



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ IV: ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΣΗ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΟΡΓΑΝΙΚΗΣ ΧΗΜΙΚΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΣΤΕΡΕΩΣΗ ΠΟΡΩΔΩΝ ΔΟΜΙΚΩΝ ΛΙΘΩΝ
ΙΣΤΟΡΙΚΩΝ ΜΝΗΜΕΙΩΝ ΜΕ ΒΙΟΑΠΟΘΕΣΗ
ΑΝΘΡΑΚΙΚΟΥ ΑΣΒΕΣΤΙΟΥ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
ΔΑΣΚΑΛΑΚΗΣ ΜΑΡΚΟΣ

Επιβλέπων Καθηγητής: Φώτιος Ρήγας

ΑΘΗΝΑ 2016



**NATIONAL TECHNICAL
UNIVERSITY OF ATHENS**

SCHOOL OF CHEMICAL ENGINEERING

DEPARTMENT IV: SYNTHESIS AND DEVELOPMENT OF
INDUSTRIAL PROCESSES

ORGANIC CHEMICAL TECHNOLOGY LABORATORY

**BIOCONSOLIDATION OF POROUS STONE
SUBSTRATES OF HISTORICAL MONUMENTS
VIA BIOMINERALIZATION OF CALCIUM
CARBONATE**

PhD THESIS

DASKALAKIS MARKOS

Supervisor: Fotis Rigas

ATHENS 2016

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

Αντωνία Μοροπούλου, Καθηγήτρια

Μαρία Λοϊζίδου, Καθηγήτρια

Φώτιος Ρήγας, τ. Αν. Καθηγητής (Επιβλέπων Διατριβής)

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή:

Αντωνία Μοροπούλου, Καθηγήτρια

Μαρία Λοϊζίδου, Καθηγήτρια

Ιωάννα Αναστασοπούλου, τ. Καθηγήτρια

Δανάη Ντούλια, τ. Καθηγήτρια

Αντώνιος Μαγουλάς, Ερευνητής Α' ΕΛΚΕΘΕ

Αστέριος Καραγιάννης – Μπακόλας, Επίκ. Καθηγητής

Φώτιος Ρήγας, τ. Αν. Καθηγητής



ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΕΘΝΙΚΗΣ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΕΠΕΑΕΚ



ΕΥΡΩΠΑΪΚΗ ΕΝΩΣΗ
ΣΥΓΧΡΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ
ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ



Η ΠΑΙΔΕΙΑ ΣΤΗΝ ΚΟΡΥΦΗ

Επιχειρησιακό Πρόγραμμα
Εκπαίδευσης και Αρχικής
Επαγγελματικής Κατάρτισης

Το έργο αυτό συγχρηματοδοτήθηκε από το Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο (75%) και από Εθνικούς πόρους (25%) – Επιχειρησιακό Πρόγραμμα Εκπαίδευσης και Αρχικής Επαγγελματικής Κατάρτισης (ΕΠΕΑΕΚ) και ειδικότερα από το πρόγραμμα ΠΥΘΑΓΟΡΑΣ II.

This work was supported by the Ministry of National Education and Religious Affairs (Community Support Framework 2000–2006) under the Pythagoras II research program. The project is co-funded by the European Social Fund (75%) and National Resources (25%).

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ανώτατη Σχολή Χημικών Μηχανικών του Ε.Μ.Πολυτεχνείου δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα (Ν. 5343/1932, Άρθρο 202).

Στην Οικογένειά μου

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	1
ABSTRACT	4
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	7
1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	11
1.1 <i>Λίθος - Μάρμαρο</i>	11
1.2 <i>Παράγοντες Διάβρωσης του Λίθου</i>	12
1.2.1 <i>Περιβαλλοντικοί Παράγοντες</i>	12
1.2.2 <i>Χημικοί Παράγοντες</i>	13
1.2.3 <i>Ανθρωπογενής Δραστηριότητα</i>	14
1.2.4 <i>Βιολογικός Παράγοντας</i>	15
1.3 <i>Αντιμετώπιση της Μικροχλωρίδας που Επηρεάζει Αρνητικά τα Μνημεία</i>	19
1.4 <i>Ανθρακικό Ασβέστιο και η Σημασία του</i>	21
1.5 <i>Μελέτες Κατανόησης της Βιολογικής Σύνθεσης Ανθρακικού Ασβεστίου με Στόχο τη Βιομίμησή του</i>	23
1.5.1 <i>Αμινοξέα</i>	23
1.5.2 <i>Ολιγοπεπτίδια</i>	26
1.5.3 <i>Οργανικά Μακρομόρια</i>	27
1.5.4 <i>Πρωτεΐνες</i>	28
1.6 <i>Ετερότροφα Βακτήρια</i>	29
1.7 <i>Δομή Κυτταρικών Τοιχωμάτων</i>	31
1.8 <i>Μεταβολισμός Ετερότροφων Μικροοργανισμών</i>	39
1.9 <i>Μικροβιολογικές Διαδικασίες Απομόνωσης και Ταυτοποίησης Ετερότροφων Μικροοργανισμών</i>	41
1.10 <i>Εφαρμογές της Γενετικής στον Τομέα της Προστασίας των Μνημείων</i>	45
1.11 <i>Ο Μικροβιολογικός Παράγοντας και η Εκμετάλλευσή του για την Προστασία Μνημείων</i>	46
2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	60
2.1 <i>Δειγματοληψία</i>	60
2.2 <i>Απομόνωση και Αποθήκευση μικροοργανισμών</i>	61
2.3 <i>Ταυτοποίηση βακτηρίων</i>	62
2.4 <i>Ανάπτυξη Θρεπτικού Υγρού για Πειράματα Απόθεσης σε Μαρμάρινο Υπόστρωμα</i>	69

2.5	Υπόστρωμα	70
2.6	Προκαταρκτικά Πειράματα Απόθεσης σε Μαρμάρινο Υπόστρωμα.....	70
2.7	Πειράματα Βελτιστοποίησης Απόθεσης Ανθρακικού Ασβεστίου σε Μαρμάρινο Υπόστρωμα	71
2.8	Πειράματα Επιβεβαίωσης Βέλτιστου Σημείου.....	72
2.9	Πειράματα Απόθεσης Ανθρακικού Ασβεστίου σε μη Αποστειρωμένες Συνθήκες	72
2.10	Επεξεργασία Δειγμάτων	73
2.10.1	Ανάλυση CH ₃ COO ⁻ και Ca ²⁺	74
2.10.2	Υπέρυθρη Φασματοσκοπία (FT-IR)	74
2.10.3	Φασματοσκοπία περίθλασης ακτίνων – X (XRD)	75
2.10.4	Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης	75
2.10.5	Ανάλυση λεπτών τομών	75
2.10.6	Μεταβολή βάρους και αντοχή δειγμάτων σε υπερήχους.....	76
2.10.7	Χρωματομετρία μαρμαρίνων υποστρωμάτων.....	76
3.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	78
3.1	Απομόνωση Μικροοργανισμών	78
3.2	Ταυτοποίηση Μικροοργανισμών	79
3.3	Χρησιμοποίηση Συστημάτων API για την Ταυτοποίηση των Απομονωμένων Στελεχών..	89
3.4	Ανάπτυξη Θρεπτικού Υγρού για Πειράματα Απόθεσης σε Μαρμάρινο Υπόστρωμα.....	92
3.5	Μαρμάρινο Υπόστρωμα Δοκιμών	93
3.6	Προκαταρκτικά Πειράματα Απόθεσης σε Μαρμάρινο Υπόστρωμα.....	95
3.6.1	1 ^ο Σκέλος Προκαταρκτικών Πειραμάτων	95
3.6.1.1	Βάκιλλοι (bacillus sp.)	96
3.6.1.2	Pantoea sp.	102
3.6.1.3	Pseudomonas sp.....	105
3.6.1.4	Cupriavidus και Ralstonia sp.....	108
3.6.2	2 ^ο Σκέλος Προκαταρκτικών Πειραμάτων	111
3.7	Πείραμα Βελτιστοποίησης Απόθεσης Ανθρακικού Ασβεστίου <i>Cupriavidus metallidurans</i> ACA-DC 4073	114
3.7.1	Εξαγωγή Βέλτιστου Σημείου	114
3.7.2	Τελικό Πείραμα Επιβεβαίωσης Βέλτιστου Σημείου.....	121
3.7.3	Δοκιμή Αντοχής Επικάλυψης με Εφαρμογή Υπερήχων	126
3.7.4	Λεπτές τομές δοκιμών και στοιχειακή ανάλυση	128
3.7.5	Χρωματική Αλλαγή στα Δοκίμια.....	130
3.7.6	Πειράματα Απόθεσης Ανθρακικού Ασβεστίου σε μη Αποστειρωμένες Συνθήκες.....	132

3.8	<i>Πείραμα Βελτιστοποίησης Απόθεσης Ανθρακικού Ασβεστίου Bacillus pumilus ACA-DC 4061</i>	135
3.8.1	Εξαγωγή Βέλτιστου Σημείου.....	135
3.8.2	Τελικό Πείραμα Επιβεβαίωσης Βέλτιστου Σημείου.....	143
3.8.3	Δοκιμή Αντοχής Επικάλυψης με Εφαρμογή Υπερήχων.....	149
3.8.4	Λεπτές τομές δοκιμών και στοιχειακή ανάλυση.....	151
3.8.5	Χρωματική Αλλαγή στα Δοκίμια.....	153
3.8.6	Πειράματα Απόθεσης Ανθρακικού Ασβεστίου σε μη Αποστειρωμένες Συνθήκες.....	155
4.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	157
4.1	<i>Μαρμάρινο Υπόστρωμα</i>	157
4.2	<i>Απομόνωση και Ταυτοποίηση Μικροοργανισμών</i>	158
4.3	<i>Ανάπτυξη Θρεπτικού για την Καταβύθιση Ανθρακικού Ασβεστίου</i>	163
4.4	<i>Προκαταρκτικά Πειράματα Απόθεσης Ανθρακικού Ασβεστίου</i>	165
4.4.1	1 ^ο Σκέλος Προκαταρκτικών Πειραμάτων.....	165
4.4.2	2 ^ο Σκέλος Προκαταρκτικών Πειραμάτων.....	167
4.5	<i>Στατιστικός Σχεδιασμός</i>	168
4.6	<i>Μεταβολισμός και Απόθεση Ανθρακικού Ασβεστίου</i>	170
4.7	<i>Μορφολογία Ανθρακικού Ασβεστίου</i>	171
4.8	<i>Αποτελέσματα Λεπτών Τομών</i>	178
4.9	<i>Αποτελέσματα Χρωματομετρίας</i>	179
4.10	<i>Αποτελέσματα Δοκιμών Απόθεσης σε μη Αποστειρωμένες Συνθήκες</i>	180
4.11	<i>Τελικά Συμπεράσματα</i>	183
5.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	186
6.	ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ	209

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διατριβή εντάσσεται στην ερευνητική δραστηριότητα που αναπτύσσεται στο Εργαστήριο Οργανικής Χημικής Τεχνολογίας, Τομέας IV της Σχολής Χημικών Μηχανικών, αποσκοπεί στην Έρευνα και Ανάπτυξη της χρήσης των βακτηρίων για την στερέωση πορωδών δομικών λίθων μέσω της βιοαπόθεσης ανθρακικού ασβεστίου και χρηματοδοτήθηκε μέσω του προγράμματος ΠΥΘΑΓΟΡΑΣ II. Στόχος από την έναρξη της έρευνας ήταν η δημιουργία μιας ισχυρής ερευνητικής συνεργασίας η οποία θα προσέδιδε μια όσο το δυνατόν συνολική προσέγγιση της σχετικά νέας διαδικασίας στη προστασία των μνημείων με την εκμετάλλευση μικροοργανισμών.

Τα πειράματα εκπονήθηκαν κυρίως στο Εργαστήριο Οργανικής Χημικής Τεχνολογίας του Τομέα IV της Σχολής Χημικών Μηχανικών και μέρος των αναλύσεων στο Οριζόντιο Εργαστήριο. Λόγω όμως της πολύπλευρης προσέγγισης της διατριβής, η έρευνα επεκτάθηκε στα εργαστήρια των συνεργαζόμενων ερευνητών. Η απομόνωση και ανάλυση του γενετικού υλικού των βακτηρίων ολοκληρώθηκε στο Ινστιτούτο Θαλάσσιας Βιολογίας, Βιοτεχνολογίας και Υδατοκαλλιεργειών (ΙΘΑΒΒΥΚ) του Ελληνικού Κέντρου Θαλασσίων Ερευνών (ΕΛΚΕΘΕ) στις Γούβες Ηρακλείου Κρήτης. Η ανάλυση δειγμάτων λίθου (ηλεκτρονική μικροσκοπία, λεπτές τομές και οπτική μικροσκοπία) πραγματοποιήθηκε στο Ινστιτούτο Γεωλογικών Μεταλλευτικών Ερευνών. Η ανάλυση ακτίνων Χ του σχηματιζόμενου υλικού από τους μικροοργανισμούς εκπονήθηκε στο εργαστήριο του Ινστιτούτου Ωκεανογραφίας στο Ελληνικό Κέντρο Θαλασσίων Ερευνών στην Ανάβυσσο Αττικής.

Επιβλέπων της διατριβής ήταν ο Αναπληρωτής Καθηγητής Φώτης Ρήγας, τον οποίο ευχαριστώ θερμά για την ανάθεση του θέματος, την εμπιστοσύνη που μου έδειξε όλα τα χρόνια και τις καίριες υποδείξεις του για την ολοκλήρωσή της. Τον ευχαριστώ για την εξαιρετική ερευνητική ομάδα που σχημάτισε μέσα από την οποία ολοκληρώθηκε η Διατριβή και μου δόθηκε η ευκαιρία να συνεργαστώ μαζί τους.

Ευχαριστώ τα μέλη της Τριμελούς Συμβουλευτικής μου Επιτροπής, Καθηγήτριες Αντωνία Μοροπούλου και Μαρία Λοϊζίδου, για την υποστήριξή τους κατά τη διάρκεια εκπόνησης της διατριβής.

Ευχαριστώ τις Θεοπίστη Λυμπεροπούλου και Καλλιόπη Μπαλτά του Οριζόντιου Εργαστηρίου της Σχολής, για την επιστημονική υποστήριξη στις αναλύσεις δειγμάτων και την άριστη εκπαίδευση των οργάνων που χρησιμοποίησα.

Την Καθηγήτρια Δανάη Ντούλια για τη βοήθεια που μου προσέφερε όλα τα χρόνια μέσα στο Εργαστήριο Οργανικής και Χημικής Τεχνολογίας. Την Δρ. Βασιλική Δρίτσα για τις χρήσιμες συμβουλές της και την Δρ. Κωνσταντίνα Παπαδοπούλου που συνεργαστήκαμε εξαιρετικά όλα τα χρόνια εκπόνησης των διδακτορικών μας δημιουργώντας μια βαθιά φιλία. Τους Κώστα Τζάθα, Χάρη Λεοντόπουλο και Στάθη Ανάγνο με τους οποίους δουλέψαμε παράλληλα τα πειραματικά μέρη των διδακτορικών μας βοηθώντας και καταλαβαίνοντας ο ένας τον άλλον ειδικά τις μέρες γεμάτες άγχος και αποτυχίες. Θέλω λίγο να σταθώ στον Στάθη Ανάγνο με τον οποίο μέσα στο εργαστήριο περάσαμε τις περισσότερες ώρες και τον οποίο τον ευχαριστώ ολόψυχα. Είναι κάτι παραπάνω από φίλος όντας η ήρεμη δύναμη, πάντα αισιόδοξος και πρόθυμος να βοηθήσει ανά πάσα στιγμή.

Ευχαριστώ τους Δρ. Αντώνη Μαγουλά Διευθυντή του ΙΘΑΒΒΥΚ και τον Δρ. Γιώργο Κωτούλα Διευθυντή Ερευνών του Ινστιτούτου για την εξαιρετική μας συνεργασία και την ευκαιρία που μου έδωσαν να δουλέψω στα εργαστήριά τους. Το ενδιαφέρον που έδειξαν στην έρευνα που πραγματοποίησα μου έδωσε ακόμα περισσότερη αυτοπεποίθηση να δουλέψω πιο σκληρά και να καταφέρω αποτελέσματα άριστα όπως αυτούς. Τους ευχαριστώ που βρήκα όλες τις πόρτες των εργαστηρίων ανοιχτές αλλά και την άμεση βοήθεια σε ότι χρειαζόμουν για να ολοκληρώσω τα πειράματά μου. Τους είμαι ευγνώμων που με σύστησαν στις Κατερίνα Σκαράκη και Δρ. Σίλια Αντωνίου οι οποίες με δίδαξαν με τον πιο άψογο τρόπο τον τομέα της Γενετικής. Ένα ακόμη ευχαριστώ στη Σίλια της οποίας η καθοδήγηση και συμβουλές κατά την πραγματοποίηση των πειραμάτων ήταν εξαιρετική. Η ηθική της στήριξη και η επιμονή της μου έδωσαν κουράγιο και πίστη για την επιτυχή ταυτοποίηση των βακτηρίων. Εύχομαι όλοι όσοι ξεκινούν τη προσπάθεια ενός Διδακτορικού να συναντούν ανθρώπους σαν την Σίλια και την Κατερίνα. Ευχαριστώ και τον Αναπληρωτή Καθηγητή Νίκο Πουλακάκη που την εποχή εκείνη βρισκόταν στο Yale και ολοκλήρωσε τον προσδιορισμό των παραγόμενων αλληλουχιών.

Είμαι ευγνώμων στους Ιωάννη Κατσίκη και Δρ. Γιώργο Οικονόμου στο Ινστιτούτο Γεωλογικών και Μεταλλευτικών Ερευνών που μου δίδαξαν το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο του Ινστιτούτου και για την εμπιστοσύνη τους να το χρησιμοποιώ μόνος μου, επιτρέποντάς μου

να αναλύσω εκατοντάδες δείγματα λίθου. Η πληθώρα φωτογραφιών για την κατανόηση της διαδικασίας απόθεσης θα ήταν ελλιπής χωρίς τη χρήση των εγκαταστάσεών τους.

Ευχαριστώ τον Δρ. Αριστομένη Καραγιώργη, Διευθυντή Έρευνας στο Ινστιτούτο Ωκεανογραφίας του ΕΛΚΕΘΕ για τη βοήθειά του με την ανάλυση δειγμάτων XRD αλλά και για τις πολύτιμες συμβουλές του κατά τη συγγραφή των δημοσιεύσεων. Οι συζητήσεις μας με βελτίωσαν όχι μόνο σαν ερευνητή αλλά και σαν άνθρωπο. Ευχαριστώ και τον Αλκιβιάδη Παπαγεωργίου του εργαστηρίου Ιζηματολογίας/Ακτίνων-Χ για την πραγματοποίηση των αναλύσεων.

Ευχαριστώ την Δρ. Αθηνά Μαυρίδου, Καθηγήτρια Μικροβιολογίας στο Τεχνολογικό Ίδρυμα Αθήνας, για τις προτάσεις και συμβουλές της στην ανάπτυξη των μικροβιολογικών πειραμάτων αλλά και για το μόνιμο ενδιαφέρον της για την εξέλιξη της δουλειάς μου.

Τον Δρ. Στέλιο Μπακόλα, Επίκουρο Καθηγητή της Σχολής Χημικών Μηχανικών, τον ευχαριστώ για όλα όσα μου δίδαξε για τον τομέα προστασίας και συντήρησης μνημείων. Επειδή η εκπόνηση ενός διδακτορικού σε μεγάλο ποσοστό είναι και θέμα ψυχολογίας, η συμπαράστασή του με βοήθησε να συνεχίσω και να μην σταματήσω να παλεύω για το καλύτερο αποτέλεσμα. Θεωρώ τη φιλία μας ένα από τα μεγαλύτερα κέρδη από την εκπόνηση αυτού του διδακτορικού και ελπίζω κάποια μέρα να μπορέσω να του ανταποδώσω έστω και ένα μικρό κομμάτι όσων μου προσέφερε.

Τον πιο ξεχωριστό ρόλο τον διαδραμάτισε η οικογένεια μου, οι γονείς μου Πόπη και Γιάννης και ο αδελφός μου Δημήτρης. Χωρίς αυτούς, το διδακτορικό δεν θα μπορούσε ποτέ να ολοκληρωθεί. Χαριτολογώντας πάντα τους έλεγα: «Ευτυχώς που κέρδισα την Υποτροφία Δασκαλάκη. Μεγάλοι Ευεργέτες». Φυσικά αυτό δεν απέχει καθόλου από την πραγματικότητα διότι μου έδωσαν την ευκαιρία να βρεθώ στην Αθήνα και να κάνω αυτό που ονειρευόμουν. Ποτέ δεν μου είπαν όχι και πάντα ήταν περήφανοι για μένα. Δεν θα μπορούσα να έχω καλύτερους συμπαραστάτες και πιστεύω ότι είναι περήφανοι που η «υποτροφία» τους απέδωσε αυτούς τους καρπούς. Τους ευχαριστώ από τα βάθη της καρδιάς μου και τους το αφιερώνω.

ABSTRACT

This PhD Thesis presents the development of a bio-consolidation methodology for stone monument protection. Research in the field of monument protection has been intensified the last two decades due to the demand of more environmental and substrate friendly restoration procedures, the need of resolving the effects of the microbiological factor in stone decay and its potential for bio-restoration due to its proved ability to promote calcium carbonate precipitation. The basic prerequisites of such methodologies are that it should not pose a negative effect upon the stone, should be easily implemented, fiscally viable and detectable after application.

The microorganisms presented were isolated from the ancient marble quarries of Pentelic marble and the Paiania cave in the outer district of Attiki, thus they are considered already adapted in the oligotrophic stone substrate. Sampling from the ancient quarry was performed during winter after rainfall in order to limit the sampling of microorganisms recently deposited via air transfer. Samples from the cave were collected during the same period taking advantage of the increase of percolating water from the cave ceiling that should activate the indigenous microflora. Isolation aimed for non-fastidious microorganisms, cultivable in a general growth medium. An holistic research approach could not be satisfied without a detailed bacterial identification. Therefore, genetic identification of the isolates has been re-developed aiming for the full or almost full 16S rDNA and not for a fragment as most published research in this field.

A series of different nutrient sources was investigated to develop the appropriate growth medium that would promote adequate growth and circumvent precipitation that was observed when using the B4 medium. The growth curve for the microorganisms was performed in order to detect the point of maximal growth in the selected medium. Subsequently, the first screening for calcium carbonate formation on solid and liquid cultures provided important preliminary insight for the morphology of the bio-precipitate and when the process is completed. The initial tests included three different growth medium concentrations, analyzing the time of acetate exhaustion, calcium immobilization, the pH, the crystal morphology of calcium carbonate formed and the color of the crystals. Based on these parameters, the best candidates were selected for further investigation.

Pentelic marble was selected as the test substrate because it has been the construction material of choice for some of the most renowned ancient monuments in Greece (e.g. the Parthenon). Monuments and statues from ancient Athens and other locations such as Delphi and Delos were constructed with Pentelic marble or marbles with similar physicochemical characteristics (Parian marble from Paros Island). Furthermore, it has not been tested for the colonization and biomineralization of microorganisms. One of the main characteristics is the low to negligible porosity. It is possible that this may be one of the factors why those monuments still stand in an open air environment. Low porosity provides a hostile environment for bacteria due to the fact that there are no sites for easy colonization. The only sites for early colonization will be presented to be the points of crystal fracture and change of crystal direction on the surface of the substrates.

Cupriavidus metallidurans ACA-DC 4073 and *Bacillus pumilus* ACA-DC 4061 were the bacteria selected considering quantitative parameters like the weight increase accomplished and qualitative parameters such as the non-color transfer on the new crystals from the growth solution and viability after nutrient exhaustion. A statistical model was applied in order to investigate its applicability for determining the optimal values of selected factors for biomineralization: growth medium concentration, inoculum concentration and incubation temperature. The model assisted in performing simultaneous experiments identifying the conditions under which each isolate could accomplish the maximum bio-precipitation of calcium carbonate. The optimum conditions were reviewed for their accuracy in a final experimental session. All samples from the final test were subjected in sonication treatment in order to check the coherence of the new material. Finally the bacteria were applied on a larger marble surface area by spraying under non-sterile conditions. This test was regarded as a preliminary *in situ* approach. The only parameter controlled was the incubation temperature.

Both selected isolates proved efficient in both liquid cultures and spraying application. Samples isolated from the first presented a considerable weight increase and the newly formed surface was resistant in sonication treatment. One of the main discoveries was the constant formation of vaterite from most bacteria when inoculated in the developed growth medium. Vaterite is considered as the least stable anhydrous calcium carbonate polymorph with calcite being the most stable one. Microbial involvement in precipitation procedure showed that it could stabilize vaterite. Samples analyzed with FT-IR after a few years did not show any difference. Furthermore, sonication did not alter the final morphology

Abstract

of the biomineral. Until recently, vaterite formation has been regarded as a defect and bacteria that promoted such biomineral were not considered as candidates for restoration purposes. Nevertheless, its formation has been highlighted recently from other research groups and this Thesis can be considered a further proof that bacteria stabilize vaterite that withstands sonication treatment and considered candidates for restoration techniques. Finally, *Cupriavidus metallidurans* ACA-DC 4073 and other isolates presented herein have not been isolated from a stone surface before. *Bacillus pumilus* ACA-DC 4061, although previously reported, its ability to considerably promote biomineralization of calcium carbonate has not been previously demonstrated.

The presented methodology can be considered successful based on the prerequisites suggested in the first paragraph of this summary. We aimed at:

- *The process should not pose a negative effect upon the stone:* we prove that the novel biomineral alter the substrate surface at a minimum level, while the color change can be controlled by the time of application.
- *Should be easily implemented:* each isolate tested can be prepared for spraying in a few days. Spraying itself presents an easy approach to cover from small to large surface areas. The growth medium suggested does not include selective ingredients and can be prepared promptly.
- *Should be fiscally viable:* The cost of the microorganism is negligible because it has been isolated from the environment, the cost of the growth medium has been reduced compared with the use of a selective medium. Furthermore, the time needed for preparation of all components does not add extra labor costs.
- *Should be detectable after application:* the consistent formation of vaterite presents this ability of the suggested application because its crystal structure can be differentiated from other calcium carbonate minerals. The figures of the thin sections presented herein show the distinct layer of the newly formed biomineral versus the marble substrate. Finally, FT-IR analysis which is a more direct approach can differentiate among calcite and vaterite.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα Διδακτορική Διατριβή αποτελεί μια συστηματική προσπάθεια ανάπτυξης μεθόδου αποκατάστασης λίθινων μνημείων με τη χρήση μικροοργανισμών. Τις τελευταίες δύο δεκαετίες η έρευνα στο συγκεκριμένο τομέα έχει ενταθεί, τόσο για να βρεθούν τρόποι συντήρησης συμβατότεροι ως προς το υπόστρωμα, όσο και για να εξακριβωθεί ο ρόλος του βακτηριακού παράγοντα στη διάβρωση, αλλά και στην εκμετάλλευση της ικανότητάς του να λειτουργεί ως πυρήνας σχηματισμού ανθρακικού ασβεστίου. Η επιδιωκόμενη μέθοδος χρειάζεται να μην επηρεάζει σημαντικά το λίθο, να είναι εύκολη και άμεση στην εφαρμογή της, οικονομικά βιώσιμη και ανιχνεύσιμη μετά την ολοκλήρωσή της, ώστε να παρακολουθείται εύκολα η πορεία χρονικά μετά την επέμβαση.

Οι μικροοργανισμοί απομονώθηκαν από τα αρχαία σημεία εξόρυξης Πεντελικού μαρμάρου και από το σπήλαιο της Παιανίας, έτσι ώστε να έχουν ήδη προσαρμοστεί στο ολιγότροφο περιβάλλον του λίθου. Από την Πεντέλη η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε χειμώνα μετά από έντονη βροχόπτωση, ώστε να μειωθούν οι μικροοργανισμοί οι οποίοι είχαν πρόσφατα επικαθίσει λόγω πιθανής μεταφοράς τους μέσω του αέρα. Την ίδια εποχή έγινε και η δειγματοληψία στο σπήλαιο της Παιανίας, όπου η ροή υδάτων από την επιφάνεια προς το εσωτερικό του σπηλαίου είχε ενεργοποιήσει τη μικροχλωρίδα. Η επιλογή έγινε για ετερότροφους μικροοργανισμούς οι οποίοι δεν έχουν απαιτητικές θρεπτικές αξιώσεις για την καλλιέργειά τους, ώστε να αρκούνται σε ένα γενικό θρεπτικό μέσο, μειώνοντας έτσι το εκτιμώμενο κόστος της διαδικασίας. Αναπτύχθηκε από την αρχή πλήρως η μεθοδολογία γενετικής ταυτοποίησης για στελέχη απομονωμένα από τα συγκεκριμένα υποστρώματα, διότι οι περισσότερες δημοσιεύσεις στον τομέα, δεν στόχευαν την αλληλούχηση σχεδόν ολόκληρου του 16S rDNA, αλλά ένα μικρό μέρος του. Επομένως, για μια ολοκληρωμένη προσέγγιση, κρίθηκε απαραίτητο να πραγματοποιηθεί ακριβέστερη ταυτοποίηση των μικροοργανισμών, προσέγγιση που να καθιστά την προτεινόμενη μέθοδο αποδεκτή από το σύνολο των ερευνητών.

Ακολούθησε η δημιουργία του νέου θρεπτικού διαλύματος. Δοκιμάστηκαν μια σειρά εναλλακτικών συστατικών και επιλέχθηκε ο βέλτιστος συνδυασμός για τη πλειονότητα των απομονωμένων βακτηρίων και ειδικά για αυτά που παρουσίαζαν ταχύτερο σχηματισμό ανθρακικού ασβεστίου σε στερεές καλλιέργειες. Μετά την ταυτοποίηση των

μικροοργανισμών και την εξέλιξη των θρεπτικών υγρών, έγινε έλεγχος της καμπύλης ανάπτυξης όλων των βακτηρίων σε υγρές καλλιέργειες, με σκοπό να εξακριβωθεί ο χρόνος στον οποίο το κάθε στέλεχος φτάνει στη μέγιστη πληθυσμιακή του κατάσταση. Ακολούθησαν οι πρώτες δοκιμές για απόθεση ανθρακικού ασβεστίου σε στερεές και υγρές καλλιέργειες, συγκεντρώνοντας σημαντικές πληροφορίες για την πολυμορφικότητα του βιολογικού και για το πότε ολοκληρώνεται η διαδικασία, λαμβάνοντας εξαρχής υπόψη ότι η βελτιστοποίηση αφορά και το χρόνο ολοκλήρωσης. Τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις θρεπτικού διαλύματος δοκιμάστηκαν αρχικά και αναλύθηκε διεξοδικά η μορφολογία, το είδος του ανθρακικού ασβεστίου, το χρώμα των κρυστάλλων, καθώς και οι μεταβολές του pH, της κατανάλωσης οξικού ανιόντος και της μείωσης του κατιόντος ασβεστίου σε συνάρτηση με το χρόνο. Με αυτόν τον τρόπο επελέγησαν οι μικροοργανισμοί με τις καλύτερες προϋποθέσεις.

Η επιλογή του μαρμάρου ως υπόστρωμα έγινε για τους εξής λόγους: πρώτον αποτελεί ένα υλικό από το οποίο έχουν κατασκευαστεί μνημεία πολιτιστικής κληρονομιάς παγκόσμιου βεληνεκούς, ειδικά στον Ελλαδικό χώρο, δεύτερον δεν έχει δοκιμαστεί διεξοδικά βάσει της υπάρχουσας βιβλιογραφίας για την ικανότητα απόθεσης μικροοργανισμών πάνω σε αυτό και τρίτον θεωρούμε ότι σε σχέση με πιο πορώδεις λίθους αποτελεί τη δυσκολότερη επιφάνεια στην οποία μπορούν να αποθέσουν οι μικροοργανισμοί λόγω των ελάχιστων πόρων που διαθέτει. Οι πόροι μπορούν να προσφέρουν την κατάλληλη θέση ώστε τα βακτήρια να μπορέσουν να έρθουν σε επαφή με το υπόστρωμα, να το εποικήσουν και να αρχίσουν τη διαδικασία σχηματισμού ανθρακικού ασβεστίου. Αυτή τη «φιλοξενία» το Πεντελικό μάρμαρο δεν την προσφέρει. Αντιθέτως τα μόνα σημεία, όπως θα παρουσιαστεί στα αποτελέσματα, είναι τα σημεία θραύσης των κρυστάλλων ανθρακικού ασβεστίου και όπου αλλάζουν διεύθυνση, σχηματίζοντας εσοχές.

Από τα προκαταρκτικά πειράματα, επιλέχθηκαν τελικά οι δύο αποδοτικότεροι μικροοργανισμοί *Cupriavidus metallidurans* ACA-DC 4073 και *Bacillus pumilus* ACA-DC 4061, λαμβάνοντας υπόψη ποσοτικές παραμέτρους, όπως συνολική απόθεση πάνω στο δοκίμιο, βιωσιμότητα του στελέχους, αλλά και ποιοτικές παραμέτρους όπως να μη μεταφέρεται χρώμα από τον μικροοργανισμό στους κρυστάλλους. Με την εφαρμογή στατιστικού σχεδιασμού πειραμάτων βελτιστοποιήθηκε η απόθεση ως προς τρεις παράγοντες: συγκέντρωση θρεπτικού, συγκέντρωση εμβολιασμού κυττάρων και θερμοκρασία. Η διαδικασία έδωσε τη δυνατότητα με μια σειρά ταυτόχρονων πειραμάτων να παρακολουθηθεί υπό ποιες συνθήκες οι μικροοργανισμοί απέδωσαν τη μέγιστη απόθεση. Οι

βέλτιστες συνθήκες που εντοπίστηκαν με το σχεδιασμό ελέγχθηκαν σε επιπλέον πείραμα για την εγκυρότητά τους και τα τελικά δείγματα αναλύθηκαν για την αντοχή του αποτεθέντος υλικού με την εφαρμογή υπερήχων. Τέλος, ως ολοκλήρωση της έρευνας, οι μικροοργανισμοί εφαρμόστηκαν σε μεγαλύτερη επιφάνεια μαρμάρου με ψεκασμό, σε μη αποστειρωμένες συνθήκες, ως προκαταρκτική προσομοίωση πραγματικής εφαρμογής των αποτελεσμάτων στο περιβάλλον. Το μόνο που διατηρήθηκε σταθερό ήταν η θερμοκρασία επώασης.

Και τα δύο στελέχη απέδωσαν ικανοποιητικά σε υγρές καλλιέργειες υπό τις βέλτιστες συνθήκες αλλά και κατά τον ψεκασμό τους. Όπως θα παρουσιαστεί στα αποτελέσματα, η απόθεση είναι σημαντική στην επιφάνεια του μαρμάρου και παραμένει σχεδόν ανέπαφη με την εφαρμογή των υπερήχων. Σημαντική ανακάλυψη επίσης, αποτελεί η συστηματική απόθεση βατερίτη και όχι ασβεστίτη από το σύνολο των μικροοργανισμών, με τη χρήση του προτεινόμενου θρεπτικού. Ο βατερίτης λόγω της αστάθειάς του θεωρείται ότι μετατρέπεται σχετικά σύντομα σε ασβεστίτη. Η παρέμβαση των μικροοργανισμών στη διαδικασία σχηματισμού, απέδειξε ότι ο βατερίτης παραμένει σταθερός για παρατεταμένο χρονικό διάστημα χωρίς να ανιχνεύεται κάτι διαφορετικό, ακόμα και μετά την εφαρμογή υπερήχων. Είναι μια σημαντική διαφοροποίηση, η οποία βιβλιογραφικά ξεκίνησε να γίνεται αποδεκτή μόλις πρόσφατα. Παλαιότερα, η απόθεση βατερίτη θεωρείτο μειονέκτημα και οι μικροοργανισμοί οι οποίοι σχημάτιζαν αυτή τη δομή, δεν θεωρούνταν ικανοί να αποδώσουν σε διαδικασίες προστασίας μνημείων. Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στη διατριβή αποδεικνύουν όμως το αντίθετο. Από τους δύο μικροοργανισμούς που τελικά χρησιμοποιήθηκαν, ο ένας (*Cupriavidus metallidurans* ACA-DC 4073) δεν έχει απομονωθεί στο παρελθόν από λίθινες επιφάνειες, όπως και ορισμένα από τα υπόλοιπα στελέχη που δοκιμάστηκαν. Επιπλέον ο *Bacillus pumilus* ACA-DC 4061 έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία, αλλά οι δυνατότητες απόθεσής του δεν είχαν αναλυθεί διεξοδικά.

Βάσει των προϋποθέσεων που τέθηκαν στην πρώτη παράγραφο της περίληψης μπορούμε να θεωρήσουμε επιτυχή τα αποτελέσματα, εφόσον η *επιδιωκόμενη μέθοδος*:

- *Απαιτείται να μην επηρεάζει σημαντικά το λίθο*: η διαδικασία απόθεσης διαφοροποίησε ελάχιστα τη μορφολογία της επιφάνειας ενώ η χρωματική μεταβολή για τα επιλεγμένα στελέχη μπορεί να ελεγχθεί βάσει του χρόνου εφαρμογής της μεθόδου.
- *Να είναι εύκολη και άμεση στην εφαρμογή της*: η προτεινόμενη προσέγγιση χρειάζεται μερικές ημέρες για να είναι το επιλεγμένο στέλεχος έτοιμο προς ψεκασμό, ενώ η

χρήση του ψεκασμού καθατού, προσφέρει άμεση κάλυψη μεγάλης επιφάνειας. Το θρεπτικό που χρησιμοποιείται μπορεί να παρασκευαστεί εύκολα και δεν χρειάζονται εξειδικευμένα συστατικά.

- *Να είναι οικονομικά βιώσιμη:* το κόστος του μικροοργανισμού είναι μηδαμινό, μιας και απομονώθηκε από το περιβάλλον, ενώ του θρεπτικού είναι περιορισμένο, σε σχέση με τη χρήση κάποιου εξειδικευμένου θρεπτικού, που θα χρειαζόταν ακριβότερα συστατικά. Επιπλέον, ο χρόνος παραγωγής ικανών ποσοτήτων βακτηρίου έτοιμου προς εφαρμογή, δεν θεωρείται ικανός να αυξήσει σημαντικά το κόστος.
- *Να είναι ανιχνεύσιμη μετά την ολοκλήρωσή της:* ο συστηματικός σχηματισμός βατερίτη προσφέρει αυτή τη δυνατότητα διότι η δομή του διαφοροποιείται από τη δομή του ανθρακικού ασβεστίου, αλλά και τυχόν προσμείξεων σε λίθινα υποστρώματα, τόσο του μαρμάρου, όσο και άλλων. Οι εικόνες λεπτών τομών αναδεικνύουν αυτήν τη δυνατότητα, καθώς η νέα απόθεση διαφοροποιείται σημαντικά και είναι ευκρινής στο οπτικό μικροσκόπιο. Επίσης, η ανάλυση με FT-IR, η οποία είναι αμεσότερη, δίνει τη δυνατότητα επιβεβαίωσης της διαφοροποίησης του βατερίτη από τον ασβεστίτη.

1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 Λίθος - Μάρμαρο.

Ο λίθος αποτελεί ένα από τα βασικά υλικά τα οποία χρησιμοποιήθηκαν εκτεταμένα για την κατασκευή κτιρίων, αλλά και έργων τέχνης. Ως υλικό κατατάσσεται σε τρεις βασικές κατηγορίες, βάσει της μεθόδου σχηματισμού της:

- Πυριγενής ή μαγματική, από την κρυστάλλωση μαγματικού υλικού το οποίο αποτελείται κυρίως από πυρίτιο.
- Ιζηματογενής, σχηματιζόμενη από την καθίζηση ή καταβύθιση υλικών, οργανικών και ανόργανων, τα οποία στη συνέχεια μετατρέπονται σε συμπαγές πέτρωμα (ασβεστόλιθος).
- Μεταμορφωσιγενής, που προέρχεται από την μεταμόρφωση των δύο παραπάνωκατηγοριών, λόγω ενδογενών γεωλογικών δυνάμεων και πραγματοποιείται με φυσικοχημικές διεργασίες, όπως το μάρμαρο (Winkler 1997; Δερμιτζάκης 1994).

Ειδικότερα, τα μάρμαρα, προέρχονται από τα αντίστοιχα ασβεστολιθικά πετρώματα, η μεταμόρφωση των οποίων προκύπτει σε συνθήκες υψηλής πίεσης, θερμοκρασίας στο εσωτερικό του φλοιού της Γης και τάσης από τη μετακίνηση των λιθοσφαιρικών πλακών. Το χημικό περιβάλλον και οι χημικές διεργασίες που πραγματοποιούνται, διαρκούν μεγάλο χρονικό διάστημα ώστε να προκύψει το τελικό ορυκτό, του οποίου τα χαρακτηριστικά εξαρτώνται από το μέγεθος και τη διάρκεια των αλλαγών που υπέστησαν. Για παράδειγμα, μπορεί να είναι λεπτόκοκκα έως χοντρόκοκκα και αυτό εξαρτάται από τη διάρκεια μεταμόρφωσης των μητρικών υλικών. Το μάρμαρο χαρακτηρίζεται ως ένα από τα πυκνότερα, βαρύτερα και ανθεκτικότερα πετρώματα και αποτελείται από ασβεστίτη και/ή δολομίτη. Η λευκότητα του μαρμάρου αντικατοπτρίζει και την καθαρότητά του από προσμείξεις άλλων συστατικών (Winkler 1997; Δερμιτζάκης 1994).

Το Πεντελικό και το Παριανό μάρμαρο πληρούν όλα τα παραπάνω χαρακτηριστικά, τα οποία και τα κατέστησαν ιδανικά για την κατασκευή κτιρίων και έργων τέχνης με ιδιαίτερη σημασία στην πολιτιστική κληρονομιά. Για το λόγο αυτό, επιλέχθηκε το Πεντελικό (σημείο εξόρυξης το βουνό Διόνυσος) για να χρησιμοποιηθεί και στα πειράματα. Ένας ακόμη λόγος, ήταν ότι δεν έχει δοκιμαστεί, καθώς το ελάχιστο πορώδες που το χαρακτηρίζει, καθιστά το Πεντελικό μάρμαρο, αφιλόξενο ως προς την εποίκιση από μικροοργανισμούς. Οι

τελευταίοι, όπως θα εξηγηθεί παρακάτω, μπορούν ευκολότερα να αναπτυχθούν σε σημεία όπως οι πόροι, στους οποίους προστατεύονται από περιβαλλοντικές και χημικές επιδράσεις.

1.2 Παράγοντες Διάβρωσης του Λίθου

Από τη στιγμή που ένα υλικό, όπως ο λίθος, απομονωθεί από το φυσικό περιβάλλον, δυνητικά αρχίζει και η διαδικασία διάβρωσής του. Οι παράγοντες που την επηρεάζουν είναι περιβαλλοντικοί, χημικοί και βιολογικοί.

1.2.1 Περιβαλλοντικοί Παράγοντες

Στους περιβαλλοντικούς παράγοντες, μπορούν να αναφερθούν: ο άνεμος, ο ήλιος και το νερό. Ο άνεμος, για παράδειγμα, επηρεάζει διότι απομακρύνει υλικό από την επιφάνεια του λίθου, μειώνοντας τη συνεκτικότητά του και ταυτόχρονα, η απομάκρυνση αυτή, μπορεί να παρασύρει επιπρόσθετο υλικό. Ο ήλιος, με την αυξομείωση της θερμοκρασίας στην επιφάνεια του υλικού, προκαλεί συστολή και διαστολή, με αποτέλεσμα μηχανικά να επηρεάζεται η δομή του λίθου. Το νερό, εισερχόμενο στο πορώδες δίκτυο του λίθου επηρεάζει, είτε μεταφέροντας ενώσεις στο εσωτερικό, είτε διαλυτοποιώντας το λίθο, είτε επιδρώντας μαζί με τις αυξομειώσεις της θερμοκρασίας. Είναι προφανές, ότι αυτό που παρατηρείται στο περιβάλλον, είναι ο συνδυασμός των επιδράσεων των παραπάνω παραγόντων. Το σημαντικότερο όμως, είναι όταν οι παράγοντες αυτοί εμπλέκονται με τους χημικούς και βιολογικούς, διότι οι επιδράσεις και συνέπειες είναι εντονότερες και γίνονται εμφανείς συντομότερα. Στην απλούστερη των περιπτώσεων, ο άνεμος μπορεί να μεταφέρει τα κατάλληλα «αντιδραστήρια» για να εξελιχθεί μια χημική ή βιολογική διαδικασία, η θερμοκρασία επιταχύνει σχεδόν όλες της αντιδράσεις οι οποίες μπορούν να πραγματοποιηθούν μέσω ανόργανων, οργανικών και βιολογικών επικαθίσεων και η υγρασία, μπορεί να δημιουργήσει το κατάλληλο υδατικό περιβάλλον για βιολογική ανάπτυξη ή αντίδραση χημικών παραγόντων.

1.2.2 Χημικοί Παράγοντες

Στους χημικούς παράγοντες μπορούν αρχικά να ενταχθούν τα άλατα χημικών στοιχείων, των οποίων η διαλυτότητα στο νερό, προκαλεί σημαντικές αλλαγές στη σύσταση του λίθου. Τα άλατα αυτά, μπορεί να υπάρχουν ήδη μέσα στο λίθο κατά την εξόρυξή της και αυξομειώνονται ανάλογα με τη διαδικασία που υφίσταται ο λίθος, έως την τελική χρήση της ως υλικό κατασκευής. Στη συνέχεια, τα άλατα συνεχίζουν να δρουν βάσει των περιβαλλοντικών και βιολογικών παραγόντων που καθορίζουν τη διαθεσιμότητα και δραστηριότητά τους, όπως είναι η εγγύτητα της θάλασσας, η οποία συνιστά σημαντική πηγή αλάτων στα Ελλαδικά μνημεία. Λόγω της διαλυτότητάς τους και της μεταφοράς τους από το νερό, μπορούν να επηρεάσουν επιφανειακά, αλλά και το εσωτερικό του δομικού ιστού του λίθου. Βασική διαδικασία επίδρασης των αλάτων στο λίθο, αποτελούν η κρυστάλλωση και η διάλυσή τους, κατά την απομάκρυνση ή αύξηση του νερού στην επιφάνεια ή το εσωτερικό του. Οι μεταβολές αυτές επιδρούν, για παράδειγμα, σχηματίζοντας στερεά άλατα τα οποία ασκούν πίεση στο υπόστρωμα. Η πίεση μπορεί να δημιουργήσει ρήγματα και τελικά αποκόλληση τεμαχίων λίθου. Επιπρόσθετα, μια άλλη διαδικασία η οποία μπορεί να συντελείται ταυτόχρονα, είναι η διαλυτοποίηση λίθου ή προσμίξεών του, εξαιτίας αύξησης της υγρασίας και η αντίδραση των ιόντων με τα άλατα που ήδη υπάρχουν, σχηματίζοντας άλλες ενώσεις (Winkler 1997). Ιδιαίτερη σημασία στην επίδραση των αλάτων, έχουν τα δομικά του χαρακτηριστικά, όπως το μέγεθος των πόρων και το συνολικό ποσοστό τους. Ανάλογα με την κατανομή τους και το μέγεθός τους, ένα άλας, όπως το χλωριούχο νάτριο, μπορεί να επιδράσει διαφορετικά. Μεγαλύτεροι πόροι, σημαίνουν μεγαλύτερη ποσότητα προσρόφησης υγρών, αλλά και ταχύτερης εξάτμισής τους με αποτέλεσμα να μην κρυσταλλώνεται το άλας σημαντικά στο εσωτερικό των πόρων, αλλά κυρίως στην επιφάνεια του υποστρώματος. Αντίθετα, σε λίθους με μικρότερο πορώδες, το χλωριούχο νάτριο μπορεί να προσροφάται ως διάλυμα σε μικρότερες ποσότητες, αλλά αποτίθεται στο εσωτερικό των πόρων κατά την εξάτμιση, καθώς δεν μπορεί να απομακρυνθεί ταχέως (Van et al. 2007).

Στους χημικούς παράγοντες μπορούν να καταταχθούν επίσης, όλες εκείνες οι διεργασίες που αφορούν ενώσεις προερχόμενες από ανθρωπογενή δραστηριότητα.

1.2.3 Ανθρωπογενής Δραστηριότητα

Ο ανθρώπινος παράγοντας, δυνητικά, συμμετέχει στη διάβρωση του λίθου από τη στιγμή που θα τον εξορύξει και θα τον επεξεργαστεί για τη χρήση του ως δομικό στοιχείο ή έργο τέχνης. Μετά όμως τη βιομηχανική επανάσταση και τη συνεχή διαφοροποίηση του περιβαλλοντικού ιστού των πόλεων, η επίδραση στις λίθινες κατασκευές είναι περισσότερο εμφανής. Για το λόγο αυτό, ερευνητικά, έχουν πραγματοποιηθεί σημαντικές προσπάθειες για την ανάλυση των συγκεντρώσεων των ρύπων από ανθρωπογενείς δραστηριότητες, τον τρόπο δράσης τους στο λίθο, την αλληλεπίδραση με φυσικούς παράγοντες και τελικά τις δυνατότητες αντιμετώπισής τους.

Η στοιχειακή ανάλυση επιφανειών με εμφανή διάβρωση, αναδεικνύει πληθώρα στοιχείων τα οποία αποτίθενται, ειδικά σε αστικές περιοχές, όπως Fe, Br, Pb, Zn (Sabbioni 1995). Ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες που έχει μελετηθεί είναι η όξινη βροχή, δηλαδή η κατακρήμνιση από την ατμόσφαιρα νερού στις διάφορες μορφές του, οι οποίες περιέχουν διαλυμένα θειικά, νιτρικά και άλλα οξείδια, μειώνοντας σημαντικά το pH του υγρού. Κύρια πηγή των ενώσεων αυτών, είναι η καύσεις των αυτοκινήτων και γενικότερα των ορυκτών καυσίμων (Bityukova 2006). Στην επαφή τους με το λίθο, προκαλούν τη διάλυσή του. Σημαντικό ρόλο παίζει η συγκέντρωση, η μορφολογία και δομή του υποστρώματος και το pH. Το αποτέλεσμα είναι ο σχηματισμός $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ και $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, των οποίων η διαλυτότητα είναι μεγαλύτερη, με αποτέλεσμα να παρασύρονται από το υπόστρωμα ή να παραμένουν εκεί, προκαλώντας αισθητικές διαφοροποιήσεις και/ή επιταχύνοντας τη διαδικασία διάβρωσης. Ο ρυθμός επίδρασης, επηρεάζεται σημαντικά και από κλιματικούς παράγοντες (Hamilton et al. 1995) και γενικότερα από το είδος της ένωσης που σχηματίζουν το θείο και το άζωτο. Έτσι, τα νιτρικά και θειικά οξέα προκαλούν σημαντικότερη διάβρωση σε σχέση με το SO_2 και NO_x (NO και NO_2) (Sikiotis and Kirkitsos 1995), μολονότι τα τελευταία θεωρούνται πρόδρομες ενώσεις των θεικών και νιτρικών οξέων. Ειδικότερα, το SO_2 διαλυόμενο στο νερό αποδίδει θειώδη ιόντα (SO_3^{-2}), τα οποία με τη σειρά τους μετατρέπονται σε θειικά ιόντα που μετατρέπουν το ασβεστολιθικό υπόστρωμα σε γύψο (Massey 1999). Εκτός από την όξινη βροχή, μπορεί να υπάρξει και αλκαλική προσβολή του υποστρώματος, συνήθως σε περιορισμένη επιφάνεια, όταν το pH του νερού είναι υψηλό, προκαλώντας το σχηματισμό $\text{Ca}(\text{OH})_2$, το οποίο είναι περισσότερο διαλυτό από το CaCO_3 (Σκουλικίδης 2000; Bityukova 2006).

Η αύξηση της εμφάνισης όξινης ή αλκαλικής βροχής οφείλεται στην καύση για παραγωγή ενέργειας (πετρέλαιο, βενζίνη, κάρβουνο και φυσικό αέριο) και στα κατάλοιπα από βιομηχανικές διαδικασίες, όπως η παραγωγή τσιμέντου και άλλων βιομηχανικών υλικών. Παράλληλα, εκλύονται οργανικές ενώσεις, οι οποίες επηρεάζουν σε σημαντικό βαθμό τη διάβρωση των λίθινων κατασκευών, καθώς αποτίθενται στην επιφάνειά τους σχηματίζοντας τις λεγόμενες «μαύρες στρώσεις». Η ανάλυση τέτοιων δειγμάτων απέδειξε ότι αποτελούνται από γύψο, μαζί με πληθώρα οργανικών ενώσεων, οι οποίες έχουν ταυτοποιηθεί ως αλκάνια, αλκένια, αρωματικοί υδρογονάνθρακες, πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες, οργανικά οξέα (Fobe et al. 1995; Schiavon et al. 2004; Gavino et al. 2004) σε συνδυασμό με τις προαναφερθέντες ανόργανες ενώσεις. Οι οργανικές ενώσεις που επικάθονται πάνω σε λίθινα υποστρώματα επιταχύνουν τη διαδικασία διάβρωσης, λειτουργώντας καταλυτικά στο σχηματισμό SO_3 , το οποίο παρουσία υγρασίας μετατρέπεται σε θειικό οξύ και στη συνέχεια σε γύψο, παρουσία ανθρακικών (Rodriguez-Navarro et al. 1996). Παρόλα αυτά, υπάρχουν και αντίθετα αποτελέσματα, που λειτουργούν «προστατευτικά», καθυστερώντας την επίδραση του SO_2 (Schiavon et al. 2004). Περαιτέρω έρευνες ως προς τη σύσταση των επικαθίσεων, αναδεικνύουν την πληθώρα οργανικών ενώσεων, οι οποίες δεν περιορίζονται στις προαναφερθέντες και προέρχονται, είτε από αντιδράσεις πάνω στην επιφάνεια του λίθου, είτε από την ατμόσφαιρα (Machill et al. 1997). Η ανάλυση μαύρων επικαθίσεων σε Πεντελικό μάρμαρο από τον Παρθενώνα επιβεβαιώνει όλα τα παραπάνω: γύψος με ασβεστίτη και πυριτικά άλατα αποτελούν τα βασικά στοιχεία του, τα οποία εμπλουτίστηκαν από βαρέα μέταλλα, οργανικές ενώσεις και ενώσεις που περιέχουν άζωτο, προερχόμενα από ανθρωπογενείς ή/και άλλες βιολογικές πορείες ζώων ή μικροοργανισμών (Kalaitzaki-Maravelaki 2005). Πολλές οργανικές ενώσεις επομένως, μπορούν να αποδοθούν και σε διαδικασίες που εμπλέκουν το βιολογικό παράγοντα, είτε άμεσα μέσω του μεταβολισμού του, είτε έμμεσα λειτουργώντας ο ίδιος ως συστατικό απόθεσης οργανικών μετά το θάνατό του (Garcia-Vallès et al. 1997).

1.2.4 Βιολογικός Παράγοντας

Στην κατηγορία αυτή, κατατάσσονται οι επιδράσεις οι οποίες αποδίδονται σε μικροοργανισμούς και πολυκύτταρους οργανισμούς.

Όσον αφορά τους πολυκύτταρους οργανισμούς, τα φυτά εποίκουν λίθους, εφόσον υπάρχει το κατάλληλο περιβάλλον για την ανάπτυξη του ριζικού τους συστήματος.

Επηρεάζουν σταδιακά λίθινες κατασκευές, με την απελευθέρωση ενώσεων που διαλυτοποιούν το λίθο, ώστε να απορροφήσουν μέταλλα απαραίτητα για την ανάπτυξή τους. Για να υπάρξει όμως ένα τέτοιο γεγονός, το υπόστρωμα χρειάζεται πρώτα να αποικηθεί από μικροοργανισμούς, βρύα και λειχήνες, οι οποίοι σταδιακά διαβρώνουν το υπόστρωμα, ώστε να υπάρξει ο αναγκαίος χώρος για την δημιουργία ριζών από τα φυτά (Allsopp et al. 2004). Επίσης περιττώματα πτηνών, επιδρούν στην επιφάνεια του λίθου, όχι μόνο λόγω του αλκαλικού pH, αλλά και των οργανικών ενώσεων που περιέχουν, οι οποίες είτε διαβρώνουν χημικά το υπόστρωμα, είτε λειτουργούν ως πηγή ενέργειας μικροοργανισμών, μυκήτων και βακτηρίων.

Οι λειχήνες είναι μύκητες οι οποίοι συμβιώνουν με φωτοσυνθετικούς μικροοργανισμούς όπως τα κυανοβακτήρια και πράσινες άλγες. Η συμβίωση αυτή τους καθιστά ανθεκτικούς οργανισμούς με αποτέλεσμα να συναντώνται σε ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες (Villar et al. 2004). Οι λειχήνες διαχωρίζονται σε είδη που αναπτύσσονται σε υποστρώματα ουδέτερου ή αλκαλικού pH (calicicolous) και όξινα (silicicolous) πετρώματα. Οι περιβαλλοντικές προϋποθέσεις ανάπτυξής τους είναι συγκεκριμένες για κάθε είδος, με αποτέλεσμα να παρατηρούνται διαφορετικά είδη ανάλογα με την εποχή και να αποτελούν ένδειξη περιβαλλοντικών αλλαγών. Η διάβρωση που προκαλούν είναι μηχανική και χημική. Η μηχανική παρεμβολή τους, οφείλεται στη διείδυση των υφών του μύκητα από το σημείο του υποστρώματος όπου αναπτύσσεται ο θαλλός. Ο τελευταίος, με τις διαδοχικές συστολές-διαστολές, βάσει της υγρασίας του περιβάλλοντος, επηρεάζει τη συνοχή του υποστρώματος. Οι λειχήνες, επηρεάζουν μέσω του μεταβολισμού των οργανισμών που τις αποτελούν. Παράγουν διοξείδιο του άνθρακα, οξαλικό οξύ, αλλά και μια σειρά οξέων τα οποία χαρακτηρίζονται ως «λειχηνικά» οξέα, διαβρώνοντας το λίθινο υπόστρωμα (Saiz-Jimenez 1999; Lisci et al. 2003).

Οι μύκητες, αποτελούν έναν από τους κυριότερους εποικιστές των λίθινων κτισμάτων με σοβαρές συνέπειες στην αισθητική και δομική κατάσταση των κτιρίων. Μπορούν να χαρακτηριστούν επιλιθικοί και ενδολιθικοί, ανάλογα με το αν αναπτύσσονται στην επιφάνεια ή μέσα στους πόρους και τις ρωγμές του λίθου. Στα μνημεία, οι κύριες κατηγορίες μυκήτων είναι οι Υφομύκητες (hyphomycetes), σε περιβάλλον το οποίο έχει υγρασία και οι «μεριστωματικοί μύκητες» (meristematic fungi) ή «μικροαποικιακής μορφολογίας μύκητες» (microcolonial fungi), σε ξηρότερο περιβάλλον (Sterflinger 2010). Ο χρωματισμός των τελευταίων είναι μαύρος, λόγω της μελανίνης που παράγουν, καθιστώντας τους ιδιαίτερα ανθεκτικούς στην υπεριώδη ακτινοβολία. Γενικότερα, διαθέτουν αξιοσημείωτες αντοχές σε

περιβαλλοντικές αλλαγές, όσον αφορά την υγρασία και τη διαθεσιμότητα θρεπτικών ουσιών (Urzi et al. 2000; Chertov et al. 2004). Λόγω της περιβαλλοντικής επιβάρυνσης με πληθώρα οργανικών ενώσεων και της επικάλυψης αυτών στην επιφάνεια του λίθου, οι μύκητες ως ετερότροφοι οργανισμοί, μπόρεσαν να αναπτυχθούν, χρησιμοποιώντας αυτούς ως πηγή ενέργειας. Η αφομοίωση των συστατικών αυτών, καταλήγει στην παραγωγή οξέων τα οποία διαβρώνουν το υπόστρωμα. Σε συνδυασμό με τις υφές, σταδιακά οι μύκητες εισχωρούν στο εσωτερικό του λίθου, δημιουργώντας κενά και οπές στη συνοχή του, με συνέπεια την απομάκρυνση θραυσμάτων. Η αργή διάλυση του υποστρώματος αποφέρει επίσης και τα απαραίτητα μέταλλα για την ανάπτυξή τους (Fomina et al. 2010; Gadd et al. 2010).

Οι παραπάνω διαδικασίες βιολογικής επίδρασης οργανισμών, δεν θα μπορούσαν να πραγματοποιηθούν με την ταχύτητα με την οποία εξελίσσονται στα λίθινα υποστρώματα, εάν δεν αλληλοϋποστηρίζονταν. Ένας από τους βασικότερους συνδετικούς κρίκους στην όλη διαδικασία, είναι οι μονοκύτταροι μικροοργανισμοί, δηλαδή τα βακτήρια. Παρόλο που ο λίθος αποτελεί ένα υπόστρωμα περιορισμένης θρεπτικής αξίας, η βιοποικιλότητα, όσον αφορά τα βακτήρια εκπλήσσει, ειδικά την τελευταία δεκαετία, οπότε εφαρμόστηκαν γενετικές τεχνικές ανίχνευσης των βακτηρίων. Οι τελευταίες, αύξησαν σημαντικά την ταυτοποίηση στελεχών, διότι δεν απαιτείται η εργαστηριακή καλλιέργειά τους, αλλά η απομόνωση και αλληλούχηση του ριβοσωμικού DNA. Τα βακτήρια που ανιχνεύονται στο λίθο, διαχωρίζονται σε φωτοαυτότροφα και ετερότροφα. Η πρώτη κατηγορία, αφορά βακτήρια τα οποία μπορούν να αναπτυχθούν χρησιμοποιώντας ως πηγή άνθρακα το διοξείδιο του άνθρακα και ενέργεια το φως. Τα ετερότροφα βακτήρια χρησιμοποιούν ως πηγή άνθρακα οργανικές ενώσεις. Η κατηγοριοποίηση των μικροοργανισμών εξειδικεύεται περαιτέρω ως προς τα μόρια τα οποία αφομοιώνει ο μικροοργανισμός, έτσι ώστε να μπορέσει να συνθέσει τα απαραίτητα για αυτόν βιολογικά συστατικά και να αναπτυχθεί (Καραγκούνη-Κύρτσου 1999; Henderson's Dictionary of Biological Terms 2000).

Εάν θεωρήσουμε την περίπτωση που ο λίθος έχει μόλις εξορυχθεί και ο μικροβιολογικός παράγοντας είναι περιορισμένος, τότε το υπόστρωμα αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί από φωτοαυτότροφους μικροοργανισμούς όπως τα κυανοβακτήρια. Το πλεονέκτημά τους είναι ότι χρειάζονται μόνο διοξείδιο του άνθρακα ως πηγή άνθρακα για το μεταβολισμό τους, με αποτέλεσμα να θεωρούνται ως οι πρώτοι εν δυνάμει μικροοργανισμοί οι οποίοι μπορούν να αναπτυχθούν σε ένα λίθινο υπόστρωμα. Η ανθεκτικότητά τους σε περιβαλλοντικές διακυμάνσεις είναι επίσης αποδεδειγμένη (Gaylarde and Morton 2002). Η παραγωγή βιομάζας από αυτούς, προσφέρει το κατάλληλο θρεπτικό περιβάλλον για την

ακόλουθη εποίκηση από ετερότροφους οργανισμούς. Αξίζει όμως να σημειωθεί, ότι η διαδοχική ανάπτυξη δεν είναι απαραίτητη. Ειδικά σήμερα, με την έντονη παραγωγή ανθρωπογενών οργανικών παραπροϊόντων, η ανάπτυξη οργανισμών κάθε είδους στο λίθο, είναι ταυτόχρονη και αλληλοϋποστηριζόμενη. Τα κυανοβακτήρια, θεωρούνται από τους μικροοργανισμούς που προκαλούν αλλοιώσεις και φθορές στα μνημεία, όπως αισθητικές, λόγω της παραγωγής χρωστικών. Για το λόγο ότι η επίδρασή τους είναι ορατή, αποτελούν αντικείμενο συστηματικής έρευνας, όσον αφορά τη βιοποικιλότητα στα μνημεία (Tomaselli et al. 2000; Macedo et al. 2009; McNamara et al. 2009). Επιπρόσθετα, επηρεάζουν και συνεισφέρουν στις βιογεωχημικές (biogeochemical) και βιογεωφυσικές (biogeophysical) διαδικασίες διάβρωσης του λίθου. Στην πρώτη κατηγορία, αντιστοιχεί η παραγωγή οργανικών οξέων τα οποία εκλύονται από τον μικροοργανισμό, είτε ως προϊόντα μεταβολισμού, είτε ως ενώσεις που τον βοηθούν στην απορρόφηση μετάλλων, οργανικών και ανόργανων ενώσεων, καθώς και στη διαδικασία εποίκησης βαθύτερα μέσα στους πόρους του υποστρώματος (Macedo et al. 2009). Στη δεύτερη κατηγορία, αντιστοιχούν οι χρωστικές ενώσεις και τα βιολογικά πολυμερή που παράγει ο μικροοργανισμός για την προστασία του [Βιοϋμένια (Biofilms) και εξωκυτταρικές πολυμερείς ενώσεις (Extracellular Polymeric Substances, EPS)] που επηρεάζουν τις φυσικές ιδιότητες του υποστρώματος (Warscheid and Braams 2000; Scheerer et al. 2009).

Τα Βιοϋμένια, αποτελούνται από τη συσσώρευση μικροοργανισμών που έρχονται σε επαφή μεταξύ τους σχηματίζοντας μια «κοινωνία» και από τις ενώσεις που εκκρίνονται από τους ίδιους τους μικροοργανισμούς, ώστε να προσκολλώνται στο υπόστρωμα. Οι ενώσεις αυτές, ονομάζονται εξωκυτταρικές πολυμερείς ενώσεις (EPS) και απαρτίζονται από πολυσακχαρίτες, λιποπολυσακχαρίτες, πρωτεΐνες, γλυκοπρωτεΐνες, λιπίδια, λιπαρά οξέα, νουκλειικά οξέα και ένζυμα. Η διεπιφάνεια που σχηματίζεται από το βιοϋμένιο, λειτουργεί ως προστατευτικό φράγμα απέναντι σε περιβαλλοντικές διακυμάνσεις, σε τοξικές ουσίες, καθώς και ως χώρος ανταλλαγής θρεπτικών συστατικών και συγκέντρωσης μεταβολισμένων ουσιών και μεταβολιτών (Warscheid and Braams 2000; Scheerer et al. 2009). Για το λόγο αυτό θεωρούνται ως ένας από τους σημαντικούς παράγοντες συσσώρευσης συστατικών, τα οποία μπορούν να αλληλεπιδράσουν με την επιφάνεια του υποστρώματος και έχουν μελετηθεί συστηματικά για την επίδρασή τους στη βιο-διάβρωση των λίθινων μνημείων και έργων τέχνης. Η παραγωγή τους πραγματοποιείται από την πλειονότητα των μικροοργανισμών, εφόσον οι συνθήκες το ευνοούν (Braissant et al. 2003; Ercole et al. 2007; Dupraz et al. 2009; Tourney et al. 2009; Abee et al. 2011).

1.3 Αντιμετώπιση της Μικροχλωρίδας που Επηρεάζει Αρνητικά τα Μνημεία

Η πιο «απλή» χρήση των γνώσεών μας για τους μικροοργανισμούς, είναι η ανίχνευση της μικροχλωρίδας στο υπό προστασία υπόστρωμα, ώστε να διαγνωστούν οι πιθανές επιλογές για τη μείωση αυτής, με τη χρήση φυσικών μεθόδων ή χημικών.

Στις φυσικές μεθόδους συγκαταλέγονται η μείωση της υγρασίας και της έκθεσης στο φως και στο οξυγόνο (Allsopp et al. 2004). Οι περιπτώσεις αφορούν μνημεία τα οποία μπορούν να μετακινηθούν σε ελεγχόμενο περιβάλλον και όχι για τα κτίρια. Με αυτόν τον τρόπο μπορεί να επιτευχθεί μείωση της διαβρωτικής δράσης μικροοργανισμών, ακόμα και αναστολή τους. Σε μικρότερα αντικείμενα, όπως βιβλία, η επίδραση αυξημένης θερμοκρασίας με χαμηλή υγρασία ή η απομόνωση σε περιβάλλον χωρίς οξυγόνο αποδίδουν ικανοποιητικά (Tiano, διαδικτυακό κείμενο). Γενικότερα, η αυστηρή παρακολούθηση των αντικειμένων σε ελεγχόμενο περιβάλλον, μπορεί να περιορίσει τη μικροχλωρίδα σε σημαντικό βαθμό, αλλά είναι ανέφικτο να επιτευχθεί αυτό για όλα τα προστατευόμενα αντικείμενα. Εναλλακτικά, μπορεί να χρησιμοποιηθεί η υπεριώδης ακτινοβολία (300 – 200 nm). Οι μικροοργανισμοί επηρεάζονται βάσει της φάσης ανάπτυξης στην οποία βρίσκονται και από το είδος της επιφάνειας. Σε περιπτώσεις που υπάρχουν ευαίσθητα αντικείμενα, επιλέγεται η ακτινοβολία στα 308 nm που προσφέρει μια ισορροπία ανάμεσα σε αποτελεσματική αποστείρωση και ελάχιστη καταστροφή υποστρώματος. Η μείωση της υγρασίας ευνοεί τη δράση της ακτινοβολίας (Belloni et al. 2006).

Επιπλέον, για να μειωθεί η επίδραση του μικροβιολογικού παράγοντα, εφαρμόζονται πολυμερείς ενώσεις που αδιαβροχοποιούν την επιφάνεια, μειώνοντας δραστικά τη συγκέντρωση του νερού (de Buergo Ballester and Conzález 2001; Manoudis et al. 2009) και ταυτόχρονα στερεοποιούν θραύσματα του υποστρώματος (Cardiano et al. 2005). Η επιλογή τους έχει ως βασικό πλεονέκτημα την παρατεταμένη διατήρηση συγκεκριμένων συνθηκών στην επιφάνεια, που δεν επιτρέπουν την ανάπτυξη μικροοργανισμών ή βοηθούν στον άμεσο καθαρισμό της επιφάνειας. Τα πολυμερή αποτελούν μια ομάδα χημικών μεθόδων. Σε αυτές, επίσης, περιλαμβάνονται όλες εκείνες οι ενώσεις, αέρια, υγρά ή σε σκόνη, οι οποίες επιδρούν στην δομή ή στο μεταβολισμό των μικροοργανισμών. Το “ιδανικό” βιοκτόνο θα πρέπει να πληροί μια σειρά προϋποθέσεων:

- Τοξικό στους υπό στόχο μικροοργανισμούς
- Μη τοξικό σε ανθρώπους, ζώα και φυτά
- Συμβατό με το υπο συντήρηση υλικό και να μην μεταβάλει το χρώμα ή τη σύστασή του
- Να είναι σταθερό σε κατάσταση αποθήκευσης και σε τυχόν αραιώσή του και
- Να είναι οικονομικά βιώσιμο (Allsopp et al. 2004).

Μέχρι στιγμής δεν έχει βρεθεί συστατικό το οποίο να μπορεί να καλύπτει το σύνολο των παραπάνω προϋποθέσεων.

Οι μηχανισμοί δράσης των βιοκτόνων κατηγοριοποιούνται στους παρακάτω:

- Οξειδωτικούς (λύση των κυτταρικών τοιχωμάτων και ενδοκυττάρων συστατικών)
- Προσβολή μεμβρανών κυττάρων (αποδιάταξη πρωτεϊνών, απενεργοποίηση ενζύμων, ιοντικών καναλιών, αποδιάταξη κυτταρικών τοιχωμάτων)
- Μεταβολικούς (αποδιάταξη πρωτεϊνών, αναστολές σύνθεσης πρωτεϊνών ή κυτταρικών συστατικών, αναστολή σύνθεσης DNA).

Μια πληθώρα ενώσεων μπορεί να επιδράσει σύμφωνα με τους παραπάνω τρόπους, όπως αλκοόλες, φαινόλες και ενώσεις προερχόμενες από αυτές, οργανικά οξέα, εστέρες, αλδεΐδες, και ετεροκυκλικές ενώσεις, όπως πυριδίνες ή οι θειαζόλες, υποκατεστημένες ή μη. Επίσης, ανόργανες ενώσεις όπως τα υποχλωρικά ανιόντα, υποβρωμικά ανιόντα, το βρώμιο και τα παράγωγά του, υπεροξειδία, ιωδοφόρα, μέταλλα και τα τεταρτοταγή-υποκατεστημένα αμμωνιακά άλατα αποτελούν πολύ δραστικές ενώσεις και είναι ευρέως διαδεδομένα (Barkley 1981; Videla 2002; Allsopp et al. 2004). Ειδικά τα τελευταία προσφέρουν ένα ευρύ φάσμα δράσης εναντίον βακτηρίων, μυκήτων, λειχήνων και αλγών. Πρόσφατα, μια εναλλακτική προσέγγιση που προτείνεται είναι η χρήση ενζύμων τα οποία παράγουν H_2O_2 κατά την εφαρμογή του. Η προτίμηση αυτής της μεθόδου έγκειται στον καλύτερο έλεγχο της αποδέσμευσης του H_2O_2 και μείωσης των εφαρμοζόμενων ποσοτήτων (Valentini et al. 2010). Οι ενώσεις που προτείνονται για την εφαρμογή σε μνημεία πολιτιστικής κληρονομιάς, επιβάλλεται να δοκιμαστούν εργαστηριακά, προσομοιώνοντας το υπόστρωμα και το μικροβιολογικό περιβάλλον που στοχεύεται (Blazquez et al. 2000, Urzi and De Leo 2007) ή σε μέρος του υποστρώματος στο χώρο εφαρμογής του μνημείου (Ascaso et al. 2002). Με αυτόν τον τρόπο εξασφαλίζεται η σωστή δοσολογία για άμεσα αποτελέσματα, καθώς και η ελαχιστοποίηση τυχόν αρνητικών συνεπειών που μπορεί να υποστεί το υπόστρωμα. Για

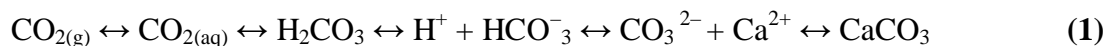
παράδειγμα, μέταλλα ή ανόργανα στοιχεία με οργανικούς υποκαταστάτες (ιοδωφόρα, τεταρτοταγή αμμωνιακά άλατα) τα οποία δρουν τοξικά απέναντι σε μικροοργανισμούς μπορεί να μεταβάλλουν το χρώμα του υποστρώματος. Ορισμένες οργανικές ενώσεις και τα παράγωγά τους μπορεί να θεωρηθούν οικο-τοξικές αλλά και πηγή ενέργειας για μικροοργανισμούς που θα επιβιώσουν μετά την εφαρμογή, ειδικά αυτές οι οποίες περιέχουν άζωτο. Ανόργανες ενώσεις, παρόλη την ευρύτατη δράση τους, μπορεί να σχηματίσουν άλατα στην επιφάνεια ή στο εσωτερικό του υποστρώματος προκαλώντας μηχανικές αλλαγές σε αυτό, καταστρέφοντας τη συνεκτικότητά του (Warscheid and Braams 2000; Scheerer et al. 2009). Παρόλα αυτά, η πληθώρα επιλογών που υπάρχουν προς εφαρμογή και οι εναλλακτικές οι οποίες συνεχώς ανακαλύπτονται, προσφέρουν τη δυνατότητα εύρεσης της βέλτιστης διαδικασίας για την αντιμετώπιση του μικροβιολογικού παράγοντα.

1.4 Ανθρακικό Ασβέστιο και η Σημασία του

Η Γη χρειάστηκε να διανύσει μια ιστορία δισεκατομμυρίων ετών διαρκούς μεταμόρφωσης και εξέλιξης η οποία οδήγησε στα σημερινά ορυκτά τα οποία γνωρίζουμε. Πιο συγκεκριμένα, το κρίσιμο σημείο «έκρηξης» της δημιουργίας νέων ορυκτών ήταν όταν αυξήθηκε περισσότερο από 1% η περιεκτικότητα της ατμόσφαιρας σε οξυγόνο (σε σχέση με τα σημερινά δεδομένα), πριν 2.4 δισεκατομμύρια χρόνια. Η αλλαγή αυτή που ονομάζεται «Μεγάλο Οξειδωτικό Γεγονός» (Great Oxidation Event), άλλαξε ριζικά την ορυκτολογία της γήινης επιφάνειας. Περισσότερα από 2500 ορυκτά περιλαμβάνουν νερό στην κρυσταλλική τους δομή (Hazen and Ferry 2010). Αυτό, σε συνδυασμό με την επίδραση του μικροβιολογικού παράγοντα που αναπτύχθηκε σε αερόβιες συνθήκες, συνέδραμαν στην εξέλιξη των ορυκτών όπως τα γνωρίζουμε σήμερα. Δείγματα απολιθωμάτων από εκείνη την εποχή, αποδεικνύουν ότι μια από τις πρώτες μονοκύτταρες μορφές ζωής ήταν τα κυανοβακτήρια. Τα κυανοβακτήρια, απέκτησαν τη δυνατότητα χρήσης του οξυγόνου, ως εξέλιξη της δυνατότητας που είχαν προηγουμένως οι μικροοργανισμοί, να χρησιμοποιούν κάποια μέταλλα για τη διαδικασία της αναπνοής σε ανοξικές συνθήκες. Παρόλα αυτά, δεν μπορούν να θεωρηθούν ως αποκλειστικοί παράγοντες οξυγόνωσης της ατμόσφαιρας, αλλά συμμετείχαν σημαντικά στην αύξησή του (Knoll 2003a) και συνεπώς στην εξέλιξη και των ορυκτών.

Το ανθρακικό ασβέστιο, συμμετέχει ενεργά στη βιολογική διαδικασία μέσω της ισορροπίας του περιβαλλοντικού pH. Πιο συγκεκριμένα, μείωση του pH θα πυροδοτήσει τη

διάλυση του ανθρακικού ασβεστίου, ώστε η αντίδραση με τα κατιόντα υδρογόνου να οδηγήσουν στο σχηματισμό διοξειδίου του άνθρακα και τη διαφυγή του στην ατμόσφαιρα. Αύξηση του pH, θα οδηγήσει στην αντίδραση των υδροξυλίων με κατιόντα υδρογόνου και την άμεση αντίδραση προς σχηματισμό ανθρακικού ασβεστίου σε υψηλές συγκεντρώσεις διτανθρακικών ανιόντων (αντίδραση 1).



Επομένως, με αυτόν τον τρόπο, ρυθμίζεται το pH του περιβάλλοντος διατηρώντας το κοντά σε ουδέτερες τιμές, οι οποίες με τη σειρά τους ενισχύουν τη επιβίωση των οργανισμών (Zavarzin 2002). Η περαιτέρω εμπλοκή του μικροβιολογικού παράγοντα στον κύκλο του ανθρακικού ασβεστίου, είναι ακόμη πιο πολύπλοκη και αφορά τα θρεπτικά συστατικά που υπάρχουν, το είδος του μεταβολισμού, τις κυτταρικές μεμβράνες των μικροοργανισμών και τον τρόπο με τον οποίο συμβιώνουν εντός της μικροβιολογικής πανίδας (Ehrlich 1998).

Τα κυανοβακτήρια μπορούν, εν μέρει, να θεωρηθούν ότι συμμετείχαν και στη δημιουργία του ανθρακικού ασβεστίου ως ορυκτού, αλλά και στη χρήση του, ή έστω την παρουσία του, σε συμβιωτικούς σχηματισμούς (Raven and Giordano 2009). Η εμφάνιση και εξέλιξη οργανισμών οι οποίοι χρησιμοποίησαν το ασβέστιο ως σκελετικό συστατικό, είτε με τη μορφή ανθρακικού ασβεστίου, είτε φωσφορικού ασβεστίου, θεωρείται ότι πραγματοποιήθηκε παράλληλα και δεν αποτελεί το ένα, εξέλιξη του άλλου. Οι λόγοι που οδήγησαν στη δημιουργία τέτοιων δομών, περιλαμβάνουν βιοχημικές ικανότητες των οργανισμών, αλλά και περιβαλλοντικές μεταβολές μέσα στο γεωλογικό χρόνο. Ως επί το πλείστον, η αναλογία ενεργειακού κόστους σχηματισμού, προς την απόδοση επιβίωσης από «εχθρικούς» οργανισμούς, μπορεί να θεωρηθεί σημαντικός παράγοντας εξέλιξης των διαδικασιών αυτών (Knoll 2003b). Πάντως, οι βιοχημικές διεργασίες που προκαλούν το σχηματισμό ανθρακικού ασβεστίου ή φωσφορικού ασβεστίου είναι παρόμοιες και μπορούν να θεωρηθούν ότι αναπτύχθηκαν αρχικά σε κατώτερους οργανισμούς και εξελίχθηκαν παράλληλα (Knoll 2003b; Dove 2010). Επίσης, είναι ενδεικτικό ότι η επιλογή δεν είναι τυχαία, διότι οι προαναφερθείσες ενώσεις ασβεστίου έχουν χαμηλές ενέργειες δεσμών και διαλυτότητα (Mann 2001). Επομένως, παρόλο το κόστος σύνθεσης τέτοιων υλικών, το τελικό κέρδος για τον οργανισμό είναι σημαντικό.

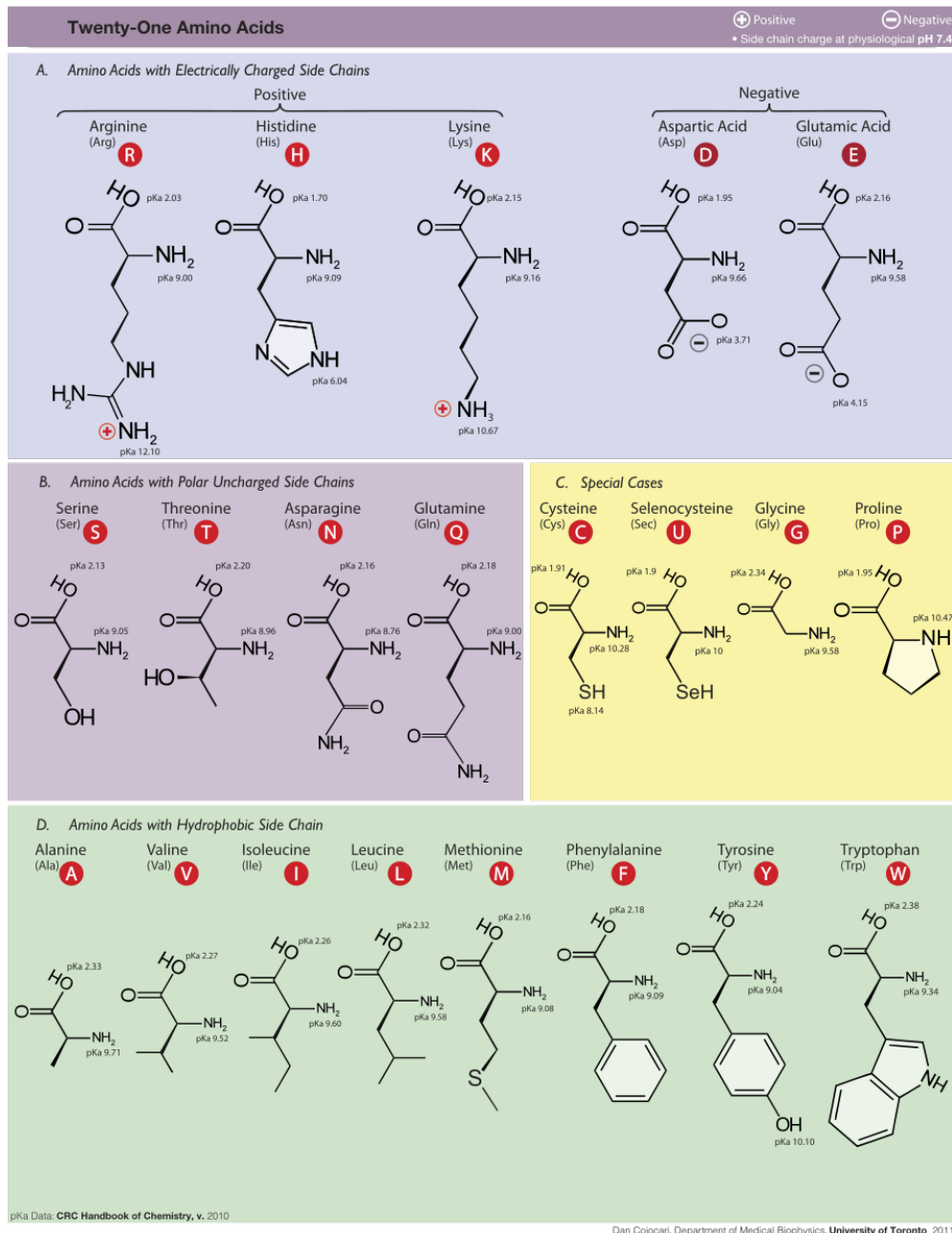
1.5 Μελέτες Κατανόησης της Βιολογικής Σύνθεσης Ανθρακικού Ασβεστίου με Στόχο τη Βιομίμησή του

Η σημασία της σύνθεσης των μορφών ανθρακικού ασβεστίου γίνεται εύκολα αντιληπτή, εάν αναλογιστεί κανείς τη σημασία που υπάρχει στην κατανόηση του τρόπου κατασκευής των μορφών ανθρακικού ασβεστίου και φωσφορικού ασβεστίου για τα σπονδυλωτά ζώα, συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου. Η βιο-μίμηση τέτοιων διαδικασιών, επιτρέπει την κατασκευή υλικών από απλά συστατικά, τα οποία διαθέτουν εξαιρετικές αντοχές και οι οποίες προέκυψαν από την εξέλιξη τους μέσα στο γεωλογικό χρόνο. Σήμερα, αυτά που παρατηρούνται στο περιβάλλον είναι τα επιτυχή αποτελέσματα που προσέφεραν τη δυνατότητα επιβίωσης (Ramachandra 2003). Για να γίνουν κατανοητές οι βιολογικές δομές και η διαδικασία σύνθεσης και τελικού σχηματισμού τους, γίνονται προσπάθειες με διάφορες προσεγγίσεις. Μια από αυτές είναι η ανάδειξη της αλληλεπίδρασης των βιολογικών μορίων και μεγαλομορίων με το προς διερεύνηση μέταλλο (ασβέστιο). Επιπλέον, οργανικές ενώσεις μικρού και μεγάλου μοριακού βάρους, διερευνώνται ως απλούστερες εκδοχές συνθετότερων διαδικασιών. Η βιβλιογραφία είναι σημαντική και συμπεριλαμβάνει περιπτώσεις που σταθεροποιείται ο βατερίτης, δεδομένου ότι αποτελεί συστηματικό προϊόν στα πειράματα του παρόντος διδακτορικού, με αξιοσημείωτη σταθερότητα.

1.5.1 Αμινοξέα

Η λευκίνη (Εικόνα 1), η οποία δεν διαθέτει φορτισμένη πλευρική αλυσίδα, μπορεί να σταθεροποιήσει το σχηματισμό βατερίτη, σε υπέρκορο διάλυμα ασβεστίου και ανθρακικού ανιόντος, στο οποίο προστέθηκε ποσότητα ασβεστίτη. Ο βατερίτης σχηματίζεται στην επιφάνεια του ασβεστίτη, ο οποίος προστίθεται τελευταίος στην αντίδραση ώστε να λειτουργήσει ως πυρήνας κρυστάλλωσης (Malkaj et al. 2004). Με ανάλογο τρόπο, το γλουταμικό οξύ (Manoli and Dalas 2001), το οποίο διαθέτει καρβοξυλομάδα στην πλευρική του αλυσίδα, όπως και το ασπαρτικό οξύ (Malkaj and Dalas 2004), σταθεροποιούν τον βατερίτη επηρεάζοντας θετικά τη δομή του με τις δύο καρβοξυλομάδες. Αντίστοιχη επιβεβαίωση για το L-ασπαρτικό οξύ, προήλθε και με διαφορετική διαδικασία ανάμειξης, όπου χλωριούχο ασβέστιο και διαφορετικές συγκεντρώσεις αμινοξέος προστέθηκαν σε διάλυμα Na_2CO_3 προκαλώντας τη σταθεροποίηση του βατερίτη. Η εξήγηση αποδίδεται στο γεγονός ότι το αμινοξύ αλληλεπιδρά ηλεκτροστατικά με το ασβέστιο και στη συνέχεια τα ανθρακικά ανιόν αντικαθιστά το αμινοξύ με πυρηνόφιλη υποκατάσταση, σχηματίζοντας βατερίτη. Το ελεύθερο αμινοξύ, στη συνέχεια, σταθεροποιεί τον κρύσταλλο, εμποδίζοντας τη

μετατροπή του στο σταθερότερο ασβεστίτη (Tong et al. 2004). Γλυκίνη και L-αλανίνη σταθεροποίησαν τη δομή του βατερίτη, όταν η αναλογία αμινοξέος/ασβεστίου ήταν 2 και πάνω. Αυτό εξηγείται από το γεγονός ότι σε $\text{pH} \geq 7$, η καρβοξυλομάδα είναι αρνητικά φορτισμένη και δρα ηλεκτροστατικά με το κατιόν του ασβεστίου. Για να υπάρξει ισορροπία, δύο καρβοξυλομάδες πρέπει να ενωθούν με το κατιόν του ασβεστίου, το οποίο στη συνέχεια αντικαθίσταται από τα ανθρακικά, όπως περιγράφηκε παραπάνω. Επομένως, είναι σημαντικό το ισοηλεκτρικό σημείο του κάθε αμινοξέος, συνδυαζόμενο με το pH του διαλύματος (Shivkumara et al. 2006). Η L-κυστεΐνη δεν επιδρά και προκαλεί την καταβύθιση ασβεστίτη, η L- τυροσίνη προκαλεί το σχηματισμό μίγματος βατερίτη-ασβεστίτη και η L-λυσίνη σχηματίζει σχεδόν αποκλειστικά βατερίτη σε ουδέτερο pH. Η εξήγηση γίνεται και εδώ βάσει των ισοηλεκτρικών σημείων του κάθε αμινοξέος. Για την L-λυσίνη για παράδειγμα ($\text{pI}=9.82$) και οι δύο αμινομάδες είναι θετικά φορτισμένες σε ουδέτερο pH, έλκοντας ηλεκτροστατικά ανθρακικά ανιόντα. Συνεπώς, προκαλούν την εμφάνιση τοπικά υπερκορεσμού με αποτέλεσμα να σχηματίζεται ανθρακικό ασβέστιο με τη μορφή βατερίτη, ο οποίος σταθεροποιείται με την επίδραση των αμινοξέων στην επιφάνεια του κρυστάλλου (Tong et al. 2004; Xie et al. 2005).



Εικόνα 1: Λίστα αμινοξέων.

Από τα προαναφερθέντα αποτελέσματα του τρόπου που επηρεάζουν τα αμινοξέα, μπορεί να παρατηρηθεί ότι τα στερεοϊσομερή τους, μπορεί να λειτουργούν με διαφορετικό τρόπο απέναντι στο σχηματισμό ανθρακικού ασβεστίου. Οι Wolf et al. (2007) διερεύνησαν αυτή τη διαδικασία και επιβεβαίωσαν τη συγκεκριμένη υπόθεση. Η L-αλανίνη σταθεροποιεί το βατερίτη, ενώ το D-στερεοϊσομερές, τον ασβεστίτη. Τα αμινοξέα L-προλίνη, L-βαλίνη και L-α-αμινοβουτυρικό οξύ σταθεροποιούν τον αραγονίτη, σε αντίθεση με τα D- που

προκαλούν την καταβύθιση αποκλειστικά ασβεστίτη. Σημειώνεται ότι πειραματικά, η διαδικασία που ακολουθήθηκε ονομάζεται «αργής διάχυσης», όπου αμινοξύ και ασβέστιο είναι διαλυμένα σε νερό και το ανθρακικό αμμώνιο σε διαφορετικό δοχείο. Τα αντιδρώντα τοποθετούνται σε ξηραντήρα, όπου στον πυθμένα βρίσκεται το ανθρακικό αμμώνιο και η αντίδραση γίνεται αργά, με τη διάχυση των ατμών από τη διάσπαση του ανθρακικού αμμωνίου και τη διάλυση των συστατικών στο διάλυμα που περιέχει ασβέστιο - αμινοξύ. Και εδώ αποδείχθηκε ότι τα αμινοξέα επιδρούν στην επιφάνεια ανάπτυξης του κρυστάλλου. Η επίδραση, δεν επιτρέπει ουσιαστικά την διάλυση του βατερίτη σε διάλυμα και τη μετατροπή του στη σταθερότερη δομή, διότι αυξάνεται η ενέργεια που χρειάζεται να γίνει η διαδικασία. Τα αμινοξέα δεν συμμετέχουν στην κρυσταλλική δομή, αλλά επηρεάζουν μόνο την επιφάνεια στην οποία προστίθενται ανθρακικά και ασβέστιο για την ανάπτυξη του κρυστάλλου (Wolf et al. 2007).

1.5.2 Ολιγοπεπτίδια

Τα ολιγοπεπτίδια, αναπόφευκτα θα επηρεάζουν και αυτά σημαντικά τη μορφολογία, πιθανώς ως αποτέλεσμα των συνεργιών των αμινοξέων που τα απαρτίζουν, αλλά και των στερεοχημικών επιδράσεων των στερεοϊσομερών του κάθε αμινοξέος που συμμετέχει. Οι Li et al. (2002), χρησιμοποίησαν βιβλιοθήκη 15-μερών όξινων ολιγοπεπτιδίων, για να διερευνηθεί ο βαθμός επιρροής τους στο σχηματισμό ανθρακικού ασβεστίου. Ο βατερίτης σχηματίστηκε και παρέμεινε σταθερός για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα παρουσία ολιγοπεπτιδίου σε υδατικά διαλύματα. Αντίθετα, απουσία ύδατος, το βατερίτης δεν μεταβλήθηκε σε ασβεστίτη, γεγονός που υποδεικνύει ότι η διαδικασία μετατροπής έγινε μέσω της διάλυσης και ανακρυστάλλωσής του. Η επίδραση των ολιγοπεπτιδίων γίνεται στην έναρξη της διαδικασίας κατά το σχηματισμό των πρώτων κρυστάλλων βατερίτη. Εάν δεν υπάρχουν εκείνη τη στιγμή τα ολιγοπεπτίδια, η διαδικασία δεν μπορεί αργότερα να διακοπεί και ο μετασχηματισμός σε ασβεστίτη εξελίσσεται ομαλά (Li et al. 2002). Η χρήση 12-μερών βασικών ή ουδέτερων ολιγοπεπτιδίων, επιβεβαίωσε την επίδραση αυτών στη πολυμορφικότητα του σχηματιζόμενου υλικού, αλλά όχι στο επίπεδο της αλληλεπίδρασης των ιόντων ασβεστίου με το πολυπεπτίδιο. Δηλαδή, μια πρόδρομη σύνδεση ανθρακικού ασβεστίου προϋπάρχει βάσει του pH και στην οποία πάνω επιδρά η «εκλεκτικότητα» των ολιγοπεπτιδίων στη σταθεροποίηση της τελικής μορφής του υλικού (Gebauer et al. 2009).

1.5.3 Οργανικά Μακρομόρια

Τα οργανικά οξέα επηρεάζουν τη μορφολογία του ανθρακικού ασβεστίου. Κατά τη σύνθεση ασβεστίτη, καρβοξυλικά οξέα από οξικό (αιθανοϊκό) οξύ έως πεντανοϊκό οξύ, επηρέασαν τη μορφολογία των κρυστάλλων, προωθώντας το σχηματισμό ασβεστίτη στο διάλυμα (Henderson et al. 2008). Προχωρώντας σε μεγαλύτερες ανθρακικές αλυσίδες, η σταθερότητα του βατερίτη αυξάνεται. Η χρήση, για παράδειγμα, πολύ-ακρυλικού οξέος, προκάλεσε το σχηματισμό του βατερίτη σε διάλυμα με τα κατάλληλα ανόργανα αντιδραστήρια, αποδεικνύοντας ότι καρβοξυλομάδες μπορούν να έχουν και διαφορετική επίδραση από μονομερή οργανικά οξέα (Pecher et al. 2009). Μια επιπλέον προσέγγιση, αποτελούν τα οργανικά μακρομόρια, τα οποία δεν περιλαμβάνουν αμινοξέα, αλλά οργανικές ενώσεις όπως λιπαρά οξέα και παράγωγά τους. Ανάλογα αυτών υπάρχουν στις κυτταρικές μεμβράνες των βακτηρίων. Οι μονο-στοιβάδες Langmuir αποτελούν χρήσιμα ερευνητικά εργαλεία για την κατανόηση της αλληλεπίδρασης οργανικών μακρομορίων με το ασβέστιο, που έχουν σαν αποτέλεσμα τον προσανατολισμένο σχηματισμό ανθρακικού ασβεστίου (Mann 2001). Μια από τις πρωτοποριακές εργασίες σε αυτόν τον τομέα, απέδειξε ότι μονοστοιβάδες στεατικού οξέος, όταν σχημάτισαν τη διάταξη Langmuir, σταθεροποίησαν σε υπερκορεσμένο διάλυμα, το σχηματισμό βατερίτη αντί για ασβεστίτη. Οι υδρόφιλες καρβοξυλομάδες του οξέος, σε διάταξη, προκάλεσαν τη συγκέντρωση των κατιόντων ασβεστίου, με αποτέλεσμα οι διαστάσεις των μορίων των καρβοξυλίων να ενισχύσουν το σχηματισμό του κρυστάλλου του βατερίτη, αντί για τον κρύσταλλο του ασβεστίτη (Mann et al. 1988). Κάτι ανάλογο παρατηρήθηκε και όταν χρησιμοποιήθηκε το πολυμερές πολύ-ακρυλαμίδιο – ακρυλικό οξύ. Η προσθήκη του ακρυλικού οξέος στη σύνθεση του πολύ-ακρυλαμιδίου, πρόσθεσε καρβοξυλομάδες, οι οποίες επηρέασαν την πορεία σχηματισμού ασβεστίτη, σχηματίζοντας στα αρχικά στάδια μίγμα βατερίτη – ασβεστίτη. Επομένως, στη συγκεκριμένη δομή πολυμερούς, για ορισμένο χρονικό διάστημα, ο βατερίτης παρέμεινε σταθερός (Grassmann and Löbmann 2004).

Ανάλογα αποτελέσματα προέκυψαν όταν δοκιμάστηκαν φωσφολιπιδικές μονοστοιβάδες και η αναλυτικότερη μελέτη τους αποκάλυψε διαφορετικούς σχηματισμούς ανάλογα την πίεση που ασκείται στη στοιβάδα, καθορίζοντας τη διάταξη των μορίων της. Αυτό έχει σαν συνέπεια το άμορφο ανθρακικό ασβέστιο να μπορεί να μετατραπεί σε βατερίτη. Οι πρώτοι κρύσταλλοι βατερίτη ανιχνεύθηκαν, όταν με μηδενική πίεση επί της φωσφολιπιδικής μονοστοιβάδας, η απομάκρυνση του CO₂ ήταν αρκετά γρήγορη, ώστε να δημιουργηθεί τοπικά υπερκορεσμός, άρα να σχηματιστεί αρχικά ο ασταθέστερος

κρύσταλλος, στη διεπιφάνεια αέρα – νερού. Όταν όμως η μονοστοιβάδα απέκτησε συγκεκριμένη διάταξη, ο βατερίτης επικράτησε έως το μέγεθος των κρυστάλλων να αυξηθεί τόσο, ώστε να γίνει ασταθές και να μετατραπούν σε ασβεστίτη μέσω της διαδικασίας επαναδιαλυτοποίησης – ανακρυστάλλωσης. Εναλλακτικά όμως, παρατηρήθηκε και η περαιτέρω σταθεροποίηση του βατερίτη, η οποία αποδόθηκε στην άμεση εμπλοκή της φωσφολιπιδικής στοιβάδας, στη μείωση της επιφανειακής ενέργειας των κρυστάλλων. Η μείωση αυτή, αποτρέπει κινητικά τη μετατροπή των κρυστάλλων σε ασβεστίτη. Η όλη διαδικασία μπορεί να αντιστοιχιστεί στις κυτταρικές μεμβράνες και πώς αυτές ρυθμίζουν το σχηματισμό της εκάστοτε δομής, μέσω των δομικών τους συστατικών και των βιομορίων, ασκώντας τις κατάλληλες πιέσεις αλλά και το ρυθμό απομάκρυνσης CO₂ που παραπέμπει στον μεταβολισμό (Xiao et al. 2009). Παλαιότερα, είχε αποδειχθεί ότι τα φωσφορικά ανιόντα μπορούν να επιδράσουν στην ταχύτητα μετασχηματισμού βατερίτη προς ασβεστίτη, μειώνοντάς την (Katsifaras and Spanos 1999). Αντίθετα, μόρια DNA δεν βρέθηκε να σταθεροποιούν καμία άλλη μορφή ανθρακικού ασβεστίου, πλην του ασβεστίτη. Η επίδρασή τους «περιορίστηκε» στη μορφολογία και το μέγεθος των κρυστάλλων (Cheng et al. 2010).

1.5.4 Πρωτεΐνες

Η ανάλυση πρωτεϊνών από σημεία όπου παράγεται βιολογικά βατερίτης, αποτελούν μια σημαντική πηγή στη διερεύνηση του τρόπου χρήσης του και σταθεροποίησής του από τους οργανισμούς. Η απομόνωση υδατοδιαλυτών γλυκο-πρωτεϊνών (πρωτεΐνες που μετά τη σύνθεσή τους μεταβάλλονται ενζυματικά με προσθήκη αλυσίδων ολιγοσακχαριτών) από μαργαριτάρια, απέδειξε ότι επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό το σχηματισμό του βατερίτη, συμμετέχοντας στη σταθερότητά του, διότι αυτές ανιχνεύτηκαν στο εσωτερικό των σχηματισμένων κρυστάλλων. Η δυνατότητα αυτή μπορεί να αποδοθεί στο βαθμό ολιγοσακχαριτών που υπάρχουν και αλληλεπιδρούν με τα ιόντα, διότι αντίστοιχες έρευνες έδειξαν ότι η απουσία τους δεν προσφέρει τη συγκεκριμένη εκλεκτικότητα (Natoli et al. 2010). Επιπρόσθετα, στο κόκκαλο του αυτιού των ψαριών (τον «αυτόλιθο»), ο βατερίτης εμφανίζεται σε συνδυασμό με αραγονίτη. Απομόνωση όξινων μακρομορίων έδειξε, ότι ο βατερίτης βρίσκεται σε άμεση σχέση με τις πρωτεΐνες που διαθέτουν υψηλότερη αναλογία στα αμινοξέα γλουταμινικό και γλουταμίνη, οι οποίες προφανώς επιδρούν στη σταθερότητά του. Σε ποιο βαθμό, αυτό είναι άγνωστο (Falini et al. 2005). Μια άλλη πρωτεΐνη, η οποία περιλαμβάνει αμινοξέα που αναφέρθηκαν παραπάνω ότι σταθεροποιούν τον βατερίτη, είναι

η φιβροΐνη του μεταξιού (Wu et al. 2011). Επιπλέον, η θειική χονδροϊτίνη (Manoli and Dalas 2000) που είναι μακρομόριο σακχάρων ενισχύει εργαστηριακά το σχηματισμό βατερίτη.

1.6 Ετερότροφα Βακτήρια

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, τα βακτήρια μπορούν να κατηγοριοποιηθούν βάσει των μεταβολικών τους χαρακτηριστικών, δηλαδή ποια πηγή ενέργειας, άνθρακα και ηλεκτρονίων χρησιμοποιούν (Πίνακας 1).

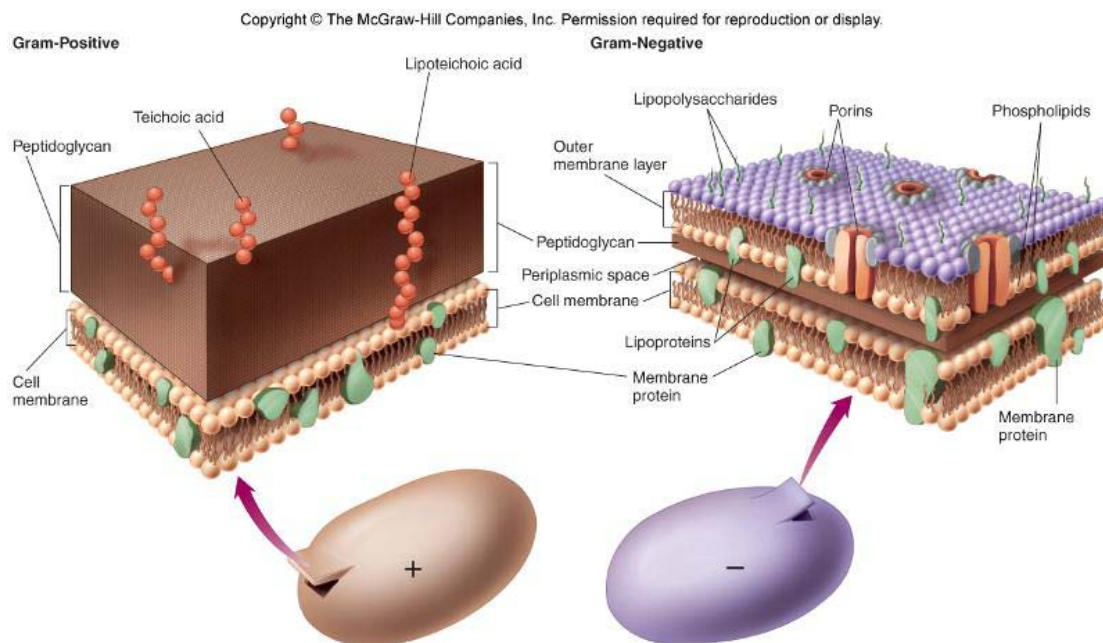
Τα κυανοβακτήρια κατατάσσονται στους φωτολιθοαυτότροφους μικροοργανισμούς, διότι χρησιμοποιούν ως πηγή ενέργειας τον ήλιο, πηγή άνθρακα το διοξείδιο του άνθρακα και πηγή ηλεκτρονίων μπορεί να είναι το νερό, με παραπροϊόν διάσπασής του το οξυγόνο. Οι μικροοργανισμοί που θα αναφερθούν με λεπτομέρεια παρακάτω, ανήκουν στους χημειοετερότροφους μικροοργανισμούς, όπου κατατάσσονται και τα περισσότερα μη φωτοσυνθετικά βακτήρια. Το βασικότερο χαρακτηριστικό τους είναι ότι χρησιμοποιούν οργανικές ενώσεις ως πηγές άνθρακα, υδρογόνου και γενικότερα ηλεκτρονίων. Παρόλα αυτά, διαθέτουν την ικανότητα να διαφοροποιούν το μεταβολισμό τους ανάλογα με τις περιβαλλοντικές συνθήκες και τις διαθέσιμες πηγές ενέργειας. Όλοι οι μικροοργανισμοί αυτοί είναι αερόβιοι μικροοργανισμοί, δηλαδή δεν αναπτύσσονται σε συνθήκες έλλειψης οξυγόνου.

Πίνακας 1: Κατάταξη μικροοργανισμών βάσει των μεταβολικών χαρακτηριστικών (Καραγκούνη-Κύρτσου 1999).

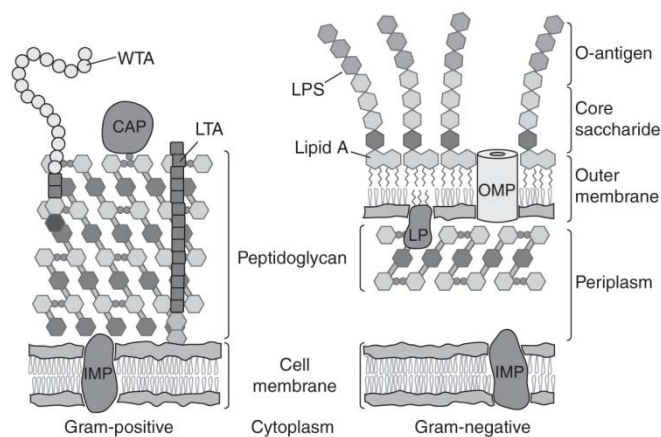
<i>Πηγή ενέργειας</i>	<i>Πηγή υδρογόνου ή/και ηλεκτρονίων</i>	<i>Πηγή άνθρακα</i>	<i>Ονομασία</i>
Φως Φωτο-	Οργανική -οργανο-	Οργανική -ετερότροφος	Φωτοοργανοετερότροφος
		Διοξείδιο άνθρακα -αυτότροφος	Φωτοοργανοαυτότροφος
	Ανόργανη -λιθο	Οργανική -ετερότροφος	Φωτολιθοετερότροφος
		Διοξείδιο άνθρακα -αυτότροφος	Φωτολιθοαυτότροφος
Χημικές ενώσεις οργανικές ή ανόργανες Χημιο-	Οργανική -οργανο-	Οργανική -ετερότροφος	Χημιοοργανοετερότροφος
		Διοξείδιο άνθρακα -αυτότροφος	Χημιοοργανοαυτότροφος
	Ανόργανη -λιθο	Οργανική -ετερότροφος	Χημιολιθοετερότροφος
		Διοξείδιο άνθρακα -αυτότροφος	Χημιολιθοαυτότροφος

1.7 Δομή Κυτταρικών Τοιχωμάτων

Ένας άλλος διαχωρισμός των μικροοργανισμών αποτελεί και η χρώση κατά Gram. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, οι μικροοργανισμοί διαχωρίζονται βάσει της αντίδρασης που έχει η κυτταρική τους μεμβράνη, απέναντι στη χρωστική «κρυσταλλικό ιώδες». Οι Gram-θετικοί μικροοργανισμοί, διατηρούν το χρωματισμό που αποκτούν κατά την έκπλυση με οργανικό διαλύτη, ενώ οι Gram-αρνητικοί, χάνουν τη χρώση τους. Η βασική διαφορά των δύο κυτταρικών μεμβρανών είναι ως προς τη δομή τους, η οποία ανταποκρίνεται και στη χρωστική (Εικόνα 2).



Εικόνα 2: Δομή και σύσταση του κυτταρικού περιβλήματος των βακτηρίων. Αριστερά είναι οι Gram-θετικοί και δεξιά οι Gram-αρνητικοί μικροοργανισμοί. Cell membrane: κυτταρική μεμβράνη. Peptidoglycan: πεπτιδογλυκάνη. Teichoic acid: τειχικό οξύ. Lipoteichoic acid: λιποτειχικό οξύ. Membrane protein: μεμβρανική πρωτεΐνη. Lipoproteins: λιποπρωτεΐνες. Periplasmic space: περιπλασματικός χώρος. Outer membrane layer: εξωτερική μεμβρανική στοιβάδα. Lipopolysaccharides: λιποπολυσακχαρίτες. Porins: πορίνες. Phospholipids: φωσφολιπίδια.



Εικόνα 3: Κάθετη τομή του κυτταρικού περιβλήματος Gram-θετικών (αριστερά) και Gram-αρνητικών (δεξιά) βακτηρίων; CAP (covalently attached protein): ομοιοπολικά συνδεδεμένη πρωτεΐνη; WTA (wall teichoic acid): Τειχικά οξέα; LTA (lipoteichoic acid): Λιποτειχικά οξέα; Peptidoglycan: Πεπτιδογλυκάνη; IMP (integral membrane protein): Μεμβρανική πρωτεΐνη; Cell membrane: Κυτοπλασματική μεμβράνη; Cytoplasm: Κυτόπλασμα; Periplasm: Περιπλασματικός χώρος; LP (lipoprotein): Λιποπρωτεΐνη; Outer membrane: Εξωτερική μεμβράνη; OMP (outer membrane protein): Πρωτεΐνη εξωτερικής μεμβράνης; LPS (lipopolysaccharide): Λιποπολυσακχαρίτης που αποτελείται από Λιπίδιο A (Lipid A) και τον πολυσακχαρίτη. Ο πολυσακχαρίτης διαχωρίζεται στον Πυρήνα ολιγοσακχαριτών (Core saccharide) και στο Ο-αντιγόνο (O-antigen) (Silhavy et al. 2010).

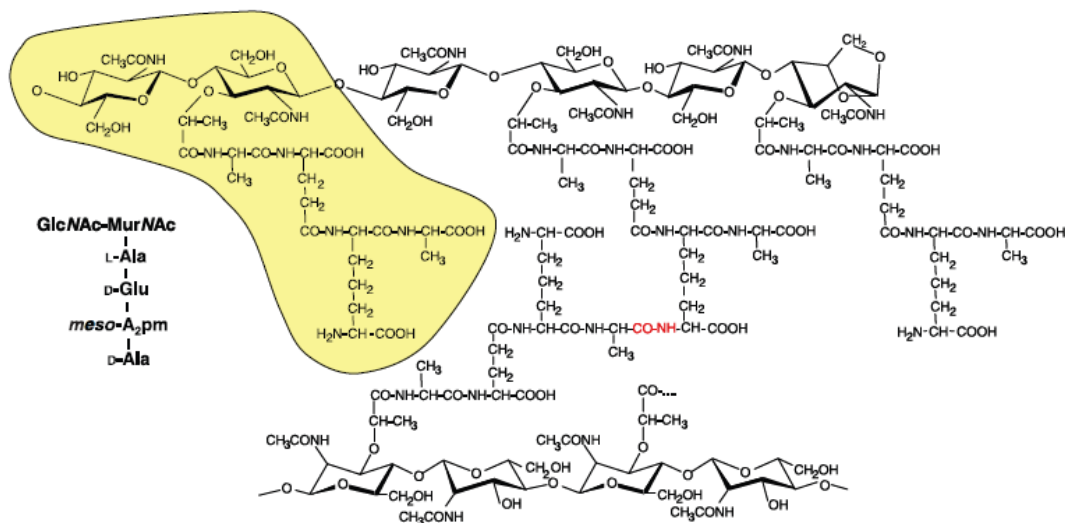
Το είδος του κυτταρικού περιβλήματος των βακτηρίων, δεν είναι ούτε εύκολο στον προσδιορισμό του, ούτε απλό στη σύσταση. Σε αντίθεση με τα κύτταρα των ανώτερων οργανισμών, τα βακτήρια αντιμετωπίζουν ένα απρόβλεπτο και συχνά εχθρικό περιβάλλον μέσα στο οποίο πρέπει να επιβιώσουν και να πολλαπλασιαστούν. Για το λόγο αυτό, οι μικροοργανισμοί έχουν αναπτύξει ένα πολύπλοκο κυτταρικό περίβλημα το οποίο προστατεύει τις ζωτικές τους λειτουργίες, αλλά ταυτόχρονα συνεισφέρει στην επιβίωσή τους και στην αναγνώριση των περιβαλλοντικών συνθηκών. Στην επιφάνεια των κυττάρων πραγματοποιούνται αντιδράσεις οι οποίες επιτρέπουν στα κατάλληλα θρεπτικά να εισχωρήσουν στο εσωτερικό ή για να αντιμετωπίσουν τοξικές καταστάσεις (Silhavy et al. 2010).

Το κυτόπλασμα, που περιέχει το σύνολο των συστατικών ενός προκαρυωτικού κυττάρου, περιβάλλεται από την κυτοπλασματική μεμβράνη (Εικόνες 2 και 3). Η κυτοπλασματική μεμβράνη αποτελείται από διπλή στοιβάδα φωσfolιπιδίων, των οποίων η υδρόφιλη κεφαλή (φωσφορική ομάδα) διατάσσεται προς το υγρό, καλύπτοντας την υδρόφοβη οργανική αλυσίδα προς το εσωτερικό. Η διπλή αυτή στοιβάδα, με αυτόν τον τρόπο, μπορεί και διατηρεί τη δομή της, προστατεύοντας το εσωτερικό του κυττάρου. Η σημασία της αναδεικνύεται, αν αναλογιστεί κανείς ότι πληθώρα λειτουργιών του

μικροοργανισμού είναι άρρηκτα συνδεδεμένες με τις πρωτεΐνες, οι οποίες βρίσκονται ακκυροβολημένες ανάμεσα στα φωσφολιπίδια.

