πλεονεκτήματα στην εμφάνιση, τη γεύση, το άρωμα και το πήγμα του τελικού προϊόντος συγκριτικά με αυτά που προκύπτουν από άλλα στελέχη του βακτηρίου, και (β) παράγει μία βακτηριοσίνη, τη θερμοφιλίνη T, η οποία αναστέλλει την ανάπτυξη ορισμένων βακτηρίων αλλοίωσης και μπορεί να χρησιμοποιηθεί δυναμικά ως φυσικός αναστολέας αυτών. Για την ολοκληρωμένη μελέτη του υπεύθυνου γενετικού τόπου παραγωγής της θερμοφιλίνης T είναι απαραίτητος ένας φορέας κλωνοποίησης, μεταφοράς και έκφρασης γονιδίων στο στέλεχος αυτό, ο οποίος κατασκευάζεται συνήθως από ενδογενή πλασμίδια του υπό διερεύνηση στελέχους. Κατά συνέπεια, ο στόχος της συγκεκριμένης εργασίας ήταν η διερεύνηση ύπαρξης φυσικού πλασμίδιου στον ACA-DC 0040.

Μετά από εφαρμογή πολλών μεθόδων απομόνωσης εντοπίστηκε σε αυτόν ένα πλασμίδιο, το οποίο κλωνοποιήθηκε και υποβλήθηκε σε προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του. Σύμφωνα με την προκαταρκτική της ανάλυση, έχει μέγεθος περίπου 2,8 kb, κατατάσσεται στην πρώτη από τις πέντε ομάδες των πλασμιδίων του *S.thermophilus*, και περιέχει τρία πιθανά αναγνωστικά πλαίσια, δύο από τα οποία κωδικοποιούν δυναμικά μία πρωτεΐνη έναρξης της αντιγραφής τύπου κυλιόμενου κύκλου και μία πρωτεΐνη απόκρισης σε θερμικό σοκ (heat shock proteins, HSPs). Είναι γνωστό ότι ένας μικρός αριθμός στελεχών *S.thermophilus* περιέχει μικρά φυσικά πλασμίδια που φέρουν πιθανά γονίδια HSPs, στα οποία οφείλεται η ικανότητα ανάπτυξης σε υψηλή θερμοκρασία και χαμηλό pH, με αποτέλεσμα να προτιμάται η χρησιμοποίησή τους στην παραγωγή γαλακτοκομικών προϊόντων όπου επικρατούν τέτοιες συνθήκες. Εξ όσων γνωρίζουμε, πρόκειται για το πρώτο στέλεχος *S.thermophilus* ελληνικής συλλογής στο οποίο εντοπίζεται φυσικό πλασμίδιο.

Λέξεις-κλειδιά: *Streptococcus thermophilus*, πλασμίδιο, HSP

3.6 Isolation and characterization of a native plasmid in *Streptococcus thermophilus* ACA- DC 0040 strain.

Vassiliadis A., Afendra A.-S.

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

S. thermophilus ACA-DC 0040 (AUA collection), a lactic acid bacterium (LAB) isolated from traditional Greek yoghurt is a strain of great interest, because (a) it gathers advantages in appearance, flavor, scent and curd to the final product compared to those obtained by other *S.thermophilus* strains, and (b) it produces thermophilin T, a bacteriocin which inhibits growth of certain LAB and food spoilage bacteria and can be used as a potential biopreservative. For the extensive study of the locus responsible for the production of thermophilin T, a cloning, transfer and expression vector for this strain is essential, usually constructed by endogenous plasmids of the strain under study. Therefore, the aim of this work was the investigation for the existence of native plasmid(s) in ACA-DC 0040.

After application of several isolation methods, a native plasmid was located which was cloned and sequenced. According to the preliminary sequence analysis, it has a size of about 2.8 kb, is classified in the first of five groups of *S.thermophilus* plasmids, and contains three putative ORFs, two of which potentially encode a HSP and a rolling circle replication protein. Small native plasmids encoding HSPs do exist in few *S.thermophilus* strains, which exhibit a capability of growing in high temperature and low pH and therefore their use in dairy production where these conditions are common is preferred. To our knowledge, it is the first *S.thermophilus* strain of a greek collection in which a native plasmid is found.

Keywords: *Streptococcus thermophilus*, plasmid, HSP

3.7 Καθαρισμός και μερικός χαρακτηρισμός της β-D-ξυλοζιδάσης από ένα θερμόφιλο βακτηριακό στέλεχος του γένους *Geobacillus*

Γαλανοπούλου Α.Π., Σταθοπούλου Π.Μ., Καραγκούνη Α.Α. και Χατζηνικολάου Δ.Γ.

Ομάδα Μικροβιολογίας, Τομέας Βοτανικής, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθήνας, Πανεπιστημιούπολη Ζωγράφου, 15784 Ζωγράφου, Αττική, Ελλάδα

Η βιομετατροπή της ημικυτταρίνης συγκεντρώνει το αυξανόμενο ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας λόγω της πιθανής εφαρμογής της σε διάφορες βιοτεχνολογικές διεργασίες. Μεταξύ των ημικυτταρινών, η ξυλάνη αποτελεί τον κύριο ετεροπολυσακχαρίτη της φυτικής βιομάζας και απαντά σε αφθονία στο δευτερογενές φυτικό τοίχωμα. Η πλήρης διάσπαση της ξυλάνης απαιτεί τη συνεργιστική δράση ενός αριθμού ενζύμων. Μεταξύ αυτών είναι και η β-D-ξυλοζιδάση, ένζυμο υπεύθυνο για την υδρόλυση της ξυλοβιόξης και μικρών ξυλο-ολιγοσακχαριτών σε μονομερή ξυλόζης. Η παρούσα εργασία, εστιάζεται στον καθαρισμό και μερικό χαρακτηρισμό μίας β-D-ξυλοζιδάσης από ένα βακτηριακό στέλεχος του γένους *Geobacillus* απομονωμένο από το ηφαιστειακό σύμπλεγμα της Σαντορίνης. Το συγκεκριμένο στέλεχος, παρήγαγε μία β-D-ξυλοζιδάση η οποία λήφθηκε από το υπερκείμενο βακτηριακών καλλιιεργειών και καθαρίστηκε μέσω μίας διαδικασίας τριών σταδίων: χρωματογραφία ανιοντοανταλλαγής σε στήλη Q-Sepharose, ισοηλεκτρική εστίαση στη ίδια στήλη και ακόλουθα χρωματογραφία μοριακής διήθησης σε στήλη Sephadex G-100. Το τελικό προϊόν του καθαρισμού έδωσε μια ζώνη μοριακού βάρους 58 kDa κατά την ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE. Προσδιορίστηκαν οι κινητικές παράμετροι του καθαρού ενζύμου καθώς και μεταβολή της ενεργότητας και σταθερότητάς του ως συνάρτηση της θερμοκρασίας και του pH. τέλος μελετήθηκε η επίδραση μεταλλικών ιόντων και διαφόρων αποδιατακτικών παραγόντων στην ενεργότητα της καθαρής β-D-ξυλοζιδάσης.

Λέξεις-κλειδιά: β-D-ξυλοζιδάση, *Geobacillus* sp., απομόνωση, χαρακτηρισμός

3.7 Purification and partial characterization of a thermostable β-D-xylosidase from a novel thermophilic *Geobacillus* isolate

Galanopoulou A.P., Stathopoulou P.M., Karagouni A.D. and Hatzinikolaou D.G.

Microbiology Group, Sector of Botany, Department of Biology, National and Kapodistrian University of Athens, Zografou Campus, 15784 Zografou, Greece

Bioconversion of hemicelluloses has recently gained significant attention as a consequence of its potential applications in various industrial applications. Among hemicelluloses, xylans are the major heteropolysaccharides of plant biomass and especially abundant in secondary cell walls. Complete degradation of xylan requires the concerted action of several enzymes. Among them, β-D-xylosidases catalyze the hydrolysis of xylobiose and short xylo-oligosaccharides into xylose units. The present study focuses on the purification and characterization of a β-D-xylosidase from a novel thermophilic *Geobacillus* sp., isolated from volcanic sediments at the island of Santorini, Aegean Sea, Greece. The isolate, produced a β-D-xylosidase that was purified from the bacterial culture supernatant using three chromatographic steps; Q-sepharose ion exchange, Q-sepharose isoelectric focusing and a final Sephadex G-100 gel filtration step. At the end of this procedure, a single band at 58 kDa was revealed by SDS-PAGE. The kinetic parameters of the purified enzyme were determined using p-NPX as substrate in addition to its pH and temperature activity and stability characteristics. Finally, the effect of metal ions and detergents on the activity of the β-D-xylosidase was examined.

Keywords: β-D-xylosidase, *Geobacillus* sp., isolation, characterization

3.8 Βιομετατροπή αποπρωτεϊνωμένου τυρογάλακτος σε ένα νέο πηκτωματοποιητή/ σταθεροποιητή ανεπεξέργαστης τζελλάνης

Γιαβάσης Ι.¹, Γογολός Β.¹, Γιαμπουράς Ι.¹, Γκουτσίδης Π.² και Πετροτός Κ.²

¹ Εργαστήριο Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας Τροφίμων, Τμήμα Τεχνολογίας Τροφίμων ΤΕΙ Λάρισας, Παράρτημα Καρδίτσας, Καρδίτσα.

² Εργαστήριο Γεωργικής Μηχανικής-Μηχανικής Τροφίμων, Τμήμα Μηχανικής Βιοσυστημάτων ΤΕΙ Λάρισας, Λάρισα.

Το αποπρωτεϊνωμένο τυρόγαλα (ύστερα από υπερδιήθηση για απομάκρυνση πρωτεϊνών) αξιοποιήθηκε πλήρως ως υπόστρωμα για την μετατροπή του σε προϊόν ακατέργαστης τζελλάνης από το βακτήριο *Sphingomonas paucimobilis* με σκοπό την παραγωγή ενός νέου πηκτωματοποιητή/ σταθεροποιητή. Ο *S. paucimobilis*, που αναπτύσσεται συνήθως σε υποστρώματα λακτόζης, βελτιώθηκε και προσαρμόστηκε σταδιακά σε υποστρώματα λακτόζης έπειτα από διαδοχικές καλλιέργειες σε υγρά και στερεά υποστρώματα. Διερευνήθηκε η επίδραση της πλήρους αφαίρεσης πρωτεϊνών, της ανάδευσης, της θερμοκρασίας, της συγκέντρωσης λακτόζης, της προσθήκης γλυκερόλης, της μεθόδου ζύμωσης (batch, fed-batch, bi-staged) με ή χωρίς επιπλέον προσθήκη υποστρώματος ή μεταβολή στη θερμοκρασία ή το pH ανάπτυξης, στην ανάπτυξη της βιομάζας, την παραγωγή τζελλάνης, την κατανάλωση σακχάρων, τον λόγο αναπνοής (RQ) και το φαινομενικό ιξώδες του υγρού ζύμωσης. Το πλήρες, ιξώδες τελικό υγρό ζύμωσης λυοφυλιώθηκε και χρησιμοποιήθηκε ως πηκτωματοποιητής/ σταθεροποιητής σε υδατικά διαλύματα σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (0.1-2.0%). Η πλήρης απομάκρυνση των πρωτεϊνών (που είναι χρήσιμες για την ανάπτυξη βιομάζας, αλλά μειώνουν την παραγωγή τζελλάνης) στο πλήρως αποπρωτεϊνωμένο τυρόγαλα (ΠΑΤ) και η αραίωση (50%) του ΠΑΤ οδήγησαν σε υψηλή παραγωγή τζελλάνης και πλήρη αξιοποίηση των σακχάρων. Οι fed-batch ζυμώσεις δεν βελτίωσαν την σύνθεση τζελλάνης, καθώς φαίνεται ότι ο μικροοργανισμός είναι ευαίσθητος σε κάποια συστατικά του τυρογάλακτος εκτός της λακτόζης, η οποία βελτίωσε την παραγωγή τζελλάνης όταν προστέθηκε υπό τη μορφή καθαρού σακχάρου. Η προσθήκη γλυκερόλης στο ΠΑΤ διπλασίασε το παραγόμενο ιξώδες του υγρού ζύμωσης και αύξησε ιδιαίτερα το ρυθμό ανάπτυξης και την παραγωγικότητα της τζελλάνης. Το ιξώδες του βελτιστοποιημένου ανεπεξέργαστου προϊόντος τζελλάνης με βάση το ΠΑΤ ήταν συγκρίσιμο με αυτό της καθαρής τζελλάνης, και παρουσίασε υψηλή θερμική σταθερότητα (στους 80°C). Αυτό το νέο προϊόν, αποτέλεσμα εφαρμοσμένης βιομηχανικής έρευνας (στα πλαίσια του προγράμματος «Κουπόνια Καινοτομίας») το οποίο αξιοποιεί πλήρως το τυρόγαλα, χωρίς να απαιτεί στάδια καθαρισμού ή συνθετικά υποστρώματα ανάπτυξης, και χωρίς εναπομείναντα απόβλητα, έχει πρόσφατα κατοχυρωθεί ως ευρεσιτεχνία και παρουσιάζει πολλές δυνατότητες βιομηχανικών εφαρμογών.

3.8 Bioconversion of deproteinized whey to a novel crude gellan gum thickener/ stabiliser

Giavasis I.¹, Gogolos V.¹, Giabouras I.¹, Goutsidis P.² and Petrotos K.²

¹ Lab of Food Microbiology & Biotechnology, Dept. Food Technology, Technological Educational Institute of Larisa, Greece

² Lab of Food Engineering, Dept. Biosystems Engineering, Technological Educational Institute of Larisa, Greece

Deproteinized (ultrafiltrated) cheese whey was fully utilised as a substrate for the production of crude gellan gum by *Sphingomonas paucimobilis* and the development of a novel thickener/viscosifier/stabiliser. *S. paucimobilis*, normally growing on glucose, was gradually adapted to lactose after repeated liquid and solid cultures in lactose media. The effects of protein removal, agitation, temperature, lactose concentration, glycerol addition, fed-batch processes, bi-staged processes (with a pH or temperature shift), etc upon gellan and biomass production, sugar utilisation, respiratory quotient (RQ) and broth intrinsic viscosity were investigated. The entire viscous fermentation broth was lyophilized and tested for its viscosifying/ stabilising ability in water solutions at several concentrations (0.1-2.0%). Complete removal of proteins (useful for growth, but limiting gellan biosynthesis) in fully- deproteinized whey (FDP) and the dilution of whey (by 50%) led to high gellan concentrations and complete sugar utilisation. Fed-batch processes did not improve gellan accumulation, showing that the organism is sensitive to high concentrations of some whey components, but not to lactose, since addition of pure lactose increased gellan and broth viscosity significantly. Glycerol addition in the FDP medium doubled the viscosity of the process medium and led to distinct increase in growth rate and gellan formation rate. The viscosity of the optimised whey-based crude gellan was comparable to that of pure gellan, showing high thermostability. This novel product of applied industrial research ("Innovation Vouchers" programm), which utilises the whole of whey, without purification steps, and needs no synthetic media, has been recently patented and shows great potential for many industrial applications.

Keywords: gellan gum, deproteinized whey, microbial polysaccharide

3.9 Διεγερτική δράση ενός νέου σκευάσματος πολυφαινόλων από υγρά απόβλητα ελαιουργείου στην ανάπτυξη και την παραγωγή γαλακτικού οξέος από γαλακτικά βακτήρια

Γιαβάσης Ι.¹, Τσαντέ Ε.¹, Γκουτσίδης Π.² Παπαθεοδώρου Κ.³ και Πετρωτός Κ.²

¹ Εργαστήριο Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας Τροφίμων, Τμήμα Τεχνολογίας Τροφίμων ΤΕΙ Λάρισας, Παράρτημα Καρδίτσας, Καρδίτσα.

² Εργαστήριο Γεωργικής Μηχανικής-Μηχανικής Τροφίμων, Τμήμα Μηχανικής Βιοσυστημάτων ΤΕΙ Λάρισας, Λάρισα

³ SHM-Hellas Dairy Products, Βελεστίνο, Βόλος.

Η χρήση ενός σκευάσματος πολυφαινόλων από υγρά απόβλητα ελαιουργείου διερευνήθηκε σε σχέση με τη διέγερση της ανάπτυξης γαλακτικών βακτηρίων και την παραγωγή γαλακτικού οξέος. Οι πολυφαινόλες, γνωστές κυρίως για την αντιοξειδωτική και αντιμικροβιακή τους δράση, απομονώθηκαν από υγρά απόβλητα ελαιουργείου μέσω μακροπορώδους ρητίνης, συμπυκνώθηκαν με αντίστροφη όσμωση και λυοφυλίσθηκαν. Η παραγόμενη σκόνη πολυφαινόλης προστέθηκε σε συγκεντρώσεις 0ppm (μάρτυρας), 500ppm, 1000ppm, 2000ppm, and 5000ppm σε υγρά θρεπτικά υποστρώματα (τροποποιημένο MRS/M17 broth, ή γάλα), ή στερεά υποστρώματα (κιμάς) στα οποία εμβολιάστηκαν και αναπτύχθηκαν ξεχωριστά διαφορετικά γαλακτικά βακτήρια (*Lactobacillus casei*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus curvatus*, *Pediococcus pentosaceus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis*). Όλοι οι λακτοβάκιλλοι που μελετήθηκαν ενισχύθηκαν από την παρουσία 500-1000ppm πολυφαινόλης στο υπόστρωμα ανάπτυξης σε σχέση με το μάρτυρα, σε ότι αφορά την ανάπτυξη βιομάζας και παραγωγή γαλακτικού οξέος, ιδίως όταν χρησιμοποιήθηκε υψηλό ποσοστό αρχικού εμβολίου. Άλλα γαλακτικά βακτήρια δεν παρουσίασαν παρόμοια συμπεριφορά. Τα 5000ppm ήταν ανασταλτικά για όλες τις χρησιμοποιούμενες καλλιέργειες. Σε όλες τις περιπτώσεις οι πολυφαινόλες δεν καταναλώθηκαν, δείχνοντας πως η διεγερτική δράση πιθανώς σχετίζεται με την ενεργοποίηση σημαντικών ενζύμων (όπως π.χ. η ενεργοποίηση της β-γαλακτοσιδάσης στους λακτοβακίλλους). Όταν χρησιμοποιήθηκε γάλα ως υπόστρωμα, η οξίνιση και πήξη από λακτοβακίλλους συνέβη πολύ νωρίτερα με την προσθήκη πολυφαινόλης 500-1000ppm (εμφανίζοντας και μεγαλύτερο ιξώδες πηγματος με προσθήκη πολυφαινόλης), ενώ σε ζυμούμενο κιμά οι λακτοβάκιλλοι που εμβολιάστηκαν παρουσίασαν υψηλότερους πληθυσμούς και γρηγορότερη οξίνιση μετά την προσθήκη 500-1000ppm πολυφαινόλων. Αυτή η πρόσφατα πατενταρισμένη βιομηχανική έρευνα (στα πλαίσια του προγράμματος «Κουπόνια Καινοτομίας») μπορεί να έχει πολλές εφαρμογές στο σχεδιασμό θρεπτικών υποστρωμάτων και βιοδιεργασιών για την ανάπτυξη γαλακτικών βακτηρίων και την παραγωγή γαλακτικού, καθώς και στην παραγωγή ζυμούμενων προϊόντων γάλακτος και κρέατος.

3.9 Stimulatory effect of novel polyphenol-based supplements from olive mill waste on the growth and acid production of lactic acid bacteria

Giavasis I.¹, Tsante E.¹, Goutsidis P.² Papatheodorou K.³ and Petrotos K.²

¹ Lab of Food Microbiology & Biotechnology, Dept. Food Technology, Technological Educational Institute of Larisa, Greece

² Lab of Food Engineering, Dept. Biosystems Engineering, Technological Educational Institute of Larisa, Greece

³ SHM-Hellas Dairy Products, Velesino, Volos, Greece

The utilization of polyphenol-based supplements from olive mill waste (OMW) in lactic acid fermentation and in media for the cultivation of lactic acid bacteria (LAB), in order to stimulate biomass growth and lactate biosynthesis was investigated. Polyphenols from OMW were separated via microporous resins, condensed by reverse osmosis and lyophilised, following a patented process. The OMW-polyphenol powder (free or encapsulated) was added at 0ppm (blank), 500ppm, 1000ppm, 2000ppm, and 5000ppm in liquid culture media (modified MRS/M17 broth, or milk), or solid media (minced meat) in which several lactic acid bacteria were separately grown (*Lactobacillus casei*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus curvatus*, *Pediococcus pentosaceus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis*). All lactobacilli tested were clearly stimulated by the presence of 500-1000 ppm polyphenols in the culture medium compared to the blank, as concerns total biomass and lactate accumulation, especially when using high initial inoculum. Other LAB did not show a similar pattern. 5000ppm was inhibitory for all cultures. In all cases, polyphenol was not consumed, and it seems that the stimulatory effect occurs via key enzyme stimulation (e.g. higher β-galactosidase activity in lactobacilli). When using milk as a substrate, acidification and coagulation by lactobacilli occurred much earlier with addition of 500-1000ppm polyphenol (showing higher viscosity when 500-1000ppm polyphenol was added), while in fermented meat lactobacilli reached higher populations with 500-1000ppm polyphenol addition. This recently patented industrial research ("Innovation Vouchers" programme) has several implications in designing media and processes for growing LAB and producing lactate, as well as in fermented dairy and meat products.

Keywords: polyphenols olive mill waste, lactic acid bacteria, lactate

3.10 Κινητική μελέτη της παραγωγής βιομάζας, κυτταρικών λιπιδίων και πολυσακχαριτών των εδώδιμων μυκήτων *Pleurotus pulmonarius* και *Flammulina velutipes*

Διαμαντοπούλου Π.¹, Παπανικολάου Σ.², Κωμαΐτης Μ.², Αγγελής Γ.³, Φιλίππουσης Α.^{1*}

¹ Εθνικό Ίδρυμα Αγροτικής Έρευνας, Ι.Τ.Ε.Γ.Ε.Π., Εργαστήριο Εδώδιμων Μυκήτων, Σ. Βενιζέλου 1 - Λυκόβρυση Αττικής, Ελλάδα;

² Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα, Ελλάδα;

³ Εργαστήριο Μικροβιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Τομέας Γενετικής Βιολογίας κντάρου και Ανάπτυξης, Πανεπιστήμιο Πατρών, Πάτρα, Ελλάδα

*email: aphilippoussis@nagref.gr

Κινητική ανάλυση της παραγωγής μυκηλιακής βιομάζας, κυτταρικών λιπιδίων καθώς και έξω- (EPSs) και ένδο-(IPSs) πολυσακχαριτών πραγματοποιήθηκε για τους εδώδιμους μύκητες *Pleurotus pulmonarius* και *Flammulina velutipes* σε αναδεδόμενες και μη καλλιέργειες σε γλυκόζη για 24 ημέρες. Σημαντικά υψηλές τιμές βιομάζας καταγράφηκαν και στους δύο μύκητες και η ανάδευση αύξησε τη μέγιστη παραγωγή της βιομάζας σε σχέση με αυτή των στατικών καλλιεργειών (22,5 g/l έναντι 14,0 g/l στον *P. pulmonarius* και 19,9 g/l έναντι 12,1 g/l στον *F. velutipes*). Θετική επίδραση είχε η ανάδευση και στα λιπίδια του *P. pulmonarius*, καθώς στις κινητές φιάλες παράχθηκαν 4 g/l and 0,15-0,28 g/g επί ξηρού βάρους μυκηλίου, ενώ στις στατικές μόλις 1 g/l και 0,05-0,08 g/g. Ωστόσο, οι καλλιέργειες του *F. velutipes* (κίνητες, ακίνητες) έδωσαν παρόμοιες τιμές λιπιδίων σε απόλυτες τιμές (2 g/l), αλλά σε ό,τι αφορά τα g/g ξηρού βάρους εμφανίστηκαν ελαφρώς αυξημένα στις στατικές (0,11-0,19 g/g) σε σχέση με τις αναδεδόμενες φιάλες (0,08-0,15 g/g). Αντίθετα, η παραγωγή των IPSs (σε απόλυτες τιμές) και στα δύο μανιτάρια ήταν σημαντικά ψηλότερη στις αναδεδόμενες από ό,τι στις στατικές καλλιέργειες (10,9 έναντι 6,1 g/l για τον *P. pulmonarius* και 6,7 έναντι 5,5 g/l για τον *F. velutipes*). Ωστόσο, η συγκέντρωση των IPSs (g/g ξηρής βιομάζας) κυμάνθηκε μεταξύ 0,44-0,50 g/g και δεν επηρεάστηκε από την ανάδευση. Σε ό,τι αφορά τους EPSs, οι μέγιστες τιμές τους καταγράφηκαν στα αρχικά στάδια της καλλιέργειας και των δύο μυκήτων. Για τον *P. pulmonarius*, οι EPSs συντέθηκαν σε λίγο υψηλότερες συγκεντρώσεις στις ακίνητες φιάλες (EPSmax 0,509 έναντι 0,488 g/l στις κινούμενες), ενώ για τον *F. velutipes*, η παραγωγή των EPSs επηρεάστηκε από την ανάδευση (EPSmax 0,610 έναντι 0,510 g/l στις κινούμενες).

Λέξεις-κλειδιά: μυκηλιακή βιομάζα, κυτταρικά λιπίδια, έξω- και ένδο πολυσακχαρίτες

3.10 Kinetic analysis of mycelial biomass, cellular lipids and polysaccharides production by *Pleurotus pulmonarius* and *Flammulina velutipes*

Diamantopoulou P.¹, Papanikolaou S.², Komaitis M.², Aggelis G.³, Philippoussis A.^{1*}

¹ National Agricultural Research Foundation, Institute of Technology of Agricultural Products, Laboratory of Edible Fungi, 1 Sofokli Venizelou street, 14123 - Lykovryssi, Attiki, Greece;

² Department of Food Science and Technology, Agricultural University of Athens, 75 Iera Odos, 11855 - Athens, Greece;

³ Unit of Microbiology, Department of Biology, Division of Genetics, Cell and Development Biology, University of Patras, 26500 - Patras, Greece

*email: aphilippoussis@nagref.gr

Kinetic analysis of mycelial biomass, cellular lipids and exo- (EPSs) and intra-cellular (IPSs) polysaccharides production was performed for the mushrooms *Pleurotus pulmonarius* and *Flammulina velutipes*, in shake- and static-flask glucose-based submerged cultures for 24 days. Significant biomass values were obtained for both mushrooms and agitation increased its maximum production as compared with the static cultures (22.5 against 14.0 g/l for *P. pulmonarius* and 19.9 against 12.1 g/l for *F. velutipes* respectively). Agitation had also significant impact on the lipids of *P. pulmonarius*, as 4 g/l and 0.15-0.28 g/g in dry weight were obtained in the shake-flask cultures compared to 1 g/l and 0.05-0.08 g/g of the static- ones. Lipids of ~2 g/l were produced in *F. velutipes* agitated and non-agitated cultures and slightly higher quantities of total intracellular lipids were obtained in static- (0.11-0.19 g/g dry weight) than in shake-flask (8-15% g/g) experiments. IPSs production of both mushrooms in absolute values was significantly higher in the shake- than the static-flask cultures (10.9 against 6.1 g/l for *P. pulmonarius* and 6.7 against 5.5 g/l for *F. velutipes*). However, the quantity of IPSs (per g of dry fungal mass), ranging between 0.44-0.50 g/g, was not affected by agitation. As for EPS, the maximum quantities were recorder at the begging of both *P. pulmonarius* and *F. velutipes* cultivation. EPSs of *P. pulmonarius* were synthesized in slightly higher quantities in the static- than the shake-flask cultures (EPSmax 0.509 against 0.488 g/l), whereas EPSs of *F. velutipes* were affected by agitation (EPSmax 0.610 in the shake- against 0.510 g/l static-flask cultures).

Keywords: mycelial biomass, cellular lipids, exo- and intra-cellular polysaccharides

3.11 Βιοκαταλυόμενη αποδόμηση περιβαλλοντικών ρύπων χρησιμοποιώντας συστήματα λακκάσης-διαμεσολαβητή

Δρίβας Γ.¹, Τaha A.A.¹, Παυλίδης I.B.¹, Πατήλα M-B.¹, Ντάντος Α.², Καταπόδης Π.¹, Σταμάτης Χ.¹

¹Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας, Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, 45110 Ιωάννινα (hstamati@cc.uoi.gr)

²CP Foodlab Ltd, 2082 Λευκωσία, Κύπρος

Οι λακκάσες υπάγονται στην κατηγορία των μέταλλο-εξαρτώμενων οξειδοαναγωγασών, ένζυμα τα οποία έχουν την ικανότητα να καταλύουν την οξείδωση κυρίως φαινολικών οργανικών ενώσεων με παράλληλη αναγωγή του μοριακού οξυγόνου σε νερό. Παράλληλα, με την παρουσία μικρών οργανικών μορίων, ικανών να δρουν ως διαμεσολαβητές για τη μεταφορά ηλεκτρονίων, τα ένζυμα αυτά μπορούν να καταλύσουν αποτελεσματικά την οξείδωση πλήθους διαφορετικών ενώσεων διευρύνοντας έτσι σημαντικά το φάσμα εφαρμογής τους. Το γεγονός ότι οι ενζυμικά καταλυόμενες αυτές αντιδράσεις οξείδωσης λαμβάνουν χώρα σε ήπιες συνθήκες (π.χ. σε θερμοκρασία πολύ κοντά σε αυτή του περιβάλλοντος), καταδεικνύει τη δυναμική τους στην ανάπτυξη περιβαλλοντικά φιλικών μεθόδων αποδόμησης ξενοβιοτικών ενώσεων.

Στην παρούσα εργασία μελετάμε τη δυνατότητα εφαρμογής συστημάτων λακκάσης- διαμεσολαβητών (LMS) για την αποδόμηση περιβαλλοντικών ρύπων όπως συνθετικές χρωστικές καθώς και πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες. Τα συστήματα αυτά βασίζονται στην εφαρμογή διαφόρων ελεύθερων και ακινητοποιημένων λακκασών από μύκητες (*Botrytis cinerea*, *Trametes hirsute* and *Trametes versicolor*) ή της βακτηριακής λακκάσης που κλωνοποιήθηκε από το βακτήριο *Bacillus licheniformis* και εκφράστηκε σε *E. coli*. Μελετήθηκε η επίδραση διαφόρων παραγόντων που επιδρούν στην αποτελεσματικότητα της βιοκαταλυόμενης αποδόμησης και διαπιστώθηκε ότι παράγοντες όπως η πηγή της λακκάσης, ο φορέας ακινητοποίησης, η συγκέντρωση και το είδος του διαμεσολαβητή καθώς και το μέσο επίτευξης των αντιδράσεων επιδρούν στην αποτελεσματικότητα της βιοδιεργασίας.

3.11 Biocatalytic degradation of environmental pollutants using laccase-mediator systems

Drivas G.¹, Taha A.A.¹, Pavlidis I.V.¹, Patila M-V.¹, Dados A.², Katapodis P.¹, Stamatis H.¹

¹Laboratory of Biotechnology Department of Biological Applications & Technologies, University of Ioannina, 45110 Ioannina, Greece (hstamati@cc.uoi.gr)

²CP Foodlab Ltd, 2082 Nicosia, Cyprus

Laccases (*p*-diphenol: dioxygen oxidoreductases, EC 1.10.3.2) are multi-copper enzymes, which catalyze the oxidation of variety of phenolic and other organic substrates coupled to the reduction of molecular oxygen to water with the one-electron reaction mechanism. However, it was shown that in the presence of small molecules, capable to act as electron transfer mediators, oxidation of numerous of organic compounds becomes feasible expanding, thus, the range of compounds that can be oxidised by these enzymes. Since these oxidations occur in water at close to ambient temperature (20–40°C), the potential exists for a green and environmentally friendly oxidation method for xenobiotic molecules.

In the present study we demonstrated the application of laccase-mediated systems (LMS) for the degradation of environmental pollutants, such as synthetic phenolic dyes and polycyclic aromatic hydrocarbons. The enzymatic systems used are free or immobilized fungal laccases from *Botrytis cinerea*, *Trametes hirsute* and *Trametes versicolor*, as well as a bacterial laccase cloned from *Bacillus licheniformis* and expressed in *E. coli*. Various parameters which affect the biodegradation efficiency were studied. The degradation ability of laccases depends on their origin, the type and the concentration of the mediator used as well as the reaction medium used.

Keywords: Laccase, biocatalysis, biodegradation, PAHs, mediator, pollutants

3.12 Διερεύνηση της δυνατότητας αξιοποίησης του μύκητα *Paecilomyces variotii* στην παραγωγή αιθανόλης από λιγνινοκυτταρινούχα υποστρώματα με διεργασία ενός σταδίου.

Ζέρβα Α., Σταθοπούλου Π.Μ., Κατσίφας Ε.Α., Καραγκούνη Α.Δ. και Χατζηνικολάου Δ.Γ.

Ομάδα Μικροβιολογίας, Τομέας Βοτανικής, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθήνας, Πανεπιστημιούπολη Ζωγράφου, 15784 Ζωγράφου, Ατική, Ελλάδα

Η βιοαιθανόλη θεωρείται σήμερα ως μια πολλά υποσχόμενη ανανεώσιμη πηγή ενέργειας που θα μπορούσε να αντικαταστήσει τα ορυκτά καύσιμα. Αντίστοιχα, η λιγνινοκυτταρινούχος βιομάζα είναι μια άφθονη και ανανεώσιμη πρώτη ύλη που θα μπορούσε να αξιοποιηθεί μικροβιακά στην παραγωγή αιθανόλης. Οι τρέχουσες βιοτεχνολογικές διεργασίες που χρησιμοποιούνται για το σκοπό αυτό, απαιτούν τη χημική ή ενζυμική μετατροπή του υποστρώματος σε απλά σάκχαρα προκειμένου αυτά να μπορούν να χρησιμοποιηθούν από έναν αιθανολοπαραγωγό μικροοργανισμό. Το κόστος της όλης διεργασίας θα μπορούσε να μειωθεί σημαντικά αν η απευθείας μετατροπή της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας σε αιθανόλη ήταν εφικτή από έναν μικροοργανισμό που θα είναι ικανός να παράγει τα απαραίτητα ένζυμα αποικοδόμησης της βιομάζας (κυρίως κυτταρινάσες και ξυλανάσες), να υδρολύει τους αντίστοιχους πολυσακχαρίτες και να ζυμώνει τα μονομερή σάκχαρα που προκύπτουν (πεντόζες και εξόζες) προς παραγωγή αιθανόλης.

Στην παραπάνω κατεύθυνση, μελετήθηκε η επίδραση διαφόρων παραγόντων στην παραγωγή αιθανόλης από το νηματοειδή μύκητα *Paecilomyces variotii*, προκειμένου να αξιολογηθεί η δυνατότητα χρήσης του μικροοργανισμού αυτού σε τέτοιου είδους διεργασίες. Ο *P. variotii* έχει την ικανότητα να ζυμώνει τη γλυκόζη και την ξυλόζη προς παραγωγή αιθανόλης με εξαιρετικά μεγάλη απόδοση, που πλησιάζει τη μέγιστη θεωρητική τιμή. Επίσης, μπορεί να αναπτύσσεται σε πολύπλοκα λιγνινοκυτταρινούχα υποστρώματα ως μόνη πηγή άνθρακα, αφού αποδείχθηκε πως παράγει όλα τα απαραίτητα ένζυμα για την αποικοδόμηση της κυτταρίνης και της ημικυτταρίνης. Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας υποδεικνύουν ότι ο *P. variotii* αποτελεί ένα καινούριο και πιθανώς ισχυρό υποψήφιο στην παραγωγή βιοαιθανόλης από λιγνινοκυτταρινούχο βιομάζα σε διεργασίες ενός σταδίου.

Λέξεις-κλειδιά: Βιοαιθανόλη, *Paecilomyces variotii*, λιγνινοκυτταρινούχα υποστρώματα, διεργασία ενός σταδίου

3.12 Evaluation of *Paecilomyces variotii* potential in the consolidated bioprocessing of lignocellulosics

Zerva A., Stathopoulou P.M., Katsifas E.A., Karagouni D.A. and Hatzinikolaou D.G.

Microbiology Group, Sector of Botany, Department of Biology, National and Kapodistrian University of Athens, University Campus, 15784 Zografou, Attica, Greece

Bioethanol is considered as the most promising renewable energy source for fossil fuel replacement. The lignocellulosic biomass is an abundant and renewable raw material that can be used for fuel ethanol production, but the technology developed so far requires chemical or enzymatic conversion of the substrate to fermentable sugars before they can be utilized by an ethanologenic microorganism. The single – step conversion of lignocellulose to ethanol would greatly enhance the cost effectiveness of bioethanol production. Such a process, called consolidated bioprocessing (CBP), requires the use of an organism able to produce the necessary saccharolytic enzymes, hydrolyze the polysaccharides and ferment both hexose and pentose sugars. Such an organism is yet to be found, as most of the organisms capable of producing ethanol with satisfying yields do not possess the necessary enzyme factory for the degradation of lignocellulose.

In the present study, we examined the effect of a number of process parameters on the production of ethanol from the filamentous fungus *Paecilomyces variotii* in order to evaluate its potential in consolidated bioprocessing applications. The fungus is able to ferment glucose and xylose to ethanol with exceptionally high yields, that are very close to the theoretical maximum value. Moreover, it is able to grow on complex substrates as sole carbon source, while producing the necessary enzymes for the degradation of cellulose and hemicellulose. Our results demonstrate that *P. variotii* is a new and potentially powerful candidate for the consolidated bioprocessing of lignocellulosics.

