



Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο  
Σχολή Χημικών Μηχανικών  
Τομέας Σύνθεσης και Ανάπτυξης Βιομηχανικών Διαδικασιών  
Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας



## Διπλωματική Εργασία

Ανάπτυξη Μικροβιακής Τεχνολογίας για την αποκατάσταση περιβαλλοντικών αλλοιώσεων λίθινων επιφανειών αρχαιολογικών μνημείων

Σινάπης Μάριος-Σίμος

Επιβλέπων: Μαμμά Διομή, Επίκ. Καθηγήτρια ΕΜΠ

Αθήνα, Ιανουάριος 2024

## **Ευχαριστίες**

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε κατά τα ακαδημαϊκά έτη 2022-2023 και 2023-2024 στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου (ΕΜΠ), υπό την επίβλεψη της Επίκουρης Καθηγήτριας Διομής Μαμμά. Στα πλαίσια έρευνας της διπλωματικής εργασίας μου δόθηκε η ευκαιρία να επεκτείνω τις επιστημονικές μου γνώσεις στον τομέα της Βιοτεχνολογίας και πιο συγκεκριμένα στα γνωστικά αντικείμενα της διαχείρισης και μελέτης μικροοργανισμών, αποκτώντας παράλληλα σημαντική εργαστηριακή εμπειρία. Με την ολοκλήρωση αυτού του κεφαλαίου της ακαδημαϊκής μου πορείας, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την επιβλέπουσα καθηγήτρια μου κ. Διομή Μαμμά για την εμπιστοσύνη που με έδειξε να ασχοληθώ με ένα τόσο ενδιαφέρον και πολυσύνθετο θέμα, καθώς και για την πολύτιμη επιστημονική και συμβουλευτική καθοδήγηση και χρόνο που διέθεσε σε όλα τα στάδια εκπόνησής της παρούσας εργασίας. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Σάββα Γενίτσαρη του Βιολογικού Τμήματος του Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (ΕΚΠΑ) για την πολύτιμη συνεργασία και βοήθεια του στον ταξινομικό χαρακτηρισμό των μικροοργανισμών. Στο ίδιο πλαίσιο, θα ήθελα να ευχαριστήσω ξεχωριστά κάθε ένα μέλος της επιστημονικής ομάδας διδακτορικών και μεταδιδακτορικών ερευνητών του Εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας για τις επισημάνσεις και τις συμβουλές τους σε τεχνικά ζητήματα ανά πάσα στιγμή και το εξαιρετικό κλίμα συνεργασίας. Τέλος, αισθάνομαι την ανάγκη και την υποχρέωση να εκφράσω τις πιο θερμές μου ευχαριστίες στους δικούς μου ανθρώπους, την οικογένειά και τους φίλους μου για την ηθική υποστήριξη, τη συμπαράσταση και την κατανόηση που έδειξαν σε όλο το διάστημα των σπουδών μου.

## Περίληψη

Τα φαινόμενα βιοδιάβρωσης και αλλοίωσης μνημείων που οφείλονται στην ανάπτυξη μικροοργανισμών στις λίθινες επιφάνειες τους, καθιστούν επιτακτική την ανάγκη εφαρμογής οικολογικών μικροβιακών τεχνολογιών, με την αρωγή μεταγονιδιατικών μεθόδων ανάλυσης, για την αειφόρο προστασία και συντήρηση της πολιτισμικής κληρονομιάς. Οι μικροοργανισμοί που αναπτύσσονται στις λίθινες επιφάνειες των μνημείων εκτός από την εμφανή επιβλαβή τους δράση, μπορούν με κατάλληλη αξιοποίηση και διαχείριση των μεταβολικών τους δικτύων να συμβάλλουν στην αποκατάσταση φθορών. Η μελέτη των ωφέλιμων επιδράσεων των μικροοργανισμών στα λίθινα υποστρώματα πραγματοποιείται μέσω λήψης δειγμάτων από λίθινες επιφάνειες με διαφορετικούς τύπους βιοδιάβρωσης των επιδεικτικών μνημείων Ευπαλίειο Όρυγμα, Ιερά Μονή Παναγίας Βαρνάκοβας, μνημείο Αφεντάκη (Κοιμωμένη του Χαλεπά) και μνημείο Δελιγιάννη (Κοιμωμένη του Βισάρη). Τα δείγματα αυτά καλλιεργούνται στο εργαστήριο σε διαφορετικά θρεπτικά μέσα, με σκοπό την ανάπτυξη και απομόνωση μικροοργανισμών και την μετέπειτα αλληλούχιση και ταξινομικό τους χαρακτηρισμό τους με τη χρήση μεταγονιδιατικών μεθόδων ανάλυσης. Συνολικά ταυτοποιήθηκαν 86 από τις 117 διαφορετικές μορφολογικά μικροβιακές αποικίες που αναπτύχθηκαν, με 52 να ανήκουν σε βακτήρια και 34 σε μύκητες. Έπειτα πραγματοποιείται ανάπτυξη των βακτηρίων σε υγρές καλλιέργειες για τη μελέτη των κινητικών χαρακτηριστικών της μέγιστης συγκέντρωσης κυτταρικής μάζας και του δυναμικού μεταφοράς, ενώ εν συνεχεία διεξάγεται έλεγχος της ουρεολυτικής τους δράσης και προσδιορισμός της ενεργότητας του ενζύμου καρβονική ανυδράση, με σκοπό την επιλογή των κατάλληλων βακτηρίων για την κατευθυνόμενη εναπόθεση ανθρακικού ασβεστίου σε δείγματα λίθινων επιφανειών των επιδεικτικών μνημείων. Τα αυτόχθονα βακτήρια που εμφανίζουν τη βέλτιστη ικανότητα βιοορυκτοποίησης και βιοστερέωσης ανθρακικού ασβεστίου ανά τύπο λίθινου υποστρώματος είναι τα *Sporosarcina thermotolerans* για το Ευπαλίειο όρυγμα, *Metabacillus litoralis* για την Ιερά Μονή Παναγίας Βαρνάκοβας και *Micrococcus luteus* για τα μνημεία Αφεντάκη και Δελιγιάννη του Α΄ Νεκροταφείου Αθηνών.

**Λέξεις κλειδιά:** λίθινες επιφάνειες, βακτήρια, ουρεολυτική δράση, καρβονική ανυδράση, ανθρακικό ασβέστιο

## **Abstract**

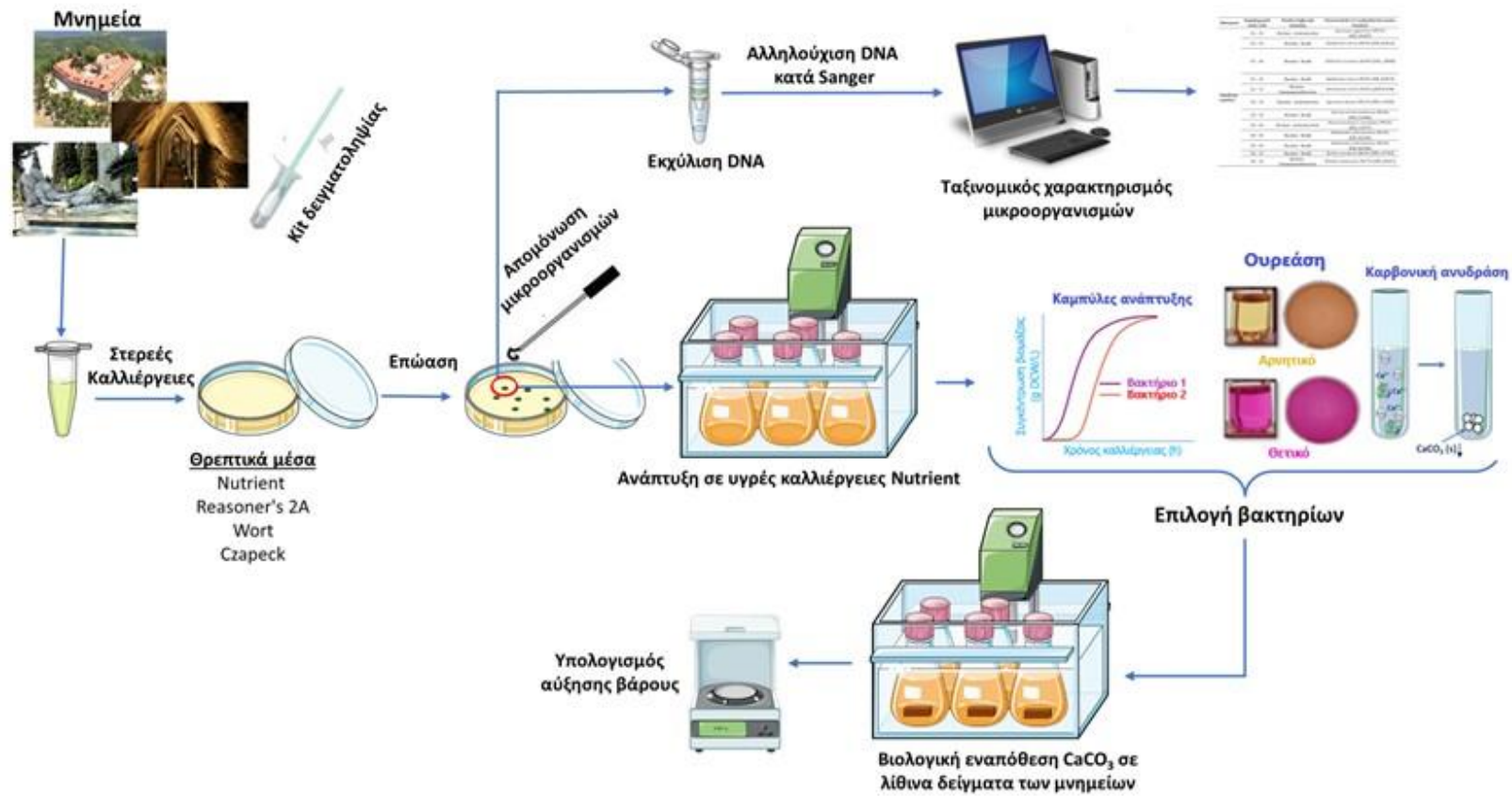
Biodegradation and alteration of stone monuments caused by the growth of microorganisms, necessitate the implementation of ecological microbial technologies, assisted by metagenomic analysis methods, for the sustainable protection and preservation of cultural heritage. Aside from the harmful effects of microbial growth on stone surfaces, some microorganisms with proper utilization and management of their metabolic networks could contribute to the restoration of damages. The study of the beneficial effects of microorganisms on stone substrates involves sampling from different types of biodeterioration of the monuments Eupalinian Aqueduct, Holy Monastery of Panagia Varnakova, Afentaki Monument and Deligianni Monument both at the First Cemetery of Athens. These samples were cultured in the laboratory using various nutrient media, aiming the growth and isolation of microorganisms for sequencing and taxonomic characterization using metagenomic methods of analysis. In total, 86 out of 117 different morphologically microbial colonies were identified, with 52 belonging to bacteria and 34 to fungi. After that, the bacteria were cultured in liquid nutrient medium to determine their maximum cell mass concentration and growth rate. In addition, evaluation methods were conducted to determine their ureolytic activity and the enzymatic activity of carbonic anhydrase for the selection of the appropriate bacteria for the directed deposition of calcium carbonate on stone samples from the demonstrative monuments. The native bacteria that possess the optimal biomineralization and biofixation capacity of calcium carbonate per stone substrate are *Sporosarcina thermotolerans* for the Eupalinian Aqueduct, *Metabacillus litoralis* for the Holy Monastery of Panagia Varnakova and *Micrococcus luteus* for the Afentaki Monument and Deligianni Monument at the First Cemetery of Athens.

**Key words:** stone surfaces, bacteria, ureolytic activity, carbonic anhydrase, calcium carbonate

## **Σκοπός Διπλωματικής Εργασίας**

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι: (α) η απομόνωση (με εφαρμογή μεθόδων που βασίζονται στην καλλιέργεια) και ταυτοποίηση (με εφαρμογή μοριακών τεχνικών) μικροοργανισμών (βακτήρια και μύκητες) που αποικίζουν τις λίθινες επιφάνειες τεσσάρων επιδεικτικών μνημείων της Ελλάδας, (β) η μελέτη της ανάπτυξης των απομονωθέντων μικροοργανισμών σε εργαστηριακή κλίμακα και ο έλεγχος βιοδεικτών (ένζυμα ουρεάση και καρβονική ανυδράση) που σχετίζονται με την εναπόθεση ανθρακικού ασβεστίου και κατ' επέκταση την αποκατάσταση φθορών στις επιφάνειες των μνημείων και (γ) η μελέτη της ικανότητας έναπόθεσης αναθρακικού ασβεστίου αυτόχθονων μικροοργανισμών σε δείγματα λίθινων επιφανειών των επιδεικτικών μνημείων.

### Graphical Abstract



## Περιεχόμενα

Περίληψη .....	ii
Abstract .....	iii
Σκοπός Διπλωματικής Εργασίας .....	iii
Graphical Abstract .....	v
Κεφάλαιο 1: Θεωρητικό υπόβαθρο .....	114
1.1 Εισαγωγή στις καταστρεπτικές και ωφέλιμες επιδράσεις της μικροβιακής ανάπτυξης στις λίθινες επιφάνειες μνημείων .....	114
1.2 Περιβάλλοντα ανάπτυξης μικροοργανισμών .....	114
1.2.1 Εσωτερικά περιβάλλοντα .....	115
1.2.2 Υπαίθρια περιβάλλοντα .....	115
1.2.3 Υπόγεια περιβάλλοντα .....	116
1.3 Κατηγορίες μικροοργανισμών με βάση τις περιοχές ανάπτυξης τους στα λίθινα υποστρώματα .....	117
1.4 Παράγοντες που επηρεάζουν την μικροβιακή ανάπτυξη στις λίθινες επιφάνειες .....	118
1.4.1 Βιοδεκτικότητα .....	118
1.4.2 Περιβαλλοντικοί παράγοντες .....	119
1.4.2.1 Θερμοκρασία .....	119
1.4.2.2 Υγρασία .....	119
1.4.2.3 pH .....	20
1.4.2.4 Διαθεσιμότητα οξυγόνου .....	20
1.4.2.5 Ηλιακή ακτινοβολία .....	20
1.4.2.6 Συγκέντρωση χλωριούχου νατρίου (NaCl) .....	21
1.4.2.7 Υδροστατική πίεση .....	21
1.4.2.8 Ωσμωτική πίεση .....	21
1.4.2.9 Παρουσία θρεπτικών συστατικών .....	21
1.5 Φαινόμενα διάβρωσης και αλλοίωσης των λίθινων επιφανειών μνημείων από την ανάπτυξη μικροοργανισμών .....	22
1.5.1 Βακτήρια .....	27
1.5.1.1 Ετερότροφα βακτήρια .....	27
1.5.1.2 Αυτότροφα βακτήρια .....	28
1.5.2 Μύκητες .....	29
1.5.2.1 Νηματοειδής μύκητες .....	29
1.5.2.2 Μαύροι μύκητες (Black Fungi) .....	30

1.5.3 Φωτοσυνθετικοί μικροοργανισμοί.....	31
1.5.4 Λειχήνες .....	33
1.5.5 Βιοφίλμ (Biofilm) .....	39
<b>1.6 Μικροβιακές τεχνολογίες συντήρησης και αποκατάστασης λίθινων επιφανειών μνημείων μέσω βιοορυκτοποίησης.....</b>	<b>43</b>
1.6.1 Μικροβιακά επαγόμενη βιοορυκτοποίηση .....	46
1.6.2 Μεταβολικά δίκτυα εναπόθεσης ανθρακικού ασβεστίου.....	47
1.6.2.1 Ουρεόλυση.....	48
1.6.2.2 Φωτοσύνθεση.....	52
1.6.2.3 Αμμωνιοποίηση αμινοξέων.....	52
1.6.2.4 Απονιτροποίηση .....	53
1.6.2.5 Οξείδωση θειικών αλάτων .....	53
1.6.2.6 Αναερόβια οξείδωση μεθανίου .....	54
1.6.3 Περιορισμοί της μικροβιακά επαγόμενης βιοορυκτοποίησης ανθρακικού ασβεστίου .....	54
1.6.4 Μελλοντικές προοπτικές της βιοορυκτοποίησης .....	55
<b>Κεφάλαιο 2: Μέθοδοι και Υλικά.....</b>	<b>57</b>
2.1 Σημεία δειγματοληψίας ανά επιδεικτικό μνημείο .....	57
2.2 Διαδικασία δειγματοληψίας.....	60
2.3 Εκχύλιση μικροβιακού φορτίου.....	61
2.4 Θρεπτικά μέσα.....	61
2.5 Ανάπτυξη βακτηρίων σε βυθισμένες (υγρές) καλλιέργειες .....	62
2.6 Μέτρηση οπτικής πυκνότητας.....	63
2.7 Καμπύλες αναφοράς βακτηρίων.....	63
2.8 Αλληλούχιση γενετικών δεικτών και ταυτοποίηση απομονωμένων μικροοργανισμών.....	63
2.9 Έλεγχος ουρεολυτικής δράσης των βακτηρίων .....	64
2.10 Προσδιορισμός ενεργότητας του ενζύμου καρβονική ανυδράση των βακτηρίων .	65
2.11 Προσδιορισμός πρωτεΐνης.....	67
2.12 Διαδικασία ανάπτυξης ωφέλιμων μικροοργανισμών σε δείγματα λίθινων επιφανειών των επιδεικτικών μνημείων .....	67
2.12.1 Χειρισμός δειγμάτων πέτρας από τις λίθινες επιφάνειες των επιδεικτικών μνημείων.....	67
2.12.2 Ανάπτυξη ωφέλιμων βακτηρίων στα δείγματα λίθινων επιφανειών των επιδεικτικών μνημείων .....	68
2.12.3 Εκτίμηση της εναπόθεσης ανθρακικού ασβεστίου στα δείγματα πέτρας.....	69
<b>Κεφάλαιο 3: Αποτελέσματα και Συζήτηση.....</b>	<b>70</b>



<b>3.1 Απομόνωση μικροοργανισμών από τα σημεία δειγματοληψίας των επιδεικτικών μνημείων.....</b>	<b>70</b>
<b>3.2 Ταυτοποίηση και ταξινομικός χαρακτηρισμός μικροοργανισμών.....</b>	<b>85</b>
<b>3.3 Ανάπτυξη απομονοθέντων βακτηρίων σε υγρές καλλιέργειες.....</b>	<b>104</b>
<b>3.4 Έλεγχος ουρεολυτικής δράσης των βακτηρίων .....</b>	<b>116</b>
<b>3.5 Προσδιορισμός ενεργότητας καρβονικής ανυδράσης των βακτηρίων για τη παραγωγή ανθρακικού ασβεστίου.....</b>	<b>140</b>
<b>3.6 Ανάπτυξη των ωφέλιμων ασβεστοπαραγωγικών βακτηρίων σε δείγματα των λίθινων επιφανειών των επιδεικτικών μνημείων.....</b>	<b>143</b>
<b>3.6.1 Ανάπτυξη των επιλεγμένων βακτηρίων σε δείγματα λίθινων επιφανειών των επιδεικτικών μνημείων .....</b>	<b>149</b>
<b>Κεφάλαιο 4: Συμπεράσματα.....</b>	<b>158</b>
<b>Προτάσεις για μελλοντική έρευνα .....</b>	<b>160</b>
<b>Βιβλιογραφία.....</b>	<b>162</b>
<b>Παράρτημα I .....</b>	<b>170</b>
<b>Παράρτημα II .....</b>	<b>178</b>

## Ευρετήριο Εικόνων

<b>Εικόνα 1:</b> Παράγοντες που επηρεάζουν τη μικροβιακή ανάπτυξη σε εσωτερικά κλειστά περιβάλλοντα (Lo Schiavo et al., 2020).....	15
<b>Εικόνα 2:</b> Μικροβιακή ανάπτυξη σε υπαίθρια και εσωτερικά περιβάλλοντα (Mihajlovski, 2015).....	16
<b>Εικόνα 3:</b> Σχηματισμός βιοορυκτών (Gabriel & Northup, 2012) .....	16
<b>Εικόνα 4:</b> Κατηγορίες μικροοργανισμών ανάλογα τις περιοχές ανάπτυξης τους στα λίθινα υποστρώματα (Dievart et al., 2022).....	17
<b>Εικόνα 5:</b> Φαινόμενα βιοδιάβρωσης λίθινων επιφανειών από την ανάπτυξη μικροοργανισμών (Cozzolino et al., 2022) .....	2Error! Bookmark not defined.
<b>Εικόνα 6:</b> Διαφορετικές κατηγορίες μικροβιακού αποικισμού σε λίθινες επιφάνειες μνημείων (Cuzman et al., 2021) .....	2Error! Bookmark not defined.
<b>Εικόνα 7:</b> Λεπτομέρειες φθαρμένης τοιχογραφίας από εσωτερικό τοίχο της Ιεράς Μονής Αγίας Παρθένου στη Σερβία (Stupar et al., 2014) .....	23
<b>Εικόνα 8:</b> Φαινόμενα βιοδιάβρωσης στην Ιερά Μονή της Αγίας Παρθένου στη Σερβία (Stupar et al., 2014).....	23
<b>Εικόνα 9:</b> Φαινόμενα βιοδιάβρωσης και αλλοίωσης από την ανάπτυξη και τη μεταβολική δράση μικροοργανισμών στις λίθινες επιφάνειες του μνημείου του Λουκιανού στη Τουρκία (İnce et al., 2020).....	24
<b>Εικόνα 10:</b> Φαινόμενα βιοδιάβρωσης λίθινων αρχαιολογικών μνημείων από την ανάπτυξη και τη μεταβολική δράση μικροοργανισμών στην Τάξιλα, Πακιστάν (Farooq & Maknoon 2020).....	24
<b>Εικόνα 11:</b> Φαινόμενα χρωματικών αλλοιώσεων σε λίθινες επιφάνειες μνημείων από την ανάπτυξη μικροοργανισμών (Gaylarde & Baptista-Neto, 2021).....	25
<b>Εικόνα 12:</b> Εναποθέσεις ατμοσφαιρικών ρύπων σε λίθινες επιφάνειες μνημείων της Ιστορικής Νεκρόπολης στην Αγία Πετρούπολη, Ρωσία (Sazanova et al., 2022).....	26
<b>Εικόνα 13:</b> Σχηματισμός βιοφίλμ με τη μορφή μαύρης κρούστας στις λίθινες επιφάνειες μνημείων του πολιτισμού των Μάγια, Μεξικό, λόγω της έκκρισης μελανίνης από την ανάπτυξη μυκήτων, καθώς και των εναποθέσεων ατμοσφαιρικών ρύπων θείου με τη μορφή αιωρούμενων σωματιδίων σκόνης (Ortega-Morales et al., 2016).....	26
<b>Εικόνα 14:</b> Ανάπτυξη βακτηρίων σε λίθινα υποστρώματα .....	27
<b>Εικόνα 15:</b> Βακτηριακές αποικίες λευκού, γκρι και κίτρινου χρώματος σε τοιχώματα του σπηλαίου Altamira στην Ισπανία (Gabriel & Northup 2012) .....	28
<b>Εικόνα 16:</b> Μορφολογία και φυσιολογία μυκήτων (Paiva, 2023).....	29
<b>Εικόνα 17:</b> Ανάπτυξη μυκήτων σε τοιχώματα σπηλαίων .....	30
<b>Εικόνα 18:</b> Ανάπτυξη μυκήτων στις εξωτερικές επιφάνειες και στο εσωτερικό λίθινων υποστρωμάτων (Salvadori & Muncichia 2016).....	30
<b>Εικόνα 19:</b> Ανάπτυξη κυανοβακτηρίων με τη μορφή (Α) βιοφίλμ και (Β) μεμονωμένων αποικιών.....	31

<b>Εικόνα 20:</b> Μορφολογία κυανοβακτηρίων που εντοπίζονται σε λίθινες επιφάνειες μνημείων (Keshari & Adhikary 2013).....	32
<b>Εικόνα 21:</b> Ανάπτυξη κυανοβακτηρίων και μικροφυκών σε λίθινα υποστρώματα (Wierzchos et al., 2012).....	32
<b>Εικόνα 22:</b> Ανάπτυξη λειχήνων σε λίθινα υποστρώματα (Urradhay et al., 2016).....	34
<b>Εικόνα 23:</b> Ανατομία θαλλού λειχήνας.....	34
<b>Εικόνα 24:</b> Ανατομία θαλλού με βάση το είδος της λειχήνας (Supriati, 2021) .....	35
<b>Εικόνα 25:</b> Φλοιώδεις λειχήνες.....	35
<b>Εικόνα 26:</b> Φυλλώδης λειχήνα.....	35
<b>Εικόνα 27:</b> Θαμνώδεις λειχήνες.....	36
<b>Εικόνα 28:</b> Φαινόμενα βιοδιάβρωσης λίθινων υποστρωμάτων από την ανάπτυξη λειχήνων (Salvadori & Municchia, 2016) .....	37
<b>Εικόνα 29:</b> Αποτελέσματα βιοδιάβρωσης και αισθητικής αλλοίωσης από την ανάπτυξη λειχήνων στις λίθινες επιφάνειες αγαλμάτων και τοιχωμάτων (Cozzolino et al., 2022) .....	37
<b>Εικόνα 30:</b> Φαινόμενα υποβάθμισης λίθινων μνημείων εξαιτίας της μικροβιακής ανάπτυξης (Sierra-Fernández et al., 2017) .....	38
<b>Εικόνα 31:</b> Φαινόμενο πεδογένεσης (pedogenesis).....	38
<b>Εικόνα 32:</b> Ανάπτυξη κίτρινων βιοφίλμ στα τοιχώματα του παλαιολιθικού σπηλαίου Pindal στην Ισπανία (Martin-Pozas et al., 2023) .....	40
<b>Εικόνα 33:</b> Στάδια σχηματισμού βιοφίλμ σε λίθινα υποστρώματα (Martino, 2016).....	41
<b>Εικόνα 34:</b> Αξιολόγηση του διττού βιοκαταστροφικού και βιοπροστατευτικού ρόλου των βιοφίλμ.....	42
<b>Εικόνα 35:</b> Μικροβιακή ανάπτυξη σε υπόγεια περιβάλλοντα κατακομβών (Zammit et al., 2011).....	43
<b>Εικόνα 36:</b> Μικροβιακά επαγόμενη εναπόθεση ανθρακικού ασβεστίου μέσω της μεταβολικής διεργασίας της ουρεόλυσης στην επιφάνεια και το πορώδες σύστημα λίθινων υποστρωμάτων (Fu et al., 2023) .....	44
<b>Εικόνα 37:</b> Βιολογικά ελεγχόμενη βιοορυκτοποίηση (Castro-Alonso et al., 2019) .....	45
<b>Εικόνα 38:</b> Βιολογικά διαμεσολαβούμενης βιοορυκτοποίησης (Castro-Alonso et al., 2019).46	46
<b>Εικόνα 39:</b> Μικροβιακά επαγόμενη βιοορυκτοποίηση (Castro-Alonso et al., 2019) .....	46
<b>Εικόνα 40:</b> Περιοχές εναπόθεσης και συσσώρευσης ανθρακικού ασβεστίου (Zhu & Dittrich, 2016).....	47
<b>Εικόνα 41:</b> Μεταβολικά δίκτυα εναπόθεσης ανθρακικού ασβεστίου (Zhu & Dittrich, 2016).48	48
<b>Εικόνα 42:</b> Μικροβιακά επαγόμενη βιοορυκτοποίηση ανθρακικού ασβεστίου καταλυόμενη από τα ένζυμα ουρεάση και καρβονική ανυδράση (Castro-Alonso et al., 2019) .....	49
<b>Εικόνα 43:</b> Διαδικασία απευθείας μετατροπής του δεσμευμένου από την ατμόσφαιρα διοξειδίου του άνθρακα σε ανθρακικό ασβέστιο στην επιφάνεια λίθινου υποστρώματος (Qian et al., 2016) .....	51

<b>Εικόνα 44</b> Στάδια και αντιδράσεις της μικροβιακά επαγόμενης βιοορυκτοποίησης ανθρακικού ασβεστίου μέσω κατάλυσης από το ένζυμα ουρεάση και καρβονική ανυδράση (Zheng & Qian 2020) .....	52
<b>Εικόνα 45:</b> Αντιδράσεις και παραπροϊόντα των διαφορετικών μεταβολικών δικτύων της μικροβιακά επαγόμενης βιοορυκτοποίησης ανθρακικού ασβεστίου (Zhu & Ditttrich, 2016) 54	54
<b>Εικόνα 46:</b> Εφαρμογή της οικολογικής μεθόδου αποκατάστασης λίθινων επιφανειών μέσω βακτηριακού εμβολιασμού (Joseph, 2021).....	55
<b>Εικόνα 47:</b> Σημεία δειγματοληψίας από το Μνημείο Αφεντάκη (Κοιμωμένη του Χαλεπά), Α΄ Νεκροταφείο Αθηνών.....	57
<b>Εικόνα 48:</b> Σημεία δειγματοληψίας από το Μνημείο Δελιγιάννη (Κοιμωμένη του Βιτσάρη), Α΄ Νεκροταφείο Αθηνών.....	58
<b>Εικόνα 49:</b> Σημεία δειγματοληψίας από την Ιερά Μονή Παναγίας Βαρνάκοβας .....	58
<b>Εικόνα 50:</b> Σημεία δειγματοληψίας από το Ευπαλίνειο όρυγμα.....	58
<b>Εικόνα 51:</b> Λήψη βιολογικού δείγματος μέσω της μεθόδου swabbing με χρήση αποστειρωμένου βαμβακοφόρου στείλεου (swab) από περιοχή με εμφανή μαύρη και λευκή διάβρωση του αγάλματος “Κοιμωμένη του Χαλεπά” του ταφικού μνημείου της Αφεντάκη στο Α΄ Νεκροταφείο Αθηνών.....	60
<b>Εικόνα 52:</b> Σχηματισμός ανθρακικού ασβεστίου με τη δράση του ενζύμου ανθρακική ανυδράση.....	67
<b>Εικόνα 53:</b> Εναπόθεση CaCO <sub>3</sub> στα δείγματα λίθινων επιφανειών των επιδεικτικών μνημείων .....	68
<b>Εικόνα 54:</b> Ευπαλίνειο όρυγμα .....	70
<b>Εικόνα 55:</b> Ιερά Μονή Παναγίας Βαρνάκοβας .....	71
<b>Εικόνα 56:</b> Άγαλμα του ταφικού μνημείου της Αφεντάκη “Η Κοιμωμένη του Χαλεπά” .....	71
<b>Εικόνα 57:</b> Άγαλμα του ταφικού μνημείου της Δελιγιάννη “Η Κοιμωμένη του Βιτσάρη” ....	71
<b>Εικόνα 58:</b> Μικροβιακές αποικίες που αναπτύχθηκαν σε στερεές καλλιέργειες των θρεπτικών μέσων με άγαρ (Α) Nutrient, (Β) R2A, (Γ) Czapeck και (Δ) Wort από τα σημεία δειγματοληψίας στο Ευπαλίνειο όρυγμα .....	73
<b>Εικόνα 59:</b> Μικροβιακές αποικίες που αναπτύχθηκαν σε στερεές καλλιέργειες των θρεπτικών μέσων με άγαρ (Α) Czapeck και Wort, (Β) Nutrient και (Γ) R2A από τα σημεία δειγματοληψίας στην Ιερά Μονή Παναγίας Βαρνάκοβας.....	75
<b>Εικόνα 60:</b> Μικροβιακές αποικίες που αναπτύχθηκαν σε στερεές καλλιέργειες των θρεπτικών μέσων με άγαρ (Α) Czapeck και Nutrient Broth και (Β) Wort και R2A από τα σημεία δειγματοληψίας στο ταφικό μνημείο Αφεντάκη “Κοιμωμένη του Χαλεπά”, Α΄ Νεκροταφείο Αθηνών.....	77
<b>Εικόνα 61:</b> Μικροβιακές αποικίες που αναπτύχθηκαν σε στερεές καλλιέργειες των θρεπτικών μέσων με άγαρ (Α) Czapeck και Nutrient Broth και (Β) Wort και R2A από τα σημεία δειγματοληψίας στο ταφικό μνημείο Δελιγιάννη “Κοιμωμένη του Βιτσάρη”, Α΄ Νεκροταφείο Αθηνών.....	78
<b>Εικόνα 62:</b> Εναπόθεση ανθρακικού ασβεστίου από ουρεολυτικά βακτήρια μέσω της μεταβολικής διεργασίας της ουρεόλυσης για την αποκατάσταση λίθινων επιφανειών .....	11Error! Bookmark not defined.

**Εικόνα 63:** Περιοχή pH αλλαγής χρώματος του δείκτη κόκκινο της φαινόλης ..... 11 **Error! Bookmark not defined.**

**Εικόνα 64:** Το θρεπτικό μέσο ελέγχου της ουρεολυτικής δράσης των βακτηρίων σε (α) στερεή και (β) υγρή μορφή πριν τον εμβολιασμό ..... 118

**Εικόνα 65:** Διαδικασία εναπόθεσης ανθρακικού ασβεστίου γύρω από τα βακτηριακά κύτταρα, μέσω της καταλυόμενης από τη καρβονική ανυδράση υδρόλυσης του δεσμευμένου διοξειδίου του άνθρακα..... 140

**Εικόνα 66:** Μηχανισμός εναπόθεσης ανθρακικού ασβεστίου από βακτηριακά κύτταρα μέσω δέσμευσης διοξειδίου του άνθρακα..... 141

## Ευρετήριο Σχημάτων

<b>Σχήμα 1:</b> Παράγοντες που επηρεάζουν τη μικροβιακή ανάπτυξη (Stanaszek-Tomal, 2020) .	19
<b>Σχήμα 2:</b> Διάγραμμα ροής εργασιών για τον προσδιορισμό της ενεργότητας της καρβονικής ανυδράσης .....	66
<b>Σχήμα 3:</b> Πειραματική διαδικασία προσδιορισμού της ενεργότητας της καρβονικής ανυδράσης των βακτηρίων .....	66
<b>Σχήμα 4:</b> Διάγραμμα ροής πειραματικής διαδικασίας ανάπτυξης των ωφέλιμων βακτηρίων σε δείγματα των λίθινων επιφανειών των επιδεικτικών μνημείων, στην κλίμακα του εργαστηρίου .....	67
<b>Σχήμα 5:</b> Αντίδραση υδρόλυσης της ουρίας για τον έλεγχο της ουρεολυτικής δράσης των βακτηρίων .....	118

## Ευρετήριο Πινάκων

<b>Πίνακας 1:</b> Σημεία δειγματοληψίας από κάθε επιδεικτικό μνημείο, κωδικός δείγματος και τύπος φθοράς.....	59
<b>Πίνακας 2:</b> Σύσταση θρεπτικού μέσου Nutrient.....	61
<b>Πίνακας 3:</b> Σύσταση θρεπτικού μέσου Wort .....	61
<b>Πίνακας 4:</b> Σύσταση θρεπτικού μέσου Reasoner's 2A.....	61
<b>Πίνακας 5:</b> Σύσταση θρεπτικού μέσου Czapeck .....	62
<b>Πίνακας 6:</b> Εκκινητές και συνθήκες PCR .....	64
<b>Πίνακας 7:</b> Σύσταση θρεπτικού μέσου για τον έλεγχο της ουρεολυτικής δράσης των βακτηρίων .....	65
<b>Πίνακας 8:</b> Αποτελέσματα στερεών καλλιιεργειών, των διαφορετικών θρεπτικών μέσων, ανά σημείο δειγματοληψίας για το Ευπαλίνειο όρυγμα .....	79
<b>Πίνακας 9:</b> Αποτελέσματα στερεών καλλιιεργειών, των διαφορετικών θρεπτικών μέσων, ανά σημείο δειγματοληψίας για την Ιερά Μονή Παναγίας Βαρνάκοβας.....	80
<b>Πίνακας 10:</b> Αποτελέσματα στερεών καλλιιεργειών, των διαφορετικών θρεπτικών μέσων, ανά σημείο δειγματοληψίας για το μνημείο Αφεντάκη (Α΄ Νεκροταφείο Αθηνών) .....	81
<b>Πίνακας 11:</b> Αποτελέσματα στερεών καλλιιεργειών, των διαφορετικών θρεπτικών μέσων, ανά σημείο δειγματοληψίας για το μνημείο Δελιγιάννη (Α΄ Νεκροταφείο Αθηνών).....	83
<b>Πίνακας 12:</b> Ταξινομικός σχολιασμός βακτηρίων που απομονώθηκαν από το Ευπαλίνειο όρυγμα .....	87
<b>Πίνακας 13:</b> Ταξινομικός σχολιασμός μυκήτων που απομονώθηκαν από το Ευπαλίνειο όρυγμα .....	89
<b>Πίνακας 14:</b> Ταξινομικός σχολιασμός βακτηρίων που απομονώθηκαν από την Ιερά Μονή Παναγίας Βαρνάκοβας .....	90
<b>Πίνακας 15:</b> Ταξινομικός σχολιασμός μυκήτων που απομονώθηκαν από την Ιερά Μονή Παναγίας Βαρνάκοβας .....	93
<b>Πίνακας 16:</b> Ταξινομικός σχολιασμός βακτηρίων που απομονώθηκαν από το μνημείο Αφεντάκη “Κοιμωμένη του Χαλεπά” στο Α΄ Νεκροταφείο Αθηνών.....	93
<b>Πίνακας 17:</b> Ταξινομικός σχολιασμός μυκήτων που απομονώθηκαν από το μνημείο Αφεντάκη “Κοιμωμένη του Χαλεπά” στο Α΄ Νεκροταφείο Αθηνών.....	95
<b>Πίνακας 18:</b> Ταξινομικός σχολιασμός βακτηρίων που απομονώθηκαν από το μνημείο Δελιγιάννη “Κοιμωμένη του Βιτσάρη” στο Α΄ Νεκροταφείο Αθηνών .....	98
<b>Πίνακας 19:</b> Ταξινομικός σχολιασμός μυκήτων που απομονώθηκαν από το μνημείο Δελιγιάννη “Κοιμωμένη του Βιτσάρη” στο Α΄ Νεκροταφείο Αθηνών .....	100
<b>Πίνακας 20:</b> Αποτελέσματα ελέγχου ουρεολυτικής δράσης των βακτηρίων που απομονώθηκαν από το Ευπαλίνειο όρυγμα .....	120
<b>Πίνακας 21:</b> Αποτελέσματα ελέγχου της ουρεολυτικής δράσης βακτηρίων που απομονώθηκαν από την Ιερά Μονή Παναγίας Βαρνάκοβας.....	125

<b>Πίνακας 22:</b> Αποτελέσματα ελέγχου της ουρεολυτικής δράσης βακτηρίων που απομονώθηκαν από τη “Κοιμωμένη του Χαλεπά” του μνημείου Αφεντάκη στο Α΄ Νεκροταφείο Αθηνών.....	133
<b>Πίνακας 23:</b> Αποτελέσματα ελέγχου της ουρεολυτικής δράσης βακτηρίων που απομονώθηκαν από τη “Κοιμωμένη του Βιτσάρη” του μνημείου Δελιγιάννη στο Α΄ Νεκροταφείο Αθηνών.....	137
<b>Πίνακας 24:</b> Βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα εναπόθεσης ανθρακικού ασβεστίου σε δείγματα λίθινων επιφανειών των επιδεικτικών μνημείων .....	144
<b>Πίνακας 25:</b> Αποτελέσματα κινητικών χαρακτηριστικών ανάπτυξης, ουρεολυτικής δράσης και ενεργότητας καρβονικής ανυδράσης των βακτηρίων που απομονώθηκαν από το Ευπαλίνειο όρυγμα .....	145
<b>Πίνακας 26:</b> Αποτελέσματα κινητικών χαρακτηριστικών ανάπτυξης, ουρεολυτικής δράσης και ενεργότητας καρβονικής ανυδράσης των βακτηρίων που απομονώθηκαν από την Ιερά Μονή Παναγίας Βαρνάκοβας.....	147
<b>Πίνακας 27:</b> Αποτελέσματα κινητικών χαρακτηριστικών ανάπτυξης, ουρεολυτικής δράσης και ενεργότητας καρβονικής ανυδράσης των βακτηρίων που απομονώθηκαν από τα μνημεία Αφεντάκη και Δελιγιάννη στο Α΄ Νεκροταφείο Αθηνών.....	148
<b>Πίνακας 28:</b> Μύκητες που ταυτοποιήθηκαν στα τέσσερα επιδεικτικά μνημεία .....	158
<b>Πίνακας 29:</b> Βακτήρια που ταυτοποιήθηκαν στα τέσσερα επιδεικτικά μνημεία.....	159
<b>Πίνακας 30:</b> Αποτελέσματα ελέγχου της ουρεολυτικής δράσης των βακτηρίων που απομονώθηκαν από το Ευπαλίνειο όρυγμα .....	178
<b>Πίνακας 31:</b> Αποτελέσματα ελέγχου της ουρεολυτικής δράσης των βακτηρίων που απομονώθηκαν από την Ιερά Μονή Παναγίας Βαρνάκοβας.....	188
<b>Πίνακας 32:</b> Αποτελέσματα ελέγχου της ουρεολυτικής δράσης των βακτηρίων που απομονώθηκαν από τη “Κοιμωμένη του Χαλεπά” του μνημείου Αφεντάκη στο Α΄ Νεκροταφείο Αθηνών.....	200
<b>Πίνακας 33:</b> Αποτελέσματα ελέγχου της ουρεολυτικής δράσης των βακτηρίων που απομονώθηκαν από τη “Κοιμωμένη του Βιτσάρη” του μνημείου Δελιγιάννη στο Α΄ Νεκροταφείο Αθηνών.....	206



## Ευρετήριο Διαγραμμάτων

<b>Διάγραμμα 1:</b> Βακτηριακή ποικιλότητα σε επίπεδο τάξης στα επιδεικτικά μνημεία.....	85
<b>Διάγραμμα 2:</b> Αριθμός δυνητικά επιβλαβών και ωφέλιμων στελεχών για τις λίθινες επιφάνειες που απομονώθηκαν και καλλιεργήθηκαν από τα σημεία δειγματοληψίας κάθε μνημείου. ....	103
<b>Διάγραμμα 3:</b> Χρονική μεταβολή της συγκέντρωσης κυτταρικής μάζας και του pH κατά την ανάπτυξη του βακτηρίου <i>Mycococcus xanthus</i> ATCC 435 σε υγρή καλλιέργεια.....	105
<b>Διαγράμματα 4:</b> Χρονική μεταβολή (α) της συγκέντρωσης κυτταρικής μάζας και (β) του pH κατά την ανάπτυξη των βακτηρίων <i>Agromyces agglutinans</i> , <i>Metabacillus indicus</i> , <i>Solibacillus isronensis</i> και <i>Pseudomonas cichori</i> που απομονώθηκαν από το Ευπαλίνιο Όρυγμα (Σημείο δειγματοληψίας E1). ....	105
<b>Διαγράμματα 5:</b> Χρονική μεταβολή (α) της συγκέντρωσης κυτταρικής μάζας και (β) του pH κατά την ανάπτυξη των βακτηρίων <i>Agrococcus jenensis</i> , <i>Sporosarcina thermotolerans</i> , <i>Metabacillus herbersteinensis</i> που απομονώθηκαν από το Ευπαλίνιο Όρυγμα (Σημείο δειγματοληψίας E3). ....	106
<b>Διαγράμματα 6:</b> Χρονική μεταβολή (α) της συγκέντρωσης κυτταρικής μάζας και (β) του pH κατά την ανάπτυξη των βακτηρίων <i>Rhodococcus baikonurensis</i> και <i>Rhodococcus wratislaviensis</i> που απομονώθηκαν από το Ευπαλίνιο Όρυγμα (Σημείο δειγματοληψίας E7). ....	106
<b>Διάγραμμα 7:</b> Μέγιστες πειραματικές και προβλεπόμενες από τη λογιστική εξίσωση τιμές συγκέντρωσης κυτταρικής μάζας των βακτηρίων που απομονώθηκαν από το Ευπαλίνιο όρυγμα .....	107
<b>Διάγραμμα 8:</b> Δυναμικό μεταφοράς των βακτηρίων που απομονώθηκαν από το Ευπαλίνιο όρυγμα. Η ράβδος με κόκκινο χρώμα αφορά στο δυναμικό μεταφοράς του βακτηρίου <i>M. xanthus</i> ATCC 435. ....	108
<b>Διάγραμμα 9:</b> Χρονική μεταβολή της συγκέντρωσης κυτταρικής μάζας και του pH κατά την ανάπτυξη του βακτηρίου <i>Peribacillus frigoritolerans</i> που απομονώθηκε από τον τύπο πορόλιθου S στην Ιερά Μονή Παναγίας Βαρνάκοβας (Σημείο δειγματοληψίας VS1). ....	109
<b>Διάγραμμα 10:</b> Χρονική μεταβολή (α) της συγκέντρωσης κυτταρικής μάζας και (β) του pH κατά την ανάπτυξη των βακτηρίων <i>Sutcliffiella halmapala</i> και <i>Metabacillus litoralis</i> που απομονώθηκαν από τον τύπο πορόλιθου S στην Ιερά Μονή Παναγίας Βαρνάκοβας (Σημείο δειγματοληψίας VS2). ....	109
<b>Διάγραμμα 11:</b> Χρονική μεταβολή (α) της συγκέντρωσης κυτταρικής μάζας και (β) του pH κατά την ανάπτυξη των βακτηρίων <i>Streptomyces thinghirensis</i> και <i>Metabacillus herbersteinensis</i> που απομονώθηκαν από τον τύπο πορόλιθου S στην Ιερά Μονή Παναγίας Βαρνάκοβας (Σημείο δειγματοληψίας VS3). ....	110
<b>Διάγραμμα 12:</b> Χρονική μεταβολή (α) της συγκέντρωσης κυτταρικής μάζας και (β) του pH κατά την ανάπτυξη των βακτηρίων <i>Paenibacillus insulae</i> , <i>Streptomyces anulatus</i> , <i>Bacillus sp.</i> και <i>Streptomyces sp.</i> που απομονώθηκαν από τον τύπο πορόλιθου S στην Ιερά Μονή Παναγίας Βαρνάκοβας (Σημείο δειγματοληψίας VS4). ....	110

- Διάγραμμα 13:** Χρονική μεταβολή της συγκέντρωσης κυτταρικής μάζας και του pH κατά την ανάπτυξη του βακτηρίου *Bacillus sp.* που απομονώθηκε από τον τύπο πορόλιθου S στην Ιερά Μονή Παναγίας Βαρνάκοβας (Σημείο δειγματοληψίας VS5). ..... 111
- Διάγραμμα 14:** Χρονική μεταβολή (α) της συγκέντρωσης κυτταρικής μάζας και (β) του pH κατά την ανάπτυξη των βακτηρίων *Metabacillus herbersteinensis*, *Metabacillus crassostreae*, *Fictibacillus halophilus* και *Metabacillus litoralis* που απομονώθηκαν από τον τύπο πορόλιθου O στην Ιερά Μονή Παναγίας Βαρνάκοβας (Σημείο δειγματοληψίας VO1)..... 111
- Διάγραμμα 15:** Χρονική μεταβολή της συγκέντρωσης κυτταρικής μάζας και του pH κατά την ανάπτυξη του βακτηρίου *Raenibacillus harenae* που απομονώθηκε από τον τύπο πορόλιθου O στην Ιερά Μονή Παναγίας Βαρνάκοβας (Σημείο δειγματοληψίας VO2). ..... 112
- Διάγραμμα 16:** Χρονική μεταβολή (α) της συγκέντρωσης κυτταρικής μάζας και (β) του pH κατά την ανάπτυξη των βακτηρίων *Raenibacillus prosopidis* και *Bacillus mesophilus* που απομονώθηκαν από τον τύπο πορόλιθου O στην Ιερά Μονή Παναγίας Βαρνάκοβας (Σημείο δειγματοληψίας VO3). ..... 112
- Διάγραμμα 17:** Μέγιστες πειραματικές και προβλεπόμενες από τη λογιστική εξίσωση τιμές συγκέντρωσης κυτταρικής μάζας των βακτηρίων που απομονώθηκαν από την Ιερά Μονή Παναγίας Βαρνάκοβας. .... 113
- Διάγραμμα 18:** Δυναμικό μεταφοράς των βακτηρίων που απομονώθηκαν από την Ιερά Μονή Παναγίας Βαρνάκοβας. Η ράβδος με κόκκινο χρώμα αφορά στο δυναμικό μεταφοράς του βακτηρίου *M.xanthus* ATCC 435. .... 114
- Διαγράμματα 19:** Χρονική μεταβολή (α) της συγκέντρωσης κυτταρικής μάζας και (β) του pH κατά την ανάπτυξη των βακτηρίων *Micrococcus luteus* και *Bacillus sp.* που απομονώθηκαν από μνημείο “Κοιμωμένη του Χαλεπά” της Αφεντάκη στο Α΄ Νεκροταφείο Αθηνών (Σημεία δειγματοληψίας A1 και A4 αντίστοιχα) ..... 115
- Διάγραμμα 20:** Χρονική μεταβολή (α) της συγκέντρωσης κυτταρικής μάζας και (β) του pH κατά την ανάπτυξη του βακτηρίου *Bacillus sp.* που απομονώθηκε από μνημείο “Κοιμωμένη του Βισάρη” της Δελιγιάννη στο Α΄ Νεκροταφείο Αθηνών (Σημείο δειγματοληψίας D1).. 115
- Διάγραμμα 21:** Ενεργότητα καρβονικής ανυδράσης βακτηρίων που απομονώθηκαν από το Ευπαλίνειο ορύγμα. .... 142
- Διάγραμμα 22:** Ενεργότητα καρβονικής ανυδράσης βακτηρίων που απομονώθηκαν από την Ιερά Μονή Παναγίας Βαρνάκοβας..... 142
- Διάγραμμα 23:** Ενεργότητα καρβονικής ανυδράσης βακτηρίων που απομονώθηκαν από τα μνημεία της Αφεντάκη και της Δελιγιάννη στο Α΄ Νεκροταφείο Αθηνών ..... 143
- Διάγραμμα 24:** Τελική τιμή pH των βακτηριακών καλλιεργειών σε δείγματα λίθινων επιφανειών του Ευπαλινείου ορύγματος ..... 149
- Διάγραμμα 25:** Εναπόθεση ανθρακικού ασβεστίου σε δείγματα λίθινων επιφανειών του Ευπαλινείου ορύγματος..... 150
- Διάγραμμα 26:** Τελική τιμή pH των βακτηριακών καλλιεργειών σε δείγματα λίθινων επιφανειών της Ιεράς Μονής Παναγίας Βαρνάκοβας ..... 151
- Διάγραμμα 27:** Εναπόθεση ανθρακικού ασβεστίου σε δείγματα λίθινων επιφανειών της Ιεράς Μονής Παναγίας Βαρνάκοβας..... 151
- Διάγραμμα 28:** Τελική τιμή pH των βακτηριακών καλλιεργειών σε δείγματα λίθινων επιφανειών του Α΄ Νεκροταφείου Αθηνών..... 152

- Διάγραμμα 29:** Εναπόθεση ανθρακικού ασβεστίου σε δείγματα λίθινων επιφανειών του Α' Νεκροταφείου Αθηνών ..... 153
- Διάγραμμα 30:** Εναπόθεση ανθρακικού ασβεστίου ανά τύπο λίθινης επιφάνειας (μάρμαρο, πωρόλιθος και συμπαγής ασβεστόλιθος) από τα βακτήρια (α) *Sporosarcina thermotolerans*, (β) *Pseudomonas cichorii*, (γ) *Peribacillus frigoritolerans*, (δ) *Micrococcus luteus*, (ε) *Metabacillus litoralis*, (στ) *Myxococcus xanthus* ATCC 435 και (ζ) μίγμα των βακτηρίων .... 155
- Διάγραμμα 31:** Καμπύλη αναφοράς συγκέντρωσης ανθρακικού ασβεστίου συναρτήσει της απορρόφησης στα 600nm ..... 177

## **Κεφάλαιο 1: Θεωρητικό υπόβαθρο**

### **1.1 Εισαγωγή στις καταστρεπτικές και ωφέλιμες επιδράσεις της μικροβιακής ανάπτυξης στις λίθινες επιφάνειες μνημείων**

Αρχαιολογικά μνημεία που επιβίωσαν χιλιάδες χρόνια ως κατάλοιπα πολιτισμικής κληρονομιάς, αντιμετωπίζουν επιταχυνόμενους ρυθμούς διάβρωσης και αποσύνθεσης που οφείλονται στην ανάπτυξη μικροβιακής ζωής στις επιφάνειες των λίθινων υποστρωμάτων τους. Οι μικροοργανισμοί που αναπτύσσονται προκαλούν με τη πάροδο του χρόνου μη αντιστρεπτές φθορές και αλλοιώσεις που οφείλονται στη δράση προϊόντων του μεταβολισμού τους, όπως ένζυμα, χρωστικές και διαβρωτικές ουσίες. Τα ήδη καθιερωμένα και συμβατικά υλικά συντήρησης εκτός από τη χαμηλή αποδοτικότητα και το παροδικό τους χαρακτήρα, κρίνονται ως μη φιλικά προς το περιβάλλον (Joseph, 2021). Αντιμέτωπη με την υποχρέωση διάδοσης των αρχαιολογικών μνημείων στις επόμενες γενιές, η παγκόσμια κοινότητα οφείλει να αναλάβει ενεργό ρόλο για τη βιώσιμη διατήρηση των μνημείων πολιτιστικής κληρονομιάς με την αρωγή της βιοτεχνολογίας (Meng et al., 2023). Πιο συγκεκριμένα, κρίνεται επιτακτική η ανάγκη εφαρμογής νέων οικολογικών βιο-υλικών για την προστασία και την αποκατάσταση των μνημείων μέσω αξιοποίησης των αυτόχθονων μικροβιακών πληθυσμών με ωφέλιμες επιδράσεις (Joseph, 2021). Η γνώση της ποικιλομορφίας της μικροβιακής ζωής απέχει αρκετά από το να είναι πλήρης, καθώς λιγότερο από το 1% των μικροοργανισμών που συναντώνται στα φυσικά περιβάλλοντα είναι καλλιεργήσιμα σε εργαστηριακές συνθήκες (Beata, 2020).

Γι' αυτό το λόγο, κρίνεται αναγκαία η κατανόηση των σχέσεων αλληλεπίδρασης των αυτόχθονων μικροοργανισμών, τόσο μεταξύ τους, όσο και με το εξωκυτταρικό τους περιβάλλον, για το καθορισμό του επιβλαβή ή προστατευτικού τους ρόλου στις λίθινες επιφάνειες (Pyzik et al., 2021). Η χρήση μεταγονιδιοματικών μεθόδων ανάλυσης για την ταυτοποίηση και τον ταξινομικό χαρακτηρισμό των μικροοργανισμών προωθεί τη κατανόηση των μηχανισμών βιοδιάβρωσης ή βιοαποκατάστασης που υιοθετούν. Οι ραγδαίες εξελίξεις στο χώρο της βιοτεχνολογίας επιτρέπουν την ελεγχόμενη διαχείριση μικροβιακών πληθυσμών με σκοπό το σχεδιασμό οικολογικών μεθόδων και υλικών συντήρησης για τη προστασία των μνημείων (Fernandes, 2006). Ο ωφέλιμος ρόλος των μικροοργανισμών έγκειται στην ικανότητα εναπόθεσης ανθρακικών αλάτων για την αποκατάσταση φθορών στις λίθινες επιφάνειες των μνημείων, μέσω κατάλληλης αξιοποίησης των μεταβολικών τους δικτύων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν τα ουρεολυτικά βακτήρια με ικανότητα εναπόθεσης ανθρακικού ασβεστίου για την πλήρωση ρωγμών (Koner et al., 2021).

Συνεπώς, με τη χρήση των σύγχρονων βιοτεχνολογικών και μεταγονιδιοματικών πρακτικών καθίσταται εφικτός ο προσδιορισμός των φαινομένων βιοκαταστροφής των μνημείων που προκαλούνται από την ανάπτυξη μικροοργανισμών στις λίθινες επιφάνειες τους, καθώς και η αξιοποίηση των κατάλληλων ωφέλιμων αυτόχθονων μικροβιακών πληθυσμών με σκοπό τη συντήρηση και την αποκατάστασή τους (Nazel, 2016).

### **1.2 Περιβάλλοντα ανάπτυξης μικροοργανισμών**

Η κυρίαρχη παρουσία των μικροοργανισμών σε όλα τα φυσικά περιβάλλοντα, οφείλεται στην προσαρμοστική τους ικανότητα στις περιβαλλοντικές συνθήκες και στο τεράστιο δυναμικό των παραγόμενων μεταβολιτών τους που επιτρέπουν την ανάπτυξη τους σε σχεδόν όλους τους τύπους λίθινων υποστρωμάτων (Stanaszek-Tomal, 2020).

### 1.2.1 Εσωτερικά περιβάλλοντα

Σε κλειστά εσωτερικά περιβάλλοντα, όπως μουσεία και ναοί, οι πηγές προέλευσης των μικροοργανισμών στις λίθινες επιφάνειες είναι η ατμόσφαιρα και η ανθρώπινη δραστηριότητα σε αυτά τα μέρη (Εικόνα 1). Οι μικροοργανισμοί είναι παρόντες στις εκτεθειμένες εξωτερικές επιφάνειες λίθινων αγαλμάτων και τοιχωμάτων, προκαλώντας φαινόμενα βιοδιάβρωσης και χρωματικών αλλοιώσεων. Αυτό οφείλεται κυρίως στις συνθήκες του εξωτερικού περιβάλλοντος των κυττάρων, όπως τα υψηλά ποσοστά υγρασίας, οι θερμοκρασιακές διακυμάνσεις και ο μη τακτικός που συχνά συναντώνται σε ναούς. (Stanaszek-Tomal, 2020).



**Εικόνα 1:** Παράγοντες που επηρεάζουν τη μικροβιακή ανάπτυξη σε εσωτερικά κλειστά περιβάλλοντα. Οι φωτογραφίες προέρχονται από την κρύπτη των Παπών, της κατακόμβης του Αγίου Καλλίστου στη Ρώμη, Ιταλία. Η παρουσία επισκεπτών απαιτεί φως και οδηγεί σε αύξηση της θερμοκρασίας, της σχετικής υγρασίας και στην απελευθέρωση διοξειδίου του άνθρακα, μεταβάλλοντας δραματικά την ευαίσθητη ισορροπία του τοπικού οικοσυστήματος (Lo Schiavo et al., 2020).

### 1.2.2 Υπαίθρια περιβάλλοντα

Η μικροβιακή ζωή που αναπτύσσεται στις λίθινες επιφάνειες υπαίθριων μνημείων συνιστά ένα πολύπλοκο και ποικιλόμορφο οικοσύστημα μικροοργανισμών που περιλαμβάνει βακτήρια, μύκητες, κυανοβακτήρια, μικροφύκη και λειχήνες (Scheerer et al., 2009). Σε υπαίθρια περιβάλλοντα με θερμό και υγρό κλίμα, δημιουργούνται ευνοϊκές συνθήκες για την ανάπτυξη των περισσότερων μικροοργανισμών, με τη βέλτιστη να επιτυγχάνεται σε θερμά περιβάλλοντα, με θερμοκρασίες άνω των 20°C και σε περιοχές με υψηλά ποσοστά σχετικής υγρασίας μεταξύ 65–70%.

Σε υπαίθρια περιβάλλοντα οι μικροοργανισμοί μεταφέρονται κυρίως μέσω του αέρα σε στρώματα σκόνης αιωρούμενων σωματιδίων. Η μικροβιακή ανάπτυξη υπόκειται σε εποχιακές διακυμάνσεις, καθώς οι κατευθυνόμενες από ανέμους βροχοπτώσεις και τα επίπεδα θερμοκρασίας, υγρασίας και ηλιακής ακτινοβολίας των επιφανειών δημιουργούν

διακριτά σημεία συγκέντρωσής τους, με αποτέλεσμα τη σύνθεση τοπικών μικρό-οικοσυστημάτων διαφορετικής βιοποικιλότητας (Εικόνα 2) (Stanaszek-Tomal, 2020).



**Εικόνα 2:** Μικροβιακή ανάπτυξη σε υπαίθρια και εσωτερικά περιβάλλοντα. Στην περιοχή A) παρουσιάζεται η λίθινη επιφάνεια ενός υπαίθριου γλυπτού από το πάρκο του κάστρου Courances στη Γαλλία, ενώ στην περιοχή B) απεικονίζονται οι εσωτερικοί λίθινοι πυλώνες από την εκκλησία «Les Salles-Lanauguyon» στη Γαλλία. Τα βέλη δείχνουν τις περιοχές υψηλής μικροβιακής ανάπτυξης (Mihajlovski, 2015)

### 1.2.3 Υπόγεια περιβάλλοντα

Τα υπόγεια περιβάλλοντα, όπως τα σπήλαια και οι κατακόμβες, αποτελούν οικοσυστήματα που χαρακτηρίζονται από μοναδική βιοποικιλότητα και μια πολύ λεπτή ισορροπία μεταξύ των μικροβιακών πληθυσμών που αναπτύσσονται στις βραχώδεις επιφάνειες τους. Τα ποσοστά σχετικής υγρασίας είναι υψηλά (περίπου 90%), η κυκλοφορία του αέρα είναι ασθενής και η θερμοκρασία παραμένει σταθερή σε χαμηλές τιμές σχεδόν όλο το χρόνο. Η μεταβολή αυτών των συνθηκών από διακυμάνσεις της διαθέσιμης φωτεινής ακτινοβολίας και την απελευθέρωση υψηλών ποσοστών διοξειδίου του άνθρακα μέσω αναπνοής των επισκεπτών, τροποποιούν ολόκληρο το γηγενές οικοσύστημα (Bontemps et al., 2022).

Σε αρκετές περιπτώσεις, οι σπηλιές αποτελούν δυσμενή περιβάλλοντα για την ανάπτυξη μικροοργανισμών, λόγω της χωρικής απομόνωσης και των χαμηλών επιπέδων διαθέσιμων θρεπτικών συστατικών. Στα υπόγεια περιβάλλοντα, η ουρεόλυση και η φωτοσύνθεση αποτελούν τις κυριότερες μεταβολικές οδούς εναπόθεσης ανθρακικού ασβεστίου από τους μικροοργανισμούς που συμμετέχουν ενεργά στο σχηματισμό σταλακτιτών και σταλαγμιτών (Εικόνα 3) (Bontemps et al., 2022).

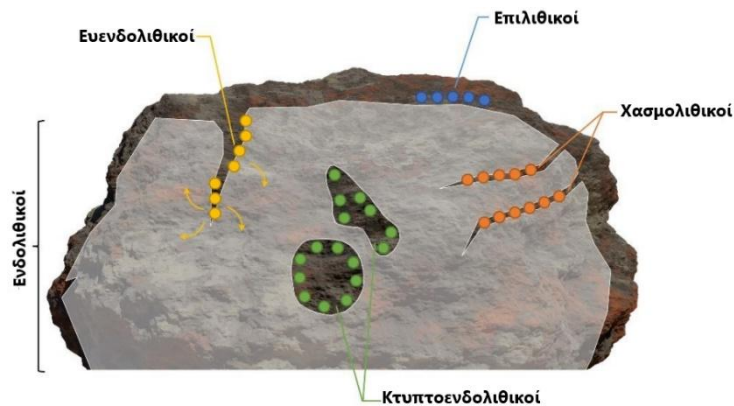


**Εικόνα 3:** Σχηματισμός βιοορυκτών. A) Σταλακτίτες (στην οροφή), B) Σταλαγμίτες (στο έδαφος), Γ) Σύνθεση βιοορυκτών. Τα πράσινα βιοορυκτά αποτελούνται από δισθενή θειικό σίδηρο και βρίσκονται στο ορυχείο Pozo Alfredo στην Ανδαλουσία, Ισπανία (Gabriel & Northup, 2012).

Αξίζει να σημειωθεί, ότι με την εισαγωγή ουρίας στις ασβεστολιθικές επιφάνειες των σπηλαιών, μέσω ανθρώπινης παρέμβασης, είτε μέσω των ούρων των θηλαστικών, είναι δυνατή η ανάπτυξη ουρεολυτικών βακτηρίων, τα οποία δεσμεύουν το διαθέσιμο διοξείδιο του άνθρακα και τα ιόντα ασβεστίου του λίθινου υποστρώματος για την εναπόθεση ανθρακικού ασβεστίου (Joseph, 2021).

### 1.3 Κατηγορίες μικροοργανισμών με βάση τις περιοχές ανάπτυξης τους στα λίθινα υποστρώματα

Οι μικροοργανισμοί αναπτύσσονται είτε στην επιφάνεια του λίθινου υποστρώματος (επιλιθικοί), είτε σε προστατευόμενες περιοχές, όπως ρωγμές και σχίσματα (χασμολιθικοί), ή διεισδύσουν μερικά χιλιοστά ή ακόμη και εκατοστά στο εσωτερικό πορώδες σύστημα του (ενδολιθικοί) (Εικόνα 4) (Scheerer et al., 2009). Οι ενδολιθικοί μικροοργανισμοί διεισδύουν στο εσωτερικό των λίθινων υποστρωμάτων προς αναζήτηση νέων πηγών θρεπτικών συστατικών, περιοχών ανάπτυξης απουσίας ανταγωνισμού και προστασίας τους από την υπεριώδη ηλιακή ακτινοβολία, τις θερμοκρασιακές διακυμάνσεις και τους ισχυρούς ανέμους που αναστέλλουν την ανάπτυξη τους (Stanaszek-Tomal, 2020). Επιπλέον, οι ενδολιθικοί μικροοργανισμοί ανάλογα με τις περιοχές ανάπτυξης τους στο εσωτερικό των λίθινων υποστρωμάτων διακρίνονται σε χασμοενδολιθικούς που αναπτύσσονται στο εσωτερικό ρωγμών, σε κρυπτοενδολιθικούς που εντοπίζονται στο πορώδες σύστημα του λίθου και σε ευενδολιθικούς, οι οποίοι παρουσιάζουν την ικανότητα διείσδυσης σε βάθος έως και μερικών εκατοστών κάτω από την επιφάνεια του λίθινου υποστρώματος. Επομένως, ο ενδολιθικός αποικισμός αποτελεί μια προσαρμοστική στρατηγική επιβίωσης που υιοθετείται από πολλούς μικροοργανισμούς, όπως κυανοβακτήρια, μικροφύκη, μύκητες και λειχήνες, αποτελώντας ένα καθοριστικά εξελικτικό πλεονέκτημα της φυσικής επιλογής (Urzí & Albertano, 2001).