Η προστασία της μεμβράνης αυτής από το περιβάλλον, συνεπώς και του συνόλου του μικροοργανισμού, εκτελείται από το κυτταρικό τοίχωμα, το οποίο συνεισφέρει στη διατήρηση του σχήματος του μικροοργανισμού. Οι Gram-θετικοί μικροοργανισμοί διαθέτουν απλούστερο κυτταρικό τοίχωμα σε σχέση με τους Gram-αρνητικούς (Hogg 2005).

Για τους Gram-θετικούς μικροοργανισμούς, όπως είναι οι βάκιλοι, το κυτταρικό τοίχωμα αποτελείται από στρώματα πεπτιδογλυκάνης. Η πεπτιδογλυκάνη μπορεί να θεωρηθεί ως ένα φυσικό πολυμερές, του οποίου η βασική μονάδα πολυμερισμού είναι ο δισακχαρίτης N-ακετυλογλυκοζαμίνη – N-ακετυλομουραμικό οξύ, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 4, όπου παρουσιάζεται η χημική σύσταση της πεπτιδογλυκάνης και ο τρόπος σύνδεσης των αλυσίδων μεταξύ τους.

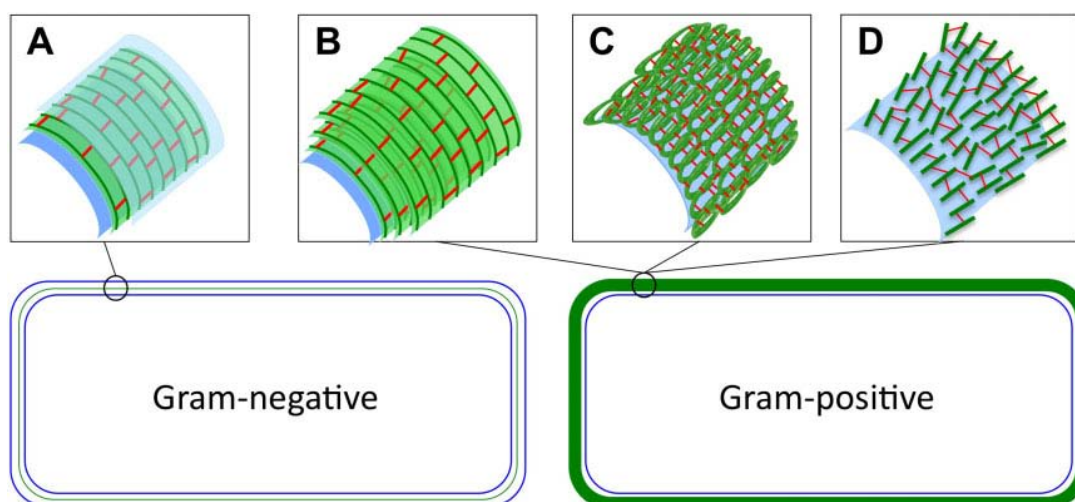


Εικόνα 4: Βασική μονάδα της πεπτιδογλυκάνης με το δισακχαρίτη και της ολιγοπεπτιδικής γέφυρας (κίτρινο πλαίσιο) όπου φαίνεται ο τρόπος σύνδεσης με δεύτερη πεπτιδογλυκάνη. GlcNAc: N-ακετυλο-γλυκοζαμίνη; MurNAc: N-ακετυλο-μουραμικό οξύ (Vollmer et al. 2008).

Τα σάκχαρα εναλλάσσονται στην αλυσίδα σχηματίζοντας τη «γλυκάνη». Ο C-3 του N-ακετυλομουραμικού οξέος ενώνεται με ένα ολιγοπεπτίδιο τεσσάρων αμινοξέων, των οποίων το είδος τους μπορεί να διαφοροποιηθεί ανάλογα με τον μικροοργανισμό. Η καρβοξυ-ομάδα του 4^{ου} αμινοξέος της μιας αλυσίδας ολιγοπεπτιδίου, η D-αλανίνη, σχηματίζει πεπτιδικό δεσμό με την αμινομάδα που βρίσκεται στην πλευρική αλυσίδα του 3^{ου} αμινοξέος της έτερης αλυσίδας, το διαμινοπιμελικό οξύ. Εναλλακτικά, μπορεί να

παρεμβάλλονται και άλλα μόρια ανάμεσα στο δεσμό αυτό, ο οποίος ενώνει τους πολυσακχαρίτες και σχηματίζει την πεπτιδική γέφυρα (Schleifer and Kandler 1972; Vollmer et al. 2008).

Η πεπτιδική γέφυρα, εκτός από το να ενώνει τις αλυσίδες πεπτιδογλυκάνης, αποτελεί και το σημείο όπου ενώνονται οι μεμβρανικές πρωτεΐνες για τους Gram-θετικούς μικροοργανισμούς (Vollmer et al. 2008). Η διάταξη στα Gram-θετικά βακτήρια της πεπτιδογλυκάνης, αποτελεί ένα από τα κύρια ερευνητικά ζητήματα μέχρι και σήμερα. Πρόσφατες μελέτες, ανέδειξαν την πιθανότερη διάταξη της πεπτιδογλυκάνης και στα δύο είδη βακτηρίων όπως φαίνεται στην Εικόνα 5. Στα Gram-αρνητικά βακτήρια, τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι το λεπτό στρώμα πεπτιδογλυκάνης ανάμεσα στην εξωτερική κυτταρική μεμβράνη και την κυτοπλασματική μεμβράνη, περικλείει το κύτταρο περιμετρικά, όντας παράλληλη στις άλλες δύο μεμβράνες. Η πεπτιδογλυκάνη σχηματίζει ένα στρώμα, όπου οι αλυσίδες της είναι στο ίδιο επίπεδο μεταξύ τους, καλύπτοντας όλο το κύτταρο.

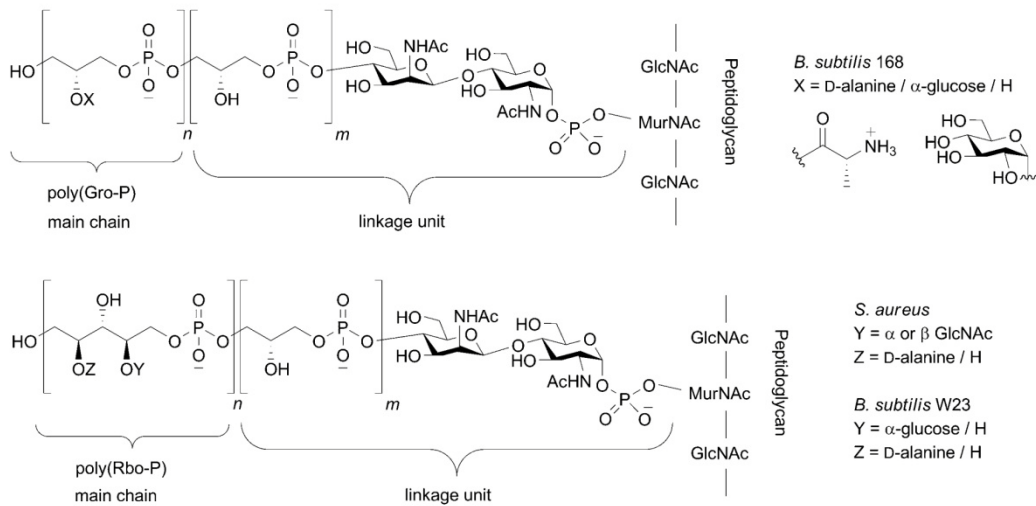


Εικόνα 5: Διάταξη πεπτιδογλυκάνης σε Gram-θετικά και Gram-αρνητικά βακτήρια (Porham 2013). Η λεπτή στρώση αλυσίδων πεπτιδογλυκάνης (πράσινο) ανάμεσα στην κυτοπλασματική και εξωτερική μεμβράνη (μπλε και διαφανές μπλε) στα Gram-αρνητικά βακτήρια περιβάλλει περιμετρικά την πρώτη και οι ολιγοπεπτιδικές αλυσίδες (κόκκινο) βρίσκονται στο ίδιο επίπεδο. Τρία μοντέλα προτάθηκαν για τη διάταξη στα Gram-θετικά βακτήρια: (B) πολλαπλές περιμετρικές στρώσεις αλυσίδων; (C) πυκνές σπείρες αλυσίδων πεπτιδογλυκάνης ενωμένες με ολιγοπεπίδια στο τρισδιάστατο χώρο και (D) κάθετες αλυσίδες πεπτιδογλυκάνης ως προς τη κυτοπλασματική μεμβράνη.

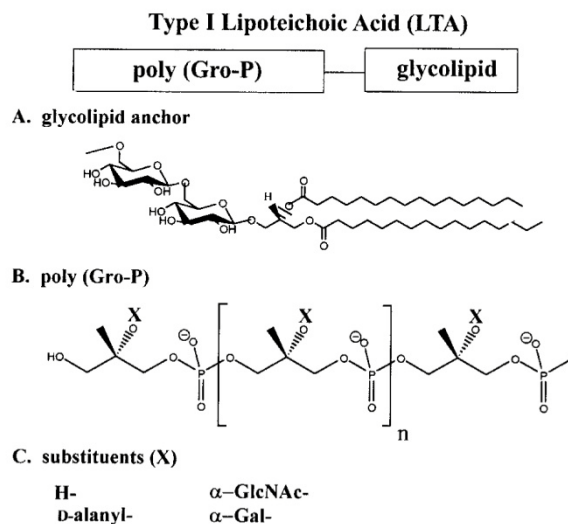
Η διάταξη όμως στα Gram-θετικά βακτήρια ήταν δυσκολότερη να εξακριβωθεί. Μελέτες πρότειναν τρεις διαφορετικές πιθανές δομές: (α) την πολλαπλή περιμετρική διάταξη των αλυσίδων πεπτιδογλυκάνης, παρόμοια με αυτή των Gram-αρνητικών, σε στρώσεις, (β)

πυκνές σπείρες αλυσίδων πεπτιδογλυκάνης και (γ) κάθετες αλυσίδες πεπτιδογλυκάνης, ως προς τη κυτοπλασματική μεμβράνη. Τα πιο πρόσφατα αποτελέσματα δείχνουν ότι η περιμετρική διάταξη διαδοχικών στρωμάτων πεπτιδογλυκάνης είναι αυτή στην οποία μαθηματικά μοντέλα, συμβαδίζουν με πειραματικά αποτελέσματα (Porham 2013; Beeby et al. 2013).

Ένα ακόμη συστατικό του κυτταρικού τοιχώματος των Gram-θετικών βακτηρίων είναι τα τειχικά (Εικόνα 6) και λιποτειχικά οξέα (Εικόνα 7). Κύρια δομική μονάδα είναι φωσφορική γλυκερόλη ή ριβιτόλη, οι οποίες σχηματίζουν μεγάλες αλυσίδες ενωμένες με φωσφοδιεστερικούς δεσμούς.



Εικόνα 6: Αντιπροσωπευτικές χημικές δομές των τειχικών οξέων διαφορετικών gram-θετικών βακτηρίων (Swoboda et al. 2010). Τα τειχικά οξέα ενώνονται στη πεπτιδογλυκάνη με φωσφοδιεστερικό δεσμό μεταξύ του N-ακετυλο-μουραμικού οξέος και της N-ακετυλο-γλυκοζαμίνης. Η N-ακετυλο-γλυκοζαμίνη ενώνεται με την N-ακετυλο-μαννοζαμίνη και 1-3 φωσφορικές γλυκερόλες δημιουργώντας τη μονάδα πρόσδεσης του τειχικού οξέος (linkage unit). Ακολουθεί η αλυσίδα φωσφορικής γλυκερόλης ή ριβιτόλης (main chain: κύρια αλυσίδα) που κυμαίνεται από 20-40 μονάδες οι οποίες μπορούν να υποκατασταθούν ανάλογα το βακτήριο (X, Z και Y). Παραδείγματα υποκατάστασης παρουσιάζονται δεξιά για τον *Bacillus subtilis* 168 και *Staphylococcus aureus*.

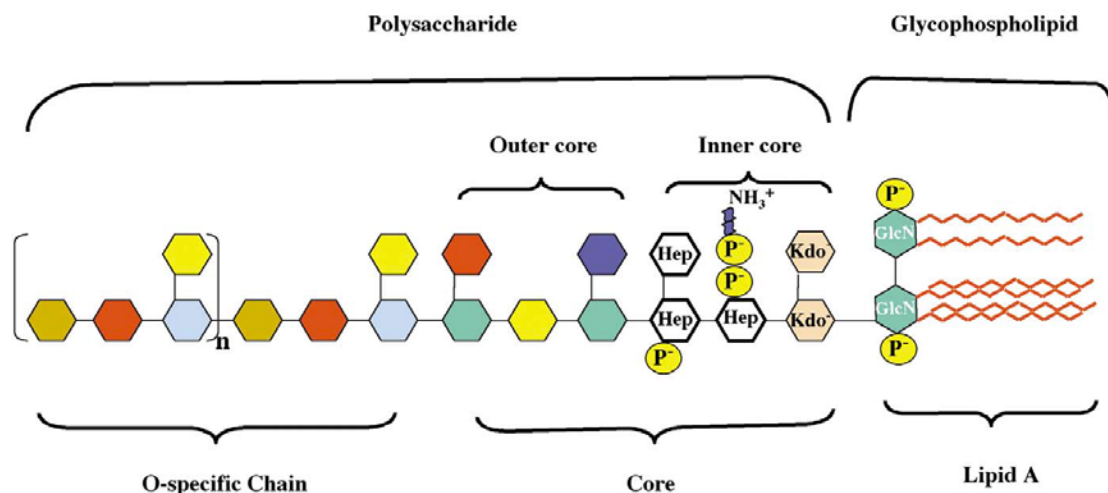


Εικόνα 7: Σύσταση λιποτεϊχικού οξέος Τύπου 1: Η γλυκολιπιδική άγκυρα (glycolipid anchor) που σταθεροποιεί το μόριο με την κυτταρική μεμβράνη αποτελείται από δύο μόρια γλυκόζης ενωμένα σε οξυγόνο γλυκερόλης. Τα δύο άλλα υδροξύλια της γλυκερόλης έχουν εστεροποιηθεί με λιπαρά οξέα. Το γλυκολιπίδιο διαπερνά την πεπτιδογλυκάνη με την φωσφορυλιωμένη πολυγλυκερόλη (poly-Gro-P) η οποία μπορεί να διαθέτει διάφορους υποκαταστάτες στη θέση X της γλυκερόλης (substituents X) (Neuhaus and Baddiley 2003).

Τα τειχικά οξέα, είναι ενωμένα ομοιοπολικά με την πεπτιδογλυκάνη, μέσω ενός δισακχαρίτη N-ακετυλ-μαννοζαμίνης και N-ακετυλ-γλυκοζαμίνης, (Coley et al. 1978; Kojima et al. 1985; Neuhaus and Baddiley 2003) που καταλήγει στον C-6 του N-ακετυλ-μουραμικού οξέος της πεπτιδογλυκάνης. Αντίθετα, τα λιποτεϊχικά διαπερνούν τη πεπτιδογλυκάνη και ενώνονται στην κυτοπλασματική μεμβράνη με μια γλυκολιπιδική αλυσίδα, σταθεροποιώντας τις δυο δομές του κυττάρου μεταξύ τους. Όλα μαζί, λόγω της πληθώρας φωσφορικών ομάδων, σχηματίζουν ένα πυκνό δίκτυο αρνητικού φορτίου στην επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης των Gram-θετικών βακτηρίων. Υδροξύλια τα οποία δε συμμετέχουν στο σχηματισμό του φωσφοδιεστερικού δεσμού, μπορούν να υποκατασταθούν με άλλες ενώσεις (Εικόνες 6 και 7), πιο συχνή από τις οποίες είναι η D-αλανίνη, σχηματίζοντας εστερικό δεσμό. Με αυτόν τον τρόπο, η αμινομάδα της αλανίνης (θετικά φορτισμένη) μένει ελεύθερη και συμμετέχει στον καθορισμό του συνολικού αρνητικού φορτίου του πολυμερούς και κατ' επέκταση του κυτταρικού τοιχώματος, αλληλεπιδρώντας με τους διπλανούς φωσφοδιεστερικούς δεσμούς της κύριας αλυσίδας. Επομένως, το συνολικό φορτίο εξαρτάται από τον αριθμό των υποκατεστημένων υδροξυλομάδων (Neuhaus and Baddiley 2003; Swoboda et al. 2010). Για να περιοριστούν οι απωστικές δυνάμεις που εμφανίζονται ανάμεσα στα μακρομόρια, εκτός του εστέρα με την αλανίνη, τα

τειχικά οξέα δεσμεύουν κατιονικές ομάδες, μονοσθενή ή δισθενή κατιόντα μετάλλων (Swoboda et al. 2010). Η συγκέντρωση των εστέρων αλανίνης εξαρτάται από διάφορους παράγοντες: θερμοκρασία, pH, θρεπτικό περιβάλλον (Neuhaus and Baddiley 2003). Έχει παρατηρηθεί ότι απουσία εστέρα αλανίνης, τα μακρομόρια δεσμεύουν σημαντικές ποσότητες Mg^{2+} (Swoboda et al. 2010). Θεωρούνται ότι συμμετέχουν ενεργά στη συγκέντρωση κατιόντων (όπως το Ca^{2+}) πάνω στην κυτταρική μεμβράνη, απαραίτητων για τις φυσιολογικές λειτουργίες των κυττάρων, καθώς και για την αντιμετώπιση αλλαγών στην ωσμωτική πίεση. Επιπρόσθετα, τα τειχικά οξέα λειτουργούν σαν μέρος της «σκαλωσιάς» που στηρίζει τη λειτουργία πρωτεϊνών, συμμετέχουν ενεργά στη μίτωση και επιδρούν κατά τη μόλυνση των ανώτερων οργανισμών από βακτήρια (Neuhaus and Baddiley 2003; Swoboda et al. 2010).

Σε αντίθεση με τα Gram-θετικά βακτήρια, τα Gram-αρνητικά βακτήρια περιλαμβάνουν ένα λεπτό στρώμα πεπτιδογλυκάνης ανάμεσα στη κυττοπλασματική μεμβράνη και την εξωτερική μεμβράνη, η οποία αποτελείται κυρίως από λιποπολυσακχαρίτες, φωσφολιπίδια και πρωτεΐνες (Hogg 2005). Η βασική δομή της εξωτερικής μεμβράνης είναι η διπλοστοιβάδα λιποπολυσακχαριτών και φωσφολιπιδίων. Στην εξωτερική μεριά, σε άμεση επαφή με το περιβάλλον, βρίσκονται οι λιποπολυσακχαρίτες, ενώ η στοιβάδα φωσφολιπιδίων «κοιτάει» προς το εσωτερικό. Η λιπιδική αλυσίδα και των δυο μορίων δημιουργεί μια πυκνή δομή, που σταθεροποιεί τη μεμβράνη (Silhavy et al. 2010) (Εικόνες 2 και 3). Οι λιποπολυσακχαρίτες αποτελούνται από το λιπίδιο A, τον εσωτερικό πυρήνα, τον εξωτερικό πυρήνα και το O-αντιγόνο.



Εικόνα 8: Παράδειγμα λιποπολυσακχαρίτη εντεροβακτηρίων. Το Λιπίδιο A (Lipid A) αποτελείται από φωσφορυλιωμένες γλυκοζαμίνες (GlcN) όπου οι τεθλασμένες γραμμές είναι τα λιπαρά οξέα. Ο εσωτερικός πυρήνας (inner core) ενώνεται με αυτές μέσω του κετο-δεοξυ-οκτανικού οξέος (Kdo). Ακολουθεί ο εξωτερικός πυρήνας (outer core) που συγκρατεί το Ο-αντιγόνο (O-specific chain). Hep: L-γλυκερο-D-μαννο-επτόζη; P⁻ : φωσφορικό ανιόν (Caroff et al. 2002).

Το λιπίδιο A (Εικόνα 8) αποτελείται από δύο φωσφορυλιωμένες γλυκοζαμίνες ή ανάλογες ενώσεις αυτής, στον οποίων τις αμινομάδες και 3'-υδροξύλια ενώνονται τα λιπίδια. Το μόριο αυτό ενώνεται με το όξινο σάκχαρο κετο-δεοξυ-οκτανικό οξύ (Kdo), το οποίο μπορεί να είναι ενωμένο με επιπλέον μία ή δύο Kdo. Στη Kdo που ενώνεται με το λιπίδιο A, είναι ενωμένες οι τρεις επτόζες (L-γλυκερο-D-μαννο-επτόζη), οι οποίες είναι φωσφορυλιωμένες και συνιστούν όλα μαζί τον «εσωτερικό πυρήνα» (inner core) του λιποπολυσακχαρίτη (Caroff et al. 2002). Η παραπάνω δομή όμως μπορεί να διαφέρει ανάλογα τον μικροοργανισμό, προσφέροντας πληθώρα εναλλακτικών λιποπολυσακχαριτικών πυρήνων (Caroff et al. 2003). Οι επτόζες που παρουσιάζονται στην παραπάνω εικόνα, έχουν υποκαταστάτες όπως φωσφορικό, δι-φωσφορικό ή φωσφο-αιθανολαμίνη (Caroff et al. 2002). Τα δύο πρώτα προσφέρουν αρνητικό φορτίο, ενώ το τελευταίο προσφέρει τη θετικά φορτισμένη αμινομάδα μεταβάλλοντας το συνολικό φορτίο του μορίου. Ο εξωτερικός πυρήνας που είναι ενωμένος με το Ο-αντιγόνο, αποτελείται από εξόζες (π.χ. γλυκόζη) και εξοζαμίνες (π.χ. γλυκοζαμίνη) (Kabanov and Prokhorenko 2010). Το εξώτερο μέρος του λιποπολυσακχαρίτη, είναι το Ο-αντιγόνο ή αλλιώς Ο-πολυσακχαρίτης το οποίο αποτελείται από αλυσίδα σακχάρων των οποίων η σύσταση και το μήκος ποικίλει μεταξύ των βακτηρίων. Οι μονοσακχαρίτες, ως βασικές μονάδες των πολυσακχαριτών, μπορούν να είναι είτε ουδέτεροι είτε όξινοι διαφοροποιώντας το συνολικό φορτίο του αντιγόνου και κατ' επέκταση και της κυτταρικής μεμβράνης (Kabanov and Prokhorenko

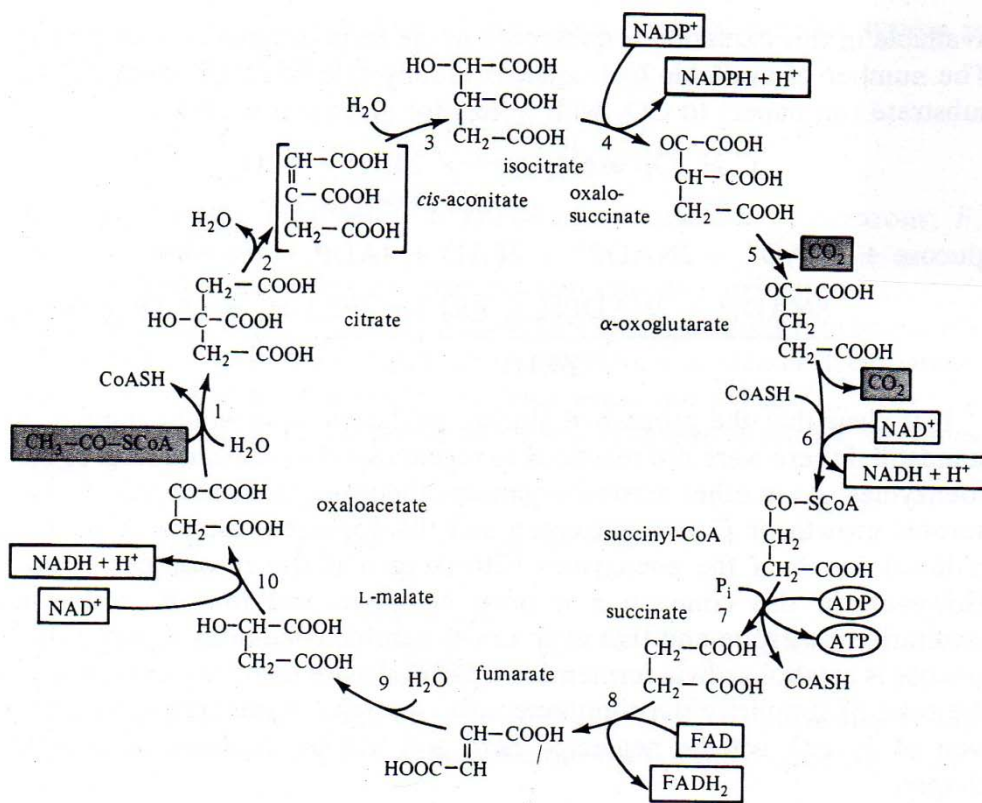
2010). Πλην της ποικιλίας τους, μπορούν να διαθέτουν διάφορους υποκαταστάτες όπως φωσφορικό, φωσφο-αιθανολαμίνη, ή O- και N-ακετυλ ομάδες, μεταβάλλοντας το συνολικό φορτίο (Caroff et al. 2003). Γενικά, το είδος των σακχάρων που αποτελούν το O-αντιγόνο σε συνδυασμό με τους υποκαταστάτες τους, χαρακτηρίζουν την τοξική δράση των συστατικών αυτών (Kabanov and Prokhorenko 2010). Το σύνολο των λιποπολυσακχαριτών δημιουργούν το υψηλό αρνητικό φορτίο της μεμβράνης, γεγονός σημαντικό για την αλληλεπίδραση με το περιβάλλον και τα κατίοντα. Η επίδραση είναι τόσο ισχυρή που μπορούν να αποτελέσουν σημεία συγκέντρωσης μεταλλοϊόντων (Beveridge 1999).

1.8 Μεταβολισμός Ετερότροφων Μικροοργανισμών

Η βιοποικιλότητα των βακτηρίων έγκειται στη δυνατότητά τους να εκμεταλλεύονται μια πληθώρα ενώσεων για την ολοκλήρωση του μεταβολισμού τους. Με την έννοια του μεταβολισμού, θεωρούμε όλες αυτές τις αντιδράσεις που γίνονται στο εσωτερικό του κυττάρου οι οποίες, είτε παράγουν ενέργεια, είτε καταναλώνουν την ήδη υπάρχουσα. Τα θρεπτικά συστατικά τα οποία απορροφώνται από τον μικροοργανισμό, επεξεργάζονται βιοχημικά, ώστε με την αποικοδόμησή τους να παραχθεί η απαραίτητη ενέργεια και ταυτόχρονα, να είναι χρήσιμα ως δομικά συστατικά σύνθεσης άλλων μορίων και μακρομορίων. Ο καταβολισμός των ενώσεων που λαμβάνονται από τον μικροοργανισμό, καταλήγουν συνήθως στο σχηματισμό διαφόρων ενώσεων που συμμετέχουν σε κάποιο σημείο στη διαδικασία παραγωγής ενέργειας. Μια από τις κυριότερες διαδικασίες είναι ο καταβολισμός λιπιδίων, πρωτεϊνών, πολυσακχαριτών και νουκλεϊκών οξέων σε οξικό ανιόν, με το οποίο πραγματοποιείται ο κύκλος του τρικαρβοξυλικού οξέος (Hogg 2005).

Η βασική διαδικασία παραγωγής ενέργειας στους μικροοργανισμούς πραγματοποιείται μέσω της γλυκόλυσης (αποικοδόμηση της γλυκόζης κατά Embden-Meyerhof-Parnas), όπου ένα μόριο γλυκόζης μετατρέπεται σε δύο μόρια πυροσταφυλικού οξέος. Εναλλακτικό αυτού του κύκλου αποτελεί η αποδόμηση της γλυκόζης κατά Entner-Doudoroff για ορισμένα γένη Gram-αρνητικών βακτηρίων. Παράλληλα, με τις παραπάνω διαδικασίες μπορεί να εξελίσσεται και ένας δεύτερος κύκλος παραγωγής ενέργειας, αυτός της φωσφορικής πεντόζης, κατά τον οποίο παράγονται μόρια τα οποία, είτε συμμετέχουν στη γλυκόλυση, είτε στη σύνθεση άλλων βασικών μορίων για το κύτταρο (Hogg 2005; Gottschalk 1985).

Το τελικό προϊόν του καταβολισμού της γλυκόζης, ανεξάρτητα από την ακολουθία των αντιδράσεων, είναι το πυροσταφυλικό οξύ και συμμετέχει στον «κύκλο του τρικαρβοξυλικού οξέος» (ή «κύκλος του Krebs» ή «κύκλος του κιτρικού οξέος»; Εικόνα 9). Το πυροσταφυλικό οξύ, καταρχήν, χάνει έναν άνθρακα κατά την αντίδραση αποκαρβυξυλίωσης και ένωσης το υ με το συνένζυμο-A σχηματίζοντας το ακετυλο-συνένζυμο-A. Το ακετυλο-συνένζυμο-A, είναι πολύ σημαντικό ενδιάμεσο μόριο, διότι σε αυτό καταλήγει η αποδόμηση πολλών οργανικών ενώσεων, ώστε να μπορεί να καλύπτονται οι ανάγκες ολοκλήρωσης του «κύκλου του τρικαρβοξυλικού οξέος». Από τον κύκλο αυτό παράγεται ενέργεια, η οποία αποθηκεύεται από τον μικροοργανισμό σε ATP, NADH και FADH₂ και τα τελευταία δύο μετατρέπονται σε ATP.



Εικόνα 9: Κύκλος τρικαρβοξυλικού οξέος ή Κύκλος του κιτρικού οξέος.

Επιπρόσθετα, ορισμένα από τα συστατικά του κύκλου του κιτρικού οξέος, χρησιμοποιούνται για τη σύνθεση άλλων μορίων (α-κετογλουταρικό ανιόν, οξαλοοξικό ανιόν, ηλεκτρικό ανιόν). Τα συστατικά αυτά χρειάζεται με κάποιο τρόπο να αναπληρωθούν. Για το λόγο αυτό, υπάρχουν εναλλακτικές μεταβολικές πορείες, παρακάμπτοντας εν μέρει κάποια βήματα, ώστε να παραχθεί η αναγκαία ποσότητα αντιδραστηρίων για να συνεχιστεί ο

κύκλος. Ανάλογη διαδικασία, παρατηρείται και όταν ο μικροοργανισμός διαθέτει σαν πηγή άνθρακα το οξικό ανιόν. Το οξικό ανιόν, όταν απορροφάται από τον μικροοργανισμό, μπορεί να σχηματίσει άμεσα το ακετυλο-συνένζυμο-A και να εισαχθεί στον κύκλο του κιτρικού οξέος (Gottschalk 1985).



Υπάρχει ένας σημαντικός αριθμός εναλλακτικών επιλογών για τους ετερότροφους μικροοργανισμούς, ώστε να αντιμετωπίσουν τα ζητήματα που αφορούν το μεταβολισμό τους.

Εκτός από τον άνθρακα, οι μικροοργανισμοί χρειάζονται και άζωτο. Ένας τρόπος αφομοίωσης του αζώτου, είναι μέσω της αποδόμησης των αμινοξέων και τη χρήση του κατιόντος αμμωνίας που προκύπτει για τη σύνθεση απαραίτητων ενώσεων. Η οξειδωτική απαμίνωση, μπορεί να πραγματοποιηθεί με οξειδάσες του κυτοχρώματος, οι οποίες δεν είναι εκλεκτικές, ή με αφυδρογονάσες, οι οποίες είναι εξειδικευμένες για συγκεκριμένα αμινοξέα. Επιπλέον, η απαμίνωση μπορεί να γίνει και από τις αφυδρατάσες, οι οποίες για να αντιδράσουν απαιτείται το β-άτομο άνθρακα ως προς τον άνθρακα της αμινομάδας, να μπορεί να προσφέρει υδρογόνο ή υδροξύλιο, ώστε πρώτα να αφαιρεθεί ένα μόριο νερού και στη συνέχεια να απομακρυνθεί η αμινομάδα ως αμμωνία. Και τα αμινοξέα με κυκλικές πλευρικές αλυσίδες μπορούν να απαμινωθούν. Συνεπώς, ο μικροοργανισμός αποκτά ποσότητες αμμωνίας χρήσιμες για την παραγωγή ενώσεων (Gottschalk 1985).

1.9 Μικροβιολογικές Διαδικασίες Απομόνωσης και Ταυτοποίησης Ετερότροφων Μικροοργανισμών

Οι παραπάνω μεταβολικές διαδικασίες δεν θα ήταν ποτέ γνωστές, εάν δεν εξελισσόταν η μικροβιολογία όσον αφορά την απομόνωση μικροοργανισμών. Η εργαστηριακή απομόνωση βακτηρίων αποτελεί μια από τις βασικές μεθόδους στην ερευνητική αυτή προσπάθεια. Ακόμα και σήμερα ό,τι και αν ταυτοποιείται γενετικά, η εργαστηριακή απομόνωση αποτελεί τον απώτερο στόχο, ώστε να δοκιμαστούν οι πιθανές βιοτεχνολογικές εφαρμογές. Για το λόγο αυτό, εξελίσσονται διαρκώς οι τρόποι απομόνωσης μικροοργανισμών σε θρεπτικά συστατικά, είτε αυτά είναι γενικά, είτε χημικώς καθορισμένα. Με τον πρώτο όρο, εννοούμε τα θρεπτικά που η σύστασή τους δεν είναι πλήρως

καθορισμένη, αλλά εξασφαλίζουν όλες εκείνες τις ουσίες οι οποίες θα χρησιμοποιηθούν ως πηγή άνθρακα, αζώτου, αλάτων, ιχνοστοιχείων και άλλων συστατικών που συνεισφέρουν στην ανάπτυξη. Τέτοια παραδείγματα αποτελούν οι πεπτόνες που αποτελούνται από υδρολυμένες πρωτεΐνες, τα ζωικά και φυτικά εκχυλίσματα, προϊόντα υδρόλυσης του γάλακτος και το εκχύλισμα ζύμης (Atlas 2004). Χρησιμοποιούνται ευρέως και αποτελούν την «πρώτη γραμμή» απομόνωσης μικροοργανισμών από το περιβάλλον. Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό τους είναι, ότι μπορούν σε αυτά να προστεθούν και χημικές ενώσεις που ευνοούν την ανάπτυξη συγκεκριμένων στελεχών, χωρίς την ανάγκη εφαρμογής πολύπλοκων διαδικασιών ανάμειξης συστατικών. Τα χημικώς καθορισμένα θρεπτικά, είναι αυτά των οποίων η χημική τους σύσταση είναι πλήρως γνωστή και περιλαμβάνουν συστατικά που επίσης αντιστοιχούν στα απαραίτητα στοιχεία (άνθρακας, άζωτο, κλπ). Πιο εξειδικευμένα θρεπτικά μπορούν να προκύψουν από την ελαχιστοποίηση των προς ανάμειξη συστατικών για τη δημιουργία ενός «βασικού θρεπτικού» (minimal medium), στο οποίο μπορεί να προστεθούν στη συνέχεια εκλεκτικοί παράγοντες ανάπτυξης, που βοηθούν την εκλεκτική απομόνωση μικροοργανισμών.

Οι προσπάθειες απομόνωσης και ανάπτυξης εργαστηριακά μικροοργανισμών συνεχίζεται με αμείωτη ένταση, εκμεταλλεόμενοι διαδικασίες και τεχνικές οι οποίες χρησιμοποιούνται σε άλλους τομείς της επιστήμης (Zengler et al. 2002; Ingham et al. 2007). Η λογική πίσω από τις τεχνολογικές εξελίξεις, οι οποίες συνεχώς ανανεώνονται, έγκειται πρώτον στην προσομοίωση του περιβάλλοντος απομόνωσης, όσον αφορά τα συστατικά και τις φυσικές συνθήκες που επικρατούν, και επίσης στην παραδοχή ότι οι μικροοργανισμοί ζουν σε ένα πολύπλοκο μικρόκοσμο όπου επικοινωνούν με αυτό, είτε είναι έμβιο, είτε αβιοτικό. Η απομόνωση και καλλιέργεια μικροοργανισμών αποτελεί σημαντικότερο κομμάτι της σύγχρονης έρευνας, διότι μόνο με αυτόν τον τρόπο μπορεί ουσιαστικά να παρατηρηθεί η επικοινωνία και απόκριση του μικρόκοσμου, αλλά και της πληθώρας πρωτεϊνών που αυτός παράγει. Συνεπώς, μια πληθώρα βιοτεχνολογικών εφαρμογών θα ήταν αδύνατη χωρίς την καλλιέργεια μικροοργανισμών.

Ο αριθμός ταυτοποιημένων ευκαρυωτικών οργανισμών αριθμεί περί τα 1.8 εκατομμύρια είδη, όταν εκτιμήσεις για την βιοποικιλότητα στον πλανήτη μπορεί να φτάνει και 10 φορές περισσότερο (Alain and Querellou 2009). Η συνολική ποσότητα άνθρακα των μικροοργανισμών (Βακτήρια και Αρχαία) υπολογίζεται ότι είναι ίση με αυτή των φυτών, ανεξάρτητα εάν αυτό αφορά επίγειο, υπόγειο ή υδατικό περιβάλλον (Whitman et al. 1998). Οι συντηρητικοί αυτοί υπολογισμοί, αναδεικνύουν τη σημασία των μικροοργανισμών και το

ρόλο τους σε όλους τους βιολογικούς και βιοχημικούς κύκλους που αφορούν τη διατήρηση της ζωής στη Γη.

Για να υπάρξουν ανάλογοι υπολογισμοί, χρειάστηκε η καινοτόμα εφαρμογή της Αλυσωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR), η οποία επέτρεψε τον πολλαπλασιασμό γενετικού DNA γρήγορα και εύκολα. Το γονίδιο το οποίο χρησιμοποιήθηκε ήταν το 16S ριβοσωμικό RNA (rRNA). Γενικότερα, το ριβοσωμικό RNA ή τα γονίδια που το κωδικοποιούν (rDNA), αποτελούν τα καταλληλότερα μακρομόρια τα οποία μπορούν να παρουσιάσουν τη σχέση μεταξύ των μικροοργανισμών, διότι βρίσκονται στο σύνολο αυτών, διαθέτουν χαρακτηριστική σταθερότητα στην αλληλουχία των νουκλεοτιδίων, χωρίς να επηρεάζονται από περιβαλλοντικούς παράγοντες και δεν μεταφέρονται μεταξύ μικροοργανισμών (Rosselló-Mora and Amann 2001). Η διαφοροποίηση στην αλληλουχία νουκλεοτιδίων, δίνει και τη φυλογενετική σχέση μεταξύ των μικροοργανισμών (Rosselló-Mora and Amann 2001) και η συστηματική χρήση μοριακών/γενετικών κριτηρίων, αναδιαμόρφωσε τη σχέση μεταξύ των μικρο- και μακροοργανισμών, στην προσπάθεια ενός ενοποιημένου «Δέντρου της Εξέλιξης» (Woese et al. 1990; DeLong and Pace 2001). Η ραγδαία ανάπτυξη γενετικών μεθόδων απομόνωσης και αλληλούχησης των γονιδίων (Ronaghi 2001), έχει οδηγήσει σήμερα στο επίπεδο να είναι γνωστοί περισσότεροι μικροοργανισμοί από όσους εργαστηριακά μπορούν να καλλιεργηθούν, διότι το rRNA μπορεί να απομονωθεί και να αλληλουχηθεί από το σύνολο του περιβαλλοντικού δείγματος, αποδεικνύοντας πειραματικά τον πλουραλισμό του μικροβιακού κόσμου (Sogin et al. 2006) και προσφέροντας ανεξάντλητες πηγές για πρωτεΐνες προς βιοτεχνολογικές εφαρμογές (Singh 2009).

Η αλληλούχηση του 16S rDNA, αποτελεί κομμάτι των γενετικών μεθόδων που θεωρούνται δόκιμες για την ταυτοποίηση ενός μικροοργανισμού μαζί με την ομοιότητα DNA-DNA και την εκατοστιαία περιεκτικότητα σε G+C (Rosselló-Mora and Amann 2001). Για μικροοργανισμούς οι οποίοι είναι ήδη ταυτοποιημένοι, η αλληλούχηση, σε συνδυασμό με τον φαινοτυπικό προσδιορισμό συγκεκριμένων βιοχημικών δοκιμών, είναι αρκετή. Επομένως, η ανάπτυξη της διαδικασίας εργαστηριακά, δεν είναι αυτοματοποιημένη, όπως θα παρουσιαστεί και παρακάτω, αλλά μια διαρκής προσπάθεια βελτιστοποίησης της τεχνικής. Στο πειραματικό πρωτότυπο αναπτύχθηκε επελέγη από την αρχή η προσπάθεια αλληλούχησης του συνόλου, ή σχεδόν του συνόλου, του 16S rRNA, διότι αυτό αποτελεί τη βέλτιστη διαδικασία και άμεσα αποδεκτή από την επιστημονική κοινότητα (Hugenholtz et al. 1998; Stackebrandt et al. 2002; Rappé and Giovannoni 2003). Επιπρόσθετα, βελτιώνει

σημαντικά την υποστηριζόμενη διδακτορική διατριβή, προσφέροντας μια τυποποιημένη, πλέον, μέθοδο για την άμεση ταυτοποίηση μικροοργανισμών, οι οποίοι μπορούν να έχουν βιοτεχνολογική εφαρμογή ανάλογη με αυτούς που θα παρουσιαστούν παρακάτω.

Για να βελτιωθεί η διαδικασία ταυτοποίησης ενός μικροοργανισμού, υπάρχει πληθώρα πειραματικών διαδικασιών, όπως αυτή των Logan et al. 2009. Η δημοσίευση αυτή αποτελεί χαρακτηριστικό παράδειγμα των γενικότερων διαδικασιών που ακολουθούνται στις ταυτοποιήσεις. Η ταυτοποίηση του 16S rRNA, μπορεί να συνοδευτεί με το βιοχημικό χαρακτηρισμό του απομονωμένου μικροοργανισμού βάσει των μεταβολικών και καταβολικών του χαρακτηριστικών. Παραδείγματα φαινοτυπικών χαρακτηριστικών αποτελούν: η θερμοκρασία ανάπτυξης, η μορφολογία της αποικίας σε στερεά υποστρώματα διαφορετικής σύστασης, το μέγεθος των κυττάρων και η κινητικότητά τους ή μη υπό το μικροσκόπιο, αερόβια-δυνητικά αναερόβια-αναερόβια ανάπτυξη, συγκέντρωση NaCl που αναπτύσσεται ο μικροοργανισμός. Οι βιοχημικές δοκιμές, αφορούν μια πληθώρα ενώσεων τις οποίες οι μικροοργανισμοί μπορούν να αποδομούν, για την απορρόφηση άνθρακα, αζώτου και ως δέκτες ηλεκτρονίων. Οι δοκιμές πραγματοποιούνται ανάλογα με το είδος που αναμένεται προς απομόνωση (Goris et al. 2001; Palleroni 2005; Grimont and Grimont 2005; Balkwill 2005; Logan et al. 2009; Logan and De Vos 2009). Για το λόγο αυτό, ενδείκνυται αρχικά η μοριακή ταυτοποίηση, ώστε να επιλεγούν οι καταλληλότερες βιοχημικές δοκιμασίες. Σήμερα υπάρχουν εμπορικά τυποποιημένες διαδικασίες βιοχημικής ταυτοποίησης, οι οποίες χρησιμοποιούνται για διάφορα γένη, όπως τα “API[®] strips” της Biomérieux και το σύστημα της Biolog[®], με τα οποία μπορεί κανείς σε σύντομο χρονικό διάστημα να πραγματοποιήσει μια σειρά βιοχημικών δοκιμασιών. Χρησιμοποιούνται κατά την ταυτοποίηση ακόμα και νέων στελεχών μικροοργανισμών, λόγω της επαναληψιμότητας των αποτελεσμάτων τους. Αξίζει όμως να σημειωθεί, ότι παρόλο που χρησιμοποιούνται ευρέως, είναι προτιμότερη η επανάληψη χαρακτηριστικών κριτηρίων με εναλλακτικές μεθόδους προς επιβεβαίωσή τους, ειδικά εκείνων που θεωρούνται σημαντικά προς το διαχωρισμό συγγενών βακτηριακών ειδών. Στις περιπτώσεις αυτές, η βιβλιογραφία συνεισφέρει στην επιλογή των κατάλληλων θρεπτικών, για τα καλύτερα δυνατά αποτελέσματα, ώστε να υπάρχει και η δυνατότητα σύγκρισης – επαναληψιμότητας των αποτελεσμάτων.

1.10 Εφαρμογές της Γενετικής στον Τομέα της Προστασίας των Μνημείων

Γενικότερα, η γενετική στον τομέα της συντήρησης και προστασίας των μνημείων άργησε να χρησιμοποιηθεί με ευρύτητα. Μια πρώτη προσέγγιση αρχικά πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της μεθόδου Ηλεκτροφόρησης Πηκτής με Διαβαθμισμένη Αποδιατακτική σύσταση (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE), στην οποία εκμεταλλεύεται το γεγονός ότι το 16S rDNA κάθε μικροοργανισμού, λόγω της διαφορετικής σύστασής του σε νουκλεοτίδια, αποδιατάσσεται σε διαφορετικό σημείο της πηκτής (γέλης), αφήνοντας χαρακτηριστικό αποτύπωμα πάνω σε αυτή. Με αυτόν τον τρόπο δίνεται η δυνατότητα παρατήρησης της βιοποικιλότητας και η απομόνωση στη συνέχεια του κάθε κομματιού του 16S rDNA προς την αλληλούχησή του (Muyzer et al. 1993; Muyzer and Smalla 1998). Η μέθοδος αυτή έχει δοκιμαστεί σε δείγματα από τοιχογραφίες για την ταυτοποίηση βακτηρίων (Röllerke et al. 1996; Gurtner et al. 2000; Schabereiter-Gurtner 2001a) και Αρχαίων (Röllerke et al. 1998; Piñar et al. 2001) και σε δείγματα γυαλιού (Röllerke et al. 1999). Μια πληθώρα στελεχών ανιχνεύτηκε στα παραπάνω δείγματα, όπως και σε δείγματα από τοιχογραφίες σπηλαίων (Schabereiter-Gurtner et al. 2002a and b; Schabereiter-Gurtner et al. 2004). Επίσης, η διαδικασία αυτή προσέφερε τη δυνατότητα ανίχνευσης στελεχών, τα οποία μέχρι πρότινος δεν είχαν ανιχνευτεί σε λίθινα υποστρώματα (Piñar et al. 2001a; Schabereiter-Gurtner et al. 2001b; Schabereiter-Gurtner et al. 2002a and b). Το βασικό μειονέκτημα όμως αυτής της μεθόδου, είναι το μικρό μέρος του συνολικού 16S rDNA που μπορεί να χρησιμοποιηθεί. Η αλληλούχηση αυτού του δείγματος στη συνέχεια προσφέρει πληροφορία μόνο σε επίπεδο γένους, με υψηλή πιθανότητα σφάλματος σε σχέση με τη ολόκληρη ή σχεδόν ολόκληρη αλληλούχηση του 16S rDNA.

Παλαιότερη προσέγγιση που έχει δοκιμαστεί είναι ο πολλαπλασιασμός με PCR τυχαίων κομματιών DNA, από περιβαλλοντικό δείγμα, με μικρότερους εκκινητές από τους συνηθισμένους και η παρατήρηση του αποτυπώματος των αποτελεσμάτων, βάσει κάποιας συγκεκριμένης αλληλουχίας που αντιστοιχεί σε ήδη γνωστό μικροοργανισμό (Zanardini et al. 1997).

Εναλλακτικά, η χρήση του προφίλ των λιπαρών οξέων των βακτηριακών τοιχωμάτων με αυτοματοποιημένα πρωτόκολλα έχει εφαρμοστεί, αλλά με αποτελέσματα που περιορίζονται συνήθως σε συγκεκριμένα γένη βακτηρίων όπως *Bacillus* (Gonzalez et al. 1999; Saiz-Jimenez and Laiz 2000; Gorbushina et al. 2004; Nuhoglu et al. 2006) και

συνοδεύονται με τη χρήση των βιοχημικών αυτοματοποιημένων δοκιμών. Αν συγκριθούν τα αποτελέσματα με αυτά της αλληλούχησης του 16S rDNA, πιθανόν να είναι διαφορετικά, γεγονός που επιβεβαιώνει την ευαισθησία της μεθόδου της αλληλούχησης ολόκληρου ή σχεδόν ολόκληρου του 16S rDNA των απομονωμένων μικροοργανισμών (Heyrman and Swings 2001).

Η μοριακή ταυτοποίηση μικροοργανισμών έχει ξεκινήσει πρόσφατα να εφαρμόζεται συστηματικά και να αποτελεί τη μέθοδο την οποία χρησιμοποιούν οι περισσότεροι για την ανάλυση των απομονωμένων ή μή βακτηρίων, λόγω μείωσης του κόστους της διαδικασίας. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να αναπτύσσεται σταδιακά, μια βελτιωμένη βάση δεδομένων με τους μικροοργανισμούς που αναπτύσσονται σε υποστρώματα πολιτιστικού ενδιαφέροντος και αποτελούν εν δυνάμει βιολογικούς παράγοντες διάβρωσης (Laiz et al. 2009; Capodicasa et al. 2010; Pepe et al. 2010; Pepe et al. 2011). Επίσης, καθίσταται ευκολότερη η παρακολούθηση της βιοποικιλότητας του υποστρώματος και των επιπτώσεών της σε αυτό (Laiz et al. 2011), καθώς και η βιωσιμότητα επιλεγμένων στελεχών που εφαρμόζονται για την προστασία της πολιτιστικής κληρονομιάς (Piñar et al. 2010).

1.11 Ο Μικροβιολογικός Παράγοντας και η Εκμετάλλευσή του για την Προστασία Μνημείων

Με τη βελτίωση της γνώσης όσον αφορά την ανίχνευση, την απομόνωση, το μεταβολισμό των βακτηρίων και της πληθώρας επιλογών που διαθέτουν ώστε να αναπτυχθούν σε διάφορα υποστρώματα, προέκυψε και η εναλλακτική προσέγγιση εκμετάλλευσης των βακτηρίων προς την προστασία των λίθινων μνημείων, ή άλλων έργων τέχνης, όπως οι τοιχογραφίες (Fernades 2006), περισσότερο φιλικές προς το περιβάλλον. Σε αυτές, συγκαταλέγονται ενώσεις οι οποίες παράγονται από τους ίδιους τους οργανισμούς και λειτουργούν τοξικά απέναντι σε ανταγωνιστές τους. Για παράδειγμα, η εφαρμογή της τοξίνης του *Bacillus thuringiensis* εναντίον εντόμων (Ramirez et al. 2005) για προστασία μνημείων από ξύλο.

Μια άλλη εφαρμογή μικροοργανισμών αποτέλεσε η απομάκρυνση ζωικής κόλλας, ένα συστατικό που χρησιμοποιήθηκε για την αποκόλληση τοιχογραφίας, η οποία παρουσίαζε φαινόμενα διάβρωσης και έπρεπε να απομακρυνθεί από τη σημείο που βρισκόταν. Το πρόβλημα που ανέκυψε μετά από χρόνια, ήταν ότι η γάζα, η οποία χρησιμοποιήθηκε στην

επιφάνεια της τοιχογραφίας με τη χρήση της ζωικής κόλλας, στερεοποιήθηκε και δεν μπορούσε να απομακρυνθεί και να αναδειχθεί το έργο. Η εφαρμογή του βακτηρίου *Pseudomonas stutzeri* A29 στην επιφάνεια, κατάφερε να αποδομήσει την πρωτεϊνική στρώση που κάλυπτε το έργο τέχνης, μέσα σε μερικές ώρες από την εφαρμογή του. Τα υπολείμματα κόλλας, απομκρύνθηκαν με τη χρήση καθαρών ενζύμων, ώστε να αποφευχθεί η παρατεταμένη εφαρμογή του βακτηρίου, γεγονός που θα μπορούσε να καταστρέψει και την τοιχογραφία (Ranalli et al. 2005). Ο τρόπος δράσης του μικροοργανισμού, έγκειται στην παραγωγή υψηλών ποσοτήτων πρωτεασών, οι οποίες αποικοδομούν κολλαγόνο και καζεΐνη (Antonioli et al. 2005).

Μολονότι οι διαδικασίες διάβρωσης πραγματοποιούνται σε αερόβιες συνθήκες, ή σε συνθήκες περιορισμένης συγκέντρωσης οξυγόνου, η χρήση αναερόβιων μικροοργανισμών για την απομάκρυνση μαύρων επιστρώσεων, αποδείχθηκε πρόσφατα επιτυχής. Οι μαύρες επιστρώσεις προέρχονται από την αντίδραση του λίθινου υποστρώματος με την ατμόσφαιρα και τις θειικές ενώσεις που μεταφέρει. Ως αποτέλεσμα, σταδιακά επέρχεται μετατροπή του ανθρακικού ασβεστίου σε γύψο, ο οποίος αποκτά μαύρο χρώμα από την ταυτόχρονη ενσωμάτωση άλλων ενώσεων, οι οποίες δίνουν το μαύρο χρωματισμό. Ο μικροοργανισμός που εφαρμόστηκε ήταν ο *Desulfovibrio vulgaris* subsp. *vulgaris* ATCC 29579, ο οποίος αντέχει σε περιβάλλον με μικρή περιεκτικότητα σε οξυγόνο, σε αντίθεση με άλλα στελέχη του ίδιου μικροοργανισμού που δεν αντέχουν. Η προετοιμασία του μικροοργανισμού για εφαρμογή, βελτιστοποιήθηκε και εφαρμόστηκε σε μαρμάρινη επιφάνεια με τη βοήθεια πολυμερούς, το οποίο επέτρεψε τη μεταφορά και απομάκρυνση των κυττάρων από την επιφάνεια. Επιπρόσθετα, το πολυμερές συνεισέφερε στη δημιουργία ανοξικών συνθηκών, οι οποίες επιτυγχάνονται με την κάλυψη του υποστρώματος με ειδική μεμβράνη (Carpitelli et al. 2006). Τα αποτελέσματα ήταν ικανοποιητικά, με τη σχεδόν πλήρη απομάκρυνση του γύψου και αποκατάσταση του μαρμάρου σε αντίστοιχα επίπεδα, με άλλα σημεία τα οποία δεν ήταν επιβαρυνμένα με μαύρη επικάλυψη. Επιπλέον, στα σημεία στα οποία ταυτοποιήθηκε πατίνα, αυτή δεν απομακρύνθηκε με την εφαρμογή του μικροοργανισμού (Carpitelli et al. 2007) Αντίστοιχη επιτυχία υπήρξε και κατά την εφαρμογή του μικροοργανισμού σε ασβεστολιθικά αγάλματα. Η εφαρμογή του απομάκρυνε τις μαύρες επικαθίσεις θεικών από περισσότερο πορώδες υπόστρωμα, σε σχέση με το ήδη δοκιμασμένο μάρμαρο. Επιπλέον, δεν επηρέασε την πατίνα η οποία βρισκόταν κάτω από αυτές. Τα λίθινα υποστρώματα αποκτούν πατίνα με τη πάροδο του χρόνου και σε πολλές περιπτώσεις θεωρείται αναπόσπαστο μέρος τους το οποίο δεν πρέπει να αλλοιωθεί, μια και το ίδιο προστατεύει το υπόστρωμα. Αυτό

είναι περισσότερο σημαντικό σε αγάλματα στα οποία, αν η πατίνα αφαιρεθεί, χάνουν τις εκφραστικές τους λεπτομέρειες και τα χαρακτηριστικά τους (Polo et al. 2010).

Βελτιώνοντας την παραπάνω εφαρμογή, δόθηκε η δυνατότητα της παράλληλης μείωσης και των νιτρικών ανιόντων μαζί με τα θειικά. Για να πραγματοποιηθεί αυτό, χρησιμοποιήθηκαν ο παραπάνω μικροοργανισμός μαζί με *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707, ο οποίος μπορεί να απομακρύνει τα νιτρικά, χρησιμοποιώντας τα για την ανάπτυξή του. Η ταυτόχρονη εφαρμογή αποδείχθηκε επιτυχής, παρόλο που οι δύο μικροοργανισμοί δεν έχουν τις ίδιες απαιτήσεις όσον αφορά το οξυγόνο. Η ξεχωριστή εφαρμογή τους είχε δραστηρότερα αποτελέσματα. Η διαδοχική ή η ταυτόχρονη εφαρμογή μπορεί να αποφασιστεί ανάλογα με το υπόστρωμα. Η διαδικασία προσέφερε μείωση των νιτρικών και θειικών αλάτων, καθώς και διατήρηση των χαμηλών επιπέδων τους έξι χρόνια μετά την εφαρμογή (Alfano et al. 2011).

Αν η πατίνα που βρίσκεται σε λίθινο υπόστρωμα αναγνωριστεί ότι προέρχεται κυρίως από βιολογικό παράγοντα και των χρωστικών που αυτός εκκρίνει, μπορεί να αποφασιστεί η αφαίρεσή του, ώστε να αναδειχθεί το μνημείο. Σε αυτήν την περίπτωση, πρόσφατα προτάθηκε η χρήση του ενζύμου της γλυκοζιτικής οξειδάσης, η οποία παρουσία γλυκόζης παράγει H_2O_2 , το οποίο με τη σειρά του καταστρέφει τη βιολογική πατίνα, οξειδώνοντάς την. Επιπλέον, το ένζυμο είναι σταθερό απέναντι σε βαρέα μέταλλα, απολυμαίνει την επιφάνεια με ένα ήπιο μέσο όπως είναι το υπεροξείδιο, το οποίο δεν εφαρμόζεται σε μεγάλες ποσότητες αλλά σταδιακά, διότι ελέγχεται από την ποσότητα και δραστηριότητα του ενζύμου. Η εφαρμογή του σε πορώδη υλικά κρίθηκε επιτυχής σε σχέση με παραδοσιακές μεθόδους, όπως EDTA και $(NH_4)_2CO_3$ με στερεωτικό συστατικό τον σεπιόλιθο (Valentini et al. 2010).

Υπάρχει ένα ακόμη στάδιο που «συμπληρώνει» αυτή την αλυσίδα διαδικασιών αποκατάστασης και προστασίας των μνημείων και είναι η δημιουργία νέου υλικού, συμβατικού ως προς το υπόστρωμα, το οποίο να προστατεύει τη διαβρωμένη επιφάνεια διατηρώντας τη μορφολογία της και να καλύπτει, ή να στερεώνει, μικρές ρηγματώσεις, μειώνοντας την επίδραση φυσικών και χημικών παραγόντων. Με αυτόν τον τρόπο, μειώνεται ο ρυθμός διάβρωσης του υποστρώματος στο περιβάλλον. Η προσέγγιση για αυτήν τη διαδικασία παλαιότερα επιδιώχθηκε με τη χρήση πολυμερών ενώσεων, οι οποίες δημιουργούσαν ένα αδιαπέραστο τοίχωμα απέναντι σε ουσίες και μικροοργανισμούς. Όμως οι ενώσεις αυτές αποδείχθηκαν ανεπιτυχείς, διότι απέκλειαν εσωτερικά ενώσεις και συστατικά που είχαν ήδη επικαθίσει στους πόρους του λίθινου υποστρώματος και δεν

μπορούσαν να απομακρυνθούν. Ως συνέπεια, ήταν η διάβρωση «εκ των έσω» με σοβαρότερες συνέπειες και καταστροφικότερα αποτελέσματα. Επίσης τα πολυμερή αυτά, δεν μπορούσαν να διατηρήσουν συνεκτικότητα και αδράνεια απέναντι στους μικροοργανισμούς, διότι σταδιακά διασπάστηκαν. Μεσοπρόθεσμα, μετετράπησαν σε πλούσια οργανική τροφή για μονοκύτταρους και πολυκύτταρους οργανισμούς, μετά την ενζυμική αποδόμησή τους. Εναλλακτικά, η εκμετάλλευση μικροοργανισμών για την απόθεση ανθρακικού ασβεστίου στο υπόστρωμα, αποτελεί μια φυσική διαδικασία, περιβαλλοντικά φιλική, συμβατή με το υπόστρωμα, οικονομικότερη αλλά και επαναλήψιμη.

Οι Boquet et al. (1973), ήταν από τους πρώτους οι οποίοι απέδειξαν την ικανότητα των μικροοργανισμών να προκαλούν την καταβύθιση ανθρακικού ασβεστίου από μικροοργανισμούς, σε θρεπτικό συστατικό ενισχυμένο σε ασβέστιο. Η έρευνα αυτή, κατέληξε στην ανάπτυξη μιας πρωτότυπης μεθόδου σχηματισμού ανθρακικού ασβεστίου από μικροοργανισμούς, κατοχυρωμένη με ευρεσιτεχνίες (Adolphe et al. 1990; Castanier et al. 1995) και αποτέλεσε το έναυσμα για την πιο συστηματική διερεύνηση των μικροοργανισμών στον τομέα της προστασίας των μνημείων. Ο προτεινόμενος μικροοργανισμός ήταν ο *Bacillus cereus*, παρόλο που στις ευρεσιτεχνίες αναφέρονται και άλλα ετερότροφα βακτήρια. Η διαδικασία εφαρμογής η οποία προτάθηκε ήταν ο ψεκάσμος της επιφάνειας με θρεπτικό διάλυμα που περιείχε το μικροοργανισμό και στη συνέχεια ο ψεκάσμος της επιφάνειας, μόνο με το θρεπτικό διάλυμα. Η συχνότητα ψεκάσμου και η διάρκεια εφαρμογής, εξαρτάται από την επιφάνεια στην οποία εφαρμόζεται. Το είδος του μικροοργανισμού επίσης, μπορεί να διαφοροποιηθεί για τον ίδιο λόγο. Η πρώτη εφαρμογή σε περιβαλλοντικές συνθήκες αφορούσε τοίχο εκκλησίας κτισμένης τον 12^ο αιώνα, η οποία πέντε χρόνια πριν τη εφαρμογή, είχε συντηρηθεί πλήρως. Η εφαρμογή ελέγχθηκε μετά από 6 και 12 μήνες, αποδεικνύοντας τη σταθερότητα της νέας βιο-απόθεσης μακροσκοπικά, με ηλεκτρονική μικροσκοπία δείγματος, απορρόφησης ύδατος, μικροβιολογικής ανάλυσης και χρωματομετρίας. Ανάλογη δοκιμή πραγματοποιήθηκε σε ομοιώματα αγαλμάτων, τα οποία ένα χρόνο μετά τον ψεκάσμό τους όπως παραπάνω, τοποθετήθηκαν σε διαφορετικούς περιβαλλοντικούς χώρους: αστικός, υπαίθρου, παραθαλάσσιος, σε εσωτερικό χώρο και σε θάλαμο επιτάχυνσης προσομοίωσης φθοράς. Στον τελευταίο, τα αποτελέσματα απέδειξαν την αντίσταση της νέας επικάλυψης στη φθορά, σε αντίθεση με δείγματα τα οποία δεν είχαν υποστεί καμία διεργασία. Στον εσωτερικό χώρο, τα δείγματα δεν υπέστησαν διάβρωση. Στο εξωτερικό περιβάλλον, η επιφάνεια διατηρήθηκε σε μεγάλο βαθμό 3 χρόνια μετά. Τον τέταρτο χρόνο, παρατηρήθηκε διάβρωση ανάλογα με το περιβάλλον που είχαν τοποθετηθεί.

Τα χειρότερα αποτελέσματα εμφανίστηκαν σε δείγματα της υπαίθρου και παραθαλάσσια, με έντονη εμφάνιση νέων μικροοργανισμών, μυκήτων, λειχήνων και αλγών. Αντίθετα, τα «αστικά» δείγματα εμφάνισαν τη μικρότερη διάβρωση (Castanier et al. 1999; Le Métayer-Levrel et al. 1999). Πρόσφατα, η διαδικασία αυτή δοκιμάστηκε εργαστηριακά και σε γύψο (Anne et al. 2010).

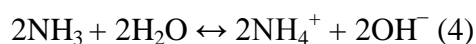
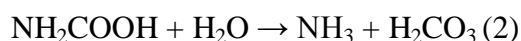
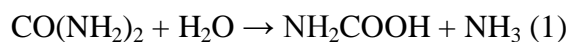
Μια εναλλακτική προσέγγιση αναπτύχθηκε από Ισπανούς ερευνητές με τη χρήση του μικροοργανισμού *Myxococcus xanthus*, ο οποίος παλαιότερα είχε αποδειχθεί ότι προκαλεί τον σχηματισμό στρουβίτη ($MgNH_4PO_4 \cdot 6H_2O$) (Ben Omar et al. 1995; Ben Omar et al. 1998) και οι κυτταρικές του μεμβράνες (Gonzalez-Muñoz et al. 1996) ή ο ίδιος ο μικροοργανισμός (Gonzalez-Muñoz et al. 2000), μπορούσαν να προκαλέσουν το σχηματισμό ασβεστίτη. Οι πρώτες δοκιμές ανακοινώθηκαν το 2004, για τη δυνατότητα απόθεσης ανθρακικού ασβεστίου από τον μικροοργανισμό σε λίθινο υπόστρωμα, όμοιο με αυτό που έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως στα μνημεία της Ισπανίας. Η διάρκεια των πειραμάτων ήταν 30 ημέρες, με τη χρήση 2 διαφορετικών θρεπτικών. Η διαφορά ήταν ότι στο ένα, το pH διατηρήθηκε σταθερό με τη χρήση ρυθμιστικού διαλύματος. Η πηγή ασβεστίου ήταν το οξικό ασβέστιο, ενώ συμπεριλήφθηκε και πηγή ανθρακικών ανιόντων με τη μορφή άλατος. Κύρια μορφή του ανθρακικού ασβεστίου που αποτέθηκε ήταν ο ασβεστίτης, ενώ μικρή ποσότητα βατερίτη εμφανίστηκε σε καλλιέργειες με το θρεπτικό M3, το οποίο δεν είχε ρυθμιστικό διάλυμα. Η αντοχή του υλικού που επικάθισε πάνω στο υπόστρωμα, διερευνήθηκε με τη χρήση λουτρού υπερήχων, μια εφαρμογή που δεν είχε μέχρι πρότινος δοκιμαστεί και προσέφερε τη δυνατότητα ελέγχου της συνεκτικότητας του υλικού με το υπόστρωμα, αλλά και του μέτρου της προστασίας του υποστρώματος από τη νέα επιφάνεια, ως προς την απώλεια υλικού. Επιπρόσθετα, όσον αφορά τα δύο θρεπτικά που χρησιμοποιήθηκαν (M3 και M3-P), θεωρήθηκε καλύτερο αυτό με το ρυθμιστικό διάλυμα (M3-P), διότι το σταθερό pH βοήθησε στο σχηματισμό ασβεστίτη, με την αποφυγή υπερκορεσμού του διαλύματος με CO_3^{2-} , ενώ η επιπλέον πηγή φωσφόρου, παρέτεινε τη διάρκεια δράσης του μικροοργανισμού (Rodríguez-Navarro et al. 2003). Ο βατερίτης αποτέλεσε συστηματικό προϊόν, στην έρευνα των Ισπανών, σε θρεπτικό το οποίο δεν είχε ρυθμιστικό διάλυμα και πάντα παρουσία θρεπτικής οργανικής ύλης, όπως είναι η πεπτόνη. Η μορφολογία του ήταν σφαίρες διαφορετικής διαμέτρου και ράβδοι διαστάσεων βακτηρίου. Στην περίπτωση σχηματισμού βατερίτη σε θρεπτικό υγρό όπου αναπτύσσεται ο μικροοργανισμός, προτάθηκε ότι η σταθερότητά του οφείλεται σε οργανικά μόρια, τα οποία γίνονται μέρος του κρυστάλλου του βατερίτη, τον σταθεροποιούν και εμποδίζουν τη

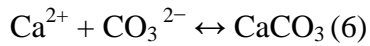
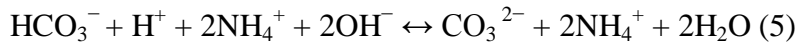
διαλυτοποίηση και ανακρυστάλλωση σε ασβεστίτη. Οι ενώσεις αυτές μπορεί να προέρχονται από το ίδιο το θρεπτικό, αλλά λόγω του βακτηρίου επικρατεί το κυτταρικό τοίχωμα και οι εξωκυττάρια πολυμερείς ενώσεις. Η πληθώρα αρνητικών φορτίων, δρουν ως πυρήνες συσσώρευσης των κατιόντων ασβεστίου (Rodriguez-Navarro et al. 2007).

Η υψηλή απόδοση του *M. xanthus* οδήγησε στην εξέλιξη της διαδικασίας και στη δοκιμή του μικροοργανισμού, αλλά και των θρεπτικών, για την βιολογική απόθεση ανθρακικού ασβεστίου σε λίθινες επιφάνειες. Οι δοκιμές σε διαβρωμένο λίθινο υπόστρωμα απέδειξαν τις δυνατότητες εφαρμογής της μεθόδου σε εργαστηριακές συνθήκες. Από τα δύο θρεπτικά που πρότεινε η συγκεκριμένη ερευνητική ομάδα, το M3, που προωθεί το σχηματισμό βατερίτη σε σημαντικές ποσότητες, έδωσε τα καλύτερα αποτελέσματα ως προς την αντοχή σε υπερήχους και τη μεγαλύτερη απόδοση σε αύξηση βάρους των δειγμάτων. Επιπρόσθετα, δοκιμάστηκε η εφαρμογή θρεπτικού υγρού, με ή χωρίς *M. xanthus*, σε μη αποστειρωμένα δείγματα, έτσι ώστε να διερευνηθεί η δυνατότητα ενεργοποίησης της μικροχλωρίδας του υποστρώματος, ως προς το σχηματισμό ανθρακικού ασβεστίου. Η ενεργοποίηση ήταν επιτυχής, με τη μικροχλωρίδα του υποστρώματος να συμμετέχει σημαντικά στο σχηματισμό του νέου υλικού. Η συνδυασμένη χρήση θρεπτικού – *M. xanthus*, βοήθησε τη διαδικασία, κυρίως στην αρχή της, διότι ήταν ήδη ενεργοποιημένος για την απόθεση ανθρακικού ασβεστίου. Μετά από μερικές μέρες επώασης η μικροχλωρίδα ήταν αυτή που συμμετείχε περισσότερο ενεργά (Jimenez-Lopez et al. 2007). Η ίδια μεθοδολογία εφαρμόστηκε και σε δείγμα λίθου, το οποίο είχε εξορυχθεί χωρίς περαιτέρω διάβρωση ή επεξεργασία και προέκυψαν αντίστοιχα αποτελέσματα. Το θρεπτικό M3 ήταν αποδοτικότερο, ενεργοποιώντας τη μικροχλωρίδα του λίθου, το οποίο ενισχύθηκε περαιτέρω με τη συμμετοχή του *M. xanthus*. Η μικροχλωρίδα που ενεργοποιήθηκε στις παραπάνω δύο περιπτώσεις, έχει ομοιότητες. Επίσης, η ενίσχυση πληθυσμιακά των βακίλων από τη διαδικασία και η ύπαρξη αρκετών στελεχών από το συγκεκριμένο γένος, ανέδειξαν τη σημασία και τη σταθερότητα αυτών των μικροοργανισμών, στο να προωθούν το σχηματισμό ανθρακικού ασβεστίου. Σημειώνεται ότι, η μικροχλωρίδα αναγνωρίστηκε με το διαχωρισμό του 16S rDNA με DGGE και αλληλούχηση του αντίστοιχου μέρους του γονιδίου και δεν έγινε προσπάθεια απομόνωσης μεγαλύτερου κομματιού του ριβοσωμικού DNA (Jimenez-Lopez et al. 2008). Αυτό πραγματοποιήθηκε σε πιο πρόσφατη δημοσίευση (Jroundi et al. 2010) όπου έγινε προσπάθεια απομόνωσης μικροοργανισμών από το σημείο εφαρμογής των προτεινόμενων θρεπτικών, σε τοίχο μνημείου στο περιβάλλον. Το θρεπτικό που εφαρμόστηκε ήταν το M3-P, λόγω του ότι στις προηγούμενες δημοσιεύσεις ενίσχυσε το

σηματισμό ασβεστίτη σε σχέση με τον βατερίτη. Η αιτία επιλογής του θρεπτικού με το ρυθμιστικό διάλυμα, ήταν ότι η απόθεση ασβεστίτη θεωρείται από τους συγγραφείς, περισσότερο συμβατή με το λίθινο υπόστρωμα, έναντι του βατερίτη. Παρόλα αυτά, αναφέρεται ότι οι καλλιέργειες των νέων απομονωμένων βακτηρίων σε στερεά θρεπτικά εμφάνισαν μίγματα ασβεστίτη με βατερίτη, γεγονός που ενισχύει τα δικά μας συμπεράσματα όσον αφορά τη συστηματική εμφάνιση του τελευταίου. Η συγκεκριμένη εφαρμογή στο περιβάλλον απέδειξε επίσης, ότι το θρεπτικό από μόνο του ήταν ικανό να προσφέρει ανιχνεύσιμα αποτελέσματα απόθεσης στο λίθινο υπόστρωμα, απουσία του *M. xanthus*. Η ενεργοποίηση της μικροχλωρίδας του μνημείου, η οποία ήταν πλούσια σε μικροοργανισμούς που προκαλούν την καταβύθιση ανθρακικού ασβεστίου, ήταν επαρκής (Jroundi et al. 2010). Περαιτέρω έρευνα σε δοκίμια λίθου από το ίδιο μνημείο και από σημεία εξόρυξης ανέδειξε ένα σημαντικό αριθμό βακτηρίων τα οποία ενεργοποιούνται με τη χρήση του M3-P με/χωρίς *M. xanthus*. Αυτά που επικρατούν ανήκουν στα γένη *Bacillus*, *Pseudomonas* και *Brevibacillus* (Piñar et al. 2010). Η δοκιμή του θρεπτικού M3 έδωσε και αυτό ικανοποιητικά αποτελέσματα με τη χρήση απομονωμένων βακτηρίων από διαβρωμένο λίθο, ή σε συνδυασμό αυτών με τον *M. xanthus*. Τα αποτελέσματα δεν είναι συγκρίσιμα με τις παραπάνω εργασίες που αναφέρονται στη μικροχλωρίδα του υποστρώματος, διότι εδώ συγκρίνονται απομονωμένα στελέχη. Ειδική αναφορά όμως πραγματοποιείται για το στέλεχος *Bacillus fusiformis*, το οποίο μολονότι ήταν από τους αποδοτικότερους στην αύξηση βάρους, η μειωμένη αντίσταση στις δοκιμές αντοχής με υπερήχους, υποδεικνύει ότι η απόθεση περιορίστηκε στην επιφάνεια του δοκιμίου και για το λόγο αυτό δεν προτείνεται για εφαρμογές βιο-στερέωσης. Η μειωμένη συνεκτικότητα στην επιφάνεια θα απασχολήσει τη συζήτηση αποτελεσμάτων, διότι η χρήση μαρμάρου επικεντρώνεται σε αυτήν την βιο-απόθεση.

Βέλγοι επιστήμονες επέλεξαν τη διερεύνηση μικροοργανισμών, οι οποίοι έχουν τη δυνατότητα να υδρολύουν το μόριο της ουρίας με το αντίστοιχο ένζυμο της ουρεάσης, όπως παρουσιάζεται και στις παρακάτω χημικές αντιδράσεις:





Η ουρία υδρολύεται ενδοκυτταρικά σε αμμωνία και καρβαμικό οξύ (1), το οποίο άμεσα υδρολύεται σε αμμωνία και ανθρακικό οξύ (2). Τα προϊόντα των αντιδράσεων αυτών σε υδατικό διάλυμα ισορροπούν, σύμφωνα με τις αντιδράσεις (3, 4), αυξάνοντας όμως ταυτόχρονα το pH και προκαλώντας το σχηματισμό ανθρακικών ανιόντων, μετατοπίζοντας την ισορροπία της αντίδρασης (5) προς τα δεξιά. Με την ύπαρξη κατιόντων ασβεστίου μπορεί να σχηματισθεί ανθρακικό ασβέστιο (6). Στελέχη του γένους *Bacillus* απομονώθηκαν από διαφορετικά οικοσυστήματα και παρουσίασαν διαφορετική μορφολογία όσον αφορά το σχηματισμό ασβεστίτη (Hammes et al. 2003). Από τους μικροοργανισμούς αυτούς, πέντε στελέχη του είδους *Bacillus sphaericus* δοκιμάστηκαν σε υπόστρωμα ασβεστόλιθου. Η διαδικασία ήταν διαφορετική από αυτή που έχει περιγραφεί για τον *M. xanthus*, εμβαπτίζοντας το υπόστρωμα αρχικά σε θρεπτικό διάλυμα με τους μικροοργανισμούς, απουσία ασβεστίου και κατόπιν η προσθήκη CaCl_2 , ως πηγής ασβεστίου. Τα αποτελέσματα ήταν ενθαρρυντικά και για τα δύο στελέχη *B. sphaericus* που δημιούργησαν μια νέα επιφάνεια από ασβεστίτη (Dick et al. 2006).

Περαιτέρω διερεύνηση της απόθεσης ανθρακικού ασβεστίου πραγματοποιήθηκε σε δείγματα τσιμέντου, που αποτελεί ένα ακόμη τομέα στον οποίο μπορεί να βρει εφαρμογή η βιο-απόθεση. Οι δοκιμές έγιναν αρχικά σε θρεπτικό διάλυμα που περιλάμβανε το μικροοργανισμό *B. sphaericus* LMG225 57 (επιλεγμένος από τους προηγούμενους), ώστε να δημιουργηθεί η κατάλληλη βακτηριακή πυκνότητα στο υπόστρωμα και στη συνέχεια τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε διαφορετικά διαλύματα που περιείχαν ασβέστιο, ουρία και/ή θρεπτικά συστατικά (nutrient broth). Η σύσταση του διαλύματος προκάλεσε το σχηματισμό διαφορετικών μορφών ανθρακικού ασβεστίου. Ασβεστίτης σχηματίστηκε παρουσία ουρίας και χλωριούχου ασβεστίου. Η αλλαγή σε οξικό ασβέστιο προκάλεσε την αύξηση σφαιρικών δομών που αντιστοιχούν σε βατερίτη. Η προσθήκη nutrient broth οδήγησε επίσης στην επικράτηση του βατερίτη, ανεξάρτητα από την πηγή ασβεστίου. Η εναλλακτική επιλογή της χρήσης μίγματος ουρεολυτικών βακτηρίων από εγκαταστάσεις διαχείρισης λυμάτων, είχε ανάλογα αποτελέσματα στη μορφολογία των κρυστάλλων, ειδικά στην επικράτηση του βατερίτη που ήταν πιο εμφανής. Το μίγμα μικροοργανισμών επιλέχθηκε ως οικονομικότερη εφαρμογή, έναντι της χρήσης καθαρής καλλιέργειας. Τα αποτελέσματα, όσον αφορά χρωματικές διαφορές στο υπόστρωμα και απορροφητικότητα ύδατος, βελτιστοποιήθηκαν με

τη χρήση καθαρής καλλιέργειας, η οποία προσέφερε ανταγωνιστικά αποτελέσματα σε σχέση τόσο με το μίγμα βακτηρίων, όσο και με κλασικές μεθόδους προστασίας όπως πυριτικά, ακρυλικά πολυμερή και πολυμερή πολυουρεθάνης (De Muynck et al. 2008a). Περαιτέρω διερεύνηση του μικροοργανισμού στη βελτίωση της αντοχής τσιμεντένιων υλικών, ως προς την υδατοαπορροφητικότητα, ενανθράκωση, μετακίνηση ιόντων χλωρίου και αντοχή στη ψύξη - θέρμανση, επιβεβαίωσε θετικά ότι η απόθεση νέου υλικού μπορεί να βοηθήσει. Επίσης, παρόλο που το θρεπτικό ήταν διαφοροποιημένο, ο βατερίτης ήταν εμφανής στις περιπτώσεις χρήσης οξικού ασβεστίου (De Muynck et al. 2008b). Αυτό αποτελεί και ένα από τα προβλήματα για να συγκριθούν επαρκώς οι προτεινόμενες μεθοδολογίες, ακόμα και σε δημοσιεύσεις των ίδιων ερευνητικών ομάδων. Παρόλα αυτά, μπορούν να εξαχθούν γενικά συμπεράσματα όσον αφορά την επίδραση των συστατικών των διαλυμάτων που χρησιμοποιούνται.

Η επίδραση της συγκέντρωσης ουρίας και ασβεστίου σε δείγματα ασβεστόλιθου, διερευνήθηκε πρόσφατα για τον *B. sphaericus*. Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων απόθεσης, δεν χρησιμοποιήθηκε καμία άλλη θρεπτική πηγή, με αποτέλεσμα, η απόθεση να οφείλεται αποκλειστικά στη δράση της ουρεάσης των βακτηρίων, που είχαν ήδη αποθεθεί πάνω στο υπόστρωμα. Αύξηση των συγκεντρώσεων των θρεπτικών, δεν προσέφερε ανάλογη αύξηση απόθεσης. Επομένως, η αύξηση των συγκεντρώσεων δεν αποδίδει γραμμικά, αλλά εμφανίζει κορεσμό, ο οποίος μπορεί να οφείλεται στη απενεργοποίηση του ενζύμου λόγω του σχηματισμού ανθρακικού ασβεστίου στην κυτταρική μεμβράνη του μικροοργανισμού και στον τελικό θάνατο αυτών. Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι η αύξηση στην απόθεση δεν βελτίωσε σημαντικά την αντίσταση του υλικού, ως προς την επίδραση υπερήχων, λόγω της περιορισμένης διείσδυσής του στους πόρους του υποστρώματος. Η χρήση οξικού ασβεστίου είχε βελτιωμένα αποτελέσματα και ταυτόχρονα μείωσε τη συγκέντρωση χλωρικών ανιόντων, τα οποία θα μπορούσαν να επηρεάσουν σε ανοιχτό περιβάλλον την επιφάνεια του ασβεστόλιθου με το σχηματισμό αλάτων (De Muynck et al. 2010b). Επιπλέον, η αυξημένη συγκέντρωση κατιόντων αμμωνίου, μπορεί να προωθήσει την ανάπτυξη βακτηρίων που το μετατρέπουν σε νιτρικό ανιόν, όταν το pH αρχίσει να μειώνεται μετά την ολοκλήρωση της απόθεσης. Παρόλα αυτά, η ανάπτυξη τέτοιων μικροοργανισμών προϋποθέτει αρκετό χρόνο σε σχέση με άλλα ετερότροφα βακτήρια (De Muynck et al. 2010a). Ο παραπάνω έλεγχος, στη βιο-απόθεση ανθρακικού ασβεστίου της αναλογίας ουρίας/ασβεστίου, αποτελεί σημαντική προσπάθεια ανάλυσης την επίπτωσης του θρεπτικού, σε σχέση με τα επιδιωκόμενα αποτελέσματα επαρκούς απόθεσης. Η διαδικασία ακολουθήθηκε και από εμάς

κατά τη διάρκεια του διδακτορικού, έχοντας εξ αρχής παρατηρήσει την επίδραση της συγκέντρωσης των θρεπτικών συστατικών στην πολυμορφικότητα του ανθρακικού ασβεστίου, στην ταχύτητα σχηματισμού του, αλλά και στη βελτιστοποίηση της διαδικασίας με τη μικρότερη δυνατή θρεπτική επιβάρυνση του υποστρώματος.

Η βέλτιστη αναλογία ουρίας/ασβεστίου χρησιμοποιήθηκε και για τη σύγκριση των ουρεολυτικών μικροοργανισμών *B. sphaericus*, *Sporosarcina pasteurii* (παλιότερα *B. pasteurii*), *Sporosarcina ureae* και *Sporosarcina psychrophila* πάνω σε ασβεστόλιθο. Η διερεύνηση αυτή είχε ως στόχο να καθοριστεί η επίδραση της θερμοκρασίας στην διαδικασία απόθεσης. Τα δύο πρώτα στελέχη παρουσίασαν ανταγωνιστικά αποτελέσματα χωρίς να είναι δυνατή, προς το παρόν, μια ξεκάθαρη επιλογή ανάμεσά τους. Και τα δύο αύξησαν τη δράση της ουρεάσης και την απόθεσή τους με την αύξηση της θερμοκρασίας μέχρι τους 28°C. Μεγαλύτερη θερμοκρασία δεν παρείχε κάποια δραστηκή βελτίωση. Η μεταβολή βάρους για τον *B. sphaericus* ήταν η μεγαλύτερη σε σχέση με τα υπόλοιπα στελέχη, προσφέροντας και μεγαλύτερη αντίσταση όταν τα δείγματα υποβλήθηκαν σε υπερήχους. Σύμφωνα με τους συγγραφείς, ο *B. sphaericus* εμφανίζεται ως η πιο ενδεδειγμένη επιλογή σε ευρύτερες περιβαλλοντικές συνθήκες (De Muynck et al. 2013).

Αξίζει να αναφερθεί ότι πρόσφατα δοκιμάστηκε η ικανότητα του μικροοργανισμού να προκαλέσει το σχηματισμό ανθρακικού ασβεστίου, όταν αναμίχθηκε με πυριτική γέλη, ώστε να σχηματιστεί μια πάστα που να καλύψει ρηγματώσεις σε δείγματα τσιμέντου. Η απόδοση ήταν επιτυχής μόλις σε μικρές ρωγμές (Tittelboom et al. 2010). Ο ίδιος μικροοργανισμός, όταν συγκρίθηκε με τους *Pseudomonas putida* και *Bacillus subtilis*, σχημάτισε σχεδόν αποκλειστικά βατερίτη σε θρεπτικό διάλυμα παρόμοιο με το B4 το οποίο περιέχει οξικό ασβέστιο. Η ποσότητα παραγωγής υλικού ήταν μεγαλύτερη σε σχέση με τη χρήση θρεπτικού το οποίο περιείχε ουρία, παρουσιάζοντας μια εναλλακτική προσέγγιση, κατά την οποία δεν ενισχύεται το ένζυμο της ουρεάσης και καθιστά τον μικροοργανισμό λειτουργικό σε περισσότερες επιλογές θρέψης (Shirakawa et al. 2011).

Ένας άλλος ουρεολυτικός μικροοργανισμός ο οποίος διερευνάται είναι ο *Sporosarcina pasteurii* (μέχρι πρόσφατα: *Bacillus pasteurii*), του οποίου η άμεση συμμετοχή στο σχηματισμό ασβεστίτη σε διάλυμα ουρίας-CaCl₂ αποδείχθηκε αρχικά σε στήλες άμμου, μειώνοντας τη διαπερατότητά τους (Stocks-Fischer et al. 1999). Ο συγκεκριμένος μικροοργανισμός, επιλέχθηκε όχι μόνο για την αποδοτικότητά του να σχηματίζει ανθρακικό ασβέστιο και να μειώνει τη διαπερατότητα, αλλά και για την ανθεκτικότητά του να

αναπτύσσεται σε διαλύματα που περιείχαν περιβαλλοντικούς ρύπους (Gollapudi et al. 1995). Δοκιμές σε τσιμέντο, ανέδειξαν ότι ο μικροοργανισμός δεν μπορεί να επιβιώσει στο υψηλό pH του υποστρώματος, όταν αναμειγνύεται με τα συστατικά του τσιμέντου. Σε περιπτώσεις που στοχεύουν στην αποκατάσταση ρηγματώσεων, ο σχηματισμός ασβεστίτη βοηθά στην αποκατάστασή τους, κυρίως όμως σε όσες είναι μικρού βάθους (Ramachandran et al. 2001). Για αυτό και ο ίδιος μικροοργανισμός (Bang et al. 2001), αλλά και το απομονωμένο ένζυμο (Bachmeier et al. 2002), διερευνήθηκαν χρησιμοποιώντας ως μέσο προστασίας τους την ακινητοποίησή τους στο πολυμερές πολυουρεθάνη. Πειράματα προσομοίωσης σε ρηγματώσεις κύβων τσιμέντου, απέδειξαν ότι ο μικροοργανισμός σχημάτισε ασβεστίτη μέσα στο πολυμερές ενισχύοντας την αντοχή του υποστρώματος (Bang et al. 2001). Επίσης, το απομονωμένο ένζυμο από τον μικροοργανισμό διατήρησε τη λειτουργικότητά του, προκαλώντας την καταβύθιση ασβεστίτη στο εσωτερικό του δικτύου του πολυμερούς. Η χρήση μόνο του ενζύμου αποτελεί μια εναλλακτική, ώστε να μη χρησιμοποιηθεί όλο το κύτταρο (Bachmeier et al. 2002). Επιπλέον, ο συγκεκριμένος μικροοργανισμός συγκρίθηκε με τέσσερα στελέχη (*Sporosarcina soli*, *Bacillus massiliensis*, *Arthobacter crystallopoietes* και *Lysinibacillus fusiformis*) απομονωμένα από τσιμέντο, για την ικανότητά τους να ενισχύουν την αντοχή κονιάματος τσιμέντου-άμμου, αναμειγνύοντάς τους με τα συστατικά. Ο μικροοργανισμός με τη μεγαλύτερη επίδραση στην αντοχή του κονιάματος ήταν ο *A. crystallopoietes* με μεγάλη διαφορά, ακόμα και από τον *S. pasteurii* (Park et al. 2010). Απουσιάζουν όμως αναλύσεις του εσωτερικού του τσιμέντου, ώστε να αποδειχθεί εάν πράγματι οι μικροοργανισμοί σχημάτισαν ασβεστίτη, ή η θετική επίδραση ήταν λόγω της οργανικής μάζας των κυττάρων. Όμως μια συνολική διερεύνηση μεθόδων εφαρμογής του μικροοργανισμού, όπως εμβάπτιση σε διάλυμα, ψεκάσμος, απόθεση μαζί με άγαρ στην επιφάνεια του τσιμέντου και ως συστατικό κονιάματος για τη στερεοποίηση μικρών ρωγμών, έδωσαν ικανοποιητικά αποτελέσματα (Chunxiang et al. 2010). Η χρήση άγαρ ως μέσου στερεοποίησης και προστασίας των μικροοργανισμών, έτσι ώστε να μπορέσουν να αποθέσουν στην επιφάνεια τσιμέντου μολονότι αξιολογήθηκε πολύ θετικά (Chunxiang et al. 2010), προσθέτει σημαντικό οργανικό φορτίο στην επιφάνεια, το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πηγή ενέργειας για την εποίκιση της επιφάνειας από πληθώρα μικροοργανισμών. Σε δείγματα τούβλων, ο *S. pasteurii* ήταν αποδοτικότερος, σχηματίζοντας ασβεστίτη και μειώνοντας τη απορροφητικότητα νερού του υποστρώματος συγκρινόμενος με άλλους μικροοργανισμούς (Sarda et al. 2009). Για να βελτιωθεί περαιτέρω η απόδοσή του, αναπτύχθηκε πρόσφατα εξειδικευμένο θρεπτικό, το οποίο ενίσχυσε τη λειτουργικότητα της ουρεάσης και συνεπώς και το σχηματισμό ανθρακικού ασβεστίου, αλλά με μίγμα ασβεστίτη

– βατερίτη (Raut et al. 2013). Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, το υψηλό pH του τσιμέντου αναστέλλει τη λειτουργικότητα των κυττάρων. Η μετάλλαξη με τη χρήση υπερϊώδους ακτινοβολίας, προσέφερε στέλεχος που αναπτυσσόταν σε υψηλότερο pH (~11), συνοδευόμενο από αποδοτικότερο ένζυμο ουρεάσης και σχηματισμό ασβεστίτη. Η δοκιμή του όμως σε τσιμέντο δεν έχει πραγματοποιηθεί ακόμα (Achal et al. 2009).

Υπάρχουν αρκετοί μικροοργανισμοί οι οποίοι έχουν απομονωθεί και των οποίων η ικανότητα να προκαλούν το σχηματισμό ανθρακικού ασβεστίου, έχει διερευνηθεί. Αρκετοί από αυτούς, θα μπορούσαν να αποτελέσουν εν δυνάμει βακτήρια για δοκιμές σε λίθινα υποστρώματα, ανεξάρτητα από το περιβάλλον απομόνωσης.

Για παράδειγμα, οι Zamarreño et al., απομόνωσαν μικροοργανισμούς από ασβεστοποιημένο ξύλο, το οποίο ήταν βυθισμένο σε πηγή γλυκού νερού. Δύο στελέχη του γένους *Pseudomonas* και ένα *Acinetobacter* διερευνήθηκαν διεξοδικότερα για το είδος απόθεσής τους σε θρεπτικό διάλυμα B4, με τα πρώτα να σχηματίζουν ασβεστίτη και το δεύτερο να σχηματίζει βατερίτη (Zamarreño et al. 2009a και b). Από σπήλαια έχουν απομονωθεί στελέχη *Bacillus* όπως *B. thuringiensis* and *B. pumilus* τα οποία σχημάτισαν ασβεστίτη σε B4 θρεπτικό άγαρ με βέλτιστη απόθεση τους 25°C (Baskar et al. 2006). Ο *B. pumilus* σε υγρή καλλιέργεια B4, στην οποία είχε προστεθεί μίγμα αλάτων, δεν σχημάτισε ασβεστίτη ή βατερίτη, αλλά μαγνησιούχο ασβεστίτη (Silva-Castro et al. 2013). Οι *B. megaterium*, *B. firmus*, *B. sphaericus*, μαζί με στελέχη από *Arthrobacter*, *Kingella* και *Xanthomonas*, απομονώθηκαν από σπήλαιο στην Ιταλία και από χώμα. Όλοι οι μικροοργανισμοί σχημάτισαν ασβεστίτη, σε στερεές καλλιέργειες B4 θρεπτικού, στους 32 °C (Cacchio et al. 2003). Ο *B. megaterium*, όταν χρησιμοποιήθηκε σε ανόργανο διάλυμα πηγής ασβεστίου και ανθρακικών ανιόντων, προκάλεσε επίσης το σχηματισμό ασβεστίτη. Αντίθετα, το φυγοκεντρημένο διάλυμα μέσα στο οποίο καλλιεργήθηκε, σχημάτισε μίγμα ασβεστίτη-βατερίτη, υποδεικνύοντας ότι τα οργανικά συστατικά του μεταβολισμού του, συνδράμουν τη σταθεροποίηση της αλλόμορφης δομής (Lian et al. 2006). Ο *B. cereus* που απομονώθηκε από λίθο, σχημάτισε ασβεστίτη σε παρόμοιο θρεπτικό υγρό, αλλά με πηγή ασβεστίου το CaCl₂, αντί του οξικού ασβεστίου (Han et al. 2013). Οι δύο προαναφερθέντες μικροοργανισμοί (*B. megaterium* και *cereus*) απομονωμένοι από διαφορετικό οικοσύστημα, όταν καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό που περιείχε Nutrient broth + ουρία + CaCl₂, παρουσίασαν υψηλή ενεργότητα του ενζύμου της ουρεάσης, σχηματίζοντας ασβεστίτη και μικροποσότητες βατερίτη. Στην ίδια έρευνα, οι *B. thuringiensis* και *Lysinibacillus fusiformis* σχημάτισαν σχεδόν αποκλειστικά βατερίτη. Η απόδοση σε βάρος των σχηματιζόμενων

κρυστάλλων μεταξύ των τεσσάρων βακτηρίων δεν είχε μεγάλες διαφορές, καθώς και η ενεργότητα της ουρεάσης, επομένως κάθε μικροοργανισμός «προωθεί» διαφορετικά το σχηματισμό CaCO_3 (Kaur et al. 2013). Επίσης, σημειώνεται ότι το γένος *Lysinibacillus* βρίσκεται πολύ κοντά στο γένος *Bacillus* και πρόσφατα προτάθηκε η μεταφορά των *B. fusiformis* και *sphaericus* σε *L. fusiformis* και *sphaericus* (Ahmed et al. 2007). Επομένως, τα συμπεράσματα για αυτά τα στελέχη μπορούν προς το παρόν να συγκριθούν μεταξύ τους, συνδυάζοντας τη γνώση για τα ολιγοπεπτίδια της πεπτιδογλυκάνης. Στελέχη του γένους *Kocuria*, *Bacillus* και *Acinetobacter* απομονώθηκαν σε άλλο σπήλαιο και όλοι οι μικροοργανισμοί είχαν τη δυνατότητα να προκαλέσουν την καταβύθιση ανθρακικού ασβεστίου, σε στερεό B4 θρεπτικό άγαρ, με τη μορφή ασβεστίτη, εκτός από κάποια στελέχη του γένους *Kocuria* τα οποία προκάλεσαν την καταβύθιση και βατερίτη (Cacchio et al. 2004). Σε σπήλαιο στην Αμερική, σημαντικό ποσοστό των απομονωμένων μικροοργανισμών ήταν του γένους *Bacillus* και από διάφορα άλλα γένη, όλα με την ικανότητα να σχηματίζουν και τις τρεις πολυμορφικές δομές του ανθρακικού ασβεστίου σε B4 θρεπτικό άγαρ. Σημαντικό συμπέρασμα της συγκεκριμένης έρευνας υπήρξε το γεγονός, ότι στέλεχος στο οποίο είχε απενεργοποιηθεί το γονίδιο της πρωτεΐνης ChaA (απομακρύνει τα κατιόντα ασβεστίου από το εσωτερικό των κυττάρων) δεν κατάφεραν να επιβιώσουν και να προκαλέσουν το σχηματισμό ανθρακικού ασβεστίου. Η συγκεκριμένη ανακάλυψη, σύμφωνα με τους συγγραφείς, αναδεικνύει ότι ο σχηματισμός ανθρακικού ασβεστίου από τα βακτήρια, δεν είναι μια παθητική διαδικασία, αλλά ενεργή προς όφελός τους, έτσι ώστε να προστατευτούν από τις υψηλές τοξικές συγκεντρώσεις του κατιόντος (Banks et al. 2010). Τέλος, οι *Ralstonia eutropha* και *Xanthobacter autotrophicus*, όταν καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικά που περιείχαν ασβέστιο με κιτρικό ή οξαλικό, προκάλεσαν το σχηματισμό ασβεστίτη και βατερίτη αντίστοιχα (Braissant et al. 2002).

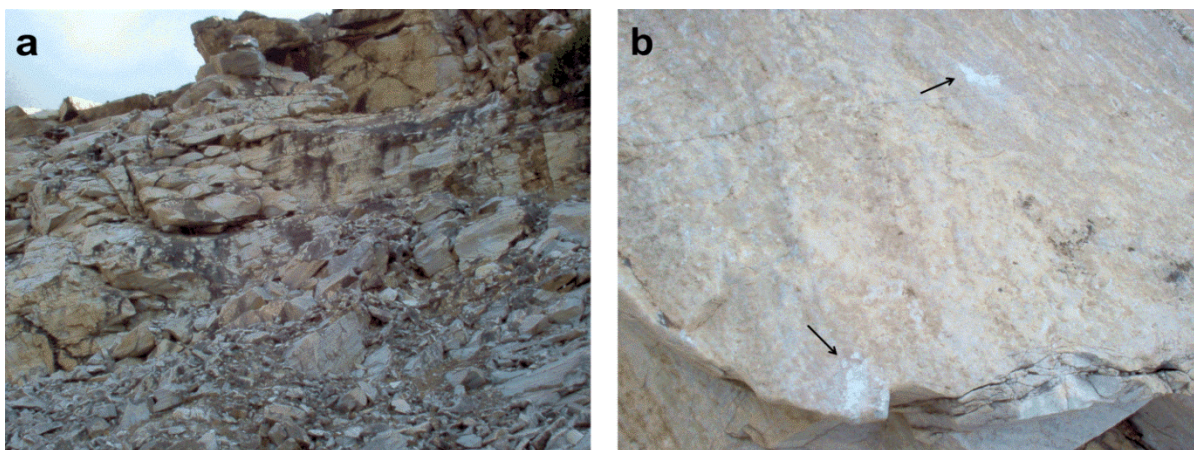
Είναι προφανές, ό π η διαρκώς αυξανόμενη βιβλιογραφία, συνεχώς επιβεβαιώνει το συμπέρασμα ότι η απόθεση ανθρακικού ασβεστίου από μικροοργανισμούς είναι ένα γενικό φαινόμενο και ότι πράγματι, συμμετέχουν στο σχηματισμό αυτού του ορυκτού εδώ και εκατομμύρια χρόνια. Όμως, το να μπορούν οι μικροοργανισμοί αυτοί να ικανοποιήσουν τις προϋποθέσεις για τη χρήση τους στην προστασία των μνημείων, είναι μια διαδικασία η οποία χρειάζεται να διερευνηθεί περαιτέρω συστηματικά. Οι προσπάθειες που έχουν γίνει έως τώρα, έχουν αποδώσει μια σειρά από μικροοργανισμούς, οι οποίοι βρίσκονται ήδη στο στάδιο της εφαρμογής σε ιστορικά μνημεία. Η διαδικασία, όπως παρουσιάστηκε παραπάνω, ήταν η επιλογή του αποδοτικότερου μικροοργανισμού και η βελτιστοποίηση του θρεπτικού

διαλύματος για τη μέγιστη δυνατή απόθεση. Ο αριθμός όμως των στελεχών είναι σχετικά μικρός και η συνεχής ανάδειξη νέων στελεχών επιβάλλεται για την ευρύτερη εφαρμογή και κατανόηση της νέας προσέγγισης στη προστασία και αποκατάσταση μνημείων με ιστορική σημασία.

2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Δειγματοληψία

Οι χώροι, οι οποίοι επιλέχθηκαν για τη λήψη στερεών και υγρών δειγμάτων για την απομόνωση μικροοργανισμών, ήταν το βουνό της Πεντέλης, σε ένα από τα αρχαία σημεία εξόρυξης μαρμάρου και το σπήλαιο «Κουτούκι» της Παιανίας. Στο πρώτο υπάρχουν εμφανή σημεία βράχων μαρμάρου τα οποία έχουν διάφορες επικαθίσεις (Εικόνα 10).



Εικόνα 10: (a) Πανοραμική φωτογραφία σημείου της περιοχής εξόρυξης Πεντελικού μαρμάρου; (b) σημεία λήψης δείγματος με νυστέρι για την απομόνωση μικροοργανισμών (μαύρο βέλος).

Τα σημεία από όπου ελήφθησαν δείγματα, ήταν όσο το δυνατόν πιο ψηλά από το επίπεδο του εδάφους. Επίσης, επιλέχθηκε ημέρα κατά το μήνα Ιανουάριο, την επόμενη βροχόπτωσης, η οποία θα είχε απομακρύνει σκόνη και επικαθίσεις που είχαν μεταφερθεί με τον αέρα. Όλα τα εργαλεία (νυστέρι, λάμα νυστεριού, σφυρί, βαμβακοφόροι στυλεοί, θρεπτικό υγρό, δοκιμαστικοί σωλήνες και κωνικές φιάλες), είχαν αποστειρωθεί πριν τη χρήση τους.

Βαμβακοφόρος στυλεός εμβαπτίστηκε αρχικά στο θρεπτικό υγρό και στη συνέχεια, ήρθε σε επαφή με την επιφάνεια του μαρμάρου και μεταφέρθηκε μέσα στο θρεπτικό υγρό. Στερεό δείγμα από το μάρμαρο απομονώθηκε, είτε ξύνοντας την επιφάνεια με νυστέρι, είτε με σφυρί στην άκρη του λίθου. Όλα τα δείγματα αποθηκεύτηκαν άμεσα σε πάγο για τη μεταφορά τους στο εργαστήριο προς επεξεργασία.

Από το σπήλαιο, η απομόνωση πραγματοποιήθηκε υπό την επίβλεψη του προσωπικού του σπηλαίου και ελήφθησαν δείγματα νερού από σταλακτίτη, από κοιλότητα στην οποία συγκεντρωνόταν νερό που έσταζε από την κορυφή του σπηλαίου και από νερό το οποίο έρρεε σε ένα από τα τοιχώματα. Επίσης, επιτράπη η λήψη μικρής ποσότητας μη στερεής λάσπης από τη βάση σταλαγμίτη. Φωτογραφίες δεν επιτράπησαν να ληφθούν.

2.2 Απομόνωση και Αποθήκευση μικροοργανισμών

Για την απομόνωση μικροοργανισμών χρησιμοποιήθηκαν θρεπτικά υλικά, τα οποία ενισχύουν την ανάπτυξη βακτηρίων που δεν διαθέτουν εξειδικευμένες θρεπτικές απαιτήσεις. Τα ονόματα των θρεπτικών παρατίθενται παρακάτω με την αγγλική τους ονομασία καθώς αυτή χρησιμοποιείται ευρέως. Το βασικό θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε ήταν Nutrient Broth (Merck και Oxoid). Η διαφορά των δύο εταιριών, είναι ότι το θρεπτικό από την Oxoid περιέχει περισσότερα συστατικά και παρασκευάστηκε στο εργαστήριο βάσει των αναλογιών που αναφέρονται στον Οδηγό Θρεπτικών της εταιρίας.

Τα υγρά δείγματα τα οποία είχαν εμβολιαστεί με το βαμβακοφόρο στυλεό, επώαστηκαν στους 28 °C, σε οριζόντια πλατφόρμα κυκλικής ανάδευσης (Labnet Orbit-1000), με ταχύτητα 120 rpm, αφού προηγουμένως είχε προστεθεί το μυκητοκτόνο Mycostatin, 50 µg/mL, (ευγενική προσφορά της Bristol Myers Squibb), έτσι ώστε να μην αναπτυχθούν μύκητες κατά τη διάρκεια της επώασης. Μέρος των στερεών δειγμάτων, προστέθηκε στα παραπάνω θρεπτικά διαλύματα τα οποία περιείχαν το μυκητοκτόνο Mycostatin. Οι συνθήκες αρχικής επώασης ήταν ίδιες. Από όλα τα δείγματα, κάθε 24 ώρες λαμβανόταν μικροποσότητα η οποία απλωνόταν σε τρυβλίο από το αντίστοιχο θρεπτικό. Πριν τον εμβολιασμό των τριβλίων, στην επιφάνεια αυτών απλώθηκε Mycostatin ώστε να ενισχυθεί η ανάπτυξη μόνο βακτηρίων. Η διαδικασία διήρκησε 72 ώρες με στόχο την επιλογή μικροοργανισμών οι οποίοι ήταν ήδη μεταβολικά ενεργοί από την επιφάνεια απομόνωσης.

Οι μικροοργανισμοί οι οποίοι απομονώθηκαν, εμβολιάστηκαν διαδοχικά σε νέα τριβλία έως οι αποικίες να παρουσιάσουν ευδιάκριτα μορφολογικά χαρακτηριστικά και χρώμα. Στη συνέχεια, μια διακριτή αποικία από τον κάθε μικροοργανισμό μεταφέρθηκε σε υγρή καλλιέργεια και μετά από 24 ώρες, ξανά σε τρυβλίο για την επιβεβαίωση ότι η

απομόνωση ήταν επιτυχής και ότι μόνο ένας μικροοργανισμός, με τα ίδια μορφολογικά χαρακτηριστικά, είχε αναπτυχθεί.

Για τη μόνιμη αποθήκευση των μικροοργανισμών, όλα τα απομονωμένα στελέχη εμβολιάστηκαν σε υγρές καλλιέργειες και επώαστηκαν στους 30 °C, υπό ανάδευση (120 rpm), για 24 ώρες. Το θρεπτικό υγρό φυγοκεντρήθηκε στις 12000 rpm, για 15 λεπτά και το ίζημα που αντιστοιχεί στα κύτταρα, συγκεντρώθηκε σε πλαστικούς σωλήνες erpendorf των 2 mL, δημιουργώντας ένα πυκνό διάλυμα κυττάρων. 0.5 mL του πυκνού εναιωρήματος προστέθηκε σε φιάλες οι οποίες περιείχαν ειδικό διάλυμα και μικρές χάντρες (PROTECT vials – bacterial preservers, Technical service consultants Limited, UK). Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν βάσει των οδηγιών της εταιρίας. Οι φιάλες αυτές ψύχθηκαν στους -30 °C. Για να επιβεβαιωθεί η επιτυχής αποθήκευση των μικροοργανισμών, 48 ώρες και 3 0 ημέρες μετά τη ψύξη τους, ελέγχθηκε η βιωσιμότητά τους σε θρεπτικό υγρό. Επιπλέον έλεγχος πραγματοποιείτο περιοδικά κάθε 2-3 μήνες. Για την ενεργοποίηση ενός στελέχους, μια χάντρα από την αντίστοιχη φιάλη εμποτιζόταν σε θρεπτικό διάλυμα και επωαζόταν 18-24 ώρες, στους 30 °C.

Όλα τα στελέχη παραδόθηκαν προς φύλαξη στην Τράπεζα Μικροοργανισμών του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, Εργαστήριο Γαλακτοκομίας. Οι κωδικοί που αντιστοιχούν στα στελέχη αναγράφονται στα αποτελέσματα.

2.3 Ταυτοποίηση βακτηρίων

Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στο ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε. στις Γούβες, Ηράκλειο – Κρήτης και οι μικροοργανισμοί μεταφέρθηκαν σε τριβλία μετά από επώαση για 24 ώρες, ώστε να έχουν αναπτυχθεί πλήρως. Η πρώτη διαδικασία στο εργαστήριο, ήταν η λήψη δείγματος από μια καλά σχηματισμένη αποικία, με την άκρη αποστειρωμένης οδοντογλυφίδας και η εμβάπτιση αυτής σε 50 µL υπερκάθαρο νερό (Merck). Τα δείγματα υπέστησαν θερμική επεξεργασία 98 °C, για 5 min και αποθηκεύτηκαν στην κατάψυξη. Με αυτό τον τρόπο, διαρρηγνύονται οι κυτταρικές μεμβράνες και το DNA απελευθερώνεται στο διάλυμα.

Οι παράγοντες οι οποίοι επηρεάζουν μια Αλυσωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction – PCR) είναι αρκετοί και αφορούν από τα αντιδραστήρια τα οποία χρησιμοποιούνται και τις τελικές συγκεντρώσεις τους, έως και τη συσκευή στην οποία πραγματοποιείται η αντίδραση και το λογισμικό που έχει εγκατεστημένο. Για το λόγο αυτό,

μετά από σειρά προσπαθειών όπου πειραματικά δεδομένα από τη βιβλιογραφία δεν έδωσαν τα αναμενόμενα αποτελέσματα, αποφασίστηκε η πλήρης ανάπτυξη της διαδικασίας από την αρχή.

Για την πραγματοποίηση της PCR χρησιμοποιήθηκαν τα εξής αντιδραστήρια:

- Δείγμα DNA
- Ρυθμιστικό διάλυμα συγκέντρωσης 1x (buffer) [10 mM Tris-HCl (pH 9), 50 mM KCl, and 0.1% Triton X-100]
- Υπερκάθαρο νερό (ultra-pure water)
- MgCl₂
- Τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs)
- Εκκινητές (primers)
- Taq πολυμεράση (Taq polymerase)

Η ποσότητα του κάθε συστατικού, διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην αντίδραση και στο αποτέλεσμα που θα προκύψει, όσον αφορά την ποσότητα και καθαρότητα του τελικού DNA. Επίσης, οι προ αμίξεις από το αρχικό δείγμα λήψης του DNA, επηρεάζουν άμεσα την αντίδραση, ακόμα και μικροποσότητες κάποιων συστατικών μπορούν να αναστείλουν τη διαδικασία. Μετά από σειρά προκαταρκτικών πειραμάτων, οι μεταβλητές που αποφασίστηκε να διατηρηθούν σταθερές ήταν: ο συνολικός όγκος της αντίδρασης στα 30 μL, η ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος στον δεδομένο όγκο να είναι 3 μL (από αρχικό διάλυμα συγκέντρωσης 10x, στο μίγμα να υπάρχει συγκέντρωση 1x), η ποσότητα πολυμεράσης στα 0.2 μL σε όλες τις αντιδράσεις και η ποσότητα των δεοξυριβονουκλεοτιδίων στα 0.5 μL. Στη συνέχεια δοκιμάστηκαν οι εξής μεταβλητές:

- Διαφορετικές συγκεντρώσεις MgCl₂ (1.5, 2 και 3 mM)
- Διαφορετικοί συνδυασμοί εκκινητών (27f-1492r, 27f-906r, 515f-1492r)
- Διαφορετικές θερμοκρασίες αποδιάταξης της αλυσίδας DNA: 4 & 9 °C. Η δυνατότητα αυτή δίνεται από τη συσκευή που χρησιμοποιείται για την αντίδραση της PCR και για αυτό το λόγο, το σύνολο του συγκεκριμένου πειράματος ονομάστηκε «κλιμακωτό» (gradient).

Οι παράμετροι της αντίδρασης PCR ήταν οι εξής:

- Προ-επώαση στους 94 °C για 3 min
- Αποδιάταξη στους 94 °C για 1 min
- θερμοκρασία σύνδεσης στους 48-59° C για 1 min
- Επιμήκυνση στους 72 °C για 3 min
- Πρόσθετο βήμα 72 °C για 10 min

Αριθμός κύκλων: 35

Η συσκευή που χρησιμοποιήθηκε ήταν BIORAD.

Από τα παραπάνω πειράματα η συγκέντρωση $MgCl_2$ 3 mM προσφέρει καλύτερα αποτελέσματα, τα ζεύγη εκκινητών 27f/1492r και 515f/1492r απέδωσαν επαρκείς ποσότητες DNA, χωρίς την εμφάνιση παραπροϊόντων μετά το τέλος της αντίδρασης. Η θερμοκρασία στην οποία οι εκκινητές απέδωσαν καλύτερα ήταν 48-50 °C, από τις οποίες επελέγη η χαμηλότερη.

Οι επιπλέον δοκιμές για να βρεθεί επιτυχής συνδυασμός παραμέτρων για το ζεύγος εκκινητών 27f-906r:

- Touchdown PCR: κατά την οποία η αρχική θερμοκρασία σύνδεσης των εκκινητών στην αλυσίδα DNA είναι χαμηλή (47 °C) και σταδιακά όσο εξελίσσεται η αντίδραση η θερμοκρασία αυξάνεται για να φτάσει στους 55 °C.
- Nested PCR: στην οποία αρχικά πολλαπλασιάζεται η αλυσίδα DNA 27f-1492r, η οποία μετά το πέρας της PCR χρησιμοποιείται σαν υπόστρωμα για δεύτερη αντίδραση PCR με τους εκκινητές 27f-906r, έτσι ώστε να κλωνοποιηθεί η αλυσίδα που είναι επιθυμητή. Αυτή η διαδικασία δίνει τη δυνατότητα να γίνει ο πολλαπλασιασμός σε δείγμα, το οποίο ουσιαστικά δεν περιλαμβάνει το σύνολο του βακτηριακού DNA, αλλά μόνο το μέρος του ριβοσωμικού DNA το οποίο μας ενδιαφέρει. Επομένως η αντίδραση περιέχει σαφώς λιγότερες «άχρηστες» αλυσίδες DNA και περιορίζεται η πιθανότητα σύνδεσης των εκκινητών σε λάθος σημεία όπου δεν είναι πλήρως συμπληρωματικά.
- Reamplification PCR: στην οποία πραγματοποιείται κανονικά η αντίδραση PCR με τους εκκινητές υπό διερεύνηση και στη συνέχεια το προϊόν την αντίδρασης αυτής

χρησιμοποιείται ξανά με τους ίδιους εκκινητές ώστε να ενισχυθεί (re-amplification) η απόδοση και να πολλαπλασιαστεί το ριβοσωμικό DNA που επιθυμείται.

Όλες οι προσπάθειες βελτιστοποίησης για τους εκκινητές 27f-906r δεν ικανοποίησαν και για το λόγο αυτό, η συνέχεια των πειραμάτων πραγματοποιήθηκε με τα ζεύγη εκκινητών 27f/1492r και 515f/1492r.

Οι παράμετροι και ποσότητες των αντιδράσεων PCR με τους επιλεγμένους εκκινητές συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 2: Συγκεντρωτική παρουσίαση των αντιδράσεων PCR που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση ολόκληρου ή σχεδόν ολόκληρου του 16S rDNA απομονωμένων στελεχών.

Αντιδρώντα	27f/1492r	515f/1492r
DNA	2 μL	2 μL
Ρυθμιστικό διάλυμα 10x	3 μL	3 μL
MgCl ₂	2.4 μL (2 mM τελική συγκέντρωση)	3.6 μL (3 mM τελική συγκέντρωση)
dNTPs	0.5 μL	0.5 μL
Εκκινητής 27f	0.7 μL	-
Εκκινητής 514f	-	0.7 μL
Εκκινητής 1492r	0.7 μL	0.7 μL
Ταq πολυμεράση	0.3 μL	0.3 μL
H ₂ O	20.4 μL	19.2 μL

Τα προϊόντα της αντίδρασης ανιχνεύτηκαν με τη χρήση βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr) σε πήγμα αγαρόζης 1%. Ο δείκτης για το μέγεθος του προϊόντος που χρησιμοποιήθηκε (marker), ήταν ο GeneRuler 100bp DNA ladder Plus (Fermentas).