Keywords: Bioethanol, *Paecilomyces variotii*, lignocellulose, CBP

3.13 Φαρμακευτικοί μακρομύκητες του γένους *Ganoderma*: Επιλεγμένοι φυσιολογικοί χαρακτήρες, παραγωγή πολυσακχαριτών και ενδοκυτταρικά σάκχαρα

Ζερβάκης Γ.Ι.¹, Stajic M.², Glamočlija J.³, Maksimović V.⁴, Vukojević J.², Simonić J.²

¹Εργαστήριο Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας, Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, ²Institute of Botany, Faculty of Biology, University of Belgrade, ³Institute for Biological Research "Siniša Stanković", Belgrade, ⁴Institute for Multidisciplinary Research, Belgrade, Serbia

Οι μύκητες των ειδών *Ganoderma* (Basidiomycota, Polyporales) συγκαταλέγονται μεταξύ των πλέον σημαντικών μικροοργανισμών που αξιοποιούνται στη φαρμακευτική βιομηχανία. Ανάμεσα στα πιο ενδιαφέροντα βιοδραστικά συστατικά των μυκήτων *Ganoderma* συμπεριλαμβάνονται τα τριτερπενοειδή και οι πολυσακχαρίτες. Οι τελευταίοι έχουν απομονωθεί από τα βασιδιόματα και τη μυκηλιακή βιομάζα υγρών καλλιιεργειών και έχουν επιδείξει -ιδιαίτερα οι β-(1,3) γλυκοζιδικοί δεσμοί των β-D-γλυκανών που περιέχουν- αντικαρκινικές ιδιότητες μέσω ανοσοτροποποίησης, καταστολής αγγειογένεσης σε καρκινικά κύτταρα και αύξησης του αριθμού των φυσικών φονικών κυττάρων (NK and T cells) σε καρκινοπαθείς προχωρημένου σταδίου. Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, απομονώθηκαν από δασικά οικοσυστήματα της Ελλάδας και ταυτοποιήθηκαν έξι είδη *Ganoderma* (*G. adpersum*, *G. applanatum*, *G. carnosum*, *G. lucidum*, *G. pfeifferi* και *G. resinaceum*), τα οποία στη συνέχεια αξιολογήθηκαν όσον αφορά γραμμικές ταχύτητες αύξησης και ικανότητα αποικισμού υποστρωμάτων πλούσιων σε φαινολικές ενώσεις, ενώ προσδιορίστηκαν και τα θερμοκρασιακά άριστα για τη μυκηλιακή ανάπτυξη τους. Ακολούθως, επιλεγμένα στελέχη του είδους *G. lucidum* προερχόμενα από διαφορετικές χώρες εξετάστηκαν συγκριτικά και σε σχέση με παραγωγή ενδοκυτταρικών και εξωκυτταρικών πολυσακχαριτών, καθώς και με τη σύσταση των ενδοκυτταρικών σακχάρων τους. Τα αποτελέσματα φανέρωσαν μεγάλη απόκλιση στις τιμές μεταξύ των διαφόρων στελεχών τόσο όσον αφορά στην παραγωγή βιομάζας όσο και στην παραγωγή ενδοκυτταρικών πολυσακχαριτών (3.1 - 28.2 g L⁻¹ και 20.0- 53.3 mg g⁻¹ αντίστοιχα), ενώ σημαντικές διαφορές διαπιστώθηκαν και στην παραγωγή εξωκυτταρικών πολυσακχαριτών (0.2 to 1.5 mg mL⁻¹). Επιπλέον, ποιοτικές και ποσοτικές διαφοροποιήσεις ανιχνεύτηκαν στη σύσταση των ενδοκυτταρικών σακχάρων, όμως σε όλα στελέχη (πλην ενός) η γλυκόζη εμφανίστηκε ως κυρίαρχο σάκχαρο. Είναι αξιοσημείωτο πως οι συγκεκριμένοι χαρακτήρες (θερμοκρασιακά άριστα ανάπτυξης, παραγωγή πολυσακχαριτών, σύσταση ενδοκυτταρικών σακχάρων) μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως επιπλέον κριτήρια για τον χαρακτηρισμό στελεχών εντός του συμπλόκου-είδους *G. lucidum*. Επιπλέον, είναι εξαιρετικά ενδιαφέροντα η ανάπτυξη βιοτεχνολογικών εφαρμογών μέσω της αξιοποίησης των

βιοδραστικών ενώσεων τις οποίες σχηματίζουν οι μύκητες *Ganoderma* που μελετήθηκαν.

3.13 Medicinal mushroom fungi of the genus *Ganoderma*: selected physiological characters, polysaccharides production and intracellular sugars

Zervakis G.I.¹, Stajic M.², Glamočlija J.³, Maksimović V.⁴, Vukojević J.², Simonić J.²

¹Laboratory of General and Agricultural Microbiology, Department of Agricultural Biotechnology, Agricultural University of Athens, Iera Odos 75, 11855 Athens, Greece ²Institute of Botany, Faculty of Biology, University of Belgrade, Takovska 43,11000 Belgrade, Serbia ³Institute for Biological Research "Siniša Stanković", Bulevar Despota Stefana 143, 11000 Belgrade, Serbia ⁴Institute for Multidisciplinary Research, Kneza Višeslava 1a, 11030 Belgrade, Serbia

Ganoderma species are among the most valuable mushroom fungi (Basidiomycota, Polyporales) in the pharmaceutical industry. Several major substances (e.g. polysaccharides, triterpenoids) with potent medicinal effects and activation of macrophages, NK and T cells have been isolated from *Ganoderma* strains. Their polysaccharides, and in particular the β- (1,3) glycosidic bonds of β-D-glucan, are biologically active by conferring enhanced anti- tumour and immuno-modulating activities in host-cells. Several wild *Ganoderma* strains isolated from selected forest habitats of Greece and assigned in six species (*G. adpersum*, *G. applanatum*, *G. carnosum*, *G. lucidum*, *G. pfeifferi* and *G. resinaceum*) were comparatively evaluated as regards their linear growth rates and their ability to colonize substrates rich in phenolics, while their temperature optima for vegetative growth were also assessed. Further work focused on selected *G. lucidum* strains of worldwide origin for determining intraspecific variability in polysaccharides production and intracellular sugar composition. Results demonstrated a wide variation on mycelia biomass and intracellular polysaccharide production values (3.1 - 28.2 g L⁻¹ and 20.0 - 53.3 mg g⁻¹, respectively), while differences in extracellular polysaccharide amounts ranged from 0.2 to 1.5 mg mL⁻¹. Significant quantitative and qualitative differences in intracellular sugar composition were noted; glucose was the predominant sugar in all strains but one. It seems that such characters (i.e. temperature optima for growth, polysaccharide production and intracellular sugar composition) could serve as additional criteria for strains discrimination within the taxonomically-challenging *G. lucidum* complex. Moreover, of biotechnological importance is the development of application associated with the bioactive properties of the *Ganoderma* compounds examined.

Λέξεις-κλειδιά: Φαρμακευτικά μανιτάρια, πολυσακχαρίτες *Ganoderma*, ενδοκυτταρικά σάκχαρα

3.14 Ετερότροφη Απονιτροποίηση Πόσιμου Νερού

Καρανάσιος Κ.Α.¹, Μακρή Σ.Π.¹, Τεκερλεκοπούλου Α.¹ και Βαγενάς Δ.Β.^{1,2*}

¹ Τμήμα Διαχείρισης Περιβάλλοντος & Φυσικών Πόρων, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων Αγρινίου, Σεφέρη 2, 30100,

² Ερευνητικό Ινστιτούτο Χημικής Μηχανικής και Χημικών Διεργασιών Υψηλής Θερμοκρασίας, 26504 Πάτρα

*email: dvagenas@cc.uoi.gr

Τις τελευταίες δεκαετίες η χρήση λιπασμάτων και φυτοφαρμάκων, τα αστικά και τα βιομηχανικά απόβλητα αποτελούν τις κυριότερες πηγές νιτρικών στα επιφανειακά και υπόγεια ύδατα. Τα ανώτερα επιτρεπτά όρια νιτρικού και νιτρώδους αζώτου στο πόσιμο νερό είναι 11.3 mg/L και 0.03 mg/L, αντίστοιχα. Η κατανάλωση νερού με υψηλές συγκεντρώσεις των ανωτέρω ρύπων εγκυμονεί κινδύνους για την ανθρώπινη υγεία.

Γενικά, οι βιολογικές μέθοδοι επεξεργασίας αποβλήτων προτιμούνται έναντι των φυσικοχημικών, καθώς είναι πιο οικονομικές και φιλικές προς το περιβάλλον. Κατά τη διαδικασία της βιολογικής απονιτροποίησης κατάλληλοι μικροοργανισμοί χρησιμοποιούν τα NO₃- ως τελικό δέκτη ηλεκτρονίων για την αναπνοή υπό ανοξικές συνθήκες. Η ετερότροφη απονιτροποίηση είναι η μέθοδος στην οποία απονιτροποιητικοί μικροοργανισμοί χρησιμοποιούν ως δότη ηλεκτρονίων και ως πηγή άνθρακα, οργανική πηγή άνθρακα.

Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της ετερότροφης απονιτροποίησης σε αντιδραστήρα σταθερής κλίνης πιλοτικής κλίμακας με πληρωτικό υλικό πυριτικό χαλίκι. Ο εμβολιασμός του αντιδραστήρα πραγματοποιήθηκε από μικτή ετερότροφη καλλιέργεια, που προήλθε από τη μονάδα επεξεργασίας υγρών αποβλήτων του Δήμου Αγρινίου. Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων η πηγή άνθρακα που χρησιμοποιήθηκε ήταν εμπορική ζάχαρη.

Πραγματοποιήθηκαν δύο σει πειραμάτων με τις ίδιες αρχικές συγκεντρώσεις νιτρικού αζώτου, όπου στο καθένα χρησιμοποιήθηκε διαφορετικός λόγος C/N. Οι αρχικές συγκεντρώσεις του νιτρικού αζώτου κυμαίνονταν από 20mg/L έως 800mg/L. Ο αρχικός λόγος C/N που χρησιμοποιήθηκε για την πρώτη σειρά πειραμάτων ήταν 13.5, ενώ για την επόμενη σειρά μειώθηκε στο μισό, 6.75. Για όλα τα σει πειραμάτων επιτεύχθηκαν υψηλοί ρυθμοί απονιτροποίησης από 3.21-8.62 g/Ld.

Από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι η χρήση αντιδραστήρων σταθερής κλίνης επιτρέπει την επεξεργασία νερού με υψηλές αρχικές συγκεντρώσεις νιτρικού αζώτου. Σημαντική επίδραση στη λειτουργία του αντιδραστήρα και στο ρυθμό απονιτροποίησης παρουσιάζει ο λόγος C/N, όπου έλλειψη υποστρώματος (ζάχαρης) δρα παρεμποδιστικά στην διεργασία της απονιτροποίησης κυρίως στις πιο χαμηλές συγκεντρώσεις (<80ppm).

Λέξεις-κλειδιά: Πόσιμο νερό, Απονιτροποίηση, Ετερότροφη

3.14 Heterotrophic denitrification of drinking water

Karanasios K.A.¹, Makri S.P.¹, Tekerlekopoulou A.¹ and Vayenas D.V.^{1,2*}

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

² Institute of Chemical Engineering and High Temperature Chemical Processes, 26504 Patras, Greece

*email: dvagenas@cc.uoi.gr

Nitrate contamination of groundwater and surface water, due to unbounded use of fertilizers and pesticides, has become a common environmental problem in many parts of the world. Nitrate nitrogen enrichment of receiving waters should be avoided, since drinking water containing high NO₃--N concentrations is reported to increase the probability of methemoglobinemia and gastric cancers.

Biological denitrification is an alternative technology, which is carried out by facultative bacteria that can use NO₃- as a terminal electron acceptor for respiration under anoxic conditions. Furthermore, biological denitrification is considered to be a cost-effective and friendly to the environment method of removal of nitrates, due to the use of microbial cultures.

The aim of the present study was to investigate the heterotrophic denitrification in fixed-bed, pilot-scale reactor with gravel as support media. A mixed culture was used for acclimation, which was enriched from sludge taken from the wastewater treatment plant of the city of Agrinio, Greece. Sugar was used in the experiments as carbon source.

Two set of experiments were carried out in order to investigate two different ratios of C/N keeping same initial NO₃- concentrations. The initial nitrate concentration varied from 20 to 800 mg/L, while the ratio of C/N was 13.5 and 6.75.

This study revealed that the use of pilot-scale, fixed-bed reactor is able to treat high nitrate concentrations from drinking water. Significant influence in the reactor's performance plays the ratio of C/N, where the lack of substrate (sugar) inhibits the denitrification process, especially in low concentrations (<80ppm).

3.15 Τα γονίδια που εμπλέκονται στην αποδόμηση του φθαλικού οξέος στο στέλεχος *Arthrobacter phenanthrenivorans* Sphe3 είναι οργανωμένα σε οπερόνιο

Κουρτίδου Ε.¹, Βανδέρα Ε.¹, Αφένδρα Α.Σ.², Κυρπίδης Ν.³, Δραΐνας Κ¹†, Κούκκου Α.Ε.¹

¹ Εργαστήριο Βιοχημείας, Τμήμα Χημείας, ² Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα

³ Genome Biology Program, Department of Energy Joint Genome Institute, 2800 Mitchell Drive, Walnut Creek, CA, 94598, USA

Το στέλεχος *Arthrobacter phenanthrenivorans* Sphe3, που αποδομεί φαινανθρένιο και απομονώθηκε από μια περιοχή της Ελλάδας, το έδαφος της οποίας ήταν ρυπασμένο με κρεοζωτέλαιο, είναι ικανό να χρησιμοποιεί το φθαλικό οξύ ως μοναδική πηγή άνθρακα και ενέργειας. Από την πλήρη αλληλουχία του γονιδιώματος του στελέχους φαίνεται ότι αυτό περιλαμβάνει δύο κυκλικά πλασμίδια, τα pASPHE301 και pASPHE302 μεγεθών 190kb και 94kb, αντίστοιχα (Stand Genomic Sci. 4:123-130). Ένα ενδιαφέρον χαρακτηριστικό στην αποδόμηση του φθαλικού οξέος από το στέλεχος Sphe3, είναι το γεγονός ότι το σύμπλεγμα των γονιδίων που πιθανόν εμπλέκονται στην αποδόμηση του φθαλικού, εντοπίζεται και στα δύο πλασμίδια με μεταξύ τους ομοιότητα 88%. Και στα δύο πλασμίδια, έχει ταυτοποιηθεί ένα σύνολο επτά υποθετικών γονιδίων τα οποία κωδικεύουν πρωτεΐνες που συμμετέχουν στη μετατροπή του φθαλικού οξέος σε πρωτοκατεχοϊκό οξύ συμπεριλαμβανομένων των εξής: μεγάλη και μικρή υπομονάδα της 3,4-διοξυγονάσης του φθαλικού (96% και 97% ταυτοσημότητα αντίστοιχα), πρωτεΐνη άγνωστης λειτουργίας (91% ταυτοσημότητα), υπομονάδα της φερρεδοξίνης της 3,4-διοξυγονάσης του φθαλικού (100% ταυτοσημότητα), υπομονάδα της φερρεδοξίνης ρεδοουκτάσης της 3,4-διοξυγονάσης του φθαλικού (91% ταυτοσημότητα), αποκαρβοξυλάση του 3,4-διυδροξυφθαλικού οξέος (92% ταυτοσημότητα) και ένα μεταγραφικό ρυθμιστικό παράγοντα της οικογένειας IclR (91% ταυτοσημότητα). Η δομή και η οργάνωση των γονιδίων αυτών υποδηλώνει ότι συγκροτούν ένα οπερόνιο. Πραγματοποιήθηκαν πειράματα RT-PCR με υπόστρωμα ολικό RNA από κύτταρα Sphe3 ανεπτυγμένα σε ελάχιστο θρεπτικό μέσο M9 παρουσία φαινανθρενίου. Τα προϊόντα ενίσχυσης από την RT-PCR έδωσαν ζώνες αναμενόμενου μεγέθους σε όλες τις περιοχές. Από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι τα προαναφερθέντα γονίδια συμμεταγράφονται. Τα γονίδια που εμπλέκονται στη αποδόμηση του φθαλικού οξέος οργανώνονται με παρόμοιο τρόπο και σε άλλα βακτηριακά στελέχη όπως τα *Arthrobacter keyseri* 12B, *Terrabacter* sp. DBF63 και *Nocardioides* sp. KP7, ενώ η τοποθέτηση και ο προσανατολισμός του γονιδίου που κωδικεύει τον ρυθμιστικό παράγοντα της μεταγραφής διαφέρουν στο βακτήριο *M. vanbaalenii* PYR-1.

† Αφιερώνεται στη μνήμη του Καθηγητή Δραΐνα Κωνσταντίνου

3.15 *Arthrobacter phenanthrenivorans* Sphe3 phthalate degradation genes are organized as an operon

Kourtidou E.¹, Vandera E.¹, Afendra A.S.², Kyrpides N.C.³, Drinas K.¹†, Koukku A.I.¹

¹ Laboratory of Biochemistry, Department of Chemistry ² Department of Biological Applications and Technology, University of Ioannina, 45110 Ioannina, Greece

³ Genome Biology Program, Department of Energy Joint Genome Institute, 2800 Mitchell Drive, Walnut Creek, CA, 94598, USA

Phenanthrene degrading *Arthrobacter phenanthrenivorans* strain Sphe3 isolated from a creosote-contaminated soil in Greece is able to utilize phthalate as sole carbon and energy source. Total genome sequence of the strain showed that it possesses two circular plasmids named pASPHE301 and pASPHE302 of 190kb and 94 kb respectively (Stand Genomic Sci. 4:123-130). One interesting aspect of phthalate degradation by Sphe3 is that putative phthalate-degrading operons are present in both plasmids and share an identity of 88%. A total of seven putative genes were identified on both plasmids encoding the conversion of phthalate to protocatechuate consisting of a large and small subunit of phthalate 3,4-dioxygenase (96 % and 97% identity with each other, respectively), a protein of unknown function (91 % identity with each other), a ferredoxin component of phthalate 3,4-dioxygenase (100 % identity with each other), a ferredoxin reductase component of phthalate 3,4-dioxygenase (91 % identity with each other), a 3,4- dihydroxyphthalate decarboxylase (92 % identity with each other) and a transcriptional regulator of the IclR family (91 % identity with each other). The structure and organization of these genes in both plasmids suggest that they compose an operon. We performed RT-PCR analysis using total RNA from Sphe3 cells grown on minimal medium M9 in the presence of phenanthrene. RT-PCR amplification products of the expected sizes were observed in all the regions. No specific amplification was detected without RT. These results suggest that the above mentioned genes are transcribed as a single transcriptional unit. Genes encoding enzymes involved in phthalate degradation are clustered in a similar manner in other bacterial species, including *Arthrobacter keyseri* 12B, *Terrabacter* sp. DBF63 and *Nocardioides* sp. KP7, whereas the placement and orientation of the putative regulatory gene differ from those of *M. vanbaalenii* PYR-1.

Keywords: *Arthrobacter phenanthrenivorans* Sphe3, phthalate operon

† In memory of Professor Constantin Drinas who so unexpectedly lost his life in a car accident on July 5th, 2011.

3.16 Κυανοβακτήρια και Μικροφύκη του Ελλαδικού χώρου χρήσιμα στη βιοενέργεια

Κουταλιανού Μ., Μωυσιά Κ., Κατσίφας Ε.Α. και Καραγκούνη Α.Δ.

Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Βιολογίας, Τομέας Βοτανικής, Ομάδα Μικροβιολογίας, Πανεπιστημιούπολη 15781 Αθήνα

Η αύξηση της τιμής των καυσίμων τα τελευταία χρόνια, οδήγησε την παγκόσμια επιστημονική κοινότητα να στραφεί στην παραγωγή βιοκαυσίμων. Τα μικροφύκη και τα κυανοβακτήρια λόγω της υψηλής περιεκτικότητας των κυττάρων τους σε λιπίδια θεωρούνται ως οι καταλληλότεροι μικροοργανισμοί για την παραγωγή βιοντίζελ. Στόχος της παρούσας μελέτης ήταν η απομόνωση κυανοβακτηρίων και μικροφυκών, από διάφορα οικοσυστήματα της Ελλάδας, τα οποία θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για παραγωγή βιοενέργειας. Πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες από υδάτινα οικοσυστήματα του Ελλαδικού χώρου (Ασπρόπυργος, Κορώνεια) καθώς και από τα μνημεία της Ακρόπολης. Κάθε απομονωμένος μικροοργανισμός καλλιεργήθηκε σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα BG-11, BG11 με 4% NaCl και σε θαλασσινό νερό εμπλουτισμένο με Walne medium και εκτιμήθηκε ο χρόνος διπλασιασμού της καλλιέργειας, η τελική ποσότητα βιομάζας στο τέλος της φάσης επιβράδυνσης και το % ποσοστό λιπιδίων ανά γραμμάριο βιομάζας. Στη συνέχεια έγινε επιλογή των αποδοτικότερων στελεχών με στόχο την παραγωγή βιοντίζελ σε πιλοτική κλίμακα σε συνθήκες πεδίου.

Λέξεις-κλειδιά: βιοντίζελ, κυανοβακτήρια, μικροφύκη

3.16 Cyanobacteria and Microalgae isolated from Greece useful in bioenergy production

Koutalianou M., Moysi K., Katsifas E.A. and Karagouni A.D.

National and Kapodistrian University of Athens Faculty of Biology, Department of Botany, Microbiology Group Panepistimiopoulis 15781, Athens

The increasing cost in fuel production led the scientific community to turn to alternative energy sources such as biofuels. Microalgae and cyanobacteria, due to their high lipid content are considered to be the most suitable microorganisms for biodiesel production. The aim of this study was the isolation of cyanobacteria and microalgae from diverse Greek habitats, with potential use in biofuels production. Samplings from aquatic ecosystems (Aspropirgos, Koronia) and from the monuments of Acropolis were collected. Each isolated microorganism was cultured in liquid media BG-11, BG-11 with 4% NaCl and in sea water enriched with Walne medium. The doubling time of the culture, the total biomass concentration at the end of the logarithmic decline phase and the % lipid / g of biomass were estimated. The most efficient strains were selected to produce biodiesel on pilot scale experiments in field conditions.

Keywords: biodiesel, cyanobacteria, microalgae

3.17 Βιοέλεγχος του μαρασμού φυτών τομάτας που προκαλείται από τον μύκητα *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici* με την εφαρμογή ενδογενών Στρεπτομυκήτων.

Κούτρα Δ.Ε., Κανινή Γ.Σ., Κατσιφας Ε.Α., Χατζηνικολάου Δ.Γ. και Καραγκούνη Α.Δ.

Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Βιολογίας, Τομέας Βοτανικής, Ομάδα Μικροβιολογίας,, 15781 Αθήνα, Ελλάδα

Ο βιολογικός έλεγχος των φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών του εδάφους βασίζεται στην χρήση φυσικών ανταγωνιστών τους. Παραδείγματα τέτοιων οργανισμών είναι α) μικροοργανισμοί που παράγουν αντιμικροβιακές ουσίες, β) μικροοργανισμοί επάγουν την ανθεκτικότητα στα φυτά-στόχους και γ) μικροοργανισμοί που επικρατούν λόγω της ικανότητάς τους να εκμεταλλεύονται ταχύτερα τα θρεπτικά συστατικά που εκκρίνονται από τα φυτά.

Ο οικολογικός ρόλος των Στρεπτομυκήτων ως πιθανοί παράγοντες βιοελέγχου απολαμβάνει αυτή τη στιγμή ιδιαίτερης προσοχής. Οι Στρεπτομυκήτες είναι γνωστοί για την ικανότητά τους να παράγουν αντιβιοτικά με μεγάλη ποικιλία χημικής δομής. Ειδικότερα, περίπου το 60 % των αντιβιοτικών που χρησιμοποιούνται στη γεωργία έχουν παραχθεί και απομονωθεί από στελέχη Στρεπτομυκήτων. Έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα στον βιοέλεγχο διάφορων τύπων του φυτοπαθογόνου μύκητα *Fusarium oxysporum*, παθογόνων των φυτών όπως το βαμβάκι, το σπαράγγι, το φασόλι και η τομάτα, ως εναλλακτική λύση στη χρήση συνθετικών μυκητοκτόνων.

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση της αποτελεσματικότητας ενδογενών στελεχών στρεπτομυκήτων επιλεγμένων λόγω της έντονης αντιμυκητιακής δράσης τους *in vitro*, να ελέγξουν επεισόδια μαρασμού, που προκάλεσε ο μύκητας *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici* σε φυτά τομάτας. Επιπλέον, εκχυλίσματα καλλιεργειών των επιλεγμένων στρεπτομυκήτων εξετάστηκαν ως προς την ικανότητά τους να αναστέλλουν κοινούς μικροβιακούς δείκτες με σκοπό να διερευνηθεί το εύρος του φάσματος της αντιμικροβιακής δράσης. Στο πεδίο του προσδιορισμού της χημικής φύσης των αντιμυκητιακών ουσιών τα εκχυλίσματα των καλλιεργειών κλασματώθηκαν και τα κλάσματα [μεγάλου (πρωτεϊνικό κλάσμα) και μικρού μοριακού βάρους] εξετάστηκαν για την αντιμυκητιακή τους δράση.

Λέξεις-κλειδιά: Βιοέλεγχος, *Fusarium oxysporum*, Στρεπτομυκήτες

3.17 Biocontrol of wilt on tomato plants caused by *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici* by the application of Greek Indigenous Streptomycetes.

Koutra D.E., Kanini G.S., Katsifas E.A., Hatzinikolaou D.G. and Karagouni A.D.

National & Kapodistrian University of Athens, Faculty of Biology, Department of Botany, Microbiology Group 15781 Athens, Greece

Biological control of soil borne plant pathogens is based on application of natural antagonists of the pathogen. Examples are (i) beneficial microorganisms producing antimicrobial components, (ii) microbes which can induce systemic resistance to the plant, and (iii) microbes which can out-compete pathogens because they are quicker in consuming nutrients secreted by the plants.

The ecological role of streptomycetes as potential biocontrol agents is currently, gaining increased attention. Streptomyces are well known as capable of producing antibiotics with a wide variety of chemical structures. In particular, approximately 60 % of antibiotics developed for agricultural use are isolated from Streptomyces spp. Streptomyces species have been used extensively in the biological control of several forms of *Fusarium oxysporum*, which caused wilt disease in many plant species such as cotton, asparagus, French bean and tomato, as an alternative to the application of synthetic fungicides.

This study aimed to investigate the efficiency of selected indigenous *Streptomyces* isolates, currying proven *in vitro* antifungal activity, to control *Fusarium* wilt on tomato plants. Additionally, the culture extracts of the selected streptomycetes were examined for their ability to inhibit the growth of common microbial indicators, in order to investigate the spectrum of their antimicrobial activity. Attempts were made to identify the chemical nature of the antifungal compounds. For this purpose the culture extracts have been fractionated and the fractions [high (protein) and low MW fractions] tested for antifungal activity.

Keywords: Biocontrol, *Fusarium oxysporum*, streptomycetes.

3.18 Τοποεκλεκτικοί βιομετασχηματισμοί φυσικών πολυφαινολών

Κυριακού Ε.¹, Κατσούρα Μ.², Πριμηκύρη Α.¹, Χαρισιάδης Π.¹, Γεροθανάσης Ι.¹, Σταμάτης Χ.² και Τζάκος Α.¹

¹ Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

² Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Τα φυσικά προϊόντα και κυρίως τα φλαβονοειδή κατέχουν ένα ενδιαφέρον τμήμα του χημικού χώρου, σημαντικής βιολογικής σημασίας, εξαιτίας της χημικής ποικιλομορφίας και αλληλεπίδρασής τους με βιολογικά μακρομόρια ως συνέπειας εξελικτικής επιλογής. Ωστόσο, οι ενώσεις αυτές χαρακτηρίζονται από περιορισμένη βιοδιαθεσιμότητα, πιθανότατα λόγω της χαμηλής λιποφιλίας τους. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι τα *O*-μεθυλιωμένα φλαβονοειδή εμφανίζουν υψηλότερη εντερική απορρόφηση, αντοχή έναντι του ηπατικού μεταβολισμού καθώς και αντικαρκινική δράση σε σχέση με τα πολύ-υδροξυλιωμένα παράγωγα. Προκειμένου να επιτευχθεί τοποεκλεκτική ακυλίωση των φλαβονοειδών και ταυτόχρονα να αποφευχθούν τα πολλαπλά απαιτούμενα στάδια προστασίας/αποπροστασίας στο πλαίσιο μιας καθαρά χημικής σύνθεσης, εξαιτίας του μεγάλου αριθμού υδροξυλομάδων που διαθέτουν, στραφήκαμε στην βιοκατάλυση. Υψηλές αποδόσεις αλλά και υψηλή τοποεκλεκτικότητα στην ακυλίωση του άγλυκου τμήματος των φλαβονοειδών επιτεύχθηκε μέσω ενζυμικού μετασχηματισμού. Στο πλαίσιο αυτής της μεθόδου η αύξηση της φυσικής βιοποικιλότητας των φλαβονοειδών μπορεί να επιτευχθεί με την παραγωγή περισσότερων βιοδραστικών παραγώγων μέσω βιομετατροπής.

Λέξεις-κλειδιά: φλαβονοειδή, βιοδιαθεσιμότητα, βιοκατάλυση

3.18 Regioselective biotransformation of natural derived polyphenols

Kyriakou E.¹, Katsoura M.², Primikyri A.¹, Charisiadis P.¹, Gerothanassis I.¹, Stamatis H.² and Tzakos A.¹

¹ Department of Chemistry, University of Ioannina

² Department of Biological Applications and Technologies, University of Ioannina

Natural products and especially flavonoids cover a very interesting chemical space of biological relevance due to their vast chemical diversity, and fine-tuning for optimal interactions with biological macromolecules through evolutionary selection. However, they usually suffer from low bioavailability upon oral administration, probably because of their low lipophilicity. Indeed, recent studies indicated that *o*-methylated flavonoids illustrated higher intestinal absorption, resistance to hepatic metabolism and better anticancer activity in respect to the hydroxylated compounds. In order to achieve regioselectivity in acylation reactions of flavonoids and avoid the tedious protection/deprotection steps required in a chemical synthesis method, due to the numerous reactive hydroxyl groups of this flavonoid, we turned to biocatalysis. We achieved high conversion yields as also high degree of regioselectivity of aglycone flavonoids to relevant esters by enzyme transformations. In the frame of this method an increase of the natural biodiversity of flavonoids could be achieved toward the production of more potent bioactive derivatives through biotransformation.

Keywords: Flavonoids, bioavailability, biocatalysis

3.19 Μεταβολισμός της γλυκερόλης στη ζύμη *Yarrowia lipolytica*

Μακρή Α.*, Φάκας Σ. & Αγγελής Γ.

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

*Email: annamakri@upatras.gr

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε ο μεταβολισμός της γλυκερόλης στη ζύμη *Yarrowia lipolytica* ACA-DC 50109 με έμφαση στη μετατροπή της σε λιπίδια (Single Cell Oils-SCO) και κιτρικό οξύ. Σε καλλιέργειες που πραγματοποιήθηκαν σε βιοαντιδραστήρα διαλείποντος έργου, επί πολλαπλώς περιοριστικού μέσου, διαπιστώθηκε η ύπαρξη τριών διακριτών φάσεων αύξησης που χαρακτηρίζονται από ιδιαίτερα μορφολογικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά: η φάση βιοσύνθεσης κυτταρικής μάζας, η ελαιογόνος φάση και η φάση παραγωγής κιτρικού οξέος.

Η γλυκερόλη διαπερνά την κυτταροπλασματική μεμβράνη με διευκολυνόμενη διάχυση και καταβολίζεται μέσω της οδού της φωσφορυλίωσης. Την υψηλή ενεργότητα της NAD^+ εξαρτώμενης ισοκιτρικής αφυδρογονάσης (NAD^+ -ICDH) κατά τη διάρκεια της φάσης βιοσύνθεσης κυτταρικής μάζας διαδέχθηκε σημαντική πτώση της ενεργότητάς της, επάγοντας τη λιπογένεση. Απρόσμενη αποδόμηση των αποθεματικών λιπιδίων και σημαντική βιοσύνθεση πολικών λιπιδίων παρατηρήθηκε κατά τη διάρκεια της φάσης παραγωγής κιτρικού οξέος. Το ελαϊκό οξύ ήταν το κυριότερο λιπαρό οξύ ενώ η φωσφατιδυλχολίνη-PC το κύριο φωσφολιπίδιο-P.

Σε συνεχές σύστημα καλλιέργειας επί θρεπτικού υλικού περιοριστικού σε άζωτο, βιοσυντέθηκαν περιορισμένες ποσότητες λιπιδίων (~10% wt/wt, επί της ξηρής βιομάζας), γεγονός που μπορεί αποδοθεί στο ότι δεν υπήρχε μια περιοχή του ειδικού ρυθμού αραίωσης (D, h^{-1}) στην οποία τα ένζυμα-κλειδιά, (ATP:κιτρική λυάση και μηλικό ένζυμο) να παρουσιάζουν συγχρόνως υψηλές ενεργότητες, ενώ η ενεργότητα της NAD^+ -ICDH μειώθηκε, όχι όμως σημαντικά, στους χαμηλούς D . Τα λιπίδια της ζύμης ήταν περισσότερο ακόρεστα σε ενδιάμεσες τιμές D . Σε όλους τους D η φωσφατιδυλαιθανολαμίνη-PE, η φωσφατιδυλινοσιτόλη-PI και η PC αντιπροσωπεύουν τις κυριότερες κλάσεις των P.

Σε πειράματα που πραγματοποιήθηκαν επί θρεπτικού υλικού περιοριστικού σε άζωτο, σε $D=0,026 h^{-1}$ σε διαφορετικές συγκεντρώσεις διαλυμένου οξυγόνου-DO παρατηρήθηκε αυξημένο ποσοστό του κλάσματος των P επί των ολικών λιπιδίων στις ακραίες σε τιμές DO. Ανεξάρτητα των τιμών DO η PC ήταν η κλάση με το μεγαλύτερο ποσοστό, ακολουθούμενη από την PI και PE.

Λέξεις-κλειδιά: *Yarrowia lipolytica*, μεταβολισμός γλυκερόλης, SCO και κιτρικό οξύ

3.19 Glycerol metabolism in *Yarrowia lipolytica*

Makri A.*, Fakas S. & Aggelis G.

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

*Email: annamakri@upatras.gr

In this present work glycerol metabolism in *Yarrowia lipolytica* ACA-DC 50109 was studied. The growth of *Y. lipolytica* was studied in batch cultures in multiple limited medium and three distinct phases were identified during growth cycle. In each phase, yeast cells were characterized by specific morphological and biochemical features: biomass formation phase, lipogenic phase and citric acid production phase.

Glycerol passes into the microbial cell by facilitated diffusion. *Y. lipolytica* successfully converts glycerol via phosphorylation pathway. Though high activity of NAD^+ dependent isocitric dehydrogenase (NAD^+ -ICDH) was detected during biomass formation phase, this activity was significantly decreased afterwards. Surprisingly, lipid turnover and synthesis of polar lipids simultaneously occurred with citric acid production. Oleic acid was the major fatty acid and phosphatidylcholine – PC was the main phospholipid-P. In continuous culture in nitrogen limited medium (N.L.) *Y. lipolytica* accumulated low quantities of lipids (~10% w/w, in dry weight), maybe due to the fact that there was not a region of specific dilution rate (D, h^{-1}) in which ATP:citrate lyase and malic enzyme presented simultaneously high activity while NAD^+ -ICDH activity was slightly decreased in low D . Lipids were more unsaturated in intermediate D while phosphatidylethanolamine-PE, phosphatidylinositol-PI and PC are the main P classes.

In experiments performed in N.L. medium in $D=0,026 h^{-1}$ in different dissolved oxygen-DO concentrations, it was found that in extreme DO values the percentage of P was increased. Independently the DO concentration PC was the main class followed by PI and PE.

Keywords: *Yarrowia lipolytica*, glycerol metabolism, SCO and citric acid

3.20 Μελέτη της μετατροπής της ακάθαρτης γλυκερόλης σε 1,3-προπανοδιόλη, 2,3-βουτανοδιόλη και αιθανόλη από επιλεγμένα βακτηριακά στελέχη

Μετσοβίτη Μ., Παραμυθιώτης Σ., Δροσινός Ε.Χ., Γαλιώτου-Παναγιώτου Μ., Νυχάς Γ.-Ι., Παπανικολάου Σ.

Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ελλάδα

*Email: spananik@aau.gr

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση της δυνατότητας μετατροπής της προερχόμενης από τη διεργασία παραγωγής βιοντήζελ απόβλητης γλυκερόλης σε προϊόντα υψηλής προ σταθιμότητας αξίας χρήσιμα για τη βιο μηχανία τρο φίμων και πλαστικών, όπως η 1,3-προπανοδιόλη, η 2,3-βουτανοδιόλη και η αιθανόλη. Σε πρώτη φάση πραγματοποιήθηκε επιλογή 84 στελεχών σχετικά με την ικανότητα τους να αφομοιώνουν τη γλυκερόλη. Εξ αυτών, 12 στελέχη αφομοίωσαν την ακάθαρτη γλυκερόλη υπό αναερόβιες συνθήκες και 5 υπό αερόβιες. Σε κλειστή καλλιέργεια υπό αναερόβια που πραγματοποιήθηκε σε βιοαντιδραστήρα, παράχθηκε 1,3-προπανοδιόλη σε συγκέντρωση 11.3 g/L από το στέλεχος *Clostridium butyricum* NRRL B-23495, ενώ η αντίστοιχη τιμή 1,3-προπανοδιόλης ήταν 10.1 g/L από ένα πρόσφατα απομονωμένο στέλεχος *Citrobacter freundii* (οι συντελεστές αποδόσεως της παραγόμενης 1,3-προπανοδιόλης προς γλυκερόλη ήταν 0.58 and 0.48 g/g αντίστοιχα). Το ανωτέρω στέλεχος *C. butyricum* καλλιεργούμενο σε βιοαντιδραστήρα υπό υψηλότερες αρχικές συγκεντρώσεις γλυκερόλης (55 g/L), παρήγαγε 1,3-προπανοδιόλη της οποίας η μέγιστη τιμή ήταν ~32 g/L. Εξ άλλου, 2,3-βουτανοδιόλη παράχθηκε από ένα νέο απομονωμένο στέλεχος *Enterobacter aerogenes* υπό πλήρως αερόβιες συνθήκες σε πειράματα που έλαβαν χώρα σε αναδευόμενες φιάλες, με μέγιστη τελική συγκεντρωσή διόλης ~22 g/L (συντελεστής αποδόσεως ~0.40 g/g) σε μέσα αρχικής συγκεντρώσεως γλυκερόλης 55 g/L. Τελικώς, σε κλειστές αναερόβιες καλλιέργειες που πραγματοποιήθηκαν σε βιοαντιδραστήρα με σταθερό pH, ένα άλλο πρόσφατα απομονωμένο στέλεχος *C. freundii* διενήργησε στη μετατροπή της γλυκερόλης σε αιθανόλη με τελική συγκεντρωσή αιθανόλης 14.5 g/L, συντελεστή αποδόσεως 0.45 g/g και παραγωγικότητα κατά όγκο ~0.7 g/L/h, που είναι τιμές πολύ κοντινές στις υψηλότερες της βιβλιογραφίας για αυτού του είδους τη ζύμωση.

Λέξεις-κλειδιά: βιοντήζελ, ακάθαρτη γλυκερόλη, 1,3-προπανοδιόλη, 2,3-βουτανοδιόλη, αιθανόλη

Ευχαριστίες

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

3.20 Study of the conversion of crude glycerol into 1,3-propanediol, 2,3-butanediol and ethanol by selected bacterial strains

Metsoviti M., Paramithiotis S., Drosinos E.H., Galiotou-Panayotou M., Nychas G.-J.E., Papanikolaou S. *

Department of Food Science and Technology, Agricultural University of Athens, Athens, Greece

*Email: spananik@aau.gr

Study of bacterial strains capable to convert glycerol deriving from biodiesel facilities into metabolic compounds of importance for the food, textile and chemical industry like 1,3- propanediol (PDO), 2,3-butanediol (BD) and ethanol (EtOH) was performed. 84 bacterial strains were screened using glycerol as carbon source. After initial trials, 12 strains were revealed capable of consuming raw glycerol under anaerobic conditions, while 5 strains consumed glycerol under aerobiosis. In batch bioreactor anaerobic cultures, PDO up to 11.3 g/L was produced by *Clostridium butyricum* NRRL B-23495, while the respective value was 10.1 g/L by a newly isolated *Citrobacter freundii* (conversion yields of 1,3-propanediol produced per glycerol consumed 0.58 and 0.48 g/g respectively). Adaptation of *C. butyricum* at higher initial glycerol concentration media (e. g. 55 g/L), resulted in PDOmax concentration of ~32 g/L. On the other hand, BD was produced by a new *Enterobacter aerogenes* isolate in shake-flask experiments, under fully aerobic conditions, with a maximum concentration of ~22 g/L (yield ~0.40 g/g) being achieved at initial glycerol concentration media of 55 g/L. Finally in batch bioreactor anaerobic cultures performed at constant pH, another newly isolated *C. freundii* isolate converted waste glycerol into EtOH, with the final values of EtOH concentration of 14.5 g/L, conversion yield of 0.45 g/g and volumetric productivity of ~0.7 g/L/h being achieved. These values are close to the maximum ones achieved in the international literature for this type of conversion.

Keywords: biodiesel, crude glycerol, 1,3-propanediol, 2,3-butanediol, ethanol

Acknowledgements

Financial support has been provided by the European Union (FP7 Program "Propanergy – Integrated bioconversion of glycerine into value-added products and biogas at pilot plant scale", Grant number: 212671).

3.21 Βιοσύνθεση λιπιδίων με υψηλή περιεκτικότητα σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα από καλλιέργειες Ζυγομυκήτων σε γλυκερόλη

Μπέλλου Σ., Μουστογιάννη Α. & Αγγελής Γ.

Εργαστήριο Μικροβιολογίας, Τομέας Γενετικής, Βιολογίας Κυπάρου και Ανάπτυξης, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών, Πάτρα, 265 04-GR
Email: George.Aggelis@upatras.gr

Οι ελαιογόνοι Ζυγομύκητες έχουν την ικανότητα να μεταβολίζουν τη γλυκερόλη και να συσσωρεύουν σημαντικές ποσότητες λιπιδίων, κυρίως ουδέτερων λιπιδίων (NL) και δευτερευόντως γλυκολιπιδίων, σφινγολιπιδίων και φωσφολιπιδίων (P). Η βιοσύνθεση των P στους *Mortierella ramanniana*, *Mucor* sp. και *Cunninghamella echinulata* πραγματοποιήθηκε ενώ η διαδικασία συσώρευσης των NL ήταν σε εξέλιξη. Όλα τα λιπιδιακά κλάσματα ήταν πλούσια σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA), αν και παρατηρήθηκε μείωση της συγκέντρωσης τους με το χρόνο στην περίπτωση του *M. ramanniana*. Αντίθετα, στην περίπτωση του *C. echinulata*, η συγκέντρωση των PUFA αυξήθηκε κατά τη διάρκεια της αύξησης σε όλα τα κλάσματα, και κυρίως στο κλάσμα των P.

Η κύρια λειτουργία των PUFA στους Ζυγομύκητες σχετίζεται με τη συμμετοχή τους στις μυκηλιακές μεμβράνες. Κατά συνέπεια θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι η βιοσύνθεση αυτών των λιπαρών οξέων σχετίζεται άμεσα με τη μυκηλιακή αύξηση. Ωστόσο αυτό ισχύει μόνο για ορισμένες περιπτώσεις Ζυγομυκήτων όπως αυτή του *M. ramanniana*. Αντίθετα, υπό τις ίδιες πειραματικές συνθήκες, η βιοσύνθεση των PUFA 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. Η φωσφατιδυλ- ινοσιτόλη και φωσφατιδυλ-χολίνη ήταν οι υπερέχουσες κλάσεις των φωσφολιπιδίων στις περιπτώσεις των *C. echinulata* και *M. ramanniana*, αντίστοιχα. Ειδικότερα, στην περίπτωση του *M. ramanniana* μείωση της συγκέντρωσης των PUFA παρατηρήθηκε μετά από επώαση του μυκηλίου σε χαμηλές θερμοκρασίες (συνθήκες υπό τις οποίες φυσιολογικά ευνοείται η βιοσύνθεση των PUFA), υποδεικνύοντας ότι η βιοσύνθεση των PUFA σε αυτό το μύκητα σχετίζεται με τον πρωτογενή μεταβολισμό.

Λέξεις-κλειδιά: Ζυγομύκητες, Κατανομή λιπαρών οξέων, Ουδέτερα και πολικά λιπίδια

3.21 Biosynthesis of lipids with high polyunsaturated fatty acids content by Zygomycetes grown on glycerol

Bellou S., Moustogianni A. & Aggelis G.

Unit of Microbiology, Division of Genetics; Cell and Development Biology, Department of Biology; University of Patras; Patras; 265 04 – GR
E-mail: George.Aggelis@upatras.gr

Several strains of Zygomycetes cultivated on glycerol produced mycelia rich in lipids containing higher amounts of neutral lipids (NL) than glycolipids plus sphingolipids and phospholipids (P), while biosynthesis of P in *Mortierella ramanniana*, *Mucor* sp. and *Cunninghamella echinulata* occurred though NL accumulation process was in progress. Polyunsaturated fatty acids (PUFA) concentration gradually decreased in all lipid fractions of *M. ramanniana* during growth. In contrast, in *C. echinulata* concentration of both linoleic and γ -linolenic acids increased with time, especially in P.

Taking for granted that the main function of PUFA is associated to their participation in mycelial membranes we could suppose that biosynthesis of these fatty acids is associated to mycelial growth. However, this is accurate only for some Zygomycetes, e.g. *M. ramanniana*. On the contrary, PUFA biosynthesis in *C. echinulata* persists after growth cessation, suggesting that in this species biosynthetic ability is not a strictly growth-associated process. Phosphatidyl-inositol and phosphatidyl-choline were the major P classes in *C. echinulata* and *M. ramanniana*, respectively. In *M. ramanniana*, a decrease of PUFA concentration was noticed even when mycelia were incubated in low temperature (conditions that normally favor PUFA biosynthesis), indicating that PUFA biosynthesis in this fungus is associated to primary metabolism.

Keywords: Zygomycetes, Fatty acid distribution, Neutral and polar lipids

3.22 Μελέτη των λιπιδίων του *Brachionus plicatilis* μετά από διατροφή του με καλλιέργειες μικροφυκών

Μπίρκου Μ.^{1,2}, Μπόκας Δ.², Αγγελής Γ.¹

¹ Εργαστήριο Μικροβιολογίας, Τομέας Γενετικής, Βιολογίας Κυττάρου και Ανάπτυξης, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών, Πάτρα, 265 04-GR

² Πλαγκτόν Α.Ε., Γρίβα 17, Αγρίνιο 301 00-GR

Τα μικροφύκη αποτελούν σημαντική ή αποκλειστική πηγή τροφής πολλών υδρόβιων ζώων (π.χ. τροχοζώων) τα οποία στη συνέχεια χρησιμοποιούνται στη διατροφή των ιχθύων. Καλλιεργούνται σε βιομηχανική κλίμακα ως πηγή πολυακόρεστων λιπαρών οξέων. Τα τροχόζωα του είδους *Brachionus plicatilis* χρησιμοποιούνται ευρύτατα ως πρώτη τροφή των προνυμφών των ψαριών και μπορεί να αφομοιώνουν διάφορες κατηγορίες τροφών όπως μικροφύκη, ζύμες, βακτήρια ή γαλακτώματα πλούσια σε ω-3 λιπαρά οξέα (εμπλουτιστικά).

Στην παρούσα εργασία το στέλεχος *B. plicatilis* CCAP 5010/4 καλλιεργήθηκε σε δεξαμενές των 2,500 L και σε θερμοκρασία 25 °C. Για τη διατροφή του *B. plicatilis* χρησιμοποιήθηκαν διάφορες κατηγορίες τροφών όπως καλλιέργειες μικροφυκών (*Nannochloropsis oculata* και *Chlorella* sp.), ζύμη αρτοποιίας καθώς και εμπλουτιστικά, με σκοπό να διευκρινιστεί η επίδραση τους στη συσσώρευση λιπιδίων καθώς και στη σύσταση τους σε λιπαρά οξέα. Βρέθηκε ότι ανεξαρτήτως των συνθηκών που επικρατούσαν το ποσοστό των λιπιδίων που συσσωρεύτηκε έφτασε περίπου το 30% (w/w) επί της ξηρής βιομάζας. Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι το πρότυπο κατανομής των λιπαρών οξέων των λιπιδίων του *B. plicatilis* ακολούθησε το πρότυπο κατανομής των λιπαρών οξέων της τροφής η οποία χρησιμοποιούνταν κάθε φορά. Για παράδειγμα, τροχόζωα τα οποία τράφηκαν με καλλιέργειες μικροφυκών συσσώρευσαν λιπίδια τα οποία περιείχαν σημαντικά ποσοστά εικοσαπεντανοϊκού οξέος (>15%). τέλος, παρατηρήθηκε *de novo* βιοσύνθεση ω-3 λιπαρών οξέων στα τροχόζωα τα οποία τράφηκαν με ζύμη αρτοποιίας.

Μεταξύ των λιπιδιακών κλασμάτων, τα ουδέτερα λιπίδια κατείχαν το υψηλότερο ποσοστό (65% w/w επί των ολικών λιπιδίων) και ακολουθούσαν τα φωσφολιπίδια (25% w/w επί των ολικών λιπιδίων) και τα γλυκο- και σφίγγο- λιπίδια (10% w/w επί των ολικών λιπιδίων).

Λέξεις-κλειδιά: *Brachionus plicatilis*, λιπαρά οξέα, μικροφύκη

3.22 Fatty acids composition of *Brachionus plicatilis* lipids fed with microalgae cultures

Birkou M.^{1,2}, Bokas D.², Aggelis G.¹

¹ Unit of Microbiology, Division of Genetics, Cell and Development Biology, Department of Biology; University of Patras 265 04 – GR

² Plagton S.A., Griva 17, Agrinio 301 00 - GR

Microalgae are an important feed and feed additive for many aquatic animals (i.e. rotifers) which, in turn, are used as live food in larvae feed. They are cultivated as a source of polyunsaturated fatty acids in large scale. The rotifer *Brachionus plicatilis* is widely used as first-feeding of marine fish larvae as it can be easily manipulated and may be fed on a variety of food types.

In the present study *B. plicatilis* CCAP 5010/4 was cultivated in 2,500 L tanks, at a constant temperature 25 °C. Different food types such as microalgae cultures (*Nannochloropsis oculata* and *Chlorella* sp.), baker's yeast and enrichers (oil emulsions) were used in order to study the effect of feeding conditions on lipid content and fatty acid composition of *B. plicatilis* lipids and consequently how fatty acids are transferred in fish larvae through food chain. We found that lipid content of *B. plicatilis* was constant and approximately equal to 30% (w/w) of dry weight for almost all feeding conditions. Moreover, fatty acid composition of *B. plicatilis* lipids was depended on the fatty acid composition of the feed. For instance, when rotifers were fed with microalgae cultures their lipids were rich in eicosapentaenoic acid (>15%). Furthermore, it was observed *de novo* biosynthesis of ω-3 fatty acids in rotifers fed with baker's yeast.

Among lipid fractions, the proportion of neutral lipids was the highest (65% w/w of total lipids), followed by phospholipids (25% w/w of total lipids) and glyco- plus sphingo-lipids (10% w/w of total lipids).

Keywords: *Brachionus plicatilis*, fatty acids, microalgae

3.23 Βιοενεργότητα απομονωμένων στελεχών από το υποθαλάσσιο ηφαίστειο Κολούμπο

Μπουρμπούλη Μ.¹, Σαββίδης Α.¹, Ρούσσης Β.², Παπαθανασίου Ε.³
Καραγκούνη Α.Δ.¹

¹ Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Βιολογίας, Τομέας Βοτανικής, Ομάδα Μικροβιολογίας, Πανεπιστημιούπολη Ζωγράφου, 15781 Αθήνα

² Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Φαρμακευτικής, Τομέας Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων, Πανεπιστημιούπολη Ζωγράφου, 15771, Αθήνα

³ ΕΛ.ΚΕ.ΘΕ, Ινστιτούτο Ωκεανογραφίας, 46,7 χλμ. Αθηνών-Σουνίου, Ανάνυσσος, 19013, Αττική

Τα υδροθερμικά πεδία βαθιάς θάλασσας ανακαλύφθηκαν μόλις πριν από 35 χρόνια και από τότε έχουν γίνει πολλές προσπάθειες για τη συλλογή και την ερμηνεία δεδομένων όσον αφορά στις βιοτεχνολογικές εφαρμογές των μικροβιακών πληθυσμών που τις κατοικούν. Οι βακτηριακοί πληθυσμοί βαθιάς θάλασσας παρουσιάζουν γονιδιώματα μεγαλύτερου μεγέθους σε σχέση με τα ίδια είδη που βρίσκονται σε ρηχά νερά, γεγονός που μεταφράζεται σε υψηλότερο ποσοστό ρυθμιστικών γονιδίων και άρα αυξανόμενης δευτερογενούς μεταβολικής ικανότητας. Μολονότι υπάρχει μεγάλο ενδιαφέρον για τους μικροοργανισμούς που κατοικούν σε υδροθερμικές πηγές, η μικροβιακή κατανομή και ποικιλότητα παραμένουν άγνωστες σε μεγάλο βαθμό. Πρόσφατη εξερεύνηση του υποθαλάσσιου ηφαίστειου Κολούμπο, με τηλεχειριζόμενο όχημα, αποκάλυψε πολύ ενεργό υδροθερμικό πεδίο με θερμοκρασία 220 °C. Στην παρούσα μελέτη παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του πληθυσμού μεσόφιλων βακτηρίων που απομονώθηκαν από τον πυθμένα του Κολούμπο. 800 αερόβια ετερότροφα βακτήρια και ακτινοβακτήρια απομονώθηκαν από ίζημα και καμινάδες και αναπύχθηκαν στα εκλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα Marine Agar και Tryptone Glucose Agar. Πραγματοποιήθηκε ανάλυση των απομονωθέντων βακτηρίων σε επίπεδο στελεχούς με BOX-PCR. Τα διαφορετικά στελέχη που προέκυψαν μελετήθηκαν φαινοτυπικά και ταξινομήθηκαν βάση της ανάλυσης της αλληλουχίας του γονιδίου 16S rDNA. Τα απομονωθέντα στελέχη ελέγχθηκαν *in vitro* για αντιμυκητιακή και αντιβακτηριακή δραστηριότητα έναντι 3 μικροβιακών δεικτών (*E. coli*, *B. subtilis*, και *S. cerevisiae*). Στα δραστικά στελέχη διερευνήθηκε η ποιότητα των παραγόμενων βιοενεργών ενώσεων.

Λέξεις-κλειδιά: υδροθερμικά πεδία βαθιάς θάλασσας, μικροβιακή ποικιλότητα, βιοενεργές ενώσεις

3.23 Bioactivity of bacterial isolates from Kolumbo submarine volcano, Aegean sea

Bourbouli M.¹, Savvides A.¹, Roussis V.², Papathanassiou E.³, Karagouni A.D.¹

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

² Division of Pharmacognosy and Chemistry of Natural Products, Department of Pharmacy, University of Athens, Panepistimiopolis Zografou, Athens 15771, Greece

³ Hellenic Centre for Marine Research, Institute of Oceanography, P.O.Box 712, 19013, Anavissos, Attiki, Greece

Deep sea hydrothermal vents were discovered almost 35 years ago and since then a lot of efforts have been made to collect and interpret data giving information about the biotechnological resources of biologically diverse communities flourishing in the vicinity of vents flows. Deep-sea bacterial communities compared to surface-dwelling species, have a larger average genome size translated into a higher proportion of regulation genes therefore providing an increased secondary metabolic capacity. Although there has been tremendous scientific interest in the microbial ecology of "hot-spot ecosystems", such as hydrothermal vents, the distribution and diversity of taxonomic groups of bacteria and within the deep sea is largely unknown. Recent remotely operated vehicle exploration of Kolumbo submarine volcano in the Aegean Sea revealed a very active high-temperature hydrothermal vent field with temperatures as high as 220 °C. Here we present the results for the mesophilic bacteria population isolated from Kolumbo hydrothermal field. 800 aerobic heterotrophic bacteria and actinobacteria have been isolated from samples of chimneys and sediment grown on Marine Agar and Tryptone Glucose Agar media. BOX-PCR analysis was performed for the discrimination of the bacterial isolates at the strain level. Each one of the different strains was characterized phenotypically and classified by 16S rDNA gene amplification and sequencing analysis. These isolates were screened *in vitro* for antifungal and antibacterial activity against 3 test strains (*E. coli*, *B. subtilis*, and *S. cerevisiae*); the quality of the bioactive compounds is under investigation.

3.24 Αποτελεσματικότητα διαφορετικών τύπων θρεπτικών στη βιοεξυγίανση (landfarming) αμμώδους ακτής ρυπασμένης με πετρέλαιο

Νικολοπούλου, Μ.¹, Πασαδάκης Ν.² και Καλογεράκης Ν.¹

¹ Τμήμα Μηχανικών Περιβάλλοντος

² Τμήμα Μηχανικών Ορυκτών Πόρων

Πολυτεχνείο Κρήτης, Πολυτεχνειούπολη, 73100 Χανιά

Οι Μεσογειακές ακτές είναι ιδιαίτερες εκτεθειμένες σε κάθε πιθανή ρύπανση από πετρελαιοειδή λόγω της εκβιομηχάνισης και της αστικοποίησης των περιοχών και της μεταφοράς του πετρελαίου και των ραφινρισμένων προϊόντων του από τα διυλιστήρια. Η βιοεξυγίανση μέσω της τεχνικής landfarming είναι παράλληλα απλή και χαμηλού κόστους συγκρινόμενη με άλλες. Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να μελετηθούν πιθανές μέθοδοι που θα ενίσχυαν τον ρυθμό βιοαποδόμησης του πετρελαίου στη ρυπασμένη ακτή μειώνοντας έτσι τον χρόνο που απαιτείται για να βιοαποδομηθεί.

Προσεγγίσεις με ανόργανα θρεπτικά (KNO₃ και K₂HPO₄, -NPK treatment) στην ρυπασμένη με πετρέλαιο αμμώδη ακτή μπορεί να διεγείρει την αποδόμηση των υδρογονανθράκων από τους αυτόχθονες μικροοργανισμούς. Η δυνατότητα των βιογενών επιφανειοδραστικών ενώσεων (Rhamnolipids), παρουσία οργανικών θρεπτικών (Uric Acid, Lecithin-ULR treatment) να διεγείρουν την βιοαποδόμηση του γηρασμένου πετρελαίου σε ιζήματα εξετάστηκε σε μικρόκοσμο στο εργαστήριο για περίοδο 45 ημερών.

Οι αποδομητές του πετρελαίου μετρώνται με βάση την διαδικασία ανάλυσης του πιο πιθανού αριθμού (Most Probable Number) σύμφωνα με τους Wrenn και Venosa. Η βιοαποδόμηση εκτιμάται με βάση την ανάλυση σε Αέριο Χρωματογράφο / φασματομέτρο μάζας (GC/MS) των κορεσμένων και πολυαρωματικών αρωματικών υδρογονανθράκων (PAHs) και οι υπολογιζόμενες συγκεντρώσεις διωρθώνονται ως προς το χοπάνιο για αβιοτικό έλεγχο. Οι αναλύσεις δείχνουν ότι το κορεσμένο κλάσμα του εναπομείναντος πετρελαίου βιοαποδομείται εκτενέστερα σε σχέση με το αρωματικό κλάσμα, όπως επίσης και η μικροβιακή ανάπτυξη είναι μεγαλύτερη ύστερα από διάστημα 3 εβδομάδων σε σχέση με αυτή στο δείγμα ελέγχου (control). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα δείγματα NPK και ULR είναι εξίσου αποτελεσματικά σε ένα διάστημα 30 ημερών και ότι τα κανονικά αλκάνια C12-C35 όπως και οι αρωματικοί υδρογονάνθρακες 2, 3 και 4 δακτυλίων αποδομήθηκαν πάνω από 85% μετά από 45 ημέρες. Τα αποτελέσματα καταδεικνύουν ότι τα ανόργανα θρεπτικά που προστέθηκαν ενίσχυσαν σημαντικά την δράση των αυτοχθόνων μικροοργανισμών, καθώς επίσης και την απομάκρυνση των ολικών ανακτώμενων πετρελαιοειδών υδρογονανθράκων (TRPH) μετά από επεξεργασία 45 ημερών.

Λέξεις-κλειδιά: πετρελαιοκηλίδες, landfarming, ανόργανα θρεπτικά, λιποφιλικά θρεπτικά, βιογενείς επιφανειοδραστικές ενώσεις.

3.24 Effectiveness of different types of nutrients on landfarming of crude oil contaminated beach sand

Nikolopoulou M.¹, Pasadakis N.² and Kalogerakis N.¹

¹ Department of Environmental Engineering

² Department of Mineral Resources Engineering

Technical University of Crete, Polytechniopolis, 73100 Chania, Greece

Mediterranean coastal regions are particularly exposed to oil pollution due to extensive industrialization and urbanization and transport of crude and refined oil to and from refineries. Bioremediation through landfarming is both simple and cost-effective to implement compared with other treatment Technologies. The purpose of the present study was to investigate possible methods to enhance the rate of biodegradation of oil contaminated beach sand, thus reducing the time usually required for bioremediation.

Amendment of inorganic nutrients (KNO₃ and K₂HPO₄, -NPK) to oil contaminated beach sand can potentially stimulate the biodegradation of hydrocarbons by the indigenous microbial biomass. The ability of biosurfactants (Rhamnolipids), in the presence of organic nutrients (Uric Acid, Lecithin-ULR), to stimulate biodegradation in sediments amended with weathered crude oil was also investigated in laboratory microcosms over a 45-day period. Hydrocarbon degraders were measured according to most probable number (MPN) procedure of Wrenn and Venosa. Biodegradation was tracked by GC/MS analysis of aliphatic and polycyclic aromatic hydrocarbons components and the measured concentrations were corrected for abiotic removal by hopane normalizations. The saturated fraction of the residual oil is degraded more extensively than the aromatic fraction and the bacterial growth after an incubation period of approximately 3 weeks is greater from the bacterial growth in the control.

The results showed that the treatments of NPK and ULR are equally effective in a period of almost 30 days, C12-C35 n-alkanes were degraded more than 85% and the 2, 3 and 4 ringed polyaromatic hydrocarbons were degraded more than 85% after 45 days. The results clearly show that the addition of inorganic nutrients to beach sand significantly enhanced the activity of indigenous microorganisms, as well as the removal of total recoverable petroleum hydrocarbons (TRPH) over a 45-day study period.

Keywords: oil spills, landfarming, inorganic nutrients, lipophilic nutrients, biosurfactants.

3.25 Αξιοποίηση αποβλήτων ελαιοτριβείων μέσω μικροβιακών διεργασιών

Ντάικου Ι.¹ και Λυμπεράτος Γ.^{1,2}

¹ ΓΤΕ/ΕΙΧΗΜΥΘ, Πλατάνι Πατρών, 26504, Πάτρα

² Σχολή Χημικών Μηχανικών, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, 15780, Αθήνα

Το ελαιόλαδο αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα αγροτικά προϊόντα στην λεκάνη της Μεσογείου. Ωστόσο κατά την παραγωγή του προκύπτουν μεγάλες ποσότητες αποβλήτων που αν δεν υποστούν κατάλληλη επεξεργασία πριν την διάθεσή τους, μπορεί να οδηγήσουν σε περιβαλλοντική υποβάθμιση. Από τα σύνθητη στην Ελλάδα τριφασικά ελαιοτριβεία παράγονται ταυτόχρονα δυο τύποι αποβλήτων* ένα υγρό απόβλητο, ο κασιγάρος, κι ένα στερεό, ο ελαιοπυρήνας.

Ο κασιγάρος περιέχει αδιάλυτη οργανική ύλη πλούσια σε λιγνοκυτταρίνη καθώς και διαλυτές οργανικές ενώσεις όπως σάκχαρα, πολυαλκοόλες, φαινολικά οξέα και πολυφαινόλες. Ο ελαιοπυρήνας αποτελείται από την ημιαφυδατωμένη σάρκα του καρπού καθώς και τους συνθλιμμένους πυρήνες, και συνεπώς περιέχει υψηλά ποσοστά λιγνοκυτταρίνης. Εφόσον και τα δυο απόβλητα διαθέτουν υψηλή περιεκτικότητα υδατανθράκων, σύνθετων ή/και απλών θεωρητικά θα μπορούσαν να αποτελέσουν κατάλληλα υποστρώματα για την παραγωγή διαφόρων προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας μέσω μικροβιακών διεργασιών. Ωστόσο εικάζεται ότι η παρουσία φαινολικών ουσιών στα απόβλητα αυτά μπορεί να έχει παρεμποδιστική δράση στην ανάπτυξη συγκεκριμένων μικροοργανισμών.

Στην παρούσα εργασία παρουσιάζονται συγκριτικά πέντε διαφορετικές προσεγγίσεις για την αξιοποίηση των αποβλήτων ελαιοτριβείου μέσω διαφορετικών τύπων μικροοργανισμών. Μικτές βακτηριακές καλλιέργειες χρησιμοποιήθηκαν είτε για την συνδιαστική παραγωγή υδρογόνου και βιοπλαστικών, είτε βιοαερίου από κασιγάρο. Επίσης καθαρές καλλιέργειες του βακτηρίου *Ruminococcus albus*, της ζύμης *Pachysolen tannophylus* και του μύκητα *Pleurotus ostreatus* χρησιμοποιήθηκαν για την βιομετατροπή του ελαιοπυρήνα σε υδρογόνο, αιθανόλη και βρώσιμη βιομάζα αντίστοιχα. Αποδείχθηκε ότι οι διεργασίες που βασίζονται σε μεθανογόνα βακτήρια και στο *R. albus* ήταν οι λιγότερο επιτυχείς, ενώ σε όλες τις άλλες περιπτώσεις οι αποδόσεις του τελικού προϊόντος ήταν αρκετά ικανοποιητικές.

Λέξεις-κλειδιά: απόβλητα ελαιοτριβείων, μικροβιακές ζυμώσεις, υδρογόνο, πολυ-υδροξυ-αλκανοϊκοί εστέρες, αιθανόλη

3.25 Valorisation of olive mill wastes via microbial processes

Ntaikou I.¹ and Lyberatos G.^{1,2}

¹ FORTH/ICEHT, 26504, Patras

² School of Chemical Engineering, National Technical University of Athens, 15780, Athens

The production process of olive oil, one of the main agricultural products in the Mediterranean area, leads to the generation of large quantities wastes that can represent an environmental hazard when not treated properly. From the commonly used three phase mills, two streams of wastes emerge, i.e. the liquid olive mill wastewater (OMW) and olive mill solid residues (OMSR). OMW contains insoluble organic substances rich in lignocellulose and soluble organic substances such as sugars and phenolic compounds. OMSR consists of the remaining pulp of olive processing after the extraction of oil as well as the cracked seed of the olive fruits, containing thus large quantities of lignocellulose, but also residual phenolics. Since they are rich in carbohydrates, both wastes could possibly be used as substrate in various bioconversions for the production of high added value products. A question though that has to be answered is whether the selected microorganisms are inhibited by the presence of phenolics.

In the present study, five approaches for the valorization of olive mill wastes are presented, using different types of microorganisms. Mixed bacterial cultures were used for either the combined production of hydrogen and PHAs from OMW, or for biogas production. Pure cultures of the bacterium *Ruminococcus albus*, the yeast *Pachysolen tannophylus* and the fungus *Pleurotus ostreatus* were used for the conversion of OMSR to hydrogen, ethanol and edible biomass respectively. It was shown that processes based on methanogenic bacteria and *R. albus* were the least successful, whereas in all other cases yields were quite satisfactory.

3.26 Εφαρμογή μικροβιακών λιπασών για τη βιοκαταλυτική παρασκευή νέων υβριδικών αντιοξειδωτικών σε πράσινα μέσα

Παπαδοπούλου Α.¹, Χατζηκωνσταντίνου Α.¹, Κατσούρα Μ.¹, Πολύδερα Α. Κ.¹, Βουτσάς Ε.², Δέτση Α.³, Σταμάτης Χ.¹

¹ Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας, Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, 45110 Ιωάννινα

² Εργαστήριο Θερμοδυναμικής και Φαινομένων Μεταφοράς, Σχολή Χημικών Μηχανικών Ε.Μ. Πολυτεχνείο 15780 Αθήνα

³ Εργαστήριο Οργανικής χημείας, Σχολή Χημικών Μηχανικών Ε.Μ. Πολυτεχνείο 15780 Αθήνα

Στην παρούσα εργασία εστιάζουμε στην ανάπτυξη βιοκαταλυτικών διεργασιών, μέσω της εφαρμογής λιπασών μικροβιακής προέλευσης σε πράσινα μέσα, για την παρασκευή μιας νέας κατηγορίας υβριδικών αντιοξειδωτικών, παραγώγων του λιποϊκού οξέος. Το α- λιποϊκό οξύ, είναι ένα φυσικό αντιοξειδωτικό μόριο το οποίο έχει βρει ευρύτατη εφαρμογή ως διατροφικό συμπλήρωμα, αποτέλεσμα της αντιοξειδωτικής και αντιφλεγμονώδους δράσης αλλά και άλλων πιθανών ευεργετικών βιολογικών δράσεων. Στην εργασία παρουσιάζονται αποτελέσματα που αφορούν στην παρασκευή νέων παραγώγων του λιποϊκού οξέος, που παρασκευάζονται μέσω της ενζυμικά καταλυόμενης σύζευξης του λιποϊκού οξέος με άλλα φυσικά βιοδραστικά μόρια όπως η τυροσόλη και η τυραμίνη αλλά και βιταμίνες (B₆ and C). Η σύζευξη των βιοδραστικών αυτών μορίων επιτυγχάνεται μέσω αντιδράσεων εστεροποίησης και αμιδοποίησης που καταλύουν μικροβιακές λιπάσες σε πράσινα μέσα που βασίζονται στη χρήση ιοντικών υγρών. Οι ιδιότητες των ιοντικών υγρών όπως η χαμηλή τοξικότητα αλλά και η δυνατότητα ρύθμισης των ιδιοτήτων τους, έχουν οδηγήσει στην όλο και μεγαλύτερη χρήση των διαλυτών αυτών σε βιοκαταλυτικές διεργασίες για την παρασκευή προϊόντων με διατροφική και θεραπευτική αξία. Στην παρούσα εργασία μελετήσαμε παράγοντες που επιδρούν στην αποτελεσματικότητα της αποτελεσματικότητας των βιοκαταλυτικών συστημάτων όπως η φύση των ιοντικών υγρών, η συγκέντρωση των υποστρωμάτων, η φύση των λιπασών κ.ά. Η αντιοξειδωτική δράση των νέων υβριδικών αντιοξειδωτικών, προσδιορίστηκε μέσω της ικανότητά τους να αναστέλουν τη δράση ενζύμων που εμπλέκονται σε μεταβολικές οξειδωτικές διεργασίες, όπως η οξειδάση της ξανθίνης και η λιποξυγενάση.

3.26 Use of microbial lipases for the biocatalytic preparation of novel hybrid antioxidants in "green" media

Papadopoulou A.¹, Chatzikonstantinou A.¹, Katsoura M.¹, Polydera A. C.¹, Voutsas E.², Detsi A.³, Stamatis H.¹

¹ Laboratory of Biotechnology, Department of Biological Applications & Technologies, University of Ioannina, Ioannina, Greece

² Laboratory of Thermodynamics and Transport Phenomena, School of Chemical Engineering, National Technical University of Athens

³ Laboratory of Organic Chemistry, School of Chemical Engineering, National Technical University of Athens, Greece

In the present work we focused on the development of biocatalytic processes, using microbial lipases in green reaction media, for the preparation of a new class of hybrid antioxidants, derivatives of lipoic acid. α-Lipoic acid is an antioxidant molecule widely used as nutrition complement, due to its antioxidant, anti-inflammatory and other possible beneficial biological activities. More specifically, derivatives of lipoic acid with other bioactive molecules such as tyrosol or tyramine as well as with various vitamins (B₆ and C) were produced through esterification or amidation reactions catalyzed by various immobilized lipases in several "green" media such as ionic liquids-based media. The reduced toxicity and widely tunable properties of ionic liquids is an important advantage for their use as media for the biocatalytic modification of compounds that can be used as food additives or as therapeutic compounds. In the present work we investigated the effect of the nature of ionic liquids, the molar ratio of substrates and their solubility, the origin of the enzymes used etc, on the biocatalytic performance of microbial lipases. The antioxidant activity of the hybrid molecules was evaluated through their ability to inhibit the activity of xanthine-oxidase and lipoxigenase.

Keywords: Lipase, antioxidants, lipoic acid, biocatalysis, ionic liquids

3.27 Επαγωγή και βελτιστοποίηση των συνθηκών καλλιέργειας των κυττάρων της πολυμορφικής ζύμης *Kluyveromyces marxianus* για παραγωγή εξωκυττάρων υδρολασών

Παπαμιχαήλ Ε.Μ., Φούκης Α., Σκλιβανίτη Ε., Στεργίου Π.Γ., και Θεοδώρου Α.Γ.

Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Τμήμα Χημείας, Ιωάννινα 45110, Ελλάδα
Email: epapamic@cc.uoi.gr

Οι εξωκυττάρια υδρολάσες περιλαμβάνουν ένζυμα όπως: (α) αμυλάσες, δηλαδή ένζυμα που καταλύουν κυρίως, την υδρόλυση των ο-γλυκοζιτικών δεσμών των πολυσακχαριτών, (β) πρωτεάσες, δηλαδή ένζυμα που καταλύουν την υδρόλυση των πεπτιδικών δεσμών των πρωτεϊνών και των πολυπεπτιδίων και (γ) λιπάσες, δηλαδή ένζυμα που καταλύουν κυρίως την υδρόλυση των τρι-ακυλ-γλυκερολών σε δι-, είτε μονο- ακυλ-γλυκερόλες, γλυκερίνη και ελεύθερα οργανικά οξέα.

Οι υδρολάσες έχουν βρει μια μεγάλη ποικιλία δυναμικών χρήσεων σε διαφορετικά πεδία βιομηχανικών και βιοτεχνολογικών εφαρμογών, στις βιομηχανίες τροφίμων, στην βιο-ιατρική και στην φαρμακευτική έρευνα, καθώς και στις χημικές βιομηχανίες. Ως ένζυμα υψηλού βιοτεχνολογικού ενδιαφέροντος θεωρούνται οι μικροβιακές υδρολάσες, λόγω της υψηλής τους σταθερότητας, καθώς και λόγω της αυξημένης και ελεγχόμενης παραγωγής τους. Γι' αυτό, ποικίλα βακτήρια, ζύμες και μύκητες έχουν χρησιμοποιηθεί για παραγωγή υδρολασών σε βιομηχανική κλίμακα.