**Εικόνα 4:** Κατηγορίες μικροοργανισμών ανάλογα τις περιοχές ανάπτυξης τους στα λίθινα υποστρώματα (Dievart et al., 2022)

Με τη χρήση μεταγονιδιοματικών μεθόδων ανάλυσης προσδιορίζεται η ποικιλομορφία των ενδολιθικών μικροοργανισμών και υπογραμμίζονται οι σημαντικές διαφορές της με την αντίστοιχη των επιλιθικών. Αυτού του είδους οι διαφορές οφείλονται στις συνθήκες που επικρατούν στο εξωτερικό και στο εσωτερικό περιβάλλον του λίθινου υποστρώματος. Για παράδειγμα, στη περίπτωση των επιλιθικών μικροοργανισμών επικρατεί υψηλή διαθεσιμότητα και ποικιλία θρεπτικών συστατικών που προσκολλώνται στις επιφάνειες του λίθινου υποστρώματος. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, λειτουργικές και μεταβολικές διαφοροποιήσεις μεταξύ των επιλιθικών και των ενδολιθικών μικροβιακών πληθυσμών που οφείλονται στην ανάπτυξη των κατάλληλων μηχανισμών επιβίωσης τους στα διαφορετικά περιβάλλοντα που αναπτύσσονται. Γενικότερα, οι μικροοργανισμοί σε μετριοπαθή κλίματα

τήνουν να αναπτύσσονται στην επιφάνεια των λίθων, ενώ σε τροπικά και υποτροπικά κλίματα προτιμούν να διεισδύουν στο εσωτερικό των λίθινων υποστρωμάτων (Scheerer et al., 2009).

#### **1.4 Παράγοντες που επηρεάζουν την μικροβιακή ανάπτυξη στις λίθινες επιφάνειες**

Η ανάπτυξη και η βιοποικιλότητά της μικροβιακής ζωής στις λίθινες επιφάνειες των υπαίθριων μνημείων εξαρτάται τόσο από τις επικρατούσες περιβαλλοντικές συνθήκες, όσο και από τη βιοδεκτικότητα (bioreceptivity) του υποστρώματος. Η βιοδεκτικότητα των λίθινων υποστρωμάτων και οι περιβαλλοντικές συνθήκες εξαρτώνται από τη γεωγραφική του θέση του μνημείου. Οι συνθήκες του τοπικού μικρο- και μακρο- περιβάλλοντος, η ατμοσφαιρική ρύπανση, η παρουσία θρεπτικών συστατικών, καθώς και ο αρχιτεκτονικός σχεδιασμός και οι τεχνικές λεπτομέρειες των μνημείων εξαρτώνται άμεσα από την τοποθεσία τους που αποτελεί τη πρωταρχική παράμετρο μικροβιακής ανάπτυξης (Eyssautier-Chuine, 2021). Η θέση ενός μνημείου μακριά από τα κέντρα των μεγαλουπόλεων, τους δρόμους συχνής κυκλοφορίας, τις βιομηχανίες και ιδιαίτερα μακριά από τη θάλασσα προστατεύει τις λίθινες επιφάνειες του από φαινόμενα ταχείας διάβρωσης που οφείλονται σε επικαθίσεις (Warscheid & Braams 2000). Επιπλέον αξίζει να σημειωθεί, η σταδιακή διάβρωση μνημείων που εκτίθενται σε πλατείες, από τα εξαιρετικά όξινα περιττώματα των πτηνών που οδηγούν στη διάλυση των συστατικών των λίθινων υποστρωμάτων και δημιουργώντας χρώσεις. Επίσης, οι ρωγμές των επιφανειών αποτελούν ιδανικό μέρος για φωλιές εντόμων και κυρίως μυρμηγκιών, τα οποία παράγουν το έντονα διαβρωτικό μυρμηγκικό οξύ. Τέλος, η ανθρώπινη επαφή σε καθημερινή βάση των λίθινων επιφανειών, προκαλεί τη λείανση τους (Cattò, 2023).

##### **1.4.1 Βιοδεκτικότητα**

Στους μικροοργανισμούς που εντοπίζονται στις λίθινες επιφάνειες μνημείων, αρχαιολογικών χώρων, αγαλμάτων, τοιχογραφιών, μωσαϊκών, σπηλαίων και κατακομβών κυριαρχεί η ανάπτυξη βακτηρίων, μυκήτων, μικροφυκών και λειχήνων. Ανάλογα με τον τύπο του υποστρώματος (ασβεστόλιθος, πωρόλιθος, μάρμαρο κ.λπ.) διαφέρει η υφή της επιφάνειας, η σκληρότητα, ο πορώδης χαρακτήρας, το pH και η χημική του σύνθεση, χαρακτηριστικά που καθιστούν ευνοϊκές ή δυσμενείς τις συνθήκες για την ανάπτυξη μικροβιακής ζωής. Η ικανότητα των λίθινων υποστρωμάτων να υποστηρίξουν την ανάπτυξη μικροβιακής ζωής ονομάζεται βιοδεκτικότητα. Η πρωτογενής βιοδεκτικότητα εκφράζει τη δυνατότητα αποικισμού ενός υποστρώματος πλούσιου σε θρεπτικά συστατικά, η δευτερογενής βιοδιαθεσιμότητα περιλαμβάνει τα αποτελέσματα των επιδράσεων βιοτικών και αβιοτικών παραγόντων στην υποβάθμιση του υποστρώματος, ενώ η τριτογενής βιοδιαθεσιμότητα αφορά την ποσότητα και το είδος των διαθέσιμων θρεπτικών συστατικών που περιέχονται στο υπόστρωμα (π.χ. νεκρή βιομάζα, σωματίδια σκόνης, ζωικά κόπρανα, αντιβιοτικά, κ.λπ.). Οι διαφορετικοί τύποι λίθινων υποστρωμάτων παρουσιάζουν διαφορετική βιοδεκτικότητα ως προς την ανάπτυξη μικροοργανισμών που σχετίζεται κυρίως με τη χημική σύνθεση του υποστρώματος, αλλά και με φυσικά του χαρακτηριστικά, όπως το πορώδες σύστημα και η τραχύτητα της επιφάνειας (Joseph 2021). Τα λίθινα υποστρώματα με υψηλό πορώδες ευνοούν τον μικροβιακό αποικισμό, λόγω της μεγαλύτερης διαθεσιμότητας νερού. Η τραχύτητα και το μέτρο της λιποφιλικότητας της επιφάνειας δραματίζουν καθοριστικό ρόλο στον αποικισμό των μικροοργανισμών, η πλειοψηφία των οποίων χαρακτηρίζονται ως υδρόφιλοι, καθώς όσο μικρότερο μέτρο λιποφιλικότητας και όσο μεγαλύτερη τραχύτητα εμφανίζει το λίθινο υπόστρωμα, τόσο ισχυρότερη είναι η προσκόλληση των μικροοργανισμών σε αυτό. Επιπλέον, η προσκόλληση αυξάνεται σε πορώδεις επιφάνειες λόγω της μεγαλύτερης διαθέσιμης επιφάνειας δέσμευσης των



μικροοργανισμών. Τέλος, οι τραχύτερες επιφάνειες επιτρέπουν τη προστασία των μικροοργανισμών από τον άνεμο και την έκθεση στην ηλιακή υπεριώδη ακτινοβολία (Stanaszek-Tomal, 2020).

#### 1.4.2 Περιβαλλοντικοί παράγοντες

Οι κύριοι παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών στις λίθινες επιφάνειες των μνημείων εξαρτώνται από την γεωγραφική τους θέση (Σχήμα 1). Υψηλές διακυμάνσεις και ακραίες μεταβολές των περιβαλλοντικών συνθηκών, ενδέχεται να προκαλέσουν αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης και της μεταβολικής δραστηριότητας, οδηγώντας στο θάνατο των μικροοργανισμών (Joseph 2021).



**Σχήμα 1:** Παράγοντες που επηρεάζουν τη μικροβιακή ανάπτυξη (Stanaszek-Tomal, 2020)

##### 1.4.2.1 Θερμοκρασία

Η θερμοκρασία αποτελεί τη σημαντικότερη παράμετρο ανάπτυξης των μικροοργανισμών. Το θερμοκρασιακό εύρος μικροβιακής ανάπτυξης περιλαμβάνει το ελάχιστο και μέγιστο όριο θερμοκρασίας, εντός των οποίων πραγματοποιείται κυτταρική ανάπτυξη, καθώς και το βέλτιστο θερμοκρασιακό εύρος, στο οποίο επιτυγχάνεται ο μέγιστος ρυθμός ανάπτυξης. Στην εύκρατη ζώνη, οι περισσότεροι μικροοργανισμοί αναπτύσσονται σε θερμοκρασία δωματίου, η οποία κυμαίνεται συνήθως μεταξύ 18–20 °C (Stanaszek-Tomal, 2020).

Οι μικροοργανισμοί ανάλογα με το βέλτιστο θερμοκρασιακό εύρος ανάπτυξής τους, διακρίνονται σε τρεις κατηγορίες. Οι ψυχρόφιλοι, οι οποίοι αναπτύσσονται βέλτιστα σε θερμοκρασίες μεταξύ 0-5°C, οι μεσόφιλοι μεταξύ 20-45°C και οι θερμόφιλοι 55-75°C.

Σε θερμά κλίματα, οι εκτεθειμένες στην ηλιακή ακτινοβολία λίθινες επιφάνειες, εμφανίζουν υψηλές διακυμάνσεις επιφανειακής θερμοκρασίας συγκριτικά με τις αντίστοιχες σκιερές. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, την παραγωγή ουσιών από τους μικροοργανισμούς για τη προστασία των κυττάρων τους. Αξίζει να σημειωθεί, ότι η μικροβιακή ανάπτυξη και ποικιλομορφία είναι συνήθως πολύ υψηλότερες στις σκιερές επιφάνειες των λίθινων μνημείων, λόγω της επικράτησης ευνοϊκότερων τιμών θερμοκρασίας (Joseph, 2021).

##### 1.4.2.2 Υγρασία

Η ανάπτυξη των μικροοργανισμών στις λίθινες επιφάνειες των μνημείων, επηρεάζεται σημαντικά από την υγρασία του αέρα και τη διαθεσιμότητα νερού του υποστρώματος. Όλοι οι μικροοργανισμοί αναπτύσσονται βέλτιστα για τιμές ενεργότητας νερού ( $a_w$ ) κοντά στο 1.0, όπου  $0 \leq a_w \leq 1.0$ . Τα ελάχιστα επίπεδα υγρασίας που επιτρέπουν την ανάπτυξη

μικροοργανισμών ποικίλλουν σημαντικά, με την πλειοψηφία τους να αναπτύσσονται σε ποσοστά σχετικής υγρασίας μεγαλύτερα του 40%. Η παρουσία υγρασίας τόσο στην επιφάνεια, όσο και στο εσωτερικό των λίθινων υποστρωμάτων οφείλεται σε βροχοπτώσεις, σε συμπύκνωση υδρατμών και στη μεταφορά τριχοειδών νερών (Tenore et al., 2023).

#### 1.4.2.3 pH

Το pH του λίθινου υποστρώματος επηρεάζει τη μικροβιακή ανάπτυξη, καθώς οι μικροοργανισμοί αναπτύσσονται σε στενά εύρη τιμών pH. Οι ακραίες τιμές pH δεν ευνοούν τη μικροβιακή ανάπτυξη, λόγω της ανασταλτικής επίδρασης των ιόντων  $H^+$  ή  $OH^-$ . Το pH ενός λίθινου υποστρώματος, σχετίζεται με το πλήθος των ιόντων  $H^+$  που απελευθερώνονται κατά την επαφή του με υδατικά διαλύματα (Joseph, 2021).

Αν και τα περισσότεροι μικροοργανισμοί αναπτύσσονται σε ουδέτερες τιμές pH, οι μύκητες αναπτύσσονται βέλτιστα σε ελαφρώς όξινα υποστρώματα (αμμόλιθοι) σε τιμές μεταξύ 5.2–5.6, ενώ οι αλκαλικές συνθήκες (ασβεστόλιθοι) ευνοούν την ανάπτυξη κυανοβακτηρίων σε τιμές pH μεταξύ 7.5–10.0. Τα περισσότερα βακτήρια προτιμούν ένα ουδέτερο ή ελαφρώς αλκαλικό pH που κυμαίνεται μεταξύ 7.0–7.5.

Είναι προφανές, ότι δεν είναι δυνατόν να καθοριστεί επακριβώς η βέλτιστη τιμή pH για κάθε είδος μικροοργανισμού. Γι' αυτό το λόγο, οι μικροοργανισμοί διακρίνονται με βάση το εύρος τιμών pH στο οποίο παρουσιάζουν τη βέλτιστη ανάπτυξη σε οξεόφιλους για τιμές pH μεταξύ 1.0–5.0, σε ουδετερόφιλους όταν το pH κυμαίνεται μεταξύ 6.5–7.0 και σε αλκαλόφιλους για pH μεταξύ 8.0–11.0 (Tenore et al., 2023).

#### 1.4.2.4 Διαθεσιμότητα οξυγόνου

Καθοριστικό ρόλο στην ανάπτυξη των μικροοργανισμών διαδραματίζει και η διαθεσιμότητα οξυγόνου, οι οποίοι ανάλογα με τις απαιτήσεις τους διακρίνονται σε τρεις κατηγορίες. Στους υποχρεωτικά αερόβιους, οι οποίοι απαιτούν οξυγόνο, καθώς παράγουν την απαραίτητη ενέργεια για την ανάπτυξη και τη μεταβολική τους δράση μέσω αερόβιας αναπνοής. Οι προαιρετικά αναερόβιοι μικροοργανισμοί, μπορούν να αναπτυχθούν τόσο σε αερόβιες, όσο και σε αναερόβιες συνθήκες, παρόλο που η βέλτιστη ανάπτυξη τους πραγματοποιείται παρουσία οξυγόνου. Τέλος, οι υποχρεωτικά αναερόβιοι δεν μπορούν να αναπτυχθούν και να επιβιώσουν παρουσία οξυγόνου, καθώς είναι τοξικό γι' αυτούς.

Η μικροβιακή ανάπτυξη στις επιφάνειες των λίθινων μνημείων ενισχύεται από την έλλειψη αποτελεσματικού αερισμού, η οποία είναι χαρακτηριστική κατά τη διάρκεια της θερινής περιόδου. Ο ορθός αερισμός παρεμποδίζει την απορρόφηση της υγρασίας από το λίθινο υπόστρωμα. Ελλείψει συχνού και υψηλής έντασης αερισμού, δεν είναι δυνατή η απομάκρυνση της υγρασίας από τις λίθινες επιφάνειες, με αποτέλεσμα την επιβάρυνση του ατμοσφαιρικού αέρα με επιπλέον μικροβιακό φορτίο που υποβαθμίζει σημαντικά την ποιότητα του (Stanaszek-Tomal, 2020).

#### 1.4.2.5 Ηλιακή ακτινοβολία

Η ηλιακή ακτινοβολία είτε ενισχύει, είτε αναστέλλει την ανάπτυξη των μικροοργανισμών ανάλογα την ένταση της. Οι περισσότεροι μικροοργανισμοί και ιδιαίτερα οι φωτοσυνθετικοί (μικροφύκη, κυανοβακτήρια) απαιτούν ήπιας έντασης ηλιακή ακτινοβολία για την ανάπτυξη και την επιτέλεση των μεταβολικών τους διεργασιών. Παρόλα αυτά, η συνεχής έκθεσή σε υψηλά επίπεδα υπεριώδους ακτινοβολίας ενδέχεται να αναστείλει την ανάπτυξη ορισμένων μικροοργανισμών και να οδηγήσει δυνητικά στο θάνατό τους. Αυτό συμβαίνει συνήθως στη περίπτωση των λιγότερο ανθεκτικών μικροοργανισμών που δεν διαθέτουν τους κατάλληλους μηχανισμούς επιβίωσης έναντι στην υπεριώδη ακτινοβολία, με κυριότερο τη παραγωγή των κατάλληλων χρωστικών (Stanaszek-Tomal, 2020).

#### 1.4.2.6 Συγκέντρωση χλωριούχου νατρίου (NaCl)

Οι μικροοργανισμοί και κυρίως τα βακτήρια ανάλογα με την ικανότητά τους να αναπτύσσονται με βάση την ανοχή και τις διαφορετικές τους απαιτήσεις σε χλωριούχο νάτριο (NaCl), διακρίνονται σε αλόφιλους, οι οποίοι απαιτούν μέτριες συγκεντρώσεις άλατος έως 15%, οι εξαιρετικά ή υποχρεωτικά αλόφιλοι, οι οποίοι είναι ανθεκτικοί σε υψηλές συγκεντρώσεις αλατιού έως 30% και τέλος οι προαιρετικά αλόφιλοι που είναι εξαιρετικά ευαίσθητοι στην παρουσία άλατος και μπορούν να αναπτυχθούν μόνο παρουσία χαμηλών συγκεντρώσεων του έως 2% (Stanaszek-Tomal, 2020).

#### 1.4.2.7 Υδροστατική πίεση

Οι μικροοργανισμοί εμφανίζουν ευαισθησία σε υψηλές τιμές υδροστατικής πίεσης που μπορεί να οδηγήσει στην αναστολή της ανάπτυξής τους. Με βάση την ανοχή τους σε συνθήκες υψηλής πίεσης, τα βακτήρια και οι μύκητες διακρίνονται σε τρεις κατηγορίες. Τα κατά Gram αρνητικά βακτήρια, ευαίσθητα σε υψηλές πιέσεις, τα οποία απενεργοποιούνται άνω των 300 MPa, σε μύκητες που απενεργοποιούνται σε πιέσεις μεγαλύτερες των 400 MPa και τα κατά Gram θετικά βακτήρια, τα οποία είναι ανθεκτικά σε υψηλές πιέσεις έως των 600MPa (Stanaszek-Tomal, 2020).

#### 1.4.2.8 Ωσμωτική πίεση

Ωσμωτική είναι η πίεση που εφαρμόζει το νερό στην ημιδιαπερατή μεμβράνη (πλασματική μεμβράνη) που περιβάλλει το κύτταρο, ως απάντηση στην άνιση κατανομή των διαλυμένων ουσιών του εξωκυτταρικού περιβάλλοντος. Όταν ένας μικροοργανισμός βρίσκεται σε υποτονικό περιβάλλον, στο οποίο η συγκέντρωση της διαλυμένης ουσίας έξω από το κύτταρο είναι χαμηλότερη το εσωτερικό του, εισέρχεται υπό ελεγχόμενη ροή νερό μέσω της πλασματικής μεμβράνης, , ώστε να αποτραπεί η βίαιη λύση του κυττάρου.

Τα περισσότερα βακτήρια, μύκητες και μικροφύκη διαθέτουν άκαμπτα κυτταρικά τοιχώματα, τα οποία τους προσδίδουν υψηλή αντοχή σε ελαφρά υποτονικό περιβάλλον, διατηρώντας τη συγκέντρωση των διαλυμένων ουσιών τους ελαφρώς υψηλότερη στο εσωτερικό τους. Αντίθετα, όταν οι μικροοργανισμοί βρίσκονται σε υπερτασικό περιβάλλον, όπου η συγκέντρωση των διαλυμένων ουσιών είναι υψηλότερη στο εξωκυτταρικό περιβάλλον, ακολουθεί απορροή νερού από το ενδοκυτταρικό, προκαλώντας την αφυδάτωση του κυττάρου, τη συστολή της κυτταρικής του μεμβράνης που οδηγεί τελικά στη λύση του.

Η αύξηση της συγκέντρωσης διαλυμένων ουσιών στο περιβάλλον επηρεάζει τη διαθεσιμότητα του νερού στα κύτταρα. Οι μικροοργανισμοί ικανοί να διατηρούν σταθερά τα επίπεδα νερού τους σε περιβάλλοντα με υψηλή συγκέντρωση διαλυμένων ουσιών (υπερτονικά περιβάλλοντα) αυξάνοντας την αντίστοιχη συγκέντρωσή τους στο ενδοκυτταρικό περιβάλλον, θεωρούνται ωσμωτικά ανεκτικοί (Stanaszek-Tomal, 2020).

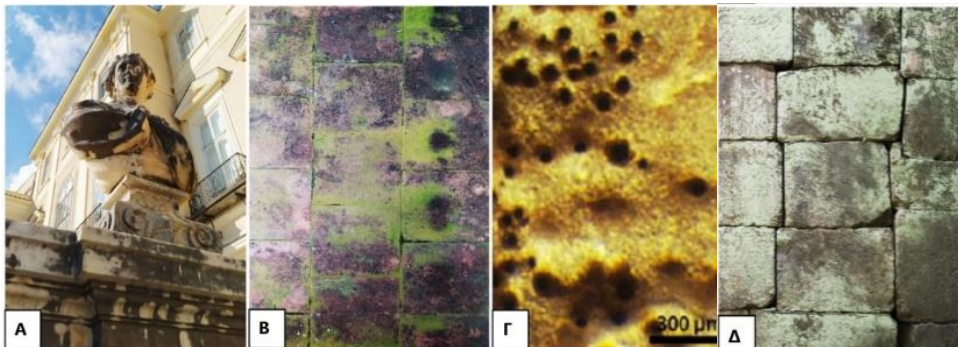
#### 1.4.2.9 Παρουσία θρεπτικών συστατικών

Απαραίτητη προϋπόθεση για την ανάπτυξη μικροβιακής ζωής αποτελεί η παρουσία πηγών άνθρακα και αζώτου με υψηλές συγκεντρώσεις θρεπτικών συστατικών, όπως φωσφορικών, νιτρικών και θειικών αλάτων. Στη περίπτωση των αυτότροφων μικροοργανισμών, πηγή ενέργειας είναι η ηλιακή ακτινοβολία (φωτοαυτότροφοι) ή η ενέργεια που παράγεται κατά την οξείδωση ανόργανων ενώσεων (χημιοαυτότροφοι), ενώ πηγή ανόργανου άνθρακα αποτελεί το διαθέσιμο στην ατμόσφαιρα διοξείδιο του άνθρακα. Από την άλλη πλευρά, για τους ετερότροφους μικροοργανισμούς, οι οργανικές ενώσεις αποτελούν τις πηγές ενέργειας και άνθρακα (Joseph, 2021). Επιπλέον, για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών απαιτούνται μεταλλικά ιόντα σιδήρου, μαγνησίου, ασβεστίου, ψευδαργύρου, νατρίου, καλίου και

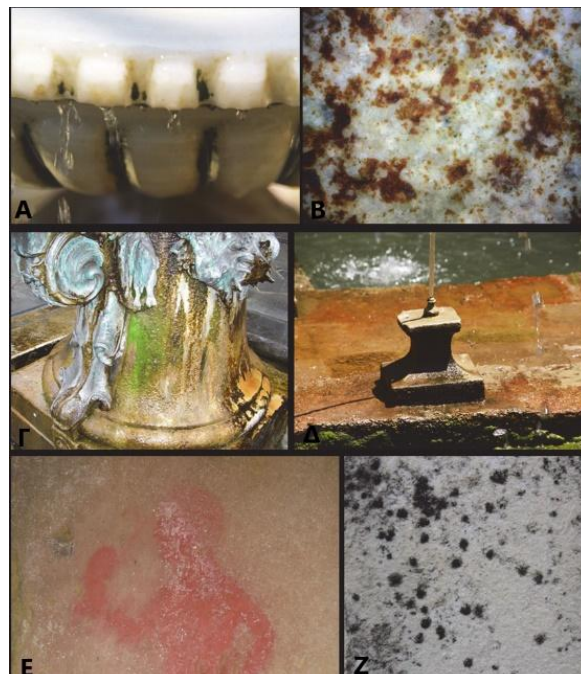
ιχνοστοιχεία. Τέλος, οι περισσότεροι μικροοργανισμοί απαιτούν την παρουσία νερού και ατμοσφαιρικού αέρα για την παροχή οξυγόνου, αζώτου και υδρογόνου (Stanaszek-Tomał, 2020).

### 1.5 Φαινόμενα διάβρωσης και αλλοίωσης των λίθινων επιφανειών μνημείων από την ανάπτυξη μικροοργανισμών

Οι μικροοργανισμοί υπεύθυνοι για τη βιοδιάβρωση και την υποβάθμιση των λίθινων επιφανειών μνημείων είναι τα αυτότροφα και ετερότροφα βακτήρια, οι μύκητες, οι φωτοσυνθετικοί μικροοργανισμοί (μικροφύκη και κυανοβακτήρια) και οι λειχήνες, τόσο σε μεμονωμένη δράση, όσο και μέσω του συνεργατικού σχηματισμού βιοφίλμ (Εικόνες 5 και 6).



**Εικόνα 5:** Φαινόμενα βιοδιάβρωσης λίθινων επιφανειών από την ανάπτυξη μικροοργανισμών, Α) Σχηματισμός μαύρης κρούστας από ετερότροφα βακτήρια, Β) Σχηματισμός πράσινης πατίνας από κυανοβακτήρια, Γ) Πρόκληση μικρό-ρωγμών από λειχήνες και Δ) Φαινόμενα αποχρωματισμού από λειχήνες (Cozzolino et al., 2022).



**Εικόνα 6:** Διαφορετικές κατηγορίες μικροβιακού αποικισμού σε λίθινες επιφάνειες μνημείων, Α) Πράσινες αποικίες μικροφυκών, Β) Μικροβιακή πατίνα βακτηριακής προέλευσης, Γ) Σχηματισμός καφέ και πράσινων βιοφίλμ από κυανοβακτήρια,, Δ) Δημιουργία βιοφίλμ από φωτοαυτότροφους μικροοργανισμούς, Ε) Λευκές και ροζ κηλίδες από νηματοειδή βακτήρια και Ζ) Ανάπτυξη αποικιών μυκήτων (Cuzman et al., 2021).

Οι μηχανισμοί βιοδιάβρωσης σχετίζονται με τις μεταβολικές δραστηριότητες των μικροοργανισμών που αναπτύσσονται στις επιφάνειες και στο εσωτερικό πορώδες σύστημα λίθινων υποστρωμάτων (Εικόνα 7).



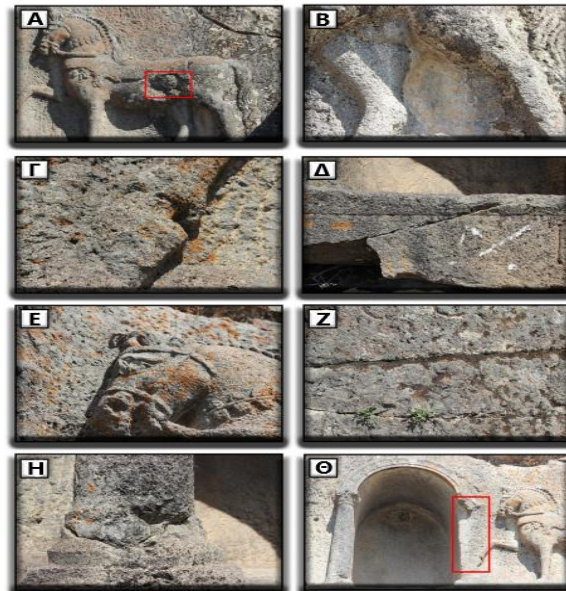
**Εικόνα 7:** Λεπτομέρειες φθαρμένης τοιχογραφίας από εσωτερικό τοίχο της Ιεράς Μονής Αγίας Παρθένου στη Σερβία, Α) Αποχρωματισμοί στην επιφάνεια της τοιχογραφίας, Β) Ρωγμές με εμφανή μικροβιακή ανάπτυξη (Stupar et al., 2014).

Οι επιβλαβείς επιδράσεις της ανάπτυξης μικροοργανισμών σε μνημεία διακρίνονται σε μηχανικές, βιοχημικές και αισθητικές. Τα μικροβιακά κύτταρα συμβάλουν άμεσα στην υποβάθμιση των λίθινων επιφανειών, χρησιμοποιώντας τις ως υπόστρωμα θρεπτικών συστατικών ή έμμεσα μέσω επιβολής μηχανικών πιέσεων που διαταράσσουν τη δομή τους και έκκρισης διαβρωτικών και χρωστικών μεταβολικών προϊόντων που προκαλούν φθορές και αλλοιώσεις (Εικόνα 8) (Joseph, 2021).

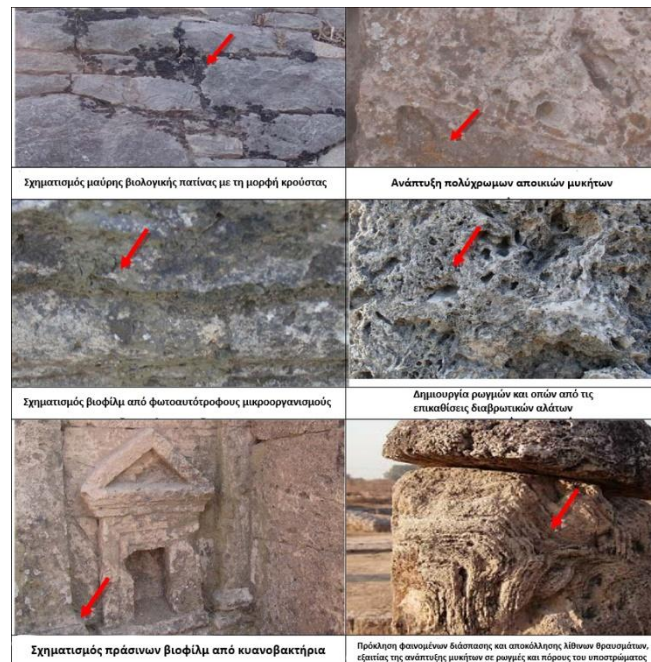


**Εικόνα 8:** Φαινόμενα βιοδιάβρωσης στην Ιερά Μονή της Αγίας Παρθένου στη Σερβία, Α) Αισθητικές αλλοιώσεις στο εξωτερικό του ναού, Β) Ρωγμές σε εμπρόσθια πρόσοψη, Γ) Σχηματισμός βιοφίλμ από μύκητες και λειχήνες, Δ) Σύνθεση βιολογικής πατίνας από κυανοβακτήρια, Ε) και Ζ) Ανάπτυξη βρύων και λειχήνων σε εξωτερικές επιφάνειες τοιχωμάτων (Stupar et al., 2014).

Πιο συγκεκριμένα, οι μηχανικές φθορές οφείλονται σε καταπονήσεις από τη διείσδυση των ριζοειδών απολήξεων των μικροοργανισμών στο εσωτερικό του υποστρώματος με αποτέλεσμα την εξασθένηση της δομής του και τη πρόκληση ρωγμών (Scheerer et al., 2009). Η εμφάνιση φαινομένων βιοδιάβρωσης οφείλεται στην έκκριση μεταβολικών προϊόντων από τους μικροοργανισμούς, όπως οργανικά και ανόργανα οξέα, αλκαλικές ενώσεις και ωσμωλύτες που οδηγούν στη διάλυση των λίθινων υποστρωμάτων (Εικόνες 9 και 10).

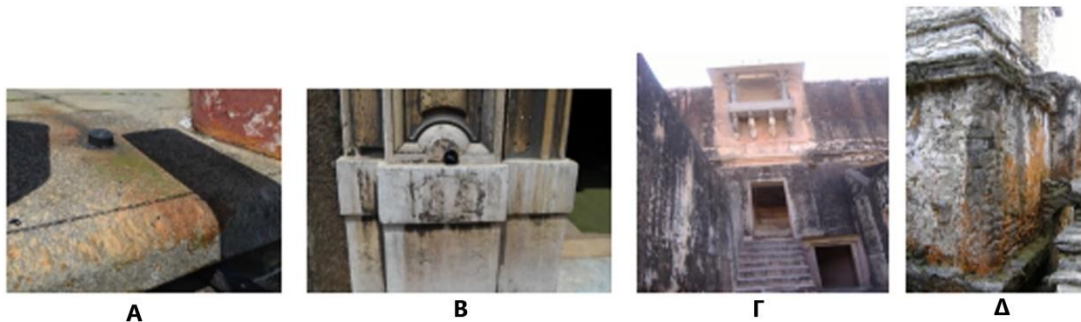


**Εικόνα 9:** Φαινόμενα βιοδιάβρωσης και αλλοίωσης από την ανάπτυξη και τη μεταβολική δράση μικροοργανισμών στις λίθινες επιφάνειες του μνημείου του Λουκιανού στη Τουρκία. Α) Θρυμματισμός, Β) Εναποθέσεις αλάτων και χρωματικές αλλοιώσεις, Γ) Δημιουργία ρωγμών, Δ) Δημιουργία σχισμών, Ε) Ανάπτυξη λειχήνων, Ζ) Ανάπτυξη βρύων, Η) Εναποθέσεις ατμοσφαιρικών ρύπων, Θ) Διαβρωτικά φαινόμενα (Ince et al., 2020).



**Εικόνα 10:** Φαινόμενα βιοδιάβρωσης λίθινων αρχαιολογικών μνημείων από την ανάπτυξη και τη μεταβολική δράση μικροοργανισμών στην Ταξίλα, Πακιστάν (Farooq & Maknoon 2020).

Η εμφάνιση χρώσεων στις λίθινες επιφάνειες μνημείων προκαλείται από τις χρωστικές ουσίες που εκκρίνουν οι μύκητες και οι φωτοσυνθετικοί μικροοργανισμοί για την προστασία τους από την υπεριώδη ηλιακή ακτινοβολία (Reale et al., 2021). Οι συνηθέστερες χρωστικές ουσίες υπεύθυνες για τη πρόκληση χρωματικών αλλοιώσεων περιλαμβάνουν τη χλωροφύλλη (μικροφύκη) με πράσινο χρώμα, τα καροτενοειδή (κυανοβακτήρια) με κίτρινο-πορτοκαλί χρώμα και τη μελανίνη (μύκητες) με μαύρο χρώμα. Οι χρωστικές αυτές προσροφώνται στις λίθινες επιφάνειες, οδηγώντας με τη πάροδο του χρόνου στην αισθητική υποβάθμιση του μνημείου (Εικόνα 11) (Sandybayeva et al., 2022).

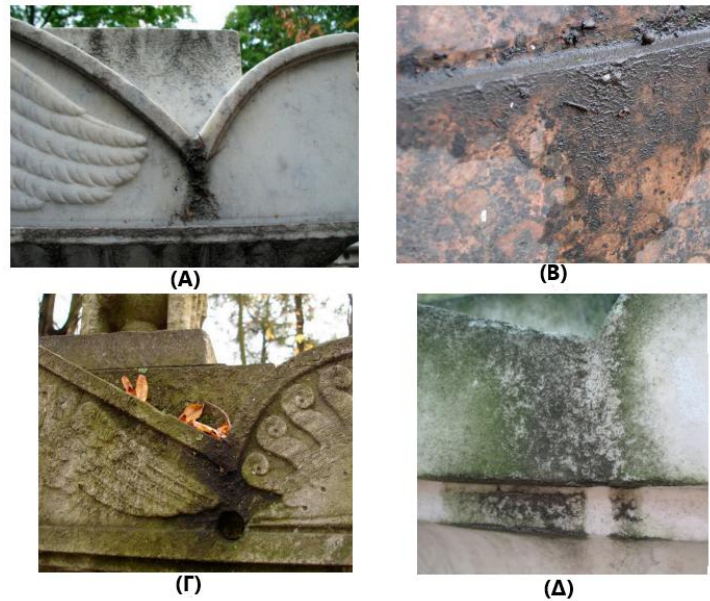


**Εικόνα 11:** Φαινόμενα χρωματικών αλλοιώσεων σε λίθινες επιφάνειες μνημείων από την ανάπτυξη μικροοργανισμών. Α) Σχηματισμός κόκκινων και πράσινων βιοφίλμ από μικροφύκη. Οι κόκκινες και πορτοκαλί αποχρώσεις στις κοίλες περιοχές υποδεικνύουν την έκκριση χρωστικών καροτενοειδών που προστατεύουν τα κύτταρα από την υπερβολική έκθεση στην υπεριώδη ηλιακή ακτινοβολία, Β) Γκρι και καφέ αποχρωματισμοί σε ασβεστολιθικές επιφάνειες που προκαλούνται από την ανάπτυξη και την παραγωγή μεταβολικών προϊόντων κυανοβακτηρίων και μυκήτων, Γ) Σχηματισμός γκρι βιοφίλμ από κυανοβακτήρια και μύκητες, Δ) Σχηματισμός γκρι και καφέ/κόκκινων βιοφίλμ σε ασβεστολιθικά υποστρώματα που κυριαρχούν κυανοβακτήρια και μικροφύκη αντίστοιχα (Gaylarde & Baptista-Neto, 2021).

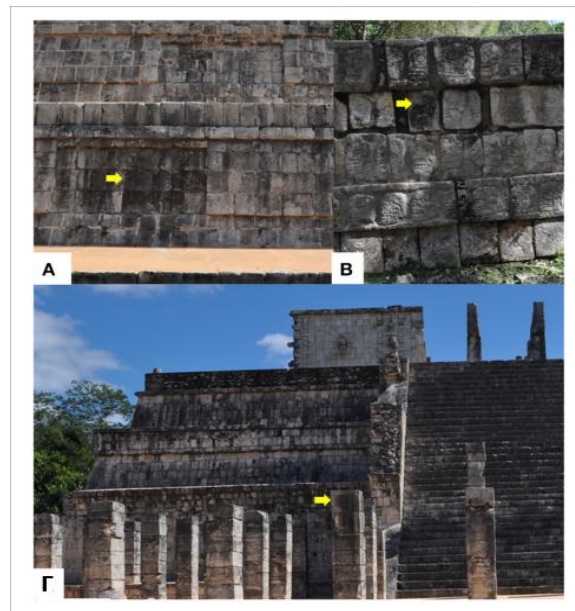
Τέλος, η ανθρώπινη δραστηριότητα, συμβάλλει στην ενίσχυση της ανάπτυξης και της μεταβολικής δράσης των μικροοργανισμών που αποικούν στα μνημεία. Το άγγιγμα των επιφανειών με τα χέρια, προκαλεί τη δημιουργία λιπαρών λεκέδων, προκαλώντας την εμφάνιση καφέ-κίτρινων χρώσεων, με αποτέλεσμα την αισθητική αλλοίωση της αρχικής τους εμφάνισης. Συγχρόνως, οι λιπαροί λεκέδες αποτελούν εστίες έλξης αιωρούμενων σωματιδίων, οπότε η αρχική χρωματική αλλοίωση εντείνεται με τη πάροδο του χρόνου (Scheerer et al., 2009).

Οι σκούροι αποχρωματισμοί στις επιφάνειες των μνημείων μπορεί επίσης να οφείλονται σε αιωρούμενα σωματίδια που προσκολλώνται στις εξωκυτταρικές πολυμερικές ουσίες των βιοφίλμ, με χαρακτηριστικό παράδειγμα αυτό του σχηματισμού ενός λεπτού στρώματος μαύρης κρούστας από τις επικαθίσεις ατμοσφαιρικών ρύπων ανθρωπογενούς προέλευσης (έντονη κυκλοφορία τροχοφόρων, βιομηχανικές καύσεις), τις οποίες αξιοποιούν οι μικροοργανισμοί ως πηγές θρεπτικών συστατικών (Εικόνα 12) (Comite et al., 2021). Οι μαύρες κρούστες αποτελούν τραχιά και πορώδη ομοιογενή στρώματα, ισχυρά συνδεδεμένα στις λίθινες επιφάνειες, με πάχος που κυμαίνεται μεταξύ 0.5-1.5 cm (Fassina, 1995). Εξαιτίας του μελανού τους χρώματος στις περιοχές αυτές απορροφάται εντονότερα η ηλιακή ακτινοβολία, οπότε προκαλούνται φαινόμενα διαστολής και συστολής των λίθινων επιφανειών, λόγω των απότομων επιφανειακών θερμοκρασιακών διακυμάνσεων που προκαλούν θερμικές καταπονήσεις, με αποτέλεσμα την εξασθένηση της δομής του υποστρώματος. Ο σχηματισμός μαύρης κρούστας στις λίθινες επιφάνειες ενισχύεται από

την ανάπτυξη μικροοργανισμών, κυρίως κυανοβακτηρίων σε υποτροπικά και τροπικά κλίματα και μυκήτων σε εύκρατα (Εικόνα 13) (Islam et al., 2024).



**Εικόνα 12:** Εναποθέσεις ατμοσφαιρικών ρύπων σε λίθινες επιφάνειες μνημείων της Ιστορικής Νεκρόπολης στην Αγία Πετρούπολη, Ρωσία. (Α) Σχηματισμός μαύρης κρούστας σε μαρμάρινη επιφάνεια από εναποθέσεις ατμοσφαιρικών ρύπων με τη μορφή αιωρούμενων σωματιδίων, (Β) Σχηματισμός μαύρης κρούστας σε επιφάνεια γρανίτη, λόγω αντίδρασης των θειικών εναποθέσεων με τον ασβεστίτη, με αποτέλεσμα τη παραγωγή γύψου και την μετέπειτα προσκόλληση αιωρούμενων ρύπων, (Γ) Επιφανειακές εναποθέσεις ρύπων, οργανικής ύλης και σχηματισμός βιοφίλμ σε λίθινες επιφάνειες, (Δ) Ανάπτυξη φωτοαυτότροφων βιοφίλμ κυανοβακτηρίων και μικροφυκών στην επιφάνεια εναποθέντων ρύπων του λίθινου υποστρώματος (Sazanova et al., 2022).



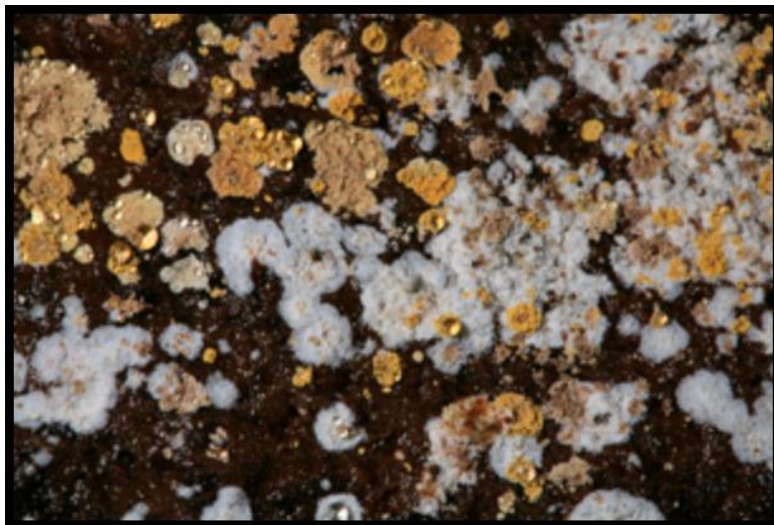
**Εικόνα 13:** Σχηματισμός βιοφίλμ με τη μορφή μαύρης κρούστας στις λίθινες επιφάνειες μνημείων του πολιτισμού των Μάγια, Μεξικό, λόγω της έκκρισης μελανίνης από την ανάπτυξη μυκήτων, καθώς και των εναποθέντων ατμοσφαιρικών ρύπων θείου με τη μορφή αιωρούμενων σωματιδίων σκόνης (Ortega-Morales et al., 2016).



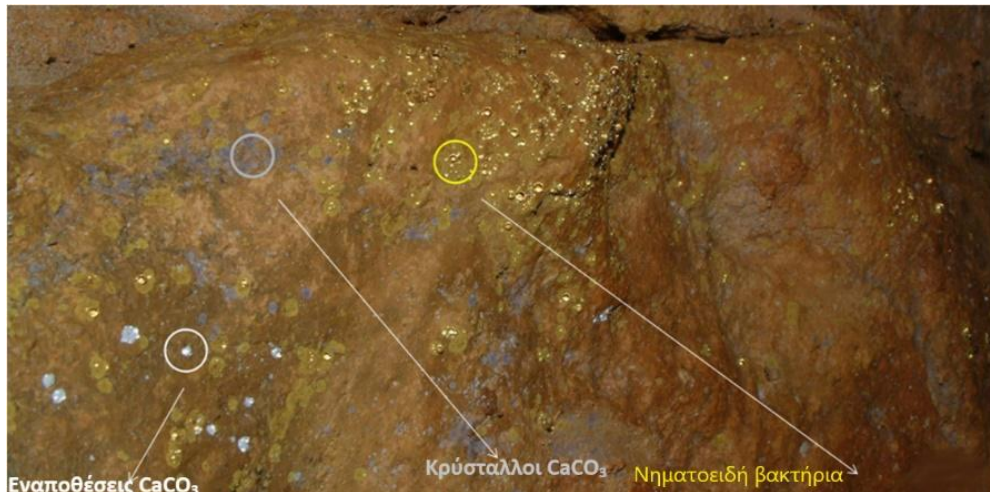
### 1.5.1 Βακτήρια

#### 1.5.1.1 Ετερότροφα βακτήρια

Τα ετερότροφα βακτήρια αξιοποιούν τις διαθέσιμες πηγές άνθρακα και αζώτου, συμπεριλαμβανομένων των ατμοσφαιρικών επικαθίσεων στις λίθινες επιφάνειες, όπως μεθάνιο, αμμωνία, νιτρώδη άλατα, θειικά άλατα, καθώς και τον ανόργανο άνθρακα του διοξειδίου του άνθρακα, ως πηγές ενέργειας για την ανάπτυξη τους (Zhang et al., 2019). Συνήθως η ανάπτυξη τους στις λίθινες επιφάνειες κυριαρχεί έναντι των άλλων μικροοργανισμών, λόγω της εξαιρετικά υψηλής βιοποικιλότητας τους, με τα συνηθέστερα γένη που εντοπίζονται να είναι τα *Bacillus* και *Pseudomonas* (Εικόνα 14). Βακτηριακά είδη που ανήκουν σε αυτά τα γένη, αξιοποιούνται λόγω της ικανότητας τους να εναποθέτουν ανθρακικό ασβέστιο για την αποκατάσταση λίθινων επιφανειών μνημείων. Επιπλέον, τα ετερότροφα βακτήρια εμφανίζουν υψηλή αντοχή και προσαρμοστικότητα έναντι των περιβαλλοντικών συνθηκών (Andreolli et al., 2020). Ο επιβλαβής ρόλος των ετερότροφων βακτηρίων για τα λίθινες επιφάνειες των μνημείων έγκειται στη παραγωγή έντονα διαβρωτικών μεταβολικών προϊόντων, όπως οργανικά οξέα και αλκαλικές ενώσεις που συντελούν στη μη αντιστρεπτή διάλυση των λίθινων υποστρωμάτων (Schroer et al., 2021). Τέλος, τα ετερότροφα βακτήρια που ανήκουν στη τάξη των *Actinomycetes* αποτελούν νηματοειδή βακτήρια, τα οποία διεισδύουν στα λίθινα υποστρώματα προκαλώντας μηχανικές βλάβες, ενώ συγχρόνως παράγουν ένα ευρύ φάσμα χρωστικών ουσιών στις επιφάνειες τους (Εικόνα 15) (Wu et al., 2023).



**Εικόνες 14:** Ανάπτυξη βακτηρίων σε λίθινα υποστρώματα



**Εικόνα 15:** Βακτηριακές αποικίες λευκού, γκρι και κίτρινου χρώματος σε τοιχώματα του σπηλαιού Altamira στην Ισπανία (Gabriel & Northup 2012).

### 1.5.1.2 Αυτότροφα βακτήρια

Τα φωτοαυτότροφα βακτήρια, με τα κυανοβακτήρια να αποτελούν την κυρίαρχη κατηγορία τους, αξιοποιούν το διοξείδιου του άνθρακα της ατμόσφαιρας και την ηλιακή ακτινοβολία για τη παραγωγή της απαιτούμενης ενέργειας για την ανάπτυξή τους (Wu et al., 2023). Αυτού του είδους τα βακτήρια αναπτύσσονται συνήθως σε περιβάλλοντα με αρκετά υψηλά ποσοστά υγρασίας.

Γενικότερα, τα αυτότροφα βακτήρια προκαλούν φθορές και αλλοιώσεις στα λίθινα υποστρώματα που αναπτύσσονται. Ανάλογα το είδος του μηχανισμού διάβρωσης που υιοθετούν διακρίνονται σε οξειδοαναγωγικά θειικών ενώσεων, νιτροποιητικά και οξειδωτικά σιδήρου και μαγγανίου (Schröer et al., 2021).

Τα οξειδοαναγωγικά βακτήρια θειικών ενώσεων αποκτούν την απαιτούμενη για την ανάπτυξή τους ενέργεια μέσω οξείδωσης του θείου και των θειικών αλάτων σε θειικό οξύ. Στα ασβεστολιθικά υποστρώματα, παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων διοξειδίου του άνθρακα και επιπέδων υγρασίας, πραγματοποιείται η διεργασία της γυψοποίησης (Wang & Liu 2021). Γυψοποίηση ονομάζεται η βιοχημική μετατροπή των κρυστάλλων ανθρακικού ασβεστίου των λίθινων επιφανειών σε γύψο σε υδατικό περιβάλλον. Πιο συγκεκριμένα, το βακτηριακά παραγόμενο θειικό οξύ αντιδρά με το ανθρακικό ασβέστιο των λίθινων υποστρωμάτων, υπό την επίδραση υψηλών επιπέδων υγρασίας, σύμφωνα με την αντίδραση:  $\text{CaCO}_3 + \text{H}_2\text{SO}_4 \rightarrow \text{CaSO}_4 + \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ , οδηγώντας στη σύνθεση θειικού ασβεστίου ( $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), δηλαδή γύψου. Ο σχηματιζόμενος γύψος εμφανίζει υψηλότερη διαλυτότητα στο νερό συγκριτικά με το ανθρακικό ασβέστιο, με αποτέλεσμα να διαρρέει ευκολότερα από τις λίθινες επιφάνειες εξαιτίας βροχοπτώσεων, προκαλώντας φαινόμενα φθοράς (Jroundi 2014).

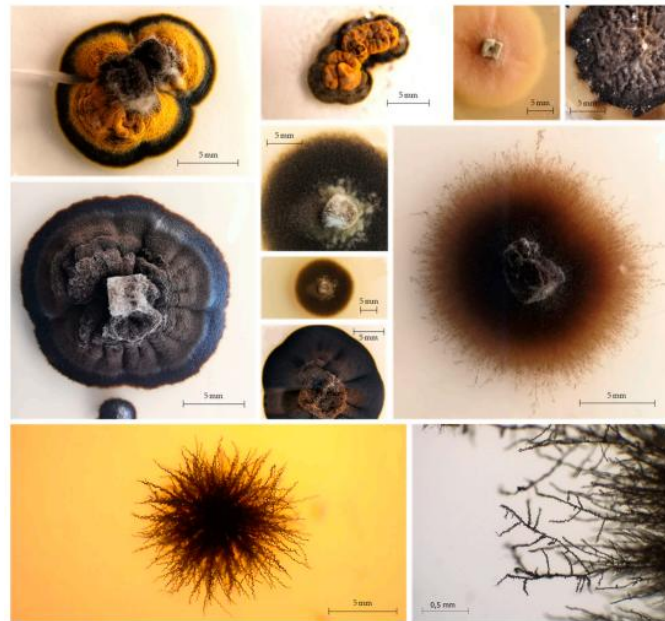
Τα νιτροποιητικά βακτήρια, τα οποία αποτελούν τους κυρίαρχους μικροοργανισμούς υπεύθυνους για τη βιοδιάβρωση των ασβεστολιθικών πετρωμάτων και του μαρμάρου, οξειδώνουν την αμμωνία και τα νιτρώδη άλατα που επικάθονται στις λίθινες επιφάνειες σε νιτρικό και νιτρώδες οξύ αντίστοιχα. Το νιτρικό και το νιτρώδες οξύ που παράγονται οδηγούν στη διάβρωση των λίθινων υποστρωμάτων (Warscheid & Braams 2000). Η αμμωνία προέρχεται κυρίως από τα λιπάσματα και μεταφέρεται με τη μορφή αμμωνιακών αλάτων μέσω του αέρα, ενώ τα νιτρώδη άλατα προέρχονται από ανθρωπογενείς δραστηριότητες, όπως τα καυσάερια βιομηχανιών και τροχοφόρων (Schröer et al., 2021).

Τα βακτήρια που εμφανίζουν την ικανότητα μετατροπής του δισθενούς σιδήρου που περιέχεται με τη μορφή αλάτων στα λίθινα υποστρώματα σε τρισθενή, αποκτούν την

απαιτούμενη για την ανάπτυξη τους ενέργεια μέσω οξείδωσης του παραγόμενου τρισθενούς σιδήρου σε οξειδία του σιδήρου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, την εμφάνιση καφέ και κόκκινων αποχρωματισμών, λεπτών επιστρώσεων (σχηματισμός πατίνας) και διαβρωτικών φαινομένων στις λίθινες επιφάνειες των μνημείων, οδηγώντας στην βιοχημική και αισθητική τους υποβάθμιση (Gaylarde & Little 2022).

### 1.5.2 Μύκητες

Οι μύκητες που αναπτύσσονται στις λίθινες επιφάνειες μνημείων διακρίνονται σε νηματοειδείς (υφομύκητες) και σε μαύρους ζυμομύκητες (black fungi) (Εικόνα 16) (Scheerer, 2009).



Εικόνα 16: Μορφολογία και φυσιολογία μυκήτων (Ραίνα, 2023).

#### 1.5.2.1 Νηματοειδής μύκητες

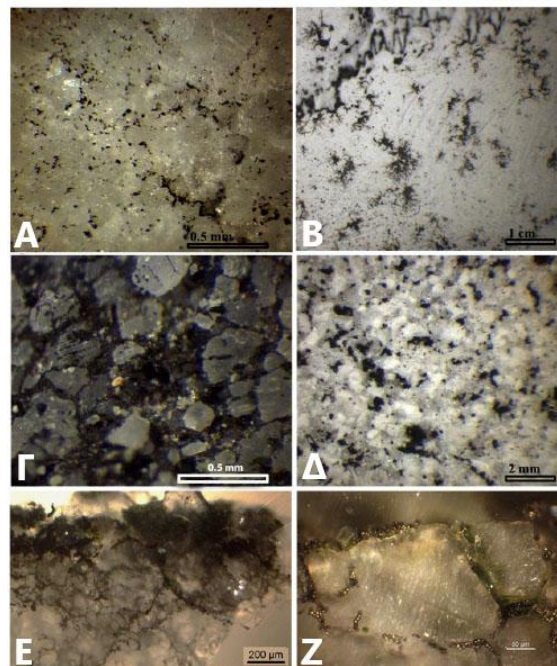
Οι νηματοειδείς υφομύκητες (*Hyphomycetes*), κοινώς γνωστοί ως μούχλα (Scheerer, 2009), δεν διαθέτουν τις κατάλληλες αναπαραγωγικές δομές για την εξάπλωση τους. Η παραγωγή κονιδίων (σπορίων) πραγματοποιείται μέσω εξειδικευμένες υφών που ονομάζονται κονιδιοφόρες (Εικόνα 16). Η μεταφορά των σπορίων μέσω της αέριας κυκλοφορίας και η προσκόλληση τους στις λίθινες επιφάνειες αποτελεί το πρώτο στάδιο του μυκητιακού αποικισμού. Πολλά γένη μυκήτων που ανήκουν στη τάξη των *Hyphomycetes*, ιδιαίτερα τα *Aspergillus*, *Fusarium*, και *Penicillium* παράγουν τοξικούς μεταβολίτες (mycotoxins). Οι αποικίες που σχηματίζουν στις λίθινες επιφάνειες μνημείων έχουν μια χαρακτηριστική μελανή όψη, γκρι, καφέ ή μαύρου χρώματος (Εικόνα 16), οι οποίες αναπτύσσονται ακόμη και σε υπόγεια περιβάλλοντα σπηλαίων που επικρατούν χαμηλές θερμοκρασίες και υψηλά επίπεδα υγρασίας (Εικόνα 17) (Joseph, 2021).



**Εικόνα 17:** Ανάπτυξη μυκήτων σε τοιχώματα σπηλαίων

### 1.5.2.2 Μαύροι μύκητες (Black Fungi)

Οι μαύροι μύκητες που σχηματίζουν αργά επεκτεινόμενες αποικίες, διαθέτουν υψηλές συγκεντρώσεις μελανίνης στα ανθεκτικά τους κυτταρικά τοιχώματα. Σε αυτή την κατηγορία μυκήτων ανήκουν τα γένη *Hortaea*, *Sarcinomyces*, *Coniosporium*, *Carpobotryella*, *Exophiala*, *Knufia*, και *Trimmatostroma*. Αυτοί οι μύκητες εμφανίζουν παρόμοιο μηχανισμό ανάπτυξης με τον αντίστοιχο των ζυμών, εγκαταλείποντας το στάδιο των νηματοειδών υφών και υιοθετώντας αυτό του σχηματισμού αποικιών (Εικόνα 18). Αυτός ο μηχανισμός χαρακτηρίζεται από εξαιρετικά αργή ανάπτυξη των κυτάρων, ως απάντηση στην έλλειψη θρεπτικών στοιχείων και σε ακραίες μεταβολές των περιβαλλοντικών συνθηκών (Scheerer et al., 2009). Η ανάπτυξη τους στα λίθινα υποστρώματα ενισχύεται και από την παραγωγή χρωστικών ουσιών, συμπεριλαμβανομένων των καρτενοειδών και της μελανίνης για την προστασία τους από την υπεριώδη ηλιακή ακτινοβολία (Joseph, 2021).



**Εικόνα 18:** Ανάπτυξη μυκήτων στις εξωτερικές επιφάνειες και στο εσωτερικό λίθινων υποστρωμάτων. (Α),(Γ): Ανάπτυξη μαύρων μυκήτων σε μαρμάρινα υποστρώματα, (Β),(Δ): Ανάπτυξη μαύρων αποικιών μυκήτων σε ασβεστολιθικά υποστρώματα, (Ε),(Ζ): Διείσδυση μυκητιακών υφών στα αντίστοιχα υποστρώματα κατά μήκος του κρυσταλλικού πλέγματος (Salvadori & Municchia 2016).

Το κύριο φαινόμενο υποβάθμισης των λίθινων υποστρωμάτων που προκαλείται από την ανάπτυξη μυκήτων, σχετίζεται με την παραγωγή βλεννογόνων ουσιών, οι οποίες περιέχουν μεταξύ πολλών άλλων μεταβολιτών, όξινη διαβρωτικές ενώσεις. Οι όξινοι μεταβολίτες (οξικό, κιτρικό, μυρμηκικό οξύ) και ιδιαίτερα το έντονα διαβρωτικό οξαλικό οξύ, το οποίο μέσω μιας διαδικασίας γνωστής ως οξυδόλυση, προκαλεί διάβρωση των λίθινων υποστρωμάτων, λόγω οξείδωσης των μεταλλικών ιόντων τους, προς τον σχηματισμό οξαλικών αλάτων, με κύριο το οξαλικό ασβέστιο.

Οι χηλικές ενώσεις που παράγουν οι μύκητες ως παραπροϊόντα του μεταβολισμού τους, προκαλούν δέσμευση των μεταλλικών ιόντων του λίθινου υποστρώματος και εναπόθεση πολύπλοκων αδρανών συμπλόκων που οδηγούν σε αλλοίωση της επιφάνειας του. Αντίστοιχα, οι χρωστικές ουσίες, με κύρια τη μελανίνη, που εκκρίνονται από τους μύκητες οφείλονται για την εμφάνιση χρωματικών αλλοιώσεων και την αισθητική υποβάθμιση των λίθινων επιφανειών.

Οι μύκητες δεν απαιτούν την παρουσία ηλιακής ακτινοβολίας για την ανάπτυξη τους, με αποτέλεσμα τη βαθύτερη διείσδυση των υφών τους στα λίθινα υποστρώματα, με σκοπό την εύρεση νέων πηγών θρεπτικών συστατικών. Το φαινόμενο αυτό, οδηγεί στο σχηματισμό ρωγμών και στην απόσπαση λίθινων θραυσμάτων, λόγω αποσταθεροποίησης της δομής του υποστρώματος από την άσκηση μηχανικών πιέσεων (Scheerer et al., 2009).

### 1.5.3 Φωτοσυνθετικοί μικροοργανισμοί

Οι φωτοσυνθετικοί μικροοργανισμοί και κυρίως τα κυανοβακτήρια και τα μικροφύκη, δεν απαιτούν την παρουσία οργανικής πηγής άνθρακα για την ανάπτυξή τους, γεγονός που τους προσδίδει σημαντικό πλεονέκτημα ανάπτυξης έναντι των ετερότροφων βακτηρίων και μυκήτων.

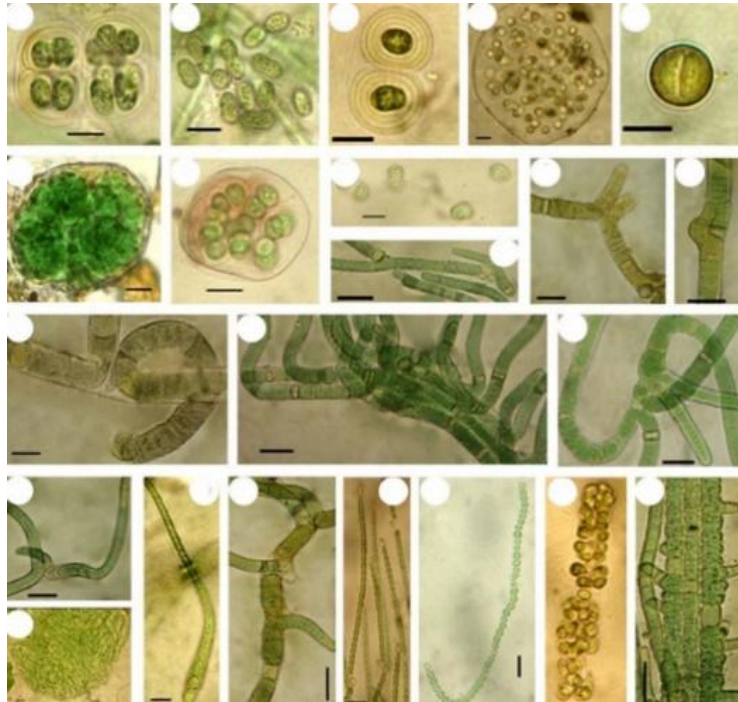
Τα πράσινα μικροφύκη συναντώνται κυρίως σε περιοχές με υψηλά ποσοστά υγρασίας και η συμβολή τους στη βιοδιάβρωση των λίθινων επιφανειών φαίνεται να σχετίζεται κυρίως με τη σύνθεση θρεπτικών συστατικών που συμβάλουν στην ανάπτυξη άλλων επιβλαβών μικροοργανισμών (Εικόνα 19) (Crispim & Gaylarde 2005).



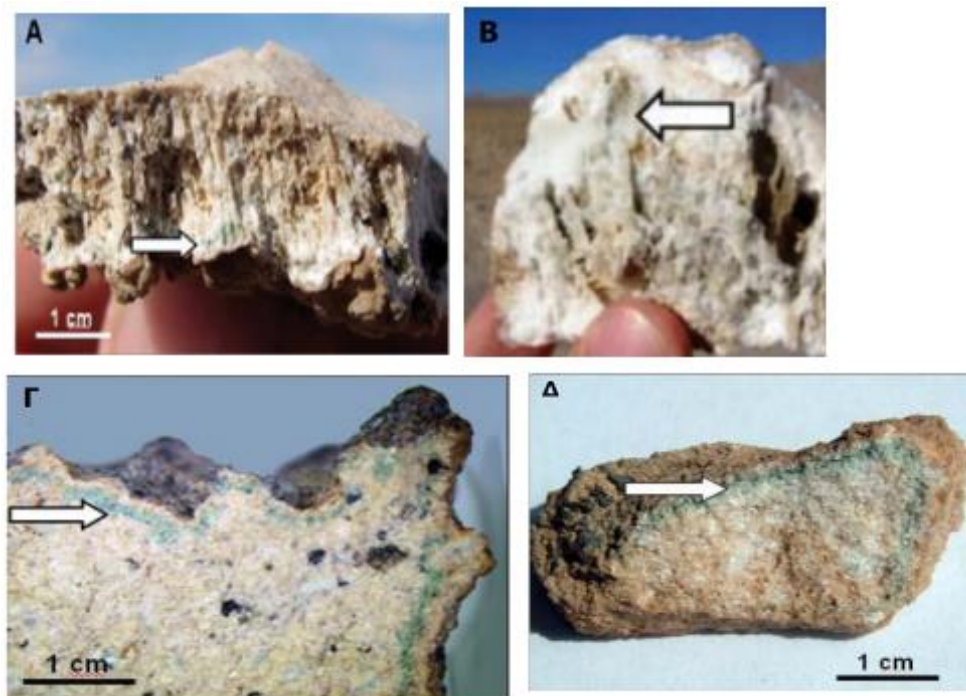
**Εικόνα 19:** Ανάπτυξη κυανοβακτηρίων με τη μορφή (A) βιοφίλμ και (B) μεμονωμένων αποικιών

Από την άλλη πλευρά, τα κυανοβακτήρια συμμετέχουν ενεργά στην υποβάθμιση των λίθινων επιφανειών, καθώς πρόκειται για μικροοργανισμούς προσαρμοσμένους να αναπτύσσονται υπό ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες, χάρις στα ανθεκτικά κυτταρικά τους τοιχώματα και την παραγωγή μεταβολικών χρωστικών (Εικόνα 20). Η ικανότητα αυτή των κυανοβακτηρίων να επιβιώνουν τους επαναλαμβανόμενους κύκλους ξήρανσης και επανενυδάτωσης και τα υψηλά επίπεδα υπεριώδους ακτινοβολίας UV, τα καθιστά

κυρίαρχους μικροοργανισμούς στις επιφάνειες μνημείων στην εύκρατη ζώνη (Εικόνα 21) (Wu et al., 2023). Η προστασία των κυανοβακτηρίων και των μικροφυκών από την υπεριώδη ακτινοβολία πραγματοποιείται από την έκκριση καροτενοειδών και σκυτονεμίνη, αντίστοιχα (Joseph, 2021).



**Εικόνα 20:** Μορφολογία κυανοβακτηρίων που εντοπίζονται σε λίθινες επιφάνειες μνημείων (Keshari & Adhikary 2013).



**Εικόνα 21:** Ανάπτυξη κυανοβακτηρίων και μικροφυκών σε λίθινα υποστρώματα. Α) γύψου, Β) αλίτη (αλατούχου NaCl πετρώματος), Γ) ιγνιμβρίτη (ηφαιστειακό πέτρωμα) και Δ) αμμόλιθου (Wierzchos et al., 2012).

Παρά την υψηλή αντοχή τους στην υπεριώδη ακτινοβολία, η ανάπτυξη των κυανοβακτηρίων, αλλά και των μικροφυκών, ευνοείται σε προστατευόμενες εσωτερικές κοιλότητες των λίθινων υποστρωμάτων, όπως ρωγμές και σχισμές, στις οποίες επικρατούν συνθήκες ήπιας έντασης ακτινοβολία, υψηλότερα επίπεδα υγρασίας και πληθώρα θρεπτικών συστατικών (Wu et al., 2023). Αξίζει να σημειωθεί, ότι η ποιότητα (φυσική ή τεχνητή) και η ένταση της φωτεινής ακτινοβολίας είναι οι κύριοι παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη των φωτοσυνθετικών μικροοργανισμών.

Η ένταση της φωτεινής ακτινοβολίας αποδεικνύεται ο κυρίαρχος παράγοντας για τον καθορισμό του είδους των φωτοσυνθετικών μικροοργανισμών που επικρατούν στις λίθινες επιφάνειες (Scheerer et al., 2009). Στα εσωτερικά κλειστά περιβάλλοντα (σπήλαια και κατακόμβες) και στις εσοχές των λίθινων υποστρωμάτων που έχουν περιορισμένη πρόσβαση σε ηλιακή ακτινοβολία, τείνουν να κυριαρχούν τα κυανοβακτήρια, ενώ σε υπαίθριες περιοχές και σε εξωτερικές επιφάνειες με συνεχή έκθεση σε ηλιακή ακτινοβολία κυριαρχούν συνήθως πράσινα μικροφύκη (McNamara & Mitchell 2005).