Τα δείγματα τα οποία ελήφθησαν από σειρά διαδοχικών αντιδράσεων, ώστε να εξασφαλιστεί επαρκής ποσότητα πολλαπλασιασμένου DNA, υποβλήθηκαν σε καθαρισμό με τη χρήση τυποποιημένης συσκευής της Qiagen (QIAquick PCR Purification Kit Protocol), Nucleospin Extract II (Macherey-Nagel) και PureLink Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen) βάσει των εσώκλειστων οδηγιών, για να εξακριβωθεί ποια μέθοδος προσέφερε τα καλύτερα αποτελέσματα.

Το επόμενο βήμα στη διαδικασία ταυτοποίησης των απομονωμένων βακτηρίων, αφορούσε τον πολλαπλασιασμό των απομονωμένων και καθαρισμένων δειγμάτων DNA σε

γενετικώς τροποποιημένα βακτήρια *E. coli* με το πλασμίδιο PCR II-TOPO, βάσει της τυποποιημένης συσκευής TOPO® TA Cloning® Kit της Invitrogen, ακολουθώντας τις εσωκλειστές οδηγίες. Το δείγμα DNA των βακτηρίων επωάζεται σε ειδικό μίγμα αντιδρώντων με πλασμίδιο DNA, με αποτέλεσμα να σχηματίζεται ένα ενιαίο κυκλικό DNA, το οποίο στη συνέχεια προστίθεται σε έτοιμες φιάλες που περιέχουν τα βακτήρια *E. coli* (One Shot Mach T1 chemically competent cells). Το κυκλικό DNA εισάγεται στο εσωτερικό των βακτηρίων και πολλαπλασιάζεται με τον ίδιο ρυθμό που πολλαπλασιάζονται και τα κύτταρα. Τα θετικά κύτταρα (που περιέχουν το κυκλικό DNA) διαχωρίζονται από τα αρνητικά, διότι τα πρώτα είναι λευκά σε χρώμα, σε αντίθεση με τα αρνητικά τα οποία είναι μπλε. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι τα κύτταρα τα οποία περιλαμβάνουν τον φορέα, ο οποίος έχει ενωθεί με το DNA που μας ενδιαφέρει, δεν μπορεί να εκφράσει συγκεκριμένο γονίδιο το οποίο παράγει το ένζυμο της β-γαλακτοσιδάσης. Το γονίδιο αυτό βρίσκεται ακριβώς στο σημείο όπου ο φορέας ενώνεται με το DNA, με αποτέλεσμα να απενεργοποιείται. Χωρίς ένζυμο δεν μπορεί να διασπαστεί συγκεκριμένη ένωση (X-gal ή 5-bromo-4-chloro-indolyl-β-D-galactopyranoside), η οποία υπάρχει στα τριβλία που χρησιμοποιούνται. Η διάσπαση της X-gal θα απελευθέρωνε το 5-bromo-4-chloro-3-hydroxyindole το οποίο διμερίζεται άμεσα στο 5,5'-dibromo-4,4'-dichloro-indigo έντονου μπλε χρώματος (<http://en.wikipedia.org/wiki/X-gal>).

Ποσότητα από τις θετικές αποικίες ελήφθη με τη μύτη αποστειρωμένης πλαστικής πιπέτας σε 20 μL H₂O και υποβλήθηκε σε θερμικό σοκ στους 98° C, για 5 min. Ακολούθησε η αντίδραση PCR για τον πολλαπλασιασμό των θετικών φορέων με εκκινητές οι οποίοι περιλαμβάνονται στην παραπάνω συσκευή: sr6 και T7.

Τα πρωτόκολλα με 2 μL 16S rDNA παρουσιάζονται στον Πίνακα 3. Οι παράμετροι της αντίδρασης PCR ήταν οι εξής:

- Προ-επώαση στους 94 °C για 5 min
- Αποδιάταξη στους 94 °C για 1 min
- Ανόπτηση (Annealing) στους 50 °C για 1 min
- Επιμήκυνση στους 72 °C για 3 min
- Πρόσθετο βήμα 72 °C για 10 min

} Αριθμός κύκλων: 30

Πίνακας 3: Συγκεντρωτικά πρωτόκολλα για τον πολλαπλασιασμό του φορέα DNA μετά τη χρήση του TOPO® TA Cloning® Kit της Invitrogen.

Αντιδρώντα	Sp6-T7	M13f-M13r
DNA	2 μ L	2 μ L
Ρυθμιστικό διάλυμα 10x	2 μ L	2 μ L
MgCl ₂	1.2 μ L	1.2 μ L
dNTPs	0.3 μ L	0.3 μ L
Εκκινητής sp6-f	0.5 μ L	-
Εκκινητής T7-r	0.5 μ L	-
Εκκινητής M13f	-	0.25 μ L ή 0.1 μ L
Εκκινητής M13r	-	0.25 μ L ή 0.1 μ L
Ταq πολυμεράση	0.1 μ L	0.1 μ L
H ₂ O	13.4 μ L	13.9 μ L ή 14.2 μ L

Οι εκκινητές οι οποίοι έδωσαν την καλύτερη απόδοση, ήταν οι M13 f/r και στις δυο συγκεντρώσεις. Για τη συνέχεια, χρησιμοποιήθηκε η μικρότερη εκ των δύο ποσοτήτων που δοκιμάστηκαν (0.25 μ L).

Η διαφορά των ζευγών των εκκινητών, είναι η απόστασή τους από το σημείο που ενώνεται το δείγμα DNA μέσα στον φορέα. Το ζεύγος M13, βρίσκεται σε μεγαλύτερη απόσταση από το ζεύγος sp6-f/ T7-r, με αποτέλεσμα να μειώνεται ο αριθμός νουκλεοτιδίων τα οποία θα αλληλουχηθούν από το δείγμα. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι στη διαδικασία τελικής αλληλούχησης, η απόδοση της αντίδρασης ελαττώνεται σταδιακά μη μπορώντας να διακρίνει μεταξύ των νουκλεοτιδίων. Επομένως για να διατηρηθεί η ευκρίνεια και να μεγιστοποιηθεί ο τελικός αριθμός νουκλεοτιδίων, επιδιώχθηκε η περαιτέρω βελτιστοποίηση της αντίδρασης PCR με το ζεύγος sp6-f/T7-r. Το πρωτόκολλο το οποίο τελικά αποδείχθηκε επαρκές ήταν το εξής:

Πίνακας 4: Τελικό πρωτόκολλο για την απομόνωση 16S rDNA των μικροοργανισμών.

Αντιδρώντα	Ποσότητες
16S rDNA	3 μ L
Ρυθμιστικό διάλυμα 10x	2 μ L
MgCl ₂	1.2 μ L
dNTPs	0.3 μ L
Εκκινητής sp6-f	0.5 μ L
Εκκινητής T7-r	0.5 μ L
Taq πολυμεράση	0.1 μ L
H ₂ O	12.4 μ L

Τα προϊόντα των αντιδράσεων καθαρίστηκαν με QIAquick PCR Purification Kit. Για την επιβεβαίωση ότι το προϊόν της PCR αντίδρασης ήταν το βακτηριακό ριβοσωμικό DNA και όχι κάποιο μέρος του φορέα που χρησιμοποιήθηκε, μια ακόμη αντίδραση PCR πραγματοποιήθηκε με το ζεύγος εκκινητών 515f/1492r.

Τα καθαρισμένα δείγματα DNA εστάλησαν για αλληλούχηση στο «DNA Analysis Facility» του Πανεπιστημίου Yale, Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής.

Η αλληλούχηση πραγματοποιήθηκε και από τα δύο άκρα της αλυσίδας, γεγονός που επέτρεψε τη διασφάλιση της πιστότητας και της ποιότητας των αποτελεσμάτων. Οι αλληλουχίες που αντιστοιχούσαν στο κάθε στέλεχος ευθυγραμμίστηκαν και τυχόν λάθη της διαδικασίας διορθώθηκαν. Οι αλληλουχίες στη συνέχεια εισήχθησαν στη βάση δεδομένων BLASTN του National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) όπου συγκρίθηκαν ήδη γνωστές αλληλουχίες ώστε να εξακριβωθεί ο μικροοργανισμός στον οποίο ανήκουν. Από την πληθώρα αλληλουχιών στελεχών μέσα στη βάση δεδομένων (οι οποίες έχουν ελάχιστες διαφορές μεταξύ τους), επελέγησαν ορισμένες βάσει των εξής ποιοτικών και ποσοτικών παραμέτρων:

- Ο μικροοργανισμός ο οποίος αντιστοιχεί στην αλληλουχία που συγκρίνεται με τη δική μας να είναι εργαστηριακά απομονωμένο στέλεχος και όχι να έχει αλληλουχηθεί μόνο το ριβοσωμικό του DNA.
- Η ομοιότητα βάσει του BLASTN να είναι πάνω από 99%
- Το μήκος του DNA το οποίο συγκρίνεται να είναι τουλάχιστον ίσο με την προς ανάλυση αλυσίδα

- Η μέγιστη τιμή (maximum score) ομοιότητας να είναι η μεγαλύτερη δυνατή.

Οι αλληλουχίες με τη μεγαλύτερη ομοιότητα βάσει των παραπάνω κριτηρίων, επελέγησαν για να συγκριθούν με κάθε βακτήριο ώστε να προκύψει η τελική ταυτοποίηση.

2.4 Ανάπτυξη Θρεπτικού Υγρού για Πειράματα Απόθεσης σε Μαρμάρινο Υπόστρωμα

Στις αρχικές δοκιμές απόθεσης ανθρακικού ασβεστίου με τη χρήση μικροοργανισμών χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό B4, το οποίο ήταν το πρώτο που αναπτύχθηκε για τη συγκεκριμένη δοκιμή σχηματισμού ανθρακικού ασβεστίου από βακτήρια (Boquet et al. 1973). Παρατηρήθηκε ότι κατά τη ρύθμιση του pH=8 το διάλυμα θόλωνε και μετά από μερικές ώρες σχηματιζόταν ίζημα, το οποίο όμως δεν μπορούσε να απομακρυνθεί με φιλτράρισμα υπό κενό. Για το λόγο αυτό, δοκιμάστηκαν διαφορετικές διαδικασίες αποστείρωσης των συστατικών του θρεπτικού, καθώς και αντιδραστήρια από διαφορετικές εταιρίες. Σε όλες τις περιπτώσεις ο σχηματισμός θολού διαλύματος εμφανιζόταν κατά τη ρύθμιση του pH. Κατά συνέπεια, διερευνήθηκε η ανάπτυξη ενός διαφορετικού θρεπτικού, από ανάλογα θρεπτικά συστατικά. Οι βασικές προϋποθέσεις που θα έπρεπε να πληροί το νέο θρεπτικό ήταν η επαρκής και γρήγορη ανάπτυξη των απομονωμένων στελεχών, η δυνατότητα ρύθμισης του pH κοντά στο 8 και η δυνατότητα προσθήκης επαρκούς ποσότητας ασβεστίου, ώστε να ενισχυθεί η απόθεση ανθρακικού ασβεστίου από τους μικροοργανισμούς.

Για την αντικατάσταση του Yeast extract δοκιμάστηκαν Tryptose (LABM, Merck και Fluka), Bacteriological Peptone, Soy Peptone, Beef extract και Proteose Peptone A (LABM). Οι ποσότητες οι οποίες δοκιμάστηκαν υπολογίστηκαν σε σχέση με την περιεκτικότητα αζώτου του κάθε προϊόντος, το οποίο θα αντικαθιστούσε το Yeast extract και αναφέρεται στην ετικέτα. Επομένως, βάσει του αρχικού θρεπτικού B4, προσδιορίστηκε η ποσότητα που χρειάζεται για να αντικαταστήσει το Yeast extract, ώστε η περιεκτικότητα του θρεπτικού σε άζωτο να παραμείνει σταθερή. Ο έλεγχος της επαρκούς ανάπτυξης των μικροοργανισμών, προσδιορίστηκε ποιοτικά παρακολουθώντας την μεταβολή της απορρόφησης σε μήκος κύματος 620 nm, με φωτόμετρο (Hach DR-2000), συγκρινόμενο με την αντίστοιχη ανάπτυξη σε 24 ώρες σε Yeast extract. Ως τυφλό χρησιμοποιήθηκε το αντίστοιχο μη εμβολιασμένο θρεπτικό υγρό.

Η πηγή ασβεστίου διατηρήθηκε το $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Ca}$ (Sigma) και διερευνήθηκε η μέγιστη ποσότητα, η οποία μπορούσε να διαλυθεί χωρίς να προκληθεί ο σχηματισμός ιζήματος κατά τη ρύθμιση του pH κοντά στο 8.

Σημειώνεται ότι σε σχέση με το B4 θρεπτικό, αφαιρέθηκε η γλυκόζη, ώστε οι μικροοργανισμοί να αφομοιώσουν αποκλειστικά το θρεπτικό υγρό και το οξικό ανιόν (αναλυτικότερη εξήγηση βρίσκεται στα αποτελέσματα). Ως πιθανότερα για εφαρμογή επιλέχθηκαν οι Tryptose και Bacteriological Peptone. Η τελική σύσταση του θρεπτικού διαλύματος ήταν: Tryptose 0.3456 g ή Bacteriological Peptone 0.36 g και 2.5 mL από 10% διάλυμα $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Ca}$.

2.5 Υπόστρωμα

Το λίθινο υπόστρωμα το οποίο επελέγη για την πραγματοποίηση των πειραμάτων ήταν το Πεντελικό μάρμαρο, εξορυγμένο από το βουνό Διόνυσος, στο οποίο επιτρεπόταν η εξόρυξή του. Μη επεξεργασμένες πλάκες μαρμάρου κόπηκαν σε δοκίμια διαστάσεων 4 cm x 1-1.5 cm x 1 cm (μήκος x πλάτος x ύψος) ή 4 cm x 4 cm x 2 cm και αρχικά καθαρίστηκαν από χρώμα και σκόνη με νερό βρύσης. Μια τελευταία πλύση πραγματοποιήθηκε με απιονισμένο νερό και στη συνέχεια αφέθηκαν να στεγνώσουν σε φούρνο στους 50 °C, για 24 ώρες. Πριν τη χρήση τους σε πειράματα, αποστειρώθηκαν δύο διαδοχικές φορές. Μετά από κάθε αποστείρωση και ξήρανση για 24 ώρες, στους 50 °C, μετρήθηκε η μεταβολή βάρους τους. Η τελική τιμή βάρους που χρησιμοποιήθηκε ως σημείο εκκίνησης για την απόθεση, ήταν ακριβώς πριν εμβαπτιστεί στο θρεπτικό διάλυμα. Η τρίτη αποστείρωση των υποστρωμάτων πραγματοποιήθηκε μέσα στο θρεπτικό υγρό.

2.6 Προκαταρκτικά Πειράματα Απόθεσης σε Μαρμάρινο Υπόστρωμα

Σε φιάλη τελικού όγκου 250 mL με βιδωτό μπλε πώμα, προστέθηκαν 99 mL του θρεπτικού διαλύματος επιλεγμένης συγκέντρωσης. Ως συγκέντρωση 1x θεωρήθηκε η βασική σύσταση του θρεπτικού διαλύματος (Bacteriological peptone 0.36 g και 2.5 mL από 10% διάλυμα $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Ca}$), 2x και 4x, οι διπλάσιες και τετραπλάσιες ποσότητες, αντίστοιχα. Για κάθε συγκέντρωση θρεπτικού εμβολιάστηκαν όλοι οι μικροοργανισμοί, έτσι ώστε να

σαρωθεί η ικανότητά τους να προκαλέσουν την καταβύθιση ανθρακικού ασβεστίου. Σε κάθε φιάλη προστέθηκε 1 mL μικροοργανισμού. Οι φιάλες τοποθετήθηκαν σε επωαστήρα θερμοκρασίας 28 °C, πάνω σε οριζόντια πλατφόρμα κυκλικής ανάδευσης, με ταχύτητα 120 rpm. Το «τυφλό» διάλυμα δεν περιείχε εμβολιασμένο μικροοργανισμό. Η διάρκεια του πειράματος ήταν 15 ή 20 ημέρες. Οι φιάλες μετά την εμφανή ανάπτυξη του μικροοργανισμού (48 ώρες), ανοίχθηκαν ελάχιστα ώστε να επιτρέπεται η είσοδος οξυγόνου. Κάθε 48 ώρες, λαμβανόταν δείγμα υγρού και απλωνόταν σε τριβλία αντίστοιχης συγκέντρωσης σε Bacteriological peptone, ώστε να ελεγχθεί η μορφολογία του μικροοργανισμού και ότι δεν υπήρχαν μολύνσεις.

Επίσης ελέγχθηκε η δυνατότητα των μικροοργανισμών να προκαλούν την αντίστροφη διαδικασία, δηλαδή τη διαλυτοποίηση του ανθρακικού ασβεστίου. Η σύσταση του θρεπτικού διαλύματος το οποίο χρησιμοποιήθηκε για το σκοπό αυτό ήταν (σε g/L): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.22; KH_2PO_4 , 1.2; MgSO_4 , 0.23; yeast extract, 0.05; glucose, 67.0; CaCO_3 , 75.0 και άγαρ 20.0. Μετά την αποστείρωση του διαλύματος και την επαναφορά του σε θερμοκρασία δωματίου προστέθηκαν 3.3 mL FeCl_3 0.1M. Η διαδικασία επώασης διήρκεσε 30 ημέρες.

2.7 Πειράματα Βελτιστοποίησης Απόθεσης Ανθρακικού Ασβεστίου σε Μαρμάρينو Υπόστρωμα

Στελέχη τα οποία στα προκαταρκτικά πειράματα έδειξαν ικανοποιητικά αποτελέσματα, επελέγησαν για περαιτέρω ανάλυση, ώστε να διερευνηθούν οι συνθήκες ανάπτυξης υπό τις οποίες θα απέδιδαν τη βέλτιστη δυνατή απόθεση ανθρακικού ασβεστίου σε μαρμάρينو υπόστρωμα. Επιπλέον, τα πειράματα αυτά είχαν ως στόχο να διερευνήσουν, εάν ο στατιστικός αλγόριθμος που επιλέχθηκε μπορούσε να προσφέρει, με τη προτεινόμενη σειρά πειραμάτων, πραγματικά και αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα.

Οι μεταβλητές οι οποίες επελέγησαν ήταν η συγκέντρωση θρεπτικού διαλύματος, η θερμοκρασία επώασης και η αρχική συγκέντρωση εμβολιασμού. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση των λογισμικών Design-Expert 6.0.6 και StatGraphicsPlus 5.0.

Τα στατιστικά εργαλεία που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της επάρκειας των μοντέλων να περιγράψουν τα πειραματικά δεδομένα, ήταν η σημαντικότητα του μοντέλου (significance of the model obtained), η δοκιμασία έλλειψης προσαρμογής (lack-of-fit test) και η δοκιμασία επαρκούς ακρίβειας.

Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν τρεις φορές για τον *Cupriavidus metallidurans* και 5 φορές για τον *Bacillus pumilus*. Ο χρόνος επώασης ήταν 14 ημέρες, βάσει των προκαταρκτικών πειραμάτων, όπου παρατηρήθηκε η πλήρης αφομοίωση οξικών ανιόντων αλλά και η δραστική μείωση του ιόντων ασβεστίου. Από πρακτικής άποψης, μια μέθοδος για να είναι εφαρμόσιμη σε πραγματικές συνθήκες χρειάζεται να είναι όσο το δυνατόν συντομότερη. Ταυτόχρονα όμως οι 14 ημέρες προσφέρουν επαρκή χρόνο ώστε να διερευνηθούν η διαδικασία και η ταχύτητα απόθεσης, η μορφολογία του σχηματιζόμενου ανθρακικού ασβεστίου πάνω στο υπόστρωμα και η αντίδραση του μικροοργανισμού σε συνθήκες με πλούσιο θρεπτικό υγρό, έως την εξάντλησή του. Η προετοιμασία των θρεπτικών υγρών και των μαρμάρινων δοκιμίων ήταν η ίδια όπως περιγράφηκε παραπάνω.

2.8 Πειράματα Επιβεβαίωσης Βέλτιστου Σημείου

Κάθε σειρά πειραμάτων, από τα οποία προέκυψαν οι βέλτιστες παράμετροι για την μέγιστη απόθεση ανθρακικού ασβεστίου, επιβεβαιώθηκαν σε ένα τελικό πείραμα. Τα πειράματα διήρκεσαν 15 ημέρες και κάθε 72 ώρες τέσσερα δείγματα απομακρύνονταν για ανάλυση. Η διαδικασία ανάλυσης ήταν ίδια με αυτή των δειγμάτων από τα προκαταρκτικά πειράματα και παρουσιάζεται παρακάτω.

2.9 Πειράματα Απόθεσης Ανθρακικού Ασβεστίου σε μη Αποστειρωμένες Συνθήκες

Σε μεγαλύτερα δοκίμια μαρμάρου (4 cm x 4 cm x 2 cm) έγινε προσπάθεια προσομοίωσης εφαρμογής των επιλεγμένων μικροοργανισμών με ψεκασμό. Τα δοκίμια τοποθετήθηκαν οριζόντια σε αλουμινένια βάση δημιουργώντας μια επιφάνεια 96 cm². Ο επιλεγμένος μικροοργανισμός ενεργοποιήθηκε λαμβάνοντας μια χάντρα από την κατάψυξη σε BP3x και ανακαλλιεργήθηκε 2 διαδοχικές φορές. Μια ποσότητα 200 μL απλώθηκε σε τρυβλίο αντίστοιχου θρεπτικού και μετά από 24 ώρες, τα κύτταρα συλλέχθηκαν σε 10 mL

θρεπτικού διαλύματος με βαμβακοφόρο στυλεό, σχηματίζοντας ένα πυκνό διάλυμα κυττάρων. Δείγμα 1 mL του διαλύματος χρησιμοποιήθηκε για τον εμβολιασμό 100 mL BP3x. Το διάλυμα αυτό χρησιμοποιήθηκε για τον ψεκάσμο του μαρμάρινου υποστρώματος, από τη 3^η έως την 4^η ημέρα επώασής του. Δείγμα 1 mL από τη φιάλη χρησιμοποιήθηκε για τον εμβολιασμό της επόμενης, προς χρήση, φιάλης. Ο ψεκάσμος έγινε με τη χρήση αεροσυμπιεστή KNF ($P_{\max} = 4 \text{ atm}$) και αερογράφου Η διάταξη αυτή επιβεβαιώθηκε ότι δεν προκαλεί τη μείωση του βακτηριακού πληθυσμού, με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων. Κάθε 12 ώρες, η επιφάνεια ψεκαζόταν μέχρι την πλήρη κάλυψή της, από μια λεπτή στρώση υγρού. Ποσότητα 10 mL διαλύματος ήταν ο ελάχιστος όγκος για να καλυφθεί. Η συγκέντρωση των βακτηρίων που ψεκαζόταν κυμάνθηκε από 2.0 μέχρι $3.5 \times 10^9 \text{ CFU/mL}$. Η υγρασία διατηρήθηκε όσο το δυνατόν σταθερή, με βαμβάκι εμποτισμένο σε μη αποστειρωμένο νερό. Η επώαση έγινε σε θάλαμο με σταθερή θερμοκρασία, χωρίς όμως να διατηρούνται αποστειρωμένες συνθήκες. Μετά την ολοκλήρωση του πειράματος, βαμβακοφόρος στυλεός ήρθε σε επαφή με την επιφάνεια τυχαίου δείγματος και μεταφέρθηκε μετά σε τρυβλίο, έτσι ώστε να ελεγχθούν εάν αναπτύχθηκαν και άλλα στελέχη, πλην του μικροοργανισμού, σε εφαρμογή. Τα δείγματα μαρμάρου εκπλύθηκαν με αποστειρωμένο απιονισμένο νερό υπό πίεση, ώστε να απομακρυνθούν κύτταρα και επικαθίσεις οι οποίες δεν ήταν σταθερές πάνω στην επιφάνεια και τοποθετήθηκαν στο φούρνο στους 50 °C για ξήρανση. Την επόμενη ημέρα ζυγίστηκαν, για να υπολογιστεί η μεταβολή βάρους και ακολούθησε η ανάλυσή τους με ηλεκτρονική μικροσκοπία.

2.10 Επεξεργασία Δειγμάτων

Μετά την ολοκλήρωση του κάθε πειράματος, προσδιορίστηκε το pH (WTW Inolab pH-720 pHmeter) του τελικού διαλύματος και απομονώθηκαν 6 mL για αναλύσεις. Το μαρμάρينو υπόστρωμα πλύθηκε με απιονισμένο νερό και μεταφέρθηκε σε φούρνο για ξήρανση στους 50 °C, ώστε μετά από 24 ώρες να ζυγιστεί το τελικό του βάρος. Το υπόλοιπο θρεπτικό υγρό φιλτραρίστηκε σε φίλτρο Buchner και το ανθρακικό ασβέστιο το οποίο είχε κολλήσει στα τοιχώματα της φιάλης, αποκολλήθηκε προσεκτικά με σπάτουλα. Το στερεό υλικό από την τελευταία διαδικασία πλύθηκε 3-4 φορές με απιονισμένο νερό και τοποθετήθηκε στο φούρνο και αυτό για ξήρανση. Μετά την ξήρανση, αποθηκεύτηκε σε πλαστικά δοχεία, σε θερμοκρασία δωματίου για περαιτέρω αναλύσεις.

2.10.1 Ανάλυση CH_3COO^- και Ca^{2+}

Για την ανάλυση CH_3COO^- εφαρμόστηκε υγρή χρωματογραφία, χρησιμοποιώντας τη συσκευή Dionex BioLC, με ηλεκτροχημικό ανιχνευτή ElectroChemical Detector ED50, σιγαστήρα σήματος ASRS-Ultra II-4 mm και κολώνα διαχωρισμού Ionpac AS14 4x250 mm Analytical της ίδιας εταιρίας. Η ταχύτητα ροής ήταν 1 mL/min, η κινητή φάση ήταν διάλυμα Na_2CO_3 3.5 mM- NaHCO_3 1 mM και ο όγκος του διαλύματος προς ανάλυση 25 μL . Τα αποτελέσματα συλλέχθηκαν με τη χρήση του λογισμικού Chromeleon 6.20 Service Pack 1. Τα πρότυπα διαλύματα παρασκευάστηκαν από χημικώς καθαρό CH_3COOK (Sigma), το οποίο είχε υποστεί ξήρανση πριν τη χρήση του, στους 70 °C, για 48 ώρες. Από τις τιμές που ελήφθησαν υπολογίστηκε η πρότυπη καμπύλη, συγκέντρωση προς επιφάνεια, με το υπολογιστικό πρόγραμμα Microsoft Office Excel. Βάσει αυτής έγιναν οι υπολογισμοί των συγκεντρώσεων για τα δείγματα. Τα δείγματα προς ανάλυση αραιώθηκαν 1:100 σε υπερκάθαρο νερό, ώστε το σήμα που προέκυπτε να συμπεριλαμβάνεται μέσα στα όρια των πρότυπων διαλυμάτων και ανίχνευσης του οργάνου.

Τα ιόντα ασβεστίου αναλύθηκαν με φασματοσκοπία ατομικής απορρόφησης στη συσκευή Varian AA240FS. Τα δείγματα για να αναλυθούν αραιώθηκαν 1:100 σε υπερκάθαρο νερό, ενώ τα πρότυπα για το σχηματισμό της καμπύλης αναφοράς του οργάνου, προετοιμάστηκαν με τον ίδιο ακριβώς τρόπο.

2.10.2 Υπέρυθρη Φασματοσκοπία (FT-IR)

Όλα τα στερεά δείγματα που απομονώθηκαν από το φιλτράρισμα του θρεπτικού διαλύματος, αναλύθηκαν με υπέρυθρη φασματοσκοπία. Μικρή ποσότητα λειοτριβήθηκε σε γουδί αχάτη, μαζί με την αναγκαία ποσότητα KBr. Η σκόνη αφέθηκε να στεγνώσει για 24 ώρες σε φούρνο, στους 50 °C και στη συνέχεια τοποθετήθηκε σε ειδική ατσάλινη μήτρα, ώστε να συμπιεστεί με πίεση 6 τόνων και να σχηματιστεί λεπτό δισκίο (pellet). Ακολούθησε ξανά η ξήρανση σε φούρνο για 24 ώρες, ώστε να μειωθεί όσο το δυνατόν η υγρασία του δείγματος. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε συσκευή BIORAD FTS 3000 MX, σαρώνοντας 32 φορές με ευκρίνεια 4 cm^{-1} εύρος φάσματος από 4000 έως 400 cm^{-1} .

2.10.3 Φασματοσκοπία περίθλασης ακτίνων - X (XRD)

Οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν στο ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε. στην Ανάβυσσο. Δείγματα ανθρακικού ασβεστίου λειοτριβήθηκαν σε γουδί και στη συνέχεια διαλύθηκαν σε Milli-Q νερό. Το διάλυμα φιλτραρίστηκε σε φίλτρο αλουμινίου αργά, έτσι ώστε να σχηματιστεί στην επιφάνεια του φίλτρου ένα ομοιόμορφο στρώμα σκόνης. Το δείγμα αυτό τοποθετήθηκε σε δειγματοφορέα, για να αναλυθεί στη συσκευή Rigaku D/MAX B, με λυχνία CuK_{α} και μονοχρωμάτορα γραφίτη. Οι συνθήκες λειτουργίας ήταν 40 kV, 20 mA και το φάσμα σάρωσης ήταν 2.0 - 50.0 °2θ, σε βήματα 0.01°.

2.10.4 Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης

Το σχηματιζόμενο ανθρακικό ασβέστιο αναλύθηκε με Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης (Scanning Electron Microscope-SEM) εξοπλισμένο με σύστημα στοιχειακής μικροανάλυσης ακτίνων-X διασπειρόμενης ενέργειας (EDS, Oxford Energy Dispersive X-ray), συζευγμένο με Στοιχειακό Μικροαναλυτή (EDS). Το δοκίμιο μαρμάρου ή ανθρακικού ασβεστίου, αρχικά επικαλύφθηκε με λεπτό στρώμα πλατίνας, ώστε να γίνει ηλεκτρικά αγωγίμο και στη συνέχεια τοποθετήθηκε σε ειδική βάση για την είσοδό του στη συσκευή. Στο ίδιο μικροσκόπιο αναλύθηκαν οι λεπτές τομές δειγμάτων μαρμάρου, ώστε να προσδιοριστεί ημι-ποσοτικά η σύσταση του νέου υλικού και τα δοκίμια μαρμάρου, μετά την επεξεργασία τους με υπερήχους.

2.10.5 Ανάλυση λεπτών τομών

Σε μικροσκόπιο LEICA MZ12₅ αντίθετης φάσης, με συνδεδεμένη κάμερα LEICA DFC 420C, εξετάστηκαν οι λεπτές τομές δειγμάτων μαρμάρου. Τα δοκίμια που επελέγησαν είχαν ήδη υποστεί τη δοκιμασία αντοχής με υπερήχους, ώστε να διαπιστωθεί η συνεκτικότητα και η αντοχή του νέου υλικού.

2.10.6 Μεταβολή βάρους και αντοχή δειγμάτων σε υπερήχους

Τα δοκίμια υποβλήθηκαν σε ξήρανση στους 50 °C, για 24 ώρες και η μεταβολή βάρους υπολογίστηκε από τη διαφορά της τελικής μείον την αρχική τιμή, πριν την έναρξη του πειράματος.

Η αντοχή και συνοχή του νέου υλικού σε σχέση με το υπόστρωμα, προσδιορίστηκε με τη χρήση υπερήχων, όπως αρχικά προτάθηκε από Rodriguez-Navarro et al. (2003). Πιο συγκεκριμένα, τα δοκίμια τοποθετήθηκαν με τη μικρή πλευρά σε ποτήρι ζέσεως και βυθίστηκαν σε απιονισμένο νερό. Το ποτήρι τοποθετήθηκε μέσα στο λουτρό υπερήχων (Branson 5510 συχνότητας 42kHz) και υποβλήθηκε σε υπερήχους για 5 λεπτά. Στη συνέχεια, κάθε δοκίμιο εκπλύθηκε με απιονισμένο νερό και τοποθετήθηκε για ξήρανση στο φούρνο στους 50 °C, για 24 ώρες. Η διαδικασία επαναλήφθηκε 5 συνεχόμενες φορές και μετά από την κάθε εφαρμογή, τα δοκίμια ζυγίζονταν ώστε να βρεθεί η τελική μείωση του βάρους, σε σχέση με την αρχική, πριν τη διαδικασία. Τα «τυφλά» δοκίμια των πειραμάτων, υποβλήθηκαν στην ίδια ακριβώς διαδικασία και ανάλυση. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέση ποσοστιαία μεταβολή βάρους ΔWt (%) βάσει της εξίσωσης:

$$\Delta Wt(\%) = [(W_{\text{πριν υπέρηχο}} - W_{\text{μετά κάθε υπέρηχο}}) / W_{\text{πριν υπέρηχο}}] \times 100$$

2.10.7 Χρωματομετρία μαρμάρινων υποστρωμάτων

Η χρωματική χροιά των δοκιμίων, προσδιορίστηκε μετά την υποβολή τους σε υπέρηχους, με τη χρήση φορητού χρωματόμετρου DR Lange (type LMG183). Μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε 5 σημεία στην επιφάνεια κάθε δοκιμίου και η μέση τιμή προέκυψε από το λογισμικό της συσκευής (DR LANGE spectral qc version 3.51). Οι μέσες τιμές χρησιμοποιήθηκαν για να υπολογιστεί η συνολική χρωματική διαφορά ΔE από την παρακάτω εξίσωση:

$$\Delta E = [\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2}]^{1/2}$$

Η διαφορά για την κάθε παράμετρο, προέκυψε αφαιρώντας από τη μέση τιμή που βρέθηκε για το κάθε δοκίμιο, τη μέση τιμή του τυφλού υποστρώματος, το οποίο ήταν δοκίμιο που δεν είχε εμβολιαστεί με μικροοργανισμό. Ως L^* ορίζεται η φωτεινότητα, με μηδέν το μαύρο και 100 το λευκό, a^* είναι οι συντεταγμένες, όπου η αρνητική τιμή αντιστοιχεί στο πράσινο χρώμα και η θετική στο κόκκινο, b^* είναι οι συντεταγμένες, όπου η αρνητική τιμή

αντιστοιχεί στο μπλε και η θετική στο κίτρινο. Επομένως, συστήνεται ένα τρισδιάστατο σύστημα αξόνων όπου το άξονας z είναι το \mathbf{L}^* . Οι τιμές που προκύπτουν, αποτελούν μια ικανοποιητική μέθοδο εκτίμησης της οπτικής διαφοροποίησης στο υπόστρωμα, όταν σε αυτό έχει αποτεθεί το νέο υλικό από την εφαρμογή των μικροοργανισμών. Στόχος είναι η βέλτιστη απόθεση σε συνδυασμό με την ελάχιστη αντιληπτή διαφοροποίηση στο γυμνό μάτι παρατηρητή που αντιστοιχεί σε τιμές $\Delta E < 6$. Οι τιμές που ελήφθησαν συγκρίθηκαν και με δεδομένα από αρχαία μάρμαρα τα οποία χρονολογούνται τον 5^ο και 4^ο αιώνα π.Χ.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Απομόνωση Μικροοργανισμών

Από τις δύο περιοχές απομόνωσης, στοχεύτηκαν βακτήρια τα οποία δεν θα είχαν υψηλές θρεπτικές απαιτήσεις, ώστε στη συνέχεια των πειραμάτων να χρησιμοποιηθούν μη εξειδικευμένα θρεπτικά υγρά. Επίσης, απομονώθηκαν μικροοργανισμοί που είχαν τη δυνατότητα να αναπτυχθούν μέσα σε 48 ώρες επώασης στο εργαστήριο. Τυχόν διαφοροποιήσεις μετά το πέρας των 48 ωρών, δεν ελήφθησαν υπόψη, έτσι ώστε να κρατηθούν μόνο αυτοί οι οποίοι είχαν τη δυνατότητα να προσαρμοστούν άμεσα στο νέο θρεπτικό τους περιβάλλον. Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 1) παρατίθενται οι απομονωμένοι μικροοργανισμοί, η περιοχή προέλευσης και η αρχική τους ονομασία. Κατά την αρχική διαδικασία απομόνωσης στελεχών, καταγράφηκαν περισσότερα απομονωμένα στελέχη από αυτά που παρουσιάζονται στον Πίνακα 1. Ο απομονωμένος μικροοργανισμός “B” διαχωρίστηκε σε δύο, μετά από ανακαλλιέργειες και δεν είχε παρατηρηθεί κατά την πρώτη απομόνωση ότι ήταν δύο στελέχη. Σε ορισμένες περιπτώσεις, είτε τα στελέχη αποδείχθηκαν ίδια, είτε δεν ήταν δυνατός ο ασφαλής καθαρισμός το ψ από δεύτερο στέλεχος, που αναπτυσσόταν παράλληλα στο ίδιο τρυβλίο, αλλά με διαφορετική ταχύτητα. Για παράδειγμα, η αρχική απομόνωση “H₂O” διαχωρίστηκε σε “H₂O κίτρινο” και “H₂O λευκό”, όμως ο κίτρινος ανιχνευόταν σε μερικές περιπτώσεις τυχαία, σε πειράματα με τον λευκό. Επίσης η γενετική τους αλληλούχηση, έδωσε ένα μίγμα αποτελεσμάτων και των δύο. Για το λόγο αυτό, δεν συνεχίστηκε η χρήση τους.

Πίνακας 5: Αρχική λίστα απομονωμένων στελεχών από την Πεντέλη και το σπήλαιο της Παιανίας.

Αρχικό όνομα μικροοργανισμού	Περιοχή	Είδος δείγματος
ΠΡΩΤΟΣ (1^{ος})	Πεντέλη	Στερεό δείγμα (λίθος)
B μπεζ	Πεντέλη	Στερεό δείγμα (λίθος)
B λευκός	Πεντέλη	Στερεό δείγμα (λίθος)
C	Πεντέλη	Στερεό δείγμα (λίθος)
ΠΚ	Σπήλαιο Παιανίας	Βαμβακοφόρος στυλεός σε τοίχωμα σπηλαιίου. Στερεό δείγμα
ΠΛ1	Σπήλαιο Παιανίας	Λιμνάζοντα ύδατα σπηλαιίου
ΠΛ2	Σπήλαιο Παιανίας	Λιμνάζοντα ύδατα σπηλαιίου
T2	Πεντέλη	Στερεό δείγμα
T3	Σπήλαιο Παιανίας	Στερεό δείγμα (λάσπη)
T5 λευκός	Πεντέλη	Στερεό δείγμα (λίθος)
T6	Σπήλαιο Παιανίας	Στερεό δείγμα (λάσπη)
T7	Σπήλαιο Παιανίας	Στερεό δείγμα (λάσπη)
T9	Σπήλαιο Παιανίας	Στερεό δείγμα (λάσπη)
T10	Πεντέλη	Στερεό δείγμα (λίθος)

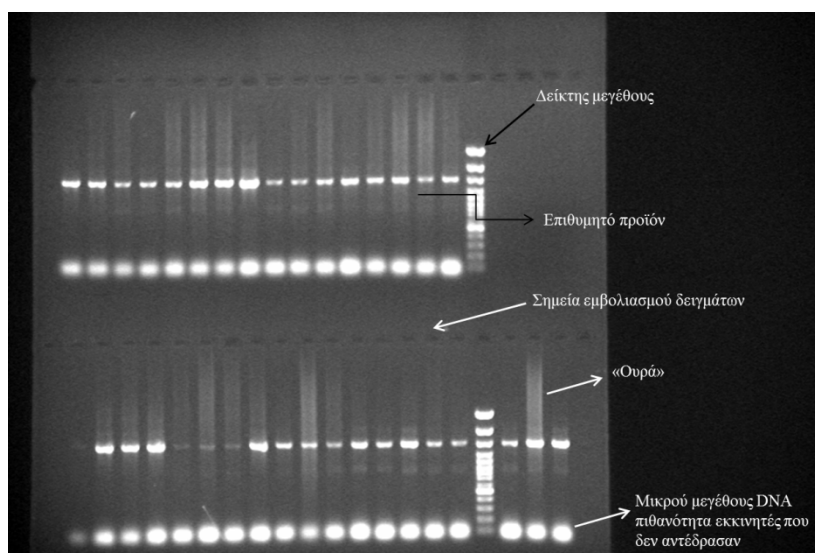
3.2 Ταυτοποίηση Μικροοργανισμών

Η επιλογή των εκκινήτων, η θερμοκρασία σύνδεσής τους με την αλυσίδα DNA, η ποσότητα αρχικού δείγματος και η συγκέντρωση του $MgCl_2$, αποτελούν τους κυριότερους παράγοντες οι οποίοι καθορίζουν την επιτυχία ή μη της Αλυσωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR). Η Taq πολυμεράση και τα δεοξυριβονουκλεοτίδια τα οποία χρησιμοποιούνται παρέχονται έτοιμα, οπότε θεωρούνται απόλυτης καθαρότητας και δεν επηρεάζουν τόσο, όσο οι παραπάνω παράγοντες. Εάν βελτιστοποιηθεί η αντίδραση, η ποσότητα των δεοξυριβονουκλεοτιδίων μπορεί να καθοριστεί, ώστε να επαρκεί για την πραγματοποίηση της αντίδρασης και την βελτίωση της απόδοσης.

Η αποτυχία μιας αντίδρασης αποδεικνύεται όταν σε γέλη αγαρόζης, τα δείγματα που υποβάλλονται σε διαφορά τάσης, δεν κινούνται ενιαία. Αντίθετα, στο ίδιο δείγμα εμφανίζεται, μετά από την παρέλευση συγκεκριμένου χρόνου, ο σχηματισμός διαφορετικών ζωνών ή «ουράς», που αντιστοιχούν σε διαφορετικού μήκους προϊόντα (μη πλήρης ή μη εξειδικευμένη αντιγραφή), το δείγμα να απουσιάζει άρα δεν πολλαπλασιάστηκε, ή το δείγμα

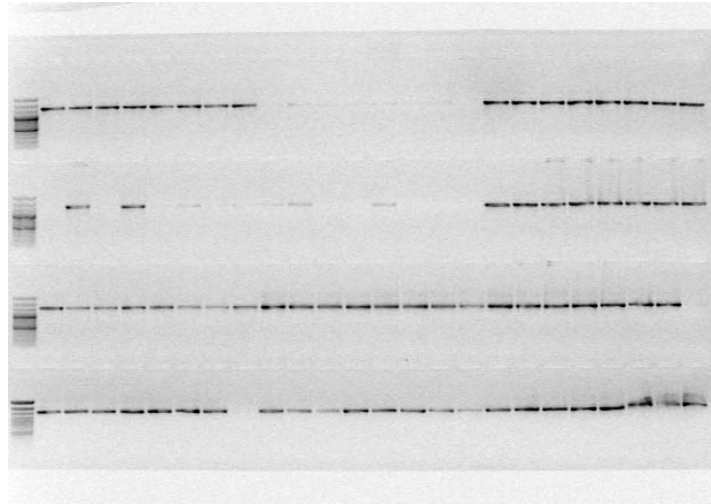
Αποτελέσματα

να βρίσκεται στο σημείο εμβολιασμού της γέλης αгарόζης που σημαίνει ότι το 16S rDNA δεν πολλαπλασιάστηκε, αλλά ολόκληρο το βακτηριακό DNA βρίσκεται ως έχει. Επίσης, συχνά παρατηρείται και μια έντονη ζώνη στο τέλος της στήλης, που αποδίδεται στους εκκινητές (το μικρό κομμάτι DNA κινείται γρηγορότερα και φτάνει μέχρι το τέλος), οι οποίοι προφανώς δεν αντέδρασαν με το υπόστρωμα. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η παρακάτω εικόνα:



Εικόνα 11: Σειρά δειγμάτων σε γέλη αгарόζης όπου παρουσιάζονται διαφορετικές περιπτώσεις αποτελεσμάτων DNA.

Στην Εικόνα 11, φαίνεται ότι γενικά το μέρος του DNA το οποίο απομονώθηκε, πολλαπλασιάστηκε, αλλά με προσμίξεις και εναπομείναντα αντιδρώντα (εκκινητές). Επομένως, από τους τέσσερις αρχικούς παράγοντες, οι βέλτιστες συνθήκες για θερμοκρασία, επιλογή εκκινητών και συγκέντρωση $MgCl_2$, έχουν σε γενικές γραμμές προσδιοριστεί και χρειάζεται η βελτιστοποίησή τους. Για παράδειγμα, η έντονη «μπάντα» στο τέλος του κάθε δείγματος, μας δείχνει ότι οι ποσότητες των εκκινητών χρειάζεται να μειωθούν, διότι αρκετή ποσότητα δεν αντέδρασε. Η ύπαρξη «ουράς», επίσης υποδεικνύει ότι οι εκκινητές δεν συνδέονται μόνο στα σημεία όπου υπάρχει πλήρης συμπληρωματικότητα αλυσίδων, επομένως χρειάζεται να διαφοροποιηθεί είτε η θερμοκρασία, είτε η συγκέντρωση του $MgCl_2$. Πραγματοποιώντας διαδοχικές δοκιμές και αλλάζοντας συνεχώς τις παραμέτρους, ελήφθησαν αποτέλεσμα όπως φαίνεται στην Εικόνα 12.

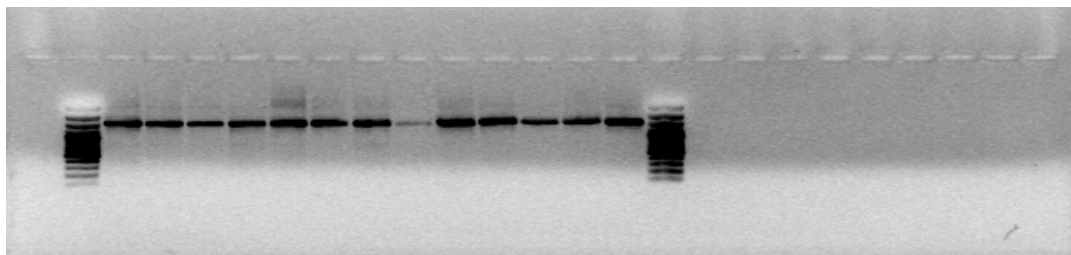


Εικόνα 11: Επιτυχής πολλαπλασιασμός 16S rDNA το οποίο δεν παρουσιάζει παραπροϊόντα. Ορισμένα σημεία εμβολιασμού είναι κενά, που υποδεικνύει ότι το δείγμα δεν πολλαπλασιάστηκε ή η συγκέντρωσή του είναι αρκετά χαμηλή για να ανιχνευτεί οπτικά κάτω από υπεριώδες φως.

Ορισμένες από τις στήλες (ή πηγάδια) στη γέλη αγαρόζης, φαίνονται σαν να μην έχουν απολύτως τίποτα, που σημαίνει ότι η αντίδραση δεν ήταν επιτυχής ή το προϊόν είναι σε πολύ χαμηλή συγκέντρωση. Παρόλα αυτά, οι επιτυχείς αντιδράσεις δεν είχαν περίσσεια εκκινητών, το στοχευμένο μέρος του DNA για να πολλαπλασιαστεί είχε το επιθυμητό μέγεθος, ενώ δεν ανιχνεύτηκαν άλλα μικρότερα ή μεγαλύτερα πολλαπλασιασμένα κομμάτια DNA. Η αντίδραση υπό τις συγκεκριμένες συνθήκες είναι η σωστή, με πιθανές βελτιστοποιήσεις να χρειάζονται για συγκεκριμένα στελέχη. Επομένως, οι παράμετροι που παρουσιάστηκαν στο πειραματικό μέρος αποδείχθηκαν επαρκείς για τη λήψη 16S rDNA κάθε στελέχους.

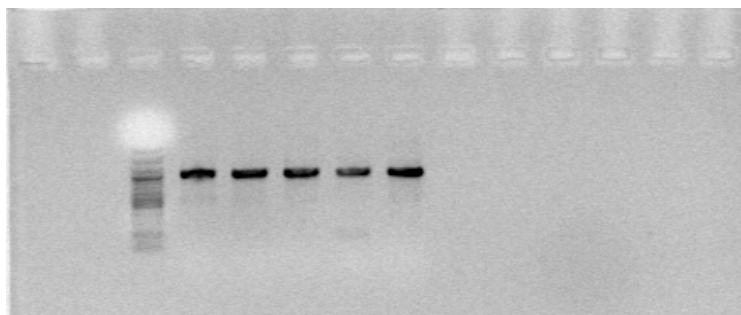
Κατά τον καθαρισμό της αντίδρασης που ακολούθησε, αποδείχθηκε ότι η χρήση του έτοιμου πακέτου της Qiagen προσέφερε τα καλύτερα αποτελέσματα, σε σχέση με το Nucleospin Extract II (Macherey-Nagel) και PureLink Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen):

Αποτελέσματα



Εικόνα 13: Γέλη αγαρόζης δειγμάτων 16S rDNA μετά τον καθαρισμό τους με το έτοιμο πακέτο καθαρισμού της Qiagen. Η ένταση και πυκνότητα της κάθε «γραμμής» αποδεικνύει τον επιτυχή καθαρισμό. Οι ακραίες στήλες εκατέρωθεν των δειγμάτων, είναι δείκτες μεγέθους.

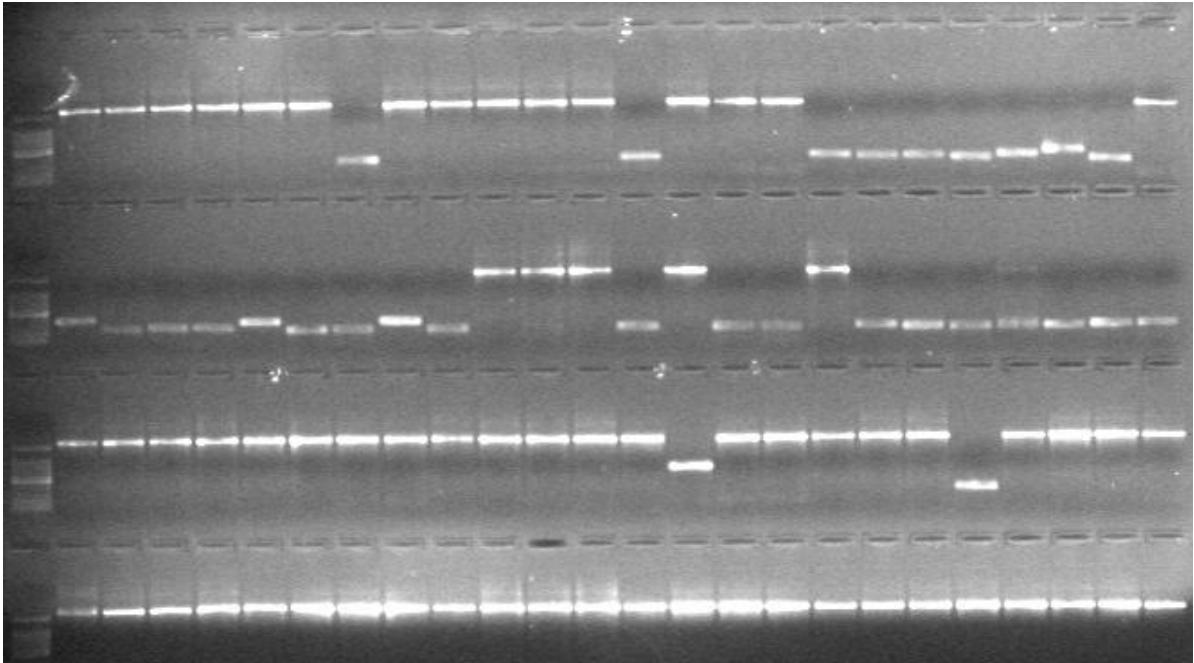
Στην Εικόνα 13, φαίνεται ότι εξακολουθούν να υπάρχουν κάποιες πιθανές προσμείξεις από μεγαλύτερα κομμάτια DNA, αλλά στα περισσότερα δείγματα η ένταση της κάθε γραμμής, που αντιστοιχεί στο απομονωμένο και επιθυμητό κομμάτι, είναι τόσο έντονη, που σημαίνει ότι η ποσότητα θα μπορέσει να υπερκεράσει τυχόν ανταγωνισμό μεταξύ του κομματιού που θέλουμε και των υπόλοιπων προσμείξεων. Αξίζει να σημειωθεί, ότι η παραπάνω φωτογραφία αντιστοιχεί στο μέρος 27f/1492r που είναι σχεδόν ολόκληρο το 16S rDNA και είναι πιο δύσκολος ο εξειδικευμένος πολλαπλασιασμός του, αλλά και ο καθαρισμός του. Σε αντίθεση με τον πολλαπλασιασμό και καθαρισμό μικρότερου μέρους, όπως το 514f/1492r, του οποίου είναι εμφανής η μεγαλύτερη καθαρότητα:



Εικόνα 14: Γέλη αγαρόζης δειγμάτων 16S rDNA που αντιστοιχεί στους εκκινητές 514f/1492r μετά τον καθαρισμό τους με το έτοιμο πακέτο καθαρισμού της Qiagen. Μικρότερο μέρος της αλληλουχίας ήταν ευκολότερο να καθαριστεί.

Ακολούθησαν οι διαδικασίες κλωνοποίησης των 16S rDNA. Οι αντιδράσεις αυτές βελτιστοποιήθηκαν με στόχο τη μείωση, κατά το δυνατόν, των συγκεντρώσεων των αντιδρώντων, χωρίς όμως να διακυβευτεί η απόδοση της αντίδρασης. Μειώνοντας τα αντιδρώντα, εξασφαλίστηκε η κατανάλωσή τους μέχρι το πέρας των αντιδράσεων με αποτέλεσμα να μην υπάρχουν στη συνέχεια, στη διαδικασία αλληλούχησης, προσμείξεις

άλλων μορίων DNA. Όσο η πειραματική διαδικασία πλησιάζει προς την τελική αλληλούχηση των δειγμάτων, τόσο οι αντιδράσεις γίνονται περισσότερο ευαίσθητες σε προσμείξεις και παραπροϊόντα. Στην Εικόνα 5 παρουσιάζονται ενδεικτικά, αποτελέσματα κλωνοποίησης.

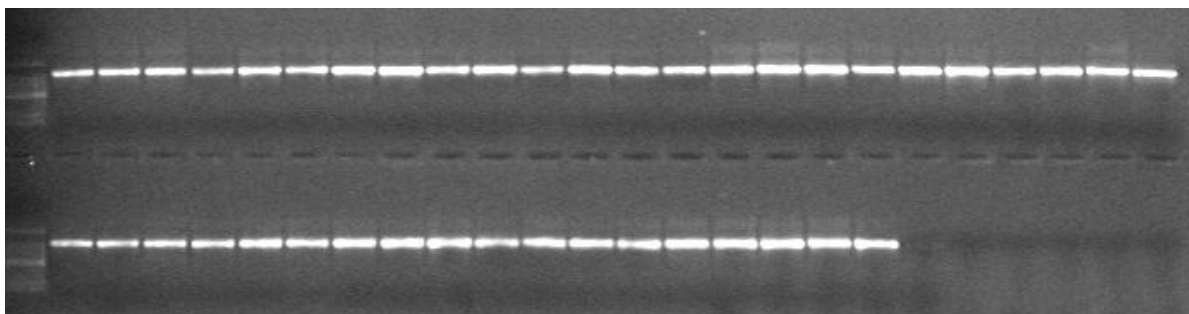


Εικόνα 15: Θετικές και αρνητικές αντιδράσεις απομόνωσης πλασμιδίου από τα κύτταρα *E.coli*, με εκκινητές τους *srb* και T7. Οι θετικές αντιδράσεις είναι στην ίδια ευθεία στην κορυφή, σε σχέση με το δείκτη. Οι αρνητικές αντιδράσεις, που απουσίαζε το ένθεμα στο πλασμίδιο, φαίνονται ως να έχουν προχωρήσει ταχύτερα στη γέλη αγαρόζης, διότι το πολλαπλασιασμένο μέγεθος ανάμεσα στους επιλεγμένους εκκινητές, είναι σαφώς μικρότερο. Το ένθεμα στη συγκεκριμένη φωτογραφία είναι ολόκληρο το 27f-1492r.

Κατά τη βελτιστοποίηση της διαδικασίας κλωνοποίησης, παρατηρήθηκε αστάθεια των αποτελεσμάτων, όταν επαναλήψεις αντιδράσεων δεν έδιναν ίδια αποτελέσματα. Η αιτία βρέθηκε στο ν τρόπο λήψης του δείγματος από τους θερμικώς κατεστραμμένους θετικούς κλώνους *E.coli*, για την αντίδραση της PCR. Τα κύτταρα *E.coli* που περιείχαν το πλασμίδιο, αραιώνονταν σε νερό και στη συνέχεια με θερμικό σοκ, απελευθερώνονταν τα πλασμίδια στο διάλυμα, ώστε να χρησιμοποιηθεί ποσότητα αυτού ως υπόστρωμα για την αντίδραση PCR πολλαπλασιασμού του ενθέματος. Πριν τη λήψη δείγματος, τα θερμικώς κατεστραμμένα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν, ώστε να αποφευχθεί η λήψη κυτταρικών τοιχωμάτων ή άλλων προσμίξεων. Αυτό αποδείχθηκε λάθος. Τα δείγματα πριν τη χρήση τους, χρειάζεται να αναδεύονται έντονα, ώστε το διάλυμα να είναι όσο το δυνατόν ομοιογενές. Με αυτήν την κίνηση, λαμβάνεται επαρκής ποσότητα πλασμιδίου για να πραγματοποιηθούν οι αντιδράσεις.

Αποτελέσματα

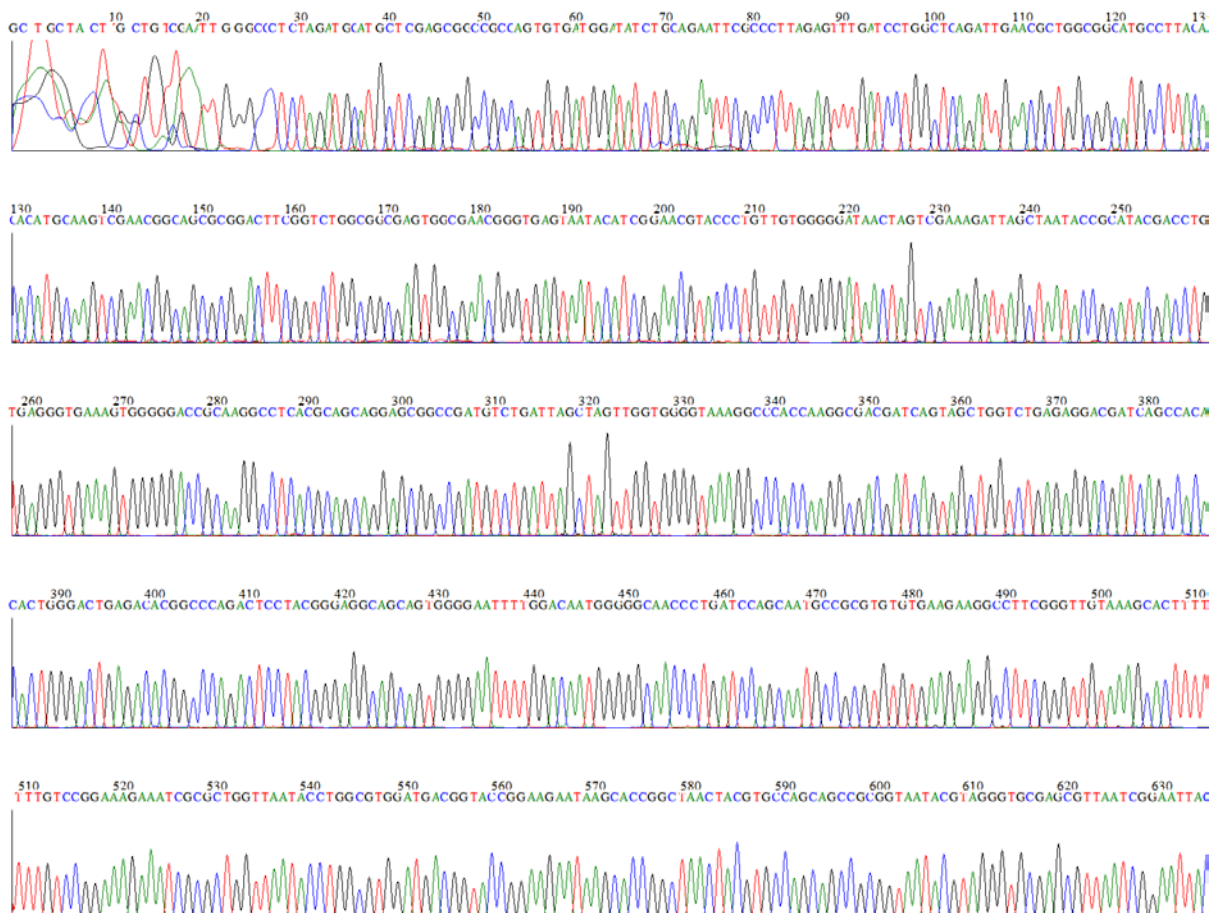
Το θετικό με τη χρήση πλασμιδίων, ήταν ότι ακόμα και από αντιδράσεις οι οποίες έδωσαν ασθενή ή ακόμα και καθόλου (οπτικά σε γέλη αγαρόζης) αποτελέσματα, ο επανέλεγχος με μικρότερο κλώνο από το επιθυμητό ένθεμα (514f/1492r), αποδείχθηκε θετικός. Επομένως, υπάρχει ποσότητα 16S rDNA του μεγαλύτερου ενθέματος (27f/1492r), αλλά σε μικροποσότητες. Στην Εικόνα 16, παρουσιάζεται το τελικό στάδιο ελέγχου των θετικών κλώνων, κατά το οποίο πολλαπλασιάστηκε με αντίδραση PCR μικρότερο μέρος από το συνολικό ένθεμα του πλασμιδίου και συγκεκριμένα, το 514f/1492r. Είναι εμφανής η συνολική επιτυχία και επιβεβαίωση του συνόλου των μοριακών πειραμάτων. Η φωτεινότητα της κάθε γραμμής, σε σχέση με τη φωτεινότητα του δείκτη βάσεων (marker), αποδεικνύει ποιοτικά και την απομόνωση ικανοποιητικής ποσότητας του 16S rDNA κάθε στελέχους.



Εικόνα 16: Θετικές αντιδράσεις 514f/1492r απομονωμένων πλασμιδίων που επιβεβαιώνουν την ύπαρξη της μεγαλύτερης αλυσίδας DNA στα προς αλληλούχηση δείγματα.

Η επιτυχία των παραπάνω διαδικασιών επιβεβαιώθηκε με την τελική αλληλούχηση των δειγμάτων και τη λήψη αποτελεσμάτων, τα οποία διευκόλυναν τη συνέχεια των πειραμάτων. Πιο συγκεκριμένα, επιτεύχθηκε η λήψη χρωματογραφημάτων, στα οποία οι κορυφές μπορούσαν να προσδιοριστούν εύκολα σε πιο νουκλεοτίδιο αντιστοιχούσαν. Επίσης, η αλληλούχηση ήταν δυνατή σε μεγάλο μέρος της αλυσίδας των δειγμάτων, με αποτέλεσμα την αλληλεπικάλυψη μεταξύ τους (27f/1492r με 514f/1492r). Η αλληλούχηση πραγματοποιήθηκε και από τις δύο κατευθύνσεις και στα δύο δείγματα. Συνεπώς, ήταν διαθέσιμα περισσότερα από ένα αποτελέσματα για την αλυσίδα, η οποία αντιστοιχούσε στο μέσο και προς τον εκκινητή 1492r, του μεγάλου ενθέματος. Η επικάλυψη των αποτελεσμάτων στο «μέσο» των δύο κατευθύνσεων, βοήθησε επίσης στην εύκολη αντιστοίχιση των δειγμάτων και στην εξακρίβωση τυχόν εσφαλμένων νουκλεοτιδίων. Μειώνοντας τα λάθη, τα αποτελέσματα της ταυτοποίησης με τη βάση δεδομένων, υπήρξαν ακριβέστερα.

Στην Εικόνα 17, παρουσιάζεται το σύνολο του χρωματογραφήματος κατά την αλληλούχηση του ενθέματος 27f/1492r, με κατεύθυνση από τον εκκινητή 27f, για το στέλεχος B_MΠΕΖ, χρησιμοποιώντας το υπολογιστικό πρόγραμμα BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>). Το δείγμα προέρχεται από καθαρισμένη αντίδραση PCR από το πλασμίδιο και είχε πολλαπλασιαστεί με τη χρήση εκκινητών του πλασμιδίου. Με αυτόν τον τρόπο, εξασφαλίζεται ότι η αλληλούχηση θα ξεκινήσει νωρίτερα από το σημείο στο οποίο βρίσκεται ο εκκινητής 27f. Μπορεί μεν να μειώνεται ο αριθμός των νουκλεοτιδίων τα οποία ταυτοποιούνται και αντιστοιχούν στο ριβοσωμικό DNA, αλλά αναγνωρίζεται εύκολα το σημείο του κάθε εκκινητή, πέρα από το οποίο και προς την κατεύθυνση «εμπρός», βρίσκονται τα νουκλεοτίδια, τα οποία αντιστοιχούν στο ένθεμα. Επίσης, από την εικόνα είναι ευκρινές ότι τα αρχικά νουκλεοτίδια, δεν έχουν καθαρές κορυφές. Η ταυτοποίηση όμως που «χάνεται», αφορά το πλασμίδιο. Ο εκκινητής ξεκινά στο 85^ο νουκλεοτίδιο και ολοκληρώνεται στο 104^ο. Επομένως, όλα τα προηγούμενα αντιστοιχούν στο πλασμίδιο τα οποία είναι γνωστά, επιβεβαιώνοντας έτσι ότι η αλληλούχηση πραγματοποιήθηκε σωστά και αφορούσε το πλασμίδιο (επιπλέον επιβεβαίωση πλην την οπτικής βάσει των καθαρών κορυφών).



Αποτελέσματα



Εικόνα 17: Αποτέλεσμα αλληλούχησης ενθέματος 27f/1492r 16S rDNA του B_MΠΕΖ, ξεκινώντας από το 27f. Ο εκκινητής βρίσκεται στο σημείο 85 – 104. Πριν από αυτόν, τα νουκλεοτίδια αντιστοιχούν στο πλασμίδιο. 1000 νουκλεοτίδια μπορούν εύκολα να επιβεβαιωθούν λόγω των καθαρών κορυφών.

Από την εικόνα φαίνεται ότι μπορεί εύκολα να προσδιοριστεί και να ελεγχθεί χωρίς αμφιβολίες, ένας μεγάλος αριθμός νουκλεοτιδίων, τουλάχιστον μέχρι το 1000^ο. Πέρα από το 1000^ο, παρατηρούνται πιο συχνά πολλαπλές κορυφές όμοιων νουκλεοτιδίων, τα οποία υπονοούν αβεβαιότητα στον αριθμό τους. Είναι υποκειμενικό και βάσει της ποσότητας της πληροφορίας που υπάρχει, εάν και αυτά τα νουκλεοτίδια θεωρηθούν σωστά. Αφαιρώντας τα πρώτα 84, αλληλουχήθηκαν 916 νουκλεοτίδια. Επειδή η ίδια ακριβώς διαδικασία γίνεται και αντίστροφα, στη συμπληρωματική προς την παραπάνω αλυσίδα, προκύπτει σημαντική αλληλοεπικάλυψη των δύο αποτελεσμάτων, ώστε οι δύο αλληλουχίες να δώσουν το σύνολο του 27f/1492r ενθέματος, ενώ με μεγάλη ασφάλεια και χωρίς λάθη, μπορούν να ενοποιηθούν οι δύο αλυσίδες, διότι ένας μεγάλος αριθμός νουκλεοτιδίων στο μέσο αυτών είναι ο ίδιος. Περαιτέρω επιβεβαίωση επιτυγχάνεται από το ένθεμα 514f/1492r, αλλά μόνο από την κατεύθυνση του 1492r και αντίστροφα. Τα αποτελέσματα για όλες τις αλληλουχίες είχαν

ανάλογη μορφή με την παραπάνω εικόνα, με αποτέλεσμα να γίνει ασφαλής απομόνωση του επιθυμητού 16S rDNA του κάθε στελέχους.

Στη συνέχεια, η αλληλουχία εισήχθηκε στο υπολογιστικό πρόγραμμα BLASTn (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastHome), ώστε να εξακριβωθεί, εάν και σε πιο γνωστό μικροοργανισμό αντιστοιχούσε.

Ένας δεύτερος επανέλεγχος των αποτελεσμάτων έγινε με την επιλογή των πλησιέστερων αλληλουχιών που προέκυψαν από τη βάση δεδομένων, οι οποίες ευθυγραμμίστηκαν με το δείγμα και ελέγχθηκαν τα σημεία με διαφορετικά νουκλεοτίδια και αν το χρωματογράφημα στα σημεία αυτά, ήταν αμφιλεγόμενο. Εάν όχι, τότε το νουκλεοτίδιο αποτελούσε απλά σημείο διαφοράς με τη συγκρινόμενη αλληλουχία/μικροοργανισμό. Γενικά, τα χρωματογραφήματα τα οποία ελήφθησαν δεν προσέφεραν σημεία αμφισβήτησης, εκτός και εάν γίνονταν δεκτά νουκλεοτίδια προς το τέλος της αλληλούχησης, όπου οι κορυφές άρχιζαν να επικαλύπτουν η μία την άλλη. Η ταυτοποίηση των απομονωμένων στελεχών, παρουσιάζεται στον Πίνακα 6.

Πίνακας 6: Ταυτοποίηση απομονωμένων στελεχών και το πλησιέστερο σε αυτούς στέλεχος, το οποίο αντιστοιχεί σε επίσημα απομονωμένο μικροοργανισμό και η αλληλουχία του, βρίσκεται στη βάση δεδομένων NCBI. Στην τελευταία στήλη, δίνονται οι κωδικοί NCBI για τις νέες αλληλουχίες.

Αρχικό όνομα μικροοργανισμού	Τελικό όνομα μικροοργανισμού ¹	Ποσοστό ομοιότητας (%)	Κωδικός NCBI
T6	<i>Bacillus pumilus</i> ACA-DC 4061	99.80	JQ046373
B λευκός (BL)	<i>Paenibacillus polymyxa</i> ACA-DC 4062	98.95	JQ412065
T10	<i>Bacillus licheniformis</i> ACA-DC 4063	99.80	JQ412068
C	<i>Bacillus cereus</i> ACA-DC 4064	99.54	JQ412066
T2	<i>Bacillus megaterium</i> T2	<i>Bacillus megaterium</i> strain C1 / 99% <i>Bacillus megaterium</i> strain MPF- 906 / 99%	
ΠΡΩΤΟΣ (PR)	<i>Pantoea</i> sp. ACA-DC 4066	<i>Pantoea agglomerans</i> / 99.80 <i>Pantoea vagans</i> / 99.53	JQ412064
T3	<i>Pantoea</i> sp. ACA-DC 4067	<i>Pantoea agglomerans</i> strain 48b/90 / 99% <i>Pantoea vagans</i> C9-1 / 99%	
T5 λευκός (T5_L)	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> ACA-DC 4068	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> subsp. <i>aurantiaca</i> strain NCIB 10068 / 99.47%	JQ412067
T7	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> ACA-DC 4069	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> subsp. <i>aurantiaca</i> strain ST-1 / 99%	
T9	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> ACA-DC 4070	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> subsp. <i>aurantiaca</i> strain ST-1 / 99%	

Αρχικό όνομα μικροοργανισμού	Τελικό όνομα μικροοργανισμού ¹	Ποσοστό ομοιότητας (%)	Κωδικός NCBI
ΠΛ1	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> ACA-DC 4071	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> subsp. <i>aurantiaca</i> strain NCIB 10068 / 99%	
ΠΛ2	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> ACA-DC 4072	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> subsp. <i>aurantiaca</i> strain NCIB 10068 / 99%	
Β μπεζ	<i>Cupriavidus metallidurans</i> ACA-DC 4073	<i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34 / 99.87	JQ046372
ΠΚ	<i>Ralstonia</i> sp. ACA-DC 4074	<i>Ralstonia pickettii</i> 12D chromosome 1 / 99% <i>Ralstonia detusculanense</i> / 99%	

¹ Το πρόθεμα «ACA-DC αριθμός» αντιστοιχεί στους κωδικούς κατάθεσης των απομονωμένων μικροοργανισμών στην Τράπεζα Μικροοργανισμών του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, Εργαστήριο Γαλακτοκομίας.

Ο μικροοργανισμός με αρχική ονομασία T2 αρχικά ταυτοποιήθηκε, αλλά κατά τη διάρκεια ελέγχου βιωσιμότητας, δεν έγινε εφικτή η ανάκτησή του.

3.3 Χρησιμοποίηση Συστημάτων API για την Ταυτοποίηση των Απομονωμένων Στελεχών

(Στο κείμενο που ακολουθεί χρησιμοποιούνται οι αγγλικοί όροι χημικών ενώσεων και βιοχημικών δοκιμών προς διευκόλυνση σύγκρισης και έρευνας με τη διεθνή βιβλιογραφία)

Ο *Bacillus cereus* C, παρουσίασε παρόμοια αποτελέσματα με αυτά τα οποία υπήρχαν στον πίνακα ταυτοποίησης των συστημάτων API, αλλά και στο Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Logan and De Vos 2009). Θετικά ήταν τα αποτελέσματα σε D-ribose, D-glucose, D-fructose, N-acetylglucosamine, arbutin, esculin, D-maltose, sucrose, D-trehalose, starch, glycogen, αλλά αρνητικά για glycerol, D-ribose, salicin and D-cellobiose. Σε API 20E η arginine dehydrolase, η αφομοίωση του κιτρικού οξέος και η gelatinase ήταν θετικά, αλλά το τεστ για Voges-Proskauer ήταν αρνητικό.

Ο *Bacillus licheniformis* T10, δεν παρουσίασε διαφορές στα αποτελέσματά του βάσει της βιβλιογραφίας.

Ο *Paenibacillus polymyxa* BL, έδειξε θετικά αποτελέσματα για L-arabinose, D-adonitol, Methyl-βD-xylopyranoside, D-galactose, D-glucose, N-acetylglucosamine, amygdalin, arbutin, esculin, salicin, D-cellobiose, D-maltose, D-lactose, D-melibiose, sucrose, D-rafinose και άμυλο (starch). Αρνητική ζύμωση παρατηρήθηκε για glycerol, D-xylose, D-manose, D-mannitol, D-trehalose, gentiobiose και D-turanose.

Για τον *Cupriavidus metallidurans* B_MPEZ, τα αποτελέσματα συμβαδίζουν με αυτά της ταυτοποίησης του μικροοργανισμού και της μετακίνησής του στο γένος βάσει της βιβλιογραφίας (Goris et al. 2001): η αναγωγή νιτρικών, D-gluconate, caprate, adipate, L-malate βρέθηκαν θετικά ενώ Citrate, D-glucose, L-arabinose, D-mannose, mannitol, maltose, N-acetylglucosamine, indole, protease, esculin, arginine dehydrolase και urease βρέθηκαν αρνητικά.

Όσο αφορά τον *Pseudomonas chlororaphis* T5_L, τα φαινοτυπικά τεστ βρέθηκαν να συμβαδίζουν βάσει της βιβλιογραφίας. Όμως ο ι διαφοράς σε επίπεδο υπό-είδους (sub-species) βιβλιογραφικά (Peix et al. 2007) δεν κατέσται δυνατή. Όπως φαίνεται και στον Πίνακα 7, η σύγκριση με τα στελέχη της βιβλιογραφίας δεν μπορεί να οδηγήσει σε ασφαλή συμπεράσματα. Για τον λόγο αυτό, χρησιμοποιήθηκε το όνομα που περιγράφει το είδος αλλά όχι το υποείδος.

Πίνακας 7: Σύγκριση μεταβολικών χαρακτηριστικών των υποειδών *P. chlororaphis*, με το απομονωμένο στέλεχος T5_L. Ασφαλές συμπέρασμα δεν μπορεί να εξαχθεί, για αυτό και θεωρήθηκε ότι η ταυτοποίηση ήταν επιτυχής έως το είδος του στελέχους.

	<i>P. chlororaphis</i> T5_L	<i>P. chlororaphis</i> subsp. <i>Chlororaphis</i> *	<i>P. chlororaphis</i> subsp. <i>Aureofaciens</i> *	<i>P. chlororaphis</i> subsp. <i>Aurantiaca</i> *
Non-fluorescent pigments:				
Green (chlororaphin)	+	+	-	+
Orange (phenazine-1-carboxylate)	-	-	+	+
Denitrification	+	+	v	-
Assimilation as carbon source:				
L-Arabinose	-	-	+	+
5-Ketogluconate	-	+	+	-

*Τα αποτελέσματα προέρχονται από Peix et al. (2007).

Τα ημι-αυτοματοποιημένα συστήματα API, έδειξαν ότι τα στελέχη «ΠΡΩΤΟΣ» και «Τ3» ανήκουν στο γένος *Pantoea*. Πιο συγκεκριμένα, υδρόλυση της ζελατίνης και Voges-Proskauer τεστ ήταν θετικά. Οι μικροοργανισμοί παρήγαγαν τα ένζυμα arginine dehydrolase και b-galactosidase, αλλά όχι ινδόλη και ουρεάση. Τα αποτελέσματα έδειξαν θετική παραγωγή οξέος από L-arabinose, D-mannitol, N-acetylglucosamine, lactose και sucrose. Πηγές άνθρακα οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν από τα στελέχη είναι L-arabinose, D-glucose, D-fructose, D-mannose, aesculin, D-sorbitol, amygdalin, D-mannitol, maltose, trehalose, cellobiose, sucrose, glycerol, lactose, glycogen, D-tagatose. Πηγές άνθρακα που δεν χρησιμοποιούνται είναι L-rhamnose, inositol, D-ribose, D-xylose, D-galactose, D-ribose, gentiobiose D-lyxose D-xylose, L-rhamnose, inositol, D-lyxose and D-fucose erythritol, D-adonitol, L-sorbose, dulcitol, inulin, raffinose, xylitol, turanose, L-arabitol, 2-ketoglutarate, 5-ketogluconate, L-fucose. Και στην περίπτωση αυτή, η γενετική ταυτοποίηση έδειξε δύο γένη να βρίσκονται πολύ κοντά όσον αφορά τους απομονωμένους μικροοργανισμούς. Τα βιοχημικά τεστ δεν κατάφεραν να προσφέρουν κάποια βελτίωση στη ταυτοποίηση, διότι τα απομονωμένα στελέχη παρουσιάζουν διαφορές στα βιοχημικά χαρακτηριστικά σε σχέση με τη βιβλιογραφία. Η πρόσφατη απομόνωση του *P. vagans* (Brady et al. 2009), είχε σαν αποτέλεσμα και βιοχημικά, οι μικροοργανισμοί να μην μπορούν να αποδοθούν σε συγκεκριμένο στέλεχος (Deloile et al. 2009). Η τελική ονομασία που δόθηκε στα απομονωμένα στελέχη ήταν έως το γένος και όχι το είδος. Ο πίνακας που ακολουθεί δείχνει τη σύγκριση των απομονωμένων στελεχών με τη βιβλιογραφία.

Πίνακας 8: Σύγκριση βιοχημικών χαρακτηριστικών του στελέχους «ΠΡΩΤΟΣ» με τα δύο στελέχη τα οποία ταυτοποιήθηκαν γενετικά ως τα πλησιέστερα σε αυτό. Ασφαλές συμπέρασμα δεν μπορεί να εξαχθεί με αποτέλεσμα τα στελέχη που απομονώθηκαν να ονομαστούν ως προς το γένος και όχι το είδος.

	<i>Pantoea sp. PR</i>	<i>Pantoea agglomerans</i>	<i>Pantoea vagans</i>
Indole production*	–	–	–
Utilization of:			
D-Arabitol*	–	+	–
Gentiobiose*	–	–	(+)
5-Ketogluconate*	–	–	(+)
Lactose*	+	–	–
Malonic acid*	ND [†]	–	+
L-Ornithine*	–	–	+
L-Pyroglutamic acid*	ND	–	–
L-Tartrate*	ND	–	+
Tween 40*	ND	–	+
Tween 80*	ND	–	+
Yellow pigment [‡]	+	+	ND
Arginine dihydrolase [‡]	–	0/19 [§]	ND
Voges – Proskauer [‡]	+	16/19 [§]	ND
Gelatin hydrolysis [‡]	+	19/19 [§]	ND
Acid from Inositol [‡]	–	0/19 [§]	ND
Acid from melibiose [‡]	–	6/19 [§]	ND
Fosfomycin susceptibility [‡]	ND	0/19 [§]	ND

*Τα δεδομένα για *Pantoea agglomerans* και *Pantoea vagans* προέρχονται από Brady et al. (2009).

[†]ND = not determined.

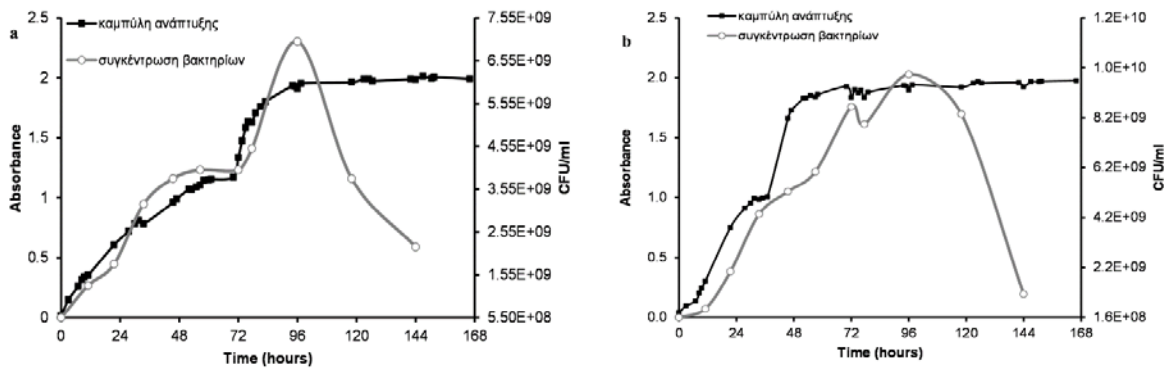
[‡]Τα δεδομένα για *Pantoea agglomerans* προέρχονται από Delétoile et al. (2009).

[§]Τα αποτελέσματα αυτά δίνονται ως: «αριθμός στελεχών με το συγκεκριμένο χαρακτηριστικό / συνολικός αριθμός στελεχών που ελέγχθηκαν».

3.4 Ανάπτυξη Θρεπτικού Υγρού για Πειράματα Απόθεσης σε Μαρμάρινο Υπόστρωμα

Το θρεπτικό υγρό B4, αποτελεί το συνηθέστερο μέσο δοκιμής βακτηριακής καταβύθισης ανθρακικού ασβεστίου. Η ανάπτυξη των μικροοργανισμών είναι άμεση και σε σημαντικές ποσότητες. Τα θρεπτικά μέσα Tryptose και Bacteriological Peptone, προκρίθηκαν για περαιτέρω δοκιμές διότι δεν προκαλούσαν το σχηματισμό θολώματος ή ιζήματος κατά τη ρύθμιση του pH. Η Bacteriological Peptone παρείχε σαφώς μεγαλύτερη ανάπτυξη των μικροοργανισμών, σε σχέση με την Tryptose και για αυτό εν τέλει επελέγη. Η αφαίρεση της γλυκόζης αποφασίστηκε για να μειωθεί ο αριθμός πηγών άνθρακα (η πρώτη είναι τα συστατικά της Tryptose ή Bacteriological Peptone και το δεύτερο το οξικό ανιόν). Το pH του Tryptose ή Bacteriological Peptone ρυθμίστηκε κοντά στο 8 και στη συνέχεια, τα συστατικά του θρεπτικού αποστειρώθηκαν ξεχωριστά. Αναμείχθηκαν, αφού πρώτα τα

διαλύματα είχαν επανέλθει σε θερμοκρασία δωματίου. Σημειώνεται ότι μετά την αποστείρωση, το pH μειωνόταν 0.2 μονάδες περίπου. Γενικά όλα τα απομονωμένα στελέχη, αναπτύχθηκαν ικανοποιητικά στο νέο θρεπτικό διάλυμα πλην του *P. Polymyxa*, ο οποίος αναπτυσσόταν μόνο στο Nutrient broth που αρχικά απομονώθηκε. Στο Σχήμα 1, παρουσιάζεται η καμπύλη ανάπτυξης δύο εκ των απομονωμένων στελεχών. Σημαντική παρατήρηση, αποτελεί η εμφάνιση διαύξεσης. Διαύξηση είναι η συγχώνευση δύο καμπύλων ανάπτυξης σε μία, κατά τη διάρκεια του πολλαπλασιασμού του βακτηριακού πληθυσμού και εμφανίζεται όταν τα κύτταρα αρχικά αφομοιώνουν ένα εκ των θρεπτικών συστατικών και στη συνέχεια ξεκινά η αφομοίωση του δεύτερου, προσφέροντας μια δεύτερη διαδικασία ανάπτυξης. Στη προκειμένη περίπτωση η πρώτη φάση οφείλεται στην αφομοίωση της Bacteriological Peptone και η δεύτερη στην αφομοίωση του οξικού ανιόντος.



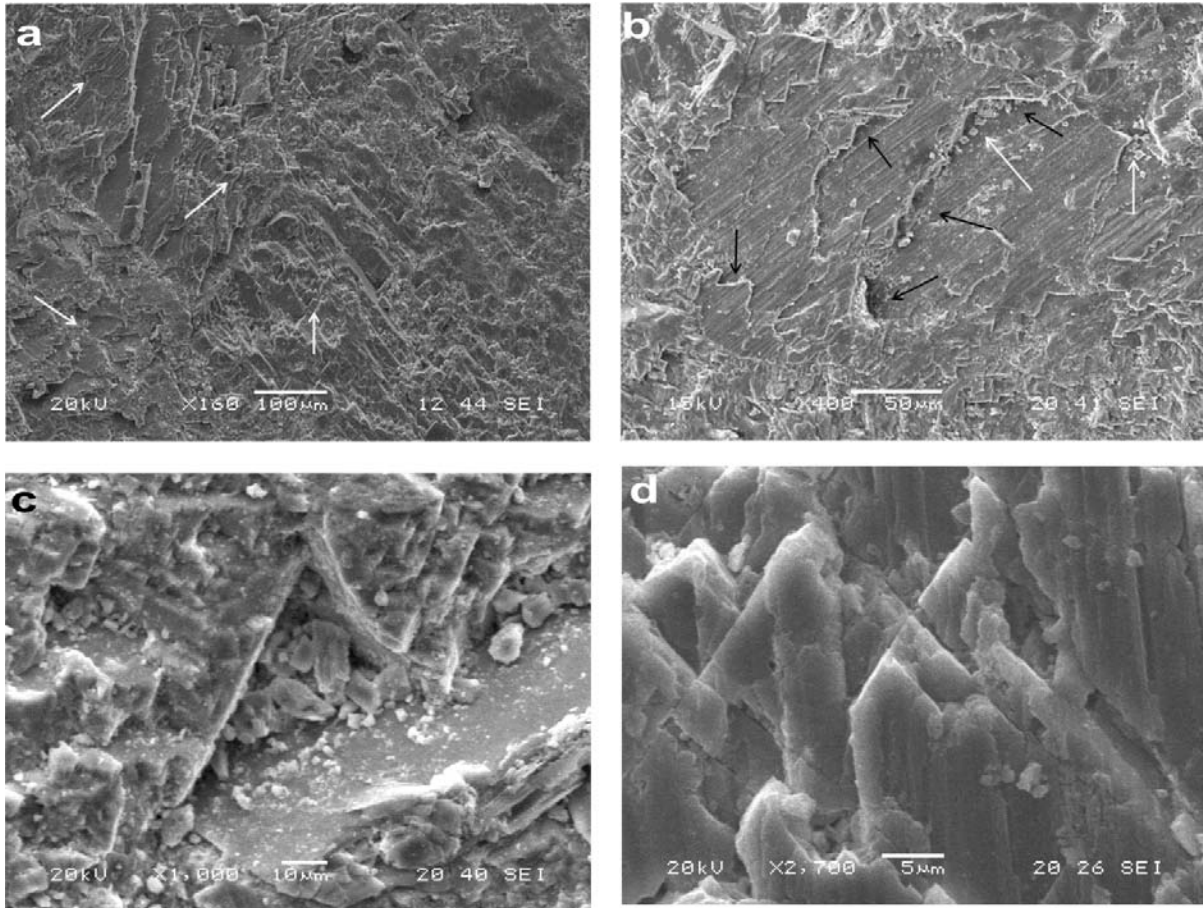
Σχήμα 1: Γραφικές παραστάσεις καμπύλης ανάπτυξης και συγκέντρωσης βακτηρίων των **(a)** *Bacillus pumilus* ACA-DC 4061 σε θρεπτικό διάλυμα BP3x και 30 °C και **(b)** *Cupriavidus metallidurans* ACA-DC 4073 σε θρεπτικό διάλυμα BP3x και 35 °C.

3.5 Μαρμάρινο Υπόστρωμα Δοκιμών

Φωτογραφίες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας του μαρμαρίνου υποστρώματος το οποίο χρησιμοποιήθηκε κατά τη διάρκεια των πειραμάτων παρουσιάζεται στην Εικόνα 18. Από αυτές φαίνεται η απουσία πόρων, οι οποίοι θα μπορούσαν να λειτουργήσουν ως σημεία συγκέντρωσης των βακτηρίων, για την έναρξη της απόθεσής τους. Τα μόνα σημεία τα οποία πιθανότατα θα βοηθήσουν στα πρώτα «βήματα» της διαδικασίας, είναι τα σημεία αλλαγής της κατεύθυνσης των κρυστάλλων ασβεστίτη, όπου σχηματίζονται εσοχές (Εικόνα 18 a) ή στα σημεία όπου το μάρμαρο, λόγω της επεξεργασίας κοπής του, έχει σπάσει, δημιουργώντας διαφορά ύψους ανάμεσα σε διαδοχικούς κρυστάλλους ασβεστίτη (Εικόνα 18

Αποτελέσματα

b). Ήταν σημαντικό να μελετηθεί διεξοδικά η μορφολογία των θραυσμάτων (Εικόνα 18 c), ώστε να είναι εφικτός ο διαχωρισμός από τη βιολογική απόθεση ασβεστίτη. Για το λόγο αυτό, πάντα τα τυφλά δείγματα των πειραμάτων ελέγχονταν στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, ώστε να εξακριβωθεί εάν υπήρξαν διαφοροποιήσεις μετά την ολοκλήρωση των πειραμάτων. Κανένα από τα τυφλά δείγματα δεν έδειξε κάτι διαφορετικό, ούτε ουσιαστική ανόργανη απόθεση κατά τη διάρκεια των πειραμάτων. Αντίθετα, σε όλα τα τυφλά δείγματα υπήρξε μικρή μείωση του βάρου, πιθανότατα λόγω της διάλυσης στο υγρό μέρος του υποστρώματος.



Εικόνα 18: Εικόνες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας μαρμαρίνων δοκιμίων αποστειρωμένων πριν τη χρησιμοποίησή τους σε πειράματα. **(a)** παρουσιάζεται μια γενική εικόνα όπου (λευκά βέλη) είναι εμφανείς οι διαφορετικές κατευθύνσεις των κρυστάλλων ανθρακικού ασβεστίου; **(b)** παρουσιάζεται ως παράδειγμα σημείο του μαρμαρίνου δοκιμίου όπου η κοπή και ο τρόπος θραύσης του μαρμάρου, σχηματίζουν πιθανά σημεία συγκέντρωσης των βακτηρίων και δημιουργίας των πρώτων «πυρήνων» απόθεσης (μαύρα βέλη). Τα λευκά βέλη παρουσιάζουν τα θραύσματα του μαρμάρου όπως αυτά φαίνονται σε μικρή μεγέθυνση; **(c)** μεγέθυνση σημείου μαρμαρίνου υποστρώματος όπου φαίνονται τα θραύσματα μαρμάρου και **(d)** μεγέθυνση των κρυστάλλων μαρμάρου όπως διατάσσονται στο χώρο, δημιουργώντας την επιφάνεια την οποία τα βακτήρια πρέπει να αποθέσουν το νέο ανθρακικό ασβέστιο.

3.6 Προκαταρκτικά Πειράματα Απόθεσης σε Μαρμάρινο Υπόστρωμα

3.6.1 1^ο Σκέλος Προκαταρκτικών Πειραμάτων

Η ανάπτυξη του κατάλληλου θρεπτικού υλικού, βοήθησε στην εξακρίβωση της ικανότητας των μικροοργανισμών να προκαλούν απόθεση ανθρακικού ασβεστίου. Σημειώνεται, ότι όλα τα στελέχη που απομονώθηκαν και διατηρήθηκαν εργαστηριακά στην

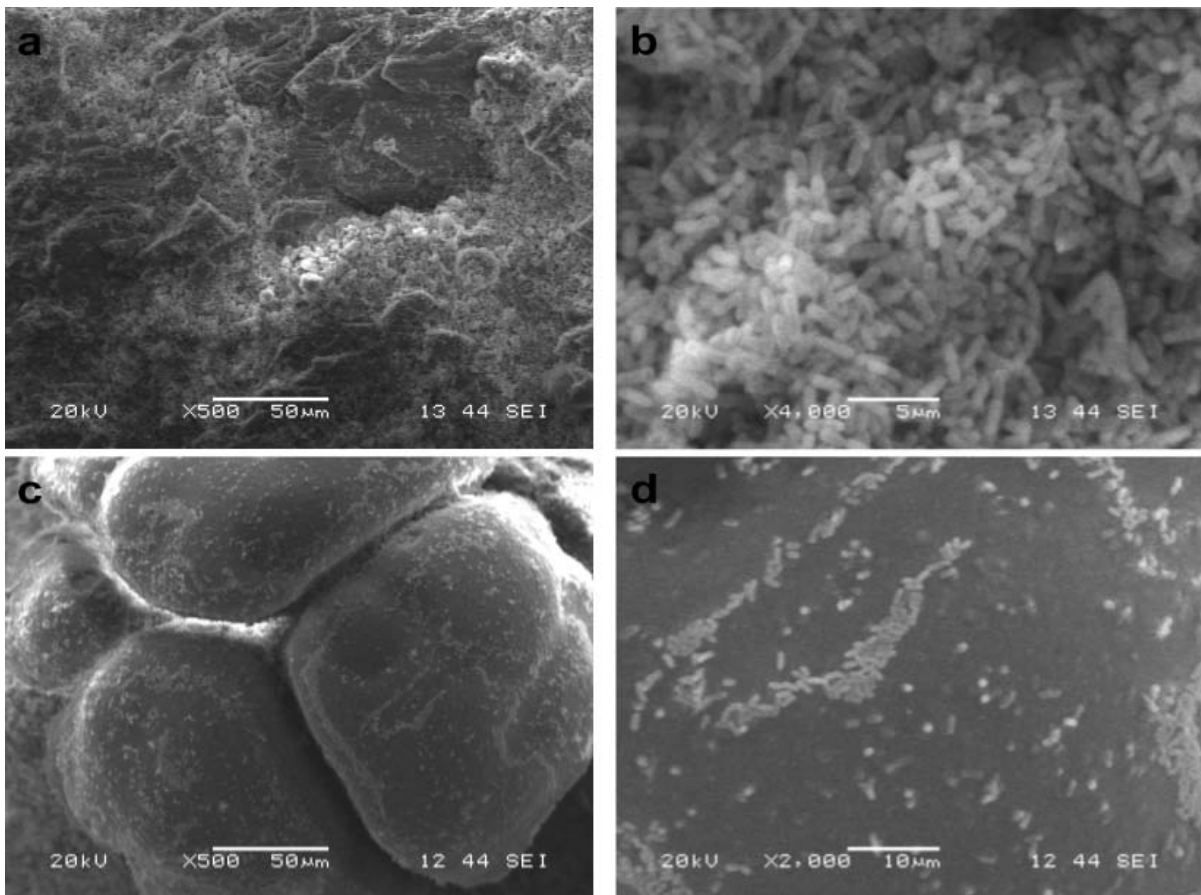
κατάψυξη, είχαν τη δυνατότητα να προκαλέσουν τη διάλυση ανθρακικού ασβεστίου σε δοκιμές που έγιναν σε στερεές καλλιέργειες (τρυβλία).

Ο έλεγχος της απόθεσης ανθρακικού ασβεστίου έγινε σε Bacteriological Peptone, με την αναγκαία ποσότητα οξικού ασβεστίου. Σχεδόν όλα τα στελέχη τα οποία ήταν διαθέσιμα, αναπτύχθηκαν σε υγρές καλλιέργειες θρεπτικών διαλυμάτων συγκέντρωσης 1x, 2x και 4x της αρχικής, ώστε να προσδιοριστεί ο τρόπος απόθεσης σε μαρμάρινα υποστρώματα και ποια παρείχαν αποτελέσματα τα οποία θα δικαιολογούσαν την περαιτέρω διερεύνησή τους. Τα προκαταρκτικά αποτελέσματα, ομαδοποιημένα ως προς το γένος των μικροοργανισμών, παρουσιάζονται παρακάτω.

3.6.1.1 Βάκιλλοι (*bacillus* sp.)

Ο *Bacillus megaterium* T2 δεν ανακτήθηκε κατά τη εκκίνηση των πειραμάτων από τα δείγματα που βρισκόντουσαν στην κατάψυξη και επομένως, παρόλο που ταυτοποιήθηκε, δεν κατέστη δυνατή η περαιτέρω διερεύνησή του. Επίσης, το στέλεχος *Paenibacillus polymyxa* BL, ήταν το μοναδικό στέλεχος που δεν αναπτύχθηκε στο επιλεγμένο θρεπτικό.

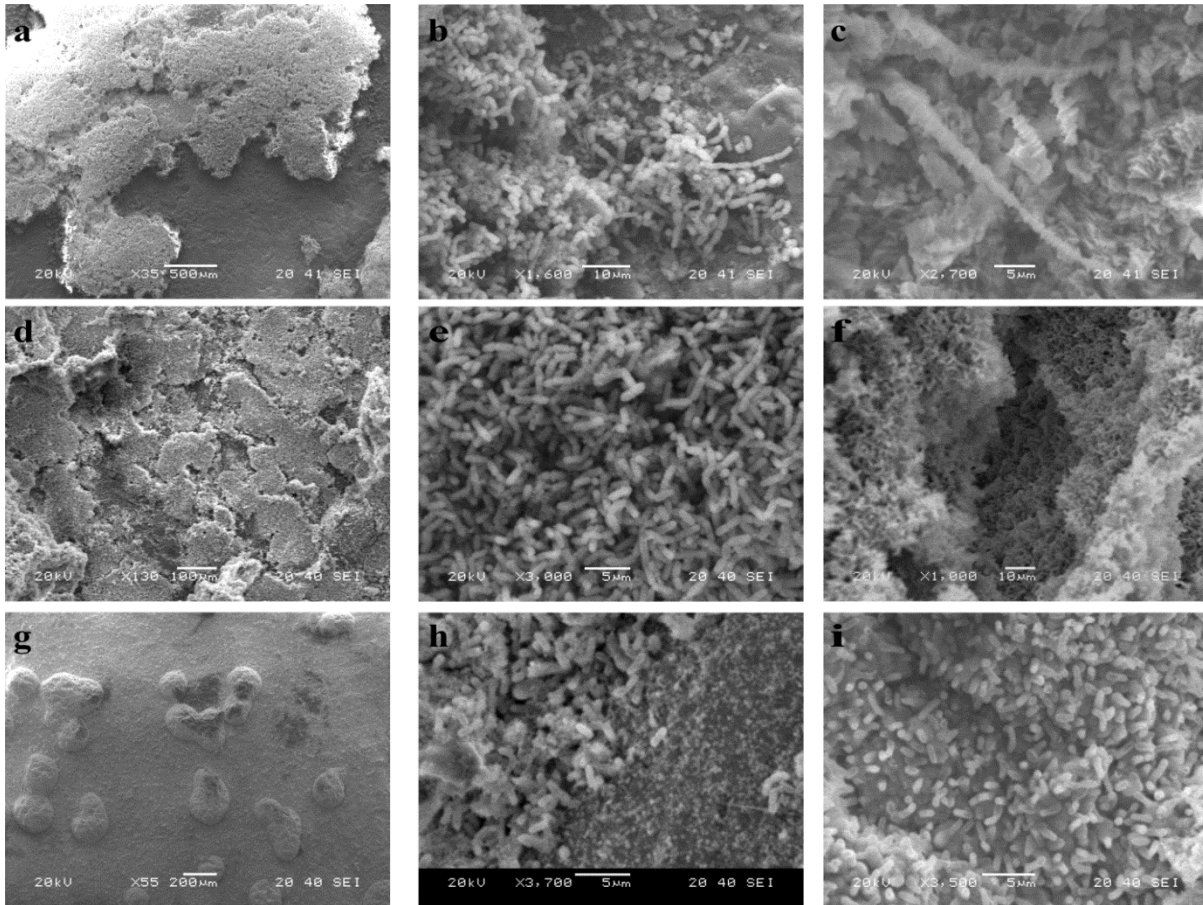
Στη συγκέντρωση BP1x, η μεταβολή βάρους στο υπόστρωμα ήταν επουσιώδης για τους *Bacillus cereus* ACA-DC 4064 και *Bacillus licheniformis* ACA-DC 4063, ενώ για τον *Bacillus pumilus* ACA-DC 4061, ήταν περισσότερο ανιχνεύσιμη, με μια μεταβολή βάρους +0.015 g, γεγονός το οποίο μας επέτρεπε να έχουμε πιθανότητες να παρατηρηθεί η απόθεση στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Ο *B. pumilus* ACA-DC 4061, μπορούσε να αναγνωριστεί, διότι παρατηρήθηκαν αποθέσεις οι οποίες αντιστοιχούσαν στις διαστάσεις των κυττάρων όπως φαίνεται στην Εικόνα 19, σχήμα ράβδου που αντιστοιχεί στις διαστάσεις του μικροοργανισμού (Εικόνα 19 b) και μεγάλα συσσωματώματα (Εικόνα 19 c), τα οποία είναι σχηματισμένα από συγκέντρωση των κυττάρων, όπως αποδεικνύεται και από τη μεγέθυνσή τους (Εικόνα 19 d).



Εικόνα 19: (a) Πανοραμική λήψη επιφάνειας μαρμάρου επωασμένο με *Bacillus pumilus* ACA-DC 4061 σε θρεπτικό διάλυμα BP1x, όπου παρατηρείται μερική επικάλυψη με ανθρακικό ασβέστιο; (b) μεγέθυνση σημείου της (a) όπου φαίνεται η μορφολογία του νέου υλικού που αντιστοιχεί στις διαστάσεις των κυττάρων; (c) διαφορετικό σημείο από το ίδιο δείγμα όπου παρουσιάζεται διαφορετική μορφολογία με συσσωματώματα ανθρακικού ασβεστίου; (d) μεγέθυνση της επιφάνειας των συσσωματωμάτων όπου παρατηρούνται οι μικροοργανισμοί επικαλυμμένοι από ανθρακικό ασβέστιο, αποδεικνύοντας ότι η δημιουργία των μορφών οφείλεται στη συγκέντρωση μεγάλου αριθμού βακτηρίων σε μικρή επιφάνεια.

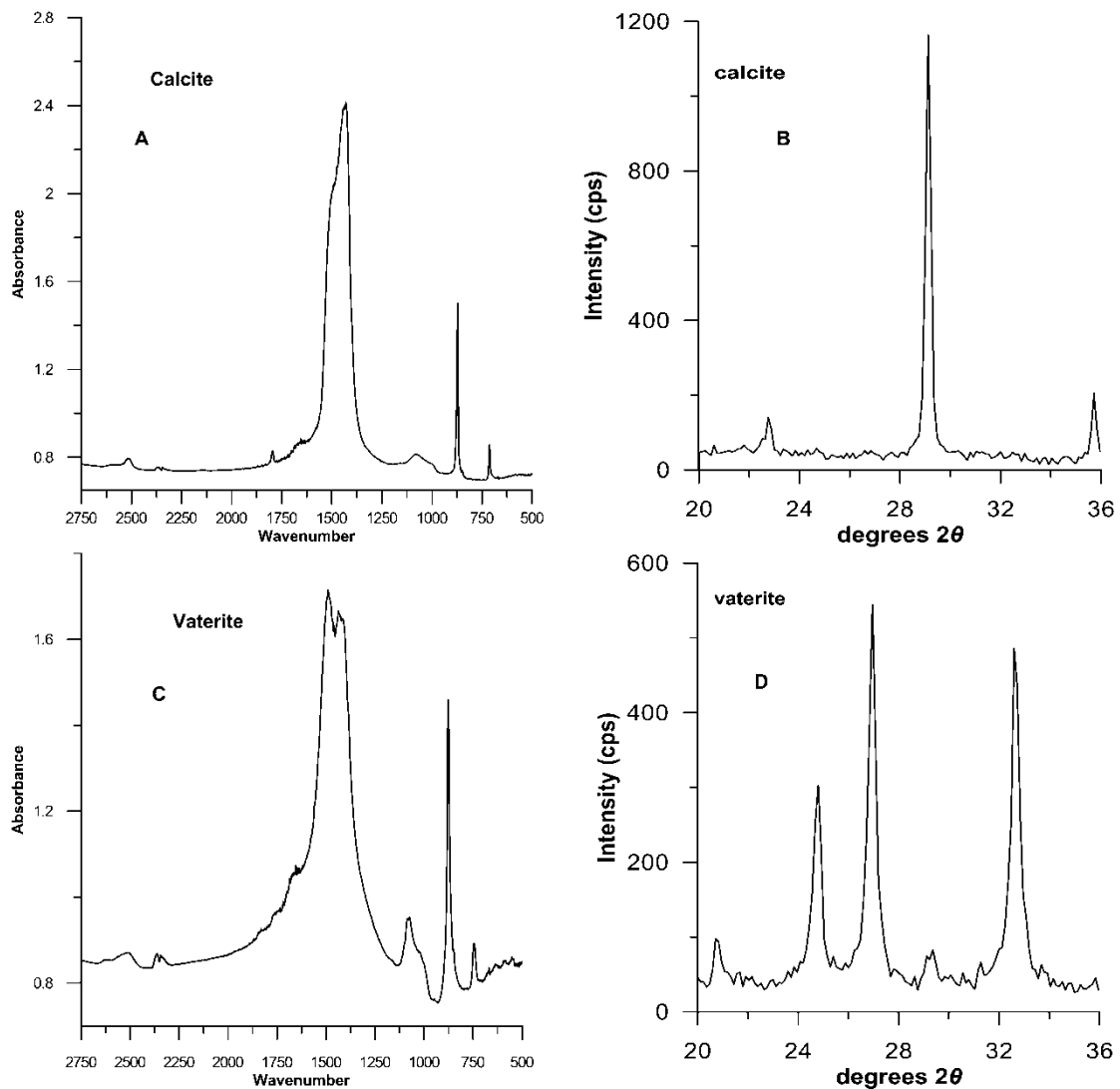
Ουσιαστική απόθεση στα προκαταρκτικά πειράματα παρατηρήθηκε όταν η συγκέντρωση του θρεπτικού διπλασιάστηκε (BP2x), προκαλώντας το σχηματισμό ανθρακικού ασβεστίου το οποίο κάλυψε μερικώς την επιφάνεια του μαρμάρινου δοκιμίου. Ειδικότερα, παρατηρήθηκε έντονη απόθεση σε συγκεκριμένες επιφάνειες, ενώ σε άλλα σημεία, ελάχιστη. Αυτό καταδεικνύει, ότι τα βακτήρια συγκεντρώνονται αρχικά σε ορισμένα σημεία της επιφάνειας και από εκεί, «ξεκινά» η σταδιακή επέκτασή τους. Παρακάτω, παρουσιάζεται η μορφολογία των *B. cereus* ACA-DC 4064 (Εικόνα 20 a-c), *B. licheniformis* ACA-DC 4063 (Εικόνα 20 d-f) και *B. pumilus* ACA-DC 4061 (Εικόνα 20 g-i). Η γενική τάση όλων των βακίλων είναι να σχηματίζουν μορφές οι οποίες παραπέμπουν στις διαστάσεις των κυττάρων (Εικόνα 20 b, e και h). Το κρίσιμο είναι να βρεθεί το σημείο της

επιφάνειας στο οποίο θα μπορέσουν οι μικροοργανισμοί να αρχίσουν να συγκεντρώνονται και παράλληλα, να προκαλούν στον μικρο-περιβάλλον τους τις κατάλληλες μεταβολές, ώστε να σχηματιστεί το ανθρακικό ασβέστιο. Λόγω όμως της συνεχούς ανάδευσης, η νέα επιφάνεια δεν είναι ομοιόμορφη, αλλά σχηματίζονται «φύλλα» ανθρακικού ασβεστίου (Εικόνα 20 a και d) ή πτυχώσεις που ξεχωρίζουν από την συνολική επιφάνεια (Εικόνα 20 g). Μια σημαντική διαπίστωση επίσης είναι, ότι οι παραπάνω μορφές παραπέμπουν στο σχηματισμό βατερίτη, διότι δείγματα τα οποία είχαν αποκλειστικά αυτές τις μορφές, έδειξαν την ύπαρξη μόνο βατερίτη στα φάσματά τους (Σχήμα 2 c και d). Η κυριότερη διαφοροποίηση παρατηρήθηκε στον *B. cereus* ACA-DC 4064 (Εικόνα 20 c), όπου οι δενδριτικές μορφές είναι εντελώς διαφορετικές. Ο συγκεκριμένος σχηματισμός εξηγείται από το γεγονός ότι το δείγμα περιέχει κυρίως ασβεστίτη, ο οποίος ανιχνεύτηκε με FT-IR και XRD (Σχήμα 2 a και b). Οι μορφές αυτές λόγω του ότι είναι πολυεδρικές – πυραμιδικές, παραπέμπουν στην σταθερότερη, αλλόμορφη δομή του ανθρακικού ασβεστίου.



Εικόνα 20: Φωτογραφίες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας *B. cereus* ACA-DC 4064 (a-c); (a) πανοραμική εικόνα του δοκιμίου όπου φαίνεται η μερική επικάλυψη; (b) η μορφολογία της επικάλυψης η οποία οφείλεται στα βακτήρια. Φαίνονται οι αλυσίδες που σχηματίζουν τα κύτταρα που εφάπτονται διαδοχικά το ένα το άλλο; (c) διαφορετική μορφολογία που ανιχνεύτηκε στην επιφάνεια, αποτελούμενη από «δενδριτικές» μορφές, οι οποίες δημιουργούνται από πυραμιδικές μορφολογίες ενωμένες μεταξύ τους. Η μορφή αυτή αντιστοιχίζεται σε ασβεστίτη, σε αντίθεση με τις μορφές που παραπέμπουν σε κύτταρα, η οποία αντιστοιχίζεται σε βατερίτη; *B. licheniformis* ACA-DC 4063 (d-f); και *B. pumilus* ACA-DC 4061 (g-i).

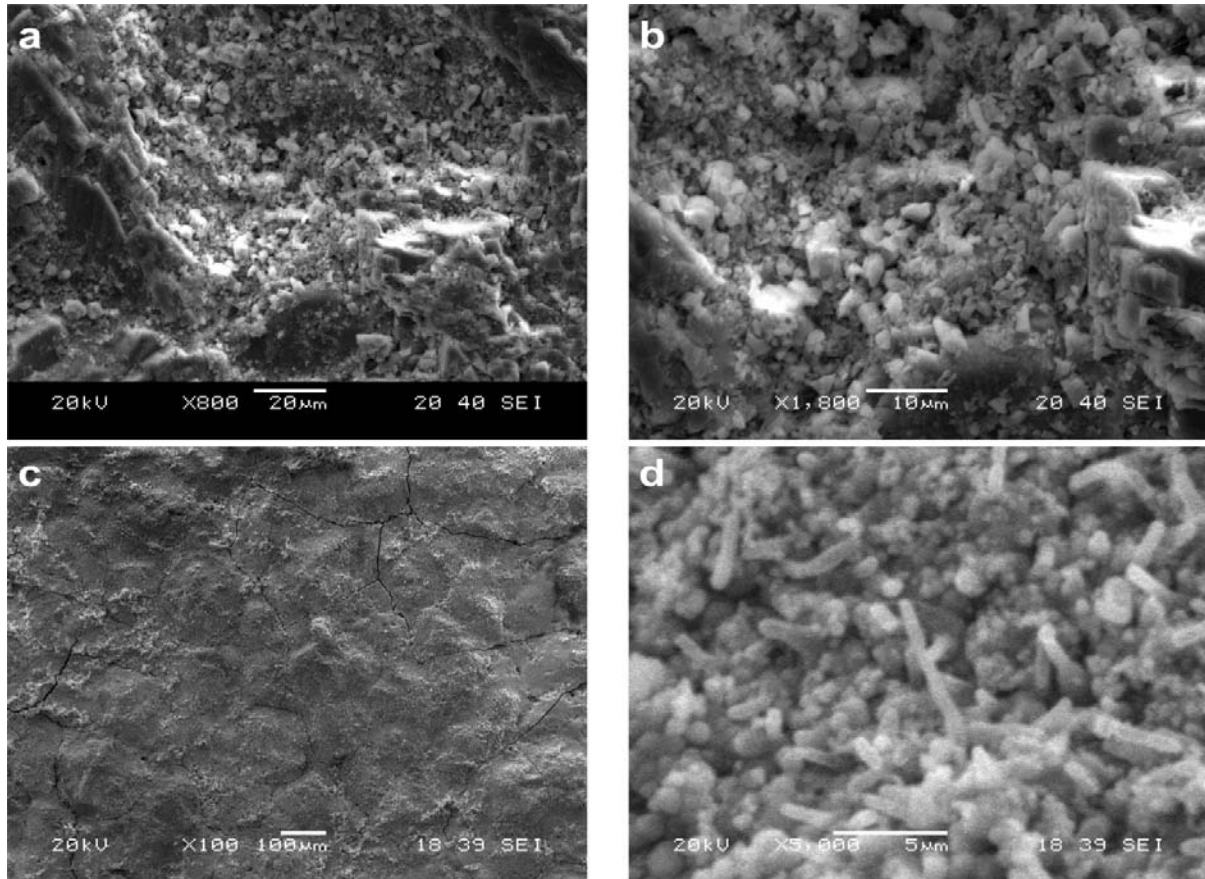
Αποτελέσματα



Σχήμα 2: FT-IR (A) και XRD (B) φάσματα ασβεστίτη; FT-IR (C) και XRD (D) φάσματα βατερίτη. Τα παραπάνω αποτελούν χαρακτηριστικά παραδείγματα φασμάτων στα οποία ανιχνεύτηκαν αποκλειστικά μια από τις δύο μορφές. Μίγματα ασβεστίτη – βατερίτη περιέχουν συνδυασμό τους. Οι κορυφές ασβεστίτη στο φάσμα FTIR είναι στα 713, 875, 1423 (μονή κορυφή), 1794 and 2516 cm⁻¹. Οι κορυφές για τον βατερίτη αναγνωρίστηκαν στα 745, 875, 1084, 1437-1487 (διπλή κορυφή) and 2508 cm⁻¹. Στα φάσματα XRD οι 2θ βαθμοί για τον ασβεστίτη ήταν 23.05 (9%), 29.40 (100%), and 35.96 (15%) και για τον βατερίτη ήταν 24.87 (90%), 27.01 (100%), and 32.80 (90%).