Σε αυτή την εργασία ερευνήσαμε την παραγωγή των εξωκυττάρων υδρολασών (αμυλασών, πρωτεασών και λιπασών) με επαγωγή και βελτιστοποίηση των συνθηκών καλλιέργειας των κυττάρων της πολυμορφικής ζύμης *Kluyveromyces marxianus* IF0 0288. Τα υδρολυτικά ένζυμα είναι ευαίσθητα σε ποικίλες συνθήκες καλλιέργειας περιβαλλοντολογικών συνθηκών και παραγόντων. Η δραστηριότητά τους μπορεί να μειώνεται σημαντικά είτε ακόμη και να εξαφανίζεται από μια ποικιλία φυσικών είτε και χημικών παραγόντων, οι οποίοι επηρεάζουν ισχυρά τις καταλυτικές τους λειτουργίες. Σε περισσότερες λεπτομέρειες, μελετήσαμε την επίδραση διαφορετικών περιβαλλοντολογικών παραμέτρων και παραγόντων (πηγές άνθρακα είτε και αζώτου ή λιπιδίων, χρόνοι ζύμωσης, τιμές pH και θερμοκρασίες των μέσων καλλιέργειας), οι οποίες βελτιστοποιήθηκαν για την παραγωγή διαφόρων υδρολασών από τον παραπάνω αναφερόμενο μικροοργανισμό. Η σύνθεση των μέσων ανάπτυξης βρέθηκε να είναι πολύ σημαντική για την βελτίωση της παραγωγής υδρολασών από τον μικροοργανισμό *Kluyveromyces marxianus*.

Λέξεις-κλειδιά: *Kluyveromyces marxianus*, Αμυλάσες, Λιπάσες, Πρωτεάσες

3.27 Inducing and optimizing cell-culture conditions of polymorphic yeast *Kluyveromyces marxianus* for production of extracellular hydrolases

Papamichael E.M., Foukis A., Sklivaniti H., Stergiou P-Y., and Theodorou L.G.

University of Ioannina, Department of Chemistry, Ioannina 45110, Greece
Email: epapamic@cc.uoi.gr

Extracellular hydrolases comprise enzymes such as: (a) amylases, i.e. enzymes mostly catalyzing the hydrolysis of o-glycoside bonds of polysaccharides, (b) proteases, i.e. enzymes catalyzing the hydrolysis of peptide bonds of proteins and polypeptides, and (c) lipases, i.e. enzymes mostly catalyzing the hydrolysis of tri-acyl-glycerols into di- and/or mono-acyl- glycerols, glycerol and free fatty acids.

Hydrolases have found a great variety of potential uses in different areas of industrial and biotechnological applications, in food industries, biomedical and pharmaceutical research, as well as in chemical industries. Of higher biotechnological interest are considered microbial hydrolases, due to their high stability, as well as due to their augmented and controlled production. Thus, various bacteria, yeasts and fungi have been used to produce hydrolases in industrial scale.

In this work, we investigated the production of extracellular hydrolases (amylases, proteases and lipases) by inducing and optimizing the cell-culture conditions of the polyimorphic yeast *Kluyveromyces marxianus* IF0 0288. Hydrolytic enzymes are susceptible in various cell-culture and environmental conditions and factors; their activity may be significantly reduced or even extinguished by a variety of physical and/or chemical factors, which strongly affect their catalytic functions. In more details, we studied the effect of different environmental parameters and factors (carbon and/or nitrogen or lipid sources, fermentation times, pH-value and temperature of the culture media), which were optimized for production of different hydrolases from the above mentioned micro-organism. The composition of growth media was found of higher importance for the scale up production of hydrolases by the microorganism *Kluyveromyces marxianus*.

Keywords: *Kluyveromyces marxianus*, Amylases, Proteases, Lipases

3.28 Καθαρισμός και κινητική μιας νέας εξωκυττάριας σερίνοπρωτεάσης από την ζύμη *Kluyveromyces marxianus* με πιθανό βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον

Παπαμιχαήλ Ε.Μ., Φούκης Α., Στεργίου Π.Γ., και Θεοδώρου Α.Γ.

Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Τμήμα Χημείας, Ιωάννινα 45110, Ελλάδα

Email: epapamic@cc.uoi.gr

Ο *Kluyveromyces marxianus* (*K. marxianus*) είναι ομοθαλική ζύμη και τελεομορφική της *Candida kefyf*. Έχει αναφερθεί πρόσφατα ότι η παρουσία του *K. marxianus* παίζει σπουδαίο ρόλο στην ανάπτυξη των λειτουργικών και αισθητηριακών ιδιοτήτων στα γαλακτοκομικά προϊόντα, στα ζυμούμενα ποτά καθώς και στην ωρίμανση των τυριών. Εξ άλλου, ο *K. marxianus*, έχει βρεθεί χρήσιμος στα γαλακτοκομικά προϊόντα (απομάκρυνση λακτόζης) στην κατεργασία του χυμού μήλων, στην παραγωγή Ινουλινάσης και στην βιοαποικοδόμηση ξενοβιοτιών παραγόντων. Το πρωτεολυτικό σύστημα του *K. marxianus* δεν έχει μελετηθεί σε έκταση, παρά την πιθανή βιομηχανική χρησιμότητά του. Τελευταία, απομονώσαμε, καθαρίσαμε και χαρακτηρίσαμε μια νέα πρωτεάση από το εξωκυττάριο υγρό καλλιέργειας του *K. marxianus* IFO 0288.

Η νέα πρωτεάση καθαρίστηκε ως 95 φορές με καταβύθιση με θειικό αμμώνιο και ο καθαρισμός της ως την ομοιογένεια επιτεύχθηκε με δύο χρωματογραφικά στάδια (μοριακή διήθηση και χρωματογραφία συγγένειας σε σύστημα FPLC). Το καθαρό ένζυμο βρέθηκε να έχει M.B. = 45 kDa, είναι πιθανότατα μια σερίνοπρωτεάση που διατηρεί σημαντική δραστηριότητα σε θερμοκρασίες 10°C-55°C και ουδέτερες τιμές pH και ονομάστηκε ως πρωτεάση KM-IFO-0288-A.

Οι παράμετροι Michaelis-Menten της πρωτεάσης KM-IFO-0288-A επηρεάζονται ισχυρά από εξειδικευμένους μη-αντιστρεπτούς αναστολείς των σερίνοπρωτεασών (3,4- διχλωρο-ισο- κουμαρίνη και PMSF), ενώ δεν επηρεάζονται από τον E-64 (μη-αντιστρεπτός αναστολέας κυστείνοπρωτεασών). Αυτές οι ιδιότητες της πρωτεάσης KM-IFO-0288 παρατηρήθηκαν κατά την υδρόλυση του συνθετικού υποστρώματος Suc-AAAf-pNA. Σημαντικές τιμές σταθερών pKa, σταθερών ταχύτητας, ενέργειας ενεργοποίησης και άλλοι σημαντικοί παράγοντες υπολογίστηκαν από διαγράμματα των παραμέτρων kcat/Km, kcat και Km ως προς την τιμή pH, την θερμοκρασία και την [NaCl]. Επιπλέον, βρέθηκε ότι η πρωτεάση KM-IFO-0288-A παραμένει δραστική σε οργανικούς διαλύτες και σε επιφανειακά ενεργές ουσίες (απορρυπαντικά) κι έτσι θα μπορούσε να χαρακτηριστεί ως ένζυμο με βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον.

Λέξεις-κλειδιά: *Kluyveromyces marxianus*, Καθαρισμός, Ενζυμική κινητική, Σερίνοπρωτεάση

3.28 Purification and kinetics of a novel extracellular serine protease from yeast *Kluyveromyces marxianus* with possible biotechnological interest

Papamichael E.M., Foukis A., Stergiou P.-Y., and Theodorou L.G.

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

Email: epapamic@cc.uoi.gr

Kluyveromyces marxianus (*K. marxianus*) is homothallic yeast, and teleomorph of *Candida kefyf*, the presence of *K. marxianus* plays an important role in the development of functional and sensorial properties in dairy products, fermented drinks and cheese ripening. Besides, it was found useful in treating dairy products, apple juices, production of Inulinase, and biodegradation of xenobiotic agents. The proteolytic system of *K. marxianus* has not been studied extensively, despite its potential industrial relevance. Recently, we isolated, purified and characterized a novel protease from the extracellular culture-fluid of *K. marxianus* IFO 0288.

The novel protease was purified 95 times, by precipitation with ammonium sulfate; its purification up to homogeneity was achieved by two chromatographic steps (gel filtration and affinity chromatography on FPLC-system). The native enzyme showed a molecular mass of 45 kDa, it is more likely a serine protease maintaining considerable activity at temperatures 10°C-55°C and neutral pH-values, and it was designated as protease KM-IFO-0288-A. The Michaelis-Menten parameters of protease KM-IFO-0288-A were strongly affected by specific irreversible inhibitors of serine proteases (3,4-dichloro-isocoumarin and PMSF), while they remained unaffected by E-64 (irreversible inhibitor specific for cysteine proteases).

These properties of protease KM-IFO-0288 were observed in its hydrolysis of synthetic substrate Suc-AAAf-pNA. Valuable pKas, rate constants, activation energies and other important factors were estimated from the profiles of parameters kcat/Km, kcat and Km versus pH, temperature, and [NaCl]. Moreover, it was found that protease KM-IFO-0288-A remains active in polar organic solvents and detergents, and thus it could be characterized as biotechnologically interest enzyme.

Keywords: *Kluyveromyces marxianus*, Purification, Enzyme kinetics, Serine protease

3.29 Παραγωγή βιοντήζελ από το μικροφύκος *Nannochloropsis sp.* σε φωτοβιοαντιδραστήρα ανερχόμενης φυσαλίδας

Πετρούτσος Δ.³, Κέκος Δ.² Σταμάτης Χ.¹ and Καταπόδης Π.¹

¹ Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Ιωάννινα

² Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, Σχολή Χημικών Μηχανικών, Αθήνα

³ Πανεπιστήμιο Πατρών, Τμήμα Χημικών Μηχανικών, Πάτρα

Τα μικροφύκη, ως νέα πρώτη ύλη, παρουσιάζουν εξαιρετικό ενδιαφέρον για την παραγωγή βιοντήζελ κυρίως λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς τους σε λιπίδια αλλά και τους υψηλούς ρυθμούς παραγωγής των λιπιδίων. Ο σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη επίδρασης της έντασης του φωτός, το pH του μέσου καλλιέργειας και οι συγκεντρώσεις αζώτου και φωσφόρου στην αύξηση και στην παραγωγικότητα των λιπιδίων από το μικροφύκος *Nannochloropsis sp.* σε φωτοβιοαντιδραστήρα ανερχόμενης φυσαλίδας. Οι παράμετροι που μελετήθηκαν επηρέασαν σημαντικά τόσο το ρυθμό αύξησης του μικροφύκου όσο και την περιεκτικότητά του σε ουδέτερα λιπίδια κατάλληλα για βιοντήζελ. Οι άριστες συνθήκες που προέκυψαν για την παραγωγή λιπιδίων ήταν pH 8.4, ένταση φωτός $75 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, συγκέντρωση νιτρικών 1.1 mM και συγκέντρωση φωσφορικών 30 μM . Σε αυτές τις συνθήκες η περιεκτικότητα σε λιπίδια των κυττάρων του *Nannochloropsis sp.* ήταν 55.0% w/w, ενώ η μέση παραγωγικότητα των ουδέτερων λιπαρών έφτασε τα $38 \text{ mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$. Τα ουδέτερα λιπίδια εκχυλίστηκαν με κ-εξάνιο και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η ενζυμική μετατροπή τους σε βιοντήζελ μέσω της εμπορικά διαθέσιμης ακινητοποιημένης λιπάσης *Candida antarctica*.

Λέξεις-κλειδιά: Βιοντήζελ, *Nannochloropsis sp.*, Φωτοβιοαντιδραστήρας

3.29 Biodiesel production by the microalga *Nannochloropsis sp.* in bubble column photobioreactor

Petroutsos D.³, Kekos D.², Stamatis H.¹ and Katapodis P.¹

¹ University of Ioannina, Department of Biological Applications & Technologies, Ioannina

² National Technical University of Athens, School of Chemical Engineering, Athens

³ University of Patras, Department of Chemical Engineering, Patra

Microalgae have received much attention as novel raw materials for biodiesel production, because of their high lipid content and high lipid production rate. The aim of the present work was to study the effects of the light intensity, the pH of the medium and the nitrogen and phosphorus concentrations on the growth and lipid productivity of *Nannochloropsis sp.* in bubble column photobioreactors. The growth and the lipid content of microalgae were strongly influenced by the variation of tested parameters. The optimum conditions for lipid production were found to be pH 8.4, light intensity $75 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, nitrogen concentration 1.1 mM and phosphorus concentration 30 μM . In optimal conditions the lipid content of *Nannochloropsis sp.* was 55.0% w/w with average neutral lipid productivity up to $38 \text{ mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$. These neutral lipids produced were extracted and enzymatically converted to biodiesel using a commercial preparation of immobilized lipase from *Candida antarctica* in solvent free system.

3.30 Οργάνωση του γενετικού τόπου *blp* για την επαγωγή, τη σύνθεση και την έκκριση της θερμοφιλίνης T στο οξυγαλακτικό βακτήριο *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0040

Σαμαρά Ε.¹, Βασιλειάδης Α.¹, Ακτύπης Α.², Χατζηλουκάς Ε.¹, Αφένδρα Α.-Σ.¹

¹ Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών & Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

² Τμήμα Επιστήμης & Τεχνολογίας Τροφίμων, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Ο *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0040 είναι ένα οξυγαλακτικό βακτήριο που έχει απομονωθεί από ελληνικό παραδοσιακό γιαούρτι και παρουσιάζει πλεονεκτήματα ως προς την ποιότητα του τελικού προϊόντος που παράγει σε σχέση με άλλα στελέχη. Χαρακτηριστικό του γνώρισμα που αποτελεί το αντικείμενο της παρούσας εργασίας είναι η παραγωγή μιας βακτηριοσίνης, της θερμοφιλίνης T, η οποία αναστέλλει την ανάπτυξη συγγενικών οξυγαλακτικών βακτηρίων, αλλά και ορισμένων βακτηρίων αλλοίωσης, και επομένως θα μπορούσε δυνητικά να χρησιμοποιηθεί ως φυσικό συντηρητικό σε τρόφιμα που αποτελούν προϊόντα ζύμωσης.

Σε προηγούμενες εργασίες έχει ενισχυθεί μέσω PCR ο γενετικός τόπος που θεωρείται υπεύθυνος για την επαγωγή, τη σύνθεση και την έκκριση της θερμοφιλίνης T και έχει ταυτοποιηθεί η νουκλεοτιδική του αλληλουχία. Βάσει αυτής έχει σχεδιαστεί η πιθανή οργάνωσή του σε οπερόνια, ενώ έχει ξεκινήσει η μελέτη του τρόπου μεταγραφής τους. Για τη βέλτιστη ανίχνευση των μεταγραφόμενων μορίων προσδιορίστηκε η μέγιστη παραγωγή θερμοφιλίνης συναρτήσει του θρεπτικού μέσου και του χρόνου ανάπτυξης. Βάσει αυτών των στοιχείων, καλλιέργεια ACA-DC 0040 αναπτύχθηκε σε θρεπτικό μέσο M17 + 2% γλυκόζης για 3 ώρες και κατόπιν χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση ολικού RNA. Από τα πειράματα ανίχνευσης mRNA μέσω RT-PCR επιβεβαιώθηκε η συμμεταγραφή των γονιδίων βιοσύνθεσης του μεταφορέα ABC, της βοηθητικής πρωτεΐνης μεταφοράς και του πεπτιδίου επαγωγής, καθώς και των γονιδίων τροποποίησης της βακτηριοσίνης έναντι διευρυμένου φάσματος βακτηρίων. Επίσης, διαπιστώθηκε η συμμεταγραφή στα γονίδια του ρυθμιστικού συστήματος αίσθησης απαρτίας από το οποίο επάγεται η παραγωγή της βακτηριοσίνης, γεγονός μη εφικτό σε προηγούμενα πειράματα. Ως προς την περιοχή που περιλαμβάνει τα δύο πιθανά αναγνωστικά πλαίσια για τη σύνθεση της θερμοφιλίνης *blpU* και *blpK* και τα αντίστοιχα ανοσίας παρατηρήθηκε η συμμεταγραφή όλων σε ένα πολυκιστρονικό RNA. Εντούτοις, παρατηρήθηκε μέσω ανάλυσης northern και η ανεξάρτητη μεταγραφή του *blpK*.

Λέξεις-κλειδιά: *Streptococcus thermophilus*, θερμοφιλίνη, γενετικός τόπος *blp*

3.30 Organization of the genetic locus *blp* for the induction, synthesis and secretion of thermophilin T in the lactic acid bacterium *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0040

Samara E.¹, Vassiliadis A.¹, Aktypis A.², Hatzilukas E.¹, Afendra A.-S.¹

¹ Department of Biological Applications and Technologies, University of Ioannina

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

S. thermophilus ACA-DC 0040 is a LAB isolated from traditional Greek yoghurt which gathers advantages in the quality of the final product compared to other strains. A main characteristic that constitutes the subject of this work is the production of a bacteriocin, thermophilin T, active against several LAB and food spoilage bacteria and considered therefore as a putative biopreservative.

In previous works, the genetic locus potentially responsible for the induction, synthesis and secretion of thermophilin T has been amplified and sequenced. The organization of the locus in operons has been predicted and is studied at the transcriptional level. To increase the detection sensitivity of the transcribed molecules, the thermophilin production depending on growth time and medium has been determined. Based on these data, strain ACA-DC 0040 was grown in M17 medium + 2% glucose for 3 h and used then for total RNA isolation. The mRNA detected by RT-PCR verified the cotranscription of (a) ABC transporter biosynthetic gene, helper carrier protein gene και inducer peptide gene, and (b) the genes responsible for the bacteriocine modification against a wide range of bacteria. Additionally, it revealed the transcription of the quorum sensing regulatory system genes which induce the bacteriocin production, a result that was not feasible in previous experiments. It was also shown that the putative bacteriocin biosynthetic peptides *blpU* και *blpK* and the immunity genes were all contrascribed to one polycistronic RNA. However, northern analysis revealed also the transcription of only *blpK*.

Keywords: *Streptococcus thermophilus*, θερμοφιλίνη, περιοχή *blp*

3.31 Υπερέκφραση θερμοσταθερής λιπάσης από βακτήριο ηφαιστειακού ενδιαιτήματος σε διαφορετικές σειρές δεκτικών κυττάρων *Escherichia coli*.

Σταθοπούλου Π.Μ., Καραγκούνη Α.Δ. και Χατζηνικολάου Δ.Γ.
Ομάδα Μικροβιολογίας, Τομέας Βοτανικής, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθήνας, Πανεπιστημιούπολη Ζωγράφου, 15784 Ζωγράφου, Αττική, Ελλάδα

Οι λιπάσες καταλύουν την υδρόλυση (παρουσία νερού) των εστέρων μεταξύ γλυκερόλης και μακράς αλυσίδας λιπαρών οξέων, δρώντας στην διεπιφάνεια μεταξύ ύδατος και αδιάλυτου υποστρώματος. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον εμφανίζουν οι θερμοσταθεροί εκπρόσωποι των εν λόγω βιοκαταλυτών, καθώς εμφανίζουν εξαιρετική θερμοδυναμική σταθερότητα τόσο σε ακραίες θερμοκρασιακές τιμές όσο και υπό την παρουσία οργανικών διαλυτών. Τα πλεονεκτήματα αυτά προκύπτουν ενδεχομένως ως αποτέλεσμα της προσαρμοστικής στρατηγικής των θεμόφιλων λιπολυτικών μικροοργανισμών σε ενδιαιτήματα ακραίων συνθηκών. Αν και οι τελευταίοι συνιστούν πλούσια πηγή βιομορίων με βιοτεχνολογικά αξιοποιήσιμα χαρακτηριστικά, τα χαμηλά επίπεδα έκφρασης αυτών, αποτελούν περιοριστικό παράγοντα για την ευρεία αξιοποίησή τους. Η κλωνοποίηση θερμοσταθερών λιπασών σε μεσόφιλους δέκτες σε αρκετές περιπτώσεις οδηγεί σε υψηλότερα επίπεδα έκφρασης. Πρωταρχικός στόχος της παρούσας ερευνητικής προσπάθειας ήταν η επιλογή στελέχους με υψηλή λιπολυτική ικανότητα από ένα σύνολο απομονωθέντων θεμόφιλων βακτηρίων από το ηφαιστειακό σύμπλεγμα της Σαντορίνης (Ελλάδα) τα οποία προηγουμένως είχαν ομαδοποιηθεί με βάση το 16s rDNA και το αποτύπωμα BOX PCR τους. Το επιλεγμένο θεμόφιλο βακτήριο εμφάνισε φυλογενετική συγγένεια με το γένος *Geobacillus* και το γονιδίωμα του χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα για την ενίσχυση του γονιδίου της λιπάσης. Τα εκκινητικά μόρια σχεδιάστηκαν με βάση γνωστές κατατεθειμένες αλληλουχίες θεμόφιλων λιπασών. Το γονίδιο της λιπάσης ενισχύθηκε και ακολούθως κλωνοποιήθηκε στο πλασμίδιο pBluescript SK(+) με στόχο την πλήρη αλληλούχηση του. Για την πρωτεϊνική υπερέκφραση χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο pET-15b το οποίο περιέχει τον ισχυρό T7 υποκινητή (επαγόμενος με IPTG) και προσθέτει κατάλοιπα ιστιδινών στο αμινοτελικό άκρο του μορίου επιτρέποντας τον εύκολο καθαρισμό του. Το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pET-15b κλωνοποιήθηκε σε διαφορετικές σειρές δεκτικών κυττάρων *E. coli* με στόχο την υπερέκφραση διαλυτής ενεργής πρωτεΐνης. Η υδρόφοβη φύση των λιπασών σε συνδυασμό με τον υψηλό ρυθμό παραγωγής τους συχνά οδηγεί στην συγκρότηση ανενεργών συσσωματωμάτων, γεγονός που αντιμετωπίστηκε με την αριστοποίηση των συνθηκών ανάπτυξης και ενζυμικής επαγωγής.

Λέξεις-κλειδιά: Θερμοσταθερή λιπάση, *Geobacillus* sp., κλωνοποίηση, υπερέκφραση

3.31 Identification of a thermostable lipase from a newly isolated *Geobacillus* strain and overexpression in different *Escherichia coli* host strains

Stathopoulou P.M., Karagouni A.D. and Hatzinikolaou D.G.
Microbiology Group, Sector of Botany, Department of Biology, National and Kapodistrian University of Athens, University Campus, 15784 Zografou, Attica, Greece

Lipases are a class of enzymes that catalyze the hydrolysis of long chain triacylglycerols at the interface between the insoluble substrate and water. The importance of thermostable lipases has steadily increased due to their extreme thermodynamic stability at elevated temperatures and in organic solvents, as a consequence of adaptation of the corresponding microorganisms to higher growth temperatures. Although thermophiles are able to produce proteins with biotechnological interesting properties the main disadvantage is their low expression level. Since the use and development of molecular biology techniques, an increasing number of thermostable lipases has been cloned in mesophiles and led to much higher expression levels. The primary aim of the present study was to select and identify (16s rDNA, BOX PCR) thermophilic bacteria, isolated from a volcanic environment (Santorini, Greece), with high lipolytic potential. The selected strain revealed phylogenetic similarity with *Geobacillus* sp. The lipase gene was amplified and fully sequenced after cloning in pBluescript SK(+) vector. The PCR primers for lipase gene amplification were designed based on conserved DNA sequences of reported lipases from the genus *Geobacillus*. The lipase gene was sub-cloned in pET-15b vector by digesting the insert with *Bam*HI/*Nde*I followed by ligation. The pET-15b vector contains the strong T7 promoter (IPTG induced) and His-tags to facilitate the purification steps afterwards. The pET-15b construct was transformed into different *E. coli* expression host strains with the purpose of finding the optimal growth and protein expression conditions/host strain combination for high level protein production and subsequent purification.

Keywords: Thermostable lipase, *Geobacillus* sp., gene cloning, overexpression

3.32 Μελέτη της μικροβιακής ποικιλότητας κατά τη διάρκεια αυθόρμητης ζύμωσης του μούστου ποικιλίας Ασύρτικο σε εργαστηριακό βιοαντιδραστήρα

Ταγαρούλια Ν., Σαββίδης Α., Καραγκούνη Α.

*Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Βιολογίας, Τομέας Βοτανικής, Ομάδα Μικροβιολογίας, 15781 Αθήνα, Ελλάδα
Email: akar@biol.uoa.gr*

Η μικροβιακή ποικιλότητα κατά την οινοποίηση χαρακτηρίζεται σχετικά περιορισμένη. Το γεγονός αυτό οφείλεται στις υψηλές συγκεντρώσεις αιθανόλης και των χαμηλών τιμών pH, σε συνδυασμό με τη χρήση συντηρητικών ουσιών. Λόγω των ανωτέρω συνθηκών, στο μούστο και το κρασί παρατηρείται η ανάπτυξη συγκεκριμένων ομάδων μικροοργανισμών, στις οποίες περιλαμβάνονται οξυγαλακτικά βακτήρια, βακτήρια οξικού οξέος, ζυμομύκητες και μύκητες. Σκοπός της παρούσας εργασίας αποτέλεσε η μελέτη της ενδογενούς μικροβιακής ποικιλότητας του μούστου (ποικιλία Ασύρτικο) και του παραγόμενου κρασιού, μέσω αυθόρμητης ζύμωσης. Το δείγμα μούστου προέρχεται από την Ελληνική οινοπαραγωγική περιοχή, της Σαντορίνης. Η ζύμωση πραγματοποιήθηκε σε βιοαντιδραστήρα όγκου 7,5 L, στους 25 οC, για τρεις εβδομάδες. Δειγματοληψία πραγματοποιείται κάθε μέρα με απώτερο στόχο τον ποσοτικό και ποιοτικό προσδιορισμό του ενδογενούς μικροβιακού πληθυσμού του μούστου και κατ' επέκταση του κρασιού. Τα απομονωθέντα βακτήρια διαχωρίστηκαν μέσω της BOX-PCR μεθόδου, ενώ αντίστοιχα η ITS-PCR εφαρμόστηκε ικανοποιητικά για την περίπτωση των ζυμομυκήτων. Όλα τα στελέχη χαρακτηρίστηκαν φαινοτυπικά και ταυτοποιήθηκαν μέσω ενίσχυσης του 16S rRNA γονιδίου (για τα βακτήρια) και της ITS1-5,8S-ITS2 ριβοσωμικής περιοχής (για τις ζύμες) όπου και ακολούθησε αλληλούχιση των προϊόντων ενίσχυσης. Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης συγκρίθηκαν με τις αλληλουχίες που υπάρχουν στη βάση δεδομένων της GenBank. Ο αμπελώνας της Σαντορίνης παρουσιάζει μια μοναδική ποικιλία σε ανόργανα στοιχεία, λόγω της έντονης ηφαιστειακής δραστηριότητας και σε συνδυασμό με τις ελάχιστες βροχοπτώσεις και τους ισχυρούς ανέμους, ένας εντυπωσιακά μεγάλος αριθμός μικροοργανισμών φαίνεται να έχει προσαρμοστεί σε αυτές τις συνθήκες. Οι αυτόχθονοι μικροοργανισμοί φαίνεται να είναι υπεύθυνοι για τους παραγόμενους οίνους που χαρακτηρίζονται από υψηλή ποιότητα. Με γνώμονα ότι η διεθνής οινοπαραγωγή έχει σαν κύριο στόχο τη διασφάλιση της ποιότητας του οίνου, η παρούσα μελέτη μπορεί να δώσει την ευκαιρία να απομονωθούν βακτηριακά στελέχη ή στελέχη ζυμών, με έντονο βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον, προς βιομηχανική χρήση. Άλλωστε, είναι ευρέως γνωστό ότι η ποιότητα του κρασιού αποτελεί άμεση συνέπεια της μικροβιακής του σύστασης.

Λέξεις-κλειδιά: βιοαντιδραστήρας, ζύμες, βακτήρια

3.32 Study of the microbial diversity during spontaneous fermentation of must of Asyrtico in a bioreactor

Tagaroulia N., Savvides A., Karagouni A.

*National and Kapodistrian University of Athens, Faculty of Biology, Department of Botany, Microbiology Group, 15781 Athens, Greece
Email: akar@biol.uoa.gr*

It is well documented that the diversity of microorganisms during winemaking is relatively limited, due to the interactive and cumulative effects of high ethanol concentrations and low pH values, combined with the use of preservatives during processing. Therefore, only acid- and ethanol-tolerant microbial groups can grow in grape juice, must and wine, which include lactic acid and acetic acid bacteria, yeasts and fungi. The aim of this work was to study the composition of indigenous wine-associated microorganisms present during spontaneous fermentation of must (Asyrtico variety) originated from the wine-producing area of Greece, Santorini. Fermentation was carried out in 7.5 L bioreactor, at 25 oC for 3 weeks. Sample of must was taken every day in order to investigate the quantitative and qualitative changes of natural microbial population. The isolated bacteria were discriminated through BOX-PCR analysis, while Internal Transcribed Spacer (ITS) ribotyping was convincingly applied for yeast species identification. All strains were characterized phenotypically and were also classified by 16S rRNA gene amplification (for bacteria) and ITS1-5,8S-ITS2 ribosomal region amplification (for yeasts) and sequencing analysis. Sequence data were compiled, aligned and compared with sequences obtained from the GenBank database. Santorini was formed from successive volcanic eruptions and is characterised by different autochthonous grape varieties cultivated in this area and the wines produced are of high quality. This study may provide new bacterial or/and yeasts strains for industrial and biotechnological use.

Keywords: bioreactor, yeast, bacteria

3.33 Probiolives: ζύμωση επιταπέζιων ελιών με επιλεγμένα στελέχη προβιοτικών βακτηρίων. Για ένα νέο λειτουργικό τρόφιμο (FP7-SME-2008- 2 project)

Τάσσου Χ.¹, Πανάγου Ε.², Garrido- Fernandez Α.³, Peres C.⁴, Cocolin L.⁵ & Chammem N.⁶

¹ Εθνικό Ίδρυμα Αγροτικής Έρευνας, Ινστιτούτο Τεχνολογίας Γεωργικών Προϊόντων, Σοφ.Βενιζέλου 1, Λυκόβρυση, 141 23, Αττική

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

³ Instituto de la Grasa, Consejo Superior de Investigaciones Científica, Seville, Spain

⁴ Instituto Nacional dos Recursos Biológico, Lisbon, Portugal

⁵ University of Turin, Faculty of Agriculture, Sector of Microbiology and Food Science, Turin, Italy

⁶ L'Institut National des Sciences Appliquées et de Technologie, Tunis, Tunisia

Η ιδέα του έργου είναι να παρέχει στις Ενώσεις των Μικρομεσαίων Επιχειρήσεων και στα μέλη τους εργαλεία για βελτίωση του τεχνολογικού τους επιπέδου, της ανταγωνιστικότητάς τους και των εσόδων τους από την παραγωγή ελιών, ζυμωμένων με προβιοτικά βακτήρια, κατά προτίμηση απομονωμένων από την μικροχλωρίδα των ελιών. Τα γαλακτικά βακτήρια της μικροχλωρίδας των ελιών είναι οι κυρίαρχοι μικροοργανισμοί στη φυσική ζύμωση και θα μελετηθεί αν κάποια από αυτά διαθέτουν προβιοτικές ιδιότητες. Τα προβιοτικά βακτήρια που θα επιλεγούν, θα εισαχθούν στην άλμη στην αρχή της ζύμωσης για να λειτουργήσουν ως εκκινήτες, για να μελετηθεί η ικανότητά τους να κυριαρχήσουν και να εξασφαλίσουν κανονική ζύμωση εμποδίζοντας την ανάπτυξη και την επιβίωση ανεπιθύμητων μικροοργανισμών. Ο στόχος είναι η παραγωγή ενός λειτουργικού προϊόντος, που να περιέχει προβιοτικά βακτήρια σε επαρκείς ποσότητες που να βελτιώνουν την υγεία του καταναλωτή, χωρίς να αλλοιώνουν τα ποιοτικά χαρακτηριστικά των ζυμωμένων ελιών. Μελέτες για την αποδοχή από τους καταναλωτές του νέου τροφίμου θα είναι απαραίτητες για την εκμετάλλευσή και την εισαγωγή του στην ευρωπαϊκή και διεθνή αγορά. Παράλληλα θα επιτευχθεί καλύτερος έλεγχος της διαδικασίας της ζύμωσης με έγκαιρη ανίχνευση μιας πιθανής αλλοίωσης ή εκτροπής της ζύμωσης. Επίσης η εκτίμηση του απαιτούμενου χρόνου για την ολοκλήρωση της ζύμωσης θα επιτευχθεί με τον έλεγχο δεικτών ποιότητας (π.χ πηκτικών) κατά τη διάρκεια της διαδικασίας ζύμωσης μέσω της χρήσης βελτιωμένων και νέων οργάνων (π.χ. «ηλεκτρονική μύτη») και εργαλείων (μαθηματικά μοντέλα).

Λέξεις-κλειδιά: Προβιοτικά, Γαλακτικά βακτήρια, επιτραπέζιες ελιές

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

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

Tassou C.C.¹, Panagou E.², Garrido- Fernandez Α.³, Peres C.⁴, Cocolin L.⁵ & Chammem N.⁶

¹ National Agricultural Research Foundation, Institute of Technology of Agricultural Products, Sof. Venizelou 1, Lycovrissi, 141 23, Attiki

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

³ Instituto de la Grasa, Consejo Superior de Investigaciones Científica, Seville, Spain

⁴ Instituto Nacional dos Recursos Biológico, Lisbon, Portugal

⁵ University of Turin, Faculty of Agriculture, Sector of Microbiology and Food Science, Turin, Italy

⁶ L'Institut National des Sciences Appliquées et de Technologie, Tunis, Tunisia

The concept of this project is to provide to the SME Associations and their members SMEs with tools to increase their technological level, competitiveness and profits by the production of olives, fermented with probiotic bacteria, preferably isolated among the lactic acid bacteria colonizing the olives. Lactic acid bacteria from the olive microbiota are the dominant microorganisms in natural fermentations and there will be studied if some of them possess probiotic properties. The selected probiotic bacteria will be introduced into the brines at the onset of fermentation, to act as starters, to be able to dominate and ensure a proper fermentation inhibiting the growth and survival of undesirable microorganisms. The goal is the production of a functional product, containing probiotic bacteria in adequate amounts to improve consumer's health, without altering the quality characteristics of fermented olives. Consumer acceptance studies will be essential for the exploitation and the introduction of the new food into the EU and international market. At the same time a better control of the fermentation process, early detection of faulty fermentation and spoilage and assessment of the time needed for fermentation completion will be achieved by monitoring the quality indices (e.g. volatiles) throughout the process with the use of advanced and emerging instruments and tools (mathematical models).

Keywords: table olives, fermentation, probiotic lactic acid bacteria

The project is funding from the EU (FP7/2007- 2013), under grant agreement n° 243471-PROBIOLIVES.

3.34 Βιολογική αναγωγή εξασθενούς χρωμίου

Τεκερλεκοπούλου Α.¹, Τσιφλικιώτου Μ.¹, Ακριτίδου Λ.¹, Βιεννάς Α.¹, Τσιάμης Γ.¹, Μπούρτζης Κ.¹, Βαγενάς Δ.^{1,2}

¹ Τμήμα Διαχείρισης Περιβάλλοντος και Φυσικών Πόρων, Πανεπιστήμιο Δυτικής Ελλάδας, Αγρίνιο, Ελλάδα, E-mail: atekerle@cc.uoi.gr

² Ερευνητικό Ινστιτούτο Χημικής Μηχανικής και Χημικών Διεργασιών Υψηλής Θερμοκρασίας (ΙΤΕ/ΕΙΧΗΜΥΘ), Πάτρα, Ελλάδα

Τα τελευταία χρόνια έχει κλιμακωθεί το ενδιαφέρον για το χρώμιο, εξαιτίας της αύξησής του σε τοξικά επίπεδα για το περιβάλλον. Οι συμβατικές μέθοδοι επεξεργασίας των χρωμικών αποβλήτων είναι κυρίως φυσικοχημικές και παρουσιάζουν αρκετά μειονεκτήματα, όπως την παραγωγή τοξικής λάσπης, την ατελή απομάκρυνση του μετάλλου και το υψηλό κόστος εφαρμογής τους. Έτσι, καθίσταται σαφής η αναγκαιότητα της επεξεργασίας τους με τρόπο περισσότερο αποτελεσματικό, οικονομικό και φιλικό προς το περιβάλλον. Στην παρούσα μελέτη, μελετήθηκε η βιολογική αναγωγή του εξασθενούς χρωμίου μέσω κατάλληλων μικροοργανισμών. Πραγματοποιήθηκαν πειράματα τόσο σε αντιδραστήρες αιωρούμενης ανάπτυξης όσο και σταθερής κλίνης, υπό διαλείπουσα λειτουργία. Για τον εμβολιασμό των αντιδραστήρων χρησιμοποιήθηκε βιομηχανική λάσπη από την Ελληνική Βιομηχανική Αεροπορία, χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα ζάχαρη. Αρχικά, πραγματοποιήθηκαν σειρές πειραμάτων για τη διεξοδική μελέτη της συμπεριφοράς μικτής καλλιέργειας και την καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών της αναγωγής του Cr (VI) σε αντιδραστήρες διαλείπουσης έργου αιωρούμενης ανάπτυξης για αρχικές συγκεντρώσεις Cr (VI) 1.4 -110 mg/l. Ο μέγιστος ρυθμός αναγωγής Cr (VI) (1.976 mg/l-h) παρουσιάστηκε για αρχική συγκέντρωση 12.85 mg/l με ρυθμό παραγωγής βιομάζας 4.1 mg biomass/ l-h. Επίσης, για τις ίδιες αρχικές συγκεντρώσεις διεξήχθησαν πειράματα με μικτή καλλιέργεια σε αντιδραστήρες σταθερής κλίνης με πλαστικό πληρωτικό υλικό. Με τη χρήση των αντιδραστήρων αυτών επιτεύχθηκαν υψηλοί ρυθμοί αναγωγής (1.19 mg/l-h) ακόμη και σε υψηλές αρχικές συγκεντρώσεις (109 mg/l). Τέλος, αναπτύχθηκε μαθηματικό μοντέλο τα οποίο περιγράφει τη διαδικασία αναγωγής του Cr (VI) σε αντιδραστήρες αιωρούμενης ανάπτυξης και σταθερής κλίνης, υπό διαλείπουσα λειτουργία και για ένα μεγάλο εύρος συγκεντρώσεων Cr (VI). Η μικροβιακή ανάλυση έδειξε ότι στους αντιδραστήρες επικρατούν βακτήρια και μύκητες. Στα βακτήρια κυρίαρχο στέλεχος ήταν τα *Klebsiella sp.* και *Citrobacter sp.* Στους μύκητες το κυρίαρχο στέλεχος ήταν το *Pichia jadinii*. Η μελέτη της δυναμικής συμπεριφοράς των πληθυσμών που ανάγουν το εξασθενές χρώμιο σε διάφορες λειτουργικές συνθήκες, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως οδηγός στο σχεδιασμό και στην αξιολόγηση συνθηκών με σκοπό τη μέγιστη απόδοση των συστημάτων επεξεργασίας.