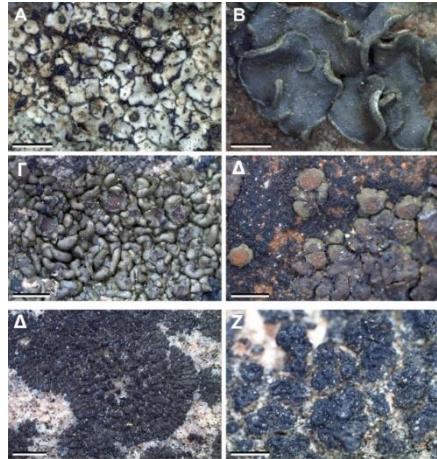
Τα κυανοβακτήρια και τα μικροφύκη, είναι μεταβολικά ενεργά ή αδρανή ανάλογα με τη διαθεσιμότητα νερού. Παρόλα αυτά, μπορούν να ευδοκιμήσουν κάτω από ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες, σχηματίζοντας ανθεκτικές αποικίες που εμπλέκονται στην υποβάθμιση των λίθινων επιφανειών). Ωστόσο, η έλλειψη θρεπτικών συστατικών και η πολύ αργή τους ανάπτυξη περιορίζει σημαντικά την επιζήμια συμβολή τους στη βιοδιάβρωση και την αλλοίωση των λίθινων υποστρωμάτων (Joseph, 2021). Τα κυανοβακτήρια διαδραματίζουν καταλυτικό ρόλο στη βιοορυκτοποίηση ανθρακικού ασβεστίου, μέσω της διαδικασίας της φωτοσύνθεσης (Gaylarde 2020).

Εκτός από την προφανή αισθητική αλλοίωση των λίθινων επιφανειών από την έκκριση χρωστικών ουσιών, οι φωτοσυνθετικοί μικροοργανισμοί οφείλονται και για τη πρόκληση φθορών, μέσω απελευθέρωσης αλκαλικών ενώσεων και διαβρωτικών οξέων που προκαλούν φαινόμενα διάλυσης των λίθινων υποστρωμάτων (Kakakhel et al., 2019).

Στις λίθινες επιφάνειες που αποικούν και αναπτύσσονται μικροφύκη σχηματίζονται χρωματιστές (πράσινες, γκρι, μαύρες, καφέ και πορτοκαλί) ζελατινώδεις επικαλύψεις (πατίνες), ενώ στην περίπτωση των κυανοβακτηρίων εμφανίζονται σκούρες καφέ και μαύρες επιστρώσεις, αλλά και ροζ χρώσεις. Σε περιβάλλοντα με υψηλά ποσοστά υγρασίας οι πατίνες τείνουν να έχουν πράσινο χρώμα, ενώ σε ξηρές συνθήκες είναι συνήθως γκρι, χωρίς αυτό να συνεπάγεται το θάνατο των μικροοργανισμών (Scheerer et al., 2009).

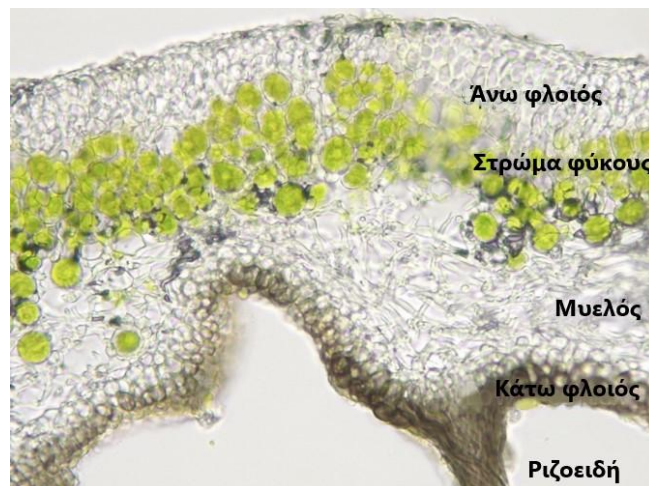
#### 1.5.4 Λειχήνες

Η λειχήνες αποτελούν μια αμοιβαία συμβιωτική ένωση μεταξύ φωτοσυνθετικών μικροοργανισμών (μικροφυκών ή κυανοβακτηρίων) και μυκήτων (Εικόνα 22). Αυτοί οι μικροοργανισμοί αναπτύσσονται ξεχωριστά, προκειμένου να εξασφαλιστεί η επιβίωση αυτής της συμβιωτικής μορφής μικροβιακής ζωής. Το μυκητιακό μέρος της λειχήνας ονομάζεται mycobiont και το φωτοσυνθετικό που μπορεί να είναι μικροφύκος ή κυανοβακτήριο ονομάζεται photobiont. Οι περισσότερες λειχήνες συσχετίζονται με μικροφύκη. Το μικροφύκος, ως φωτοαυτότροφος μικροοργανισμός, παράγει οργανικές ουσίες, κυρίως υδατάνθρακες που αποτελούν πηγή άνθρακα και ενέργειας για τη λειχήνα, καθώς και όλα τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά για την ανάπτυξή της. Ο μύκητας προσφέρει στη συμβίωση νερό και ανόργανα άλατα, παράγοντας μεγάλο αριθμό δευτερογενών μεταβολιτών και οξέων και υποστηρίζοντας δομικά τη λειχήνα μέσω των μυκηλιακών υφών του. Ο ιστός που αναπτύσσεται μεταξύ του μύκητας και του φύκου, ονομάζεται θαλλός (thallus). Τα μεταβολικά προϊόντα της λειχήνας αποθηκεύονται στο θαλλό, ενώ το άμυλο, η χιτίνη και τα λειχηνικά οξέα στα κυτταρικά τοιχώματα των μικροοργανισμών (Yamamoto, 2006).



**Εικόνα 22:** Ανάπτυξη λειχήνων σε λίθινα υποστρώματα (Urradhay et al., 2016).

Σε εγκάρσια τομή του θαλλού παρατηρείται η ανατομία της συμβίωσης μεταξύ μύκητα και φύκους (Εικόνα 23). Ο θαλλός αποτελείται από τέσσερα διακριτά στρώματα. Ένα πυκνό εξωτερικό προστατευτικό στρώμα υφών, τον άνω φλοιό (upper cortex), κάτω από το οποίο εντοπίζεται το φωτοσυνθετικό στρώμα φύκους (algal layer), στη συνέχεια, περιλαμβάνεται ένα στρώμα μυκηλιακών υφών, ο μυελός (medulla), ενώ στο τέλος παρατηρείται ο κάτω φλοιός (lower cortex) (Shirtcliffe et al., 2006).

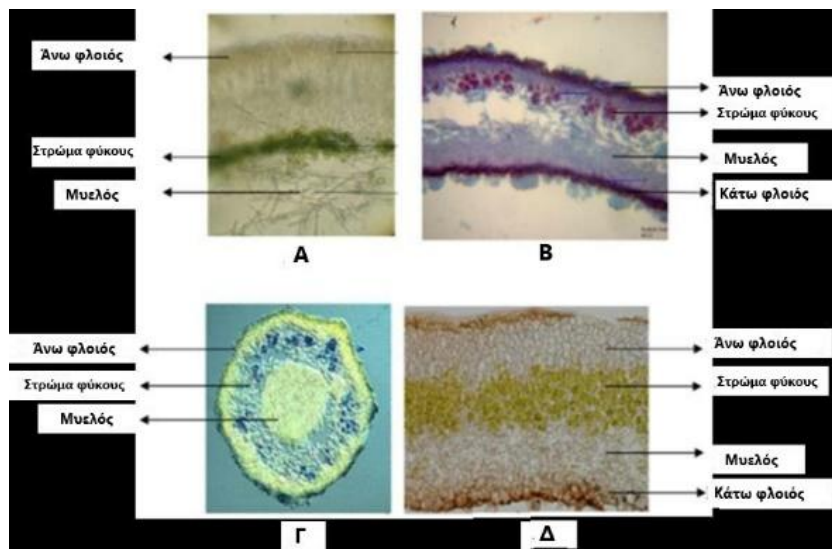


**Εικόνα 23:** Ανατομία θαλλού λειχήνας

Οι λειχήνες δεν διαθέτουν ριζικό σύστημα, αλλά μηχανισμούς προσκόλλησης στην επιφάνεια του λίθινου υποστρώματος. Οι δομές αυτές που βοηθούν στη σταθερή προσκόλληση ονομάζονται ριζοειδή (rhizines) και αποτελούν απλές τριχοειδείς απολήξεις, που εκφύονται από τον κάτω φλοιό, με τη μορφολογία τους να ποικίλει ανάλογα με το είδος της λειχήνας και του λίθινου υποστρώματος (Εικόνα 24).

Οι λειχήνες εμφανίζονται σε μια ποικιλία χρωμάτων (λευκό, μαύρο, κόκκινο, πορτοκαλί, καφέ, κίτρινο και πράσινο). Η μορφολογία της λειχήνας που κατά κύριο λόγο καθορίζεται από τον μύκητα, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ταξινόμησή τους σε τρεις κατηγορίες ανάλογα με τη φυσιολογία και το μηχανισμό σύνδεσής τους στο υπόστρωμα (Εικόνα 24) (Yamamoto, 2006).





**Εικόνα 24:** Ανατομία θαλλού με βάση το είδος της λειχήνας. (Α) Φλοιώδης λειχήνα, (Β) και (Δ) Φυλλώδεις λειχήνες, (Γ) Θαμνώδης λειχήνα (Supriati, 2021).

Οι φλοιώδεις (crustose) λειχήνες (Εικόνα 25) στις οποίες ολόκληρη η επιφάνεια του θαλλού προσκολλάται στο υπόστρωμα, δημιουργώντας ένα είδος κρούστας. Οι φλοιώδεις λειχήνες δε διαθέτουν το κατώτερο στρώμα φλοιού, αλλά μόνο τον άνω φλοιό, το στρώμα φύκους και τις μυκηλιακές υφές, οι οποίες διεισδύουν στο υπόστρωμα μέσω ριζοειδών και πραγματοποιείται απευθείας σύνδεση του μυελού του θαλλού με το υπόστρωμα (Yamamoto, 2006).



**Εικόνα 25:** Φλοιώδεις λειχήνες

Οι φυλλώδεις (foliose) λειχήνες (Εικόνα 26), οι οποίες αναπτύσσονται στην επιφάνεια του υποστρώματος και εισχωρούν σε αυτό μέσω ριζοειδών, σχηματίζοντας ένα είδος φυλλώσεων με επίπεδους λοβούς που μοιάζουν με φύλλα και ανυψώνονται στην επιφάνεια του. Στις φυλλώδεις λειχήνες, ο θαλλός μπορεί εύκολα να απομακρυνθεί από το υπόστρωμα σχεδόν ανέπαφος, λόγω του πάχους και της ασθενέστερης σύνδεσης του (Yamamoto, 2006).



**Εικόνα 26:** Φυλλώδης λειχήνα

Τέλος, οι θαμνώδεις (fruticose) λειχήνες (Εικόνα 27), αποτελούνται από ένα άφυλλο φυτικό μέρος με πολλαπλές διακλαδώσεις που ξεκινούν από τη βάση του θαλλού και αναπτύσσονται ελεύθερα σε τρισδιάστατη μορφή και ένα δίκτυο ριζοειδών για την προσκόλληση τους στο υπόστρωμα (Yamamoto, 2006).



**Εικόνα 27:** Θαμνώδεις λειχήνες

Η βιοδιάβρωση και η αισθητική αλλοίωση των λίθινων επιφανειών των μνημείων από την ανάπτυξη λειχήνων συντελείται μέσω μηχανικών και χημικών επιδράσεων.

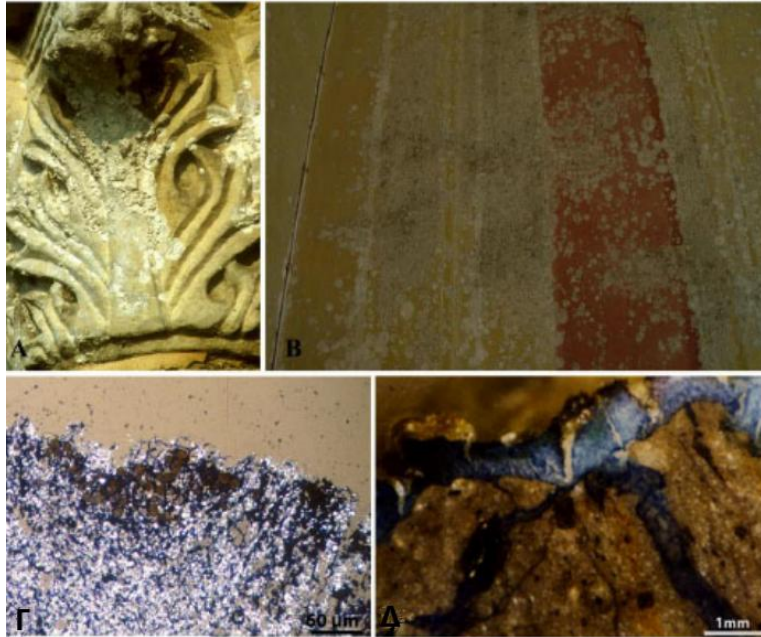
Οι μηχανικές επιδράσεις περιλαμβάνουν τη διείσδυση των ριζοειδών στο εσωτερικό ρωγμών και πόρων του υποστρώματος, με αποτέλεσμα την εξασθένηση της δομής του (Kakakhel et al., 2019). Έπειτα, από τη διείσδυση των ριζοειδών, ακολουθεί η διαστολή και συστολή του θαλλού. Η ενυδάτωση (διαβροχή) και η αφυδάτωση (ξήρανση) του θαλλού της λειχήνας, εξαιτίας θερμοκρασιακών διακυμάνσεων προκαλούν την ανάπτυξη δυνάμεων και την εφαρμογή μηχανικών πιέσεων στο εσωτερικό του υποστρώματος, με αποτέλεσμα τη δημιουργία ρωγμών. Επιπλέον, η διείσδυση των υφών οδηγεί σε αύξηση του πορώδους με αποτέλεσμα τη διείσδυση υγρασίας στο εσωτερικό των υποστρωμάτων, όπου με τη πτώση της θερμοκρασίας υπό του μηδενός οδηγεί στο σχηματισμό πάγου, με αποτέλεσμα τη πρόκληση ρωγμών. Οι συνεχόμενοι κύκλοι κατάψυξης και απόψυξης του θαλλού είναι ιδιαίτερα επιβλαβείς για τα μαρμάρινα υποστρώματα σε ψυχρές περιοχές, όταν επικρατούν συνθήκες παγετού. Σε ακραίες περιπτώσεις μηχανικής καταπόνησης των υποστρωμάτων παρατηρούνται φαινόμενα θρυμματισμού, τα οποία οδηγούν με τη πάροδο του χρόνου στη συνεχή ελάττωση της επιφάνειας του μνημείου (Comite et al., 2021).

Η βιοδιάβρωση και η αισθητική αλλοίωση των λίθινων επιφανειών των μνημείων από την ανάπτυξη λειχήνων εντάσσεται στις χημικές μεθόδους υποβάθμισής τους (Εικόνες 28 και 29). Το τελικό διαβρωτικό αποτέλεσμα, οφείλεται στα μεταβολικά προϊόντα των λειχήνων που περιλαμβάνουν οργανικά και ανόργανα οξέα (οξαλικά και λειχηνικά) και χρωστικές ουσίες (μελανίνη) που προκαλούν διαβρώσεις και χρωματικές αλλοιώσεις αντίστοιχα. Αυτά φαινόμενα οδηγούν οδηγώντας στην αισθητική υποβάθμισή των μνημείων, καθώς τίθεται σε κίνδυνο η αναγνωρισιμότητά τους από το κοινό (Kakakhel et al., 2019).

Το οξαλικό οξύ εκκρίνεται κατά κύριο λόγο από τους μύκητες και τις λειχήνες, ως παραπροϊόν του μεταβολισμού τους. Το οξαλικό αποτελεί ένα έντονα διαβρωτικό οξύ από τα ισχυρότερα οξέα υπεύθυνο για την πρόκληση διαβρώσεων σε ένα ευρύ φάσμα λίθινων υποστρωμάτων. Η έκκριση του σε ασβεστολιθικά πετρώματα οδηγεί στη σύνθεση οξαλικού ασβεστίου, το οποίο αποτελεί κατ' εξοχήν προϊόν βιοδιάβρωσης. Τα λειχηνικά οξέα παράγονται ως προϊόντα του μεταβολισμού των λειχήνων και είναι υπεύθυνα για την εμφάνιση φαινομένων διάβρωσης κυψελοειδούς μορφής στο λίθινο υπόστρωμα (Nash, 1996).

Το διοξείδιο του άνθρακα που παράγεται ως προϊόν του μεταβολισμού των λειχήνων κατά τη διαδικασία της κυτταρικής αναπνοής (Zhu & Dittrich, 2016), οδηγεί παρουσία υψηλών επιπέδων υγρασίας στη παραγωγή ανθρακικού οξέος που προκαλεί διάβρωση του υποστρώματος. Τέλος, η δράση των αλκαλικών μεταβολικών προϊόντων των λειχήνων

αποτελεί μηχανισμό διάβρωσης των λίθινων υποστρωμάτων που πραγματοποιείται υπό έντονα αλκαλικές συνθήκες, τιμών pH άνω του 9.6, και ονομάζεται αλκαλινόλυση (alkalinolysis) (Nash, 1996).

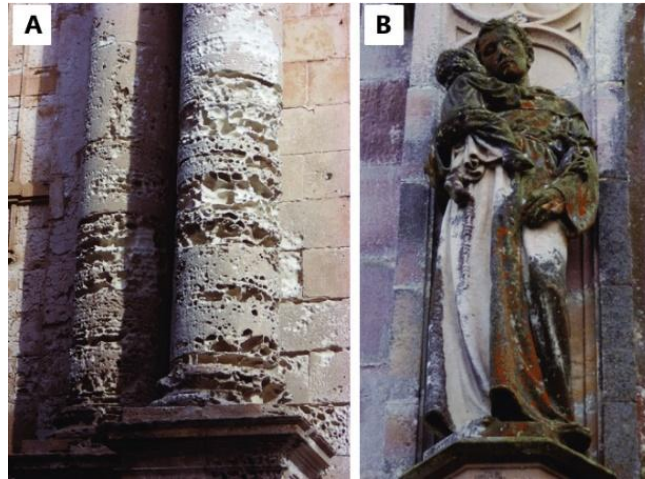


**Εικόνα 28:** Φαινόμενα βιοδιάβρωσης λίθινων υποστρωμάτων από την ανάπτυξη λειχήνων. (A),(B): Ανάπτυξη λειχήνων σε μαρμάρινη επιφάνεια αγάλματος (A) και σε λίθινο υπόστρωμα τοιχογραφίας (B), (Γ): Σχηματισμός και έκκριση οξαλικού ασβεστίου σε ασβεστολιθικό υπόστρωμα από τις υφές αναπτυσσόμενων μυκήτων, (Δ): Διείσδυση του θαλλού και των ριζοειδών λειχήνας σε λίθινο υπόστρωμα (Salvadori & Municchia, 2016).



**Εικόνα 29:** Αποτελέσματα βιοδιάβρωσης και αισθητικής αλλοίωσης από την ανάπτυξη λειχήνων στις λίθινες επιφάνειες αγαλμάτων (A,B) και τοιχωμάτων (Γ,Δ) (Cozzolino et al., 2022).

Η βιοδιάβρωση των λίθινων υποστρωμάτων από τα μεταβολικά προϊόντα των λειχήνων συμβάλλει στη δημιουργία φθορών με τη μορφή κρατήρα, κυρίως σε ασβεστολιθικές επιφάνειες. Οι κρατήρες που σχηματίζονται εξυπηρετούν τη διείσδυση των ριζοειδών στο εσωτερικό των υποστρωμάτων, με αποτέλεσμα την απόσπαση θραυσμάτων, τα οποία ενσωματώνονται στο θαλλό της λειχήνας, προκαλώντας το φαινόμενο δημιουργίας οπών (pitting) (Εικόνα 30) (Mottershead & Lucas 2000).



**Εικόνα 30:** Φαινόμενα υποβάθμισης λίθινων μνημείων εξαιτίας της μικροβιακής ανάπτυξης. (A) Επικαθίσεις διαβρωτικών αλάτων και δημιουργία οπών (φαινόμενο pitting), (B) Αισθητικές αλλοιώσεις λόγω φαινομένων αποχρωματισμού από τα μεταβολικά προϊόντα των μικροοργανισμών (Sierra-Fernández et al., 2017).

Τέλος, η ανάπτυξη των λειχήνων σε λίθινες επιφάνειες συντελεί στην εξομοίωση των λειχήνων με αυτές και τη δημιουργία ενός νέου πεδίου. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται πεδογένεση (pedogenesis) (Εικόνα 31) και η διάρκεια της ποικίλλει ανάλογα με το είδος της λειχήνας, τα φυσικά χαρακτηριστικά και τη χημική σύνθεση του υποστρώματος (Seaward, 1997).



**Εικόνα 31:** Φαινόμενο πεδογένεσης (pedogenesis)

Παρόλα αυτά, η ανάπτυξη λειχήνων στις επιφάνειες μνημείων δεν υποδηλώνει αυτόματα την υποβάθμισή τους. Οι μηχανισμοί βιοδιάβρωσης και βιοπροστασίας λίθινων υποστρωμάτων από την ανάπτυξη λειχήνων συνυπάρχουν σε μια λεπτή ισορροπία που μπορεί να μετατοπισθεί ακαριαία από μεταβολές των περιβαλλοντικών συνθηκών (Joseph, 2021).

Υπό την επίδραση ιδιαίτερα δυσμενών αβιοτικών παραγόντων, η συνεισφορά των λειχήνων στην προστασία των λίθινων επιφανειών φαίνεται να υπερτερεί σημαντικά έναντι των επιβλαβών τους επιδράσεων (Shirtcliffe et al., 2006). Η ενεργή βιοπροστασία των λίθινων επιφανειών από τις λειχήνες πραγματοποιείται από το σχηματισμό μιας αδιάβροχης προστατευτικής κρούστας που προφυλάσσει το υπόστρωμα από επιβλαβείς αβιοτικούς παράγοντες περιορίζοντας τα φαινόμενα διάβρωσης που προκαλούν. Η επικάλυψη των λίθινων επιφανειών μνημείων από λειχήνες μπορεί να δράσει ευεργετικά σε διάφορους τύπους υποστρωμάτων, είτε μέσω περιορισμού της διαθεσιμότητάς νερού, είτε μέσω

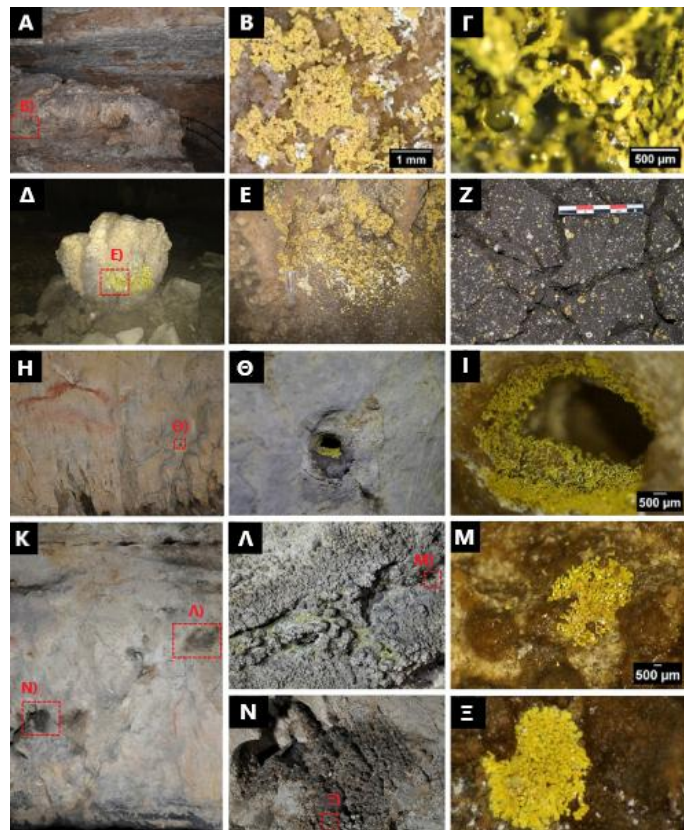
προστασίας τους από περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως οι εναποθέσεις ατμοσφαιρικών ρύπων, οι τριβές του ανέμου και οι θερμοκρασιακές διακυμάνσεις Carter & Viles, 2005).

Η παρουσία λειχήνων σε πορώδη υποστρώματα αποτρέπει τη διείδυση βροχής ή υγρασίας. Οι πολλαπλές στοιβάδες του εξωτερικού φλοιού των λειχήνων που συνιστώνται κατά κύριο λόγο από υδρόφοβες ενώσεις, σχηματίζουν μια υδατοστεγή επίστρωση που προστατεύει τις λίθινες επιφάνειες. Πολλά είδη λειχήνων χαρακτηρίζονται ανθεκτικά στην ατμοσφαιρική ρύπανση, αφού το υδατοδιαλυτό διοξείδιο του θείου (SO<sub>2</sub>) αδυνατεί να εισέλθει σε μεγάλες συγκεντρώσεις στο θαλλό της λειχήνας, καθώς μικροσκοπικά κανάλια επιτρέπουν την ανταλλαγή αερίων με το εξωτερικό περιβάλλον και την αναπνοή του θαλλού. Η προστασία αυτή του θαλλού μεταβιβάζεται και στο λίθινο υπόστρωμα.

Επιπλέον, στα ασβεστολιθικά υποστρώματα οι λειχήνες προσφέρουν ένα άλλο είδος προστασίας, γνωστή με τον όρο οξαλική πατίνα, η οποία προφυλάσσει το υπόστρωμα από την διαβρωτική επίδραση εξωγενών παραγόντων. Η αφαίρεση της κατά τις διαδικασίες συντήρησης ενός μνημείου αφαιρεί την αρχαιολογική αξία της διαχρονικότητας, καθώς χρειάζεται αιώνες προκειμένου να επανασηματιστεί. Η οξαλική πατίνα προσδίδει στην επιφάνεια του υποστρώματος ένα κίτρινο-καφέ χρώμα. Κατά κύριο λόγο, η πατίνα συνίσταται από οξαλικό ασβέστιο που παράγεται από τις λειχήνες. Η παραγωγή οξαλικού οξέος πραγματοποιείται και κατά την καύση υδρογονανθράκων στις βιομηχανίες, επομένως ο σχηματισμός της οξαλικής πατίνας πέρα από βιολογικής προέλευσης, μπορεί να αποτελεί και προϊόν ανθρωπογενούς δραστηριότητας. Ο προστατευτικός ρόλος των λειχήνων στην για τα υπαίθρια μνημεία, μετριάζει έως κάποιον βαθμό την κατά κανόνα καταστρεπτική τους επίδραση (Shirtcliffe et al., 2006).

### **1.5.5 Βιοφίλμ (Biofilm)**

Η πλειοψηφία των μικροοργανισμών στις λίθινες επιφάνειες μνημείων αναπτύσσεται κυρίως μέσα σε πολύπλοκες και πολυσύνθετες μικροβιακές κοινότητες γνωστές ως βιοφίλμ (biofilm). Τα βιοφίλμ είναι δομημένα συγκροτήματα μικροβιακών κυττάρων που προσκολλώνται στο λίθινο υπόστρωμα και συνυπάρχουν εντός μια μήτρας εξωκυτταρικών πολυμερικών ουσιών (EPS). Τα βιοφίλμ συγκροτούνται από διάφορα είδη μικροοργανισμών που σχηματίζουν ένα συνεργατικό δίκτυο μεταβολικών διεργασιών, με σκοπό την αξιοποίηση των διαθέσιμων θρεπτικών συστατικών του υποστρώματος (McNamara & Mitchell, 2005). Ο σχηματισμός βιοφίλμ αποτελεί ένα μηχανισμό επιβίωσης και προστασίας των μικροοργανισμών που τους επιτρέπει να αναπτύσσονται έναντι σε ακραίες διακυμάνσεις των περιβαλλοντικών συνθηκών και διαθεσιμότητας θρεπτικών συστατικών. Τα βιοφίλμ συναντώνται τόσο σε φυσικό, όσο και σε ανθρωπογενές περιβάλλον, με τη δράση τους να χαρακτηρίζεται είτε ως ευεργετική, είτε ως επιζήμια για τις λίθινες επιφάνειες των μνημείων ανάλογα τη βιοποικιλότητα των μικροοργανισμών (Eικόνα 32) (Morton & Surman, 1994).



**Εικόνα 32:** Ανάπτυξη κίτρινων βιοφίλμ στα τοιχώματα του παλαιολιθικού σπηλαίου Pindal στην Ισπανία (Martin-Pozas et al., 2023).

Η διαδικασία σχηματισμού και ανάπτυξης βιοφίλμ συντονίζεται από μεταβολικά μονοπάτια, ενώ η χωροταξική δομή και οργάνωση εξαρτάται από τη βιοποικιλότητα των μικροοργανισμών και από τις επικρατούσες περιβαλλοντικές συνθήκες. Τα βιοχημικά σήματα μεταξύ των κυττάρων, επηρεάζουν κάθε βήμα της διαδικασίας σύνθεσης βιοφίλμ, ενισχύοντας παράλληλα την τη μεταβολική δράση των μικροοργανισμών.

Οι κοινότητες βιοφίλμ, συνιστώνται από διαφορετικές κατηγορίες και είδη μικροοργανισμών και είναι αποτέλεσμα συνεργατικών, ανταγωνιστικών ή και συμβιωτικών αλληλεπιδράσεων και σχέσεων μεταξύ κυττάρου-κυττάρου των διαφορετικών μικροβιακών στελεχών, καθώς και μεταξύ κυττάρων-εξωτερικού περιβάλλοντος.

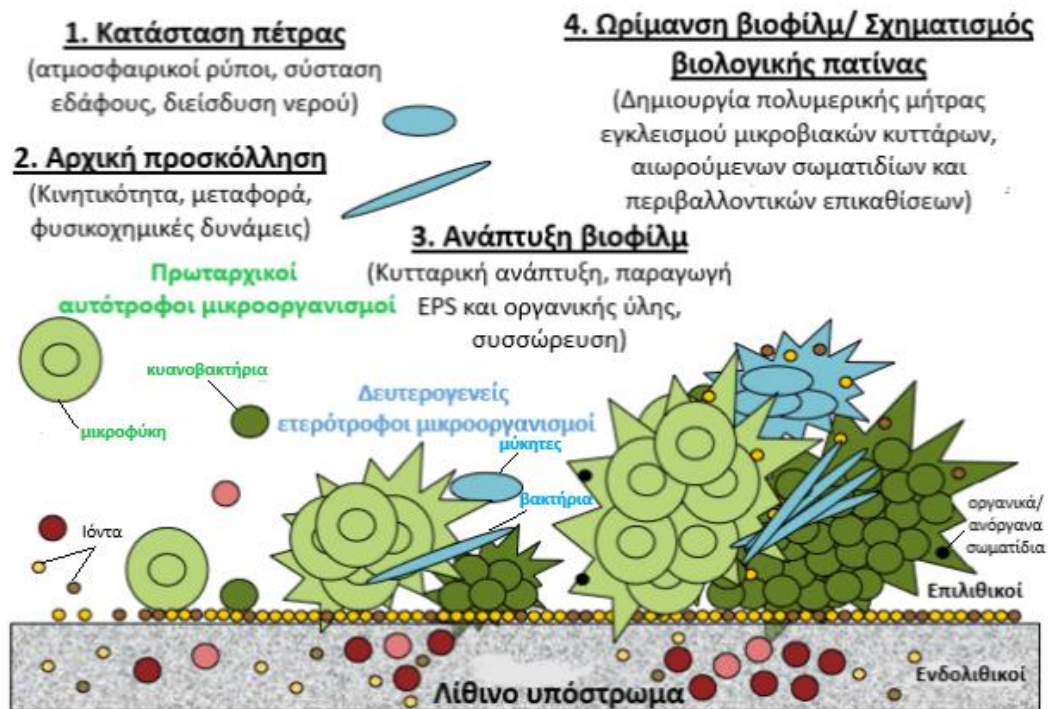
Η βιοποικιλότητα των μικροβιακών πληθυσμών που συμμετέχουν στα βιοφίλμ μεταβάλλεται με τη πάροδο του χρόνου. Η χρήση μεταγονιδιοματικών τεχνολογιών προσφέρει ολοκληρωμένη κατανόηση της δυναμικής μεταξύ των μικροοργανισμών, καθώς και τη δυνατότητα πρόβλεψης της συμπεριφοράς των βιοφίλμ σε βραχυπρόθεσμες και μακροχρόνιες μεταβολές των περιβαλλοντικών συνθηκών.

Η συγκρότηση των βιοφίλμ πραγματοποιείται μέσω αρχικής συσσώρευσης αυτότροφων φωτοσυνθετικών μικροοργανισμών (μικροφύκη και κυανοβακτήρια), οι οποίοι υποστηρίζουν την ανάπτυξη των ετερότροφων μέσω παραγωγής των απαραίτητων θρεπτικών συστατικών και εξωκυτταρικών πολυμερικών ουσιών, όπως πολυσακχαρίτες (Joseph, 2021). Παρόλο που οι φωτοσυνθετικοί μικροοργανισμοί αποτελούν την κύρια πηγή θρεπτικών συστατικών για τα βιοφίλμ, πιθανές πηγές άνθρακα αποτελούν τα αιωρούμενα σωματίδια που προσκολλώνται με τη μορφή σκόνης στις επιφάνειες των λίθινων υποστρωμάτων, καθώς οι απεκκρίσεις ζώων και φυτών (Scheerer et al., 2009).

Πρωταρχικό στάδιο για το σχηματισμό βιοφίλμ στις λίθινες επιφάνειες αποτελεί η δημιουργία ενός προστατευτικού στρώματος από εξωκυτταρικές πολυμερικές ουσίες

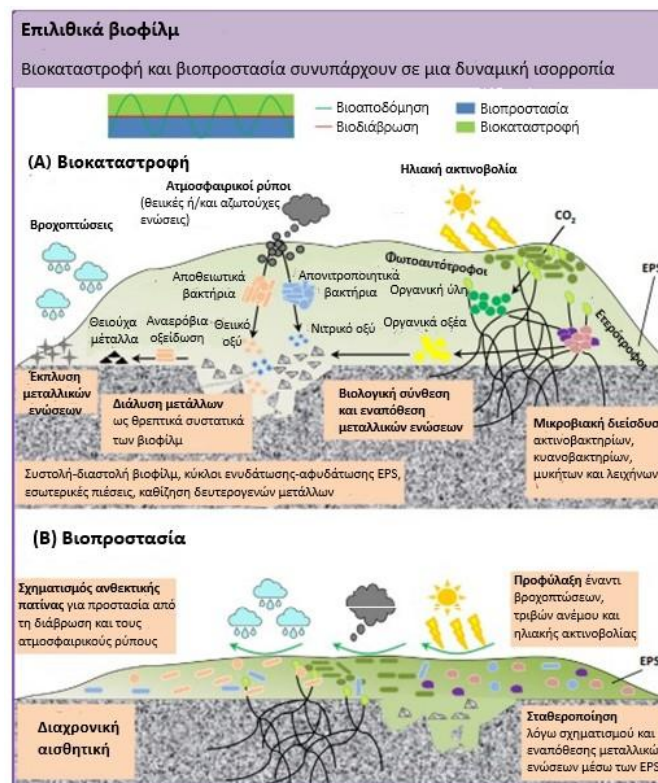
(πολυσακχαρίτες, πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα και λιπίδια) που εξασφαλίζει τη μη αντιστρεπτή προσκόλληση και σύνδεση των μικροβιακών κυττάρων, τόσο μεταξύ τους, όσο και με το λίθινο υπόστρωμα (Zhao et al., 2023). Επομένως, πραγματοποιείται ο σχηματισμός μια κολλώδους μήτρας που περιβάλλει τα μικροβιακά κύτταρα σε ένα τρισδιάστατο ενυδατωμένο και τοπικά φορτισμένο (συνήθως αρνητικά) τζελ, το οποίο συνίσταται από εξωκυτταρικές πολυμερικές ουσίες, σε ποσοστό που ποικίλει σημαντικά από 50-90% της συνολικής βιομάζας του. Αυτή η προστατευτική μήτρα διαδραματίζει κυρίαρχο ρόλο στη προστασία των μικροοργανισμών από τις διακυμάνσεις των περιβαλλοντικών συνθηκών, αποτελώντας ένα είδος φυσικού φράγματος μεταξύ κυττάρων και εξωτερικού περιβάλλοντος (Morton & Surman 1994). Καθώς οι αρχικές μικροβιακές αποικίες αναπτύσσονται, πρόσθετα μικροοργανισμοί, οι λεγόμενοι δευτερογενείς αποικιοκράτες, ενσωματώνονται στην πολυμερική μήτρα, αυξάνοντας τη συνολική βιομάζα και τη βιοποικιλότητα των μικροοργανισμών.

Τα βιοφίλμ περιλαμβάνουν πολύπλοκα κανάλια διάχυσης που μεταφέρουν θρεπτικά συστατικά και νερό προς τα κύτταρα και απομακρύνουν από αυτά τα μεταβολικά τους απόβλητα. Το τελευταίο στάδιο ωρίμανσης των βιοφίλμ, περιλαμβάνει την απόσπαση μικροβιακών κυττάρων από την κύρια βιομάζα σε γειτονικές επιφάνειες, με σκοπό την εξάπλωση και το σχηματισμό νέων βιοφίλμ (Εικόνα 33) (Joseph, 2021).



Εικόνα 33: Στάδια σχηματισμού βιοφίλμ σε λίθινα υποστρώματα (Martino, 2016).

Η ανάπτυξη βιοφίλμ στις λίθινες επιφάνειες μνημείων βρίσκεται συνεχώς μεταξύ μιας δυναμικής ισορροπίας βιοδιαβρωτικών και βιοπροστατευτικών φαινομένων, η έκταση και τα αποτελέσματα των οποίων εξαρτώνται από το είδος του λίθινου υποστρώματος (φυσικά χαρακτηριστικά, χημική σύνθεση), καθώς και από τις επικρατούσες περιβαλλοντικές συνθήκες (κλιματολογικές συνθήκες, ατμοσφαιρική ρύπανση, περιβάλλουσα βλάστηση, αρχιτεκτονική γεωμετρία) (Εικόνα 34) (Liu et al., 2022). Με την εφαρμογή μεταγονιδιαματικών μεθόδων ανάλυσης προσδιορίζονται οι επιβλαβείς και οι επωφελείς μικροοργανισμοί των βιοφίλμ υπεύθυνοι για τη διάβρωση ή την προστασία των λίθινων επιφανειών (Wu et al., 2023). Επομένως, προκειμένου να καθοριστεί ο βαθμός της βιοπροστατευτικής ή βιοδιαβρωτικής δράσης των βιοφίλμ, χρειάζεται να χαρακτηριστούν και να αξιολογηθούν πλήρως οι κυρίαρχοι μικροβιακοί πληθυσμοί, η χημική σύσταση του λίθινου υποστρώματος και οι επικρατούσες περιβαλλοντικές συνθήκες (Carter & Viles, 2005).



**Εικόνα 34:** Αξιολόγηση του διττού βιοκαταστροφικού (Α) και βιοπροστατευτικού (Β) ρόλου των βιοφίλμ

Οι εναποθέσεις αλάτων στο πορώδες σύστημα των λίθινων υποστρωμάτων σε συνδυασμό με την επίδραση της υγρασίας που οδηγεί στην ενυδάτωση και σε διόγκωση τους, έχουν ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ρωγμών. Υπό την επίδραση χαμηλών θερμοκρασιών, η ενυδάτωση των αλάτων αυξάνει την περιεκτικότητά τους σε νερό, οδηγώντας στην άσκηση μηχανικών καταπονήσεων, εξαιτίας του σχηματισμού κρυστάλλων πάγου. Τέλος, η συσσώρευση μεγάλων ποσοτήτων αλάτων μπορεί να οδηγήσει σε φαινόμενα διάβρωσης και διάλυσης των λίθινων επιφανειών (Sánchez et al., 2023).

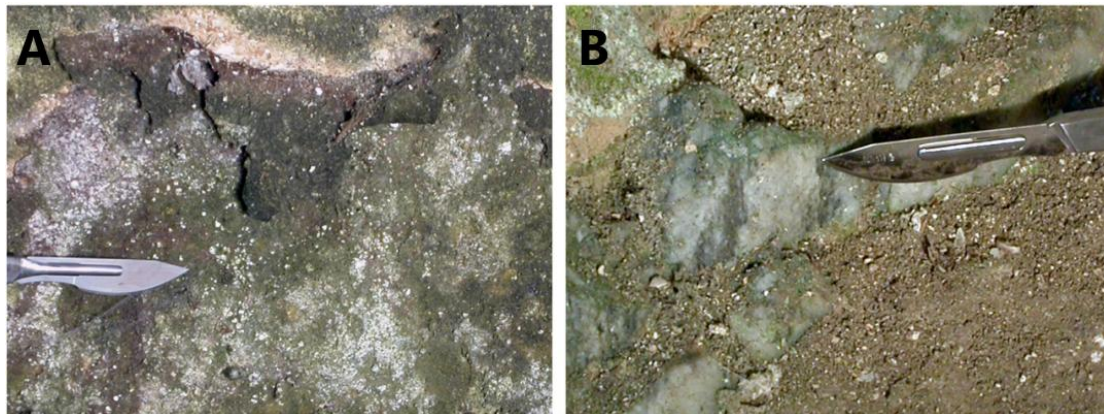
Οι επιβλαβείς επιδράσεις της ανάπτυξης βιοφίλμ σε λίθινες επιφάνειες μνημείων περιλαμβάνουν μηχανικές φθορές, χρωματικές αλλοιώσεις και φαινόμενα διάβρωσης και που διακρίνονται σε τριών διαφορετικών ειδών αλλοιώσεις που ονομάζονται πατίνες (Meng et al., 2023).



Το πρώτο είδος βιολογικής πατίνας σχετίζεται με την αλλοίωση των αισθητικών γνωρισμάτων των λίθινων υποστρωμάτων, κυρίως ασβεστολιθικά και μαρμάρια, από την ανάπτυξη βιοφίλμ στην επιφάνεια ή κατά μήκος αυτών (Morton & Surman, 1994). Τα μεταβολικά προϊόντα των μικροοργανισμών ευθύνονται για την εμφάνιση χρώσεων, ενώ η προσκόλληση και η συσσώρευση αιωρούμενων σωματιδίων στις εξωκυτταρικές πολυμερικές ουσίες, οδηγεί στην εμφάνιση μαύρης κρούστας.

Το δεύτερο είδος πατίνας σχετίζεται με φαινόμενα βιοδιάβρωσης των λίθινων υποστρωμάτων, λόγω έκκρισης διαβρωτικών μεταβολικών προϊόντων από τους μικροοργανισμούς.

Τέλος, το τρίτο είδος πατίνας περιλαμβάνει τον σχηματισμό μιας κρούστας αποβλήτων που αποτελείται από δευτερεύοντα προϊόντα μεταβολισμού των μικροοργανισμών (Εικόνα 35), η οποία εμφανίζεται κυρίως σε αργιλικά και ασβεστολιθικά υποστρώματα και μπορεί να διεισδύσει σε βάθος έως και 1 cm με αποτέλεσμα τη πρόκληση μηχανικών φθορών και την εμφάνιση ρωγμών (Komar et al., 2023).



**Εικόνα 35:** Μικροβιακή ανάπτυξη σε υπόγεια περιβάλλοντα κατακομβών, σχηματισμός μαύρης κρούστας (A) και δημιουργία πράσινης πατίνας και λευκών επικαθίσεων αλάτων (B), εξαιτίας της ανάπτυξης και εξάπλωσης βιοφίλμ, στα οποία κυριαρχούν μύκητες, κυανοβακτήρια και μικροφύκη, στο Αβαείο Tad-Dejr στη Μάλτα (Zammit et al., 2011).

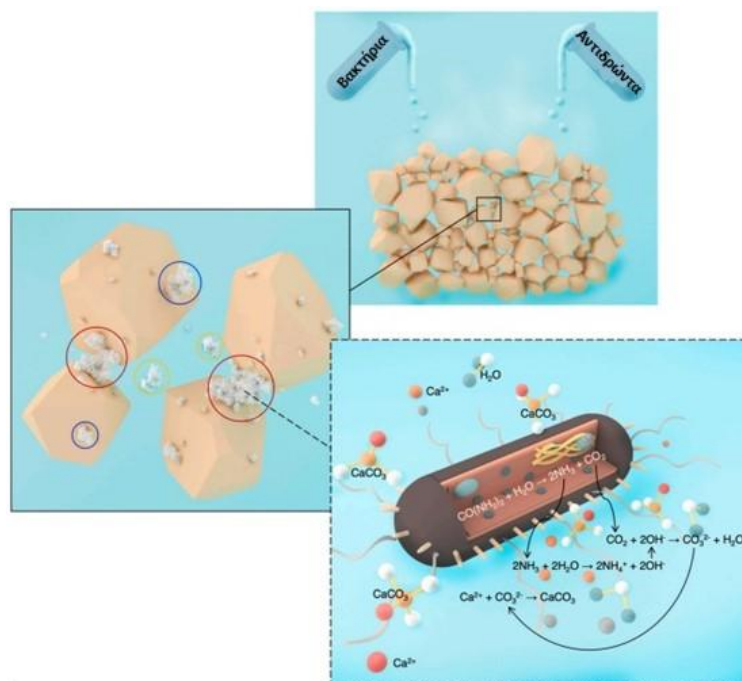
### 1.6 Μικροβιακές τεχνολογίες συντήρησης και αποκατάστασης λίθινων επιφανειών μνημείων μέσω βιοορυκτοποίησης

Τα υποστρώματα των λίθινων επιφανειών μνημείων είναι είτε φυσικής προέλευσης (ασβεστόλιθος, αμμόλιθοι, πυριτικά πετρώματα), είτε τεχνητής (μάρμαρο, γρανίτης). Η ραγδαία επιδείνωση των φαινομένων βιοδιάβρωσης και αλλοίωσης των λίθινων επιφανειών μνημείων έχει επιστήσει την προσοχή της παγκόσμιας κοινότητας με σκοπό το σχεδιασμό και την εφαρμογή κατάλληλων στρατηγικών συντήρησης και αποκατάστασης των ιστορικών μνημείων. Οι καθιερωμένες συμβατικές πρακτικές συντήρησης περιλαμβάνουν επεμβατικές μηχανικές και χημικές μεθόδους που σε αρκετές περιπτώσεις χαρακτηρίζονται από παροδικότητα και χαμηλή αποδοτικότητα, ενώ θεωρούνται επιβλαβείς τόσο για την ανθρώπινη υγεία, όσο και για το φυσικό περιβάλλον, εξαιτίας των τοξικών παραπροϊόντων που απελευθερώνουν. Επομένως, με σκοπό την διατήρηση και την εδραίωση των μνημείων εφαρμόζονται καινοτόμες οικολογικές προσεγγίσεις που στηρίζονται στη κατευθυνόμενη αξιοποίηση των κατάλληλων μικροβιακών πληθυσμών, κυρίως αυτόχθονων βακτηρίων, τα οποία αναπτύσσονται στις επιφάνειες τους και παρουσιάζουν την ικανότητα βιοορυκτοποίησης (biomineralization) (Jroundi et al., 2010). Από το σύνολο των βιοορυκτών που συναντώνται στις επιφάνειες των μνημείων το 50% αυτών συνιστώνται από ασβέστιο,

με το ανθρακικό ασβέστιο ( $\text{CaCO}_3$ ) να αποτελεί περισσότερο από το 4% του φλοιού της γης (Castro-Alonso et al., 2019).

Η βιοορυκτοποίηση αφορά τη μεταβολή της χημικής σύνθεσης ενός τοπικού μικρο-περιβάλλοντος, λόγω μικροβιακής δραστηριότητας που οδηγεί στην εναπόθεση και συσσώρευση ανθρακικών αλάτων. Η βιοορυκτοποίηση αποτελεί ένα ευρέως διαδεδομένο φαινόμενο που συναντάται στα φυσικά περιβάλλοντα και μπορεί να οδηγήσει στο σχηματισμό περισσότερων από 64 διαφορετικών ανθρακικών αλάτων (Anbu et al., 2016). Αυτά τα άλατα εναποτίθενται ως αποτέλεσμα της αντίδρασης των ιόντων μετάλλων (ασβεστίου, μαγνησίου, σιδήρου) του λίθινου υποστρώματος, με μεταβολικά προϊόντα των μικροοργανισμών ή ενώσεις του εξωκυτταρικού τους περιβάλλοντος. Οι συνηθέστερες εναποθέσεις περιλαμβάνουν οξείδια σιδήρου και μαγγανίου, ανθρακικά, φωσφορικά, νιτρικά και πυριτικά άλατα, με κυριότερη και πιο ωφέλιμη για τις λίθινες επιφάνειες των μνημείων βιοορυκτοποίηση ανθρακικού ασβεστίου από ουρεολυτικά βακτήρια (Joseph, 2021).

Η εναπόθεση και η συσσώρευση ανθρακικού ασβεστίου στην επιφάνεια και στο εσωτερικό πορώδες σύστημα των λίθινων υποστρωμάτων, συμβάλλουν στο σχηματισμό ενός λεπτού προστατευτικού στρώματος, καθώς και στη σταθεροποίηση της δομής του αντίστοιχα (Εικόνα 36).

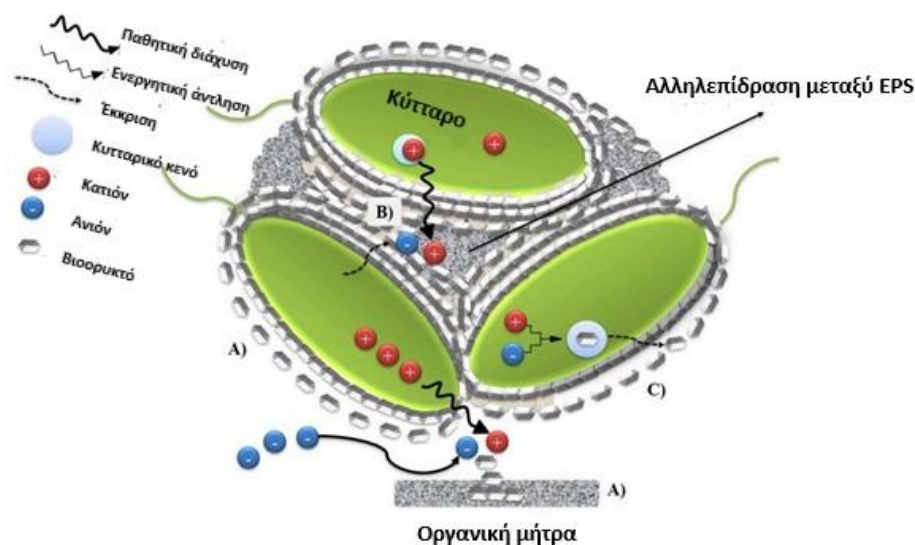


**Εικόνα 36:** Μικροβιακά επαγόμενη εναπόθεση ανθρακικού ασβεστίου μέσω της μεταβολικής διεργασίας της ουρεόλυσης στην επιφάνεια και το πορώδες σύστημα λίθινων υποστρωμάτων (Fu et al., 2023).

Τις τελευταίες δεκαετίες, η βακτηριακή βιοορυκτοποίηση αποτελεί μια αποδοτική και συνάμα φιλική προς το περιβάλλον μικροβιακή μέθοδος συντήρησης και αποκατάστασης των ασβεστολιθικών και μαρμάρινων επιφανειών μνημείων (Li et al., 2019). Παρά το γεγονός, ότι η ανάπτυξη βακτηρίων στις λίθινες επιφάνειες μνημείων συσχετίζεται με επιβλαβή φαινόμενα, σε αρκετές βιβλιογραφικές και ερευνητικές μελέτες πραγματοποιείται αξιοποίηση των κατάλληλων ωφέλιμων βακτηρίων με την ικανότητα εναπόθεσης ανθρακικού ασβεστίου (carbonatogenic bacteria), για την αποκατάσταση αρχαιολογικών μνημείων (De Muynck et al., 2010).

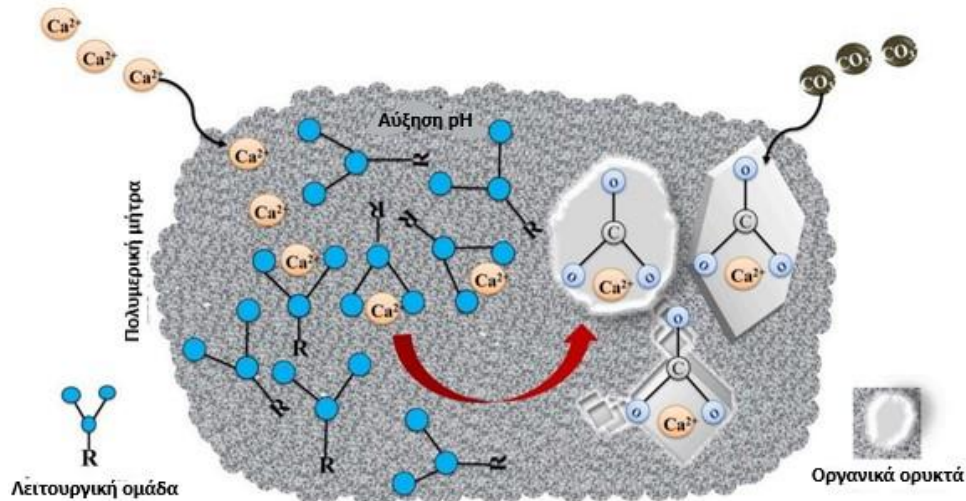
Για τη βιοορυκτοποίηση τα βακτήρια αξιοποιούν διάφορα μεταβολικά δίκτυα. Στη φύση υφίστανται τρία είδη βιοορυκτοποίησης, η μικροβιακά επαγόμενη, η βιολογικά ελεγχόμενη και η λιγότερο διαδεδομένη βιολογικά διαμεσολαβούμενη.

Η βιολογικά ελεγχόμενη βιοορυκτοποίηση (Biologically Controlled Mineralization ή BCM) περιλαμβάνει τις μεταβολικές διεργασίες των κυττάρων, οι οποίες ελέγχουν και κατευθύνουν εξ' ολοκλήρου τις διαδικασίες εναπόθεσης, συσσώρευσης, καθώς και τη δομή και τη μορφολογία των παραγόμενων βιοορυκτών (Achal et al., 2015). Αυτός ο μηχανισμός μπορεί να αποτελεί μια εξωκυτταρική (BCM<sub>e</sub>), ενδοκυτταρική (BCM<sub>in</sub>) ή διακυτταρική (BCM<sub>int</sub>) διεργασία με τη συμμετοχή οργανικών μακρομορίων πολυσακχαριτών και εξωκυτταρικών πολυμερικών ουσιών. Η βιολογικά ελεγχόμενη βιοορυκτοποίηση οδηγεί στο σχηματισμό πολύπλοκων και εξειδικευμένων δομών όπως κόκαλα, κελύφη, δόντια, και εμφανίζεται κυρίως σε ιστούς πολυκύτταρων ευκαριωτικών οργανισμών. Οι βιογενείς ενώσεις συντίθενται είτε ενδοκυτταρικά, είτε εξωκυτταρικά με τρόπο μοναδικό για κάθε είδος οργανισμού, με τη συνολική διαδικασία να ρυθμίζεται πλήρως από ειδικό μεταβολικό και γενετικό έλεγχο (Εικόνα 37) (Achal et al., 2015).



**Εικόνα 37:** Βιολογικά ελεγχόμενη βιοορυκτοποίηση. Στο σημείο A) παρουσιάζεται ο εξωκυτταρικός μηχανισμός (BCM<sub>e</sub>) συσσώρευσης των μεταλλικών ενώσεων στην οργανική μήτρα μέσω παθητικής διάχυσης των κατιόντων έξω από το κύτταρο. Στο σημείο B) αναπαρίσταται η διακυτταρική διεργασία, κατά την οποία οι επιθηλιακές επιφάνειες των κυττάρων χρησιμεύουν ως οργανικό υπόστρωμα για τον προσανατολισμό και τη διαμόρφωση της εναπόθεσης των βιολογικά σχηματιζόμενων ορυκτών αλάτων γύρω από την κυτταρική επιφάνεια. Τέλος, στην περιοχή C) πραγματοποιείται ο ενδοκυτταρικός μηχανισμός (BCM<sub>in</sub>) σύνθεσης των βιολογικά παραγόμενων ορυκτών σε ένα εξειδικευμένο κυστίδιο στο εσωτερικό του κυττάρου και η μετέπειτα έκκριση τους στην κυτταρική επιφάνεια (Castro-Alonso et al., 2019).

Η βιολογικά διαμεσολαβούμενη βιοορυκτοποίηση (Biologically Mediated Mineralization ή BMM) αφορά την παθητική εναπόθεση βιοορυκτών από τα μικροβιακά κύτταρα, ως αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης μεταξύ μιας οργανικής μήτρας και οργανικών ή/και ανόργανων ενώσεων, χωρίς την ανάγκη εξωκυτταρικής ή ενδοκυτταρικής μεταβολικής δράσης (Εικόνα 38), όπως στη χαρακτηριστική περίπτωση των εξωκυτταρικών πολυμερικών ουσιών (Castro-Alonso et al., 2019).



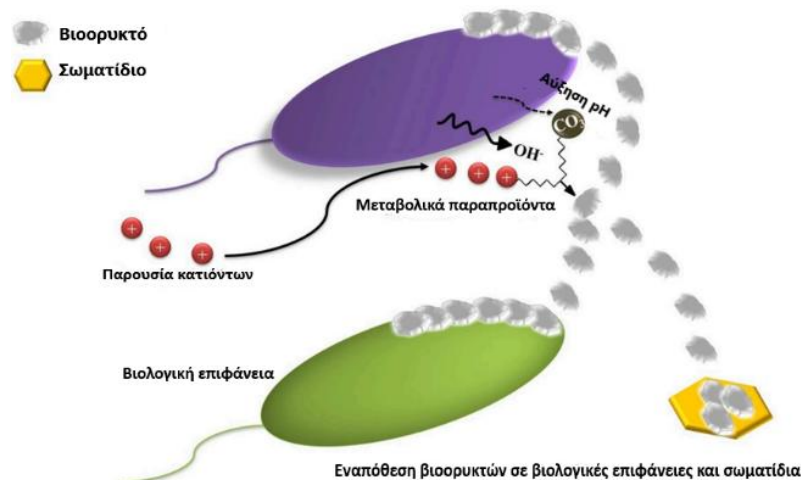
**Εικόνα 38:** Βιολογικά διαμεσολαβούμενη βιοορυκτοποίηση (Castro-Alonso et al., 2019).

### 1.6.1 Μικροβιακά επαγόμενη βιοορυκτοποίηση

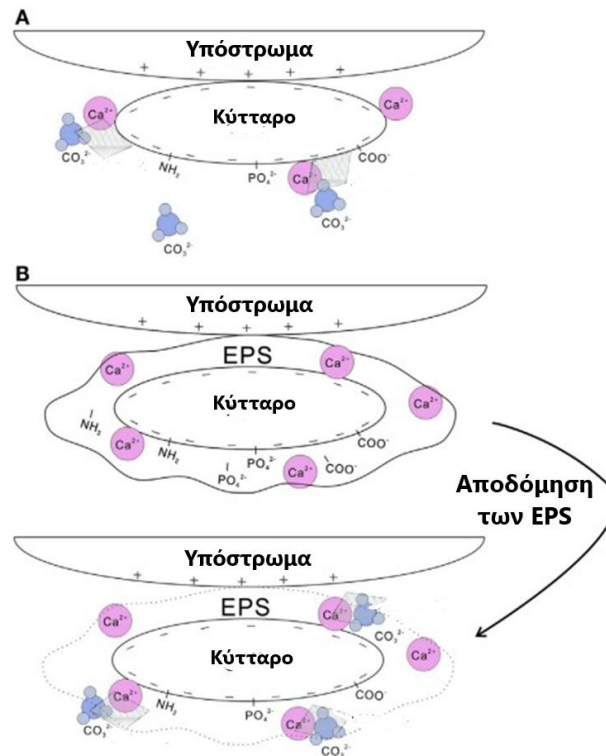
Η μικροβιακά επαγόμενη βιοορυκτοποίηση (Microbiologically Induced Calcite Precipitation ή MICP) σχετίζεται με την εναπόθεση ανθρακικών αλάτων, μέσω αλληλεπιδράσεων μεταξύ των μεταβολικών προϊόντων των μικροβιακών κυττάρων και των διαθέσιμων ιόντων μετάλλων του εξωκυτταρικού περιβάλλοντος (Εικόνα 39). Ωστόσο, σε αυτό το μηχανισμό η συμμετοχή των κυττάρων στο σχηματισμό και την εναπόθεση των βιοορυκτών είναι περιορισμένη και συνδέεται περισσότερο με τη βιοχημική μεταβολή των συνθηκών του τοπικού μικρο-περιβάλλοντος τους (Krajewska, 2018).

Πιο συγκεκριμένα, μέσω μεταβολικών διεργασιών, μεταβάλλεται το pH του υποστρώματος σε αλκαλικό, ευνοώντας παρουσία ιόντων ασβεστίου, την εναπόθεση ανθρακικού ασβεστίου. Επιπλέον, τα κυτταρικά τοιχώματα των βακτηρίων δρουν ως ετερογενείς πυρήνες συσσώρευσης εναποθέσεων βιοορυκτών που με τη σειρά τους εισέρχονται στο ενδοκυτταρικό περιβάλλον (Εικόνα 40) (Anbu et al., 2016).

Η εναπόθεση ανθρακικού ασβεστίου από βακτήρια πραγματοποιείται μέσω διαφόρων μεταβολικών δικτύων με κυριότερα τη φωτοσύνθεση και τους κύκλους αζώτου και θείου. Κατά τις μεταβολικές διεργασίες του κύκλου αζώτου, η εναπόθεση ανθρακικού ασβεστίου πραγματοποιείται παρουσία οξυγόνου από δύο διαφορετικές οδούς, της αμμωνιοποίησης των αμινοξέων και της υδρόλυσης της ουρίας (Vaskevicius et al. 2023).



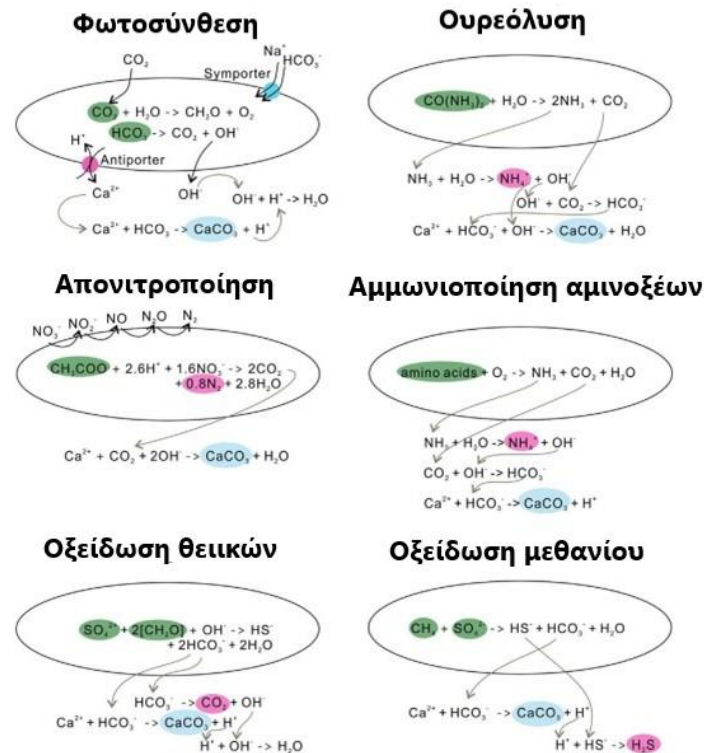
**Εικόνα 39:** Μικροβιακά επαγόμενη βιοορυκτοποίηση (Castro-Alonso et al., 2019).



**Εικόνα 40:** Περιοχές εναπόθεσης και συσσώρευσης ανθρακικού ασβεστίου. Στο σχήμα (A) παρουσιάζεται η διαδικασία δέσμησης των ιόντων ασβεστίου από τις αρνητικά φορτισμένες λειτουργικές ομάδες καρβοξυλίων και αμινών των κυτταρικών τοιχωμάτων των βακτηρίων που οδηγεί στην εποικήμενη εναπόθεση ανθρακικού ασβεστίου στην επιφάνεια των κυττάρων που εντοπίζονται ανθρακικά ιόντα. Στο σχήμα (B) τα αρνητικά φορτισμένα κυτταρικά τοιχώματα των βακτηρίων που περιβάλλονται από εξωκυτταρικές πολυμερικές ουσίες (EPS), οι οποίες περιέχουν τους δεσμευτικούς παράγοντες μεταλλικών κατιόντων ασβεστίου, τείνουν να συνδέονται με θετικά φορτισμένες επιφάνειες. Έπειτα από την αποδόμησή των EPS, η συσσώρευση υψηλών τοπικών συγκεντρώσεων ιόντων ασβεστίου, συντελεί παρουσία ανθρακικών ιόντων στη σύνθεση ανθρακικού ασβεστίου (Zhu & Dittrich, 2016).

### 1.6.2 Μεταβολικά δίκτυα εναπόθεσης ανθρακικού ασβεστίου

Τα μεταβολικά δίκτυα εναπόθεσης ανθρακικού ασβεστίου περιλαμβάνουν τη φωτοσύνθεση που σχετίζεται με μικροφύκη και κυανοβακτήρια, την ουρεόλυση, δηλαδή διάσπαση της ουρίας, την αμμωνιοποίηση και την απονιτροποίηση που αφορούν τον κύκλο αζώτου των βακτηρίων, την αναερόβια οξείδωση θειικών αλάτων που περιλαμβάνεται στον κύκλο του θείου και τέλος την αναερόβια οξείδωση μεθανίου (Εικόνα 41) (Krajewska, 2018). Στα χερσαία περιβάλλοντα, η κύρια μεταβολική οδός εναπόθεσης ανθρακικού ασβεστίου είναι η ουρεόλυση σε ποσοστό 43% και ακολουθεί η φωτοσύνθεση με ποσοστό 38% (Zhu & Dittrich, 2016).



Εικόνα 41: Μεταβολικά δίκτυα εναπόθεσης ανθρακικού ασβεστίου (Zhu & Dittrich, 2016).