Παρόμοια απόθεση υπήρξε στα προκαταρκτικά πειράματα με τετραπλάσια συγκέντρωση θρεπτικού (BP4x). Η απόθεση που παρατηρήθηκε ήταν αποκλειστικά από βατερίτη για τους *B. licheniformis* ACA-DC 4063 και *B. pumilus* ACA-DC 4061, ενώ ο *B. cereus* ACA-DC 4064 μας έδωσε μίγμα βατερίτη – ασβεστίτη. Οι πολυεδρικές μορφές, παρόμοιες με θραύσματα μαρμάρου, θεωρήθηκαν ότι οφείλονται στο σχηματισμό ασβεστίτη. Ράβδοι και σφαιρικές μορφές διαφορετικής διαμέτρου, παραπέμπουν στον βατερίτη του δείγματος. Οι σφαιρικές μορφές που αναγνωρίστηκαν, εμφανίστηκαν συχνότερα σε σχέση με

δείγματα BP2x συγκέντρωσης. Οι εικόνες που παρουσιάζονται ως παράδειγμα παρακάτω, είναι χαρακτηριστικές (Εικόνα 21). Διαπιστώθηκε ότι οι πολυεδρικές μορφές επιβεβαιώνουν την ύπαρξη ασβεστίτη, ενώ οι σφαιρικές ή οι μορφές που παραπέμπουν στις διαστάσεις των κυττάρων των βακίλων, παραπέμπουν φασματοσκοπικά σε βατερίτη.



Εικόνα 21: Φωτογραφίες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σε πειράματα με θρεπτικό BP4x των *B. cereus* ACA-DC 4064 (**a και b**): (**a**) πανοραμική εικόνα επιφάνειας όπου φαίνεται η ανεπαρκής επικάλυψη το δοκιμίου; (**b**) είναι μεγέθυνση της (**a**) όπου οι πολυεδρικές μορφές παραπέμπουν σε ασβεστίτη, ενώ η ύπαρξη ράβδων που αποδίδονται στον μικροοργανισμό, παραπέμπει σε βατερίτη. *B. pumilus* ACA-DC 4061 (**c και d**): (**c**) πανοραμική άποψη δείγματος όπου αποδεικνύεται η πλήρης επικάλυψη της επιφάνειας μαρμάρου από νέο υλικό; (**d**) μεγέθυνση της (**c**) όπου φαίνεται ο αποκλειστικός σχηματισμός ράβδων και σφαιρικών μορφών, ανάλυση των οποίων έδειξε βατερίτη.

Οι μεταβολές βάρους που παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα, αποτελούν ένδειξη της απόκρισης του κάθε μικροοργανισμού σε διαφορετικές συγκεντρώσεις θρεπτικού. Ο *B. pumilus* ACA-DC 4061 αποδεικνύεται αποδοτικότερος όσο αυξάνεται η συγκέντρωση, ενώ οι υπόλοιποι μειώνουν την απόδοσή τους στη μέγιστη συγκέντρωση BP4x. Επίσης, παρατηρήθηκε έντονος καφέ χρωματισμός των διαλυμάτων των *B. cereus*

Αποτελέσματα

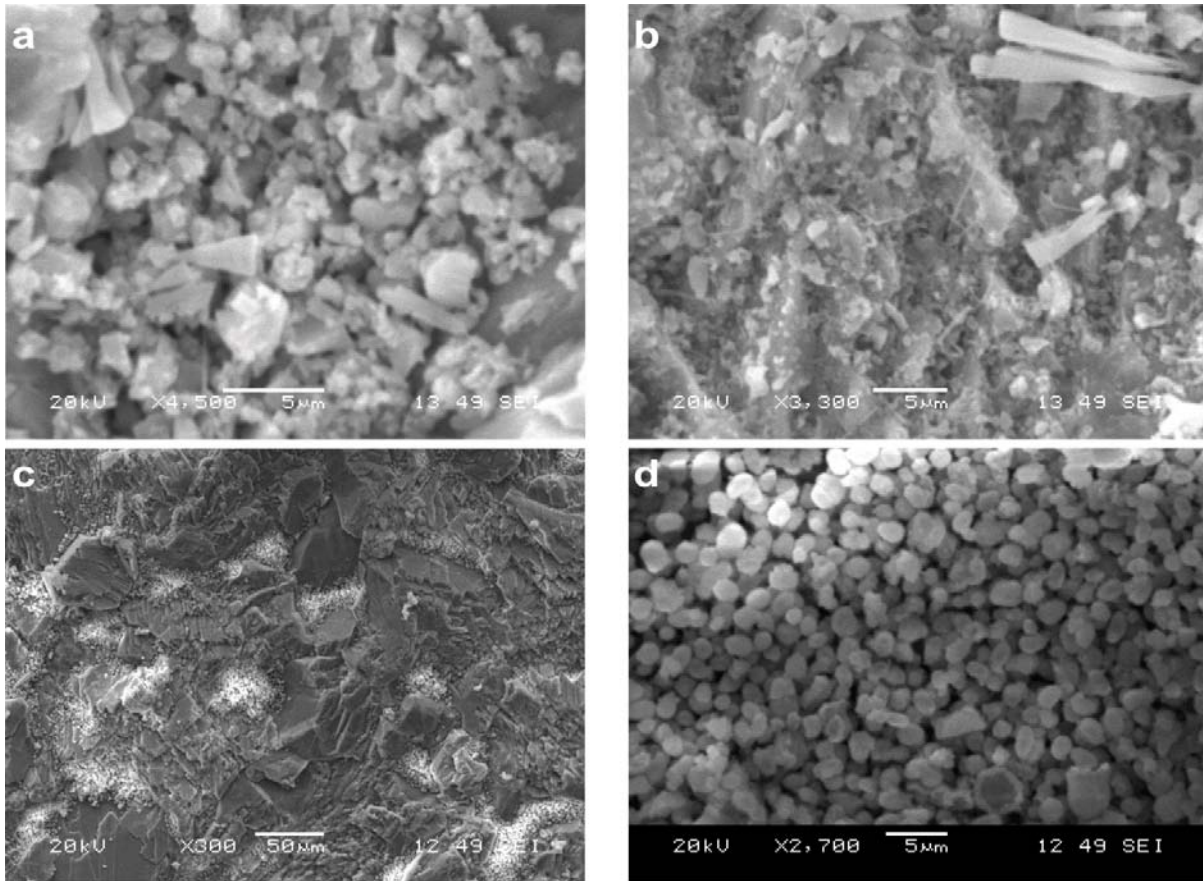
ACA-DC 4064 και *B. licheniformis* ACA-DC 4063 που μεταφέρθηκε και στους κρυστάλλους.

Πίνακας 9: Μεταβολή βάρους δοκιμίων μαρμάρου στα προκαταρκτικά πειράματα βακίλων, σε διαφορετικές συγκεντρώσεις θρεπτικού. Το επικρατέστερο χρώμα των δοκιμίων, αναφέρεται στην τελευταία στήλη. Η παρατήρηση έγινε οπτικά.

Μικροοργανισμός	BP1x	BP2x	BP4x	Χρώμα
<i>Bacillus pumilus</i> ACA-DC 4061	0.0144 g	0.0317 g	0.0702 g	Λευκό
<i>Bacillus cereus</i> ACA-DC 4064	0.0058 g	0.0726 g	0.0038 g	καφέ
<i>Bacillus licheniformis</i> ACA-DC 4063	0.0083 g	0.0348 g	0.0314 g	Λευκό έως καφέ

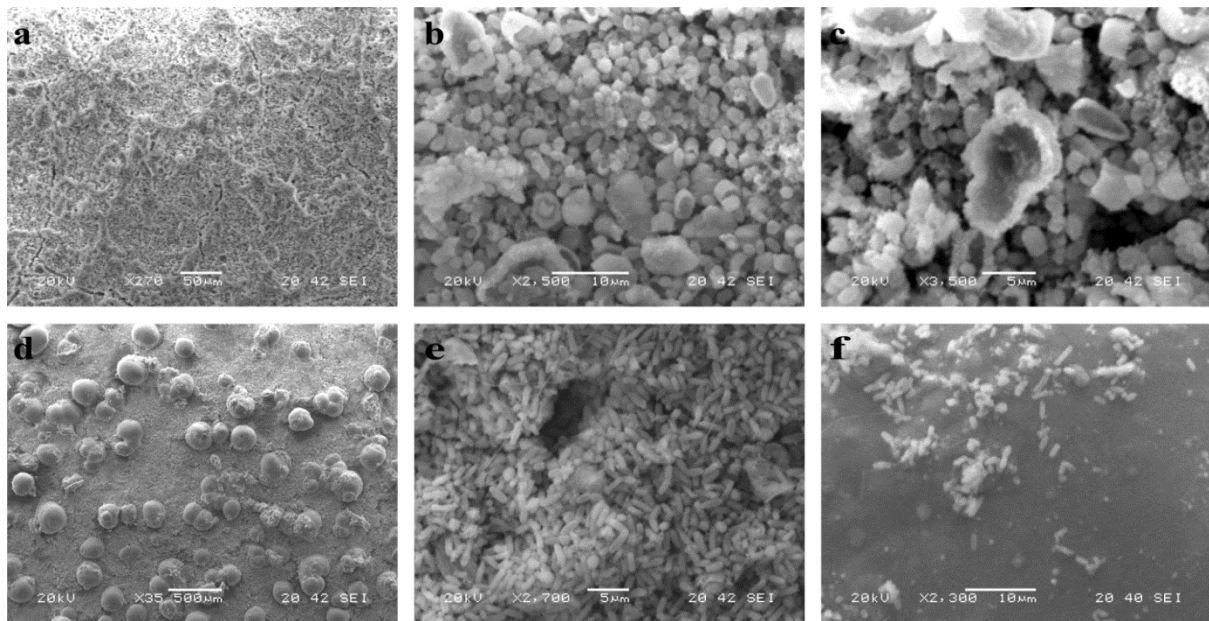
3.6.1.2 *Pantoea* sp.

Όπως αναφέρθηκε και στο κεφάλαιο της απομόνωσης, δύο στελέχη τα οποία αρχικά ονομάστηκαν «ΠΡΩΤΟΣ» (PR) και «Τ3» αποδείχθηκε ότι ανήκουν στο γένος *Pantoea*. Στην αρχική συγκέντρωση θρεπτικού διαλύματος (BP1x), η απόθεση είναι ελάχιστη και σποραδική. Ο *Pantoea* sp. ACA-DC 4066, προκάλεσε το σχηματισμό ασβεστίτη, όπως αποδεικνύεται και από τις Εικόνες 22 a και b. Η μορφολογία παραπέμπει στη συγκεκριμένη δομή, εμφανίζοντας μορφές σε σχήμα ακίδας, λεπτές ράβδους σαν ίνες, αλλά και μικροκρυσταλλικό υλικό. Το τελευταίο θα έπρεπε να παραπέμπει στο βατερίτη, αλλά προφανώς δεν είναι αρκετό ώστε να ανιχνευτεί με FT-IR. Αντίθετα, ο *Pantoea* sp. ACA-DC 4067, προκάλεσε το σχηματισμό βατερίτη με σφαιρικές δομές ή ράβδους, που αντιστοιχούν στα όρια διαστάσεων του μικροοργανισμού (Εικόνα 22 d). Επίσης παρατηρήθηκε και ο σχηματισμός μορφής σε σχήμα καμπάνας, ο οποίος πιθανότατα προέρχεται από τη συσσωμάτωση κυττάρων. Η Εικόνα 22 c δείχνει ότι τα κύτταρα αρχικά συγκεντρώθηκαν σε εσοχές του μαρμάρινου υποστρώματος.



Εικόνα 22: Φωτογραφίες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας *Pantoea* sp. ACA-DC 4066 (**a και b**): (**a**) μορφές ακίδας και μικροκρυσταλλικό υλικό; (**b**) λεπτές ίνες και ακίδες. *Pantoea* sp. ACA-DC 4067 (**c και d**): (**c**) σημεία αρχικής επικάλυψης από τον μικροοργανισμό σε χαμηλή μεγέθυνση; (**d**) μεγέθυνση της (**c**) όπου φαίνεται ο αποκλειστικός σχηματισμός σφαιρικών μορφών και μικρών ράβδων, παραπέμποντας σε βατερίτη.

Η διαδικασία απόθεσης ενισχύεται κατά την αύξηση της συγκέντρωσης του θρεπτικού (BP2x). Παρατηρήθηκε, κατά τη διάρκεια του πειράματος, διαφορετική μορφολογία απόθεσης. Κοινό χαρακτηριστικό είναι ότι και στις δύο περιπτώσεις σχηματίστηκε βατερίτης με τη μορφή μικρών ράβδων. Στον ίδιο χρόνο επώασης όμως, ο *Pantoea* sp. ACA-DC 4067 δεν παρουσίασε τις μεγάλες σφαιρικές μορφές σε αντίθεση με τον *Pantoea* sp. ACA-DC 4066. Αντίθετα, οι καμπανοειδείς ή ημισφαιρικές μορφές του *Pantoea* sp. ACA-DC 4067, δεν παρατηρήθηκαν στον *Pantoea* sp. ACA-DC 4066, εμφανίζοντας μια εναλλακτική τάση συσσωμάτωσης των κυττάρων κατά τη διάρκεια της βιο-απόθεσης. Η διαφορετικότητα αυτή, δείχνει την ποικιλομορφία η οποία μπορεί να παρατηρηθεί κατά τη διάρκεια των πειραμάτων και μένει να αποδειχθεί εάν αυτό διατηρείται και σε διαφορετικές συνθήκες ή αποτελεί τυχαίο γεγονός.



Εικόνα 23: Φωτογραφίες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας **(a-c)** *Pantoea* sp. ACA-DC 4067 και **(d-f)** *Pantoea* sp. ACA-DC 4066 σε θρεπτικό διάλυμα BP2x: **(a)** πανοραμική λήψη μαρμάρινης επιφάνειας, όπου παρουσιάζεται η επικάλυψη που προκλήθηκε από τον *Pantoea* sp. ACA-DC 4067; **(b)** μεγέθυνση της **(a)** όπου φαίνονται οι σχηματιζόμενες μορφολογίες και αντιστοιχούν στις διαστάσεις των κυττάρων του μικροοργανισμού, καθώς και ημισφαιρικές μορφές μεγαλύτερης διαμέτρου, οι οποίες προφανώς οφείλονται στη συσσωμάτωση των βακτηρίων με ταυτόχρονο σχηματισμό βατερίτης; **(c)** μεγέθυνση της **(b)** όπου φαίνεται με μεγαλύτερη ευκρίνεια ημισφαιρική μορφολογία. Επιπλέον, παρατηρείται και η ύπαρξη μικροκρυσταλλικού υλικού σε επαφή με τους μικροοργανισμούς; **(d)** Πανοραμική εικόνα του *Pantoea* sp. ACA-DC 4066 όπου φαίνονται οι μεγάλοι σφαιρικοί σχηματισμοί; **(e)** μεγέθυνση της επιφάνειας εκτός των σφαιρών, η οποία αποτελείται κυρίως από κυτταρικές μορφολογίες ανθρακικού ασβεστίου; **(f)** μεγέθυνση σφαιρικής επιφάνειας η οποία αποδεικνύει το σχηματισμό τους από συσσωμάτωση βακτηρίων.

Κατά τις δοκιμές σε συγκέντρωση θρεπτικού διαλύματος BP4x, η απόδοση της απόθεσης δεν ήταν ανάλογη της μεγαλύτερης συγκέντρωσης. Αντίθετα, η ποσότητα που μετρήθηκε στα δοκίμια ήταν παραπλήσια ή μικρότερη αυτής πειραμάτων, με συγκέντρωση BP1x (Πίνακας 10). Όπου ανιχνεύτηκαν, υπό το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, παρουσίασαν παρόμοιες δομές μορφολογίας, αντίστοιχες των διαστάσεων των κυττάρων. Επίσης, το χρώμα του διαλύματος στο τέλος της πειραματικής διαδικασίας παρουσιάζεται στον ίδιο πίνακα. Οι χρωματισμοί «καφέ» και «κίτρινο» ήταν ορατοί και στο νέο υλικό πάνω στα δοκίμια.

Πίνακας 10: Μεταβολή βάρους δοκιμίων μαρμάρου επωασμένων με *Pantoea* sp. ACA-DC 4066 και *Pantoea* sp. ACA-DC 4067 σε διαφορετικές συγκεντρώσεις θρεπτικού και το χρωματικό αποτέλεσμα που παρατηρήθηκε οπτικά.

Μικροοργανισμός	BP1x	BP2x	BP4x
<i>Pantoea</i> sp. ACA-DC 4066	0.0040 g Καφέ	0.0548 g Καφέ	0.0034 g Λευκό-κίτρινο
<i>Pantoea</i> sp. ACA-DC 4067	0.0123 g Κίτρινο	0.0456 g Λευκό-κίτρινο	0.0042 g Κίτρινο

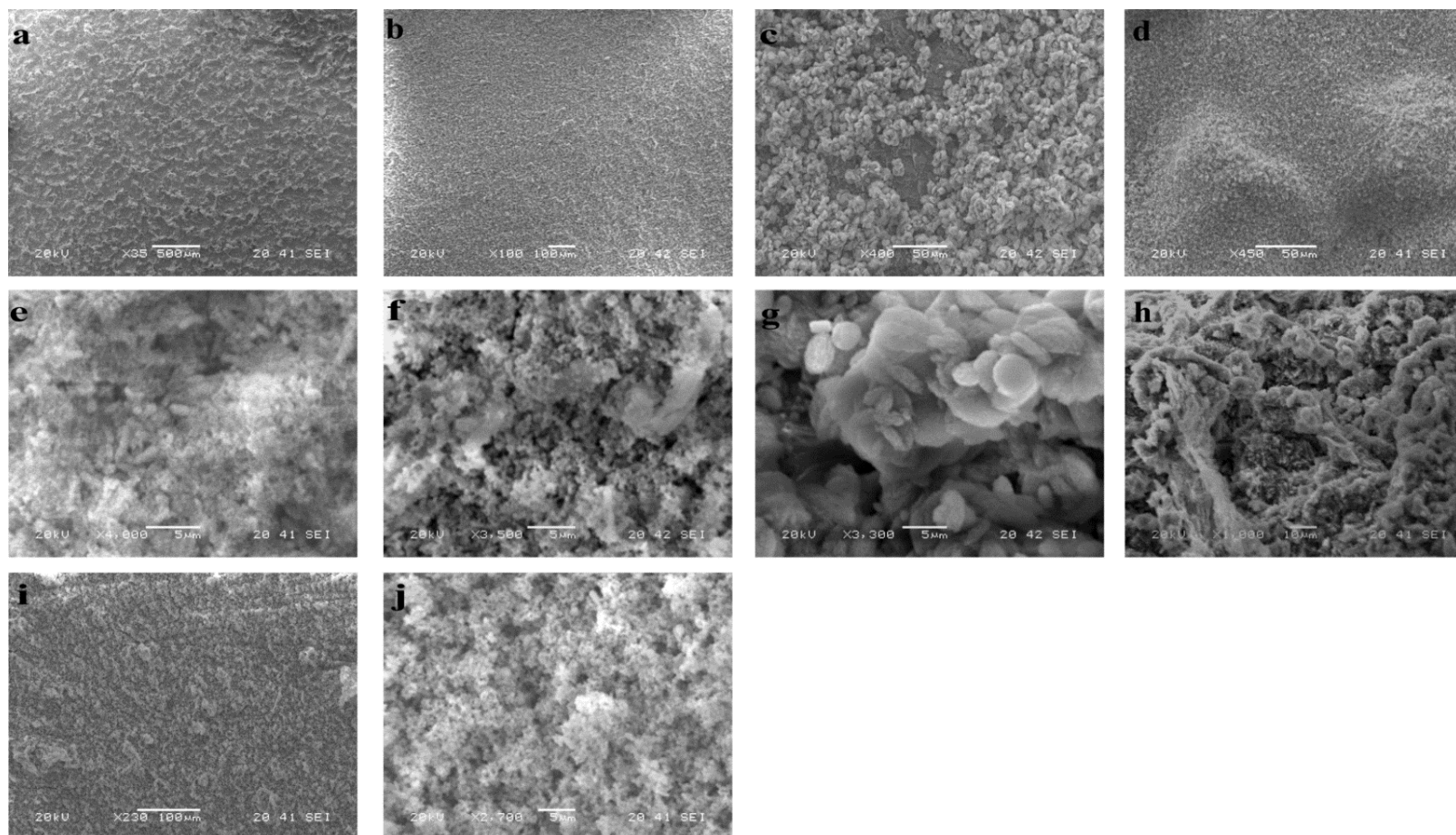
3.6.1.3 *Pseudomonas* sp.

Μολονότι τα απομονωμένα βακτήρια ανήκουν στο ίδιο στέλεχος, παρουσιάστηκαν ορισμένες διαφορές κατά τη διάρκεια των προκαταρκτικών πειραμάτων. Σε θρεπτικό διάλυμα BP1x, κανένας δεν εμφάνισε ουσιαστική και ανιχνεύσιμη απόθεση. Οι εικόνες από το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο έδειξαν μόνο θραύσματα μαρμάρου. Στη συγκέντρωση BP2x, παρατηρήθηκαν διαφορετικές μορφολογίες, που στην πλειοψηφία τους παραπέμπουν στο σχηματισμό βατερίτη. Για τα στελέχη *Pseudomonas chlororaphis* ACA-DC 4071 (Εικόνα 24 a και e) και ACA-DC 4072 (Εικόνα 24 b και f), η μορφολογία είναι παρόμοια, αλλά με τον δεύτερο να σχηματίζει σφαίρες μεγαλύτερης διαμέτρου. Στον *Pseudomonas chlororaphis* ACA-DC 4069 (Εικόνα 24 c και g), η κύρια μορφή ήταν δίσκοι ανθρακικού ασβεστίου, ενώ στον *Pseudomonas chlororaphis* ACA-DC 4070 (Εικόνα 24 d και h), πέρα από τις σφαιρικές μορφές και το μικροκρυσταλλικό υλικό, παρατηρήθηκαν και πολυεδρικές, οι οποίες παραπέμπουν σε ασβεστίτη. Ο *Pseudomonas chlororaphis* ACA-DC 4068 (Εικόνα 24 i και j), εμφάνισε απόθεση κυρίως μικροκρυσταλλικού υλικού. Η μεταβολή βάρους έδειξε αυξητική τάση έως το BP2x, με άμεση μείωση απόθεσης στη μεγαλύτερη συγκέντρωση θρεπτικού, εκτός των *Ps. chlororaphis* ACA-DC 4068 και *Ps. chlororaphis* 4070, που ήταν αποδοτικότεροι σε BP4x. Το χρώμα του διαλύματος είχε πράσινη χροιά, η οποία τελικά μεταφέρθηκε και στους κρυστάλλους ανθρακικού ασβεστίου, παρουσιάζοντας απόθεση σε χρώμα πράσινο – λαδί.

Αποτελέσματα

Πίνακας 11: Μεταβολές βάρους των στελεχών *Pseudomonas chlororaphis* σε διαφορετικές συγκεντρώσεις θρεπτικού και το χρωματικό αποτέλεσμα στη μέγιστη συγκέντρωση.

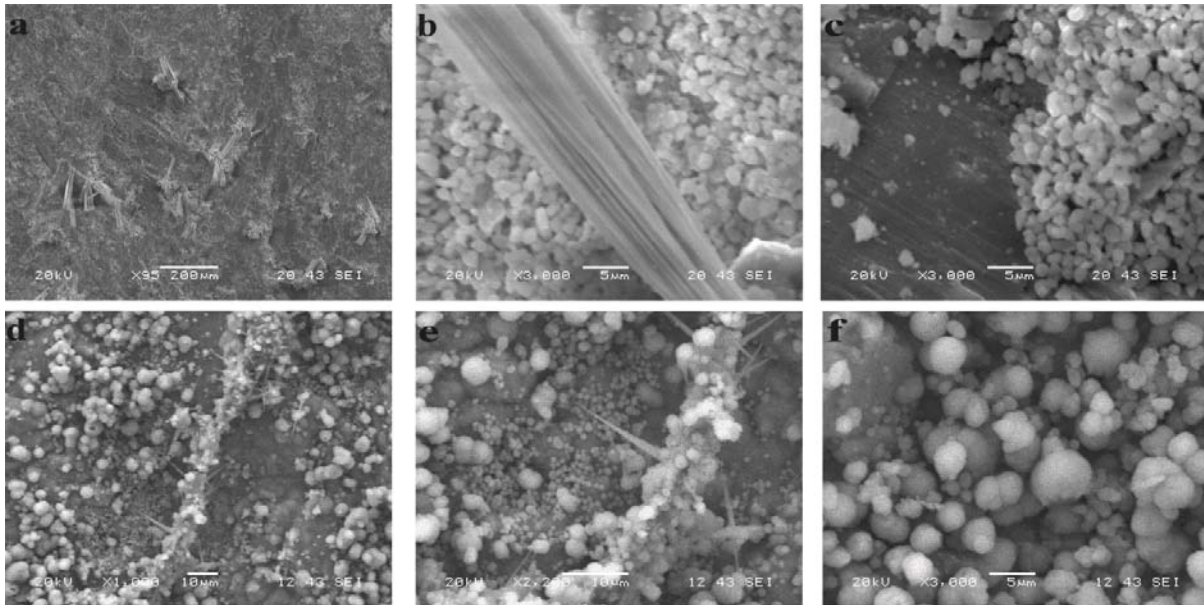
Μικροοργανισμός	BP1x	BP2x	BP4x	Χρώμα BP4x
<i>Ps. chlororaphis</i> ACA-DC 4071	0.0048 g	0.0269 g	0.00205 g	Πράσινο- λαδί
<i>Ps. chlororaphis</i> ACA-DC 4072	0.0036 g	0.0244 g	0.0186 g	Πράσινο- λαδί
<i>Ps. chlororaphis</i> ACA-DC 4068	0.0035 g	0.0152 g	0.0450 g	Πράσινο- λαδί
<i>Ps. chlororaphis</i> ACA-DC 4069	0.0053 g	0.0059 g	0.0042 g	Πράσινο- λαδί
<i>Ps. chlororaphis</i> ACA-DC 4070	0.0060 g	0.0154 g	0.0320 g	Πράσινο- λαδί



Εικόνα 24: (a, e) *Ps. chlororaphis* ACA-DC 4071: (a) πανοραμική εικόνα και (e) μεγέθυνσή της, όπου φαίνεται μικροκρυσταλλικό υλικό και βακτήρια καλυμμένα με ανθρακικό ασβέστιο; (b, f) *Ps. chlororaphis* ACA-DC 4072: (b) πανοραμική εικόνα και (f) μεγέθυνσή της όπου φαίνεται μικροκρυσταλλικό υλικό μεγαλύτερης διαμέτρου από την (e) διότι σε περίπου ίδια μεγέθυνση οι σφαίρες είναι περισσότερο διακριτές; (c, g) *Ps. chlororaphis* ACA-DC 4069: (c) πανοραμική εικόνα και (g) μεγέθυνσή της, όπου παρουσιάζεται διαφορετική μορφολογία σφαιρικών μορφών σαν δισκία, τα οποία πιθανότατα αποτελούνται από συσσωματώματα βακτηρίων τα οποία επικαλύφθηκαν από ανθρακικό ασβέστιο; (d, h) *Ps. chlororaphis* ACA-DC 4070: (d) γενική εικόνα επικάλυψης, με διαφορετικές μορφολογίες, παρόμοιες με τα προηγούμενα στελέχη όσον αφορά σφαίρες, μικροκρυσταλλικό υλικό και βακτήρια σε άμεση επαφή με το μικροκρυσταλλικό υλικό και (h) μορφές πολυεδρικές, οι οποίες παραπέμπουν σε ασβεστίτη; (i, j) *Ps. chlororaphis* ACA-DC 4068: (i) γενική εικόνα μαρμάρινου δοκιμίου, επικαλυμμένο από ανθρακικό ασβέστιο το οποίο εμφανίζεται (j) ως επί το πλείστον μικροκρυσταλλικό.

3.6.1.4 *Cupriavidus* και *Ralstonia* sp.

Οι τελευταίοι δύο μικροοργανισμοί αφορούν στελέχη τα οποία φυλογενετικά βρίσκονται κοντά μεταξύ τους. Στα προκαταρκτικά πειράματα απόθεσης ανθρακικού ασβεστίου, παρουσίασαν σχεδόν παρόμοιες μορφολογίες με ελάχιστες διαφορές. Στη χαμηλότερη συγκέντρωση θρεπτικού, ανιχνεύτηκαν σποραδικές αποθέσεις νέου υλικού. Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 25, οι σφαιρικές μορφές επικρατούν σε συνδυασμό με ακίδες. Η διαφορά των τελευταίων βρίσκεται στο μέγεθος. Ο *Cupriavidus metallidurans* ACA-DC 4073 προκάλεσε το σχηματισμό μεγάλων ακίδων οι οποίες αντιστοιχούν στον ασβεστίτη (Εικόνα 25 a και b). Οι σφαίρες ξεκινούν από διαστάσεις μικρότερες ή ίσες με 1μm (μικροκρυσταλλικό υλικό) και καταλήγουν στις διαστάσεις που αντιστοιχούν στη διάμετρο των κυττάρων (Εικόνα 25 c). Οι ακίδες αρχικά φαίνεται σαν να έχουν σχηματιστεί νωρίτερα και στη συνέχεια εναποτεθεί στην μαρμάρινη επιφάνεια. Όμως προσεκτικότερη παρατήρηση δείχνει ότι εμφανίζονται αποκλειστικά στα σημεία όπου ο μικροοργανισμός έχει ξεκινήσει την απόθεσή του, μαζί με σφαιρικές μορφολογίες. Επομένως, η διαδικασία απόθεσης ακολουθεί δύο διαφορετικές πορείες οι οποίες πιθανώς να εξελίσσονται παράλληλα, χωρίς όμως να μπορούν βάσει των αποτελεσμάτων αυτών να εξηγηθούν αναλυτικότερα. Στον *Ralstonia* sp. ACA-DC 4074, οι ακίδες είναι σαφώς μικρότερες και εξέχουν από συσσωματώματα σφαιρικών μορφών (Εικόνα 25 d και e). Αυτό ενισχύει περισσότερο την παραπάνω άποψη, ότι ο σχηματισμός τους πραγματοποιήθηκε πάνω στην επιφάνεια των δοκιμίων, υπό την άμεση επίδραση του μικροοργανισμού. Σημειώνεται ότι, στη περίπτωση του *Ralstonia* sp. ACA-DC 4074, η αναγνώριση των ακίδων έγινε σε περιορισμένα σημεία της επιφάνειας. Η επικρατούσα μορφολογία ήταν αυτή των σφαιρών (Εικόνα 25 f) και για το λόγο αυτό, τα δείγματα σε FT-IR, δεν έδωσαν ξεκάθαρα τη ύπαρξη ασβεστίτη.



Εικόνα 25: (a-c) *C. metallidurans* ACA-DC 4073: (a) πανοραμική εικόνα δοκιμίου μαρμάρου μετά από την επώαση με τον μικροοργανισμό; (b) ακίδες; (c) σφαιρικές μορφές διαφορετικής διαμέτρου και η διαφορά του νέου υλικού σε σχέση με το υπόστρωμα. (d-f) *Ralstonia* sp. ACA-DC 4074: (d) πανοραμική εικόνα δοκιμίου μαρμάρου; (e) μεγέθυνση στην οποία φαίνονται οι ακίδες να προεξέχουν από συσσωμάτωμα σφαιρικών μορφών και (f) μεγέθυνση των σφαιρικών μορφών όπου φαίνονται ξεκάθαρα τα διαφορετικά μεγέθη.

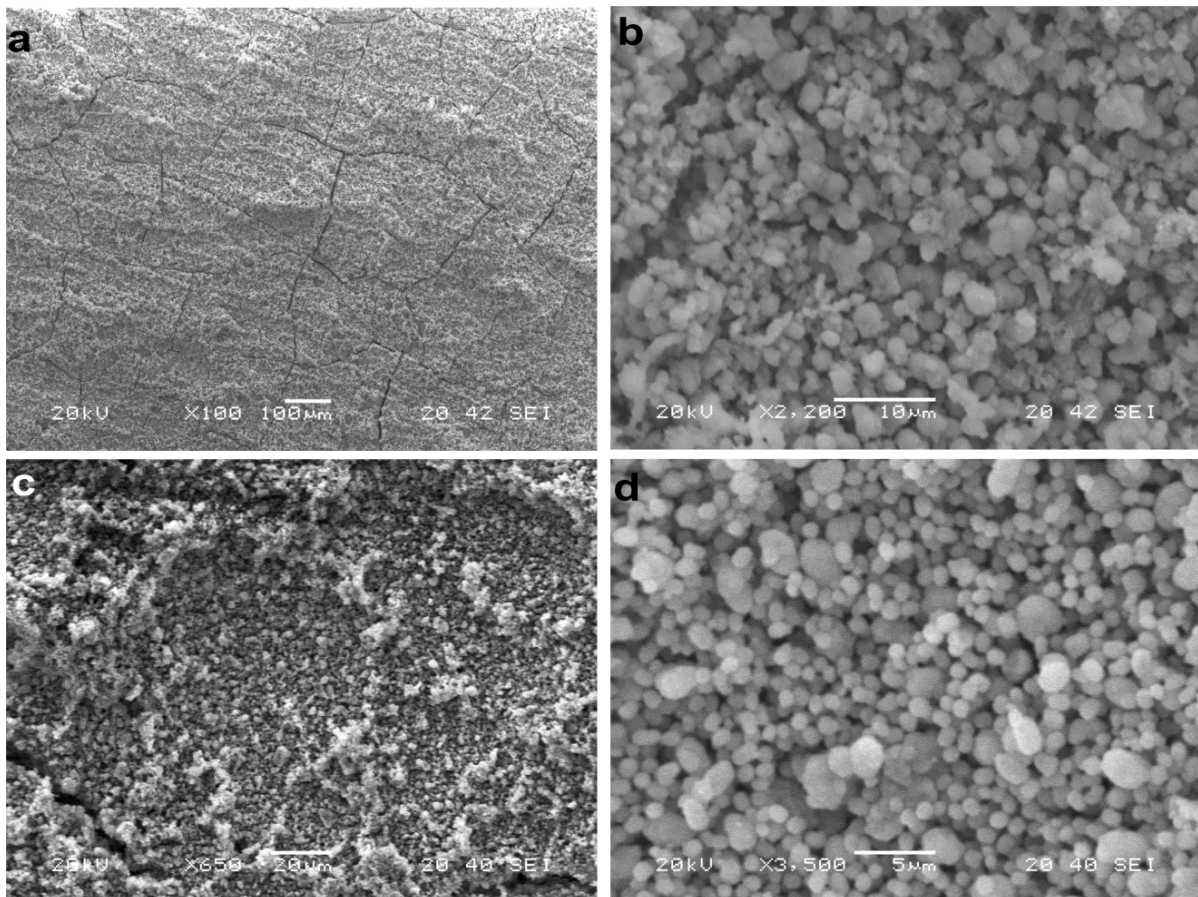
Η αύξηση της συγκέντρωσης θρεπτικού είχε άμεσο αντίκτυπο στην απόθεση. Σε συγκέντρωση BP2x, το νέο υλικό κάλυψε σχεδόν πλήρως το δοκίμιο μαρμάρου με βατερίτη για τον *Ralstonia* sp. ACA-DC 4074 και βατερίτη, με ανιχνεύσιμες ποσότητες ασβεστίτη, για τον *C. metallidurans* ACA-DC 4073. Η μορφολογία και στις δύο περιπτώσεις ήταν σφαιρικές μορφές διαφορετικής διαμέτρου: από μικροκρυσταλλικό υλικό έως σφαίρες διαστάσεων ίσων με κυττάρων ή και λίγο μεγαλύτερες λόγω της συνεχόμενης συσσωμάτωσης επιπλέον ανθρακικού ασβεστίου, στο ήδη σχηματισμένο υλικό (Εικόνα 26). Στην μέγιστη συγκέντρωση (BP4x), ο *C. metallidurans* ACA-DC 4073 μείωσε την απόδοσή του ενώ ο *Ralstonia* sp. ACA-DC 4074, ήταν το μοναδικό στέλεχος (μαζί με τους *Ps. chlororaphis* ACA-DC 4070 και ACA-DC 4068 σε μικρότερο βαθμό) που τη βελτίωσε (Πίνακας 12). Η μορφολογία παρέμεινε η ίδια και η ανάλυση FT-IR, έδειξε βατερίτη.

Τέλος, το χρώμα των διαλυμάτων μετά το τέλος των πειραμάτων στη συγκέντρωση BP2x, παρέμεινε λευκό ή λευκό με κίτρινη χροιά, με αποτέλεσμα να μην παρατηρηθεί οπτικά κάποια σημαντική αλλαγή στο χρώμα πάνω στα μάρμαρα. Για τον *Ralstonia* sp. ACA-DC 4074, στη συγκέντρωση BP4x, το χρώμα των κρυστάλλων είχε ελάχιστη κίτρινη χροιά.

Αποτελέσματα

Πίνακας 12: Μεταβολές βάρους των στελεχών *C. metallidurans* ACA-DC 4073 και *Ralstonia* sp. AACA-DC 4074 σε διαφορετικές συγκεντρώσεις θρεπτικού και το χρωματικό αποτέλεσμα.

Μικροοργανισμός	BP1x	BP2x	BP4x	Χρώμα
<i>C. metallidurans</i> ACA-DC 4073	0.0072 g	0.0579 g	0.0048 g	Λευκό
<i>Ralstonia</i> sp. ACA- DC 4074	0.0207 g	0.0794 g	0.0863 g	Λευκό- κίτρινο



Εικόνα 26: (a – b) *C. metallidurans* ACA-DC 4073; (a) πλήρης επικάλυψη με βατερίτη και (b) μεγέθυνση της (a) παρουσιάζοντας τη γενική μορφολογία σφαιρικών μορφών που παρατηρήθηκε. (c – d) *Ralstonia* sp. ACA-DC 4074; (c) γενική εικόνα της επικάλυψης του *Ralstonia* sp. ACA-DC 4074 και (d) μεγέθυνση της (c) όπου παρατηρούνται οι ίδιες μορφές με αυτές του *C. metallidurans* ACA-DC 4073.

3.6.2 2^ο Σκέλος Προκαταρκτικών Πειραμάτων

Στο δεύτερο στάδιο των προκαταρκτικών πειραμάτων, πραγματοποιήθηκε δοκιμή των μικροοργανισμών ξανά σε θρεπτικό διάλυμα BP2x, ώστε να εξακριβωθεί εάν τα προηγούμενα αποτελέσματα ήταν επαναλήψιμα. Η συγκέντρωση θρεπτικού επιλέχθηκε, διότι στη συγκεκριμένη τιμή όλοι οι μικροοργανισμοί παρουσίασαν θετικά αποτελέσματα, πλην ορισμένων που είχαν την ικανότητα να συνεχίσουν την απόθεση και σε μεγαλύτερη συγκέντρωση. Όμως η διαφοροποίηση αυτή στη συγκέντρωση BP4x, υποδεικνύει την εμφάνιση αστάθειας κατά τη διάρκεια των πειραμάτων, η οποία έπρεπε να αποφευχθεί. Ο κυριότερος στόχος ήταν να παρακολουθηθεί η διαδικασία απόθεσης λαμβάνοντας δείγματα κάθε 5 ημέρες, για διάστημα 15 ημερών. Με αυτό τον τρόπο εξακριβώθηκε ποια από τα στελέχη έχουν τη δυνατότητα να διατηρήσουν ικανοποιητική απόδοση απόθεσης ανθρακικού ασβεστίου και ταυτόχρονα, τη βιωσιμότητά τους. Επίσης, το χρώμα του διαλύματος, και πως αυτό μεταβάλλεται και μεταφέρεται στο νέο υλικό, θεωρήθηκε σημαντική ποιοτική παράμετρος. Τέλος, διερευνήθηκε η ανάπτυξη των στελεχών, κυρίως τις πρώτες ημέρες ώστε να εξακριβωθεί εάν η ποιοτική παράμετρος της απορρόφησης στα 620 nm θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως γρήγορη και ασφαλής ένδειξη θετικών αποτελεσμάτων βιο-απόθεσης.

Πίνακας 13: 2^{ος} γύρος προκαταρκτικών πειραμάτων σε μαρμάρινο υπόστρωμα για την παρακολούθηση της απόθεσης σε θρεπτικό συγκέντρωσης BP2x διάρκειας 15 ημερών.

Μικροοργανισμός	5 ημέρες	10 ημέρες	15 ημέρες	Χρώμα ¹	Βιωσιμότητα ²
<i>Cupriavidus metallidurans</i> ACA-DC 4073	0.0266 g	0.0399 g	0.0344 g	Λευκό - μπεζ	Ζωντανός τη 15 ^η μέρα
<i>Ralstonia</i> sp. ACA-DC 4074	0.0184 g	0.0451 g	0.0343 g	Κίτρινο	Ζωντανός τη 15 ^η μέρα
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> ACA-DC 4071	0.0021 g	0.0065 g	0.0056 g	Πράσινο	Ζωντανός τη 15 ^η μέρα
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> ACA-DC 4072	0.0153 g	0.0224 g	0.0312 g	Λευκό	Ζωντανός τη 15 ^η μέρα
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> ACA-DC 4069	0 g	0 g	0.0021 g	-	Ζωντανός τη 15 ^η μέρα
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> ACA-DC 4068	0.0029 g	0.0423 g	0.0450 g	Γκρι - πράσινο	Ζωντανός τη 15 ^η μέρα
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> ACA-DC 4070	0.0022 g	0.0108 g	0.0235 g	Πράσινο	Ζωντανός τη 15 ^η μέρα
<i>Pantoea</i> sp. ACA-DC 4066	0.0546 g	0.0582 g	0.0615 g	Μπεζ - κίτρινο	Νεκρός τη 15 ^η μέρα
<i>Pantoea</i> sp. ACA-DC 4067	0.0596 g	0.0336 g	0.0567 g	Κίτρινο	Νεκρός τη 15 ^η μέρα
<i>Bacillus pumilus</i> ACA-DC 4061	0.002 g	0.0064 g	0.0452 g	Λευκό - μπεζ	Ζωντανός τη 15 ^η μέρα
<i>Bacillus cereus</i> ACA-DC 4064	0 g	0.1348 g	0.0232 g	Καφέ	Ζωντανός τη 15 ^η μέρα
<i>Bacillus licheniformis</i> ACA- DC 4063	0.0093 g	0.0237 g	0.0305 g	Καφέ	Νεκρός τη 15 ^η μέρα

¹Το χρώμα αντιστοιχεί σε αυτό που παρατηρήθηκε οπτικά στους νέους κρυστάλλους ανθρακικού ασβεστίου πάνω στα μαρμάρινα δοκίμια.

²Βιωσιμότητα πραγματοποιήθηκε με τη λήψη ποσότητας με θηλιά εμβολιασμού (inoculation loop) και άπλωμα σε τρυβλίο αντίστοιχου θρεπτικού.

Το χρώμα του διαλύματος είχε σημαντική επίδραση στο τελικό αποτέλεσμα. Διαλύματα τα οποία δεν ήταν λευκού χρώματος, έδειξαν ότι το χρώμα μεταφέρεται στο κρυσταλλικό υλικό. Χαρακτηριστικό παράδειγμα ήταν οι *B. cereus* ACA-DC 4064 και *B. licheniformis* ACA-DC 4063, των οποίων η απόθεση είχε καφέ χρώμα. Αντίθετα, ο *B. pumilus* ACA-DC 4061, παρόλο που παρουσίασε προς το τέλος των δοκιμών τη μέγιστη απόθεσή του, το διάλυμα παρέμεινε λευκό και η βιωσιμότητά του ικανοποιητική. Και τα δύο στελέχη *Pantoea* sp. ξεχώρισαν ως προς την απόθεσή τους. Ο *Pantoea* sp. ACA-DC 4066, έδωσε ασθενέστερη κίτρινη χροιά, όμως η βιωσιμότητά και των δύο ήταν προβληματική. Από τα στελέχη *Pseudomonas chlororaphis* ξεχώρισε ο *Ps. chlororaphis* ACA-DC 4068 με σημαντική απόθεση, αλλά το χρώμα των κρυστάλλων δεν ήταν ικανοποιητικό. Ο *Ps.*

chlororaphis ACA-DC 4072 εμφάνισε μεν μικρότερη απόθεση, αλλά ανθρακικό ασβέστιο λευκού χρώματος και βιώσιμος μέχρι το τέλος του πειράματος. Τέλος, από *C. metallidurans* ACA-DC 4073 και *Ralstonia* sp. ACA-DC 4074, η απόθεση και των δύο ήταν ικανοποιητική όπως και η βιωσιμότητά τους. Ο πρώτος όμως παρείχε λευκό πορτοκάλι απόθεση οπτικά στην επιφάνεια των μαρμάρινων δοκιμίων.

Για τις τελικές δοκιμές, προκρίθηκαν οι *Ps. chlororaphis* ACA-DC 4072, *C. metallidurans* ACA-DC 4073, *B. pumilus* ACA-DC 4061. Αναλυτικότερη παρουσίαση για τις συγκεκριμένες επιλογές υπάρχει στη συζήτηση αποτελεσμάτων.

3.7 Πείραμα Βελτιστοποίησης Απόθεσης Ανθρακικού Ασβεστίου *Cupriavidus metallidurans* ACA-DC 4073

3.7.1 Εξαγωγή Βέλτιστου Σημείου

Ο στόχος ο οποίος τέθηκε ήταν να προσδιοριστούν οι τιμές θερμοκρασίας, συγκέντρωσης θρεπτικού διαλύματος και όγκου εμβολιασμού για τη μέγιστη δυνατή αύξηση βάρους. Ως κεντρικό σημείο «μηδέν», επελέγησαν οι τιμές εκείνες οι οποίες έδειξαν από τα προκαταρκτικά πειράματα, ότι προσφέρουν μετρήσιμα αποτελέσματα τα οποία θα βοηθούσαν στην πιθανή εξαγωγή συμπερασμάτων. Δεν διερευνήθηκαν οι τετραπλάσιες συγκεντρώσεις θρεπτικού σε σχέση με την αρχική, διότι δεν έδωσαν για τους επιλεγμένους μικροοργανισμούς ικανοποιητικά αποτελέσματα. Επίσης θερμοκρασία κοντά στους 40°C, έδειξε να μειώνει τη βιωσιμότητα του μικροοργανισμού. Συνυπολογίζοντας ότι η «απόσταση» των παραμέτρων πρέπει να είναι η ίδια από το σημείο μηδέν, προέκυψαν οι συγκεντρώσεις και θερμοκρασίες οι οποίες φαίνονται στον Πίνακα 14.

Πίνακας 14: Πραγματικές τιμές των παραγόντων σχεδίασης και η αντιστοίχισή τους στις μεταβλητές του συστήματος.

Παράγοντες σχεδιασμού	-1	0	1	Βέλτιστες (τιμές κωδικών)	Βέλτιστες (φυσικές τιμές)
X_1 : Θερμοκρασία (°C)	25	30	35	1.0	35
X_2 : Συγκέντρωση θρεπτικού (gr/100 mL)	0.36	0.72	1.08	0.86	0.92
X_3 : Όγκος εμβολιασμού (mL)	0.5	1.0	1.5	0.00	1.0

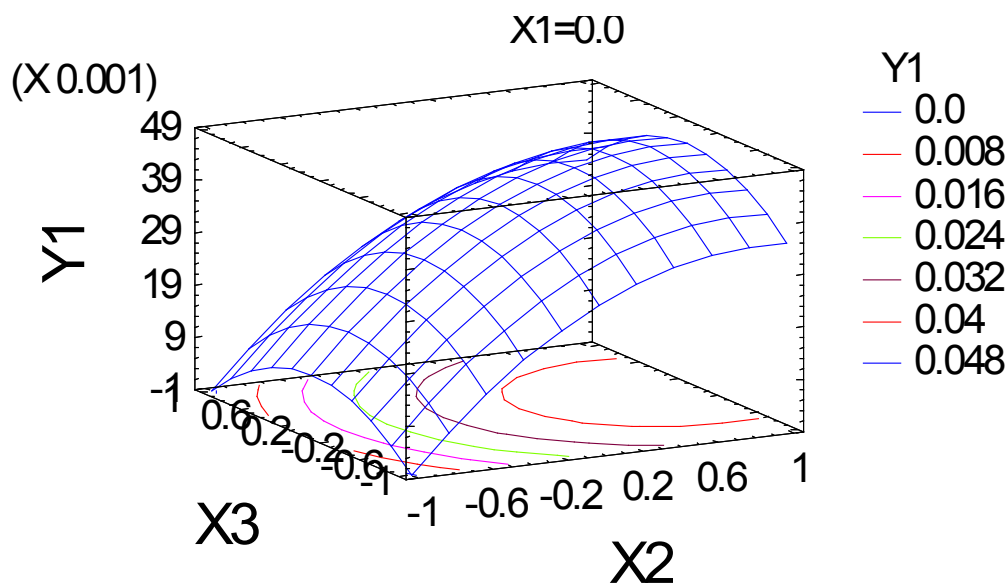
Το μοντέλο που επελέγη για το στατιστικό σχεδιασμό ήταν δευτεροβάθμιο. Το στατιστικό πρόγραμμα παρείχε 15 συνδυασμούς παραγόντων που πραγματοποιήθηκαν ταυτόχρονα σε τρεις επαναλήψεις. Τα αντίστοιχα δευτεροβάθμια μοντέλα υπολογίστηκαν για τους παραπάνω παράγοντες βελτιστοποίησης και οι τιμές οι οποίες θεωρήθηκαν στατιστικώς μη αποδεκτές, αποκλείστηκαν από τους περαιτέρω υπολογισμούς. Οι στατιστικές επιδράσεις των επιλεγμένων παραγόντων και των αλληλεπιδράσεών τους που είχαν τιμές $p > 0.05$ αποκλείστηκαν, ενώ αυτές με τιμές $p < 0.05$, χρησιμοποιήθηκαν διότι θεωρήθηκαν ότι είχαν

στατιστικά μεγαλύτερη από 95% πιθανότητα να είναι διαφορετικές από το μηδέν, άρα στατιστικά σημαντικές. Το μοντέλο της δευτεροβάθμιας εξίσωσης αποδείχθηκε επαρκές για να περιγράψει τα δεδομένα που προέκυψαν, με αποτέλεσμα να προκύψει η εξίσωση που ακολουθεί:

$$Y = 0.0383 + 0.0100X_1 + 0.0178X_2 - 0.0104X_2^2 - 0.0111X_3^2$$

Y είναι η αύξηση βάρους των δοκιμίων μαρμάρου, X_1 ο παράγοντας θερμοκρασίας, X_2 είναι ο παράγοντας της συγκέντρωσης θρεπτικού και X_3 είναι ο παράγοντας του όγκου του εμβολιασμού.

Οι παράγοντες X_3 , X_1^2 , X_1X_2 , X_1X_3 , και X_2X_3 αποκλείστηκαν ως στατιστικά ασήμαντοι. Το κριτήριο έλλειψης προσαρμογής (lack of fit), είχε τιμή $p = 0.6067$ η οποία είναι μεγαλύτερη από το 0.05, που σημαίνει ότι το μοντέλο είναι ικανό να εκφράσει τα δεδομένα που προέκυψαν από τα πειράματα. Η τιμή F του μοντέλου είναι $F=10.83$ που υποδεικνύει ότι το μοντέλο είναι σημαντικό, με 0,01% πιθανότητα η τιμή να είναι τόσο μεγάλη λόγω «θορύβου». Αυτό επιβεβαιώνεται επίσης και από την αναλογία τιμών σήματος προς θόρυβο, που το είναι ίση με $10.05 > 4$. Εφόσον η τιμή είναι μεγαλύτερη του 4, το μοντέλο μπορεί να εκφράσει επαρκώς τις πειραματικές τιμές. Οι βέλτιστες τιμές οι οποίες προέκυψαν από τη στατιστική ανάλυση, δίνονται τον Πίνακα 14 ως βέλτιστες τιμές των κωδικοποιημένων παραγόντων, καθώς και τις βέλτιστες φυσικές τιμές τους, δηλαδή τις τιμές που αντιστοιχούν σε κάθε επιλεγμένο παράγοντα. Ο χώρος σχεδιασμού γραφικά αλλά και το μέγιστο, παρουσιάζονται στο Σχήμα 3.



Σχήμα 3: Υπολογισμένη επιφάνεια απόκρισης για τις κωδικοποιημένες τιμές των παραγόντων σχεδιασμού X2 και X3, έχοντας σταθεροποιήσει τον παράγοντα X1 στο μηδενικό του επίπεδο. Η περιοχή του άριστου (μέγιστου), φαίνεται καθαρά στη γραφική απεικόνιση ισοϋψών.

Η αρχική ποσότητα μικροοργανισμών που εμβολιάστηκε κάθε φορά ήταν $3-5 \times 10^8$ cfu/mL, επομένως διατηρήθηκε πρακτικά το ίδιο σημείο εκκίνησης για όλα τα δείγματα. Η μέγιστη διάρκεια πειράματος καθορίστηκε η 14^η μέρα, εφόσον και στα προκαταρκτικά πειράματα παρατηρήθηκε ότι η διαδικασία είχε ολοκληρωθεί έως τότε. Παρόλο που οι συγκεντρώσεις ασβεστίου και οξικών εξαντλήθηκαν νωρίτερα από την 10^η ημέρα, η επέκταση του πειράματος έγινε εσκεμμένα με σκοπό να διερευνηθεί, εάν ο μικροοργανισμός συνέχιζε να αποθέτει και μετά την εξάντλησή τους.

Ποιοτικά, οι τιμές απορρόφησης και συγκέντρωσης βακτηρίων είναι παραπλήσιες στα πειράματα με ίδια συγκέντρωση θρεπτικού ανεξαρτήτως θερμοκρασίας. Οι μεταβολές βάρους ήταν θετικές σε όλα σχεδόν τα δείγματα (πλην ενός), γεγονός το οποίο προσέφερε την αναγκαία πληροφορία στο υπολογιστικό μοντέλο για να προσδιορίσει τις αποδοτικότερες τιμές των παραμέτρων. Η μέγιστη απόθεση εμφανίζεται στη περιοχή της μέγιστης συγκέντρωσης θρεπτικού και θερμοκρασίας. Το pH όλων των δειγμάτων ήταν >8 , γεγονός που βοήθησε στη βιο-απόθεση. Περαιτέρω συμπεράσματα μπορούν να προκύψουν, αν κατηγοριοποιηθούν τα αποτελέσματα ως προς διαφορετικές παραμέτρους, αλλά για την επεξεργασία αυτή χρησιμοποιήθηκε το υπολογιστικό πρόγραμμα, ώστε να εξακριβωθεί εάν μπορεί το ίδιο να συνεισφέρει μια συνολική ανάλυση, προς όφελος της συντόμευσης τέτοιων

διαδικασιών. Στον Πίνακα 14, παρουσιάζονται συγκεντρωτικά η μεταβολή βάρους κάθε δοκιμίου και ο μέσος όρος αυτών, η απορρόφηση, το pH και η συγκέντρωση των κυττάρων κατά την απομόνωση κάθε δοκιμίου.

Αποτελέσματα

- 1 **Πίνακας 14:** Παρουσίαση όλων των αποτελεσμάτων του *C. metallidurans* ACA-DC 4073 σε συνδυασμό με τις παραμέτρους που επελέγησαν και τις τιμές
 2 τους. Κάθε χρώμα αντιστοιχεί σε διαφορετική ομάδα δειγμάτων τα οποία πραγματοποιήθηκαν ταυτόχρονα (κίτρινο, γκρι και πράσινο).

Θερμοκρασία (°C)	Συγκέντρωση θρεπτικού (g/100ml)	Όγκος εμβολιασμού (ml)	Αριθμός δείγματος	Μεταβολή βάρους (g)	Μέσος όρος (g)	Abs 620nm ¹	pH	Συγκέντρωση βακτηρίων (cfu/ml)
25	0.36	1	467	0.0028	0.0015	0.835 [0.473 1:1]	8.72	1.00E+08
25	0.36	1	455	0.0008		0.952 [0.532 1:1]	8.56	2.30E+08
25	0.36	1	475	0.0008		0.927 [0.537 1:1]	8.60	1.90E+08
25	1.08	1	472	0.0033	0.0280	1.660 [1.227 1:1]	8.45	6.00E+08
25	1.08	1	504	0.0446		1.773 [1.349 1:1]	8.57	3.40E+08
25	1.08	1	486	0.0361		1.607 [1.186 1:1]	8.47	5.70E+08
25	0.72	0.5	473	0.0045	0.0236	1.354 [0.900 1:1]	8.60	1.20E+08
25	0.72	0.5	484	0.0308		1.450 [0.995 1:1]	8.68	1.80E+08
25	0.72	0.5	493	0.0354		1.311 [0.882 1:1]	8.62	2.70E+08
25	0.72	1.5	477	0.0076	0.0149	1.404 [0.960 1:1]	8.64	
25	0.72	1.5	499	0.0237		1.452 [0.971 1:1]	8.66	1.60E+08
25	0.72	1.5	471	0.0133		1.341 [0.912 1:1]	8.62	2.40E+08
35	0.36	1	460	0.0022	0.0094	0.776 [0.438 1:1]	8.85	2.40E+06
35	0.36	1	503	0.0024		0.888 [0.515 1:1]	8.80	1.10E+07
35	0.36	1	481	0.0236		0.918 [0.547 1:1]	8.82	2.60E+07
35	1.08	1	470	0.0869	0.0730	1.618 [1.125 1:1]	8.66	5.30E+06
35	1.08	1	507	0.0582		1.911 [1.458 1:1]	8.74	3.10E+07
35	1.08	1	487	0.0738		1.894 [1.465 1:1]	8.68	1.00E+08
35	0.72	0.5	465	0.0607	0.0384	1.355 [0.870 1:1]	8.90	2.80E+06
35	0.72	0.5	505	0.0155		1.483 [1.015 1:1]	8.76	5.70E+06
35	0.72	0.5	494	0.0389		1.498 [1.014 1:1]	8.76	5.10E+07
35	0.72	1.5	476	0.0301	0.0297	1.385 [0.888 1:1]	8.75	1.30E+07
35	0.72	1.5	508	0.0268		1.480 [1.007 1:1]	8.86	2.30E+07
35	0.72	1.5	496	0.0322		1.527 [1.022 1:1]	8.72	5.40E+07
30	0.72	1	452	0.0551	0.0357	1.287 [0.836 1:1]	8.66	8.30E+07
30	0.72	1	506	0.0241		1.508 [0.992 1:1]	8.65	1.20E+08
30	0.72	1	495	0.0280		1.676 [1.205 1:1]	8.65	1.10E+08

30	0.72	1	458	0.0526	0.0472	1.430 [1.015 1:1]	8.60	4.20E+07
30	0.72	1	483	0.0288		1.540 [1.109 1:1]	8.65	8.40E+07
30	0.72	1	490	0.0602		1.476 [1.126 1:1]	8.72	9.40E+07
30	0.72	1	464	0.0060	0.0319	1.317 [0.874 1:1]	8.66	7.60E+07
30	0.72	1	454	0.0186		1.493 [1.028 1:1]	8.65	8.50E+07
30	0.72	1	488	0.0712		1.545 [1.150 1:1]	8.72	1.20E+08
30	0.36	0.5	466	0.0037	0.0025	0.858 [0.487 1:1]	8.67	4.30E+07
30	0.36	0.5	502	0.0028		0.911 [0.516 1:1]	8.72	8.50E+07
30	0.36	0.5	457	0.0010		0.826 [0.460 1:1]	8.68	9.70E+07
30	1.08	0.5	469	0.0529	0.0225	1.633 [1.168 1:1]	8.52	1.50E+08
30	1.08	0.5	480	0.0147		1.677 [1.183 1:1]	8.55	5.70E+07
30	1.08	0.5	461	0.0000		1.776 [1.350 1:1]	8.61	2.10E+08
30	0.36	1.5	468	0.0041	0.0049	0.851 [0.494 1:1]	8.68	1.20E+08
30	0.36	1.5	478	0.0030		0.912 [0.524 1:1]	8.67	1.20E+08
30	0.36	1.5	491	0.0076		0.927 [0.5271:1]	8.72	1.30E+08
30	1.08	1.5	474	0.0244	0.0373	1.599 [1.131 1:1]	8.66	1.60E+08
30	1.08	1.5	479	0.0339		1.667 [1.241 1:1]	8.69	1.60E+08
30	1.08	1.5	482	0.0537		1.672 [1.240 1:1]	8.58	1.20E+08

- 1 ¹Οι τιμές απορρόφησης αντιστοιχούν σε αυτές που μετρήθηκαν απευθείας από το διάλυμα (εκτός αγκύλης) και σε αυτές που μετρήθηκαν με αραιώση 1:1 με
2 νερό ώστε η τιμή να βρίσκεται εντός των ορίων πραγματικής μέτρησης του οργάνου ($Abs \leq 1$).

Αποτελέσματα

Πίνακας 15: Μορφολογία του νέου ανθρακικού ασβεστίου, όπως ανιχνεύτηκε με ανάλυση FT-IR όλων των δειγμάτων που απομονώθηκαν από τα πειράματα βελτιστοποίησης.

Θερμοκρασία (°C)	Συγκέντρωση BP (g / 100ml)	Όγκος εμβολιασμού (ml)	No. δείγματος	Αποτέλεσμα FT-IR ¹
25	0.36	1	467	Ασβ. + Βατ.
25	0.36	1	455	Ασβεσίτης
25	0.36	1	475	Ασβεσίτης
25	1.08	1	472	Βατ. + Ασβ.
25	1.08	1	504	Βατερίτης
25	1.08	1	486	Βατερίτης
25	0.72	0.5	473	Βατ. + Ασβ.
25	0.72	0.5	484	Βατ. = Ασβ.
25	0.72	0.5	493	Βατερίτης
25	0.72	1.5	477	Βατ. + Ασβ.
25	0.72	1.5	499	Ασβ. = Βατ.
25	0.72	1.5	471	Βατερίτης
35	0.36	1	460	Βατ. = Ασβ.
35	0.36	1	503	Ασβ. + Βατ.
35	0.36	1	481	Βατ. + Ασβ.
35	1.08	1	470	Βατερίτης
35	1.08	1	507	Βατερίτης
35	1.08	1	487	Βατερίτης
35	0.72	0.5	465	Ασβ. + Βατ.
35	0.72	0.5	505	Βατ. + Ασβ.
35	0.72	0.5	494	Βατερίτης
35	0.72	1.5	476	Βατ. + Ασβ.
35	0.72	1.5	508	Βατ. + Ασβ.
35	0.72	1.5	496	Βατερίτης
30	0.72	1	452	Ασβ. + Βατ.
30	0.72	1	506	Βατ. + Ασβ.
30	0.72	1	495	Βατ. + Ασβ.
30	0.72	1	458	Βατ. + Ασβ.
30	0.72	1	483	Βατ. + Ασβ.
30	0.72	1	490	Βατ. + Ασβ.
30	0.72	1	464	Βατ. + Ασβ.
30	0.72	1	454	Βατ. + Ασβ.
30	0.72	1	488	Βατερίτης
30	0.36	0.5	466	Ασβ. + Βατ.
30	0.36	0.5	502	Ασβ. + Βατ.
30	0.36	0.5	457	Ασβεσίτης
30	1.08	0.5	469	Βατ. + Ασβ.
30	1.08	0.5	480	Βατερίτης
30	1.08	0.5	461	Βατ. + Ασβ.
30	0.36	1.5	468	Ασβ. + Βατ.
30	0.36	1.5	478	Ασβεσίτης
30	0.36	1.5	491	Ασβ. + Βατ.
30	1.08	1.5	474	Βατ. + Ασβ.
30	1.08	1.5	479	Βατερίτης
30	1.08	1.5	482	Βατ. + Ασβ.

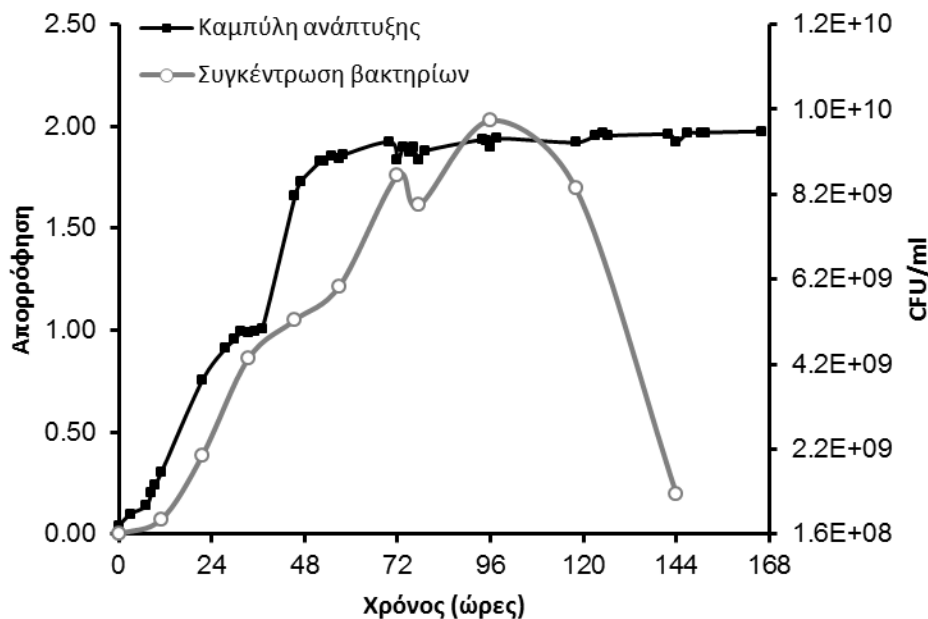
¹ Ασβ. = Ασβεσίτης, Βατ. = Βατερίτης.

Από τον Πίνακα 15, εξάγονται χρήσιμα αποτελέσματα, όσον αφορά την πορεία σχηματισμού του νέου ανθρακικού ασβεστίου και ποια από τις αλλόμορφες δομές επικρατεί. Βάσει της θερμοκρασίας, ο ασβεστίτης επικρατεί ή ανιχνεύεται σε σημαντική αναλογία σε σχέση με τον βατερίτη στις χαμηλότερες θερμοκρασίες και σταδιακά δίνει τη θέση του στον βατερίτη, καθώς αυξάνεται στους 35° C, όπου εκεί ο βατερίτης ανιχνεύεται αποκλειστικά. Η συγκέντρωση του θρεπτικού έχει και αυτή άμεση επίδραση. Στη χαμηλότερη συγκέντρωση θρεπτικού, ο ασβεστίτης διατηρείται σε όλες τις θερμοκρασίες, είτε ως η επικρατούσα δομή, είτε ως μίγμα. Αυτό αλλάζει καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση όπου ο βατερίτης είναι επικρατέστερος. Όσο αφορά τον αρχικό όγκο εμβολιασμού, δεν παρατηρήθηκε κάποια επίδραση.

Σε όλα τα δείγματα μετρήθηκαν οι συγκεντρώσεις CH_3COO^- και Ca^{2+} , με το πρώτο να έχει εξαντληθεί, ενώ είχε απομείνει ελάχιστη ποσότητα του δεύτερου. Επομένως, επιβεβαιώνεται ότι η ανάπτυξη του μικροοργανισμού εξελίχθηκε κανονικά, «ακινητοποιώντας» το σύνολο σχεδόν των κατιόντων ασβεστίου και τα αποτελέσματα μεταβολής βάρους οφείλονται στην επίδραση του μικροοργανισμού.

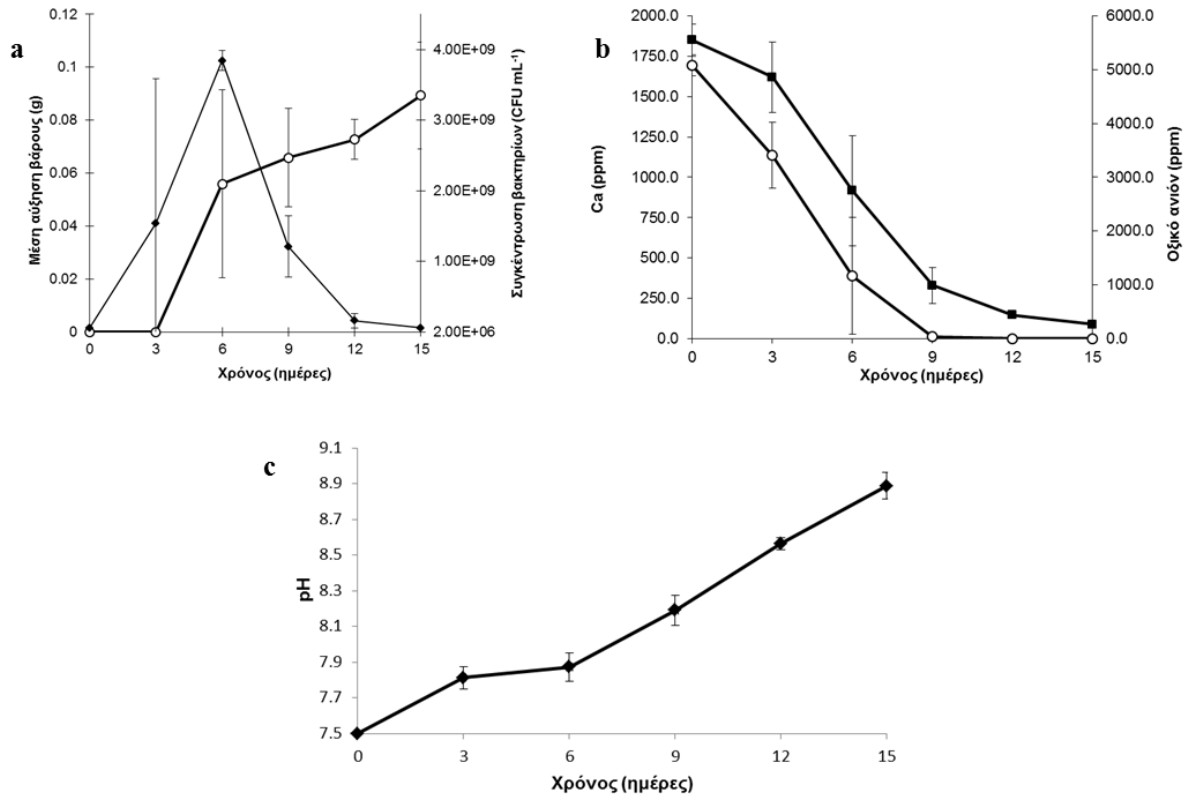
3.7.2 Τελικό Πείραμα Επιβεβαίωσης Βέλτιστου Σημείου

Βάσει των τιμών που προέκυψαν από τις παραμέτρους του στατιστικού σχεδιασμού, ελέγχθηκε αρχικά η καμπύλη ανάπτυξης του μικροοργανισμού ώστε να παρατηρηθεί η πορεία του στη δεδομένη συγκέντρωση των θρεπτικών συστατικών και τότε ξεκινά η αφομοίωση των οξικών ανιόντων. Η καμπύλη ανάπτυξης φαίνεται στο Σχήμα 4:



Σχήμα 4: Γραφική παράσταση καμπύλης ανάπτυξης του *C. metallidurans* ACA-DC 4073 και η συγκέντρωση των βακτηρίων κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης. Το φαινόμενο της διαύξεσης παρατηρείται ανάμεσα στις 24-48 ώρες, όπου και ξεκινά ή αφομοίωση των οξικών ανιόντων από τον μικροοργανισμό.

Η αλλαγή χρώματος του διαλύματος σε λευκό γαλάκτωμα, ανιχνεύτηκε ταυτόχρονα με την εκκίνηση αφομοίωσης του οξικού ανιόντος και την άμεση αύξηση του πληθυσμού. 55 ώρες μετά την εκκίνηση της διαδικασίας, παρατηρήθηκε ίζημα ανθρακικού ασβεστίου. Την ίδια χρονική περίοδο ολοκληρώθηκε η ανάπτυξη του μικροοργανισμού και οι τιμές συγκέντρωσης σταθεροποιήθηκαν για μερικές ώρες. Επίσης, είναι ενδεικτικό ότι η μείωση του πληθυσμού δεν γίνεται αντιληπτή από την απορρόφηση, η οποία παραμένει εφεξής σταθερή. Επομένως, η συστηματική μέτρηση και της πραγματικής συγκέντρωσης των μικροοργανισμών, με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων, είναι απαραίτητη για την ακριβέστερη παρακολούθηση της διαδικασίας.



Σχήμα 5: Γραφικές παραστάσεις βέλτιστου πειράματος του *C. metallidurans* ACA-DC 4073. **(a)** αύξηση βάρους δοκιμίων σε κάθε πειραματική ημέρα απομόνωσης (○) και η αντίστοιχη συγκέντρωση βακτηρίων (◆); **(b)** πορεία μείωσης οξικών ανιόντων(○) και κατιόντων ασβεστίου (■). Οι τιμές αντιστοιχούν στις συγκεντρώσεις των συστατικών στο θρεπτικό διάλυμα; **(c)** Πορεία αύξησης διαλύματος pH. Κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος 4 δειγμάτων. Μπάρες σφάλματος: τυπική απόκλιση.

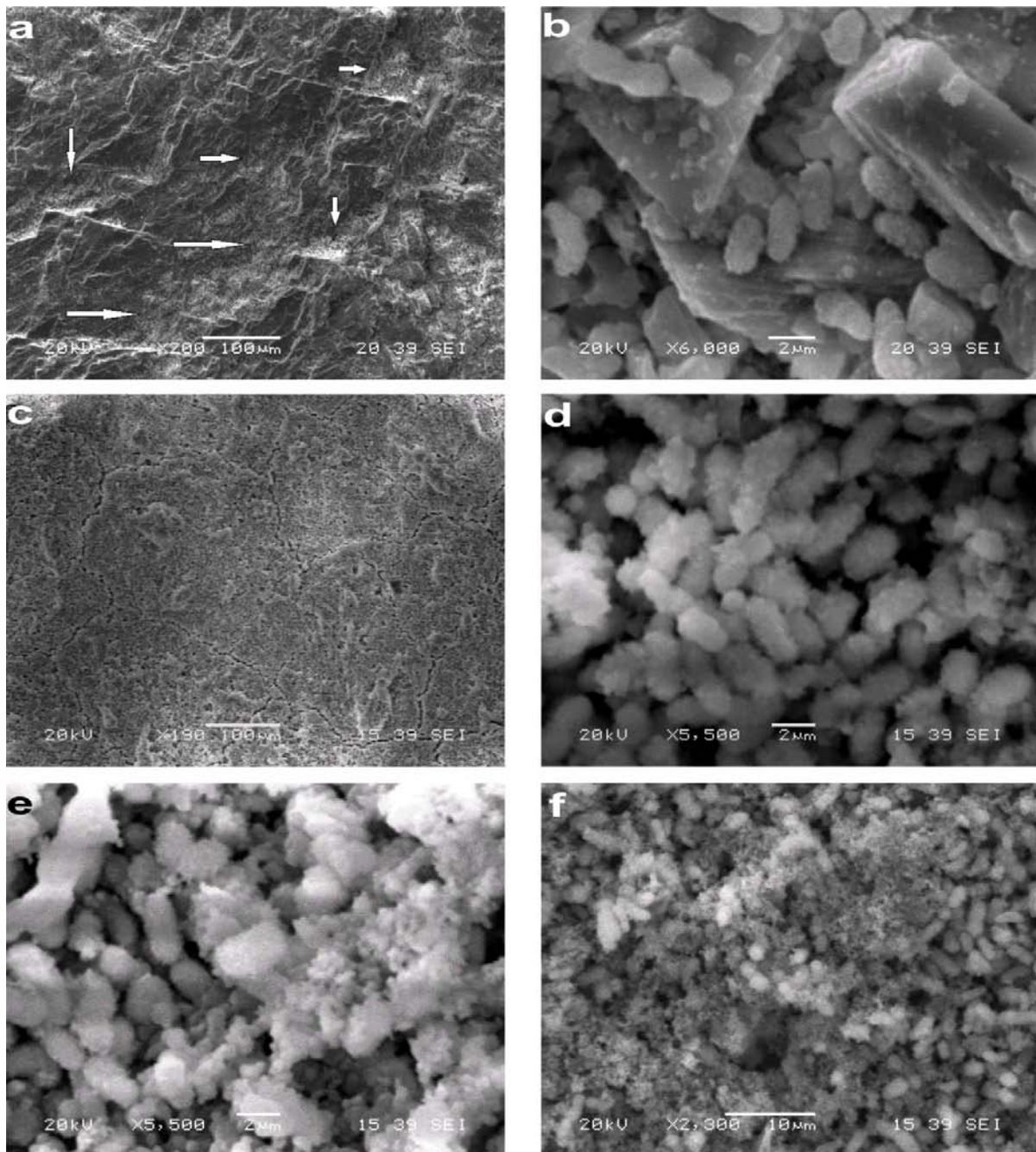
Τις πρώτες 3 ημέρες δεν παρατηρείται καμία μεταβολή στην απόθεση, ενώ οξικά ανιόντα έχουν αρχίσει ήδη να καταναλώνονται και ο πληθυσμός των βακτηρίων αυξάνεται μέσα στο διάλυμα. Μετά την 3η ημέρα, παρατηρήθηκε λευκό γαλάκτωμα που υποδεικνύει ότι ο σχηματισμός ανθρακικού ασβεστίου έχει αρχίσει και η διαδικασία προχωράει ομαλά. Ο σχηματισμός ανθρακικού ασβεστίου είναι άμεσος, διότι την 6^η ημέρα μετρήθηκε σημαντική απόθεση στα δοκίμια, ενώ οι συγκεντρώσεις των ιόντων έχουν μειωθεί. Αυτό στη συνέχεια προκάλεσε την άμεση αύξηση του pH, διότι τα οξικά δεν επιδρούν πλέον ως ρυθμιστικό διάλυμα (Σχήμα 5c). Η πλήρης κατανάλωση οξικών συνοδεύτηκε με τη σταδιακή πληθυσμιακή μείωση του μικροοργανισμού, στο οποίο προφανώς συνδράμει και η απόθεση.

Φωτογραφία για το πώς φαίνεται οπτικά η μέγιστη απόθεση ανθρακικού ασβεστίου:



Εικόνα 27: Δοκίμια μαρμάρου απομονωμένα κατά την 12^η μέρα πειράματος βέλτιστων συνθηκών για την απόθεση ανθρακικού ασβεστίου για τον μικροοργανισμό *C. metallidurans* ACA-DC 4073. Το χρώμα των δοκιμίων φαίνεται οπτικά ικανοποιητικό μιας και είναι σχεδόν λευκό, με ελαφρά γκρι απόχρωση.

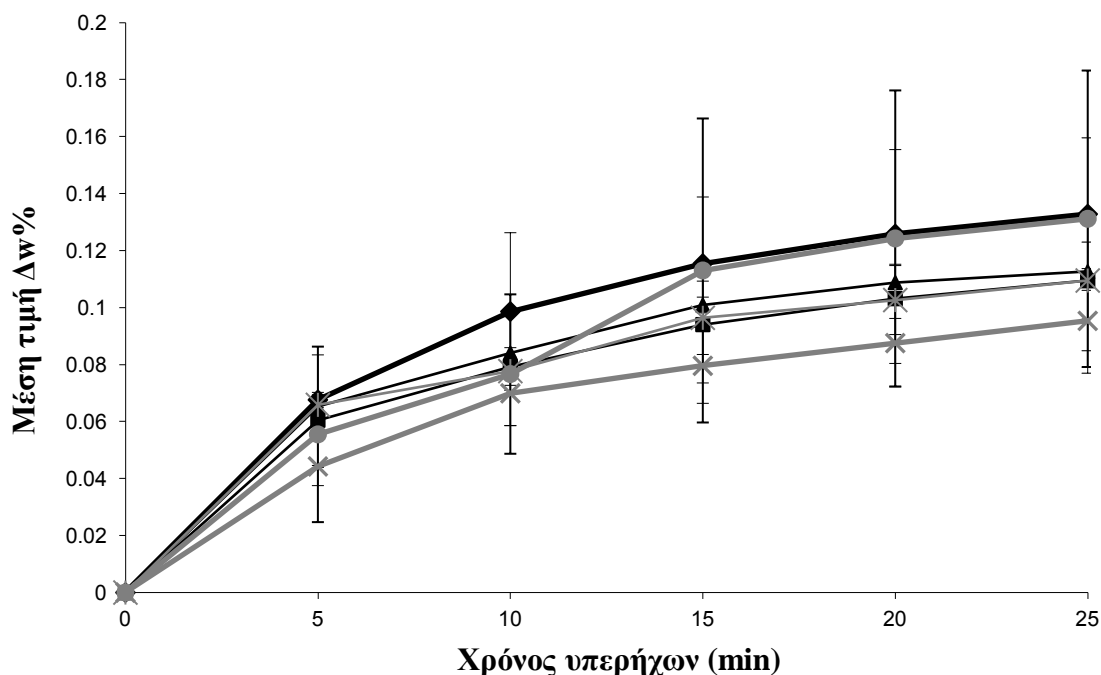
Το σύνολο των δειγμάτων αναλύθηκαν με φασματοσκοπία υπεριώδους (FT-IR) και φασματοσκοπία ακτίνων X (XRD), όπου απέδειξαν ότι το ανθρακικό ασβέστιο που σχηματίστηκε ήταν βατερίτης. Στην Εικόνα 28, παρουσιάζεται η διαδοχική διαδικασία απόθεσης ανθρακικού ασβεστίου υπό το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Μολονότι δοκίμια από την τρίτη ημέρα επώασης έδειξαν μείωση του βάρους τους, στην Εικόνα 28 a (λευκά βέλη), ταυτοποιήθηκε η έναρξη της διαδικασίας, δημιουργώντας τους πρώτους πυρήνες απόθεσης ανθρακικού ασβεστίου. Το νέο υλικό σχηματίστηκε αρχικά σε εσοχές των κρυστάλλων μαρμάρου. Σε μεγαλύτερη μεγέθυνση, παρουσιάζονται και οι διαστάσεις των κυττάρων, τα οποία έχουν περιβληθεί με ανθρακικό ασβέστιο (Εικόνα 28 b), καθώς και ο σχηματισμός μικροκρυσταλλικών σφαιρών στο μικροπεριβάλλον τους. Η διαδικασία εξελίσσεται αυξάνοντας την απόθεση, με συνέπεια την κάλυψη της επιφάνειας του δοκιμίου (Εικόνα 28 c). Σε όλες τις ημέρες κατά τις οποίες ελέγχθηκαν δείγματα, η απόθεση σχηματίζεται από σφαιρικές μορφές αντίστοιχες των κυτταρικών διαστάσεων και από μικροκρυσταλλικές σφαίρες, πάντα σε άμεση σχέση με τα κύτταρα (Εικόνα 28 d, e, f). Η συστηματική αυτή απόθεση, προσέφερε σταθερή αύξηση του βάρους μέχρι το τέλος του πειράματος, αλλά και επιβεβαίωσε μορφολογικά ότι η όλη διαδικασία εξελίσσεται με την επίδραση του μικροοργανισμού. Οι αποθέσεις στα δείγματα των τελευταίων ημερών (12^η και 15^η) παρουσιάζουν μια αύξηση του μικροκρυσταλλικού υλικού.



Εικόνα 28: Φωτογραφίες ηλεκτρονικού μικροσκοπίου από δείγματα πειράματος επιβεβαίωσης βέλτιστου σημείου: **(a)** δοκίμιο από την 3^η ημέρα απομόνωσης όπου φαίνονται πανοραμικά τα αρχικά σημεία εκκίνησης της απόθεσης βατερίτης; **(b)** μεγέθυνση της (a) με τις διαστάσεις του σχηματιζόμενου υλικού να είναι ίδιες με αυτές των κυττάρων; **(c)** πλήρης επικάλυψη σε δοκίμιο από την 9^η ημέρα; **(d)** μεγέθυνση του (c) αποδεικνύοντας ότι η μορφολογία παραμένει η ίδια σε όλη τη διάρκεια του πειράματος, όπως φαίνεται και στις εικόνες που ακολουθούν; **(e)** δοκίμιο από την 12^η ημέρα και **(f)** δοκίμιο από την 15^η ημέρα πειράματος. Και στις δύο περιπτώσεις οι μορφολογία παρέμεινε η ίδια, με πιθανή αύξηση του μικροκρυσταλλικού υλικού σε σχέση με την απόθεση που παραπέμπει σε κύτταρα.

3.7.3 Δοκιμή Αντοχής Επικάλυψης με Εφαρμογή Υπερήχων

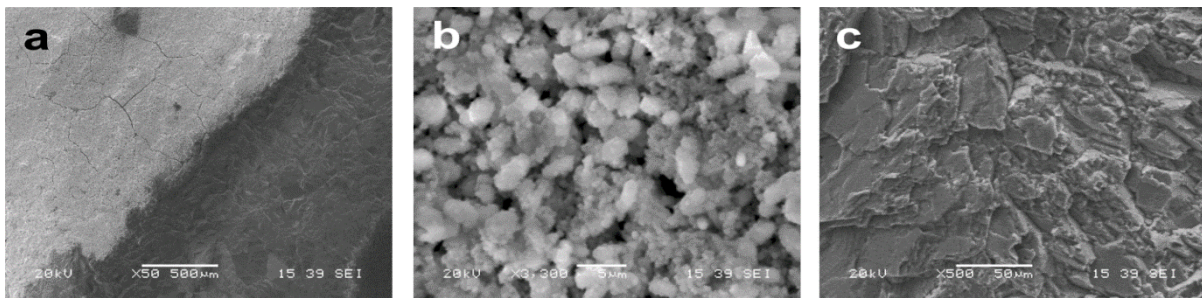
Για να εξακριβωθεί η συνεκτικότητα του νέου υλικού πάνω στο μάρμαρο, όλα τα δοκίμια υποβλήθηκαν σε δοκιμασία υπερήχων. Οι δονήσεις οι οποίες ασκούνται μέσω κυμάτων στην επιφάνεια απομακρύνουν υλικό με μικρή συνοχή, ή δημιουργούν ρήγματα τα οποία μπορούν να αναγνωριστούν.



Σχήμα 5: Γραφική παράσταση της μέσης τιμής ποσοστιαίας μείωσης βάρους μαρμάρινων δοκιμίων πειράματος βέλτιστης απόθεσης μετά την εφαρμογή υπερήχων. Κάθε γραμμή αντιστοιχεί στη μέση τιμή της μείωσης βάρους τριών δοκιμίων απομονωμένων κατά τις διαφορετικές πειραματικές ημέρες: (♦) 3^η ημέρα επώασης; (■) 6^η ημέρα επώασης; (▲) 9^η ημέρα επώασης; (×) 12^η ημέρα επώασης; (*) 15^η ημέρα επώασης και (●) τυφλό δοκίμιο μαρμάρου. Μπάρες σφαλμάτων: τυπική απόκλιση.

Η ικανότητα του βατερίτη να παραμένει στην επιφάνεια των δοκιμίων αποδεικνύεται στη γραφική παράσταση (Σχήμα 5). Από τις πρώτες ημέρες απόθεσης, η ελάττωση της απώλειας βάρους είναι εμφανής. Κατά τις δύο πρώτες εφαρμογές των υπερήχων, η μείωση είναι συγκρίσιμη με αυτή του τυφλού δείγματος, ενώ στη συνέχεια διαφοροποιείται ανάλογα με την ημέρα απομόνωσης. Τα δείγματα με την μεγαλύτερη αντοχή προήλθαν από τη 12^η ημέρα. Η απώλεια βάρους κάθε σειράς δειγμάτων, ήταν μικρότερη από τη συνολική απόθεση, δίνοντας διαρκώς θετικές τιμές κατά τον υπολογισμό της διαφοράς μεταξύ της αρχής και του τέλους του πειράματος. Η μείωση οφείλεται στην απομάκρυνση απόθεσης η

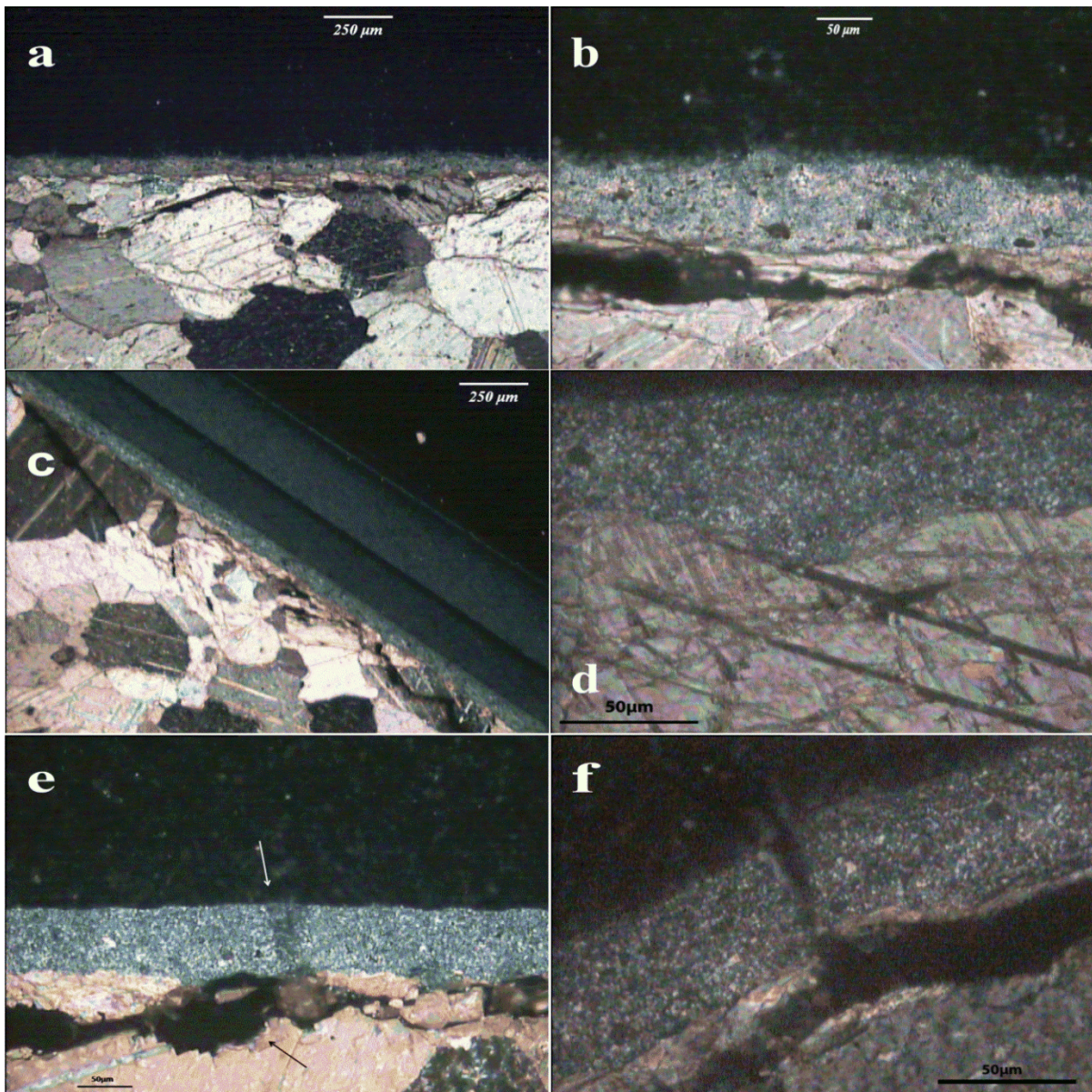
οποία δεν ήταν επαρκώς συνδεδεμένη με την επιφάνεια, αλλά και από την απομάκρυνση θραυσμάτων μαρμάρου από το σύνολο των επιφανειών του δοκιμίου. Δεν αναγνωρίστηκαν σημεία αποκόλλησης θραυσμάτων του νέου υλικού, πράγμα το οποίο θα γινόταν αντιληπτό στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, με την αναγνώριση της μαρμάρινης επιφάνειας κατά την ανάλυσή τους. Στην Εικόνα 29 a, φαίνεται σημείο στο οποίο η επικάλυψη δεν ήταν πλήρης: δεξιά η ακάλυπτη επιφάνεια και αριστερά η νέα επικάλυψη με βατερίτη. Η μορφολογία του νέου υλικού δεν άλλαξε καθόλου (Εικόνα 29 b), διατηρώντας τη συνοχή του με το μάρμαρο. Τα ρήγματα που φαίνονται σε χαμηλή μεγέθυνση είναι τα ίδια όπως και σε δοκίμια που δεν υπεβλήθησαν σε υπερήχους. Μεγέθυνση της ακάλυπτης επιφάνειας, απέδειξε την πλήρη απομάκρυνση όλων των θραυσμάτων των κρυστάλλων ασβεστίτη που προέρχονται από το μάρμαρο, αλλά και τυχόν αρχικές επικαλύψεις από νέο υλικό, όπως αυτό που παρατηρήθηκε τις πρώτες ημέρες απόθεσης των πειραμάτων (η εικόνα μπορεί να συγκριθεί με τις Εικόνες 28 a και b).



Εικόνα 29: (a) Φωτογραφία ηλεκτρονικού μικροσκοπίου με χαμηλή μεγέθυνση μαρμάρινου δοκιμίου 12^{ης} πειραματικής ημέρας μετά την υποβολή του σε πέντε διαδοχικές επεξεργασίες με υπερήχους. Δεξιά φαίνεται η μη καλυμμένη με νέο υλικό επιφάνεια ενώ αριστερά στην εικόνα φαίνεται το νέο υλικό (βατερίτης) που έχει παραμείνει; (b) μεγέθυνση όπου φαίνεται η διατήρηση της μορφολογίας, μετά την υποβολή σε υπερήχους και (c) μεγέθυνση της ακάλυπτης επιφάνειας όπου παρουσιάζεται η δράση των υπερήχων οι οποίοι απομάκρυναν πλήρως όλες τις αποθέσεις που δεν διέθεταν συνοχή με το υπόστρωμα ή/και θραύσματα του τελευταίου.

3.7.4 Λεπτές τομές δοκιμίων και στοιχειακή ανάλυση

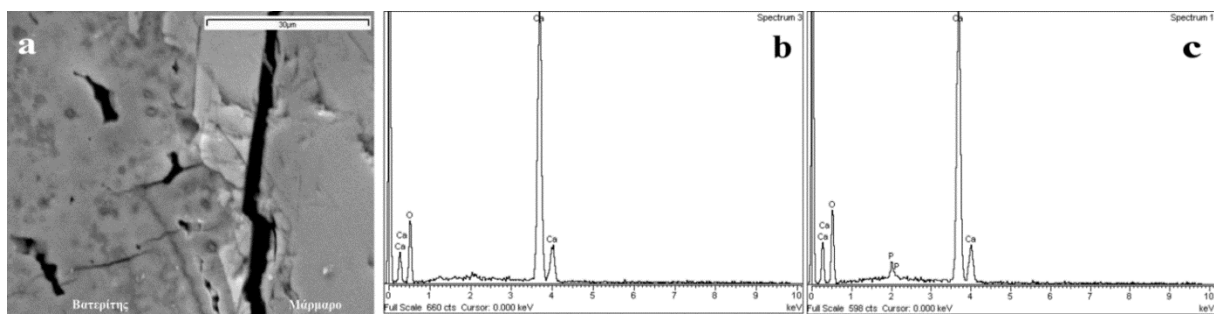
Μια επιπλέον διαδικασία παρατήρησης της ποιότητας της απόθεσης είναι οι λεπτές τομές των δοκιμίων. Το δείγμα, μετά τους υπερήχους, κόπηκε στο μέσο του δοκιμίου ώστε να ληφθεί αντιπροσωπευτική τομή ολόκληρης της επιφάνειας. Στις παρακάτω εικόνες παρουσιάζονται τα χαρακτηριστικά της απόθεσης υπό οπτικό μικροσκόπιο κάθετου πολωμένου φωτός, αλλά και σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, δειγμάτων τα οποία έχουν υποστεί υπερήχους. Στις Εικόνες 30 a και c, παρουσιάζονται οι κάθετες τομές υπό χαμηλή μεγέθυνση δειγμάτων από την 12^η και 15^η πειραματική μέρα αντίστοιχα. Η επιφάνεια φαίνεται να είναι εξ ολοκλήρου καλυμμένη και να ακολουθεί το ανάγλυφο του μαρμάρου. Σε μεγαλύτερη μεγέθυνση (Εικόνες 30 b και d), αναδεικνύεται η συνοχή του νέου υλικού ως προς τη μαρμάρινη επιφάνεια. Η διαφορά μεταξύ των δύο δειγμάτων οφείλεται στα κενά που υπάρχουν στο εσωτερικό του βατερίτη από τη 12^η μέρα πειράματος (Εικόνα 30 b), σε σύγκριση με της 15^{ης} που το νέο υλικό είναι περισσότερο συμπαγές (Εικόνα 30 d). Ο βατερίτης μπόρεσε να παραμείνει σχετικά ανέπαφος από τη επεξεργασία προετοιμασίας των δειγμάτων, όπως αποδεικνύεται και από την Εικόνα 30 e, παρόλο που το μάρμαρο απουσιάζει κάτω από τη νέα επιφάνεια, ο βατερίτης έχει παραμείνει προσκολλημένος. Σε μεγαλύτερη μεγέθυνση φαίνεται εγκάρσια ρωγμή που προκάλεσε τη συνολική μετατόπιση του νέου υλικού, χωρίς όμως να αποκολληθεί ή να σπάσει σε μικρότερα κομμάτια (Εικόνα 30 f).



Εικόνα 30: Λεπτές τομές δειγμάτων μετά την υποβολή τους σε υπερήχους: **(a)** φωτογραφία λεπτής τομής δείγματος της 12^{ης} πειραματικής ημέρας; **(b)** μεγέθυνση της (a) όπου παρουσιάζεται η συνοχή του υλικού και τα κενά στο εσωτερικό του βατερίτη; **(c)** φωτογραφία λεπτής τομής 15^{ης} πειραματικής ημέρας σε χαμηλή μεγέθυνση αποδεικνύοντας την πλήρη επικάλυψη της επιφάνειας του δοκιμίου; **(d)** μεγέθυνση όπου διακρίνεται η απουσία εσωτερικών κενών στον βατερίτη αλλά και η συμπαγής επαφή με το μάρμαρο; **(e)** σημείο μαρμάρου όπου φαίνεται το εσωτερικό σπάσιμο (μαύρο βέλος) το οποίο δεν επηρεάζει τη συνοχή του βατερίτη, εκτός από μια πιθανή κάθετη τομή (λευκό βέλος); **(f)** μεγέθυνση εγκάρσιας ρωγμής στο βατερίτη, η οποία προκλήθηκε από το εσωτερικό σπάσιμο στο μαρμάρινο υπόστρωμα και προκάλεσε τη συνολική μετατόπιση της μίας πλευράς. Ο βατερίτης διατηρήθηκε στη λεπτή επιφάνεια του μαρμάρου.

Περαιτέρω επιβεβαίωση της αντοχής του βατερίτη, αποδεικνύεται από τη μελέτη των λεπτών τομών στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο και την ημι-ποσοτική στοιχειακή ανάλυσή του. Στην Εικόνα 31 a, φαίνεται η συνοχή του βατερίτη σε σχέση με τη μαρμάρινη επιφάνεια η

οποία δεν έχει διαρραγεί ακόμα και με το διαμήκες σπάσιμο στο εσωτερικό του μαρμάρου. Η κάλυψη του ανάγλυφου του μαρμάρου είναι επίσης εμφανής. Η διαφορά του βιο-υλικού σε σχέση με το μάρμαρο, παρουσιάστηκε και κατά την ημι-ποσοτική ανάλυση του δείγματος. Το βιο-υλικό εμφανίζει μια πρόσθετη κορυφή (Εικόνα 31 c) φωσφόρου, σε σχέση με το καθαρό μάρμαρο (Εικόνα 31 b). Το ίδιο παρατηρήθηκε σε διαφορετικά σημεία του ίδιου δείγματος, αλλά και σε άλλα δοκίμια που αναλύθηκαν. Μπορεί να θεωρηθεί ως διαφορά μεταξύ των δύο μορφών ανθρακικού ασβεστίου, υποδεικνύοντας ταυτόχρονα και την πηγή σχηματισμού τους.



Εικόνα 31: Ανάλυση λεπτής τομής σε (a) ηλεκτρονικό μικροσκόπιο: παρουσιάζεται η διαφορά μεταξύ βατερίτη και μαρμάρου; (b) ημι-ποσοτική ανάλυση του δείγματος (a) της μαρμάρινης επιφάνειας δείχνοντας την ύπαρξη καθαρού ασβεστίου, ενώ (c) η ίδια ανάλυση του βατερίτη παρουσιάζει μια επιπλέον κορυφή φωσφόρου.

3.7.5 Χρωματική Αλλαγή στα Δοκίμια

Στα δείγματα από το πείραμα επιβεβαίωσης του βέλτιστου σημείου και μετά την υποβολή τους σε υπερήχους, μετρήθηκε η χρωματική τους διαφορά ως προς το τυφλό δείγμα του πειράματος και ως προς αρχαία δοκίμια μαρμάρου από αρχαιολογικούς χώρους των Αθηνών. Στα δοκίμια με σχεδόν πλήρη επικάλυψη από βατερίτη παρατηρήθηκαν χρωματικές αλλαγές, όπως παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 16: Χρωματικές συντεταγμένες δοκιμίων μαρμάρου, από το πείραμα επιβεβαίωσης του βέλτιστου σημείου του *C. metallidurans* ACA-DC 4073 μετά την υποβολή τους σε υπερήχους.

Δείγματα	Avg ΔL*	Avg Δa*	Avg Δb*	Avg ΔE ^{*1}	Avg ΔE ^{*2}	Avg ΔE ^{*3}
Μάρμαρα 3 ^{ης} ημέρας	-0.44	-0.26	-0.29	0.95	15.82	17.76
Μάρμαρα 6 ^{ης} ημέρας	-2.70	-0.35	3.57	4.57	12.16	13.74
Μάρμαρα 9 ^{ης} ημέρας	-8.66	-0.22	10.16	13.42	6.17	6.02
Μάρμαρα 12 ^{ης} ημέρας	-7.87	-0.51	15.04	17.70	7.96	5.55
Μάρμαρα 15 ^{ης} ημέρας	-10.04	-0.29	12.06	15.87	6.22	4.98
Εφαρμογή ψεκασμού	0.23	-0.67	1.25	1.69	12.09	14.35
	L*	a*	b*			
Τυφλό μάρμαρο πειραμάτων	89.9	-0.65	-1.13			
Μάρμαρο χωρίς επεξεργασία από πείραμα ψεκασμού	84.98	-0.9	-1.99			
Δείγμα αρχαίου μαρμάρου εκτεθειμένο στο περιβάλλον από τον 5 ^ο Αιώνα π.Χ.	75.94	1.09	6.55			
Δείγμα αρχαίου μαρμάρου εκτεθειμένο στο περιβάλλον από τον 4 ^ο Αιώνα π.Χ.	75.73	1.5	9.59			

Κάθε δείγμα είναι ο μέσος όρος τριών δοκιμίων. Για την εφαρμογή με ψεκασμό, κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος 5 δειγμάτων. Για κάθε δοκίμιο μετρήθηκαν πέντε διαφορετικά σημεία στην επιφάνεια και η μέση τιμή υπολογίστηκε αυτόματα από το λογισμικό του χρωματόμετρου. Για το τυφλό μάρμαρο, παρουσιάζονται οι απόλυτες τιμές του, καθώς δεν παρατηρήθηκε καμία διαφορά. Για τα αρχαία δείγματα, οι τιμές αντιστοιχούν σε μέσες τιμές όπως παραπάνω.

¹ΔE* υπολογίστηκε με δείγμα αναφοράς το τυφλό μάρμαρο από τα πειράματα βέλτιστου σημείου.

²ΔE* υπολογίστηκε με δείγμα αναφοράς το αρχαίο δείγμα #1, 5^{ου} αιώνα π.Χ.

³ΔE* υπολογίστηκε με δείγμα αναφοράς το αρχαίο δείγμα #2, 4^{ου} αιώνα π.Χ.

Τα «τυφλά» δείγματα μαρμάρου δεν παρουσίασαν χρωματικές διαφορές μετά την επώασή τους στο θρεπτικό διάλυμα. Για το λόγο αυτό, χρησιμοποιήθηκαν σαν μέτρο σύγκρισης για τα υπόλοιπα δοκίμια. Από τον πίνακα, παρατηρείται μια σταδιακή μείωση του L^* καθώς η απόθεση στα δοκίμια αυξάνεται. Το χρώμα των δοκιμίων της 12^{ης} και 15^{ης} ημέρας ήταν λευκό-μπεζ έως ελαφρύ γκρι, το οποίο επηρέασε τις τιμές του L^* έως και δέκα μονάδες. Η παράμετρος a^* (θετικές τιμές = ερυθρό χρώμα, αρνητικές τιμές = πράσινο χρώμα) είχε μικρές μεταβολές στον αρνητικό άξονα (πράσινο), καθιστώντας τα δοκίμια πιο κοντά στο μηδέν σε σχέση με το «τυφλό». Οι σημαντικότερες διαφορές παρουσιάστηκαν στον άξονα της παραμέτρου b^* (θετικές τιμές = κίτρινο χρώμα, αρνητικές τιμές = μπλε χρώμα), όπου ο χρωματισμός βρίσκεται στις θετικές τιμές δίνοντας στην επιφάνεια κίτρινη χροιά. Ο συνδυασμός των μεταβολών αυτών έδωσε οπτικά το τελικό αποτέλεσμα που

περιγράφηκε παραπάνω. Η συνολική διαφορά χρώματος ΔE^* έδειξε ότι τα δείγματα στα οποία υπήρχε ουσιαστική απόθεση στην επιφάνεια (9^η ημέρα και εξής) είχαν σημαντικές διαφορές, οι οποίες είναι ορατές δια γυμνού οφθαλμού ($\Delta E^* > 6$). Αυτές όμως οι τιμές αφορούν μάρμαρο το οποίο ουσιαστικά έχει μόλις εξορυχθεί και είναι σχεδόν απόλυτα λευκό (τιμή θετική L κοντά στο 100). Όταν τα δείγματα συγκριθούν με πραγματικά δοκίμια αρχαίων μνημείων, οι χρωματικές διαφορές «αντιστρέφονται» εμφανίζοντας, σε ορισμένες περιπτώσεις, αποτελέσματα με $\Delta E^* \leq 6$, αποδεκτά για εφαρμογές συντήρησης.

3.7.6 Πειράματα Απόθεσης Ανθρακικού Ασβεστίου σε μη Αποστειρωμένες Συνθήκες

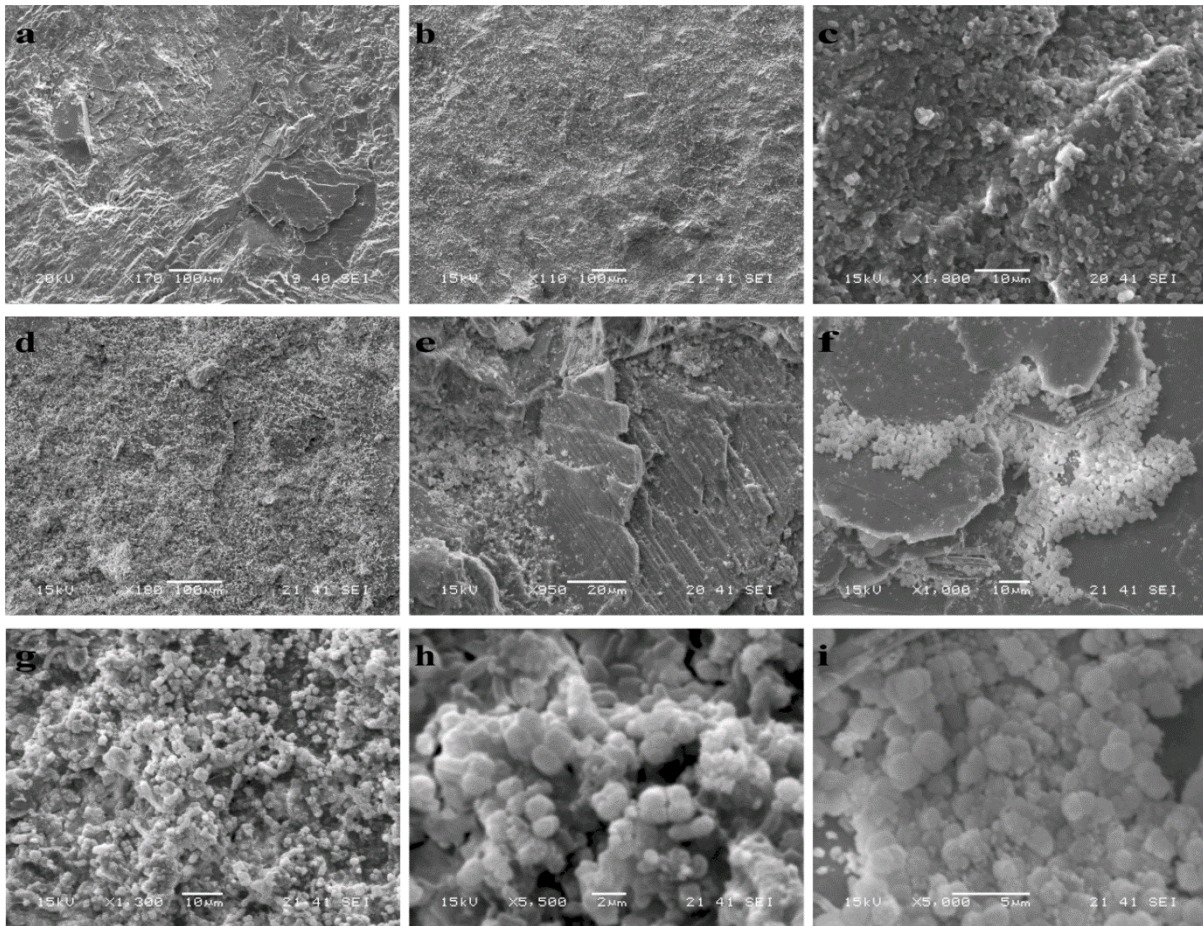
Ως τελική δοκιμή, τα επιλεγμένα θρεπτικά διαλύματα εμβολιασμένα με τον μικροοργανισμό ψεκάστηκαν σε επιφάνεια μαρμάρου υπό συνθήκες μη αποστειρωμένες. Τα αποτελέσματα ήταν ενθαρρυντικά και αποδεικνύουν ότι η χρήση του συγκεκριμένου στελέχους μπορεί να προσφέρει λύσεις για την απόθεση ανθρακικού ασβεστίου σε επιφάνεια λίθου. Η διαδικασία ψεκασμού δεν μείωσε τη βιωσιμότητα του μικροοργανισμού. Ο όγκος που χρησιμοποιήθηκε για την κάλυψη της επιφάνειας κατά τη διάρκεια του πειράματος, ήταν ο ελάχιστος δυνατός και μετρήθηκε στα 10 mL. Η συγκέντρωση κυττάρων κυμάνθηκε $2.0 - 3.5 \times 10^9$ cfu/mL, ανάλογη των προηγούμενων πειραμάτων. Η λεπτή υγρή επιφάνεια από το διάλυμα θρεπτικού/μικροοργανισμού διατηρήθηκε για 12 ώρες. Δύο ψεκασμοί το 24ωρο ήταν το ελάχιστο για να αποτραπεί η ξήρανση της επιφάνειας, σε συνδυασμό με βαμβάκι εμποτισμένο σε μη αποστειρωμένο νερό, μειώνοντας την πιθανότητα ο μικροοργανισμός να πεθάνει λόγω έλλειψης υγρασίας. Συνθήκες έλλειψης θρεπτικού δεν μπορεί να αποκλειστεί, αλλά δεν ήταν δυνατόν να ελεγχθεί. Επίσης, δεν παρατηρήθηκε κάποια μόλυνση στην επιφάνεια κατά τη διάρκεια της εφαρμογής, πράγμα το οποίο υποδηλώνει ότι ο μικροοργανισμός εκμεταλλεύτηκε αποκλειστικά το θρεπτικό φορτίο μην επιτρέποντας σε άλλο στέλεχος να αναπτυχθεί.

Θετική μεταβολή βάρους ανιχνεύτηκε σε όλα τα δοκίμια, θεωρώντας έτσι το πείραμα επιτυχές. Η ανάλυση δειγμάτων σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, έδειξε ότι σχηματίστηκε μια λεπτή επιφάνεια νέου ανθρακικού ασβεστίου. Η ποσότητα δεν είναι συγκρίσιμη με αυτή των πειραμάτων, τα οποία ήταν εμβλαπτισμένα σε θρεπτικό υγρό, αλλά αποδεικνύει ότι ο *C. metallidurans* ACA-DC 4073 μπορεί να είναι αποδοτικός και σε περιορισμένες ποσότητες

θρεπτικού. Η Εικόνα 32 a, δείχνει το μαρμάρινο υπόστρωμα χωρίς καμία επεξεργασία προς σύγκριση με τις Εικόνες 32 b, c και d, όπου παρουσιάζεται η επιφάνεια δειγμάτων από διαφορετικά σημεία. Η ελαχιστοποίηση του όγκου ψεκασμού, όπως ήταν φυσικό, δεν επέτρεψε, σε κάποια σημεία, την πλήρη επικάλυψη. Υπήρξαν σημεία στα οποία ο μικροοργανισμός δεν έχει επεκταθεί. Αυτό επανεπιβεβαίωσε ότι τα αρχικά σημεία απόθεσης είναι οι εσοχές ή τα σημεία σύγκλισης των κρυστάλλων μαρμάρου (Εικόνες 32 e και f), όπως και στα προηγούμενα πειράματα. Μεγέθυνση (Εικόνες 32 g, h και i), δείχνει ότι η μορφολογία (σφαιρικές μορφές) παρέμεινε η ίδια, ενώ δεν ανιχνεύτηκαν μορφολογίες οι οποίες να παραπέμπουν στην ύπαρξη ασβεστίτη.

Η λεπτή επιφάνεια από το ανθρακικό ασβέστιο δεν προκάλεσε σημαντικές χρωματικές διαφορές. Όπως φαίνεται στον Πίνακα 16, το ΔΕ είναι μικρότερο από 6, με αποτέλεσμα να μην είναι αναγνωρίσιμες χρωματικές μεταβολές δια γυμνού οφθαλμού. Το αντίθετο συμβαίνει, όταν τα αποτελέσματα συγκριθούν με αρχαία δείγματα μαρμάρου και αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι το νέο υλικό, έχει τιμές πολύ κοντά στο λευκό (τιμές L^*), δεδομένου ότι και η απόθεση είναι χαμηλότερη από τα προηγούμενα πειράματα. Οι τιμές αυτές όμως μπορούν να μεταβληθούν, εάν ο ψεκασμός γίνει με μεγαλύτερους όγκους ή μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Τα αποτελέσματα μπορούν να θεωρηθούν ως βάση για περαιτέρω διερεύνηση και ανάλυση του χρόνου και του μικροβιακού φορτίου που χρειάζεται, ώστε οι χρωματικές αλλαγές να είναι μη ανιχνεύσιμες σε συνδυασμό με τη μέγιστη δυνατή απόθεση.

Αποτελέσματα



Εικόνα 32: Φωτογραφίες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας δειγμάτων από πείραμα ψεκασμού *C. metallidurans* ACA-DC 4073 σε μεγαλύτερη μαρμάρινη επιφάνεια υπό μη αποστειρωμένες συνθήκες. **(a)** τυφλό μάρμαρο; **(b, c και d)** εικόνες χαμηλής μεγέθυνσης όπου παρουσιάζεται η νέα επιφάνεια ανθρακικού ασβεστίου σε σύγκριση με την (a); **(e και f)** χαμηλή επικάλυψη του δοκιμίου μαρμάρου παρουσιάζοντας τη διαδικασία έναρξης απόθεσης σε εσοχές των κρυστάλλων ασβεστίτη, ή σε σημεία σύγκλισης των διαφορετικών κατευθύνσεων των κρυστάλλων; **(g, h και i)** μεγέθυνση του νέου υλικού που παραπέμπει σε βατερίτη, λόγω των σφαιρικών μορφών και διαστάσεων των κυττάρων.