Λέξεις-κλειδιά: εξασθενές χρώμιο, βιολογική αναγωγή, μαθηματικό μοντέλο

3.34 Biological reduction of hexavalent chromium

Tekerlekopoulou A.¹, Tsiflikioti M.¹, Akritidou L.¹, Biennas A.¹, Tsiamis G.¹, Bourtzis K.¹, Vayenas D.^{1,2}

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

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

Recently great interest has been escalated for chromium. The conventional treatment methods are mainly physicochemical and present important disadvantages, such as the production of toxic sludge and high application cost. Thus, is rendered explicit the necessity of a friendlier treatment method for the environment.

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

Initially, experiments were performed to extensively study the behavior of a mixed culture and to further understand the mechanism of biological Cr (VI) reduction within suspended growth batch reactors for initial concentrations 1.4-110 mg/l. The maximum Cr (VI) reduction rate of 1.976 mg/l-h was achieved for initial concentration 12.85 mg/l with biomass production rate 4.1 mg biomass/ l-h. Experiments were also carried out in packed-bed reactors with plastic support media. High removal rates were achieved (1.19 mg/l-h) even in high initial concentrations (109 mg/l). Finally, a mathematical model was developed to describe and predict the process of Cr (VI) reduction in suspended growth and packed-bed reactors.

Microbial analysis revealed that bacteria and fungus prevail in reactors. The dominant bacteria strains, related to the *Klebsiella sp.* and *Citrobacter sp.* while the dominant fungal strain related to *Pichia jadinii*.

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

Keywords: hexavalent chromium, biological reduction, modeling

3.35 Απομόνωση και χαρακτηρισμός γηγενών στελεχών ζυμομυκήτων κατά τη διάρκεια αυθόρμητης ζύμωσης χυμού ροδιού (Πέλλα, Β. Ελλάδα).

Τσαπουρνιώτη Π., Παραπούλη Μ., Περισυνάκης Α., Δραΐνας Κ.†
Εργαστήριο Βιοχημείας, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων 451 10
Ιωάννινα, Ελλάδα

Το ρόδι (*Punica granatum* L.) καλλιεργείται παγκοσμίως από τα αρχαία χρόνια διότι παρουσιάζει εξαιρετικά ωφέλιμες ιδιότητες για την ανθρώπινη υγεία. Παραδοσιακά, ήταν γνωστό ότι η κατανάλωση του ροδιού είχε σπουδαία ιατρική σημασία. Η άποψη αυτή ήρθε να ενισχυθεί από πρόσφατες επιστημονικές έρευνες οι οποίες αποκάλυψαν τις αντικαρκινικές, αντιοξειδωτικές, αντιμικροβιακές και αντικές ιδιότητες του χυμού ροδιού. Στο Δυτικό κόσμο, η γνώση αυτή σε συνδυασμό με μια γενικότερη ανάγκη των καταναλωτών για τρόφιμα υψηλής διατροφικής αξίας οδήγησε σταδιακά σε αυξημένη ζήτηση και κατανάλωση χυμού ροδιού και παραγώγων του όπως το αλκοολούχο ποτό από ρόδι. Ακολουθώντας λοιπόν αυτή τη γενικότερη τάση και γνωρίζοντας τη σημασία της χρήσης γηγενών στελεχών σαν καλλιέργειες εκκίνησης για την παραγωγή ανώτερης ποιότητας αλκοολούχων ποτών παραθέτουμε εδώ μια πρώτη απόπειρα χαρτογράφησης της ζυμοχλωρίδας ζυμούμενου χυμού ροδιού (*Punica granatum* var. *wonderful*) με στόχο την απομόνωση στελεχών ζυμών τα οποία δύνανται στη συνέχεια να χρησιμοποιηθούν σαν καλλιέργειες εκκίνησης για την παραγωγή αλκοολούχου ποτού από ρόδι. Συνολικά απομονώθηκαν 333 στελέχη ζυμών από το μέσο και το τέλος αυθόρμητης ζύμωσης χυμού ροδιού προερχόμενου από καλλιέργειες της περιοχής της Πέλλας, Β. Ελλάδα. Για την μοριακή ταξινόμησή τους αξιοποιήθηκαν οι πολυμορφισμοί της περιοχής ITS1-5.8SfDNA- ITS2. Η ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας της 5.8S-ITS περιοχής των πρώτων 50 ζυμών αποκάλυψε ότι και στις δύο φάσεις οι ζύμες που κυριαρχούν είναι εκπρόσωποι του είδους *Hanseniaspora* sp. ενώ επίσης εντοπίστηκαν και στελέχη του είδους *Issatchenkia* sp. Σημειώνεται, ότι η μελέτη της ζυμοχλωρίδας ζυμούμενου χυμού ροδιού *Punica granatum* var. *wonderful* γίνεται για πρώτη φορά.

Keywords: *Punica granatum* var. *wonderful*, αλκοολούχο ποτό από ρόδι, ζυμοχλωρίδα

† Η εργασία αυτή είναι αφιερωμένη στη μνήμη του Καθηγητή Δραΐνα Κωνσταντίνου

3.35 Isolation and characterization of indigenous yeast strains during spontaneous fermentation of pomegranate juice (Pella, N. Greece).

Tsapournioti P., Parapouli M., Perisynakis A., Drainas C.†
Laboratory of Biochemistry, Department of Chemistry, University of Ioannina, 451 10
Ioannina, Greece

Pomegranate (*Punica granatum* L.) has been cultivated due to its health beneficial properties from ancient times globally. The traditional medical importance of pomegranate is now supported by recent scientific studies revealing the anticarcinogenic, antioxidant, antimicrobial and antiviral activities of the pomegranate juice. In the Western world, this knowledge in addition to the public demand for nutritional food have led to an increased consumption of pomegranate juice and its by-products, such as pomegranate beverage. Following this trend and being fully aware of the importance of employing indigenous strains as starter cultures for the production of high quality alcoholic drinks we report here a first attempt to illuminate the yeast ecology of *Punica granatum* var. *wonderful* fermented juice (Pella, Greece) and isolate yeast strains to be further used as starters for the production of pomegranate beverage. Between these frames 152 and 181 strains were isolated from two different fermentation phases, mid and late fermentation respectively. Species diversity was evaluated using the 5.8S- Internal Transcribed Spacers (ITS) polymorphisms. Sequence analyses of 5.8S-ITS region of the first 50 isolates revealed that in both phases the predominant yeasts are representatives of *Hanseniaspora* sp. whereas were also found present strains belonging to *Issatchenkia* sp. To our knowledge this is the first study on *Punica granatum* var. *wonderful* yeast populations.

Keywords: *Punica granatum* var. *wonderful*, pomegranate beverage, yeast flora

† In memory of Professor Constantin Drainas

4. ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΕΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ

4. MICROBIAL INTERACTIONS

4.1 Μελέτη της περιοχής κινητοποίησης του πλασμιδίου pZA1003 του *Zymomonas mobilis* NCIB 11163

Καμπανός Ε., Αφένδρα Α.-Σ.

Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών

Το *Zymomonas mobilis* αναπτύσσεται σε χυμούς τροπικών φυτών παράγοντας μεγάλη ποσότητα αιθανόλης στην οποία παρουσιάζει υψηλή αντοχή συγκριτικά με τον παραδοσιακό ζυμομύκητα. Τα στελέχη του διαθέτουν συνήθως πλασμίδια, τα οποία αξιοποιούνται στην κατασκευή φορέων κλωνοποίησης και έκφρασης ετερόλογων γονιδίων στο *Z. mobilis*, αλλά και στην παροχή χρήσιμων πληροφοριών για την προέλευση, την εξέλιξη του και τη διασπορά γενετικών πληροφοριών από αυτό. Το στέλεχος *Z. mobilis* NCIB 11163 συγκεντρώνει τα παραπάνω πλεονεκτήματα, ενώ το πλασμιδιακό του προφίλ ανέκαθεν καταδείκνυε την ύπαρξη πλασμιδίων, η οποία επιβεβαιώθηκε πρόσφατα με τον προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας ολόκληρου του γονιδιώματός του.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε το ενδογενές πλασμίδιο pZA1003 (4551 bp) του *Z. mobilis* 11163 και συγκεκριμένα η περιοχή που θεωρείται υπεύθυνη για την κινητοποίηση του πλασμιδίου στα πλαίσια σύζευξης. Το πλασμίδιο περιέχει 6 αναγνωστικά πλαίσια, δύο από τα οποία πιθανολογείται ότι κωδικοποιούν βάσει ομολογίας με άλλα γονίδια: (α) μία ριλαξάση (πρωτεΐνη κινητοποίησης Mob) και (β) μία πρωτεΐνη καθοδικά της πιθανής Mob ομόλογη με πρωτεΐνες MobC που δρουν βοηθητικά προς τη ριλαξάση. Το τμήμα του pZA1003 που φέρει τα δύο αυτά αναγνωστικά πλαίσια μαζί με την ανοδική τους περιοχή όπου εδράζεται πιθανόν το *oriT* κλωνοποιήθηκε στο φορέα pUCBM21. Το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο που προέκυψε (pUCBM21Zmob) χρησιμοποιήθηκε σε πειράματα επιβοηθούμενης σύζευξης μεταξύ κυττάρων *E. coli* προκειμένου να διαπιστωθεί η ικανότητα κινητοποίησής του. Ως συζευκτικά πλασμίδια χρησιμοποιήθηκαν τα pRK2013 (IncP) και R64drd-11(IncI). Παρατηρήθηκε κινητοποίηση του pUCBM21Zmob μέσω του pRK2013, αλλά όχι μέσω του R64drd-11, γεγονός που υποδεικνύει προτίμηση του πλασμιδίου ως προς τα συζευκτικά πλασμίδια της ομάδας ασυμβατότητας IncP. Πρόκειται για την πρώτη πειραματική ένδειξη ότι το πλασμίδιο pZA1003 διαθέτει λειτουργίες κινητοποίησης.

Λέξεις-κλειδιά: *Zymomonas mobilis*, πλασμίδιο, κινητοποίηση

(Η εργασία αυτή είναι αφιερωμένη στη μνήμη του Κωνσταντίνου Δραΐνα)

4.1 Study of the *Zymomonas mobilis* NCIB 11163 plasmid pZA1003 mobilization region

Kambanos E., Afendra A.-S.

University of Ioannina, Department of Biological Applications and Technologies

Zymomonas mobilis grows in tropical plant juices producing large amounts of ethanol with high tolerance in it compared to the traditional yeast. Its strains usually contain plasmids, which are utilized in the construction of vectors for cloning and expression of heterologous genes in *Z. mobilis*, but also to obtain useful information concerning their origin, evolution and the genetic information spread by it. *Z. mobilis* NCIB 11163 possesses the above advantages and shows a rich plasmid profile which has previously been confirmed by the determination of the nucleotide sequence of its whole genome.

The endogenous plasmid pZA1003 (4551 bp) of NCIB 11163 contains 6 ORFs, two of which code for a putative relaxase (mobilization protein Mob) and a protein downstream of the putative Mob homologous to MobC proteins which act as helpers to the relaxase. Both proteins are known to be essential for plasmid mobilization during conjugation. The pZA1003 fragment containing these two ORFs together with their upstream region containing a putative *oriT* has been cloned in the vector pUCBM21. The recombinant plasmid obtained (pUCBM21Zmob) was used in helped conjugation experiments between *E. coli* cells in order to identify mobilization abilities. Plasmids pRK2013 (IncP) and R64drd-11(IncI) were used as helpers. Mobilization of pUCBM21Zmob has been observed in the case of pRK2013, but not of R64drd-11, a fact that implies the preference of pUCBM21Zmob to the conjugative plasmids of IncP group. This is the first experimental evidence concerning mobilization functions of pZA1003.

Keywords: *Zymomonas mobilis*, plasmid, mobilization

(This work is dedicated to the memory of Constantin Drainas)

4.2 Γενετικός προσδιορισμός της ανταγωνιστικής δράσης του βακτηρίου *Pseudomonas fluorescens* X κατά φυτοπαθογόνων μυκήτων

Κρεμμύδας Γ. και Γεωργακόπουλος Δ.Γ.

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας
(dgeorga@aua.gr)

Το βακτήριο *Pseudomonas fluorescens* X είναι βιολογικός ανταγωνιστής του μύκητα *Rhizium ultimum* και προστατεύει φυτάρια και σπόρους από τήξεις. Μετά από μεταλλαξογένεση με το μεταθετό στοιχείο Tn5-RL27, η ιδιότητα του βακτηρίου αποδόθηκε στο γονίδιο που κωδικοποιεί την αφυδρογονάση της γλυκόζης, στα γονίδια βιοσύνθεσης της πυρρολοκινολινκινόνης (PQQ, συνένζυμο της αφυδρογονάσης) και δύο ακόμα γονίδια (*sup5* και *sup6*) τα οποία φαίνεται ότι βρίσκονται οργανωμένα σε ένα υποθετικό οπερόνιο (SupX). Ο έλεγχος της καταστολής του *P. ultimum* από τα γονίδια αυτά απεδείχθη με επανόρθωση της μετάλλαξης από τα γονίδια αυτά *in trans*. Ανωφερικά του οπερονίου αυτού, το οποίο αποτελείται από τρία ακόμα γονίδια (ένα από τα οποία κωδικοποιεί μια NRPS), εντοπίστηκε θέση αναγνώρισης ενός μεταγραφικού παράγοντα της οικογένειας GntR. Μελέτη της συνταϊνίας του γονιδιακού τόπου του SupX αποκάλυψε ότι είναι διαδεδομένο στο γένος *Pseudomonas* και εμφανίζει μεγάλη ομοιότητα με το οπερόνιο βιοσύνθεσης της μαγκοτοξίνης από το στέλεχος *Ps. syringae* pv. *syringae* UMAF0158. Μελετήθηκε η έκφραση των γονιδίων του SupX με ποσοτική Real-Time PCR. Διαπιστώθηκε ότι η έκφρασή τους επάγεται όταν το βακτήριο βρίσκεται στη στατική φάση και αναπτύσσεται παρουσία γλυκόζης στο θρεπτικό μέσο. Η έκφραση των γονιδίων του SupX διακόπτεται στα μεταλλαγμένα στελέχη τα οποία έχουν ένθεση του μεταθετού στοιχείου στα γονίδια βιοσύνθεσης του PQQ και στο γονίδιο που κωδικοποιεί την αφυδρογονάση της γλυκόζης. Η αφυδρογονάση της γλυκόζης και η PQQ φαίνεται ότι ρυθμίζουν έμμεσα την έκφραση των γονιδίων του οπερονίου SupX, οξειδώνοντας τη γλυκόζη σε γλυκονικό οξύ, το οποίο αποτελεί αναστολέα ορισμένων από τους μεταγραφικούς παράγοντες της οικογένειας GntR. Ο προτεινόμενος μηχανισμός δράσης του βακτηρίου υποδηλώνει την βιοσύνθεση ενός δευτερογενούς μεταβολίτη, πιθανώς κάποιου κυκλικού λιποπεπτιδίου, από το SupX και την ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων αυτών από τα επίπεδα του γλυκονικού οξέος, γεγονός που αποτελεί πρώτη επιστημονική καταγραφή σε βιολογικούς ανταγωνιστές *Pseudomonas*.

Λέξεις-κλειδιά: βιολογική καταπολέμηση, φυτοπαθογόνοι μύκητες

Ευχαριστίες: η παρούσα εργασία χρηματοδοτήθηκε από το πρόγραμμα ΙΙΕΝΕΔ 03ΕΔ230

4.2 Genetic characterization of the antagonism against phytopathogenic fungi by *Pseudomonas fluorescens* X

Kremmydas G. and Georgakopoulos D.G.

Agricultural University of Athens, Department of Agricultural Biotechnology
(dgeorga@aua.gr)

Pseudomonas fluorescens X has the ability to suppress damping off caused by *Pythium ultimum*. Spontaneous mutagenesis, sequencing and complementation showed that biocontrol ability of this isolate is controlled by the pyrroloquinoline quinone (PQQ) biosynthesis genes, the glucose dehydrogenase (*gcd*) gene, and two genes (*sup5* and *sup6*) which seem to be organized in a putative operon (SupX). Putative operon SupX consists of five genes (one of them encoding for a NRPS). Upstream of SupX is a unique binding site for a transcriptional factor of the GntR family. Synteny of the genetic locus of the SupX revealed that it is common in Pseudomonads and shows high similarity with the mangotoxin operon in *Ps. syringae* pv. *syringae* UMAF0158. Quantitative real-time PCR analysis indicated that transcription of SupX was strongly reduced when *gcd* or one of the PQQ genes is mutated. On the contrary, transcription of SupX is induced by the presence of glucose in the medium and transcription levels appear to be higher during the late exponential phase. *Gcd*, which uses PQQ as a cofactor, catalyses the oxidation of glucose to gluconic acid, which inhibits some of the transcriptional factors of the GntR family, thus affecting the transcription of SupX. This study provides new evidence for the role of glucose on the biosynthesis of an antifungal compound and the biocontrol activity in *Ps. fluorescens* X.

Keywords: Biological control, phytopathogenic fungi

Acknowledgements: This research was funded by the project PENED 03ΕΔ230 (GSRT)

4.3 Μερική μοριακή ανάλυση γενετικών στοιχείων με γονιδίωμα από δίκλωνο RNA, ενυπαρχόντων σε ιθαγενείς απομονώσεις φυτοπαθογόνων μυκήτων

Μαγκλάρας Π., Κόλλα Κ., Παπαβλασόπουλος Α., Παπαχρήστος Χ., Αλεξανδράτος Α., Σερίφη Η., Παπατόλη Λ., Χατζηλουκάς Ε.
Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών & Τεχνολογιών, Ιωάννινα

Η ύπαρξη γενετικών στοιχείων αποτελούμενων από δίκλωνο RNA (double-stranded RNA, dsRNA) σε μύκητες θεωρείται ως σημαντική ένδειξη μόλυνσης των τελευταίων από ιούς (μυκοϊούς). Οι μυκοϊοί θεωρείται ότι απαντώνται σε όλες τις ταξινομικές ομάδες μυκήτων, αλλά οι μολύνσεις αυτές είναι κατά κανόνα ασυμπτωματικές και δεν γίνονται αντιληπτές. Σε ορισμένες όμως περιπτώσεις, η μόλυνση ενός μύκητα από μυκοϊό είναι δυνατόν να οδηγήσει στην εμφάνιση διαφόρων συμπτωμάτων, μεταξύ αυτών και στην εμφάνιση του φαινομένου της υπομολυσματικότητας. Η υπομολυσματικότητα απαντάται σε φυτοπαθογόνους μύκητες και συνίσταται στην μερική ή ολική αδυναμία του μύκητα να μολύνει το φυτό-ξενιστή του και να προκαλέσει την αντίστοιχη ασθένεια. Για τον λόγο αυτό, μυκοϊοί που προκαλούν υπομολυσματικότητα στους ξενιστές τους χρησιμοποιούνται ως αντιδραστήρια βιολογικής καταπολέμησης των φυτοπαθογόνων μυκήτων. Στα πλαίσια της προσφοράς προς την κατεύθυνση απομόνωσης και χαρακτηρισμού τέτοιων μυκοϊών, εξετάστηκαν άνω των 400 απομονώσεων φυτοπαθογόνων μυκήτων – συλλεγμένων από καλλιέργειες στην Ήπειρο – για την παρουσία μορίων dsRNA μεγέθους 0,5 kb και άνω. Εντοπίστηκαν συνολικά δώδεκα διαφορετικές απομονώσεις μυκήτων που περιείχαν πληθυσμούς μορίων dsRNA και ταυτοποιήθηκε μοριακά η ταξινομική τους θέση. Ακολούθως επιχειρήθηκε η σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA) και η κλωνοποίηση του από επιλεγμένα μόρια dsRNA. Η προέλευση των κλώνων cDNA ταυτοποιήθηκε μέσω στυπώματος κατά Northern και αποδείχθηκε ότι αποτελούν κλώνους των στοχευόμενων μορίων. Ταυτοποιήθηκε η νουκλεοτιδική ακολουθία των κλώνων και αναζητήθηκε η πιθανή ομοιότητά τους με άλλες αλληλουχίες κατατεθειμένες στις βάσεις δεδομένων, αλλά δεν ανευρέθη καμία ομοιότητα. Η *in silico* μετάφραση των αλληλουχιών αυτών έδειξε μικρές ομοιότητες, της τάξης του 25 έως 37% με πολυπεπτίδια ιϊκής προέλευσης, όπως καψιδιακές πρωτεΐνες άλλων ιών. Η σημασία αυτών των ευρημάτων θα συζητηθεί.

Λέξεις-κλειδιά: μυκοϊοί, γενετικά στοιχεία από δίκλωνο RNA, φυτοπαθογόνοι μύκητες

4.3 Partial molecular analysis of double-stranded RNA genetic elements occurring in indigenous isolates of phytopathogenic fungi.

Maglaras P., Kolla K., Papavlasopoulos A., Papachristos Ch., Alexandratos A., Serifi I., Papatoli L., Hatziloukas E.
University of Ioannina, Department of Biological Applications & Technologies, Ioannina, Greece

The presence of double-stranded RNA (dsRNA) genetic elements in fungi is generally considered as a strong indication of a mycoviral infection of the fungal host. Mycoviruses are ubiquitous in fungi, but their presence remains mostly undetected due to the asymptomatic nature of the infection. In some instances though, infection of a fungus by a mycovirus can result in altered host phenotypes among others also in the appearance of the phenomenon of hypovirulence. Hypovirulence occurs in plant pathogenic fungi and manifests itself in form of partial or complete inability of the fungus to infect its host plant and cause disease. For this reason, mycoviruses able to cause hypovirulence of their phytopathogenic hosts are used as reagents of biological control against them. In order to contribute to the isolation and characterization of such mycoviruses, more than 400 isolations of phytopathogenic fungi have been collected from Epirus and screened for the presence of larger dsRNA molecules (from 0,5 kb up to ca. 11 kb). Only twelve different fungal isolates were detected as carrying various populations of dsRNS molecules and their taxonomic position has been identified. Furthermore, selected dsRNA molecules were used as templates to produce and clone cDNA. The origin of various cDNA clones was verified using Northern hybridization. The nucleotide sequence of several cDNA inserts was determined and examined for the presence of similar sequences in existing data banks. No sequence similarity was detected at this level. *In silico* translation of the inserts and search for sequence similarity at the polypeptide level revealed a low percentage (25 to 37%) of similarity with several polypeptides of viral origin, such as capsid proteins. The significance of the results will be discussed.

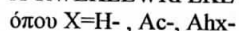
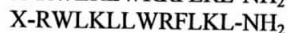
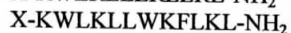
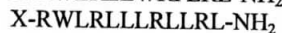
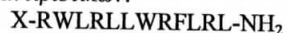
Keywords: mycoviruses, dsRNA genetic elements, plant pathogenic fungi

4.4 Σύνθεση και μελέτη αμφιπαθητικών α-ελικοειδών πεπτιδικών μοντέλων για την ανάπτυξη νέων αντιμικροβιακών μέσων

Μπαλλίου Α., Μαρριανού Α., Σακκά Μ., Κούκκου Α.-Ε., Σακαρέλλου-Δαϊτσιώτου Μ., Σακαρέλλος Κ., Δραΐνας Κ. και Πάνου-Πομώνη Ε.

Ερευνητικό Εργαστήριο Χημείας Πεπτιδίων, Τομέας Οργανικής Χημείας και Βιοχημείας, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, 45110 Ιωάννινα, Ελλάδα.

Τα αντιμικροβιακά κατιονικά πεπτιδία (AMPs) είναι τμήμα του ανοσοποιητικού συστήματος και αποτελούν την πρώτη γραμμή άμυνας έναντι παθογόνων βακτηρίων για πολλά είδη ζωής. Τα AMPs έχουν ευρύ φάσμα δράσης έναντι Gram αρνητικών και Gram θετικών βακτηρίων, μυκήτων και ιών. Τα συνθετικά κατιονικά πεπτιδία είναι μια κατηγορία θετικά φορτισμένων, μικρού μεγέθους πεπτιδίων με διαμόρφωση αμφιπαθητικής δομής. Η ευρεία χρήση των αντιβιοτικών έχει σαν αποτέλεσμα την ανάπτυξη ανθεκτικών βακτηριακών στελεχών, με επιτακτική την ανάγκη για την ανάπτυξη νέας γενιάς αντιμικροβιακών μέσων. Στη συγκεκριμένη μελέτη συντέθηκαν τα παρακάτω ελικοειδή πεπτιδία για την ανάπτυξη νέων αντιβιοτικών:



Η σύνθεση επιτελέστηκε με τη συμβατική Fmoc/tBu μέθοδο στερεής φάσης. Τα πεπτιδία καθαρίστηκαν με HPLC και ταυτοποιήθηκαν με ESI-MS. Τα παραπάνω πεπτιδία εξετάστηκαν για την αντιμικροβιακή τους δράση έναντι Gram (-), Gram (+) βακτηρίων και μυκήτων. Τα πεπτιδία εξετάστηκαν επίσης για την αιμολυτική τους δράση όπως και για την πρωτεολυτική τους σταθερότητα. Τα διαμορφωτικά χαρακτηριστικά των πεπτιδικών μοντέλων αξιολογήθηκαν με φασματοσκοπία κυκλικού διχρωϊσμού (CD).

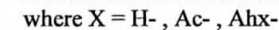
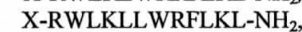
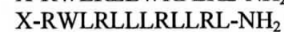
Λέξεις κλειδιά: κατιονικά αντιμικροβιακά πεπτιδία, αιμολυτική δράση, πρωτεολυτική σταθερότητα

4.4 Synthesis and study of amphipathic α-helical peptide models for the development of new antimicrobial agents.

Balliu A., Marianou A., Sakka M., Koukkou A.-I., Sakarellos-Daitsioti M., Sakarellos C., Drinas C. and Panou-Pomonis E.

Peptide Chemistry Research Laboratory, Section of Organic Chemistry and Biochemistry, Department of Chemistry, University of Ioannina, 45110 Ioannina, Greece

Antimicrobial cationic peptides (AMPs) are part of the innate immune system and are used as the first line of defense against bacterial pathogens in many species. The AMPs have broad-spectrum of action against both Gram negative and Gram positive bacteria as well as fungi, and viruses. Synthetic cationic peptides are a class of positively charged small peptides with amphipathic conformation. The widespread use of antibiotics has led to the development of antibiotic-resistant microbial strains, resulting in an urgent need for new antimicrobial agents. In the present study, cationic helical peptides of the following type were synthesized in order to develop new antibiotics:



Synthesis was performed by the conventional stepwise Fmoc/tBu solid-phase method. The peptides were purified by HPLC and identified by ESI-MS. The above peptides were tested for their antimicrobial activity against gram (-) bacteria, gram (+) bacteria and fungi. The peptides were also tested for their hemolytic activity and proteolytic stability. The conformational characteristics of the peptides models were evaluated by circular dichroism spectroscopy (CD).

Keywords: cationic antimicrobial peptides, proteolytic stability, hemolytic assay

4.5 Διερεύνηση των συμβιωτικών αλληλεπιδράσεων *Wolbachia* – μύγας τσέτσε

Ντουντούμης Β.¹, Τσιάμης Γ.¹, Wamwiri F.^{2,5}, Brelsoford C.^{2,3}, Alam U.², Aksoy E.², Νταλαπέρας Σ.¹, Abd-Alla A.⁴, Ouma J.⁵, Takac P.⁶, Aksoy S.², και Μπούρτζης Κ.^{1,7}

¹ Τμήμα Διαχείρισης Περιβάλλοντος και Φυσικών Πόρων, Πανεπιστήμιο Δυτικής Ελλάδας, Αγρίνιο ² Yale University School of Public Health, New Haven, CT USA ³ Current address: Department of Entomology, University of Kentucky, Lexington, KY USA ⁴ Insect Pest Control Laboratory, Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture, Vienna, Austria ⁵ Trypanosomiasis Research Centre, Kenya Agricultural Research Institute, Kikuyu 00902 Kenya ⁶ Institute of Zoology, Department of Entomology, Slovak Academy of Science, Bratislava, Slovakia ⁷ Biomedical Sciences Research Center Vari, Greece

Η *Wolbachia* είναι ένα γένος ενδοσυμβιωτικών βακτηρίων της α-υποομάδας των πρωτεοβακτηρίων ικανό να μολύνει ένα ευρύ φάσμα αρθροπόδων και νηματωδών της φιλαρίας. Αυτή η ομάδα βακτηρίων ώθησε την έρευνα προς μια ενδεχόμενη χρήση τους στον έλεγχο φορέων ασθενειών αγροτικής και ιατρικής σημασίας, συμπεριλαμβανομένης και της μύγας τσέτσε του γένους *Glossina* sp.. Η μύγα τσέτσε μεταδίδει την Αφρικανική Τρυπανοσωμίαση, τον υπαίτιο παράγοντα της 'ασθένειας του ύπνου' στον άνθρωπο και της αντίστοιχης ασθένειας στα ζώα γνωστή ως 'nagana'. Η μοριακή ταυτοποίηση των βακτηριακών στελεχών της *Wolbachia* και η εξέταση του φαινομένου της οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων από τη *Wolbachia* στον πυρήνα της μύγας τσέτσε θα βοηθήσουν στην ανάπτυξη και χρήση βασισμένων στη *Wolbachia* βιολογικών μεθόδων ελέγχου. Για τη μελέτη αυτή χρησιμοποιήσαμε μια ειδική 16S rRNA PCR ανάλυση για να διερευνήσουμε την ύπαρξη της *Wolbachia* σε οκτώ διαφορετικούς εργαστηριακούς και φυσικούς πληθυσμούς από έντεκα διαφορετικά είδη *Glossina* με προέλευση δεκατρείς χώρες της Αφρικής. Η σάρωση της *Wolbachia* σε σύνολο 5339 δειγμάτων έδειξε ότι η μόλυνση ήταν επικρατούσα στους πληθυσμούς *Glossina morsitans morsitans*, *G. morsitans centralis* και *G. austeni*. Επίσης ανιχνεύθηκε σε *G. medicorum*, *G. brevipalpis*, *G. palpalis palpalis*, *G. tachinoides* και *G. morsitans submorsitans*, και για πρώτη φορά σε *G. pallidipes* και *G. palpalis gambiensis*. Αντιθέτως δεν ανιχνεύθηκε σε *G. fuscipes fuscipes*. Επιπλέον, στελέχη *Wolbachia* από διαφορετικούς εργαστηριακούς και φυσικούς πληθυσμούς των ειδών *Glossina* χαρακτηρίστηκαν χρησιμοποιώντας το 16S rRNA, το *wsp* (*Wolbachia* Surface Protein) γονίδιο και τους MLST (Multi Locus Sequence Typing) γονιδιακούς δείκτες. Η ανάλυση αυτή οδήγησε στην ανίχνευση γεγονότων οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων, όπου τουλάχιστον τέσσερα *Wolbachia* γονίδια (16S rRNA, *ftsZ*, *fbpA* και *wsp*) εισήλθαν στο πυρηνικό γονιδίωμα της μύγας τσέτσε.

4.5 Investigation of *Wolbachia* - tsetse flies (genus *Glossina*) symbiotic interactions

Doudoumis V.¹, Tsiamis G.¹, Wamwiri F.^{2,5}, Brelsoford C.^{2,3}, Alam U.², Aksoy E.², Dalaperas S.¹, Abd-Alla A.⁴, Ouma J.⁵, Takac P.⁶, Aksoy S.² and Bourtzis K.^{1,7}

¹ Department of Environmental and Natural Resources Management, University of Western Greece, 2 Seferi St, 30100 Agrinio, Greece ² Yale University School of Public Health, 60 College St., 811 LEPH, New Haven, CT 06520 USA ³ Current address: Department of Entomology, University of Kentucky, S-225 Ag. Science Center North, Lexington, KY 40546 USA ⁴ Insect Pest Control Laboratory, Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture, Vienna, Austria ⁵ Trypanosomiasis Research Centre, Kenya Agricultural Research Institute, P.O. Box 362, Kikuyu 00902 Kenya ⁶ Institute of Zoology, Department of Entomology, Slovak Academy of Science, Dubravská cesta 9, 845 06 Bratislava, Slovakia ⁷ Biomedical Sciences Research Center Al. Fleming, 16672 Vari, Greece

Wolbachia is a genus of endosymbiotic α-Proteobacteria infecting a wide range of arthropods and filarial nematodes. This bacterial group has prompted research regarding its potential for the control of disease vectors of agricultural and health importance, including *Glossina* sp., which transmits African trypanosomes, the causative agents of sleeping sickness in humans and nagana in animals. The molecular identification of strains and the examination of horizontal gene transfer from *Wolbachia* to the tsetse flies' nuclear are considered essential for the development of *Wolbachia*-based biological control methods. We employed a *Wolbachia* specific 16S rRNA PCR assay to investigate the presence of *Wolbachia* in eight different laboratory stocks as well as in natural populations of eleven different *Glossina* species originating from thirteen African countries. The *Wolbachia* screening of 5339 specimens showed that the infection was prevalent in *Glossina morsitans morsitans*, *G. morsitans centralis* and *G. austeni* populations. It was also detected in *G. medicorum*, *G. brevipalpis*, *G. palpalis palpalis*, *G. tachinoides* and *G. morsitans submorsitans* and, for the first time, in *G. pallidipes* and *G. palpalis gambiensis*. On the other hand, *Wolbachia* was not found in *G. fuscipes fuscipes*. Furthermore, *Wolbachia* infections of laboratory and natural populations of *Glossina* species were characterized using the 16S rRNA, the *wsp* (*Wolbachia* Surface Protein) gene and MLST (Multi Locus Sequence Typing) gene markers. This analysis led to the detection of horizontal gene transfer events, in which at least four *Wolbachia* genes (16S rRNA, *ftsZ*, *fbpA* and *wsp*) were inserted into the tsetse fly nuclear genome.

Keywords: *Wolbachia*, *Glossina morsitans*, symbiosis, genome evolution

4.6 Η φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης CagA του *H. pylori* σε θέσεις EPIYA, συμβάλλει μέσω ενεργοποίησης TAK1 και NF-κB, στην ενεργοποίηση και έκκριση της ιντερλευκίνης-8 από τα γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα

Παπαδάκος Κ.¹, Martinez B.¹, Χατζηλουκάς Ε.², Μεντής Α.¹ και Σγούρας Δ.¹

1 Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ, Εργαστήριο Ιατρικής Μικροβιολογίας, Αθήνα

2 Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Ιωάννινα

Το *Helicobacter pylori* (*Hp*) αποτελεί αιτιολογικό παράγοντα για την ανάπτυξη γαστρικής φλεγμονής, πεπτικού έλκους και αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης γαστρικής νεοπλασίας. Η πρωτεΐνη CagA του *Hp* μετά από φωσφορυλίωση της από ενδοκυττάριας κινάσες σε επαναλαμβανόμενες θέσεις φωσφορυλίωσης τυροσίνης (EPIYA), συνεισφέρει στη παθογένεια στο γαστρικό επιθήλιο, παρεμβαίνοντας σε μονοπάτια μεταγωγής σήματος που ελέγχουν κυτταρική πολικότητα, ανάπτυξη και ανοσολογική απόκριση. Σκοπός μας ήταν η διερεύνηση της επίπτωσης των θέσεων φωσφορυλίωσης της CagA, στην ενεργοποίηση και έκκριση προ-φλεγμονωδών μορίων όπως της IL-8 από τα γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα (AGS) και η διερεύνηση του μοριακού μηχανισμού. Κατασκευάστηκαν γενετικά τροποποιημένα στελέχη του πρότυπου P12 *Hp* στελέχους που εξέφραζαν CagA πρωτεΐνη με μεταβλητό αριθμό EPIYA θέσεων φωσφορυλίωσης και των αντίστοιχων μη φωσφορυλιώσιμων μορφών με αντικατάσταση της τυροσίνης με φαινυλαλανίνη (EPIFA). Τα στελέχη αυτά χρησιμοποιήθηκαν για να μολυνθούν κύτταρα AGS για 2, 4 και 24 ώρες. Η ενεργοποίηση του γονιδίου της IL-8 προσδιορίστηκε με ποσοτική PCR-πραγματικού χρόνου και η συγκέντρωση της εκκρινόμενης IL-8 στα κυτταρικά υπερκείμενα με ELISA. Στις 2 ώρες, στελέχη με λειτουργικές θέσεις φωσφορυλίωσης, αύξησαν κατά 120 φορές την ενεργοποίηση του IL-8 γονιδίου. Αντίθετα, στελέχη που εξέφραζαν CagA απουσία θέσεων φωσφορυλίωσης ή με μη-φωσφορυλιώσιμα μοτίβα (EPIFA), απέτυχαν να ενεργοποιήσουν αντίστοιχα ισόποσα το γονίδιο της IL-8. Η ενεργοποίηση του γονιδίου IL-8 επανήλθε στα βασικά επίπεδα 4 ώρες μετά. Η συγκέντρωση IL-8 στα κυτταρικά υπερκείμενα στις 24 ώρες, βρέθηκε να εξαρτάται από τον αριθμό των EPIYA θέσεων. Παρατηρήθηκε χρόνο-εξαρτώμενη ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB μέσω της TAK1 για τα στελέχη με ενεργές θέσεις φωσφορυλίωσης, όχι όμως για τα μη φωσφορυλιώσιμα μεταλλάγματα της CagA. Αναστολή της TAK1, με χρήση 5Z-7-Oxozeaenol, ανέστειλε την έκκριση της IL-8 με δόσο-εξαρτώμενο τρόπο. Η φωσφορυλίωση της CagA στα EPIYA μοτίβα, συντελεί στην πλήρη μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου της IL-8 και την επακόλουθη έκκριση της από τα γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα στη λοίμωξη από *Hp*.