### 1.6.2.1 Ουρεόλυση

Η ουρία αποτελεί πηγή αζώτου για ένα εύρος μικροοργανισμών, συμπεριλαμβανομένων των βακτηρίων, των μυκήτων και των κυανοβακτηρίων. Η ουρεολυτική δράση αφορά το σύνολο αυτών των μικροοργανισμών, παρόλο που ορισμένα βακτήρια εμφανίζουν υψηλή ενεργότητα ουρεάσης που καταλύει την αντίδραση υδρόλυσης της ουρίας.

Η ουρεάση σχετίζεται με την εναπόθεση ανθρακικού ασβεστίου, μέσω τεσσάρων διαφορετικών παραμέτρων, του pH, της συγκέντρωση διαλυμένου ανόργανου άνθρακα (DIC), της συγκέντρωση ασβεστίου και της διαθεσιμότητας των περιοχών συσσώρευσης ανθρακικού ασβεστίου (De Muynck et al., 2010). Οι τρεις πρώτες παράμετροι επηρεάζουν τη συγκέντρωση των ανθρακικών ιόντων, ενώ η τελευταία παράμετρος είναι απαραίτητη για την αποτελεσματική σύνθεση ανθρακικού ασβεστίου. Όλες αυτές οι παράμετροι επηρεάζουν σημαντικά την ουρεολυτική δράση των μικροοργανισμών που ευθύνεται για την εναπόθεση ανθρακικού ασβεστίου (Anbu et al., 2016).

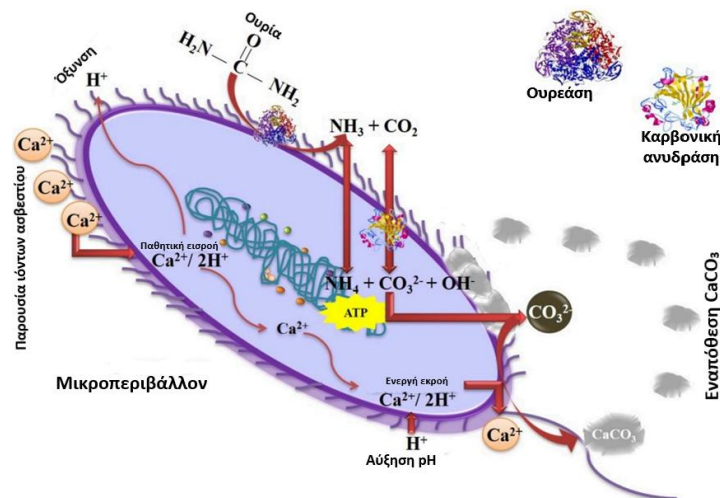
Η ουρεόλυση πραγματοποιείται κυρίως από ουρεολυτικά βακτήρια, τα οποία αυξάνουν τη συγκέντρωση του διαλυμένου ανόργανου άνθρακα (DIC) και του pH του εξωκυτταρικού τους περιβάλλοντος. Ως εκ τούτου, παρουσία ιόντων ασβεστίου, όπως στην περίπτωση των ασβεστολιθικών υποστρωμάτων, η αντίδραση διάσπασης της ουρίας ευνοεί την εναπόθεση ανθρακικού ασβεστίου (De Muynck et al., 2010).

Κατά τη μεταβολική διεργασία ουρεόλυσης, πραγματοποιείται μια σειρά πολύπλοκων και πολυσύνθετων αντιδράσεων που καταλύονται από τα ένζυμα ουρεάση και καρβονική ανυδράση. Η υδρόλυση της ουρίας από την ουρεάση οδηγεί στο σχηματισμό αμμωνίας και ανθρακικού οξέος, σύμφωνα με τις αντιδράσεις,  $\text{CO}(\text{NH}_2)_2 + \text{H}_2\text{O} \xrightarrow{\text{Ουρεάση}} \text{NH}_2\text{COOH} + \text{NH}_3 \xrightarrow{\text{H}_2\text{O}} \text{H}_2\text{CO}_3 + 2\text{NH}_3$ . Σε περίπτωση αναστολής ή απουσίας του ενζύμου, η υδρόλυση της ουρίας πραγματοποιείται μέσω ενός πιο αργού σταδίου σχηματισμού ενδιάμεσων οργανικών ενώσεων που ονομάζονται καρβένια, τα οποία υδρολύονται αυθόρμητα σε αμμωνία και ανθρακικό οξύ,  $\text{CO}(\text{NH}_2)_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{HN}=\text{C}=\text{O} + \text{NH}_3 \xrightarrow{2\text{H}_2\text{O}} \text{H}_2\text{CO}_3 + 2\text{NH}_3$ . Στη συνέχεια, το

σχηματιζόμενο ανθρακικό οξύ διίσταται μέσω κατάλυσης από την καρβονική ανυδράση σε όξινα ανθρακικά ιόντα και η παραγόμενη αμμωνία υδρολύεται σε αμμωνιακά ιόντα, σύμφωνα με τις αντιδράσεις  $\text{H}_2\text{CO}_3 \leftrightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$  και  $\text{NH}_3 + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{NH}_4^+ + 2\text{OH}^-$ . Η αύξηση του pH του υδατικού περιβάλλοντος, εξαιτίας των παραγόμενων αμμωνιακών ιόντων και υδροξυλίωντων, οδηγεί στη περαιτέρω διάσταση των όξινων ανθρακικών ιόντων σε διττανθρακικά  $\text{HCO}_3^- + \text{H}^+ + 2\text{NH}_4^+ + 2\text{OH}^- \rightarrow \text{CO}_3^{2-} + 2\text{NH}_4^+ + 2\text{H}_2\text{O}$ , γεγονός που ευνοεί παρουσία περίσσειας ιόντων ασβεστίου στο εξωκυτταρικό περιβάλλον, την εναπόθεση ανθρακικού ασβεστίου γύρω από τα κύτταρα, όπως περιγράφεται από τις παρακάτω αντιδράσεις,  $\text{Ca}^{2+} + \text{Cells} \rightarrow \text{Cells}-\text{Ca}^{2+}$  και  $\text{Cells}-\text{Ca}^{2+} + \text{CO}_3^{2-} \rightarrow \text{Cells}-\text{CaCO}_3$  (Εικόνα 42) (Castro-Alonso et al., 2019).

Η υδρόλυση τόσο του διοξειδίου του άνθρακα, όσο και του ανθρακικού οξέος σε όξινα ανθρακικά και μετέπειτα σε διττανθρακικά ιόντα αποτελεί το περιοριστικό στάδιο του ρυθμού της συνολικής αντίδρασης σχηματισμού ανθρακικού ασβεστίου. Η κατάλυση αυτού του του σταδίου πραγματοποιείται από το ένζυμο καρβονική ανυδράση. Η ενεργότητα της καρβονικής ανυδράσης εξαρτάται από τις διαφορετικές αλληλουχίες των αμινοξέων, με αποτέλεσμα τη ταξινόμηση της σε τρεις εξελικτικές τάξεις που προσδιορίζονται ως  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - καρβονική ανυδράση (Effendi & Ng, 2019).

Τα ιόντα ασβεστίου δεσμεύονται στα κυτταρικά τοιχώματα των βακτηρίων που αποτελούνται από αρνητικά φορτισμένες λειτουργικές ομάδες, όπως καρβοξύλια και αμίνες. Στη συνέχεια, τα δεσμευμένα ιόντα ασβεστίου αντιδρούν με τα ανθρακικά ανιόντα, προκειμένου να σχηματιστεί ανθρακικό ασβέστιο σε αδιάλυτη μορφή. Τα κυτταρικά τοιχώματα των βακτηρίων διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη σύνθεση ανθρακικού ασβεστίου, καθώς αποτελούν περιοχές συσσώρευσης ανθρακικού ασβεστίου (Anbu et al., 2016).



**Εικόνα 42:** Μικροβιακά επαγόμενη βιοορυκτοποίηση ανθρακικού ασβεστίου καταλυόμενη από τα ένζυμα ουρεάση και καρβονική ανυδράση (Castro-Alonso et al., 2019).

Τόσο η ουρεολυτική δράση, όσο και η παραγόμενη ποσότητα ανθρακικού ασβεστίου, επηρεάζονται από διάφορους παράγοντες και πιο συγκεκριμένα το είδος του βακτηρίου, τη κυτταρική συγκέντρωση, το pH, τη θερμοκρασία και των συγκεντρώσεων ουρίας και ασβεστίου (Helmi et al., 2016).

Το είδος του βακτηρίου καθορίζει την ουρεολυτική τους δράση και ιδιαίτερα το ρυθμό διάσπασης της ουρίας και τη ποσότητα του παραγόμενου ανθρακικού ασβεστίου. Τα γένη βακτηρίων γνωστά για την εναπόθεση ανθρακικού ασβεστίου μέσω ουρεόλυσης είναι τα *Bacillus*, *Sporosarcina* και *Myxococcus* (Vaskevicius et al., 2023). Υψηλή κυτταρική συγκέντρωση μεταξύ  $10^7$  έως  $10^9$  κύτταρα, οδηγούν σε αύξηση της παραγόμενης ποσότητας

ανθρακικού ασβεστίου, λόγω υψηλότερης ενεργότητας των ενζύμων ουρεάση και καρβονική ανυδράση και αύξησης των περιοχών συσσώρευσης ανθρακικού ασβεστίου (Fu et al., 2023).

Ο σχηματισμός ανθρακικού ασβεστίου επηρεάζεται από το pH, καθώς τόσο η ουρεάση, όσο και η καρβονική ανυδράση δρουν βέλτιστα σε αλκαλικές τιμές του. Η τιμή pH για την οποία η ουρεάση παρουσιάζει βέλτιστη δράση είναι 8.3, πάνω από την οποία μειώνεται σταδιακά η ενεργότητα του ενζύμου (Anbu et al., 2016), ενώ η καρβονική ανυδράση εμφανίζει βέλτιστη δράση σε πιο αλκαλικές συνθήκες και συγκεκριμένα για τιμές pH που κυμαίνονται μεταξύ 9.0-9.2 (Zheng & Qian 2020). Σε υδατικά περιβάλλοντα για τιμές του pH κάτω του 7.0, το ανθρακικό ασβέστιο τείνει να διαλύεται, με την επανακρυσταλλοποίηση του να πραγματοποιείται υπό αλκαλικές συνθήκες σε τιμές pH μεταξύ 8.0-8.5 (Anbu et al., 2016).

Το βέλτιστο εύρος θερμοκρασιών για τη βέλτιστη δράση των δύο ενζύμων αντιδράσεων κυμαίνεται από 30 έως 35°C (Helmi et al., 2016). Μελέτες του κινητικού ρυθμού υδρόλυσης της ουρίας από την ουρεάση και την καρβονική ανυδράση επισημαίνουν εκθετική αύξηση της παραγόμενης ποσότητας ανθρακικού ασβεστίου, καθώς αυξάνεται η θερμοκρασία από 15 έως 30°C, λόγω αύξησης της ενεργότητας των ενζύμων, έως και τη θερμοκρασία 35° C όπου και διαπιστώνεται η μέγιστη τιμή της, ενώ για υψηλότερες θερμοκρασίες παρουσιάζεται ολοένα και αυξανόμενη μείωση της δραστηριότητας των ενζύμων, άρα και της παραγόμενης ποσότητας ανθρακικού ασβεστίου (Krajewska, 2009).

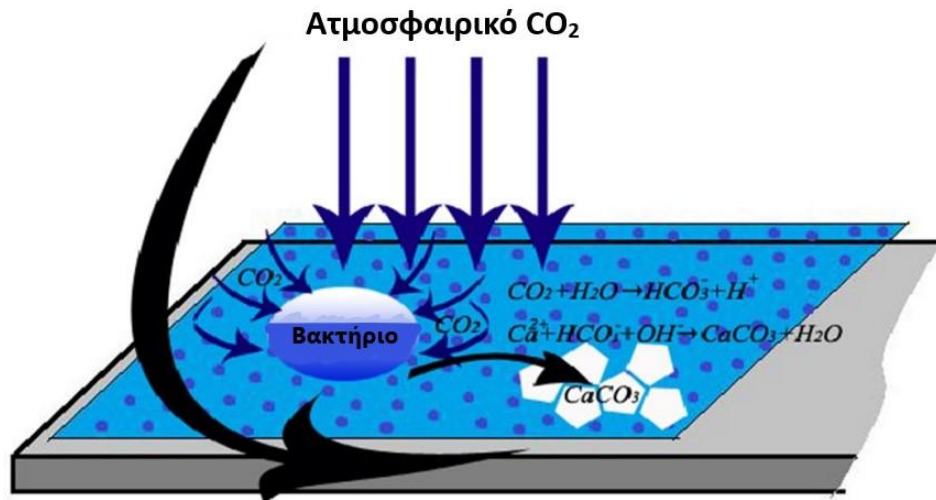
Αύξηση της συγκέντρωσης των ιόντων ασβεστίου και της ουρίας, οδηγεί σε αύξηση της σχηματιζόμενης ποσότητας ανθρακικού ασβεστίου. Ωστόσο, υψηλές συγκεντρώσεις ουρίας και ιόντων ασβεστίου άνω των 0.5 M μειώνουν αισθητά την αποτελεσματικότητα εναπόθεσης, με τη βέλτιστη απόδοση να παρατηρείται σε χαμηλά επίπεδα συγκέντρωσης μεταξύ 0.05–0.5 M. Οι βέλτιστες συγκεντρώσεις ουρίας και ιόντων ασβεστίου είναι 0.5 M και 0.25 M, αντίστοιχα. Στην πραγματικότητα, τα ιόντα ασβεστίου δεν συμμετέχουν στις μεταβολικές διεργασίες των κυττάρων, αντίθετα συσσωρεύονται στα κυτταρικά τοιχώματα, όπου και πραγματοποιείται η σύνθεση ανθρακικού ασβεστίου. Η εναπόθεση ανθρακικού ασβεστίου εξαρτάται περισσότερο από τη συγκέντρωση των ιόντων ασβεστίου σε σχέση με τη συγκέντρωση της ουρίας. Αυτό διαπιστώνεται, λόγω αύξησης της ενζυμικής ενεργότητας της ουρεάσης έως και δέκα φορές παρουσία ιόντων ασβεστίου συγκριτικά με την απουσία τους (Anbu et al., 2016). Τέλος, οι διαφορετικές πηγές ιόντων ασβεστίου, οδηγούν σε διαφορετικούς ρυθμούς παραγωγής ανθρακικού ασβεστίου, με το χλωριούχο ασβέστιο (CaCl<sub>2</sub>) να αποτελεί τη βέλτιστη (Li et al., 2019).

Η ουρεάση αποτελεί ένα μεταλλικό ένζυμο που περιέχει νικέλιο, ανήκει στην ομάδα των υδρολασών που διασπούν την ουρία και εντοπίζεται σε ένα ευρύ φάσμα μικροοργανισμών, συμπεριλαμβανομένων των βακτηρίων, των μυκήτων και των μικροφυκών (Krajewska, 2009). Ο σημαντικότερος ρόλος της ουρεάσης, έγκειται στην κατάλυση της αντίδρασης υδρόλυσης της ουρίας σε αμμωνία που προκαλεί αύξηση του pH, με παράλληλη παραγωγή διοξειδίου του άνθρακα που οδηγεί σε περίσσεια διαλυμένου ανόργανου άνθρακα, συντελώντας παρουσία ιόντων ασβεστίου στη σύνθεση ανθρακικού ασβεστίου (Castro et al., 2016).

Η καρβονική ανυδράση αποτελεί ένα μεταλλικό ένζυμο, με περιεκτικότητα σε ψευδάργυρο που παράγεται, τόσο από προκαρυωτικούς, όσο και από ευκαρυωτικούς μικροοργανισμούς, καθώς είναι απαραίτητη σε μια πληθώρα βιολογικών διεργασιών, όπως η αναπνοή, η ανταλλαγή ιόντων μεταξύ κυττάρων και περιβάλλοντος, η βιοορυκτοποίηση και η φωτοσύνθεση. Επιπλέον, καταλύει την αμφίδρομη υδρόλυση του διοξειδίου του άνθρακα σε όξινα ανθρακικά και μετέπειτα σε διττανθρακικά ανιόντα που συντελεί παρουσία ιόντων ασβεστίου στο σχηματισμό ανθρακικού ασβεστίου (Achal et al., 2015) (Εικόνα 43), η δομή και η μορφολογία του οποίου εξαρτάται από τη συνεχή παροχή διοξειδίου του άνθρακα του και την παρουσία πολυμερικών βιογενών ενώσεων (εξωκυτταρικές πολυμερικές ουσίες)



που συνδράμουν στις διαδικασίες σύνθεσης και συσσώρευσης του ανθρακικού ασβεστίου (Castro et al., 2016).



**Εικόνα 43:** Διαδικασία απευθείας μετατροπής του δεσμευμένου από την ατμόσφαιρα διοξειδίου του άνθρακα σε ανθρακικό ασβέστιο στην επιφάνεια λίθινου υποστρώματος (Qian et al., 2016).

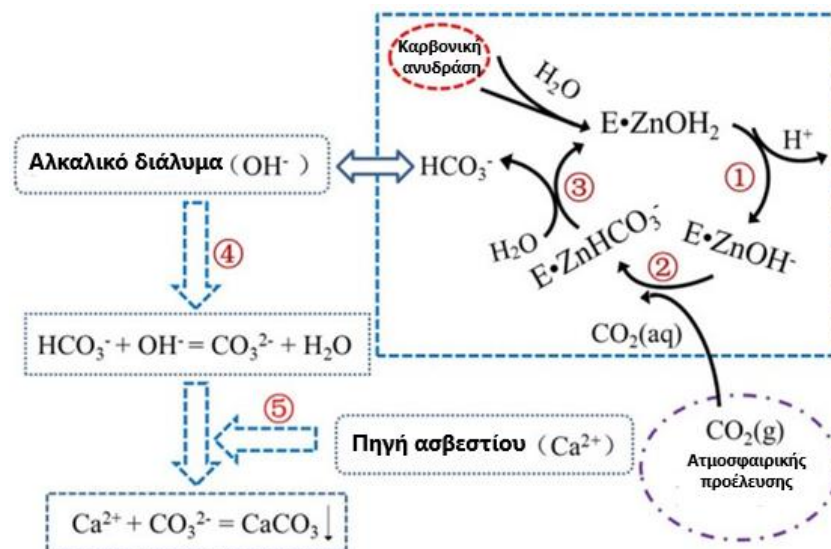
Η βιοορυκτοποίηση ανθρακικού ασβεστίου μέσω ουρεόλυσης, εξαρτάται από έξι θεμελιώδεις παράγοντες, τη δραστηριότητα της ουρεάσης, την ενεργότητα της καρβονικής ανυδράσης, τη συγκέντρωση των ιόντων ασβεστίου, τη συγκέντρωση του διαλυμένου ανόργανου άνθρακα (DIC), το pH και τη διαθεσιμότητα περιοχών συσσώρευσης του σχηματιζόμενου ανθρακικού ασβεστίου (Castro et al., 2016).

Προκειμένου να κατανοηθεί ξεχωριστά ο καταλυτική δράση της ουρεάσης και της καρβονικής ανυδράσης, καθώς και ο συνεργατικός τους ρόλος για τη βιοορυκτοποίηση ανθρακικού ασβεστίου, αναστέλλεται η δράση των ενζύμων τόσο μεμονωμένα, όσο και σε συνδυασμό (Dhami et al., 2014).

Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ της καρβονικής ανυδράσης και της ουρεάσης ερευνώνται μέσω προσδιορισμού του ρυθμού παραγωγής ανθρακικού ασβεστίου, έπειτα από την μεμονωμένη και ταυτόχρονη αντίστοιχα αναστολή της δράσης των δύο ενζύμων (Botré & Botré 1989). Η εναποθείσα ποσότητα ανθρακικού ασβεστίου μειώνεται σημαντικά κατά την αναστολή της δράσης και των δύο ενζύμων σε σύγκριση με εκείνη της μεμονωμένης δράσης του καθενός, γεγονός που υποδηλώνει τον καταλυτικό τους ρόλο για την επιτάχυνση της διεργασίας. Πιο συγκεκριμένα, η καρβονική ανυδράση διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην υδρόλυση του διοξειδίου του άνθρακα σε διττανθρακικά ανιόντα, ενώ η ουρεάση συμβάλλει στη διατήρηση αλκαλικού περιβάλλοντος που σε συνδυασμό με τη παρουσία ιόντων ασβεστίου προάγουν την εναπόθεση ανθρακικού ασβεστίου (Achal & Pan 2011). Παρόλα αυτά, η αναστολή της εναπόθεσης ανθρακικού ασβεστίου είναι αρκετά υψηλότερη παρουσία του αναστολέα ουρεάσης σε σύγκριση με τον αναστολέα καρβονικής ανυδράσης. Κατά τη διάρκεια του μεγαλύτερου μέρους της διαδικασίας, ο σχηματισμός ανθρακικού ασβεστίου καταλύεται και από τα δύο ένζυμα, ενώ προς το τέλος της αντίδρασης, έπειτα από την σταθεροποίηση του ρυθμού παραγωγής του, η ουρεάση φαίνεται να διαδραματίζει τον κυρίαρχο ρόλο (Botré & Botré 1989).

Η αναστολή της ουρεάσης προκαλεί μεγαλύτερη μείωση στην ποσότητα του εναποθέντος ανθρακικού ασβεστίου (Dhami et al., 2014). Η υδρόλυση της ουρίας έχει ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση τόσο διττανθρακικών ιόντων, όσο και αμμωνίας στα κυτταρικά τοιχώματα των βακτηρίων, με την ενσωμάτωση της δραστηρικής ομάδας του ψευδαργύρου (Zn<sup>2+</sup>) της καρβονικής ανυδράσης, στη δραστηρική θέση της ουρεάσης να εξαρτάται από τον

μεταβολισμό του διοξειδίου του άνθρακα σε ανθρακικά ιόντα που ρυθμίζεται από την καρβονική ανυδράση (Achal & Pan 2011), όπως περιγράφεται από τις αντιδράσεις,  $E \cdot ZnOH_2 \leftrightarrow E \cdot ZnOH^- + H^+$  και  $E \cdot ZnOH^- + CO_2 \leftrightarrow E \cdot ZnHCO_3^-$  (Εικόνα 44) (Zheng & Qian 2020).



**Εικόνα 44:** Στάδια και αντιδράσεις της μικροβιακά επαγόμενης βιοορυκτοποίησης ανθρακικού ασβεστίου μέσω κατάλυσης από τα ένζυμα ουρεάση και καρβονική ανυδράση (Zheng & Qian 2020).

### 1.6.2.2 Φωτοσύνθεση

Οι φωτοσυνθετικοί μικροοργανισμοί και κυρίως τα κυανοβακτήρια και τα μικροφύκη έχουν την ικανότητα εναπόθεσης ανθρακικού ασβεστίου σε υδατικά περιβάλλοντα μέσω της φωτοσύνθεσης. Αυτό πραγματοποιείται μέσω ανταλλαγής όξινων ανθρακικών, διττανθρακικών ιόντων και υδροξυλιόντων σε ολόκληρη την έκταση της κυτταρικής μεμβράνης, με αποτέλεσμα την αύξηση του pH του εξωκυτταρικού μικρο-περιβάλλοντος. Τα ιόντα ασβεστίου εισέρχονται στα κύτταρα μέσω ενός πρωτεϊνικού φορέα, ενώ το διοξείδιο του άνθρακα εισέρχεται είτε μέσω αυτού του φορέα είτε μέσω διάχυσης. Το διοξείδιο του άνθρακα που δεσμεύεται από το περιβάλλον μέσω της καταλυόμενης από την καρβονική ανυδράση υδρόλυσής του, χρησιμοποιείται για τη σύνθεση οργανικών ενώσεων, κυρίως με τη μορφή διττανθρακικών ιόντων λόγω των υψηλών τιμών pH που επικρατούν,

$(CO_2 + H_2O \xrightarrow{\text{Καρβονική ανυδράση}} CO_3^{2-} + 2H^+)$  που σε συνδυασμό με τη παρουσία περίσσειας ιόντων ασβεστίου οδηγεί στο σχηματισμό ανθρακικού ασβεστίου, με ταυτόχρονη παραγωγή

διοξειδίου του άνθρακα, σύμφωνα με την αντίδραση  $Ca^{2+} + 2CO_3^{2-} + H_2O \xrightarrow{\text{Καρβονική ανυδράση}} CaCO_3 + CO_2 + 2OH^-$ , ανατροφοδοτώντας με αυτό τον τρόπο τη διαδικασία σχηματισμού οργανικών ενώσεων, καθώς και την παραγωγή υδροξυλιόντων που απελευθερώνονται στο εξωκυτταρικό περιβάλλον με αποτέλεσμα τη δημιουργία αλκαλικών συνθηκών (Castro-Alonso et al., 2019).

### 1.6.2.3 Αμμωνιοποίηση αμινοξέων

Η οξειδωτική αμμωνιοποίηση των αμινοξέων που περιγράφεται από την αντίδραση  $Amino\ acids + O_2 \rightarrow NH_3 + CO_2 + H_2O$ , συντελεί στο σχηματισμό αμμωνίας, η υδρόλυση της οποίας οδηγεί στη παραγωγή αμμωνιακών ιόντων και υδροξυλιόντων, τα οποία αυξάνουν το pH και την αλκαλικότητα του μικρο-περιβάλλοντος γύρω από τα κύτταρα σύμφωνα με την

αντίδραση,  $\text{NH}_3 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{NH}_4^+ + \text{OH}^-$ , καθώς και σε διοξείδιο του άνθρακα, το οποίο σε υδατικό περιβάλλον διαλύεται και μετατρέπεται είτε σε όξινα ανθρακικά ( $\text{HCO}_3^-$ ), είτε σε διττανθρακικά ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) ιόντα σε υψηλές τιμές pH (Castro-Alonso et al., 2019). Η παρουσία ιόντων ασβεστίου και αλκαλικού περιβάλλοντος σε συνδυασμό με τη συσσώρευση όξινων ανθρακικών ιόντων, ευνοούν τον σχηματισμό ανθρακικού ασβεστίου  $\text{Ca}^{2+} + \text{CO}_3^{2-} \rightarrow \text{CaCO}_3$ , κυρίως με τη μορφή βατερίτη και ασβεσίτη, μέσω ετερογενούς τους συσσώρευσης στα κυτταρικά τοιχώματα των βακτηρίων και στις εξωκυτταρικές πολυμερικές ουσίες των βιοφίλμ. Τόσο η μορφολογία, όσο και η ποσότητα των σχηματιζόμενων κρυστάλλων ανθρακικού ασβεστίου, διαφέρουν ανάλογα το είδος βακτηρίου και τον τύπο του λίθινου υποστρώματος (Marvasi et al., 2020).

Τα βακτήρια του γένους *Mycococcus* και πιο συγκεκριμένα το είδος *Mycococcus xanthus*, πρόκειται για αρνητικά κατά Gram, μη παθογόνα, ετερότροφα βακτήρια που έχουν την ικανότητα αξιοποίησης των αμινοξέων ως μοναδική πηγή ενέργειας, αποτελώντας τους κυρίαρχους μικροοργανισμούς παραγωγής ανθρακικού ασβεστίου, μέσω της μεταβολικής οδού αμμωνιοποίησης των αμινοξέων (Jroundi et al., 2010).

#### 1.6.2.4 Απονιτροποίηση

Υπό αναερόβιες συνθήκες, το παραγόμενο από τους μικροοργανισμούς νιτρικό οξύ χρησιμοποιείται για την οξειδωση οργανικών ενώσεων, οι οποίες με τη σειρά τους παρέχουν την απαιτούμενη ενέργεια για την κυτταρική ανάπτυξη (Zhang et al., 2019). Τα απονιτροποιητικά βακτήρια που μειώνουν τη συγκέντρωση των νιτρικών αλάτων, είναι συνήθως προαιρετικά αναερόβια, γεγονός που τους παρέχει ευελιξία στο μηχανισμό ανάπτυξής τους. Με αυτό τον τρόπο, η διαδικασία της απονιτροποίησης αναμένεται να πραγματοποιηθεί παρουσία νιτρικών αλάτων και οργανικού άνθρακα με περιορισμένη διαθεσιμότητα οξυγόνου (Zhu et al., 2016). Κατά τη διαδικασία της απονιτροποίησης, η οξείδωση της οργανικής ύλης από το βακτηριακά παραγόμενο νιτρικό οξύ οδηγεί στη παραγωγή αέριου άζωτου, διοξειδίου του άνθρακα και υδροξυλιόντων που αυξάνουν το pH του εξωκυτταρικού περιβάλλοντος και σε συνδυασμό με την ταυτόχρονη κατανάλωση υδρογονοκατιόντων, δημιουργούν τις κατάλληλες αλκαλικές συνθήκες, στις οποίες παρουσία περίσσειας ιόντων ασβεστίου πραγματοποιείται η εναπόθεση ανθρακικού ασβεστίου γύρω από τα κύτταρα (Castro-Alonso et al., 2019), σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση στην οποία θεωρείται η γλυκόζη ως πηγή οργανικής ύλης,  $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + \text{Ca}^{2+} 4\text{NO}_3^- + \text{H}^+ + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CaCO}_3 + 5\text{CO}_2 + 2\text{N}_2 + \text{OH}^- + 7\text{H}_2\text{O}$ . Κατά τη διάρκεια αυτής της διεργασίας παράγεται ως παραπροϊόν αέριο άζωτο ( $\text{N}_2$ ), το οποίο είναι αβλαβές, ωστόσο εγκυμονεί ο κίνδυνος συσσώρευσης των τοξικών νιτρικών και νιτρικών οξειδίων, εάν ανασταλεί η δράση οποιουδήποτε από τα τέσσερα διαφορετικά ένζυμα που εμπλέκονται στην κατάλυση της διεργασίας απονιτροποίησης (Zhu et al., 2016).

#### 1.6.2.5 Οξείδωση θειικών αλάτων

Σε αναερόβια περιβάλλοντα πλούσια σε οργανικές πηγές ενέργειας και περίσσειας ιόντων ασβεστίου, πραγματοποιείται εναπόθεση ανθρακικού ασβεστίου από βακτήρια που έχουν την ικανότητα ελάττωσης της συγκέντρωσης των θειικών αλάτων (Sulfate-reducing bacteria ή SRB), μέσω οξείδωσης τους σε θείο, καθώς και οξείδωσης των διαθέσιμων οργανικών ενώσεων σε διττανθρακικά ιόντα, με ταυτόχρονη αύξηση του pH λόγω παραγωγής υδροξυλιόντων. Αυτού του είδους τα βακτήρια, οδηγούν σε αύξηση των τοπικών συγκεντρώσεων ιόντων ασβεστίου, μέσω δέσμευσης τους από τις εξωκυτταρικές πολυμερικές ουσίες ή απευθείας εξαγωγής τους από τα ίδια τα κύτταρα. Η δημιουργία αλκαλικών συνθηκών σε συνδυασμό με τη συσσώρευση ανθρακικών ιόντων και ιόντων ασβεστίου, ευνοούν την εναπόθεση ανθρακικού ασβεστίου γύρω από τα κύτταρα (Zhu & Ditttrich, 2016). Χαρακτηριστικό παράδειγμα αυτής της μεταβολικής οδού σύνθεσης

ανθρακικού ασβεστίου, αποτελεί η διάλυση γύψου ( $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) που σχηματίζονται στις λίθινες επιφάνειες μνημείων που συντελεί στην οξείδωση των θειικών ιόντων σε θείο. Πιο συγκεκριμένα, τα ιόντα ασβεστίου που απελευθερώνονται κατά τη διάλυση του γύψου, αντιδρούν με το διαθέσιμο διοξείδιο του άνθρακα, υπό αλκαλικές συνθήκες που δημιουργούνται από την υδρόλυση του ανόργανου άνθρακα του διοξειδίου σε διττανθρακικά ιόντα, προωθώντας με αυτό τον τρόπο την εναπόθεση ανθρακικού ασβεστίου από τα βακτηριακά κύτταρα (Castro-Alonso et al., 2019), σύμφωνα με την συνολική αντίδραση,  $2\text{CaSO}_4 + \text{CO}_2 + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CaCO}_3 + 2\text{S} + 2\text{OH}^- + \text{Ca}^{2+} + \text{H}_2\text{O} + 3\text{O}_2$

### 1.6.2.6 Αναερόβια οξείδωση μεθανίου

Η αναερόβια οξείδωση του μεθανίου από βακτήρια προωθεί την εναπόθεση ανθρακικού ασβεστίου, σε αντίθεση με την αερόβια του οξείδωση, η οποία οδηγεί σε οξείδωση του διαθέσιμου ανόργανου άνθρακα σε ανθρακικά ιόντα, με αποτέλεσμα την αύξηση της οξύτητας του μικρο-περιβάλλοντος, λόγω παραγωγής υδρογονοκατιόντων. Κατά την αναερόβια οξείδωση, το δεσμευμένο από τα βακτήρια μεθάνιο ( $\text{CH}_4$ ) οξειδώνεται απευθείας σε διττανθρακικά ιόντα ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) και το παραγόμενο θειικό οξύ ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) σε όξινα θειούχα ιόντα ( $\text{HS}^-$ ). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, παρουσία περίσσειας ιόντων ασβεστίου ( $\text{Ca}^{2+}$ ), την εναπόθεση ανθρακικού ασβεστίου, με ταυτόχρονη παραγωγή ως παραπροϊόν της αντίδρασης υδρόθειο, το οποίο είναι τοξικό (Zhu & Dittrich, 2016), σύμφωνα με τη συνολική αντίδραση  $\text{Ca}^{2+} + \text{CH}_4 + \text{H}_2\text{SO}_4 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CaCO}_3 + \text{HS}^- + 3\text{H}^+ + 2\text{H}_2\text{O}$

Οι συνολικές αντιδράσεις και τα προϊόντα των διαφορετικών μεταβολικών δικτύων των μικροοργανισμών για την μικροβιακά επαγόμενη βιοορυκτοποίηση ανθρακικού ασβεστίου παρουσιάζονται αναλυτικά στην Εικόνα 45.

Μικροβιακές κατηγορίες	Μεταβολική διεργασία	Αντιδράσεις	Παραπροϊόντα
Κυανοβακτήρια Μικροφύκη	Φωτοσύνθεση	$2\text{HCO}_3^- + \text{Ca}^{2+} \rightarrow \text{CH}_2\text{O} + \text{CaCO}_3 + \text{O}_2$	$\text{O}_2$ $\text{CH}_2\text{O}$
Ουρεολυτικά βακτήρια	Ουρεόλυση	$\text{CO}(\text{NH}_2)_2 + 2\text{H}_2\text{O} + \text{Ca}^{2+} + \text{Cell} \rightarrow 2\text{NH}_4^+ + \text{Cell-CaCO}_3$	$\text{NH}_4^+$
Απονιτροποιητικά βακτήρια	Απονιτροποίηση	$\text{CH}_3\text{COO}^- + 2.6\text{H}^+ + 1.6\text{NO}_3^- \rightarrow 2\text{CO}_2 + 0.8\text{N}_2 + 2.8\text{H}_2\text{O}$ $\text{Ca}^{2+} + \text{CO}_2(\text{aq}) + 2\text{OH}^- \rightarrow \text{CaCO}_3(\text{s}) + \text{H}_2\text{O}$	Τέλεια αντίδραση: $\text{CO}_2 + \text{N}_2$ Ατελής αντίδραση: $\text{NO} + \text{N}_2\text{O}$
Βακτήρια γένους <i>Mycosoccus</i>	Αμμωνιοποίηση αμινοξέων	-	$\text{NH}_3$
Αποθειωτικά βακτήρια	Οξείδωση θειικών	$\text{SO}_4^{2-} + 2[\text{CH}_3\text{O}] + \text{OH}^- + \text{Ca}^{2+} \rightarrow \text{CaCO}_3 + \text{CO}_2 + 2\text{H}_2\text{O} + \text{HS}^-$	$\text{CO}_2$ $\text{HS}^-$
Μεθανογόνα	Οξείδωση μεθανίου	Αναερόβια οξείδωση: $\text{CH}_4 + \text{SO}_4^{2-} + \text{Ca}^{2+} \rightarrow \text{CaCO}_3 + \text{H}_2\text{S} + \text{H}_2\text{O}$ Αερόβια οξείδωση: $\text{CH}_4 + 2\text{O}_2 \rightarrow \text{CO}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$	$\text{H}_2\text{S}$

**Εικόνα 45:** Αντιδράσεις και παραπροϊόντα των διαφορετικών μεταβολικών δικτύων της μικροβιακά επαγόμενης βιοορυκτοποίησης ανθρακικού ασβεστίου (Zhu & Dittrich, 2016).

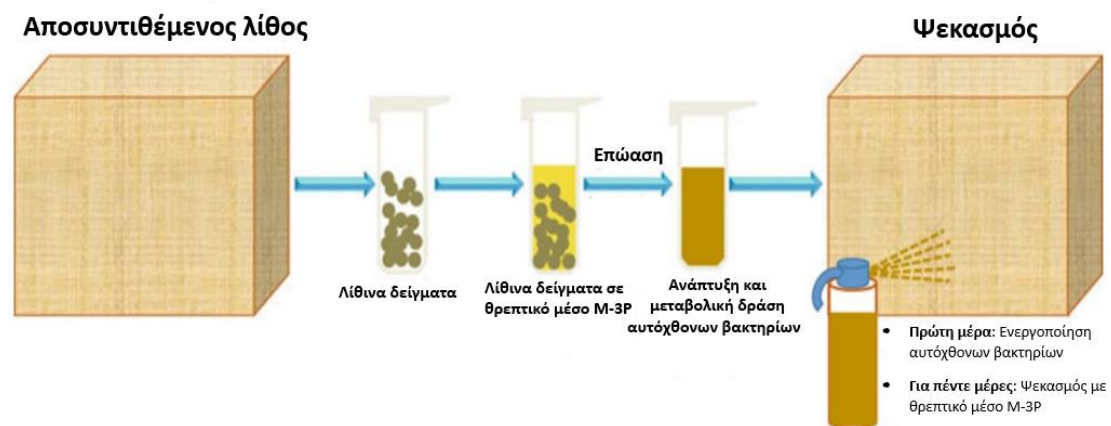
### 1.6.3 Περιορισμοί της μικροβιακά επαγόμενης βιοορυκτοποίησης ανθρακικού ασβεστίου

Κύριος σκοπός των πρακτικών της μικροβιακά επαγόμενης βιοορυκτοποίησης ανθρακικού ασβεστίου αποτελεί η απομόνωση και η επιλογή των κατάλληλων αυτόχθονων βακτηρίων από τις λίθινες επιφάνειες μνημείων με σκοπό την κατευθυνόμενη εναπόθεση ανθρακικού ασβεστίου μέσω ουρεόλυσης για την αποκατάστασή τους (Vaskevicius et al., 2023). Παρά τις ωφέλιμες επιδράσεις των στρατηγικών της μικροβιακά επαγόμενης βιοορυκτοποίησης στη συντήρηση των μνημείων, έγκεινται ορισμένοι περιορισμοί που απαιτούν άμεση ρύθμιση προκειμένου να καταστεί εφικτή η εφαρμογή αυτών των μεθόδων στα ίδια τα μνημεία (Jroundi et al., 2017).

Αρχικά, η βιοορυκτοποίηση ανθρακικού ασβεστίου δεν είναι απόλυτα φιλικές προς το περιβάλλον, καθώς κατά τη διαδικασία υδρόλυσης της ουρίας παράγεται ως τελικό προϊόν αμμωνία, η οποία σε υψηλές συγκεντρώσεις είναι τοξική και επικίνδυνη για την ανθρώπινη υγεία, το φυσικό περιβάλλον και τους αυτόχθονες μικροοργανισμούς. Επιπλέον, τα αμμωνιακά άλατα που περιέχονται στα λίθινα υποστρώματα ενδέχεται μέσω μεταβολικών διεργασιών να οξειδωθούν σε νιτρικό οξύ αντιδρά, το οποίο είναι εξαιρετικά διαβρωτικό και συμβάλλει στη διάλυση του υποστρώματος. Ένα ακόμη μειονέκτημα αποτελεί η αργή ταχύτητα και η υψηλή πολυπλοκότητα και ευαισθησία που χαρακτηρίζουν τη βιοορυκτοποίηση, καθώς εξαρτάται εξ ολοκλήρου από περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως η θερμοκρασία, το pH και η υγρασία που καθιστούν πρόκληση την εφαρμογή μικροβιακών τεχνολογιών σε ευρεία παγκόσμια κλίμακα. Τέλος, χρειάζεται να αντιμετωπιστούν οι οικονομικοί περιορισμοί όσο αναφορά τη χρήση πηγών θρεπτικών συστατικών υψηλής ποιότητας για την αποτελεσματική ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Ο υπερμεγέθης όγκος των αντιδραστηρίων και των βακτηριακών καλλιεργειών καθιστά τις μικροβιακές τεχνολογίες μια σημαντική οικονομική πρόκληση σε σύγκριση με τις συμβατικές μεθόδους συντήρησης. Για τους παραπάνω λόγους, απαιτούνται πρόσθετες έρευνες για την αποδοτική και οικονομική βελτιστοποίηση της κατευθυνόμενης από βακτήρια βιοορυκτοποίησης ανθρακικού ασβεστίου και μείωσης των ανεπιθύμητων παραπροϊόντων της, προκειμένου να καταστεί εφικτή η επί τόπου εφαρμογή της σε μνημεία (Nazel, 2016).

#### 1.6.4 Μελλοντικές προοπτικές της βιοορυκτοποίησης

Η αποτελεσματική αξιοποίηση των κατάλληλων ωφέλιμων βακτηρίων για τη βιοορυκτοποίηση ανθρακικού ασβεστίου στις λίθινες επιφάνειες μνημείων πραγματοποιείται μέσω δύο κύριων μεθόδων, κάθε μία με τα δικά της πλεονεκτήματα και περιορισμούς. Η πρώτη μέθοδος περιλαμβάνει τον απευθείας εμβολιασμό μέσω ψεκασμού των λίθινων επιφανειών με καλλιέργειες ωφέλιμων αυτόχθονων ή αλλόχθονων βακτηρίων (Εικόνα 46), ενώ η δεύτερη την ενίσχυση των αυτόχθονων βακτηριακών πληθυσμών ικανών να εναποθέσουν ανθρακικό ασβέστιο, μέσω επικάλυψης της λίθινης επιφάνειας με αποστειρωμένο διάλυμα θρεπτικών συστατικών που ευνοεί την ανάπτυξή τους (Joseph, 2021).



**Εικόνα 46:** Εφαρμογή της μικροβιακής οικολογικής μεθόδου αποκατάστασης λίθινων επιφανειών μνημείων μέσω βακτηριακού εμβολιασμού (Joseph, 2021).

Η δεύτερη μέθοδος ενίσχυσης της ανάπτυξης των ωφέλιμων αυτόχθονων βακτηρίων, διακρίνεται για την υψηλή αποτελεσματικότητά και την άμεση εφαρμογής της, αποτελώντας μια αποδοτική και συνάμα ευέλικτη πρακτική για τη συντήρηση των λίθινων

επιφανειών μνημείων. Βέβαια, σε περιπτώσεις ακραίας βιοδιάβρωσης προτιμάται η πρώτη μέθοδος του απευθείας εμβολιασμού βακτηρίων ικανών να εναποθέσουν ανθρακικό ασβέστιο στα λίθινα υποστρώματα (Jroundi et al., 2010).

Μια κρίσιμη προϋπόθεση για την αποτελεσματικότητα και των δύο αυτών μεθόδων αποτελεί η παρουσία βακτηριακών πληθυσμών ικανών να συνθέσουν επαρκείς ποσότητες ανθρακικού ασβεστίου. Ειδικότερα, πολυάριθμες μελέτες επιβεβαιώνουν την αφθονία αυτών των βακτηρίων στην πλειοψηφία των λίθινων υποστρωμάτων και φυσικών περιβαλλόντων, που συντελεί στην επιτυχία αυτών των πρακτικών *in situ*.

Ωστόσο, απαιτείται περαιτέρω έρευνα για τον καθορισμό της αποτελεσματικότητας αυτών των μικροβιακών τεχνολογιών για τη συντήρηση και την αποκατάσταση των λίθινων υποστρωμάτων, ιδιαίτερα σε ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες ξηρασίας και υγρασίας, όπως σε τροπικά, υποτροπικά και κρύα κλίματα. Τέλος, οι μελλοντικές έρευνες χρειάζεται να εστιάσουν στην ταυτοποίηση και τον ταξινομικό χαρακτηρισμό των μικροοργανισμών που αναπτύσσονται στις λίθινες επιφάνειες των μνημείων (Nazel, 2016).

## Κεφάλαιο 2: Μέθοδοι και Υλικά

### 2.1 Σημεία δειγματοληψίας ανά επιδεικτικό μνημείο

Δείγματα ελήφθησαν από:

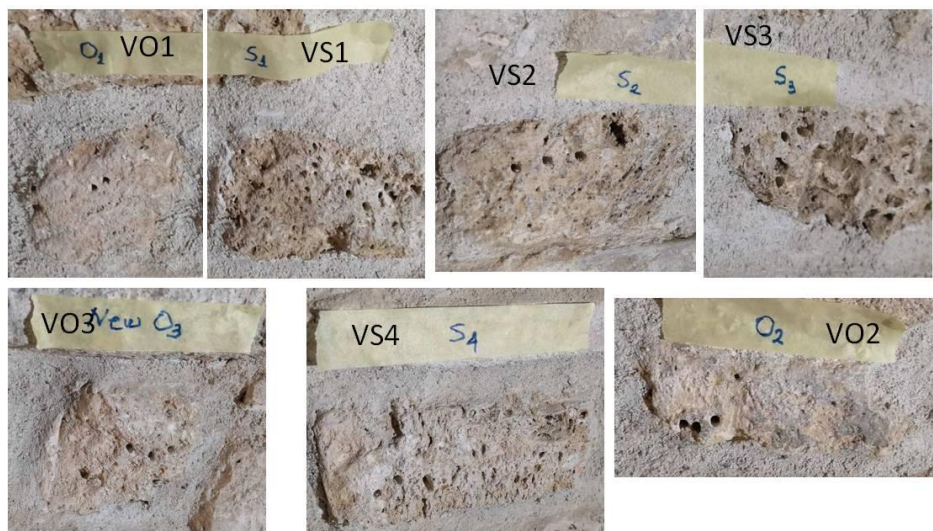
- Γλυπτά μνημεία στο Α΄ Νεκροταφείο Αθηνών, το οποίο αποτελεί μια υπαίθρια συλλογή γλυπτικής, αντιπροσωπευτικής του 19ου αιώνα στην Ελλάδα. Πιο συγκεκριμένα, λήφθηκαν δείγματα από την επιφάνεια των γλυπτών «Η Ωραία Κοιμωμένη» του Γ. Χαλεπά (φιλοτεχνήθηκε τη δεκαετία 1880) και η «Κοιμωμένη στον τάφο της Ευρυδικής Δελιγιάννη», που φιλοτεχνήθηκε από τον Ι. Βιτσάρη το 1883. Τα δύο αυτά μνημεία αποτελούν τυπικό παράδειγμα ανάγλυφων μαρμάρινων επιφανειών που εμφανίζουν μειωμένη περικρυσταλλική συνοχή στην επιφάνειά τους, λόγω της έκθεσής τους στα περιβαλλοντικά φορτία (περιβάλλον αστικής ρυπασμένης ατμόσφαιρας με ιδιαίτερο μικρόκλιμα λόγω βλάστησης). Στις Εικόνες 47 και 48 παρουσιάζονται τα σημεία δειγματοληψίας από το μνημείο Αφεντάκη και Δελιγιάννη, αντίστοιχα.
- Τον ιερό Ναό της Ιεράς Μονής της Παναγίας της Βαρνάκοβας, που είναι ένα από τα ιστορικότερα μοναστήρια της Ελλάδας και ιδρύθηκε κατά τη μεσοβυζαντινή περίοδο, το έτος 1077. Ανατινάχθηκε το 1826 και επανοικοδομήθηκε το 1831. Το 2020 ο Ιερός Ναός καταστράφηκε ολοσχερώς από πυρκαγιά και κατά την δειγματοληψία πραγματοποιούνταν εργασίες αποκατάστασης. Αποτελεί τυπικό παράδειγμα μνημείου που οι εξωτερικές του λίθινες όψεις παρουσιάζουν βιοδιάβρωση με επακόλουθη αισθητική υποβάθμιση, (περιβάλλον ήπιας ρυπασμένης ατμόσφαιρας). Στην Εικόνα 49 παρουσιάζονται τα σημεία δειγματοληψίας από την Ιερά Μονή Παναγίας Βαρνάκοβας
- Το Ευπαλίνειο όρυγμα, στο Πυθαγόρειο της Σάμου, που θεωρείται το σημαντικότερο τεχνικό έργο της αρχαίας Ελλάδας και περιλαμβάνεται στα μνημεία της Παγκόσμιας Πολιτιστικής Κληρονομιάς της UNESCO, ενώ πρόσφατα χαρακτηρίστηκε ως «Παγκόσμιο Σηραγγολογικό Τοπόσημο» από τη Διεθνή Ένωση Σηράγγων. Αποτελεί τυπικό παράδειγμα υπόγειας μνημειακής κατασκευής από λαξευμένο βράχο που βάλλεται από υγρασία (περιβάλλον ελεγχόμενου μικροκλίματος). Στην Εικόνα 50 παρουσιάζονται τα σημεία δειγματοληψίας από το Ευπαλίνειο Όρυγμα



**Εικόνα 47:** Σημεία δειγματοληψίας από το Μνημείο Αφεντάκη (Κοιμωμένη του Χαλεπά ), Α΄ Νεκροταφείο Αθηνών



**Εικόνα 48:** Σημεία δειγματοληψίας από το Μνημείο Δελιγιάννη (Κοιμωμένη του Βιτσάρη), Α' Νεκροταφείο Αθηνών



**Εικόνα 49:** Σημεία δειγματοληψίας από την Ιερά Μονή Παναγίας Βαρνάκοβας



**Εικόνα 50:** Σημεία δειγματοληψίας από το Ευπαλίνιο όρυγμα



Τα σημεία δειγματοληψίας επιλέχθηκαν έτσι ώστε να αντιπροσωπεύουν ένα ευρύ φάσμα διαφορετικών μοτίβων βιοδιάβρωσης (Πίνακας 1).

**Πίνακας 1:** Σημεία δειγματοληψίας από κάθε επιδεικτικό μνημείο, κωδικός δείγματος και τύπος φθοράς

Μνημείο/ Συντεταγμένες/ Υλικό	Κωδικός δείγματος βιολογικού ελέγχου	Τύπος φθοράς
Αφεντάκη 37°57'47"N 23°44'16"E Μάρμαρο	A1	Μαύρη κρούστα
	A2	Φαινομενικά υγιής επιφάνεια
	A3	Μαύρη βιοδιάβρωση, με μπεζ χροιά κατά τόπους & μειωμένη περικρυσταλλική συνοχή
	A4	Φαιοκάστανη κρούστα – περιοχή συγκέντρωσης όμβριων υδάτων
	A5	Έντονη μαύρη βιοδιάβρωση ομοιόμορφης μορφολογίας & μειωμένη περικρυσταλλική συνοχή
	A6	Μαύρη βιοδιάβρωση με μπεζ χροιά & μειωμένη περικρυσταλλική συνοχή
	A7	Μαύρη βιοδιάβρωση & μειωμένη περικρυσταλλική συνοχή
	A8	Μαύρη βιοδιάβρωση, με μορφολογία συσσωματωμάτων κατά τόπους & μειωμένη περικρυσταλλική συνοχή
Δελιγιάννη 37°57'47"N 23°44'16"E Μάρμαρο	Δ1	Μαύρη κρούστα
	Δ2	Μαύρη βιοδιάβρωση & μειωμένη περικρυσταλλική συνοχή
	Δ5	Φαιοκάστανη κρούστα
	Δ7	Φαινομενικά υγιής επιφάνεια
	Δ8	Έντονη μαύρη βιοδιάβρωση & μειωμένη περικρυσταλλική συνοχή
	Δ9	Πορτοκαλόχροα περιοχή & μειωμένη περικρυσταλλική συνοχή
Δ11	Έντονη μαύρη βιοδιάβρωση & μειωμένη περικρυσταλλική συνοχή	
Ευπαλίνειο Όρυγμα 37°41'40"N 26°55'50"E Συμπαγής ασβεστόλιθος	E1	Πράσινη βιοδιάβρωση, 910μ. από τη βόρεια είσοδο, δυτική παρειά
	E2	Περιοχή μαύρης διάβρωσης, 770μ. από τη βόρεια είσοδο, δυτική παρειά
	E3	Περιοχή λευκών αποθέσεων, 771μ. από τη βόρεια είσοδο, ανατολική παρειά
	E4	Περιοχή λευκών αποθέσεων, 614μ. από τη βόρεια είσοδο, ανατολική παρειά
	E5	Περιοχή ανακρυσταλλωμένου ασβεστίτη, πλούσια σε υγρασία, τμήμα λευκών υποπεριοχών, 607μ. από τη βόρεια είσοδο, ανατολική παρειά
	E6	Περιοχή ανακρυσταλλωμένου ασβεστίτη,

	E7	πλούσια σε υγρασία, γκρίζα ημιδιαφανούς απόχρωσης, 607μ. από τη βόρεια είσοδο, ανατολική παρειά Περιοχή βράχου (υποστρώματος) δίπλα από τον ανακρυσταλλωμένο ασβεστίτη, 607μ. από τη βόρεια είσοδο, ανατολική παρειά
Ιερά Μονή Παναγίας Βαρνάκοβας 38°47'29"N 21°96'48"E Πωρόλιθος	S1	Πωρόλιθος, σπογγοειδούς μορφολογίας
	S2	Πωρόλιθος, σπογγοειδούς μορφολογίας
	S3	Πωρόλιθος, σπογγοειδούς μορφολογίας
	S4	Πωρόλιθος, σπογγοειδούς μορφολογίας
	S5	Πωρόλιθος σπογγοειδούς μορφολογίας
	O1	Πωρόλιθος, νότια παρειά (η εσωτερική)
	O2	Πωρόλιθος, νότια παρειά (η εσωτερική)
	O3	Πωρόλιθος, νότια παρειά (η εσωτερική)
	O4	Πωρόλιθος, βόρεια παρειά εσωτερικής τοιχοποιίας

## 2.2 Διαδικασία δειγματοληψίας

Η δειγματοληψία πραγματοποιείται με αποστειρωμένους βαμβακοφόρους στείλους (swabs), εμποτισμένους σε αποστειρωμένο διάλυμα φυσιολογικού ορού στον οποίο έχει προστεθεί ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων (Phosphate Buffered Saline, PBS, pH=7.4). Οι βαμβακοφόροι στείλοι εφαρμόζονται στα προκαθορισμένα σημεία δειγματοληψίας (Εικόνα 51), τα οποία παρουσιάζουν διαφορετικά είδη διάβρωσης και βρίσκονται σε διαφορετικές εξωτερικές συνθήκες.



**Εικόνα 51:** Λήψη βιολογικού δείγματος μέσω της μεθόδου *swabbing* με χρήση αποστειρωμένου βαμβακοφόρου στείλου (*swab*), από περιοχή με εμφανή μαύρη και λευκή διάβρωση του αγάλματος “Κοιμωμένη του Χαλεπά” του μνημείου της Αφεντάκη στο Α΄ Νεκροταφείο Αθηνών.

### 2.3 Εκχύλιση μικροβιακού φορτίου

Ο βαμβακοφόρος στειλός (swab) που φέρει το μικροβιακό φορτίο, εμβαπτίζεται σε αποστειρωμένο διάλυμα PBS (pH=7.4) και γλυκερόλης 10% v/v, με σκοπό την αποθήκευση και τη μετέπειτα μεταφορά του στο εργαστήριο υπό συνθήκες ψύξης. Στο εργαστήριο ακολουθεί ανάδευση των δειγμάτων για 3 λεπτά σε vortex, προκειμένου να εκχυλιστούν οι μικροοργανισμοί και εν συνεχεία τα δείγματα αποθηκεύονται στους -80°C για περαιτέρω πειραματισμούς.

### 2.4 Θρεπτικά μέσα

Τα βιολογικά δείγματα επιστρώνονται σε τρυβλία Petri τα οποία περιέχουν τέσσερα διαφορετικά θρεπτικά μέσα (Nutrient agar, Reasoner's 2A (R2A) agar, Wort agar και Czapeck agar), η σύσταση των οποίων περιγράφεται αναλυτικά στους Πίνακες 2-5.

*Πίνακας 2: Σύσταση θρεπτικού μέσου Nutrient*

Θρεπτικό μέσο Nutrient	
Συστατικά	Συγκέντρωση (g/L)
Εκχύλισμα ζύμης (Yeast extract)	2.0
Πεπτόνη (Peptone)	8.0
Χλωριούχο νάτριο (NaCl)	5.0
Τελική τιμή pH (25°C) 6.8 ± 0.2	

*Πίνακας 3: Σύσταση θρεπτικού μέσου Wort*

Θρεπτικό μέσο Wort	
Συστατικά	Συγκέντρωση (g/L)
Εκχύλισμα βύνης (Malt extract)	15.0
Πεπτόνη (Peptone)	1.0
Μαλτόζη (Maltose)	12.5
Γλυκόζη (Glucose)	2.5
Όξινο φωσφορικό κάλιο (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	1.0
Χλωριούχο αμμώνιο (NH <sub>4</sub> Cl)	1.0
Τελική τιμή pH (25°C) 4.8 ± 0.2	

*Πίνακας 4: Σύσταση θρεπτικού μέσου Reasoner's 2A*

Θρεπτικό μέσο Reasoner's 2A	
Συστατικά	Συγκέντρωση (g/L)
Ενζυμικό υδρόλυμα καζεΐνης (Enzymatic Digest of Casein)	0.25
Πεπτόνη A (Enzymatic Digest of Animal Tissue)	0.25
Υδρόλυμα καζεΐνης όξινης υδρόλυσης (Acid Hydrolysate of Casein)	0.50
Εκχύλισμα ζύμης (Yeast extract)	0.50
Γλυκόζη (Glucose)	0.50
Διαλυτό άμυλο (Soluble Starch)	0.50

Όξινο φωσφορικό κάλιο ( $K_2HPO_4$ )	0.30
Επταένυδρο θειικό μαγνήσιο ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ )	0.05
Πυροσταφυλικό νάτριο ( $CH_3COONa$ )	0.30
<b>Τελική τιμή pH (25°C) 7.3 ± 0.2</b>	

**Πίνακας 5:** Σύσταση θρεπτικού μέσου Czapeck

<b>Θρεπτικό μέσο Czapeck</b>	
<b>Συστατικά</b>	<b>Συγκέντρωση (g/L)</b>
Σακχαρόζη (Sucrose)	30.0
Νιτρικό νάτριο ( $NaNO_3$ )	3.0
Όξινο φωσφορικό κάλιο ( $K_2HPO_4$ )	1.0
Θειικό μαγνήσιο ( $MgSO_4$ )	0.50
Χλωριούχο κάλιο (KCl)	0.50
Δισθενής θειικός σίδηρος ( $Fe SO_4$ )	0.01
<b>Τελική τιμή pH (25°C) 7.3 ± 0.2</b>	

Στη περίπτωση των στερεών καλλιεργειών προστίθεται στα θρεπτικά μέσα άγαρ σε συγκέντρωση 20 g/L. Στις περιπτώσεις των θρεπτικών μέσων Reasoner's 2A και Wort, εξαιτίας της περιεκτικότητάς τους σε γλυκόζη, καθώς και του θρεπτικού μέσου Czapeck, λόγω της περιεκτικότητάς του σε σακχαρόζη, η αποστείρωσή πραγματοποιείται στους 109 °C για 40 λεπτά, ενώ το θρεπτικό μέσο Nutrient αποστειρώνεται στους 121°C για 20 λεπτά (Dyda et al., 2018). Στη συνέχεια, υπό στείρες συνθήκες σε θάλαμο νηματικής ροής τα θρεπτικά μέσα επιστρώνονται σε τρυβλία Petri, τα οποία εμβολιάζονται με 0.01 mL από κάθε βιολογικό δείγμα. Οι στερεές καλλιέργειες πραγματοποιούνται εις διπλούν. Μετά τον εμβολιασμό τους, τα τρυβλία επωάζονται σε θάλαμο σταθερής θερμοκρασίας στους 28 °C για 48-96 ώρες. Με το πέρας της επώασης, σε κάθε θρεπτικό μέσο επιλέγονται μικροβιακές αποικίες που ανήκουν είτε σε βακτήρια, είτε σε μύκητες με βάση τις μορφολογικές/μακροσκοπικές διαφορές και τη σχετική πληθυσμιακή αφθονία του αριθμού μονάδων τους (CFU ή Colony Forming Unit) εντός του τρυβλίου, άνω του 1% των συνολικών CFUs. Η απομόνωση των μικροοργανισμών σε καθαρές καλλιέργειες πραγματοποιείται με τη μέθοδο των παραλλήλων γραμμών (Streaking) σε τρυβλία Petri με στερεό θρεπτικό υπόστρωμα του εκάστοτε μέσου από το οποίο απομονώθηκε ο κάθε μικροοργανισμός. Τέλος, οι καθαρές πλέον μικροβιακές αποικίες των απομονωθέντων μικροοργανισμών αποθηκεύονται σε διάλυμα γλυκερόλης 10% v/v στην υπέρ-κατάψυξη στους -80°C για μετέπειτα ανάλυση.

## 2.5 Ανάπτυξη βακτηρίων σε βυθισμένες (υγρές) καλλιέργειες

Το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιείται για την ανάπτυξη των επιλεγμένων βακτηρίων σε υγρές καλλιέργειες είναι το Nutrient Broth (Πίνακας 2). Οι καλλιέργειες πραγματοποιούνται σε κωνικές φιάλες τύπου Erlenmeyer. Η αναλογία όγκου καλλιέργειας προς τον συνολικό όγκο της φιάλης διατηρείται στο 1/5 (v/v) προκειμένου να εξασφαλίζεται ο ικανοποιητικός αερισμός της. Το θρεπτικό μέσο αποστειρώνεται στους 121°C για 20 λεπτά. Ο εμβολιασμός των καλλιεργειών πραγματοποιείται υπό στείρες συνθήκες σε θάλαμο νηματικής ροής, με 1% (v/v) προκαλλιέργειας στο ίδιο θρεπτικό μέσο. Οι φιάλες τοποθετούνται σε αναδεδυμένο θερμοστατούμενο επωαστήριο που λειτουργεί με ταχύτητα ανάδευσης 150 rpm, σε θερμοκρασία 28°C. Ανά τακτά χρονικά διαστήματα λαμβάνεται δείγμα και μετράται η οπτική πυκνότητα και το pH της καλλιέργειας. Οι υγρές καλλιέργειες και οι μετρήσεις τους

για κάθε βακτήριο πραγματοποιούνται εις διπλούν (καμπύλες χρονικής ανάπτυξης συναρτήσει της οπτικής πυκνότητας).

## 2.6 Μέτρηση οπτικής πυκνότητας

Η μέτρηση της οπτικής πυκνότητας πραγματοποιείται με τη χρήση φασματοφωτομέτρου σε μήκος κύματος 600 nm, έπειτα από κατάλληλη αραιώση του δείγματος καλλιέργειας με απιονισμένο νερό.

## 2.7 Καμπύλες αναφοράς βακτηρίων

Για τις καμπύλες αναφοράς των βακτηρίων πραγματοποιείται διήθηση όγκου καλλιέργειας 5 και 10 mL σε προζυγισμένα και ξηρά φίλτρα μεγέθους πόρων 0.45 μm. Ακολουθεί έκπλυση με απιονισμένο νερό και τα φίλτρα τοποθετούνται για ξήρανση στους 90°C μέχρι σταθερού βάρους με σκοπό τον υπολογισμό της συγκέντρωσης ξηρής κυτταρικής μάζας (Dry Cell Weight/L ή DCW/L) της καλλιέργειας. Η διαδικασία πραγματοποιείται εις τριπλούν. Επιπλέον από το ίδιο δείγμα της καλλιέργειας πραγματοποιούνται αραιώσεις και μετράται η οπτική πυκνότητα στα 600 nm (μέγιστη τιμή οπτικής πυκνότητας 0.5). Οι καμπύλες αναφοράς όλων των εξετασθέντων βακτηρίων παρουσιάζονται στο Παράρτημα Ι.

## 2.8 Αλληλούχηση γενετικών δεικτών και ταυτοποίηση απομονωμένων μικροοργανισμών

Οι απομονωμένοι μικροοργανισμοί μεταφέρονται σε αποστειρωμένα Eppendorf και πραγματοποιείται εκχύλιση του DNA τους με τη χρήση κιτ απομόνωσης DNA από δείγματα εδάφους (Macherey-Nagel NucleoSpin® Soil Genomic DNA Isolation kit), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η συγκέντρωση και η ποιότητα του ανακτηθέντος DNA προσδιορίζεται με φασματοφωτόμετρο Thermo Scientific™ NanoDrop™ και επιβεβαιώνεται με ηλεκτροφόρηση. Η αλυσωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας 1-5 μL εκχυλίσματος DNA σε τελικό όγκο μίγματος PCR 25 μL, συμπεριλαμβανομένης της Kara HiFi Taq (Kara Biosystems, UK) πολυμεράσης. Η ενίσχυση των μικροβιακών στελεχών μέσω της PCR πραγματοποιείται με τη χρήση εκκινητών ειδικών για βακτήρια που ενισχύουν ολόκληρο το γονίδιο 16S rRNA και την V3-V4 υπερμεταβλητή περιοχή του γονιδίου 16S rRNA, όταν η πρώτη ενίσχυση δεν παρέχει ορατές ζώνες.

Τα στελέχη που δεν ενισχύονται θεωρείται ότι είναι μύκητες, επομένως χρησιμοποιούνται ειδικοί εκκινητές για μύκητες που στοχεύουν τον εσωτερικό μεταγραφόμενο διαχωριστή (Internal Transcribed Spacer, ITS) για την επακόλουθη PCR. Οι εκκινητές που χρησιμοποιούνται και οι αντίστοιχες συνθήκες PCR παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.

Τα προϊόντα της PCR οπτικοποιούνται σε πήκτωμα αγαρόζης 1% υπό υπεριώδες φως. Εκείνα με θετικό σήμα ενίσχυσης καθαρίζονται περαιτέρω χρησιμοποιώντας το κιτ καθαρισμού XS Gel και PCR Macherey-Nagel NucleoSpin® σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Τα δεδομένα αλληλούχησης των καθαρών προϊόντων PCR λαμβάνονται με την τεχνολογία Sanger. Όλες οι αναγνώσεις συγκρίνονται με τον αλγόριθμο BLAST έναντι της βάσης δεδομένων NCBI (National Center for Biotechnology Information) και ανακτώνται οι κοντινότεροι συγγενείς.