3.8 Πείραμα Βελτιστοποίησης Απόθεσης Ανθρακικού Ασβεστίου *Bacillus pumilus* ACA-DC 4061

3.8.1 Εξαγωγή Βέλτιστου Σημείου

Ο μικροοργανισμός, κατά τη διάρκεια της βελτιστοποίησης, δεν εμφάνισε τη συστηματικότητα που παρουσιάστηκε στον *C. metallidurans* ACA-DC 4073. Για το λόγο αυτό, πραγματοποιήθηκαν πέντε δοκιμές αντί για τρεις, συγκεντρώνοντας αποτελέσματα 75 δειγμάτων, εκ των οποίων στο στατιστικό πρόγραμμα χρησιμοποιήθηκαν οι 57. Η αύξηση των δοκιμών προσέφερε καλύτερη εικόνα στο πώς ο μικροοργανισμός συμπεριφέρεται, βάσει των επιλεγμένων μεταβλητών. Ο Πίνακας 17, παρουσιάζει το σύνολο των μεταβολών βάρους των δοκιμών, την απορρόφηση θρεπτικού διαλύματος και τη συγκέντρωση του μικροοργανισμού. Πιο συγκεκριμένα, από τις τιμές μεταβολής βάρους είναι εμφανές ότι ο μικροοργανισμός διαθέτει μέγιστο στους 30 °C (0.0908 g), αλλά υπάρχει σημαντική απόθεση και στους 25 °C (0.08538 g). Στους 35 °C, η απόθεση μειώνεται μολονότι παραμένει υπολογίσιμη. Οι συγκεντρώσεις των κυττάρων διατηρούνται σε υψηλές τιμές έως το τέλος των πειραμάτων. Ποιοτικά, οι τιμές απορρόφησης, σε συνδυασμό με τη συγκέντρωση, δείχνουν ότι το πείραμα πραγματοποιήθηκε ομαλά, διότι σε γενικές γραμμές είναι παραπλήσιες σε όλες τις ομάδες πειραμάτων (κάθε ομάδα περιλαμβάνει 5 τιμές). Τέλος, οι τιμές του pH ήταν υψηλές, γεγονός που επιβεβαιώνει ότι ο μικροοργανισμός ενίσχυσε με το μεταβολισμό του τη δημιουργία του κατάλληλου περιβάλλοντος, ευνοώντας την απόθεση ανθρακικού ασβεστίου.

Αποτελέσματα

Πίνακας 17: Συγκενρωτικός πίνακας όλων των πειραμάτων κατά τις δοκιμές βελτιστοποίησης του *Bacillus pumilus* ACA-DC 4061, παρουσιάζοντας τις μεταβολές βάρους και τη μέση τιμή τους, την απορρόφηση, το pH και τη συγκέντρωση βακτηρίων. Κάθε διαφορετικό χρώμα αντιστοιχεί σε διαφορετική ομάδα δειγμάτων τα οποία πραγματοποιήθηκαν ταυτόχρονα (κίτρινο, μωβ, γκρι, πράσινο και μπλε).

Θερμοκρασία (°C)	Συγκέντρωση θρεπτικού (g/100ml)	Όγκος εμβολιασμού (ml)	Αριθμός δείγματος	Μεταβολή βάρους (g)	Μέσος όρος (g)	Abs 620nm	pH	Συγκέντρωση βακτηρίων (cfu/ml)
25	0.36	1	598	0.0054	0.0093	0.901/0.516	8.55	3.6x10*8
25	0.36	1	611	0.0050		0.622/0.335	8.83	2.5x10*8
25	0.36	1	633	0.0205		1.229/0.743	8.90	2.7x10*8
25	0.36	1	653	0.0044		1.115/0.649	8.75	3.0x10*8
25	0.36	1	675	0.0113		1.183/0.650	8.86	4.3x10*8
25	1.08	1	599	0.0896	0.08538	1.442/1.045	8.00	1.5x10*8
25	1.08	1	612	0.1793		1.605/1.020	8.32	1x10*9
25	1.08	1	642	0.0769		1.327/0.824	8.67	5.3x10*8
25	1.08	1	657	0.0584		1.105/0.647	8.24	2.6x10*9
25	1.08	1	667	0.0227		1.572/1.077	8.37	1.95x10*9
25	0.72	0.5	577	0.029	0.03176	1.041/0.500	8.59	>4x10*8
25	0.72	0.5	616	0.0589		1.071/0.625	8.69	1.1x10*9
25	0.72	0.5	645	0.0163		0.780/0.390	8.82	7.2x10*8
25	0.72	0.5	651	0.0224		1.838/1.441	8.65	7.2x10*8
25	0.72	0.5	669	0.0322		1.538/1.030	8.55	3.6x10*8
25	0.72	1.5	597	0.0919	0.06802	0.849/0.460	8.46	>4x10*8
25	0.72	1.5	621	0.1539		0.900/0.502	8.67	6.9x10*8
25	0.72	1.5	498	0.0318		1.799/1.446	8.74	4.6x10*8
25	0.72	1.5	654	0.0291		0.655/0.349	8.57	1.4x10*9
25	0.72	1.5	664	0.0334		1.441/0.909	8.65	4.9x10*8
35	0.36	1	602	0.0603	0.06614	0.086/0.038	8.94	3.8x10*8
35	0.36	1	618	0.0588		0.253/0.130	9.18	6.6x10*6
35	0.36	1	640	0.0805		0.052/0.019	9.25	5.1x10*8
35	0.36	1	646	0.0255		0.224/0.115	9.15	4.7x10*6
35	0.36	1	674	0.1056		0.076/0.020	9.14	2.7x10*6
35	1.08	1	600	0.0056	0.03818	0.925/0.551	8.31	

35	1.08	1	630	0.0371		1.080/0.677	8.56	5.2x10*8
35	1.08	1	643	0.044		0.723/0.431	8.60	3.9x10*8
35	1.08	1	655	0.0399		1.296/0.801	8.55	5.2x10*7
35	1.08	1	671	0.0643		0.704/0.389	8.46	7.0x10*7
35	0.72	0.5	609	0.0273	0.04048	0.375/0.185	8.84	1.2x10*8
35	0.72	0.5	626	0.0787		0.202/0.095	9.00	1.3x10*7
35	0.72	0.5	634	0.014		0.200/0.094	9.17	2.28x10*7
35	0.72	0.5	650	0.0244		0.323/0.162	8.97	2.2x10*8
35	0.72	0.5	673	0.058		0.165/0.056	8.96	5.1x10*7
35	0.72	1.5	607	0.0267	0.05184	0.360/0.200	8.84	3.6x10*6
35	0.72	1.5	619	0.0671		0.245/0.126	9.01	3.7x10*7
35	0.72	1.5	562	0.0537		0.175/0.092	9.11	2.8x10*7
35	0.72	1.5	659	0.0362		0.243/0.156	9.03	4.4x10*7
35	0.72	1.5	676	0.0755		0.194/0.094	8.92	3.0x10*7
30	0.72	1	591	0.0131	0.03826	1.008/0.538	8.55	1.97x10*8
30	0.72	1	622	0.0598		0.295/0.135	8.82	1.1x10*5
30	0.72	1	627	0.0326		0.302/0.152	9.00	1.1x10*8
30	0.72	1	647	0.0043		0.275/0.135	8.91	9.9x10*7
30	0.72	1	663	0.0815		0.838/0.467	8.76	1.64x10*8
30	0.72	1	608	0.1749	0.08976	0.263/0.158	8.45	2.73x10*8
30	0.72	1	624	0.1011		0.472/0.237	8.88	2.4x10*8
30	0.72	1	605	0.0399		0.290/0.141	8.92	2.4x10*8
30	0.72	1	656	0.0883		0.440/0.215	8.98	1.0x10*8
30	0.72	1	670	0.0446		0.542/0.270	8.76	1.5x10*8
30	0.72	1	603	0.0691	0.0477	0.338/0.170	8.66	2.03x10*8
30	0.72	1	617	0.0875		0.405/0.202	8.92	1.6x10*8
30	0.72	1	644	0.0219		0.300/0.190	8.98	9.6x10*7
30	0.72	1	652	0.0178		0.467/0.240	8.80	1.6x10*8
30	0.72	1	668	0.0422		0.600/0.400	8.86	1.1x10*8
30	0.36	0.5	581	0.0793	0.05254	0.125/0.060	8.74	>3x10*7
30	0.36	0.5	615	0.0424		0.825/0.450	8.94	1.2x10*8
30	0.36	0.5	623	0.0539		0.195/0.093	9.15	3.3x10*7

Αποτελέσματα

30	0.36	0.5	658	0.0245		0.101/0.026	9.12	1.1x10*7
30	0.36	0.5	677	0.0626		0.114/0.050	9.13	2.66x10*7
30	1.08	0.5	568	0.0575	0.0908	0.983/0.567	8.06	
30	1.08	0.5	613	0.0811		1.090/0.675	8.31	2.5x10*8
30	1.08	0.5	637	0.0762		1.063/0.581	8.40	1.5x10*8
30	1.08	0.5	648	0.0585		1.994/1.580	8.33	9.8x10*8
30	1.08	0.5	678	0.1809		1.789/1.290	8.27	1.4x10*9
30	0.36	1.5	604	0.0638	0.0333	0.090/0.045	8.75	>3x10*7
30	0.36	1.5	610	0.0177		0.242/0.121	9.10	< 10*6
30	0.36	1.5	636	0.025		0.130/0.070	9.22	1.8x10*7
30	0.36	1.5	661	0.032		0.400/0.209	9.17	9.1x10*6
30	0.36	1.5	672	0.0279		0.950/0.562	9.02	6.2x10*7
30	1.08	1.5	601	0.0441	0.0676	0.798/0.450	8.00	-
30	1.08	1.5	629	0.0261		1.134/0.720	8.44	1.2x10*8
30	1.08	1.5	641	0.0772		1.447/0.926	8.51	4.3x10*8
30	1.08	1.5	660	0.1597		1.531/0.926	8.33	8.3x10*8
30	1.08	1.5	628	0.0311		1.248/0.715	8.50	5.1x10*8

Ο στατιστικός σχεδιασμός που επελέγη εδώ, ήταν ο ίδιος με αυτόν που χρησιμοποιήθηκε στον *C. metallidurans* ACA-DC 4073. Οι δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν ήταν 60, όπως παρουσιάστηκαν στον παραπάνω πίνακα, εκ των οποίων 57 χρησιμοποιήθηκαν για την εξαγωγή του στατιστικού μοντέλου. Οι στατιστικά σημαντικοί παράγοντες (με $p < 0.05$ στο επίπεδο σημαντικότητας 95%) χρησιμοποιήθηκαν για την περαιτέρω ανάλυση. Η τελική εξίσωση που προέκυψε από την επεξεργασία ήταν:

$$Y_1 = 0.0478 + 0.0105X_1 + 0.0119X_2 - 0.0167X_1X_2,$$

Απορρίφθηκαν έτσι οι παράγοντες που δεν ήταν σημαντικοί: X_3 , X_1^2 , X_2^2 , X_3^2 , X_2X_3 και X_1X_3

Επομένως, η εξίσωση είναι πλέον πρωτοβάθμια μιας και οι παράγοντες δευτέρου βαθμού δεν κρίθηκαν σημαντικοί από τον στατιστικό έλεγχο. Η στατιστική ανάλυση που ακολούθησε περιλάμβανε τα στατιστικά κριτήρια «επάρκεια στατιστικού μοντέλου» (model significance), «έλλειψη προσαρμογής» (lack-of-fit) και «επαρκής ακρίβεια» (adequate precision) των αποτελεσμάτων.

Πίνακας 18: Παράμετροι στατιστικής επάρκειας του μοντέλου που προέκυψε από την ανάλυση των αποτελεσμάτων βελτιστοποίησης.

	Model significance	Lack-of-fit	Adequate precision
<i>Αποδεκτές τιμές</i>	p-value < 0.05	p-value > 0.05	Signal to noise ratio > 4
<i>Υπολογισμένες τιμές</i>	0.0021	0.7986	8.074

Από τις παραπάνω τιμές, αποδεικνύεται ότι το προτεινόμενο μοντέλο δεν οφείλεται σε στατιστικό θόρυβο, επειδή η τιμή του 0.0021 είναι μικρότερη από 0.05. Επομένως, το μοντέλο είναι σημαντικό και επαρκές να περιγράψει τις ληφθείσες τιμές και επιπλέον διότι $\text{lack-of-fit} = 0.7986 > 0.05$. Τέλος, ο λόγος των τιμών προς τον θόρυβο του μοντέλου είναι $8.074 > 4$, το οποίο σημαίνει ότι οι τιμές που μπορούν να προβλεφθούν με το προτεινόμενο μοντέλο, μπορούν να διαχωριστούν από το στατιστικό σφάλμα, άρα να παρέχουν την απαραίτητη ακρίβεια. Βάσει της παραπάνω εξίσωσης, το βέλτιστο σημείο απόθεσης του *B. rumilus* ACA-DC 4061 παρουσιάζεται στον πίνακα που ακολουθεί:

Αποτελέσματα

Πίνακας 19: Πραγματικές τιμές των παραγόντων σχεδιασμού και η αντιστοίχισή τους στις μεταβλητές του συστήματος.

Παράγοντες σχεδιασμού	-1	0	1	Βέλτιστες (Κωδικές τιμές)	Βέλτιστες (Φυσικές τιμές)
X_1 : Θερμοκρασία (°C)	25	30	35	-1.0/0.0 ¹	25/30 ¹
X_2 : Συγκέντρωση θρεπτικού (g /100 mL)	0.36	0.72	1.08	1.0	1.08
X_3 : Όγκος εμβολιασμού (mL)	0.5	1.0	1.5	0.0	1.0

¹ 30 °C επελέγη ως η επιπλέον βέλτιστη θερμοκρασία.

Η ανάλυση των δειγμάτων ως προς το σχηματισμό βατερίτη, ασβεστίτη και μειγμάτων τους παρουσιάζεται στον Πίνακα 20.

Πίνακας 20: Συγκενρωτικά αποτελέσματα ανάλυσης δειγμάτων ανθρακικού ασβεστίου από το σύνολο των πειραμάτων βελτιστοποίησης του μικροοργανισμού *Bacillus pumilus* ACA-DC 4061.

Θερμοκρασία (°C)	Συγκέντρωση θρεπτικού (g/100ml)	Όγκος εμβολιασμού (ml)	Αριθμός δείγματος	FT - IR
25	0.36	1	598	Βατερίτης
25	0.36	1	611	Βατερίτης
25	0.36	1	633	Βατ. + Ασβ.
25	0.36	1	653	Βατ. + Ασβ.
25	0.36	1	675	Βατ. + Ασβ.
25	1.08	1	599	Βατερίτης
25	1.08	1	612	Βατερίτης
25	1.08	1	642	Βατ. + Ασβ.
25	1.08	1	657	Βατ. + Ασβ.
25	1.08	1	667	Βατ. = Ασβ.
25	0.72	0.5	577	Βατερίτης
25	0.72	0.5	616	Ασβ. + βατ.(ελαχ)
25	0.72	0.5	645	Ασβ. + βατ.(ελαχ)
25	0.72	0.5	651	Βατερίτης
25	0.72	0.5	669	Βατ.+ Ασβ.(ελαχ)
25	0.72	1.5	597	Ασβεστίτης
25	0.72	1.5	621	Ασβ. = Βατ.
25	0.72	1.5	498	Βατερίτης
25	0.72	1.5	654	Ασβ. + Βατ.
25	0.72	1.5	664	Ασβ. + Βατ.
35	0.36	1	602	Βατ. + Ασβ. (ελαχ)
35	0.36	1	618	Βατερίτης
35	0.36	1	640	Βατερίτης
35	0.36	1	646	Βατερίτης
35	0.36	1	674	Βατ. + Ασβ.
35	1.08	1	600	Βατερίτης
35	1.08	1	630	Βατερίτης
35	1.08	1	643	Βατερίτης
35	1.08	1	655	Βατερίτης
35	1.08	1	671	Βατερίτης
35	0.72	0.5	609	Βατερίτης
35	0.72	0.5	626	Βατερίτης
35	0.72	0.5	634	Βατερίτης
35	0.72	0.5	650	Βατερίτης
35	0.72	0.5	673	Βατερίτης
35	0.72	1.5	607	Βατερίτης
35	0.72	1.5	619	Βατ.+Ασβ (ελαχ)
35	0.72	1.5	562	Βατερίτης
35	0.72	1.5	659	Βατερίτης
35	0.72	1.5	676	Βατερίτης
30	0.72	1	591	Βατερίτης
30	0.72	1	622	Βατερίτης
30	0.72	1	627	Βατ. + Ασβ.
30	0.72	1	647	Ασβεστίτης
30	0.72	1	663	Βατ.+ Ασβ.(ελαχ)
30	0.72	1	608	Βατερίτης

Αποτελέσματα

30	0.72	1	624	Βατερίτης
30	0.72	1	605	Ασβ. + βατ. (λίγο)
30	0.72	1	656	Βατ. + Ασβ. (ίσες)
30	0.72	1	670	Βατερίτης
30	0.72	1	603	Ασβεσίτης
30	0.72	1	617	Βατερίτης
30	0.72	1	644	Ασβεσίτης
30	0.72	1	652	Βατερίτης
30	0.72	1	668	Ασβ. + βατ.(ελαχ)
30	0.36	0.5	581	Ασβ. + βατ. (λίγο)
30	0.36	0.5	615	Βατερίτης
30	0.36	0.5	623	Βατερίτης
30	0.36	0.5	658	Ασβ.+ Βατ.
30	0.36	0.5	677	Ασβ.+ Βατ. (λίγο)
30	1.08	0.5	568	Βατερίτης
30	1.08	0.5	613	Βατερίτης
30	1.08	0.5	637	Βατερίτης
30	1.08	0.5	648	Βατερίτης
30	1.08	0.5	678	Βατερίτης
30	0.36	1.5	604	Ασβ. + βατ. (λίγο)
30	0.36	1.5	610	Βατ+ Ασβ (λίγο)
30	0.36	1.5	636	Βατερίτης
30	0.36	1.5	661	Βατερίτης
30	0.36	1.5	672	Βατερίτης
30	1.08	1.5	601	Βατερίτης
30	1.08	1.5	629	Βατερίτης
30	1.08	1.5	641	Βατερίτης
30	1.08	1.5	660	Βατερίτης
30	1.08	1.5	628	Βατερίτης

Στους 25 °C εμφανίζονται βατερίτης και ασβεσίτης σε όλα σχεδόν τα δοκίμια, ενώ δεν μπορεί να αναγνωριστεί κάποια τάση προς το σχηματισμό ενός εκ των δύο βάσει της συγκέντρωσης θρεπτικού. Στους 30 °C και στη χαμηλότερη συγκέντρωση, αναγνωρίστηκαν και οι δύο μορφές. Αυξάνοντας τη συγκέντρωση (BP2x) ο βατερίτης εμφανίζεται συχνότερα ως μοναδική δομή, αλλά υπάρχουν και δείγματα τα οποία είχαν κυρίως ασβεσίτη. Στη μέγιστη συγκέντρωση (BP3x) ταυτοποιήθηκε μόνο βατερίτης. Στην υψηλότερη θερμοκρασία (35 °C), ο βατερίτης επικρατεί ανεξαρτήτως συγκέντρωσης θρεπτικού. Επομένως, η θερμοκρασία οδηγεί στο σχηματισμό βατερίτη, καθώς επίσης και η υψηλότερη συγκέντρωση θρεπτικού.

3.8.2 Τελικό Πείραμα Επιβεβαίωσης Βέλτιστου Σημείου

Όπως παρουσιάστηκε παραπάνω, η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έδωσε το μέγιστο στους 25 °C. Επιλέγη όμως να δοκιμαστεί παράλληλα και η επιπλέον θερμοκρασία των 30 °C, διότι η μέση τιμή απόθεσης είναι μεγαλύτερη. Οι αρχικές συνθήκες εμβολιασμού ήταν παρόμοιες (9.2×10^6 cfu/mL στους 25 °C and 4.3×10^7 cfu/mL στους 30 °C), ξεκινώντας ουσιαστικά από το ίδιο σημείο. Το λευκό γαλάκτωμα, που υποδεικνύει ποιοτικά και την εκκίνηση σχηματισμού του νέου υλικού, με ταυτόχρονη αφομοίωση του οξικού ανιόντος, δημιουργήθηκε μετά από περίπου 72 ώρες. Το χρώμα των διαλυμάτων, καθόλη τη διάρκεια των πειραμάτων, παρέμεινε το ίδιο, επιβεβαιώνοντας έτσι ποιοτικά ότι δεν υπήρξε κάποια αρνητική αλλαγή στον μεταβολισμό του μικροοργανισμού.

Η διαδικασία κατανάλωσης του οξικού ασβεστίου παρουσιάζεται στα γραφήματα του Σχήματος 6. Η κατανάλωση οξικού, ξεκινά οριακά γρηγορότερα στους 25 °C (Σχήμα 6 a) και είναι ταχύτερη (Σχήμα 6 c) για τις πρώτες ημέρες με μέγιστο την 9^η. Στη συνέχεια παρατηρείται σημαντική μείωση. Στους 30 °C η καθυστέρηση των τριών πρώτων ημερών ανακτάται στο επόμενο διάστημα (3^η – 6^η ημέρα), φτάνοντας σε χαμηλότερο μέγιστο και διατηρείται έως την ολοκλήρωση της διαδικασίας ουσιαστικά σταθερή. Και στα δύο πειράματα, το τελικό σημείο με μικρές ποσότητες οξικού αχρησιμοποίητες, είναι το ίδιο. Η πορεία αφομοίωσης οξικού επηρέασε τον μικροβιακό πληθυσμό. Στο μέγιστο του ρυθμού κατανάλωσης οξικού, ανιχνεύτηκε και το μέγιστο της συγκέντρωσης των βακτηρίων. Το τελικό σημείο ήταν το ίδιο, αλλά η πορεία μείωσης προς αυτό ήταν πιο απότομη στους 25 °C από ότι στους 30 °C (Σχήμα 6 e).

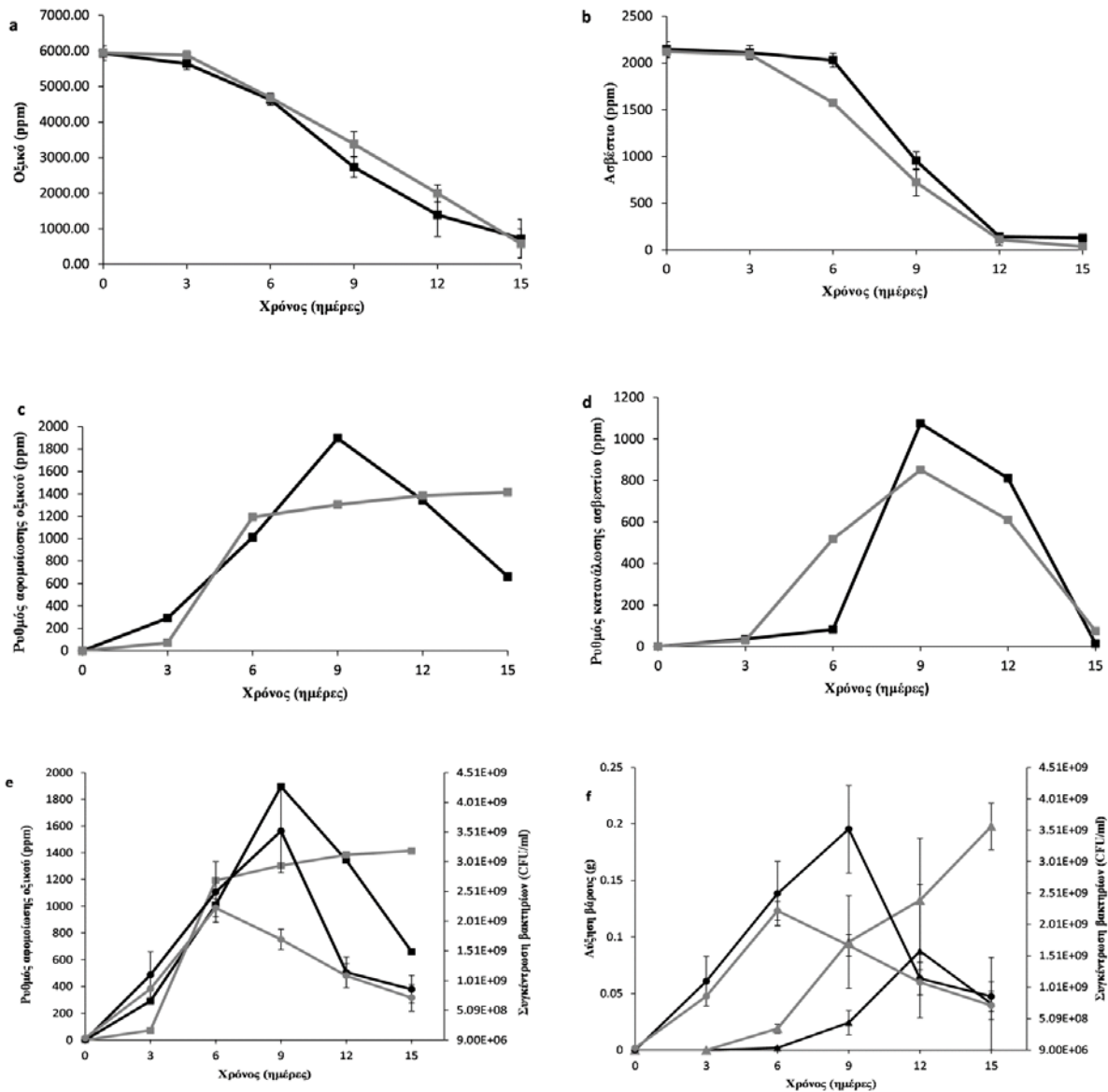
Ο ρυθμός κατανάλωσης των κατιόντων ασβεστίου ξεκινά από το ίδιο σημείο, αλλά η κατανάλωση σε απόλυτες τιμές είναι ταχύτερη στην υψηλότερη θερμοκρασία (Σχήμα 6 b). Ο ρυθμός ακινητοποίησης των κατιόντων είναι επίσης ομαλότερους στους 30 °C (Σχήμα 6 d), ενώ η σχεδόν πλήρης εξάντλησή τους, ανιχνεύτηκε την ίδια πειραματική ημέρα. Αναδεικνύεται, ότι η διάρκεια ακινητοποίησης και απόθεσης του νέου υλικού διαρκεί περίπου 12 ημέρες στους 30 °C και 9 ημέρες στους 25 °C (λαμβάνοντας υπόψη και το διάστημα 12^{ης} – 15^{ης} ημέρας όπου εξαντλείται πλήρως).

Η μεταβολή βάρους στα δοκίμια ακολουθεί την πορεία συγκέντρωσης των κυττάρων (Σχήμα 6 f). Η αύξηση βάρους στους 30 °C ανιχνεύεται την 6^η ημέρα και διατηρεί αυξητική πορεία. Καθώς ο πληθυσμός μειώνεται, η απόθεση αυξάνεται έως το τέλος του πειράματος. Στους 25 °C, ο *B. pumilus* ACA-DC 4061 δείχνει τη μέγιστη απόθεση στα δοκίμια μαρμάρου

Αποτελέσματα

την 12^η ημέρα, δηλαδή στην επόμενη σειρά δειγμάτων που ελήφθησαν μετά το μέγιστο του πληθυσμού την 9^η ημέρα. Η απόθεση όμως διακόπηκε και δεν συνεχίστηκε και στα δείγματα της τελευταίας ημέρας.

Από την όλη διαδικασία αναδεικνύεται ότι οι 30 °C αποτελούν το πραγματικό βέλτιστο σημείο. Ο συνδυασμός σταθερής αφομοίωσης οξικού ανιόντος, με χαμηλότερη συγκέντρωση κυττάρων και η μεγαλύτερη διάρκεια «εκμετάλλευσης» των κατιόντων ασβεστίου, οδήγησε στη βέλτιστη επικάλυψη των δοκιμίων.



Σχήμα 6: Γραφικές παραστάσεις κατανάλωσης οξικών ανιόντων και κατιόντων ασβεστίου στις δύο πειραματικές θερμοκρασίες: **(a)** (■) αφομοίωση οξικού στους 25 °C και (■) αφομοίωση οξικού στους 30 °C; **(b):** (■) κατανάλωση ασβεστίου στους 25 °C και (■) κατανάλωση ασβεστίου στους 30 °C; **(c):** (■) ρυθμός αφομοίωσης οξικού στους 25 °C και (■) ρυθμός αφομοίωσης οξικού στους 30 °C; **(d):** (■), ρυθμός κατανάλωσης ασβεστίου στους 25 °C και (■) ρυθμός κατανάλωσης ασβεστίου στους 30 °C; **(e):** (■) αφομοίωση οξικού και (●) συγκέντρωση βακτηρίων στους 25 °C, (■) αφομοίωση οξικού και (●) συγκέντρωση βακτηρίων στους 30 °C; **(f):** (▲) αύξηση βάρους και (●) συγκέντρωση βακτηρίων στους 25 °C, (▲) αύξηση βάρους και (●) συγκέντρωση βακτηρίων στους 30 °C. Μπάρες: Τυπική απόκλιση.

Το σύνολο των δειγμάτων και από τα δύο πειράματα αναλύθηκαν με FT-IR. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον Πίνακα 18 που ακολουθεί. Εξαιρώντας τις πρώτες 3 ημέρες όπου δεν υπήρξε απομονώσιμο δείγμα, η επώαση σε μεγαλύτερη θερμοκρασία προωθεί αποκλειστικά το σχηματισμό βατερίτη. Αντίθετα, στους 25 °C, ο ασβεστίτης εμφανίζεται

στις πρώτες ημέρες επώασης, έως ότου η αφομοίωση του οξικού αυξηθεί στο βαθμό που ο μεταβολισμός είναι γρηγορότερος και ο σχηματισμός ανθρακικού ασβεστίου πιο εμφανής. Ο βατερίτης εμφανίζεται μόνο όταν οι συγκεντρώσεις και του ασβεστίου και του οξικού έχουν αρχίσει να μειώνονται ουσιαστικά.

Πίνακας 21: Δομή ανθρακικού ασβεστίου από πειράματα επιβεβαίωσης βέλτιστων σημείων του *Bacillus pumilus* T6.

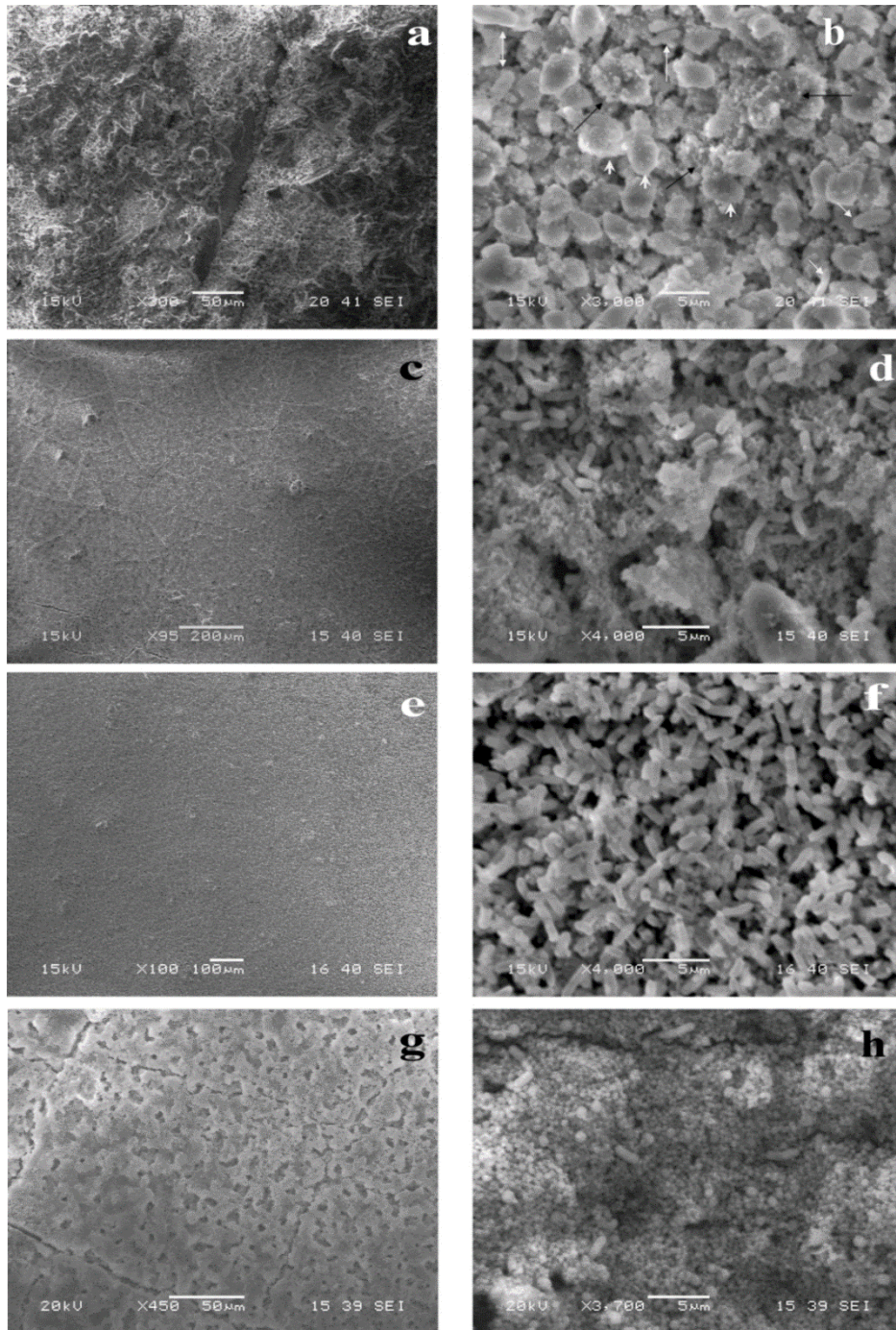
Ημ. επώασης	30 °C		25 °C	
	Αρ. δείγματος	FT-IR	Αρ. δείγματος	FT-IR
3	694	-	717	-
3	699	-	713	-
3	697	-	714	-
3	683	-	716	-
6	690	Βατερίτης	703	Ασβεστίτης
6	684	Βατερίτης	705	Ασβεστίτης
6	685	Βατερίτης	704	Ασβ-Βατ
6	689	Βατερίτης	702	Ασβεστίτης
9	692	Βατερίτης	708	Βατ-Ασβ
9	698	Βατερίτης	707	Βατ-Ασβ
9	691	Βατερίτης	709	Βατ-Ασβ
9	696	Βατερίτης	706	Βατερίτης
12	695	Βατερίτης	710	Βατερίτης
12	681	Βατερίτης	711	Βατερίτης
12	686	Βατερίτης	712	Βατερίτης
12	693	Βατερίτης	715	Βατερίτης
15	687	Βατερίτης	719	Βατερίτης
15	680	Βατερίτης	720	Βατερίτης
15	688	Βατερίτης	724	Βατερίτης
15	682	Βατερίτης	718	Βατερίτης

Η ηλεκτρονική μικροσκοπία επικεντρώθηκε σε δείγματα των 30 °C. Σε δείγμα της 3^{ης} ημέρας, χωρίς θετική μεταβολή βάρους, δεν παρατηρήθηκαν μορφές που υποδεικνύουν την εκκίνηση της απόθεσης. Το μόνο που ανιχνεύτηκε ήταν πολυεδρικές μορφές, οι οποίες παρέπεμπαν σε θραύσματα του δοκιμίου. Στην Εικόνα 33, παρουσιάζεται η διαδικασία απόθεσης για τις υπόλοιπες πειραματικές ημέρες.

Η αρχική απόθεση ξεκινά, όπως αναμενόταν, σε εσοχές των κρυστάλλων ασβεστίτη του μαρμάρινου δοκιμίου (Εικόνα 33 a). Βατερίτης είναι η μοναδική αλλόμορφη δομή του ανθρακικού ασβεστίου στην όλη διαδικασία, δίνοντας δύο κύριες μορφολογίες (Εικόνα 33 b): ράβδοι που παραπέμπουν στις διαστάσεις των κυτταρικών μεμβρανών και σφαιρικές μορφές (ωοειδείς), οι οποίες μπορούν να αποδοθούν στην περαιτέρω απόθεση γύρω από τα

κύτταρα. Οι ωοειδείς μορφές, «προδίδουν» τον τρόπο σχηματισμού τους από τις μικριτικές σφαίρες, οι οποίες φαίνονται να καλύπτουν σποραδικά ήδη σχηματισμένες μορφολογίες, επεκτείνοντας ουσιαστικά τον όγκο και τη μορφή κάθε κυττάρου το οποίο καλύφθηκε από ανθρακικό ασβέστιο. Η συνέχεια της απόθεσης εξελίσσεται με την επικάλυψη νέων ποσοτήτων ανθρακικού ασβεστίου, ίδιας μορφολογίας και κυρίως κυττάρων και μικριτικών σφαιρών (Εικόνα 33 d), σχηματίζοντας μια ενιαία επιφάνεια βατερίτη (Εικόνα 33 c). Την 12^η ημέρα (Εικόνα 33 e), η μορφολογία φαίνεται να είναι περισσότερο «ραβδόμορφη» (Εικόνα 33 f). Τα κύτταρα τα οποία επικαλύπτονται πλήρως από βατερίτη αποτίθενται στην επιφάνεια και ο συνολικός πληθυσμός στο διάλυμα μειώνεται. Τέλος τη 15^η ημέρα είναι εμφανής η τελευταία βιο-απόθεση βατερίτη (Εικόνα 33 g), όπου επικρατεί το αντίστροφο: μικροκρυσταλλικές σφαίρες οι οποίες σχηματίζονται στο μικροπεριβάλλον των ζωντανών κυττάρων, αλλά δεν είναι επαρκείς οι ποσότητες για να επικαλύψουν το σύνολο της κυτταρικής μεμβράνης (Εικόνα 33 h).

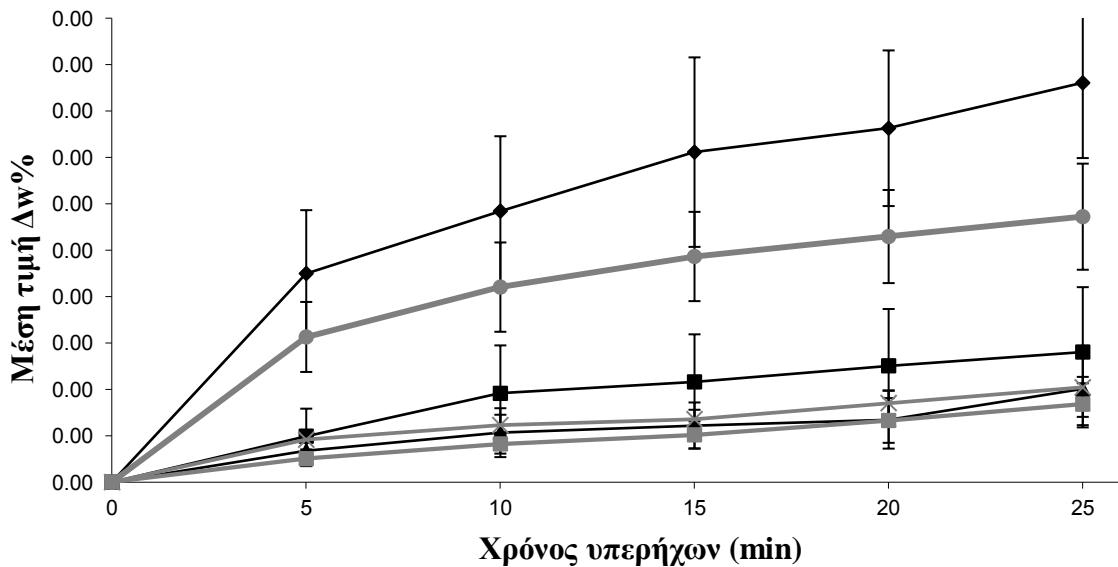
Αποτελέσματα



Εικόνα 33: Φωτογραφίες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας υπό τις βέλτιστες συνθήκες επώασης στους 30°C του *B. pumilus* ACA-DC 4061. (a) Αρχική πανοραμική εικόνα απόθεσης κατά την 6^η πειραματική ημέρα; (b) μεγέθυνση της (a) όπου φαίνονται οι διαφορετικές μορφολογίες: ράβδοι κυττάρων (λευκά λεπτά βέλη), μικριτικές σφαίρες (μαύρα βέλη), ωοειδείς σφαιρικές μορφές (λευκές αιχμές βέλους); (c) απόθεση την 9^η ημέρα; (d) μεγέθυνση της (c) με μικριτικές σφαίρες και ράβδους που αντιστοιχούν στα κύτταρα να επικρατούν; (e) απόθεση την 12^η ημέρα; (f) μεγέθυνση της (e) όπου ο σχηματιζόμενος βατερίτης είναι ως επί το πλείστον ράβδοι; (g) απόθεση την 15^η ημέρα όπου φαίνεται ευκολότερα η νέα επικάλυψη βατερίτη; (h) μεγέθυνση της (g) όπου οι μικριτικές σφαίρες σχηματίζουν το τελευταίο στρώμα απόθεσης.

3.8.3 Δοκιμή Αντοχής Επικάλυψης με Εφαρμογή Υπερήχων

Η εφαρμογή υπερήχων στα δοκίμια του βέλτιστου σημείου των 30 °C εμφάνισε τη θετική επίδραση της απόθεσης βατερίτη στην επιφάνεια των μαρμάρων:



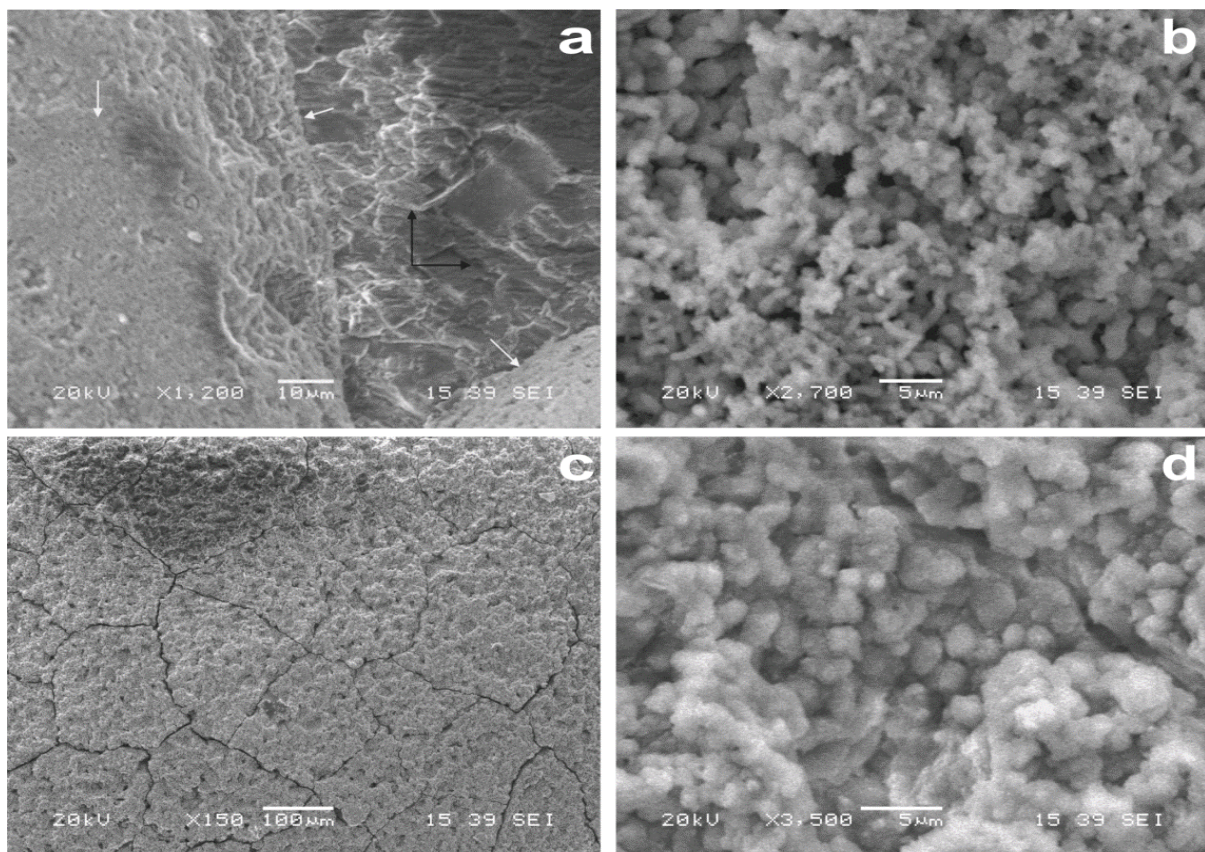
Σχήμα 7: Γραφική παράσταση της μείωσης βάρους μαρμαρίνων δοκιμίων πειράματος βέλτιστης απόθεσης στους 30°C, κατά τη διάρκεια της εφαρμογής υπερήχων. Κάθε γραμμή αντιστοιχεί στη μέση τιμή της μείωσης βάρους τριών δοκιμίων, απομονωμένα κατά τις διαφορετικές πειραματικές ημέρες: (♦) 3η ημέρα επώασης; (■) 6η ημέρα επώασης; (▲) 9η ημέρα επώασης; (■) 12η ημέρα επώασης; (×) 15η ημέρα επώασης και (●) τυφλό δοκίμιο μαρμάρου.

Παρατηρήθηκε ουσιαστική επίδραση στην αντοχή, στα δείγματα της 6^{ης} ημέρας και εξής (Σχήμα 7). Από τη στιγμή που ανιχνεύτηκε απόθεση στα δοκίμια, η μεγαλύτερη αντοχή εμφανίστηκε στα δείγματα της 12^{ης} ημέρας, με αυτά της 15^{ης} να χάνουν ελαφρά περισσότερο νέο υλικό. Γενικότερα όμως, ο βατερίτης προσφέρει ουσιαστική στερεοποίηση στην επιφάνεια στην οποία αποτίθεται, το οποίο αποδεικνύεται και από τις φωτογραφίες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας και των λεπτών τομών δειγμάτων.

Στην Εικόνα 34 που ακολουθεί, παρουσιάζονται δείγματα της 12^{ης} (Εικόνες 34 a, b) και 15^{ης} ημέρας επώασης (Εικόνες 34 c, d), μετά την υποβολή των δειγμάτων σε υπερήχους. Ως γενική παρατήρηση, η μορφολογία δεν διαφοροποιείται. Οι μορφές οι οποίες περιγράφηκαν για τις αντίστοιχες πειραματικές ημέρες, πριν τους υπερήχους, διατηρούνται με μικρές διαφορές, αποδεικνύοντας την ανθεκτικότητα του βατερίτη και την ουσιαστική

Αποτελέσματα

σύνδεσή του στην επιφάνεια του μαρμάρου. Στην Εικόνα 34 a, παρουσιάζεται σημείο κοντά στο άκρο του δοκιμίου όπου υπάρχει κενό και φαίνεται και η επιφάνεια του μαρμάρου. Είναι εμφανής η διαφορά ύψους της νέας επικάλυψης με τη μαρμάρινη επιφάνεια. Θραύσματα μαρμάρου αλλά και επικαθίσεις οι οποίες δεν έχουν συνοχή με το υπόστρωμα απομακρύνθηκαν. Η μορφολογία του βατερίτη (Εικόνα 34 b) διατηρείται, παρόλο που η πληθώρα μορφών σε σχήμα ράβδου που είχαν παρατηρηθεί, δεν φαίνεται σε ανάλογη ένταση όπως στην Εικόνα 33 f. Πιθανώς αποκολλήθηκαν, μιας και η επιφάνεια υποβλήθηκε σε ισχυρότερες δυνάμεις κατά τη διαδικασία των υπερήχων. Η επιφάνεια που υπήρχε από κάτω διατηρήθηκε ανέπαφη με παρόμοιες μορφές μικριτικές σφαίρες ή ράβδους.

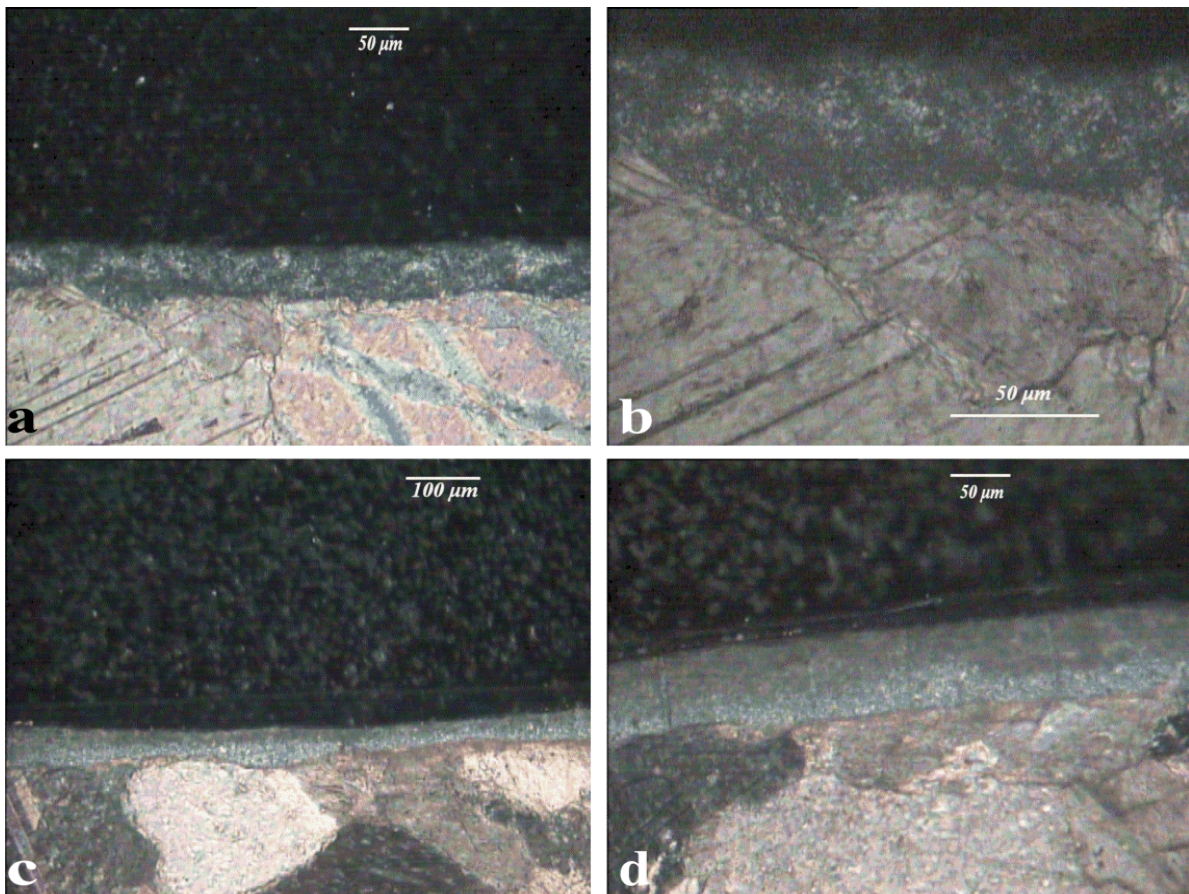


Εικόνα 34: Φωτογραφίες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας δειγμάτων μετά την υποβολή τους σε υπερήχους: **(a)** δείγμα 12^{ης} πειραματικής ημέρας όπου παρουσιάζεται διαφορά καλυμμένης (λευκά βέλη) και μη καλυμμένης επιφάνειας (μαύρα βέλη). Είναι εμφανής η διαφορά ύψους των δύο επιφανειών καθώς και η πλήρης καθαρισμός της επιφάνειας του μαρμάρου από θραύσματα ή από μη συνεκτικές επικαθίσεις βατερίτη; **(b)** μεγέθυνση της (a) όπου φαίνεται η επιφάνεια να αποτελείται από ράβδους κυττάρων και μικριτικές σφαίρες; **(c)** επιφάνεια 15^{ης} πειραματικής ημέρας; **(d)** μεγέθυνση της (c) που παρουσιάζει την μορφολογία μετά τους υπερήχους έχοντας μια πιο συνεκτική και συμπαγή μορφή.

Τα δείγματα της 15^{ης} ημέρας, σε χαμηλή μεγέθυνση (Εικόνα 34 c), δείχνουν την ίδια μορφολογία όπως και προηγουμένως. Όμως η πληθώρα μικριτικών σφαιρών που είχε παρατηρηθεί, αντικαταστάθηκε κυρίως από μια συμπαγέστερη επιφάνεια η οποία προέρχεται από τη συσσωμάτωση των διαφορετικών μορφολογιών δίνοντας μεγαλύτερη αντοχή (Εικόνα 34 d). Είναι αναμενόμενο να απομακρύνεται μέρος από την επιφάνεια που υπάρχει, μιας και η μείωση βάρους οφείλεται, εν μέρει, σε απώλειες από την επιφάνεια του βατερίτη.

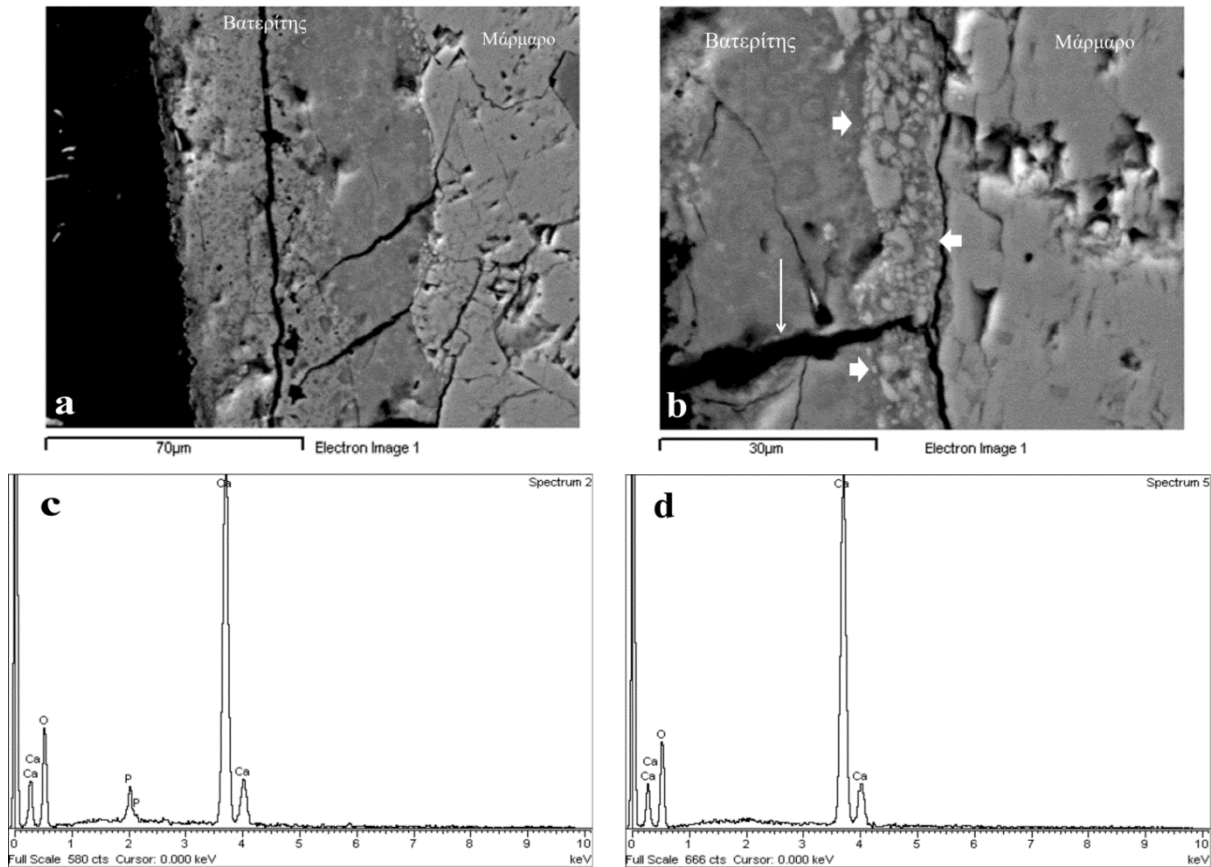
3.8.4 Λεπτές τομές δοκιμίων και στοιχειακή ανάλυση

Τα δείγματα κόπηκαν σε λεπτές τομές. Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 35, οι φωτογραφίες οπτικού μικροσκοπίου υπό πολωμένο φως αποδεικνύουν το σχηματισμό μιας ενιαίας επιφάνειας βατερίτη ακολουθώντας το ανάγλυφο του δοκιμίου. Εσωτερικά, ο βατερίτης δείχνει συμπαγής και συνεκτικός, χωρίς να παρατηρούνται ουσιαστικά κενά (Εικόνες 35 b και d).



Εικόνα 35: Φωτογραφίες οπτικού μικροσκοπίου λεπτών τομών δειγμάτων μετά από την υποβολή τους στους υπερήχους: (a, b) 12^η πειραματική ημέρα και (c, d) 15^η πειραματική ημέρα.

Ρωγμές στο εσωτερικό του νέου υλικού παρατηρήθηκαν, όταν οι λεπτές τομές τοποθετήθηκαν στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο για περαιτέρω έλεγχο και ημι-ποσοτική ανάλυση. Το δείγμα της Εικόνας 36 είναι από τη 1^η πειραματική ημέρα, η οποία παρουσίασε την καλύτερη αντοχή στους υπερήχους. Το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο προσφέρει υψηλότερη ανάλυση, όπου φαίνονται ρήγματα στο εσωτερικό του βατερίτη, λόγω της προετοιμασίας των λεπτών τομών. Στην Εικόνα 36 a επιβεβαιώνεται ότι το νέο υλικό ακολουθεί το ανάγλυφο της μαρμάρινης επιφάνειας. Επίσης, παρατηρώντας την επιφάνεια του βατερίτη διακρίνονται μικρές οπές και το υλικό δείχνει λιγότερο συμπαγές, ενώ κοντά στην επιφάνεια του δοκιμίου το υλικό είναι συνεκτικότερο. Μεγαλύτερη ευκρίνεια δίνεται στην Εικόνα 36 b, όπου πράγματι το υλικό είναι περισσότερο συμπαγές κοντά στο μάρμαρο, ενώ φαίνεται καθαρά ότι ο βατερίτης κατάφερε να στερεώσει τα θραύσματα μαρμάρου τα οποία βρίσκονταν στην επιφάνεια (λευκές κεφαλές βέλους). Η αντοχή του βιο-υλικού αναδεικνύεται και από την ενιαία αποκόλλησή του από το υπόστρωμα, μαζί όμως με τα θραύσματα τα οποία είχε ενσωματώσει. Το ότι τα θραύσματα προέρχονται από το μάρμαρο, αποδεικνύεται από τις ημι-ποσοτικές αναλύσεις οι οποίες έδειξαν καθαρό ανθρακικό ασβέστιο (Εικόνα 36 d). Αντίθετα, ο βατερίτης παρουσιάζει την επιπλέον κορυφή που αντιστοιχεί σε φώσφορο και εμφανίζεται αποκλειστικά στις νέες αποθέσεις.



Εικόνα 36: Φωτογραφίες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας και ημι-ποσοτική ανάλυση λεπτών τομών: **(a)** λεπτή τομή από δοκίμιο 12^{ης} ημέρας απομόνωσης όπου παρουσιάζεται η απόθεση βατερίτη και ποιοτικά η πυκνότητά του. Όσο πιο κοντά στην εξωτερική επιφάνεια του βατερίτη, τόσο περισσότερες οπές παρατηρούνται, σε αντίθεση με την απόθεση κοντά στο μάρμαρο; **(b)** μεγέθυνση άλλου σημείου λεπτής τομής όπου παρουσιάζεται η βιο-στερέωση θραυσμάτων μαρμάρου από τον βατερίτη (λευκές κεφαλές βέλους), καθώς και εγκάρσιο σπάσιμο του υλικού (λευκό βέλος), λόγω της διαδικασίας προετοιμασίας δείγματος; **(c)** ημι-ποσοτική ανάλυση βατερίτη με την επιπλέον κορυφή φωσφόρου; **(d)** ημι-ποσοτική ανάλυση μαρμαρίνου δοκιμίου όπου απουσιάζει η κορυφή φωσφόρου.

3.8.5 Χρωματική Αλλαγή στα Δοκίμια

Οι χρωματικές συντεταγμένες μετά το πέρας των πειραμάτων και την υποβολή των δειγμάτων σε υπερήχους, παρουσιάζονται στον Πίνακα 22. Δείγματα τα οποία καλύφθηκαν με τον βατερίτη είχαν ανιχνεύσιμη χρωματική διαφορά. Από τις χρωματικές συντεταγμένες, οι ΔL^* και Δa^* δεν έδειξαν σημαντική διαφοροποίηση σε σχέση με το τυφλό. Οι τιμές όμως στον άξονα b^* (κίτρινο θετικές τιμές – μπλε αρνητικές τιμές) παρουσίασαν θετική μεταβολή αναδεικνύοντας την κίτρινη χροιά του νέου υλικού. Επομένως, η συνολική ΔE^* επηρεάζεται από τη μεταβολή στον άξονα b^* . Το ΔE^* ξεπέρασε το όριο του $\Delta E^* \geq 3$, το οποίο λαμβάνεται ως το όριο που οι διαφορές γίνονται αντιληπτές από γυμνό οφθαλμό. Η πλειοψηφία των τιμών εμπίπτει στο $3.5 < \Delta E^* < 6$. Όταν τα δείγματα συγκρίνονται με πραγματικά δοκίμια

Αποτελέσματα

αρχαίων μνημείων, τα οποία έχουν υποστεί περιβαλλοντική φθορά, οι τιμές είναι πολύ μεγαλύτερες, που σημαίνει ότι η νέα απόθεση γίνεται αντιληπτή.

Πίνακας 22: Χρωματικές συντεταγμένες δοκιμίων μαρμάρου από το πείραμα επιβεβαίωσης του βέλτιστου σημείου *B. pumilus* ACA-DC 4061 του μετά την υποβολή τους σε υπερήχους και εφαρμογής ψεκασμού.

Δείγματα	Avg ΔL^*	Avg Δa^*	Avg Δb^*	Avg ΔE^{*1}	Avg ΔE^{*2}	Avg ΔE^{*3}
Μάρμαρα 3 ^{ης} ημέρας	0.06	0.13	0.04	0.22	16.76	18.60
Μάρμαρα 6 ^{ης} ημέρας	-1.31	-0.18	2.75	2.66	14.63	16.29
Μάρμαρα 9 ^{ης} ημέρας	-2.13	-0.28	3.15	4.09	13.55	15.14
Μάρμαρα 12 ^{ης} ημέρας	-1.42	-0.38	4.69	4.96	13.78	15.05
Μάρμαρα 15 ^{ης} ημέρας	-1.05	-0.65	6.22	6.37	13.92	14.88
Εφαρμογή ψεκασμού	1.29	-0.51	2.52	2.94	12.21	14.20
	L*	a*	b*			
Τυφλό μάρμαρο πειραμάτων	90.56	-0.85	-1.37			
Μάρμαρο χωρίς επεξεργασία από πείραμα ψεκασμού	84.98	-0.9	-1.99			
Δείγμα αρχαίου μαρμάρου εκτεθειμένο στο περιβάλλον από τον 5 ^ο Αιώνα π.Χ.	75.94	1.09	6.55			
Δείγμα αρχαίου μαρμάρου εκτεθειμένο στο περιβάλλον από τον 4 ^ο Αιώνα π.Χ.	75.73	1.5	9.59			

Κάθε δείγμα είναι ο μέσος όρος τριών δοκιμίων. Για την εφαρμογή με ψεκασμό, κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος 5 δειγμάτων. Για κάθε δοκίμιο μετρήθηκαν πέντε διαφορετικά σημεία στην επιφάνεια και η μέση τιμή υπολογίστηκε αυτόματα από το λογισμικό του χρωματόμετρου. Για το τυφλό μάρμαρο παρουσιάζονται οι απόλυτες τιμές του, καθώς δεν παρατηρήθηκε καμία διαφορά. Για τα αρχαία δείγματα οι τιμές αντιστοιχούν σε μέσες τιμές όπως παραπάνω.

¹ ΔE^* υπολογίστηκε με δείγμα αναφοράς το τυφλό μάρμαρο από τα πειράματα βέλτιστου σημείου.

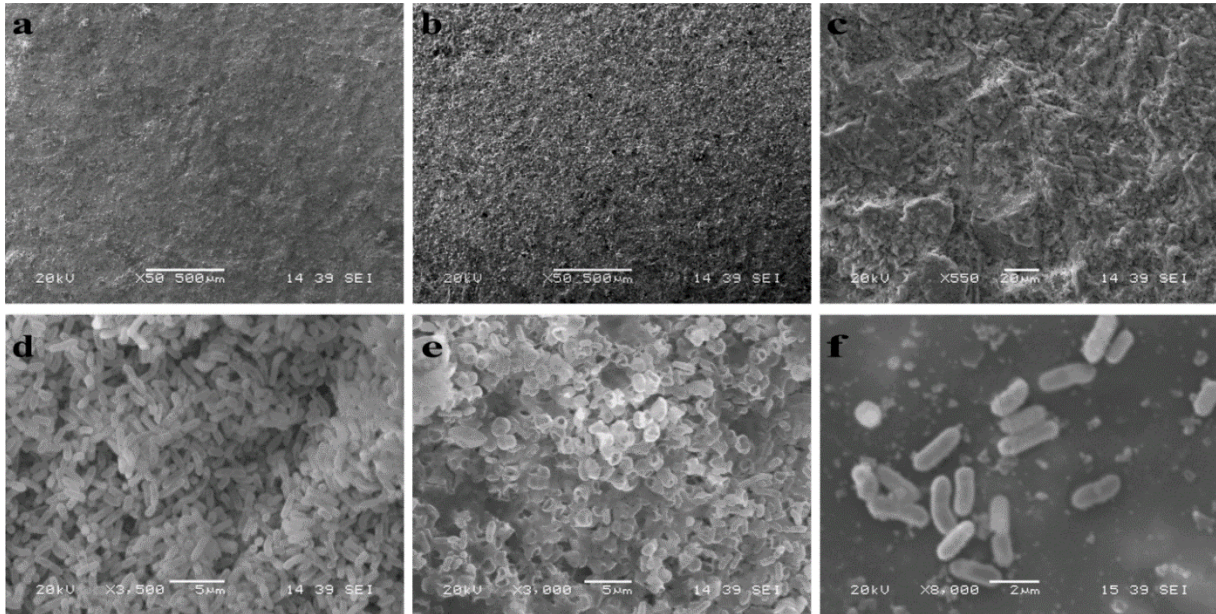
² ΔE^* υπολογίστηκε με δείγμα αναφοράς το αρχαίο δείγμα #1, 5^ο αιώνα π.Χ.

³ ΔE^* υπολογίστηκε με δείγμα αναφοράς το αρχαίο δείγμα #2, 4^ο αιώνα π.Χ.

3.8.6 Πειράματα Απόθεσης Ανθρακικού Ασβεστίου σε μη Αποστειρωμένες Συνθήκες

Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν ίδια με αυτήν για τον *C. metallidurans* ACA-DC 4073, με τις απαραίτητες διαφοροποιήσεις στη διάρκεια χρήσης κάθε φιάλης για ψεκασμό. Οι φιάλες χρησιμοποιήθηκαν μετά από 72 και έως 96 ώρες από τη στιγμή εμβολιασμού τους, έτσι ώστε να εξασφαλιστεί ότι η διαδικασία απόθεσης δεν έχει ξεκινήσει σε σημαντικό βαθμό, μιας και στα πειράματα βέλτιστου σημείου (30 °C), αυτό είχε ήδη συμβεί την 6^η ημέρα (144 ώρες). Το χρώμα του διαλύματος στις 72 ώρες, ήταν λευκό γαλάκτωμα το οποίο αποτέλεσε ένδειξη της εκκίνησης αφομοίωσης οξικού ανιόντος. Οι αρχικές συγκεντρώσεις κυττάρων ήταν ανάλογες του βέλτιστου πειράματος, ενώ ο όγκος του διαλύματος ήταν ο ελάχιστος δυνατός (10 mL). Τα αποτελέσματα παρουσιάζουν την ελάχιστη δυνατή απόθεση που μπορεί να επιτευχθεί υπό αυτές τις συνθήκες με διάρκεια πειράματος τις 10 ημέρες.

Στις πρώτες εικόνες (Εικόνα 37 a, b), παρουσιάζεται πανοραμικά η επιφάνεια δύο διαφορετικών δοκιμίων, όπου οι κρύσταλλοι ασβεστίτη του μαρμάρου δεν είναι ορατοί όπως κανονικά θα ήταν σε περίπτωση μειωμένης επικάλυψης (Εικόνα 37 c). Αυτό επιβεβαιώνει ότι ο μικροοργανισμός προκάλεσε την απόθεση νέου υλικού. Το είδος αυτού είναι βατερίτης, κρίνοντας από τις φωτογραφίες σε μεγαλύτερη μεγέθυνση. Η επικρατούσα μορφή είναι ράβδοι (Εικόνα 37 d), διαστάσεων των κυττάρων του βακίλου. Επίσης παρατηρήθηκαν ημισφαιρικές ή ραβδοειδείς μορφές, οι οποίες είχαν κενό στο ένα άκρο τους και από το οποίο πιθανότατα να «διέφυγε» ο μικροοργανισμός πριν την πλήρη ενσωμάτωσή του από κρυστάλλους ανθρακικού ασβεστίου, ή να διακόπηκε απότομα η διαδικασία από την ολοκλήρωση του πειράματος (Εικόνα 37 e). Στην εικόνα αυτή πάντως, φαίνεται χαρακτηριστικά ότι το κενό στο εσωτερικό των σχηματιζόμενων σφαιροειδών μορφών έχει τη διάμετρο του βακτηρίου. Στην τελευταία εικόνα (Εικόνα 37 f), παρουσιάζεται η μέγιστη δυνατή μεγέθυνση επιβεβαιώνοντας ότι οι διαστάσεις του σχηματιζόμενου βατερίτη είναι ίδιες με αυτές των κυττάρων του *B. pumilus* ACA-DC 4061 βάσει της βιβλιογραφίας. Επιπρόσθετα το μικριτικό υλικό που σχηματίζεται στο μικροπεριβάλλον των κυττάρων, επιβεβαιώνει το χαρακτηρισμό του έχοντας διαστάσεις μικρότερες του 1 μm.



Εικόνα 37: Φωτογραφίες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας δειγμάτων πειράματος *B. pumilus* ACA-DC 4061 σε μη αποστειρωμένες συνθήκες: **(a, b)** πανοραμικές εικόνες διαφορετικών δοκιμίων όπου παρουσιάζεται η νέα επικάλυψη. Οι κρύσταλλοι ασβεστίτη του μαρμάρου δεν είναι ορατοί; **(c)** πανοραμική εικόνα επιφάνειας με χαμηλότερη επικάλυψη από το νέο υλικό, όπου οι κρύσταλλοι του μαρμάρου είναι ορατοί; **(d)** μεγέθυνση της επικάλυψης, όπου παρουσιάζεται η επικρατούσα μορφολογία ράβδων των κυττάρων του μικροοργανισμού; **(e)** μεγέθυνση της επικάλυψης, όπου παρουσιάζονται ημισφαιρικές μορφές ή ραβδοειδείς οι οποίες διαθέτουν άνοιγμα από το οποίο προφανώς «διέφυγε» ο μικροοργανισμός πριν την πλήρη ενσωμάτωσή του στο κρυσταλλικό υλικό και **(f)** μέγιστη δυνατή μεγέθυνση σε σημείο ελάχιστης επικάλυψης όπου παρουσιάζεται η διάσταση των κυττάρων αλλά και το μικριτικό υλικό που σχηματίζεται στο μικροπεριβάλλον.

Τέλος, από τον συγκεντρωτικό πίνακα χρωματομετρίας (Πίνακας 22), είναι εμφανές ό τ ως π ρ ος τ ο μάρμαρο τ ο ο πο ό χ ρ ησιμ ο π ήθηκε στα πειράματα, υπήρξαν μικρές μεταβολές στις χρωματικές συντεταγμένες. Ως προς τα αρχαία δείγματα μαρμάρου οι διαφορές είναι σημαντικότερες. Επιπλέον εφαρμογή, θα συνεισφέρει στην μείωση αυτών των διαφορών και στη καλύτερη χρωματική απόδοση της διαδικασίας, με τελικές τιμές αποδεκτές από τις επικρατούσες οδηγίες συντήρησης μνημείων.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

4.1 Μαρμάρινο Υπόστρωμα

Η επιλογή του υποστρώματος, βασίστηκε στο γεγονός ότι το Πεντελικό μάρμαρο αποτελεί ένα από τα κύρια υλικά κατασκευής αρχαίων μνημείων στην περιοχή της Αττικής. Επίσης, το Παριανό μάρμαρο έχει χρησιμοποιηθεί σε μνημεία άλλων περιοχών και τα δύο συναντώνται στους Δελφούς. Το λευκό τους χρώμα αποτελεί ένα από τα χαρακτηριστικά για τα οποία είναι παγκοσμίως διάσημα. Επομένως το μάρμαρο Διονύσου, από όπου επιτρεπόταν η σύγχρονη εξόρυξη ανάλογου μαρμάρου, επελέγη ώστε να μπορεί να παραλληλιστεί με τους δύο τύπους που χρησιμοποιήθηκαν στην αρχαιότητα. Τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά τους είναι παραπλήσια, το κυριότερο των οποίων είναι το πορώδες, το οποίο πρακτικά είναι ελάχιστο. Το ελάχιστο πορώδες θεωρήθηκε ως μια επιπλέον πρόκληση για τους μικροοργανισμούς. Θεωρητικά, απουσιάζουν οι περιοχές (πόροι) που μπορούν να συνεισφέρουν στην εποίκηση από μικροοργανισμούς, προσφέροντας σημεία συσσώρευσης θρεπτικών συστατικών και νερού, αλλά και προστασίας από περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως εκτεταμένη ηλιακή ακτινοβολία. Το ελάχιστο πορώδες, μπορεί να θεωρηθεί ως ένα φυσικό σύστημα προστασίας του μαρμάρου το οποίο, με την πάροδο του χρόνου και τη διάβρωση, μειώνεται. Το υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε δεν έχει υποστεί ανάλογη διάβρωση, επομένως μελετήθηκε η ικανότητα των στελεχών σε «πρότυπη» επιφάνεια και τα αποτελέσματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βάση σε μελλοντικές έρευνες. Επιβεβαιώθηκε ότι οι μικροοργανισμοί μπορούν να αποθέσουν ανθρακικό ασβέστιο, σε εύλογο χρονικό διάστημα, σε επιφάνεια με ελάχιστες διαφοροποιήσεις ή αλλοιώσεις. Από τις φωτογραφίες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας των «τυφλών» μαρμάρινων υποστρωμάτων, οι περιοχές οι οποίες μπορούν να θεωρηθούν ως πιθανά μέρη της αρχικής απόθεσης, είναι τα σημεία αλλαγής της κατεύθυνσης των κρυστάλλων ασβεστίτη ή σε ρωγμές οι οποίες προέκυψαν κατά την κοπή του μαρμάρου. Αυτό επιπρόσθετα επιβεβαιώθηκε από τις λεπτές τομές των δειγμάτων όπου το νέο υλικό σχημάτισε ένα ενιαίο στρώμα στην επιφάνεια των δοκιμίων ακολουθώντας το ανάγλυφό τους.

4.2 Απομόνωση και Ταυτοποίηση Μικροοργανισμών

Η απομόνωση των μικροοργανισμών αποτέλεσε ένα από τα σημαντικότερα βήματα για την επιτυχή έκβαση της συγκεκριμένης έρευνας. Οι δειγματοληπτικοί χώροι αποφασίστηκαν με βάση τα προγραμματισμένα μελλοντικά πειράματα. Τα αρχαία σημεία εξόρυξης μαρμάρου επιλέχθηκαν, δεδομένου του στόχου ανάπτυξης μεθόδου σε μαρμάρινα υποστρώματα. Επομένως, είναι προτιμητέο οι μικροοργανισμοί να διαθέτουν επαρκές «ιστορικό», όσον αφορά τη δυνατότητα ανάπτυξής τους στα ίδια υποστρώματα. Επίσης, η περιοχή της Πεντέλης μπορεί να θεωρηθεί ότι είναι μειωμένης περιβαλλοντικής μόλυνσης, διότι δεν βρίσκεται στο στενό αστικό κύκλο της Αθήνας. Τα σημεία δειγματοληψίας ήταν τυχαία. Ταυτόχρονα όμως, ελήφθησαν δείγματα τα οποία είχαν διαφορετικούς χρωματισμούς υπονοώντας διαφορετικό οργανικό φορτίο στην κάθε επιφάνεια. Η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε φθινόπωρο προς χειμώνα, οπότε οι θερμοκρασίες δεν είναι ακόμα ιδιαίτερα χαμηλές και μετά από βροχόπτωση, ώστε η σκόνη από την επιφάνεια και ασθενείς επικαθίσεις να έχουν κατά το δυνατόν απομακρυνθεί.

Το σπήλαιο της Παιανίας επιλέχθηκε για δύο λόγους: Πρώτον, είναι περιορισμένης κλίμακας οι έρευνες στην Ελλάδα όσον αφορά τη μικροβιολογική πανίδα σπηλαίων. Επομένως, συνδύαστηκε η παρούσα ερευνητική προσπάθεια, με μια πρώτη προσεγγιστική μελέτη ενός σπηλαίου. Δεύτερον, ο διαρκής σχηματισμός σταλαγμιτών και σταλακτιτών προσφέρεται για την απομόνωση βακτηρίων, τα οποία συμμετέχουν στη διαδικασία αυτή με το σχηματισμό ανθρακικού ασβεστίου. Άρα θεωρήθηκε ότι θα υπάρξουν περισσότερες πιθανότητες να απομονωθούν βακτήρια με αυξημένες ικανότητες στο να προκαλούν το σχηματισμό του. Στο σπήλαιο της Παιανίας, η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε το χειμώνα, οπότε το σπήλαιο έχει μειωμένη επισκεψιμότητα, έτσι ώστε να εξασφαλιστεί η μικρότερη δυνατή επιβάρυνση από μεταφορά μικροοργανισμών από το εξωτερικό στο εσωτερικό του. Η θερμοκρασία του σπηλαίου είναι σταθερή και η υγρασία τη συγκεκριμένη περίοδο αυξημένη, διότι το βρόχινο νερό φιλτράρεται από το έδαφος κάτω από την επιφάνειά του και ρέει στα τοιχώματα ή στους σταλακτίτες. Οι συνθήκες αυτές ευνοούν την ανάπτυξη της εσωτερικής μικροπανίδας, λόγω της απαραίτητης υγρασίας και θρεπτικών υλικών που μεταφέρονται.

Ουσιαστική ανάλυση της μικροχλωρίδας των δειγμάτων θα μπορούσε να γίνει με τη πλήρη ταυτοποίηση των δειγμάτων γενετικά, το οποίο θα ήταν και το ιδανικό. Η διαδικασία αυτή δεν ήταν στόχος του συγκεκριμένου διδακτορικού. Επελέγη η διαδικασία απομόνωσης

εκείνων των στελεχών τα οποία μπορούν να καλλιεργηθούν άμεσα, σε συνήθη μικροβιολογικά θρεπτικά. Όλα τα απομονωμένα στελέχη (εκτός ενός), αναπτύχθηκαν επαρκώς σε γενικά θρεπτικά, διότι δεν διαθέτουν εξεζητημένες θρεπτικές απαιτήσεις, παράμετρος η οποία ήταν βασική στην απομόνωση των βακτηρίων. Το αντίθετο, θεωρητικά, θα προκαλούσε αύξηση του κόστους ανάπτυξης της μεθοδολογίας το οποίο δεν ήταν επιθυμητό, δεδομένου ότι παράλληλη προϋπόθεση της συγκεκριμένης ερευνητικής προσπάθειας, ήταν μια οικονομικά βιώσιμη πρόταση, ανταγωνιστική των συμβατικών μεθόδων αποκατάστασης λίθινων μνημείων. Μια εναλλακτική, μελλοντική, προσέγγιση θα μπορούσε να είναι η ανάπτυξη θρεπτικών διαλυμάτων τα οποία θα βελτιστοποιούσαν την απόθεση βάσει των θρεπτικών αναγκών κάθε απομονωμένου στελέχους, αλλά αυτό πιθανότατα θα ήταν απαραίτητο μόνο σε εξεζητημένες συνθήκες αποκατάστασης μνημείων, όπου είναι επιθυμητό η αποφυγή ενεργοποίησης άλλων στελεχών, τα οποία έχουν ταυτοποιηθεί ως καταστρεπτικά στην λίθινη επιφάνεια και ταυτόχρονα δεν μπορούν να απομακρυνθούν.

Η διαδοχικές αραιώσεις και εμβολιασμοί θρεπτικών για την απομόνωση των στελεχών, αποτέλεσαν κρίσιμο μέρος της διαδικασίας και χρειάστηκαν να επαναληφθούν μέχρι την απομόνωση (οπτικά) ενός μόνο στελέχους, σε κάθε σχηματιζόμενη αποικία. Ακόμα και σε αυτήν την περίπτωση, παρατηρήθηκε ότι μετά από την ενεργοποίηση κατεψυγμένων δειγμάτων, υπήρξε χρωματική διαφοροποίηση των αποικιών, που σε ορισμένες περιπτώσεις αποδείχθηκε ότι ήταν διαφορετικά στελέχη. Παρατηρήθηκε όμως και το αντίστροφο, δηλαδή στελέχη που παρουσίασαν διαφορετικά μορφολογικά χαρακτηριστικά, γενετικά να είναι τα ίδια. Για την καλύτερη αρχική διαφοροποίηση των στελεχών, ενδείκνυται η αποθήκευση των στελεχών σε κατάψυξη και η αναγέννησή τους τουλάχιστον 3-5 φορές, σε διάστημα 12 μηνών από την αποθήκευση. Η παραπάνω διαδικασία βοήθησε στον καλύτερο διαχωρισμό των στελεχών. Ο άμεσος γενετικός προσδιορισμός του κάθε στελέχους μπορεί να «υποδείξει», εάν το στέλεχος από το οποίο απομονώθηκε το 16S rDNA αποτελείται αποκλειστικά από ένα ή περισσότερους μικροοργανισμούς: δηλαδή, εάν το ποσοστό ομοιότητας με τη βάση δεδομένων είναι χαρακτηριστικά χαμηλό (<95%), τότε μπορεί να αλληλουχήθηκαν περισσότερες από μια αλυσίδες 16S rDNA.

Το επόμενο βήμα στην ταυτοποίηση, ήταν ο βιοχημικός έλεγχος και η απομόνωση του ριβοσωμικού DNA για την αλληλούχησή του. Η πειραματική διαδικασία που επιλέχθηκε εδώ, ήταν πρώτα ο βιοχημικός έλεγχος και μετά η γενετική ταυτοποίηση. Όμως, τα αποτελέσματα και οι πολλαπλές πειραματικές προσπάθειες απέδειξαν ότι είναι καλύτερο το

αντίστροφο: η γενετική ταυτοποίηση των στελεχών να προηγείται του βιοχημικού προσδιορισμού. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται το καλύτερο δυνατό αποτέλεσμα, σε αντίθεση με την αντίστροφη διαδικασία, η οποία σε ορισμένες περιπτώσεις οδήγησε σε αμφιλεγόμενα συμπεράσματα που χρειάστηκαν να επαναληφθούν. Ο βιοχημικός έλεγχος πραγματοποιήθηκε με τα ημι-αυτοματοποιημένα συστήματα API, τα οποία θεωρούνται σε επίπεδο γένους ακριβή, παρόλο που τα εγχειρίδια χρήσης τους δηλώνουν ότι μπορούν να προσφέρουν ταυτοποίηση σε επίπεδο είδους. Αυτό μπορεί να γίνει πραγματικότητα, αλλά περιβαλλοντικά δείγματα μικροοργανισμών μπορούν να παρουσιάσουν διαφορές σε βιοχημικά τεστ, παραπέμποντας σε διαφορετικό είδος από αυτό που προκύπτει με τη γενετική ταυτοποίηση. Επομένως, εξασφαλίζοντας την απομόνωση και αλληλούχηση ολόκληρου ή σχεδόν ολόκληρου του 16S rDNA, δίνεται η δυνατότητα επιλογής του κατάλληλου συνδυασμού των API συστημάτων για τη διερεύνηση του βιοχημικού προφίλ. Τα αποτελέσματα από τα συστήματα API χρησιμοποιήθηκαν για την επιβεβαίωση του στελέχους, μόνο όταν αναλύθηκαν και τα γενετικά αποτελέσματα. Σε επίπεδο είδους, χωρίς τα αποτελέσματα DNA, στις περισσότερες περιπτώσεις ήταν διαφορετικά. Το γένος όμως επιβεβαιώθηκε σε όλες τις αναλύσεις. Οι διαφορές, για παράδειγμα, στην τελική ταυτοποίηση των *Pseudomonas chlororaphis* είναι ελάχιστες και μπορεί να θεωρηθούν ότι είναι χαρακτηριστικές του κάθε απομονωμένου στελέχους. Για να θεωρηθεί όμως απόλυτα ακριβής η ταυτοποίηση, είναι απαραίτητες επιπλέον βιοχημικές δοκιμές οι οποίες παρεκκλίνουν από τους στόχους της διατριβής και για το λόγο αυτό, αναφέρεται μόνο το όνομα σε επίπεδο είδους και όχι υποείδους.

Το Γένος των Βακίλων, συμπεριλαμβάνει βακτήρια τα οποία είναι Gram – θετικά. Η μορφολογία των κυττάρων είναι ράβδοι, διαφορετικού μήκους, ευθείς ή ελαφρώς καμπυλωτοί. Τα κύτταρα μπορούν να εμφανιστούν, είτε ως ξεχωριστές μονάδες, είτε σε ζεύγη. Σε αρκετές όμως περιπτώσεις παρατηρείται ο σχηματισμός αλυσίδων από κύτταρα ενωμένα στις άκρες τους. Ένα βασικό χαρακτηριστικό είναι ο σχηματισμός ενδο-σπορίων (Logan and De Vos, 2009). Τα σπόρια είναι ιδιαίτερα ανθεκτικά σε ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες. Τα περισσότερα στελέχη, και ειδικότερα αυτά που απομονώθηκαν στη συγκεκριμένη διατριβή είναι αερόβια, αλλά μπορούν να αντεπεξέλθουν και σε συνθήκες περιορισμένου οξυγόνου. Αναπτύσσονται σε γενικά μικροβιολογικά θρεπτικά και δεν χρειάζονται εξειδικευμένες συνθήκες καλλιέργειας, εκτός συγκεκριμένων περιπτώσεων. Γενικά, χαρακτηρίζονται ως χημειο-οργανότροφα, ετερότροφα βακτήρια, με τη δυνατότητα να αφομοιώνουν πληθώρα οργανικών ενώσεων, ανάλογα με το περιβάλλον που

αναπτύσσονται. Η μορφολογία των αποικιών κατά την καλλιέργειά τους δεν είναι δεδομένη. Ακόμα και διαδοχικές καλλιέργειες ενός στελέχους, στο ίδιο θρεπτικό, μπορεί να δώσει διαφοροποιήσεις στη μορφολογία, πράγμα που μερικές φορές μπορεί να οδηγήσει στην υπόνοια ότι υπάρχει μόλυνση. Για το λόγο αυτό, ενδείκνυται η καλλιέργεια σε διαφορετικά θρεπτικά αλλά και η επανάληψη, ώστε να παρατηρηθούν και να ταυτοποιηθούν τέτοιες διαφορές. Η απομόνωση των μικροοργανισμών, συνήθως γίνεται από το χώμα, αλλά μπορούν να απομονωθούν από τις περισσότερες περιβαλλοντικές επιφάνειες ή συνθήκες. Τα περισσότερα στελέχη δεν είναι παθογόνα, με εξαίρεση τον *Bacillus anthracis*. Ο *Bacillus cereus* επίσης μπορεί να προκαλέσει τροφική δηλητηρίαση (Logan and De Vos, 2009).

Από το γένος *Paenibacillus*, απομονώθηκε και ταυτοποιήθηκε ένα στέλεχος. Η ονομασία του σηματοδοτεί και ότι προέρχεται από το διαχωρισμό από το γένος *Bacillus*, διότι η λέξη “*paene*” σημαίνει στα λατινικά «σχεδόν» και έγινε αποδεκτό το 1993. Είναι κατά Gram-θετικά βακτήρια, παρόλο που κατά τη χρώση τους συνήθως ανιχνεύονται υπό το μικροσκόπιο ως αρνητικά. Τα κύτταρα έχουν μορφή ράβδου και σχηματίζουν ενδο-σπόρια. Αναπτύσσονται σε γενικά μικροβιολογικά θρεπτικά, αλλά συνήθως σε nutrient broth, όπως επιβεβαιώθηκε και από τις δικές μας δοκιμές. Θεωρούνται δυνητικά αερόβιοι μικροοργανισμοί, παρόλο που η ανακάλυψη πιο πρόσφατων στελεχών έδειξε την ύπαρξη και αποκλειστικά αερόβιων στελεχών. Δεν αποτελούν παθογόνους μικροοργανισμούς για τον άνθρωπο και απομονώνονται κυρίως από το χώμα (Priest 2009). Οι Groth et al. 2001, έχουν αναφέρει ότι απομονωμένο στέλεχος *Paenibacillus polymyxa* από σπήλαιο, είχε τη δυνατότητα σχηματισμού ασβεστίτη και βατερίτη σε στερεό B4 υπόστρωμα.

Οι *Pseudomonas* είναι κατά Gram αρνητικά βακτήρια, με ευθείς ή ελαφρώς καμπυλωμένες ράβδους. Διαθέτουν μαστίγια, τα οποία επιτρέπουν την κίνησή τους, και είναι αερόβιοι μικροοργανισμοί. Διαθέτουν πλασμίδια, τα οποία προσφέρουν ιδιαίτερα χαρακτηριστικά σε αρκετά στελέχη του γένους, όπως αντοχή σε αντιβιοτικά και δυνατότητα καταβολισμού ασυνήθιστων πηγών άνθρακα. Μπορούν να παράγουν χρωστικές ουσίες, ίδιες με αυτές που ανιχνεύτηκαν, τόσο στο θρεπτικό διάλυμα, όσο και στους κρυστάλλους CaCO₃. Ορισμένα στελέχη είναι παθογόνοι, αλλά προσβάλουν κυρίως άτομα με μειωμένης αντοχής ανοσοποιητικό σύστημα. Η οικολογία τους δεν περιορίζεται σε κάποιο συγκεκριμένο περιβάλλον, αλλά μπορούν να απομονωθούν από διάφορα οικοσυστήματα (Palleroni 2005). Όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή, έχουν απομονωθεί, ή απλά ταυτοποιηθεί, σε δείγματα από λίθινα μνημεία. Έχουν αναφερθεί σε ευρεσιτεχνία των Γάλλων ερευνητών (Adolphe et al. 1990) ως ένας εκ των μικροοργανισμών που μπορούν να επιλεγούν προς χρήση και

συγκεκριμένα η *Pseudomonas stutzerii*. Ο ίδιος μικροοργανισμός έχει αναφερθεί στην επιτυχή βιο-αποκατάσταση τοιχογραφιών (Ranalli et al. 2005) και ο *Pseudomonas pseudoalcaligenes* στη βιο-αποκατάσταση λίθινων μνημείων (Alfano et al. 2011).

Το γένος *Pantoea* ανήκει στην οικογένεια των εντεροβακτηρίων (*Enterobacteriaceae*). Τα κύτταρα έχουν σχήμα ευθείας ράβδου και είναι κατά Gram αρνητικά. Οι αποικίες κατά την ανάπτυξή τους σε αρκετές περιπτώσεις αποκτούν κίτρινο χρώμα, ενώ είναι δυνητικά αερόβιοι μικροοργανισμοί (Grimont and Grimont 2005). Το είδος του μικροοργανισμού μεταξύ *P. agglomerans* και *P. vagans*, δεν μπόρεσε να εξακριβωθεί απόλυτα, βάσει της πρόσφατης δημοσίευσης όπου προτείνεται ως νέο στέλεχος ο *P. vagans* (Brady et al. 2009). Ο *P. agglomerans* είναι ένα στέλεχος το οποίο μπορεί να απομονωθεί από φυτά, έδαφος, νερό και τον άνθρωπο. Θεωρείται φυτοπαθογόνος (Brady et al. 2008), αλλά η ανταγωνιστική δράση του έναντι άλλων φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών οδήγησε στην εφαρμογή του στην αγροτική βιομηχανία (Nunes et al. 2002; Jin et al. 2003; Völksch et al. 2009). Υπάρχουν αναφορές ως παθογόνος για τον άνθρωπο κυρίως σε ενδονοσοκομειακές λοιμώξεις (Brady et al. 2008; Völksch et al. 2009). Μια πιθανή βιοτεχνολογική του εφαρμογή δεν μπορεί να αποκλειστεί. Βάσει της βιβλιογραφίας είναι η πρώτη φορά που τέτοιο στέλεχος ελέγχθηκε για την ικανότητά του να προκαλεί τη καταβύθιση ανθρακικού ασβεστίου.

Το γένος *Cupriavidus* στην τελευταία έκδοση του Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, διαθέτει ένα μόνο στέλεχος (Balkwill 2005). Όμως, πρόσφατη μελέτη άλλαξε τα δεδομένα, μεταφέροντας μια σειρά απομονωμένων στελεχών, που μέχρι πρότινος ανήκαν στο γένος *Ralstonia*, στο γένος *Cupriavidus*. Είναι κατά Gram αρνητικά, με μαστίγια που εξέχουν περιφερειακά της κυτταρικής μεμβράνης (Vandamme and Coenye 2004). Το στέλεχος που ταυτοποιήθηκε στη παρούσα εργασία, απομονώθηκε αρχικά στο Βέλγιο από δείγματα επιβαρυνμένα με βαρέα μέταλλα (Goris et al. 2001). Επομένως, η απομόνωση του αποδεικνύει ότι μπορεί να απομονωθεί και από άλλα οικοσυστήματα. Δείγμα του μικροοργανισμού εστάλη στους Βέλγους ερευνητές, κατόπιν αιτήματός τους, για την αποθήκευσή του στη τράπεζα μικροοργανισμών του στελέχους. Η ικανότητα που διαθέτει ο *C. metallidurans* να επιβιώνει σε περιβάλλον με υψηλές συγκεντρώσεις βαρέων μετάλλων, οδήγησε στην ανάλυση του γονιδιώματός του (Janssen et al. 2010), ώστε να γίνει ευκολότερη η βιοτεχνολογική του έρευνα και εκμετάλλευση. Γενικότερα, απομονωμένα στελέχη αυτού του γένους δεν αναφέρονται συχνά στη βιβλιογραφία που αφορά τη δυνατότητα απόθεσης

ανθρακικού ασβεστίου. Οι Portillo et al. (2009) διερεύνησαν ένα στέλεχος απομονωμένο από σπήλαιο χωρίς όμως να αναφέρονται σε πιο είδος ανήκει. Η επιβίωση σε υψηλές συγκεντρώσεις βαρέων μετάλλων, μπορεί να προσφέρει σημαντικό πλεονέκτημα κατά την εφαρμογή του σε αστικό περιβάλλον, όπου βαρέα μέταλλα επικάθονται και συγκεντρώνονται στην επιφάνεια των μνημείων.

Τέλος, το γένος *Ralstonia* όπως αναφέρθηκε και παραπάνω διαφοροποιήθηκε σημαντικά, διότι τα στελέχη του πρόσφατα διαχωρίστηκαν. Γενικότερα, τα κύτταρα είναι ράβδοι και είναι αυστηρώς αερόβια. Μπορεί να διαθέτουν μαστίγια ή μη. Το χρώμα των αποικιών είναι συνήθως μπεζ και ορισμένα στελέχη είναι φυτοπαθογόνα. Ορισμένα στελέχη επίσης είναι παθογόνοι σε άτομα με προδιάθεση και για το λόγο αυτό, η ταυτοποίηση αρκετών στελεχών προήλθε από κλινικά δείγματα. Παρόλα αυτά, μπορούν να απομονωθούν από διαφορετικά οικοσυστήματα (Yabuuchi et al. 2005). Δεν αναφέρονται συχνά σε δημοσιεύσεις στις οποίες ελέγχεται η δυνατότητα απόθεσης ανθρακικού ασβεστίου. Και σε αυτήν την περίπτωση, οι Portillo et al. (2009) αναφέρονται σε ένα στέλεχος απομονωμένο από σπήλαιο. Σημειώνεται ότι η ονομασία *R. detusculanense*, που έδωσε η ταυτοποίηση του 16S rDNA από τη βάση δεδομένων, βιβλιογραφικά αποδίδει ελάχιστες αναφορές, οι οποίες στην πλειοψηφία τους δεν είναι δημοσιευμένες. Βάσει των πληροφοριών που δίδονται για τις αλληλο χιές υ μέσα στη βάση δεδο ένων μ της NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/?term=ralstonia+detusculanense>), στελέχη που έχουν το ίδιο 16S rDNA έχουν απομονωθεί από δείγματα νερού με βαρέα μέταλλα ή από δείγματα ραδιενεργού νερού.

4.3 Ανάπτυξη Θρεπτικού για την Καταβύθιση Ανθρακικού Ασβεστίου

Το θρεπτικό διάλυμα που αναπτύχθηκε αποτελεί μια ικανοποιητική πρόταση για την ανάπτυξη μικροοργανισμών από διαφορετικά γένη. Ο περιορισμός των θρεπτικών συστατικών το καθιστά οικονομικότερο και εύκολο στην παρασκευή του, αλλά ταυτόχρονα, επελέγη εκείνο το συστατικό στο οποίο τα στελέχη ανταποκρίθηκαν με ανάλογους ρυθμούς ανάπτυξης, όπως και στο Yeast extract. Υπενθυμίζεται πως ο απώτερος στόχος ήταν η δημιουργία μιας μεθόδου, η οποία θα ήταν οικονομικά και χρονικά βιώσιμη για να εφαρμοστεί σε πραγματικές συνθήκες. Σημαντικός παράγοντας είναι, κατά το δυνατόν, η

ταχύτητα της διαδικασίας ώστε να περιοριστεί η εμπλοκή άλλων παραγόντων κατά τη διάρκεια της εφαρμογής της, όπως για παράδειγμα η ανάπτυξη ανταγωνιστικών μικροοργανισμών, οι οποίοι θα μπορούσαν να αφομοιώσουν τα θρεπτικά συστατικά. Όλοι οι μικροοργανισμοί, που ελέγχθηκαν για την ικανότητά τους να προκαλέσουν το σχηματισμό ανθρακικού ασβεστίου, αφομοίωσαν το οξικό ανιόν, το οποίο προσέφερε την επιπλέον ανάπτυξη ώστε να επιτευχθεί η αναγκαία συγκέντρωση κυττάρων, για ουσιαστική απόθεση. Επίσης, η αύξηση της συγκέντρωσης των συστατικών δεν προκάλεσε σημαντική αλλαγή στο χρώμα του αρχικού θρεπτικού διαλύματος (τουλάχιστον μέχρι την τριπλάσια συγκέντρωση). Αυτό βοήθησε στη μη μεταφορά κίτρινης χροιάς στα δοκίμια, αποδίδοντας τις όποιες χρωματικές αλλαγές στο κάθε στέλεχος ξεχωριστά και όχι στο θρεπτικό. Επομένως, κάθε χρωματική αλλαγή μπορούσε να αποδοθεί στον τρόπο ανάπτυξης και μεταβολισμού του βακτηρίου, δίνοντας ένα επιπλέον ποιοτικό παράγοντα για την επιλογή των στελεχών που τελικά δοκιμάστηκαν. Η πεπτόνη (bacteriological peptone, LABM) που τελικά επιλέχθηκε, προσέφερε τη δυνατότητα του καλύτερου ελέγχου του pH, πριν την αποστείρωση, σε τιμές κοντά στο 8. Αντίθετα, το B4 θρεπτικό το οποίο συνήθως χρησιμοποιείται βιβλιογραφικά, εμφάνισε το πρόβλημα ότι η ρύθμιση του pH όταν πλησιάζει το 8, προκαλεί το σχηματισμό θολώματος και τελικά ιζήματος. Το θόλωμα αυτό ανιχνεύτηκε ανεξάρτητα από τη σειρά ανάμειξης των συστατικών, ή εάν πρώτα αποστειρώνονταν και μετά αναμειγνύονταν. Επομένως, κάποια ποσότητα ασβεστίου πιθανόν να καταβυθίζεται, η οποία όμως δεν κατέστη δυνατόν να απομονωθεί και να αναλυθεί με FT-IR. Εάν το pH δεν ρυθμιζόταν (pH~7), τότε το διάλυμα παρέμενε διαυγές. Οι Marvasi et al. (2012) στην πρόσφατη έρευνά τους για τη σημασία του B4 θρεπτικού, ανέδειξαν το ρόλο που διαδραματίζει το pH του B4 στον σχηματισμό CaCO_3 : Μολονότι δεν αναφέρουν σχηματισμό ιζήματος όταν το pH ρυθμίστηκε πάνω από 8, σημειώνουν ότι ρυθμιστική δράση μπορεί να ασκήσει κυρίως το εκχύλισμα ζύμης (yeast extract), λόγω των πρωτεϊνών του. Η τιτλοδότησή του ανέδειξε ότι στο pH ~ 6.5 – 7.5 υπήρξε χαμηλή ρυθμιστική ικανότητα (το pH αυξήθηκε γρήγορα με μικρή προσθήκη βάσεως), η οποία αποκαταστάθηκε μετά το pH = 8. Αυτό πιθανότατα να σημαίνει, ότι σε αυτό το εύρος χρειάζεται να γίνεται προσεκτική ρύθμιση του pH, ώστε να μην προκληθεί απότομη αύξησή του και να σχηματιστεί CaCO_3 . Η συγκεκριμένη έρευνα, έστω και καθυστερημένα για τη συγκεκριμένη διδακτορική διατριβή, ανέδειξε ότι το B4 θρεπτικό είναι ιδιαίτερα ευαίσθητο στη ρύθμιση του pH. Η απουσία παλαιότερων αναφορών στο θέμα αυτό, μπορεί να οφείλεται στο ότι το θρεπτικό ετοιμαζόταν και χρησιμοποιούταν άμεσα, με αποτέλεσμα όποιο θόλωμα να αποδιδόταν στην βακτηριακή ανάπτυξη, ή ότι τελικά το pH

δεν ρυθμιζόταν, όπως μπορεί να παρατηρηθεί από μια προσεκτικότερη μελέτη προηγούμενης εργασίας των παραπάνω συγγραφέων (Marvasi et al. 2010). Η απόθεση ανθρακικού ασβεστίου εμφανίζεται όταν το pH > 8. Μολονότι θα μπορούσε να εφαρμοστεί χωρίς τη ρύθμιση pH, προκαλείται η καθυστέρηση της διαδικασίας, διότι ο μικροοργανισμός χρειάζεται 48-72 ώρες για να προκαλέσει την αύξησή του στην επιθυμητή τιμή. Επομένως, για να μειωθεί ο πειραματικός χρόνος, το pH ήταν αναγκαίο να ρυθμιστεί. Ανάλογο ζήτημα δεν προέκυψε με την πεπτόνη. Το pH ρυθμίστηκε κοντά στο 8 (~ 7.5) και όχι παραπάνω, ώστε ο κάθε μικροοργανισμός να συμβάλει στην περαιτέρω αύξησή του και να εκκινήσει η καταβύθιση του ανθρακικού ασβεστίου. Ο περιορισμός, κατά το δυνατόν, των θρεπτικών συστατικών, συνετέλεσε στο να μην προστεθεί επιπλέον πηγή ανθρακικών ανιόντων με τη μορφή αλάτων ή ρυθμιστικού διαλύματος, για να διατηρηθεί το pH σταθερό (Rodríguez-Navarro et al. 2003). Η γλυκόζη αφαιρέθηκε διότι, μολονότι αποτελεί μια από τις συνηθέστερες πηγές άνθρακα, μπορεί να προκαλέσει την άμεση ανάπτυξη ανταγωνιστικών στελεχών σε μια περιβαλλοντική εφαρμογή. Επίσης, τα προϊόντα του μεταβολισμού της μπορεί να είναι οξέα, τα οποία εάν απελευθερωθούν από το μικροοργανισμό, ενδέχεται να προκαλέσουν διάβρωση στη σύσταση του υποστρώματος. Οι Portillo et al. (2009) ανέφεραν ότι η γλυκόζη ως συστατικό θρεπτικού διαλύματος, εμποδίζει το σχηματισμό ανθρακικού ασβεστίου από μικροοργανισμούς.

4.4 Προκαταρκτικά Πειράματα Απόθεσης Ανθρακικού Ασβεστίου

4.4.1 1^ο Σκέλος Προκαταρκτικών Πειραμάτων

Με την πρώτη σειρά πειραμάτων, εξακριβώθηκε εάν τα στελέχη που απομονώθηκαν μπορούν ουσιαστικά να προκαλούν το σχηματισμό ανθρακικού ασβεστίου, με τη χρήση του επιλεγμένου θρεπτικού. Η σάρωση διαφορετικών συγκεντρώσεων θρεπτικού διαλύματος, εξακρίβωσε πώς η αύξηση των συστατικών βοηθά στην ταχύτερη και ουσιαστικότερη απόθεση του νέου υλικού. Επίσης, η ανάλυση σχεδόν όλων των δειγμάτων, δημιούργησε μια βάση δεδομένων από εικόνες οι οποίες βοήθησαν στην κατανόηση του σχηματισμού του βατερίτη και τους λόγους για τους οποίους αυτός σχηματίζεται συστηματικά.

Κατά τις πρώτες πειραματικές ημέρες, οι περισσότεροι μικροοργανισμοί δεν προκάλεσαν απόθεση. Αντίθετα παρατηρήθηκε μια μικρή ελάττωση του βάρους των δοκιμίων η οποία οφείλεται στην απομάκρυνση θραυσμάτων από την επιφάνεια. Ανάλογες

μειώσεις βάρους παρατηρήθηκαν συστηματικά σε όλα τα τυφλά δείγματα. Η πρώτη σειρά πειραμάτων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις θρεπτικού, για τα στελέχη *Bacillus*, έδειξε ικανοποιητικά αποτελέσματα για τον *Bacillus pumilus* ACA-DC 4061. Τα άλλα δύο στελέχη χρησιμοποιήθηκαν κυρίως ως «πρότυπα», με την έννοια ότι είχαν ήδη παρουσιαστεί ως μικροοργανισμοί ικανοί να προκαλούν το σχηματισμό CaCO_3 (Adolphe et al. 1990). Επιπλέον όμως, αποδείχθηκε ότι τα στελέχη αυτά μπορούν να σχηματίσουν και βατερίτη. Επίσης, παρατηρήθηκε η μεταβολή του χρώματος του διαλύματος σε καφέ πλην του *B. pumilus* ACA-DC 4061, όντας σημαντικός παράγοντας στην τελική επιλογή των στελεχών.

Η πρώτη σειρά πειραμάτων για τα στελέχη του γένους *Pantoea* έδειξε ότι και εδώ σε χαμηλές συγκεντρώσεις θρεπτικού, κυριαρχεί ο ασβεστίτης ή μίγματά του με βατερίτη. Σε διπλάσια συγκέντρωση όμως και τα δύο στελέχη έδωσαν ικανοποιητικά αποτελέσματα σε αύξηση βάρους, μεγαλύτερη από αυτή του *B. pumilus* ACA-DC 4061. Το χρώμα και εδώ αποτελεί ανασταλτικό παράγοντα ειδικά για τον *Pantoea* sp. ACA-DC 4066. Ο *Pantoea* sp. ACA-DC 4067, ξεχώρισε από τους δύο κατά τα πρώτα αποτελέσματα. Η σημαντική πτώση της απόδοσης στη μέγιστη συγκέντρωση θρεπτικού (BP4x) προβλημάτισε όσον αφορά εάν θα έπρεπε να συνεχίσει να χρησιμοποιείται μελλοντικά και αν αποτελεί ένδειξη ότι υπάρχει κάποιο «θρεπτικό όριο» στην αποτελεσματικότητα της διαδικασίας.

Τα απομονωμένα στελέχη *Pseudomonas* ανήκουν όλα στο ίδιο είδος. Μολονότι οι συνθήκες ήταν όσο το δυνατόν παρόμοιες καθόλη τη διάρκεια των πειραμάτων, τα στελέχη παρουσίασαν διαφορετικές μορφολογίες βατερίτη ειδικά στην συγκέντρωση BP2x. Ο πλουραλισμός των μορφών, αποδεικνύει τη αναγκαιότητα της διερεύνησης όλων των στελεχών για τον τρόπο απόθεσης του νέου υλικού. Ο *Ps. chlororaphis* ACA-DC 4072 απέδωσε λευκό υλικό στην επιφάνεια των δοκιμίων (BP2x), ενώ οι *Ps. chlororaphis* ACA-DC 4070 και ACA-DC 4068 παρουσίασαν σημαντική αύξηση σε BP4x, γεγονός που δείχνει διαφορετική απόκριση σε αυξημένη συγκέντρωση. Ανάλογη συμπεριφορά παρουσίασαν μόνο οι *B. pumilus* ACA-DC 4061 και *Ralstonia* sp. ACA-DC 4074. Όμως η συστηματική παραγωγή πράσινης χροιάς στο διάλυμα προβλημάτισε, διότι ανιχνεύτηκε σε όλες τις συγκεντρώσεις θρεπτικού διαλύματος και σε αρκετές περιπτώσεις μεταφέρθηκε στους κρυστάλλους.

Τελευταίοι αναφέρονται οι *Ralstonia* sp. ACA-DC 4074 και *C. metallidurans* ACA-DC 4073 διότι γενεαλογικά είναι παραπλήσιοι μικροοργανισμοί. Και οι δύο απέδωσαν στην πρώτη σειρά πειραμάτων ικανοποιητικά, προσφέροντας σημαντική και ομοιόμορφη

επικάλυψη. Όμως η ανίχνευση του στελέχους *Ralstonia* σε κλινικά δείγματα (Ryan et al. 2006), τον καθιστά αμφίβολο όταν υπάρχει η εναλλακτική του *C. metallidurans* ACA-DC 4073.

4.4.2 2^ο Σκέλος Προκαταρκτικών Πειραμάτων

Η δεύτερη σειρά πειραμάτων πραγματοποιήθηκε, ώστε να επιβεβαιωθεί ότι τα αποτελέσματα της πρώτης δεν ήταν τυχαία και για την προκαταρκτική παρακολούθηση του σχηματισμού ανθρακικού ασβεστίου σε διαφορετικά χρονικά σημεία. Τα αποτελέσματα μορφολογικά, δεν εμφάνισαν σημαντικές διαφοροποιήσεις, αλλά προσέφεραν σημαντικές πληροφορίες, ώστε να είναι καλύτερη η τελική επιλογή των στελεχών. Τα γενικά χαρακτηριστικά που αναφέρθηκαν για κάθε μικροοργανισμό παραπάνω, διατηρήθηκαν και εδώ. Από το σύνολο των στελεχών που διερευνήθηκαν, αυτοί που «προκρίθηκαν» για την τελική επιλογή, με σειρά μειούμενης απόθεσης, ήταν: *Pantoea* sp. ACA-DC 4066, *Pantoea* sp. ACA-DC 4067, *B. pumilus* ACA-DC 4061, *Ps. chlororaphis* ACA-DC 4072, *Ps. chlororaphis* ACA-DC 4068, *C. metallidurans* ACA-DC 4073 και *Ralstonia* sp. ACA-DC 4074. Τα υπόλοιπα στελέχη *Pseudomonas* δεν είχαν ικανοποιητική απόθεση και οι βάκιλοι *B. cereus* ACA-DC 4064 και *B. licheniformis* ACA-DC 4063, απορρίφθηκαν λόγω του έντονου καφέ χρώματος των κρυστάλλων.

Η αποφυγή αλλαγής χρώματος των κρυστάλλων αποτέλεσε ένα από τα κύρια χαρακτηριστικά επιλογής, διότι το μαρμάρινο υπόστρωμα είναι λευκό. Επομένως, κάθε αλλαγή θα ήταν ορατή άμεσα με τη χρήση χρωματικών μεθόδων. Ως τελικός στόχος, τέθηκε η ελαχιστοποίηση των διαφοροποιήσεων αυτών, ώστε να παρατηρηθεί ποιος από τους επιλεγμένους μικροοργανισμούς προκαλεί τη μικρότερη αισθητική διαφοροποίηση. Η απάντηση στο ερώτημα γιατί έγινε η επιλογή αυτή, όταν τα περισσότερα μνημεία έχουν διαφορετικές χρωματικές τιμές από τις περιβαλλοντικές επιδράσεις στην επιφάνειά τους, είναι ότι ορίστηκε μια αρχή στη διερεύνηση των παραγόντων και για τον χρωματικό παράγοντα, προσδιορίστηκε το λευκό του πρόσφατα εξορυγμένου μαρμάρου. Οι μικροοργανισμοί αναπόφευκτα θα διαφοροποιήσουν τη χρωματική απόκριση της επιφάνειας, αλλά είναι αναγκαίο να δημιουργηθεί η βάση δεδομένων με στοιχεία τα οποία να δείχνουν τη σταδιακή μεταβολή, θεωρώντας ως «σημείο μηδέν» το λευκό του Πεντελικού.

Ο *Ps. chlororaphis* ACA-DC 4068 τελικά απορρίφθηκε λόγω του συστηματικού σχηματισμού πράσινου χρώματος στο διάλυμα, το οποίο μεταφερόταν και στους κρυστάλλους. Επιπλέον, η εκκίνηση σχηματισμού και απόθεσης ανθρακικού ασβεστίου δείχνει να καθυστερεί σημαντικά σε σχέση με τους υπόλοιπους προς επιλογή μικροοργανισμούς (Αποτελέσματα; Πίνακας 9). Ο *Ralstonia* sp. ACA-DC 4074 απορρίφθηκε, διότι οι γενετική πληροφορία τον παρέπεμπε σε στέλεχος το οποίο θεωρείται σημαντικός ενδονοσοκομειακός παθογόνος μικροοργανισμός (Ryan et al. 2006). Τα στελέχη *Pantoea*, παρόλο που έδωσαν τις μεγαλύτερες και γρηγορότερες αποθέσεις, τελικά δεν δοκιμάστηκαν στη συγκεκριμένη διδακτορική διατριβή, λόγω της ανάμειξής τους σε ενδονοσοκομειακές λοιμώξεις. Επιπλέον, η μη επιβίωσή τους κατά τη λήψη δειγμάτων την 15^η ημέρα (2^η σειρά προκαταρκτικών πειραμάτων), έδειξε ευαισθησία στην μείωση των θρεπτικών συστατικών και στη δραστική μείωση του πληθυσμού όταν εξαντλούνται. Μολονότι αυτό θα μπορούσε να αξιοποιηθεί, για έλεγχο της ανάπτυξής τους κατά τη διάρκεια μιας εφαρμογής, υποδεικνύει ότι σε περίπτωση ανταγωνιστικών μικροοργανισμών στην επιφάνεια του λίθου, η αξιοποίηση του θρεπτικού από κάποιο άλλο οργανισμό, μπορεί να προκαλέσει την αποτυχία της επέμβασης. Θεωρήθηκε καλύτερο να ερευνηθούν στελέχη με βιωσιμότητα ακόμα και μετά την εξάντληση του οξικού ανιόντος, διότι αυτό αποτελεί ένδειξη ότι σε ανταγωνιστικές συνθήκες, ο μικροοργανισμός θα μπορέσει να αναπτυχθεί και να ανταγωνιστεί τον μικροβιόκοσμο του υποστρώματος. Οι μικροοργανισμοί οι οποίοι διατήρησαν τη βιωσιμότητά τους, έως την ολοκλήρωση των πειραμάτων ήταν οι *C. metallidurans* B_MPEZ και *B. pumilus* ACA-DC 4061. Επιπλέον, είχαν ικανοποιητική απόθεση και οι χρωματικές μεταβολές, οπτικά, ήταν μειωμένες. Ο *Ps. chlororaphis* ACA-DC 4072 δοκιμάστηκε να βελτιστοποιηθεί. Μολονότι η βιο-απόθεση παρέμεινε ικανοποιητική, η εφαρμογή υπερήχων στα δοκίμια απομάκρυνε όλο το υλικό από αυτά. Για το λόγο αυτό δεν αναφέρθηκε στα περαιτέρω πειραματικά αποτελέσματα.