4.6 *H. pylori* CagA protein phosphorylation on EPIYA motifs triggers IL-8 gene induction and consequent secretion of IL-8 in gastric epithelial cells, by activating NF-κB through TAK1 kinase.

Papadakos K.¹, Martinez B.¹, Hatziloukas E.², Mentis A.¹, Sgouras D.¹

1 Institut Pasteur Hellénique, Laboratory of Medical Microbiology, Athens

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

Helicobacter pylori (*Hp*) is the etiologic factor for development of gastric inflammation, peptic ulceration and increased risk for gastric neoplasia. The *Hp* CagA protein following its translocation in gastric epithelial cells is phosphorylated by host kinases on repeating EPIYA phosphorylation motifs and perturbs signal transduction pathways controlling cellular polarity, growth and proinflammatory response. Our aim was to investigate the impact of EPIYA CagA phosphorylation, on IL-8 transcriptional activation and secretion by gastric epithelial cells and elucidate the molecular mechanism. Based on reference strain P12, we constructed genetically modified *Hp* mutants expressing CagA protein with variable numbers of EPIYA phosphorylation motifs and their respective EPIFA phosphorylation deficient counterparts. These strains were used to infect AGS cells for 2, 4 and 24 hours. IL-8 gene activation was quantified by Quantitative Real Time PCR and concentration of secreted IL-8 in supernatants was determined by ELISA. Presence of EPIYA phosphorylation, independent of motif- number significantly increased IL-8 gene transcription by 120-fold, within 2 hours post infection. Strains expressing CagA with non-functional EPIFA motifs failed to fully activate IL-8 gene transcription and induce IL-8 protein. At 4 hours, IL-8 gene transcription reached background levels. At 24 hours, IL-8 concentration appeared dependent on the number of EPIYA motifs. Concomitant time-dependent NF-κB activation through TAK1 was observed. Dose-dependent inhibition of IL-8 secretion was observed in the presence of TAK1 inhibitor 5Z-7-Oxozeaenol. Phosphorylation of CagA on EPIYA motifs, contributes to the full transcriptional activation of IL-8 gene and subsequent secretion of IL-8 during *Hp* infection of gastric epithelial cells.

Keywords: *Helicobacter pylori*, pathogenesis, CagA

4.7 Νεοφανεείς δράσεις πρωτεϊνών τελεστών τύπου III και δυνατότητες αξιοποίησής τους στη φυτοπροστασία

Παπανικολάου Α., Σαρρής Π., Σκανδάλης Ν. και Πανόπουλος Ν.

¹Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ηράκλειο

²Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο, Κηφισιά, Αθήνα

Οι πρωτεΐνες-τελεστές Τύπου III συνιστούν παράγοντες παθογένειας σε πολλά αρνητικά κατά Gram βακτήρια και ενίονται στα κύτταρα ευκαρυωτικών ξενιστών μέσω ειδικής εκκριτικής νανοσυσκευής (ενισώματος, εκκριτικό σύστημα Τύπου III). Σε φυτοπαθγόνα βακτήρια, οι πρωτεΐνες-τελεστές καταστέλλουν μηχανισμούς εγγενούς ανοσίας και πυροδοτούν μηχανισμούς ανθεκτικότητας τύπου HR (αντίδραση υπερευαισθησίας) σε ποικιλίες φυτών που διαθέτουν λειτουργικά αντιστοιχούς υποδοχείς που κωδικοούνται από τα κλασσικά γονίδια «κάθετης» ανθεκτικότητας φυτών σε ασθένειες (*R genes*). Πολλές πρωτεΐνες-τελεστές είναι πολυλειτουργικές, με διακριτές δομικές επικράτειες που σχετίζονται με διαφορετικές δράσεις στα κύτταρα των ξενιστών. Προηγούμενα πειράματά μας (Sarris et al., Mol. Plant Microb. Interact. 2011), έδειξαν ότι ορισμένες πρωτεΐνες-τελεστές Τύπου III από παθότυπους του βακτηρίου *Pseudomonas syringae* δρουν ως ενισχυτές της RNA-διαμεσολαβούμενης σίγησης. Για να μελετηθεί λεπτομερέστερα ο μηχανισμός και οι συνέπειες της εμπλοκής του μηχανισμού σίγησης στην αλληλεπίδραση παθογόνων-ξενιστή σε διάφορα υποσυστήματα κατασκευάστηκαν γενετικά τροποποιημένα φυτά *Nicotiana benthamiana* που εκφράζουν ένα τέτοιο γονίδιο. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε γονιδιακή κασέτα συστατικής έκφρασης σε δυαδικό φορέα αγροβακτηρίου για γενετικό μετασχηματισμό φυλλικών δίσκων του φυτού. Στη συνέχεια έγινε μοριακός έλεγχος και χαρακτηρισμός των φυτών T0/T1 γενιάς με αναλύσεις Northern, Southern και PCR, που επιβεβαίωσε την ενσωμάτωση και μεταγραφική έκφραση του γονιδίου σε τρεις τουλάχιστον σειρές. Πειραματικές μολύνσεις σε δύο γενετικά τροποποιημένες σειρές έδειξαν ότι αυτές ήταν ανθεκτικές σε ογκογόνο στέλεχος του *Agrobacterium tumefaciens*, επιβεβαιώνοντας προηγούμενες παρατηρήσεις για την εμπλοκή του μηχανισμού της σίγησης στην βακτηριακή ογκογένεση. Επίσης, οι γενετικά τροποποιημένες σειρές ήταν ανθεκτικές σε αλευρώδεις (*Bemisia* sp.). Τα ευρήματα αυτά προδιαγράφουν δυνατότητες εφαρμογών στη φυτοπροστασία έναντι μυζητικών εντόμων που είναι φορείς πολλών σημαντικών ιολογικών ασθενειών σε φυτικές καλλιέργειες.

4.7 New effects of bacterial Type III effectors and their exploitation in plant biotechnology

Papanikolaou A.¹, Sarris P.¹, Skandalis N.² and Panopoulos N.¹

¹Department of Biology, University of Crete, Heraklion, Greece

²Benaki Phytopathological Institute, Kifisia, Athens, Greece

Type III effectors (T3SE) are virulence proteins of many gram negative bacteria that are injected into host cells by the Type III injectisome. In plant-bacterium pathosystems, T3SEs suppress innate plant immunity and may induce effector-triggered immunity if they are recognized by plant resistance genes (*R genes*), a form of resistance often expressed as a rapid, localized hypersensitive response (HR). Many T3SEs are multifunctional proteins, with distinct cellular functions associated with different structural domains. Previous studies (Sarris et al. Mol. Plant Microb. Interact. 2011) showed that some T3SEs from *Pseudomonas syringae* enhance the sense-posttranscriptional gene silencing (s-PGTS) mechanisms in plants in which HR is not elicited in response to effector delivery via the agrobacterium transient expression system (Sarris et al., 2011). Only a subset of the effectors tested from various pathovars of *Pseudomonas syringae* have such activity, while the majority do not appear to do so. We have now shown that a genecoding for one such effector can provide protection against infestation by a phloem-feeding insect pest (whitefly) and crown gall tumorigenesis in a model plant, *Nicotiana benthamiana*, following transformation by agrobacterium. This finding enables a novel technological exploitation of this or other bacterial effector proteins with silencing enhancer activity in crop protection, in particular, against phloem-feeding insects that transmit viruses to crop plants.

4.8 Ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά στελεχών της *Escherichia coli* που απομονώθηκαν από κόπρανα υγιών παραγωγικών ζώων και δείγματα πόσιμου νερού στην Ελλάδα.

Συρρή Γ.¹, Πετρίδου Ε.¹, Δελφάκη Α.¹, Τζιμοτούδης Ν.¹, Μπράμης Γ.², Γιαδίνης Ν.³, Κρήτας ΣΚ.¹, και Φιλιούσης Γ.¹

¹ Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο / Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Λοιμωδών Νοσημάτων / Κτηνιατρική Σχολή Θεσσαλονίκης

² Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο / Εργαστήριο Ζωοτεχνίας / Κτηνιατρική Σχολή Θεσσαλονίκης

³ Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο / Κλινική των Παραγωγικών Ζώων / Κτηνιατρική Σχολή Θεσσαλονίκης

Η παρούσα μελέτη αναφέρεται στην αντιβιοαντοχή 65 στελεχών *Escherichia coli* (*E. coli*), που απομονώθηκαν από κόπρανα υγιών παραγωγικών ζώων και 33 στελεχών, που απομονώθηκαν από δείγματα πόσιμου νερού. Εφαρμόστηκε η μέθοδος διάχυσης σε στερεό υπόστρωμα για να καθοριστεί η ευαισθησία των στελεχών σε δισκία των ακολούθων αντιβιοτικών: Πενικιλίνη (6μg), αμοξικιλίνη (25μg), τετρακυκλίνη (30μg), στρεπτομυκίνη (10μg), γενταμυκίνη (10μg), τριμεθοπρίμη / σουλφαμεθοξαζόλη (1,29 / 23,75 μg), κεφίξιμη (5 μg), ceftiofur (30μg), ενροφλοξασίνη (5 μg), και χλωραμφενικόλη (30μg). Ορια ευαισθησίας στα αντιβιοτικά καθορίστηκαν σύμφωνα με τις κατευθυντήριες γραμμές του EUCAST. Η πλειονότητα των στελεχών *E. coli*, που απομονώθηκαν από δείγματα πόσιμου νερού βρέθηκαν να είναι ευαίσθητα στα παραπάνω αντιβιοτικά με εξαίρεση 6 που ήταν ανθεκτικά στην τετρακυκλίνη και 4 στη στρεπτομυκίνη. Αντιθέτως τα στελέχη, που απομονώθηκαν από δείγματα κοπράνων παρουσίασαν αυξημένη ανθεκτικότητα. Ειδικότερα και τα 65 στελέχη ήταν ανθεκτικά στην πενικιλίνη, 42 στην τετρακυκλίνη, 27 στη χλωραμφαινικόλη, 39 στην τριμεθοπρίμη/σουλφαμεθοξαζόλη, 48 στη στρεπτομυκίνη, 42 στην αμοξικιλίνη, 23 στην ενροφλοξασίνη, 22 στη γενταμυκίνη, 7 στην κεφίξιμη και 5 στο ceftiofur. Ανάλυση του γενετικού υλικού των στελεχών αποκάλυψε την παρουσία γονιδίων, που κωδικοποιούν αντοχή στην τετρακυκλίνη (*tet(A)*, *tet(B)* and *tet(M)*) και στην ενροφλοξασίνη (*qnr(A)*, *qnr(B)*, *qnr(S)*). Η χρήση των αντιβιοτικών ως αυξητικών παραγόντων των ζώων αυξάνει όχι μόνο το επίπεδο αντίστασης των παθογόνων, αλλά και των συμβιωτικών απαθογόνων βακτηρίων. Η *E. coli* είναι βακτήριο που αποικίζει το έντερο των ζώων και θεωρείται ως ο κύριος δείκτης της ρύπανσης του πόσιμου νερού από κόπρανα. Κατά συνέπεια τα παραγωγικά ζώα και το πόσιμο νερό είναι φορείς για τη μετάδοση του παραπάνω βακτηρίου στον άνθρωπο. Κατά την άποψη μας η αυξημένη ανθεκτικότητα που παρουσιάζουν στελέχη της *E. coli* πρέπει να γίνει αντικείμενο ιδιαίτερης μελέτης.

Λέξεις-κλειδιά: *Escherichia coli*, βιοανθεκτικότητα, παραγωγικά ζώα, πόσιμο νερό

4.8 Antibiotic resistance of *Escherichia coli* strains isolated from stools of healthy food animals and tap water samples in Greece.

Syrri G.¹, Petridou E.¹, Delfaki A.¹, Tzimotoudis N.¹, Bramis G.², Giadinis N.³, Kritas SK.¹, and Filioussis G.¹

¹ Aristotle University/ Laboratory of Microbiology and Infectious diseases /School of Veterinary Medicine/ Thessaloniki Greece

² Aristotle University /Departement of animal production /School of Veterinary Medicine/ Thessaloniki Greece

³ Aristotle University /Clinic of farm animals/ School of Veterinary Medicine/ Thessaloniki Greece

The antibiotic resistance profile of 65 *Escherichia coli* (*E. coli*) strains isolated from stools of healthy food animals and 33 isolated from tap water samples, are reported in the present study.

Disc diffusion method was used to determine susceptibility to the following antibacterials: Penicillin (6μg), amoxicillin (25μg), tetracycline (30μg), streptomycin (10μg), gentamycin (10μg), trimethoprim/sulfamethoxazole (1,29/23,75μg), cefixime (5μg), ceftiofur (30μg), enrofloxacin (5μg), and chloramphenicol (30μg). Breakpoints were determined according to EUCAST guidelines.

The strains isolated from tap water samples exhibited low resistances since only 6 were resistant to tetracycline and 4 to streptomycin. The strains isolated from stool samples exhibited high resistances. Briefly all 65 isolates were resistant to penicillin, 42 to tetracycline, 27 to chloramphenicol, 39 to trimethoprim/sulfamethoxazole, 48 to streptomycin, 42 to amoxicillin, 23 to enrofloxacin, 22 to gentamycin, 7 to cefixime and 5 to ceftiofur.

Amplification of DNA of the isolates revealed the presence of genes that code for resistant determinants: tetracycline (*tet(A)*, *tet(B)* and *tet(M)*), and enrofloxacin (*qnr(A)*, *qnr(B)*, *qnr(S)*).

The use of antibiotics as growth promoters of food animals increases not only the level of resistance of pathogenic, but also of commensal bacterial species. *Escherichia coli* (*E. coli*) is a symbiotic inhabitant of the intestine that it is also considered as the main indicator of fecal pollution of drinking water. Food animals and tap water could be the vectors for the transmission of different bacteria to humans. Therefore we strongly support that the exposed resistances should be considered for further investigation.

4.9 Ρόλοι της β υπομονάδας της πρωτεΐνης G και της SNF1 κινάσης κατά την αλληλεπίδραση του μύκητα *Verticillium dahliae* με το φυτό - ξενιστή

Τζίμα Α.¹, Παπλωματάς Ε.Ι.¹, Τσιτσιγιάννης Δ.Ι.¹ και Kang S.²

¹ Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιερά Οδός 75, 11855 Αθήνα, Ελλάδα

² Department of Plant Pathology, The Pennsylvania State University, University Park, PA 16802, USA

Η μελέτη γονιδίων παθογένειας σε φυτοπαθογόνους μύκητες έχει αποκτήσει ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Στην παρούσα μελέτη, διερευνήθηκε ο ρόλος του γονιδίου της β υπομονάδας της πρωτεΐνης G και του γονιδίου *SNF1* στον μύκητα αδρομύκωσης, *Verticillium dahliae*. Απενεργοποίηση καθενός από τα γονίδια προκάλεσε δραστική μείωση της παθογένειας των μεταλλαγμένων στελεχών σε αντιπροσωπευτικούς ξενιστές. Ωστόσο, σε μικροσκοπική παρατήρηση αρχικών σταδίων μόλυνσης ένα *VGB* μεταλλαγμένο στέλεχος, σημειασμένο με dsRed (κόκκινη φθορίζουσα πρωτεΐνη) παρουσίασε αυξημένη βλαστικότητα και μυκηλιακή ανάπτυξη συγκριτικά με άγριο *gfp* (πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη) στέλεχος. Αντίθετα ένα *VdSNF1* μεταλλαγμένο στέλεχος σημειασμένο με *gfp* παρουσίασε μειωμένη αρχική αποίκηση. Ωστόσο, τόσο *VGB* όσο και *VdSNF1* μεταλλαγμένα στελέχη παρουσίασαν μείωση δυνατότητας αποίκησης σε μεταγενέστερα στάδια. Επιπλέον, απενεργοποίηση του γονιδίου *VGB* προκάλεσε επαγωγή σχηματισμού μικροσκληρωτίων, αύξηση της κονιδιοποίησης και μείωση στην παραγωγή αιθυλενίου. Αυξημένη κονιδιοποίηση παρατηρήθηκε επίσης στα *VdSNF1* στελέχη, ωστόσο η παραγωγή μικροσκληρωτίων παρουσίασε μικρή μείωση. Η ανάπτυξη των *VdSNF1* στελεχών ήταν σημαντικά μειωμένη σε πηκτίνη και γαλακτόζη, ενώ σε γλυκόζη, σακχαρόζη και ξυλόζη ήταν παρόμοια με το άγριο στέλεχος. Αυτό πιθανόν οφείλεται στην μειωμένη έκφραση ενζύμων αποδόμησης κυτταρικού τοιχώματος στα *VdSNF1* στελέχη τόσο σε υλικό που περιείχε πηκτίνη, αλλά και σε υλικό προσομοίωσης αγγειακού υγρού. Σε *VGB* στελέχη, διαφορές στον φαινότυπο συσχετίστηκαν με διαφορές στην έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στη μετάδοση σήματος και την ανάπτυξη του *V. dahliae*. Τα αποτελέσματα της εργασίας προτείνουν ένα θεμελιώδη ρόλο των γονιδίων *VGB* και *VdSNF1* στην παθογένεια του *V. dahliae*. Είναι σημαντικό να καθοριστούν γονίδια που δρουν σε μεταγενέστερα στάδια αυτών των μονοπατιών και καθορίζουν την μείωση στην παθογένεια.

4.9 Roles of the G protein β subunit and *SNF1* in the interaction of *Verticillium dahliae* with the host plant

Tzima A.¹, Paplomatas E.J.¹, Tsitsigiannis D.I.¹ and Kang S.²

¹ Laboratory of Plant Pathology, Agricultural University of Athens, 75 Iera Odos, 11855 Athens, Greece

² Department of Plant Pathology, The Pennsylvania State University, University Park, PA 16802, USA

The study of pathogenicity genes in plant pathogenic fungi has gained increased attention. In the present study, the role of the G protein β subunit (*VGB*) and the *SNF1* gene (*VdSNF1*) was investigated in the vascular wilt fungus *Verticillium dahliae*. Disruption of either gene resulted in drastic decrease in virulence on representative hosts. Nevertheless, during microscopic observation of early infection behavior, a dsRed labeled *VGB* mutant germinated faster and showed increased hyphal elongation compared to a *gfp*-labeled wild type strain. In contrast, a *gfp*-labeled *VdSNF1* mutant showed that it was defective in initial colonization. Despite these differences, both *VGB* and *VdSNF1* mutants were impaired in later stages of vascular colonization. Moreover, disruption of the *VGB* gene caused induction of microsclerotia production, increase in conidiation and decrease in ethylene production. Increased conidiation was also observed in *VdSNF1* mutants' while microsclerotia formation was slightly reduced. Growth of *VdSNF1* mutants on pectin and galactose was significantly reduced while on glucose, sucrose and xylose they grew similar to wild type and ectopic strains. This can be explained by reduced expression of CWDEs that was observed in *VdSNF1* mutants both in pectin containing medium and in simulated xylem fluid medium. Phenotypical changes observed in *70ΔGb15* also correlated with transcriptional changes in several genes involved in signaling and development of *V. dahliae*. The findings of the present work suggest an essential role of both *VGB* and *VdSNF1* in virulence of *V. dahliae*. It will be important to elucidate signaling and downstream molecules of these pathogenicity genes.

Keywords: Plant pathogenic fungi, signaling, cell wall degrading enzymes, catabolite repression

**5. ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ ΩΣ ΜΟΝΤΕΛΑ
ΒΑΣΙΚΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ**

**5. MODEL MICROORGANISMS
IN BASIC RESEARCH**

5.1 Η tRNA συνοδός πρωτεΐνη La (Lupus antigen) από τον μυξομήκητα *Dictyostelium discoideum* έχει κοινά βιοχημικά χαρακτηριστικά με την ομόλογη πρωτεΐνη από τον άνθρωπο

Αποστολίδη Μ., Τουμπέκη Χ., Δραΐνας Δ. και Σταθόπουλος Κ.

Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πατρών

Η πρωτεΐνη La (Lupus antigen) συμμετέχει ενεργά στην βιογένεση των μικρών μορίων RNA, συμπεριλαμβανομένου της δέσμευσης και της προστασίας της 3' ακόλουθης αλληλουχίας των πρόδρομων μορίων tRNA. Στον άνθρωπο, έχει περιγραφεί ως αυτοαντιγόνο στον ορό ασθενών που πάσχουν από συστηματικό ερυθηματώδη λύκο (systemic lupus erythematosus) και σύνδρομο Sjögren. Επιπλέον, είναι γνωστό ότι διευκολύνει την RNase P στην απομάκρυνση της 5' οδηγού αλληλουχίας *in vivo*. Στην παρούσα μελέτη, πραγματοποιήθηκε μοριακή κλωνοποίηση, υπερέκφραση και βιοχημικός χαρακτηρισμός της πρωτεΐνης La (40.3 kDa) από το μυξομήκητα *D. discoideum*. *In silico* ανάλυση της τριτοταγούς δομής της πρωτεΐνης, έδειξε ότι περιλαμβάνει μοτίβα χαρακτηριστικά για πρόδεση RNA με υψηλή συντήρηση στο N-τελικό της άκρο. *In vitro* μελέτες έδειξαν ότι η πρωτεΐνη La μπορεί να δεσμεύσει με μεγάλη συγγένεια πρόδρομα μόρια tRNA (Kd: 4 ± 1 nM) χωρίς την παρουσία του χαρακτηριστικού 3'UUU-OH μοτίβου, το οποίο φαίνεται να είναι απαραίτητο για La πρωτεΐνες από άλλους οργανισμούς (*S. pombe*, *S. cerevisiae*), αλλά όχι και για την ανθρώπινη La πρωτεΐνη. Η προσθήκη αυξανόμενων συγκεντρώσεων ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης La αναστέλλει ελάχιστα την ωρίμανση του tRNA από την ομόλογη RNase P. Η φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης La σε συγκεκριμένα αμινοξέα δεν έδειξε ενίσχυση της συγγένειας της ως προς το υπόστρωμα, όπως συμβαίνει και για την ανθρώπινη πρωτεΐνη. Τέλος, πραγματοποιήθηκαν *in vitro* μελέτες, παρουσία της πρωτεΐνης La σε μια προσπάθεια σωστής αναδίπλωσης της RNA υπομονάδας της RNase P από τον ίδιο οργανισμό, χωρίς όμως να ανακτηθεί η δραστηριότητα του ριβοενζύμου. Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδεικνύουν την ομοιότητα που παρουσιάζει η πρωτεΐνη La του *D. discoideum* με την ομόλογη ανθρώπινη πρωτεΐνη και να δίνουν το έναυσμα για περαιτέρω μελέτη προκειμένου να αποσαφηνιστεί ο ακριβής ρόλος της στην πυροδότηση της ανοσολογικής απόκρισης.

Λέξεις-κλειδιά: tRNA, Lupus antigen, autoimmunity.

5.1 The tRNA-chaperone La protein (Lupus antigen) from the slime mold *Dictyostelium discoideum* exhibits common biochemical features with the homologous human protein

Apostolidi M., Toumpeki C., Drinas D. and Stathopoulos C.

Department of Biochemistry, School of Medicine, University of Patras

The La protein (Lupus antigen) is an essential RNA chaperone, involved in the biogenesis of small RNA molecules, including the binding and protection of the 3' trailer sequence of the precursor tRNAs. In human, it was described as an autoantigen recognized by antibodies present in serum of patients suffering from systemic lupus erythematosus and Sjögren syndrome. In the present study, we cloned, overexpressed and biochemically characterized the La protein from *D. discoideum* (40.3 kDa). *In silico* analysis of the putative tertiary structure of La showed that includes highly conserved characteristic RNA binding motifs at the N-terminal site. *In vitro* assays showed that La protein can bind with high affinity to its pre-tRNA substrates (Kd: 4 ± 1 nM) without requiring the presence of the 3'UUU-OH motif in tRNAs, which although necessary for La recognition from other organisms (*S. pombe*, *S. cerevisiae*), is not essential for the homologous human protein. Moreover, the ability the RNA subunit of RNase P to fold properly and exhibit ribozyme activity in presence of La was examined. However, under various conditions tested, the presence of La didn't support ribozyme activity. Increasing concentrations of recombinant La slightly inhibit the tRNA maturation by homologous RNase P. Finally, phosphorylation of La protein in specific amino acids didn't result to enhanced affinity to the substrate. Our data indicate that *D. discoideum* La protein shares common features with its human counterpart and could be used for further studies on its origin and its exact role in autoimmune response initiation in human.

Keywords: tRNA, Lupus antigen, autoimmunity.

5.2 Το αμινοτελικό άκρο του μεταφορέα ουρικού/ξανθίνης UapA εμπεριέχει μοτίβο που ρυθμίζει την υποκυτταρική διακίνηση και την λειτουργία του

Γιαλελής Β., Διαλλινάς Γ. και Αμίλλης Σ.

Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών/ Τμήμα Βιολογίας, Αθήνα

Ο νηματοειδής μύκητας *Aspergillus nidulans* αποτελεί οργανισμό μοντέλο με εξαιρετικές δυνατότητες όσον αφορά στη μελέτη της ενδοκυτταρικής διακίνησης και ενδοκύτωσης διαμεμβρανικών πολυτοπικών πρωτεϊνών, όπως οι μεταφορείς μεταβολιτών και τα κανάλια ιόντων. Ιδιαίτερα ρόλο στη στόχευση των πρωτεϊνών αυτών κατέχουν τα μη-διαμεμβρανικά υδρόφιλα άκρα τους. Εντός αυτών, συντηρημένα μοτίβα διαλογής (DXD/E, FF, YY, LL, FY και YXXØ, όπου Ø υδρόφοβο αμινοξύ) αλληλεπιδρούν δυναμικά με πρωτεϊνικούς παράγοντες του ενδοπλασματικού δικτύου (ΕΔ) και του Golgi, αλλά και υδρόφιλα σύμπλοκα (COPII), για να κατευθύνουν τη σωστή στόχευση των πρωτεϊνών αυτών στη πλασματική μεμβράνη. Στην εργασία αυτή παρουσιάζουμε τη συστηματική ανάλυση του αμινοτελικού άκρου του μεταφορέα ουρικού/ξανθίνης UapA, ενός από τους πιο εκτεταμένα μελετημένους μεταφορείς σε ευκαρυωτικά κύτταρα, μέσω στοχευόμενης μεταλλαξιγένεσης και λεπτομερούς λειτουργικής ανάλυσης των μεταλλαγμένων στελεχών. Βρέθηκε ότι το μοτίβο G⁴⁰LIGDYDY⁴⁷, συντηρημένο σε όλα τα ομόλογα UapA μυκήτων και ειδικά η Tyr47, είναι απαραίτητα τόσο για τη στόχευση του UapA, όσο και για την κατάλυση της μεταφοράς των υποστρωμάτων του. Ωστόσο, η έλλειψη λειτουργικότητας σε μεταλλάγματα που εμπεριέχουν την αντικατάσταση Y47A δεν φαίνεται να οφείλεται στην ικανότητα δέσμευσης αυτής καθαρής των υποστρωμάτων. Κατασταλτικές μεταλλαγές που επαναφέρουν τη λειτουργία του UapA στο στέλεχος Y47A χαρτογραφήθηκαν στο έβδομο και το εντέκατο διαμεμβρανικό τμήμα της πρωτεΐνης. Τα αποτελέσματα μας οδηγούν στην υπόθεση ότι το μοτίβο G⁴⁰LIGDYDY⁴⁷, κυρίως μέσω του αρωματικού δακτυλίου της Y47, στρατολογεί έναν άγνωστο παράγοντα/μηχανισμό, ο οποίος προκαλεί αλλοστερικές αλλαγές στη δομή του UapA, απαραίτητες τόσο για την έξοδο του από το ΕΔ, όσο και για την σταθεροποίηση και λειτουργία του στην πλασματική μεμβράνη. Σχετική εργασία που παρουσιάζεται στο συνέδριο (Καραχάλιου & Διαλλινάς) προτείνει ότι αλλοστερικές διαμορφώσεις του UapA μέσω του αμινοτελικού άκρου οδηγούν στον ολιγομερισμό και την δομική διευθέτηση του μεταφορέα, μηχανισμό απαραίτητο για την στόχευση και λειτουργία του στην πλασματική μεμβράνη.

Λέξεις-κλειδιά: νηματοειδής μύκητας *A. nidulans*, στόχευση μεμβρανικών πρωτεϊνών, απομόνωση κατασταλτικών μεταλλαγών

5.2 The amino terminal region of the uric/xanthine permease UapA contains regulatory motif for its sub-cellular trafficking and function

Yialelis V., Diallinas G. and Amillis S.

National and Kapodistrian University of Athens, Faculty of Biology, Athens 15781, e-mail: diallina@biol.uoa.gr

Aspergillus nidulans is a fungal model system of excellent potentiality for studying trafficking and endocytosis of metabolite transporters or ion channels. The cytoplasmically located hydrophilic ends of these polytopic transmembrane proteins include conserved motifs, such as DXD/E, FF, YY, LL, FY and YXXØ (where Ø hydrophobic residue), which dynamically interact with ER and Golgi chaperones and hydrophilic complexes (COPII) to control proper targeting in the plasma membrane. In this work we present a systematic mutational analysis of the amino terminal region of uric acid/xanthine permease UapA, one of the most studied transporters in eukaryotic cells. This approach recognized a motif, G⁴⁰LIGDYDY⁴⁷, conserved in all fungal UapA-like transporters, as necessary for proper targeting in plasma membrane and transport activity. Within this motif, Tyr47 plays a major functional role. We subsequently obtained second-site suppressors of mutant Y47A, mapping in transmembrane segments 7 and 11, which restored the function of UapA. These results suggest that the G⁴⁰LIGDYDY⁴⁷ motif, mainly through the aromaticity of Y47, recruits/activates an unknown factor/mechanism, that elicits allosteric changes on the UapA structure, which are necessary for ER-exit and UapA-mediated transport. A relevant work presented in this conference (Karachaliou & Diallinas) suggests that the allosteric changes triggered through the N terminus might be necessary for UapA oligomerization and that this oligomerization is essential for proper UapA targeting and function in the plasma membrane.

Keywords: filamentous fungus *A. nidulans*, membrane protein targeting, second site suppressors

5.3 Μοριακή και βιοχημική ανάλυση της αλληλεπίδρασης δύο μελών της FKBP οικογένειας πρωτεϊνών του *Azotobacter vinelandii* με τη μικρή υπομονάδα της συνθετάσης του καρβάμυλο-φωσφορικού οξέος

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

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

Οι πρωτεΐνες που δεσμεύουν το FK-506 (FKBPs), ανήκουν στην υπεροικογένεια των πεπτιδυλ-πρόλυλ cis/trans ισομερασών (EC: 5.2.1.8) και καταλύουν την cis/trans ισομερίωση των πεπτιδυλ-πρόλυλ δεσμών ενώ μπορούν να συμβάλουν και στο σωστό δίπλωμα πολυπεπτιδίων. Στην παρούσα εργασία περιγράφεται ο βιοχημικός χαρακτηρισμός δύο ανασυνδυασμένων FKBP, των AvFKBA1 και AvFKBA2, από το αζωτοδεσμευτικό βακτήριο *Azotobacter vinelandii* και εξετάζεται η φυσική τους αλληλεπίδραση με τη μικρή υπομονάδα της συνθετάσης του καρβάμυλο-φωσφορικού οξέος, *AvcarA*, in vivo. Με χρήση ποσοτικού RT-PCR πραγματικού χρόνου, προκύπτει πως στις ίδιες συνθήκες ανάπτυξης, τα *AvfkbA1* και *AvfkbA2* γονίδια συνεκφράζονται με το *AvcarA* γονίδιο. Επιπλέον, η ενεργότητα πεπτιδυλ-πρόλυλ cis/trans ισομεράσης των AvFKBA1 και AvFKBA2 μειώνεται παρουσία της *AvcarA*, γεγονός που επιβεβαιώνει την κάθε αλληλεπίδραση. Όμως, η ενεργότητα πεπτιδυλ-πρόλυλ cis/trans ισομεράσης δεν είναι απαραίτητη για τις αλληλεπιδράσεις καθώς αυτές διατηρούνται και κατόπιν σημειακών μεταλλάξεων στο ενεργό κέντρο των δύο FKBP. Η P³⁵⁸ της *AvcarA*, η οποία πιθανόν διαθέτει cis διαμόρφωση, είναι σημαντική μόνο για την αλληλεπίδραση της *AvcarA* με την AvFKBA2. Η παρουσία καμίας από τις δύο FKBP δεν επηρέασε την ενεργότητα υδρόλυσης της γλουταμίνης της *AvcarA*. Συμπερασματικά, τα παραπάνω αποτελέσματα υποδηλώνουν πως οι δύο FKBP αν και διαθέτουν ένα κοινό βιολογικό υπόστρωμα πιθανώς διαδραματίζουν διαφορετικούς φυσιολογικούς ρόλους.

5.3 Molecular and biochemical analysis of the interaction between two *Azotobacter vinelandii* FKBP and the small subunit of carbamoyl phosphate synthetase

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

Department of Agricultural Biotechnology, Agricultural University of Athens, Iera Odos 75, 11855, Votanikos, Athens, Greece

FK-506 binding proteins (FKBPs) belong to peptidyl-prolyl cis/trans isomerase superfamily (PPIases, EC: 5.2.1.8) which catalyze the interconversion of peptidyl-prolyl bonds while they can also act on polypeptides, as folding helper enzymes. Here, we biochemically characterize two recombinant FKBP from the soil nitrogen-fixing bacterium *Azotobacter vinelandii*, and demonstrate their *in vivo* physical interaction with *AvcarA*, the small subunit of carbamoyl phosphate synthetase. Using RT-qPCR, we show that *AvfkbA1* and *AvfkbA2* are co-expressed with *AvcarA* under the same growth conditions while a decrease in *AvFKBA1* or *AvFKBA2* PPIase activity, in the presence of *AvcarA*, further confirms each interaction. However, PPIase activity seems not to be essential for these interactions since PPIase active site mutants of both FKBP do not abolish the *AvcarA* binding. Pro³⁵⁸ of *AvcarA*, possibly retaining a *cis* configuration, is critical only for the interaction with *AvfkbA2*. The presence of either of the two FKBP did not influence the measured glutamine hydrolyzing activity of *AvcarA*. Taken together, these data indicate that although the two FKBP have a common biological substrate they probably have differing physiological roles.

Keywords: *Azotobacter vinelandii*, carbamoyl phosphate synthetase, peptidyl-prolyl cis/trans isomerase

5.4 Ολιγομερισμός του μεταφορέα UapA και ο ρόλος του στην ενδοκυτταρική διακίνηση και λειτουργία του στον *Aspergillus nidulans*

Καραγάλιου Μ. και Διαλλινάς Γ.

Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Βιολογίας, Αθήνα

Ο μεταφορέας ουρικού/ξανθίνης UapA του οργανισμού-μοντέλου *Aspergillus nidulans* έχει χρησιμοποιηθεί σαν πρότυπο πρωτεϊνικό φορτίο για τη μελέτη της ενδοκυτταρικής διακίνησης και της ενδοκύτωσης. Παρουσία υποστρώματων ο UapA ενδοκυτώνεται από την κυτταρική μεμβράνη και στοχεύεται στο μονοπάτι καταστροφής MVB/χυμοτοπίου. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι μέσω αυτού του μονοπατιού μπορούν να ενδοκυτωθούν μόνο λειτουργικά μόρια UapA. Παρ'όλα αυτά, η ταυτόχρονη έκφραση ενεργών και μη λειτουργικών μορίων οδηγεί στην ενδοκύτωση των τελευταίων. Το φαινόμενο αυτό, που καλείται *in trans* ενδοκύτωση, μας ώθησε να μελετήσουμε αν ο UapA ολιγομερίζεται. Εδώ δείχνουμε για πρώτη φορά, ότι μόρια UapA που δεν ενδοκυτώνονται λόγω απουσίας ουβικουιτινώσεως, μπορούν να ενδοκυτωθούν *in trans* παρουσία λειτουργικών μορίων. Αντίστοιχα, παρατηρήθηκε μείωση της πρόσληψης ραδιενεργού υποστρώματος από UapA αγρίου τύπου, όταν αυτοί συνεκφράστηκαν με μη λειτουργικά μόρια του μεταφορέα, υποστηρίζοντας έτσι την ιδέα του ολιγομερισμού. Ο ολιγομερισμός του UapA ενισχύθηκε περαιτέρω με τη χρήση της μεθόδου διμοριακής ανασύστασης φθορισμού (BiFC). Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ανασύσταση της κίτρινης φθορίζουσας πρωτεΐνης (YFP), η οποία εντοπίστηκε στην πλασματική μεμβράνη. Τα μόρια UapA που συμμετείχαν στην ανασύσταση παρουσίασαν αδυναμία ενδοκύτωσης από υποστρώματα, παρόλο που ενδοκυτώνονταν κανονικά από αμμωνία. Αντίθετα, μεταλλαγμένες μορφές του UapA στις οποίες παρεμποδίζεται η έξοδος από το ενδοπλασματικό δίκτυο δεν προκάλεσαν ανασύσταση της YFP, παρά μόνο όταν αυτές συνεκφράζονταν με UapA αγρίου τύπου. Οι παρατηρήσεις αυτές υποδεικνύουν το ρόλο του ολιγομερισμού στην ομαλή ενδοκυτταρική διακίνηση και τη σταθεροποίηση του UapA στην πλασματική μεμβράνη, όπως έχει δείχθει για νευροδιαβιβαστές και άλλους μεταφορείς θηλαστικών. Μια άλλη εργασία που παρουσιάζεται στο συνέδριο αυτό προτείνει ότι ο ολιγομερισμός ρυθμίζεται από έναν αλλοστερικό μηχανισμό, ο οποίος προωθείται από ένα αμινοτελικό κυτταροπλασματικό μοτίβο.

Λέξεις-κλειδιά: Στόχευση, ενδοκύτωση, ανασύσταση φθορισμού, νηματοειδής μύκητας

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

5.4 Oligomerization of the UapA transporter and its role in function and trafficking in *Aspergillus nidulans*

Karachaliou M. and Diallinas G.

National and Kapodistrian University of Athens / Faculty of Biology, Athens

The uric acid/xanthine transporter UapA of the model fungus *Aspergillus nidulans* has been used as a prototype cargo to study membrane trafficking and endocytosis. In the presence of substrates UapA is internalised from the PM and sorted into the MVB/vacuolar pathway. Interestingly, this endocytic pathway operates only for functional UapA molecules. However, we have shown that turnover of inactive UapA occurs in the simultaneous expression of active molecules. This phenomenon, called *in trans*-endocytosis, prompted us to investigate whether UapA oligomerizes. Here, we first show that substrate-elicited endocytosis of a UapA version that cannot be endocytosed due to inadequate ubiquitination can occur *in trans*, if expressed in the simultaneous presence of functional UapA. Accordingly, we observed a decrease of UapA-mediated substrate uptake, when co-expressed with inactive versions, supporting the idea oligomerization. UapA oligomerization was further supported using a bimolecular fluorescence complementation assay. In particular, UapA molecules reconstituted split YFP at the PM, but showed lack of substrate-triggered turnover, despite being normally endocytosed in the presence of ammonium. In contrast, UapA mutant versions incapable of ER-exit did not show evidence of oligomerization, whereas reconstituted YFP was observed at the PM, when mutant and wild type versions were co-expressed. These observations suggest a role of the oligomerization in proper trafficking and stable localization of UapA in the PM, as it has previously been shown for neurotransmitter or other mammalian transporters. A relevant work presented in this congress suggests that oligomerization might be regulated by an allosteric mechanism promoted by an N-terminal cytoplasmic motif.

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

5.5 Ο ρόλος του διαμεμβρανικού τμήματος TM3 στον μεταφορά ξανθίνης XanQ της *E. coli*

Καρενά Α., και Φριλίγγος Ε.

Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων Ιατρική Σχολή

Οι μεταφορείς πουρινών της οικογένειας NAT/NCS2 έχουν ευρεία διάδοση και υψηλό βαθμό εξελικτικής συντήρησης. Για τη μελέτη σχέσεων δομής-λειτουργίας στην οικογένεια αυτή, χρησιμοποιούμε μεταλλαξιγένεση κυστεϊνικής σάρωσης του μεταφορέα ξανθίνης XanQ της *E. coli*. Η ανάλυση μεταλλαξιγένεσης της αλληλουχίας 79-107 που αντιστοιχεί στο διαμεμβρανικό τμήμα 3 (TM3) του μορίου ανέδειξε τις πιο σημαντικές θέσεις σε δύο συντηρημένες περιοχές-μοτίβα, τις ⁸³GxGLx⁸⁷ (στην αρχή του TM3, που προβλέπεται ότι αντιστοιχεί σε μια περιοχή ελεύθερης διαμόρφωσης) και ⁹³NFx⁹⁵ (στο μέσο του TM3 που αντιστοιχεί στην αρχή μιας α-ελικοειδούς διαμόρφωσης). Το μοτίβο NFx περιέχει την Asn-93 που είναι καθοριστική για την αναγνώριση του υποστρώματος (ξανθίνη) με υψηλή συγγένεια και την εξειδίκευση ως προς το μιδαζολικό τμήμα του δακτυλίου (καθώς οι αλλαγές N93A και N93S επιτρέπουν αναγνώριση 8-μεθυλοξανθίνης και πρόσληψη ουρικού οξέος, ενώ η N93T καταστρέφει την συγγένεια πρόσδεσης για όλα σχεδόν τα ανάλογα ξανθίνης), και την Phe-94 που είναι σημαντική για την αναγνώριση αναλόγων στο πυριμιδινικό τμήμα του δακτυλίου (καθώς οι αλλαγές F94Y και F94I παρεμποδίζουν την αναγνώριση 2-θειο, 6-θειο και/ή 3-μεθυλοξανθίνης). Το μοτίβο GxGLx περιέχει την Gly-83 που είναι αναντικατάστατη ως προς τη δυνατότητα έκφρασης του μεταφορέα στη μεμβράνη (G83A, G83P ή G83C δίνουν μη ανιχνεύσιμα επίπεδα πρωτεΐνης) και την Leu-86 όπου η αντικατάσταση με Cys οδηγεί σε έναν ενεργό μεταφορέα που είναι ευαίσθητος σε απενεργοποίηση από το αντιδραστικό *N*-αιθυλμηλεϊμίδιο (IC₅₀ 25 μM). Με βάση και το πρόσφατα δημοσιευμένο μοντέλο κρυσταλλικής δομής του ομόλογου μεταφορέα ουρακίλης UraA, θεωρούμε ότι (α) το μοτίβο GxGLx βρίσκεται μακριά από το ενεργό κέντρο αλλά είναι σημαντικό για τη διατήρηση της δομής και των αλλαγών διαμόρφωσης που χρειάζονται για τη λειτουργία του, (β) το μοτίβο NFx βρίσκεται στην περιοχή του ενεργού κέντρου και η Asn-93 συμμετέχει σε άμεσες αλληλεπιδράσεις με το υπόστρωμα ή με το αναντικατάστατο Glu-272 (TM8) το οποίο δεσμεύει το υπόστρωμα.

Λέξεις-κλειδιά: πουρίνες, ενεργός μεταφορά, εξειδίκευση

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

5.5 The role of transmembrane segment TM3 in the xanthine transporter XanQ of *E. coli*

Karena E., and S. Frillingos S.

Laboratory of Biological Chemistry, University of Ioannina Medical School

Purine transporters of the NAT/NCS2 family are widespread and highly conserved in evolution. To study structure-function relationships in this family, we have employed Cys-scanning mutagenesis of XanQ, the major xanthine transporter of *E. coli*. Systematic site-directed mutagenesis of the sequence 79-107 including transmembrane segment TM3 showed that important positions cluster at two conserved sequence motifs, namely GxGLx (at the unwound cytoplasmic end) and NFx (at the middle of TM3). The NFx motif has Asn-93 which is essential for substrate recognition and specificity with respect to the imidazole moiety of xanthine (N93A and N93S allow recognition of 8-methylxanthine and uptake of uric acid, while N93T disrupts binding affinity for any analogue) and Phe-94 which is important for the recognition of the pyrimidine moiety (F94Y and F94I preclude recognition of 2-thio, 6-thio and/or 3-methylxanthine). The GxGLx motif has Gly-83 which is irreplaceable for the permease expression in the membrane (G83A, G83P or G83C yields negligible expression levels) and Leu-86 where a Cys replacement is sensitive to inactivation by *N*-ethylmaleimide (IC₅₀ 25 μM). In conjunction with homology modeling on the recently described x-ray structure of the uracil transporter UraA, the results suggest that (a) GxGLx is far from the binding site but is crucial for its structure and the conformational changes of the alternating access mechanism, (b) NFx is at the binding site and Asn-93 may participate directly in binding or interact with the irreplaceable substrate-binding Glu-272 (TM8).

Λέξεις-κλειδιά: purines, active transport, specificity

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

5.6 Διαφορική μεταγραφική ρύθμιση των δύο πιθανών συνθεσών των κυκλοπροπανοϊκών λιπαρών οξέων στο αλόφιλο βακτήριο *C. salexigens*

Κατσιφά Α.^{1,3}, Salvador M.³, Παραπούλη Μ.¹, Λαμπρακοπούλου Γ.², Argandoña Μ.³, Αφένδρα Α.-Σ.², Vargas C.³, Δραΐνας Κ.^{1†}, Nieto J.³ και Κούκκου Α.Ε.¹

¹ Εργαστήριο Βιοχημείας, Τμήμα Χημείας, ² Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, ³ Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Pharmacy, University of Seville, Spain

Το *Chromohalobacter salexigens* είναι ένα αλόφιλο βακτήριο με δυνατότητα ανάπτυξης σε ένα μεγάλο εύρος συγκεντρώσεων άλατος. Οι δύο κύριοι μηχανισμοί οσμωρύθμισης είναι η σύνθεση συμβατών διαλυτών ουσιών (εκτοΐνη και υδροξυ-εκτοΐνη) και η τροποποίηση της μεμβρανικής λιπιδιακής σύστασης. Η έκφραση των γονιδίων βιοσύνθεσης της εκτοΐνης εξαρτάται από το γενικό παράγοντα στρες σ^S . Σε προηγούμενη εργασία παρατηρήσαμε αύξηση του ποσοστού των κυκλοπροπανοϊκών λιπαρών οξέων (CFA) στα φωσφολιπίδια της μεμβράνης του *C. salexigens* ως απόκριση στην αυξημένη αλατότητα. Η σύνθεση των CFA καταλύεται από το ένζυμο συνθετάση των CFA. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η μεταγραφική ρύθμιση της σύνθεσης των CFA στο *C. salexigens*. Δύο πιθανά ομόλογα γονίδια (*cfal*, *cf2*) εντοπίστηκαν στο γονιδίωμα του *C. salexigens*. Η ανάλυση της τοπολογίας των δύο πρωτεϊνών CFA έδειξε κυτταροπλασματική εντόπιση, ενώ η πιθανή δομή τους ανέδειξε και στις δύο περιοχές μεθυλοτρανσφερασών και συνθεσών των CFA. Φυλογενετικά κατατάσσονται σε σύμπλεγμα με άλλες γνωστές συνθετάσες των CFA. Πρώτον, ερευνήσαμε το ρόλο της φάσης ανάπτυξης στην έκφραση των δύο προαγωγών των γονιδίων *cfal* στο φυσικό τύπο σε διαφορετικές συγκεντρώσεις άλατος. Οι δραστηρότητες των *Pcfal* και *Pcf2* εμφάνισαν τη μέγιστη τιμή τους στο τέλος της εκθετικής ή στην αρχή της στατικής φάσης ανάπτυξης. Δεύτερον, μελετήσαμε την εμπλοκή του σ^S στη μεταγραφική ρύθμιση των *cfal*. Για το σκοπό αυτό, προσδιορίσαμε την έκφραση των *Pcfal* και *Pcf2* στο *rpoS* στέλεχος CHR196 του *C. salexigens*, το οποίο είναι ελλειμματικό στον σ^S και τη συγκρίναμε με την αντίστοιχη του φυσικού τύπου σε διαφορετικές αλατότητες απουσία και παρουσία εξογενούς εκτοΐνης. Σε απόλυτη τιμή, η έκφραση του *Pcfal* ήταν υψηλότερη από την έκφραση του *Pcf2* σε οποιαδήποτε συγκέντρωση άλατος. Η δραστηρότητα του *Pcfal* στο CHR196 ήταν αυξημένη συγκριτικά με την αντίστοιχη στο φυσικό τύπο σε όλες τις συγκεντρώσεις άλατος και ειδικά στην υψηλή αλατότητα (2.5 φορές υψηλότερη), ενώ του *Pcf2* στο CHR196 ήταν χαμηλότερη από του φυσικού τύπου, ιδιαίτερα στην υψηλή συγκέντρωση άλατος. Συνεπώς φαίνεται ότι σε συνθήκες υψηλής αλατότητας, ο σ^S εμπλέκεται στην αρνητική- και θετική- μεταγραφική ρύθμιση των *cfal* και *cf2*, αντίστοιχα. Σε εξέλιξη βρίσκονται η κατασκευή και ο χαρακτηρισμός μεταλλαγμένων στελεχών (*cfal*⁻ και *cf2*⁻) του *C. salexigens*.

† Αφιερώνεται στη μνήμη του καθηγητή Κωνσταντίνου Δραΐνα

5.6 Differential transcriptional regulation of the two putative cyclopropanic fatty acid synthases of the halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens*

Katsifa A.^{1,3}, Salvador M.³, Parapouli M.¹, Lamprakopoulou G.², Argandoña M.³, Afendra A.-S.², Vargas C.³, Drains C.^{1†}, Nieto J.³ and Koukkou A.I.¹

¹ Laboratory of Biochemistry, Department of Chemistry, ² Department of Biological Applications and Technology, University of Ioannina, 45110 Ioannina, Greece, ³ Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Pharmacy, University of Seville, 41012 Seville, Spain

Chromohalobacter salexigens is a halophilic bacterium with an extremely broad salinity range of growth. Its two main osmoadaptation mechanisms are the synthesis of compatible solutes (ectoine and hydroxyectoine) and the adaptation of membrane composition. Expression of the ectoine synthesis genes is partially dependent on the general stress factor σ^S . In a previous work, we showed that under high salinity conditions, *C. salexigens* membrane lipids contained a higher percentage of cyclopropanic fatty acids (CFA), whose synthesis is catalysed by the enzyme CFA synthase. In this work, we investigated the transcriptional regulation of CFA synthesis in *C. salexigens*. Two putative *cfal* gene homologues (*cfal*, *cf2*) were found within the *C. salexigens* genome sequence. *In silico* analysis of the two CFA proteins' topology revealed that both are cytosolic. Domain analysis showed methyl-transferase and CFA domains in both proteins, and phylogenetic analysis clustered Cfa1 and Cfa2 with known CFA synthases. First, we investigated the influence of growth phase in the expression of both *cfal* promoters in the wild type strain grown at different salinities. Activities of *Pcfal* and *Pcf2* were growth- dependent, and displayed their highest values at late exponential or early stationary phase of growth. Second, we determined whether σ^S is involved in the regulation of *cfal* transcription. For this purpose, we measured *Pcfal* and *Pcf2* expression in the *C. salexigens* *rpoS* strain CHR196, which is deficient in σ^S , and compared it with the wild-type strain at different salinities, in the absence and presence of exogenous ectoine. In absolute values, *Pcfal* expression was higher than *Pcf2* expression at any salinity tested. *Pcfal* activity of CHR196 was found elevated compared to that of the wild-type at all salinities tested, especially at high salt concentration (about 2.5 times higher). On the contrary, *Pcf2* activity of CHR196 was lower than that of the wild-type, especially at high salinity. These findings suggest that, under high salinity conditions, σ^S is involved in the down- and up-regulation of *cfal* and *cf2* transcription, respectively. Work in progress involves the generation and characterization of *cfal* and *cf2* mutants of *C. salexigens*.

Keywords: *Chromohalobacter salexigens*, CFA synthase, osmoregulation

† This work is dedicated to the memory of Prof. Constantin Drains

5.7 Σχέσεις δομής-λειτουργίας του μεταφορέα κυτοσίνης-πουρινών FcyB μέσω ορθολογικής μεταλλαξιγένεσης και τυπολογικής μοντελοποίησης

Κρυπωτού Α.*, Κωστή Β.*, Αμίλλης Σ.*, Μικρός Ε.†, Μυριανθόπουλος Β.†, Διαλλινάς Γ.*

Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, *Τμήμα Βιολογίας, †Τμήμα Φαρμακευτικής

Η οικογένεια Nucleotide Cation Symporters 1 (NCS1) περιλαμβάνει διαμεμβρανικούς μεταφορείς από βακτήρια και μύκητες, οι οποίοι εξειδικεύονται στη πρόσληψη πουρινών-πυριμιδινών (π.χ. αδενίνη, γουανίνη, κυτοσίνη, ουρακίλη) και δομικά όμοιων μεταβολιτών (π.χ. αλλαντοΐνη, υδαντοΐνη, πυριδοξίνη, θειαμίνη). Ο μεταφορέας FcyB του *Aspergillus nidulans*, έχει χαρακτηριστεί σε μοριακό και βιοχημικό επίπεδο στο εργαστήριό μας και έχει προσδιοριστεί το κινητικό του προφίλ ως προς τη συγγένεια πρόσδεσης ($K_{m/i}$), την ταχύτητα μεταφοράς (V) και την εξειδίκευση για διάφορα υποστρώματα και ανάλογα πουρινών-πυριμιδινών (π.χ. 5-φθοροκυτοσίνη) με αντιμυκητιασικές ιδιότητες. Στην παρούσα εργασία προσεγγίζουμε τις σχέσεις δομής-λειτουργίας του FcyB μέσω ορθολογικής στοχευόμενης μεταλλαξιγένεσης αμινοξικών καταλοίπων που είτε συντηρούνται απολύτως στη οικογένεια NCS1, είτε συντηρούνται μερικώς, με βάση την συγκεκριμένη εξειδίκευση των μελών NCS1. Παράλληλα, χρησιμοποιώντας υπολογιστικά προγράμματα κατασκευάσαμε την τρισδιάστατη δομή του FcyB, με βάση την κρυσταλλογραφικά λυμένη δομή του μεταφορέα υδαντοΐνης Mhp1 του *Microbacterium liquefaciens* (μοναδικού μέλους της NCS1 με γνωστή δομή). Έπειτα, ακολούθησε χαρακτηρισμός των μεταλλαγμένων μορφών του FcyB μέσω δοκιμασιών ανάπτυξης και μεταξύ αυτών εντοπίστηκαν φαινότυποι: πλήρους ή μερικής απώλειας λειτουργίας και μερικής αλλαγής εξειδίκευσης. Στη συνέχεια, για τις λειτουργικές πρωτεΐνες ακολούθησε κινητικός χαρακτηρισμός και προσδιορίστηκαν οι σταθερές συγγένειας πρόσδεσης $K_{m/i}$ για υποστρώματα του μεταφορέα. Ο συνδυασμός των παραπάνω αναλύσεων μας επέτρεψε να χαρτογραφήσουμε στο χώρο τα αμινοξέα που είναι σημαντικά για το κέντρο δέσμευσης υποστρωμάτων του μεταφορέα. Τα αποτελέσματα μας υποστηρίζουν την ορθότητα του μοντέλου, ενώ τα επιλεγμένα αμινοξέα φαίνεται να συμμετέχουν άμεσα ή έμμεσα στο κέντρο δέσμευσης του FcyB. Περαιτέρω πειράματα για το χαρακτηρισμό των μεταλλαγμένων μορφών του FcyB απομένουν να πραγματοποιηθούν, σε συνδυασμό με υπολογισμούς πρόσδεσης μοριακής μηχανικής με υπόστρωμα (*docking*) στα σχεδιασμένα μοντέλα, έτσι ώστε να κατανοηθεί περαιτέρω ο μηχανισμός της μεταφορικής του λειτουργίας του FcyB, ενός μεταφορέα που θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως εξειδικευμένη θύρα εισόδου νέων αντιμυκητιασικών φάρμακων.

Λέξεις-κλειδιά: FcyB, σχέσεις δομής-λειτουργίας, in silico τρισδιάστατη δομή

5.7 Structure-function relationships in the cytosine-purine transporter FcyB through rational mutational analysis and structural modeling

Krypotou A.*, Kosti V.*, Amillis S.*, Mikros E.†, Myrianthopoulos V.†, Diallinas G.*

*National and Kapodistrian University of Athens, Faculty of Biology, Athens
†National and Kapodistrian University of Athens, School of Pharmacy, Athens

The family of Nucleotide Cation Symporters 1 (NCS1) includes bacterial and fungal transmembrane transporters specific for the uptake of purines-pyrimidines (e.g. adenine, guanine, cytosine, uracil) and other structurally similar metabolites (e.g. allantoin, hydantoin, pyridoxine, thiamine). The *Aspergillus nidulans* FcyB transporter has been characterized at the molecular and biochemical level in our lab. The kinetic profile of FcyB concerning its binding affinity ($K_{m/i}$), initial uptake rate (V) and specificity for physiological substrates and purine-pyrimidine analogues with antifungal properties (e.g. 5-fluorocytosine) has been determined. In this work we approach FcyB structure-function relationships through a rational mutational analysis of amino acids that are either highly conserved in the NCS1 family, or differentially conserved among the NCS1 members depending on substrate specificity. In parallel, we built the FcyB 3D structure by homology modeling using as a template the crystal structure of the hydantoin transporter Mhp1 of *Microbacterium liquefaciens*, the only NCS1 member with known structure. Characterization of the mutant forms of FcyB by growth tests, epifluorescence microscopic analysis and detailed kinetic studies identified several residues critical for function. Based on the topological model of FcyB, functionally critical residues are located in the putative substrate binding cleft of the transporter, which in turn supports the structural model built. A second round of mutational analysis and docking approaches are currently going on, for further understanding the mechanism of FcyB-mediated transport. Knowledge obtained from these studies can be used as a first step in designing novel, targeted, antifungal drugs taken-up specifically by FcyB-like transporters of pathogenic fungi.

Keywords: FcyB, structure-function relationships, in silico 3D structure

5.8 Από γενετικά δεδομένα σε δομικά μοντέλα και αντίστροφα: Σχέσεις δομής-λειτουργίας του μεταφορέα πουρινών UapA

Κωστή Β.^{*}, Λαμπρινίδης Γ. †, Μυριανθόπουλος Β. †, Διαλλινάς Γ.^{*} & Μικρός Ε.[†]

^{*}Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Βιολογίας, †Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Φαρμακευτικής,

Ο μεταφορέας ξανθίνης-ουρικού οξέος/H⁺ UapA του μύκητα *Aspergillus nidulans* αποτελεί πρότυπο σύστημα μελέτης των σχέσεων δομής-λειτουργίας της οικογένειας μεταφορέων πουρινών-ασκορβικού οξέος (NAT/NCS2). Γενετικά και βιοχημικά δεδομένα μιας δεκαετίας υποδεικνύουν ότι συγκεκριμένα αμινοξέα (E356, Q408, N409) στις διαμεμβρανικές περιοχές 8 και 9 (TMS8-9) αποτελούν στοιχεία του κέντρου πρόσδεσης & μεταφοράς πουρινών, ενώ άλλα στοιχεία, εκτός του πιθανού κέντρου δέσμευσης υποστρωμάτων (TMS1-2, TMS9, TMS10-11 & TMS12) συμμετέχουν στο μηχανισμό εξειδίκευσης για συγκεκριμένα υποστρώματα, υποδεικνύοντας για πρώτη φορά την ύπαρξη εκλεκτικών «θυρών» διαπερατότητας σε μεταφορείς. Στην παρούσα εργασία, χρησιμοποιώντας αλγορίθμους πρόβλεψης διαμόρφωσης πρωτεϊνών, κατασκευάσαμε την τρισδιάστατη δομή του UapA διαμόρφωσης πρωτεϊνών, κατασκευάσαμε την τρισδιάστατη δομή του UapA στηριζόμενοι στην πρόσφατα δημοσιευμένη κρυσταλλογραφική δομή βακτηριακού μεταφορέα ουρακίλης (UraA) και μέλους της οικογένειας NAT/NCS2. Η τρισδιάστατη απεικόνιση του UapA περιλαμβάνει 14 TMSs με κυτταροπλασματικά N- και C- άκρα. Τα σημαντικά για την λειτουργία αμινοξέα E356, Q408 & N409 εντοπίζονται στα TMS8 & TMS10 αντίστοιχα. Επίσης, το προτεινόμενο μοντέλο υποστηρίζει και υποστηρίζεται από νέα γενετικά/βιοχημικά δεδομένα που υποδεικνύουν ότι η H86 στο TMS1 και η S154 στο TMS3 είναι στοιχεία που συμμετέχουν άμεσα στον μηχανισμό μεταφοράς υποστρωμάτων. Βασιζόμενοι στο μοντέλο αυτό πραγματοποιήσαμε υπολογισμούς πρόσδεσης μοριακής μηχανικής με υπόστρωμα την ξανθίνη (*docking*). Τα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν τη συμμετοχή των E356 & Q408 στο μηχανισμό πρόσληψης των υποστρωμάτων καθώς φαίνεται να αλληλεπιδρούν άμεσα με την ξανθίνη. Άλλα αμινοξέα, εκλεκτικής πρόσληψης υποστρωμάτων (T526, F528), εντοπίζονται στην αρχή του TMS14. Η περιοχή αυτή φαίνεται να διαθέτει μεγάλη πλαστικότητα και δυνατότητα απόκρυψης/αποκάλυψης του σημείου εισόδου των υποστρωμάτων, υποστηρίζοντας την ύπαρξη εκλεκτικών θυρών. Τέλος, μελετήθηκε ο μηχανισμός πρόσδεσης άλλων υποστρωμάτων και θεωρητικοί υπολογισμοί επιβεβαιώνουν τα πειραματικά μας αποτελέσματα. Η παρούσα μελέτη τοποθετεί τις βάσεις για την λεπτομερή κατανόηση της μοριακής εξέλιξης των σχέσεων δομής-λειτουργίας-εξειδίκευσης στην οικογένεια NAT/NCS2 και ειδικά προσεγγίζει πώς «πρόεκυψαν» οι μεταφορείς ασκορβικού των πρωτευόντων από κοινό προγονικό μόριο με τους μεταφορείς πουρινών των μικροβίων.

Λέξεις-κλειδιά: μεταφορείς πουρινών, σχέσεις δομής-λειτουργίας, *in silico* τρισδιάστατη δομή

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

5.8 From genetic data to structural models and back: structure-function relationships in the UapA purine transporter

Kosti V.^{*}, Lamprinidis G.[†] V. Myriathopoulos, Diallinas G.^{*} & Mikros E.[†]

^{*}National and Kapodistrian University of Athens, Faculty of Biology, Athens
[†]National and Kapodistrian University of Athens, School of Pharmacy, Athens

The UapA uric acid-xanthine/H⁺ transporter of *Aspergillus nidulans* is a prototypic molecule for studying structure-function relationships in the nucleobase-ascorbate transporter family (NAT/NCS2). Previous functional data indicate that residues E356, Q408, N409 in transmembrane segments 8 and 9 (TMS8-9) are elements of the purine binding site, whereas other residues in TMS1-2, TMS9, TMS10-11 and TMS12 participate in a substrate 'filtering' mechanism, suggesting for the first time the existence of selectivity gates in transporters. In this study, we built the 3D topology of UapA through homology modeling, based on the recently published crystallographic structure of the homologous bacterial uracil transporter (UraA)³. The UapA model consists of 14 TMSs and cytoplasmic N- and C-termini. Functionally critical residues (E356, Q408 & N409) are located in TMS8 and TMS10 respectively. The model is also in accordance with recent functional data showing that H86 (TMS1) and S154 (TMS3) should participate in substrate translocation. *Docking* calculations using xanthine as a ligand strongly support a direct role of E356 & Q408 in substrate binding. Finally, two of the most important selectivity residues (T526, F528) are located in the beginning of TMS14, a region of high plasticity which could *gate* the access of substrates towards their translocation pathway. The binding mode of ligands other than xanthine further confirmed our experimental data. This study is a first step for understanding how structure defines function-selectivity in the NAT/NCS2 family and in particular how primate ascorbate transporters have evolved from a common ancestral molecule with microbial purine transporters.

Keywords: purine transporters, structure-function study, *in silico* 3D structure

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

5.9 Ανάλυση του κινασώματος των φωσφοϊνοσιτιδίων στα βλεφαριδωτά *Tetrahymena thermophila* και *Paramecium tetraurelia* παρέχει νέα δεδομένα για την εξέλιξη της σηματοδότησης μέσω των PI3-κινασών και των PIP κινασών

Λεονταρίτης Γ.¹, Γαλανοπούλου Ν.²

¹Τμήμα Φαρμακολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα

²Εργαστήριο Βιοχημείας, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Αθηνών

Τα φωσφοϊνοσιτιδία (PI) αποτελούν μεμβρανικά φωσφολιπίδια με σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση ζωτικών κυτταρικών λειτουργιών. Η βιοσύνθεσή τους από τη φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη στηρίζεται σε ένα δίκτυο εξειδικευμένων κινασών (PIK: PI3K, PI4K και PIPK) και φωσφατασών, που εντοπίζονται σε συγκεκριμένες υποκυτταρικές περιοχές. Απορρύθμιση του δικτύου αυτού μπορεί να οδηγήσει, στον άνθρωπο, σε παθολογικές καταστάσεις όπως ο καρκίνος. Η ανακάλυψη νέων δράσεων και μηχανισμών ρύθμισης της βιοσύνθεσης των PI έχει διευκολυνθεί σημαντικά από μελέτες σε μονοκύτταρους οργανισμούς-μοντέλα και κυρίως στη ζύμη *S. cerevisiae*. Οι ίδιες μελέτες έχουν οδηγήσει και στην ευρέως αποδεκτή άποψη ότι η πολυπλοκότητα του μεταβολισμού των PI αυξάνεται στους πολυκύτταρους οργανισμούς, κάτι που υπογραμμίζει και ο αυξημένος αριθμός των PIPK και PI3K στους ζωικούς οργανισμούς σε σύγκριση με τους ζυμομύκητες.

Στην παρούσα μελέτη χαρακτηρίσαμε το κινάσωμα των PI σε δύο βλεφαριδωτούς οργανισμούς, τους *Tetrahymena* and *Paramecium*, στο πλαίσιο της μελέτης της εξέλιξης των κυτταρικών ρόλων των PI. Οι PIK των δύο οργανισμών χαρακτηρίστηκαν ως προς τη δομή και τις συντηρημένες περιοχές τους, την καταλυτική λειτουργικότητα, τις φυλογενετικές σχέσεις και την έκφρασή τους σε διαφορετικές φάσεις ανάπτυξης των κυττάρων. Ταυτοποιήθηκαν 22 και 62 PIK στα κύτταρα *Tetrahymena* και *Paramecium*, αντίστοιχα (ο *S. cerevisiae* διαθέτει 6 PIK). Οι PIK αυτές χαρακτηρίζονται από: (α) μία διακριτή φυλογενετικά υποοικογένεια τύπου PI4KIIIβ, (β) την παρουσία νέων μη τυπικών PIPK, που είναι διαμεμβρανικά ένζυμα ή έχουν περιοχές EF και coiled-coil και (γ) την παρουσία PI3K τύπου I, ένζυμα που συνθέτουν PIP3. Η παράλληλη ταυτοποίηση ενός ορθόλογου γονιδίου PDK1 και πιθανών παραλόγων PKB και PTEN, τα οποία συνεκφράζονται με τις PI3K κατά τη διάρκεια της σύζευξης κυττάρων *Tetrahymena*, υποδεικνύουν την λειτουργική σηματοδότηση μέσω PIP3 στον οργανισμό αυτό. Με τα δεδομένα αυτά θεωρούμε ότι η σηματοδότηση μέσω της PIP3 στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς είναι πιο διαδεδομένη από ότι αρχικά πιστευόταν και πιθανότατα προαπαιτούμενη για βασικές λειτουργίες των ευκαρυωτικών κυττάρων.

Λέξεις-κλειδιά: κινάσες, 4,5-διφωσφορική φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη, *Tetrahymena*, μονοπάτι PI3K/PTEN/PKB

5.9 Analysis of the phosphoinositide kinome of the ciliates *Tetrahymena thermophila* and *Paramecium tetraurelia* reveals novel evolutionary links for PI3-kinases and PIP kinases

Leondaritis G.¹, Galanopoulou D.²

¹Department of Pharmacology, Medical School, University of Thessaly, Larissa, Greece

²Laboratory of Biochemistry, Department of Chemistry, University of Athens, Athens, Greece

Phosphoinositides (PIs) play a central role in regulating most aspects of cellular physiology. Their production from phosphatidylinositol is tightly controlled spatiotemporally by a set of kinases (PIKs: PI3Ks, PI4Ks and PIPKs) and, also, phosphatases; deregulation of PI interconversion pathways results in pathogenesis of human diseases including cancer. Several advances in PI research have emerged from studies in model organisms; these studies have also established the widely accepted notion that complexity in PI metabolism increases with multicellularity, a notion epitomized by the expansion of PIPKs and PI3Ks in animals compared to fungi.

In this report, we characterized the PI kinome of two ciliates *Tetrahymena* and *Paramecium* belonging to the chromalveolate clade with the rationale that it would cast light on an earlier time into evolution of PI functions. Putative PIKs were analyzed for domain organization, catalytic/functional sequence diversity, phylogenetic relationships and expression patterns. Our survey identified 22 and 62 PIKs in *Tetrahymena* and *Paramecium*, respectively, revealing an expansion compared to *S. cerevisiae* (6 PIKs). Furthermore, ciliate PIKs exhibited several novelties: a phylogenetically distinct PI4KIIIβ-like family, presence of atypical PIPKs including transmembrane and EF hand-coiled-coil kinases not described previously, and presence of class I PI3Ks, which synthesize PIP3. The identification of a PDK1 ortholog and putative PKB and PTEN paralogs, coexpressed with PI3Ks during conjugation, are indicative of functional downstream PIP3 signalling. We suggest that PIP3 signalling is more widespread than previously proposed and it may be a core requirement for ancestral eukaryotic functions.

Keywords: kinases, phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, *Tetrahymena*, PI3K/PTEN/PKB pathway

5.10 Ο ρόλος της καρβοξυλομάδας Asp-276 στον μεταφορέα ξανθίνης XanQ της *E. coli*

Μπότου Μ., Καρενά Α., και Φριλίγγος Ε.

Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων Ιατρική Σχολή

Οι μεταφορείς πουρινών της οικογένειας NAT/NCS2 έχουν ευρεία διάδοση και υψηλό βαθμό εξελικτικής συντήρησης. Για τη μελέτη σχέσεων δομής-λειτουργίας στην οικογένεια αυτή, χρησιμοποιούμε μεταλλαξιγένεση κυστεϊνικής σάρωσης του μεταφορέα ξανθίνης XanQ της *E. coli*. Από τη συστηματική αυτή μελέτη έχουν αναδειχθεί θέσεις-κλειδιά του μορίου που είναι σημαντικές για τη λειτουργία του μεταφορέα, όπως τέσσερα κατάλοιπα που δεν μπορούν να αντικατασταθούν χωρίς απώλεια της ενεργότητας (Glu-272, Asp-304, Gln-324, Asn-325) και ένα όπου απαιτείται η παρουσία μιας καρβοξυλομάδας (Asp-276). Επίσης, η κρυσταλλογραφική ανάλυση του ομόλογου μεταφορέα ουρακίλης UraA της *E. coli* που παρουσιάστηκε πρόσφατα μας δίνει σημαντικές πληροφορίες. Από μοντελοποίηση του μεταφορέα XanQ με βάση την ομόλογη κρυσταλλική δομή προκύπτει ότι τα τρία από τα τέσσερα αναντικατάστατα κατάλοιπα καθώς και το Asp-276 βρίσκονται στην περιοχή του κέντρου δέσμευσης και, μάλιστα, το αμινοξύ που αντιστοιχεί στη θέση-276 στον UraA (His-245) είναι πιθανό να εμπλέκεται τόσο στη δέσμευση υποστρώματος όσο και στη συμμεταφορά του πρωτονίου. Για να κατανοήσουμε καλύτερα το ρόλο του Asp-276 εξετάσαμε αναλυτικότερα το μετάλλαγμα D276E ως προς την εξειδίκευση και ως προς την εξάρτηση της ενεργότητας από το pH. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο μεταλλαγμένος μεταφορέας D276E διαφέρει από τον φυσικό ως προς το ότι αναγνωρίζει με υψηλή συγγένεια την 8-μεθυλοξανθίνη και δεν δεσμεύει ανάλογα ξανθίνης που διαφέρουν στο πυριμιδινικό τμήμα ενώ παραμένει ενεργός και σε χαμηλότερα pH από αυτά όπου μπορεί να λειτουργήσει ο φυσικός μεταφορέας (<6.0) διαφοροποιώντας όμως την εξειδίκευσή του. Σε συνδυασμό και με το προφίλ εξάρτησης από το pH μιας σειράς άλλων μεταλλαγμάτων όπου αντικαταστάσεις του Asp-276 συνδυάζονται με αλλαγές σε άλλες σημαντικές θέσεις του μορίου (Asn-93, TM14), καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι η θέση της καρβοξυλομάδας-276 μπορεί να επηρεάζει τόσο την εξειδίκευση όσο και την αποτελεσματικότητα της μεταφοράς υποστρώματος μέσω τροποποίησης του pKa του αναντικατάστατου Glu-272 που φαίνεται να αλληλεπιδρά άμεσα με το υπόστρωμα στο κέντρο δέσμευσης.