**Πίνακας 6: Εκκινητές και συνθήκες PCR**

Κωδικός εκκινητή	Αλληλουχία	Αναφορά	Στόχος	Συνθήκες PCR
27F 1492R	5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' 5'-TACCTTGTTACGACTT-3'	Frank et al. (2008)	Βακτήρια	Η PCR περιλαμβάνει αρχικό στάδιο μετουσίωσης διάρκειας 3 λεπτών στους 95°C, ακολουθούμενο από 30 κύκλους στους 95°C, για 30 δευτερόλεπτα, στους 60°C, για 30 δευτερόλεπτα, και επιμήκυνση στους 72°C για 2 λεπτά
Bakt_341F Bakt_805R	5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3' 5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3'	Herlemann et al. (2011)	Βακτήρια	Η PCR περιλαμβάνει αρχικό στάδιο μετουσίωσης διάρκειας 5 λεπτών στους 95°C, ακολουθούμενο από 35 κύκλους στους 95°C, για 30 δευτερόλεπτα, στους 50°C, για 30 δευτερόλεπτα, και επιμήκυνση στους 72°C για 1 λεπτό
18S ITS1 28S ITS2	5'-GTCCTGCCCTTTGTA-3' 5'-CCTGGTGGTTTCTTTCC-3'	Pantou et al. (2005)	Μύκητες	Η PCR περιλαμβάνει αρχικό στάδιο μετουσίωσης διάρκειας 5 λεπτών στους 95°C, ακολουθούμενο από 35 κύκλους στους 94°C, για 30 δευτερόλεπτα, στους 48°C, για 45 δευτερόλεπτα, και επιμήκυνση στους 72°C για 2 λεπτά

Η αλληλούχιση και η ταυτοποίηση των μικροοργανισμών που εντοπίζονται στις λίθινες και μαρμάρινες επιφάνειες των επιδεικτικών μνημείων, πραγματοποιήθηκαν σε συνεργασία με τον Επίκουρο Καθηγητή Σάββα Γενίτσαρη του Βιολογικού Τμήματος του Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (ΕΚΠΑ).

### 2.9 Έλεγχος ουρεολυτικής δράσης των βακτηρίων

Ο ποιοτικός έλεγχος της ουρεολυτικής δράσης των βακτηρίων πραγματοποιείται με βάση το πρωτόκολλο των Reeksting et al., (2020). Το πρωτόκολλο αυτό βασίζεται στην αξιολόγηση της ικανότητας των βακτηρίων να παράγουν και να αξιοποιούν το ένζυμο ουρεάση στο θρεπτικό μέσο Urease Test Broth για τη διάσπαση της περιεχόμενης ουρίας και την απελευθέρωση αμμωνίας. Ο ποιοτικός έλεγχος του ρυθμού αυτής της αντίδρασης πραγματοποιείται μέσω παρατήρησης της μεταβολής του χρώματος του προστιθέμενου δείκτη κόκκινου της φαινόλης από κίτρινο/πορτοκαλί σε μωβ ανάλογα την τιμή του pH.

Για τον προσδιορισμό της ουρεολυτικής δράσης των βακτηρίων πραγματοποιούνται στερεές (τρυβλία Petri με άγαρ) και υγρές (δοκιμαστικοί σωλήνες) καλλιέργειες με και χωρίς

την προσθήκη ουρίας, στο προαναφερθέν θρεπτικό μέσο, του οποίου η σύσταση παρουσιάζεται στον Πίνακα 7.

**Πίνακας 7:** Σύσταση θρεπτικού μέσου για τον έλεγχο της ουρεολυτικής δράσης των βακτηρίων

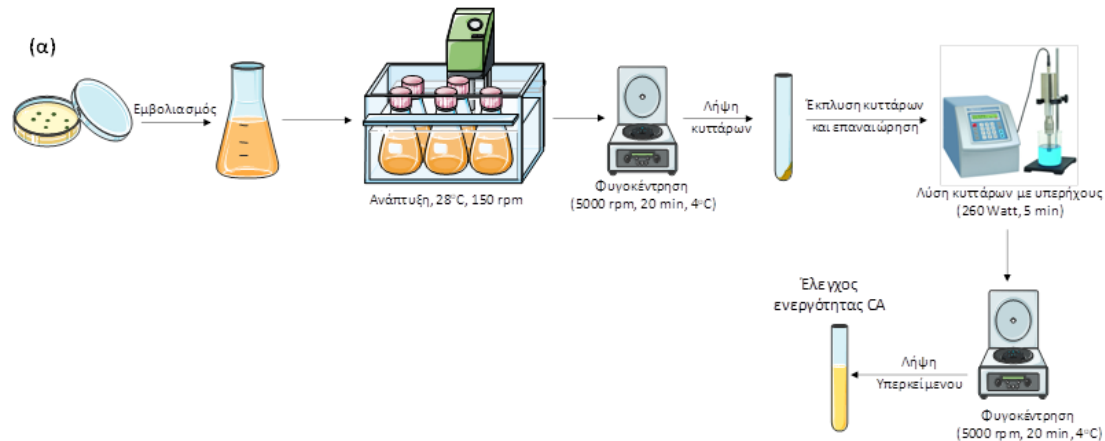
Συστατικά	Συγκέντρωση (g/L)
Εκχύλισμα ζύμης (Yeast extract)	0.10
Ουρία (Urea)	20.0
Κόκκινο της φαινόλης (Phenol Red)	0.01
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Δισόξινο φωσφορικό κάλιο)	0.10
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Όξινο φωσφορικό νάτριο)	0.10
<b>Τελική τιμή pH 6.8 ± 0.2</b>	

Στη περίπτωση των στερεών καλλιεργειών προστίθεται στο θρεπτικό μέσο άγαρ σε συγκέντρωση 20 g/L. Το μέσο ελέγχου της ουρεολυτικής δράσης (Πίνακας 6), πλην της ουρίας, αποστειρώνεται στους 121°C για 20 λεπτά, καθώς η ανάπτυξη υψηλών θερμοκρασιών οδηγεί στην υδρόλυσή της. Η ουρία αποστειρώνεται χωριστά από τα υπόλοιπα συστατικά του μέσου, μέσω σύριγγας στην οποία εφαρμόζονται φίλτρα μεγέθους πόρων 0.22 mm, για την κατακράτηση ακαθαρσιών, μικροβιακών κυττάρων και την αποφυγή επιμολύνσεων. Υπό στείρες συνθήκες, σε θάλαμο νηματικής ροής πραγματοποιείται η ανάμιξη των συστατικών του μέσου.

Για τις στερεές καλλιέργειες το θρεπτικό μέσο επιστρώνεται σε τρυβλία Petri, τα οποία εμβολιάζονται στο κέντρο με 0.015 mL κυτταρικού αιωρήματος καλλιέργειας του εκάστοτε βακτηρίου στο μέσο Nutrient Broth. Στη περίπτωση των υγρών καλλιεργειών, 2 mL του θρεπτικού μέσου τοποθετούνται σε αποστειρωμένους δοκιμαστικούς σωλήνες και εμβολιάζονται με 0.1 mL κυτταρικού αιωρήματος. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες επικαλύπτονται με ειδικά βαμβάκια, τα οποία επιτρέπουν την είσοδο φιλτραρισμένου αέρα, εξασφαλίζοντας τη διατήρηση στείρων συνθηκών. Τόσο στη περίπτωση των υγρών, όσο και των στερεών καλλιεργειών πραγματοποιούνται τριπλές επαναλήψεις, με και χωρίς τη παρουσία ουρίας στο θρεπτικό μέσο. Τα τρυβλία επωάζονται σε θάλαμο σταθερής θερμοκρασίας στους 28 °C για 48 ώρες, ενώ οι δοκιμαστικοί σωλήνες επωάζονται σε αναδεδυμένο θερμοστατούμενο επωαστήρα που λειτουργεί με ταχύτητα ανάδευσης 160 rpm, σε θερμοκρασία 28°C για 48 ώρες. Τέλος, κάθε 24 ώρες πραγματοποιείται λήψη φωτογραφίας για τον έλεγχο της μεταβολής του χρώματος του θρεπτικού μέσου (Reeksting et al., 2020).

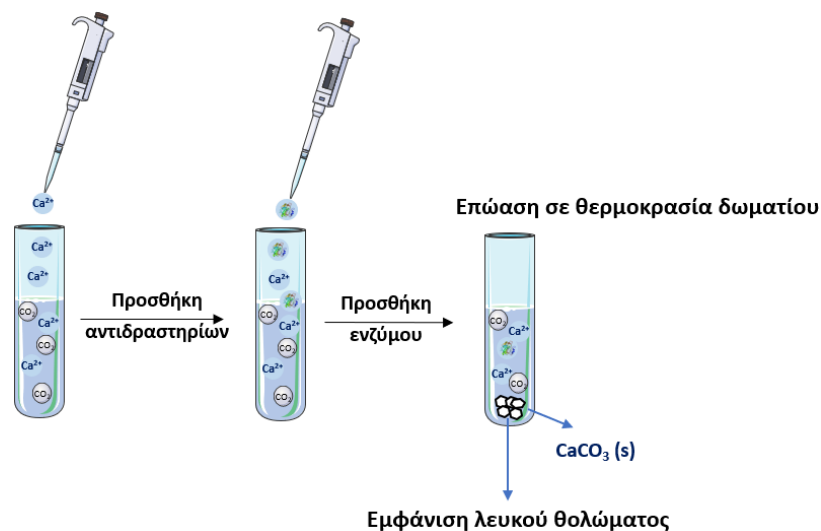
## 2.10 Προσδιορισμός ενεργότητας του ενζύμου καρβονική ανυδράση των βακτηρίων

Η διαδικασία περιλαμβάνει την ανάπτυξη των βακτηρίων σε υγρές καλλιέργειες, τη λήψη με φυγοκέντριση (5000 rpm, 4°C, 20 λεπτά) των κυττάρων, έκπλυση αυτών με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 50 mM, pH=7.5, επανάληψη φυγοκέντρισης (5000 rpm, 4°C, 20 λεπτά) για τη λήψη των κυττάρων και επαναιώρηση αυτών στο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 50 mM, pH=7.5. Έπειτα, τα κύτταρα υποβάλλονται σε λύση με τη χρήση υπερήχων (συνολικός χρόνος 5 λεπτά σε κύκλους 30 δευτερολέπτων, με ισχύ 260 Watt), ακολουθεί φυγοκέντριση και λήψη του υπερκευμένου υγρού, στο οποίο προσδιορίζεται η ενεργότητα της καρβονικής ανυδράσης και το πρωτεϊνικό περιεχόμενο (Σχήμα 2).



**Σχήμα 2:** Διάγραμμα ροής εργασιών για τον προσδιορισμό της ενεργότητας της καρβονικής ανυδράσης

Η μελέτη ενεργότητας της καρβονικής ανυδράσης πραγματοποιείται σύμφωνα με τη μέθοδο των Giri et al., (2018). Αρχικά, προετοιμάζεται κορεσμένο υδατικό διάλυμα διοξειδίου του άνθρακα, μέσω συνεχούς τροφοδότησης σε 400 mL απιονισμένου νερού, αέριου διοξειδίου του άνθρακα από εμπορική φιάλη υπό πίεση 1.4 bar για 5 ώρες, με χρήση ειδικής διάταξης που τοποθετείται εντός ξηρού πάγου καθόλη τη διάρκεια της διαδικασίας και την παρουσία πλυντρίδας για την εκτόνωση της πίεσης του συστήματος. Στη συνέχεια, σε δοκιμαστικούς σωλήνες προετοιμάζεται το μείγμα της αντίδρασης, με την προσθήκη 920 μl διαλύματος 2% w/v  $\text{CaCl}_2$ , 80 μl Tris HCl buffer (1 M, pH=8), 80 μl του υπερκειμένου υγρού λύσης των κυττάρων που αποτελεί πιθανή πηγή καρβονικής ανυδράσης και 920 μl κορεσμένου υδατικού διαλύματος διοξειδίου του άνθρακα. Ακολουθεί επικάλυψη των δοκιμαστικών σωλήνων με Parafilm. Ως τυφλό δείγμα της αντίδρασης, το υπερκείμενο υγρό λύσης των κυττάρων αντικαθίσταται με ίση ποσότητα του ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών λύσης των κυττάρων (phosphate buffer, 50 mM, pH=7.5). Η αντίδραση πραγματοποιείται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος 20 °C για 30 λεπτά. Για κάθε βακτήριο τα πειράματα πραγματοποιούνται εις τριπλούν και λαμβάνεται ο μέσος όρος των αποτελεσμάτων στη κάθε περίπτωση (Σχήμα 3).



**Σχήμα 3:** Πειραματική διαδικασία προσδιορισμού της ενεργότητας της καρβονικής ανυδράσης των βακτηρίων



Τέλος, ακολουθεί μέτρηση της θολερότητας των δειγμάτων στα 600 nm έναντι του τυφλού δείγματος (Εικόνα 52). Η ποσότητα του παραγόμενου  $\text{CaCO}_3$  προσδιορίζεται με χρήση της κατάλληλης καμπύλης αναφοράς (Διάγραμμα 31) (Prabhu et al., 2011) (Η καμπύλη αναφοράς παρουσιάζεται στο παράρτημα Ι). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως mg παραγόμενου  $\text{CaCO}_3/\text{mg}$  πρωτεΐνης/min.



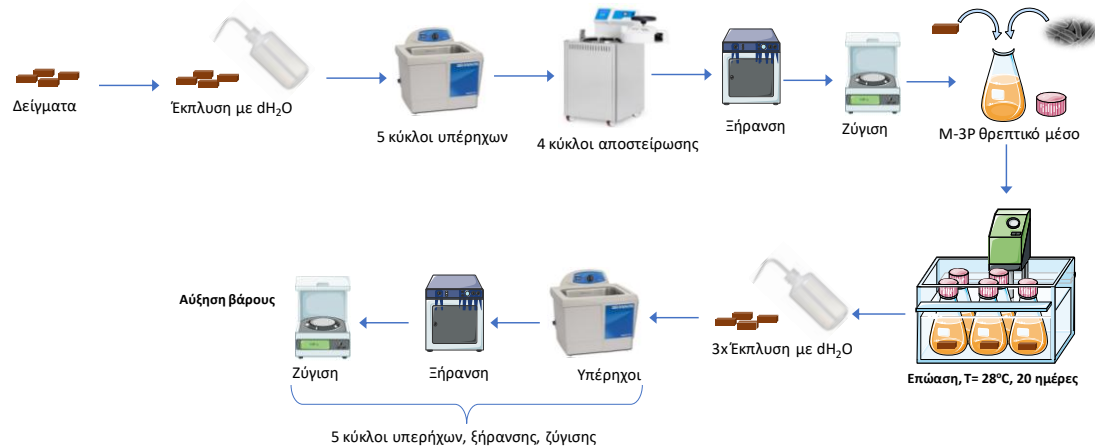
**Εικόνα 52:** Σχηματισμός ανθρακικού ασβεστίου με τη δράση του ενζύμου καρβονική ανυδράση. Αριστερά παρουσιάζεται το τυφλό δείγμα της αντίδρασης και δεξιά το αποτέλεσμα της δράσης του ενζύμου καρβονική ανυδράση.

### 2.11 Προσδιορισμός πρωτεΐνης

Ο προσδιορισμός της πρωτεΐνης πραγματοποιείται με τη μέθοδο Bradford (Bradford, 1976). Για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς χρησιμοποιείται αλβουμίνη βόειου ορού (Bovine Serum Albumin, BSA).

### 2.12 Διαδικασία ανάπτυξης ωφέλιμων μικροοργανισμών σε δείγματα λίθινων επιφανειών των επιδεικτικών μνημείων

Η διαδικασία ανάπτυξης ωφέλιμων μικροοργανισμών σε δείγματα λίθινων επιφανειών των επιδεικτικών μνημείων πραγματοποιείται σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Rodriguez-Navarro et al., (2003). Τα επιμέρους βήματα της διαδικασίας παρουσιάζονται στο Σχήμα 4.



**Σχήμα 4:** Διάγραμμα ροής πειραματικής διαδικασίας ανάπτυξης των ωφέλιμων βακτηρίων σε δείγματα των λίθινων επιφανειών των επιδεικτικών μνημείων, στην κλίμακα του εργαστηρίου

#### 2.12.1 Χειρισμός δειγμάτων πέτρας από τις λίθινες επιφάνειες των επιδεικτικών μνημείων

Τα δείγματα λίθινων επιφανειών που λαμβάνονται από τα επιδεικτικά μνημεία έχουν αρχικά βάρη που κυμαίνονται από 11-19 g για τα δείγματα από το Ευπαλίνιο Όρυγμα

(συμπαγής ασβεστόλιθος), 10-15 g των δειγμάτων από την Ιερά Μονή Παναγίας Βαρνάκοβας (πωρόλιθος) και 37-42 g για τα δείγματα από το Α΄ Νεκροταφείο Αθηνών (μάρμαρο). Αρχικά, τα δείγματα εκπλένονται με απιονισμένο νερό. Στη συνέχεια, τοποθετούνται σε απιονισμένο νερό και κατεργάζονται σε λουτρό υπερήχων (50 kHz) για διάστημα 5 λεπτών. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται 5 διαδοχικές φορές για κάθε δείγμα. Η κατεργασία των δειγμάτων με υπερήχους στοχεύει στην απομάκρυνση της σαθρής ύλης. Ακολουθεί αποστείρωση των δειγμάτων για 1 ώρα στους 100°C, συνολικά 4 φορές σε διάστημα 4 ημερών. Έπειτα, τα δείγματα τοποθετούνται για ξήρανση στους 37°C σε σκοτεινό και προστατευμένο από τη σκόνη μέρος και τέλος ζυγίζονται σε ζυγό ακριβείας.

### 2.12.2 Ανάπτυξη ωφέλιμων βακτηρίων στα δείγματα λίθινων επιφανειών των επιδεικτικών μνημείων

Επιλέχθηκαν βακτήρια που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα εναπόθεσης ανθρακικού ασβεστίου στα δείγματα λίθινων επιφανειών των επιδεικτικών μνημείων. Αρχικά, απαιτείται προετοιμασία του βακτηριακού εμβολίου σε προκαλλιέργειες του θρεπτικού μέσου CT (Bacto Casitone 1% w/v, MgSO<sub>4</sub> ·7H<sub>2</sub>O 0.1% w/v σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 10 mM με pH 6.5). Η επιθυμητή κυτταρική συγκέντρωση για τον εμβολιασμό των δειγμάτων πέτρας είναι 2·10<sup>9</sup> κύτταρα/ml. Οι προκαλλιέργειες πραγματοποιούνται σε κωνικές φιάλες τύπου Erlenmeyer όγκου 250 mL. Η αναλογία όγκου καλλιέργειας προς τον συνολικό όγκο της φιάλης διατηρείται στο 1/5 (v/v) προκειμένου να εξασφαλίζεται ικανοποιητικός αερισμός της καλλιέργειας. Το θρεπτικό μέσο αποστειρώνεται στους 121°C για 20 λεπτά. Ο εμβολιασμός των προκαλλιεργιών πραγματοποιείται σε θάλαμο νηματικής ροής, χρησιμοποιώντας 0.1 mL των αποθηκευμένων βακτηρίων στους -80°C. Οι φιάλες τοποθετούνται σε αναδεδυμένο θερμοστατούμενο επωαστήρα που λειτουργεί με ταχύτητα ανάδευσης 150 rpm, σε θερμοκρασία 28°C για 48 ώρες.

Η ανάπτυξη των ωφέλιμων βακτηρίων στα δείγματα πέτρας πραγματοποιείται στο θρεπτικό μέσο M-3P (Bacto Casitone 1% w/v, Ca(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub> ·4H<sub>2</sub>O 1% w/v, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ·1/2H<sub>2</sub>O 0.2% w/v, σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 10 mM με pH 8.0). Το θρεπτικό μέσο, πλην του οξικού ασβεστίου Ca(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>, αποστειρώνεται στους 121°C για 20 λεπτά. Η προσθήκη του οξικού ασβεστίου στο αποστειρωμένο μέσο πραγματοποιείται με χρήση σύριγγας στην οποία εφαρμόζονται φίλτρα μεγέθους πόρων 0.22 μm, υπό στείρες συνθήκες. Σε κωνικές φιάλες τύπου Erlenmeyer όγκου 250 mL, τοποθετούνται τα δείγματα των λίθινων επιφανειών και προστίθενται 100 mL του θρεπτικού μέσου M-3P, ώστε να εξασφαλίζεται η πλήρης επικάλυψή τους. Στη συνέχεια, ακολουθεί εμβολιασμός με 2 mL της βακτηριακής προκαλλιέργειας. Έπειτα, οι φιάλες τοποθετούνται σε αναδεδυμένο θερμοστατούμενο επωαστήρα που λειτουργεί με ταχύτητα ανάδευσης 100 rpm, σε θερμοκρασία 28°C για 20 ημέρες (Εικόνα 53). Η ήπια ανάδευση εξυπηρετεί στην προσομοίωση των στάσιμων συνθηκών που επικρατούν στις επιφάνειες των μνημείων.



**Εικόνα 53:** Εναπόθεση CaCO<sub>3</sub> στα δείγματα λίθινων επιφανειών των επιδεικτικών μνημείων

Προκειμένου να αποφευχθεί η εξάτμιση της υγρής φάσης λόγω παρατεταμένης επώασης, μετά τις 10 μέρες επώασης τοποθετείται parafilm πάνω από το βαμβάκι που καλύπτει τις φιάλες. Τα πειράματα εναπόθεσης  $\text{CaCO}_3$  πραγματοποιούνται εις τριπλούν.

Ως δείγματα ελέγχου χρησιμοποιούνται τέσσερα ανά επιδεικτικό μνημείο, δείγματα των λίθινων επιφανειών. Δύο εξ αυτών τοποθετούνται στο θρεπτικό μέσο χωρίς να πραγματοποιείται εμβολιασμός με βακτήριο, ενώ τα υπόλοιπα δύο σε αποστειρωμένο απιονισμένο νερό (έλεγχος διαλυτότητας). Τα τυφλά δείγματα τοποθετούνται σε αναδευόμενο θερμοστατούμενο επωαστήρα που λειτουργεί με ταχύτητα ανάδευσης 100 rpm, σε θερμοκρασία 28°C για 20 ημέρες.

### **2.12.3 Εκτίμηση της εναπόθεσης ανθρακικού ασβεστίου στα δείγματα πέτρας**

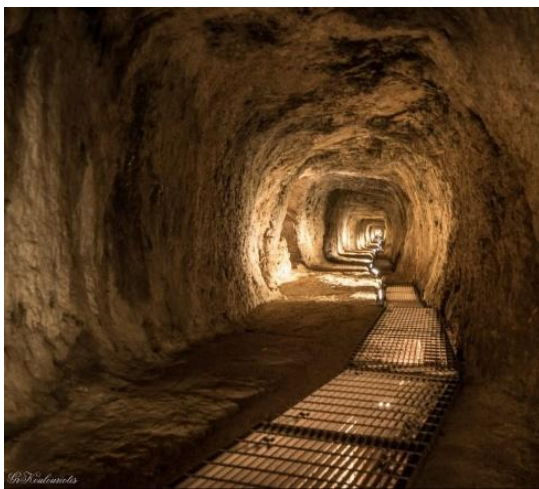
Με το πέρας των 20 ημερών ανακτώνται τα λίθινα δείγματα από το υγρό καλλιέργειας και μετράται το τελικό pH της. Στη συνέχεια, τα δείγματα εκπλένονται τρεις φορές με απιονισμένο νερό και έπειτα τοποθετούνται σε απιονισμένο νερό για κατεργασία σε λουτρό υπερήχων για 5 λεπτά σε ισχύ 50 kHz. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται πέντε διαδοχικές φορές για κάθε δείγμα. Τα δείγματα μετά από κάθε κύκλο κατεργασίας με υπερήχους τοποθετούνται για ξήρανση στους 80°C για 24 ώρες. Έπειτα από κάθε ξήρανση πραγματοποιείται ζύγιση των δειγμάτων. Τέλος, εκτιμάται η εναπόθεση ανθρακικού ασβεστίου στα δείγματα από τη διαφορά βάρους τους.

### Κεφάλαιο 3: Αποτελέσματα και Συζήτηση

#### **3.1 Απομόνωση μικροοργανισμών από τα σημεία δειγματοληψίας των επιδεικτικών μνημείων**

Συνολικά τέσσερα επιδεικτικά μνημεία επιλέγονται από τρεις περιοχές του Ελλαδικού χώρου που διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τις κλιματολογικές συνθήκες και την ποιότητα του αέρα, με σκοπό την μελέτη των αυτόχθονων μικροοργανισμών που αναπτύσσονται στις λίθινες επιφάνειες τους και την αξιολόγηση της αποκαταστατικής τους δράσης. Τα μνημεία αυτά είναι το Ευπαλίνιο όρυγμα στη Σάμο, η Ιερά Μονή Παναγίας Βαρνάκοβας στη Ναύπακτο και τα αγάλματα “Κοιμωμένη του Χαλεπά” και “Κοιμωμένη του Βισάρη” των ταφικών μνημείων της Αφεντάκη και της Δελιγιάννη αντίστοιχα, στο Α΄ Νεκροταφείο Αθηνών.

Το Ευπαλίνιο όρυγμα που βρίσκεται στο νησί της Σάμου, αποτελεί έργο απaráμιλλής αρχιτεκτονικής και μηχανικής ιδιοφυΐας του Ευπαλίνου που κατασκευάστηκε τον 6<sup>ο</sup> αιώνα π.χ., και πρόκειται για μια σήραγγα μήκους 1.036 μέτρων που χρησίμευε ως υδραγωγείο, σύμφωνα με τον Ηρόδοτο. Η σήραγγα του Ευπαλινείου θεωρείται το πρώτο υπόγειο έργο που κατασκευάστηκε και ευθυγραμμίστηκε με γεωμετρική προσέγγιση, καθώς το ιδιαίτερο χαρακτηριστικό της αποτελεί η ταυτόχρονη κατασκευή της από τις δύο πλευρές του βουνού (Εικόνα 54). Οι δύο σήραγγες συναντήθηκαν περίπου στο μέσον με αξιοθαύμαστη ακρίβεια, κάτι που ήταν σημαντικό επίτευγμα για τα τεχνολογικά δεδομένα της εποχής. Εξαιτίας της σπηλαιώδους φύσης του Ευπαλινείου και της γεωγραφικής του τοποθεσίας στο Αιγαίο πέλαγος, αναμένεται ο σχηματισμός και η ανάπτυξη επιλιθικών βιοφίλμ στις λίθινες επιφάνειες του, για την επιβίωση των μικροοργανισμών απέναντι στις επικρατούσες συνθήκες υψηλής αλατότητας και περιορισμένης ηλιακής ακτινοβολίας (Vlachopoulos, 2022).



**Εικόνα 54:** Ευπαλίνιο όρυγμα

Το βυζαντινό μοναστήρι της Παναγίας Βαρνάκοβας βρίσκεται σε ορεινό τοπίο της Νοτιοδυτικής Κεντρικής Ελλάδας, και πιο συγκεκριμένα στη Ναύπακτο, σε υψόμετρο 800 μέτρων (Εικόνα 55). Η γενική του δομή ακολουθεί το τυπικό μοναστικό συγκρότημα του 19ου αιώνα με μια σχεδόν ορθογώνια αυλή και μια εκκλησία στο κέντρο. Η εκκλησία ιδρύθηκε το 1077 από τον Άγιο Αρσένιο Βαρνακοβίτη. Κατά τη διάρκεια του 11ου και 12ου αιώνα, διακοσμήθηκε με τοιχογραφίες και μαρμάρινα μωσαϊκά, ενώ η εκτεταμένη ανακαίνιση του πραγματοποιήθηκε μεταξύ 1148-1151 από Βυζαντινούς αυτοκράτορες.

Το μοναστήρι καταστράφηκε σχεδόν εντελώς το 1826, καθώς χρησιμοποιούταν ως καταφύγιο και βάση κατά τη διάρκεια της Ελληνικής Επανάστασης, με τις εργασίες ανοικοδόμησης να ξεκινούν μετά το τέλος της το 1831. Μεταξύ των ετών 1992-2014, το μοναστήρι ανακαινίστηκε εκτενώς. Παρόλα αυτά, στις 29 Ιανουαρίου 2017, μια καταστροφική πυρκαγιά ξέσπασε εξαιτίας έκρηξης λέβητα, με αποτέλεσμα την καταστροφή του μεγαλύτερου μέρους του μοναστηριού. Έτσι, έως και σήμερα, ολόκληρο το μοναστήρι βρίσκεται υπό κατάρρευση και συνεχείς εργασίες αποκατάστασης και ανοικοδόμησης (Delegou et al., 2019).



**Εικόνα 55:** Ιερά Μονή Παναγίας Βαρνάκοβας

Η “Κοιμωμένη του Χαλεπά” αποτελεί το πιο γνωστό έργο του γλύπτη Γιαννούλη Χαλεπά που βρίσκεται στο Α΄ Νεκροταφείο Αθηνών και χρονολογείται το 1880 (Εικόνα 56). Το μαρμάρινο γλυπτό αποτελεί ταφικό αφιέρωμα στην Σοφία Αφεντάκη, την οποία απεικονίζει ξαπλωμένη σε ένα ανάκλιτρο με το αριστερό της χέρι να κρατάει έναν σταυρό πάνω στο στήθος της (Strousoroulios et al., 2023). Αυτό το χαρακτηριστικό συνδέει το άγαλμα με την ελληνική αρχαιότητα καθώς και με κλασσικές έννοιες, με την πλαστικότητα του μαρμάρου και τις διαφορετικές υφές να καθιστούν το έργο ιδιαίτερα ζωντανό. Το ταφικό μνημείο της Δελιγιάννη (Εικόνα 57) που βρίσκεται στον ίδιο χώρο και διαδέχθηκε αυτό του Χαλεπά, ανήκει στον γλύπτη Ιωάννη Βιτσάρη και απεικονίζει με παρόμοιο τρόπο και χαρακτηριστικά την ξαπλωμένη νεαρή Μαρία Δελιγιάννη, κρατώντας πάνω στο στήθος της με το δεξί της χέρι ένα σταυρό προσευχής.



**Εικόνα 56:** Άγαλμα του ταφικού μνημείου της Αφεντάκη “Η Κοιμωμένη του Χαλεπά”

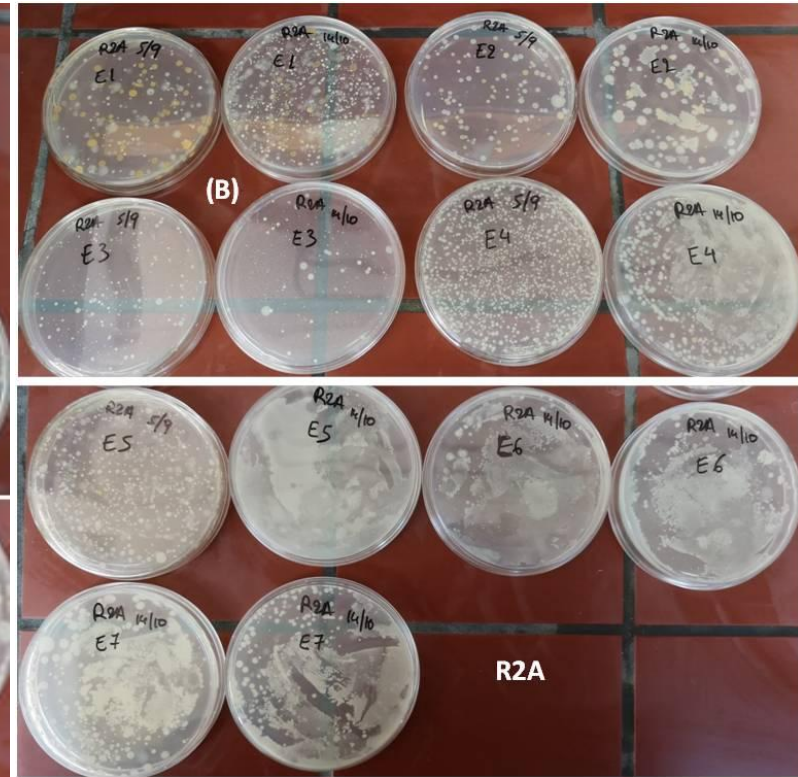
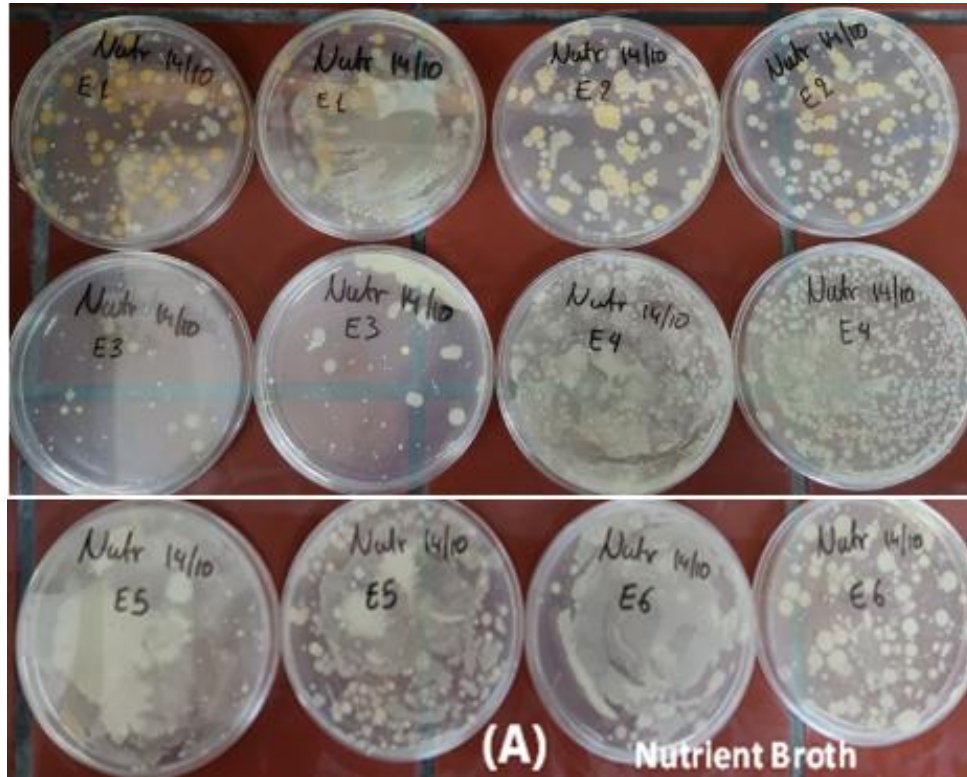


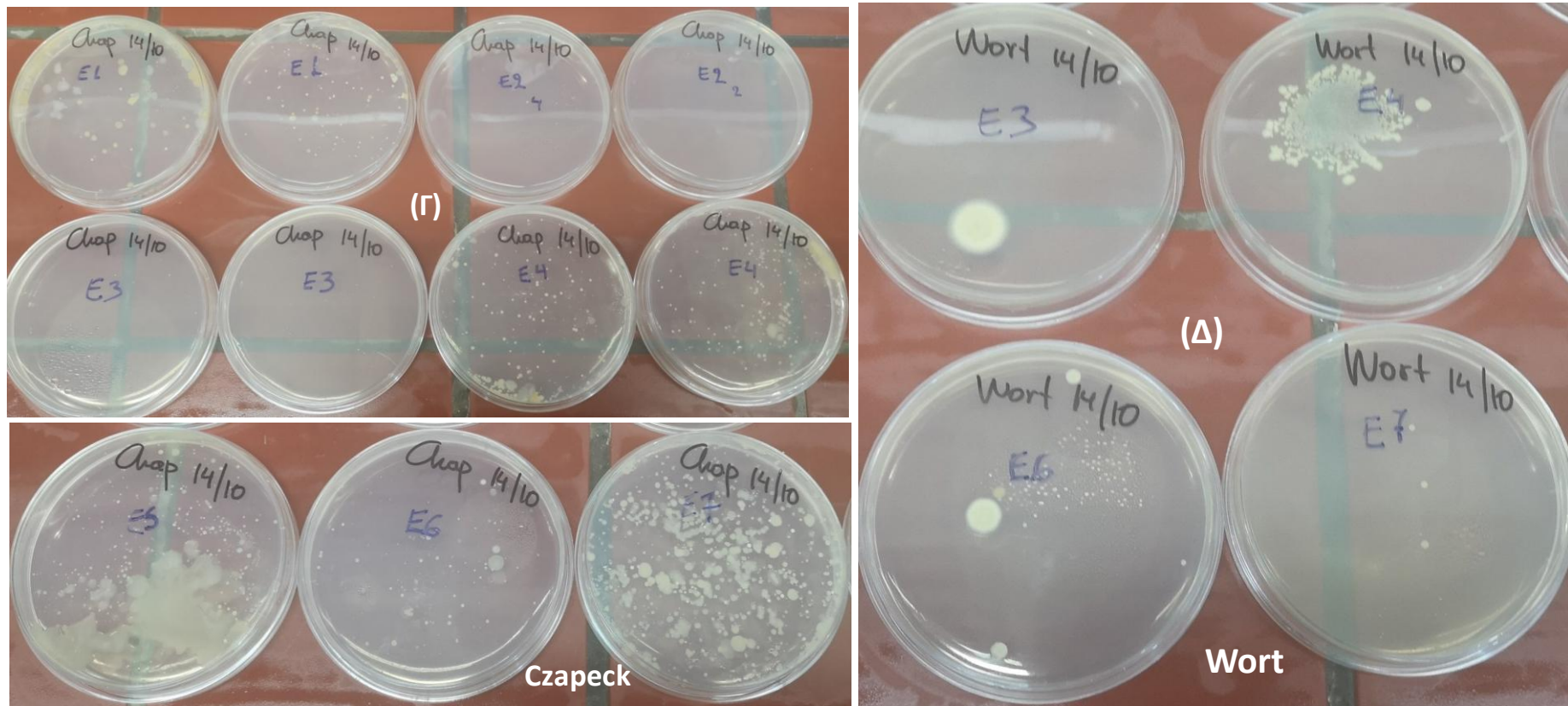
**Εικόνα 57:** Άγαλμα του ταφικού μνημείου της Δελιγιάννη “Η Κοιμωμένη του Βιτσάρη”

Τα δύο αυτά μαρμάρινα υπαίθρια αγάλματα τοποθετούνται στο κέντρο της Αθήνας σε ανοικτό επισκέψιμο χώρο, με αποτέλεσμα την εκτεταμένη υποβάθμιση και αλλοίωση τους, λόγω της συνεχούς του έκθεσης στις περιβαλλοντικές συνθήκες και στους ατμοσφαιρικούς ρύπους (Brisch & Bent, 2006).

Η ανάπτυξη των μικροοργανισμών από τα σημεία δειγματοληψίας κάθε μνημείου πραγματοποιείται σε στερεές καλλιέργειες τεσσάρων διαφορετικών θρεπτικών μέσων, ήτοι Nutrient Broth, Reasoner's 2A (R2A), Wort και Czapeck. Τα συγκεκριμένα μέσα επιλέγονται ώστε να προσομοιώσουν τις συνθήκες των μνημείων και να επιτρέπουν την ανάπτυξη υψηλής ποικιλότητας βακτηρίων και μυκήτων. Το Nutrient Broth είναι ένα θρεπτικό μέσο γενικής χρήσης, καθώς υποστηρίζει την ανάπτυξη ενός ευρέως φάσματος μικροοργανισμών. Το Reasoner's 2A είναι θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιείται για την ανάπτυξη βακτηρίων που συνήθως εντοπίζονται στο πόσιμο νερό. Το R2A λόγω της χαμηλής συγκέντρωσης εκχυλίσματος ζύμης, καζεΐνης, πεπτόνης και γλυκόζης επιτρέπει την ανάπτυξη βακτηρίων που εμφανίζουν αργούς ρυθμούς ανάπτυξης, ανεξαρτήτως του ανταγωνισμού από μικροοργανισμούς που αναπτύσσονται γρήγορα σε περιβάλλοντα με υψηλή περιεκτικότητα σε θρεπτικά συστατικά. Το θρεπτικό μέσο Wort χρησιμοποιείται ευρέως για την ανάπτυξη ζυμών και μυκήτων, ενώ το θρεπτικό μέσο Czapeck χρησιμοποιείται για την καλλιέργεια σαπροφυτικών μυκήτων και βακτηρίων του εδάφους (Dyda et al., 2018). Στα προαναφερθέντα θρεπτικά μέσα αναπτύχθηκε πλήθος διαφορετικών ειδών μυκήτων και βακτηρίων. Ενδεικτικά στις Εικόνες 58-61 παρουσιάζεται η ανάπτυξη διαφόρων μικροοργανισμών από τα διαφορετικά σημεία δειγματοληψίας των επιδεικτικών μνημείων.

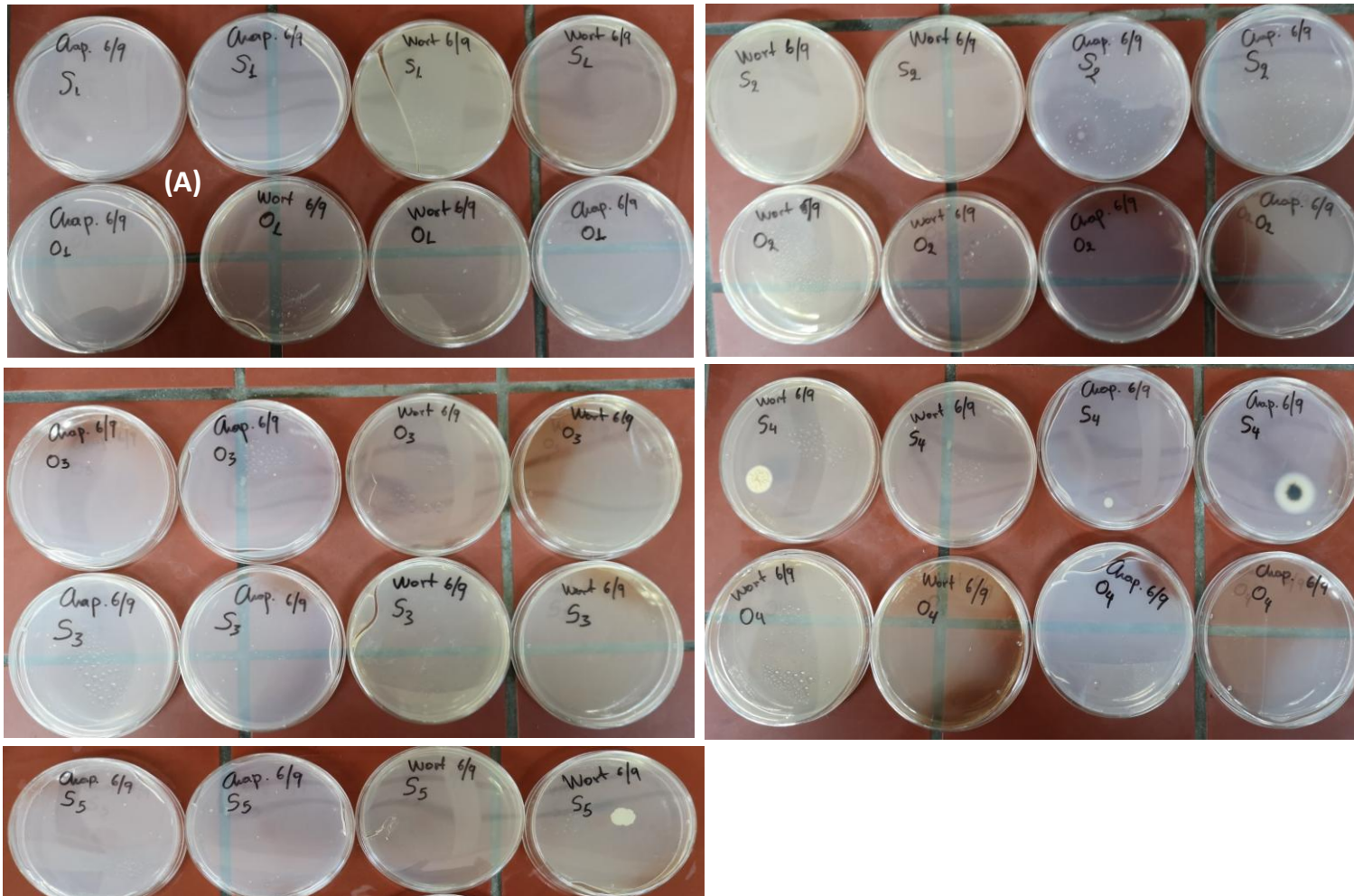
Στους μικροοργανισμούς που απομονώθηκαν και αναπτύχθηκαν από τα τέσσερα επιδεικτικά μνημεία επιλέγονται οι μακροσκοπικά/μορφολογικά διαφορετικές αποικίες που ανήκουν είτε σε βακτήρια είτε σε μύκητες με βάση τη σχετική αφθονία του αριθμού μονάδων που σχηματίζουν αποικίες (CFU), δηλαδή τις μακροσκοπικά διακριτές αποικίες σε κάθε θρεπτικό μέσο, με παρουσία στο τρυβλίο μεγαλύτερη του 1% των συνολικών CFUs. Τα αποτελέσματα ανάπτυξης στις στερεές καλλιέργειες των διαφορετικών θρεπτικών μέσων ανά σημείο δειγματοληψίας κάθε μνημείου παρουσιάζονται ενδεικτικά στους Πίνακες 8-11.

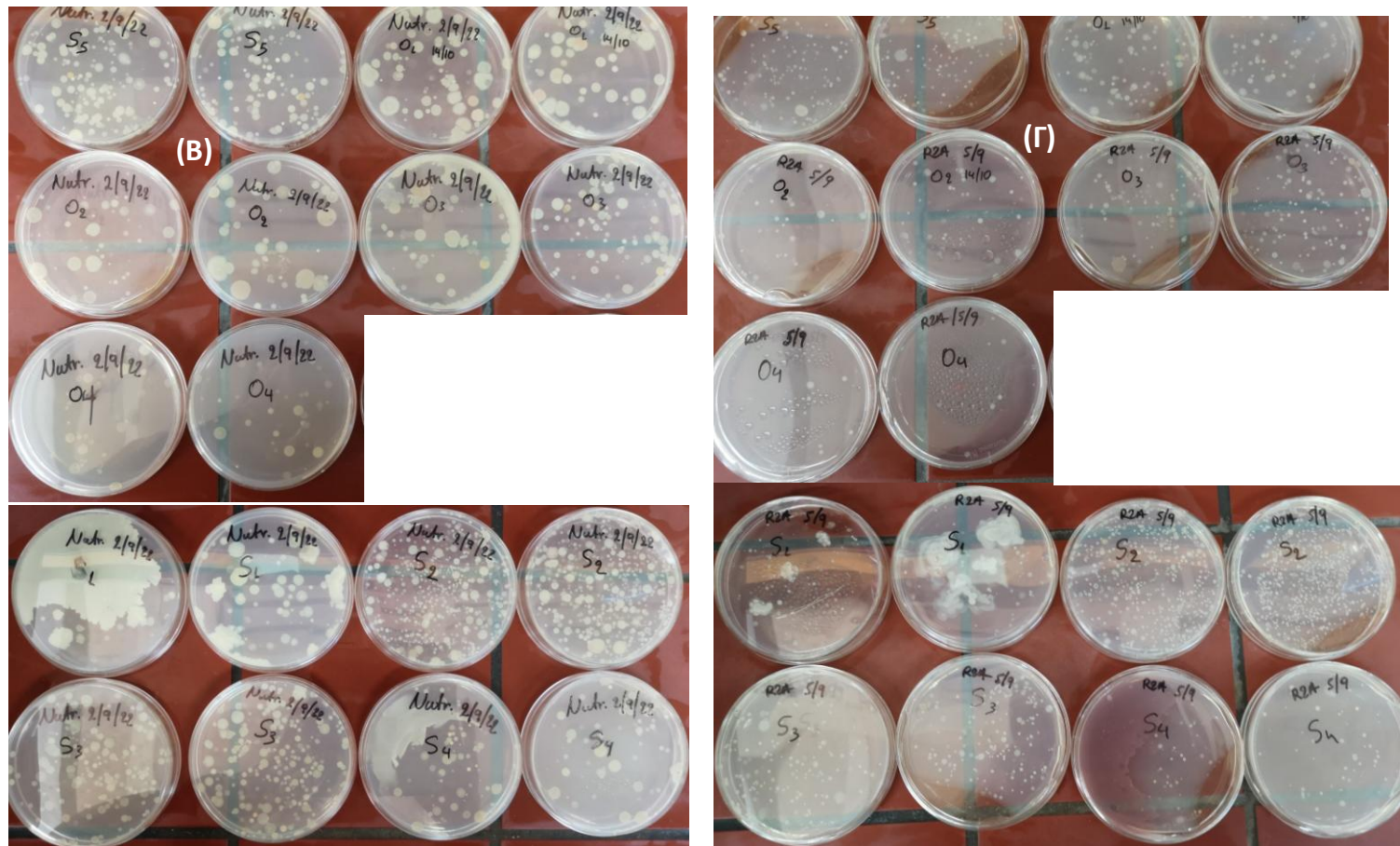




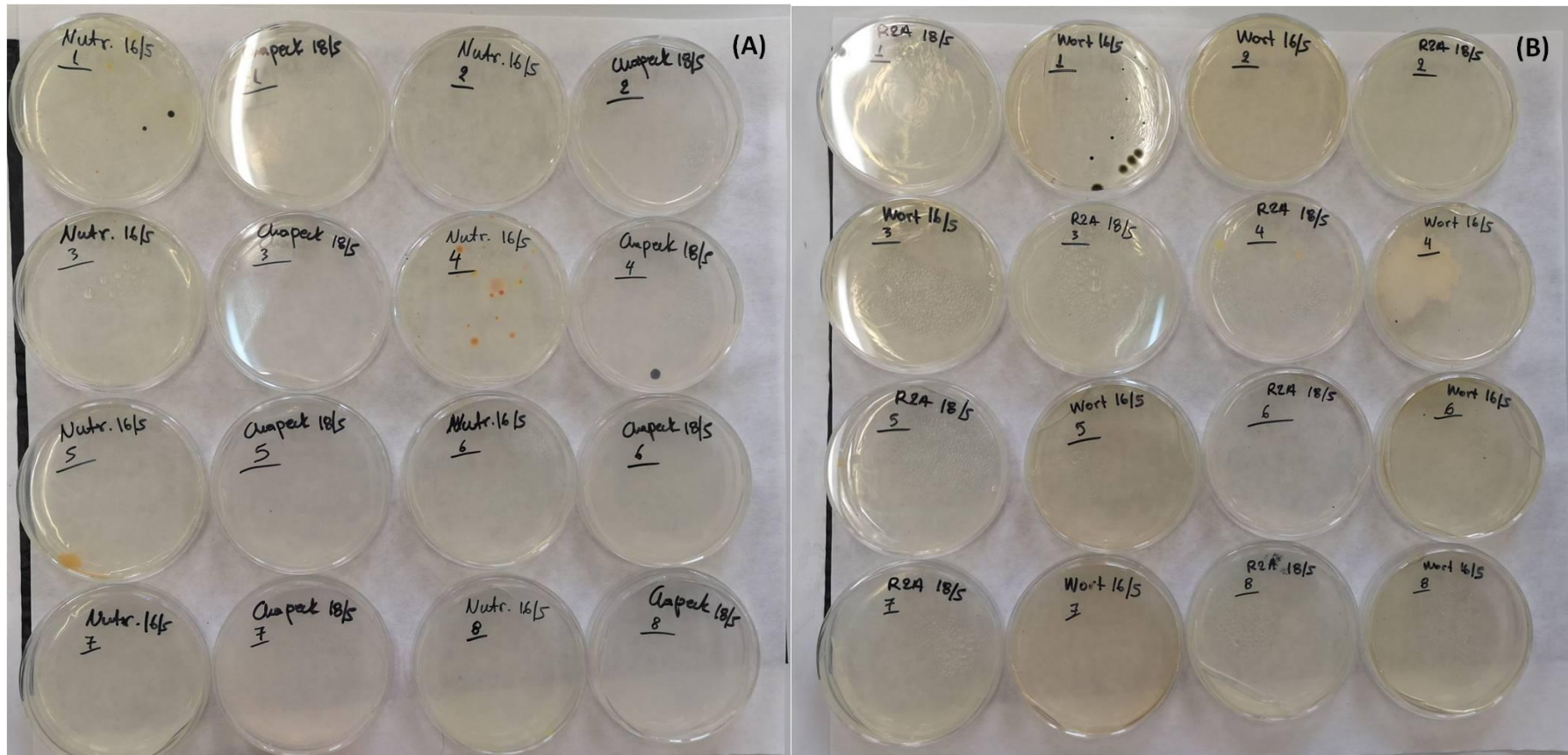
**Εικόνα 58:** Μικροβιακές αποικίες που αναπτύχθηκαν σε στερεές καλλιέργειες των θρεπτικών μέσων με άγαρ (Α) Nutrient, (Β) R2A, (Γ) Czapeck και (Δ) Wort από τα σημεία δειγματοληψίας στο Ευπαλίνιο όρυγμα



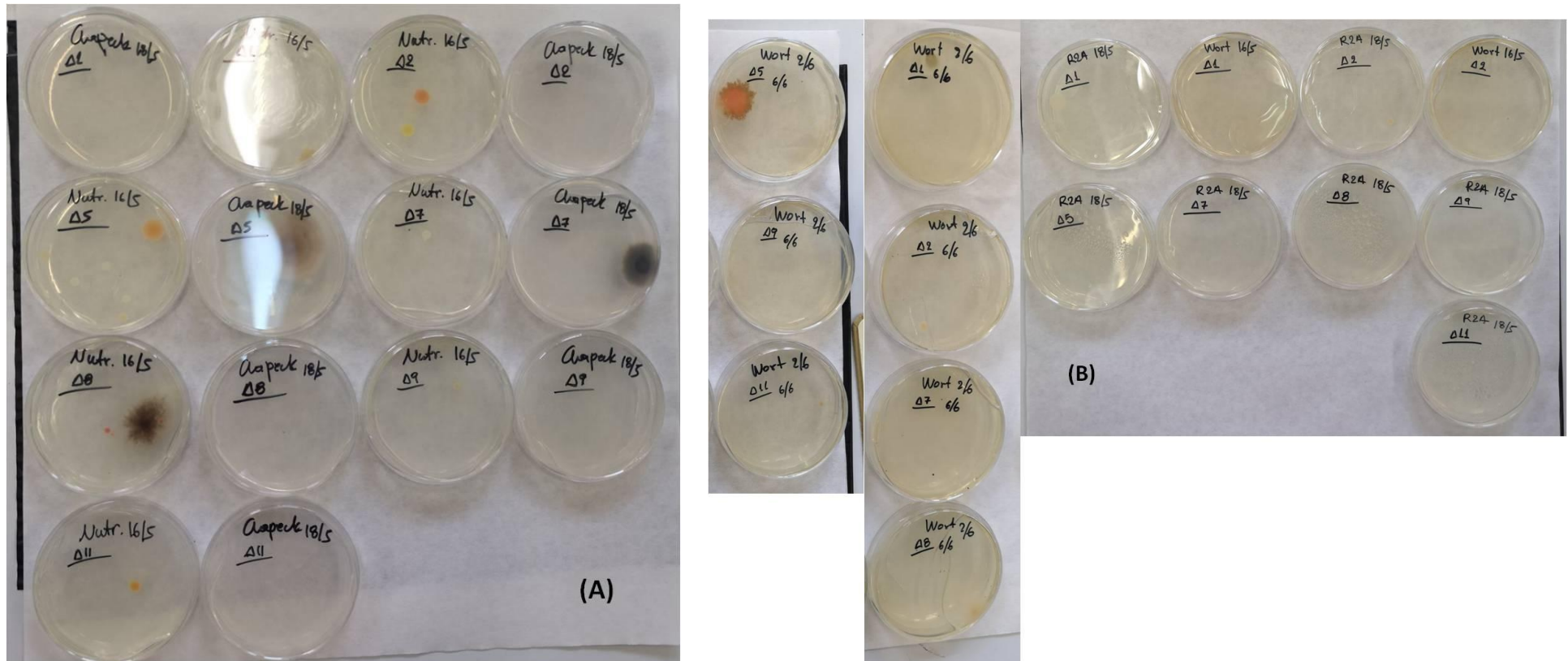




**Εικόνα 59:** Μικροβιακές αποικίες που αναπτύχθηκαν σε στερεές καλλιέργειες των θρεπτικών μέσων με άγαρ (Α) Czapeck και Wort, (Β) Nutrient και (Γ) R2A από τα σημεία δειγματοληψίας στην Ιερά Μονή Παναγίας Βαρνάκοβας




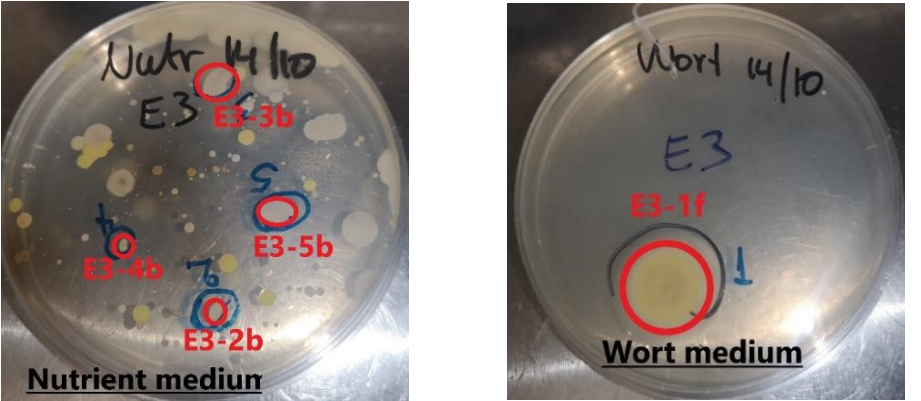


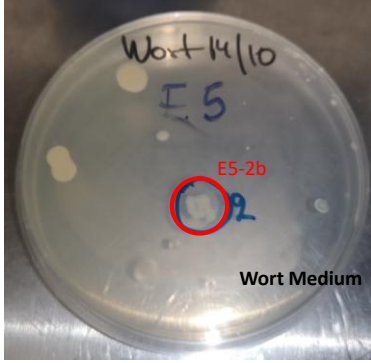
**Εικόνα 60:** Μικροβιακές αποικίες που αναπτύχθηκαν σε στερεές καλλιέργειες των θρεπτικών μέσων με άγαρ (A) Czapek και Nutrient Broth και (B) Wort και R2A από τα σημεία δειγματοληψίας στο μνημείο Αφεντάκη "Κοιμωμένη του Χαλεπά", Α' Νεκροταφείο Αθηνών



**Εικόνα 61:** Μικροβιακές αποικίες που αναπτύχθηκαν σε στερεές καλλιέργειες των θρεπτικών μέσων με άγαρ (A) Czapeck και Nutrient Broth και (B) Wort και R2A από τα σημεία δειγματοληψίας στο μνημείο Δελιγιάννη “Κοιμωμένη του Βιτσάρη”, Α' Νεκροταφείο Αθηνών

**Πίνακας 8:** Αποτελέσματα στερεών καλλιιεργειών, των διαφορετικών θρεπτικών μέσων, ανά σημείο δειγματοληψίας για το Ευπαλίειο όρυγμα

Κωδικός σημείου δειγματοληψίας	Τύπος φθοράς	Φωτογραφική απεικόνιση σημείου δειγματοληψίας	Αποτελέσματα στερεών καλλιιεργειών για τα διαφορετικά θρεπτικά μέσα (σε κόκκινο κύκλο οι απομονωμένοι μικροοργανισμοί ανά σημείο δειγματοληψίας και οι κωδικοί τους)
E1	Πράσινη βιοδιάβρωση	 <p>(σε κόκκινο κύκλο οι περιοχές δειγματοληψίας)</p>	 <p><b>Nutrient medium</b></p> <p><b>Wort medium</b></p>
E3	Λευκές αποθέσεις	 <p>(σε κόκκινο κύκλο οι περιοχές δειγματοληψίας)</p>	 <p><b>Nutrient medium</b></p> <p><b>Wort medium</b></p>

E5	Ανακρυσταλλωμένος ασβεστίτης με λευκό αποχρωματισμό		
----	---	---	---


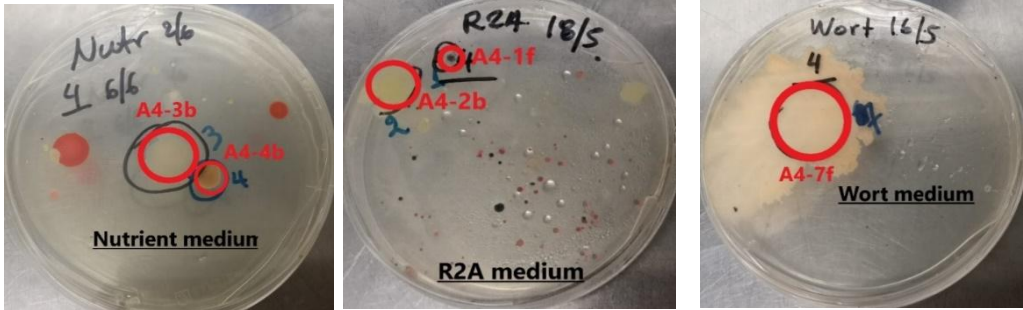
**Πίνακας 9:** Αποτελέσματα στερεών καλλιεργειών, των διαφορετικών θρεπτικών μέσων, ανά σημείο δειγματοληψίας για την Ιερά Μονή Παναγίας Βαρνάκοβας

Κωδικός σημείου δειγματοληψίας	Τύπος φθοράς	Φωτογραφική απεικόνιση σημείου δειγματοληψίας	Αποτελέσματα στερεών καλλιεργειών για τα διαφορετικά θρεπτικά μέσα (σε κόκκινο κύκλο οι απομονωμένοι μικροοργανισμοί ανά σημείο δειγματοληψίας και οι κωδικοί τους)
VO2	Πωρόλιθος		

VS5	Σπογγοειδής πωρόλιθος			
-----	-----------------------	--	---	---

**Πίνακας 10:** Αποτελέσματα στερεών καλλιεργειών, των διαφορετικών θρεπτικών μέσων, ανά σημείο δειγματοληψίας για το μνημείο Αφεντάκη (Α' Νεκροταφείο Αθηνών)

Κωδικός σημείου δειγματοληψίας	Τύπος φθοράς	Φωτογραφική απεικόνιση σημείου δειγματοληψίας	Αποτελέσματα στερεών καλλιεργειών για τα διαφορετικά θρεπτικά μέσα (σε κόκκινο κύκλο οι απομονωμένοι μικροοργανισμοί ανά σημείο δειγματοληψίας και οι κωδικοί τους)
A1	Μαύρη κρούστα	 <p>(σε κόκκινο κύκλο οι περιοχές δειγματοληψίας)</p>	

A4	Φαιοκάστανη κρούστα	 <p>(σε κόκκινο κύκλο οι περιοχές δειγματοληψίας)</p>	 <p>The figure shows three petri dishes with bacterial growth. The first dish is labeled 'Nutr 2/6' and '4 5/6', with 'Nutrient medium' written at the bottom. It shows several colonies, with two circled in red and labeled 'A4-3b' and 'A4-4b'. The second dish is labeled 'R2A 18/5' and 'A4-1f', with 'R2A medium' written at the bottom. It shows numerous small colonies, with one circled in red and labeled 'A4-2b'. The third dish is labeled 'Wort 16/5' and '4', with 'Wort medium' written at the bottom. It shows a large, dense colony circled in red and labeled 'A4-7f'.</p>
----	---------------------	--	--



**Πίνακας 11:** Αποτελέσματα στερεών καλλιιεργειών, των διαφορετικών θρεπτικών μέσων, ανά σημείο δειγματοληψίας για το μνημείο Δελιγιάννη (Α' Νεκροταφείο Αθηνών)

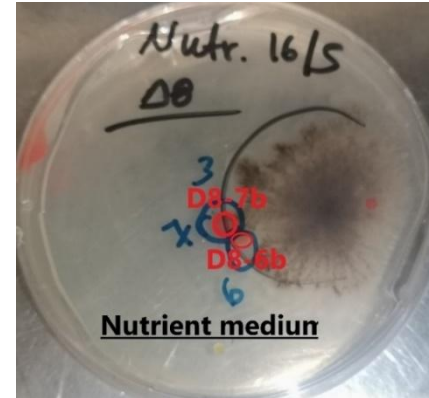
Κωδικός σημείου δειγματοληψίας	Τύπος φθοράς	Φωτογραφική απεικόνιση σημείου δειγματοληψίας	Αποτελέσματα στερεών καλλιιεργειών για τα διαφορετικά θρεπτικά μέσα (σε κόκκινο κύκλο οι απομονωμένοι μικροοργανισμοί ανά σημείο δειγματοληψίας και οι κωδικοί τους)
D1	Μαύρη κρούστα		 <p>Wort Medium</p> <p>R2A Medium</p>
D5	Λευκές αποθέσεις	 <p>(σε κόκκινο κύκλο η περιοχή δειγματοληψίας)</p>	 <p>Nutrient medium</p> <p>Wort medium</p>

D8

Έντονη  
μαύρη  
βιοδιάβρωση



(σε κόκκινο κύκλο η περιοχή  
δειγματοληψίας)



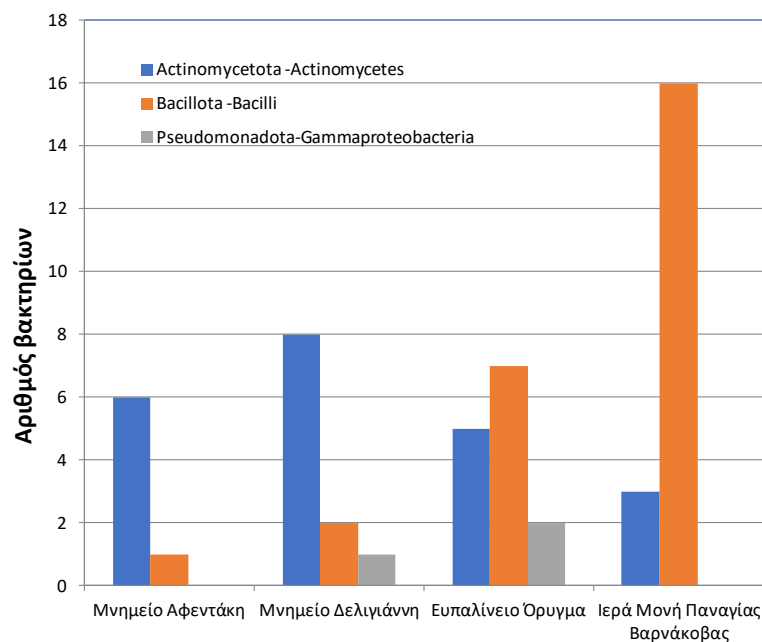
Από τις στερεές καλλιέργειες στα διαφορετικά θρεπτικά μέσα για το σύνολο των σημείων δειγματοληψίας από τα επιδεικτικά μνημεία, απομονώνονται 117 διαφορετικές μορφολογικά αποικίες μικροοργανισμών εκ των οποίων προέρχονται 29 από το Ευπαλίνειο όρυγμα, 28 από την Ιερά Μονή Παναγίας Βαρνάκοβας, 33 από το μνημείο Αφεντάκη "Κοιμωμένη του Χαλεπά" και 27 από το μνημείο της Δελιγιάννη "Κοιμωμένη του Βιτσάρη" στο Α' Νεκροταφείο Αθηνών.