4.5 Στατιστικός Σχεδιασμός

Οι παράγοντες βελτιστοποίησης που επελέγησαν, θεωρήθηκαν οι πιθανώς σημαντικότεροι για τη μέγιστη δυνατή απόθεση στην επιφάνεια των μαρμάρων. Η θερμοκρασία επηρεάζει άμεσα το ρυθμό ανάπτυξης των μικροοργανισμών, ενώ η συγκέντρωση του θρεπτικού διαλύματος έδειξε από τα προκαταρκτικά πειράματα ότι καθορίζει εκτός από την ποσότητα CaCO_3 και τη μορφολογία του. Ο όγκος εμβολιασμού,

θεωρήθηκε και αυτός σημαντικός παράγοντας, διότι μπορεί να επηρέαζε την ταχύτητα ανάπτυξης και τον χρόνο εκκίνησης της απόθεσης. Όμως τελικά αυτό δεν επιβεβαιώθηκε, καθιστώντας τον μη σημαντικό παράγοντα και στις δύο προτεινόμενες εξισώσεις απόκρισης. Ένας από τους λόγους, είναι ότι οι όγκοι δεν είχαν μεγάλη διαφορά, πράγμα που σημαίνει ότι η ποσότητα των κυττάρων δεν ήταν ικανή να προκαλέσει σημαντική αλλαγή στην πορεία ανάπτυξης. Επίσης, η επώαση για 12 ημέρες μείωσε την όποια επίδραση της συγκέντρωσης, δεδομένου ότι όλα τα δείγματα κατέληξαν να έχουν εξαντλήσει τις θρεπτικές πηγές και να δώσουν παραπλήσιες συγκεντρώσεις κυττάρων. Πιθανόν, η διακοπή του πειράματος σε νωρίτερα στάδια, να προσέφερε στον παράγοντα αυτό μεγαλύτερη επιρροή.

Το μοντέλο απόκρισης του *C. metallidurans* ACA-DC 4073 δεν έδωσε περιθώρια για πιθανή παρερμηνεία του βέλτιστου σημείου. Είναι δευτεροβάθμιας μορφής και το μέγιστο είναι ξεκάθαρο στη γραφική απεικόνισή του. Επίσης, τα αριθμητικά αποτελέσματα από τη διαδικασία, δείχνουν ότι η μέγιστη απόθεση είναι πράγματι στη συγκεκριμένη θερμοκρασία και συγκέντρωση. Στην περίπτωση του *B. pumilus* ACA-DC 4061, το προτεινόμενο βέλτιστο σημείο (25 °C) δεν επιβεβαιώθηκε κατά τη σύγκρισή του με τη μεγαλύτερη θερμοκρασία (30 °C). Ανατρέχοντας στις καθαρές μεταβολές βάρους των δειγμάτων, το πραγματικό μέγιστο για την απόθεση βρισκόταν στους 30 °C, με μικρή διαφορά από τους 25 °C. Η γενικότερη βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης του μικροοργανισμού, επίσης είναι οι 30 °C και όχι οι 25 °C, βάσει των δεδομένων που παρέχουν οι διεθνείς τράπεζες μικροοργανισμών και η βιβλιογραφία. Μια ακόμη παράμετρος η οποία πρέπει να ληφθεί υπόψη, είναι το γεγονός ότι το μάρμαρο δεν επιτρέπει επιπλέον απόθεση λόγω του ελάχιστου πορώδους. Σημειώνεται, ότι σε σειρά προκαταρκτικών δοκιμών με πορώδη λίθο (τα αποτελέσματα αυτά δεν παρουσιάζονται εδώ), οι μεταβολές βάρους ήταν σημαντικά μεγαλύτερες. Οι μεγαλύτερες αυτές τιμές μπορεί να βοηθήσουν στην ακριβέστερη πρόβλεψη του βέλτιστου. Παρόλα αυτά, δοκιμάζοντας και τις δύο θερμοκρασίες, παρουσιάστηκε η ευελιξία του στελέχους να αποθέτει σε ένα εύρος θερμοκρασίας, το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί προς όφελος μιας μελλοντικής εφαρμογής του σε πραγματικές συνθήκες.

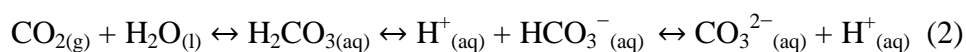
Και στους δύο μικροοργανισμούς, η βέλτιστη συγκέντρωση είναι και η μέγιστη που δοκιμάστηκε. Μπορεί να θεωρηθεί λογικό και αναμενόμενο, αλλά σημειώνεται ότι στα πρώτα πειράματα απόθεσης, η συγκέντρωση 4x δεν έδωσε τα αναμενόμενα αποτελέσματα. Επομένως, η επιλογή της συγκέντρωσης κρίνεται επιτυχής, διότι σε όλες τις περιπτώσεις παρατηρήθηκε σημαντική απόθεση στην επιφάνεια των δοκιμίων. Μελλοντικά, η συνέχιση ανάλογων δοκιμών με νέους απομονωμένους μικροοργανισμούς, θα μπορέσει να προσφέρει

περισσότερες πληροφορίες. Με βάση τα δεδομένα τα οποία παρουσιάζονται, δείχνουν ότι η πρόβλεψη μπορεί να είναι επιτυχής και να συνεισφέρει σημαντικά στη μείωση του χρόνου ελέγχου των δυνατοτήτων ενός απομονωμένου βακτηρίου. Η πιθανή επιλογή επιπλέον παραμέτρων αριστοποίησης, μπορεί να είναι η λύση στην απώλεια της ακρίβειας του βέλτιστου σημείου για τον *B. pumilus* ACA-DC 4061. Βάσει της βιβλιογραφίας, ανάλογη προσπάθεια δεν είναι γνωστή. Αντίθετα και στους δύο μικροοργανισμούς, προσέφερε τη δυνατότητα εξαγωγής συμπερασμάτων τα οποία επιβεβαιώθηκαν και πειραματικά στις τελικές δοκιμές. Μένει να αποδειχθεί μελλοντικά, εάν η προτεινόμενη διαδικασία μπορεί να βοηθήσει στη σάρωση των διαρκώς αυξανόμενων στελεχών που προτείνονται για την βιο-απόθεση ανθρακικού ασβεστίου σε λίθινα υποστρώματα.

4.6 Μεταβολισμός και Απόθεση Ανθρακικού Ασβεστίου

Για τη δημιουργία του ανθρακικού ασβεστίου, χρησιμοποιήθηκαν ετερότροφοι μικροοργανισμοί και η μεταβολική πορεία της οξειδωτικής απαμίνωσης. Με την οξειδωτική απαμίνωση, αποδομούνται τα αμινοξέα της πεπτόνης απελευθερώνοντας αμμωνία, η οποία συγκεντρώνεται και στο μικροπεριβάλλον του μικροοργανισμού, αυξάνοντας έτσι το pH του διαλύματος (Gottschalk 1985; Castanier et al. 1999; Hammes and Vestraete 2002). Ταυτόχρονα, απελευθερώνεται και CO₂ με τη μορφή ανθρακικών ανιόντων. Ο πληθυσμός των βακτηρίων αυξάνεται και ξεκινά η αφομοίωση των οξικών ανιόντων, τα οποία άμεσα «διοχετεύονται» στον κύκλο του τρικαρβοξυλικού οξέος, που αποτελεί ένα από τους κύριους μεταβολικούς κύκλους παραγωγής ενέργειας για τους μικροοργανισμούς (Braissant et al. 2002). Τελικό προϊόν του τελευταίου είναι CO₂, που απομακρύνεται στο μικροπεριβάλλον των κυττάρων, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 9.

Επομένως, η συγκέντρωση των ανθρακικών ανιόντων αυξάνεται περαιτέρω. Απλουστεύοντας τις αντιδράσεις προκύπτει:



Οι αντιδράσεις (1) και (2) προκύπτουν από την αποδόμηση των αμινοξέων, ενώ η (2) προκύπτει και από την αφομοίωση του οξικού. Τα κατιόντα αμμωνίου και τα υδροξύλια αυξάνουν το pH του μικροπεριβάλλοντος του μικροοργανισμού, ενώ ταυτόχρονα

χρησιμοποιούνται για το σχηματισμό των απαραίτητων ενώσεων προς ανάπτυξη. Αύξηση του pH μετατοπίζει την ισορροπία της αντίδρασης (2) προς τα δεξιά, οπότε περισσότερα ανθρακικά ανιόντα θα προκύψουν στο μικροπεριβάλλον, όπου υπάρχουν ταυτόχρονα τα κατιόντα ασβεστίου. Τα τελευταία ήδη βρίσκονται σε υψηλές συγκεντρώσεις (λόγω θρεπτικού) και αλληλεπιδρούν με τις αρνητικά φορτισμένες ομάδες των κυτταρικών μεμβρανών των βακτηρίων, συνεπώς «συγκρατούνται» κοντά ή πάνω στην επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης. Ο σχηματισμός ανθρακικού ασβεστίου, ενισχύει την απελευθέρωση νέων ποσοτήτων CO_3^{2-} από το εσωτερικό των κυττάρων, μέχρι την εξάντληση των θρεπτικών και τη μείωση του πληθυσμού, λόγω εγκλεισμού τους από το νέο υλικό.

Το οξικό ανιόν αποτέλεσε ιδανική πηγή ενέργειας, διότι αφομοιώθηκε άμεσα από τα στελέχη. Αυτό αποδείχθηκε παρακολουθώντας την καμπύλη ανάπτυξής τους (διαύξηση), όπου το οξικό ανιόν ξεκινά να αφομοιώνεται μετά από την πεπτόνη. Τα στελέχη του γένους *Pantoea* έδειξαν ότι χρησιμοποιούσαν οξικό από την αρχή της ανάπτυξής τους και για το λόγο αυτό δεν παρατηρήθηκε η διαύξηση. Επιπρόσθετα, οι Portillo et al. (2009) παρατήρησαν ότι το οξικό ανιόν ενισχύει το σχηματισμό ανθρακικού ασβεστίου, σε αντίθεση με τη γλυκόζη που προκάλεσε την ανάσχεσή του. Επίσης, δεν λειτουργεί σαν ρυθμιστικό διάλυμα λόγω της άμεσης κατανάλωσής του, επιτρέποντας τη γρηγορότερη αύξηση του pH σε τιμές που βοηθούν την απόθεση. Ο τρόπος με τον οποίο ο βατερίτης σταθεροποιείται, ανατρέποντας τη σειρά σταθερότητας των αλλόμορφων δομών του ανθρακικού ασβεστίου, εξηγείται παρακάτω.

4.7 Μορφολογία Ανθρακικού Ασβεστίου

Στο κεφάλαιο 1.5 της Θεωρίας, παρουσιάστηκε λεπτομερώς η βιβλιογραφία που αφορά οργανικές ενώσεις και μακρομόρια, τα οποία αποδεδειγμένα επηρεάζουν τη κρυστάλλωση του ανθρακικού ασβεστίου και γίνεται να θεωρήσουμε ότι μπορούν να ρυθμίσουν την πορεία της απόθεσης, όσον αφορά τη δομή του ανθρακικού ασβεστίου. Οι φωτογραφίες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας κατά τον έλεγχο των μικροοργανισμών και ιδιαίτερα των *C. metallidurans* ACA-DC 4073 και *B. pumilus* ACA-DC 4061, μας παραπέμπουν στην σημαντική παρεμβολή της κυτταρικής μεμβράνης των βακτηρίων, όταν ο βατερίτης αποτελεί την κύρια σχηματιζόμενη δομή. Το μήκος των ράβδων του κυττάρου του *C. metallidurans* ACA-DC 4073 είναι 1.1 – 2.2 μm (Goris et al. 2001) και από τις εικόνες

απόθεσης φαίνεται να συμπίπτει ικανοποιητικά με τις διαστάσεις των μορφών βατερίτη που παρατηρήθηκαν (Εικόνα 28). Παρατηρείται επίσης ότι μακρύτερες μορφές, είναι λεπτότερες στο μέσο περίπου του μήκους, που πιθανότατα σημαίνει ότι δύο βακτήρια τα οποία βρισκόντουσαν πολύ κοντά μεταξύ τους, τελικά παγιδεύτηκαν μέσα στο ανθρακικό ασβέστιο. Επιπλέον, οι μικροκρυσταλλικές σφαίρες που παρατηρούνται, είτε πάνω στα ήδη παγιδευμένα βακτήρια, είτε σε πολύ κοντινή απόσταση από αυτά, επιβεβαιώνουν τη «λειτουργία» των κυττάρων ως πυρήνες, όπου το CaCO_3 κρυσταλλώνεται με την ίδια μορφολογία και διατηρείται σε αυτή. Οι διαστάσεις του *B. pumilus* ACA-DC 4061 είναι 2 – 3 μm όσον αφορά το μήκος (Logan and De Vos 2009). Στις αντίστοιχες φωτογραφίες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας, επιβεβαιώνεται ξανά ότι τα κύτταρα συμμετέχουν άμεσα στο σχηματισμό, διότι οι διαστάσεις τους συμπίπτουν (Εικόνα 33) και είναι μεγαλύτερες από αυτές που παρατηρούνται για τον *C. metallidurans* ACA-DC 4073. Οι ράβδοι βατερίτη και οι αντίστοιχες διαστάσεις των κυττάρων επιβεβαιώνονται και για τους *B. cereus* ACA-DC 4064 (3 – 5 μm) και *B. licheniformis* ACA-DC 4063 (1.5 – 3 μm) (Εικόνα 20). Επομένως, οι οργανικές μορφές που σταθεροποιούν τη δομή του βατερίτη, προέρχονται από τις κυτταρικές μεμβράνες. Τα κατιόντα ασβεστίου βρίσκονται σε υψηλές συγκεντρώσεις λόγω του χρησιμοποιούμενου θρεπτικού, ενώ ταυτόχρονα, οι θρεπτικές πηγές όπως είναι η πεπτόνη και το οξικό ανιόν, προσφέρουν το κατάλληλο περιβάλλον, ώστε τα βακτήρια να αναπτυχθούν ικανοποιητικά και να σχηματίσουν υγιή κύτταρα. Οι κυτταρικές μεμβράνες προσφέρουν τα κατάλληλα σημεία, στα οποία μπορεί να αλληλεπιδράσουν το κατιόν του ασβεστίου με τα ανθρακικά ανιόντα.

Πιο συγκεκριμένα, για τον *B. pumilus* ACA-DC 4061, η επιφάνεια της πεπτιδογλυκάνης προσφέρει το κατάλληλο υπόστρωμα για τη σταθεροποίηση του βατερίτη. Η L-αλανίνη που σταθεροποιεί τον βατερίτη, υπάρχει στη πεπτιδική αλυσίδα που ενώνει τη πεπτιδογλυκάνη. Το γλουταμικό οξύ επίσης σταθεροποιεί τον βατερίτη καθώς και η L-λυσίνη, η οποία είναι εκ των 4 αμινοξέων της πεπτιδικής αλυσίδας που ενώνουν τις αλυσίδες πεπτιδογλυκάνης. Επίσης, η καρβοξυλομάδα του διαμινοπιμελικού οξέος (του 3^{ου} αμινοξέος στη πεπτιδική γέφυρα που ενώνει τις αλυσίδες πεπτιδογλυκάνης), μπορεί να συμμετέχει στη δέσμευση κατιόντων (Neuhaus and Baddiley, 2003). Η D-αλανίνη ως ανεξάρτητο μόριο, σταθεροποιεί τον ασβεστίτη (Wolf et al. 2007) και αποτελεί και αυτή συστατικό μέρος της πεπτιδικής γέφυρας. Ο εστέρας της, με τις ελεύθερες υδροξυλομάδες της φωσφορικής γλυκερόλης ή ριβιτόλης, είναι απαραίτητο συστατικό των τειχικών και λιποτειχικών οξέων και η συνολική συγκέντρωσή του, καθορίζει το συνολικό φορτίο των συγκεκριμένων

μακρομορίων. Η αμινομάδα μένει ελεύθερη και επηρεάζει το φορτίο, σε συνάρτηση με της φωσφορικές ομάδες. Επομένως, κοιτώντας τη βασική δομή της κυτταρικής μεμβράνης των Gram-θετικών βακτηρίων, υπάρχουν οι «προϋποθέσεις» για το σχηματισμό και στη σταθεροποίηση του βατερίτη. Πιθανότατα, και τα σάκχαρα της πεπτιδογλυκάνης με τις υδροξυλ-, καρβονυλ-, και αμινο-ομάδες, μπορούν να επηρεάσουν τη μορφολογία του σχηματισμού ανθρακικού ασβεστίου, σταθεροποιώντας είτε τα κατιόντα ασβεστίου, ή και τα ανθρακικά ανιόντα. Τα τειχικά οξέα, όπως περιγράφηκε και στην εισαγωγή, δεσμεύουν δισθενή κατιόντα για τον καλύτερο έλεγχο του συνολικού αρνητικού φορτίου της μεμβράνης (Swoboda et al. 2010). Το ποσοστό εστεροποίησης διαφοροποιείται σημαντικά ανάμεσα στους μικροοργανισμούς, αλλά και στον ίδιο το μικροοργανισμό, βάσει των συνθηκών ανάπτυξης. Με αυτόν τον τρόπο, αλλάζει και το συνολικό φορτίο της κυτταρικής μεμβράνης και η συγγένεια σε κατιόντα μετάλλων καθορίζοντας, μεταξύ των άλλων, τη μορφολογία της κυτταρικής μεμβράνης και την ποσότητα μεταλλοϊόντων τα οποία αλληλεπιδρούν (Neuhaus and Baddiley, 2003). Τα αμινοξέα, επιδρούν ακόμα περισσότερο μέσω των αγκυροβολημένων πρωτεϊνών στην κυτταρική μεμβράνη. Οι πρωτεΐνες αυτές, βρίσκονται ανάμεσα στις αλυσίδες της πεπτιδογλυκάνης και σταθεροποιούνται με πεπτιδικούς δεσμούς, μεταξύ των αμινοξέων της πρωτεΐνης και των αμινοξέων που ενώνουν τις αλυσίδες πεπτιδογλυκάνης (Vollmer et al. 2008). Στον Gram-αρνητικό *C. metallidurans*, το αρνητικό φορτίο της εξωτερικής μεμβράνης, ρυθμίζεται κυρίως από τους λιποπολυσακχαρίτες. Καταρχήν, το λιπίδιο A που αποτελεί τη βάση του λιποπολυσακχαρίτη, μπορεί να έχει φωσφορυλιωμένες γλυκοσαμίνες, δίνοντας αρνητικό φορτίο, αλλά και άλλους υποκαταστάτες οι οποίοι διαφοροποιούν το συνολικό φορτίο (Caroff and Karibian 2003). Η πρώτη KDO (κετο-δεοξυ-οκτανικό οξύ; Εικόνα 8), ενώνεται με τη μια εκ των δύο γλυκοζαμινών και μπορεί σε αυτήν να ενωθούν άλλες δύο KDO. Μπορούν να είναι φορτισμένες αρνητικά, λόγω της καρβοξυλομάδας που διαθέτουν, ή να φωσφορυλιωθούν, δίνοντας επιπλέον αρνητικό φορτίο. Κυρίως όμως, οι επτόζες που ενώνονται με την πρώτη KDO, μπορούν να υποστούν πολλές διαφοροποιήσεις λόγω υποκατάστασης τους με φωσφορικό, πυροφωσφορικό ή φωσφορυλεθανολαμίνη, αλλάζοντας το συνολικό αρνητικό φορτίο του εσωτερικού πυρήνα του λιποπολυσακχαρίτη (Caroff and Karibian 2003). Ο εξωτερικός πυρήνας αποτελείται συνήθως από ουδέτερες εξόζες (π.χ. γλυκόζη), ή εξόζες που έχουν αμινομάδα (εξοζαμίνες π.χ. γλυκοζαμίνη), επηρεάζοντας περαιτέρω το φορτίο (Caroff et al. 2002). Τέλος, και η Ο-αλυσίδα (ή Ο-πολυσακχαρίτης) που αποτελείται από επαναλαμβανόμενες μονάδες ολιγοσακχαριτών διαφοροποιεί το φορτίο, λόγω της πληθώρας συνδυασμών που μπορούν να παρατηρηθούν, ως προς τη μονάδα ολιγοσακχαρίτη, αλλά και

τους υποκαταστάτες των σακχάρων (φωσφορικό, φωσφορυλεθανολαμινη, αμινοξέα κ.α.) (Caroff and Karibian 2003). Σημειώνεται ότι ένας γενικός κανόνας, όσον αφορά τα σάκχαρα της αλυσίδας, είναι ότι η αναλογία όξινων προς ουδέτερων σακχάρων είναι 1:4 (Kabanov and Prokhorenko 2010). Συνολικά, το κύριο φορτίο της εξωτερικής κυτταρικής μεμβράνης είναι αρνητικό και αλληλεπιδρά άμεσα με τα κατιόντα του διαλύματος, ώστε να μπορούν να εμφανιστούν πάνω στην κυτταρική μεμβράνη πυρήνες σχηματισμού ορυκτών, που στη συγκεκριμένη περίπτωση είναι το CaCO_3 (Beveridge 1999).

Η υψηλή συγκέντρωση κατιόντων ασβεστίου, επηρεάζει σημαντικά τις παραπάνω ιοντικές διαδικασίες που εξελίσσονται στην κυτταρική μεμβράνη, με στόχο την επιβίωση του μικροοργανισμού. Τα αρνητικά φορτία, αλληλεπιδρούν άμεσα με τα θετικά Ca^{2+} ακινητοποιώντας αυτά στην κυτταρική μεμβράνη. Η συνεχής διάχυση των ανθρακικών ανιόντων λόγω του μεταβολισμού, ειδικά μετά την εκκίνηση αφομοίωσης του οξικού, βρίσκει τα κατιόντα ασβεστίου, προκαλώντας το σχηματισμό ανθρακικού ασβεστίου, με τα οργανικά μακρομόρια και τα συστατικά τους να σταθεροποιούν τη δομή του βατερίτη. Περαιτέρω κατανόηση αυτής της πορείας μένει να αποδειχθεί δεδομένου, όπως σημειώθηκε στην Εισαγωγή, μόλις πρόσφατα η ακριβής μορφολογία και δομή της κυτταρικής μεμβράνης έχει αρχίσει να γίνεται κατανοητή, ενώ οι γνώσεις περί της λειτουργικότητας των συστατικών της, συνεχώς εμπλουτίζονται.

Ο βατερίτης έχει αναφερθεί και σε άλλες πειραματικές διαδικασίες, με διαφορετικά θρεπτικά διαλύματα. Κατά Gram – αρνητικά βακτήρια (όπως ο *C. metallidurans* ACA-DC 4073), σε διαφοροποιημένο B4 θρεπτικό, σχημάτισαν βατερίτη σε συνθήκες ανάπτυξης, χωρίς ανάδευση και με χαμηλότερη συγκέντρωση οξικού ασβεστίου (Zamarreno et al. 2009a and b). Το θρεπτικό M3, που χρησιμοποιήθηκε εκτεταμένα κατά τη έρευνα του *M. xanthus* και της μικρογλωρίδας πορώδους πέτρινου υποστρώματος, προκάλεσε το σχηματισμό βατερίτη (Rodriguez-Navarro et al. 2003 and 2007; Jimenez-Lopez et al. 2007 and 2008; Jroundi et al. 2010). Το θρεπτικό BP3x, είχε χαμηλότερη συγκέντρωση οξικού ασβεστίου, σε σχέση με το M3. Η συγκέντρωση των απαραίτητων συστατικών, αποτελεί σημαντικό παράγοντα, μιας και παραπλήσια θρεπτικά (M3-P και CC) που διερευνήθηκαν από την ίδια επιστημονική ομάδα, σχημάτισαν ασβεστίτη έχοντας σαφώς χαμηλότερη συγκέντρωση οξικού ασβεστίου.

Στελέχη της Οικογένειας των Βακίλων, έχουν ταυτοποιηθεί στην πλειονότητα των περιβαλλοντικών δειγμάτων για τη διερεύνηση βιο-απόθεσης ανθρακικού ασβεστίου. Τα

θρεπτικά που έχουν χρησιμοποιηθεί έχουν με τη σειρά τους σημαντικές διαφορές, αλλά σε αρκετές περιπτώσεις εμφανίζεται βατερίτης, είτε καθαρός, είτε σε μίγματα με ασβεστίτη. Ο *B. cereus* που απομονώθηκε, έχει ήδη αναφερθεί ότι προωθεί το σχηματισμό ασβεστίτη (Castanier et al. 1999; Han et al. 2013; Kaur et al. 2013) ενώ στο θρεπτικό BP3x που χρησιμοποιήθηκε εδώ, προκάλεσε το σχηματισμό βατερίτη. Σε παρόμοιο, αλλά με περισσότερα συστατικά στερεό θρεπτικό, ο ίδιος μικροοργανισμός σχημάτισε βατερίτη και ασβεστίτη σε υγρή καλλιέργεια. Στην ίδια εργασία, ο *Bacillus licheniformis* σχημάτισε βατερίτη σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα και υγρό τις πρώτες ώρες επώασης ενώ μετά ανιχνεύτηκε ασβεστίτης (Kahoui et al. 2000). Ο *B. cereus* έχει χρησιμοποιηθεί για την απόθεση ασβεστίτη σε πέτρινα υποστρώματα από Γάλλους ερευνητές (Le Métayer-Levrel et al. 1999), οι οποίοι ήταν από τους πρώτους που εφάρμοσαν μια τέτοια μεθοδολογία για την αποκατάσταση διαβρωμένων λίθινων μνημείων, υπό τον τίτλο: Calcite Bioconcept technique (Adolphe et al. 1990). Στην ίδια ευρεσιτεχνία, αναφέρονται και οι *B. licheniformis* και *B. megaterium*. Σε άλλη έρευνα που περιελάμβανε στέλεχος του *B. licheniformis*, μίγμα ασβεστίτη-βατερίτη σχηματιζόταν όταν κύτταρα εμβολιάζονταν σε διάλυμα αλάτων ασβεστίου και ανθρακικών ανιόντων (Tourney and Ngwenya 2009). Ο *B. megaterium* απομονωμένος από σπήλαιο στην Ιταλία, σχημάτισε ασβεστίτη σε στερεό B4 υπόστρωμα (Cacchio et al. 2003). Οι *Bacillus subtilis* και *Lysinibacillus (Bacillus) sphaericus* σχηματίζουν βατερίτη σε διαφοροποιημένο B4 θρεπτικό του οποίου η βασική διαφορά ήταν ότι το pH δεν ρυθμίστηκε όπως προηγουμένως και η συγκέντρωση οξικού ασβεστίου ήταν μεγαλύτερη (Shirakawa et al. 2011).

Ανάλογο αποτέλεσμα προέκυψε από τον *Lysinibacillus (Bacillus) sphaericus* (De Muynck et al. 2008a; Kim et al. 2013) και του *Sporosarcina (Bacillus) pasteurii* (Kim et al. 2013). Οι δοκιμές πραγματοποιήθηκαν σε θρεπτικό ενισχυμένο με ουρία και οξικό ασβέστιο / Nutrient broth (De Muynck et al. 2008a and b; Kim et al. 2013). Η συγκέντρωση του οξικού ασβεστίου στα πειράματα με τον *B. pumilus* ACA-DC 4061 ήταν 0.047M, τιμή αρκετά χαμηλότερη σε σχέση με το 0.32M (De Muynck et al. 2008a) ή 0.16M (De Muynck et al. 2008b) για *B. sphaericus* και 0.164M για *S. pasteurii* (Kim et al. 2013). Ο *S. pasteurii* σχημάτισε βατερίτη σε μεγαλύτερη αναλογία συγκρινόμενος με τον *L. sphaericus* (Kim et al. 2013). Η βασική διαφορά με προηγούμενες δοκιμές, όπου σχηματιζόταν αποκλειστικά ασβεστίτης (Mitchell and Ferris 2006), ήταν το πλουσιότερο σε θρεπτικά συστατικά διάλυμα και η προσθήκη οξικού ασβεστίου. Οι *B. thuringiensis* και *L. fusiformis* προωθούν βατερίτη (Kaur et al. 2013). Αντίθετα, *B. pumilus* που απομονώθηκε από σπήλαιο, όπως και εδώ, σε

στερεό υπόστρωμα θρεπτικού B4 σχημάτισε ασβεσίτη (Baskar et al. 2006). Τα Gram – θετικά στελέχη έχουν αξιοποιηθεί λόγω του γονιδίου της ουρεάσης που διαθέτουν. Το συγκεκριμένο γονίδιο, προσφέρει ένα συγκριτικό πλεονέκτημα της γρήγορης αποδόμησης ενός φτηνού αντιδρώντος (ουρεάση) στα συστατικά του, που είναι αμμωνία και ανθρακικά ανιόντα, όπως περιγράφηκε διεξοδικά στην Εισαγωγή. Η διερεύνηση του *B. pumilus* ACA-DC 4061, επιβεβαίωσε ότι η χρήση οξικού ασβεστίου επηρεάζει σημαντικά τη τελική μορφολογία του ανθρακικού ασβεστίου, σχηματίζοντας βατερίτη. Το θρεπτικό που εφαρμόστηκε στην παρούσα διατριβή, μπορεί να θεωρηθεί ότι βρίσκεται στο κατώτερο (ή κοντά στο) όριο όπου μπορεί να προκληθεί ο σχηματισμός βατερίτη.

Οι άνυδρες αλλόμορφες δομές ανθρακικού ασβεστίου είναι τρεις: βατερίτης, αραγονίτης και ασβεσίτης, με τον βατερίτη να είναι η ασταθέστερη μορφή και τον ασβεσίτη η σταθερότερη (Mann 2001). Αυτό επίσης επιβεβαιώνεται από τα $\log K_{sp}$ των υλικών τα οποία είναι περίπου -7.95 για τον βατερίτη και -8.50 για τον ασβεσίτη, για θερμοκρασία 30 °C. Επομένως ο ασβεσίτης είναι λιγότερο διαλυτός και σταθερότερος. Ο βατερίτης θεωρείται ασταθής και μετατρέπεται σε ασβεσίτη σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και ατμοσφαιρικής πίεσης (Suzuki et al. 2006). Ο βατερίτης που έχει σχηματιστεί σε αβιοτικές συνθήκες, αν διατηρηθεί απουσία υγρασίας, παραμένει σταθερός έως και τους 670 K. Αντίθετα, αν παραμείνει σε υδατικό διάλυμα, μετατρέπεται εν τέλει σε ασβεσίτη (Wang and Becker 2009). Επιπλέον, βατερίτης ο οποίος σχηματίστηκε ανόργανα μετατρέπεται σε ασβεσίτη, όταν το διάλυμα υποβληθεί σε υπερήχους σε θερμοκρασία δωματίου (Berdonosov et al. 2005). Σε αντίθεση με τις ανόργανες διαδικασίες καταβύθισης, όταν υπάρχει η παρεμβολή οργανικών ενώσεων, η ισορροπία αλλάζει προκαλώντας τη σταθεροποίησή του. Σε πειράματα με πεπτίδια για το σχηματισμό ανθρακικού ασβεστίου, τα δείγματα εκτός διαλύματος διατήρησαν τη δομή του βατερίτη, αποδεικνύοντας ότι η μετατροπή δεν αφορά τη στερεά κατάσταση. Αντίθετα, σε διάλυμα, η συμμετοχή οργανικών μορίων (φάγοι) καθυστέρησαν αλλά δεν ανέστειλαν τη διαδικασία μετατροπής σε ασβεσίτη. Η τελευταία, εξελίσσεται με την διαλυτοποίηση του ασταθούς βατερίτη και την ταυτόχρονη ανακρυστάλλωσή τους στον σταθερότερο ασβεσίτη (Li et al. 2002). Ανάλογες διαδικασίες δεν παρατηρήθηκαν στα δικά μας δείγματα. Ο βατερίτης παρέμεινε σταθερός κατά τη διάρκεια των πειραμάτων, καθώς και κατά τη φύλαξή του σε θερμοκρασία δωματίου για περισσότερο από 2 χρόνια. Τα ίδια δείγματα, όταν διαλύθηκαν σε νερό με ρυθμισμένο $pH > 8$ και αφέθηκαν για αργή ξήρανση, έδειξαν πανομοιότυπο φάσμα FT-IR. Άρα, ούτε μετατροπή μέσου στερεάς κατάστασης του νέου υλικού παρατηρήθηκε, ούτε μέσω μεσολάβησης του

διαλύματος. Αξίζει να σημειωθεί, ότι η πληθώρα δειγμάτων που αναλύθηκαν με FT-IR, επιβεβαίωσαν την άμεση δυνατότητα που υπάρχει στο να ταυτοποιηθούν ασβεστίτης και βατερίτης με ασφάλεια, ακόμα και σε δείγματα που μια εκ των δύο μορφών ήταν φαινομενικά σε αρκετά μικρότερες ποσότητες. Οι κορυφές οι οποίες παρουσιάστηκαν στην Εικόνα 12, δείχνουν τις χαρακτηριστικές κορυφές που είναι αναγκαίες για την ταυτοποίηση (Vagenas et al. 2003). Ο νόμος του Ostwald για την σταθερότητα των σχηματιζόμενων υλικών, δηλώνει ότι η λιγότερο σταθερή κρυσταλλική φάση ενός υλικού θα σχηματιστεί πρωτύτερα της σταθερότερης (Mann 2001). Αυτό σημαίνει ότι στα πειραματικά διαλύματα, πρώτα θα εμφανιζόταν ο βατερίτης και στη συνέχεια θα μετατρεπόταν σε ασβεστίτη, που είναι και η πλέον σταθερότερη κρυσταλλική δομή. Η χαρακτηριστική σταθερότητα του βατερίτη στα πειραματικά αποτελέσματα επιβεβαιώνει τη διακοπή της διαδικασίας μετατροπής και του Νόμου του Ostwald. Ο λόγος που γίνεται αυτό και δεν εμφανίζεται σε κανέναν από τους δύο μικροοργανισμούς η μετατροπή του βατερίτη σε ασβεστίτη (είτε σε στερεή κατάσταση, είτε σε διάλυμα), είναι η άμεση παρεμβολή των οργανικών ενώσεων. Βάσει των μορφολογιών που παρατηρήθηκαν, αυτές προέρχονται από ολόκληρα κύτταρα με τον εγκλεισμό τους από ανθρακικό ασβέστιο. Οι μικροκρυσταλλικές σφαιρικές μορφές που επίσης παρατηρήθηκαν, μπορούν να οφείλονται στην εμπλοκή οργανικών μορίων ή μακρομορίων στο μικροπεριβάλλον των κυττάρων. Εναλλακτικά ενδέχεται να αποτελούν «πρόδρομους» σχηματισμούς, οι οποίοι δημιουργούνται στην επιφάνεια των κυτταρικών μεμβρανών, χωρίς όμως να «ολοκληρώνουν» τη διαδικασία εγκλεισμού του κυττάρου. Σε κάθε περίπτωση, η θεωρία της άμεσης παρεμβολής των κυττάρων ενισχύεται και από την ταυτοποίηση της κορυφής φωσφόρου στα δείγματα της απόθεσης, σε αντίθεση με το καθαρό υπόστρωμα στο οποίο δεν ανιχνεύτηκε.

Η χρήση υπερήχων προτάθηκε αρχικά από τους Rodriguez-Navarro et al. (2003), ως μέθοδος εξακρίβωσης της σταθερότητας του αποτιθέμενου υλικού στα δοκίμια και της συνεκτικότητας μεταξύ τους. Και στους δύο μικροοργανισμούς η διαφορά απώλειας βάρους ήταν ανιχνεύσιμη, με τον βατερίτη να σταθεροποιείται και να μην αποκολλάται. Σημειώνεται, ότι οι υπέρηχοι επιδρούν στο σύνολο της επιφάνειας του παραλληλόγραμμου δοκιμίου, όταν μόνο η μια εκ των δύο μεγάλων πλευρών έχει τον βατερίτη. Άρα ακόμα και αν το σύνολο της απώλειας βάρους οφειλόταν στην επικαλυμμένη πλευρά, αποδεικνύεται ότι το νέο υλικό παραμένει σε σημαντικό βαθμό ανέπαφο και με τη μορφολογία του अपαράλλακτη και για τα δύο στελέχη. Στις μόνες περιπτώσεις που παρουσιάστηκε αποκόλληση ήταν σε σημεία με ελάχιστη επικάλυψη όμοια των αρχικών σταδίων απόθεσης.

Αξιοσημείωτο είναι ότι και στις δύο περιπτώσεις μικροοργανισμών, η μικρότερη απώλεια βάρους εμφανίστηκε στα δείγματα της 12^{ης} πειραματικής ημέρας. Ανάλογες επιτυχείς αποθέσεις ανθρακικού ασβεστίου έχουν παρουσιαστεί από άλλες ερευνητικές ομάδες όπως για τον *M. xanthus* (Rodriguez-Navarro et al. 2003; Jimenez-Lopez et al. 2008) και τον *B. sphaericus* (De Muynck et al. 2010b). Οι συγκρίσεις μπορούν να είναι μόνο ποιοτικές διότι τα υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν στις παραπάνω εργασίες είναι διαφορετικά και αφορούν λίθους με μεγαλύτερο πορώδες. Οι πόριβοι στην καλύτερη απόθεση και στην προστασία του νέου υλικού από τους υπερήχους. Επομένως, η παραμονή του βατερίτη πάνω στα δοκίμια μαρμάρου αναδεικνύει τη σταθερότητα του νέου υλικού και τη συνεκτικότητά του. Περαιτέρω επιβεβαίωση προήλθε από τις λεπτές τομές και την ανάλυση τους με οπτική και ηλεκτρονική μικροσκοπία.

4.8 Αποτελέσματα Λεπτών Τομών

Η χρήση λεπτών τομών των δειγμάτων, μετά την εφαρμογή υπερήχων, επιβεβαίωσαν τις δυνατότητες των δύο μικροοργανισμών. Η οπτική και ηλεκτρονική μικροσκοπία παρουσίασαν πώς οι μικροοργανισμοί επικάλυψαν πλήρως την μαρμάρινη επιφάνεια με βατερίτη, ο οποίος είχε αντεπεξέλθει στις δυνάμεις υπερήχων, αλλά και τη διαδικασία παρασκευής των λεπτών τομών. Όσον αφορά το δεύτερο, η κατασκευή των λεπτών τομών περιλαμβάνει την εμβάπτιση του δείγματος σε κατάλληλη ρητίνη, συγκόλληση της επιφάνειας προς διερεύνηση σε γυάλινη επιφάνεια και μετά τη λειοτρίβιση του δοκιμίου ώστε να επιτευχθεί η λεπτή τομή. Η όλη διαδικασία εφαρμόζει σημαντική δύναμη στην επιφάνεια του δοκιμίου με αποτέλεσμα, κομμάτια τα οποία δεν είναι συνεκτικά να αποκολλώνται ή να μετατοπίζονται. Οι εικόνες των λεπτών τομών απέδειξαν το αντίθετο για την νέα επιφάνεια βατερίτη, ο οποίος παρέμεινε σε επαφή με την επιφάνεια του μαρμάρου. Σε σημεία όπου το μάρμαρο έσπασε, αυτό συνοδεύτηκε με τη αποκόλληση και του βατερίτη από την επιφάνειά του. Σε κανένα δοκίμιο λεπτής τομής δεν παρατηρήθηκε η απομάκρυνση του νέου υλικού. Για τον *C. metallidurans* ACA-DC 4073 στην Εικόνα 30 που παρουσιάζονται οι λεπτές τομές, φαίνεται ότι ακόμα και η απομάκρυνση του υποστρώματος, δεν εμπόδισε τον βατερίτη να παραμείνει σταθερός στο σημείο που είχε αποθεθεί. Ο *B. pumilus* ACA-DC 4061 παρουσίασε περισσότερο συμπαγή επιφάνεια απόθεσης σε σχέση με αυτή του *C. metallidurans* ACA-DC 4073. Τα κενά που παρατηρήθηκαν στον τελευταίο δεν παρατηρήθηκαν στον βράκιο, πράγμα το οποίο μπορεί να οφείλεται και στη μεγαλύτερη

απόθεση του *B. pumilus* ACA-DC 4061. Παρόλα αυτά, τα κενά σημεία στο εσωτερικό του βατερίτη του *C. metallidurans* ACA-DC 4073 μειώθηκαν σε δείγμα λεπτής τομής που προήλθε από επιπλέον επώαση. Επομένως, ο σχηματισμός νέου υλικού πιθανόν να μετατόπισε το ήδη σχηματισμένο και να το κατέστησε περισσότερο συμπαγές. Οι λεπτές τομές σε οπτικό μικροσκόπιο μπορούν να προσφέρουν την άμεση εξακρίβωση του νεότερου υλικού από το υπόστρωμα. Το χρώμα πόλωσης του φωτός, που είναι διαφορετικό, καθώς και η μικροκρυσταλλικότητά του μπορούν να συνεισφέρουν στην ποιοτική ανάλυση ενός δείγματος που προέρχεται από περιβαλλοντικό δείγμα.

Οι εικόνες από το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο των λεπτών τομών επιβεβαίωσαν τη συνεκτικότητα και τη σύσταση του βατερίτη. Η μεγαλύτερη μεγέθυνση, προσέφερε τη δυνατότητα παρατήρησης των ρωγμών μέσα στο νέο υλικό αλλά και στο υπόστρωμα, αποδεικνύοντας ότι η συμπεριφορά ήταν ανάλογη χωρίς τον βατερίτη να εμφανίζει χαμηλότερη αντοχή. Τέλος, στις εικόνες που αντιστοιχούν στον *B. pumilus* ACA-DC 4061, τα θραύσματα του μαρμάρου, τα οποία δεν απομακρύνθηκαν από την αποστείρωση ή τις πρώτες μέρες επώασης στο θρεπτικό διάλυμα, στερεώθηκαν από την ανάπτυξη του μικροοργανισμού και την απόθεση βατερίτη γύρω από αυτά, προσφέροντας μία ακόμη απόδειξη της επαρκούς βιο-απόθεσης και προστασίας της μαρμάρινης επιφάνειας.

4.9 Αποτελέσματα Χρωματομετρίας

Οι τιμές χρωματομετρίας, αποτελούν μια από τις βασικές παραμέτρους μέσω της οποίας κρίνεται εάν μια μέθοδος μπορεί να ανταποκριθεί στα προαπαιτούμενα των διαδικασιών συντήρησης. Γενική κατεύθυνση αποτελεί η επιδίωξη της ελάχιστης μεταβολής του χρώματος, κατά τη συντήρηση ενός μνημείου, προσδίνοντας σε αυτό τα νέα χαρακτηριστικά τα οποία θα το καταστήσουν βιώσιμο. Παρόλα αυτά, επιλέγεται και το αντίθετο, δηλαδή να είναι εμφανή τα σημεία επέμβασης για τη συντήρηση και στερέωση των μνημείων. Στα αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν για τους μικροοργανισμούς, τα δείγματα των τελευταίων ημερών επώασης που πέτυχαν την πλήρη κάλυψη των δοκιμίων, παρουσίασαν σημαντικές χρωματικές διαφορές. Σημειώνεται όμως ότι επελέγη η σύγκριση με νέο μάρμαρο Διονύσου, πρόσφατα εξορυγμένο και είχε το «πρότυπο» χρώμα χωρίς καμία μεταβολή. Από τις χρωματικές παραμέτρους των δειγμάτων αναφοράς φαίνεται η ποιότητα του λευκού χρώματος. Με τη χρήση των δοκιμίων, παρακολούθηθηκε από την αρχή η πορεία μεταβολής των χρωματικών παραμέτρων αντλώντας χρήσιμες πληροφορίες κατά τη διάρκεια

της σταδιακής επικάλυψης. Ο βατερίτης ο οποίος αποτέθηκε, δεν κατέστη δυνατόν να επιτύχει την προϋπόθεση της ελάχιστης χρωματική μεταβολής ($\Delta E^* \leq 6$) όταν η επιφάνεια είχε καλυφθεί. Δημιουργήθηκε όμως μια βάση δεδομένων, όπου μπορεί ποιοτικά να εκτιμηθεί, προς τα πού «κινούνται» οι χρωματικές παράμετροι του κάθε στελέχους και αναλόγως να προβλεφθεί με πιο πραγματικό υπόστρωμα έχει τη μεγαλύτερη συμβατότητα. Το τελευταίο είναι εμφανές όταν οι τιμές συγκρίθηκαν με αρχαία μαρμάρια υποστρώματα της περιοχής των Αθηνών.

Ειδικότερα, για τον *C. metallidurans* ACA-DC 4073 παρατηρήθηκε ότι οι χρωματική παράμετρος ΔE^* απομακρύνεται σημαντικά από το όριο του $\Delta E^* \leq 6$ το οποίο είναι αποδεκτό κατά τις διαδικασίες συντήρησης και αποκατάστασης. Παρόλα αυτά, οι τιμές αντιστρέφονται όταν συγκριθούν με αρχαία μάρμαρα που έχουν υποστεί φθορές αλλά και διαδοχικές αποκαταστάσεις. Σε αυτήν την περίπτωση η μέγιστη απόσταση που επιτυγχάνεται τις τελευταίες μέρες επώασης, πλησιάζει ή είναι χαμηλότερη από το όριο $\Delta E^* \leq 6$ γεγονός που θα καθιστούσε τη μέθοδο χρωματομετρικά αποδεκτή. Το αντίθετο παρατηρείται στη περίπτωση του *B. pumilus* ACA-DC 4061, όπου οι τιμές ως προς το πρότυπο λευκό μάρμαρο παραμένουν χαμηλές, πλην του τελευταίου δείγματος που ξεπερνούν ελάχιστα το όριο. Αντίθετα, όταν η σύγκριση γίνει ως προς παλαιότερα δείγματα οι τιμές είναι μεγαλύτερες. Αναδεικνύεται το γεγονός ότι οι δύο μικροοργανισμοί λειτουργούν «αντιδιαμετρικά» ως προς τις χρωματικές απαιτήσεις ενός μνημείου. Εάν η φθορά του είναι σημαντική και οι παράμετροι χρωματομετρίας απομακρύνονται από το πρότυπο του λευκού μαρμάρου, τότε η χρήση του *C. metallidurans* ACA-DC 4073 αποτελεί την ενδεδειγμένη επιλογή. Στην αντίθετη περίπτωση, μπορεί να προταθεί η χρήση του *B. pumilus* ACA-DC 4061.

4.10 Αποτελέσματα Δοκιμών Απόθεσης σε μη Αποστειρωμένες Συνθήκες

Η τελευταία σειρά πειραμάτων για κάθε μικροοργανισμό, είχε ως στόχο την προκαταρκτική προσέγγιση σε συνθήκες μη αποστειρωμένες και προσπάθεια επικάλυψης της επιφάνειας με ψεκασμό. Ο ψεκασμός του θρεπτικού διαλύματος με τον μικροοργανισμό αποτελεί την πιθανότερη επιλογή στην περίπτωση εφαρμογής της μεθόδου σε μεγάλες επιφάνειες. Τα αποτελέσματα με τη χρήση και των δύο μικροοργανισμών είναι ενθαρρυντικά, λαμβάνοντας υπόψη την ελάχιστη ποσότητα που ενίοτε εφαρμοζόταν στην

επιφάνεια των μαρμάρινων δοκιμίων, ώστε να καλυφθούν με το ελάχιστο ενιαίο στρώμα διαλύματος. Η μορφολογία της απόθεσης παρέμεινε σταθερή σε σχέση με τα προηγούμενα πειράματα. Στον *B. pumilus* ACA-DC 4061, οι μορφές αντιστοιχούν στις διαστάσεις των βακτηρίων, ενώ για τον *C. metallidurans* ACA-DC 4073 η μορφολογία των νέων κρυστάλλων είναι περισσότερο σφαιρική. Οι δομές παραπέμπουν σε βατερίτη βάσει των εικόνων ηλεκτρονικής μικροσκοπίας από τα προηγούμενα πειράματα. Αναδεικνύεται η σημασία των αρχικών πειραμάτων και η διεξοδική διερεύνηση της πορείας σχηματισμού του ανθρακικού ασβεστίου και της μορφολογίας του, σε διαφορετικές συνθήκες αλλά και ημέρες επώασης. Χρωματομετρικά, και οι δύο μικροοργανισμοί είχαν αρκετά χαμηλές τιμές ως προς το λευκό μάρμαρο και υψηλές τιμές ως προς τα αρχαία δοκίμια. Τα αποτελέσματα ήταν αναμενόμενα, λαμβάνοντας υπόψη ότι η επικάλυψη ήταν σαφώς μικρότερη από αυτή των βυθισμένων δοκιμίων σε θρεπτικό. Είναι εμφανές ότι η τελική χρωματική διαφοροποίηση μπορεί να ελεγχθεί, βάσει του χρόνου εφαρμογής της μεθόδου αλλά και του επιλεγμένου στελέχους καθιστώντας τη μέθοδο βιώσιμη.

Η απόθεση που παρατηρήθηκε στα τελευταία πειράματα, αναδεικνύει ότι σε σύντομο χρονικό διάστημα μπορεί να επιτευχθεί μια ικανοποιητική επικάλυψη, ανιχνεύσιμη και να αποδοθεί μορφολογικά στο βατερίτη. Η περαιτέρω απόθεση μπορεί να ελεγχθεί από τη συχνότητα ψεκασμού, την ποσότητα που εφαρμόζεται κάθε φορά και το σημείο ανάπτυξης που βρίσκεται ο μικροοργανισμός. Στην πρώτη προσέγγιση που πραγματοποιήθηκε εδώ, τα βακτήρια ψεκάστηκαν λίγο πριν την εκκίνηση αφομοίωσης των οξικών ανιόντων που αποτελεί και το «ένανσμα» σχηματισμού του ανθρακικού ασβεστίου. Μια μελλοντική προσέγγιση θα αποτελούσε ο ψεκασμός εμβολιασμένων θρεπτικών, όπου ο μικροοργανισμός έχει ήδη αρχίσει να αποθέτει, προσφέροντας ταυτόχρονα κρυστάλλους ανθρακικού ασβεστίου ως αρχικούς πυρήνες σχηματισμού του βιο-υλικού. Περαιτέρω έρευνα θα δώσει αναλυτικότερες εκτιμήσεις βιωσιμότητας της μεθόδου οικονομικά, ποσοτικά και ποιοτικά.

Παρόμοιες προσπάθειες για τη βιο-στερέωση λίθινων υποστρωμάτων έχουν πραγματοποιηθεί σε διαφορετικά υποστρώματα. Για το λόγο αυτό δεν μπορούν άμεσα να συγκριθούν παρά μόνο να εξαχθούν ποιοτικά συμπεράσματα. Μια από τις πρώτες προσπάθειες έγινε από Γάλλους ερευνητές όπως περιγράφηκε και στο κεφάλαιο της Θεωρίας (Adolphe et al. 1990; Castanier et al. 1995). Η μέθοδος προέκρινε τον *B. cereus* μολονότι μέσα στην κατοχυρωμένη ευρεσιτεχνία αναφέρονται και άλλα στελέχη κυρίως του ίδιου γένους. Πέρα από την επιτυχία της μεθόδου βάσει δειγμάτων που αναλύθηκαν μετά από μερικά χρόνια από τους ίδιους τους εφευρέτες, περισσότερες λεπτομέρειες δεν έχουν

ανακοινωθεί. Το μόνο που μπορεί να αναφερθεί είναι ότι η διαδικασία ψεκάσμου που χρησιμοποιήθηκε και στην παρούσα έρευνα, επιβεβαιώνει τη βιωσιμότητα από οικονομικής άποψης. Επίσης το θρεπτικό BP3x περιέχει σαφώς λιγότερα συστατικά σε σχέση με το προτεινόμενο από τους Γάλλους. Επιγραμματικά, τα θρεπτικά των Γάλλων περιέχουν μια σειρά από ανόργανα άλατα, πεπτόνη, εκχύλισμα ζύμης και γλυκόζη. Μολονότι ένα τέτοιο θρεπτικό θα συνεισφέρει σημαντική αύξηση των επιλεγμένων μικροοργανισμών, η χρήση γλυκόζης μπορεί να προκαλέσει το σχηματισμό οξέων σαν τελικό προϊόν το οποίο είναι επιβλαβές για τα λίθινα υποστρώματα. Ανάλογα, και τα άλατα τα οποία παρέχονται μπορούν να σχηματίσουν ενώσεις με περιβαλλοντικές επικαθίσεις, ή να μην αφομοιωθούν εντελώς και να παραμείνουν στην επιφάνεια επιβαρύνοντας περισσότερο το λίθο δρώντας διαβρωτικά. Για το λόγο αυτό το προτεινόμενο θρεπτικό BP3x είναι «φιλικότερο» προς μια λίθινη επιφάνεια. Παρόμοια θρεπτικά μπορούν να θεωρηθούν αυτά που έχουν χρησιμοποιηθεί σε μια σειρά ερευνητικών προσπαθειών από την Ισπανική ερευνητική ομάδα και εφαρμόστηκε αρχικά με τη χρήση του κατά Gram-αρνητικού *M. xanthus* (Rodriguez-Navarro et al. 2003). Τα θρεπτικά διαθέτουν διαφορετική πεπτόνη, οξικό ασβέστιο, αλάτι ανθρακικού καλίου με ή χωρίς ρυθμιστικό διάλυμα. Στην παρούσα ανάπτυξη θρεπτικού αποφεύχθηκε η χρήση άλατος ως επιπλέον πηγή ανθρακικών ώστε τα ανιόντα να προέλθουν αποκλειστικά από το μεταβολισμό των επιλεγμένων βακτηρίων. Επίσης, δε χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα ώστε να εξακριβωθεί εάν τα βακτήρια μπορούν να αυξήσουν το pH και να προωθήσουν το σχηματισμό ανθρακικού ασβεστίου. Βάσει των πειραμάτων με τον *M. xanthus*, βατερίτης παρατηρείται όταν το θρεπτικό δεν διαθέτει ρυθμιστικό διάλυμα (θρεπτικό M-3) και δείχνει να αποδίδει περισσότερο όταν εφαρμόζεται σε δείγματα λίθου από μνημεία με ή χωρίς τη παρουσία του *M. xanthus* (Jimenez-Lopez et al. 2007 και 2008). Το θρεπτικό που περιείχε και ρυθμιστικό διάλυμα (M3-P) εφαρμόστηκε περαιτέρω σε δείγματα λίθου από μνημεία ώστε να παρακολουθηθούν εάν σχηματίζονται ικανές ποσότητες ανθρακικού ασβεστίου και η μικροχλωρίδα που ενεργοποιείται. Η πρώτη αυτή προσέγγιση έδειξε την ενεργοποίηση βακτηρίων από διαφορετικές Οικογένειες τα οποία είχαν τη δυνατότητα να προκαλούν τη καταβύθιση μιγμάτων ασβεστίτη – βατερίτη ακόμα και σε στερεά υποστρώματα (Jroundi et al. 2010). Ο έλεγχος των συγκεκριμένων επιφανειών, μετά από μερικούς μήνες, έδειξε ότι η χρήση του συγκεκριμένου θρεπτικού προκάλεσε τη διαφοροποίηση της μικροχλωρίδας με βακτήρια από το γένος *Bacillus* και της Οικογένειας Planococcaceae να επικρατούν εις βάρος άλλων που είχαν ταυτοποιηθεί πριν την εφαρμογή (Ettenuer et al. 2011). Η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώνει και τα αποτελέσματα της

παρούσας έρευνας ότι στελέχη του γένους *Bacillus* αποτελούν σημαντική πηγή μικροοργανισμών, οι οποίοι μπορούν είτε να χρησιμοποιηθούν ως απομονωμένα στελέχη ή να θεωρηθεί ότι θα ενεργοποιηθούν κατά τη διάρκεια μιας επιτόπιας εφαρμογής. Πιο πρόσφατη έρευνα με το στέλεχος *Bacillus fusiformis* δεν επέδωσε ανάλογα αποτελέσματα (Jfoundi et al. 2012). Μολονότι η ποσότητα της απόθεσης ήταν ικανοποιητική, η εφαρμογή υπερήχων απομάκρυνε ένα σημαντικό ποσοστό αυτής. Άρα κατά το υ συγγραφείς ο *B. fusiformis* δεν ενδείκνυται για εφαρμογή σε λίθινα υποστρώματα. Σημειώνεται ότι η σημαντική μείωση από το νέο υλικό αποδόθηκε στο γεγονός ότι αποτέθηκε στην επιφάνεια του λίθου και όχι στο εσωτερικό των πόρων. Αντίθετα τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν εδώ, δεν παρουσίασαν τέτοιο μειονέκτημα. Προφανώς, η περαιτέρω διερεύνηση στον τομέα είναι επιβεβλημένη και η ανάλυση όσο το δυνατόν περισσότερων μικροοργανισμών, καθώς και η μικροχλωρίδα των προς συντήρηση υποστρωμάτων.

Τα δύο στελέχη τα οποία παρουσιάστηκαν, αποδεικνύουν ότι μπορούν να συνεισφέρουν στην εξέλιξη των μεθόδων αποκατάστασης λίθινων μνημείων, με τη χρήση της βιο-απόθεσης ανθρακικού ασβεστίου. Επιπλέον και τα στελέχη που δεν ελέγχθηκαν περαιτέρω, αλλά απέθεσαν ικανοποιητικές ποσότητες βατερίτη (*Pantoea*, *Ralstonia* και *Pseudomonas* sp.), μπορούν να ληφθούν υπόψη για το μέλλον ή εφόσον ταυτοποιηθούν στη μικροχλωρίδα λίθινου υποστρώματος.

4.11 Τελικά Συμπεράσματα

Η παρούσα διατριβή, αποτελεί την πρώτη συστηματική προσπάθεια στην Ελλάδα για την ανάπτυξη μεθόδου βιο-απόθεσης ανθρακικού ασβεστίου σε λίθινο υπόστρωμα. Η πληροφορία η οποία υπήρχε ήδη διεθνώς, αλλά και κατά τη διάρκεια της έρευνας, επεκτάθηκε, προσφέροντας επιπλέον ερευνητική καινοτομία στον τομέα. Όπως παρουσιάστηκε μέσω της πειραματικής διαδικασίας, υπήρξε διεπιστημονική προσέγγιση ώστε να αναπτυχθεί η μέγιστη δυνατή πληροφορία για τα συγκεκριμένα υποστρώματα και απομονωμένα στελέχη. Εξελίχθηκε ένα νέο, βελτιωμένο θρεπτικό διάλυμα, το οποίο αποδείχθηκε ότι μπορεί να υποστηρίξει επαρκώς την ανάπτυξη βακτηρίων από διαφορετικά Γένη. Με τον τρόπο αυτό, μελλοντικά, μπορεί ο κάθε ερευνητής να απομονώσει και να διερευνήσει άμεσα εάν οι μικροοργανισμοί προκαλούν την καταβύθιση ανθρακικού ασβεστίου. Επιπλέον, το θρεπτικό είναι ικανό να ενισχύσει την ανάπτυξη στελεχών πάνω σε λίθινη επιφάνεια και με τη μέθοδο του ψεκασμού. Αυτό το καθιστά ιδιαίτερα χρήσιμο σε μια

μελλοντική πραγματική εφαρμογή σε μνημεία, όπου μπορεί να χρησιμοποιηθεί είτε μαζί με επιλεγμένο βακτήριο, είτε μόνο του. Επίσης, ο περιορισμός των συστατικών του το καθιστά οικονομικότερο..

Η γενετική ταυτοποίηση των μικροοργανισμών, αποτελεί επιπρόσθετη καινοτομία της ερευνητικής διαδικασίας. Μέχρι πρότινος, όπως αναδείχθηκε και στην Εισαγωγή, οι ταυτοποιήσεις στελεχών από λίθινα υποστρώματα, περιορίζονταν σε ένα μόνο μέρος του 16s rDNA. Εδώ, αναπτύχθηκε και βελτιστοποιήθηκε πλήρως η διαδικασία απομόνωσης, καθαρισμού και αλληλούχησης, ώστε να είναι απομονώσιμο το σύνολο σχεδόν του 16s rDNA, προσφέροντας ακριβή ταυτοποίηση, χωρίς αμφιλεγόμενα σημεία, για στελέχη τα οποία είναι καλλιεργήσιμα εργαστηριακά. Ορισμένα από τα βακτήρια που απομονώθηκαν, δεν έχουν αναφερθεί ότι προκαλούν γενικότερα τη βιο-απόθεση ανθρακικού ασβεστίου (*Pantoea* sp., *Cupriavidus metallidurans*, *Pseudomonas chlororaphis*, *Ralstonia* sp.). Από όσα έχουν ήδη χρησιμοποιηθεί από άλλες ερευνητικές ομάδες, η βιο-απόθεση βατερίτη αποτελεί μια νέα αναφορά, αναδεικνύοντας ότι ο σχηματισμός της συγκεκριμένης δομής δεν είναι τυχαίος.

Η διαδικασία προσέγγισης της βιο-απόθεσης, με τα προκαταρκτικά σκέλη πειραμάτων, βοήθησαν στην αναγνώριση του βατερίτη και του συστηματικού σχηματισμού του. Η επαναλαμβανόμενη ανίχνευση βατερίτη είναι καίριο σημείο της διατριβής, διότι μόνο πρόσφατα ερευνητικές ομάδες άρχισαν να αναγνωρίζουν τη συστηματική βιο-απόθεση βατερίτη από βακτήρια και την επιρροή του θρεπτικού διαλύματος σε αυτή. Για το λόγο αυτό, σήμερα υπάρχει μια αναθεώρηση της άποψης ότι ο βατερίτης δεν διατηρείται σταθερός κατά τη βιο-απόθεση. Η ανάδειξη στελεχών τα οποία προκαλούν σχηματισμό βατερίτη, από μια συγκεκριμένη συγκέντρωση θρεπτικού και πάνω, παρουσιάζεται για πρώτη φορά σε συνδυασμό με την απόδειξη της σταθερότητάς του χρονικά και της ικανότητας να βιο-στερεώνει θραύσματα στο λίθινο υπόστρωμα. Αποδείχθηκε ότι ο βατερίτης είναι σταθερός σε εφαρμογή υπερήχων από αναλύσεις FT-IR, αλλά και μορφολογικά, υπό το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης. Η σταθερότητά του πλέον χρειάζεται να ληφθεί υπόψη ως προς τις διαδικασίες βιο-στερέωσης. Η ταχύτητα με την οποία θα χρειαστεί να εφαρμοστεί μια τέτοια μεθοδολογία σε πραγματικό περιβάλλον, αναδεικνύει πιθανότατα και τη συστηματική εμφάνιση αυτής της αλλόμορφης δομής ανθρακικού ασβεστίου, βάσει και του νόμου του Ostwald. Υπολογίσιμο πλεονέκτημα, αποτελεί και η διαφορετική οπτική αναγνώριση του βατερίτη σε μικροσκόπιο αντίθετης φάσης, επιτρέποντας έτσι την διαφοροποίησή του από το λίθινο υπόστρωμα. Επομένως, σε μια πραγματική εφαρμογή θα είναι άμεση η αναγνώρισή του, προσφέροντας κέρδος σε χρόνο και κόστος, αλλά και στον διαχωρισμό της επέμβασης

και παρακολούθησής της διαχρονικά. Εάν αυτό δεν είναι εφικτό, τότε με την ηλεκτρονική μικροσκοπία, η διαφοροποίηση είναι αδιαμφισβήτητη, βάσει και της πληθώρας των αναλυμένων φωτογραφιών της διατριβής, που απέδειξαν ότι η μορφολογία αντιστοιχεί κυρίως σε αυτή των βακτηρίων ή σε σφαιρικές μορφές. Η συστηματική ανάλυση εικόνων βιο-απόθεσης, από το σύνολο των απομονωμένων βακτηρίων, προσέφερε την αναγνώρισή του και σε δοκιμές σε μεγαλύτερη επιφάνεια λίθινου υποστρώματος, με τη διαδικασία του ψεκάσμου θρεπτικού-μικροοργανισμού.

Η χρήση των στατιστικών μοντέλων, ανέδειξε μια εναλλακτική προσέγγιση εφαρμογής του στατιστικού σχεδιασμού στον τομέα της βιο-στερέωσης. Επιλέγοντας τις σωστές παραμέτρους, μέσω των προκαταρκτικών πειραμάτων, η εύρεση μέγιστης βιο-απόθεσης στο εύρος τιμών που χρησιμοποιήθηκαν, μπορεί να κριθεί επιτυχής και για τα δύο στελέχη. Για τον *Cupriavidus metallidurans* ACA-DC 4073 αυτό επιβεβαιώθηκε πλήρως. Για τον *Bacillus pumilus* ACA-DC 4061, μολονότι προτάθηκε διαφορετικό μέγιστο, ο συνδυασμός γνώσεων και ερευνητικών προσεγγίσεων, μας επέτρεψε να αποδειχθεί η μερική αστοχία της μεθόδου και ότι περαιτέρω μελέτη μπορεί να τη βελτιστοποιήσει. Αποδείχθηκε ότι άμεσα και σε σχετικά σύντομο χρονικό διάστημα, μπορεί να σαρωθεί ένα εύρος τιμών, στις οποίες ο μικροοργανισμός μπορεί να δείξει αν πραγματικά είναι χρήσιμος ή όχι και να βρεθούν οι παράμετροι βελτιστοποίησης της βιο-απόθεσης.

Τέλος, τα πειράματα σε μη αποστειρωμένες συνθήκες, ψεκάζοντας τα στελέχη σε μεγαλύτερη επιφάνεια, απέδειξαν ότι οι μικροοργανισμοί μπορούν να ανταποκριθούν στη διαδικασία βιο-απόθεσης. Η διάρκεια της εφαρμογής, ο όγκος ψεκάσμου και ο χρόνος, είναι παράμετροι οι οποίες μπορούν να βελτιστοποιηθούν περαιτέρω και να αποδείξουν ότι η βιο-απόθεση μπορεί να συνεισφέρει στη στερέωση λίθων.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Abee, T., Kovács, A.T., Kuipers, O.P., van der Veen, S. 2011. Biofilm formation and dispersal in Gram-positive bacteria. *Current Opinion in Biotechnology* 22: 172-179.
2. Achal, V., Mukherjee, A., Basu, P.C., Sudhakara Reddy, M. 2009. Strain improvement of *Sporosarcina pasteurii* for enhanced urease and calcite production. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 36: 981-988.
3. Adolphe, J.-P., Loubière, J.-F., Paradas, J., Soleilhavoup, F. 1990. Procédé de traitement biologique d' une surface artificielle. European patent No. 90400697.0 (after French patent No. 8903517, 1989).
4. Ahmed, I., Yokota, A., Yamazoe, A., Fujiwara, T. 2007. Proposal of *Lysinibacillus boronitolerans* gen. nov. sp. nov., and transfer of *Bacillus fusiformis* to *Lysinibacillus fusiformis* comb. nov. and *Bacillus sphaericus* to *Lysinibacillus sphaericus* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57: 1117-1125.
5. Alain, K., Querellou, J. 2009. Cultivating the uncultured: limits, advances and future challenges. *Extremophiles* 13: 583-594.
6. Alfano, G., Lustrato G., Belli, C., Zanardini, E., Cappitelli, F., Mello, E., Sorlini C., Ranalli, G. 2011. The bioremoval of nitrate and sulfate alterations on artistic stonework: the case-study of Matera Cathedral after six years from the treatment. *International Biodeterioration and Biodegradation* 65: 1004-1011.
7. Allsopp, D., Seal, K., Gaylarde C. 2004. *Introduction to Biodeterioration*, 2nd Edition. Cambridge.
8. Anne, S., Rozenbaum, O., Andreazza, P., Rouet, J.-L. 2010. Evidence of a bacterial carbonate coating on plaster samples subjected to the Calcite Bioconcept biomineralization technique. *Construction and Building Materials* 24: 1036-1042.
9. Antonioli, P., Zapparoli, G., Abbruscato, P., Sorlini, C., Ranalli, G., Righetti, P.G. 2005. Art-loving bugs: The resurrection of Spinello Aretino from Pisa's cemetery. *Proteomics* 5: 2453-2459.

10. Ascaso, C., Wierzchos, J., Souza-Egipsy, V., de los Rios, A., Delgado Rodrigues, J. 2002. In situ evaluation of the biodeteriorating action of microorganisms and the effects of biocides on carbonate rock of the Jeronimos Monastery (Lisbon). *International Biodeterioration and Biodegradation* 49: 1-12.
11. Atlas, R.M. 2004. *Atlas of microbiological media*. 3rd Edition. CRC PRESS, USA.
12. Bachmeier, K.L., Williams, A.E., Warmington, J.R., Bang S.S. 2002. Urease activity in microbiologically-induced calcite precipitation. *Journal of Biotechnology* 93: 171-181.
13. Balkwill, D. 2005. **Cupriavidus** *Makkar and Casida 1987a*, 325^{VP} In: Brener, DJ., Krieg, NR., Staley, JT. (Eds.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd Edition. Volume 2: The *Proteobacteria*, Part C: The *Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria*. Springer.
14. Bang, S.S., Galinat, J.K., Ramakrishnan, V. 2001. Calcite precipitation induced by polyurethane-immobilized *Bacillus pasteurii*. *Enzyme and Microbial Technology* 28: 404-409.
15. Berdonosov, S.S., Znamenskaya, I.V., Melikhov, I.V. 2005. Mechanism of the vaterite-to-calcite phase transition under sonication. *Inorganic Materials* 41: 1308-1312.
16. Banks, E.D., Taylor, N.M., Gulley, J., Lubbers, B.R., Giarrizzo, J.G., Bullen, H.A., Hoehler, T.M., Barton, H.A. 2010. Bacterial calcium carbonate precipitation in cave environments: a function of calcium homeostasis. *Geomicrobiology Journal* 27: 444-454.
17. Barkley, W.E. 1981. Containment and disinfection In: Gerhardt, P., Murray, R.G.E., Costilow, R.N., Nester, E.W., Wood, W.A., Krieg, N.R., Phillips G.B. (Eds) *Manual of methods for general bacteriology*, American Society for Microbiology, USA, pp. 487-503.
18. Baskar, S., Baskar, R., Mauclair, L., McKenzie, J.A. 2006. Microbially induced calcite precipitation in culture experiments: possible origin for stalactites in Sahastradhara caves, Cehradum, India. *Current Science* 90: 58-64.
19. Beeby, M., Gumbart, J.C., Roux, B., Jensen, G.J. 2013. Architecture and assembly of the Gram-positive cell wall. *Molecular Microbiology* 88: 664-672.

20. Belloni, F., Nassisi, V., Alifano, P., Monaco, C., Panzanaro, S. 2006. The effects of UV laser radiation as a sterilizer for cultural heritage. *Macromolecular Symposia* 238: 52-56.
21. Ben Omar, M., Cañamero-Martinez, M., Gonzalez-Muñoz, M.T., Arias, J.M., Huertas, F. 1995. *Myxococcus xanthus* killed cells as inducers of struvite crystallization. Its possible role in the biomineralization processes. *Chemosphere* 30: 2387-2396.
22. Ben Omar, M., Gonzalez-Muñoz, M.T., Peñalver J.M.A. 1998. Struvite crystallization on *Myxococcus* cells. *Chemosphere* 36: 475-481.
23. Beveridge, T.J. 1999. Structures of Gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. *Journal of Bacteriology* 181(16): 4725-4733.
24. Bityukova, L. 2006. Air pollution effect on the decay of carbonate building stones in old town of Tallin. *Water, Air, and Soil Pollution* 172: 239-271.
25. Blazquez, A.B., Lorenzo, J., Flores, M., Gómez-Alarcón, G. 2000. Evaluation of the effect of some biocides against organisms isolated from historic monuments. *Aerobiologia* 16: 423-428.
26. Boquet, E., Boronat, A., Ramos-Cormenzana, A. 1973. Production of calcite (calcium carbonate) crystals by soil bacteria is a general phenomenon. *Nature* 246: 527-529.
27. Brady, C.L., Cleenwerck, I., Venter, S.N., Vancanneyt, M., Swings, J., Coutinho, T.A. 2008. Phylogeny and identification of *Pantoea* species associated with plants, humans and the natural environment based on multilocus sequence analysis (MLSA). *Systematic and applied microbiology* 31: 447 – 460.
28. Brady, C.L., Venter, S.N., Cleenwerck, I., Engelbeen, K., Vancanneyt, M., Swings, J., Coutinho, T.A. 2009. *Pantoea vagans* sp. nov., *Pantoea eucalypti* sp. nov., *Pantoea deleyi* sp. nov., *Pantoea anthophila* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59: 2339-2345.
29. Braissant, O., Cailleau, G., Dupraz, C., Verrecchia, E.P. 2003. Bacterially induced mineralization of calcium carbonate in terrestrial environments: the role of exopolysaccharides and amino acids. *Journal of Sedimentary Research* 73: 485-490.

30. Braissant, O., Verrecchia, E.P., Eragno, M. 2002. Is the contribution of bacteria to terrestrial carbon budget greatly underestimated? *Naturwissenschaften* 89: 366-370.
31. Cacchio, P., Contento, R., Ercole, C., Cappuccio, G., Martinez, M.P., Lepidi, A. 2004. Involvement of microorganisms in the formation of carbonate speleothems in the Cervo Cave (L' Aquila-Italy). *Geomicrobiology Journal* 21: 497-509.
32. Cacchio, P., Ercole, C., Cappuccio, G., Lepidi, A. 2003. Calcium carbonate precipitation by bacterial strains isolated from a limestone cave and from a loamy soil. *Geomicrobiology Journal* 20: 85-98.
33. Capodicasa, S., Fedi, S., Porcelli, A.M., Zannoni, D. 2010. The microbial community dwelling on a bioteriated 16th century painting. *International Biodeterioration and Biodegradation* 64: 727-733.
34. Cappitelli, F., Toniolo, L., Sansonetti, A., Gulotta, D., Ranalli, G., Zanardini, E., Sorlini, C. 2007. Advantage of using microbial technology over traditional chemical technology in removal of black crusts from stone surfaces of historical monuments. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 5671-5675.
35. Cappitelli, F., Zanardini, E., Ranalli, G., Mello, E., Daffonchio, D., Sorlini, C. 2006. Improved methodology for bioremoval of black crusts on historical stone artworks by use of sulfate-reducing bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 3733-3737.
36. Cardiano, P., Ponterio, R.C., Sergi, S., Lo Schiavo, S., Piraino, P. 2005. Epoxy-silica polymers as stone conservation materials. *Polymer* 46: 1857–1864.
37. Caroff, M., Karibian, D. 2003. Structure of bacterial lipopolysaccharides. *Carbohydrate Research* 338: 2431-2447.
38. Caroff, M., Karibian, D., Cavaillon, J.-M., Haeffner – Cavaillon, N. 2002. Structural and functional analyses of bacterial lipopolysaccharides. *Microbes and Infection* 4: 915-926.
39. Castanier, S., Gaele, L., Jean Francois, L. 1995. Nouvelles compositions pour mortier biologique, procédé de recouvrement d'une surface ou de complement d'une cavite a l'aide des compositions. European patent No. 9505861.

40. Castanier, S., Le Métayer-Levrel, G. and Jean-Pierre, P. 1999. Ca-carbonates precipitation and limestone genesis – the microbiogeologist point of view. *Sedimentary Geology* 126: 9-23.
41. Chen, L., Shen, Y., Xie, A., Huang, B., Jia, R., Guo, R., Tang, W. 2009. Bacteria-mediated synthesis of metal carbonate minerals with unusual morphologies and structures. *Journal of Crystal Growth and Design* 9: 743-754.
42. Cheng, B., Cai, W., Yu, J. 2010. DNA-mediated morphosynthesis of calcium carbonate particles. *Journal of Colloid and Interface Science* 352: 43-49.
43. Chertov, O., Gorbushina, A., Ceventer, B. 2004. A model for microcolonial fungi growth on rock surfaces. *Ecological Modelling* 177: 415-426.
44. Chunxiang, Q., Ruixing, W., Liang, C., Jianyun, W. 2010. Theory of microbial carbonate precipitation and its application in restoration of cement-based materials defects. *Chinese Journal Chemistry* 28: 847-857.
45. Coley, J., Tarelli, E., Archibald A.R., Baddiley J. 1978. The linkage between teichoic acid and peptidoglycan in bacterial cell walls. *FEBS Letters* 88: 1-9.
46. De Buergo Ballester, M.A., González, R.F. 2001. Basic methodology for the assessment and selection of water repellent treatments applied on carbonatic materials. *Progress in Organic Coatings* 43: 258-266.
47. De Muynck, W., Cox, K., De Belie, N., Verstraete, W. 2008a. Bacterial carbonate precipitation as an alternative surface treatment for concrete. *Construction and Building Materials* 22: 875-885.
48. De Muynck, W., De Belie, N., Verstraete, W. 2010a. Microbial carbonate precipitation in construction materials: a review. *Ecological Engineering* 36: 118-136.
49. De Muynck, W., Debrouwer, D., De Belie, N., Verstraete, W. 2008b. Bacterial carbonate precipitation improves the durability of cementitious materials. *Cement and Concrete Research* 3: 1005-1014.
50. De Muynck, W., Verbeken, K., De Belie, N., Verstraete, W. 2010b. Influence of urea and calcium dosage on the effectiveness of bacterially induced carbonate precipitation on limestone. *Ecological Engineering* 36: 118-136.

51. De Muynck, W., Verbeken, K., De Belie, N., Verstraete, W. 2013. Influence of temperature on the effectiveness of a biogenic carbonate surface treatment for limestone conservation. *Environmental Biotechnology* 97: 1335 – 1347.
52. Delétoile, A., Decré, D., Courant, S., Passet, V., Audo, J., Grimont, P., Arlet, G., Brisse, S. 2009. Phylogeny and identification of *Pantoea* species and typing of *Pantoea agglomerans* strains by multilocus gene sequencing. *Journal of Clinical Microbiology* 47: 300-310.
53. DeLong, E.F., Pace, N.R. 2001. Environmental diversity of Bacteria and Archaea. *Systematic Biology* 50: 470-478.
54. Dick, J., De Windt, W., De Graef, B., Saveyn, H., Van der Meeren, P., De Belie, N., Verstraete, W. 2006. Bio-deposition of a calcium carbonate layer on degraded limestone by *Bacillus* species. *Biodegradation* 17: 357-367.
55. Dove, P.M. 2010. The rise of skeletal biominerals. *Elements* 6: 37-42.
56. Dupraz, C., Pamela Reid, R., Braissant, O., Decho, A.W., Norman, R.S., Visscher, P.T. 2009. Processes of carbonate precipitation in modern microbial mats. *Earth-Science Reviews* 96: 141-162.
57. Ehrlich, H.L. 1998. Geomicrobiology: its significance for geology. *Earth-Science Reviews* 45: 45-60.
58. Ercole, C., Cacchio P., Botta, A.L., Centi, V., Lepidi, A. 2007. Bacterially induced mineralization of calcium carbonate: the role of exopolysaccharides and capsular polysaccharides. *Microscopy and Microanalysis* 12: 42-50.
59. Ettenuer, J., Piñar, G., Sterflinger, K., Gonzalez-Muñoz, M.T., Jroundi, F. 2011. Molecular monitoring of the microbial dynamics occurring on historical limestone buildings during and after the *in situ* application of different bio-consolidation treatments. *Science of the Total Environment* 409: 5337-5352.
60. Falini, G., Fermani, S., Vanzo, S., Miletic, M., Zaffino, G. 2005. Influence on the formation of aragonite or vaterite by otolith macromolecules. *European Journal of Inorganic Chemistry* 1: 162-167.

61. Fernades, P. 2006. Applied microbiology and biotechnology in the conservation of stone cultural heritage materials. *Applied Microbiology and Biotechnology* 73: 291-296.
62. Fobe, B.O., Vleugels, G.J., Roekens, E.J., Van Grieken, R.E. 1995. Organic and inorganic compounds in limestone weathering crusts from cathedrals in southern and western Europe. *Environmental Science and Technology* 29: 1691-1701.
63. Fomina, M., Burford, E.P., Hillier, S., Kierans, M., Gadd, G.M. 2010. Rock-building fungi. *Geomicrobiology Journal* 27: 624-629.
64. Gadd, G.M. 2010. Metals, minerals and microbes: Geomicrobiology and bioremediation. *Microbiology* 156: 609-643.
65. Garcia-Vallès, M., Vendrell-Saz, M., Krumbein W.E., Urzi, C. 1997. Coloured mineral coatings on monument surfaces as a result of biomineralization: the case of the Terragona cathedral (Catalonia). *Applied Geochemistry* 12: 255-266.
66. Gavino, M., Hermosin, B., Vergès-Belmin, V., Nowik W., Saiz-Jimenez, C. 2004. Composition of the black crusts from the Saint Denis Basilica, France, as revealed by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Separation Science* 27: 513-523.
67. Gaylarde, C.C., Morton, L.H.G. 2002. Biodeterioration of mineral materials. In: Bitton, G., (Ed.) *Encyclopedia of Environmental Microbiology*, Willey, New York, pp. 516-527.
68. Gebauer, D., Verch, A., Börner, G., Cölfen, H. 2009. Influence of selected artificial peptides on calcium carbonate precipitation – a quantitative study. *Crystal Growth and Design* 9: 2398-2403.
69. Gollapudi, U.K., Knutson, C.L., Bang, S.S., Islam, M.R. 1995. A new method for controlling leaching through permeable channels. *Chemosphere* 30: 695-705.
70. Gonzalez, I., Laiz, L., Hermosin, B., Caballero, B., Incerti, C., Saiz-Jimenez, C. 1999. Bacteria isolated from rock art paintings: the case of Atlanterra shelter (south Spain). *Journal of Microbiological Methods* 36: 123-127.

71. Gonzalez-Muñoz, M.T., Ben Chekroun, K., Ben Aboud, A., Arias, J.M., Rodriguez-Gallego, M. 2000. Bacterially induced Mg-calcite formation: role of Mg²⁺ in development of crystal morphology. *Journal of Sedimentary Research* 70: 559-564.
72. Gonzalez-Muñoz, M.T., Ben Omar, M., Cañamero-Martinez, M., Rodriguez-Gallego, M., Galindo A.L., Ma Arias, J. 1996. Struvite and calcite crystallization induced by cellular membranes of *Myxococcus xanthus*. *Journal of Crystal Growth* 163: 434-439.
73. Gorbushina, A.A., Heyrman, J., Dornieden, T., Delvalle-Gonzalez, M., Krumbein W.E., Laiz, L., Petersen, K., Saiz-Jimenez, C., Swings, J. 2004. Bacterial and fungal diversity and biodeterioration problems in mural painting environments of St. Martins church (Greene-Kreiansen, Germany). *International Biodeterioration and Biodegradation* 53: 13-24.
74. Goris, J., De Vos, P., Coenye, T., Hoste, B., Janssens D., Brim, H., Diels, L., Mergeay, M., Kersters, K., Vandamme, P. 2001. Classification of metal-resistant bacteria from industrial biotopes as *Ralstonia campinensis* sp. nov., *Ralstonia metallidurans* sp. nov. and *Ralstonia basilensis* Steinle *et al.* 1998 emend. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51: 1773-1782.
75. Gottschalk, G. 1985. *Bacterial metabolism* (2nd ed.). Springer-Verlag, New York.
76. Grassmann, O., Löbmann, P. 2004. Biomimetic nucleation and growth of CaCO₃ in hydrogels incorporating carboxylate groups. *Biomaterials* 25: 277-282.
77. Grimont, PAD., Grimont F. 2005. Genus XXIII. **Pantoea** (Gavini, Mergaert, Beji, Mielcarek, Izard, Kersters and De Ley 1989b, 343^{VP} emend. Mergaert, Verdonck and Kersters 1993, 171). Brenner, DJ., Krieg, NR., Staley, JT. (Eds). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd Edition. Volume 2: The *Proteobacteria*; Part B: The *Gammaproteobacteria*. Springer.
78. Groth, I., Schumann, P., Laiz, L., Sanchez-Moral, S., Cañaveras, J.C. and Saiz-Jimenez, C. 2001. Geomicrobiological study of the Grotta dei Cervi, Porto Badisco, Italy. *Geomicrobiology Journal* 18: 241-258.
79. Gurtner, C., Heyrman, J., Piñar, G., Lubitz, W., Swings, J., Rölleke, S. 2000. Comparative analyses of the bacterial diversity on two different biodeteriorated wall

- paintings by DGGE and 16S rDNA sequence analysis. *International Biodeterioration and Biodegradation* 46: 229-239.
- 80.** Hamilton, R.S., Revitt, D.M., Vincent, K.J., Butlin, R.N. 1995. Sulphur and nitrogen particulate pollutant deposition on to building surfaces. *The Science of the Total Environment* 167: 57-66.
- 81.** Hammes, F. Verstraete, W. 2002. Key roles of pH and calcium metabolism in microbial carbonate precipitation. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 1: 3-7.
- 82.** Hammes, F., Boon, N., de Villiers, J., Verstraete, W., Siciliano, S.D. 2003. Strain-specific ureolytic microbial calcium carbonate precipitation. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 4901-4909.
- 83.** Han, J., Lian, B., Ling, H. 2013. Induction of calcium carbonate by *Bacillus cereus*. *Geomicrobiology Journal* 30: 682-689.
- 84.** Hazen, R.M., Ferry, J.M. 2010. Mineral evolution: mineralogy in the fourth dimension. *Elements* 6: 9-12.
- 85.** Henderson, G.E., Murray, B.J., McGrath, K.M. 2008. Controlled variation of calcite morphology using simple carboxylic acids. *Journal of Crystal Growth* 310, 4190-4198.
- 86.** Henderson's Dictionary of Biological Terms. Lawrence E. (Ed.). 12th Edition. Prentice Hall, Harlow-England.
- 87.** Heyrman, J., Swings, J. 2001. 16S rDNA sequence analysis of bacterial isolates from biodeteriorated mural paintings in the Servilia Tomb (Necropolis of Carmona, Seville, Spain). *Systematic and Applied Microbiology* 24: 417-422.
- 88.** Hogg, S. 2005. *Essential Microbiology*. John Wiley and Sons, UK.
- 89.** Hugenholtz, P., Goebel, B.M., Pace, N.R. 1998. Impact of culture independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *Journal of Bacteriology* 180: 4765-4774.
- 90.** Ingham, C.J., Sprenkels, A., Bomer, J., Molenaar, D., van den Berg, A., van Hylckama Vlieg, J.E.T., de Vos W.M. 2007. The micro-Petri dish, a million-well growth chip for

- the culture and high-throughput screening of microorganisms. PNAS 104: 18217-18222.
91. Janssen, P.J., Van Houdt, R., Moors, H., Monsieurs, P., Morin, N. et al. 2010. The complete genome sequence of *Cupriavidus metallidurans* strain CH34, a master survivalist in harsh and anthropogenic environments. PLoS ONE 5: e10433. doi:10.1371/journal.pone.0010433.
 92. Jimenez-Lopez, C., Jroundi, F., Pascolini, C., Rodriguez-Navarro, C., Piñar-Larrubia, G., Rodriguez-Gallego, M., Gonzalez-Muñoz, M.T. 2008. Consolidation of quarry calcarenite by calcium carbonate precipitation induced by bacteria activated among the microbiota inhabiting the stone. International Biodeterioration and Biodegradation 62: 352-363.
 93. Jimenez-Lopez, C., Rodriguez-Navarro, C., Piñar, G., Carrillo-Rosúa, F.J., Rodriguez-Gallego, M., Gonzalez-Muñoz, M.T. 2007. Consolidation of degraded ornamental porous limestone by calcium carbonate precipitation induced by the microbiota inhabiting the stone. Chemosphere 68: 1929-1936.
 94. Jin, M., Liu, L., Wright, S.A.I., Beer, S.V., Clardy, J., 2003. Structural and functional analysis of Pantocin A: an antibiotic from *Pantoea agglomerans* discovered by heterologous expression of cloned genes. Angewandte Chemie International Edition 42: 2898-2901.
 95. Jroundi, F., Fernández-Vivas, A., Rodriguez-Navarro, C., Bedmar, E.J., Gonzalez-Muñoz, M.T. 2010. Bioconservation of deteriorated monumental calcarenite stone and identification of bacteria with carbonatogenic activity. Environmental Microbiology 60: 39-54.
 96. Jroundi, F., Gómez-Suaga, P., Jimenez-Lopez, C., Gonzalez-Muñoz, M.T., Fernández-Vivas, M.A. 2012. Stone-isolated carbonatogenic bacteria as inoculants in bioconsolidation treatments for historical limestone. Science of the Total Environment 425: 89-98.
 97. Kabanov, D.S., Prokhorenko, I.R. 2010. Structural analysis of lipopolysaccharides from Gram-negative bacteria. Biochemistry (Moscow) 75: 383-404.

98. Kahoui, R., Adolphe, J.-P., Daudon, M. 2000. Identification of early *Bacillus*-induced crystals in vitro using Fourier Transform Infrared spectroscopy. *Microbes and Environment* 15: 161-171.
99. Kalaitzaki-Maravelaki, P. 2005. Black crusts and patinas on Pentelic marble from the Parthenon and Erechtheum (Acropolis, Athens): characterization and origin. *Analytica Chimica Acta* 532: 187-198.
100. Katsifaras, A., Spanos, N. 1999. Effect of inorganic phosphate ions on the spontaneous precipitation of vaterite and on the transformation of vaterite to calcite. *Journal of Crystal Growth* 204: 183-190.
101. Kaur, N.D., Reddy, M.S., Mukherjee, A. 2013. Biomineralization of calcium carbonate polymorphs by the bacterial strains isolated from calcareous sites. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 23: 707-714.
102. Kim H.K., Park S.J., Han J.I., Lee H.K. 2013. Microbially mediated calcium carbonate precipitation on normal and lightweight concrete. *Construction and Building Materials* 38: 1073-1082.
103. Knoll, A.H. 2003a. The geological consequences of evolution. *Geobiology* 1: 3-14.
104. Knoll, A.H. 2003b. Biomineralization and evolutionary history. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry* 54: 329-356.
105. Kojima, N., Araki, Y., Ito, E. 1985. Structure of the linkage units between ribitol teichoic acids and peptidoglycan. *Journal of Bacteriology* 161: 299-306.
106. Laiz, L., Miller, A.Z., Jurado, V., Akatova, E., Sanchez-Moral, S., Gonzalez, J.M., Dionisio, A., Macedo, M.F., Saiz-Jimenez, C. 2009. Isolation of five *Rubrobacter* strains from biodeteriorated monuments. *Naturwissenschaften* 96: 71-79.
107. Laiz, L., Romanowska-Deskins, A., Saiz-Jimenez, C. 2011. Survival of a bacterial/archaeal consortium on building materials as revealed by molecular methods. *International Biodeterioration and Biodegradation* 65: 1100-1103.

108. Le Métayer-Levrel G., Castanier, S., Oriol, G., Loubière, J-F., Perthuisot, J-P. 1999. Application of bacterial carbonatogenesis to the protection and regeneration of limestones in buildings and historic patrimony. *Sedimentary Geology* 126: 25-34.
109. Li, C., Botsaris, G.D., Kaplan, D.L. 2002. Selective in vitro effect of peptides on calcium carbonate crystallization. *Crystal Growth and Design* 2: 387-393.
110. Lian, B., Hu, Q., Chen, J., Ji, J., Henry Teng, H. 2006. Carbonate biomineralization induced by a soil bacterium *Bacillus megaterium*. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 70: 5522-5535.
111. Lisci, M., Monte, M., Pacini, E. 2003. Lichens and higher plants on stone: a review. *International Biodeterioration and Biodegradation* 51: 1-17.
112. Logan, N.A., Berge, O., Bishop, A.H., Busse, H.-J., et al. 2009. Proposed minimal standards for describing new taxa of aerobic, endospore-forming bacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59: 2114-2121.
113. Logan, N.A., De Vos, P. 2009. Genus I. **Bacillus** Cohn 1872, 174^{AL} De Vos, P., Garrity, GM., Jones D., Krieg, NR., Ludwig, W., Rainey FA., Schleifer K.-H., Whitman, WB. (Eds.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd Edition. Volume 3: *The Firmicutes*. Springer.
114. Macedo, M.F., Miller, A.Z., Dionísio, A., Saiz-Jimenez, C. 2009. Biodiversity of cyanobacteria and green algae on monuments in the Mediterranean Basin: an overview. *Microbiology* 155: 3476-3490.
115. Machill, S., Althaus, K., Krumbein, W.E., Steger, W.E. 1997. Identification of organic compounds extracted from black weathered surfaces of Saxonean sandstones, correlation with atmospheric input and rock inhabiting microflora. *Organic Geochemistry* 27: 79-97.
116. Malkaj, P., Dalas, E. 2004. Calcium carbonate crystallization in the presence of aspartic acid. *Crystal Growth and Design* 4: 721-723.
117. Malkaj, P., Kanakis, J., Dalas, E. 2004. The effect of leucine on the crystal growth of calcium carbonate. *Journal of Crystal Growth* 266: 533-538.

118. Mann, S. 2001. *Biomineralization: principles and concepts in bioinorganic materials chemistry*. Oxford University Press, UK.
119. Mann, S., Heywood, B.R., Rajam, S., Birchall, J.D. 1988. Controlled crystallization of CaCO₃ under stearic acid monolayers. *Nature* 334: 692-695.
120. Manoli, F., Dalas, E. 2000. Spontaneous precipitation of calcium carbonate in the presence of chondroitin sulfate. *Journal of Crystal Growth* 217: 416-421.
121. Manoli, F., Dalas, E. 2001. Calcium carbonate crystallization in the presence of glutamic acid. *Journal of Crystal Growth* 222: 293-297.
122. Manoudis, P.N., Tsakalof, A., Karapanagiotis, I., Zuburtikudis, I., Panayiotou, C. 2009. Fabrication of super-hydrophobic surfaces for enhanced stone protection. *Surface & Coatings Technology* 203: 1322–1328.
123. Marvasi, M., Gallagher, K.L., Casillas-Martinez, L. Pagan, W.C.M., Santiago, R.E.R., Vega, G.C., Visscher, P.T. 2012. Importance of B4 medium in determining organomineralization potential of bacterial environmental isolates. *Geomicrobiology Journal* 29: 916-924.
124. Marvasi, M., Visscher, P.T., Perito, B., Mastromei, G., Casillas-Martinez, L. 2010. Physiological requirements for carbonate precipitation during biofilm development of *Bacillus subtilis etfA* mutant. *FEMS Microbiology Ecology* 71: 341-350.
125. Massey, S.W. 1999. The effects of ozone and NO_x on the deterioration of calcareous stone. *The Science of the Total Environment* 227: 109-121.
126. McNamara, C.J., Perry IV, T.D., Bearce, K.A., Hernandez-Dupue, G., Mitchell, R. 2009. Epilithic and endolithic bacterial communities on limestone from a Maya archaeological site. *Microbial Ecology* 51: 51-64.
127. Mitchell, A.C., Ferris, F.G. 2006. The influence of *Bacillus pasteurii* on the nucleation and growth of calcium carbonate. *Geomicrobiology Journal* 23: 213–226
128. Muyzer G., Smalla, K. 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek* 73: 127-141.

129. Muyzer, G., De Waal, E.C., Uitterlinden, A.G. 1993. Profiling complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 695-700.
130. Natoli, A., Wiens, M., Schröder, H.-C., Stifanic, M., Batel, R., Soldati, A.L., Jacob, D.E., Müller W.E.G. 2010. Bio-vaterite formation by glycoproteins from freshwater pearls. *Micron* 41: 359-366.
131. Neuhaus, F.C., Baddiley, J. 2003. A continuum of anionic charge: structures and functions of D-alanyl-teichoic acids in Gram-positive bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67: 686-723.
132. Nuhoglu, Y., Oguz, E., Uslu, H., Ozbek, A., Ipekoglu, B., Ocak, I., Hasenekoglu, I. 2006. The accelerating effects of the microorganisms on biodeterioration of stone monuments under air pollution and continental-cold climatic conditions in Erzurum, Turkey. *Science of the Total Environment* 364: 272-283.
133. Nunes, C., Usall, J., Teixidó, N., Fons, E., Viñas, I. 2002. Post-harvest biological control by *Pantoea agglomerans* (CPA-2) on golden delicious apples. *Journal of Applied Microbiology* 92: 247-255.
134. Palleroni, N.J. 2005. Genus I. **Pseudomonas** Migula 1894, 237AL (Nom. Cons., Opin. 5 of the Jud. Comm. 1952, 121)*. Brenner, DJ., Krieg, NR., Staley, JT. (Eds). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd Edition. Volume 2: The *Proteobacteria*; Part B: The *Gammaproteobacteria*. Springer.
135. Park, S.-J., Park, Y.-M., Chun, W.-W., Kim, W.-J., Ghim, S.-Y. 2010. Calcite-forming bacteria for compressive strength improvement in mortar. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 20: 782-788.
136. Pecher, J., Guenoun, P., Chevillard, C. 2009. Crystalline calcium carbonate thin film formation through interfacial growth and crystallization of amorphous microdomains. *Crystal Growth and Design* 9: 1306-1311.
137. Peix, A., Valverde, A., Rivas, P., Igual, J.M., Ramírez-Bahena, M.-H., Mateos, P.F., Santa-Regina, I., Rodríguez-Barrueco, C. et al. 2007. Reclassification of *Pseudomonas aurantiaca* as a synonym of *Pseudomonas chlororaphis* and proposal of three

- subspecies, *P. chlororaphis* subsp. *chlororaphis* subsp. nov., *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens* subsp. nov., comb. nov. and *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* subsp. nov., comb. nov. *International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology* 57: 1286–1290.
138. Pepe, O., Palomba, S., Sannino, L., Blaiotta, G., Ventrino, V., Moschetti, G., Villani, F. 2011. Characterization in the archaeological excavation site of heterotrophic bacteria and fungi of deteriorated wall painting of Herculaneum in Italy. *Journal of Environmental Biology* 32: 241-250.
139. Pepe, O., Sannino, L., Palomba, S., Anastasio, M., Blaiotta, G., Villani, F., Moschetti, G. 2010. Heterotrophic microorganisms in deteriorated medieval wall paintings in southern Italian churches. *Microbiological Research* 165: 21-32.
140. Piñar, G., Jimenez-Lopez, C., Sterflinger, K., Ettenauer, J., Jroundi, F., Fernandez-Vivas, A., Gonzalez-Muñoz, M.T. 2010. Bacterial community dynamics during the application of a *Myxococcus xanthus*-inoculated culture medium used for consolidation of ornamental limestone. *Microbial Ecology* 60: 15-28.
141. Piñar, G., Saiz-Jimenez, C., Schabereiter-Gurtner, C., Blanco-Varela, M.T., Lubitz, W., Rölleke, S. 2001. Archaeal communities in two disparate deteriorated ancient wall paintings: detection, identification and temporal monitoring by denaturing gradient gel electrophoresis. *FEMS Microbiology Ecology* 37: 45-54.
142. Polo, A., Cappitelli, F., Brusetti, L., Principi, P., Villa, F., Giacomucci, L., Ranalli, G., Sorlini, C. 2010. Feasibility of removing surface deposits on stone using biological and chemical remediation methods. *Microbial Ecology* 60: 1-14.
143. Popham, D.L. 2013. Visualizing the production and arrangement of peptidoglycan in Gram-positive cells. *Molecular Microbiology* 88: 645-649.
144. Portillo, M.C., Porca, E., Cuezva, S., Canaveras, J.C., Sanchez-Moral, S. and Gonzalez, J.M. 2009. Is the availability of different nutrients a critical factor for the impact of bacteria on subterranean carbon budgets? *Naturwissenschaften* 96: 1035-1042.
145. Priest, F.G. 2009. Genus I. **Paenibacillus** Ash, Priest and Collins 1994, 852^{VP} De Vos, P., Garrity, G.M., Jones D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey F.A., Schleifer K.-H.,

- Whitman, WB. (Eds.) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd Edition. Volume 3: *The Firmicutes*. Springer.
- 146.** Ramachandra, P.R. 2003. Biomimetics. *Sādhāna* 28: 657-679.
- 147.** Ramachandran, S.K., Ramakrishnan, V., Bang S.S. 2001. Remediation of concrete using micro-organisms. *ACI Materials Journal* 98: 3-9.
- 148.** Ramirez, J.L., Santana, M.A., Galindo-Castro, I., Gonzalez, A. 2005. The role of biotechnology in art preservation. *TRENDS in Biotechnology* 23: 584-588.
- 149.** Ranalli, G., Alfano, G., Belli, C., Lustrato, G., Colombini, M.P., Bonaduce, I., Zanardini, E., Abbruscato, P., Cappitelli, F., Sorlini, C. 2005. Biotechnology applied to cultural heritage: bio restoration of frescoes using viable bacterial cells and enzymes. *Journal of Applied Microbiology* 98: 73-83.
- 150.** Rappé, M.S., Giovannoni, S.J. 2003. The uncultured microbial majority. *Annual Reviews of Microbiology* 57: 369-394.
- 151.** Raut, S.H., Sarode, D.D., Lele, S.S. 2013. Biocalcification using *B. pasteurii* for strengthening brick masonry civil engineering structures. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 1: 191-200.
- 152.** Raven, J.A., Giordano, M. 2009. Biomineralization by photosynthetic organisms: evidence of coevolution of the organisms and their environment? *Geobiology* 7: 140-154.
- 153.** Rodriguez-Navarro, C. Sebastian E. 1996. Role of particulate matter from vehicle exhaust on porous building stones (limestone) sulfation. *The Science of the Total Environment* 187: 79-91.
- 154.** Rodriguez-Navarro, C., Concepcion, J.-L., Rodriguez-Navarro, A., Gonzalez-Munoz, M.T., Rodriguez-Gallego, M. 2007. Bacterially mediated mineralization of vaterite. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 71: 1197-1213.
- 155.** Rodriguez-Navarro, C., Rodriguez-Gallego, M., Chekroun, K.B., Gonzalez-Munoz, M.T. 2003. Conservation of ornamental stone by *Myxococcus xanthus* – induced carbonate biomineralization. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 2182-2193.

156. Rölleke, S., Gurtner, C., Drewello, U., Drewello, R., Lubitz, W., Weissmann, R. 1999. Analysis of bacterial communities on historical glass by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. *Journal of Microbiological Methods* 36: 107-114.
157. Rölleke, S., Muyzer, G., Wawer, C., Wanner, G., Lubitz, W. 1996. Identification of bacteria in a biodegraded wall painting by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 2059-2065.
158. Rölleke, S., Witte, A., Wanner, G., Lubitz, W. 1998. Medieval wall paintings – a habitat for archaea: identification of archaea by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA in a medieval wall painting. *International Biodeterioration and Biodegradation* 41: 85-92.
159. Ronaghi, M. 2001. Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. *Genome Research* 11: 3-11.
160. Rosselló-Mora, R., Amann, R. 2001. The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews* 25: 39-67.
161. Ryan, M.P., Pembroke, J.T., Adley, C.C. 2006. *Ralstonia pickettii*: a persistent Gram-negative nosocomial infectious organism. *Journal of Hospital Infection* 62: 278-284.
162. Sabbioni, C. 1995. Contribution of atmospheric deposition to the formation of damage layers. *The Science of the Total Environment* 167: 49-55.
163. Saiz-Jimenez, C. 1999. Biogeochemistry of Weathering Processes in Monuments. *Geomicrobiology Journal* 16: 27-37.
164. Saiz-Jimenez, C., Laiz, L. 2000. Occurrence of halotolerant/halophilic bacterial communities in deteriorated monuments. *International Biodeterioration and Biodegradation* 46: 319-326.
165. Sarda, D., Choonia H.S., Sarode, D.D., Lele, S.S. 2009. Biocalcification by *Bacillus pasteurii* urease: a novel application. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 36: 1111-1115.

- 166.** Schabereiter-Gurtner, C., Piñar, G., Lubitz, W., Rölleke, S. 2001a. An advanced molecular strategy to identify bacterial communities on art objects. *Journal of Microbiological Methods* 45: 77-87.
- 167.** Schabereiter-Gurtner, C., Piñar, G., Vybiral, D., Lubitz, W., Rölleke, S. 2001b. *Rubrobacter*-related bacteria associated with rosy discolouration of masonry and lime wall paintings. *Archives in Microbiology* 176: 347-354.
- 168.** Schabereiter-Gurtner, C., Saiz-Jimenez, C., Piñar, G., Lubitz, W., Rölleke, S. 2002a. Phylogenetic 16S rRNA analysis reveals the presence of complex and partly unknown bacterial communities in Tito Bustillo cave, Spain, and on its Paleolithic paintings. *Environmental Microbiology* 4: 392-400.
- 169.** Schabereiter-Gurtner, C., Saiz-Jimenez, C., Piñar, G., Lubitz, W., Rölleke, S. 2004. Phylogenetic diversity of bacteria associated with Paleolithic paintings and surrounding rock walls in two Spanish caves (Llonín and La Garma). *FEMS Microbiology Ecology* 47: 235-247.
- 170.** Schabereiter-Gurtner, C., Saiz-Jimenez, C., Piñar, G., Lubitz, W., Rölleke, S. Altamira cave paleolithic paintings harbor partly unknown bacterial communities. 2002b. *FEMS Microbiology Letters* 211: 7-11.
- 171.** Scheerer, S., Ortega-Morales, O., Gaylarde, C. 2009. Microbial deterioration of stone monuments – an updated overview. *Advances in Applied Microbiology* 66: 97-139.
- 172.** Schiavon, N., Chiavari, G., Fabbri, D. 2004. Soiling of limestone in an urban environment characterized by heavy vehicular exhaust emissions. *Environmental Geology* 46: 448-455.
- 173.** Schleifer, K.H., Kandler, O. 1972. Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriological Reviews* 36: 407-477.
- 174.** Schiavon, N., Chiavari, G., Fabbri, D. 2004. Soiling of limestone in an urban environment characterized by heavy vehicular exhaust emissions. *Environmental Geology* 46: 448-455.

175. Shirakawa, M.A., Cincotto, M.A., Atencio, D., Gaylarde, C.C., Vanderley, M.J. 2011. Effect of culture medium on biocalcification by *Pseudomonas putida*, *Lysinibacillus sphaericus* and *Bacillus subtilis*. *Brazilian Journal of Microbiology* 42:499-507.
176. Shivkumara, C., Singh, P., Gupta, A., Hedge, M.S. 2006. Synthesis of vaterite CaCO₃ by direct precipitation using glycine and L-alanine as directing agents. *Materials Research Bulletin* 41: 1455-1460.
177. Sikiotis, D., Kirkitsos, P. 1995. The adverse effects of nitrates on stone monuments *The Science of the Total Environment* 71: 173-182.
178. Silhavy, T.J., Kahne, D., Walker, S. 2010. The bacterial cell envelope *Cold Spring Harbor perspectives in Biology* 2: a000414.
179. Silva-Castro, G.A., Uad, I., Rivadeneyra, A., Vilchez, J.I., Martin-Ramos, D., González-López, J., Rivadeneyra, M.A. 2013. Carbonate precipitation of bacterial strains isolated from sediments and seawater: formation mechanisms. *Geomicrobiology Journal* 30: 840-850.
180. Singh, B.K. 2009. Exploring microbial diversity for biotechnology: the way forward. *Trends in Biotechnology* 28: 111-116.
181. Sogin, M.L., Morrison, H.G., Huber, J.A., Welch, D.M., Huse, S.M., Neal, P.R., Arrieta, J.M., Herndl, G.J. 2006. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored “rare biosphere”. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 103: 12115-12120.
182. Stackebrandt, E., Frederiksen, W., Garrity, G.M., Grimont, P.A.D., Kämpfer, P., Maiden, M.C.J., Nesme, X., Rosselló-Mora, R., Swings, J., Trüper, H.G., Vauterin, L., Ward, A.C., Whitman, W.B. 2002. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52: 1043–1047.
183. Sterflinger, K. 2010. Fungi: their role in deterioration of cultural heritage. *Fungal Biology Reviews* 24: 47-55.
184. Stocks-Fischer, G., Galinat, J.K., Bang S.S. 1999. Microbiological precipitation of CaCO₃. *Soil Biology and Biochemistry* 31: 1563-1571.

- 185.** Suzuki, M., Nagasawa, H., Kogure, T. 2006. Synthesis and structure of hollow calcite particles. *Crystal Growth and Design* 6: 2004-2006.
- 186.** Swoboda, J.G., Campbell, J., Meredith T.C., Walker, S. 2010. Wall teichoic acid function, biosynthesis, and inhibition. *ChemBioChem* 11: 35-45.
- 187.** Tiano, P. Biodegradation of cultural heritage: decay mechanisms and control methods. Online:
- 188.** Tittelboom, K.V., De Belie, N., De Muynck, W., Vestraete, W. 2010. Use of bacteria to repair cracks in concrete. *Cement and Concrete Research* 40: 157 – 166.
- 189.** Tomaselli, L., Lamenti, G., Bosco, M., Tiano P. 2000. Biodiversity of photosynthetic microorganisms dwelling on stone monuments. *International Biodeterioration and Biodegradation* 46: 251-258.
- 190.** Tong, H., Ma, W., Wang, L., Wan, P., Hu, J., Cao, L. 2004. Control over the crystal phase, shape, size and aggregation of calcium carbonate via L-aspartic acid inducing process. *Biomaterials* 25: 3923-3929.
- 191.** Tourney, J., Ngwenya, B.T. 2009. Bacterial extracellular polymeric substances (EPS) mediate CaCO₃ morphology and polymorphism. *Chemical Geology* 262: 138-146.
- 192.** Urzi, C., De Leo, F. 2007. Evaluation of the efficiency of water-repellent and biocide compounds against microbial colonization of mortars. *International Biodeterioration and Biodegradation* 60: 25-34.
- 193.** Urzi, C., De Leo, F., De Hoog, S., Sterflinger, K. 2000. Recent advances in the molecular biology and ecophysiology of meristematic stone-inhabiting fungi. In: Ciferri, O., Tiano, P., Mastromei, G., (Eds.), *Of Microbes and Art: The role of microbial communities in the degradation and protection of cultural heritage*, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, pp.3-19.
- 194.** Vagenas, N.V., Gatsouli, A., Kontoyannis, C.G. 2006. Quantitative analysis of synthetic calcium carbonate polymorphs using FT-IR spectroscopy. *Talanta* 59: 831-836.
- 195.** Valentini, F., Diamanti, A., Palleschi, G. 2010. New bio-cleaning strategies on porous building materials affected by biodeterioration event. *Applied Surface Science* 156: 6550-6563.

196. Van, T.T., Beck, K., Al-Mukhtar, M. 2007. Accelerated weathering tests on two highly porous limestones. *Environmental Geology* 52: 283–292.
197. Vandamme, P., Coenye, T. 2004. Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: a tale of lost and found. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54: 2285-2289.
198. Videla, H.A. 2002. Prevention and control of biocorrosion. *International Biodeterioration and Biodegradation* 49: 259-270.
199. Villar, S.E.J., Edwards, H.G.M., Seaward M.R.D. 2004. Lichen biodeterioration of ecclesiastical monuments in northern Spain. *Spectrochimica Acta Part A* 60: 1229-1237.
200. Völksch, B., Thon, S., Jacobsen, I.D., Gube, M., 2009. Polyphasic study of plant- and clinic-associated *Pantoea agglomerans* strains reveals indistinguishable virulence potential. *Infection Genetics and Evolution* 9: 1381-1391.
201. Vollmer, W., Blanot, D., de Pedro, M.A. 2008. Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiology Reviews* 32: 149-167.
202. Wang, J., Becker, U. 2009. Structure and carbonate orientation of vaterite (CaCO₃). *American Mineralogist* 94:380-386.
203. Warscheid, Th., Braams, J. 2000. Biodeterioration of stone: a review. *International Biodeterioration and Biodegradation* 46: 343-368.
204. Whitman, W.B. 1998. Prokaryotes: the unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 95: 6578-6583.
205. Winkler, E.M. 1997. *Stone in architecture: properties and durability*. 3rd Edition. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
206. Woese, C.R., Kandler, O., Wheelis, M.L. 1990. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 87: 4576-4579.

207. Wolf, S.E., Loges, N., Mathiasch, B., Panthöfer, M., Mey, I., Janshoff A., Wolfgang, T. 2007. Phase selection of calcium carbonate through the chirality of adsorbed amino acids. *Angewandte Chemie International Edition* 46: 5618-5623.
208. Wu, Y., Cheng, C., Yao, J., Chen, X., Shao, Z. 2011. Crystallization of calcium carbonate on chitosan substrates in the presence of regenerated silk fibroin. *Langmuir* 27: 2804-2810.
209. Xiao, J., Wang, Z., Tang, Y., Tang, S. 2009. Biomimetic mineralization of CaCO₃ on a phospholipid monolayer: from an amorphous calcium carbonate precursor to calcite via vaterite. *Langmuir* 26: 4977-4983.
210. Xie, A.-J., Shen, Y.-H., Zhang, C.-Y., Yuan, Z.-W., Zhu, X.-M., Yang Y.-M. 2005. Crystal growth of calcium carbonate with various morphologies in different amino acid systems. *Journal of Crystal Growth* 285: 436-443.
211. Yabuuchi, E., Kawamura, Y., Ezaki, T. 2005. Genus VII. **Ralstonia** Yabuuchi, Kosako, Yano, Hotta and Nishiuchi 1996, 625^{VP}. In: Brenner, DJ., Krieg, NR., Staley, JT. (Eds.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd Edition. Volume 2: *The Proteobacteria, Part C: The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria*. Springer.
212. Zamarreño, D.V., Inkpen, R., May E. 2009b. Carbonate crystals precipitated by freshwater bacteria and their use as a limestone consolidant. *Applied and Environmental Microbiology* 75: 5981-5990.
213. Zamarreño, D.V., May, E., Inkpen, R. 2009a. Influence of environmental temperature on biocalcification by non-spring bacteria. *Geomicrobiological Journal* 26: 298-309.
214. Zanardini, E., Andreoni, V., Borin, S., Cappitelli, F., Daffonchio, D., Talotta, P., Sorlini, C., Ranalli, G., Bruni, S., Cariati, F. 1997. Lead-resistant microorganisms from red stains of marble of the Certosa of Pavia, Italy and use of nucleic acid-based techniques for their detection. *International Biodeterioration and Biodegradation* 40: 171-182.
215. Zavarzin, G.A. 2002. Microbial geochemical calcium cycle. *Microbiology* 71: 1-17.

Βιβλιογραφία

- 216.** Zengler, K., Toledo, G., Rappe, M., Elkins, J., Nathur, E.J., Short, J.M., Keller, M. 2002. Cultivating the uncultured. PNAS 99: 15681-15686.
- 217.** Δερμιτζάκης, Μ.Δ., 1994. Γλωσσάριο γεωλογικών όρων.
- 218.** Καραγκούνη-Κύρτσου, Α. 1999. Μικροβιολογία. Εκδόσεις Α. Σταμούλης, Αθήνα.
- 219.** Σκουλικίδης, Θ.Ν., 2000. Διάβρωση και συντήρηση των δομικών υλικών των μνημείων. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο.

6. ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

Development of an environmentally friendly technique for the conservation of monuments via biomineralization

DASKALAKIS I. M.¹, RIGAS F.^{1*}, KATSIKIS I.², KARAGEORGIS A.³, MAGOULAS A.⁴

¹ School of Chemical Engineering, National Technical University of Athens, 15700 Athens, Greece

² Institute of Geology and Mineral Exploration, Athens, Greece

³ Greek Center of Marine Research, Anavissos, Greece

⁴ Greek Center of Marine Research, Herakleion, Crete, Greece

rigasf@central.ntua.gr <http://www.chemeng.ntua.gr>

Abstract: - Microorganisms were isolated from the environment and cultivated in specific media that induce calcium carbonate precipitation. The formation of crystals was monitored with optical microscope and Scanning Electron Microscopy. Furthermore, X-ray Diffraction was utilized in order to verify the composition of the crystals formed. Here, we report preliminary results that indicate the pluralism of crystal structures that different microorganisms may develop under identical conditions, indicating their potential implementation towards the development of a bioremediation technique for monument protection.

Key-Words: Calcium carbonate, calcinogenic bacteria, monument protection and conservation, bioremediation

1 Introduction

Calcium carbonate precipitation is investigated for various scientific purposes. Firstly, towards the understanding of mineral formation in geological time [1], the formation of stalactites and stalagmites in caves [2], for biotechnological applications such as selective cementation of porous materials for controlling leaching in oil reservoirs [3] or bioremediation methods for immobilization of toxic metals that contaminate land fields and compromise public health [4] and for medical purposes [5]. The protection of cultural heritage against deteriorogenic factors has been an issue of research for the past decades. The microbiological factor is continuously investigated in order to understand its effect on deterioration and to develop methods that may inhibit its detrimental results to monument's structure [6]. Nevertheless, it is suggested that such effect could be reversed in order to use microorganisms that have the ability to proliferate on calcium carbonate substrates, towards the development of techniques that shall protect the monument from further deterioration. Suggestions as such, include living microorganisms [7, 8] or macromolecules [9, 10] that promote calcium carbonate precipitation. Many strains of *Bacillus subtilis*, a well characterized microorganism, have been recently tested for several applications [11].