Λέξεις-κλειδιά: πουρίνες, ενεργός μεταφορά, διαβάθμιση πρωτονίων

5.10 The role of the Asp-276 carboxyl group in the xanthine transporter XanQ of *E. coli*

Botou M., Karena E., and Frilingos S.

Laboratory of Biological Chemistry, University of Ioannina Medical School

Purine transporters of the NAT/NCS2 family are widespread and highly conserved in evolution. To study structure-function relationships in this family, we have employed Cys- scanning mutagenesis of XanQ, the major xanthine transporter of *E. coli*. This analysis has revealed a set of key residues, including four irreplaceable residues (Glu-272, Asp-304, Gln-324, Asn-325) and one where a carboxyl group is essential for function (Asp-276). In addition, the recently described x-ray structure of the homologous uracil transporter UraA of *E. coli* has provided important insight. Homology modeling of XanQ shows that three irreplaceable side chains as well as Asp-276 are at the binding site region; the UraA amino acid corresponding to position 276 (His-245) is probably involved in both substrate binding and translocation of the proton. To dissect the role of Asp-276 we studied mutant D276E with respect to the specificity and pH profile. The results show that D276E differs from wild type in both specificity (high-affinity binding of 8-methylxanthine) and pH profile (retention of high activity at pH <6.0). The specificity and pH profile of D276E is modulated by the combination with replacements at other important positions (Asn-93, TM14). Overall, we conclude that the geometry of the carboxyl group at position 276 may affect both specificity and efficiency of transport through alteration of the pKa of the irreplaceable Glu-276 which appears to directly bind and process substrate.

Keywords: purines, active transport, proton electrochemical gradient

5.11 Γενετική και λειτουργική ανάλυση μεταφορέων πουρινών από το αζωτοδεσμευτικό ριζοβακτήριο *Sinorhizobium meliloti*

Παπακόστας Κ.¹, Μπότου Μ.¹, Καλλονιάτη Χ.², Φλεμετάκης Ε.² και Φριλίγγος Ε.¹

¹Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων Ιατρική Σχολή
²Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Οι μεταφορείς πουρινών της οικογένειας NAT/NCS2 έχουν ευρεία διάδοση και υψηλό βαθμό εξελικτικής συντήρησης. Ελάχιστα όμως μέλη έχουν χαρακτηριστεί λειτουργικά. Με βάση τον μεταφορέα ξανθίνης XanQ που χρησιμοποιούμε στο εργαστήριό μας ως πρότυπο μελέτης με αναλυτική μεταλλαξιγένεση, διαπιστώσαμε ότι τέσσερα ομόλογα της οικογένειας αυτής περιέχονται στο γονιδίωμα του αζωτοδεσμευτικού ριζοβακτηρίου *Sinorhizobium meliloti*, το οποίο σχηματίζει μη-καθορισμένα φυμάτια στις ρίζες της μηδικής, ενώ δεν υπάρχουν καθόλου αντίστοιχα γονίδια σε είδη ριζοβακτηρίων τα οποία σχηματίζουν καθορισμένα φυμάτια (όπως στο *Mesorhizobium loti*). Έλεγχος των επιπέδων μεταγραφικής έκφρασης των γονιδίων του *S. meliloti* σε φυμάτια του ψυχανθούς *Medicago truncatula* υπέδειξε ότι η γονιδιακή έκφραση του ενός ομολόγου (*SMc02513*) επάγεται κατά την οντογένεση του συμβιοσώματος. Μετά από κλωνοποίηση και ετερόλογη έκφραση των τεσσάρων γονιδίων του *S. meliloti* σε κύτταρα *E. coli* K-12, διαπιστώσαμε ότι το προϊόν του γονιδίου *SMc02513* μπορεί να λειτουργήσει ως πρωτονιο-εξαρτώμενος μεταφορέας ξανθίνης υψηλής συγγένειας που μεταφέρει επίσης ουρικό οξύ και έχει ευρεία εξειδίκευση για μια εκτενή σειρά αναλόγων ξανθίνης. Τα προϊόντα των τριών άλλων ομολόγων εμφανίζουν μια σχετικά μικρή ενεργότητα μεταφοράς ουρικού οξέος. Το γονίδιο *SMc02513* βρίσκεται μαζί με ένα από τα υπόλοιπα ομόλογα (*SMc02512*) αμέσως μετά από ένα οπερόνιο πρόσληψης και καταβολισμού γλυκερόλης των ριζοβακτηρίων (*SMc02521-14*) και φαίνεται ότι μπορεί να «εκμεταλλεύεται» αυτό το σύστημα για την έκφρασή του. Η φυσιολογική σημασία της ειδικής παρουσίας και έκφρασης του γονιδίου *SMc02513* στο γονιδίωμα του *S. meliloti* και όχι σε άλλα ριζοβακτήρια που σχηματίζουν διαφορετικό τύπο φυματίων (καθορισμένα φυμάτια) είναι ένα ενδιαφέρον θέμα προς διερεύνηση. Σε κάθε περίπτωση, η εργασία μας αποδεικνύει για πρώτη φορά ότι συστήματα πρόσληψης νουκλεοτιδικών βάσεων (ιδίως ξανθίνης) εκφράζονται σε αζωτοδεσμευτικά ριζοβακτήρια και μπορεί να παίζουν ενεργό ρόλο στην φυσιολογία της ανάπτυξης συγκεκριμένων τύπων αζωτοδεσμευτικών φυματίων των ψυχανθών.

Λέξεις-κλειδιά: πουρίνες, ενεργός μεταφορά, *Sinorhizobium meliloti*

5.11 Genetic and functional analysis of purine transporters from *Sinorhizobium meliloti*

Papakostas K.¹, Botou M.¹, Kalloniati C.², Flemetakis E.², and Frillingos S.¹

¹Laboratory of Biological Chemistry, University of Ioannina Medical School
²Department of Agricultural Biotechnology, Agricultural University of Athens

Purine transporters of the NAT/NCS2 family are widespread and highly conserved in evolution but few members have been characterized experimentally. Based on sequence comparison with the xanthine transporter XanQ which is used as a study prototype in our laboratory, four NAT homologs are encountered in the genome of the nitrogen-fixing rhizobacterium *Sinorhizobium meliloti* while no related genes are present in other rhizobial species with different nodulation physiology such as *Mesorhizobium loti*. Quantitative RT-PCR analysis shows that the gene expression of one of the *S. meliloti* homologs (*SMc02513*) is induced during development of the symbiotic nodule in *Medicago truncatula*. Cloning and heterologous expression of the four *S. meliloti* homologs in *E. coli* K-12 demonstrated that the gene product of *SMc02513* is a proton gradient-dependent, high-affinity transporter for xanthine which also transports uric acid (8-oxy-xanthine) and recognizes a series of purine analogues as ligands. The three remaining homologs display a relatively low transport activity for uric acid. The *SMc02513* gene (followed by its paralog *SMc02512*) lies immediately downstream a cluster of glycerol utilization genes (*SMc02521-14*) and may hijack on this system for genetic expression. The fact that this *SMc02513* gene is present and expressed specifically in *S. meliloti* and not in rhizobia of different nodulation types is highly interesting from a physiological point of view. In any event, our study shows for the first time that nucleobase uptake systems are expressed in rhizobacteria and may play a role in the development of particular types of symbiotic nitrogen-fixing nodules.

Keywords: purines, active transport, *Sinorhizobium meliloti*

5.12 Κλωνοποίηση, μεταφορά και έκφραση γονιδίων της α-συνουκλεΐνης στον *Saccharomyces cerevisiae*

Σφήκας Ε., Κაკανιάρης Ν., Βασίλη Ε., Πάππου Ε., Μιχαηλίδης Θ., Αφένδρα Α.Σ.

Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Η α-συνουκλεΐνη εκφράζεται άφθονα στο προσυναπτικό άκρο των νευρώνων των σπονδυλωτών και εμπλέκεται σε διάφορους τύπους νευροεκφυλιστικών διαταραχών. Σε παθολογικές καταστάσεις, όταν υπερεκφράζεται, σχηματίζει κυτταροπλασματικά έγκλειστα με τοξικές συνέπειες για τα κύτταρα. Έχουν χαρακτηριστεί τρεις ισομορφές του γονιδίου της α-συνουκλεΐνης, οι 140, 126 και 112, οι οποίες προκύπτουν από αλλαγές σε λειτουργικές περιοχές της πρωτεΐνης μέσω των μηχανισμών εναλλακτικού ματίσματος στις μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις.

Στην συγκεκριμένη εργασία μελετήθηκαν τα γονίδια της α-συνουκλεΐνης αγρίου τύπου και της ισομορφής 112 με στόχο τη διερεύνηση της επίδρασής τους, μεμονωμένα αλλά και συγκριτικά, στη βιωσιμότητα των κυττάρων με χρησιμοποίηση του ζυμομύκητα ως κυτταρικό μοντέλο. Για το λόγο αυτό, τα παραπάνω γονίδια απομονώθηκαν από πλασμιδιακό φορέα κυττάρων θηλαστικών μέσω PCR και κλωνοποιήθηκαν το καθένα ξεχωριστά στο φορέα pCM190, κατάλληλο για κύτταρα ζυμομύκητων, υπό τον έλεγχο υβριδικού υποκινητή ρυθμιζόμενου από το σύστημα tet-off. Τα ανασυνδυασμένα παράγωγα pCM190asynWT και pCM190asyn112 μεταφέρθηκαν το καθένα με μετασχηματισμό στο στέλεχος *S. cerevisiae* BY4741. Η επιλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων πραγματοποιήθηκε με δείκτη το γονίδιο *URA3* του pCM190. Η παρουσία των πλασμιδίων στα κύτταρα διαπιστώθηκε με απομόνωση του πλασμιδιακού DNA από κύτταρα ζυμομύκητα, χρησιμοποίησή του για μετασχηματισμό κυττάρων *E. coli* DH5a και περαιτέρω ανίχνευσή του στα πλασμιδιακά εκχυλίσματα του DH5a, καθώς και υβριδισμό κατά Southern.

Η ρύθμιση της μεταγραφής των γονιδίων της α-συνουκλεΐνης επιτυγχάνεται μέσω της κατάλληλης συγκέντρωσης τετρακυκλίνης στο θρεπτικό μέσο. Οι καμπύλες ανάπτυξης των μετασχηματισμένων κυττάρων παρουσία και απουσία του ρυθμιστικού παράγοντα λειτουργίας του συστήματος tet-off δεν έδειξαν κάποια αξιοσημείωτη μεταβολή στην κυτταρική βιωσιμότητα. Η διερεύνηση της μεταγραφής του γονιδίου και η χρησιμοποίηση πιο ευαίσθητων στελεχών του ζυμομύκητα είναι δύο πιθανές μελλοντικές προσεγγίσεις στα πλαίσια της γενικότερης μελέτης της α-συνουκλεΐνης.

Λέξεις-κλειδιά: α-συνουκλεΐνη, *Saccharomyces cerevisiae*

5.12 Cloning, transfer and expression of α-synuclein genes in *Saccharomyces cerevisiae*

Sfikas E., Kakaniaris N., Vassili E., Pappou E., Michailidis T., Afendra A.-S.

Department of Biological Applications and Technologies, University of Ioannina

Alpha-synuclein is abundantly expressed in presynaptic terminal of the vertebrate neurons and involved in various types of neurodegenerative disorders. In pathological situations, when overexpressed, it forms cytoplasmic inclusions with toxic effects for the cells. Three α-synuclein's gene isoforms, 140, 126 and 112, have been characterized so far, which derive by changes in the functional protein domains through the alternative splicing mechanisms in the post-transcriptional alterations.

In the present work, the α-synuclein wild type and isoform 112 genes were studied for their effect in cell viability by using yeast as a cellular model. The above genes were subcloned individually in the yeast vector pCM190 under the control of a hybrid promoter regulated by the tet-off system. The recombinant plasmids pCM190asynWT and pCM190asyn112 were used for transformation in *S. cerevisiae* BY4741. Selection was made with pCM190 *URA3* gene. The presence of plasmids in the cells was verified by isolation of plasmid DNA from yeast cells, back transformation in *E. coli* DH5a cells and further detection in the plasmid extracts of DH5a, as well as Southern blot.

The regulation of α-synuclein genes transcription is achieved by the appropriate tetracycline concentration in the growth medium. The growth curves of the transformed cells in the presence and absence of the operation regulating factor of tet-off system did not show certain remarkable change in the cellular viability. The investigation of gene's transcription and the utilisation of more sensitive yeast strains are two likely future approaches for the general study of α-synuclein.

Keywords: α-synuclein, *Saccharomyces cerevisiae*

5.13 Χαρακτηρισμός της ριβονουκλεάσης P (RNase P) από το αιθανολοπαραγωγό βακτήριο *Zymomonas mobilis*

Τουμπέκη Χ.¹, Σταματοπούλου Β.¹, Μπίκου Μ.¹, Βουρεκάς Α.¹, Τσιτλαΐδου Μ.¹, Τζακός Α.Γ.², Αφένδρα Α.-Σ.³, Δραΐνας Κ.^{2*}, Δραΐνας Δ.¹

¹Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πατρών.

²Τομέας Οργανικής Χημείας και Βιοχημείας, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.

³Εργαστήριο Γενετικής, Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.

* Ο Καθηγητής Κωνσταντίνος Δραΐνας απεβίωσε στις 5 Ιουλίου 2011.

Η ριβονουκλεάση P (RNase P) είναι ένα πανταχού παρόν ριβονουκλεοπρωτεϊνικό ένζυμο, το οποίο καταλύει την ενδονουκλεολυτική θραύση της 5' οδηγού αλληλουχίας των πρόδρομων tRNA μορίων. Η βακτηριακή RNase P αποτελείται από μία RNA και μία πρωτεϊνική υπομονάδα. Η βακτηριακή RNA υπομονάδα είναι το πρώτο ριβοένζυμο που βρέθηκε ότι δρα διαμοριακά *in vivo*. Το *Zymomonas mobilis* είναι ένα Gram αρνητικό βακτήριο, του οποίου το γονιδίωμα είναι κατά το ήμισυ περίπου μικρότερο από αυτό του *Escherichia coli* και παρουσιάζει μεγάλο βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον λόγω της ικανότητάς του να παράγει αιθανόλη με μεγάλη απόδοση.

Στην παρούσα εργασία, παρουσιάζουμε την κλωνοποίηση της RNA και της πρωτεϊνικής υπομονάδας, καθώς και το χαρακτηρισμό της ενζυμικής δραστηριότητας της ανασυσταμένης RNase P *in vitro*. Για το λόγο αυτό, προσδιορίστηκαν οι βέλτιστες συνθήκες της ενζυμικής δραστηριότητας και υπολογίστηκαν οι σταθερές K_m και V_{max} μέσω κινητικής ανάλυσης, τόσο για το ολοένζυμο όσο και για το μετάγραφο *in vitro* της RNA υπομονάδας. Ανάλυση βιοπληροφορικών δεδομένων έδειξε ότι η RNA υπομονάδα της RNase P του *Z. mobilis* είναι βακτηριακού τύπου A και φέρει τη έλικα P19, η οποία απουσιάζει από την RNA υπομονάδα του ολοενζύμου του *E. coli*. Με σκοπό να διερευνηθεί ο ρόλος της έλικας P19, κατασκευάσαμε ένα μεταλλαγμένο RNA μόριο στο οποίο απουσίαζε το συγκεκριμένο δομικό στοιχείο. Λεπτομερής κινητική ανάλυση έδειξε ότι η έλικα P19 επηρεάζει την απαίτηση σε ιόντα NH₄⁺ καθώς και την καταλυτική δραστηριότητα του ενζύμου, ενώ δεν επηρεάζει την απαίτηση σε ιόντα Mg²⁺ και την πρόδεση του υποστρώματος. Τέλος, πραγματοποιήθηκε συγκριτική μοντελοποίηση μέσω ομολογίας και σχεδιάστηκε η τριτοταγής δομή της RNA υπομονάδας της RNase P από το *Z. mobilis* και προσδιορίστηκε μία πιθανή περιοχή πρόδεσης των καταλυτικών ιόντων μετάλλων.

Λέξεις-Κλειδιά: ριβονουκλεάση P, *Zymomonas mobilis*, ριβοένζυμο

5.13 Characterization of the RNase P from ethanologenic bacterium *Zymomonas mobilis*

Toumpeki C.¹, Stamatopoulou V.¹, Bikou M.¹, Vourekas A.¹, Tsitlaidou M.¹, Tzakos A.G.², Afendra A.-S.³, Drainas C.^{2*}, Drainas D.¹

¹Department of Biochemistry, School of Medicine, University of Patras, Greece

²Sector of Organic Chemistry and Biochemistry, Department of Chemistry, University of Ioannina, Greece

³Department of Biological Applications and Technologies, University of Ioannina, Greece

*Constantin Drainas, (January 19, 1950), Professor of Biochemical Molecular Genetics and Biotechnology, passed away on July 5th 2011.

Ribonuclease P (RNase P) is a ubiquitous ribonucleoprotein enzyme catalyzing the endonucleolytic cleavage of the 5' leader sequence of precursor tRNAs (pre-tRNAs). Bacterial RNase P consists of an RNA and one protein subunit. The bacterial RNA subunit is the first ribozyme found to act *in trans in vivo*. *Zymomonas mobilis* is a Gram negative bacterium with almost the half genome size of that of *Escherichia coli* and assembles great biotechnological interest due to its ability to produce ethanol with high efficiency.

Herein, we present the cloning of the RNA and protein subunit, as also the characterization of the reconstituted RNase P enzymatic activity *in vitro*. Thus, the optimal conditions for activity were determined and the kinetic constants K_m and V_{max} were obtained through kinetic analysis for both the reconstituted holoenzyme and the RNA subunit from transcription *in vitro*. Bioinformatic analysis revealed that the architecture of the RNA subunit of the *Z. mobilis* RNase P belongs to the bacterial A type and contains a P19 helix, which is absent from the RNA subunit of the *E. coli* holoenzyme. In order to investigate the role of the P19 helix, we constructed a mutant RNA lacking this structural element. Detailed kinetic analysis showed that the P19 helix affects the NH₄⁺ requirements and the catalytic potency of the enzyme, and does not affect the Mg²⁺ requirements and the substrate binding. The 3D architecture of the RNase P RNA subunit of *Z. mobilis* and a potential location of catalytic metal ions were derived through comparative modelling.

Keywords: ribonuclease P, *Zymomonas mobilis*, ribozyme

AUTHOR'S INDEX

- A
- Abd-Alla A.....146, 147
- Afendra A.-S. 77, 95, 125, 139,
169, 181, 183
- Agathos S.N. 23
- Aggelis G..... 85, 103, 107, 109
- Akritidou L..... 133
- Aksoy E.....146, 147
- Aksoy S.....146, 147
- Aktypis A..... 125
- Alam U.....146, 147
- Alexandratos A..... 143
- Amillis S.....161, 171
- Anthimidou E..... 69
- Antonopoulou G..... 71
- Apostolidi M..... 159
- Argandoña M.....168, 169
- Argyri A.....39, 73
- B
- Bagiatis V..... 69
- Balliu A..... 145
- Bellou S..... 107
- Biennas A..... 133
- Bikou M..... 183
- Birkou M..... 109
- Blana V.....39, 73
- Bokas D..... 109
- Botou M.....177, 179
- Bourbouli M..... 111
- Bourtzis K.....33, 133, 147
- Bramis G..... 153
- Brelsfoard C.....146, 147
- Briasoulis E..... 35
- C
- Chammen N.....130, 131
- Charisiadis P..... 101
- Chatzi I..... 33
- Chatzikamari M..... 63
- Chatzikonstantinou A..... 117
- Chatzipavlidis I.....57, 59
- Cocolin L.....130, 131
- D
- Dados A.....87
- Dailianis S.....61
- Dalaperas S.....147
- Damaskinou A.....73
- del Solar G..... 3
- Delfaki A.....153
- Detsi A.....117
- Diallinas G..... 161, 165, 171, 173
- Diamantopoulou P.....85
- Dimitriadou E.....25
- Dimou M.....57, 59, 163
- Doudoumis V.....147
- Doulgeraki A.....39, 73
- Drainas C... 75, 95, 135, 145, 169,
183
- Drainas D.....5, 159, 183
- Drivas G.....87
- Drosinos E.H.....105
- E
- Efthymiou A.....59
- Ehaliotis C.....13
- Espinosa M..... 3
- F
- Fakas S.....103
- Fernández López C..... 3
- Filioussis G.....153
- Flemetakis E.....179
- Floudas D.....37
- Foukis A.....119, 121
- Frillingos S..... 167, 177, 179
- G
- Galanopoulou A.P.....79
- Galanopoulou D.....175
- Galiotou-Panayotou M.....105
- Garrido-Fernandez A.....130, 131
- Georgakakis P.....59
- Georgakopoulos D.G. .57, 67, 141
- George I.F.....23

Georgiou C.A.	67
Gerothanassis I.	101
Giabouras I.	81
Giadinis N.	153
Giavasis I.	81, 83
Gkatzou E.	43
Glamočlija J.	90, 91
Gogolos V.	81
Gonou-Zagou Z.	37
Goutsidis P.	81, 83
H	
Hatziloukas E.	125, 143, 149
Hatzinikolaou D.G.	79, 89, 99, 127
Hotos G.N.	47
I	
Ipsilantis I.	13
K	
Kakaniaris N.	181
Kalloniaty C.	179
Kalogerakis N.	15, 113
Kambanos E.	139
Kanavakis E.	25
Kang S.	154, 155
Kanini G.S.	99
Karachaliou M.	165
Karagiannopoulos M.	43
Karagouni A.D.	53, 79, 89, 97, 99, 111, 127, 129
Karanasios K.A.	93
Karapetrou G.	55
Karayanni H.	41, 45
Karena E.	167, 177
Karpouzas D.G.	13
Katapodis P.	87, 123
Katinakis P.	57, 59, 163
Katsiapi M.	45
Katsifa A.	169
Katsifas E.A.	53, 89, 97, 99
Katsoura M.	101, 117
Kefalogianni I.	57, 59
Kekos D.	123
Kolla K.	143
Komaitis M.	85
Kontali M.	61
Kornas K.A.	41, 45, 47
Kosti V.	171, 173
Koukkou A.I.	75, 95, 145, 169
Kourtidou E.	95
Koutalianou M.	97
Koutra D.E.	99
Kouvelis V.N.	27, 37
Kremmydas G.	141
Krimitzas A.	37
Kritas SK.	153
Kryptou A.	171
Kyriakidis D.A.	11
Kyriakou E.	101
Kyrpidis N.C.	75, 95
L	
Lamprakopoulou G.	169
Lamprinidis G.	173
Lekka M.E.	43
Leondaritis G.	175
Livieratos I.	33
López-Aguilar C.	3
Lorenzo-Díaz F.	3
Lukasiak J.	66, 67
Lyberatos G.	71, 115
M	
Maglaras P.	143
Makri A.	103
Makri S.P.	93
Maksimović V.	90, 91
Manousaki E.	15
Mantziou S.	25
Marianou A.	145
Marmaras G.	55
Martinez B.	148, 149
Melidis P.	63
Menkissoglou-Spiroudi U.	13
Mente E.	47
Mentis A.	149
Metafa M.	55
Metsoviti M.	105

Meziti A.	41, 47
Michailidis T.	181
Mikros E.	171, 173
Moreels D.	23
Mossialos D.	33, 49, 69
Moustaka M.	45
Moustogianni A.	107
Moysi K.	97
Myrianthopoulos V.	171, 173
N	
Nieto J.	168, 169
Nikolopoulou M.	113
Nikolouli K.	33, 49
Nikonova O.	32, 33
Noll N.	32, 33
Noutsopoulos D.	25
Ntaikou I.	115
Ntertili M.	27
Ntougias S.	63
Nychas G.-J.E.	73, 105
O	
Olsen K.	66, 67
Omirou M.	13
Ouma J.	146, 147
P	
Pachiadaki M.G.	47
Panagou E.	39, 73, 131
Panopoulos N.	151
Panou-Pomonis E.	145
Papachristos Ch.	143
Papadakos K.	149
Papadopoulou A.	117
Papadopoulou E.	13
Papadopoulou K.K.	13
Papaioannou I.A.	51
Papakostas K.	179
Papamichael E.M.	119, 121
Papanikolaou A.	151
Papanikolaou S.	85, 105
Papathanassiou E.	111
Papatheodorou K.	83
Papatoli L.	143
Papavasopoulos A.	143
Paplomatas E.J.	155
Pappas K.M.	29
Pappou E.	181
Paramithiotis S.	105
Parapouli M.	135, 169
Paraschas G.	53
Pasadakis N.	113
Patila M-V.	87
Pavlidis I.V.	87
Peres C.	130, 131
Perisynakis A.	135
Petridou E.	153
Petrots K.	81, 83
Petroutsos D.	123
Philippoussis A.	85
Pilidis G.	35
Polydera A. C.	117
Pournou A.	49
Pramateftaki P.	39, 55
PrimiKyri A.	101
Puglisi E.	12, 13
R	
Rousidou C.	13
Roussis V.	111
Rubio-Lepe T.S.	3
Ruiz-Masó J.A.	3
S	
Sainis I.	35
Sakarellos C.	145
Sakarelou-Daitsioti M.	145
Sakka M.	145
Salvador M.	168, 169
Samara E.	125
Sarris P.	151
Savvakis G.	29
Savvides A.	111, 129
Serifi I.	143
Sfikas E.	181
Sgouras D.	149
Simonić J.	90, 91
Singh B.K.	12, 13
Skagia A.	57

Skandalis N.	151
Skiada V.	59
Sklivaniti H.	119
Sophianopoulou V.	19
Stajic M.	90, 91
Stamatis H.	87, 101, 117, 123
Stamatopoulou V.	183
Stathopoulos C.	159
Stathopoulou P.M.	79, 89, 127
Stefanidou N.	45
Stergiou P-Y.	119, 121
Syri G.	153
Syrrou M.	25
T	
Tagaroulia N.	129
Taha A.A.	86, 87
Takac P.	146, 147
Tampakaki A.P.	17
Tassou C.C.	39, 73, 131
Tekerlekopoulou A.	93, 133
Thanopoulos R.	57
Theodorou L.G.	119, 121
Toumpeki C.	159, 183
Traeger-Synodinos J.	25
Traeger-Συνοδινού J.	24
Tsakalidou E.	73
Tsante E.	83
Tsapournioti P.	135
Tsarpali V.	61
Tsiamis G.	33, 133, 147
Tsiflikioti M.	133
Tsitlaidou M.	183
Tsitsigiannis D.I.	155
Typas M.A.	7, 27, 37, 51
Tzakos A.G.	101, 183
Tzavaras T.	25
Tzima A.	155
Tzimotoudis N.	153
V	
Vandera E.	75, 95
Vareli K.	35
Vargas C.	168, 169
Vassili E.	181
Vassiliadis A.	77, 125
Vayenas D.V.	93, 133
Venieraki A.	57, 59, 163
Vezyri E.	57, 59
Vlachos N.	47
Vlaikou M.A.	25
Vourekas A.	183
Voutsas E.	117
Vukojević J.	90, 91
W	
Wamwiri F.	146, 147
X	
Xexakis K.	59
Y	
Yialelis V.	161
Z	
Zerva A.	89
Zervakis G.I.	91
Zografou C.	163
Zoumpopoulou G.	73

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΣΥΓΓΡΑΦΕΩΝ

A	
Αγγελής Γ.	84, 102, 106, 108
Ακριτίδου Λ.	132
Ακτύπης Α.	124
Αλεξανδράτος Α.	142
Αμύλλης Σ.	160, 170
Ανθμίδου Ε.	68
Αντωνοπούλου Γ.	70
Αποστολίδη Μ.	158
Αργύρη Α.	38, 72
Αφένδρα Α.-Σ.	76, 94, 124, 138, 168, 180, 182
B	
Βαγενάς Δ.Β.	92, 132
Βανδέρα Ε.	74, 94
Βαρέλη Κ.	34
Βασιλειάδης Α.	76, 124
Βασίλη Ε.	180
Βεζύρη Ε.	56, 58
Βενιεράκη Α.	56, 58, 162
Βιεννάς Α.	132
Βλαΐκου Μ.Α.	24
Βλάχος Ν.	46
Βουρεκάς Α.	182
Βουτσάς Ε.	116
Γ	
Γαλανοπούλου Α.Π.	78
Γαλανοπούλου Ν.	174
Γαλιώτου-Παναγιώτου Μ.	104
Γεροθανάσης Ι.	100
Γεωργακάκης Δ.	58
Γεωργακόπουλος Δ.Γ.	56, 66, 140
Γεωργίου Κ. Α.	66
Γιαβάσης Ι.	80, 82
Γιαδίνης Ν.	152
Γιαλελής Β.	160
Γιαμπουράς Ι.	80
Γκόνου-Ζάγκου Ζ.	36
Γκότζου Ε.	42
Γκουτσίδης Π.	80, 82
Γογολός Β.	80
Δ	
Δαμασκηνού Α.	72
Δελφάκη Α.	152
Δέτση Α.	116
Δημητριάδου Ε.	24
Δήμου Μ.	56, 58, 162
Διαλλινάς Γ.	160, 164, 170, 172
Διαμαντοπούλου Π.	84
Δουλγεράκη Α.	38, 72
Δραΐνας Δ.	4, 158, 182
Δραΐνας Κ.	74, 94, 134, 144, 168, 182
Δρίβας Γ.	86
Δροσινός Ε.Χ.	104
E	
Ευθυμίου Α.	58
Z	
Ζέρβα Α.	88
Ζερβάκης Γ.Ι.	90
Ζουμποπούλου Γ.	72
Ζωγράφου Χ.	162
Θ	
Θανόπουλος Ρ.	56
Θεοδώρου Λ.Γ.	118, 120
K	
Κακαλιάρης Ν.	180
Καλλονιάτη Χ.	178
Καλογεράκης Ν.	14, 112
Καμπανός Ε.	138
Καναβάκης Ε.	24
Κανινή Γ.Σ.	98
Καραγιάννη Η.	40, 44
Καραγιαννόπουλος Μ.	42
Καραγκούνη Α.Δ.	52, 78, 88, 96, 98, 110, 126, 128
Καρανάσιος Κ.Α.	92
Καραπέτρου Γ.	54
Καραχάλιου Μ.	164
Καρενά Α.	166, 176
Καρπούζας Δ.Γ.	12
Καταπόδης Π.	86, 122

Κατινάκης Π.....	56, 58, 162
Κατσιάπη Μ.....	44
Κατσιάφα Α.....	168
Κατσιάφας Ε.Α.....	52, 88, 96, 98
Κατσούρα Μ.....	100, 116
Κέκος Δ.....	122
Κεφαλογιάννη Η.....	56, 58
Κόλλα Κ.....	142
Κονταλή Μ.....	60
Κορμάς Κ.Α.....	40, 44, 46
Κουβέλης Β.Ν.....	26, 36
Κούκκου Α.Ε.....	74, 94, 144, 168
Κουρτίδου Ε.....	94
Κουταλιανού Μ.....	96
Κούτρα Δ.Ε.....	98
Κρεμμύδας Γ.....	140
Κρήτας ΣΚ.....	152
Κριμιτζάς Α.....	36
Κρυπατού Α.....	170
Κυριακίδης Δ.Α.....	10
Κυριακού Ε.....	100
Κυρπίδης Ν.....	74, 94
Κωμαΐτης Μ.....	84
Κωστή Β.....	170, 172
Λ	
Λαμπρακοπούλου Γ.....	168
Λαμπρινίδης Γ.....	172
Λέκκα Μ.Ε.....	42
Λεονταρίτης Γ.....	174
Λιβιεράτος Ι.....	32
Λυμπεράτος Γ.....	70, 114
Μ	
Μαγκλάρας Π.....	142
Μακρή Α.....	102
Μακρή Σ.Π.....	92
Μανουσάκη Ε.....	14
Μάντζιου Σ.....	24
Μαριανού Α.....	144
Μαρμαράς Γ.....	54
Μεζίτη Α.....	40, 46
Μελίδης Π.....	62
Μενκίσογλου-Σπυρούδη Ο.....	12
Μεντέ Ε.....	46
Ν	
Νικολοπούλου, Μ.....	112
Νικολούλη Κ.....	32, 48
Νουτσόπουλος Δ.....	24
Ντάικου Ι.....	114
Νταϊλιάνης Στ.....	60
Νταλαπέρας Σ.....	146
Ντάντος Α.....	86
Ντερτιλή Μ.....	26
Ντούγιας Σ.....	62
Ντουντούμης Β.....	146
Νυχάς Γ-Ι.....	72, 104
Ξ	
Ξεξάκης Κ.....	58
Ο	
Οιχαλιώτης Κ.....	12
Ομήρου Μ.....	12
Π	
Πανάγου Ε.....	38, 72, 130
Μεντής Α.....	148
Μετάφα Μ.....	54
Μετσοβίτη Μ.....	104
Μικρός Ε.....	170, 172
Μιχαηλίδης Θ.....	180
Μόσιαλος Δ.....	32, 48, 68
Μουστάκα Μ.....	44
Μουστόγιαννη Α.....	106
Μπαγιάτης Β.....	68
Μπαλλίου Α.....	144
Μπέλλου Σ.....	106
Μπίκου Μ.....	182
Μπίρκου Μ.....	108
Μπλάνα Β.....	38, 72
Μπόκας Δ.....	108
Μπότου Μ.....	176, 178
Μπουρμπούλη Μ.....	110
Μπούρτζης Κ.....	32, 132, 146
Μπράμης Γ.....	152
Μπριασούλης Ε.....	34
Μυριανθόπουλος Β.....	170, 172
Μωυσή Κ.....	96

Πανόπουλος Ν.....	150
Πάνου-Πομόνη Ε.....	144
Παπαμχαήλ Ε.Μ.....	118, 120
Παπαβλασόπουλος Α.....	142
Παπαδάκος Κ.....	148
Παπαδοπούλου Α.....	116
Παπαδοπούλου Ε.....	12
Παπαδοπούλου Κ.Κ.....	12
Παπαθανασίου Ε.....	110
Παπαθεοδώρου Κ.....	82
Παπαϊωάννου Ι.Α.....	50
Παπακώστας Κ.....	178
Παπανικολάου Α.....	150
Παπανικολάου Σ.....	84, 104
Παπατόλη Λ.....	142
Παπαχρήστος Χ.....	142
Παπλωματάς Ε.Ι.....	154
Παππά Κ.Μ.....	28
Πάππου Ε.....	180
Παραμυθιώτης Σ.....	104
Παραπούλη Μ.....	134, 168
Παράσχας Γ.....	52
Πασαδάκης Ν.....	112
Πατήλα Μ-Β.....	86
Παυλίδης Ι.Β.....	86
Παχιαδάκη Μ.Γ.....	46
Περισυνάκης Α.....	134
Πετρίδου Ε.....	152
Πετρούτσος Δ.....	122
Πετρωτός Κ.....	80, 82
Πηλίδης Γ.....	34
Πολύδερα Α. Κ.....	116
Πούρνου Α.....	48
Πραματευτάκη Π.....	38, 54
Πριμηκύρη Α.....	100
Ρ	
Ρουσίδου Κ.....	12
Ρούσσης Β.....	110
Σ	
Σαββάκης Γ.....	28
Σαββίδης Α.....	110, 128
Σαΐνης Ι.....	34
Σακαρέλλος Κ.....	144
Σακαρέλλου-Δαΐτσιώτου Μ.....	144
Σακκά Μ.....	144
Σαμαρά Ε.....	124
Σαρρής Π.....	150
Σγούρας Δ.....	148
Σερίφη Η.....	142
Σκαγιά Α.....	56
Σκανδάλης Ν.....	150
Σκιαδά Β.....	58
Σικλιβανίτη Ε.....	118
Σοφιανοπούλου Β.....	18
Σταθόπουλος Κ.....	158
Σταθοπούλου Π.Μ.....	78, 88, 126
Σταμάτης Χ.....	86, 100, 116, 122
Σταματοπούλου Β.....	182
Στεργίου Π-Γ.....	118, 120
Στεφανίδου Ν.....	44
Συρρή Γ.....	152
Σύρρου Μ.....	24
Σφήκας Ε.....	180
Τ	
Ταγαρούλια Ν.....	128
Ταμπακάκη Α.Π.....	16
Τάσσου Χ.....	38, 72, 130
Τεκερλεκοπούλου Α.....	92, 132
Τζαβάρας Θ.....	24
Τζάκος Α.....	100, 182
Τζιμοτούδης Ν.....	152
Τζίμα Α.....	154
Τουμπέκη Χ.....	158, 182
Τσακαλίδου Ε.....	72
Τσαντέ Ε.....	82
Τσαπουρνιώτη Π.....	134
Τσαρπαλή Β.....	60
Τσιάμης Γ.....	32, 132, 146
Τσιτλαΐδου Μ.....	182
Τσιτσιγιάννης Δ.Ι.....	154
Τσιφλικιώτου Μ.....	132
Τύπας Μ.Α.....	6, 26, 36, 50
Υ	
Υψηλάντης Ι.....	12

Φ		X	
Φάκας Σ.....	102	Χαρισιάδης Π.....	100
Φιλίουσης Γ.....	152	Χατζή Ι.....	32
Φιλιπούσης Α.....	84	Χατζηκαμάρη Μ.....	62
Φλεμετάκης Ε.....	178	Χατζηκωνσταντίνου Α.....	116
Φλούδας Δ.....	36	Χατζηλουκάς Ε.....	124, 142, 148
Φούκης Α.....	118, 120	Χατζηνικολάου Δ.Γ.....	78, 88, 98, 126
Φριλίγγος Ε.....	166, 176, 178	Χατζηπαυλίδης Ι.....	56, 58
		Χώτος Γ.Ν.....	46

Τυπώθηκε στο Πανεπιστημιακό Τυπογραφείο