### 3.2 Ταυτοποίηση και ταξινομικός χαρακτηρισμός μικροοργανισμών

Από τους μικροοργανισμούς που αναπτύχθηκαν στις στερεές καλλιέργειες των διαφορετικών θρεπτικών μέσων, επιτυχημένη ταυτοποίηση πραγματοποιήθηκε σε συνολικά 86 από τους 117 απομονωθέντες μικροοργανισμούς. Τα αποτελέσματα των αλληλουχιών των στοχευμένων γενετικών δεικτών ανά καλλιεργούμενο μικροοργανισμό συγκρίνονται με αλληλουχίες της βάσης δεδομένων NCBI με τον αλγόριθμο BLAST, οπότε τελικά προκύπτουν 52 βακτήρια και 34 για μύκητες. Συνολικά, από τις λίθινες επιφάνειες των επιδεικτικών μνημείων ταξινομούνται γενετικά ανά μνημείο:

- ✓ Ευπαλίνειο όρυγμα 14 βακτήρια (Πίνακας 12) και 4 μύκητες (Πίνακας 13),
- ✓ Ιερά Μονή Παναγίας Βαρνάκοβας 19 βακτήρια (Πίνακας 14) και 3 μύκητες (Πίνακας 15)
- ✓ Μνημείο Αφεντάκη Α' Νεκροταφείο Αθηνών, 7 βακτήρια (Πίνακας 16) και 15 μύκητες (Πίνακας 17)
- ✓ Μνημείο Δελιγιάννη Α' Νεκροταφείο Αθηνών, 12 βακτήρια (Πίνακας 18) και 12 μύκητες (Πίνακας 19)

Η βακτηριακή ποικιλότητα περιορίζεται στις τρεις τάξεις των *Actinomycetes*, *Bacilli* και *Gammaproteobacteria*. Στο αστικό περιβάλλον του Α' Νεκροταφείου Αθηνών (μνημεία Αφεντάκη και Δελιγιάννη), ο αριθμός των βακτηρίων που ανήκουν στην τάξη των *Actinomycetes* βρέθηκε μεγαλύτερος συγκριτικά με τον αντίστοιχο αριθμό τους στο Ευπαλίνειο όρυγμα και στην Ιερά Μονή Παναγίας Βαρνάκοβας (Διάγραμμα 1), όπου και στα δύο μνημεία κυριαρχούν βακτήρια της τάξης των *Bacilli*. Τέλος, όλοι οι μύκητες που ταξινομήθηκαν ανήκουν στο φύλο *Ascomycota*.



**Διάγραμμα 1:** Βακτηριακή ποικιλότητα σε επίπεδο τάξης στα επιδεικτικά μνημεία

Τα αποτελέσματα της ταξινόμησης των μικροοργανισμών που απομονώνονται από τα σημεία δειγματοληψίας κάθε μνημείου ανάλογα το είδος φθοράς, καθώς και ο πλησιέστερος συγγενής τους με επιβλαβείς ή ευεργετικές ιδιότητες που δυνητικά προκαλούν αλλοίωση ή βιοαποκατάσταση σε λίθινες και μαρμάρινες επιφάνειες αναλύονται στους Πίνακες 12-19. Το N/A υποδηλώνει ότι δεν υπάρχουν πληροφορίες σχετικά με επιδράσεις των μικροοργανισμών σε μνημεία, ενώ με πράσινο χρώμα υπογραμμίζονται τα ωφέλιμα για τις λίθινες επιφάνειες βακτήρια.

**Πίνακας 12:** Ταξινομικός σχολιασμός βακτηρίων που απομονώθηκαν από το Ευπαλίειο όρυγμα

Σημείο δειγματοληψίας-κωδικός στελέχους	Τύπος φθοράς	Ταξινόμηση (Domain-Phylum -class)	Κοντινότερος συγγενής (% similarity) [Accession Number]	Πηγή απομόνωσης του κοντινότερου συγγενή	Χαρακτηριστικά που σχετίζονται με την αποκατάσταση/φθορά μνημείων
E1-2b	Πράσινη διάβρωση	Bacteria – Actinomycetota - Actinomycetes	<i>Agromyces agglutinans</i> (99.6%) [NR_181007]	Άγνωστη	N/A
E1-3b & E1-5b	Πράσινη διάβρωση	Bacteria – Bacillota -Bacilli	<i>Metabacillus indicus</i> (98.9%) [NR_042974]	Ζυμωμένα θαλασσινά	N/A
E1-4b	Πράσινη διάβρωση	Bacteria – Bacillota -Bacilli	<i>Solibacillus isronensis</i> (83.9%) [NR_118049]	Άγνωστη	Το γένος περιλαμβάνει είδη που σχετίζονται με τη διάλυση του ανθρακικού ασβεστίου και το σχηματισμό βιοφίλμ που προκαλεί μηχανική βλάβη (Skipper et al., 2022)
E1 – 7b	Πράσινη διάβρωση	Bacteria – Pseudomonadota- Gammaproteobacteria	<i>Pseudomonas cichorii</i> (90.8%) [MT415198]	Σταλακτίτης	Το γένος περιλαμβάνει είδη με ικανότητα εναπόθεσης CaCO <sub>3</sub> (Khedr et al., 2023)
E3 – 2b	Λευκές αποθέσεις	Bacteria – Actinomycetota - Actinomycetes	<i>Agrococcus jenensis</i> (99.2%) [NR_115028]	Άγνωστη	N/A

E3 – 3b	Λευκές αποθέσεις	Bacteria – Bacillota -Bacilli	<i>Sporosarcina thermotolerans</i> (98.4%) [NR_116956]	Άγνωστη	Το γένος περιλαμβάνει είδη με ικανότητα εναπόθεσης CaCO <sub>3</sub> (Khedr et al., 2023)
E3 – 5b & E3-6b	Λευκές αποθέσεις	Bacteria – Bacillota -Bacilli	<i>Metabacillus herbersteinensis</i> (99.6%) [NR_042286]	Άγνωστη	N/A
E4 – 2b	Λευκές αποθέσεις	Bacteria – Bacillota -Bacilli	<i>Bacillus nematocida</i> (88.4%) [NR_115325]	Έδαφος	Το γένος περιλαμβάνει είδη με ικανότητα εναπόθεσης CaCO <sub>3</sub> (Khedr et al., 2023)
E5 – 2b	Ανακρυσταλλωμένος ασβεστίτης, υψηλή υγρασία, τμήμα λευκών υποπεριοχών	Bacteria – Pseudomonadota-Gammaproteobacteria	<i>Rahnella contaminans</i> (99.7%) [NR_181072]	Λύματα	N/A
E7-2b	Περιοχή βράχου δίπλα από τον ανακρυσταλλωμένο ασβεστίτη	Bacteria – Actinomycetota - Actinomycetes	<i>Rhodococcus baikonurensis</i> (98.8%) [NR_024784]	Αέρας	Το γένος περιλαμβάνει είδη που βρέθηκαν σε πέτρα με διάβρωση (Lincolnshire limestone) (Skipper et al., 2022)
E7-3b	Περιοχή βράχου δίπλα από τον ανακρυσταλλωμένο ασβεστίτη	Bacteria – Actinomycetota - Actinomycetes	<i>Rhodococcus wratislaviensis</i> (93.3%) [NR_118605]	Άγνωστη	Το γένος περιλαμβάνει είδη που βρέθηκαν σε πέτρα με διάβρωση (Lincolnshire limestone) (Skipper et al., 2022)

**Πίνακας 13:** Ταξινομικός σχολιασμός μυκήτων που απομονώθηκαν από το Ευπαλίνειο όρυγμα

Σημείο δειγματοληψίας-κωδικός στελέχους	Τύπος φθοράς	Ταξινόμηση (Domain-Phylum-class)	Κοντινότερος συγγενής (% ομοιότητας) [Accession Number]	Πηγή απομόνωσης του κοντινότερου συγγενή	Χαρακτηριστικά που σχετίζονται με την αποκατάσταση/φθορά μνημείων
E3-1f	Λευκές αποθέσεις	Fungi-Ascomycota	<i>Penicillium sp.</i> (100%) [MH102085]	Φυτά	Το γένος περιλαμβάνει είδη που σχετίζονται βιοδιάβρωση λόγω ανάπτυξης υφών στο εσωτερικό της πέτρας έκκρισης οξέων, μαύρα στίγματα (Agrawal et al., 2023)
E6-1f	Περιοχή ανακρυσταλλωμένου ασβεστίτη, πλούσια σε υγρασία, γκριζας ημιδιαφανούς απόχρωσης	Fungi-Ascomycota	<i>Aspergillus sp.</i> (99%) [JX270516]	Έδαφος	Μαύροι μύκητες (black fungi), που σχετίζονται με αποχρωματισμό, μαύρη πατίνα (έκκριση μελανίνης), βιοδιάβρωση λόγω ανάπτυξης υφών στο εσωτερικό της πέτρας και έκκρισης οξέων, μηχανική καταπόνηση (Romero et al., 2021)
E6- 3f	Περιοχή ανακρυσταλλωμένου ασβεστίτη, πλούσια σε υγρασία, γκριζας ημιδιαφανούς απόχρωσης	Fungi-Ascomycota	<i>Penicillium dipodomycicola</i> (99.9%) [MF281348]	Ξύλινη επιφάνεια	Το γένος περιλαμβάνει είδη που σχετίζονται βιοδιάβρωση λόγω ανάπτυξης υφών στο εσωτερικό της πέτρας έκκρισης οξέων, μαύρα στίγματα (Agrawal et al., 2023)

**Πίνακας 14:** Ταξινομικός σχολιασμός βακτηρίων που απομονώθηκαν από την Ιερά Μονή Παναγίας Βαρνάκοβας

Σημείο δειγματοληψίας-κωδικός στελέχους	Τύπος φθοράς	Ταξινόμηση (Domain-Phylum - class)	Κοντινότερος συγγενής (% ομοιότητας) [Accession Number]	Πηγή απομόνωσης του κοντινότερου συγγενή	Χαρακτηριστικά που σχετίζονται με την αποκατάσταση/φθορά μνημείων
S1-3b	Πωρόλιθος, σπογγειδούς μορφολογίας	Bacteria – Bacillota - Bacilli	<i>Peribacillus frigoritolerans</i> (100%) [NR_117474]	Άγνωστη	Ικανότητα εναπόθεσης CaCO <sub>3</sub> (Isola et al., 2023)
S2-1b	Πωρόλιθος, σπογγειδούς μορφολογίας	Bacteria – Bacillota - Bacilli	<i>Sutcliffeiella halmapala</i> (99.7%) [NR_026144]	Άγνωστη	N/A
S2-2b	Πωρόλιθος, σπογγειδούς μορφολογίας	Bacteria – Bacillota - Bacilli	<i>Metabacillus litoralis</i> (98.9%) [NR_043015]	Θαλασσινό νερό	Ικανότητα εναπόθεσης CaCO <sub>3</sub> (Nigro et al., 2022)
S3 – 1b	Πωρόλιθος, σπογγειδούς μορφολογίας	Bacteria – Actinomycetota - Actinomycetes	<i>Streptomyces thinghirensis</i> (98.5%) [NR_116901]	Ριζόσφαιρα	N/A
S3 – 2b	Πωρόλιθος, σπογγειδούς μορφολογίας	Bacteria – Bacillota - Bacilli	<i>Metabacillus herbersteinensis</i> (99.7%) [NR_042286]	Άγνωστη	N/A
S4 – 1b	Πωρόλιθος, σπογγειδούς μορφολογίας	Bacteria – Bacillota - Bacilli	<i>Raenibacillus insulae</i> (98.9%) [NR_165679]	Έδαφος	Το γένος περιλαμβάνει είδη που σχετίζονται με βιολογικά επαγόμενη φθορά (biopits) πέτρας (Skirper et al., 2022)



S4 – 2b	Πωρόλιθος, σπογγοειδούς μορφολογίας	Bacteria – Actinomycetota - Actinomycetes	<i>Streptomyces anulatus</i> (100%) [OQ073700]	Έδαφος	N/A
S4-4b	Πωρόλιθος, σπογγοειδούς μορφολογίας	Bacteria – Bacillota - Bacilli	<i>Bacillus</i> sp. (99.4%) [AJ316317]	Τοιχογραφία	Το γένος περιλαμβάνει είδη με ικανότητα εναπόθεσης CaCO <sub>3</sub> (Khedr et al., 2023)
S4-5b	Πωρόλιθος, σπογγοειδούς μορφολογίας	Bacteria – Actinomycetota - Actinomycetes	<i>Streptomyces</i> sp. (99.6%) [MW568637]	Δέρμα νυχτερίδας	N/A
S5 – 1b	Πωρόλιθος, σπογγοειδούς μορφολογίας	Bacteria – Bacillota - Bacilli	<i>Bacillus</i> sp. (99.7%) [MG257924]	Ανθοφορία γύψου	Το γένος περιλαμβάνει είδη με ικανότητα εναπόθεσης CaCO <sub>3</sub> (Khedr et al., 2023)
O1 – 1b	Πωρόλιθος	Bacteria – Bacillota - Bacilli	<i>Metabacillus herbersteinensis</i> (99.7%) [NR_042286]	Άγνωστη	N/A
O1 – 2b	Πωρόλιθος	Bacteria – Bacillota - Bacilli	<i>Metabacillus crassostreae</i> (98.6%) [NR_178471]	Στρείδι	N/A
O1 – 3b	Πωρόλιθος	Bacteria – Bacillota - Bacilli	<i>Fictibacillus halophilus</i> (95.9%) [NR_149289]	Θερμή πηγή	N/A
O1 – 4b	Πωρόλιθος	Bacteria – Bacillota - Bacilli	<i>Metabacillus litoralis</i> (99%) [NR_043015]	Θαλασσινό νερό	Ασβεστοπαραγωγικές ιδότητες (Nigro et al., 2022)

O1 – 5b	Πωρόλιθος	Bacteria – Bacillota - Bacilli	<i>Metabacillus herbersteinensis</i> (98.9%) [NR_042286]	Άγνωστη	N/A
O2 – 1b	Πωρόλιθος	Bacteria – Bacillota - Bacilli	<i>Paenibacillus harenae</i> (92.8%) [NR_043220]	Άμμος ερήμου	Το γένος περιλαμβάνει είδη που σχετίζονται με βιολογικά επαγόμενη φθορά (biopits) πέτρας (Skipper et al., 2022)
O3 – 1b	Πωρόλιθος	Bacteria – Bacillota - Bacilli	<i>Paenibacillus prosopidis</i> (96.2%) [NR_116828]	Ρίζες	Το γένος περιλαμβάνει είδη που σχετίζονται με βιολογικά επαγόμενη φθορά (biopits) πέτρας (Skipper et al., 2022)
O3 – 2b	Πωρόλιθος	Bacteria – Bacillota - Bacilli	<i>Bacillus mesophilus</i> (97.8%) [NR_149175]	Έδαφος	Το γένος περιλαμβάνει είδη με ικανότητα εναπόθεσης CaCO <sub>3</sub> (Khedr et al., 2023)
O4-1b	Πωρόλιθος	Bacteria – Bacillota - Bacilli	<i>Metabacillus herbersteinensis</i> (99.2%) [NR_042286]	Άγνωστη	N/A

**Πίνακας 15:** Ταξινομικός σχολιασμός μυκήτων που απομονώθηκαν από την Ιερά Μονή Παναγίας Βαρνάκοβας

Σημείο δειγματοληψίας-κωδικός στελέχους	Τύπος φθοράς	Ταξινόμηση	Κοντινότερος συγγενής (% ομοιότητας) [Accession Number]	Πηγή απομόνωσης του κοντινότερου συγγενή	Χαρακτηριστικά που σχετίζονται με την αποκατάσταση/φθορά μνημείων
S5 – 3f	Πωρόλιθος	Fungi - Ascomycota	<i>Lecanicillium psalliotae</i> (98.7%) [MH809372]	Αέρας	N/A
VE-1f	Εξωτερική επιφάνεια με αποχρωματισμό	Fungi - Ascomycotoa	<i>Penicillium crustosum</i> (100%) [MT872085]	Φρούτα	Το γένος περιλαμβάνει είδη που σχετίζονται βιοδιάβρωση λόγω ανάπτυξης υφών στο εσωτερικό της πέτρας έκκρισης οξέων, μαύρα στίγματα (Agrawal et al., 2023)

**Πίνακας 16:** Ταξινομικός σχολιασμός βακτηρίων που απομονώθηκαν από το μνημείο Αφεντάκη “Κοιμωμένη του Χαλεπά” στο Α΄ Νεκροταφείο Αθηνών

Σημείο δειγματοληψίας-κωδικός στελέχους	Τύπος φθοράς	Ταξινόμηση (Domain-Phylum -class)	Κοντινότερος συγγενής (% ομοιότητας) [Accession Number]	Πηγή απομόνωσης του κοντινότερου συγγενή	Χαρακτηριστικά που σχετίζονται με την αποκατάσταση/φθορά μνημείων
A1-1b	Μαύρη κρούστα	Bacteria – Actinomycetota - Actinomycetes	<i>Arthrobacter sp.</i> (95%) [AP018697]	Έρημος	Το γένος περιλαμβάνει είδη με ικανότητα εναπόθεσης CaCO <sub>3</sub> (Khedr et al., 2023)
A1-4b	Μαύρη κρούστα	Bacteria – Actinomycetota - Actinomycetes	<i>Micrococcus luteus</i> (99.4%) [HQ717326]	Δόντια σκύλου	Το γένος περιλαμβάνει είδη με ικανότητα εναπόθεσης CaCO <sub>3</sub> (Golovkina et al., 2020)

A4-2b	Φαιοκάστανη κρούστα	Bacteria – Actinomycetota - Actinomycetes	<i>Actinotalea fermentans</i> (99.7%) [MH130308]	Πεύκο	Το γένος περιλαμβάνει είδη που βρέθηκαν σε πέτρα (Jroundi et al., 2015)
A4-3b	Φαιοκάστανη κρούστα	Bacteria – Bacillota - Bacilli	<i>Bacillus</i> sp. (100%) [HM804391]	Κοραλλιογενής βλέννα	Το γένος περιλαμβάνει είδη με ικανότητα εναπόθεσης CaCO <sub>3</sub> (Khedr et al., 2023)
A4-4b	Φαιοκάστανη κρούστα	Bacteria – Actinomycetota - Actinomycetes	<i>Rhodococcus</i> sp. (100%) [LR536418]	Ρίζες	Το γένος περιλαμβάνει είδη που βρέθηκαν σε πέτρα με διάβρωση (Lincolnshire limestone) (Skipper et al., 2021)
A5-3b	Έντονη μαύρη βιοδιάβρωση ομοιόμορφης μορφολογίας & μειωμένη περικρυσταλλική συνοχή	Bacteria – Actinomycetota - Actinomycetes	<i>Rathayibacter</i> sp. (90.3%) [JX869540]	Ρουχισμός	Το γένος περιλαμβάνει είδη που βρέθηκαν σε μεσαιωνικές τοιχογραφίες σε σημεία με υψηλή διάβρωση (Altenburgera et al., 1996)
A6-1b	Μαύρη βιοδιάβρωση με μπεζ χροιά & μειωμένη περικρυσταλλική συνοχή	Bacteria – Actinomycetota - Actinomycetes	<i>Kocuria carniphila</i> (100%) [MT393681]	Γαστρόποδα	Το γένος περιλαμβάνει είδη με ικανότητα εναπόθεσης CaCO <sub>3</sub> (Cacchio et al., 2004)

**Πίνακας 17:** Ταξινομικός σχολιασμός μυκήτων που απομονώθηκαν από το μνημείο Αφεντάκη “Κοιμωμένη του Χαλεπά” στο Α΄ Νεκροταφείο Αθηνών

Σημείο δειγματοληψίας-κωδικός στελέχους	Τύπος φθοράς	Ταξινόμηση	Κοντινότερος συγγενής (% ομοιότητας) [Accession Number]	Πηγή απομόνωσης του κοντινότερου συγγενή	Χαρακτηριστικά που σχετίζονται με την αποκατάσταση/φθορά μνημείων
A1-2f	Μαύρη κρούστα	Fungi - Ascomycota	<i>Cladosporium parahalotolerans</i> (100%) [MF473154]	Αέρας εσωτερικού χώρου	Γένος που σχετίζεται με βιολογική φθορά (biopitting), δημιουργία σκούρου χρώματος πατίνας, σακχαρώδους υφής (sugaring), κρατήρων (οπών), θρυμματισμό, μαύρη κρούστα (De Leo et al., 2022)
A1-6f	Μαύρη κρούστα	Fungi - Ascomycota	<i>Knufia petricola</i> (100%) [KC978744]	Επιφάνεια πέτρας	Γένος που σχετίζεται με βιολογική φθορά (biopitting), δημιουργία κρατήρων (οπών), σακχαρώδους υφής (sugaring), θρυμματισμό, αποχρωματισμό, πατίνα, ορατές δομικές βλάβες (De Leo et al., 2022)
A1-8f	Μαύρη κρούστα	Fungi - Ascomycota	<i>Radulidium</i> sp. (98.9%) [MN482210]	Φύλλα	N/A
A3-1f	Μαύρη βιοδιάβρωση, με μπεζ χροιά κατά τόπους & μειωμένη περικρυσταλλική συνοχή	Fungi - Ascomycota	<i>Coniosporium apollinis</i> (99.4%) [AJ244272]	Επιφάνεια πέτρας	Γένος που σχετίζεται με βιολογική φθορά (biopitting), δημιουργία σκούρου χρώματος πατίνας, σακχαρώδους υφής (sugaring), κρατήρων (οπών), θρυμματισμό (De Leo et al., 2022)

A3-3f	Μαύρη βιοδιάβρωση, με μπεζ χροιά κατά τόπους & μειωμένη περικρυσταλλική συνοχή	Fungi - Ascomycota	<i>Talaromyces clemensii</i> (96.9%) [NR_168822]	Ξύλινη επιφάνεια	N/A
A4-1f	Φαιοκάστανη κρούστα	Fungi - Ascomycota	<i>Neodidymelliopsis</i> sp. (99.7%) [MK129271]	Φυτά	Παρόν σε βιουμένια στην επιφάνεια των τοίχων κρύπτης
A4-5f	Φαιοκάστανη κρούστα	Fungi - Ascomycota	<i>Pleosporales</i> sp. (99.6%) [MH473846]	Biocrust soil	N/A
A4-6f	Φαιοκάστανη κρούστα	Fungi - Ascomycota	<i>Aureobasidium pullulans</i> (100%) [MH931262]	Ενδόφυτο	Μαύρος μύκητας (black fungi), που σχετίζεται με μαύρη πατίνα, μαύρα στίγματα, διάβρωση/αποσύνθεση πέτρας, βιοφίλμ, αποχρωματισμός, μαύρη κρούστα (De Leo et al., 2022)
A4-7f	Φαιοκάστανη κρούστα	Fungi - Ascomycota	<i>Fusarium</i> sp. (100%) [MF076600]	Φυτό	Γένος που σχετίζεται με έκκριση οξέων, χρώση και βιοδιάβρωση (Pinheiro et al., 2019)
A4-8f	Φαιοκάστανη κρούστα	Fungi - Ascomycota	<i>Aspergillus</i> sp. (100%) [OL711854]	Άγνωστη	Μαύροι μύκητες (black fungi), που σχετίζεται με αποχρωματισμό, μαύρη πατίνα (έκκριση μελανίνης), βιοδιάβρωση λόγω ανάπτυξης υφών στο εσωτερικό της πέτρας και έκκρισης οξέων, μηχανική καταπόνηση (Romero et al., 2021)

A6-2f	Μαύρη βιοδιάβρωση με μπεζ χροιά & μειωμένη περικρυσταλλική συνοχή	Fungi - Ascomycota	<i>Penicillium sanguifluum</i> (99.8%) [OW988092]	Δέρμα ανθρώπου	Το γένος περιλαμβάνει είδη που σχετίζονται βιοδιάβρωση λόγω ανάπτυξης υφών στο εσωτερικό της πέτρας έκκρισης οξέων, μαύρα στίγματα (Agrawal et al., 2023)
A6-4f	Μαύρη βιοδιάβρωση με μπεζ χροιά & μειωμένη περικρυσταλλική συνοχή	Fungi - Ascomycota	<i>Knufia marmoricola</i> (99.6%) [OQ319960]	Άγνωστη	Γένος που σχετίζεται με βιολογική φθορά (biopitting), δημιουργία κρατήρων (οπών), σακχαρώδους υφής (sugaring), θρυμματισμό, αποχρωματισμό, πατίνα, ορατές δομικές βλάβες
A8-2f	Μαύρη βιοδιάβρωση, με μορφολογία συσσωματωμάτων κατά τύπους & μειωμένη περικρυσταλλική συνοχή σβώλους	Fungi - Ascomycota	<i>Penicillium crustosum</i> (100%) [MT872085]	Αχλάδι	Το γένος περιλαμβάνει είδη που σχετίζονται βιοδιάβρωση λόγω ανάπτυξης υφών στο εσωτερικό της πέτρας έκκρισης οξέων, μαύρα στίγματα (Agrawal et al., 2023)

**Πίνακας 18:** Ταξινομικός σχολιασμός βακτηρίων που απομονώθηκαν από το μνημείο Δελιγιάννη “Κοιμωμένη του Βιτσάρη” στο Α΄ Νεκροταφείο Αθηνών

Σημείο δειγματοληψίας-κωδικός στελέχους	Τύπος φθοράς	Ταξινόμηση (Domain-Phylum - class)	Κοντινότερος συγγενής (% ομοιότητας) [Accession Number]	Πηγή απομόνωσης του κοντινότερου συγγενή	Χαρακτηριστικά που σχετίζονται με την αποκατάσταση/φθορά μνημείων
Δ1 -2b	Μαύρη κρούστα	Bacteria – Bacillota - Bacilli	<i>Bacillus</i> sp. (100%) [MT582155]	Λύματα	Το γένος περιλαμβάνει είδη με ικανότητα εναπόθεσης CaCO <sub>3</sub> (Khedr et al., 2023)
Δ5 -2b	Φαιοκάστανη κρούστα	Bacteria – Actinomycetota - Actinomycetes	<i>Kocuria turfanensis</i> (100%) [MN826469]	Αέρας	Το γένος περιλαμβάνει είδη με ικανότητα εναπόθεσης CaCO <sub>3</sub> (Cacchio et al., 2004)
Δ5-3b	Φαιοκάστανη κρούστα	Bacteria – Bacillota - Bacilli	<i>Staphylococcus warneri</i> (99.8%) [MT642942]	Θαλασσινό νερό	Το γένος περιλαμβάνει είδη με ικανότητα εναπόθεσης CaCO <sub>3</sub> (Lors et al., 2023)
Δ5-4b	Φαιοκάστανη κρούστα	Bacteria – Actinomycetota - Actinomycetes	<i>Kocuria</i> sp. (100%) [MT568619]	Άγνωστη	Το γένος περιλαμβάνει είδη με ικανότητα εναπόθεσης CaCO <sub>3</sub> (Cacchio et al., 2004)
Δ7-2b	Φαινομενικά υγιής επιφάνεια	Bacteria – Actinomycetota - Actinomycetes	<i>Streptomyces</i> sp. (99.6%) [MT626100]	Έδαφος	N/A



Δ7 – 4b	Φαινομενικά υγιής επιφάνεια	Bacteria – Actinomycetota - Actinomycetes	<i>Streptomyces dioscori</i> (99%) [NR_165766]	Φυτά	N/A
Δ8 – 5b	Έντονη μαύρη βιοδιάβρωση & μειωμένη περικρυσταλλική συνοχή	Bacteria – Actinomycetota - Actinomycetes	<i>Arthrobacter agilis</i> (98.2%) [MT397140]	Πέτρα	Το γένος περιλαμβάνει είδη με ικανότητα εναπόθεσης CaCO <sub>3</sub> (Khedr et al., 2023)
Δ8 – 7b	Έντονη μαύρη βιοδιάβρωση & μειωμένη περικρυσταλλική συνοχή	Bacteria – Actinomycetota - Actinomycetes	<i>Arthrobacter</i> sp. (99.8%) [MT749865]	Έρημος	Το γένος περιλαμβάνει είδη με ικανότητα εναπόθεσης CaCO <sub>3</sub> (Khedr et al., 2023)
Δ8 – 8b	Έντονη μαύρη βιοδιάβρωση & μειωμένη περικρυσταλλική συνοχή	Bacteria – Actinomycetota - Actinomycetes	<i>Kocuria turfanensis</i> (99.2%) [KY022480]	Σκόνη	Το γένος περιλαμβάνει είδη με ικανότητα εναπόθεσης CaCO <sub>3</sub> (Cacchio et al., 2004)
Δ9 – 1b	Πορτοκαλόχροα περιοχή & μειωμένη περικρυσταλλική συνοχή	Bacteria - Gammaproteobacteria	<i>Xanthomonadales</i> bacterium (100%) [KX027360]	Ρίζες	N/A

Δ11 – 3b	Έντονη μαύρη βιοδιάβρωση & μειωμένη περικρυσταλλική συνοχή	Bacteria – Actinomycetota - Actinomycetes	<i>Streptomyces griseovorticillatus</i> (99.7%) [MN309777]	Έδαφος	N/A
----------	--	---	--	--------	-----

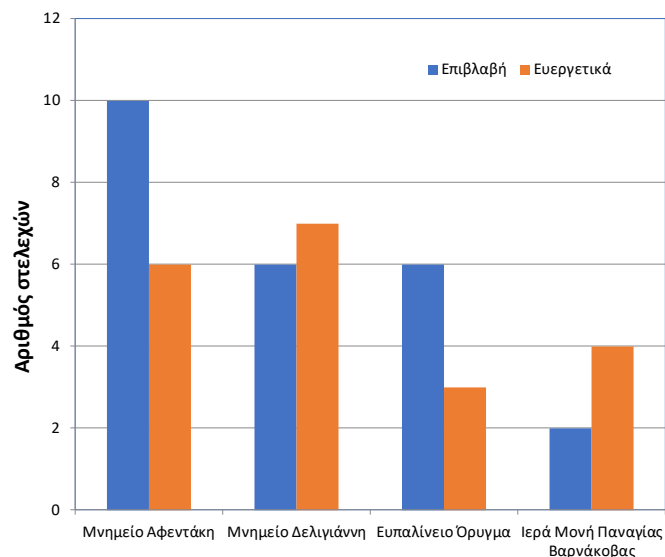
**Πίνακας 19:** Ταξινομικός σχολιασμός μυκήτων που απομονώθηκαν από το μνημείο Δελιγιάννη “Κοιμωμένη του Βιτσάρη” στο Α΄ Νεκροταφείο Αθηνών

Σημείο δειγματοληψίας-κωδικός στελέχους	Τύπος φθοράς	Ταξινόμηση	Κοντινότερος συγγενής (% ομοιότητας) [Accession Number]	Πηγή απομόνωσης του κοντινότερου συγγενή	Χαρακτηριστικά που σχετίζονται με την αποκατάσταση/φθορά μνημείων
Δ1 -1f	Μαύρη κρούστα	Fungi - Ascomycota	<i>Penicillium corylophilum</i> (100%) [MH861216]	Άγνωστη	Το γένος περιλαμβάνει είδη που σχετίζονται βιοδιάβρωση λόγω ανάπτυξης υφών στο εσωτερικό της πέτρας έκκρισης οξέων, μαύρα στίγματα (Agrawal et al., 2023)
Δ2-1f	Μαύρη βιοδιάβρωση & μειωμένη περικρυσταλλική συνοχή	Fungi - Ascomycota	<i>Neosetophoma italica</i> (99.8%) [KP711356]	Φυτά	N/A
Δ2-2f	Μαύρη βιοδιάβρωση & μειωμένη περικρυσταλλική συνοχή	Fungi - Ascomycota	<i>Penicillium crustosum</i> (100%) [MT872085]	Φρούτα	Το γένος περιλαμβάνει είδη που σχετίζονται βιοδιάβρωση λόγω ανάπτυξης υφών στο εσωτερικό της πέτρας έκκρισης οξέων, μαύρα

					στίγματα (Agrawal et al., 2023)
Δ2-3f	Μαύρη βιοδιάβρωση & μειωμένη περικρυσταλλική συνοχή	Fungi - Ascomycota	<i>Alternaria alternata</i> (100%) [MN622992]	Φυτά	Μαύρος μύκητας (black fungi), που σχετίζεται με μαύρη κρούστα, μαύρα στίγματα, μαύρη πατίνα, πατίνα πράσινου έως σκούρου πράσινου χρώματος, αποκόλληση κόκκων μαρμάρου, βιοφίλμ (De Leo et al., 2022)
Δ2-5f	Μαύρη βιοδιάβρωση & μειωμένη περικρυσταλλική συνοχή	Fungi - Ascomycota	<i>Pseudopithomyces chartarum</i> (100%) [OU989486]	Γούνα νυχτερίδας	N/A
Δ5-1f	Φαιοκάστανη κρούστα	Fungi - Ascomycota	<i>Apiospora marii</i> (100%) [KF144900]	Φύλλα	N/A
Δ7-1f	Φαινομενικά υγιής επιφάνεια	Fungi - Ascomycota	<i>Alternaria alternata</i> (100%) [MN622992]	Φυτά	Μαύρος μύκητας (black fungi), που σχετίζεται με μαύρη κρούστα, μαύρα στίγματα, μαύρη πατίνα, πατίνα πράσινου έως σκούρου πράσινου χρώματος, αποκόλληση κόκκων μαρμάρου, βιοφίλμ (De Leo et al., 2022)
Δ8-1f	Έντονη μαύρη βιοδιάβρωση & μειωμένη περικρυσταλλική συνοχή	Fungi - Ascomycota	<i>Cladosporium limoniforme</i> (99.7%) [MF473137]	Αέρας εσωτερικού χώρου	Γένος που σχετίζεται με βιολογική φθορά (biopitting), δημιουργία σκούρου χρώματος πατίνας, σακχαρώδους υφής (sugaring), κρατήρων (οπών), θρυμματισμό, μαύρη κρούστα (De Leo et al., 2022)

Δ8-2f	Έντονη μαύρη βιοδιάβρωση & μειωμένη περικρυσταλλική συνοχή	Fungi - Ascomycota	<i>Pithomyces chartarum</i> (100%) [KT898697]	Περγαμηνή	N/A
Δ8-4f	Έντονη μαύρη βιοδιάβρωση & μειωμένη περικρυσταλλική συνοχή	Fungi - Ascomycota	<i>Aureobasidium pullulans</i> (100%) [MH931262]	Φυτά	Μαύρος μύκητας (black fungi), που σχετίζεται με μαύρη πατίνα, μαύρα στίγματα, διάβρωση/αποσύνθεση πέτρας, βιοφίλμ, αποχρωματισμός, μαύρη κρούστα (De Leo et al., 2022)
Δ11-1f	Έντονη μαύρη βιοδιάβρωση & μειωμένη περικρυσταλλική συνοχή	Fungi - Ascomycota	<i>Penicillium dipodomycicola</i> (99.7%) [MF281348]	Ξύλινη επιφάνεια	Το γένος περιλαμβάνει είδη που σχετίζονται βιοδιάβρωση λόγω ανάπτυξης υφών στο εσωτερικό της πέτρας έκκρισης οξέων, μαύρα στίγματα (Agrawal et al., 2023)

Σε κάθε μνημείο εντοπίζονται αμφότερα επιζήμιοι και επωφελείς για τις λίθινες επιφάνειες μικροοργανισμοί. Οι πλησιέστεροι συγγενείς των μικροοργανισμών που καλλιεργήθηκαν στο εργαστήριο ανήκουν σε ταξινομικές ομάδες που μπορούν να προκαλέσουν αλλοιώσεις στις επιφάνειες των μνημείων, αλλά και σε δυνητικά ευεργετικά είδη με ικανότητα εναπόθεσης ανθρακικού ασβεστίου (Διάγραμμα 2). Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, 20 από τα 52 απομονωθέντα και ταυτοποιημένα βακτήρια από τα επιδεικτικά μνημεία συνδέονται με ευεργετικές επιδράσεις για την αποκατάσταση λίθινων επιφανειών και πιο συγκεκριμένα με τη δυνατότητα εναπόθεσης ανθρακικού ασβεστίου για τη πλήρωση ρωγμών, χαρακτηρίζοντας τα συγκεκριμένα στελέχη ως ασβεστοπαραγωγικά βακτήρια. Οι περισσότεροι μικροοργανισμοί που συνδέονται με φαινόμενα υποβάθμισης των μνημείων ανήκουν στην τάξη των μυκήτων. Αρκετοί μύκητες που απομονώθηκαν από τα επιδεικτικά μνημεία ανήκουν στα γένη *Alternaria* (μνημείο Δελιγιάννη), *Aspergillus* (Ευπαλίνειο όρυγμα και μνημείο Αφεντάκη), *Cladosporium* (μνημεία Αφεντάκη και Δελιγιάννη), *Coniosporium* (μνημείο Αφεντάκη), *Fusarium* (μνημείο Αφεντάκη) και *Penicillium* (εντοπίζεται σε όλα τα μνημεία) αναφέρεται στη βιβλιογραφία ότι ευθύνονται για την πρόκληση φυσικοχημικών φθορών και αισθητικών αλλοιώσεων, καθώς έχουν εντοπισθεί σε φθαρμένες επιφάνειες μνημείων. Πιο συγκεκριμένα, οι καταστρεπτικές επιδράσεις τους περιλαμβάνουν εμφάνιση χρώσεων, εκκρίσεις διαβρωτικών οξέων, πρόκληση σακχαρώδους υφής, αλλοιώσεις σε σχήμα κρατήρα, μεταβολή της χημικής σύνθεσης των λίθων, δημιουργία βιολογικής πατίνας και αποσταθεροποίηση της δομής των λίθινων υποστρωμάτων, εξαιτίας της διείσδυσης των μυκηλίων τους στο εσωτερικό των πόρων, με αποτέλεσμα τη πρόκληση μηχανικών βλαβών που οδηγούν σε φαινόμενα θρυμματισμού, απολέπισης ή ακόμα και μη αντιστρεπτής απόσπασης λίθινων θραυσμάτων από το υπόστρωμα (Πίνακες 13,15,17,19).



**Διάγραμμα 2:** Αριθμός δυνητικά επιβλαβών και ωφέλιμων στελεχών για τις λίθινες επιφάνειες που απομονώθηκαν και καλλιεργήθηκαν από τα σημεία δειγματοληψίας κάθε μνημείου.

Γενικότερα, οι πλησιέστεροι συγγενείς των μεμονωμένων στελεχών έχουν απομονωθεί από το έδαφος, τα φυτά (ρίζες, φύλλα), τη γούνα ζώων, τη σκόνη και τον αέρα, ενώ τρία βακτήρια που απομονώθηκαν από τα μνημεία της Αφεντάκη και της Ιεράς Μονής Παναγίας Βαρνάκοβας συνδέονται με τα είδη *Staphylococcus warneri* και *Metabacillus litoralis* που

απομονώθηκαν από δείγματα θαλασσινού νερού. Επιπλέον, αρκετά στελέχη από το σύνολο των μνημείων σχετίζονται με βακτηριακά και μυκητιακά είδη που εντοπίζονται σε λίθινες, μαρμάρινες, ασβεστολιθικές, ξύλινες, χάρτινες επιφάνειες και τοιχογραφίες από μνημεία και αντικείμενα πολιτιστικής κληρονομιάς σε παγκόσμιο επίπεδο.

### 3.3 Ανάπτυξη απομονωθέντων βακτηρίων σε υγρές καλλιέργειες

Από το σύνολο των μνημείων, καλλιεργήθηκαν, απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν επιτυχώς 52 βακτήρια, στα οποία πραγματοποιείται προσδιορισμός του ρυθμού ανάπτυξης των κυττάρων τους, σύμφωνα με τις καμπύλες αναφοράς του χρονικού ρυθμού μεταβολής της συγκέντρωσης ξηρής κυτταρικής μάζας (g DCW/L) και του pH της υγρής τους καλλιέργειας.

Οι λογιστικές εξισώσεις είναι ένα σύνολο εξισώσεων στις οποίες η κυτταρική ανάπτυξη παρουσιάζεται με όρους δυναμικού μεταφοράς. Η συνήθης προσέγγιση βασίζεται στην υπόθεση ότι ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης σχετίζεται με την ποσότητα του αχρησιμοποίητου δυναμικού μεταφοράς σύμφωνα με την Εξίσωση 1:

$$\mu = k \left( 1 - \frac{X}{X_{\max}} \right) \quad (\text{Εξίσωση 1})$$

,όπου  $\mu$  ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης του μικροοργανισμού ( $h^{-1}$ ),  $k$  το δυναμικό μεταφοράς ( $h^{-1}$ ),  $X$  η συγκέντρωση της κυτταρικής μάζας μία δεδομένη χρονική στιγμή  $t$  (g DCW/L) και  $X_{\max}$  η μέγιστη συγκέντρωση κυτταρικής μάζας που μπορεί να παραχθεί στο συγκεκριμένο περιβάλλον ανάπτυξης (g DCW/L).

Συνεπώς, ο ρυθμός μεταβολής της κυτταρικής μάζας δίνεται από την Εξίσωση 2:

$$\frac{dX}{dt} = kX \left( 1 - \frac{X}{X_{\max}} \right) \quad (\text{Εξίσωση 2})$$

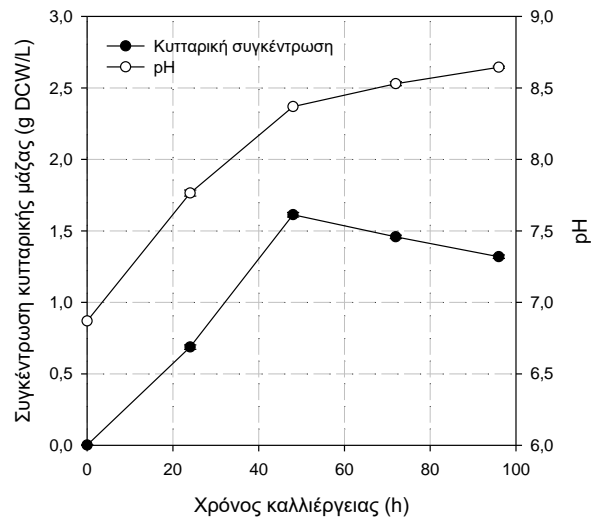
Με ολοκλήρωση προκύπτει η Εξίσωση 3:

$$X = \frac{X_0 e^{kt}}{1 - \frac{X_0}{X_{\max}} (1 - e^{kt})} \quad (\text{Εξίσωση 3})$$

,όπου  $X$  η συγκέντρωση της κυτταρικής μάζας μία δεδομένη χρονική στιγμή  $t$  (g DCW/L),  $X_0$  η συγκέντρωση της κυτταρικής μάζας κατά την έναρξη της καλλιέργειας (g DCW/L),  $X_{\max}$  η μέγιστη συγκέντρωση κυτταρικής μάζας που μπορεί να παραχθεί στο συγκεκριμένο περιβάλλον ανάπτυξης (g DCW/L),  $t$  χρόνος καλλιέργειας (h) και  $k$  το δυναμικό μεταφοράς ( $h^{-1}$ ).

Τα δεδομένα κυτταρικής ανάπτυξης του συνόλου των απομονωθέντων βακτηρίων προσαρμόζονται στη λογιστική εξίσωση (Εξίσωση 3) και εκτιμώνται τα κινητικά χαρακτηριστικά ανάπτυξής τους. Επιπλέον, πραγματοποιείται μελέτη του βακτηρίου *Mycococcus xanthus* ATCC 435 (προμηθεύτηκε από την DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH), το οποίο σύμφωνα με τη δημοσίευση των

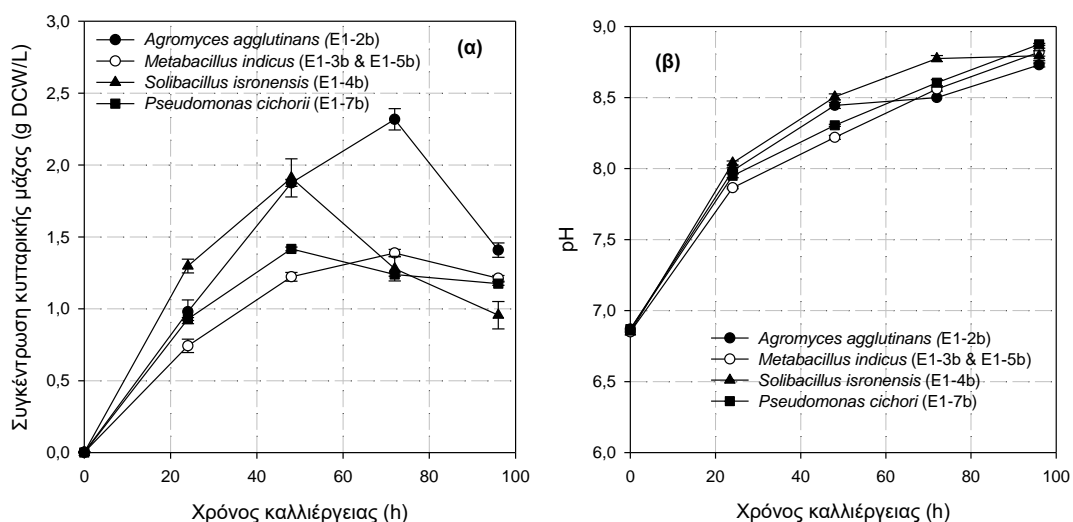
Rodriguez-Navarro et al. (2003), είναι γνωστό για την ικανότητά του να εναποθέτει ανθρακικό ασβέστιο. Η ανάπτυξη του βακτηρίου *Μγχοσoccus xanthus* ATCC 435, μέσω μελέτης του χρονικού ρυθμού μεταβολής της κυτταρικής του συγκέντρωσης και του pH της καλλιέργειας παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 3.



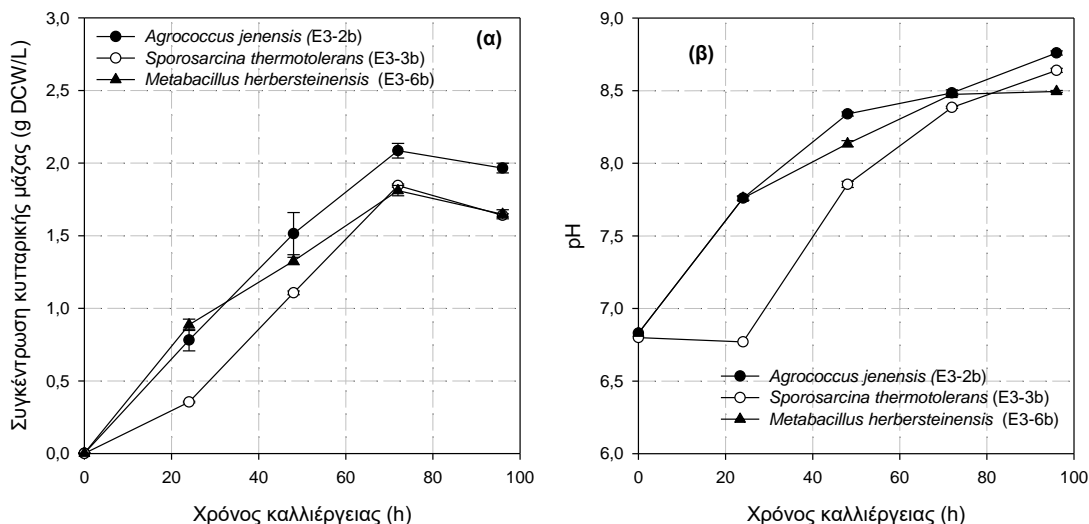
**Διάγραμμα 3:** Χρονική μεταβολή της συγκέντρωσης κυτταρικής μάζας και του pH κατά την ανάπτυξη του βακτηρίου *Μγχοσoccus xanthus* ATCC 435 σε υγρή καλλιέργεια.

Η μέγιστη συγκέντρωση κυτταρικής μάζας παρατηρείται στις 48 ώρες της καλλιέργειας ( $1.61 \pm 0.02$  g DCW/L). Το pH της καλλιέργειας αυξήθηκε από την τιμή 6.8 στην τιμή 8.4 στο σημείο μέγιστης ανάπτυξης και το δυναμικό μεταφοράς του βακτηρίου υπολογίζεται ίσο με  $0.261 \pm 0.014$  h<sup>-1</sup>.

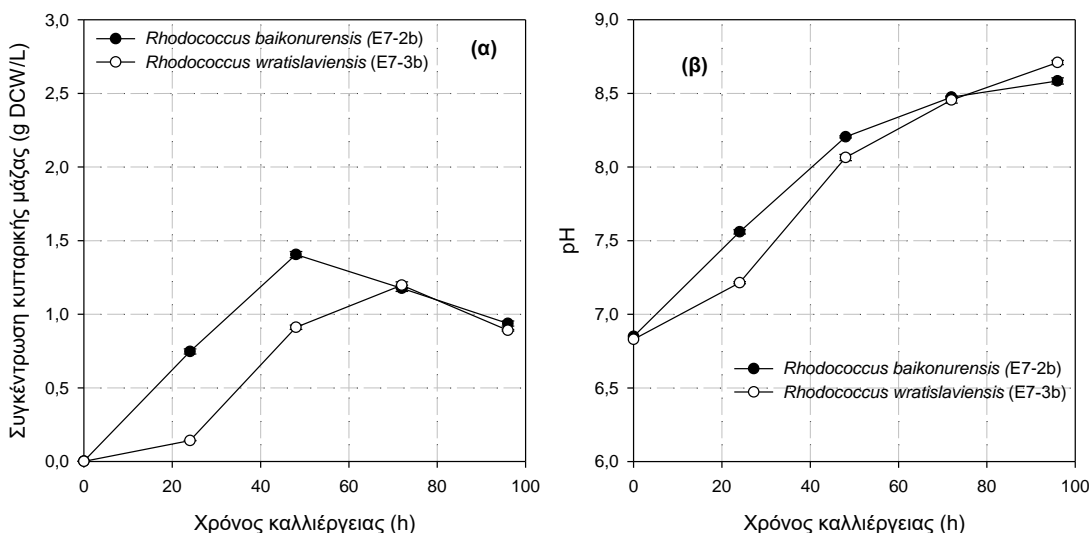
Σύμφωνα με τα δεδομένα του χρονικού ρυθμού ανάπτυξης των βακτηρίων που απομονώθηκαν από τα σημεία δειγματοληψίας στο Ευπαλίνιο όρυγμα (Διαγράμματα 4,5,6), κατασκευάζονται οι καμπύλες αναφοράς χρονικής μεταβολής συγκέντρωσης κυτταρικής μάζας και pH υγρής καλλιέργειας.



**Διαγράμματα 4:** Χρονική μεταβολή (α) της συγκέντρωσης κυτταρικής μάζας και (β) του pH κατά την ανάπτυξη των βακτηρίων *Agromyces agglutinans*, *Metabacillus indicus*, *Solibacillus isronensis* και *Pseudomonas cichori* που απομονώθηκαν από το Ευπαλίνιο Όρυγμα (Σημείο δειγματοληψίας E1).



**Διαγράμματα 5:** Χρονική μεταβολή (α) της συγκέντρωσης κυτταρικής μάζας και (β) του pH κατά την ανάπτυξη των βακτηρίων *Agrococcus jenensis*, *Sporosarcina thermotolerans*, *Metabacillus herbersteinensis* που απομονώθηκαν από το Ευπαλίειο Όρυγμα (Σημείο δειγματοληψίας E3).



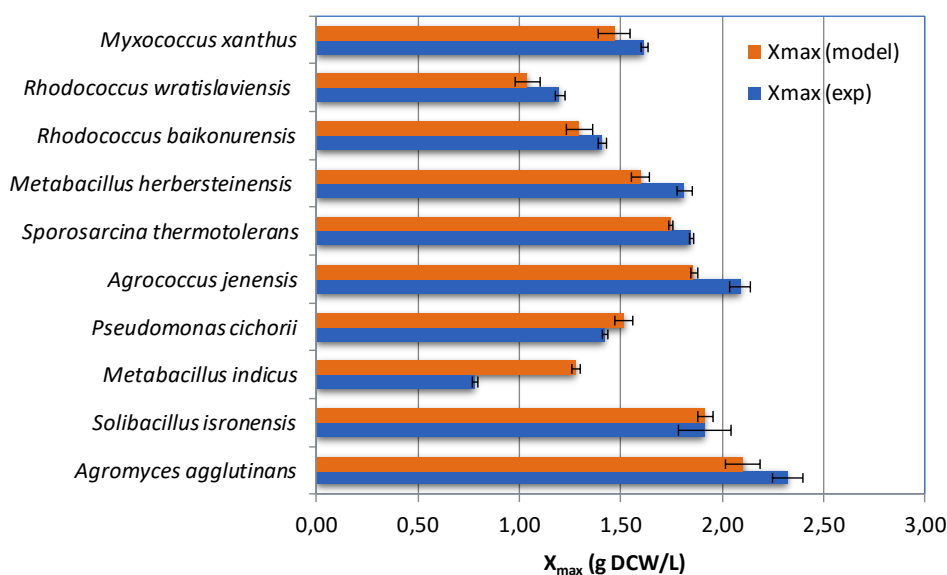
**Διαγράμματα 6:** Χρονική μεταβολή (α) της συγκέντρωσης κυτταρικής μάζας και (β) του pH κατά την ανάπτυξη των βακτηρίων *Rhodococcus baikonurensis* και *Rhodococcus wratislaviensis* που απομονώθηκαν από το Ευπαλίειο Όρυγμα (Σημείο δειγματοληψίας E7).

Όπως παρατηρείται από τις καμπύλες χρονικού ρυθμού μεταβολής της κυτταρικής μάζας των βακτηρίων που απομονώθηκαν από το Ευπαλίειο όρυγμα (Διαγράμματα 4α,5α,6α), τρία εξ' αυτών και πιο συγκεκριμένα τα είδη *S. isronensis*, *P. Cichori* και *R.baikonurensis*, εμφανίζουν τη μέγιστη κυτταρική συγκέντρωση μάζας, έπειτα από επώαση για 48 ώρες, ενώ στα υπόλοιπα βακτήρια η μέγιστη κυτταρική συγκέντρωση εντοπίζεται στις 72 ώρες ανάπτυξης. Η απουσία λανθάνουσας φάσης κατά την κυτταρική ανάπτυξη οφείλεται στη λήψη των προς εμβολιασμό κυττάρων από την εκθετική φάση ανάπτυξης των βακτηρίων.



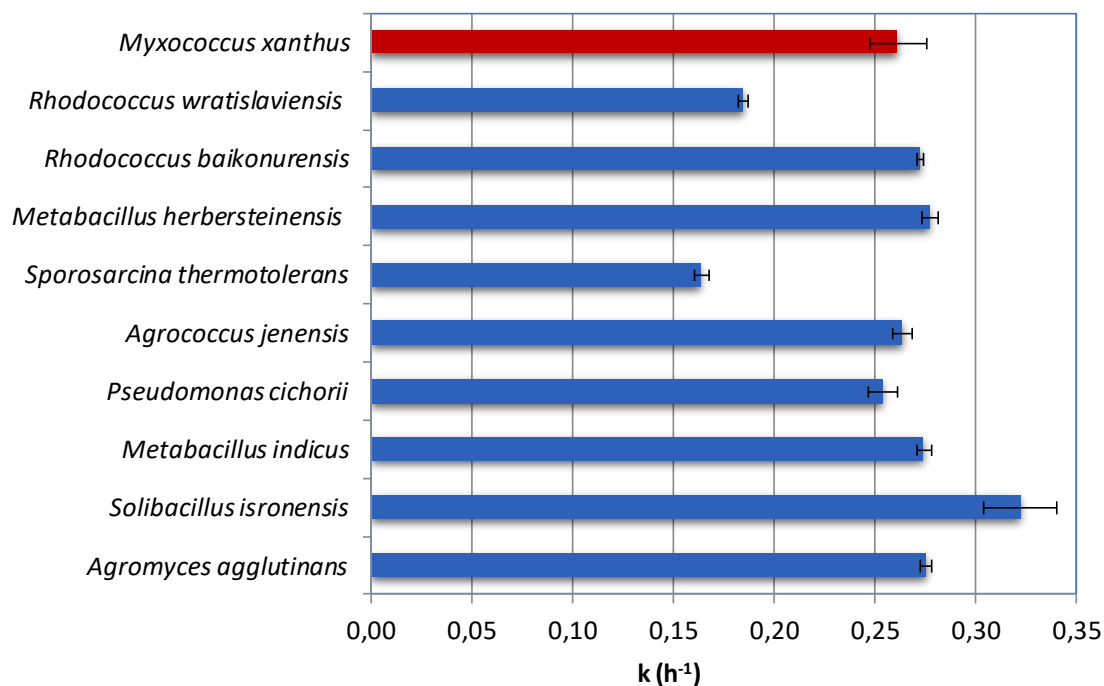
Όσο αναφορά τη χρονική μεταβολή του pH της υγρής καλλιέργειας των βακτηρίων (Διαγράμματα 4β,5β,6β), η τιμή του φαίνεται να αυξάνεται διαρκώς με την επίτευξη της μέγιστης κυτταρικής συγκέντρωσης να πραγματοποιείται σε τιμές pH μεταξύ 8.2-8.6.

Τα αποτελέσματα της χρονικής μεταβολής της κυτταρικής συγκέντρωσης των βακτηρίων προσαρμόζονται στη λογιστική εξίσωση (Εξίσωση 3), για τον υπολογισμό των κινητικών χαρακτηριστικών της μέγιστης συγκέντρωσης κυτταρικής μάζας ( $X_{max}$ ) και του δυναμικού μεταφοράς ( $k$ ) του εκάστοτε βακτηρίου (Διαγράμματα 7,8).



**Διάγραμμα 7:** Μέγιστες πειραματικές και προβλεπόμενες από τη λογιστική εξίσωση τιμές συγκέντρωσης κυτταρικής μάζας των βακτηρίων που απομονώθηκαν από το Ευπαλίνιο όρυγμα

Σύμφωνα με το Διάγραμμα 7, το μοντέλο πρόβλεψης της μέγιστης κυτταρικής συγκέντρωσης προσεγγίζει ικανοποιητικά τη πλειοψηφία των περιπτώσεων ανάπτυξης των βακτηρίων που απομονώθηκαν από το Ευπαλίνιο όρυγμα στις υγρές καλλιέργειες του θρεπτικού μέσου Nutrient Broth.

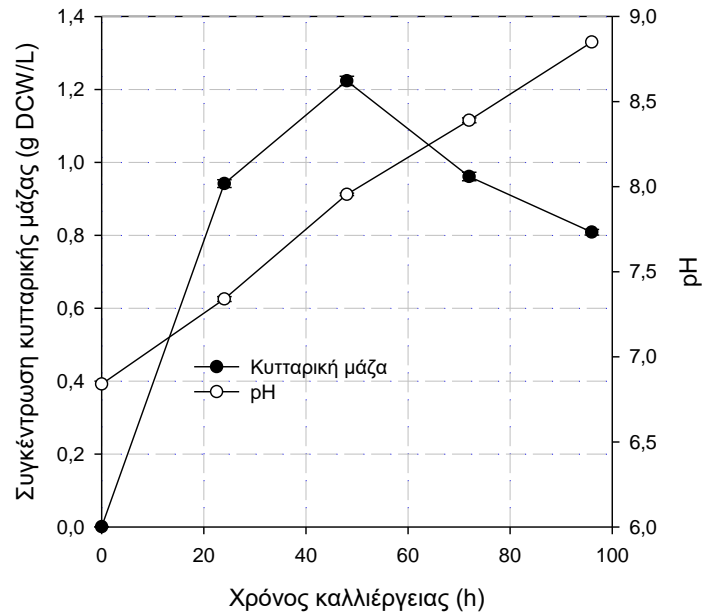


**Διάγραμμα 8:** Δυναμικό μεταφοράς των βακτηρίων που απομονώθηκαν από το Ευπαλίειο όρυγμα. Η ράβδος με κόκκινο χρώμα αφορά στο δυναμικό μεταφοράς του βακτηρίου *M. xanthus* ATCC 435.

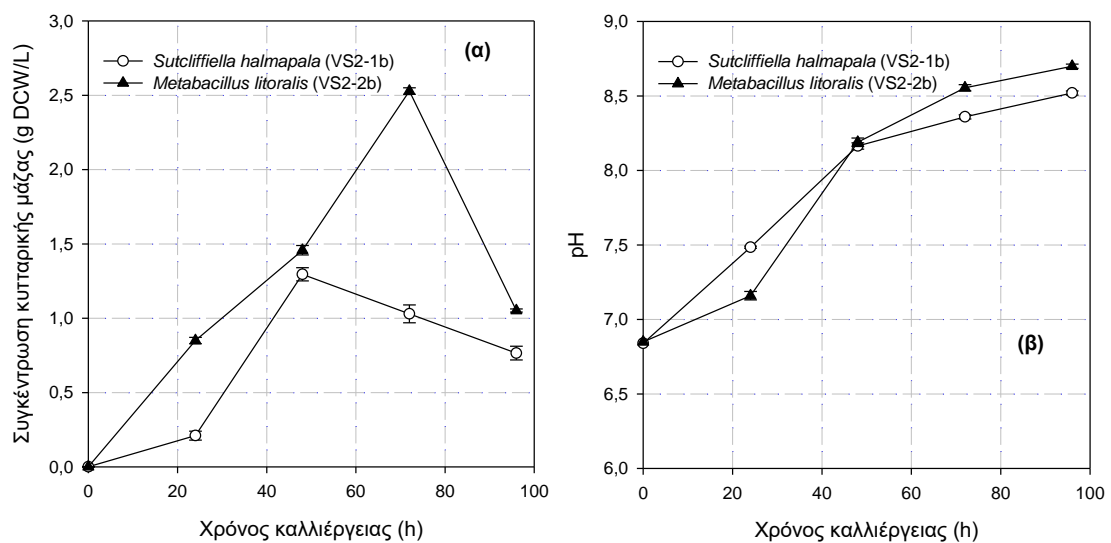
Όσο αναφορά το δυναμικό μεταφοράς των βακτηρίων (Διάγραμμα 8), κυμαίνεται στα ίδια επίπεδα για τη πλειονότητα των περιπτώσεων σε τιμές μεταξύ  $0.26-0.28 h^{-1}$ , ενώ για το στέλεχος *S. isronensis* εμφανίζεται η υψηλότερη τιμή του στα  $0.32 h^{-1}$  και για τα είδη *S. thermotolerans* και *R. wratislaviensis* οι χαμηλότερες τιμές ( $0.16-0.18 h^{-1}$ ).

Συγκεντρωτικά από τα αποτελέσματα των Διαγραμμάτων 8 και 9, το βακτήριο *S. isronensis* εμφανίζει το υψηλότερο δυναμικό μεταφοράς ( $k=0.322 \pm 0.018 h^{-1}$ ) με μέγιστη κυτταρική συγκέντρωση ίση με  $X_{max} = 1.91 \pm 0.13 g DCW/L$  (στις 48 ώρες καλλιέργειας), ενώ το βακτήριο *S. thermotolerans* παρουσιάζει σχεδόν υποδιπλάσιο δυναμικό μεταφοράς ( $k=0.163 \pm 0.004 h^{-1}$ ), με παρόμοια μέγιστη κυτταρική συγκέντρωση ( $1.85 \pm 0.01 g DCW/L$ , στις 72 ώρες καλλιέργειας). Αργό ρυθμό ανάπτυξης ( $k=0.184 \pm 0.002 h^{-1}$ ) εμφανίζει και το βακτήριο *R. wratislaviensis* με συγκριτικά χαμηλή μέγιστη συγκέντρωση κυττάρων ( $1.65 \pm 0.02 g DCW/L$ , στις 72 ώρες ανάπτυξης). Τα βακτήρια *A. agglutinans*, *M. indicus*, *P. cichorii*, *A. jenensis*, *M. herbersteinensis*, *R. baikonurensis* εμφανίζουν παραπλήσιους ρυθμούς ανάπτυξης (παρόμοιες τιμές του δυναμικού μεταφοράς που κυμαίνονται μεταξύ  $0.26-0.28 h^{-1}$ ). Η μέγιστη κυτταρική συγκέντρωση στα προαναφερθέντα βακτήρια κυμαίνεται από  $0.78 \pm 0.02 g DCW/L$  για το βακτήριο *M. indicus* (72 ώρες καλλιέργειας) έως  $2.32 \pm 0.07 g DCW/L$  για το βακτήριο *A. agglutinans* (72 ώρες καλλιέργειας).

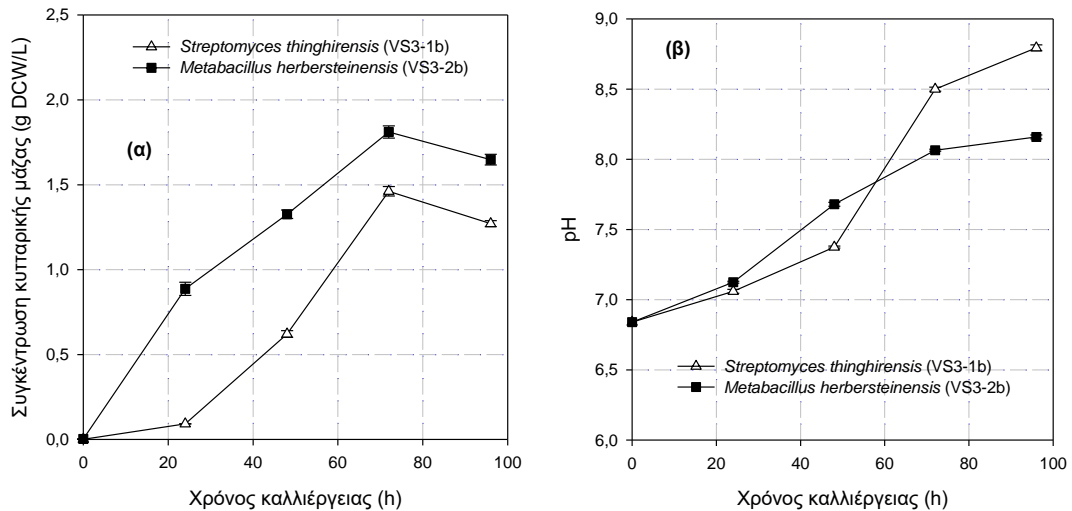
Σύμφωνα με τα δεδομένα του χρονικού ρυθμού ανάπτυξης των βακτηρίων που απομονώθηκαν από τα σημεία δειγματοληψίας στην Ιερά Μονή Παναγίας Βαρνάκοβας (Διαγράμματα 9,10,11,12,13,14,15,16), κατασκευάζονται οι καμπύλες αναφοράς χρονικής μεταβολής της συγκέντρωσης κυτταρικής μάζας και pH υγρής καλλιέργειας.