Although microorganism's calcium carbonate precipitation is a general phenomenon [12], the crystal structure that a microorganism may generate is not identical with that of other microorganisms. This could be attributed to the different pathways that a microorganism may utilize and induce a precipitation to occur. Therefore, the crystal morphology should be investigated in order to compare with the crystal structure of the potential monument that is to be protected. Such confrontation corresponds to the criteria a monument-protective strategy should consider whenever suggested [13]. Here, we report preliminary results of microorganisms that induce calcium carbonate precipitation isolated from Penteli mountain and a cave in Paiania/Hymittos mountain. This work aims at the development of a bioremediation method for deteriorated stone monuments.

2 Experimental

2.1 Sample sites

Samples were collected from three different locations in ancient quarry sites on Penteli mountain. "Koutouki" cave in Paiania district was also used to obtain samples from stalactites and stalagmites. Sampling was performed in winter when water from the roof of the cave was dripping from the walls and the stalactites.

2.2 Isolation and growth of microorganisms on specific media

Growth of microorganisms was performed in media for non-fastidious microorganisms such as Nutrient Broth (Merck) and Nutrient Broth from Oxoid that is more nutritious. Both media were doped with Mycostatin (Bristol Myers Ltd) in order to inhibit fungal growth. Preliminary differentiation of bacteria isolated was performed according to their colonial morphologies. Calcium carbonate deposition experiments were performed with B4 medium (0.25% calcium acetate, 0.4% yeast extract, 1.5% agar, pH=8 with NaOH) [12]. Glucose was not added in the medium in order to induce acetate assimilation. Calcium carbonate solubilization test was performed on an enriched medium (EM): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.22g, KH_2PO_4 1.2g, MgSO_4 0.23g, yeast extract 0.05g, glucose 67g, CaCO_3 50g in 1L deionized water supplemented with 2.5% CaCO_3 and 2% agar [14]. All chemicals were of the highest quality and purchased from Sigma, except Yeast extract for B4 medium that was purchased from Difco.

2.3 Isolation of crystals

Whenever necessary for further experimentation, colonies with obvious crystal formation on agar plates were cut aseptically and agar blocks were melt in warm water. Crystals were rinsed three times with deionized water to clean from impurities and allowed to dry at room temperature.

2.4 Scanning Electron Microscopy and Optical Microscopy

Agar blocks with bacterial colonies and obvious crystal formation were cut, placed on glass slides and allowed to dry at 37°C in order to be used for electron microscopy studies. Then, they were gold or carbon coated prior to scanning. Scanning Electron Microscopy was performed with a SEM JEOL JSM-5600 instrument coupled with microanalyte Energy Dispersive Spectra from Oxford Instruments, coupled with an E.D.S microanalyser from Oxford Instruments, type Link Pentafet. Optical microscopy was carried out at a LEICA DMLP polarizing optical microscope with the use of transmission light and the agar blocks of colonies used were not dried but used wet.

2.5 X-ray Diffraction analysis

Purified crystals as mentioned previously were collected and subjected to X-ray diffraction. The

instrument used was Rejacu T / max – B with a Cu radiation source. The $2\theta^\circ$ scan range was $2\theta^\circ = 2.0 - 50.0$ and each scan was done in steps of 0.01° . The supply voltage was set at 40kV, 20mA.

3 Results

All microorganisms isolated had the ability to precipitate mostly calcite crystals, except one that did not produce any crystals. This result pinpoints that all bacteria were not opportunistic isolates but constitute part of the microflora of the specific sample sites. Additionally, almost half of the isolates had the ability to dissolve calcium carbonate when provided as substrate providing us with the conclusion that the ability/inability of microorganisms to produce / dissolve calcium carbonate depends on the nutrients and the prevailing environmental conditions. In the following part we describe two examples of microbial calcium carbonate precipitation. Both microorganisms mentioned were isolated from Paiania cave.

3.1 T4 microorganism

Optical microscope photos showed that the center of the colony is covered with crystals. The ones with the larger size are better shaped and resemble a pyramidal structure. The smaller ones develop similar structures that are still immature pyramids. Additionally, the outer part of the colony is covered with microcrystalline particles that are difficult to observe in the optical microscope.

Therefore, the SEM photographs provide better details (Fig. 1c). We are able to observe the pyramidal structures that developed in the center of the bacterial colony. The top of the pyramid faces the inner part of the colony and the base is in contact with the air. All pyramids have clearly shaped sides but greater magnification shows that they are not similar. On the contrary, they differ on roughness showing that some of them were created by microcrystalline parts. This is also obvious in the outer side of the pyramid where greater magnification shows that the pyramid was developed from gradual aggregation of smaller crystals (Fig. 1d). Moving towards the end of the bacterial colony, different morphologies are found. We may see polyhedral structures that resemble dice.

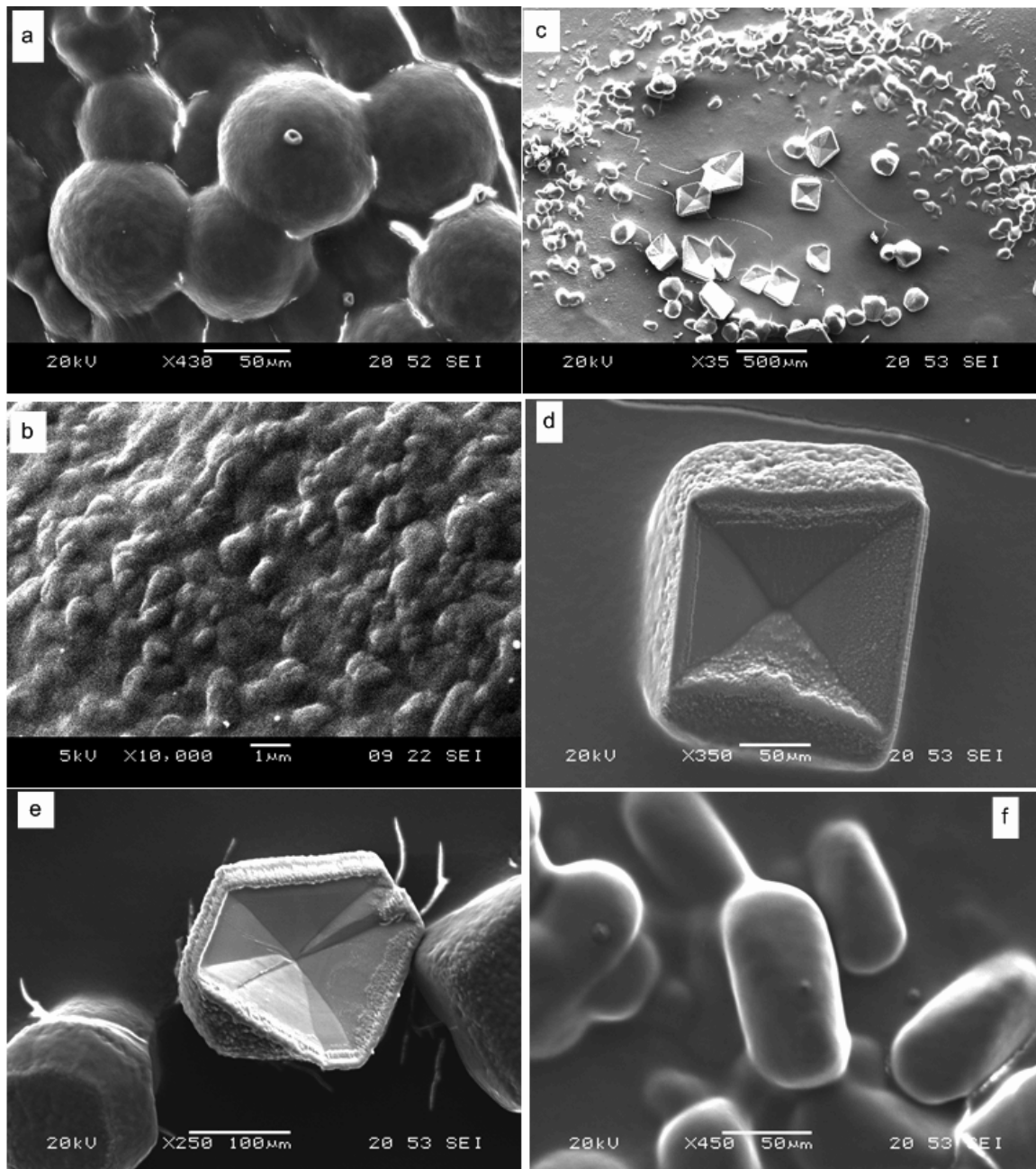


Figure 1: Scanning electron photographs from T3 and T4 microorganisms. (a) spherical forms of T3, (b) magnification of the surface of a sphere, (c) general view of T4 bacterial colony and the crystals developed, (d) magnification of a pyramid, (e) dice-like structures and the development of pyramids, (f) ellipsoidal crystal formations.

Nevertheless, the ones that are closer to the center of the colony gradually develop a flat side that probably constructs the pyramids already observed (Fig. 1e). Finally, at the outer area of the bacterial colony we observe ellipsoidal structures that “attempt” to develop a polyhedral structure mentioned before (Fig. 1f).

Semi-quantitative results from the analysis elucidate the quality of the crystal structures

according to the shape. In particular, ellipsoidal crystals contain traces of different minerals such as phosphorus, sulfur, chloride and potassium. The intensity of the calcium peak continues to fluctuate in the polyhedral structures but becomes the primer element since the pyramidal structure develops. Then, calcium carbonate (calcite) is the main mineral detected. Calcite is the only one detected by X-ray diffraction (Fig. 2). This helps us conclude that the rest of the elements detected are

in trace amounts. To sum up, we can see a gradual development of crystal morphology from the outer to the inner layers of the bacterial colony. This may assist as in continuing to investigate and elucidate the time for crystal creation that is necessary. Such knowledge shall help us find the appropriate crystal structure taking into account the stone substrate to be protected.

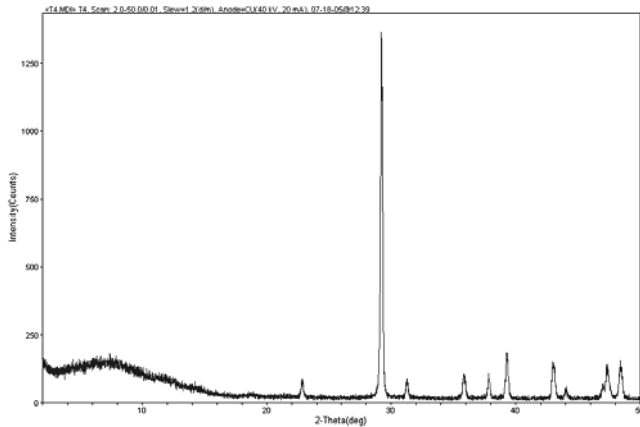


Figure 2: X-ray diffraction spectra of T4 microorganism.

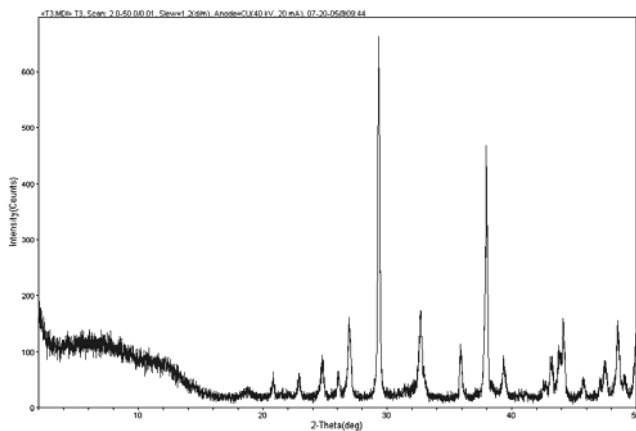


Figure 3: X-ray diffraction spectra of T3 microorganism.

3.2 T3 microorganism

T3 microorganism provides us with different crystals. Specifically, optical microscope photos show primarily spherical forms and polyhedral ones that are too small in size compared to the spheres. We should note that this is general in the whole region of the bacterial colony and we could

not detect a gradual change of any kind of morphology as mentioned before. Nevertheless, analysis with scanning electron microscopy (Fig. 1a) did not show any polyhedral structures but only the spherical forms. Scanning electron microscopy provides us with greater details regarding the surface of the spheres. It is obvious from the corresponding image (Fig. 1b) that the spheres are constructed from smaller crystalline structures that resemble the size of a microorganism that is probably fossilized. X-ray diffraction analysis (Fig. 3) reveals that the crystals are made of calcite. It is suggested, that spherical forms usually correspond to aragonite but we could not observe such peaks with certainty from XRD. We should note that the specific microorganism has the tendency of constructing complete spheres inside its colonies.

4 Discussion

Spherical calcite crystals have been reported in solid B4 media from a cave isolate *Bacillus megaterium* [15], *Micrococcus* sp. [16], vaterite crystals from *Rhodococcus* sp. [17], *Bacillus subtilis* [18] and *Myxococcus xanthus* [19]. Nevertheless, complete spheres as we report are not mentioned from the previous microorganisms besides *Myxococcus xanthus*, yet the media used to induce such precipitation included magnesium ions that we did not have in our growth media. *Bacillus pasteurii*, an urease positive microorganism has the ability to precipitate spherical calcite forms [20] but the medium utilized was supplemented with urea. Our isolates discussed here are urease negative (results not shown). Therefore, even if there was urea in our media, it could not be utilized since the conditions of precipitation are not similar. Furthermore, spherical crystal forms are usually reported as vaterite [21].

Crystal structures similar to the ones reported for T4 microorganism are mentioned for *Ralstonia eutropha* a soil bacterium in citrate and oxalate rich media [22]. The type of the crystal structure of T4 is noteworthy that all the crystals in the center of the colony are pyramids. Furthermore we could observe the gradual transformation of polyhedral dice-like crystals to pyramids. The latter transitional structures are reported for the first time indicating the pluralism of structures that one may encounter. The ability to observe such morphologies could be due to growth on agar media where the solid substrate retards the

immediate dispersion of the metabolic products from the microorganisms, assisting to create the appropriate microenvironment for calcium carbonate precipitation. We should mention here that blank experiments without microorganisms on B4 media or with sterilized inoculants did not form any obvious precipitation. Therefore, we could suggest that calcium carbonate may only form with the intervention of the living cells and probably with their metabolic products.

5 Conclusion

In this paper we reported the morphology of crystals from microorganisms isolated from Paiania cave. Some of these morphologies were not reported previously. Such structures should be tested for their ability to incorporate into the crystal structure of marbles. Further experiments should concentrate on the ability of microorganisms to fossilize into the pores of the marble developing a thin calcium carbonate layer. Ongoing experiments in our laboratory focus on this issue. Nevertheless, our results indicate that microorganisms are able to precipitate crystals of numerous morphologies depending on their environment and site of isolation. Therefore, in future bioremediation techniques with the utilization of bacterial mineralization, one should consider seriously the application of autochthonous microorganisms, which are better adapted in such substrates.

Acknowledgment

The Project is co-funded by the European Social Fund (75%) and National Resources (25%) - (EPEAEK II) - PYTHAGORAS.

References:

- [1] Ehrlich H.L., Geomicrobiology: its significance in geology, *Earth Science Reviews*, 45, 1998, pp. 45-60.
- [2] Northup D.E., Lavoie K.H., Geomicrobiology of caves: a review. *Geomicrobiology Journal* 18, 2001, pp. 199-222.
- [3] Stocks-Fischer S., Galinat J.K., Bang S.S., Microbiological precipitation of CaCO₃, *Soil Biology and Biochemistry*, 31, 1999, pp. 1563-1571.
- [4] White C., Sayer J.A., Gadd G.M., Microbial solubilization and immobilization of toxic metals: key biogeochemical processes for treatment of contamination, *FEMS Microbiology Reviews*. 20, 1997, pp. 503-516.
- [5] Boskey A.L., Biomineralization: an overview. *Connective Tissue Research*, 44: 2003, pp. 5-9.
- [6] Warscheid Th., Braams J., Biodeterioration of stone: a review, *International Biodeterioration and Biodegradation*. 46, 2000, pp. 343-358.
- [7] Castanier S., Le Metayer-Levrel G., Oriol G., Loubiere J.F., Pertuisot J.P. Bacterial carbonatogenesis and applications to preservation and restoration of historic property. pp. 203-218. In: *Of Microbes and Art: the role of microbial communities in the degradation and protection of cultural heritage*, Ciferri O., Tiano P., Mastromei G. Eds., Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2000.
- [8] Rodriguez-Navarro, C., M. Rodriguez-Gallego, K. B. Chekroun, and M. T. Gonzalez-Munoz, Conservation of ornamental stone by *Myxococcus xanthus*-induced carbonate biomineralization, *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 2003, pp. 2182-2193.
- [9] Tiano, P., Innovative treatments for stone conservation. *Corrosion Reviews*, 22, 2004, pp. 365 - 380.
- [10] Tiano, P., Stone reinforcement by calcite crystal precipitation induced by organic matrix macromolecules, *Studies in Conservation*, 40, 1995, pp. 171-176.
- [11] Piterkova L., Skarkeova M., Patakova P., Melzoch K., Molecular characterization of thermophilic and mesophilic *Bacillus* species. Proceedings of WSEAS Int. Conf. on Cellular and Molecular Biology, Biophysics and Bionengineering, 2005.
- [12] Boquet E., Boronat A., Ramos-Cormenzana A., Production of calcite (calcium carbonate) crystals by soil bacteria is a general phenomenon, *Nature*, 246, 1973, pp. 527-528.
- [13] Vozikis, T. K., Protective structures on archaeological sites in Greece. Proceedings of WSEAS Int. Conf. on Environment, Ecosystems and Development. 2005, pp. 120-125.
- [14] Di Bonaventura M.P., Del Gallo M., Cacchio P., Ercole C., Lepidi A., Microbial formation of oxalate films on monument surfaces: Bioprotection or Biodeterioration?, *Geomicrobiology Journal*, 16, 1999, pp. 55-64.
- [15] Cacchio P., Ercole C., Capuccio G., and Lepidi A., Calcium carbonate precipitation by bacterial strains isolated from a limestone cave and from a loamy soil, *Geomicrobiol. J.*, 20, 2003, pp. 85-98.

- [16] Urzi C., M. G. Vendrell V. M., and Pernice A., Biomineralization processes on rock and monument surfaces observed in field and in laboratory conditions, *Geomicrobiol. J.*, 16, 1999, pp. 39–54.
- [17] Groth, I., Schumann P., Laiz L., Sanchez-Moral S., Canaveras J.C., and Saiz-Jimenez C., Geomicrobiological Study of the Grotta dei Cervi, Porto Badisco, Italy, *Geomicrobiol. J.*, 18, 2001, pp. 241–258.
- [18] Tiano, P., Biagiotti L., Mastromei G., Bacterial bio-mediated calcite precipitation for monumental stones conservation: methods of evaluation, *J. Microbiol. Meth.*, 36, 1999, pp. 139–145.
- [19] Gonzalez-Munoz, Ma T. N., Chekroun K B, Ma Arias J., and Rodriguez-Galleo M., Bacterially induced Mg-calcite formation: role of Mg in development of crystal morphology. *J. Sedim. Res.* , 70, 2000, pp. 559–564.
- [20] Fujita Y., Ferris F.G., Lawson R.D., Colwell F.S., Smith R.W., Calcium carbonate precipitation by ureolytic subsurface bacteria. *Geomicrobiology Journal*, 17, 2000, pp. 305-318.
- [21] Tong H., Ma W., Wang L., Wan P., Hu J., Cao L., Control over the crystal phase, shape, size and aggregation of calcium carbonate via a L- aspartic inducing process. *Biomaterials* 25, 2004, pp. 3923-3929
- [22] Braissant O., Verrecchia E.P., Aragno M., Is the contribution of bacteria to terrestrial carbon budget greatly underestimated?, *Naturwissenschaften*, 89, 2002, pp. 366-370.

ORIGINAL ARTICLE

***Pseudomonas*, *Pantoea* and *Cupriavidus* isolates induce calcium carbonate precipitation for biorestitution of ornamental stone**M.I. Daskalakis¹, A. Magoulas², G. Kotoulas², I. Catsikis³, A. Bakolas¹, A.P. Karageorgis⁴, A. Mavridou⁵, D. Doulia¹ and F. Rigas¹

1 School of Chemical Engineering, National Technical University of Athens, Athens, Greece

2 Hellenic Centre for Marine Research, Herakleion, Crete, Greece

3 Institute of Geology and Mineral Exploration, Athens, Greece

4 Hellenic Centre for Marine Research, Anavyssos, Greece

5 Department of Medical Laboratories, Technological Educational Institute of Athens, Athens, Greece

Keywords*Bacillus*, biomineralization, *Cupriavidus*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, vaterite.**Correspondence**Fotis Rigas, School of Chemical Engineering,
National Technical University of Athens,
15700 Athens, Greece.
E-mail: rigasf@central.ntua.gr2012/2295: received 22 December 2012,
revised 31 March 2013 and accepted 18 April
2013

doi:10.1111/jam.12234

Abstract**Aims:** Bacterially induced calcium carbonate precipitation from various isolates was investigated aiming at developing an environmentally friendly technique for ornamental stone protection and restoration.**Methods and Results:** Micro-organisms isolated from stone samples and identified using 16S rDNA and biochemical tests promoted calcium carbonate precipitation in solid and novel liquid growth media. Biomineral morphology was studied on marble samples with scanning electron microscopy. Most isolates demonstrated specimen weight increase, covering partially or even completely the marble surfaces mainly with vaterite. The conditions under which vaterite precipitated and its stability throughout the experimental runs are presented.**Conclusions:** A growth medium that facilitated bacterial growth of different species and promoted biomineralization was formulated. Most isolates induced biomineralization of CaCO₃. Micro-organisms may actually be a milestone in the investigation of vaterite formation facilitating our understanding of geomicrobiological interactions. *Pseudomonas*, *Pantoea* and *Cupriavidus* strains could be candidates for bioconsolidation of ornamental stone protection.**Significance and Impact of the Study:** Characterization of biomineralization capacity of different bacterial species improves understanding of the bacterially induced mineralization processes and enriches the list of candidates for biorestitution applications. Knowledge of biomineral morphology assists in differentiating mineral from biologically induced precipitates.**Introduction**

Microbes have been interacting with metals and minerals since the Precambrian era (Ehrlich 1998). Biological processes involving calcium carbonate precipitation–dissolution preserve the Earth's neutral conditions in which most organisms thrive (Zavarzin 2002), and bacteria play an active role in both (Douglas 2005). Consequently, these processes can be classified under the

term biomineralization and categorized as biologically controlled mineralization, such as bone development (Mann 2001) and biologically induced mineralization (BIM), where micro-organisms modify their local environment thus promoting the conditions for extracellular calcium carbonate precipitation (Gadd 2010). In BIM, bacterial cell surfaces and outer structures define the final outcome of the mineralization process (De Muynck *et al.* 2010a).

Exposed stone is subjected to physical, chemical and biological factors. Their combinations cause the dissolution of the mineral matrix rendering the material more porous and with decreased mechanical features (Tiano *et al.* 1999). Bacteria may induce dissolution of stone materials by excreting acidic compounds during their metabolic cycle. Conversely, they are capable of promoting calcium carbonate precipitation by influencing the factors related to precipitation, namely: Ca^{2+} concentration, dissolved inorganic carbon concentration, pH and presence of nucleation sites (Hammes and Verstraete 2002). Induction of calcium carbonate biomineralization proved to be a general bacterial phenomenon (Boquet *et al.* 1973) which has been consistently demonstrated. Thus, bacteria are considered as promising candidates for the development of environmentally friendly techniques aiming at the restoration of decaying stone monuments (Adolphe *et al.* 1990). For heterotrophic bacteria under aerobic conditions, the main metabolic pathways of interest are the oxidative deamination of amino acids, the degradation of urea and the utilization of organic acids (De Muynck *et al.* 2010a). In oxidative deamination, breakdown of amino acids releases NH_4^+ that raises pH levels and carbonate concentration, which can provoke calcium carbonate precipitation in the presence of calcium (Jimenez-Lopez *et al.* 2008). Alternatively, bacteria that possess the urease enzyme catalyse urea hydrolysis to carbonate and ammonium. Finally, organic acid assimilation assists in the bioprecipitation of calcium carbonate by increasing the concentration of carbonate during metabolism (Braissant *et al.* 2002). Increased calcium carbonate precipitation has been observed when the above-mentioned amino acid and organic acid pathways are simultaneously exploited (De Muynck *et al.* 2008a).

Bacillus species have been utilized due to their ureolytic abilities (Hammes *et al.* 2003). Castanier *et al.* (1999) utilized the heterotroph *Bacillus cereus* for the development of a biomineralization method that was applied successfully on walls and statues by spraying a suspension of the micro-organism first and subsequently feeding it with the appropriate medium. *Bacillus sphaericus* was initially applied on limestone (Dick *et al.* 2006) and subsequently on concrete (De Muynck *et al.* 2008a; Van Tittelboom *et al.* 2010). For the latter substrate, *Sporosarcina pasteurii* (formerly *Bacillus pasteurii*) was tested on concrete cracks (Bang *et al.* 2001; Sung-Jin *et al.* 2010) and recently on bricks (Sarda *et al.* 2009). Rodriguez-Navarro *et al.* (2003) suggested the use of *Myxococcus xanthus* as another appropriate bacterium, which indeed promoted calcite and vaterite formation.

The goal of this work was to investigate bacterial species obtained from the surfaces of marble taken from the ancient quarry site of Pentelic marble. Nonfastidious

micro-organisms were isolated, and the growth medium was optimized for improving their efficiency for calcium carbonate precipitation. Experiments with the selected culture medium dosed with different concentrations were performed to identify the calcium carbonate polymorphs that prevailed and to distinguish the isolates that could be considered as candidates for bioconsolidation strategies.

Materials and methods

Isolation of micro-organisms

Micro-organisms were isolated from specimens taken from an ancient marble quarry, in the Penteli Mountain, Athens, Greece. Initially, the surface of the marble was wiped with a cotton swab, previously immersed in nutrient broth medium (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) and then resuspended in the medium. Additionally, using a sterile blade, stone samples were scraped into a sterile test tube. All samples were cold-stored in an icebox during transport to the laboratory where they were immediately processed.

Stone samples weighing 0.1 g were added in a 0.9% (w/v) NaCl – 0.1% (w/v) Triton-X solution, vortexed for 5 min, and 50 μl aliquots were inoculated in the nutrient broth (Merck). All media were supplemented with nystatin (kindly provided from Bristol Myers Squibb, Athens, Greece) to inhibit the growth of fungi and then incubated at 28°C/120 rpm on a horizontal shaker (Labnet Orbit-1000; Edison, NJ, USA) for 72 h. Nutrient broth medium inoculated on-site with a cotton swab was supplemented with nystatin and similarly incubated.

Every 24 h, an aliquot was serially diluted and spread on plates of the corresponding medium. Individual colonies were subcultured in liquid media and serially diluted until uniform colony morphology was observed. After purification, bacteria were stored at –30°C in PROTECT vials – bacterial preservers (Technical Service Consultants Limited, Lancashire, UK) according to the manufacturer's instructions.

Molecular biology identification

Isolation of bacterial DNA was performed by diluting bacterial cells, recovered from colonies grown in nutrient broth agar plates for 18 h, by gently touching the colony surface with a sterile pipette tip and immersing the tip in 50 μl of ultra pure water (Merck). Subsequently, samples were heat shocked at 98°C and centrifuged at 2225 g for 2 min. Next, 2 μl of the supernatant was used for 16S rDNA amplification with the eubacterial universal primers: 27 forward 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' and 1492 reverse 5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3' in the following reaction concentrations: 1× PCR buffer,

2 mmol l⁻¹ MgCl₂, 0.166 mmol l⁻¹ dNTPs, 0.233 μmol l⁻¹ of each forward and reverse primer and 1.5 U Taq polymerase (Gennaxon) to a final volume of 30 μl. The thermal profile of the PCR reactions was as follows: initial denaturation at 94°C for 3 min, followed by 35 cycles of 94°C for 1 min, 48°C for 1 min and 72°C for 3 min and a final cycle at 72°C for 10 min. The length of the amplified 16S rDNA fragment was approximately 1500 bp. The amplified fragments were then purified with the QIAquick PCR purification kit (QIAGEN, Hilden, Germany), cloned with a TOPO TA Cloning Kit and transformed into chemically competent cells in accordance with the manufacturer's instructions (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Transformants were selected on LB amp + Xgal and screened by PCR using vector primers T7 and SP6 under the following conditions: 3 μl of the lysed bacteria, 1× PCR buffer, 1.5 mmol l⁻¹ MgCl₂, 0.15 mmol l⁻¹ dNTPs, 1.5 U Taq polymerase and in a final volume of 20 μl. Reaction mixtures were incubated at 94°C for 5 min as an initial incubation step followed by 30 cycles at 94°C for 1 min, 50°C for 1 min, 72°C for 3 min and then a final step at the same temperature for 10 min.

The resulting PCR products were purified using QIAquick PCR purification kit, and sequences were determined by the DNA analysis facility at Yale University using T7 and SP6 primers.

Nearly full 16S rDNA was sequenced for the isolated micro-organisms and compared with the NCBI database with BLASTN network service (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). The sequences were submitted to GenBank, and their corresponding accession numbers are presented in Table 1.

Sequences were aligned using default parameters in CLUSTAL W and corrected by eye. Sequence divergences were estimated with the software MEGA v. 5 (www.mega-software.net) (Tamura *et al.* 2011) choosing Kimuras' two-parameter model (Kimura 1980) of evolution, and phylogenetic trees were constructed using the neighbour-joining algorithm (Saitou and Nei 1987). Branch support was assessed with 1000 bootstrap replicates. Sequences for construction of the trees, according to the results of the BLASTN program, were selected based on:

- 1 The closest type of strain that presented 100 or 99% similarity,
- 2 The length of the 16S rDNA compared should have been equal to or close to the length of our isolates,
- 3 The maximum score which should be as high as possible,
- 4 Sequences corresponded to cultured micro-organisms

For example, the phylogenetic tree for B_MPEZ isolate was constructed based upon the above prerequisites and

Table 1 Phylogenetic affinities of 16S rDNA gene sequences of stone isolates

Isolate name	Sample origin	16S rDNA length (bp)	NCBI closest match	Percentage of similarity (%)	Accession Number	Family	Class	Phylum	*Risk group
PR	Stone/cotton swab	1504	<i>Pantoea agglomerans/vagans</i>	99.80/99.53	JQ412064	Enterobacteriaceae	Gamma proteobacteria	Proteobacteria	2
B_MPEZ	Stone	1496	<i>Cupriavidus metallidurans</i>	99.87	JQ046372	Burkholderiaceae	Beta proteobacteria	Proteobacteria	1
BL	Stone	1520	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	98.95	JQ412065	Paenibacillaceae	Bacilli	Firmicutes	1
C	Stone	1515	<i>Bacillus cereus</i>	99.54	JQ412066	Bacillaceae	Bacilli	Firmicutes	2 (DSMZ)/1(ATCC)
T5_L	Stone	1501	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	99.53	JQ412067	Pseudomonadaceae	Gamma proteobacteria	Proteobacteria	1
T10	Stone	1513	<i>Bacillus licheniformis</i>	99.80	JQ412068	Bacillaceae	Bacilli	Firmicutes	1

*Risk Group: The category that each isolate corresponds to is based on the type of strains deposited in the German Collection of Micro-organisms and Cell Cultures (DSMZ) and the American Type Culture Collection (ATCC), and references therein. Risk Group 1 micro-organisms are not known to cause disease in healthy adult humans. Risk Group 2 micro-organisms present a moderate risk and should be handled under specific guidelines.

from similar isolates that facilitated the strain's initial identification and latter affiliation to the genus *Cupriavidus* (Goris *et al.* 2001; Vandamme and Coenye 2004). *Pandoraea apista* strain LMG 20576, *Burkholderia cepacia* strain ATCC25416 and *Alcaligenes faecalis* strain TZQ4 served as out-groups (see Fig. S1).

Phenotypic tests

API 20NE, 20E and CHB/E test strips (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) were used to visualize biochemical characteristics and assist in identification. Gram stain, oxidase and catalase tests were separately evaluated. Results were compared with the API Identification Tables and corresponding literature.

Growth media

B4 medium (Boquet *et al.* 1973) for biomineralization experiments was modified. Glucose was omitted, and instead of yeast extract different nutrient sources were investigated; tryptose (LABM, Lancashire, UK and Fluka; Sigma-Aldrich, Munich, Germany), bacteriological peptone (BP), soy peptone, beef extract and proteose peptone A (LABM, Lancashire, UK). $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ (Sigma-Aldrich, Munich, Germany) solution remained the source of calcium and potential enhancer of bacterial growth through the assimilation of acetate. Before sterilization, the pH was adjusted to 8 with NaOH. Qualitative observation of growth was carried out by monitoring absorbance at 620 nm with a Hach DR-2000 spectrophotometer (HACH LANGE GmbH, Düsseldorf, Germany) in samples diluted with water (1 : 1 dilution).

Stone substrate

Marble from the Dionysus site in the Penteli Mountain was the selected stone in the biomineralization experiments. This is the same type of marble that the renowned ancient monuments in Athens, like the Parthenon, were constructed with. Stone samples were cut in sizes of 4 cm × 1 cm × 1–1.5 cm. Initially, they were cleaned of soil debris with tap water, then rinsed thoroughly with deionized water and allowed to dry at 50°C for 24 h. Stone slabs were sterilized in the same manner as growth media and weighed prior to immersion in the growth medium.

Biomineralization experiments

The growth medium that proved most appropriate was 0.36 g BP and 2.5 ml of 10% (w/v) $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ in 100 ml of deionized water (BP1x). BP agar media were

prepared at 1×, 2× (0.72 g BP and 5 ml of 10% (w/v) calcium acetate) and 4× (1.44 g BP and 10 ml of 10% (w/v) calcium acetate) concentrations. Sterile stone samples were immersed in 99 ml of the above liquid medium for the biomineralization experiments and inoculated with 1 ml of each micro-organism, pregrown for 24 h. Control samples (without micro-organism) were used in all experiments and subjected to the same treatment. Additional series of control samples with dead bacteria were incubated for 30 days to investigate whether bacterial constituents could provide a template for calcium carbonate precipitation. Flasks were incubated at 30°C on a horizontal shaker at a speed of 120 rpm for 15 or 20 days. Every 48 h, a loopfull from each flask was applied on corresponding agar media to test for contamination.

For sample processing, 6 ml of medium was centrifuged to obtain the supernatant for further analysis. Viability and enumeration of bacteria were performed with the serial dilution method in 0.1% (w/v) peptone from casein (Merck) solution, absorbance of the medium was monitored at 620 nm, and the pH was monitored with a WTW Inolab pH-720 pH meter (WTW GmbH, Weilheim, Germany). The rest of the medium was filtered, and biomineral attached to flask walls was gently scraped off to obtain adequate amounts of calcium carbonate for further analyses.

Recovered stone samples were rinsed thoroughly with deionized water and dried at 50°C. After 48 h, they were weighed, and the final weight gain was calculated against the weight of the sample prior to its immersion in the growth medium. Subsequently, samples were prepared for scanning electron microscopy analysis.

Calcium and acetate monitoring

Calcium depletion was monitored with atomic absorption spectroscopy using a Varian spectrophotometer (model AA240FS). The wavelength for calcium detection was at 422.7 nm. Acetate assimilation was monitored with liquid chromatography in a DIONEX BioLC (Dionex Thermo Fisher GmbH, Idstein, Germany) coupled with an ED50 electrochemical detector and a GS50 gradient pump. The column used was an IonPac AS14 analytical. Data were recorded with Chromeleon 6.20 sp2 Build 541 software (Dionex Thermo Fisher GmbH, Idstein, Germany).

Scanning electron microscopy and ultrasonic treatment

Stone samples were first coated with platinum by electro-deposition and then placed under a JEOL scanning electron microscope to observe the morphology of the induced biomineral. Ultrasonic treatment of biomineral-

ized samples was carried out, as suggested by Rodriguez-Navarro *et al.* (2003). Briefly, biomineralized and blank stone samples were immersed in deionized water in an upright position (one of their small sides 1 cm × 1–1.5 cm was touching the bottom of the glass beaker). Sonication occurred for 5 min, and samples were immediately rinsed with deionized water and dried at 50°C for 24 h prior to weighing. The process was performed five times.

XRD and FT-IR analyses

Crystals isolated from the biomineralization media were collected, finely powdered, resuspended in Milli-Q water, filtered through silver membrane filters (pore size 0.45 µm) and subjected to X-ray diffraction. The instrument used was a Rigaku D/MAX B diffractometer (Rigaku Europe SE, Ettlingen, Germany), with CuK_α radiation, and graphite monochromator, operated at 40 kV, 20 mA. The scan range was 2.0–50.0°2θ, in steps of 0.01°.

Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) analysis was performed in all samples isolated to have a prompt result regarding the biomineral. A few crystals were mixed with KBr (Merck for spectroscopy) and pulverized in an agate mortar to form a homogenous powder from which, under a pressure of 7 tons, the appropriate pellet was prepared. All spectra were recorded from 4000 to 400 cm⁻¹ using the Bio-Rad FTS 3000 MX spectrometer (Bio-Rad Laboratories Ltd, Hemel Hempstead, UK). Scans were 32 per spectrum with a resolution of 4 cm⁻¹. The IR spectra were analysed using the spectroscopic software Win-IR Pro Version 3.0 (Bio-Rad Laboratories Ltd, Hemel Hempstead, UK) with a peak sensitivity of 2 cm⁻¹.

Results

Isolation, purification and identification of isolated micro-organisms

The isolation strategy followed in this work aimed to culture nonfastidious micro-organisms inhabiting stone surface. Isolates with their corresponding phylogenetic identification are presented in Table 1. All bacteria were identified from 16S rDNA sequencing, and their phylogenetic trees proved to be consistent in results. Isolates, with the exception of *Paenibacillus polymyxa*, were able to grow in BP, tryptose and yeast extract agar plates. Temperature growth range was 20–37°C with no growth above 40°C or below 10°C. API results assisted in bacterial identification only in accordance with DNA sequencing.

Bacillus cereus C, *Bacillus licheniformis* T10, *P. polymyxa* BL and *C. metallidurans* B_MPEZ provided results similar

to the corresponding API Identification Tables, Bergey's manual of systematic bacteriology (Logan and De Vos 2009) and corresponding literature (Goris *et al.* 2001; Vandamme and Coenye 2004; Vaneechoutte *et al.* 2004). For T5_L isolate, the phenotypic tests coincided with *Pseudomonas chlororaphis* but could not differentiate our isolate in the subspecies level (Peix *et al.* 2007) (Table S1).

Finally, for the isolate designated as PR, according to API tests, it was identified as *Pantoea* sp. Genetic identification provided us with two results corresponding with *Pantoea agglomerans* and *Pantoea vagans*. Further differentiation of the species level could not be performed because of differences in the biochemical tests (Table S2). If *P. vagans* (Brady *et al.* 2009) was not recently isolated, our micro-organism would be affiliated adequately to *P. agglomerans* (Delétoile *et al.* 2009). Owing to this ambiguity, it is designated as *Pantoea* sp. PR.

Growth media

B4 biomineralization medium was differentiated due to the fact that when components were mixed prior to, or after being sterilized, a cloudy solution formed a few hours after pH adjustment (pH = 8) leading to a fine precipitate that could not be isolated by filtration.

Yeast extract replacement was based on calculations for nitrogen content that were provided by the manufacturer. The goal was a medium that would be able to induce similarly good growth rates with an adjustable pH (a pH value close to 8) without inorganic precipitation. The best results were obtained with BP. Most micro-organisms grew in this medium with no delay, even from frozen stock cultures (as identified by measuring the absorbance of inoculated growth media after 18 h). BP's pH was adjusted prior to sterilization and was mixed with calcium acetate after being separately sterilized.

All micro-organisms except *P. polymyxa* BL were able to grow in BP medium even at the lowest concentrations (BP1x). When concentration of BP media was doubled (BP2x), bacteria underwent a period of latency, followed by a period when nutrients from BP were metabolized. Acetate further promoted bacterial growth by the diauxic effect for all isolates except *Pantoea* sp. PR, whose absorbance values during growth suggested that it was readily assimilated since the start of its growth. Acetate assimilation coincided with the onset of detectable calcium carbonate formation.

Biomineralization on marble surface

Initial screening of biomineralization was performed at various concentrations of BP solid media. As shown in Table 2, all micro-organisms at all concentrations except

at BP4x formed calcite in solid media as the main polymorph (analysis by FTIR). As presented in Fig. 1, polymorphism could be monitored by FT-IR and XRD.

Biominerall polymorphism differed in liquid media. Calcite was detected at BP1x, and vaterite was observed at concentrations BP2x and higher (Table 2). At concen-

Table 2 Calcium carbonate polymorphism of micro-organisms under different solid and liquid media concentrations

Isolate	Solid BP1x	Solid BP2x	Solid BP4x	Liquid BP1x	Liquid BP2x	Liquid BP4x	Crystal morphology	Crystal colour
<i>Pantoea</i> sp. PR	Calc	Calc+(Vat)	Vat	Calc	Vat	Vat	Mineralized bacteria; spheres	Light yellow
<i>Cupriavidus metallidurans</i> B_MPEZ	Calc	Calc	Calc	Calc	Vat+(Calc)	Vat	Micritic spheres; short rods; combination of spheres and rods.	White-beige
<i>Bacillus cereus</i> C	Calc	Calc	Vat	Calc	Vat+(Calc)	Vat	Mineralized bacteria (vaterite); dendritic (calcite).	Brown
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> T5_L	Calc	Calc+(Vat)	Vat	Calc	Vat	Vat	Micritic spheres	White-green crystals
<i>Bacillus licheniformis</i> T10	Calc	Calc+(Vat)	Vat	Calc	Vat	Vat	Mineralized bacteria	Brown

Calc, calcite; Vat, vaterite.

Polymorphs in parentheses correspond to minor but detectable amounts.

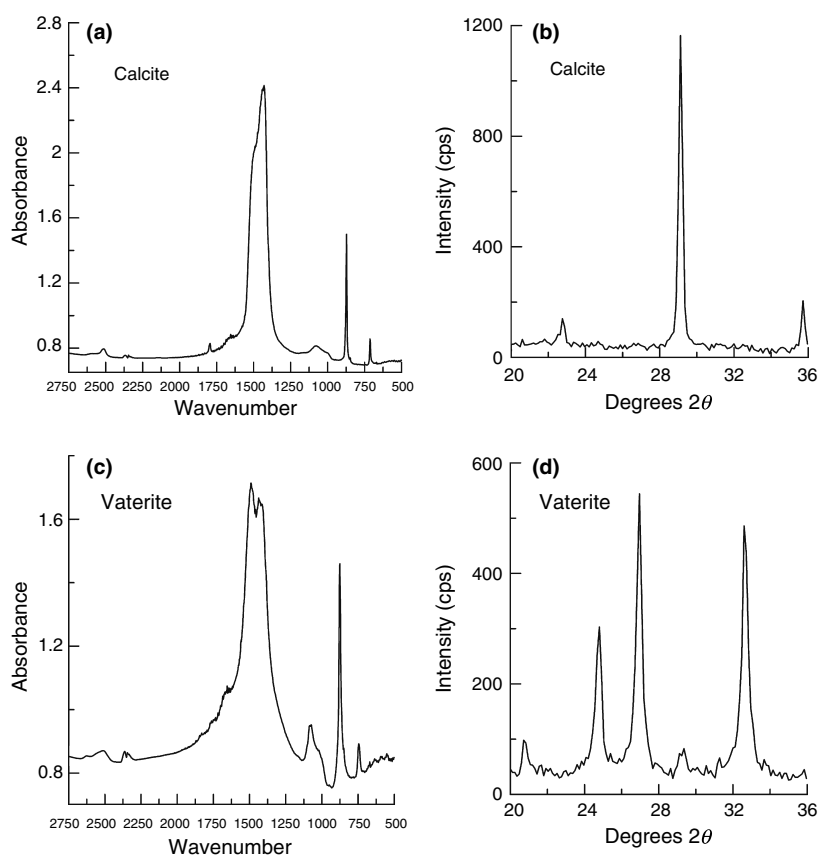


Figure 1 FTIR and XRD spectra of calcite (a and b) and vaterite (b and c) identified in biomineralization experiments. Calcite peaks on FTIR are at 713, 875, 1423 (single), 1794 and 2516 cm^{-1} . Vaterite peaks are at 745, 875, 1084, 1437–1487 (double peak) and 2508 cm^{-1} . Polymorphism was further investigated with XRD, where the corresponding 2θ degrees for calcite were at 23.05 (9%), 29.40 (100%) and 35.96 (15%) and for vaterite were at 24.87 (90%), 27.01 (100%) and 32.80 (90%).

tration BP1x, biomineralization was very low, especially on marble, and the actual morphology of the biomineral polymorphs could not be easily distinguished from marble fragments. All tested micro-organisms provided better surface biomineralization at BP2x than BP4x. Furthermore, weight increase was not analogous to the nutrient surplus (increase from BP2x to BP4x) provided, and micro-organisms tended to coagulate and form large biomineral assemblies instead of a smoother calcium carbonate surface on the substrate. This phenomenon was not associated with nutrient assimilation; at the end of the experiments, acetate and calcium concentrations were either very low or insignificant under all investigated growth medium concentrations.

Bioconsolidation strategies for preservation of stone monuments and works of art require knowledge of the biomineral's morphology in liquid media for each isolate. Such information could assist in distinguishing bioprecipitation from inorganic formation of calcium carbonate in an *in situ* application. Furthermore, sufficient morphological data are useful in determining the potential of a micro-organism for use in such preservation strategies. Marble samples from BP2x and BP4x liquid cultures analysed with scanning electron microscopy revealed similar morphologies at both concentrations for each isolate (Table 2).

To elucidate the biomineral's morphology and its polymorph correspondence, samples of the newly formed calcium carbonate filtered from the medium for each isolate were analysed with FT-IR and XRD. Furthermore, these samples were also examined under the electron microscope. Electron microscopy photographs (data not shown) revealed a biomineralization morphology similar to the one observed in marble samples. No precipitation was detected on blank experiments regardless of the duration of incubation and medium concentration. Morphology of blank marble samples is shown in Fig. 2a–c. The different orientations of the calcium carbonate filaments that comprise the substrate are presented under low magnification (Fig. 2a). Increased resolution elucidates marble fragments due to the substrate's cutting process (Fig. 2b–c). Fragments show a polyhedral morphology (Fig. 2c) discerning them from biomineralization. Sterilization of the marble did not induce any considerable fragmentation of the surface.

Pantoea sp. PR biomineral consisted of scattered large spherical assemblies and a smoother novel surface covering the marble (Fig. 2d). Mineralized bacteria created the large spherical morphologies by nucleating in larger numbers compared with the rest of the marble surface. The sphere's surface and the novel layer covering the rest of the substrate were consisted of biomineralized bacterial cells as shown in Fig. 2e. FT-IR analysis showed that samples corresponded to vaterite.

Pseudomonas chlororaphis T5_L covered the surface of the marble sample with micritic spherical morphologies (Fig. 2f). Biomineralized thin rods could be observed scattered between the spheres suggesting that these morphologies were developed in close relation to microbial utilization of calcium and induction of bioprecipitation.

Bacillus licheniformis T10 covered the substrate with a novel vaterite layer creating an uneven biomineral surface (Fig. 2g), consisted of mineralized bacteria of a size corresponding with the micro-organism's dimensions (Fig. 2h). On the contrary, *B. cereus* C showed a mixture of vaterite and calcite morphologies in different areas of the same sample. In Fig. 3i,j, the different morphologies are presented. Vaterite biomineral showed itself as biomineralized bacteria (Fig. 2i). On the contrary, crystals assembled together creating dendritic morphology (Castanier *et al.* 1999; Ben Chekroun *et al.* 2004) corresponded to calcite (Fig. 2j).

Finally, *C. metallidurans* B_MPEZ succeeded in covering the marble surface (Fig. 2k) with morphologies consisted of micritic spheres, short rods and combinations of spheres and rods (Fig. 2l).

Further experiments were conducted in BP2x media for each micro-organism with samples obtained every 5 days for 15- or 20-day tests depending on their viability. Controls without micro-organisms were simultaneously analysed; no inorganic precipitation of calcium carbonate was observed nor was there any contamination due to the long incubation period. Figure 3a shows the weight increase during these tests. Negative values of blank samples correspond to minor dissolution of the marble surface in the experimental solution. *Pantoea* sp. PR provided promising results regarding biomineralization on marble surfaces with a gradual increase in sample weight and coverage. Full coverage of the marble substrate with a layer of light yellow-coloured vaterite was detected after 10 days. Loss of the micro-organisms' viability was observed after 15 days, affecting the morphology of the final sample, where filaments of the biomineral adhered to the marble's surface. *Bacillus cereus* C showed the highest weight increase. The solution of the medium was brown, affecting the calcium carbonate's colour and presenting a considerable aesthetic difference to the naked eye. *Bacillus licheniformis* T10 did not achieve considerable biomineralization. Despite its detectable weight increase, vaterite was brown in colour due to the bacterial pigments in the solution observed after the third day. Both *Bacillus* strains remained viable until the end of the experiments (20 days).

Pseudomonas chlororaphis T5_L covered the entire surface of the marble with a smooth coating of white-green crystals after 10 days. The colour gradually changed to

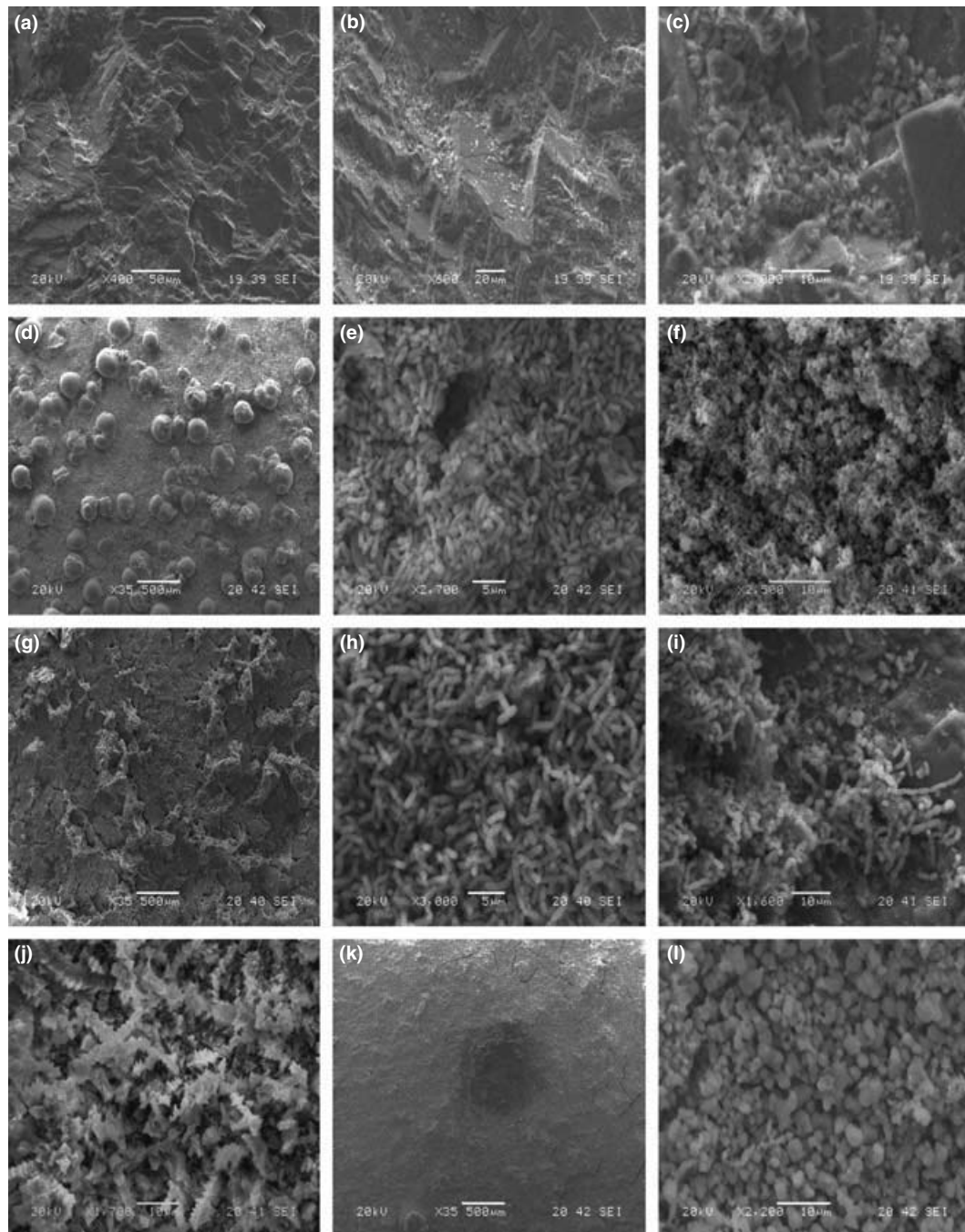
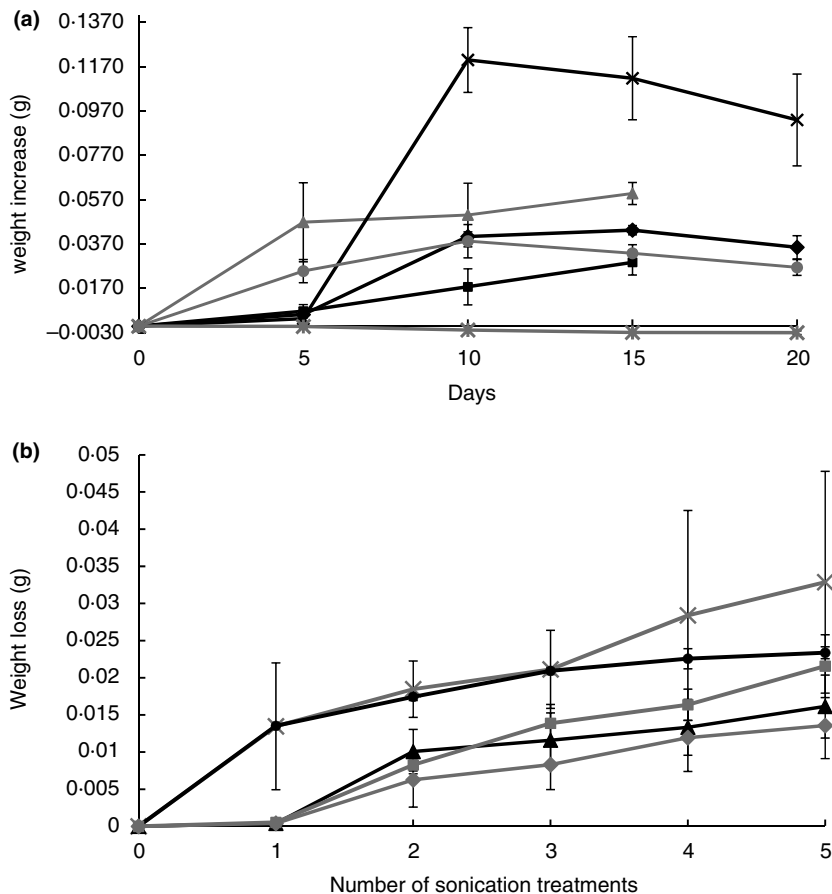


Figure 2 Biomineral morphologies induced by isolated bacteria. (a–c) blank marble; (d, e) *Pantoea* sp. PR: a general view under low magnification of the marble surface is presented in (d) where both large spherical bacterial assemblies and a layer of biomineralized bacteria coexist. Magnification of the biomineralized bacteria is shown in (e); (f) *P. chlororaphis* T5_L novel biomineral surface constituted of micritic spheres; (g, h) *B. licheniformis* T10: general view of the marble biomineralized surface in (g) and biomineralized bacterial rods consisting of the novel surface in (h); (i, j) *B. cereus* C showing different morphologies on different areas of the same sample that correspond to vaterite as biomineralized cells of rod shape (i). Gradual expansion of the novel biomineral covers the marble surface. Uncovered area is at the right edge of the picture. Calcite (j) was observed creating dentritic structures; and (k, l) *C. metallidurans* B_MPEZ: overview of the marble sample covered completely from the novel biomineral (k), whose morphology is spheres of different diameter (l).

Figure 3 (a) Graphical presentation of weight increase from each isolate during the 20 or 15 or 20-day experiments in BP2x media. Micro-organisms: (■) *B. licheniformis* T10, (▲) *Pantoea* sp. PR, (x) *B. cereus* C, (●) *C. metallidurans* B_MPEZ, (◆) *P. chlororaphis* T5_L and (*) blank marble; (b) Weight loss of biomineralized marble samples of the corresponding micro-organisms during sonication treatment. Samples selected for sonication treatment correspond to those with the highest weight increase through the experimental period, namely: *C. metallidurans* B_MPEZ from day-10, *Pantoea* sp. PR from day-15, *B. licheniformis* T10 from day-15 and *P. chlororaphis* T5_L from day-15. *B. cereus* C was not tested as this strain has already been used by another research group (Castanier et al. 1995). Micro-organisms: (◆) *P. chlororaphis* T5_L, (■) *B. licheniformis* T10, (▲) *Pantoea* sp. PR, (●) *C. metallidurans* B_MPEZ and (x) blank marble. Standard deviation bars are shown.



grey-green due to consecutive biomineral layers. The micro-organism remained viable until the end of the test.

Finally, *C. metallidurans* B_MPEZ provided gradual substrate coverage with a uniform white-beige varietal showing an optimum weight increase after 10 days. The colour of the solution was white throughout the experiment, and the micro-organism remained viable.

The pH of the final solution in the experiments was 9.0–9.3 which assisted in the bioprecipitation of calcium carbonate. Acetate was exhausted from all micro-organisms by the tenth day of the experiments. A decrease in dissolved calcium was observed only after initiation of acetate assimilation, which kept diminishing until the fifteenth day of the experiments.

Samples were subjected to sonication treatment. Sonication forces act upon all sides of the marble sample, while the surface with the new calcium carbonate layer was the one facing the medium (4 × 1 cm) during biomineralization experiments. Therefore, the overall weight loss does not correspond solely to the latter surface. Biomineralized marble substrates showed a detectable decrease in weight loss compared with blanks proving that the new calcium carbonate layer on the substrate was coherent enough to

withstand sonication forces and protect the marble underneath (Fig. 3b). *Pseudomonas chlororaphis* T5_L presented the highest resistance to sonication forces compared with blank marble. *Pantoea* sp. PR came second, while *C. metallidurans* B_MPEZ weight loss was similar to the decrease in blank marble. *Bacillus licheniformis* T10 (used for comparison purposes due to its reported biomineralization abilities) was in the middle of the weight loss under 5 consecutive 5 min sonication tests. In all cases, the overall weight loss was lower than the amount of biomineral deposited on the substrate's surface.

Discussion

Evaluation of a biomineral layer on stone substrate by different isolates was performed. Pentelic marble was selected as the test template because it has been the construction material of choice for some of the most renowned ancient monuments in Greece (e.g. the Parthenon). Monuments and statues from ancient Athens and other locations such as Delphi and Delos were constructed with Pentelic marble or marbles with similar physicochemical characteristics (Parian marble from

Paros Island). One of their main characteristics is their low to negligible porosity. It is possible that this may be one of the factors why those monuments still stand in an open air environment. Low porosity provides a hostile environment for bacteria due to the fact that there are no sites for easy colonization.

Appropriate identification of all isolates was achieved by the isolation and sequencing of almost the full length of 16S rDNA as was advised previously (Rappé and Giovannoni 2003). API tests that were used to verify the phenotypic characteristics of the micro-organisms proved similar according to the literature for each micro-organism. Nevertheless, identification of the species level varied depending on the isolate. *Bacillus*, *Paenibacillus* and *Cupriavidus metallidurans* B_MPEZ could be identified at the species level, but *Pantoea* (species level) and *Pseudomonas* (subspecies level) isolates with very close biochemical and phenotypical characteristics could not be differentiated. It is preferable to initially perform genetic identification, followed by accurate biochemical tests.

Pantoea sp. PR could not be unambiguously differentiated in the species level among *P. agglomerans* and a recent novel isolate *P. vagans* (Brady *et al.* 2009). Regardless of this, *P. agglomerans* (Gavini *et al.* 1989) is a micro-organism isolated from plants, soil, water and humans. It is considered a plant pathogen (Brady *et al.* 2008), but its antagonistic activity against other plant pathogens resulted in its application as a biological control agent (Nunes *et al.* 2002; Jin *et al.* 2003; Völksch *et al.* 2009). In addition, it has been linked to human nosocomial infections (Brady *et al.* 2008; Völksch *et al.* 2009). Nevertheless, its biotechnological applicability does not restrict its evaluation against other applications, as long as precautions are taken (Table 1). Biochemical differences of the isolate in this study and those reported in the literature outlined that a more comprehensive survey should be carried out in case such a micro-organism is selected for further investigation. It is the first time, to the best of our knowledge, that such an isolate has been evaluated for its ability to induce calcium carbonate precipitation.

Cupriavidus metallidurans B_MPEZ (formerly *Ralstonia*) was isolated from the surface of exposed marble in the Penteli Mountain, a site that is not so far regarded as heavily polluted by heavy metals. This confirmed the fact that *C. metallidurans* is a micro-organism that may be found in different environments, although initially isolated from industrial sites in Belgium during an excavation for metal-resistant bacteria (Goris *et al.* 2001). Its ability to withstand and survive in biotopes suffering from high heavy metal concentrations resulted in its full genome sequence (Janssen *et al.* 2010) and its ongoing research regarding the micro-organism's exploitation in bioremediation applications. Its ability to proliferate under

toxic conditions of heavy metals could prove to become an advantage for monuments in urban environment. *Cupriavidus metallidurans* B_MPEZ provided coverage of the substrate with an acceptable aesthetic effect for the naked eye and presented a uniform surface.

Bacillus cereus has been applied by Le Métayer-Levrel *et al.* (1999), who were among the first to develop a methodology named Calcite Bioconcept technique (Adolphe *et al.* 1990) for monument protection. After its identification, the isolate was utilized in our experiments during screening to verify the ability of the proposed growth medium to assist in biologically induced calcium carbonate precipitation. In general, *B. cereus* and *B. licheniformis* have been detected in numerous monument sites worldwide (Zanardini *et al.* 1997; Laiz *et al.* 1999; Videla *et al.* 2000; Gorbushina *et al.* 2004; McNamara *et al.* 2006; Nuhoglu *et al.* 2006; Scheerer *et al.* 2009; Pepe *et al.* 2010) and cave environments (Baskar *et al.* 2009; Banks *et al.* 2010).

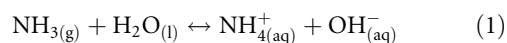
Pseudomonas species have been detected as part of the microflora in caves with *Bacillus* species (Laiz *et al.* 1999; Groth *et al.* 2000), on stone monuments (Urzi *et al.* 1999; Videla *et al.* 2000; Gorbushina *et al.* 2002; McNamara *et al.* 2006; Jimenez-Lopez *et al.* 2007; Scheerer *et al.* 2009; Jroundi *et al.* 2010) and wall paintings (Gurtner *et al.* 2000). Their identification was also reported on palaeolithic paintings with *Ralstonia* (Schabereiter-Gurtner *et al.* 2002). Biotechnological approaches have already used *Pseudomonas* endogenous capabilities for bioremediation of frescoes (Ranalli *et al.* 2005), and Zamarreño *et al.* (2009) presented the potentials of *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas aeruginosa*. Our isolate promoted biomineralization of calcium carbonate and was the isolate that resisted most in sonication forces having the lowest weight loss (Fig. 3b).

To develop an alternative medium, a nonfastidious nutrient solution with the least components possible was considered. An additional issue that should be considered further is that the colour of the solution varied from light to dark yellow depending on medium concentration. This had an adverse effect on some isolates with colour transferring to the biomineral, especially in higher medium concentrations. Inducing colour differentiations is not desirable, unless the micro-organism inevitably produces pigments which may be exploited in bioconservation interventions similarly to Le Métayer-Levrel *et al.* (1999).

Most of the isolates induced calcium carbonate precipitation establishing themselves as potential candidates for bioconsolidation methodologies (Zamarreño *et al.* 2009). The time frame in which bioprecipitation was detected differed among isolates presenting their different metabolic response through the diauxic effect of acetate. *B. cereus* C and *P. chlororaphis* T5_L required a longer period to trigger acetate assimilation. Thus, calcium

carbonate precipitation was detected after the fifth day of incubation. On the contrary, *Pantoea* sp. PR, *C. metallidurans* B_MPEZ and to a lesser extent *B. licheniformis* T10 were able to utilize acetate earlier showing a weight increase from the fifth day (Fig. 3a). Despite the delay, *P. chlororaphis* T5_L biomineral proved to confront sonication forces with the minimum overall weight loss compared with the rest of the isolates. *C. metallidurans* B_MPEZ provided the least protection.

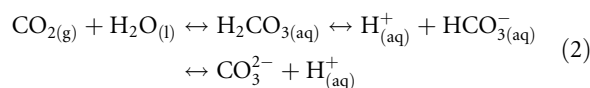
In this work, heterotrophs and their oxidative deamination of amino acids metabolic pathway were exploited. This pathway, along with the degradation of urea, is generally utilized to achieve the prerequisites for microbial carbonate precipitation: pH increase and CO_3^{2-} production. For a financially feasible method, selective media are not favourable, although they could be more efficient in the case of a specific bacterium. Therefore, the use of yeast extract and peptones is promoted to provide the appropriate elements for enhancement of bacterially induced mineralization (Boquet *et al.* 1973; Adolphe *et al.* 1990; Castanier *et al.* 1995; Rodriguez-Navarro *et al.* 2003). From the nitrogen sources investigated, BP provided the most satisfactory results. Despite being less nutritious than yeast extract, it facilitated a pH increase close to 8 without the formation of a cloudy solution. Calcium remained soluble and did not precipitate requiring filtration. Microbial metabolism facilitated pH increase to promote biomineralization. The pH increase was assisted by the oxidative deamination of BPs components and ammonium release (Gottschalk 1985; Castanier *et al.* 1999; Hammes and Verstraete 2002).



Acetate could hinder this pH increase by acting as a buffer. Its assimilation eliminated this characteristic allowing solution pH to reach values of 9.0–9.3. The creation of an alkaline environment has an impact when carbonate becomes part of the equation which is produced simultaneously during degradation of proteins and peptides (Gottschalk 1985).

In the medium applied in this study, glucose was omitted to avoid the production of acids that could dissolve the substrate or even the newly formed calcium carbonate. It has been reported that glucose as a supplement of a peptone solution inhibited biomineralization (Portillo *et al.* 2009). Acetate, an additional carbon source in the medium, is directly mineralized to carbon dioxide (assimilation of organic acids) by numerous aerobic bacteria, thus boosting microbially induced calcium carbonate precipitation (Portillo *et al.* 2009). This was observed in all our isolates. Acetate is assimilated from heterotrophs by integrating the compound in the tricarboxylic acid

cycle (Braissant *et al.* 2002) assisting in their proliferation – cell density increase (diauxic effect) and higher CO_2 concentration. Consequently, their microenvironment close to the cell membrane differs from the increased production of carbon dioxide which, in aqueous solution, transforms to carbonate ions.



Equation (1) presents the pathway for pH increase. This reduces the concentration of H^+ produced in eqn (2) shifting the equilibrium towards carbonates. In such an alkaline pH, calcium carbonate formation is favoured. Under our experimental conditions, increased cell density speeded up the process via its metabolic products and cell membrane nucleation sites. This further affected the final polymorph that precipitated, which in this work, was mainly vaterite.

Vaterite is one of the three anhydrous polymorphs of calcium carbonate with aragonite and calcite comprising the rest. Vaterite transforms to the most stable calcite under ambient conditions of pressure and temperature (Suzuki *et al.* 2006). Samples analysed with FT-IR, XRD and SEM showed that polymorphism could correlate with the morphology of the biomineral. Calcite was observed in solid media and in low liquid medium concentrations. Stability of calcite under similar experimental conditions has been presented by other research groups in different media (Buczynski and Chafetz 1990; Tiano *et al.* 1999; El Kahoui *et al.* 2000; Hammes *et al.* 2003; Ben Chekroun *et al.* 2004; Cacchio *et al.* 2004; Dick *et al.* 2006; Baskar *et al.* 2009). The slow growth rate of micro-organisms (solid and liquid media) and diffusion of nutrients and metabolic products through the colony promoted the formation of calcite. This time frame accommodated the transformation of any intermediate biomineral to the most stable polymorph, or directly to its final formation. Calcite morphology, presented in Fig. 2j, is similar to the ones presented by Ben Chekroun *et al.* (2004). On the contrary, vaterite was consistently detected with the increase in nutrient concentration (Table 2). When bacteria were grown in solution, vaterite presented a consistent spherical morphology of various sizes, including structures that corresponded to bacterial dimensions (Table 2, Fig. 2). Analogous morphologies have been reported for different micro-organisms (Rodriguez-Navarro *et al.* 2003, 2007; Ben Chekroun *et al.* 2004; De Muyenck *et al.* 2008a,b, 2010b). Spherical morphologies can be inferred to be vaterite, while rhombohedral morphology denotes calcite (Jimenez-Lopez *et al.* 2008). Constant detection of vaterite in higher concentrations in liquid (BP2× and 4×) media

outlines that nutrient surplus and increased cell growth promoted vaterite's stability. High cell growth provided the template (cell walls) where calcium cations imminently interacted with negatively charged cell walls creating a saturated environment regarding calcium. Simultaneously, increased metabolism provided the appropriate pH increase, which further assists in the deprotonation of acidic moieties of the cell walls and carbonate production. The latter, once diffused out of the cell coordinated with calcium for the formation of the biomineral. Owing to nonequilibrium conditions (increased pH, calcium and carbonate concentration) close to the cells, the Ostwald's rule of stages (Mann 2001) is, in effect, kinetically favouring vaterite. Vaterite's transformation to the most stable calcite is inhibited by the incorporation of organic compounds that became entangled during precipitation (Xiao *et al.* 2010; Natoli *et al.* 2010) in close vicinity of the cells or from the cell wall itself. Our results showed that vaterite morphology was observed as spheres of various sizes always closely related to biomineralized bacteria. Finally, XRD and FT-IR analysis of samples after 1 year of isolation showed the same spectra as the ones presented in Fig. 1.

The nutrient medium developed in this work presents similarities to the ones previously reported by other groups (Rodriguez-Navarro *et al.* 2003; De Muynck *et al.* 2010b), that is, calcium and acetate concentration and nitrogen source. There could be an effect on mineralogy based on the nutrient's components. For example, we did not use a buffer solution, inducing the formation of supersaturated conditions and finally to vaterite precipitation, similarly to Rodriguez-Navarro *et al.* (2003). Acetate is an important factor of bacterial growth under our conditions and assists in the final morphology of the precipitate as reported by De Muynck *et al.* 2008a. Further investigation regarding our isolates to delineate the effect of the growth components is currently being investigated.

Cupriavidus metallidurans B_MPEZ, *Pantoea* sp. PR and *Pseudomonas chlororaphis* T5_L could be further investigated to optimize biomineralization conditions. The results presented here showed that each microorganism has its own advantages and disadvantages regarding biomineralization efficiency, coherence to the substrate, colour impact on stone and biomineral morphology. A more detailed investigation regarding the time for biomineralization, nutrient assimilation and calcium carbonate bioprecipitation under conditions that resemble the ones *in situ* is currently under way.

Acknowledgements

This work was supported by the Ministry of National Education and Religious Affairs (Community Support

Framework 2000–2006) under the Pythagoras II research programme. The project is co-funded by the European Social Fund (75%) and National Resources (25%) We would like to thank Dr. Aglaia Antoniou and Katerina Skaraki for their guidance and assistance in molecular biology experiments and Dr. Konstantina Papadopoulou for her assistance in sonication experiments.

References

- Adolphe, J.-P., Loubière, J.-F., Paradas, J. and Soleilhavoup, F. (1990) Procédé de traitement biologique d'une surface artificielle. European patent No. 90400697.0 (after French patent No. 8903517, 1989).
- Bang, S.S., Galinat, J.K. and Ramakrishnan, V. (2001) Calcite precipitation induced by polyurethane-immobilized *Bacillus pasteurii*. *Enzyme Microb Technol* **28**, 404–409.
- Banks, E.D., Taylor, N.M., Gulley, J., Lubbers, B.R., Giarrizzo, J.G., Bullen, H.A., Hoehler, T.M. and Barton, H.A. (2010) Bacterial calcium carbonate precipitation in cave environments: a function of calcium homeostasis. *Geomicrobiol J* **27**, 444–454.
- Baskar, S., Baskar, R., Lee, N. and Theophilus, P.K. (2009) Speleothems from Mawsmai and Krem Phyllut caves, Meghalaya, India: some evidences on biogenic activities. *Environ Geol* **57**, 1169–1186.
- Brady, C., Cleenwerck, I., Venter, S., Vancanneyt, M., Swings, J. and Coutinho, T. (2008) Phylogeny and identification of *Pantoea* species associated with plants, humans and the natural environment based on multilocus sequence analysis (MLSA). *Syst Appl Microbiol*, **31**, 447–460.
- Ben Chekroun, K., Rodriguez-Navarro, C., Gonzalez-Muñoz, M.T., Arias, J.M., Cultrone, G. and Rodriguez-Gallego, M. (2004) Precipitation and growth morphology of calcium carbonate induced by *Myxococcus xanthus*: implications for recognition of bacterial carbonates. *J Sediment Res* **74**, 868–876.
- Boquet, E., Boronat, A. and Ramos-Comerzana, A. (1973) Production of calcite (calcium carbonate) crystals by soil bacteria is a general phenomenon. *Nature* **246**, 527–529.
- Brady, C.L., Venter, S.N., Cleenwerck, I., Engelbeen, K., Vancanneyt, M., Swings, J. and Coutinho, T.A. (2009) *Pantoea vagans* sp. nov., *Pantoea eucalypti* sp. nov., *Pantoea deleyi* sp. nov., *Pantoea anthophila* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **59**, 2339–2345.
- Braissant, O., Verrecchia, E.P. and Eragno, M. (2002) Is the contribution of bacteria to terrestrial carbon budget greatly underestimated? *Naturwissenschaften* **89**, 366–370.
- Buczynski, C. and Chafetz, H.S. (1990) Habit of bacterially induced precipitates of calcium carbonate and the influence of medium viscosity on mineralogy. *J Sediment Res* **61**, 226–233.
- Cacchio, P., Contento, R., Ercole, C., Cappuccio, G., Preite Martinez, M. and Lepidi, A. (2004) Involvement of

- microorganisms in the formation of carbonate speleothems in the Cervo Cave (L' Aquila-Italy). *Geomicrobiol J* **12**, 497–509.
- Castanier, S., Levrel, G. and Loubiere, J.-F. (1995) Nouvelles compositions pour mortier biologique, procede de recouvrement d'une surface ou de comblement d'une cavite a l'aide des compositions. French patent No. 9505861.
- Castanier, S., Le Métayer-Levrel, G. and Jean-Pierre, P. (1999) Ca-carbonates precipitation and limestone genesis – the microbiogeologist point of view. *Sediment Geol* **126**, 9–23.
- De Muynck, W., Cox, K., De Belie, N. and Verstraete, W. (2008a) Bacterial carbonate precipitation as an alternative surface treatment for concrete. *Constr Build Mater* **22**, 875–885.
- De Muynck, W., Debrouwer, D., De Belie, N. and Verstraete, W. (2008b) Bacterial carbonate precipitation improves the durability of cementitious materials. *Cement Concrete Res* **38**, 1005–1014.
- De Muynck, W., De Belie, N. and Verstraete, W. (2010a) Microbial carbonate precipitation in construction materials: a review. *Ecol Eng* **36**, 118–136.
- De Muynck, W., Verbeken, K., De Belie, N. and Verstraete, W. (2010b) Influence of urea and calcium dosage on the effectiveness of bacterially induced carbonate precipitation on limestone. *Ecol Eng* **36**, 99–111.
- Delétoile, A., Decré, D., Courant, S., Passet, V., Audo, J., Drimont, P., Arlet, G. and Brisse, S. (2009) Phylogeny and identification of *Pantoea* species and typing of *Pantoea agglomerans* strains by multilocus gene sequencing. *J Clin Microbiol* **47**, 300–310.
- Dick, J., De Wind, W., De Graef, B., Saveyn, H., Van der Meeren, P., De Belie, N. and Verstraete, W. (2006) Bio-deposition of a calcium carbonate layer on degraded limestone by *Bacillus* species. *Biodegradation* **17**, 357–367.
- Douglas, S. (2005) Mineralogical footprints of microbial life. *Am J Sci* **305**, 503–525.
- Ehrlich, H.L. (1998) Geomicrobiology: its significance for geology. *Earth Sci Rev* **45**, 45–60.
- El Kahoui, R., Adolphe, J.-P. and Daudon, M. (2000) Identification of early *Bacillus*-induced crystals *in vitro* using Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Microb Environ* **15**, 161–171.
- Gadd, G.F. (2010) Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation. *Microbiology* **156**, 609–643.
- Gavini, F., Mergaert, J., Beji, A., Mielcarek, C., Izald, D., Kersters, K. and De Ley, J. (1989) Transfer of *Enterobacter agglomerans* (Beijerinck 1888) Ewing and Fife 1972 to *Pantoea* gen. nov. as *Pantoea agglomerans* comb. nov. and description of *Pantoea dispersa* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* **39**, 337–345.
- Gorbushina, A.A., Lyalikova, N.N., Vlasov, Yu.D. and Khizhnyak, T.V. (2002) Microbial communities on the monuments of Moscow and St. Petersburg: biodiversity and trophic relations. *Microbiology* **71**, 350–356.
- Gorbushina, A.A., Heyrman, J., Dornieden, T., Gonzalez-Delvalle, M., Krumbein, W.E., Laiz, L., Petersen, K., Saiz-Jimenez, C. *et al.* (2004) Bacterial and fungal diversity and biodeterioration problems in mural painting environments of St. Martins church (Greene-Kreienens, Germany). *Int Biodeter Biodegr* **53**, 13–24.
- Goris, J., De Vos, P., Coenye, T., Hoste, B., Janssens, D., Brim, H., Diels, L., Mergeay, M. *et al.* (2001) Classification of metal-resistant bacteria from industrial biotopes as *Ralstonia campinensis* sp. nov., *Ralstonia metallidurans* sp. nov. and *Ralstonia basileensis* Steinle *et al.* 1998 emend. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**, 1773–1782.
- Gottschalk, G. (1985) *Bacterial Metabolism*, 2nd edn. New York: Springer-Verlag.
- Groth, I., Schumann, P., Laiz, L., Sanchez-Moral, S., Cañaveras, J.C. and Saiz-Jimenez, C. (2000) Geomicrobiological study of the Grotta dei Cervi, Porto Badisco, Italy. *Geomicrobiol J* **18**, 241–258.
- Gurtner, C., Heyrman, J., Piñar, G., Lubitz, W., Swings, J. and Rölleke, S. (2000) Comparative analyses of the bacterial diversity of two different biodeteriorated wall paintings by DGGE and 16S rDNA sequence analysis. *Int Biodeter Biodegr* **46**, 229–239.
- Hammes, F. and Verstraete, W. (2002) Key roles of pH and calcium metabolism in microbial carbonate precipitation. *Rev Environ Sci Biotechnol* **1**, 3–7.
- Hammes, F., Boon, N., de Villiers, J., Verstraete, W. and Siciliano, S.D. (2003) Strain-specific ureolytic microbial calcium carbonate precipitation. *Appl Environ Microbiol* **69**, 4901–4909.
- Janssen, P.J., Van Houdt, R., Moors, H., Monsieurs, P., Morin, N., Michaux, A., Benotmane, M.A., Leys, N. *et al.* (2010) The complete genome sequence of *Cupriavidus metallidurans* strain CH34, a master survivalist in harsh and anthropogenic environments. *PLoS ONE* **5**, e10433. doi:10.1371/journal.pone.0010433.
- Jimenez-Lopez, C., Rodriguez-Navarro, C., Piñar, G., Carrillo-Rosúa, F.J., Rodriguez-Gallego, M. and Gonzalez-Muñoz, M.T. (2007) Consolidation of degraded ornamental porous limestone stone by calcium carbonate precipitation induced by the microbiota inhabiting the stone. *Chemosphere* **68**, 1929–1936.
- Jimenez-Lopez, C., Iroundi, F., Pascolini, C., Rodriguez-Navarro, C., Piñar-Larrubia, G., Rodriguez-Gallego, M. and Gonzalez-Muñoz, M.T. (2008) Consolidation of quarry calcarenite by calcium carbonate precipitation induced by bacteria activated among the microbiota inhabiting the stone. *Int Biodeter Biodegr* **62**, 352–363.
- Jin, M., Liu, L., Wright, S.A.I., Beer, S.V. and Clardy, J. (2003) Structural and functional analysis of Pantocin A: an antibiotic from *Pantoea agglomerans* discovered by heterologous expression of cloned genes. *Angew Chem Intl Edit* **42**, 2898–2901.

- Jroundi, F., Fernández-Vivas, A., Rodríguez-Navarro, C., Bedmar, E.J. and Gonzalez-Muñoz, M.T. (2010) Bioconservation of deteriorated monumental calcarenite stone and identification of bacteria with carbonatogenic activity. *Microb Ecol* **60**, 39–54.
- Kimura, M. (1980) A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* **16**, 111–120.
- Laiz, L., Groth, I., Gonzalez, I. and Saiz-Jimenez, C. (1999) Microbiological study of the dripping waters in Altamira cave (Santillana del Mar, Spain). *J Microbiol Meth* **36**, 129–138.
- Le Métayer-Levrel, G., Castanier, S., Orial, G., Loubière, J.-F. and Perthuisot, J.-P. (1999) Application of bacterial carbonatogenesis to the protection and regeneration of limestones in buildings and historic patrimony. *Sediment Geol* **126**, 25–34.
- Logan, N.A. and De Vos, P. (2009) Genus I. *Bacillus* Cohn 1872, 174AL. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edn. ed. De Vos, P., Garrity, G.M., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A., Schleifer, K.-H. and Whitman, W.B., Vol. 3, pp. 21–128, New York: Springer.
- Mann, S. (2001) *Bioinorganic Materials Chemistry*. New York: Oxford University Press.
- McNamara, C.J., Perry, T.D., Bearce, K.A., Hernandez-Duque, G. and Mitchell, R. (2006) Epilithic and endolithic bacterial communities in limestone from a Maya archaeological site. *Microb Ecol* **51**, 51–64.
- Natoli, A., Wiens, M., Schröder, H.-C., Stifanic, M., Batel, R., Soldati, A.L., Jacob, D.E. and Müller, W.E.G. (2010) Bio-vaterite formation by glycoproteins from freshwater pearls. *Micron* **41**, 359–366.
- Nuhoglu, Y., Oguz, E., Uslu, H., Ozbek, A., Ipekoglu, B., Ocak, I. and Hasenekoglu, I. (2006) The accelerating effects of the microorganisms on biodeterioration of stone monuments under air pollution and continental-cold climatic condition in Erzurum, Turkey. *Sci Total Environ* **364**, 272–283.
- Nunes, C., Usall, J., Teixidó, N., Fons, E. and Viñas, I. (2002) Post-harvest biological control by *Pantoea agglomerans* (CPA-2) on golden delicious apples. *J Appl Microbiol* **92**, 247–255.
- Peix, A., Valverde, A., Rivas, P., Igual, J.M., Ramírez-Bahena, M.-H., Mateos, P.F., Santa-Regina, I., Rodríguez-Barrueco, C. et al. (2007) Reclassification of *Pseudomonas aurantiaca* as a synonym of *Pseudomonas chlororaphis* and proposal of three subspecies, *P. chlororaphis* subsp. *chlororaphis* subsp. nov., *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens* subsp. nov., comb. nov. and *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* subsp. nov., comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**, 1286–1290.
- Pepe, O., Sannino, L., Paloba, S., Anastasio, M., Blaiotta, G., Villani, F. and Moschetti, G. (2010) Heterotrophic microorganisms in deteriorated medieval wall paintings in southern Italian churches. *Microbiol Res* **165**, 21–32.
- Portillo, M.C., Porca, E., Cuezva, S., Canaveras, J.C., Sanchez-Moral, S. and Gonzalez, J.M. (2009) Is the availability of different nutrients a critical factor for the impact of bacteria on subterranean carbon budgets? *Naturwissenschaften* **96**, 1035–1042.
- Ranalli, G., Alfano, G., Belli, C., Lustratom, G., Colombini, M.P., Bonaduce, I., Zanardini, E., Abbruscato, P. et al. (2005) Biotechnology applied to cultural heritage: bioremediation of frescoes using viable bacterial cells and enzymes. *J Appl Microbiol* **98**, 73–83.
- Rappé, M.S. and Giovannoni, S.J. (2003) The uncultured microbial majority. *Annu Rev Microbiol* **57**, 369–394.
- Rodríguez-Navarro, C., Rodríguez-Gallego, M., Chekroun, K.B. and Gonzalez-Muñoz, M.T. (2003) Conservation of ornamental stone by *Myxococcus xanthus* – induced carbonate biomineralization. *Appl Environ Microbiol* **64**, 2182–2193.
- Rodríguez-Navarro, C., Jimenez-Lopez, C., Rodríguez-Navarro, A., Gonzalez-Muñoz, M.T. and Rodríguez-Gallego, M. (2007) Bacterially mediated mineralization of vaterite. *Geochim Cosmochim Acta* **71**, 1197–1213.
- Saitou, N. and Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstruction of phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**, 406–425.
- Sarda, D., Choonia, H.S., Sarode, D.D. and Lele, S.S. (2009) Biocalcification by *Bacillus pasteurii* urease: a novel application. *J Ind Microbiol Biot* **36**, 1111–1115.
- Schabereiter-Gurtner, C., Saiz-Jimenez, C., Piñar, G., Lubitz, W. and Rölleke, S. (2002) Altamira cave Paleolithic paintings harbor partly unknown bacterial communities. *FEMS Microbiol Lett* **211**, 7–11.
- Scheerer, S., Ortega-Morales, O. and Gaylarde, C. (2009) Microbial deterioration of stone monuments – An updated overview. *Adv Appl Microbiol* **66**, 97–139.
- Sung-Jin, P., Park, Y.-M., Chun, W.-W., Kim, W.-J. and Gjim, S.-Y. (2010) Calcite-forming bacteria for compressive strength improvement in mortar. *J Microbiol Biotechnol* **20**, 782–788.
- Suzuki, M., Nagasawa, H. and Kogure, T. (2006) Synthesis and structure of hollow calcite particles. *Cryst Growth Des* **6**, 2004–2006.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. and Kumar, S. (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* **28**, 2731–2739.
- Tiano, P., Biagiotti, L. and Mastromei, G. (1999) Bacterial bio-mediated calcite precipitation for monumental stones conservation: methods of evaluation. *J Microbiol Meth* **36**, 139–145.
- Urzi, C., Garcia-Valles, M., Vendrell, M. and Pernice, A. (1999) Biomineralization processes on rock and

- monument surfaces observed in field and in laboratory conditions. *Geomicrobiol J* **16**, 39–54.
- Van Tittelboom, K., De Belie, N., De Muynck, W. and Verstraete, W. (2010) Use of bacteria to repair cracks in concrete. *Cement Concrete Res* **40**, 157–166.
- Vandamme, P. and Coenye, T. (2004) Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: a tale of lost and found. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**, 2285–2289.
- Vanechoutte, M., Kämpfer, P., De Baere, T., Falsen, E. and Verschraegen, G. (2004) *Wautersia* gen. nov., a novel genus accommodating the phylogenetic lineage including *Ralstonia eutropha* and related species, and proposal of *Ralstonia* [*Pseudomonas*] *syzygii* (Roberts *et al.* 1990) comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**, 317–327.
- Videla, H.A., Guiamet, P.S. and Gomez de Saravia, S. (2000) Biodeterioration of Mayan archaeological sites in the Yucatan Peninsula, Mexico. *Int Biodeter Biodegr* **46**, 335–341.
- Völksch, B., Thon, S., Jacobsen, I.D. and Gube, M. (2009) Polyphasic study of plant- and clinic-associated *Pantoea agglomerans* strains reveals indistinguishable virulence potential. *Infect Genet Evol* **9**, 1381–1391.
- Xiao, J., Wang, Z., Tang, Y. and Tang, S. (2010) Biomimetic mineralization of CaCO₃ on a phospholipid monolayer: from an amorphous calcium carbonate precursor to calcite via vaterite. *Langmuir* **26**, 4977–4983.
- Zamarreño, D.V., Inkpen, R. and May, E. (2009) Carbonate crystals precipitated by freshwater bacteria and their use as a limestone consolidant. *Appl Environ Microbiol* **75**, 5981–5990.
- Zanardini, E., Andreoni, V., Borin, S., Cappitelli, F., Daffonchio, D., Talotta, P., Sorlini, C., Ranalli, G. *et al.* (1997) Lead-resistant microorganisms from red stains of marble of the Certosa of Pavia, Italy and use of nucleic acid-based techniques for their detection. *Int Biodeter Biodegr* **40**, 171–182.
- Zavarzin, G.A. (2002) Microbial geochemical calcium cycle. *Microbiology* **71**, 1–17.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Figure S1 Neighbor-joining phylogenetic tree of *Cupriavidus metallidurans* B_MPEZ based on 16S rDNA sequence comparisons. Bootstrap values were obtained with 1000 repetitions and presented as percentages on branches. *Alcaligenes faecalis*, *Burkholderia cepacia* and *Pandoraea apista* were utilized as outgroups.

Table S1 Phenotypic differences among the subspecies of *P. chlororaphis* compared with *P. chlororaphis* T5L isolate of this work.

Table S2 Phenotypic characteristics that distinguish *Pantoea agglomerans* and *Pantoea vagans* and their comparison to *Pantoea* sp. PR of this work.

Cupriavidus metallidurans biomineralization ability and its application as a bioconsolidation enhancer for ornamental marble stone

Markos I. Daskalakis · Antonis Magoulas · Georgios Kotoulas · Ioannis Katsikis · Asterios Bakolas · Aristomenis P. Karageorgis · Athena Mavridou · Danae Doulia · Fotis Rigas

Received: 25 January 2014 / Revised: 20 March 2014 / Accepted: 23 March 2014
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

Abstract Bacterially induced calcium carbonate precipitation of a *Cupriavidus metallidurans* isolate was investigated to develop an environmentally friendly method for restoration and preservation of ornamental stones. Biomineralization performance was carried out in a growth medium via a Design of Experiments (DoE) approach using, as design factors, the temperature, growth medium concentration, and inoculum concentration. The optimum conditions were determined with the aid of consecutive experiments based on response surface methodology (RSM) and were successfully validated thereafter. Statistical analysis can be utilized as a tool for screening bacterial bioprecipitation as it considerably reduced the experimental time and effort needed for bacterial evaluation. Analytical methods provided an insight to the biomineral

characteristics, and sonication tests proved that our isolate could create a solid new layer of vaterite on marble substrate withstanding sonication forces. *C. metallidurans* ACA-DC 4073 provided a compact vaterite layer on the marble substrate with morphological characteristics that assisted in its differentiation. The latter proved valuable during spraying minimum amount of inoculated media on marble substrate under conditions close to an in situ application. A sufficient and clearly distinguishable layer was identified.

Keywords *Cupriavidus metallidurans* · Biomineralization · Bioconsolidation · Vaterite · Stone · Response surface methodology (RSM)

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00253-014-5753-0) contains supplementary material, which is available to authorized users.

M. I. Daskalakis · A. Bakolas · D. Doulia · F. Rigas (✉)
School of Chemical Engineering,
National Technical University of Athens, 15700 Athens, Greece
e-mail: rigasf@central.ntua.gr

F. Rigas
e-mail: fotios.rigas@gmail.com

A. Magoulas · G. Kotoulas
Hellenic Centre for Marine Research, Herakleion, Crete, Greece

I. Katsikis
Institute of Geology and Mineral Exploration, Athens, Greece

A. P. Karageorgis
Hellenic Centre for Marine Research, 19013 Anavyssos, Greece

A. Mavridou
Department of Medical Laboratories, Technological Educational
Institute of Athens, Athens, Greece

Introduction

Calcium carbonate precipitation and its dissolution preserve the Earth's neutral conditions where most organisms thrive (Zavarzin 2002), and bacteria play an active role in both the processes (Douglas 2005). This process can be classified under the term biomineralization and categorized into biologically controlled mineralization (BCM), such as bone generation (Mann 2001), and biologically induced mineralization (BIM), where microorganisms influence modifications to their local environment, thereby promoting conditions that are conducive for extracellular calcium carbonate precipitation (Gadd 2010). In BIM, bacterial cell surfaces and outer structures considerably influence the final outcome of the mineralization process (De Muynck et al. 2010).

Calcium carbonate is the most abundant biomineral and one of the most thermodynamically stable within biological environments. It occurs in three non-hydrated crystalline polymorphs: calcite, aragonite, and vaterite, with the first being the

most stable and vaterite the least stable (Mann 2001). Calcite has a rhombohedral crystallographic unit cell, while vaterite is hexagonal (Sommerdijk and de With 2008).

The moment a stone is quarried, its deterioration is initiated due to its exposure in various environmental factors such as wind, sunlight, and temperature. The interaction of those with anthropogenic pollutants and microbes accelerates the process. Stone's pore network influences deterioration, with marble expected to be affected the least due to its lowest porosity. Nevertheless, ancient structures have been subjected in climate changes and their surface has been found to have deposits of inorganic and organic molecules and components of biological origin (Moropoulou et al. 1998, 2002; Scheerer et al. 2009). As long as these are removed, the remaining stone surface should be conserved and protected. A step forward in conservation is the implementation of bacteria in monument conservation by developing techniques that could circumvent the adverse effects of conventional treatments.

Bacteria are capable of inducing precipitation of calcium carbonate by influencing Ca^{2+} concentration, dissolved inorganic carbon concentration, pH, and the presence of nucleation sites (Hammes and Verstraete 2002). Since the early publication of Boquet et al. (1973), which proved biomineralization to be a general bacterial phenomenon, literature relating to microorganisms (Buczynski and Chafetz 1990; Cacchio et al. 2003; Parraga et al. 2004; Spadafora et al. 2010; Zhou and Chafetz 2009) or their components (Li et al. 2010) steadily increased.

Rodriguez-Navarro et al. (2003) suggested the use of *Myxococcus xanthus*, an abundant gram-negative soil bacterium. This microorganism promoted the formation of calcite and vaterite (Rodriguez-Navarro et al. 2007), and the consolidation effect on porous stone was confirmed with sonication tests (Rodriguez-Navarro et al. 2003). By applying the suggested growth media on degraded limestone (Jimenez-Lopez et al. 2007) and freshly quarried calcarenite (Jimenez-Lopez et al. 2008), with or without *M. xanthus*, an alternative method was introduced that took advantage of the indigenous microflora.

Considering the numerous strains that are cultivable from stone substrates and parameters to be addressed, the investigation of different species of bacteria, depending on their biocalcification ability, is fostered to develop a coherent bacterial-biomineralization database.

In a previous work (Daskalakis et al. 2013), we presented the biomineralization ability of different microorganisms such as *Pantoea* sp., *Pseudomonas chlororaphis*, and *Cupriavidus metallidurans*. Microorganisms were deposited to the Greek collection of bacteria of Agricultural University of Athens—Laboratory of Dairy Research.

The gram-negative *C. metallidurans* ACA-DC 4073 was isolated from the surface of exposed marble obtained from the Penteli Mountain, a site that, to the best of our knowledge, is

not considered to have been polluted by heavy metals. This verified the fact that *C. metallidurans* may be found in different environments, although it was initially isolated from industrial sites in Belgium (Goris et al. 2001). *C. metallidurans* ACA-DC 4073 was selected for a more in-depth investigation. A statistical model was applied in order to investigate its applicability for determining the optimal biomineralization values of selected factors. Results of the optimization experiments are presented accompanied with the verification of the optimal conditions that did provide considerable biomineralization on marble surfaces. Vaterite constant formation under the selected conditions and the factors that could assist its stability are discussed. Finally, an experiment that confirms *C. metallidurans* ACA-DC 4073 potential for in situ tests is demonstrated.

Materials and methods

Growth media for biomineralization experiments and stone substrate

The basic growth medium (BP1x hereafter) was 0.36 g of bacteriological peptone (Lab M, Lancashire, UK) and 2.5 mL of 10 % calcium acetate solution [$(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Ca}$ (Sigma-Aldrich, Munich, Germany)] per 100 mL. Screw-cap bottles of 250 mL capacity were used for the experiments. The final volume of the medium was 100 mL, allowing for a reasonable space for air headspace. Liquid media with the marble samples were sterilized by autoclaving for 17 min at 15 psi—121 °C. Blank samples were without bacterial inoculation and incubated until the end of the experimental period. Qualitative observation of growth was carried out by measuring the absorbance at 620 nm with a Hach DR-2000 spectrophotometer (HACH LANGE, Athens, Greece). Bacterial population (in colony-forming units; CFU mL^{-1}) was calculated with the serial dilution method. Marble stone from the Dionysus Mountain near Athens, the only area from which marble similar to that found in the Penteli Mountain could be quarried (Daskalakis et al. 2013), was cut in to sizes of 4 cm×1 cm×1–1.5 cm and used as the stone substrate in the following experiments.

Analysis of samples

Calcium acetate monitoring, X-ray diffraction (XRD), and Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) of the biomineral were performed as described in Daskalakis et al. (2013). Retrieved stone samples were allowed to dry at 50 °C for 24 h prior to weighing. The amount of calcium carbonate precipitation was calculated from the weight difference recorded before and after the treatment. Scanning electron microscopy of stone samples was performed as described in Daskalakis et al. (2013). Thin sections of stone samples were observed under a Leica MZ12₅ polarized microscope

(Analytical Instruments SA, Athens, Greece) with a Leica DFC 420C video camera. In order to obtain the mineral composition, they were coated with platinum and analyzed with JEOL scanning electron microscope (SEM) coupled with Oxford Instruments energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS) semiquantitative analysis.

Additional FT-IR analysis was performed in biomineral samples individually stored in plastic containers at room temperature for up to 2 years in order to detect a potential shift of vaterite to calcite. Prior to their analysis, they were dried for 24 h at 50 °C. Furthermore, vaterite was pulverized and resuspended in water in three different values of pH=7, 8, and 9.5 (adjusted with NaOH) in glass beakers. They were covered with aluminum foil with three small holes on top, placed in a desiccator at room temperature to dry gradually for 30 days and then analyzed with FT-IR.

Optimization of biomineralization factors

C. metallidurans ACA-DC 4073 biomineralization ability was optimized under sterile conditions through a series of tests based on experimental design. A multilevel factorial design was used to construct a second-order response surface with three design factors, namely, incubation temperature (X_1), medium concentration (X_2), and inoculum concentration (X_3). The design consisted of 15 trials replicated three times. The selected response under optimization was the weight increase Y (g). Growth media and stone samples were prepared as described above. The different medium and inoculum concentrations were obtained based on the statistical model (in the Supplementary Material Table S1), and samples were incubated at the selected temperatures on a horizontal shaker at 120 rpm. Each factor combination proposed from the statistical design corresponded to one solution with marble sample immersed in it.

The data of the statistical experiment selected were analyzed by using the software Design-Expert 6.0.6 and StatGraphics Plus 5.0. The statistics used to determine whether the constructed models were adequate to describe the experimental data were the significance of the model obtained, the lack-of-fit test, and the adequate precision statistic.

Optimal biomineralization experiment

The consistency of the optimal values regarding temperature, growth medium concentration, and inoculum concentration was established in a final experiment, where the biodeposition process was monitored for 15 days under sterile conditions. Four samples were extracted from the experiment every 3 days and analyzed as described.

Evaluation of the biodeposition treatment under non-sterile conditions

Six stone samples (each 4 cm×4 cm×2 cm) were horizontally placed on an aluminum tray creating an exposed surface area of 96 cm². The bacteria was reestablished from frozen stocks in growth medium according to the optimum growth conditions identified, 200 µL was spread on agar plates, and after 24 h, bacteria were harvested with a cotton swab and immersed in a 10 mL BP3x (1.08 g of bacteriological peptone and 7.5 mL of 10 % calcium acetate solution) solution in a falcon tube. Then, 1 mL of this solution was used as the inoculum for a fresh 100 mL solution and was used as the first flask for spraying onto marble samples after 72 h of incubation. Every 24 h, subsequent flasks containing 100 mL of the growth medium were inoculated along with 1 mL of the previous culture medium. Every 12 h, the sample area was sprayed with a 3–4-day-old bacterial culture, until it was fully covered. We sprayed bacteria with a concentration in the range 2.0–3.5×10⁹ CFU mL⁻¹. A 10-mL volume of the solution was sufficient to cover the marble with a fine liquid layer. We intended to spray the least possible volume necessary to investigate the lower endability of bacterial biomineralization under non-sterile conditions. Spraying was accomplished with a simple connection to an air compressor (KNF pump, Neuberger, Freiburg, Germany, P_{\max} =4 atm) of a miniature model airbrush. The setup did not reduce bacterial survival, as this was verified with serial dilutions of the corresponding volumes sprayed. A humid environment was maintained in the tray with cotton wool moistened with tap water. The aluminum tray was incubated at the bacteria's optimum temperature (35 °C) in a non-sterile incubator for 12 days. At the end of the experiments, a cotton swab was passed over the stone surface, and then the agar plates were inoculated with the cotton swab to investigate whether the stone surface included other microorganisms besides *C. metallidurans* ACA-DC 4073. The stones were sprayed with sterile deionized water to remove bacterial excess and unattached calcium carbonate from the surface, dried at 50 °C for 24 h, and then analyzed with scanning electron microscopy.

Weight loss with ultrasonic treatment

Biomineralized and blank stone samples from the experiments conducted under sterile conditions were immersed in deionized water in an upright position (one of their small side 1 cm×1–1.5 cm was touching the bottom of the glass beaker). Sonication occurred for 5 min (40 kHz, Branson 5510, Danbury, CT, USA) and the samples were immediately rinsed with deionized water and dried at 50 °C for 24 h prior to weighing. The process was performed five times (Daskalakis et al. 2013). Results are presented as average weight loss percentage:

$$\Delta wt(\%) = [(W_{\text{prior sonic}} - W_{\text{after each sonic}}) / W_{\text{prior sonic}}] \times 100$$

Color measurement

The chromatic aspect of the stone after the biodeposition treatment was determined with a portable DR LANGE spectro-color (TYPE LMG183) instrument (HACH LANGE, Athens, Greece). Reflectance measurements were recorded for five different points on the surface of all treated samples after they were subjected to sonication tests providing the L^* , a^* , and b^* values. A mean value was calculated from the instrument's software (DR LANGE spectral=qc version 3.51) and was used thereof. These values were used to calculate the total color difference ΔE from the following equation:

$$\Delta E = [\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2}]^{1/2}$$

With Δ being the difference between the values of the treated samples and the values of the reference samples, which were those without inoculum, L^* (lightness, 0 being black and 100 being white), a^* (negative values indicate green while positive values indicate redness) and b^* (negative values indicate blue and positive values indicate yellow). Additional comparison was performed against average color coordinates obtained from ancient marbles exposed to environmental conditions since 5th and 4th century B.C. from archeological sites in Athens.

Results

XRD and FT-IR analyses

All samples from biomineralization experiments were subjected to FT-IR analysis to determine calcium carbonate polymorphism. Vaterite was detected in all incubation temperatures. FT-IR samples could be easily analyzed regarding the peaks of each polymorph. In order to envisage vaterite's stability, the samples were resubjected to FT-IR analysis after being stored for up to 2 years. None of those samples showed any difference from the previous spectra showing the stability of vaterite. Additionally, vaterite remained stable in solutions of different pHs, thus providing us the identical spectra.

Similar results were obtained from the XRD analysis. In cases where samples from FT-IR showed low amounts for one of the polymorphs, XRD analysis was the method best-suited to clarify the mineral composition of the mixture. Nevertheless, FT-IR is a consistent method that may rapidly facilitate the observation of calcium carbonate polymorphism (in the Supplementary Material Fig. S1).

Response surface methodology

Preliminary biomineralization experiments showed that specific factors could be optimized for biologically induced calcium carbonate precipitation, thus improving the possibilities of a more pronounced bioconsolidation effect. We attempted to clarify whether the design model selected (multilevel factorial design) could provide solid and reproducible results as compared with the results from independent experiments. This could reduce the time needed for bacterial screening for their biomineralization abilities. After running the multilevel factorial design, the results derived from the statistical experiment were analyzed using the coded design matrix (Table 1). Forty five trials were performed (15 trials of the design matrix replicated three times), and the corresponding quadratic models for the above optimization parameters were first computed, from which the outliers (statistically unacceptable measurements) were found and excluded from the subsequent calculations. The insignificant effects (factors and interactions) having p values higher than 0.05 were excluded, and those with p values lower than 0.05 were further used because they were statistically different from zero at the 95 % confidence level.

The reduced second-order regression model fitted to the data for the coded values of factors after excluding the insignificant effects is as follows:

$$Y = 0.0383 + 0.0100X_1 + 0.0178X_2 - 0.0104X_2^2 - 0.0111X_3^2,$$

where Y is the maximum weight increase, X_1 is temperature factor, X_2 is the medium concentration (g/100 mL) factor, and X_3 is the inoculum volume (mL) factor.

The factors of X_3 , X_1^2 , X_1X_2 , X_1X_3 , and X_2X_3 were excluded from the equation as statistically insignificant. The lack-of-fit test has a p value equal to 0.6067, which is greater than the limiting value 0.05, thus indicating that this model is adequate to describe the data obtained from the experiments. Indeed, the model F -value of 10.83, calculated for the model obtained, implies that the model is significant. There is only 0.01 % chance that a "model F -value" this large could occur because of noise. In addition, the "Adequate Precision" statistic, which measures the signal-to-noise ratio was calculated as equal to 10.05. Because this value is greater than the desired value 4, the model can be used to navigate the design space. Finally, the values of the factors under investigation that maximized the optimization parameter, as determined from the model, are shown in Table 1. The entire design space and the region of the optimum are clearly shown in the response surface as depicted in Fig. 1.

Each experimental batch with regard to temperature levels was prepared and carried out simultaneously. Bacterial population calculated was reproducible in all series, certifying no bias in the experimental results. In all experiments, regardless

Table 1 Coded and natural values of design factors and final results of the multilevel factorial design

Effects	Design factors	-1	0	1	Optimum (coded values)	Optimum (natural values)
A	X_1 : temperature (°C)	25	30	35	1.0	35
B	X_2 : medium concentration (g/100 mL)	0.36	0.72	1.08	0.86	0.92
C	X_3 : inoculum volume (mL)	0.5	1.0	1.5	0.00	1.0

of the medium concentration, acetate was assimilated, thus inducing microbial growth with the majority of Ca^{2+} concentration diminished due to biomineralization.

Blank marble samples did not show any considerable differences after their sterilization. Fissures and fragmented marble particles on substrate surfaces were observed prior to and after the sterilization process (Fig. 2a). Analogous fragments, observed in experimental samples, are attributed to the substrate's morphology thereof.

The parameter that differentiated biomineral polymorphism was primarily the medium's concentration and, secondly, the incubation temperature. With low concentration (BP1x) and the incubation temperature at 25 °C, calcite was the main polymorph with temperature assisting in vaterite formation at 30 °C and 35 °C, where both minerals were seen in the mixtures. This gradually altered to higher concentrations; thus, at BP2x media, vaterite was the main polymorph with calcite being diminished, and finally, at BP3x media, vaterite was the only one detected. Figure 2b depicts calcite in low-concentration experiments. Crystals could be easily attributed to broken fragments, but the overall precipitation morphology implied bacterial mediation because the marble substrate has been covered by a thin film of precipitate not identified on blank samples. Thus, the sharp edges of calcite crystals, as observed in blank samples, are not detected anymore. In higher-medium concentration, the marble surface was successfully covered with the biomineral.

Optimization of response

The first set of samples (day 3) showed a slight weight decrease on marble samples due to calcium carbonate dissolution from the specimens being immersed in the nutrient solution under shaking conditions. Similar values have been observed in all blank samples (marble immersed in nutrient solution without inoculum).

Growth of *C. metallidurans* ACA-DC 4073 in the selected medium induced a diauxie effect. The bacteria had a period of latency, followed by a period when nutrients from BP medium were metabolized. Acetate assimilation followed this period. The solution was transformed to a white emulsion that signaled the onset of biomineralization. Calcium carbonate precipitation was observed after acetate assimilation was initiated. The average bacterial population was 1.54×10^9 CFU mL⁻¹ when white

emulsion occurred (Fig. 3a) on day 3. On day 4, the white emulsion could be clearly observed, leading us to day 6 of the experiment, where biomineral formation on the samples was obvious and the microbial population was at its maximum. Acetate was considerably reduced, with calcium ions diminished by half (Fig. 3b), showing a clear impact on weight. In addition, the decrease in acetate reduced its buffering effect; thus, the pH gradually increased, which assisted in calcium carbonate precipitation (Fig. 3c). Day 9 provided us with increased weight in our samples, complete assimilation of acetate, and almost total depletion of calcium. Bacterial population was reduced to values close to those prior to the onset of biomineralization. Until the end of the experiment, bacterial population continued to diminish due to nutrient depletion, brought about by constant biomineralization. Furthermore, pH values increased to reach 8.9 (Fig. 3c) during the final day of the experiment (day 15).

Samples from each set were investigated under the SEM, and, subsequently, thin sections were prepared. Analysis revealed the behavior of *C. metallidurans* ACA-DC 4073 cells in order to form the biomineral on the substrate. Vaterite was the polymorph identified throughout the experiment according to FT-IR and XRD analyses of all samples. Biomineralized bacteria were detected under the electron microscope as the prime colonizers, regardless of weight decrease in the 3-day-old marble substrates (Fig. 4a). From day 6, a more consistent vaterite layer was detected. Photomicrographs from the 9-day samples show marble covered by calcium carbonate layer of bacterial origin, constructed from

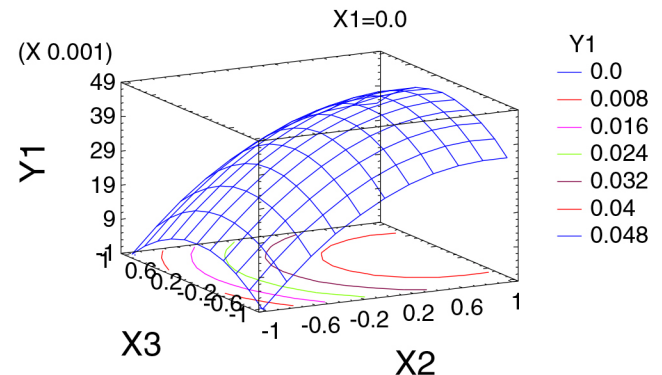


Fig. 1 Estimated response surface for the coded values of the design factors X_2 and X_3 , while fixing factor X_1 at its zero level. The region of the optimum (maximum) is clearly shown at the contour plot

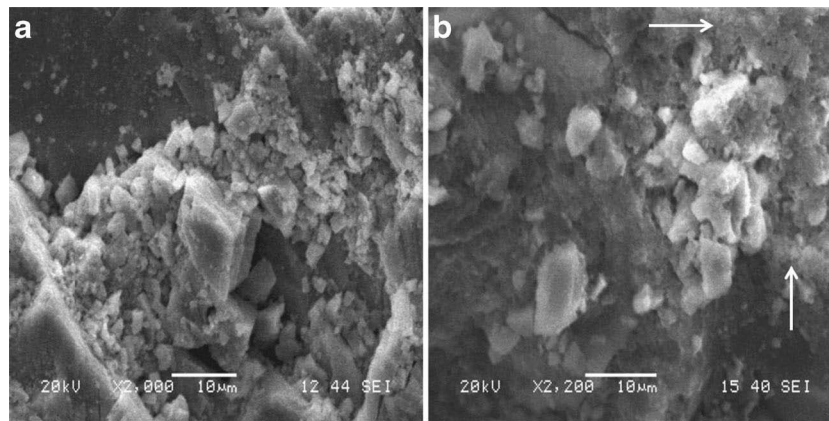


Fig. 2 Scanning electron photographs of (a) fragments of marble on blank sample's surface and microcrystalline particles; (b) small-sized crystalline particles resembling a polyhedral morphology that precipitated on marble's surface. These crystals are alike small broken parts of blank

marble (a), thus enforcing the fact that the morphologies observed are calcite. A thin film of new material (*white arrows*) was observed, indicating that precipitation had occurred differently from that observed on a blank marble

mineralized bacteria and micritic spheres in close proximity to the cells (Fig. 4c), that correspond to the morphology identified throughout the experiment. Figure 4e clearly shows the size of bacterial biomineral micritic spheres developed on or very close to the cell. Until the end of the experiment, those were the only morphologies observed.

Sonication treatment of samples

A detectable bioconsolidation effect was observed after five consecutive sonication treatment sessions. From the initial days of biomineralization, the average weight loss was reduced. Weight loss during the first two sonication treatments is comparable to the blank samples. For samples from days 6, 9, and 15 where biomineralization was observed, this can be attributed to vaterite that was not adequately adhered on the surface or on the previously deposited biomineral. Nevertheless, after the 3rd sonication, vaterite remained on the surface of the samples compared to blank specimens. The most profound effect was observed on day 12 of the experiment where we have the least weight loss (Fig. 5). In general, average weight differences prior and after each sonication treatment showed a relatively constant amount of removal (days 6–15) and are lower than the average weight gain due to biomineralization (in the Supplementary Material Table S2). This indicated that the new material had adequately adhered to the surface. Loosely attached biomineral and/or marble fragments were removed under sonication, leaving the substrate clear at sites with negligible biomineralization (Fig. 4b). Figure 4d shows the general view of the substrate, where the biomineral and the uncovered substrate are clearly distinguishable. Vaterite morphology remained unaffected (Fig. 4f).

Thin sections

Full coverage of the substrate surface was achieved after 12 days of incubation. Sonicated samples, from day-12 to day-15 experiments, were subjected to thin-section observation under a polarized microscope in order to appreciate the coherence of the vaterite layer. A continuous, solid, new material attached to the surface was observed. Figure 6a, b shows precipitated vaterite following the substrate's anaglyph. Voids detected on the day-12 sample (Fig. 6a) decreased in the 15-day sample (Fig. 6b), with the latter having a more consolidated biomineral layer of 50–100 µm. Cracks inside the marble substrate were caused by the force applied to samples during their preparation. In most cases, the new biomaterial withstood such shearing forces (Fig. 6c). Cracks in the marble resulted in the creation of fissures in the new material (Fig. 6d), but without its detachment from the substrate's surface. EDS spectra (semiquantitative analysis) of these samples showed an additional phosphorus peak on vaterite compared to the substrate (in the Supplementary Material Fig. S2). Phosphorus content varied from 3 to 5 %. Its percentage did not imply the presence of a different biomineral that would contain the phosphorus element in its chemical formula.

Color measurement

Each sample of the marble under optimal conditions was measured for its color differentiation against the blank samples from the same experiment and ancient marble samples (Table 2).