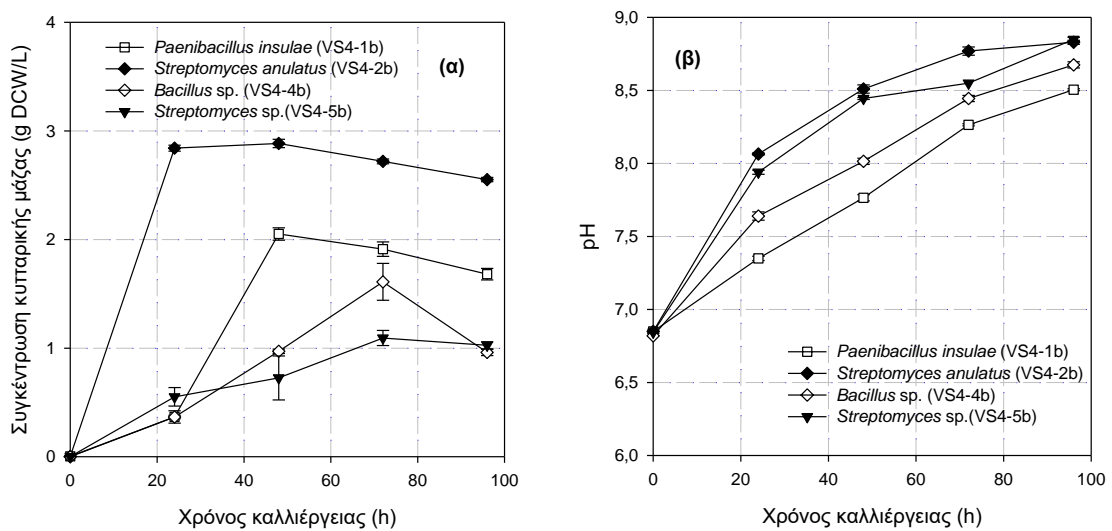
**Διάγραμμα 9:** Χρονική μεταβολή της συγκέντρωσης κυτταρικής μάζας και του pH κατά την ανάπτυξη του βακτηρίου *Peribacillus frigoritolerans* που απομονώθηκε από τον τύπο πωρόλιθου S στην Ιερά Μονή Παναγίας Βαρνάκοβας (Σημείο δειγματοληψίας VS1).



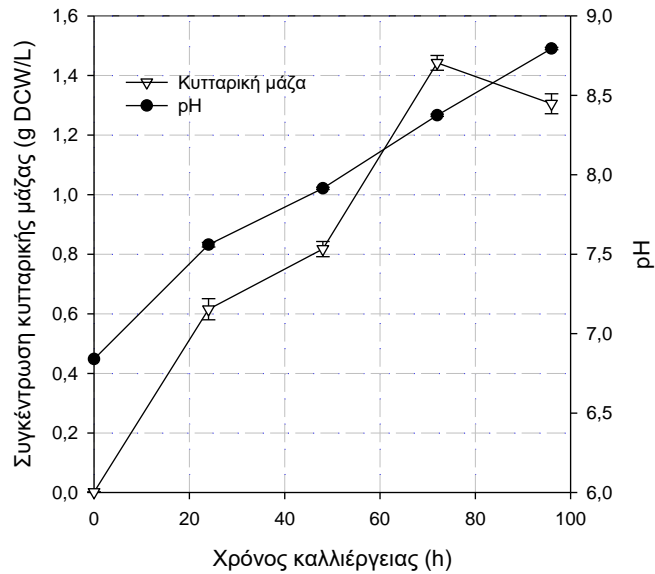
**Διάγραμμα 10:** Χρονική μεταβολή (α) της συγκέντρωσης κυτταρικής μάζας και (β) του pH κατά την ανάπτυξη των βακτηρίων *Sutcliffiella halmapala* και *Metabacillus litoralis* που απομονώθηκαν από τον τύπο πωρόλιθου S στην Ιερά Μονή Παναγίας Βαρνάκοβας (Σημείο δειγματοληψίας VS2).



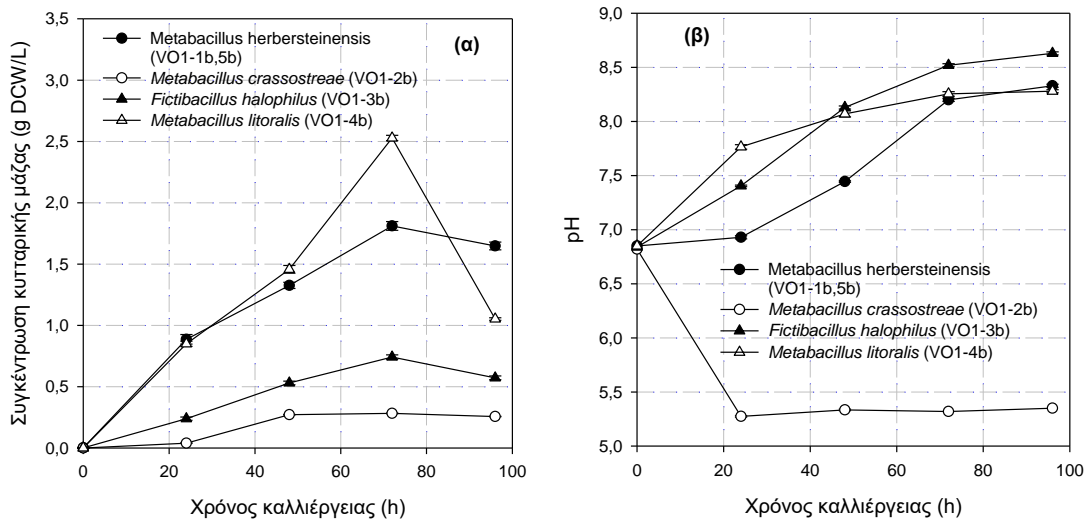
**Διάγραμμα 11:** Χρονική μεταβολή (α) της συγκέντρωσης κυτταρικής μάζας και (β) του pH κατά την ανάπτυξη των βακτηρίων *Streptomyces thinghirensis* και *Metabacillus herbersteinensis* που απομονώθηκαν από τον τύπο πωρόλιθου S στην Ιερά Μονή Παναγίας Βαρνάκοβας (Σημείο δειγματοληψίας VS3).



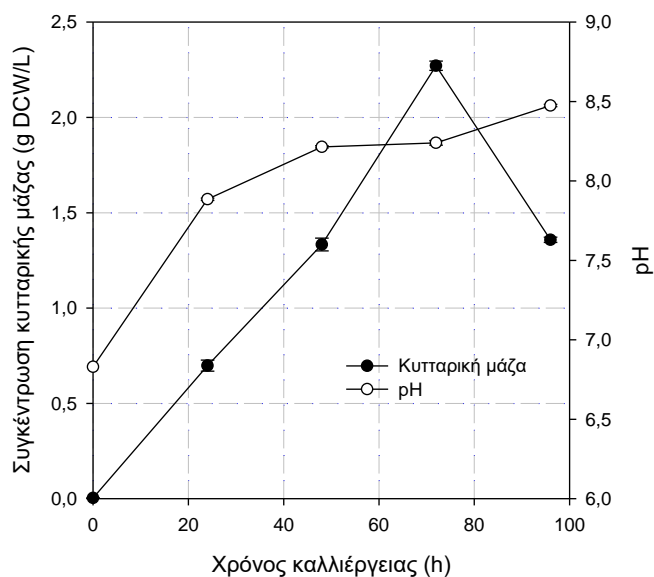
**Διάγραμμα 12:** Χρονική μεταβολή (α) της συγκέντρωσης κυτταρικής μάζας και (β) του pH κατά την ανάπτυξη των βακτηρίων *Paenibacillus insulae*, *Streptomyces anulatus*, *Bacillus* sp. και *Streptomyces* sp. που απομονώθηκαν από τον τύπο πωρόλιθου S στην Ιερά Μονή Παναγίας Βαρνάκοβας (Σημείο δειγματοληψίας VS4).



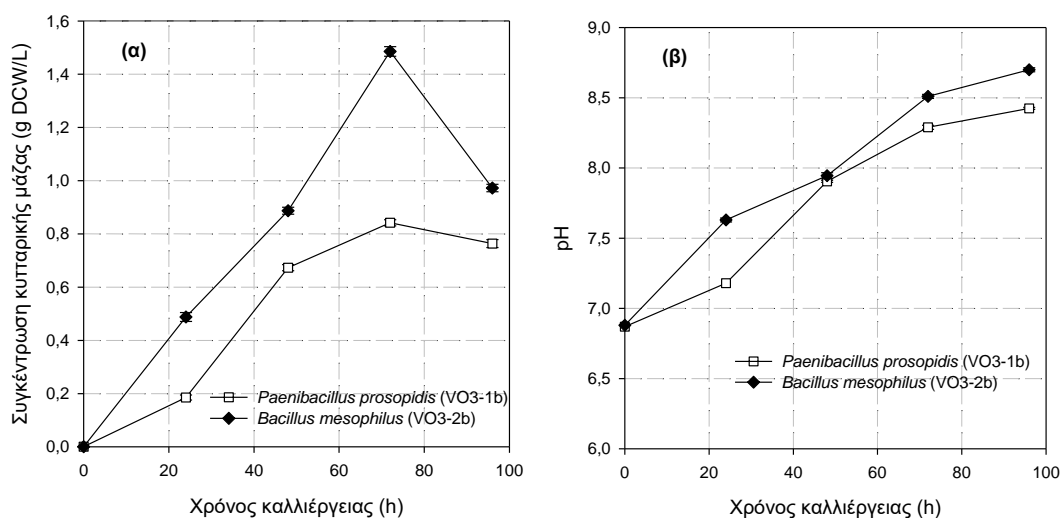
**Διάγραμμα 13:** Χρονική μεταβολή της συγκέντρωσης κυτταρικής μάζας και του pH κατά την ανάπτυξη του βακτηρίου *Bacillus* sp. που απομονώθηκε από τον τύπο πωρόλιθου S στην Ιερά Μονή Παναγίας Βαρνάκοβας (Σημείο δειγματοληψίας VS5).



**Διάγραμμα 14:** Χρονική μεταβολή (α) της συγκέντρωσης κυτταρικής μάζας και (β) του pH κατά την ανάπτυξη των βακτηρίων *Metabacillus herbersteinensis*, *Metabacillus crassostreae*, *Fictibacillus halophilus* και *Metabacillus litoralis* που απομονώθηκαν από τον τύπο πωρόλιθου O στην Ιερά Μονή Παναγίας Βαρνάκοβας (Σημείο δειγματοληψίας VO1).



**Διάγραμμα 15:** Χρονική μεταβολή της συγκέντρωσης κυτταρικής μάζας και του pH κατά την ανάπτυξη του βακτηρίου *Paenibacillus harenae* που απομονώθηκε από τον τύπο πωρόλιθου Ο στην Ιερά Μονή Παναγίας Βαρνάκοβας (Σημείο δειγματοληψίας VO2).



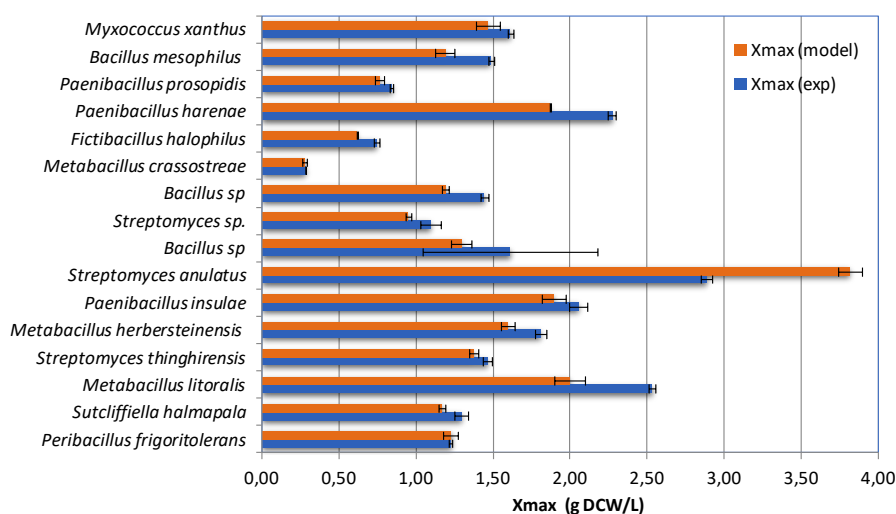
**Διάγραμμα 16:** Χρονική μεταβολή (α) της συγκέντρωσης κυτταρικής μάζας και (β) του pH κατά την ανάπτυξη των βακτηρίων *Paenibacillus prosopidis* και *Bacillus mesophilus* που απομονώθηκαν από τον τύπο πωρόλιθου Ο στην Ιερά Μονή Παναγίας Βαρνάκοβας (Σημείο δειγματοληψίας VO3).

Όπως παρατηρείται από τις καμπύλες χρονικού ρυθμού μεταβολής της κυτταρικής συγκέντρωσης των βακτηρίων που απομονώθηκαν από την Ιερά Μονή Παναγίας Βαρνάκοβας (Διαγράμματα 9,10α,11α,12α,13,14α,15,16α), πέντε εξ' αυτών και πιο συγκεκριμένα τα είδη *P. frigiditolerans*, *S.halmapala*, *P. Insulae*, *S.anulatus* και *M. crassostreae* εμφανίζουν τη μέγιστη συγκέντρωση κυτταρικής μάζας, έπειτα από επώαση για 48 ώρες (Διαγράμματα 9,10α,12α,14α), ενώ στα υπόλοιπα βακτήρια η μέγιστη κυτταρική συγκέντρωση επιτυγχάνεται στις 72 ώρες (Διαγράμματα 9,

10α,11α,12α,13,14α,15,16α). Επιπλέον, παρατηρείται λανθάνουσα φάση ανάπτυξης διάρκειας 24 ωρών για τα βακτήρια *S.halmapala*, *S. thinghirensis*, *P. insulae*, *Bacillus sp.*, *M. Crassostreae* και *P. prosopidis*.

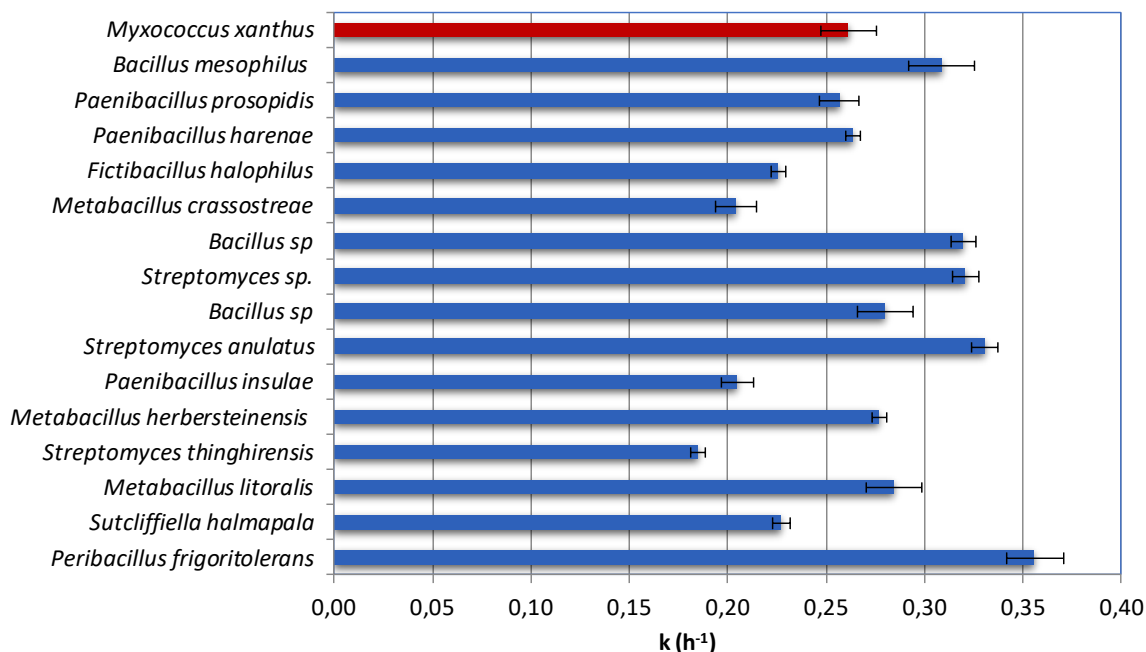
Όσο αναφορά τη χρονική μεταβολή του pH της υγρής καλλιέργειας των βακτηρίων (Διαγράμματα 9,10β,11β,12β,13,14β,15,16β), η τιμή του φαίνεται να αυξάνεται διαρκώς με την επίτευξη της μέγιστης κυτταρικής συγκέντρωσης να πραγματοποιείται σε τιμές pH μεταξύ 8.2-8.7, εκτός του στελέχους *M. crassostreae*, το οποίο ελαττώνει το pH, διατηρώντας το καθόλη τη διάρκεια ανάπτυξής του σταθερά στη τιμή 5.3.

Τα αποτελέσματα της χρονικής μεταβολής της κυτταρικής συγκέντρωσης των βακτηρίων προσαρμόζονται στη λογιστική εξίσωση (Εξίσωση 3), για τον υπολογισμό των κινητικών χαρακτηριστικών της μέγιστης συγκέντρωσης κυτταρικής μάζας ( $X_{max}$ ) και του δυναμικού μεταφοράς ( $k$ ) του εκάστοτε βακτηρίου (Διαγράμματα 17,18).



**Διάγραμμα 17:** Μέγιστες πειραματικές και προβλεπόμενες από τη λογιστική εξίσωση τιμές συγκέντρωσης κυτταρικής μάζας των βακτηρίων που απομονώθηκαν από την 1ερά Μονή Παναγίας Βαρνάκοβας.

Σύμφωνα με το Διάγραμμα 17, το μοντέλο πρόβλεψης της μέγιστης κυτταρικής συγκέντρωσης προσεγγίζει ικανοποιητικά το σύνολο των περιπτώσεων ανάπτυξης των βακτηρίων που απομονώθηκαν από την 1ερά Μονή Παναγίας Βαρνάκοβας στις υγρές καλλιέργειες του θρεπτικού μέσου Nutrient Broth, με μοναδική εξαίρεση το στέλεχος *S. Anulatus*.



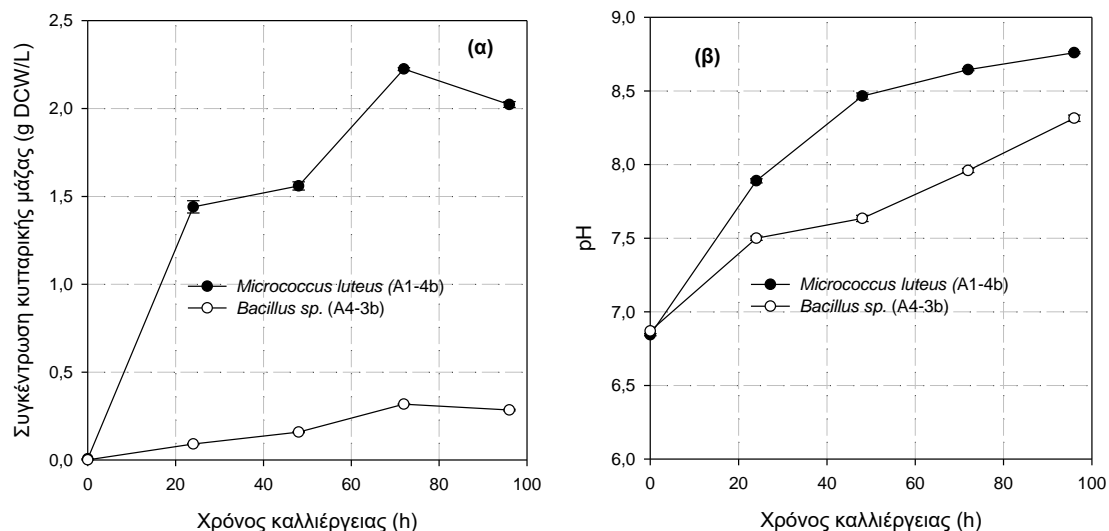
**Διάγραμμα 18:** Δυναμικό μεταφοράς των βακτηρίων που απομονώθηκαν από την Ιερά Μονή Παναγίας Βαρνάκοβας. Η ράβδος με κόκκινο χρώμα αφορά στο δυναμικό μεταφοράς του βακτηρίου *M.xanthus* ATCC 435.

Όσο αναφορά το δυναμικό μεταφοράς των βακτηρίων (Διάγραμμα 18), κυμαίνεται στα ίδια επίπεδα για τη πλειοψηφία των περιπτώσεων σε τιμές μεταξύ 0.26-0.36 h<sup>-1</sup>, ενώ στη περίπτωση των ειδών *F. halophilus*, *M. crassostreae*, *P. insulae*, *S. Thinghirensis* και *S. halmapala* κυμαίνεται σε χαμηλότερα επίπεδα μεταξύ 0.18-0.23 h<sup>-1</sup>.

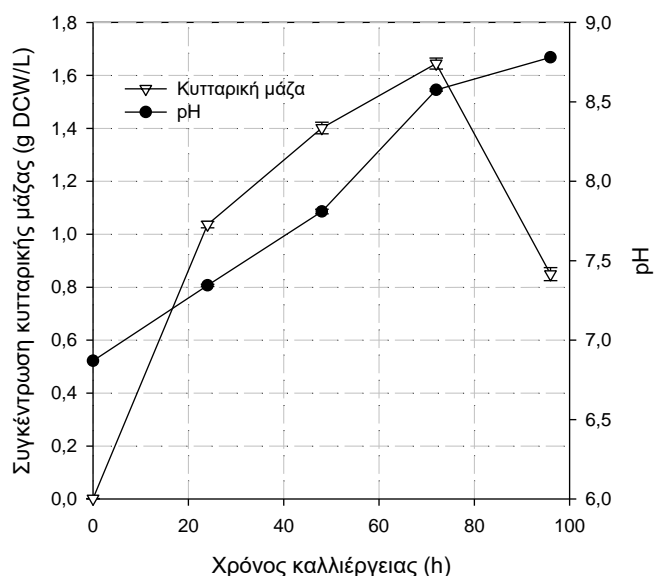
Συγκεντρωτικά από τα αποτελέσματα των Διαγραμμάτων 17 και 18, το στέλεχος *P. harenae* εμφανίζει το υψηλότερο δυναμικό μεταφοράς ( $k=0.356 \pm 0.014$  h<sup>-1</sup>) με μέγιστη κυτταρική συγκέντρωση ίση με  $1.22 \pm 0.01$  g DCW/L (48 ώρες καλλιέργειας), ενώ το είδος *S. thinghirensis* σχεδόν υποδιπλάσιο δυναμικό μεταφοράς ( $k=0.184 \pm 0.004$  h<sup>-1</sup>), με ελαφρά υψηλότερη μέγιστη συγκέντρωση κυτταρικής μάζας ( $1.46 \pm 0.03$  g DCW/L, στις 72 ώρες καλλιέργειας). Τα βακτήρια *S. anulatus*, *Streptomyces sp.*, *Bacillus sp.* και *B. mesophilus* εμφανίζουν επίσης υψηλές τιμές δυναμικού μεταφοράς που κυμαίνονται από  $0.309 \pm 0.014$  h<sup>-1</sup> έως  $0.330 \pm 0.007$  h<sup>-1</sup>. Η μέγιστη κυτταρική συγκέντρωση στα προαναφερθέντα βακτήρια κυμαίνεται από  $1.09 \pm 0.07$  g DCW/L για το βακτήριο *Streptomyces sp.* (72 ώρες καλλιέργειας) έως  $2.89 \pm 0.04$  g DCW/L για το βακτήριο *S. anulatus* (48 ώρες καλλιέργειας). Η ανάπτυξη των ειδών *M. crassostreae*, *F. halophilus* και *P. prosopidis* κυμαίνεται συγκριτικά σε χαμηλά επίπεδα, όπως φαίνεται από τις τιμές μέγιστης κυτταρικής συγκέντρωσης,  $0.28 \pm 0.02$ ,  $0.74 \pm 0.02$  και  $0.84 \pm 0.01$  g DCW/L, αντίστοιχα.

Σύμφωνα με τα δεδομένα του χρονικού ρυθμού ανάπτυξης των βακτηρίων που απομονώθηκαν από τα σημεία δειγματοληψίας στα μνημεία Αφεντάκη, "Κοιμωμένη του Χαλεπά" και Δελιγιάννη, "Κοιμωμένη του Βιτσάρη" στο Α' Νεκροταφείο Αθηνών (Διαγράμματα 19,20), κατασκευάζονται οι καμπύλες αναφοράς χρονικής μεταβολής συγκέντρωσης κυτταρικής μάζας και pH υγρής καλλιέργειας.





**Διαγράμματα 19:** Χρονική μεταβολή (α) της συγκέντρωσης κυτταρικής μάζας και (β) του pH κατά την ανάπτυξη των βακτηρίων *Micrococcus luteus* και *Bacillus sp.* που απομονώθηκαν από το μνημείο Αφεντάκη, “Κοιμωμένη του Χαλεπά” στο Α’ Νεκροταφείο Αθηνών (Σημεία δειγματοληψίας A1 και A4 αντίστοιχα)



**Διάγραμμα 20:** Χρονική μεταβολή (α) της συγκέντρωσης κυτταρικής μάζας και (β) του pH κατά την ανάπτυξη του βακτηρίου *Bacillus sp.* που απομονώθηκε από το μνημείο Δελιγιάννη, “Κοιμωμένη του Βιτσάρη” στο Α’ Νεκροταφείο Αθηνών (Σημείο δειγματοληψίας D1)

Σύμφωνα με τις καμπύλες χρονικής μεταβολής της συγκέντρωσης κυτταρικής μάζας των βακτηρίων που απομονώθηκαν από τα αγάλματα των ταφικών μνημείων Αφεντάκη και Δελιγιάννη στο Α’ Νεκροταφείο Αθηνών (Διαγράμματα 19α,20), το σύνολο αυτών εμφανίζει τη μέγιστη κυτταρική συγκέντρωση, έπειτα από επώαση για 72 ώρες.

Όσο αναφορά τη χρονική μεταβολή του pH της υγρής καλλιέργειας των βακτηρίων (Διαγράμματα 19β,20), η τιμή του φαίνεται να αυξάνεται διαρκώς με την επίτευξη της μέγιστης κυτταρικής συγκέντρωσης να πραγματοποιείται σε τιμές pH μεταξύ 8.0-8.6.

Οι τιμές των κινητικών χαρακτηριστικών ανάπτυξης των βακτηρίων που αφορούν τη μέγιστη συγκέντρωση κυτταρικής μάζας και το δυναμικό μεταφοράς υπολογίζονται για κάθε στέλεχος ως *M. luteus* ( $2.22 \pm 0.01$  mg DCW/ml και  $0.222 \pm 0.031$  h<sup>-1</sup>), *Bacillus sp.* (A4-3b) ( $0.31 \pm 0.05$  mg DCW/ml και  $0.132 \pm 0.012$  h<sup>-1</sup>) και *Bacillus sp.* (D1-2b) ( $1.64 \pm 0.02$  mg DCW/ml και  $0.352 \pm 0.004$  h<sup>-1</sup>).

Με σκοπό τον προσδιορισμό των απομονωθέντων βακτηρίων με δυνατότητα εναπόθεσης ανθρακικού ασβεστίου, πραγματοποιείται έλεγχος της ουρεολυτικής τους δράση, καθώς και της ικανότητάς τους να συνθέτουν ανθρακικό ασβέστιο μέσω απευθείας δέσμευσης διοξειδίου του άνθρακα με τη δράση του ενζύμου καρβονική ανυδράση. Οι δοκιμές που πραγματοποιούνται σχετίζονται άμεσα με τη δυνατότητα των βακτηρίων να παράγουν και να αξιοποιούν τα ένζυμα ουρεάση και καρβονική ανυδράση που καταλύουν συνεργατικά τη μεταβολικά επαγόμενη διαδικασία εναπόθεσης ανθρακικού ασβεστίου. Τα συνολικά αποτελέσματα παρουσιάζονται ανά μνημείο.

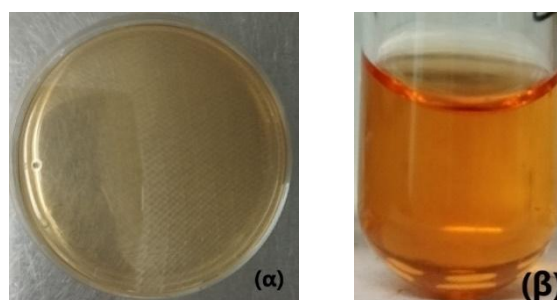
### 3.4 Έλεγχος ουρεολυτικής δράσης των βακτηρίων

Η ουρεόλυση αποτελεί μια μεταβολική διεργασία των βακτηρίων που προωθεί την εναπόθεση ανθρακικού ασβεστίου, μέσω υδρόλυσης της ουρίας και παραγωγής διττανθρακικών ιόντων (CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>), τα οποία παρουσία περίσσειας ελεύθερων ιόντων ασβεστίου (Ca<sup>2+</sup>), οδηγούν στη σύνθεση ανθρακικού ασβεστίου σε κρυσταλλική μορφή. Αυτή η μικροβιακά επαγόμενη διεργασία πλεονεκτεί έναντι των χημικών μεθόδων εναπόθεσης ανθρακικού ασβεστίου για τη συντήρηση και την αποκατάσταση των λίθινων μνημείων, τόσο σε οικονομικό, όσο και σε οικολογικό επίπεδο. Παρά τα διαθέσιμα μεταβολικά δίκτυα σύνθεσης ανθρακικού ασβεστίου των βακτηρίων, όπως η φωτοσύνθεση, η αμμωνιοποίηση των αμινοξέων, η απονιτροποίηση, η αναερόβια οξείδωση θειικών αλάτων και μεθανίου, σε εργαστηριακή κλίμακα επιλέγεται η μελέτη της ουρεόλυσης, εξαιτίας της μη απαιτητικής διαδικασίας προσδιορισμού της, της αμεσότητας των αποτελεσμάτων και του χαμηλού κόστους της.

Πιο συγκεκριμένα, η υδρόλυση της ουρίας [CO(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>] σε αμμωνία (NH<sub>3</sub>) και ανθρακικό οξύ (H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) σύμφωνα με την αντίδραση,  $\text{CO(NH}_2)_2 + 2\text{H}_2\text{O} \xrightarrow{\text{Ουρεάση}} 2\text{NH}_3 + \text{H}_2\text{CO}_3$ , και η μετέπειτα διάσπαση της παραγόμενης αμμωνίας στο νερό σε αμμωνιακά ιόντα (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) και υδροξυλιόντα (OH<sup>-</sup>),  $\text{NH}_3 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{NH}_4^+ + \text{OH}^-$ , προκαλεί αύξηση της τιμής του pH, με ταυτόχρονη διάσπαση του ανθρακικού οξέος σε ανθρακικά (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) και σε πιο αλκαλικές συνθήκες διττανθρακικά (CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) ιόντα,  $\text{H}_2\text{CO}_3 \leftrightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$  και  $\text{HCO}_3^- \leftrightarrow \text{CO}_3^{2-} + \text{H}^+$ . Η μονόδρομη αντίδραση που περιγράφει την απευθείας υδρόλυση της ουρίας σε αμμωνιακά και διττανθρακικά ιόντα είναι η εξής:  $\text{CO(NH}_2)_2 + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{NH}_4^+ + \text{CO}_3^{2-}$ . Η αντίδραση αυτή καταλύεται από το ένζυμο ουρεάση, η ενεργότητα του οποίου καθορίζει το ρυθμό διάσπασης της ουρίας. Παρουσία ιόντων ασβεστίου (Ca<sup>2+</sup>) στο περιβάλλον της αντίδρασης, πραγματοποιείται ο σχηματισμός ανθρακικού ασβεστίου, σύμφωνα με την αντίδραση,  $\text{Ca}^{2+} + \text{CO}_3^{2-} \rightarrow \text{CaCO}_3(\text{s})$  (Εικόνα 62). Η ουρεόλυση αποτελεί την κυρίαρχη στη φύση μεταβολική μέθοδο της βιολογικά επαγόμενης σύνθεσης ανθρακικού ασβεστίου, σύμφωνα με την οποία τα ουρεολυτικά βακτήρια μπορούν να χαρακτηριστούν ως ασβεστοπαραγωγοί (Zhang & Wang, 2023).

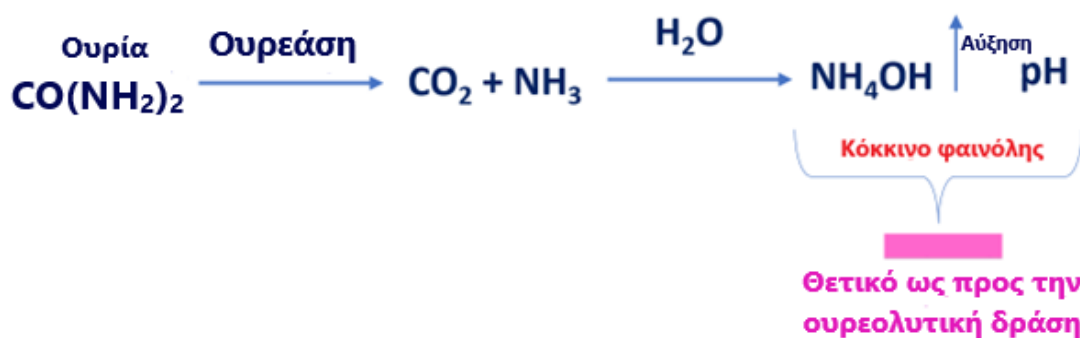


(Son et al., 2018). Η υψηλή ρυθμιστική ικανότητα του θρεπτικού μέσου απαιτεί τη παραγωγή μεγάλης ποσότητας αμμωνίας για την αύξηση του pH. Η εμφάνιση κόκκινου χρώματος στις υγρές καλλιέργειες και η παραμονή του με το πέρας των δοκιμών, σηματοδοτεί την παραγωγή αμμωνίας με πολύ αργό ρυθμό ή σε μη επαρκείς ποσότητες. Η απουσία ουρίας στο θρεπτικό μέσο εξυπηρετεί ως τυφλό δείγμα της αντίδρασης, με τη μεταβολή του χρώματος από πορτοκαλί σε μωβ να υποδεικνύει τη δυνητική ικανότητα των βακτηρίων να αξιοποιούν τη διαθέσιμη πηγή αζώτου (εκχύλισμα ζύμης) που περιέχεται στο θρεπτικό μέσο για την παραγωγή αμμωνίας, μέσω διαφορετικών μεταβολικών δικτύων, όπως η αμμωνιοποίηση των διαθέσιμων αμινοξέων (Πίνακες 30-33 στο Παράρτημα II) (Park et al., 1998).



**Εικόνα 64:** Το θρεπτικό μέσο ελέγχου της ουρεολυτικής δράσης των βακτηρίων σε (α) στερεή και (β) υγρή μορφή πριν τον εμβολιασμό

Το βακτήριο *Mycococcus xanthus* ATCC 435 χρησιμοποιείται ως αρνητικό δείγμα ελέγχου της διαδικασίας αξιολόγησης της ουρεολυτικής δράσης των απομονωθέντων από τα μνημεία βακτηρίων, καθώς έχει αποδειχθεί ότι συμβάλλει στη μικροβιακά επαγόμενη εναπόθεση ανθρακικού ασβεστίου, μέσω της μεταβολικής οδού αμμωνιοποίησης των αμινοξέων, η οποία, όπως και η ουρεόλυση, αποτελούν μεταβολικές διεργασίες του κύκλου αζώτου των βακτηρίων (Rodríguez-Navarro et al., 2003).


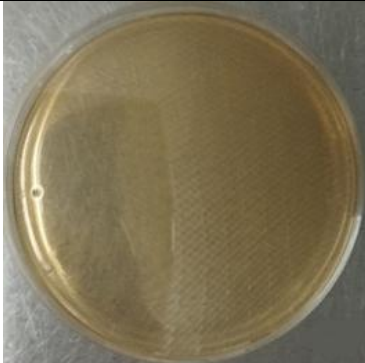








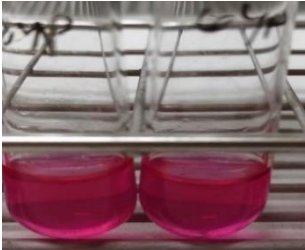

**Σχήμα 5:** Αντίδραση υδρόλυσης της ουρίας για τον έλεγχο της ουρεολυτικής δράσης των βακτηρίων

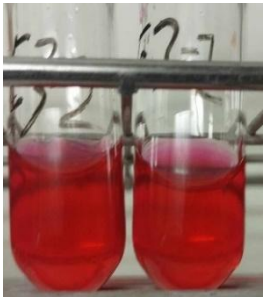
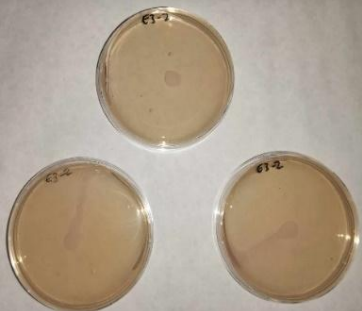


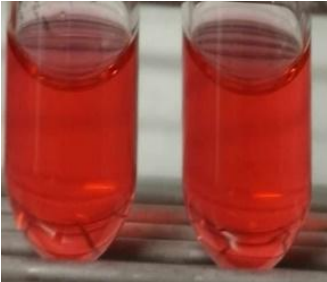
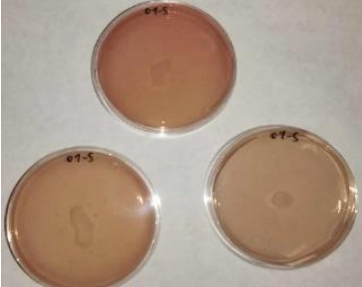
Τα αποτελέσματα ποιοτικής αξιολόγησης της ουρεολυτικής δράσης των βακτηρίων που απομονώθηκαν από τα επιδεικτικά μνημεία (Πίνακες 20-23), έπειτα από επώαση των υγρών και στερεών καλλιεργειών στους 28°C για 48 ώρες, χαρακτηρίζονται ως θετικά (τα βακτήρια διαθέτουν ουρεολυτική δράση) ή αρνητικά (τα βακτήρια δεν διαθέτουν ουρεολυτική δράση). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται και αναλύονται ανά μνημείο.

Στον έλεγχο της ουρεολυτικής δράσης που πραγματοποιείται σε 9 από τα 11 διαφορετικά είδη βακτηρίων που απομονώθηκαν από το Ευπαλίνειο όρυγμα, εμφανίζεται θετικό αποτέλεσμα σε 5 εξ αυτών και πιο συγκεκριμένα στα στελέχη *S. isronensis*, *P. cichorii*, *S. thermotolerans*, *R. wratislaviensis*, *R. baikonurensis*, όπως άλλωστε υποδεικνύεται από τη μεταβολή του χρώματος τόσο των στερεών, όσο και των υγρών καλλιεργειών σε μωβ (Πίνακας 20). Επομένως, χαρακτηρίζονται ως ουρεολυτικά βακτήρια, γεγονός που τα καθιστά ικανά για την εναπόθεση ανθρακικού ασβεστίου μέσω της μεταβολικής οδού υδρόλυσης της ουρίας. Όσο αναφορά τα υπόλοιπα 4 βακτήρια, η παραμονή του πορτοκαλί χρώματος των στερεών καλλιεργειών ή/και η μεταβολή του χρώματος των υγρών καλλιεργειών σε κόκκινο (Πίνακας 20), υποδηλώνουν αρνητικό αποτέλεσμα στον έλεγχο της ουρεολυτικής τους δράσης.


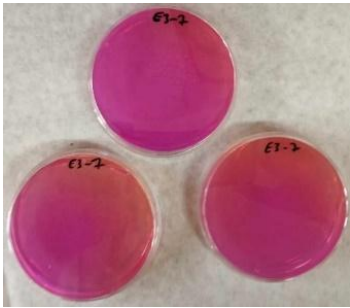

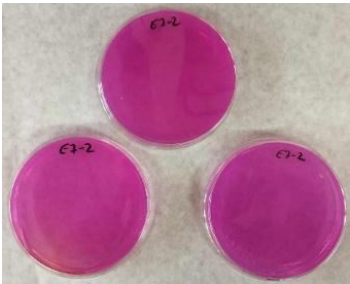
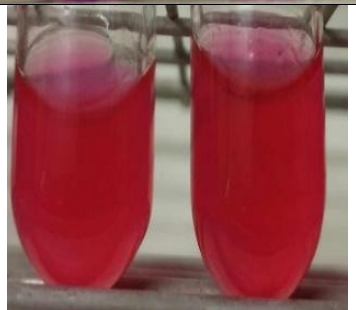
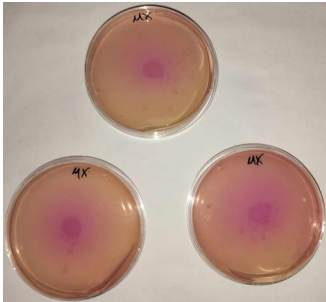
**Πίνακας 20:** Αποτελέσματα ελέγχου ουρεολυτικής δράσης των βακτηρίων που απομονώθηκαν από το Ευπαλίνιο όρυγμα

Βακτήριο (Κωδικός σημείου δειγματοληψίας)	Υγρή καλλιέργεια	Στερεή καλλιέργεια	Αποτέλεσμα ελέγχου
Μέσο ελέγχου ουρεολυτικής δράσης			Αρνητικό
<i>Agromyces agglutinans</i> (E1-2b)			Αρνητικό

<p><i>Metabacillus indicus</i> (E1-3b &amp; E1-5b)</p>			<p><b>Αρνητικό</b></p>
<p><i>Solibacillus isronensis</i> (E1-4b)</p>			<p><b>Θετικό</b></p>
<p><i>Pseudomonas cichorii</i> (E1-7b)</p>			<p><b>Θετικό</b></p>


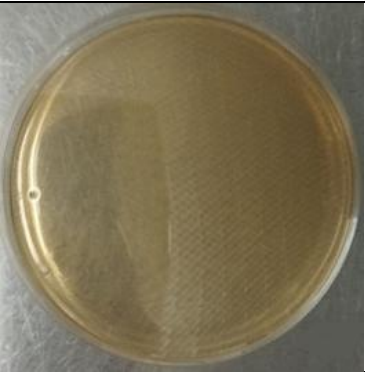

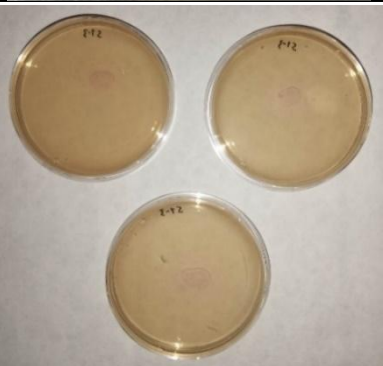
<p><i>Agrococcus jenensis</i> (E3-2b)</p>			<p><b>Αρνητικό</b></p>
<p><i>Sporosarcina thermotolerans</i> (E3-3b)</p>			<p><b>Θετικό</b></p>
<p><i>Metabacillus herbersteinensis</i> (E3-5b &amp; E3-6b)</p>			<p><b>Αρνητικό</b></p>


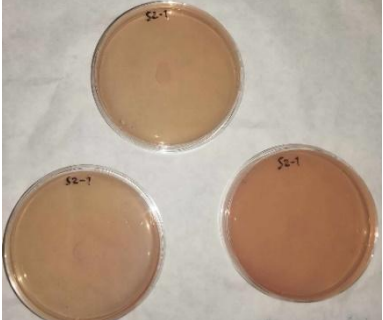

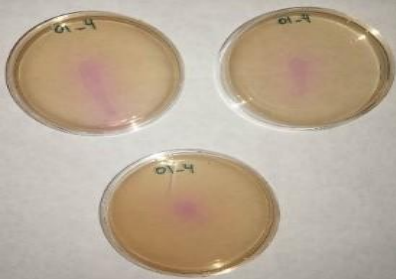
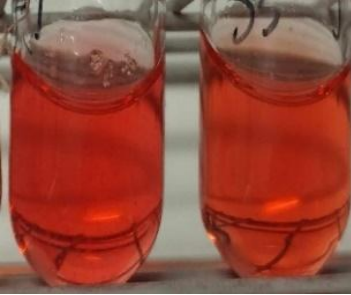
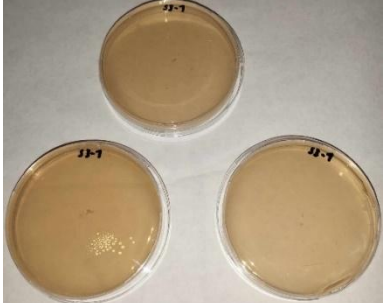



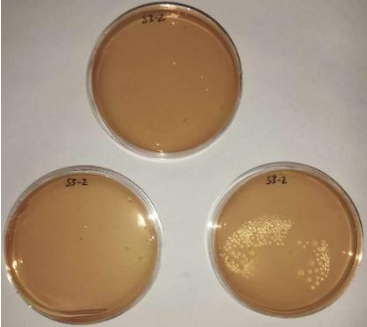
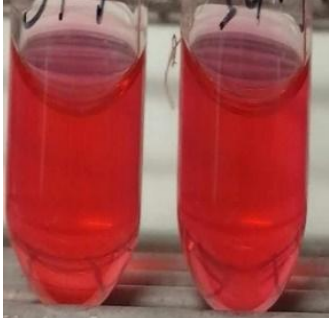
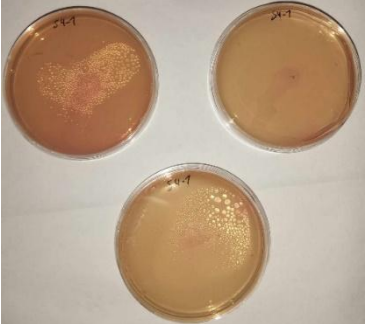
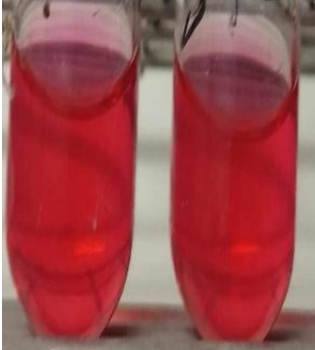
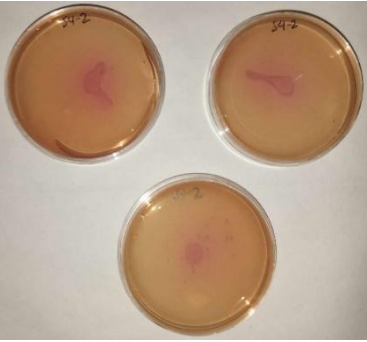
<p><i>Rhodococcus wratislaviensis</i> (E7-3b)</p>			<p><b>Θετικό</b></p>
<p><i>Rhodococcus baikonurensis</i> (E7-2b)</p>			<p><b>Θετικό</b></p>
<p><i>Myxococcus xanthus</i> (ATCC 435)</p>			<p><b>Αρνητικό</b></p>




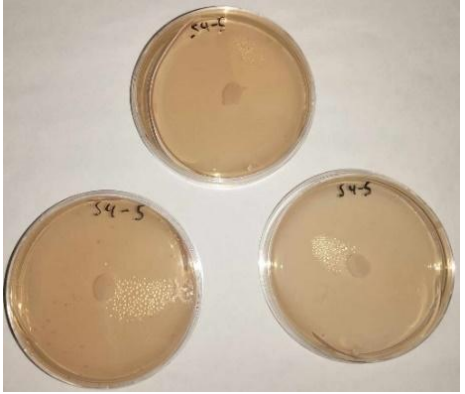
Ο έλεγχος ουρεολυτικής δράσης που πραγματοποιείται στο σύνολο των 15 διαφορετικών βακτηριακών στελεχών που απομονώθηκαν από την Ιερά Μονή Παναγίας Βαρνάκοβας, οδηγεί σε θετικό αποτέλεσμα 6 βακτηρίων (Πίνακας 21), όπως άλλωστε υποδεικνύει η μεταβολή του χρώματος των υγρών καλλιιεργειών σε μωβ και η εμφάνιση μωβ χρώσης στο κέντρο των στερεών καλλιιεργειών, στις περιπτώσεις των βακτηρίων *P. frigorigerans*, *M. litoralis* και *F. halophilus*. Όσο αναφορά τα βακτήρια *S. halmapala*, *S. thinghirensis*, *M. herbersteinensis*, *Streptomyces sp.*, *M. crassostreae* και *P. prosopidis* η παραμονή πορτοκαλί χρώματος στις στερεές και υγρές καλλιιεργειες ή η μεταβολή του χρώματος των υγρών καλλιιεργειών σε κόκκινο, υποδηλώνουν αρνητικό αποτέλεσμα της ουρεολυτικής τους δράσης. Επιπλέον, σε αρνητικό αποτέλεσμα της ουρεολυτικής δράσης οδηγεί και η εμφάνιση μωβ χρώσης στο κέντρο στερεών καλλιιεργειών, ενώ το χρώμα των υγρών καλλιιεργειών παραμένει πορτοκαλί ή κόκκινο. Το φαινόμενο αυτό οφείλεται σε τοπικές αυξήσεις του pH της στερεής καλλιιεργειας από τη παραγωγή αμμωνίας, λόγω αμμωνιοποίησης των διαθέσιμων αμινοξέων του θρεπτικού μέσου, όπως συμβαίνει στη περίπτωση των βακτηρίων *P. insulae* και *S. anulatus*. Επιπλέον, η μεταβολή του χρώματος ολόκληρης της στερεής καλλιιεργειας σε μωβ με ταυτόχρονη παραμονή πορτοκαλί χρώματος των υγρών καλλιιεργειών, στη περίπτωση του βακτηρίου *Bacillus sp.* (VS5-1b), συνεπάγεται σε αρνητικό αποτέλεσμα της ουρεολυτικής του δράσης που οφείλεται σε μαζική αύξηση του pH της στερεής καλλιιεργειας λόγω παραγωγής αμμωνίας μέσω αμμωνιοποίησης, καθώς και σε μη επαρκή ποσότητα παραγόμενης αμμωνίας στη περίπτωση των υγρών καλλιιεργειών για τη μεταβολή του pH, εξαιτίας της υψηλής ρυθμιστικής ικανότητας του θρεπτικού μέσου. Τέλος, τα βακτήρια *Bacillus sp.* (VS4-4b), *P. harenae* και *B. mesophilus*, στα οποία παρατηρείται μεταβολή του χρώματος της υγρής καλλιιεργειας σε μωβ, χωρίς την αντίστοιχη μεταβολή χρώματος ή την εμφάνιση μωβ χρώσης στις στερεές καλλιιεργειες, οδηγούν σε θετικό αποτέλεσμα της ουρεολυτικής τους δράσης, καθώς εμφανίζουν τη δυνατότητα υδρόλυσης της ουρίας, παράγοντας επαρκείς ποσότητες αμμωνίας για την αύξηση της τιμής του pH των υγρών καλλιιεργειών άνω του 8.2, όπως φανερώνεται από τη μεταβολή του χρώματος σε μωβ.


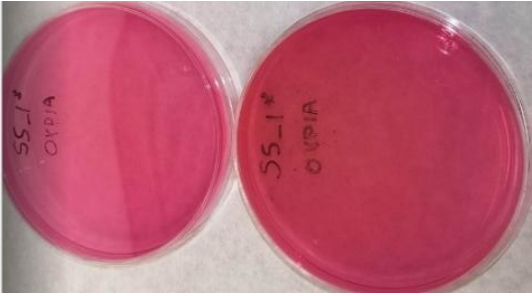

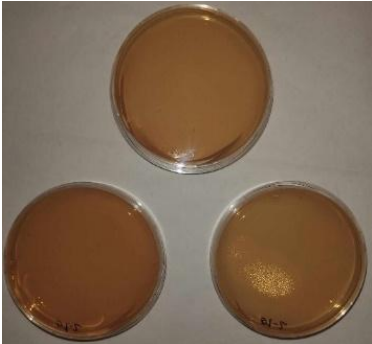
**Πίνακας 21:** Αποτελέσματα ελέγχου της ουρεολυτικής δράσης βακτηρίων που απομονώθηκαν από την Ιερά Μονή Παναγίας Βαρνάκοβας


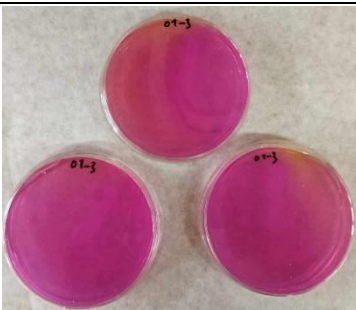

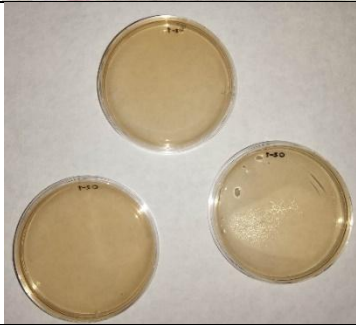

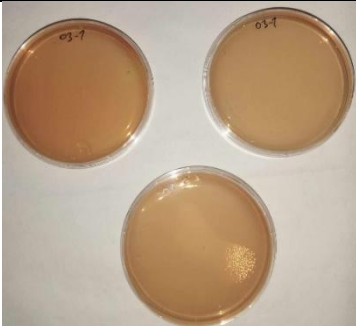
Βακτήριο (Κωδικός σημείου δειγματοληψίας)	Υγρή καλλιέργεια	Στερεή καλλιέργεια	Αποτέλεσμα ελέγχου
Μέσο ελέγχου ουρεολυτικής δράσης			<b>Αρνητικό</b>
<i>Peribacillus frigritolerans</i> (VS1-3b)			<b>Θετικό</b>

<p><i>Sutcliffiella halmapala</i> (VS2-1b)</p>			<p><b>Αρνητικό</b></p>
<p><i>Metabacillus litoralis</i> (VS2-2b &amp; VO1-4b)</p>			<p><b>Θετικό</b></p>
<p><i>Streptomyces thinghirensis</i> (VS3-1b)</p>			<p><b>Αρνητικό</b></p>



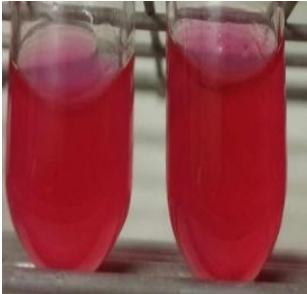
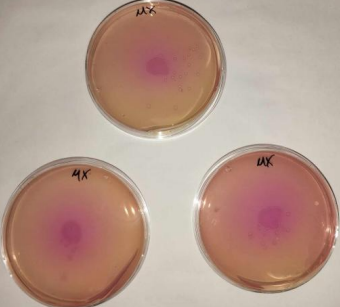
<p><i>Metabacillus herbersteinensis</i> (VS3-2b, VO1-1b, VO1-5b &amp; VO4-1b)</p>			<p><b>Αρνητικό</b></p>
<p><i>Paenibacillus insulae</i> (VS4-1b)</p>			<p><b>Αρνητικό</b></p>
<p><i>Streptomyces anulatus</i> (VS4-2b)</p>			<p><b>Αρνητικό</b></p>

<p><i>Bacillus sp.</i> (VS4-4b)</p>			<p><b>Θετικό</b></p>
<p><i>Streptomyces sp.</i> (VS4-5b)</p>			<p><b>Αρνητικό</b></p>

<p><i>Bacillus sp.</i> (VS5-1b)</p>			<p><b>Αρνητικό</b></p>
<p><i>Metabacillus crassostreae</i> (VO1-2b)</p>			<p><b>Αρνητικό</b></p>


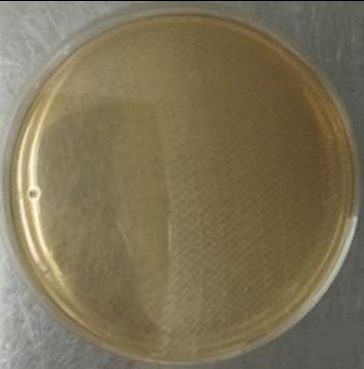


<p><i>Fictibacillus halophilus</i> (VO1-3b)</p>			<p><b>Θετικό</b></p>
<p><i>Paenibacillus harenae</i> (VO2-1b)</p>			<p><b>Θετικό</b></p>
<p><i>Paenibacillus prosopidis</i> (VO3-1b)</p>			<p><b>Αρνητικό</b></p>


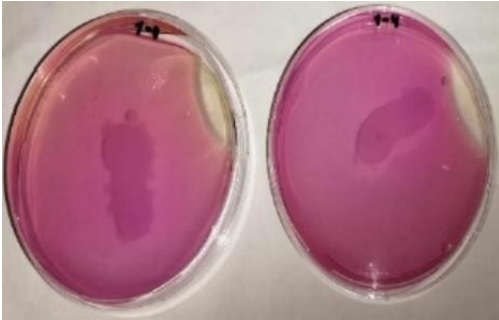

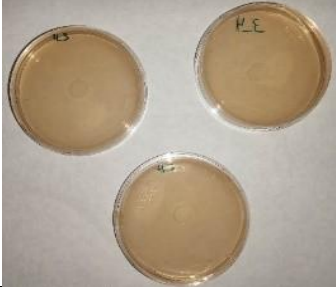
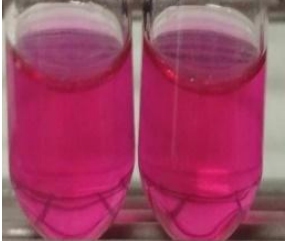



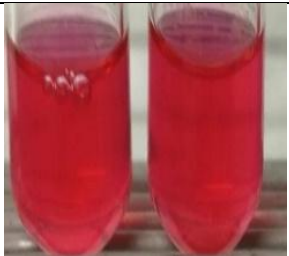
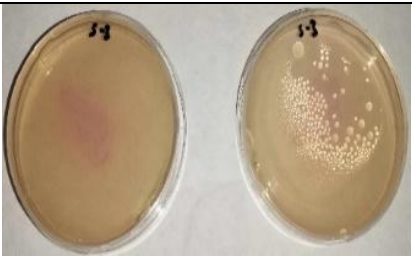

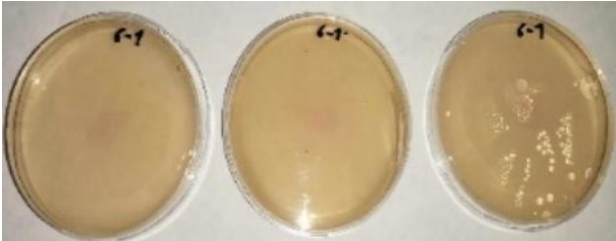
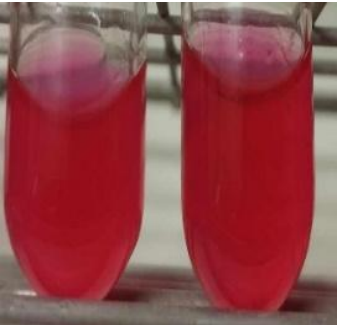
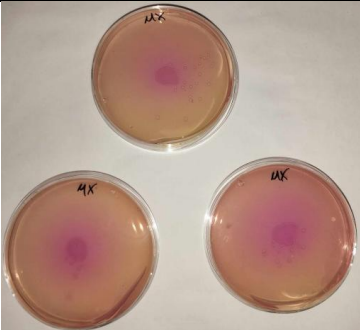
<p><i>Bacillus mesophilus</i> (VO3-2b)</p>			<p><b>Θετικό</b></p>
<p><i>Myxococcus xanthus</i> (ATCC 435)</p>			<p><b>Αρνητικό</b></p>

Από τις δοκιμές ελέγχου της ουρεολυτικής δράσης που πραγματοποιούνται σε 6 εκ των 7 διαφορετικών βακτηριακών στελεχών που απομονώθηκαν από τη "Κοιμωμένη του Χαλεπά" του μνημείου Αφεντάκη στο Α' Νεκροταφείο Αθηνών, προκύπτει θετικό αποτέλεσμα σε 3 εξ' αυτών των βακτηρίων (Πίνακας 22), όπως υποδηλώνει η μεταβολή του χρώματος τόσο των υγρών, όσο και των στερεών καλλιιεργειών των βακτηρίων *M. luteus* και *Rhodococcus sp.* σε μωβ. Στη περίπτωση του βακτηρίου *Bacillus sp.* το αποτέλεσμα ελέγχου της ουρεολυτικής του δράσης κρίνεται ως θετικό, όπως άλλωστε φανερώνεται από τη μεταβολή του χρώματος των υγρών καλλιιεργειών σε μωβ, παρά την απουσία μωβ χρώσης στις στερεές καλλιιεργειες. Στα υπόλοιπα 3 βακτήρια τα αποτελέσματα της ουρεολυτικής τους δράσης είναι αρνητικά. Πιο συγκεκριμένα, στις δοκιμές των βακτηρίων *Rathayibacter sp.* και *K. carniphila* το χρώμα των υγρών καλλιιεργειών μεταβάλλεται σε κόκκινο, με την εμφάνιση μωβ χρώσης στις στερεές καλλιιεργειες των τρυβλίων να οφείλεται στη μεταβολή του pH λόγω της παραγόμενης αμμωνίας από την αμμωνιοποίηση των διαθέσιμων αμινοξέων, ενώ στη περίπτωση του βακτηρίου *Arthrobacter sp.* παρατηρείται μεταβολή του χρώματος των υγρών καλλιιεργειών σε κόκκινο, χωρίς την εμφάνιση χρώσης στη περίπτωση των στερεών καλλιιεργειών.

**Πίνακας 22:** Αποτελέσματα ελέγχου της ουρεολυτικής δράσης βακτηρίων που απομονώθηκαν από τη “Κοιμωμένη του Χαλεπά” του μνημείου Αφεντάκη στο Α΄ Νεκροταφείο Αθηνών


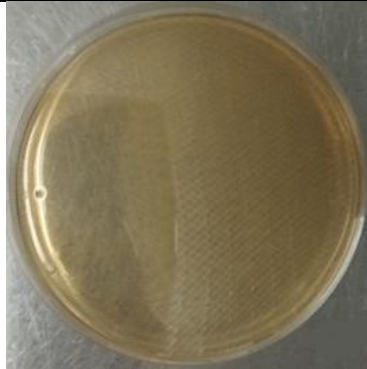

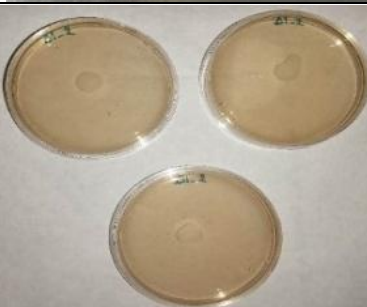
Βακτήριο (Κωδικός σημείου δειγματοληψίας)	Υγρή καλλιέργεια	Στερεή καλλιέργεια	Αποτέλεσμα ελέγχου
Μέσο ελέγχου ουρεολυτικής δράσης			Αρνητικό
<i>Arthrobacter sp.</i> (A1-1b)			Αρνητικό


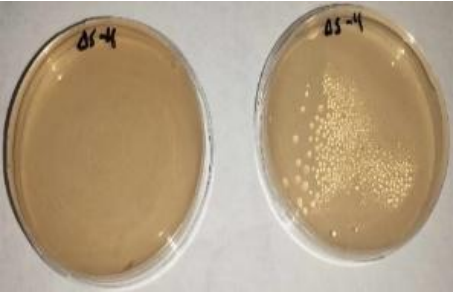

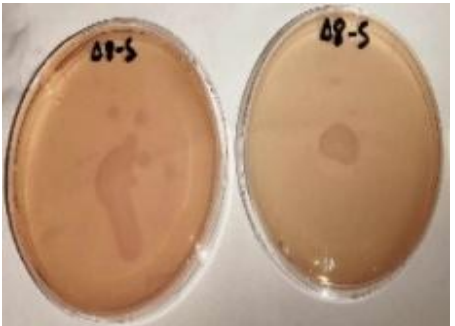


<p><i>Micrococcus luteus</i> (A1-4b)</p>			<p><b>Θετικό</b></p>
<p><i>Bacillus sp.</i> (A4-3b)</p>			<p><b>Θετικό</b></p>
<p><i>Rhodococcus sp.</i> (A4-4b)</p>			<p><b>Θετικό</b></p>

<p><i>Rathayibacter sp</i> (A5-3b)</p>			<p>Αρνητικό</p>
<p><i>Kocuria carniphila</i> (A6-1b)</p>			<p>Αρνητικό</p>
<p><i>Myxococcus xanthus</i> (ATCC 435)</p>			<p>Αρνητικό</p>

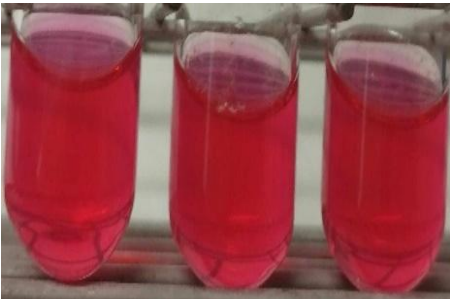
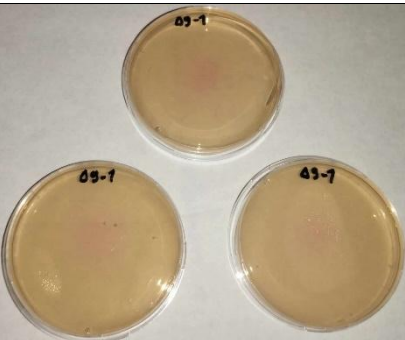

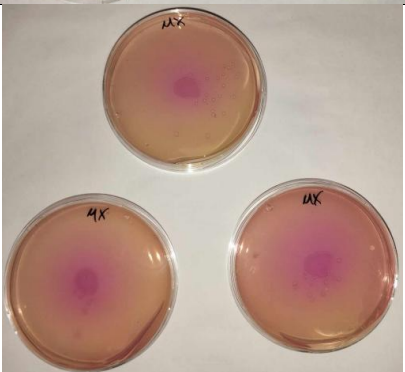
Η αξιολόγηση της ουρεολυτικής δράσης που πραγματοποιείται σε 5 εκ των 11 διαφορετικών βακτηριακών στελεχών που απομονώθηκαν από τη “Κοιμωμένη του Βιτσάρη” του μνημείου της Δελιγιάννη στο Α΄ Νεκροταφείο Αθηνών, οδηγεί σε αρνητικό αποτέλεσμα στο σύνολο των εξετασθέντων βακτηρίων, καθώς κανένα δεν τηρεί τις απαραίτητες προϋποθέσεις εμφάνισης μωβ χρώματος στις υγρές ή/και στις στερεές καλλιέργειες, ώστε να θεωρηθεί θετικό ως προς τον ποιοτικό έλεγχο της ουρεολυτικής του δράσης (Πίνακας 23). Πιο συγκεκριμένα, στα βακτήρια *Bacillus sp.*, και *A. agilis* παρατηρείται η εμφάνιση κόκκινου χρώματος στις υγρές καλλιέργειες, χωρίς μεταβολή του χρώματος των στερεών καλλιεργείων. Στη περίπτωση του βακτηρίου *Kocuria sp.*, το χρώμα των υγρών καλλιεργείων παραμένει πορτοκαλί, με παράλληλη απουσία χρώσης των στερεών καλλιεργείων. Όσον αφορά τα βακτήρια *Arthrobacter sp.* και *X. bacterium* η μεταβολή του χρώματος σε κόκκινο στις υγρές καλλιέργειες και η εμφάνιση μωβ χρώσης στις στερεές, οδηγούν σε αρνητικό αποτέλεσμα ελέγχου της ουρεολυτικής τους δράσης με τρόπο παρόμοιο με αυτόν του *Μγχοcoccus xanthus* ATCC 435.