Blank marble samples retained their original white color throughout the experiment. For the samples, the L^* values gradually reduced with incubation time and weight increase. A white-beige to light gray surface color was observed, especially for the last two sets (days 12 and 15). This affected the final L^* value, which reduced up to 10 units as compared with

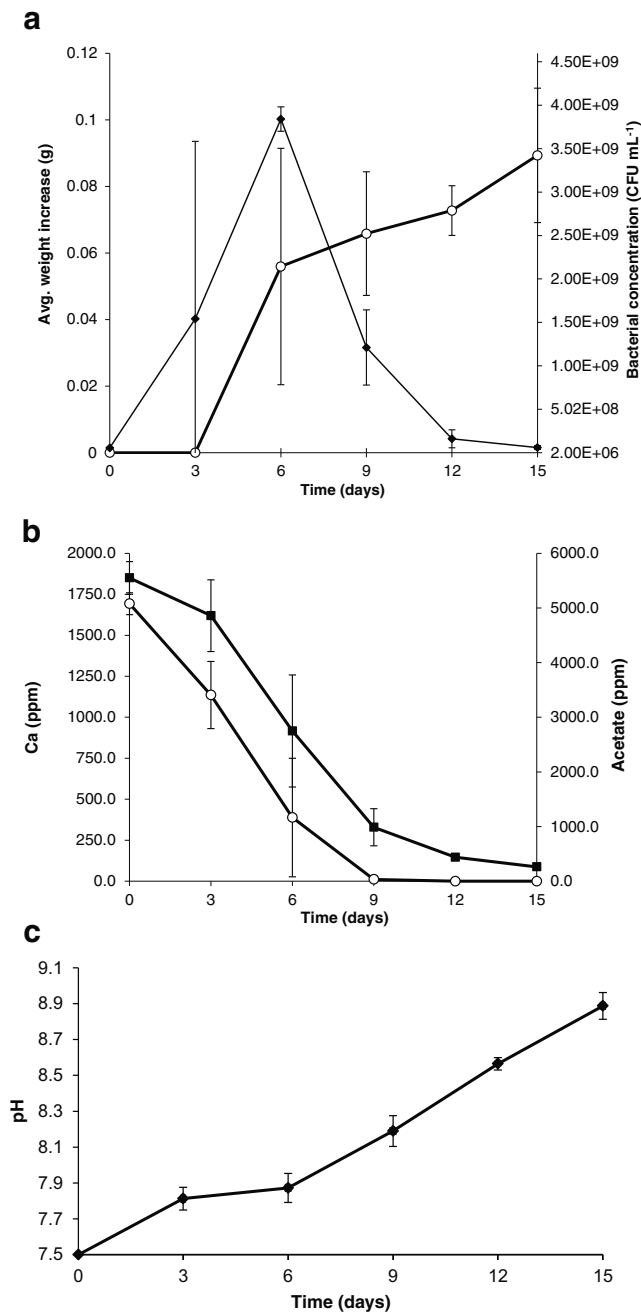


Fig. 3 **a** Weight increase on marble substrates and corresponding bacterial concentration (CFU mL⁻¹): bacterial concentration (*filled diamond*); weight increase on marble samples (*empty circle*); **b** acetate and calcium reduction during optimum experimental session. Values represent the amount of the components still in solution calcium (*filled square*); acetate (*empty circle*); and **(c)** solution pH change during optimum experimental session showing the gradual increase due to bacterial metabolism. Each value is the average of four samples. *Error bars*=standard deviation

the blank sample and corresponded to a decreased white color. The most profound difference was on the b^* -axis. The average numbers clearly showed an effect on marble toward a more yellow color. This was not clearly visible by naked eye where the difference of the L^* -axis was more profound. ΔE^* values

showed that the overall visual appearance was altered ($\Delta E^* > 6$). Chromatic differences against marbles exposed to the environment since 5th and 4th century B.C. showed that the overall ΔE^* gradually diminished (Table 2) moving the values closer to those acceptable during conservation interventions.

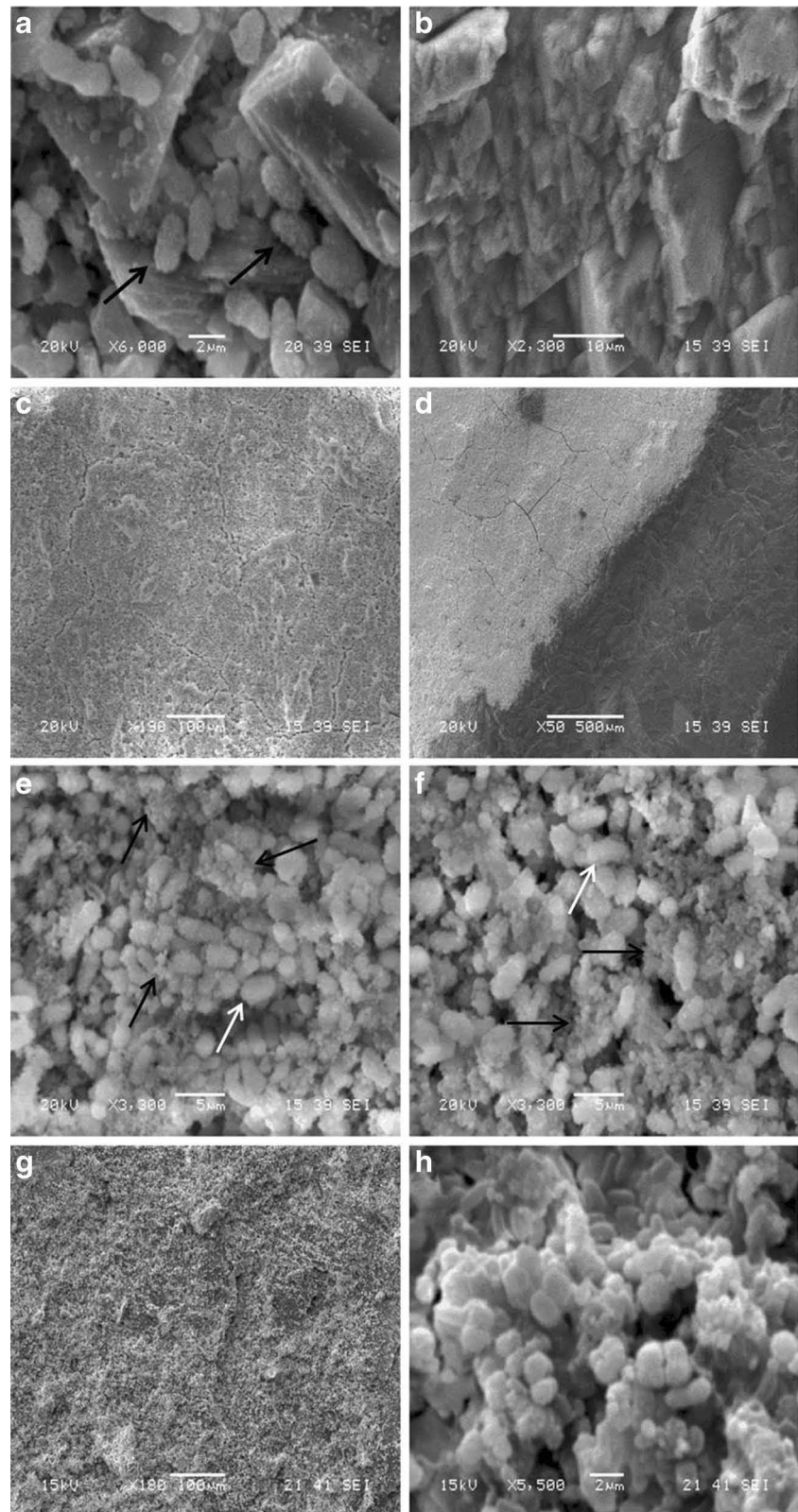
Evaluation of the biodeposition treatment

Figure 4g shows the biomineral layer under low magnification. No contamination was observed after the 12-day experiment under non-sterile conditions. A fine layer of biomineralized bacteria and micron-sized crystalline particles were created, starting from filling cavities and subsequently spreading throughout the substrate's surface. The morphology of calcium carbonate was similar to that observed in previous experiments, which assisted in identification of biomineralization (Fig. 4h). However, the layer was not as dense as in previous experiments because only minimum amounts were sprayed. Nevertheless, the fine overlying layer on the marble was without any detectable color differentiation. Color impact on samples was decreased. ΔE^* diminished to values that correspond to non-detectable differences to the naked eye when compared to untreated marble samples (Table 2). The higher differences were detected mainly for the b^* values. Calculating the ΔE^* against marble samples from archeological sites in Athens showed a notable difference with values $\Delta E^* > 6$ (Table 2).

Discussion

A previous study showed that *C. metallidurans* ACA-DC 4073 presented an acceptable resistance against sonication forces and fast assimilation of acetate, boosting growth (Daskalakis et al. 2013). In a real-case scenario, the applied microbes should be able to utilize nutrients faster against the microflora of the substrate suppressing antagonistic growth. Another selection parameter was the color of the solution after full bacterial growth and during nutrient depletion at the end of the experiments. Compared to other isolates, the color of the nutrient solution did not change at any stage of growth, which assisted in the least color transfer on the biomineral (Daskalakis et al. 2013). Finally, the bacteria itself present a promising candidate because of its ability to survive in environments that are polluted with heavy metals (Goris et al. 2001). This could be advantageous for applications in urban areas, where heavy metals and other pollutants are deposited on stone surfaces and may be toxic to microorganisms.

Fig. 4 Scanning electron photographs from samples under the optimum conditions investigated prior (**a**, **c**, and **e**) and after the sonication treatment (**b**, **d**, and **f**) and scanning electron photographs from marble surface sprayed with the bacterial solution under non-sterile conditions (**g** and **f**): **a** 3-day marble surface where regardless of weight loss, bacteria have already initiated surface colonization (*black arrows*). Micritic crystal morphologies are also observed scattered close or onto bacterial cells; **c** fully covered surface area with vaterite after 9 days of experimentation; **e** magnification of (**c**) showing biomineralized bacteria (*white arrow*) and micritic spheres (*black arrows*) of the new surface; **b** uncovered marble surface after sonication. Fragments of marble and loosely attached biomineral were completely removed due to sonication; **d** sonicated marble surface under low magnification partially covered with vaterite. The *left* side is the biomineral, and the *right* the uncovered area; **f** magnification of the biomineral after sonication treatment. Morphology is identical to (**e**) depicting the adequate coherence of the vaterite layer and its durability against sonication; **g** general view of the newly formed biomineral surface created from spraying bacterial solution on marble. It can be generally observed that the surface is covered by a new layer of calcium carbonate; **h** magnification of (**g**) where short-rod biomineralized bacteria consist the newly formed layer. Micritic crystals are obvious close to bacterial cells



Response surface methodology was applied to construct a mathematical prediction model that was used to test the ability of the isolated microorganism for future bioconsolidation

applications. For *C. metallidurans* ACA-DC 4073, the final optimal values of the three factors selected proved well-founded. Under the selected conditions, the surface of the

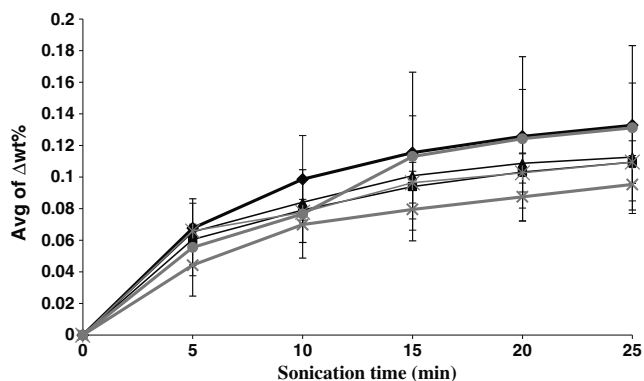
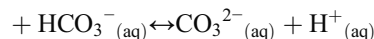
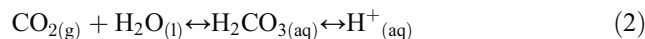
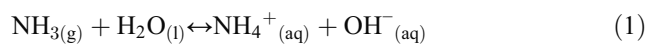


Fig. 5 Graphical presentation of average $\Delta\text{wt}(\%)$ from marble samples under optimal experimental conditions during five consecutive sonication treatments. Each line represents the average $\Delta\text{wt}(\%)$ of three samples isolated in different incubation days: (filled diamond) 3rd day of incubation; (filled square) 6th day of incubation; (filled triangle) 9th day of incubation; (multiplication sign) 12th day of incubation; (asterisk) 15th day of incubation; and (filled circle) blank marble. To improve visibility of the graph, the lines of 6-, 9-, and 15-day values are thinner than blank marble, 3- and 12-day. Standard deviation bars are shown in figure

marble was fully covered by the biomineral. However, the inoculum volume proved insignificant in our experiments, and this was further verified by the fact that mineral formation was initiated after the onset of acetate assimilation. There is a probability that, in a field application, this indicates that the presence of *C. metallidurans* among the stone microflora will be activated and could reliably promote the formation of calcium carbonate. Precipitation of bacterially induced calcium carbonate took place until the end of the experiment. However, it is better to terminate the process when cell concentration is high and antagonistic microorganisms do not have the time frame to assimilate the nutrients provided in situ.

BP medium proved its functionality under the presented experiments. According to our blank samples, calcium carbonate precipitation did not occur in uninoculated growth medium, emphasizing that inorganic precipitation did not occur. Bacterial growth did not have any immediate effect during its first exponential growth phase. Metabolism, in this stage, assisted primarily in cell number increase that was subsequently boosted with acetate consumption taking advantage of the microorganism's metabolic profile (Janssen et al. 2010). Acetate was directly mineralized to CO_2 via the tricarboxylic acid cycle (Braissant et al. 2002), while low acetate concentrations reduced CaCO_3 precipitation confirming the observations of Portillo et al. (2009). Calcium acetate was the extra source of carbon that increased considerably the cell density to the level of an effective biomineralization (Fig. 3). Therefore, the appropriate environment was formed for three main reasons: pH increase due to deamination of nutrients, increased diffusion of CO_3^{2-} , and a surplus of nucleation sites from the negatively charged cell membranes due to excessive

bacterial growth. Oxidative deamination and increased NH_4^+ shifted the equilibrium to carbonate anions:



In this alkaline pH, the bacterial negatively charged cell membrane attracts the dissolved calcium cations, and, with carbonate production, calcium carbonate is finally precipitated. Concurrently, bioprecipitation constantly shifts Eq. (2) to continuous production of carbonate ions, and the overall effect is supported by bacterial metabolism. When nutrients are exhausted, bacteria continue being biomineralized, as observed from the morphology of the precipitates (Fig. 4e). This had a direct effect on the final polymorph, which, in our case, was vaterite.

Vaterite is the least stable anhydrous polymorph of calcium carbonate and transforms to the most stable calcite under ambient conditions of pressure and temperature (Suzuki et al. 2006). If kept in contact with the solution, it transforms to calcite within 1 day. Dry abiogenic vaterite is stable up to 670 K (Wang and Becker 2009). When organic molecules or moieties become a part of the process, the stability of vaterite is enhanced. Carboxylic acids favor calcite (Henderson et al. 2008), while polyacrylic acid (Pecher et al. 2009) and stearic acid (Mann et al. 1988) stabilized the vaterite. Amino acids have been thoroughly investigated and have proved their ability to promote vaterite crystallization (Manoli and Dalas 2001; Malkaj et al. 2004; Malkaj and Dalas 2004; Xie et al. 2005; Shivkumara et al. 2006; Tong et al. 2004; Wolf et al. 2007). Specific oligopeptides stabilized vaterite crystals in aqueous solution and delayed its transformation. Dried crystals did not transform to calcite, suggesting that a solution-mediated transformation occurred instead of a solid-state transition (Li et al. 2002). Glycoproteins (Natoli et al. 2010) and phospholipids (Xiao et al. 2009) may also promote the less stable polymorph.

Gram-negative bacteria have a negative charge because of the phosphate groups of lipopolysaccharides and the negative charge of side chains from amino acids of the anchored proteins. In addition, numerous amino acids (without carboxyl groups in their side chains) affect polymorphism, while carbohydrates (present in glycoproteins and lipopolysaccharides) could be involved in the stability of vaterite. EDS analysis proved that the biomineral was calcium carbonate with minute amounts of phosphorus that could be of biological origin from organic moieties described above. Phosphate ions diminish the rate of vaterite crystallization, but, simultaneously, already formed vaterite crystals are stabilized with a drastic decrease

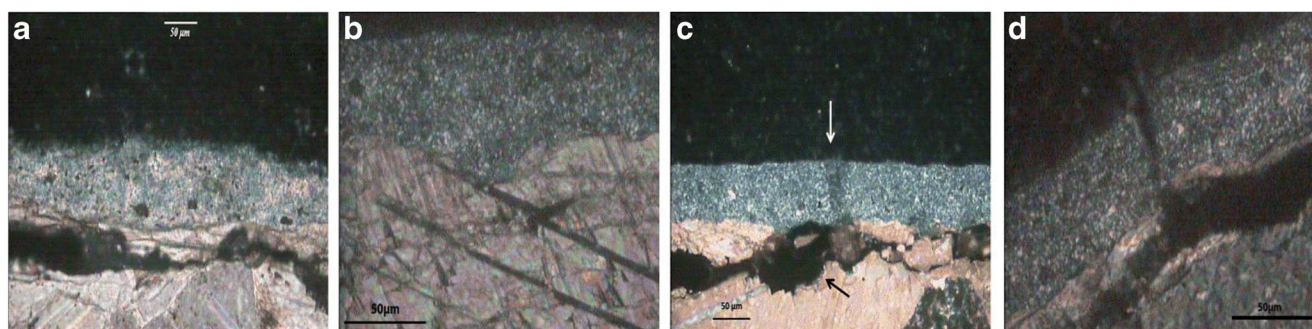


Fig. 6 Polarized microscope photos of thin sections: **a** sample after 12 days of incubation presenting the vaterite layer and the crack beneath due to sample preparation. Voids inside the biomineral are observed; **b** sample after 15 days of incubation showing a solid and homogeneous vaterite layer following the anaglyph of the substrate with less voids

inside the biomineral; **c** microscope picture from day 15 substrate showing internal marble crack (*black arrow*). Biomineral remained intact, with a minor possible perpendicular crack (*white arrow*); **d** vertical crack of vaterite. Crack is a consequence of the crack in marble. A fraction of the substrate was dislocated, thus forcing vaterite to crack

of transformation rate to calcite (Katsifaras and Spanos 1999). Thus, the overall composition of the bacterial outer cell membrane affected biomineralization toward vaterite's stability.

The Ostwald rule of stages states that the less stable crystalline phase of a mineral may form prior to the most stable one (Mann 2001). Therefore, vaterite may form but it should eventually transform to the most stable calcite. On the contrary, during bacterial metabolism, vaterite was formed but the sequential transformation to calcite was interrupted due to the direct involvement of bacterial cell walls that inhibited redissolution-recrystallization or solid-state transformation of vaterite to calcite. Those two processes were not observed during the course of our experiments, with vaterite being stable either in solution (growth medium) or as dried crystals,

verified with FT-IR analysis. Redissolved vaterite in deionized water of different pH values did not transform to calcite.

Vaterite has been reported in different growth media. Gram-negative bacteria grown in modified B4 medium promoted vaterite (*Acinetobacter* sp.) under stationary conditions and in lower calcium acetate concentrations (Zamarreño et al. 2009). In a series of experiments with *M. xanthus* and the microflora of porous stone, the application of M3 medium promoted vaterite (Rodríguez-Navarro et al. 2003, 2007; Jimenez-Lopez et al. 2007, 2008; Jroundi et al. 2010). Our media had a slightly lower calcium concentration compared to M3 medium. This could be the main factor that promoted a supersaturation incident through bacterial metabolism. In the other media utilized by the authors (M3-P and CC), calcium

Table 2 Chromatic coordinates of sonicated marble substrates after optimum condition experiment of *C. metallidurans* ACA-DC 4073 biomineralization and after the spraying application under non-sterile conditions

Date of samples	Avg ΔL^*	Avg Δa^*	Avg Δb^*	Avg ΔE^{*a}	Avg ΔE^{*b}	Avg ΔE^{*c}
3-day marbles	-0.44	-0.26	-0.29	0.95	15.82	17.76
6-day marbles	-2.70	-0.35	3.57	4.57	12.16	13.74
9-day marbles	-8.66	-0.22	10.16	13.42	6.17	6.02
12-day marbles	-7.87	-0.51	15.04	17.70	7.96	5.55
15-day marbles	-10.04	-0.29	12.06	15.87	6.22	4.98
Spraying application	0.23 ^d	-0.67 ^d	1.25 ^d	1.69	9.77	14.35
	L^*	a^*	b^*			
Untreated marble	89.9	-0.65	-1.13			
Untreated marble from spraying application	84.98	-0.9	-1.99			
Marble sample #1 exposed to the environment since 5th century B.C.	75.94	1.09	6.55			
Marble sample #2 exposed to the environment since 4th century B.C.	75.73	1.5	9.59			

Each value is the average of three samples. For spraying application, each value is the average of five samples. For each sample, five different positions on surface were measured and the average value was automatically provided by the used software. For blank marble, the actual values are presented because no actual difference was detected

^a ΔE^* was calculated considering as reference marble the untreated sample used as a blank during the experiments

^b ΔE^* was calculated considering as reference marble #1, exposed to the environment since 5th century B.C.

^c ΔE^* was calculated considering as reference marble #2, exposed to the environment since 4th century B.C.

^d Average values were calculated from the five marble samples used to create the spraying surface

concentration was lower and calcite was crystallized. Furthermore, in our experiments, we observed constant increase in pH values even after nutrient exhaustion and population decrease, prolonging the vaterite formation on the contrary to buffered growth media (Rodríguez-Navarro et al. 2003).

Inorganic vaterite, when sonicated, may transform to calcite (Berdonosov et al. 2005). We did not observe this in our samples subjected to extended sonication treatment. In all samples sonicated, the new material presented an identifiable consolidation effect. Sonication treatment affected all six sides of the marble sample; thus, weight loss was not solely from the covered surface. Even if we hypothesized that sonication affects only the new biomineral and not the whole substrate, positive weight values verified its integrity (in the Supplementary Material Table S2). Photomicrographs after sonication showed that vaterite preserved its morphology. Loosely attached biomineral from the early days of experimentation and fragmented parts from the marble surface were completely detached (Fig. 4b). Bioconsolidating results were reported for different types of stone in other investigations. The results are not ideally comparable because of the differences in the mineralogy of the stone (Rodríguez-Navarro et al. 2003; Jimenez-Lopez et al. 2008; De Muynck et al. 2010). Low $\Delta\text{wt}(\%)$ in Fig. 5 does not imply low coverage of the marble's surface. The opposite result has been presented in Figs. 4 and 6. It is mainly attributed to the type of stone investigated in this work. The negligible porosity of marble allowed for biomineralization only on the surface (Fig. 6) and primarily on the horizontal surface of each coupon in direct contact with the growth medium. In previous investigations, (Rodríguez-Navarro et al. 2003; De Muynck et al. 2010) the porous substrates used allowed for biomineralization inside the pore network, increasing the final outcome. In recent preliminary experiments on a different porous stone, we have analogously observed a higher weight increase (results not shown). The consistency of vaterite was further appreciated with thin-section analysis of the samples (Fig. 6). Voids decreased with further incubation, probably due to successive biomineralization which relocated the vaterite and formed a more compact layer (Fig. 6b). Vaterite withstood the forces it was subjected to during sample preparation, while cracks observed inside the marble did not induce its detachment. This provides an additional proof of the ability of *C. metallidurans* ACA-DC 4073 to promote bioprecipitation of a robust biomineral.

The information obtained from the sterile experiments could explain the morphology observed in the non-sterile experiments. Scanning electron photomicrographs proved that *C. metallidurans* ACA-DC 4073 created a layer of biomineral that corresponded to vaterite. The duration over which such a method could be implemented remains unanswered. If we regard as a feasible method the one tested here, the media used should be highly nutritious and vaterite will be formed. Spraying method was selected for economic reasons and for

its practicality. Lack of detectable contamination showed that a ready-to-use microbial solution provided the appropriate environment for our bacteria to advantageously promote BIM. Each growth medium was used for a few hours to avoid the formation of calcium carbonate in a solution before application. Finally, vaterite may be used to our advantage because of the fact that spherulitic or bacterially shaped formations are clearly differentiated on marble. Thus, the biomineral could be discriminated and its alteration, due to future environmental or biological attributes, could be documented. Application of a single isolate, isolated from stone microflora, seems a more certified methodology because we could be aware of the microorganism's behavior upon the selected substrate and nutritional environment. A ready-to-use pre-grown bacterial culture reduces the time of in situ application. In our case, a clear layer of newly formed calcium carbonate was achieved within a few days. De Muynck et al. (2008) mentioned that preliminary experiments with pure bacterial cultures provided better results than with mixed cultures.

Pentelic marble, used as a construction stone in numerous monuments, has a snowy white color globally appraised. Such a characteristic posed a challenge for an application that would result in minimal esthetic alterations. As a substrate, it enabled the recording of the gradual differentiation of color coordinates throughout biomineralization. During the sterile experiments, when the bacteria took charge, chromatic coordinates L^* and b^* changed. The intensity of the white color decreased and that of the yellow color increased. Therefore, ΔE^* from day 9 and thereafter produced results debatable for restoration treatments ($\Delta E^* > 6$). Nevertheless, when compared against samples that had been exposed to the open environment, ΔE^* gave lower values that are closer or lower than 6 (Table 2) and acceptable for stone-surface treatments (De Muynck et al. 2010). These results drive to the conclusion that when biomineralization is considered for an in situ application, preliminary samples should be used to investigate the alterations of the esthetic parameters. In this case, the spraying application is appropriate for a stepwise evaluation of the color in coordination with the appropriate number of treatments for adequate bioconsolidation. In our investigation, the total volume sprayed every 12 h was the least required for covering the surface. A new calcium carbonate layer covered the marble, and color coordinates showed a slight differentiation with $\Delta E^* < 3$. The comparison against samples from ancient sites showed a considerable difference with $\Delta E^* > 6$ (Table 2) because the minimum volumes applied did not produce enough biomineral that would cause a deviation from values close to white color. Further spraying would eventually reduce that difference.

This study aimed to evaluate the ability of *C. metallidurans* ACA-DC 4073 to promote calcium carbonate precipitation, to gain insight of the biomineral morphology, and, finally, its performance over a preliminary in situ application. To the best

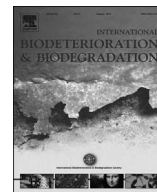
of our knowledge, this is the first study considering a *C. metallidurans* isolate and its prospects in stone conservation. Vaterite's stability under different nutrient and temperature conditions was demonstrated; a notion that has gradually become more apparent in recent research. Our results showed that it was stable under the interaction with cell membranes during high metabolic activity. Response surface methodology facilitated in parameter evaluation and reduced experimental time for evaluating the candidate microorganism. With the statistical model, we considered that the best biomineralization effect would correspond to the maximum amount of biomineral formed on the stone sample. This was successfully verified considering the fact that scanning electron microscopy photographs showed that weight increase corresponded to better coverage of the marble surface. Thin section analysis further supported this result. Color differentiations and comparison with ancient marble samples, stress that further investigation could be conducted to obtain results that balance adequate biomineralization and the least adverse esthetic effects that shall satisfy restoration intervention. *C. metallidurans* ACA-DC 4073 could be considered as a candidate for future interventions or exploited if detected among stone microflora.

Acknowledgments This work was supported by the Ministry of National Education and Religious Affairs (Community Support Framework 2000–2006) under the Pythagoras II research program. The Project is co-funded by the European Social Fund (75 %) and National Resources (25 %).

References

- Berdonosov SS, Znamenskaya IV, Melikhov IV (2005) Mechanism of the vaterite-to-calcite phase transition under sonication. *Inorg Mater* 41: 1483–1487. doi:10.1007/s10789-005-0307-6
- Boquet E, Boronat A, Ramos-Comerzana A (1973) Production of calcite (calcium carbonate) crystals by soil bacteria is a general phenomenon. *Nature* 246:527–529. doi:10.1038/246527a0
- Braissant O, Verrecchia EP, Eragno M (2002) Is the contribution of bacteria to terrestrial carbon budget greatly underestimated? *Naturwissenschaften* 89:366–370. doi:10.1007/s00114-002-0340-0
- Buczynski C, Chafetz HS (1990) Habit of bacterially induced precipitates of calcium carbonate and the influence of medium viscosity on mineralogy. *J Sediment Petrol* 61:226–233
- Cacchio P, Ercole C, Cappuccio G, Lepidi A (2003) Calcium carbonate precipitation by bacterial strains isolated from a limestone cave and from a loamy soil. *Geomicrobiol J* 20:85–98. doi:10.1080/01490450303883
- Daskalakis MI, Magoulas A, Kotoulas G, Catsikis I, Bakolas A, Karageorgis AP, Mavridou A, Doulia D, Rigas F (2013) *Pseudomonas*, *Pantoea*, *Cupriavidus* isolates induce calcium carbonate precipitation for bioremediation of ornamental stone. *J Appl Microbiol* 115:409–423. doi:10.1111/jam.12234
- De Muynck W, Cox K, De Belie N, Verstraete W (2008) Bacterial carbonate precipitation as an alternative surface treatment for concrete. *Constr Build Mater* 22:875–885
- De Muynck W, Verbeken K, De Belie N, Verstraete W (2010) Influence of urea and calcium dosage on the effectiveness of bacterially induced carbonate precipitation on limestone. *Ecol Eng* 36:99–111
- Douglas S (2005) Mineralogical footprints of microbial life. *Am J Sci* 305:503–525. doi:10.2475/ajs.305.6-8.503
- Gadd GF (2010) Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation. *Microbiology* 156:609–643. doi:10.1099/mic.0.037143-0
- Goris J, De Vos P, Coenye T, Hoste B, Janssens D, Brim H, Diels L, Mergeay M, Kersters K, Vandamme P (2001) Classification of metal-resistant bacteria from industrial biotopes as *Ralstonia campinensis* sp. nov., *Ralstonia metallidurans* sp. nov. and *Ralstonia basileensis* Steinle et al. 1998 emend. *Int J Syst Evol Microbiol* 51:1773–1782. doi:10.1099/00207113-51-5-1773
- Hammes F, Verstraete W (2002) Key roles of pH and calcium metabolism in microbial carbonate precipitation. *Rev Environ Sci Biotechnol* 1: 3–7. doi:10.1023/A:1015135629155
- Henderson GE, Murray BJ, McGrath KM (2008) Controlled variation of calcite morphology using simple carboxylic acids. *J Cryst Growth* 310:4190–4198. doi:10.1016/j.jcrysgro.2008.07.002
- Janssen PJ, Van Houdt R, Moors H, Monsieurs P, Morin N, Michaux A, Benotmane MA, Leys N, Vallaes T, Lapidus A, Monchy S, Médigue C, Taghavi S, McCorkle S, Dunn J, van der Lelie D, Mergeay M (2010) The complete genome sequence of *Cupriavidus metallidurans* strain CH34, a master survivalist in harsh and anthropogenic environments. *PLoS ONE* 5:e10433. doi: 10.1371/journal.pone.0010433
- Jimenez-Lopez C, Rodriguez-Navarro C, Piñar G, Carrillo-Rosúa FJ, Rodriguez-Gallego M, Gonzalez-Muñoz MT (2007) Consolidation of degraded ornamental porous limestone stone by calcium carbonate precipitation induced by the microbiota inhabiting the stone. *Chemosphere* 68:1929–1936. doi:10.1016/j.chemosphere.2007.02.044
- Jimenez-Lopez C, Jroundi F, Pascolini C, Rodriguez-Navarro C, Piñar-Larrubia G, Rodriguez-Gallego M, Gonzalez-Muñoz MT (2008) Consolidation of quarry calcarenite by calcium carbonate precipitation induced by bacteria activated among the microbiota inhabiting the stone. *Int Biodeterior Biodegrad* 62:352–363. doi:10.1016/j.ibiod.2008.03.002
- Jroundi F, Fernández-Vivas A, Rodriguez-Navarro C, Bedmar EJ, Gonzalez-Muñoz MT (2010) Bioconservation of deteriorated monumental calcarenite stone and identification of bacteria with carbonatogenic activity. *Environ Microbiol* 60:39–54. doi:10.1007/s00248-010-9665-y
- Katsifaras A, Spanos N (1999) Effect of inorganic phosphate ions on the spontaneous precipitation of vaterite and on the transformation of vaterite to calcite. *J Cryst Growth* 204:183–190. doi:10.1016/S0022-0248(99)00174-8
- Li C, Botsaris GD, Kaplan DL (2002) Selective in vitro effect of peptides on calcium carbonate crystallization. *Cryst Growth Des* 2:387–393. doi:10.1021/cg0255467
- Li W, Liu L, Chen W, Yu L, Li W, Yu H (2010) Calcium carbonate precipitation and crystal morphology induced by microbial carbonic anhydrase and other biological factors. *Process Biochem* 45:1017–1021. doi:10.1016/j.procbio.2010.03.004
- Malkaj P, Dalas E (2004) Calcium carbonate crystallization in the presence of aspartic acid. *Cryst Growth Des* 4:721–723. doi:10.1021/cg030014r
- Malkaj P, Kanakis J, Dalas E (2004) The effect of leucine on the crystal growth of calcium carbonate. *J Cryst Growth* 266:533–538. doi:10.1016/j.jcrysgro.2004.02.114
- Mann S (2001) Biomineralization: principles and concepts in bioinorganic materials chemistry. Oxford University Press, Oxford
- Mann S, Heywood BR, Rajam S, Birchall JD (1988) Controlled crystallization of CaCO₃ under stearic acid monolayers. *Nature* 334:692–695. doi:10.1038/334692a0

- Manoli F, Dalas E (2001) Calcium carbonate crystallization in the presence of glutamic acid. *J Cryst Growth* 222:293–297. doi:10.1016/S0022-0248(00)00893-9
- Moropoulou A, Bisbikou K, Torfs K, Van Grieken R, Zezza F, Macri F (1998) Origin and growth of weathering crusts on ancient marbles in industrial atmosphere. *Atmos Environ* 32:967–982. doi:10.1016/S1352-2310(97)00129-5
- Moropoulou A, Tsiourva T, Bisbikou K, Tsantila V, Biscontin G, Longega G, Groggia M, Dalaklis E, Petrikaki A (2002) Evaluation of the cleaning procedures on the facades of the Bank of Greece historical building in the center of Athens. *Build Environ* 37:753–760. doi:10.1016/S0360-1323(01)00058-0
- Natoli A, Wiens M, Schröder H-C, Stifanic M, Batel R, Soldati AL, Jacob DE, Müller WEG (2010) Bio-vaterite formation by glycoproteins from freshwater pearls. *Micron* 41:359–366. doi:10.1016/j.micron.2010.01.002
- Parraga J, Rivadeneyra MA, Martin-Garcia JM, Delgado R, Delgado G (2004) Precipitation of carbonates by bacteria from saline soil, in natural and artificial soil extracts. *Geomicrobiol J* 21:55–66. doi:10.1080/01490450490253464
- Pecher J, Guenoun P, Chevillard C (2009) Crystalline calcium carbonate thin film formation through interfacial growth and crystallization of amorphous microdomains. *Cryst Growth Des* 9:1306–1311. doi:10.1021/cg800251t
- Portillo MC, Porca E, Cuezva S, Canaveras JC, Sanchez-Moral S, Gonzalez JM (2009) Is the availability of different nutrients a critical factor for the impact of bacteria on subterranean carbon budgets? *Naturwissenschaften* 96:1035–1042. doi:10.1007/s00114-009-0562-5
- Rodriguez-Navarro C, Rodriguez-Gallego M, Chekroun KB, Gonzalez-Muñoz MT (2003) Conservation of ornamental stone by *Myxococcus xanthus*-induced carbonate biomineralization. *Appl Environ Microbiol* 64:2182–2193. doi:10.1128/AEM.69.4.2182-2193.2003
- Rodriguez-Navarro C, Jimenez-Lopez C, Rodriguez-Navarro A, Gonzalez-Muñoz MT, Rodriguez-Gallego M (2007) Bacterially mediated mineralization of vaterite. *Geochim Cosmochim Acta* 71:1197–1213. doi:10.1016/j.gca.2006.11.031
- Scheerer S, Ortega-Morales O, Gaylarde C (2009) Microbial deterioration of stone monuments—an updated review. *Adv Appl Microbiol* 66:97–139. doi:10.1016/S0065-2164(08)00805-8
- Shivkumara C, Singh P, Gupta A, Hedge MS (2006) Synthesis of vaterite CaCO_3 by direct precipitation using glycine and L-alanine as directing agents. *Mater Res Bull* 41:1455–1460. doi:10.1016/j.materresbull.2006.01.026
- Sommerdijk NAJ, de With G (2008) Biomimetic CaCO_3 mineralization using designer molecules and interfaces. *Chem Rev* 108:4499–4550. doi:10.1021/cr078259o
- Spadafora A, Perri E, McKenzie JA, Vasconcelos C (2010) Microbial biomineralization processes forming modern Ca:Mg carbonate stromatolites. *Sedimentology* 57:27–40. doi:10.1111/j.1365-3091.2009.01083.x
- Suzuki M, Nagasawa H, Kogure T (2006) Synthesis and structure of hollow calcite particles. *Cryst Growth Des* 6:2004–2006. doi:10.1021/cg0602921
- Tong H, Ma W, Wang L, Wan P, Hu J, Cao L (2004) Control over the crystal phase, shape, size and aggregation of the calcium carbonate via a L-aspartic acid inducing process. *Biomaterials* 25:3923–3929. doi:10.1016/j.biomaterials.2003.10.038
- Wang J, Becker U (2009) Structure and carbonate orientation of vaterite (CaCO_3). *Am Miner* 94:380–386. doi:10.2138/am.2009.2939
- Wolf SE, Loges N, Mathiasch B, Panthöfer M, Mey I, Janshoff A, Wolfgang T (2007) Phase selection of calcium carbonate through the chirality of adsorbed amino acids. *Angew Chem Int Ed* 46:5618–5623. doi:10.1002/anie.200700010
- Xiao J, Wang Z, Tang Y, Tang S (2009) Biomimetic mineralization of CaCO_3 on a phospholipid monolayer: from an amorphous calcium carbonate precursor to calcite via vaterite. *Langmuir* 26:4977–4983. doi:10.1021/la903641k
- Xie A-J, Shen Y-H, Zhang C-Y, Yuan Z-W, Zhu X-M, Yang Y-M (2005) Crystal growth of calcium carbonate with various morphologies in different amino acid systems. *J Cryst Growth* 285:436–443. doi:10.1016/j.jcrysgro.2005.08.039
- Zamareño DV, Inkpen R, May E (2009) Carbonate crystals precipitated by freshwater bacteria and their use as a limestone consolidant. *Appl Environ Microbiol* 75:5981–5990. doi:10.1128/AEM.02079-08
- Zavarzin GA (2002) Microbial geochemical calcium cycle. *Microbiology* 71:1–17. doi:10.1023/A:1017945329951
- Zhou J, Chafetz HS (2009) Biogenic caliches in Texas: the role of organisms and effect of climate. *Sediment Geol* 222:207–225. doi:10.1016/j.sedgeo.2009.09.003



Vaterite bio-precipitation induced by *Bacillus pumilus* isolated from a solutional cave in Paiania, Athens, Greece



Markos I. Daskalakis^a, Fotis Rigas^{a,*}, Asterios Bakolas^a, Antonis Magoulas^b,
Giorgos Kotoulas^b, Ioannis Katsikis^c, Aristomenis P. Karageorgis^d, Athena Mavridou^e

^a School of Chemical Engineering, National Technical University of Athens, 15700 Athens, Greece

^b Hellenic Centre for Marine Research, Institute of Marine Biology and Genetics & Aquaculture, Heraklion, 71003 Crete, Greece

^c Institute of Geology and Mineral Exploration, Athens, Greece

^d Hellenic Centre for Marine Research, Institute of Oceanography, 19013 Anavyssos, Greece

^e Technological Educational Institute of Athens, Department of Medical Laboratories, Athens, Greece

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 October 2014

Received in revised form

11 December 2014

Accepted 11 December 2014

Available online

Keywords:

Bacillus pumilus

Bioconsolidation

Biomineralization

Vaterite

Marble

Calcium carbonate

ABSTRACT

In this work, *Bacillus pumilus* ACA-DC 4061 was selected for its increased capability for biomineralization on marble, under different nutrient media concentrations and temperature conditions. The optimum conditions for the CaCO₃ bacterially-induced precipitation were determined with the aid of testing based on the Design of Experiments (DoE). Biomineral (vaterite) precipitation was favored in both the temperatures (25 and 30 °C) investigated. Stone loss rate was reduced when the samples were subjected to sonication. Thin sections of the substrate confirmed that vaterite was able to adhere onto the surface. Finally, under non-sterile conditions mimicking an *in situ* application, *B. pumilus* ACA-DC 4061 formed a fine layer of calcium carbonate. Therefore, this microorganism showed that vaterite formation may consistently occur under specific conditions and could prove useful as a candidate for on-site applications for stone conservation.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

Looking back on Earth's history, we can appreciate the role played by bacteria in its evolution (Gadd, 2010). Recent scientific proof confirms the fact that bacteria had consistently participated in calcium carbonate deposition, thus improving the environmental conditions for further evolution of life (Zavarzin, 2002). Their great importance is presented by the ongoing research with reference to their remnants in the geological samples that may shed light on the planet's formation and history (Douglas, 2005). To date, substantial research is being conducted in order to interpret the processes of precipitation of the different calcium carbonate polymorphs due to their environmental and industrial importance. Besides understanding Earth's history and cave development (Barton and Northup, 2007), this knowledge also serves to promote the various sciences, including those of surgery and dentistry (Pecher et al., 2009), biomediated soil improvement (DeJong et al.,

2010) and to improve the methods of CO₂ storage (Lee et al., 2010). Stone has found extensive use as a construction material, evident from the existing architectural monuments and statues. Nevertheless, the industrial revolution has accelerated the deterioration and degradation of several stone monuments through the emission of anthropogenic pollutants that interact with the physical (rain, air, sunlight) (Pope et al., 2002; Smith et al., 2008) and biological factors (Warscheid and Braams, 2000; Scheerer et al., 2009).

Previous research had focused initially on understanding the negative effects of bacterial proliferation upon different substrates and the correlation between the physical and microbial factors. Today, the beneficial features of bacterial metabolism are being investigated for stone protection, namely their ability to promote calcium carbonate precipitation under appropriate environmental and nutrient conditions (Boquet et al., 1973). Members of the *Bacillus* genus are among those more intensively investigated due to their ubiquity in nature.

One of the first microorganisms to be investigated in light of monument bio-restoration was the heterotrophic bacterium *Bacillus cereus* (Castanier et al., 2000). Based upon the patent applied (Adolphe et al., 1990), it was studied under specific nutrient

* Corresponding author.

E-mail addresses: fotios.rigas@gmail.com, rigasf@central.ntua.gr (F. Rigas).

URL: <http://www.chemeng.ntua.gr>

conditions that provided the appropriate elements for calcium carbonate biomineralization. The methodology was evaluated in buildings and statues in France, and recently it was applied on plaster (Anne et al., 2010). One particular *B. cereus* strain isolated from a cave, has recently been reported to produce calcite under different nutrient conditions (Han et al., 2013).

Bacillus sphaericus possesses the advantage of the urease enzyme that, when selectively induced, promotes biomineralization (Hammes et al., 2003). Experimentation on limestone (Dick et al., 2006; De Muyck et al., 2013) and concrete (De Muyck et al., 2008a, b; Kim et al., 2013) revealed the potential of implementing this microorganism. *Sporosarcina pasteurii* (formerly *Bacillus pasteurii*), is another urease positive microorganism (Stocks-Fischer et al., 1999) tested primarily on concrete as an effective mixture component and for the bio-remediation of cracks. Results showed that although it did not provide satisfactory results for the first scenario, it could prove useful in shallow – crack remediation (Ramachandran et al., 2001). The latter, was further investigated with the application of immobilized cells in polyurethane foam (Bang et al., 2001) or premixed with sand and applied on cracks (Achal et al., 2013). A different approach to circumvent the mortality of *S. pasteurii* on concrete is the development of phenotypic mutants that can survive under conditions of high pH without the loss of ureolysis (Achal et al., 2009). The same microorganism was recently tested on bricks (Sarda et al., 2009).

Additional *Bacillus* species reported for their carbonatogenic activity are *Bacillus megaterium* (Cacchio et al., 2003), *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus pumilus* (Baskar et al., 2006), *Bacillus pseudofirmus*, *Bacillus cohnii* (Jonkers et al., 2010), *Bacillus alkalinitrilicus* (Wiktor and Jonkers, 2011) and other *Bacillus* strains yet to be identified at the genus level (ChunXiang et al., 2010). Microorganisms from this genus have constantly been detected when selected media, which activate calcium carbonate biomineralization, were applied on quarried or decayed stone (Piñar et al., 2010; Ettenauer et al., 2011; Jroundi et al., 2012).

Investigation of the carbonatogenic ability of the isolates from stone or cave surfaces continues to remain of importance in order to understand the dynamics of the microorganisms and improve the growth media applied. Furthermore, the morphology of the biominerals deposited would assist in the differentiation between the inorganic and microbially induced biomineralization. Recently, bacterial isolates such as *B. cereus*, *Bacillus licheniformis* (Daskalakis et al., 2013) and *Cupriavidus metallidurans* ACA-DC 4073 (Daskalakis et al., 2014) were tested for their biomineralization capabilities. Similarly, we isolated and identified microorganisms isolated from a cave in Paiania, in the vicinity of Athens, Greece. One of the isolates, *B. pumilus* ACA-DC 4061, exhibited considerable biomineralization capability in the growth medium selected. Further investigations were done in order to delineate its potential to be applied on stone or exploited, if identified, in the stone microflora. Different media and growth parameters were investigated in order to detect the optimum bio-precipitation conditions and the endurance of the biomineral, which was mainly vaterite. Spraying the microorganism was tested under non-sterile conditions to partially mimic an *in situ* application and establish its potential and practicality. Finally, the statistical analysis presented and the biomineralization efficiency are discussed.

Materials and methods

Isolation, purification and genetic identification of *Bacillus pumilus* ACA-DC 4061

Samples for the current investigation were collected from a cave in Paiania district, near the city of Athens. The cave is accessible to

visitors only during dry seasons. The following sample types were obtained: (i) cave wall material collected by sweeping the wall surface with sterile cotton swabs, which were subsequently immersed in nutrient broth; (ii) water dripping from stalactites immediately stored in sterile test tubes; (iii) non-coherent soil material from the sides of the stalagmites and (iv) water samples from a small pool of concentrated water percolating from the cave walls and stalactites hanging above. All the samples were obtained from sites far away from the visitors' walking path, lacking a direct light source and without an obvious chromatic difference. All the samples were stored immediately on ice for transport. Isolation and genetic identification were done as described previously (Daskalakis et al., 2013). The isolate, identified as *B. pumilus* ACA-DC 4061, was deposited in the Greek Bacterial Collection of Agricultural University of Athens – Greece – Laboratory of Dairy Research.

Growth media for biomineralization experiments

The basic growth medium implemented (BP1x) was 0.36 g of Bacteriological Peptone (LABM, Lancashire, UK) and 2.5 mL of 10% (w/v) calcium acetate solution [(CH₃COO)₂Ca (Sigma–Aldrich, Munich, Germany)] in 100 ml deionized water. The growth media with 2x (BP2x) and 3x (BP3x) in the concentration specified above were also used during the biomineralization experiments. Liquid media were sterilized by autoclaving for 17 min at 15 psi – 121 °C. Screw-cap bottles of 250 mL capacity were filled with 100 ml of the growth medium. Qualitative observation of growth was performed by measuring the absorbance at 620 nm with a Hach DR-2000 spectrophotometer (HACH LANGE, Athens, Greece). The bacterial population (in CFU mL⁻¹) was calculated employing the serial dilution method.

Stone substrate

Marble from Penteli Mountain had been used in antiquity for several monuments and statues due to its high quality. Similar marble can be quarried only in the area of Dionysus (Daskalakis et al., 2013). Tiles made from this marble, were cut to sizes of 4 cm × 1 cm × 1–1.5 cm or 4 cm × 4 cm × 2 cm and used as the solid substrate.

Optimization of biomineralization factors

The biomineralization ability of *B. pumilus* ACA-DC 4061 was optimized through a series of tests based on the Design of Experiments (DoE). A Multilevel Factorial Design was used to construct a second order response surface with three design factors, namely, incubation temperature (X_1), medium concentration as regards to bacteriological peptone – calcium acetate (X_2) and inoculum concentration (X_3). The design consisted of 15 trials replicated 5 times. The response selected under optimization was weight increase Y (g). The data of the statistical experiment were analyzed using the software Design-Expert 6.0.6 to determine the various components of the Analysis of Variance (ANOVA). The statistics that were used to determine whether the models, thus constructed, adequately described the experimental data included the significance of the models, lack-of-fit test and adequate precision statistic.

All the samples were analyzed for bacterial concentration, pH, calcium and acetate concentration, biomineral type and its morphology, as described below.

Optimal biomineralization experiment

The equation determined from the mathematical model mentioned above provided the optimal values regarding the

temperature, growth medium concentration and inoculum concentration. The consistency of the results was established in the final experiment, where the biodeposition process was monitored for 15 days. The inoculation of the microorganism was time zero and four samples were extracted and analyzed from the experiment once every three days.

Analysis of experimental samples

The stone samples retrieved were allowed to dry at 50 °C for 24 h prior to weighing. The quantity of calcium carbonate precipitate was calculated from the weight difference recorded before and after the treatment. Calcium and acetate monitoring, X-ray diffraction (XRD) and Fourier Transform InfraRed spectroscopy (FT-IR) of the biomineral, Scanning Electron Microscopy (SEM) and thin sections of the stone samples were analyzed as described in Daskalakis et al. (2013). Additional FT-IR analysis was performed on the biomineral samples (mainly vaterite), which were individually stored in plastic containers at room temperature for up to two years in order to detect any potential biomineral transformation (Daskalakis et al., 2014).

Weight loss with ultrasonic treatment

Biomineralized and control stone samples (from the experiments conducted under sterile conditions) were immersed in an upright position in deionized water (one of their small sides 1 cm × 1–1.5 cm was touching the bottom of the glass beaker). Sonication was applied for 5 min (40 kHz, Branson 5510, Danbury, CT, USA) and the samples were immediately rinsed with deionized water and dried at 50 °C for 24 h prior to weighing. The process was repeated five times (Daskalakis et al., 2013). The results are presented as ΔWt (%) according to the equation given below:

$$\Delta Wt(\%) = \left[\frac{(W \text{ prior sonic} - W \text{ after each sonic})}{W \text{ prior sonic}} \right] \times 100$$

Color measurement

The chromatic aspect of the stone after the biodeposition treatment was determined using a portable DR LANGE spectrophotometer (TYPE LMG183) instrument (HACH-LANGE, Athens, Greece). Reflectance measurements were recorded at five different points on the surfaces of all treated samples and the controls after they had been subjected to sonication tests, thus providing the L^* , a^* , and b^* values. The mean value was calculated from the instrument's software (DR LANGE spectral = qc version 3.51) and used to calculate the total color difference ΔE applying the following equation:

$$\Delta E = \left[\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2} \right]^{1/2}$$

with Δ being the difference between the values of the treated samples and the values of the reference samples, which were those without the inoculum, L^* (lightness: 0 being black and 100 being diffuse white), a^* (negative values indicate green, whereas positive values indicate redness) and b^* (negative values indicate blue and positive values indicate yellow).

Evaluation of the biodeposition treatment under non-sterile conditions

The approach selected was similar to the one described previously to enable result comparability (Daskalakis et al., 2014).

Briefly, six marble stone samples (4 cm × 4 cm × 2 cm) were horizontally placed on an aluminum tray creating an exposed surface area of 96 cm². The bacteria were re-established from the frozen stocks in the BP3x growth medium in line with the optimum growth conditions identified and prepared for spraying. Every 12 h the sample area was sprayed once with 10 ml of a three- to four-day-old bacterial culture until it was fully covered, in a concentration of the 8×10^8 – 1×10^9 CFU mL⁻¹ range. The aluminum tray was incubated at 30 °C in a non-sterile incubator for 12 days. At the end of the experiment, a cotton swab was passed across the stone surface and the agar plates were inoculated with it to investigate if the stone surface hosted other microorganisms besides *B. pumilus* ACA-DC 4061. The stones were sprayed with sterile deionized water to remove the bacterial excess and loosely deposited CaCO₃. They were then dried at 50 °C for 24 h, weighed and analyzed by scanning electron microscopy (Daskalakis et al., 2014).

Results

Isolation, purification and identification of *Bacillus pumilus* ACA-DC 4061

Initial identification of the microorganism was successful using the API biochemical tests. Our results compared with the identification Table of API 50CHB and previous studies (Lovett and Young, 1969; O'Donnell et al., 1980; Priest et al., 1988) revealed similarities besides acid production from the galactose and xylose that were negative for our isolate. Interestingly, a negative utilization of the acetate had been previously reported (Priest et al., 1988). The isolate, however, attested to the opposite, as will be presented later. The almost full length 16S rDNA was compared in the database and the phylogenetic tree was constructed (Suppl. Fig. 1), which corresponded to *B. pumilus* (accession number JQ046373). The isolate was therefore, deposited under the name *B. pumilus* ACA-DC 4061.

Growth requirements for the biomineralization experiments

B. pumilus ACA-DC 4061 was able to grow in the bacteriological peptone medium regardless of its concentration. The growth curve is presented in Suppl. Fig. 2, with the corresponding bacterial population, performed in a 500 ml conical flask. The lag phase lasted for a few hours and the first exponential phase was a result of the assimilation of the bacteriological peptone. A second minor lag phase preceded the onset of the acetate assimilation that induced the diauxic growth after 72 h, over a 24-h period. During this time period, the bacterial population almost doubled, reaching its maximum at 7.0×10^9 CFU ml⁻¹. During acetate consumption, the solution color changed from light yellow to a white emulsion. The color change of the medium qualitatively indicated that the biomineralization process was under way.

Optimization of the biomineralization factors

After running all 60 trials of the Multilevel Factorial Design, the data produced from the statistical experiment were treated with well-established statistical diagnostics to exclude the non-acceptable ones. The final 57 runs were used to construct the coded design model of the optimization parameter (response) selected.

The significant effects of having p-values less than 0.05 (indicating that they are significantly different from zero at the 95% confidence level) were used for further analysis, while the rest were excluded from the models. Thus, the following reduced second order regression model was constructed. The model was fitted to

Table 1

Model significance, lack-of-fit test and adequate precision used to test the adequacy of the constructed statistical model.

	Model significance	Lack-of-fit	Adequate precision
Desirable values	p-value < 0.05	p-value > 0.05	Signal to noise ratio > 4
Values calculated	0.0021	0.7986	8.074

Table 2

Coded and natural values of design factors and final results of the Multilevel Factorial Design.

Design factors	−1	0	1	Optimum (coded values)	Optimum (natural values)
X_1 : Temperature (°C)	25	30	35	−1.0/0.0 ^a	25/30 ^a
X_2 : Medium Concentration (gr/100 ml)	0.36	0.72	1.08	1.0	1.08
X_3 : Inoculum volume (ml)	0.5	1.0	1.5	0.0	1.0

^a 30 °C was selected as an additional evaluation point.

the data for the coded values of the factors after previously having excluded all the insignificant effects:

$$Y_1 = 0.0478 + 0.0105X_1 + 0.0119X_2 - 0.0167X_1X_2$$

where: Y_1 is the maximum weight increase, X_1 is temperature (°C), X_2 is the medium concentration (gr/100 ml) and X_3 the inoculum volume (ml) factor.

The X_3 , X_1^2 , X_2^2 , X_3^2 , X_2X_3 and X_1X_3 factors were excluded as insignificant. The model thus derived was then tested with the

statistics: model significance, lack-of-fit and adequate precision (Table 1). The results indicate that the model complied with all of the desirable values of the statistics.

The optimal value of the response was calculated from the reduced model and is shown together with the corresponding natural values of the factors in Table 2.

The model was provided with an optimum at the lowest temperature evaluated (25 °C). Nevertheless, the examination of the raw data from all the experimental series performed revealed that the highest biomineralization value was achieved at 30 °C, while the maximum at 25 °C was slightly lower. Therefore, for comparison purposes, an additional evaluation at 30 °C was performed while maintaining the other two design factors the same.

Evaluation of optimum biomineralization parameters

The starting conditions in both temperatures were similar while the color of all the media after diauxic growth transformed in a white emulsion; verifying the qualitative assessment for a successful test.

At 25 °C, acetate became part of the microorganism's nutrient source sooner than the 3rd experimental day, that the first set of samples were isolated, while at 30 °C, acetate utilization initiated after the 3rd day. In both experiments similar small amounts of acetate were unused at the end of the experiments. After day 6, the acetate assimilation is faster at 25 °C, although the end point was the same. The rate of acetate assimilation revealed a notable difference. At 25 °C, the fast rate of acetate utilization occurred until day 9, after which it decreased. However, at 30 °C, the acetate utilization increased until day 6 and then remained stable throughout the experiment (Fig. 1a). The bacterial population

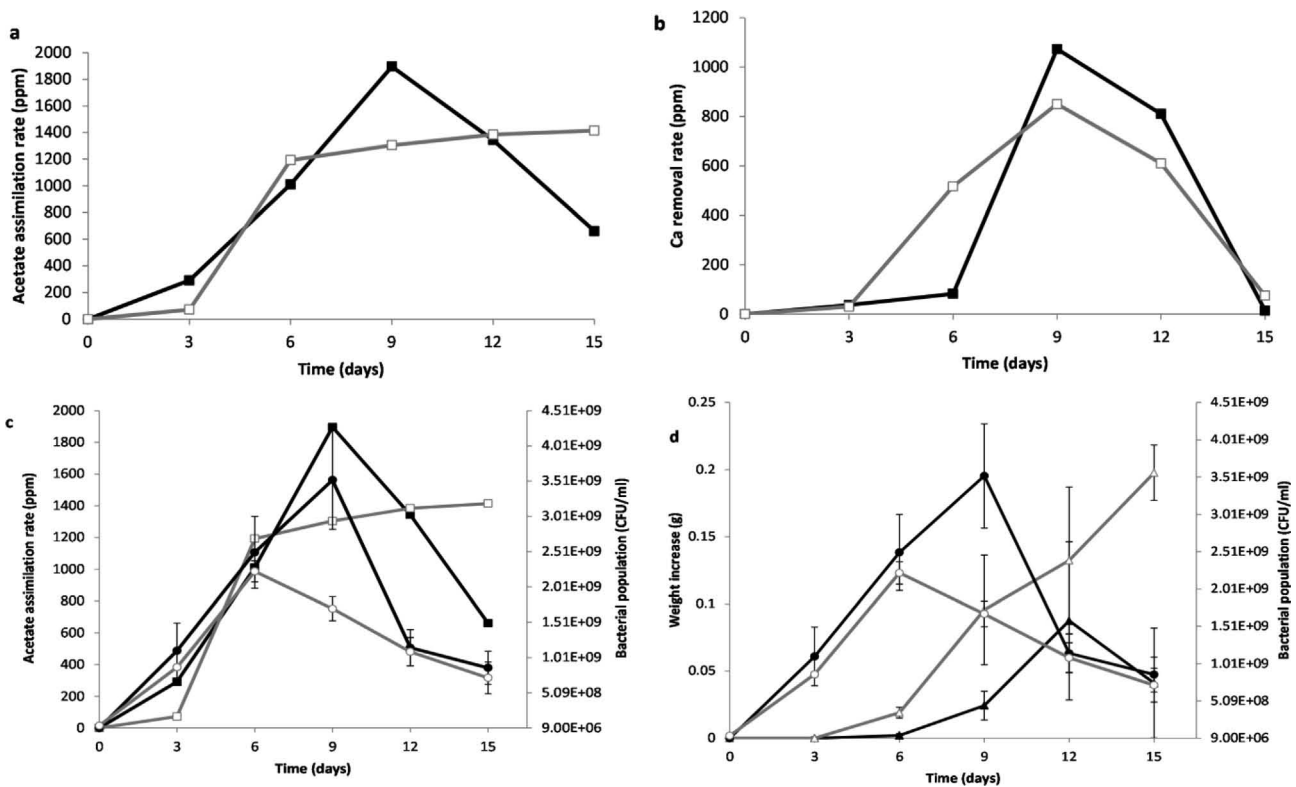


Fig. 1. Diagrams representing acetate and calcium removal, weight increase and cell density. (a) —■—: 25 °C acetate assimilation rate and —□—, 30 °C acetate assimilation rate; (b) —■—, 25 °C calcium removal rate and —□—, 30 °C calcium removal rate; (c) —■—: 25 °C acetate assimilation rate, —●—: 25 °C bacterial cell concentration, —□—: 30 °C acetate assimilation rate, —○—: 30 °C bacterial cell concentration; (d) —■—: 25 °C weight increase on marble samples, —●—: 25 °C bacterial cell concentration, —□—: 30 °C weight increase on marble samples, —○—: 30 °C bacterial cell concentration. Error bars: Standard Deviation.

presented differences according to the nutrient assimilation (Fig. 1c). At both temperatures the bacteria increased in parallel with acetate assimilation. Nutrient depletion caused a sharper decrease in the cell numbers at 25 °C compared to 30 °C, while the final cell population in both experimental conditions was similar after day 12. In both temperatures, calcium removal initiated after the 3rd day, with immobilization being faster at 30 °C than at 25 °C. The calcium rate removal graph (Fig. 1b) shows that the calcium immobilization had a smoother curve at 30 °C compared with the abrupt increase between day 6 and day 9 at 25 °C. At 30 °C, the calcium was utilized for a longer time span (12 days) compared with the experiment at 25 °C (9 days). Despite the fact that at 25 °C the bacterial population increased faster and in a higher concentration, it did not result in an improved utilization of calcium for biomineralization. This exerted a direct effect upon the final degree

of bio-precipitation observed (Fig. 1d). At 30 °C, the constant rate of acetate assimilation and the longer time period that calcium was part of the reaction in the solution, plus the lower numbers of the bacterial population resulted in a continuous weight increase on the marble samples throughout the entire duration of the experiment. However, at 25 °C, the biomineralization was delayed and revealed a decrease in the final sample set (day 15).

The FT-IR and XRD sample analysis under the two temperatures tested showed that at 30 °C, vaterite was the only polymorph identified throughout the experiment, whereas at 25 °C, the vaterite was observed in the samples after day 12. Prior to that, the biomineral demonstrated to be a mixture of calcite and vaterite, and in one case, a sample from day 6, calcite was the only polymorph detected. The spectra for both polymorphs are presented in Fig. 2.

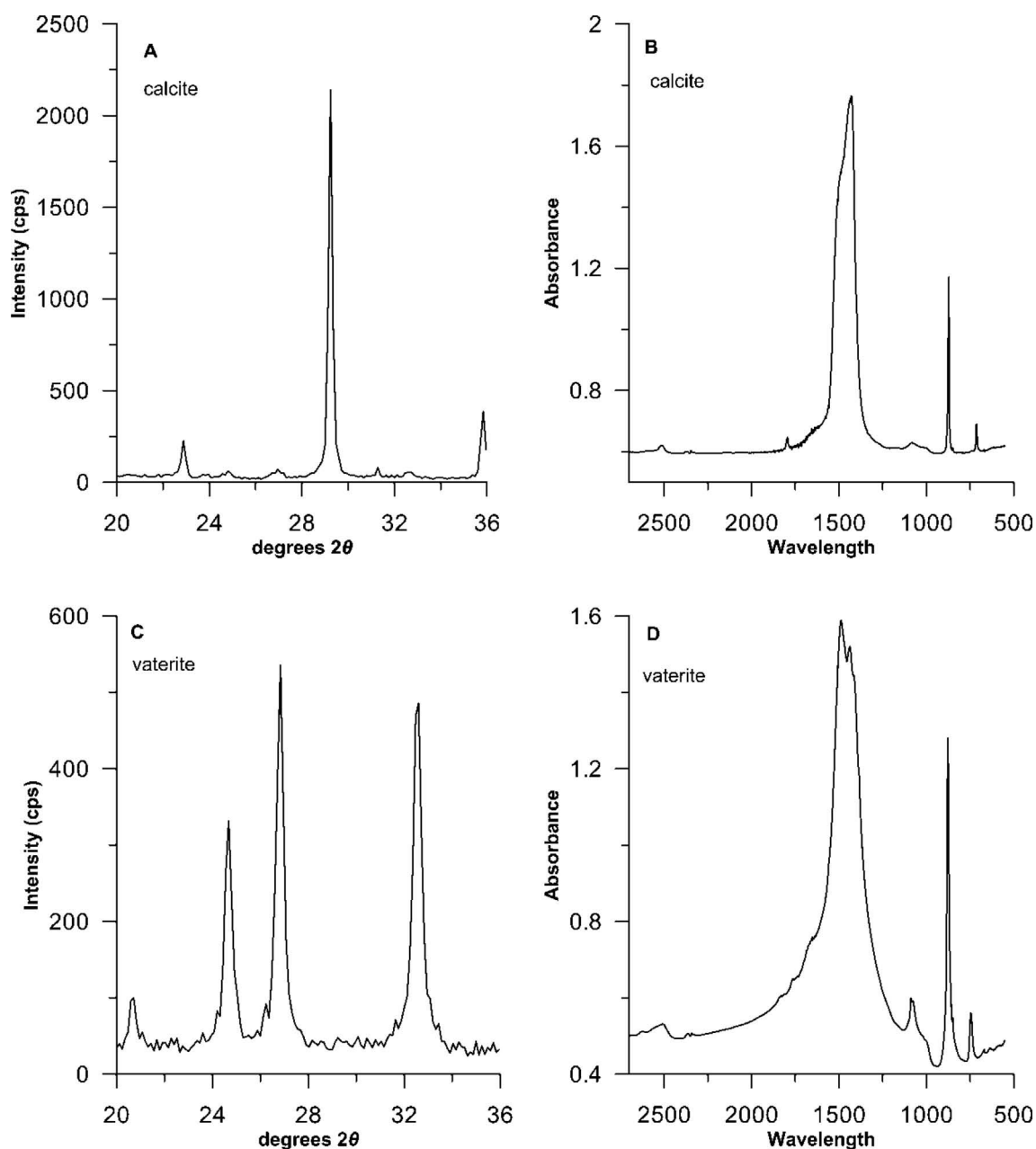


Fig. 2. XRD and FTIR spectra of calcite (A and B) and vaterite (C and D) identified in biomineralization experiments. Calcite peaks on FTIR are at 713, 875, 1423 (single), 1794 and 2516 cm^{-1} . Vaterite peaks are at 745, 875, 1084, 1437–1487 (double peak) and 2508 cm^{-1} . In XRD, the corresponding 2θ degrees for calcite were at 23.05 (9%), 29.40 (100%), and 35.96 (15%) and for vaterite were at 24.87 (90%), 27.01 (100%), and 32.80 (90%).

The morphological characteristics of the biomineral during the 30 °C experimental session are presented because this was the temperature that provided the optimum results (Fig. 3). Fig. 3a shows the blank marble surface at the end of the experiments. No apparent precipitation is obvious that could imply the inorganic formation of CaCO₃. Fig. 3b shows a sample from day 6 where bio-precipitation could be identified. A lower magnification is used in order to display both the substrate and vaterite. Biomineral particles, with spherical morphologies, dictate the new vaterite. Fig. 3c corresponds to day 9 where complete coverage of the surface was achieved. The cracks detected are observed in all the samples and may be due to the vacuum applied during scanning electron microscopy. However, the cracks did not pose any threat to the consistency of the biomineral, as will be discussed later. Fig. 3d–f show the vaterite morphology from day 9 to day 15 of the experiment, where complete substrate coverage was achieved. In Fig. 3d the black arrows indicate the biomineralized bacteria that are entangled with the micritic spheres, represented by the white arrows. While the bio-precipitation is ongoing, more biomineralized bacteria are deposited on the surface (Fig. 3e) and by the end of the experiment the microcrystalline spheres prevail, forming the final vaterite layer (Fig. 3f).

Weight loss with ultrasonic treatment and color measurements

The average weight loss percentage (Fig. 4) revealed a detectable consolidation effect of the new biomineral from 6 day samples. Better results were obtained for samples from day 9 to day 15. The day 15 samples provided slightly poorer consolidation results when compared with those of day 12. During sonication, the biomineral loosely attached onto the surface or marble fragments, where completely removed. The coherence of the vaterite layers is

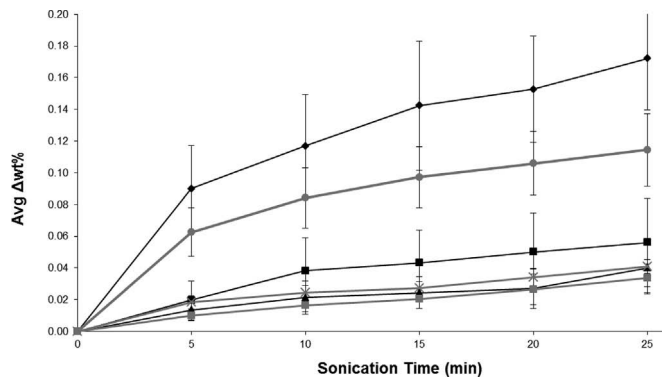


Fig. 4. Average weight loss percentage from marble samples during each sonication treatment. A detectable reduction in weight loss is shown for the samples from 6th to 15th experimental day. (◆) 3rd day samples; (●) blank; (■) 6th day samples; (▲) 9th day samples; (■) 12th day samples and (×) 15th day samples. Error bars: Standard Deviation.

presented compared with the cleared marble surface (Fig. 5a), while the morphology remained unaltered (Fig. 5b).

Sonicated samples were cut into thin sections and analyzed. Fig. 6 shows the continuous vaterite layer that covered the marble. Regardless of the sonication treatment, thin section analysis did not reveal any significant fragmentation in the biomineral infrastructure. The new layer was compact and clearly distinguishable under the microscope following the anaglyph of the substrate (Fig. 6a). Cracks are attributed to sample preparation and are clearly visible in the electron photomicrographs of the thin sections (white arrow Fig. 6b) analyzed semi-quantitatively with EDS. The bio-consolidation efficiency of the bacterially induced vaterite is

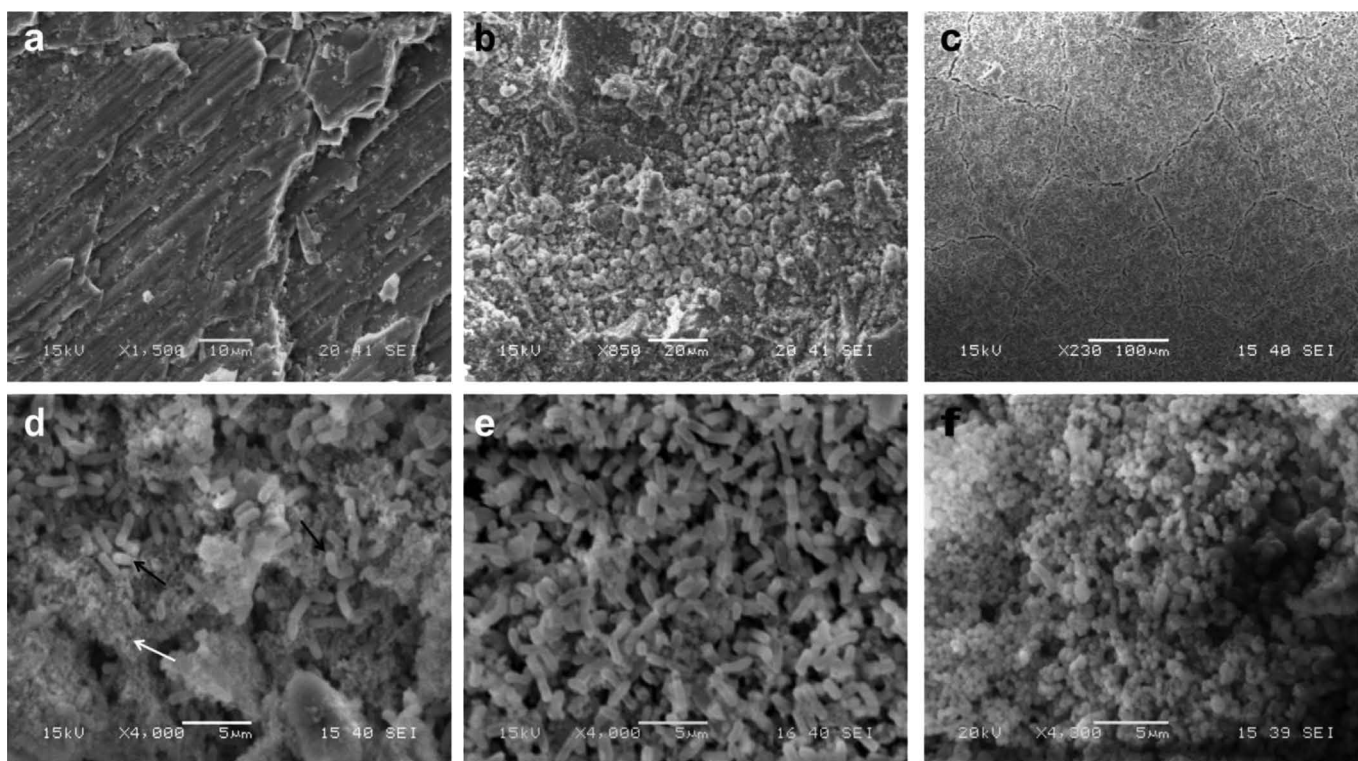


Fig. 3. Scanning electron microscopy of marble samples under optimum biomineralization conditions (30 °C). (a) Blank marble; (b) marble surface the 6th experimental day where initial biomineralization was identified; (c) complete coverage of the marble surface on 9th experimental day; (d) magnification of (c) where biomineralized cells (black arrows) and micritic spheres (white arrow) are the prevailing morphologies; (e) biomineral morphology on the 12th experimental day where biomineralized bacteria were mainly observed and (f) biomineral morphology on the final (15th) experimental day where both morphologies continue to contribute in precipitation but micritic spheres seem to prevail.

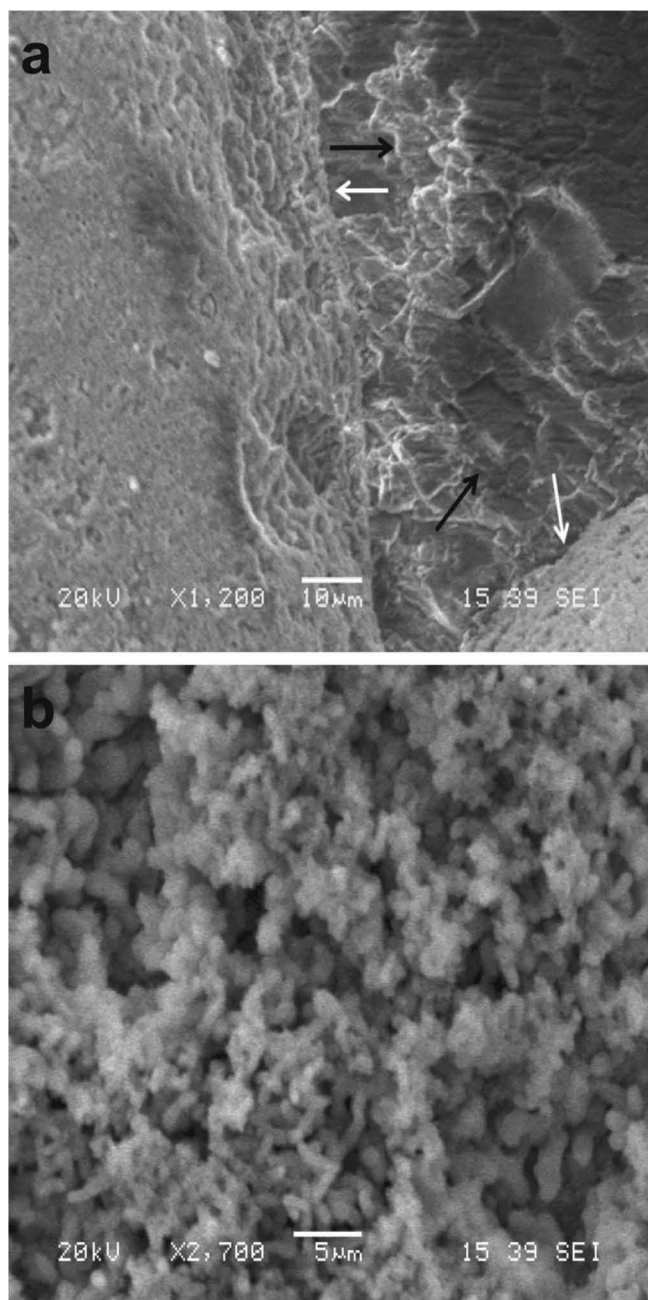


Fig. 5. Scanning electron photomicrographs. (a) Day 12 sample subjected to sonication treatment. The right side is the marble substrate (black arrows), with the left and lower right being the biomineral (white arrows). The photomicrograph is focused upon the surface of the substrate showing the difference in height and the consecutive layers of vaterite. Substrate's surface was completely cleared from loose material or marble fragments; (b) Magnification of the biomineral showing vaterite's preserved morphological characteristics after sonication.

presented by the filling up of the voids between the marble fragments (Fig. 6b white arrowheads). Semi-quantitative analysis of the left side of the sample (biomineral, Fig. 6b) could be distinguished from the substrate by trace amounts of phosphorus. The substrate did not show that peak (Suppl. Fig. 3).

After sonication, each sample was tested for its color differentiation. Control samples revealed no color differentiation. In samples where almost the entire surface was covered with vaterite, a distinct color difference in all the chromatic coordinates was visible (Table 3). ΔL^* and Δa^* did not show considerable difference. Values

in the b^* axis, yellow (positive) – blue (negative), showed a positive increase denoting more amounts of yellow color in the newly formed biomineral. Therefore, the ΔE coordinates, representing the total color difference, are affected primarily by the differences in the b^* values. ΔE exceeded the limit of $\Delta E \geq 3$ which is regarded as the difference detected by the naked eye. Most of the values, among the samples with a profound bio-consolidation effect, fall between $3.5 < \Delta E < 6$ denoting a detectable difference.

Evaluation of the biodeposition treatment

Based on the data for acetate and calcium consumption under optimum conditions, the time span that each solution was applied for was 72–96 h, literally day 3 to day 4. Therefore, it was the onset of the acetate assimilation, calcium immobilization and bacterially induced precipitation that ensured that the results would be due to the ability of *B. pumilus* ACA-DC 4061 to promote biomineralization *in situ*. Concentration of the sprayed bacterial population was similar to the values achieved under optimum conditions. Fig. 7a shows a site with no obvious biomineralization, at the end of the treatment, while Fig. 7b presents a different area where the biomineralization occurred partially; bacteria first accumulated either wherever the marble crystals changed direction or in the surface cavities. Fig. 7c proves the presence of areas with a consistent new layer of biomineral covering the marble surface. Complete coverage was not achieved. Nonetheless, that can be accomplished by spraying a higher quantity of the bacterial solution. Fig. 7d–f present the morphology of the biomineral which proved to be analogous to sterile conditions: hollow hemispherical morphologies (Fig. 7d) where the cells “escaped” complete entombment from the CaCO_3 and biomineralized bacteria (Fig. 7e). Actual dimensions of both are revealed under high magnification (Fig. 7f). The color coordinates remained low (Table 3), mainly due to the fact that the samples were covered with less biomineral than those under sterile conditions.

Discussion

In this study we intended to investigate the mineralogy and morphology of calcium carbonate precipitation during the *B. pumilus* ACA-DC 4061 growth. Such an investigation could assist in determining whether the isolated strain could potentially be considered for the conservation intervention of stone monuments.

The Dionysus marble selected is a challenging substrate as it falls among the stones having the lowest porosity. The lack of pores does not provide readily accessible sites for microorganisms to colonize the substrate.

The growth medium implemented is of key importance for the biomineral outcome. Numerous media have been utilized with B4 medium suggested by Boquet et al. (1973), being the first option for the preliminary experiments (Marvasi et al., 2012). Based on that medium we redeveloped one with bacteriological peptone as the main component and different isolates were able to promote biomineralization (Daskalakis et al., 2013, 2014). *B. pumilus* ACA-DC 4061 was able to grow rapidly in this medium, as evident by its growth curve (Fig. S2). Furthermore, the pH could be adjusted to a value close to 8, thus reducing the incubation time for initiating biomineralization, while the microorganism further increased the pH of the solution during the experimental period. An alkaline environment is critical for successful biomineralization (De Muyne et al., 2010; Marvasi et al., 2012) promoted by bacterial metabolism.

Statistical analysis was investigated to assess whether it could predict the optimum biomineralization values for the parameters selected (temperature, growth medium and inoculum

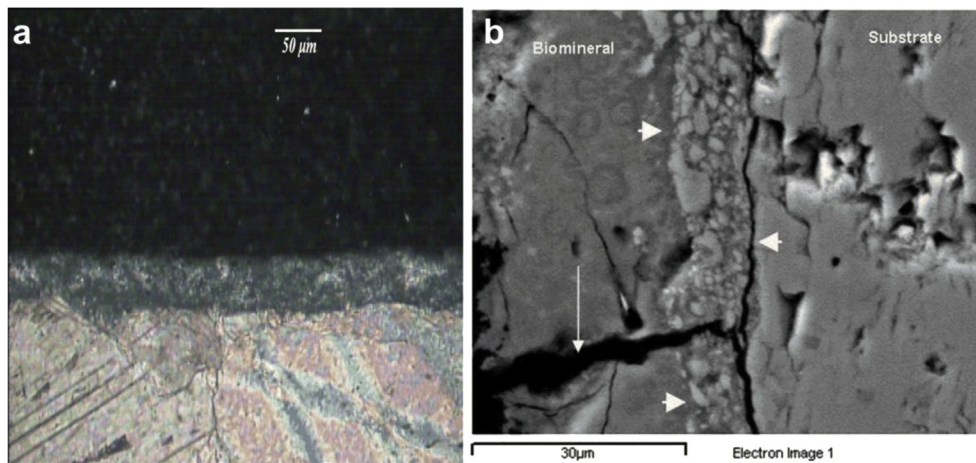


Fig. 6. Microscope analysis of thin sections of sonicated sample. (a) Sample after 12 days of incubation under the polarized microscope. The continuous biomaterial layer is shown, following the anaglyph of the substrate; (b) same sample under the electron microscope. The left side of the picture presents the biomaterial; the right side presents the marble substrate. Higher magnification shows that the novel material was detached as a whole due to forces exercised upon sample preparation, although the following of the anaglyph is still observable. The thin white arrow presents a perpendicular fissure of the biomaterial. Marble fragments (white arrowheads) were consolidated with the novel vaterite layer.

concentration). The lowest temperature of 25 °C was actually among the values that showed high biomineralization efficiency. Nevertheless, experimental knowledge regarding the microorganism's optimum growth conditions dictated that 30 °C was the temperature at which the *B. pumilus* ACA-DC 4061 would show optimum growth. The raw data (not shown), from the series of experiments performed indicated that the highest biomineralization value resided among the 30 °C trials. Therefore, this temperature was also tested maintaining the rest of the parameters as identical. It was proven that 30 °C supported a stable nutrient assimilation that resulted in higher bio-precipitation (Fig. 1d). In a previous investigation of a Gram-negative microorganism (*C. metallidurans* ACA-DC 4073), a similar statistical design provided a set of parameters that was experimentally confirmed (Daskalakis et al., 2014). In the present study, all the sets of 15 trials per statistical

experiment were performed simultaneously in order to avoid any bias between the different experimental days. The model obtained proved helpful in decreasing the experimental time necessary to investigate a wide range of different conditions. *B. pumilus* ACA-DC 4061 proved its ability to induce the CaCO₃ biomineralization within a specific range of temperatures and growth medium concentrations.

Acetate considerably assisted in the biomineralization process by increasing the cell population via diauxic growth. Cell concentration proved critical under the experimental conditions investigated. A higher utilization of acetate and cell concentration should cause a higher immobilization of calcium and eventually a faster biomineralization rate. However, the opposite was documented: *B. pumilus* ACA-DC 4061 at 25 °C, despite the overall faster acetate utilization and higher cell concentration, it produced less biomineral compared to 30 °C. According to the vaterite morphology, the biomineralization of cells was the main morphology of the bio-precipitate. At 30 °C, lower cell concentration and their concurrent biomineralization provided a steady formation of vaterite on the marble. At 25 °C, the increased cell concentration caused higher calcium dispersion on the live cells and possibly its concentration was insufficient to biomineralize the whole cells.

Calcium was practically exhausted until the 12th experimental day, while there was still a portion of acetate that remained unutilized. Such nutrient conditions may explain the slight difference in the final vaterite morphology identified on the substrates. Spherical vaterite seems to prevail at the end of the experiment (Fig. 3f) when compared with the rod-shaped vaterite observed on the samples from day 12 of the experiment (Fig. 3e). The quantity of calcium is insufficient to biomineralize all cells, while their metabolism promoted the micritic sphere formation in close vicinity of the cells. Nevertheless, biomineralized bacteria continued to be identified among the spheres.

In our experiments the consistency of vaterite formation is noteworthy. Vaterite is the least stable among the three anhydrous polymorphs of calcium carbonate and transforms to the most stable calcite under ambient conditions of temperature and pressure (Suzuki et al., 2006). This holds true during inorganic precipitation. When the organic molecules and biomolecules enter into the process, the stability of the vaterite gets improved.

Stearic acid monolayers (Mann et al., 1988) and phospholipid monolayers (Xiao et al., 2009) stabilize the vaterite. Amino acids

Table 3

Chromatic coordinates of sonicated marble substrates after the optimum-conditions experiment of *B. pumilus* ACA-DC 4061 biomineralization (3 day–15 day samples) and after the spraying application under non sterile conditions (No 1–No 4 samples).

Date of samples	Avg ΔL^*a	Avg Δa^*a	Avg Δb^*a	Avg ΔE^*
3-day marbles	0.06	0.13	0.04	0.22
6-day marbles	-1.31	-0.05	2.19	2.66
9-day marbles	-2.13	-0.28	3.15	4.09
12-day marbles	-1.42	-0.38	4.69	4.96
15-day marbles	-1.05	-0.65	6.22	6.37
Control marble	L ^{*b} 90.56	a ^{*b} -0.85	b ^{*b} -1.37	
Sample No	ΔL^*c	Δa^*c	Δb^*c	ΔE^*
1	0.69	-0.48	1.51	1.79
2	0.63	-0.63	2.83	2.97
3	1.26	-0.54	2.95	3.25
4	2.57	-0.39	2.77	3.80
Control marble	L ^{*b} 84.98	a ^{*b} -0.9	b ^{*b} -1.99	

^a Values correspond to the average from 3 samples for each experimental day. For each one of the 3 samples, 5 measurements were taken from different surface positions and the average value was calculated from the instrument's software.

^b For control marble, the actual values are presented for comparison purposes.

^c For the experiments under non sterile conditions for each numbered sample the average of 5 measurements from the substrate's surface are presented as calculated from the instrument's software.

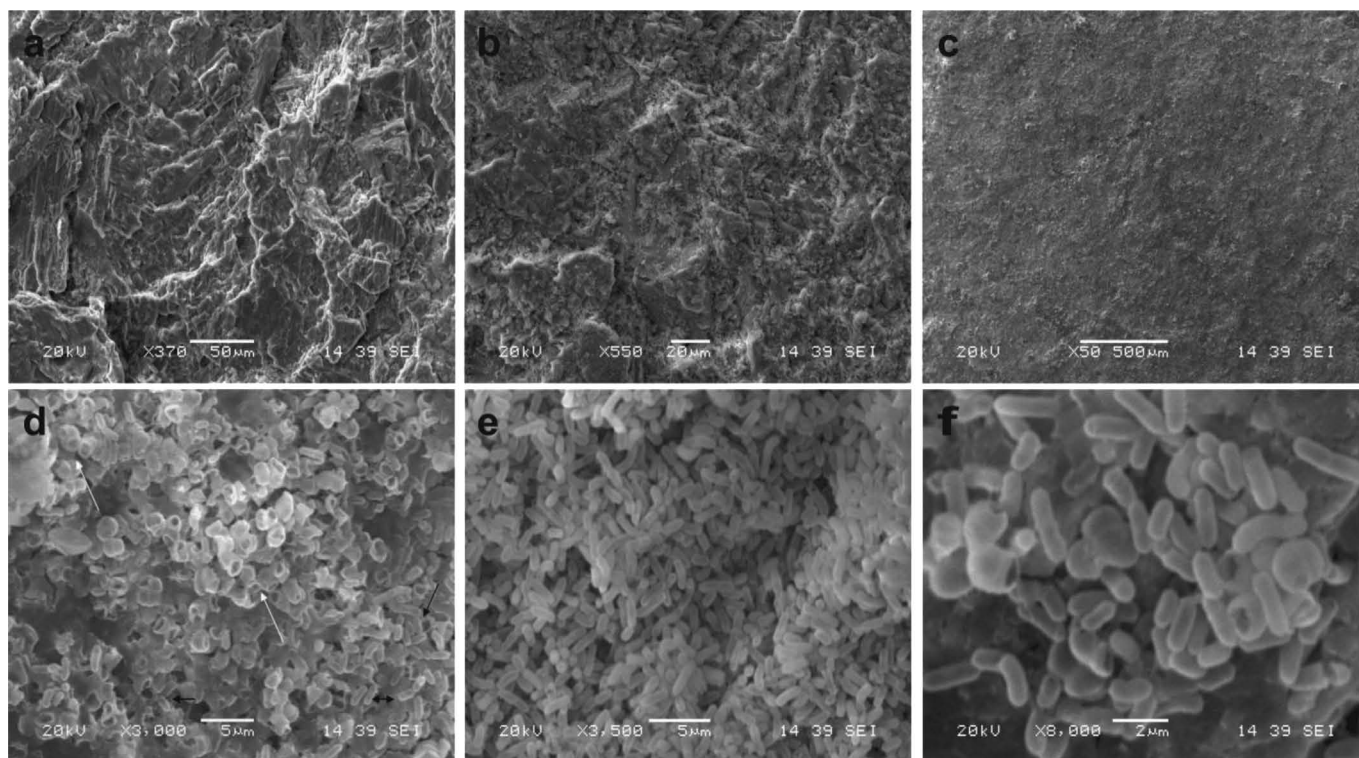


Fig. 7. Panoramic view of marble after 10-day spraying period: (a) An area of no coverage from the new biomineral; (b) an area of low coverage from the new biomineral and (c) an area of high coverage from the new biomineral. Biomineral morphology: (d) Magnification presenting the prevailing morphologies with biomaterialized bacteria (black arrows) and hollow hemispheres where bacterial cells were not completely covered from calcium carbonate; (e) a different site where biomaterialized cell rods covered the marble surface and (f) maximum magnification achieved under the electron microscope presenting the actual size of biomaterialized cells and hemispheres.

may exert control in the calcium carbonate polymorphism under specific experimental conditions (Manoli and Dalas, 2001; Li et al., 2002; Malkaj et al., 2004; Malkaj and Dalas, 2004; Xie et al., 2005; Wolf et al., 2007). Polysaccharides and their components, improve the vaterite stability (Natoli et al., 2010) whereas the phosphate ions delay its transformation to calcite (Katsifaras and Spanos, 1999). Chitosan, shown to induce vaterite formation (Wu et al., 2011), contains N-acetyl-D-glucosamine which is encountered as a component of the Gram positive bacterial cell walls.

Gram-positive bacterial cell walls could include the characteristics mentioned above due to their components. Peptidoglycans, teichoic and lipoteichoic acids provide the cell wall with negative charge. The concentration of the phosphate groups versus D-alanyl esters in teichoic and lipoteichoic acids play a crucial role in the overall negative charge of the bacterial cell wall (Neuhaus and Baddiley, 2003; Vollmer et al., 2008; Potekhina et al., 2011). Free carboxyl groups inside the peptide stem that connects the glycan strands can further assist in this function, while bacterial growth and cell health will tailor the overall effect of these moieties (Neuhaus and Baddiley, 2003). Furthermore, the proteins anchored on the cell wall could provide additional positive or negative sites for carbonate and calcium coordination.

Calcite formed when *Sporosarcina pasteurii* (former *Bacillus pasteurii*) (Bang et al., 2001; Mitchell and Ferris, 2006) or other ureolytic bacteria were tested (Fujita et al., 2000) Similarly, *B. sphaericus* stabilized the calcite in solid media (Hammes et al., 2003) and when limestone was immersed in the liquid growth medium (Dick et al., 2006). On the contrary, when the nutrient broth and calcium acetate were substituted with calcium chloride, vaterite with a spherical morphology was identified for both *B. sphaericus* (De Muynck et al., 2008a) and *S. pasteurii* (Kim et al.,

2013). The growth medium we implemented had a lower calcium acetate concentration (0.05 M) compared with the one used by De Muynck et al. (2008a) (0.32 M) and Kim et al. (2013) (0.16 M). Assuming that vaterite formation could be formed when similar nutrients are used among the *Bacillus* isolates, then the calcium acetate concentration presented in this work may reside to the low limit for vaterite formation. As mentioned in the Results Section, vaterite was consistently detected in BP3x concentration. Recently *Lysinibacillus sphaericus* (former *B. sphaericus*) produced vaterite in a modified B4 medium (Shirakawa et al., 2011). Nutrient surplus (due to nutrient broth and acetate) induced biomineralization while the biomolecules stabilized the vaterite formation.

If the vaterite crystals were temporal or of inorganic origin we should have been able to notice a gradual transformation to calcite via the solid state transition and/or solution mediated transformation (Li et al., 2002) or after sonication treatment (Berdonosov et al., 2005). The FT-IR and XRD spectra of the calcium carbonate crystals stored under ambient conditions and analyzed a year later, did not show any difference; thus the solid–state transition did not occur. Redissolution and gradual evaporation of the samples confirmed the stability of the vaterite; thus, solution-mediated transformation to calcite did not occur either. These results prove the stability of vaterite and the fact that the Ostwald's rule of stages was interrupted. Vaterite is formed first as the less stable polymorph (highest solubility) and its transformation is inhibited by the incorporation of the organic components (Li et al., 2002). Therefore, the main morphology mimicked bacterial dimensions. The presence of the spherical vaterite, smaller than bacterial dimensions, but in direct contact with them, may be considered the “precursor” morphology created upon the bacterial cell membrane with the bacterial encapsulation remaining

unfinished. Alternatively, the bacterial macromolecules, released from the cells or due to their death, may result in such vaterite micritic spheres.

Rodríguez-Navarro et al. (2003) suggested the ultrasonic treatment of the samples as an estimate of the adhesion force and consolidation efficacy of the new biomineral. Blank samples obtained after the experiments and subjected to sonication, were completely cleared from any loosely attached material and marble fragments (Fig. 5a). The Δ wt% of the blank samples vs the biomineralized samples was reduced as the latter showed the stability of the vaterite on the marble surface. A similar effect was reported for *B. sphaericus* (De Muynck et al., 2010). The values presented here are lower due to the negligible porosity of marble. The biomineral resided only on the marble surface and not inside the pores of a limestone. That would have increased the biomineral deposition as dictated from our preliminary experiments conducted on porous limestone (results not shown). The biomineral deposited within the pore network would be “protected” from sonication forces. Stability was further validated from the continuous vaterite layer visible in the thin section analysis of the sonicated samples. Scanning electron microscopy (Fig. 6b) proved that even marble fragments were fixed onto the surface as a result of the biomineralization. Finally, the morphological characteristics remained unaltered based on scanning electron microscopy. The biologically induced mineralization of vaterite was further supported by the phosphorus peak observed. No such peak was observed in any control sample. Its low percentage values demonstrated that it could be of biological origin and not due to the formation of a different biomineral. A similar peak was observed in the samples during the evaluation of *C. metallidurans* ACA-DC 4073 (Daskalakis et al., 2014). Marvasi et al., 2012, have also reported the presence of a phosphorus peak in the CaCO₃ samples from isolated bacteria. Finally, the FT-IR analysis of the sample did not show any differentiation, negating the possibility of a different biomineral.

The color effect of the new material remained at its minimum and only the last set of samples in the sterile experiment recorded $\Delta E > 6$, a value that is considered unacceptable during monument interventions. Therefore, under optimum growth conditions, *B. pumilus* ACA-DC 4061 promotes a newly formed biomineral that does not considerably affect the substrate color. In the non-sterile experiment, where the volume of the nutrient-bacterial solution was minimal, the color differentiation was observed to be even lower. This may be an advantageous characteristic of the microorganism because it can be applied in greater volumes and provide a more pronounced bioconsolidation effect in a real case scenario, with reduced color differentiation. Its maximum weight increase was almost twice as much compared with *C. metallidurans* ACA-DC 4073; while the ΔE was considerably lower, slightly above the value of $\Delta E \leq 6$ compared with our Gram-negative isolate (Daskalakis et al., 2014).

A scaled-up experiment was performed in order to observe the biomineralization efficiency of *B. pumilus* ACA-DC 4061 under conditions relatively closer to that of the environment. Non sterile conditions were adopted to investigate the potential of antagonistic growth of other microorganisms during application. No obvious contamination was detected showing that the selected microorganism was the main recipient of the nutrients. High humidity, to delay the drying of the substrate was performed for two reasons: to avoid the potential of spore formation of the applied microorganism, which could delay the biomineralization and to assist growth of other microorganisms. Temperature was kept constant as the first step in this experimental series while in future tests temperature will not be controlled. The biomineral mainly possessed bacterial cell dimensions suggesting that the process was performed primarily upon the cells or close to them, excluding

inorganic precipitation. . Spraying the minimum quantity of bacterial solution on the marble revealed that the morphology corresponded to vaterite. The calcium carbonate polymorph proved stable even under those conditions.

The question that may arise is whether vaterite is bacterial or nutrient specific. Bacterial isolates identified having the ability to produce vaterite are constantly increasing. They belong to different genera and have been isolated from different environmental niches. If we combine the results of *B. pumilus* ACA-DC 4061 and *B. sphaericus* (De Muynck et al., 2008a, b; Shirakawa et al., 2011) we can hypothesize that the main cause is the nutrient content provided. Both isolates promoted vaterite in a more nutritious environment and on different substrates. A *Bacillus* isolate promoted vaterite and calcite mixtures when M3P medium was applied on stone (Jroundi et al., 2010). On extending to Gram – negative isolates such as *C. metallidurans* ACA-DC 4073 (with BP3x medium), *Pantoea* spp., *Pseudomonas chlororaphis* (BP2x and BP4x medium) (Daskalakis et al., 2013) and *Myxococcus xanthus* (M-3 medium) (Jimenez-Lopez et al., 2007) vaterite was identified. In all the cases cited above the main similarity is calcium acetate: acetate promotes better growth of the bacteria implemented and the faster metabolism could stabilize the vaterite, as described in this work. Both types of cell membranes possess the components necessary for stabilizing the CaCO₃ and the type of nutrient that will boost bacterial growth may be the key factor to the prevalence and stability of the vaterite.

Conclusion

We investigated the ability of *B. pumilus* ACA-DC 4061 to promote biomineralization of calcium carbonate under specific growth conditions, obtained from the statistical analysis of three main factors: temperature, medium and inoculum concentration. We identified a constant formation of stable vaterite even in samples re-evaluated after a year. Biomineralization tests on the marble samples resembling *in situ* conditions showed similar morphologies. Thus we may summarize that vaterite, under the conditions presented, provided detectable biomineralization on a stone substrate. Further proof should be obtained that will demonstrate a long-term stability and the results presented in this study combined with the observations of other research groups are the first step towards it. Validation on bigger stone samples, in outdoor environmental conditions and additional mechanical tests would provide further insight on *B. pumilus* ACA-DC 4061 potential. Furthermore, we may regard its morphological differentiation as an advantage which will assist in the biomineral assessment on stone and its distinctiveness from the substrate. Such a characteristic could assist in the monitoring of the *in situ* applications for the bioconsolidation impact of vaterite and its endurance under various environmental and chemical factors.

Acknowledgment

This work was supported by the Ministry of National Education and Religious Affairs (Community Support Framework, 2000–2006) under the Pythagoras II Research Program (Project No. 68/751). The Project is co-funded by the European Social Fund (75%) and National Resources (25%).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.12.005>.

References

- Achal, V., Mukherjee, A., Basu, P.C., Sudhakar Reddy, M., 2009. Strain improvement of *Sporosarcina pasteurii* for enhanced urease and calcite production. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 36, 981–988. <http://dx.doi.org/10.1007/s10295-009-0578-z>.
- Achal, V., Mukherjee, A., Sudhakar Reddy, M., 2013. Biogenic treatment improves the durability and remediates the cracks of concrete structures. *Constr. Build. Mater.* 48, 1–5. <http://dx.doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2013.06.061>.
- Adolphe, J.-P., Loubière, J.-F., Paradas, J., Soleilhavoup, F., 1990. Procédé de traitement biologique d' une surface artificielle. European patent No. 90400697.0 (after French patent No. 8903517, 1989).
- Anne, S., Rozenbaum, O., Andrezza, P., Rouet, J.-L., 2010. Evidence of a bacterial carbonate coating on plaster samples subjected to the Calcite Bioconcept biomineralization technique. *Constr. Build. Mater.* 24, 1036–1042. <http://dx.doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2009.11.014>.
- Bang, S.S., Galinat, J.K., Ramakrishnan, V., 2001. Calcite precipitation induced by polyurethane-immobilized *Bacillus pasteurii*. *Enzyme Microb. Technol.* 28, 404–409. [http://dx.doi.org/10.1016/S0141-0229\(00\)00348-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0141-0229(00)00348-3).
- Barton, H.A., Northup, D.E., 2007. Geomicrobiology in cave environments: past, current and future perspectives. *J. Cave Karst Stud.* 69, 163–178.
- Baskar, S., Baskar, R., Maucilaire, L., McKenzie, J.A., 2006. Microbially induced calcite precipitation in culture experiments: possible origin for stalactites in Sahasradhara caves, Dehradun, India. *Curr. Sci.* 90, 58–64.
- Berdonov, S.S., Znamenskaya, I.V., Melikhov, I.V., 2005. Mechanism of the vaterite-to-calcite phase transition under sonication. *Inorg. Mater.* 41, 1308–1312. <http://dx.doi.org/10.1007/s10789-005-0307-6>.
- Boquet, E., Boronat, A., Ramos-Comezana, A., 1973. Production of calcite (calcium carbonate) crystals by soil bacteria is a general phenomenon. *Nature* 246, 527–529. <http://dx.doi.org/10.1038/246527a0>.
- Cacchio, P., Ercole, C., Cappuccio, G., Lepidi, A., 2003. Calcium carbonate precipitation by bacterial strains isolated from a limestone cave and from a loamy soil. *Geomicrobiol. J.* 20, 85–98. <http://dx.doi.org/10.1080/014904503038383>.
- Castanier, S., Le Métayer-Level, G., Oriol, G., Loubière, J.-F., Perthuisot, J.-P., 2000. Bacterial carbonatogenesis and applications to preservation and restoration of historic property. In: Ciferri, O., Tiano, P., Mastromei, G. (Eds.), *Of Microbes and Art: the Role of Microbial Communities in the Degradation and Protection of Cultural Heritage*. Proceedings of an International Conference on Microbiology and Conservation, Florence, Italy. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, pp. 203–218.
- ChunXiang, Q., QingFeng, P., Ruiing, W., 2010. Cementation of sand grains based on carbonate precipitation induced by microorganism. *Sci. China Technol. Sci.* 53, 2198–2206. <http://dx.doi.org/10.1007/s11431-009-3189-z>.
- Daskalakis, M.I., Magoulas, A., Kotoulas, G., Catsikis, I., Bakolas, A., Karageorgis, A.P., Mavridou, A., Doulia, D., Rigas, F., 2013. *Pseudomonas*, *Pantoea* and *Cupriavidus* isolates induce calcium carbonate precipitation for bioremediation of ornamental stone. *J. Appl. Microbiol.* 115, 409–423. <http://dx.doi.org/10.1111/jam.12234>.
- Daskalakis, M.I., Magoulas, A., Kotoulas, G., Catsikis, I., Bakolas, A., Karageorgis, A.P., Mavridou, A., Doulia, D., Rigas, F., 2014. *Cupriavidus metallidurans* biomineralization ability and its application as a bioconsolidation enhancer for ornamental marble stone. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 6871–6883. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-014-5753-0>.
- De Muynck, W., Cox, K., De Belie, N., Verstraete, W., 2008a. Bacterial carbonate precipitation as an alternative surface treatment for concrete. *Constr. Build. Mater.* 22, 875–885. <http://dx.doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2006.12.011>.
- De Muynck, W., Debrouwer, D., De Belie, N., Verstraete, W., 2008b. Bacterial carbonate precipitation improves the durability of cementitious materials. *Cem. Concr. Res.* 38, 1005–1014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cemconres.2008.03.005>.
- De Muynck, W., Verbeken, K., De Belie, N., Verstraete, W., 2010. Influence of urea and calcium dosage on the effectiveness of bacterially induced carbonate precipitation on limestone. *Ecol. Eng.* 36, 99–111. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoleng.2009.03.025>.
- De Muynck, W., Verbeken, K., De Belie, N., Verstraete, W., 2013. Influence of temperature on the effectiveness of a biogenic carbonate surface treatment for limestone conservation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 1335–1347. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-012-3997-0>.
- DeJong, J.T., Mortensen, B.M., Martinez, B.C., Nelson, D.C., 2010. Bio-mediated soil improvement. *Ecol. Eng.* 36, 197–210. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoleng.2008.12.029>.
- Dick, J., De Windt, W., De Graef, B., Saveyn, H., Van der Meer, P., De Belie, N., Verstraete, W., 2006. Bio-deposition of a calcium carbonate layer on degraded limestone by *Bacillus* species. *Biodegradation* 17, 357–367. <http://dx.doi.org/10.1007/s10532-005-9006-x>.
- Douglas, S., 2005. Mineralogical footprints of microbial life. *Am. J. Sci.* 305, 503–525. <http://dx.doi.org/10.2475/ajs.305.6-8.503>.
- Ettenauer, J., Piñar, G., Sterflinger, K., Gonzalez-Muñoz, M.T., Jroundi, F., 2011. Molecular monitoring of the microbial dynamics occurring on historical limestone buildings during and after the *in situ* application of different bio-consolidation treatments. *Sci. Total Environ.* 409, 5337–5352. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.08.063>.
- Fujita, Y., Ferris, F.G., Lawson, R.D., Colwell, F.S., Smith, R.W., 2000. Calcium carbonate precipitation by ureolytic subsurface bacteria. *Geomicrobiol. J.* 17, 305–318. <http://dx.doi.org/10.1080/782198884>.
- Gadd, G.F., 2010. Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation. *Microbiology* 156, 609–643. <http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.037143-0>.
- Hammes, F., Boon, N., de Villiers, J., Verstraete, W., Siciliano, S.D., 2003. Strain-specific ureolytic microbial calcium carbonate precipitation. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 4901–4909. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.69.8.4901-4909.2003>.
- Han, J., Lian, B., Ling, H., 2013. Induction of calcium carbonate by *Bacillus cereus*. *Geomicrobiol. J.* 30, 682–689. <http://dx.doi.org/10.1080/01490451.2012.758194>.
- Jimenez-Lopez, C., Rodriguez-Navarro, C., Pinar, G., Carrillo-Rosúa, F.J., Rodriguez-Gallego, M., González-Muñoz, M.T., 2007. Consolidation of degraded ornamental porous limestone stone by calcium carbonate precipitation induced by the microbiota inhabiting the stone. *Chemosphere* 68, 1929–1936. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.02.044>.
- Jonkers, H.M., Thijssen, A., Muyzer, G., Copuroglu, O., Schlangen, E., 2010. Application of bacteria as self-healing agent for the development of sustainable concrete. *Ecol. Eng.* 36, 230–235. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoleng.2008.12.036>.
- Jroundi, F., Fernandez-Vivas, M.A., Rodriguez-Navarro, C., Bedmar, E.J., González-Muñoz, M.T., 2010. Bioconservation of deteriorated monumental calcarenite stone and identification of bacteria with carbonatogenic activity. *Microbiol. Ecol.* 60, 39–54. <http://dx.doi.org/10.1007/s00248-010-9665-y>.
- Jroundi, F., Suaga-Gómez, P., Jimenez-Lopez, C., Gonzalez-Muñoz, M.T., Fernandez-Vivas, M.A., 2012. Stone-isolated carbonatogenic bacteria as inoculants in bio-consolidation treatments for historical limestone. *Sci. Total Environ.* 425, 89–98. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.02.059>.
- Katsifaras, A., Spanos, N., 1999. Effect of inorganic phosphate ions on the spontaneous precipitation of vaterite and on the transformation of vaterite to calcite. *J. Cryst. Growth* 204, 183–190. [http://dx.doi.org/10.1016/S0022-0248\(99\)00174-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-0248(99)00174-8).
- Kim, H.K., Park, S.J., Han, J.I., Lee, H.K., 2013. Microbially mediated calcium carbonate precipitation on normal and lightweight concrete. *Constr. Build. Mater.* 38, 1073–1082. <http://dx.doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2012.07.040>.
- Lee, S.-W., Park, S.-B., Jeong, S.-K., Lim, K.-S., Lee, S.-H., Trachtenberg, M.C., 2010. On carbon dioxide storage based on biomineralization strategies. *Micron* 41, 273–282. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micron.2009.11.012>.
- Li, C., Botsaris, G.D., Kaplan, D.L., 2002. Selective in vitro effect of peptides on calcium carbonate crystallization. *Cryst. Growth Des.* 2, 387–393. <http://dx.doi.org/10.1021/cg0255467>.
- Lovett, P.S., Young, F.E., 1969. Identification of *Bacillus subtilis* NRRL B-3275 as a strain of *Bacillus pumilus*. *J. Bacteriol.* 100, 658–661.
- Malkaj, P., Dalas, E., 2004. Calcium carbonate crystallization in the presence of aspartic acid. *Cryst. Growth Des.* 4, 721–723. <http://dx.doi.org/10.1021/cg030014r>.
- Malkaj, P., Kanakis, J., Dalas, E., 2004. The effect of leucine on the crystal growth of calcium carbonate. *J. Cryst. Growth* 266, 533–538. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcrysgro.2004.02.114>.
- Mann, S., Heywood, B.R., Rajam, S., Birchall, J.D., 1988. Controlled crystallization of CaCO₃ under stearic acid monolayers. *Nature* 334, 692–695. <http://dx.doi.org/10.1038/334692a0>.
- Manoli, F., Dalas, E., 2001. Calcium carbonate crystallization in the presence of glutamic acid. *J. Cryst. Growth* 222, 293–297. [http://dx.doi.org/10.1016/S0022-0248\(00\)00893-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-0248(00)00893-9).
- Marvasi, M., Gallagher, K.L., Martinez, L.C., Pagan, W.C.M., Santiago, R.E.R., Vega, G.C., Visscher, P.T., 2012. Importance of B4 medium in determining organomineralization potential of bacterial environmental isolates. *Geomicrobiol. J.* 29, 916–924. <http://dx.doi.org/10.1080/01490451.2011.636145>.
- Mitchell, A.C., Ferris, F.G., 2006. The influence of *Bacillus pasteurii* on the nucleation and growth of calcium carbonate. *Geomicrobiol. J.* 23, 213–226. <http://dx.doi.org/10.1080/01490450600724233>.
- Natoli, A., Wiens, M., Schröder, H.-C., Stifanic, M., Batel, R., Soldati, A.L., Jacob, D.E., Müller, W.E.G., 2010. Bio-vaterite formation by glycoproteins from freshwater pearls. *Micron* 41, 359–366. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micron.2010.01.002>.
- Neuhaus, F.C., Baddiley, J., 2003. A continuum of anionic charge: structures and function of D-alanyl-teichoic acids in gram-positive bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67, 686–723. <http://dx.doi.org/10.1128/MMBR.67.4.686-723.2003>.
- O'Donnell, A.G., Norris, J.R., Berkeley, R.C.W., Claus, D., Kaneko, T., Logan, N.A., Nozaki, R., 1980. Characterizations of *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus licheniformis*, and *Bacillus amyloliquefaciens* by pyrolysis gas-liquid chromatography, deoxyribonucleic acid-deoxyribonucleic acid hybridization, biochemical tests and API systems. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 30, 448–459. <http://dx.doi.org/10.1099/00207713-30-2-448>.
- Pecher, J., Guenoun, P., Chevillard, C., 2009. Crystalline calcium carbonate thin film formation through interfacial growth and crystallization of amorphous microdomains. *Cryst. Growth Des.* 9, 1306–1311. <http://dx.doi.org/10.1021/cg800251t>.
- Piñar, G., Jimenez-Lopez, C., Sterflinger, K., Ettenauer, J., Jroundi, F., Fernandez-Vivas, M.A., Gonzalez-Muñoz, M.T., 2010. Bacterial community dynamics during the application of a *Myxococcus xanthus*-inoculated culture medium used for consolidation of ornamental limestone. *Microbiol. Ecol.* 60, 15–28. <http://dx.doi.org/10.1007/s00248-010-9661-2>.
- Pope, G.A., Meierding, T.C., Paradise, T.R., 2002. Geomorphology's role in the study of weathering of cultural stone. *Geomorphology* 47, 211–225. [http://dx.doi.org/10.1016/S0169-555X\(02\)00098-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0169-555X(02)00098-3).
- Potekhina, N.V., Streshinskaya, G.M., Tulsikaya, E.M., Kozlova, Yu I., Senchenkova, S.N., Shashkov, A.S., 2011. Phosphate – containing cell wall polymers of bacilli. *Biochemistry (Moscow)* 76, 745–754. <http://dx.doi.org/10.1134/S0006297911070042>.

- Priest, F.G., Goodfellow, M., Todd, C., 1988. A numerical classification of the genus *Bacillus*. J. General Microbiol. 134, 1847–1882. <http://dx.doi.org/10.1099/00221287-134-7-1847>.
- Ramachandran, S.K., Ramakrishnan, V., Bang, S.S., 2001. Remediation of concrete using micro-organisms. ACI Mater. J. 98, 3–9. <http://dx.doi.org/10.14359/10154>.
- Rodriguez-Navarro, C., Rodriguez-Gallego, M., Chekroun, K.B., Gonzalez-Munoz, M.T., 2003. Conservation of ornamental stone by *Myxococcus xanthus* – induced carbonate biomineralization. Appl. Environ. Microbiol. 64, 2182–2193. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.69.4.2182-2193.2003>.
- Sarda, D., Choonia, H.S., Sarode, D.D., Lele, S.S., 2009. Biocalcification by *Bacillus pasteurii* urease: a novel application. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 36, 1111–1115. <http://dx.doi.org/10.1007/s10295-009-0581-4>.
- Scheerer, S., Ortega-Morales, O., Gaylarde, C., 2009. Microbial deterioration of stone monuments – an updated overview. Adv. Appl. Microbiol. 66, 97–139. [http://dx.doi.org/10.1016/S0065-2164\(08\)00805-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0065-2164(08)00805-8).
- Shirakawa, M.A., Cincotto, M.A., Atencio, D., Gaylarde, C.C., Vanderley, M.J., 2011. Effect of culture medium on biocalcification by *Pseudomonas putida*, *Lysinibacillus sphaericus* and *Bacillus subtilis*. Braz. J. Microbiol. 42, 499–507. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-838220110002000014>.
- Smith, B.J., Gomez-Heras, M., McCabe, S., 2008. Understanding the decay of stone-built cultural heritage. Prog. Phys. Geogr. 32, 439–461. <http://dx.doi.org/10.1177/0309133308098119>.
- Stocks-Fischer, S., Galinat, J.K., Bang, S.S., 1999. Microbiological precipitation of CaCO₃. Soil Biology and Biochemistry 31, 1563–1571. [http://dx.doi.org/10.1016/S0038-0717\(99\)00082-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0038-0717(99)00082-6).
- Suzuki, M., Nagasawa, H., Kogure, T., 2006. Synthesis and structure of hollow calcite particles. Cryst. Growth Des. 6, 2004–2006. <http://dx.doi.org/10.1021/cg0602921>.
- Vollmer, W., Blanot, D., De Pedro, M.A., 2008. Peptidoglycan structure and architecture. FEMS Microbiol. Rev. 32, 149–167. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00094.x>.
- Warscheid, Th, Braams, J., 2000. Biodeterioration of stone: a review. Int. Biodeterior. Biodegrad. 46, 343–368. [http://dx.doi.org/10.1016/S0964-8305\(00\)00109-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0964-8305(00)00109-8).
- Wiktor, V., Jonkers, H.M., 2011. Quantification of crack-healing in novel bacteria-based self-healing concrete. Cem. Concr. Compos. 33, 763–770. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cemconcomp.2011.03.012>.
- Wolf, A.E., Loges, N., Mathiasch, B., Panthöfer, B., Mey, I., Janshoff, A., Tremel, W., 2007. Phase selection of calcium carbonate through the chirality of adsorbed amino acids. Angew. Chem. Int. Ed. 46, 5618–5623. <http://dx.doi.org/10.1002/anie.200700010>.
- Wu, Y., Cheng, C., Yao, J., Chen, X., Shao, Z., 2011. Crystallization of calcium carbonate on chitosan substrates in the presence of regenerated silk fibroin. Langmuir 27, 2804–2810. <http://dx.doi.org/10.1021/la104712h>.
- Xiao, J., Wang, Z., Tang, Y., Tang, S., 2009. Biomimetic mineralization of CaCO₃ on a phospholipid monolayer: from an amorphous calcium carbonate precursor to calcite via vaterite. Langmuir 26, 4977–4983. <http://dx.doi.org/10.1021/la903641k>.
- Xie, A.-J., Shen, Y.-H., Zhang, C.-Y., Yuan, Z.-W., Zhu, X.-M., Yang, Y.-M., 2005. Crystal growth of calcium carbonate with various morphologies in different amino acid systems. J. Cryst. Growth 285, 436–443. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcrysgro.2005.08.039>.
- Zavarzin, G.A., 2002. Microbial geochemical calcium cycle. Microbiology 71, 1–17. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1017945329951>.