**Πίνακας 23:** Αποτελέσματα ελέγχου της ουρεολυτικής δράσης βακτηρίων που απομονώθηκαν από τη “Κοιμωμένη του Βιτσάρη” του μνημείου Δελιγιάννη στο Α΄ Νεκροταφείο Αθηνών

Βακτήριο (Κωδικός σημείου δειγματοληψίας)	Υγρή καλλιέργεια	Στερεή καλλιέργεια	Αποτέλεσμα ελέγχου
Μέσο ελέγχου ουρεολυτικής δράσης			Αρνητικό
<i>Bacillus sp.</i> (D1-2b)			Αρνητικό

<p><i>Kocuria sp.</i> (D5-4b)</p>			<p>Αρνητικό</p>
<p><i>Arthrobacter agilis</i> (D8-5b)</p>			<p>Αρνητικό</p>
<p><i>Arthrobacter sp.</i> (D8 - 7b)</p>			<p>Αρνητικό</p>

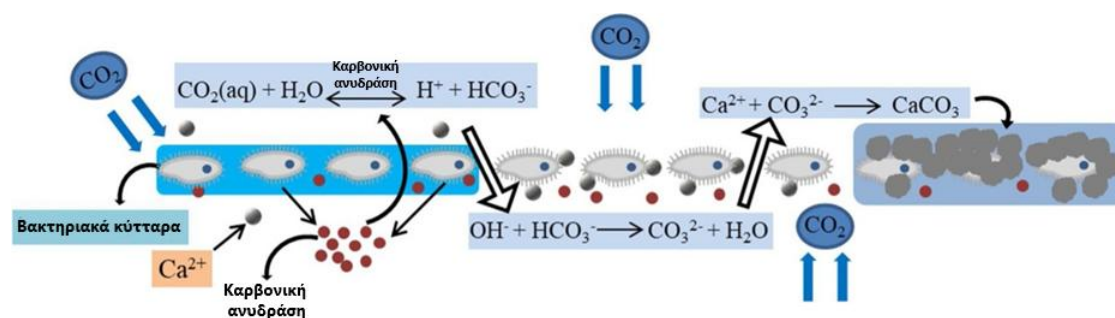


<p><i>Xanthomonadales</i> <i>bacterium</i> (D9 – 1b)</p>			<p><b>Αρνητικό</b></p>
<p><i>Myxococcus xanthus</i> (ATCC 435)</p>			<p><b>Αρνητικό</b></p>

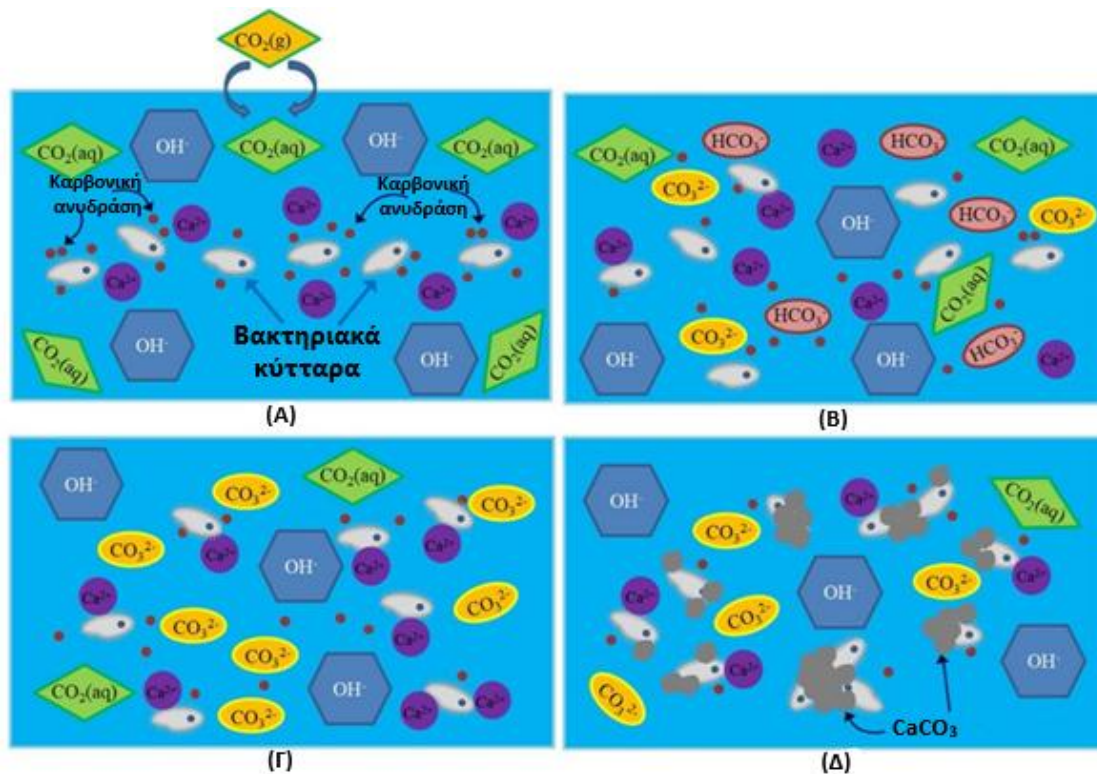
Ανακεφαλαιώνοντας, από τις δοκιμές ποιοτικού ελέγχου της ουρεολυτικής δράσης των βακτηρίων που απομονώθηκαν από τα επιδεικτικά μνημεία θετικό αποτέλεσμα προκύπτει σε 14 εκ των 35 εξετασθέντων διαφορετικών βακτηριακών στελεχών, τα οποία εμφανίζουν τη δυνατότητα εναπόθεσης ανθρακικού ασβεστίου μέσω της μεταβολικής διεργασίας υδρόλυσης της ουρίας (ουρεόλυσης) που καταλύεται από το ένζυμο ουρεάση. Τα βακτήρια που μπορούν να χαρακτηριστούν ως ουρεολυτικά είναι ανά μνημείο, για το Ευπαλίνειο όρυγμα 5 εκ των οποίων τα *S. isronensis*, *P. cichorii*, *S. thermotolerans*, *R. wratislaviensis*, *R. baikonurensis*, για την Ιερά Μονή Παναγίας Βαρνάκοβας 6 εκ των οποίων τα *P. frigoritolerans*, *M. litoralis*, *F. halophilus*, *Bacillus sp.* (VS4-4b), *P. harenae* και *B. mesophilus*, ενώ για τα μνημεία του Ά Νεκροταφείου Αθηνών, από το μνημείο της Αφεντάκη 3 βακτήρια εκ των οποίων τα *M. luteus*, *Rhodococcus sp.*, *Bacillus sp.*, και κανένα βακτήριο από το μνημείο της Δελιγιάννη.

### 3.5 Προσδιορισμός ενεργότητας καρβονικής ανυδράσης των βακτηρίων για τη παραγωγή ανθρακικού ασβεστίου

Ο έλεγχος ενεργότητας της καρβονικής ανυδράσης αποτελεί μία ακόμη παράμετρο αξιολόγησης της ικανότητας των απομονωθέντων από τα επιδεικτικά μνημεία βακτηρίων να παράγουν ανθρακικό ασβέστιο. Η αντίδραση απευθείας μετατροπής του δεσμευμένου από τα βακτηριακά κύτταρα αέριου διοξειδίου του άνθρακα σε στερεό ανθρακικό ασβέστιο, παρουσία ιόντων ασβεστίου, καταλύεται από το ένζυμο καρβονική ανυδράση. Αυτή η βιοχημική διεργασία προϋποθέτει διάλυση του αέριου διοξειδίου του άνθρακα σε υδατικό περιβάλλον, ώπου να προκύψει υδατικό διάλυμα υπερκορεσμένο σε διοξείδιο του άνθρακα, σύμφωνα με την αντίδραση  $\text{CO}_2(\text{g}) \leftrightarrow \text{CO}_2(\text{aq})$ . Το διαλυμένο διοξείδιο του άνθρακα αντιδρά με το νερό ή σε υψηλές τιμές του pH με τα ιόντα υδροξυλίου, οδηγώντας στο σχηματισμό ανθρακικού οξέος  $\text{CO}_2(\text{aq}) + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{H}_2\text{CO}_3$ . Η συγκεκριμένη αντίδραση είναι η χρονικά πιο αργή και αυτή που καθορίζει τη ταχύτητα του ρυθμού της συνολικής αντίδρασης μετατροπής του αέριου διοξειδίου του άνθρακα σε ανθρακικό ασβέστιο. Στη συνέχεια, το παραγόμενο ανθρακικό οξύ διίσταται σε όξινα ανθρακικά και για υψηλότερες τιμές pH διττανθρακικά ιόντα  $\text{H}_2\text{CO}_3 \leftrightarrow \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$  και  $\text{HCO}_3^- \leftrightarrow \text{H}^+ + \text{CO}_3^{2-}$ . Το ένζυμο καρβονική ανυδράση καταλύει τη συνολική αντίδραση, μέσω επιτάχυνσης του ρυθμού της απευθείας υδρόλυσης του διοξειδίου του άνθρακα σε διττανθρακικά ιόντα και υδρογονοκατιόντα,  $\text{CO}_2(\text{aq}) + \text{H}_2\text{O} \xrightarrow{\text{Καρβονική ανυδράση}} \text{CO}_3^{2-} + 2\text{H}^+$ . Επομένως, σε αλκαλικές συνθήκες παρουσία ιόντων ασβεστίου πραγματοποιείται η αντίδραση σχηματισμού ανθρακικού ασβεστίου  $\text{Ca}^{2+} + \text{CO}_3^{2-} \leftrightarrow \text{CaCO}_3(\text{s})$  (Εικόνες 65 και 66) (Prabhu et al., 2011).



**Εικόνα 65:** Διαδικασία εναπόθεσης ανθρακικού ασβεστίου γύρω από τα βακτηριακά κύτταρα, μέσω της καταλυόμενης από τη καρβονική ανυδράση υδρόλυσης του δεσμευμένου διοξειδίου του άνθρακα

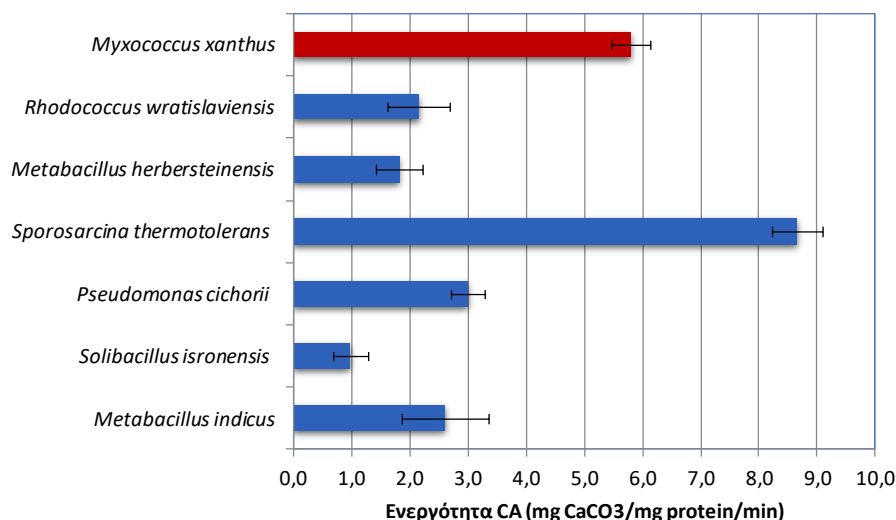


**Εικόνα 66:** Μηχανισμός εναπόθεσης ανθρακικού ασβεστίου από βακτηριακά κύτταρα μέσω δέσμευσης διοξειδίου του άνθρακα. (Α) Ανάπτυξη και πολλαπλασιασμός βακτηριακών κυττάρων για τη παραγωγή του ενζύμου καρβονική ανυδράση, (Β) Καταλυόμενη από την καρβονική ανυδράση υδρόλυση του δεσμευμένου από την ατμόσφαιρα διοξειδίου του άνθρακα ( $\text{CO}_2$ ) για τη παραγωγή όξινων ανθρακικών ( $\text{HCO}_3^-$ ) και διττανθρακικών ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) ιόντων, (Γ) Δέσμευση των διττανθρακικών ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) ιόντων και των ιόντων ασβεστίου ( $\text{Ca}^{2+}$ ) στα κυτταρικά τοιχώματα των βακτηρίων, (Δ) Εναπόθεση ανθρακικού ασβεστίου ( $\text{CaCO}_3$ ) γύρω από τα βακτηριακά κύτταρα (Zheng & Qian, 2020).

Ο προσδιορισμός ενεργότητας της καρβονικής ανυδράσης των απομονωθέντων βακτηρίων από τα επιδεικτικά μνημεία, πραγματοποιείται μέσω μελέτης του ρυθμού παραγωγής ανθρακικού ασβεστίου από περίσσεια διαλυμένου διοξειδίου του άνθρακα σε υδατικό περιβάλλον με τη προσθήκη του ενδοκυτταρικού υγρού λύσης των εξετασθέντων βακτηρίων που αποτελεί πιθανή πηγή καρβονικής ανυδράσης. Τα αποτελέσματα ενεργότητας της καρβονικής ανυδράσης στα εξετασθέντα βακτήρια ανά μνημείο συσχετίζουν τη συγκέντρωση του πρωτεϊνικού περιεχομένου των βακτηρίων με τη χρονική μεταβολή της συγκέντρωσης του παραγόμενου ανθρακικού ασβεστίου και εκφράζονται σε  $\text{mg CaCO}_3/\text{mg protein}/\text{min}$  (Διαγράμματα 22,23,24). Ως μέτρο σύγκρισης της ενεργότητας της καρβονικής ανυδράσης χρησιμοποιείται το εμπορικό στέλεχος *Mycoboccus xanthus* ATCC 435, το οποίο είναι γνωστό για την ικανότητα εναπόθεσης ανθρακικού ασβεστίου (Rodriguez-Navarro et al., 2003).

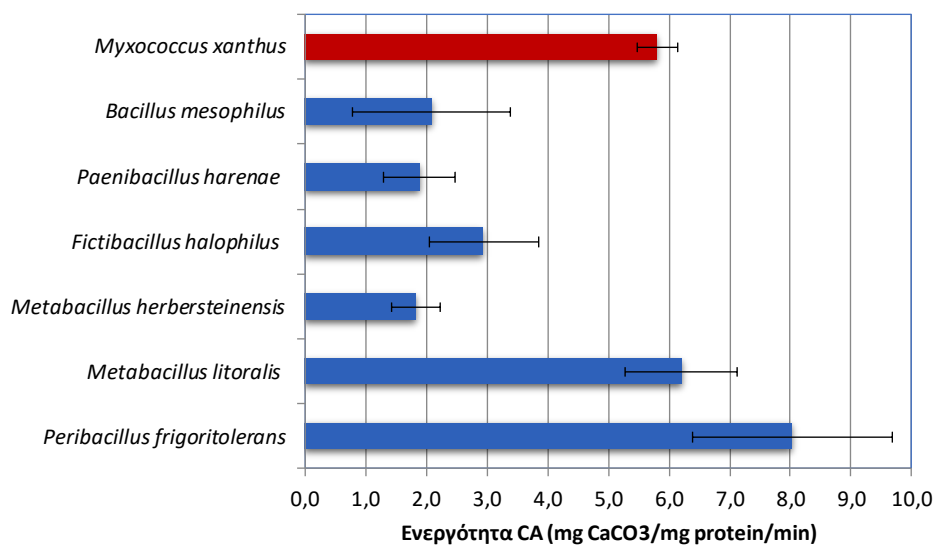
Σύμφωνα με τα αποτελέσματα προσδιορισμού της ενεργότητας της καρβονικής ανυδράσης των βακτηρίων που απομονώθηκαν από το Ευπαλίνιο Όρυγμα (Διάγραμμα 21), το στέλεχος *S. thermotolerans* εμφανίζει με διαφορά την υψηλότερη τιμή ( $8.6 \pm 0.4 \text{ mg CaCO}_3/\text{mg πρωτεΐνης}/\text{min}$ ) συγκριτικά με τα υπόλοιπα αυτόχθονα βακτήρια, ενώ η τιμή της για εμπορικό στέλεχος *M. xanthus* βρέθηκε ίση με  $5.8 \pm 0.3 \text{ mg CaCO}_3/\text{mg πρωτεΐνης}/\text{min}$ . Για τα υπόλοιπα βακτήρια η ενεργότητα καρβονικής ανυδράσης υπολογίζεται μικρότερη

των 3.0 mg CaCO<sub>3</sub>/mg πρωτεΐνης/min, με το είδος *S. Isronensis* να παρουσιάζει τη χαμηλότερη τιμή (1.0 ± 0.3 mg CaCO<sub>3</sub>/mg πρωτεΐνης/min).



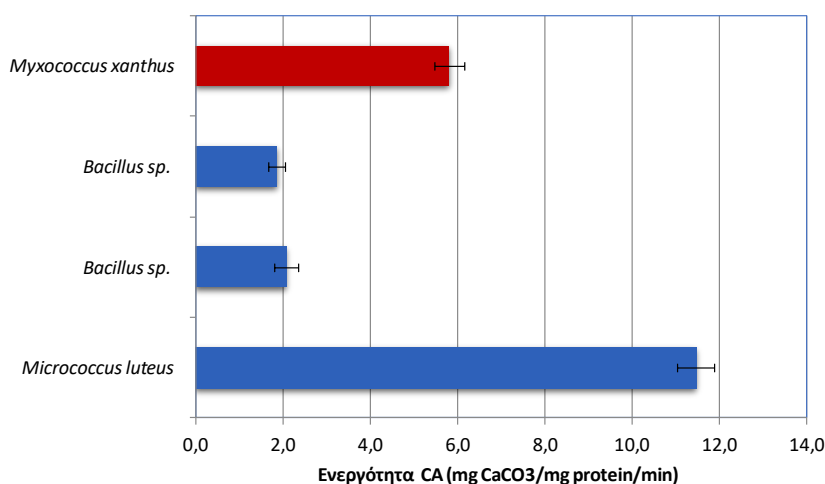
**Διάγραμμα 21:** Ενεργότητα καρβονικής ανυδράσης βακτηρίων που απομονώθηκαν από το Ευπαλίνειο όρυγμα. Η ράβδος με κόκκινο χρώμα αφορά στην ενεργότητα καρβονικής ανυδράσης του βακτηρίου *Myxococcus xanthus* ATCC 435.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα προσδιορισμού της ενεργότητας της καρβονικής ανυδράσης των βακτηρίων που απομονώθηκαν από την Ιερά Μονή Παναγίας Βαρνάκοβας (Διάγραμμα 22), το είδος *P. frigoritoleraans* εμφανίζει την υψηλότερη τιμή (8.0 ± 1.6 mg CaCO<sub>3</sub>/mg πρωτεΐνης/min), ακολουθούμενο από το *M. litoralis* (6.2 ± 0.9 mg CaCO<sub>3</sub>/mg πρωτεΐνης/min). Για τα υπόλοιπα εξετασθέντα βακτήρια, η ενεργότητα καρβονικής ανυδράσης υπολογίζεται μικρότερη των 3.0 mg CaCO<sub>3</sub>/mg πρωτεΐνης/min, με το στέλεχος *M. herbersteinensis* να παρουσιάζει τη χαμηλότερη τιμή (1.8 ± 0.4 mg CaCO<sub>3</sub>/mg πρωτεΐνης/min).



**Διάγραμμα 22:** Ενεργότητα καρβονικής ανυδράσης βακτηρίων που απομονώθηκαν από την Ιερά Μονή Παναγίας Βαρνάκοβας. Η ράβδος με κόκκινο χρώμα αφορά στην ενεργότητα καρβονικής ανυδράσης του βακτηρίου *M. xanthus* ATCC 435.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα προσδιορισμού της ενεργότητας της καρβονικής ανυδράσης των εξετασθέντων βακτηρίων που απομονώθηκαν από τα μνημεία Αφεντάκη και Δελιγιάννη στο Α' Νεκροταφείο Αθηνών (Διάγραμμα 23), το στέλεχος *M. luteus* εμφανίζει με μεγάλη διαφορά την υψηλότερη τιμή ( $11.4 \pm 0.4$  mg CaCO<sub>3</sub>/mg πρωτεΐνης/min), ενώ ακολουθούν με συγκριτικά αρκετά χαμηλές τιμές τα βακτήρια *Bacillus sp.* (A4-3b) ( $2.1 \pm 0.3$  mg CaCO<sub>3</sub>/mg πρωτεΐνης/min) και *Bacillus sp.* (D1-2b) ( $1.85 \pm 0.19$  mg CaCO<sub>3</sub>/mg πρωτεΐνης/min).



**Διάγραμμα 23:** Ενεργότητα καρβονικής ανυδράσης βακτηρίων που απομονώθηκαν από τα μνημεία Αφεντάκη και Δελιγιάννη στο Α' Νεκροταφείο Αθηνών. Η ράβδος με κόκκινο χρώμα αφορά στην ενεργότητα καρβονικής ανυδράσης του βακτηρίου *M. xanthus* ATCC 435.

### 3.6 Ανάπτυξη των ωφέλιμων ασβεστοπαραγωγικών βακτηρίων σε δείγματα των λίθινων επιφανειών των επιδεικτικών μνημείων

Η μελέτη εναπόθεσης ανθρακικού ασβεστίου στα λίθινα δείγματα προϋποθέτει την επιλογή των κατάλληλων αυτόχθονων βακτηριακών στελεχών, προκειμένου να μη διαταραχθεί η σύνθεση και η ομαλή λειτουργία του μικροβιακού οικοσυστήματος των επιδεικτικών μνημείων. Το κυριότερο κριτήριο επιλογής είναι το θετικό τους αποτέλεσμα στον έλεγχο της ουρεολυτικής τους δράσης και στη συνέχεια ακολουθεί η τιμή ενεργότητας της καρβονικής ανυδράσης, καθώς αποτελούν καταλυτικές παραμέτρους εκτίμησης της ικανότητας των βακτηρίων να εναποθέτουν ανθρακικό ασβέστιο. Επιπλέον, τα επιλεχθέντα βακτήρια οφείλουν να εμφανίζουν ικανοποιητικό ρυθμό ανάπτυξης και σχετικά υψηλή μέγιστη κυτταρική συγκέντρωση, ώστε να εξασφαλίζεται η ταχεία ανάπτυξη τους και η παραγωγή υψηλών συγκεντρώσεων των ενζύμων ουρεάση και καρβονική ανυδράση.

Ως δείγμα ελέγχου χρησιμοποιείται το εμπορικό στέλεχος *M. xanthus* ATCC 435, το οποίο παρουσιάζει την ικανότητα εναπόθεσης ανθρακικού ασβεστίου (Rodriguez-Navarro et al., 2003).

Τα αποτελέσματα μελέτης των κινητικών χαρακτηριστικών και των μεθόδων ποιοτικής (έλεγχος ουρεολυτικής δράσης) και ποσοτικής (προσδιορισμός ενεργότητας καρβονικής ανυδράσης) αξιολόγησης της ικανότητας εναπόθεσης ανθρακικού ασβεστίου των βακτηρίων που απομονώθηκαν από τα επιδεικτικά μνημεία παρουσιάζονται αναλυτικά στους Πίνακες 25-27.

Έπειτα από σύγκριση του συνόλου των χαρακτηριστικών των εξετασθέντων βακτηρίων που απομονώθηκαν από το Ευπαλίνειο όρυγμα (Πίνακας 25), με τις τιμές των αντίστοιχων χαρακτηριστικών του εμπορικού στελεχούς *M. xanthus* ATCC 435, τα είδη *P.cichorii* και *S.*

*thermotolerans* επιλέγονται για περαιτέρω μελέτη της ικανότητας εναπόθεσης ανθρακικού ασβεστίου σε δείγματα λίθινων επιφανειών των επιδεικτικών μνημείων. Τα βακτηριακά στελέχη *P. cichorii* και *S. thermotolerans* παρουσιάζουν θετικά αποτελέσματα στον έλεγχο της ουρεολυτικής τους δράσης, ενώ παράλληλα εμφανίζουν και τις υψηλότερες τιμές ενεργότητας καρβονικής ανυδράσης μεταξύ των βακτηριακών στελεχών που εξετάστηκαν από το Ευπαλίνιο όρυγμα. Τέλος, η μέγιστη συγκέντρωση κυτταρικής μάζας και των δύο βακτηρίων κυμαίνεται σε ικανοποιητικά επίπεδα, με το δυναμικό μεταφοράς του βακτηρίου *P.cichorii* που αποτελεί ένδειξη του ρυθμού ανάπτυξης του να υπολογίζεται κατά 35% μεγαλύτερο του αντίστοιχου βακτηρίου *S. thermotolerans*.

Η ανάλυση των χαρακτηριστικών των εξετασθέντων βακτηρίων που απομονώθηκαν από την Ιερά Μονή Παναγίας Βαρνάκοβας (Πίνακας 26), οδηγεί στην επιλογή των στελεχών *P. frigritolerans* και *M. litoralis*. Τα δύο αυτά είδη παρουσιάζουν θετικά αποτελέσματα στον έλεγχο της ουρεολυτικής τους δράσης, ενώ παράλληλα εμφανίζουν και τις υψηλότερες τιμές ενεργότητας καρβονικής ανυδράσης μεταξύ των αυτόχθονων βακτηρίων που εξετάστηκαν, καθώς και του στελέχους *M. xanthus* ATCC 435. Επιπλέον, οι τιμές μέγιστης κυτταρικής συγκέντρωσης και των δύο στελεχών κυμαίνονται σε ικανοποιητικά επίπεδα, ενώ συγχρόνως εμφανίζουν σχετικά υψηλούς ρυθμούς ανάπτυξης, όπως φαίνεται από τις τιμές του δυναμικού μεταφοράς.

Από τη μελέτη των χαρακτηριστικών των εξετασθέντων αυτόχθονων βακτηρίων που απομονώθηκαν από τα μνημεία Αφεντάκη και Δελιγιάννη στο Α' Νεκροταφείο Αθηνών (Πίνακας 27), επιλέγεται το βακτήριο *M. luteus*, καθώς παρουσιάζει θετικό αποτέλεσμα στον έλεγχο της ουρεολυτικής του δράσης, ενώ παράλληλα εμφανίζει την υψηλότερη από το σύνολο των μελετηθέντων βακτηρίων και σχεδόν διπλάσια από το στέλεχος *M. xanthus* ATCC 435 τιμή ενεργότητας καρβονικής ανυδράσης. Τέλος, οι τιμές της μέγιστης κυτταρικής μάζας και του δυναμικού μεταφοράς του κυμαίνονται σε ικανοποιητικά επίπεδα.

Επομένως, από το σύνολο των επιδεικτικών μνημείων επιλέγονται 5 βακτηριακά στελέχη που πληρούν τις απαραίτητες προϋποθέσεις εναπόθεσης ανθρακικού ασβεστίου (Πίνακας 24).

**Πίνακας 24:** Βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα εναπόθεσης ανθρακικού ασβεστίου σε δείγματα λίθινων επιφανειών των επιδεικτικών μνημείων

Βακτήριο	Μνημείο που απομονώθηκε
<i>Sporosarcina thermotolerans</i>	Ευπαλίνιο Όρυγμα
<i>Pseudomonas cichorii</i>	Ευπαλίνιο Όρυγμα
<i>Metabacillus litoralis</i>	Ιερά Μονή Παναγίας Βαρνάκοβας
<i>Peribacillus frigritolerans</i>	Ιερά Μονή Παναγίας Βαρνάκοβας
<i>Micrococcus luteus</i>	Α' Νεκροταφείο Αθηνών
<i>Myxococcus xanthus</i> ATCC 435	Εμπορικά διαθέσιμο στέλεχος
Μείγμα των <i>S. thermotolerans</i> , <i>P. cichorii</i> , <i>M. litoralis</i> , <i>P. frigritolerans</i> , <i>M. luteus</i> & <i>M. xanthus</i> ATCC 435 (ίση αρχική συγκέντρωση κυττάρων)	-

**Πίνακας 25:** Αποτελέσματα κινητικών χαρακτηριστικών ανάπτυξης, ουρεολυτικής δράσης και ενεργότητας καρβονικής ανυδράσης των βακτηρίων που απομονώθηκαν από το Ευπαλίγειο όρυγμα

Κωδικός στελέχους ανά σημείο δειγματοληψίας	Πλησιέστερος συγγενικός κλώνος (% ομοιότητα) [Αριθμός πρόσβασης]	Δυναμικό μεταφοράς $k$ ( $h^{-1}$ )	Μέγιστη συγκέντρωση κυτταρικής μάζας $X_{max}$ (mg DCW/ml)	Αποτέλεσμα ποιοτικού ελέγχου ουρεολυτικής δράσης	Ενεργότητα καρβονικής ανυδράσης (mg CaCO <sub>3</sub> /mg protein/min)
E1-3b & E1-5b	<i>Metabacillus indicus</i> (98.9%) [NR_042974]	0.274 ± 0.004	0.78 ± 0.02	Αρνητικό	2.61 ± 0.92
E1-4b	<i>Solibacillus isronensis</i> (83.9%) [NR_118049]	0.322 ± 0.018	1.91 ± 0.13	Θετικό	0.98 ± 0.22
E1 – 7b	<i>Pseudomonas cichorii</i> (90.8%) [MT415198]	0.253 ± 0.007	1.42 ± 0.01	Θετικό	3.00 ± 0.29
E3 – 3b	<i>Sporosarcina thermotolerans</i> (98.4%) [NR_116956]	0.163 ± 0.004	1.85 ± 0.01	Θετικό	8.65 ± 0.43
E3 – 5b & E3-6b	<i>Metabacillus herbersteinensis</i> (99.6%) [NR_042286]	0.277 ± 0.004	1.81 ± 0.04	Αρνητικό	2.76 ± 0.83

E7-3b	<i>Rhodococcus wratislaviensis</i> (93.3%) [NR_118605]	$0.184 \pm 0.002$	$1.20 \pm 0.02$	Θετικό	$2.15 \pm 0.53$
Στέλεχος αναφοράς	<i>Mycococcus xanthus</i> (ATCC 435)	$0.261 \pm 0.014$	$1.61 \pm 0.02$	Αρνητικό	$5.80 \pm 0.34$



**Πίνακας 26:** Αποτελέσματα κινητικών χαρακτηριστικών ανάπτυξης, ουρεολυτικής δράσης και ενεργότητας καρβονικής ανυδράσης των βακτηρίων που απομονώθηκαν από την Ιερά Μονή Παναγίας Βαρνάκοβας

Κωδικός στελέχους ανά σημείο δειγματοληψίας	Πλησιέστερος συγγενικός κλώνος (% ομοιότητα) [Αριθμός πρόσβασης]	Δυναμικό μεταφοράς $k$ ( $h^{-1}$ )	Μέγιστη συγκέντρωση κυτταρικής μάζας $X_{max}$ (mg DCW/ml)	Αποτέλεσμα ποιοτικού ελέγχου ουρεολυτικής δράσης	Ενεργότητα καρβονικής ανυδράσης (mg $CaCO_3$ /mg protein/min)
VS1-3b	<i>Peribacillus frigoritolerans</i> (100%) [NR_117474]	$0.356 \pm 0.014$	$1.22 \pm 0.01$	Θετικό	$8.02 \pm 1.64$
VS2-2b & VO1-4b	<i>Metabacillus litoralis</i> (98.9%) [NR_043015]	$0.284 \pm 0.012$	$2.53 \pm 0.02$	Θετικό	$6.19 \pm 0.91$
VS3 – 2b, VO1-1b, VO1-5b, VO4-1b	<i>Metabacillus herbersteinensis</i> (99.7%) [NR_042286]	$0.277 \pm 0.004$	$1.81 \pm 0.04$	Αρνητικό	$2.76 \pm 0.83$
VO1 – 3b	<i>Fictibacillus halophilus</i> (95.9%) [NR_149289]	$0.225 \pm 0.004$	$0.74 \pm 0.02$	Θετικό	$2.94 \pm 0.90$
VO2 – 1b	<i>Paenibacillus harenae</i> (92.8%) [NR_043220]	$0.263 \pm 0.003$	$2.27 \pm 0.02$	Αρνητικό	$1.88 \pm 0.57$
VO3 – 2b	<i>Bacillus mesophilus</i> (97.8%) [NR_149175]	$0.309 \pm 0.017$	$1.49 \pm 0.02$	Αρνητικό	$2.08 \pm 0.83$

Στέλεχος αναφοράς	<i>Μυχοσoccus xanthus</i> (ATCC 435)	0.261 ± 0.014	1.61 ± 0.02	Αρνητικό	5.80 ± 0.34
-------------------	---	---------------	-------------	----------	-------------

**Πίνακας 27:** Αποτελέσματα κινητικών χαρακτηριστικών ανάπτυξης, ουρεολυτικής δράσης και ενεργότητας καρβονικής ανυδράσης των βακτηρίων που απομονώθηκαν από τα μνημεία Αφεντάκη και Δελιγιάννη στο Α' Νεκροταφείο Αθηνών

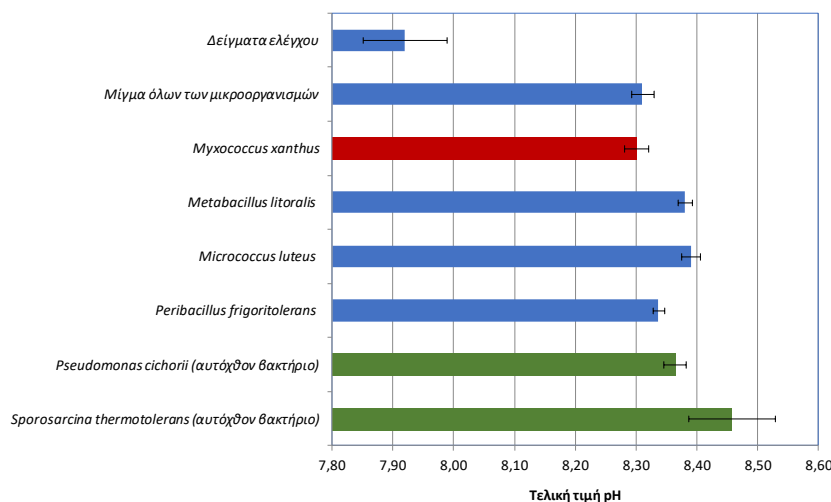
Κωδικός στελέχους ανά σημείο δειγματοληψίας	Πλησιέστερος συγγενικός κλώνος (% ομοιότητα) [Αριθμός πρόσβασης]	Δυναμικό μεταφοράς $k$ ( $h^{-1}$ )	Μέγιστη συγκέντρωση κυτταρικής μάζας $X_{max}$ (mg DCW/ml)	Αποτέλεσμα ποιοτικού ελέγχου ουρεολυτικής δράσης	Ενεργότητα καρβονικής ανυδράσης (mg CaCO <sub>3</sub> /mg protein/min)
A1-4b	<i>Micrococcus luteus</i> (99.4%) [HQ717326]	0.222 ± 0.031	2.22 ± 0.01	Θετικό	11.4 ± 0.4
A4-3b	<i>Bacillus</i> sp. (100%) [HM804391]	0.132 ± 0.012	0.31 ± 0.05	Θετικό	2.1 ± 0.3
D1-2b	<i>Bacillus</i> sp. (100%) [MT582155]	0.352 ± 0.004	1.64 ± 0.02	Αρνητικό	1.85 ± 0.19
Στέλεχος αναφοράς	<i>Μυχοσoccus xanthus</i> (ATCC 435)	0.261 ± 0.014	1.61 ± 0.02	Αρνητικό	5.80 ± 0.34

### 3.6.1 Ανάπτυξη των επιλεγμένων βακτηρίων σε δείγματα λίθινων επιφανειών των επιδεικτικών μνημείων

Με τη χρήση δειγμάτων των λίθινων επιφανειών των επιδεικτικών μνημείων πραγματοποιείται προσομοίωση των βέλτιστων συνθηκών εναπόθεσης ανθρακικού ασβεστίου από τα εξετασθέντα βακτηριακά σε εργαστηριακή κλίμακα. Η ποσότητα σε mg του ανθρακικού ασβεστίου που εναποτίθεται στα δείγματα (Διαγράμματα 25, 27, 29), αποτελεί το σύνολο των κρυστάλλων ανθρακικού ασβεστίου που προσκολλώνται και παραμένουν ισχυρά συνδεδεμένοι στην επιφάνεια και στο εσωτερικό πορώδες σύστημα των λίθινων υποστρωμάτων. Άρα, τα αποτελέσματα εναπόθεσης ανθρακικού ασβεστίου στα δείγματα είναι αντιπροσωπευτικά της ποσότητας που παραμένει συνδεδεμένη σε αυτά και όχι της συνολικά παραγόμενης ποσότητας από τα βακτηριακά κύτταρα.

Η επιλογή εμβολιασμού των λίθινων δειγμάτων με ισοπληθυσμιακό μείγμα των 5 αυτόχθονων βακτηρίων των επιδεικτικών μνημείων και του εμπορικού στελέχους *M. xanthus* ATCC 435, παρόλο που δεν συνάδει με την προστασία της οικολογίας του τοπικού μικροβιακού οικοσυστήματος των μνημείων, στοχεύει στον έλεγχο πιθανής μεταξύ τους συνεργαστικής δράσης για την εναπόθεση ανθρακικού ασβεστίου. Αξίζει να επισημανθεί, ότι δεν είναι δυνατή η γνώση της βακτηριακής προέλευσης του τελικώς εναποθέντος ανθρακικού ασβεστίου, ούτε των βακτηριακών στελεχών, των οποίων η ανάπτυξη κυριάρχησε. Γενικότερα, σκοπός των δοκιμών αποτελεί η εκτίμηση της ποσότητας του ανθρακικού ασβεστίου που παραμένει συνδεδεμένη στα δείγματα με κύρια έμφαση στα αποτελέσματα των αυτόχθονων για κάθε μνημείο βακτηρίων, ως μια εκτίμηση της μεγαλύτερης κλίμακας εφαρμογής αυτής της πρακτικής αποκατάστασης στα ίδια τα μνημεία, μέσω ενίσχυσης των αυτόχθονων βακτηριακών πληθυσμών.

Η απελευθέρωση μεταβολιτών από τα ασβεστοπαραγωγικά βακτήρια αυξάνει το pH στο περιβάλλον του κυττάρου με αποτέλεσμα την εναπόθεση ανθρακικού ασβεστίου, λόγω αύξησης του υπερκορεσμού. Το τελικό pH των καλλιεργειών εναπόθεσης ανθρακικού ασβεστίου σε δείγματα λίθινων επιφανειών του Ευπαλινείου ορύγματος παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 24. Το αρχικό pH όλων των καλλιεργειών είναι 8.0. Επιπλέον, δεν παρατηρείται σημαντική μεταβολή στην τιμή του pH των δειγμάτων ελέγχου. Σε όλες τις περιπτώσεις, παρατηρείται αύξηση του pH, με την καλλιέργεια του βακτηρίου *S. thermotolerans* να εμφανίζει τη μεγαλύτερη αύξηση (τελική τιμή pH  $8.46 \pm 0.07$ ). Παρόμοια συμπεριφορά σε ότι αφορά τη μεταβολή του pH καλλιέργειας αναφέρεται και από τους Rodriguez-Navarro et al. (2003), κατά την εναπόθεση  $\text{CaCO}_3$  από το βακτήριο *M. xanthus* σε λίθινες επιφάνειες.



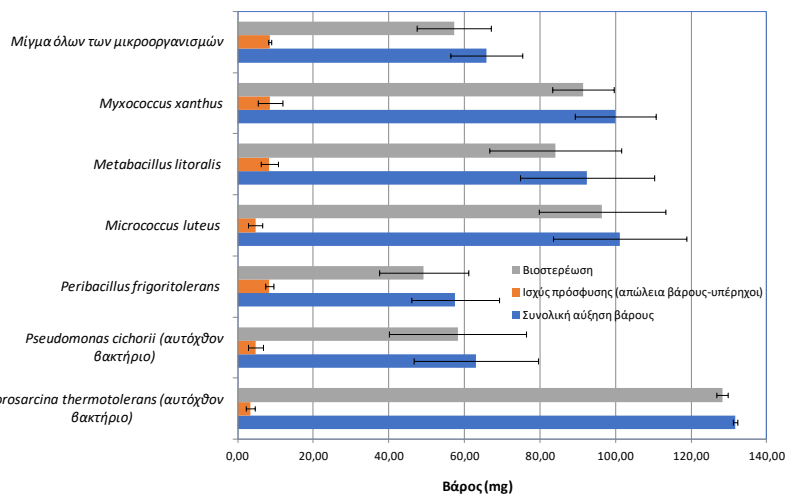
**Διάγραμμα 24:** Τελική τιμή pH των βακτηριακών καλλιεργειών σε δείγματα λίθινων επιφανειών του Ευπαλινείου ορύγματος. Οι πράσινες ράβδοι αντιστοιχούν στα αυτόχθονα βακτήρια του Ευπαλινείου ορύγματος. Η κόκκινη

ράβδος αντιστοιχεί στο εμπορικό στέλεχος *M. xanthus* ATCC 435.

Τα αποτελέσματα εναπόθεσης ανθρακικού ασβεστίου στα δείγματα λίθινων επιφανειών από το Ευπαλίνειο όρυγμα παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 25. Σε όλες τις περιπτώσεις, μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας εναπόθεσης, η κατεργασία με υπερήχους οδήγησε σε απομάκρυνση μικρών ποσοτήτων υλικού από την επιφάνεια των δειγμάτων. Η κατεργασία με υπερήχους είναι ένα αποτελεσματικό μέσο απομάκρυνσης υλικών που έχουν προσκολληθεί ασθενώς σε μια επιφάνεια (Mashelin et al., 2001) και αποτελεί μια έμμεση εκτίμηση της δύναμης πρόσφυσης μεταξύ των ασθενώς προσκολλημένων υλικών και του υποστρώματος. Στη περίπτωση των νεοσχηματισθέντων ανθρακικών αλάτων που εναποτίθενται στις λίθινες επιφάνειες, η κατεργασία με υπερήχους δίνει μια εκτίμηση της ισχύος πρόσφυσης τους, καθώς και της αποτελεσματικότητας στερεοποίησης και προστασίας τους.

Μέσω της κατεργασίας των δειγμάτων με υπερήχους απομακρύνθηκε σε ποσοστά που κυμαίνονται από 2.6% στη περίπτωση του βακτηρίου *S. thermotolerans* (αυτόχθον βακτήριο) έως 14.6% στην περίπτωση του βακτηρίου *P. frigoritoleras* (Ιερά Μονή Παναγίας Βαρνάκοβας) μέρος του συνολικού βάρους του εναποθέντος υλικού στα δείγματα των λίθινων επιφανειών. Η ισχύς της πρόσφυσης συνεπώς των νεοσυντιθέμενων ανθρακικών αλάτων ακολουθεί τη σειρά (από τη μικρότερη προς τη μεγαλύτερη απώλεια υλικού): *S. thermotolerans* (αυτόχθον βακτήριο) > *M. luteus* (Α' Νεκροταφείο Αθηνών) > *P. cichorii* (αυτόχθον βακτήριο) > *M. xanthus* ATCC 435 (εμπορικό στέλεχος) > *M. litoralis* (Ιερά Μονή Παναγίας Βαρνάκοβας) > Μίγμα όλων των μικροοργανισμών > *P. frigoritoleras* (Ιερά Μονή Παναγίας Βαρνάκοβας).

Αναφορικά με τις ποσότητες ανθρακικών αλάτων που εναποτέθηκαν στις λίθινες επιφάνειες το βακτήριο *S. thermotolerans* (αυτόχθον βακτήριο) είναι το αποτελεσματικότερο όλων εμφανίζοντας την υψηλότερη βιοστερέωση υλικού ( $128.2 \pm 1.5$  mg), ενώ το επίσης αυτόχθον βακτήριο *P. cichorii* εμφάνισε ενδιάμεση βιοστερέωση ( $58.2 \pm 18.2$  mg) (Διάγραμμα 26).

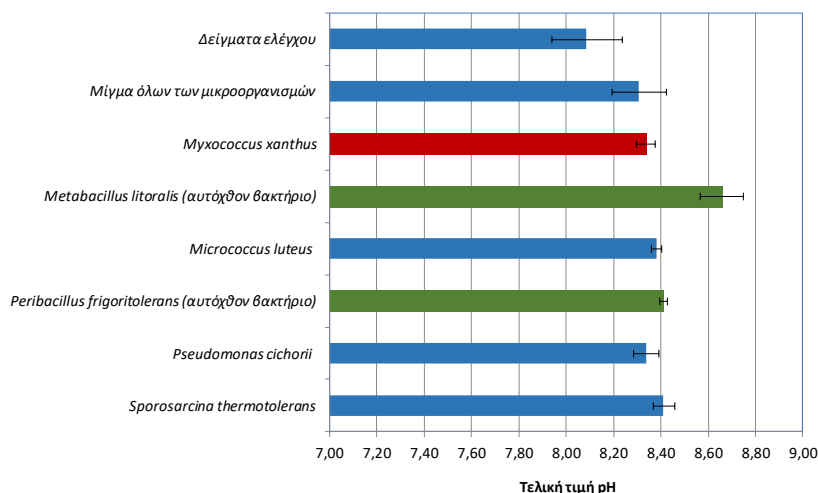


**Διάγραμμα 25:** Εναπόθεση ανθρακικού ασβεστίου σε δείγματα λίθινων επιφανειών του Ευπαλινείου ορύγματος.

Η βιοστερέωση στα δείγματα των λίθινων επιφανειών (εκφρασμένη σε mg CaCO<sub>3</sub>/g αρχικού βάρους λίθινης επιφάνειας) ακολουθεί τη σειρά (υψηλότερη προς χαμηλότερη βιοστερέωση): *S. thermotolerans* (αυτόχθον βακτήριο) ( $11.5 \pm 2.5$  mg CaCO<sub>3</sub> /g λίθινης επιφάνειας) > *M. luteus* (Α' Νεκροταφείο Αθηνών) ( $6.3 \pm 0.6$  mg CaCO<sub>3</sub> /g λίθινης επιφάνειας)  $\approx$  *M. xanthus* ATCC 435 (εμπορικό στέλεχος) ( $6.2 \pm 0.9$  mg CaCO<sub>3</sub> /g λίθινης επιφάνειας) > *M. litoralis* (Ιερά Μονή Παναγίας Βαρνάκοβας) ( $5.6 \pm 0.3$  mg CaCO<sub>3</sub> /g λίθινης επιφάνειας) > Μίγμα όλων των μικροοργανισμών ( $3.9 \pm 1.2$  mg CaCO<sub>3</sub> /g λίθινης

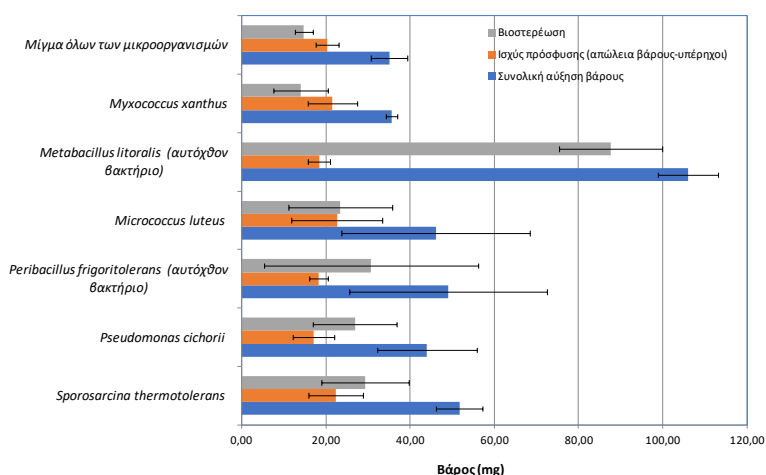
επιφάνειας) > *P. cichorii* (αυτόχθον βακτήριο) ( $3.6 \pm 0.7$  mg CaCO<sub>3</sub> /g λίθινης επιφάνειας) > *P. frigritolerans* (Ιερά Μονή Παναγίας Βαρνάκοβας) ( $2.7 \pm 0.6$  mg CaCO<sub>3</sub> /g λίθινης επιφάνειας).

Το τελικό pH των καλλιεργειών εναπόθεσης ανθρακικού ασβεστίου σε δείγματα λίθινων επιφανειών της Ιεράς Μονής Παναγίας Βαρνάκοβας παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 26. Το αρχικό pH όλων των καλλιεργειών είναι 8.0. Επιπλέον, δεν παρατηρείται σημαντική μεταβολή στην τιμή του pH των δειγμάτων ελέγχου. Σε όλες τις περιπτώσεις, παρατηρείται αύξηση του pH με την καλλιέργεια του βακτηρίου *M. litoralis* (αυτόχθον βακτήριο) να εμφανίζει τη μεγαλύτερη αύξηση (τελική τιμή pH  $8.66 \pm 0.07$ ).



**Διάγραμμα 26:** Τελική τιμή pH των βακτηριακών καλλιεργειών σε δείγματα λίθινων επιφανειών της Ιεράς Μονής Παναγίας Βαρνάκοβας. Οι πράσινες ράβδοι αντιστοιχούν στα αυτόχθονα βακτήρια της Ιεράς Μονής Παναγίας Βαρνάκοβας. Η κόκκινη ράβδος αντιστοιχεί στο εμπορικό στέλεχος *M. xanthus* ATCC 435.

Τα αποτελέσματα εναπόθεσης ανθρακικού ασβεστίου στα δείγματα λίθινων επιφανειών της Ιεράς Μονής Παναγίας Βαρνάκοβας παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 27. Σε όλες τις περιπτώσεις μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας εναπόθεσης, η κατεργασία με υπερήχους οδήγησε σε απομάκρυνση σημαντικών ποσοτήτων υλικού από την επιφάνεια των δειγμάτων. Τα ποσοστά απομάκρυνσης του νεοσυντιθέμενου υλικού ήταν πολύ υψηλότερα αυτών που παρατηρήθηκαν στην περίπτωση των δειγμάτων του Ευπαλινείου Ορύγματος (Διάγραμμα 25).



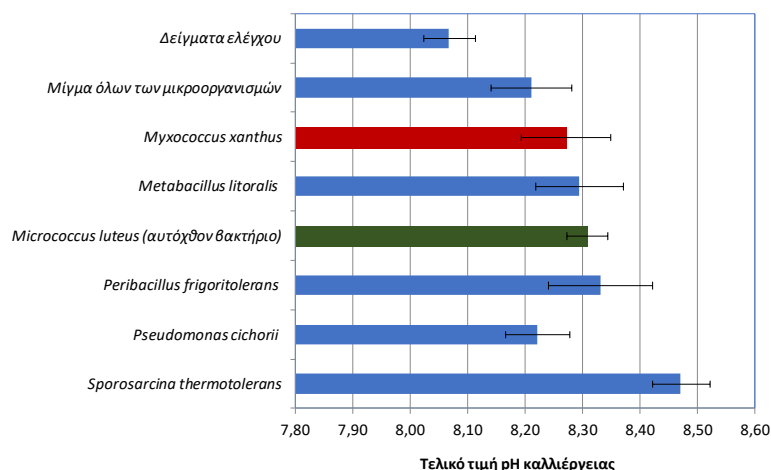
**Διάγραμμα 27:** Εναπόθεση ανθρακικού ασβεστίου σε δείγματα λίθινων επιφανειών της Ιεράς Μονής Παναγίας Βαρνάκοβας.

Η ποσότητα των νεοσυντιθέμενων ανθρακικών αλάτων που απομακρύνθηκε με την κατεργασία των δειγμάτων με υπερήχους και άρα η ισχύς πρόσφυσης του νεοσυντιθέμενου υλικού στις επιφάνειες των δειγμάτων από την Ιερά Μονή Παναγίας Βαρνάκοβας ακολουθεί τη σειρά (από τη μικρότερη προς τη μεγαλύτερη απώλεια υλικού): *P. cichorii* (Ευπαλίνιο όρυγμα) > *P. frigorigerans* (αυτόχθον βακτήριο) ≈ *M. litoralis* (αυτόχθον βακτήριο) > Μίγμα όλων των μικροοργανισμών > *M. xanthus* ATCC 435 (εμπορικό στέλεχος) > *M. luteus* (Α' Νεκροταφείο Αθηνών) ≈ *S. thermotolerans* (Ευπαλίνιο όρυγμα).

Αναφορικά με τις ποσότητες ανθρακικών αλάτων που εναποτέθηκαν στις λίθινες επιφάνειες το βακτήριο *M. litoralis* (αυτόχθον βακτήριο) είναι το αποτελεσματικότερο όλων εμφανίζοντας την υψηλότερη βιοστερέωση ( $88.7 \pm 12.3$  mg), ενώ το επίσης αυτόχθον βακτήριο *P. frigorigerans* εμφάνισε ενδιάμεση βιοστερέωση ( $49.1 \pm 19.4$  mg).

Η βιοστερέωση στα δείγματα των λίθινων επιφανειών από την Ιερά Μονή Παναγίας Βαρνάκοβας (εκφρασμένη σε mg CaCO<sub>3</sub>/g αρχικού βάρους λίθινης επιφάνειας) ακολουθεί τη σειρά (υψηλότερη προς χαμηλότερη βιοστερέωση): *M. litoralis* (αυτόχθον βακτήριο) ( $5.9 \pm 0.8$  mg CaCO<sub>3</sub> /g λίθινης επιφάνειας) > *S. thermotolerans* (Ευπαλίνιο Όρυγμα) ( $2.5 \pm 0.8$  mg CaCO<sub>3</sub> /g λίθινης επιφάνειας) > *P. frigorigerans* (αυτόχθον βακτήριο) ( $2.2 \pm 0.6$  mg CaCO<sub>3</sub> /g λίθινης επιφάνειας) > *P. cichorii* (Ευπαλίνιο Όρυγμα) ( $1.9 \pm 0.7$  mg CaCO<sub>3</sub> /g λίθινης επιφάνειας) > *M. luteus* (Α' Νεκροταφείο Αθηνών) ( $1.6 \pm 0.6$  mg CaCO<sub>3</sub> /g λίθινης επιφάνειας) > *M. xanthus* ATCC 435 (εμπορικό στέλεχος) ( $1.1 \pm 0.5$  mg CaCO<sub>3</sub> /g λίθινης επιφάνειας) > Μίγμα όλων των μικροοργανισμών ( $0.6 \pm 0.1$  mg CaCO<sub>3</sub> /g λίθινης επιφάνειας).

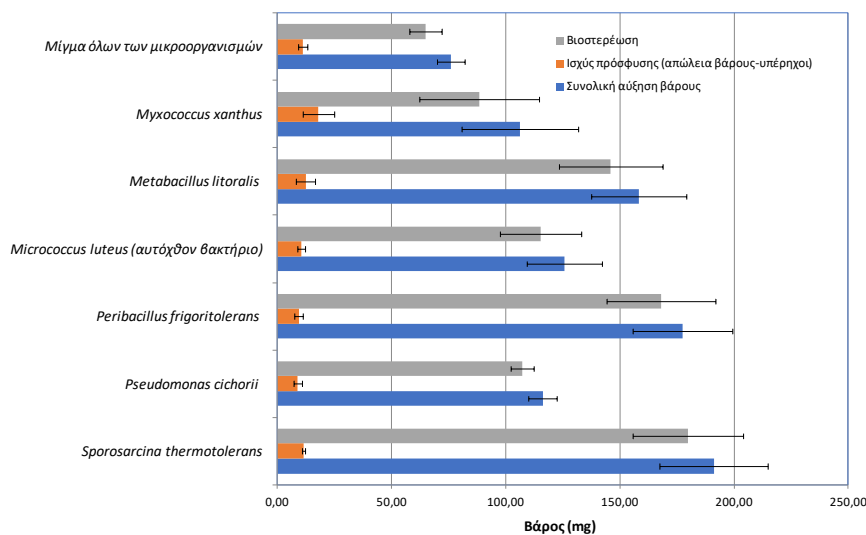
Το τελικό pH των καλλιιεργειών εναπόθεσης ανθρακικού ασβεστίου σε δείγματα λίθινων επιφανειών του Α' Νεκροταφείου Αθηνών παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 28. Το αρχικό pH όλων των καλλιιεργειών είναι 8.0. Επιπλέον, δεν παρατηρείται σημαντική μεταβολή στην τιμή του pH των δειγμάτων ελέγχου. Σε όλες τις περιπτώσεις, παρατηρείται αύξηση του pH με την καλλιέργεια του βακτηρίου *S. thermotolerans* (βακτήριο που απομονώθηκε από το Ευπαλίνιο όρυγμα) να εμφανίζει τη μεγαλύτερη αύξηση (τελική τιμή pH  $8.47 \pm 0.05$ ).



**Διάγραμμα 28:** Τελική τιμή pH των βακτηριακών καλλιιεργειών σε δείγματα λίθινων επιφανειών του Α' Νεκροταφείου Αθηνών. Οι πράσινες ράβδοι αντιστοιχούν στα αυτόχθονα βακτήρια του Α' Νεκροταφείου Αθηνών. Η κόκκινη ράβδος αντιστοιχεί στο εμπορικό στέλεχος *M. xanthus* ATCC 435.

Τα αποτελέσματα εναπόθεσης ανθρακικού ασβεστίου στα δείγματα λίθινων επιφανειών που προέρχονται από το Α' Νεκροταφείο Αθηνών παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 29. Σε

όλες τις περιπτώσεις μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας εναπόθεσης, η κατεργασία με υπερήχους οδήγησε σε απομάκρυνση μικρών ποσοτήτων υλικού από την επιφάνεια των δειγμάτων, ίδιας τάξης μεγέθους με αυτή των δειγμάτων του Ευπαλινείου ορύγγματος. Τα ποσοστά κυμαίνονται από 5.3% στην περίπτωση του βακτήριου *P. frigorigerans* (Ιερά Μονή Παναγίας Βαρνάκοβας) έως 16.9% στην περίπτωση του βακτηρίου *M. xanthus* ATCC 435 (εμπορικό στέλεχος).



**Διάγραμμα 29:** Εναπόθεση ανθρακικού ασβεστίου σε δείγματα λίθινων επιφανειών του Α' Νεκροταφείου Αθηνών

Η ποσότητα των νεοσυντιθέμενων ανθρακικών αλάτων που απομακρύνθηκε με την κατεργασία των δειγμάτων με υπερήχους και άρα η τάση πρόσφυσης (βιοστερέωση) του νεοσυντιθέμενου υλικού στις επιφάνειες των δειγμάτων του Α' Νεκροταφείου Αθηνών ακολουθεί τη σειρά: *P. frigorigerans* (Ιερά Μονή Παναγίας Βαρνάκοβας) > *S. thermotolerans* (Ευπαλινείο ορύγγμα) > *P. cichorii* (Ευπαλινείο ορύγγμα) ≈ *M. litoralis* (Ιερά Μονή Παναγίας Βαρνάκοβας) > *M. luteus* (αυτόχθον βακτήριο) > Μίγμα όλων των μικροοργανισμών > *M. xanthus* ATCC 435 (εμπορικό στέλεχος).

Αναφορικά με τις ποσότητες ανθρακικών αλάτων που εναποτέθηκαν στις λίθινες επιφάνειες το βακτήριο *S. thermotolerans* (Ευπαλινείο ορύγγμα) είναι το αποτελεσματικότερο όλων εμφανίζοντας την υψηλότερη βιοστερέωση ( $179.8 \pm 24.1$  mg), ενώ το αυτόχθον βακτήριο *M. luteus* εμφάνισε την τέταρτη καλύτερη βιοστερέωση ( $115.4 \pm 17.9$  mg).

Η βιοστερέωση στα δείγματα των λίθινων επιφανειών του Α' Νεκροταφείου Αθηνών (εκφρασμένη σε mg CaCO<sub>3</sub>/g αρχικού βάρους λίθινης επιφάνειας) ακολουθεί τη σειρά (υψηλότερη προς χαμηλότερη βιοστερέωση): *S. thermotolerans* (Ευπαλινείο Όρυγγμα) ( $4.6 \pm 0.6$  mg CaCO<sub>3</sub> /g λίθινης επιφάνειας) > *P. frigorigerans* (Ιερά Μονή Παναγίας Βαρνάκοβας) ( $4.3 \pm 0.8$  mg CaCO<sub>3</sub> /g λίθινης επιφάνειας) > *M. litoralis* (Ιερά Μονή Παναγίας Βαρνάκοβας) ( $3.8 \pm 1.4$  mg CaCO<sub>3</sub> /g λίθινης επιφάνειας) > *M. luteus* (αυτόχθον βακτήριο) ( $3.0 \pm 0.4$  mg CaCO<sub>3</sub> /g λίθινης επιφάνειας) > *P. cichorii* (Ευπαλινείο Όρυγγμα) ( $2.7 \pm 0.1$  mg CaCO<sub>3</sub> /g λίθινης επιφάνειας) > *M. xanthus* ATCC 435 (εμπορικό στέλεχος) ( $2.2 \pm 0.5$  mg CaCO<sub>3</sub> /g λίθινης επιφάνειας) > Μίγμα όλων των μικροοργανισμών ( $1.7 \pm 0.2$  mg CaCO<sub>3</sub> /g λίθινης επιφάνειας).

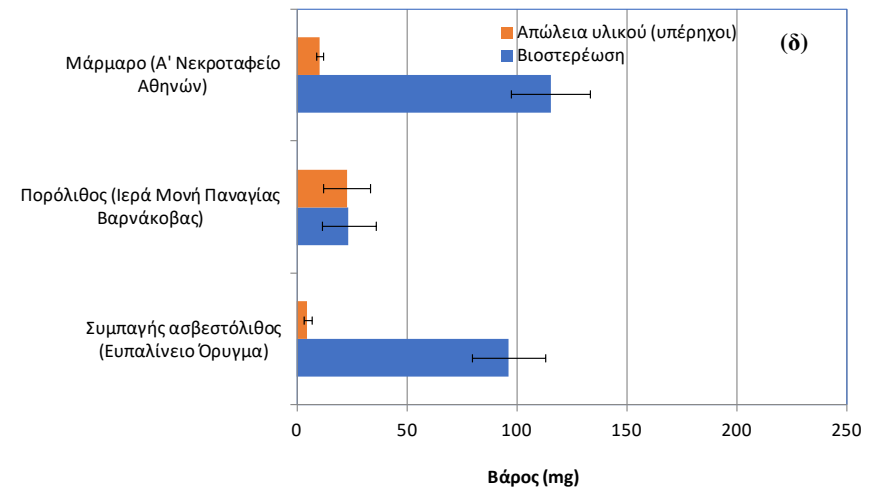
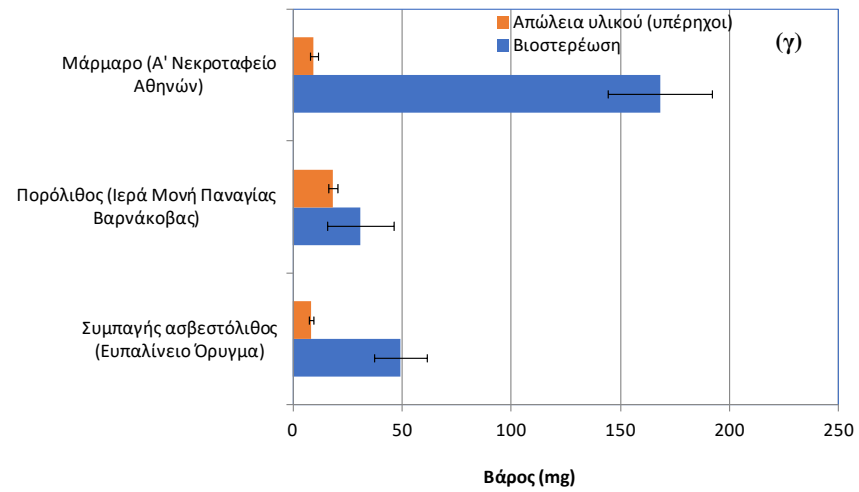
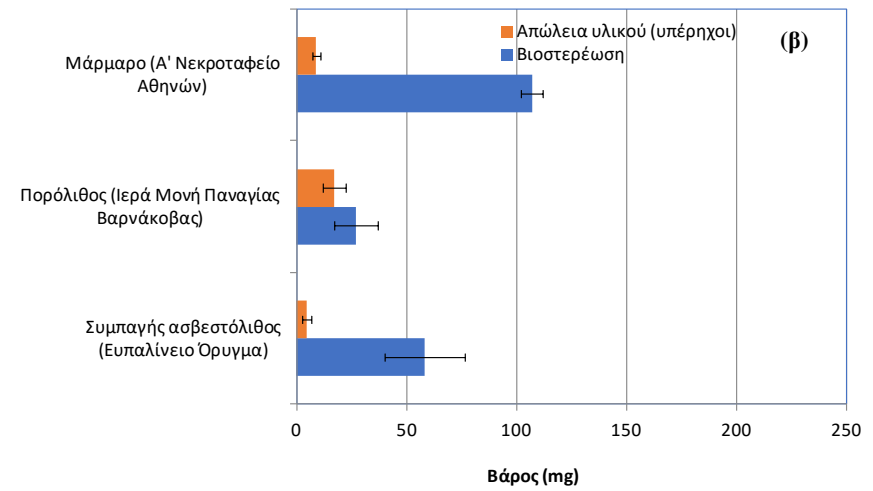
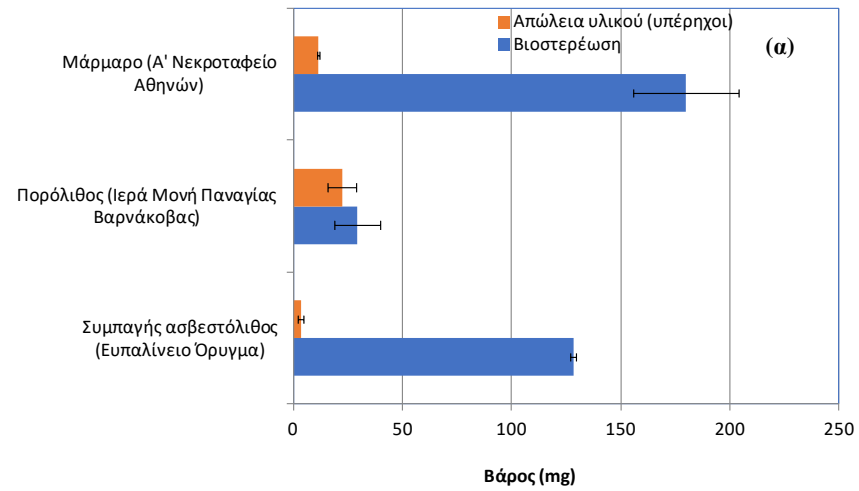
Στο σύνολο των εξετασθέντων περιπτώσεων επετεύχθη εναπόθεση ανθρακικού ασβεστίου στα δείγματα των λίθινων επιφανειών των επιδεικτικών μνημείων (Διαγράμματα 25,27,29). Το μίγμα των βακτηρίων εμφανίζεται ως το λιγότερο αποτελεσματικό στην εναπόθεση ανθρακικού ασβεστίου σε όλες τις περιπτώσεις δειγμάτων, γεγονός που υποδηλώνει έλλειψη συνεργατισμού μεταξύ των βακτηρίων.

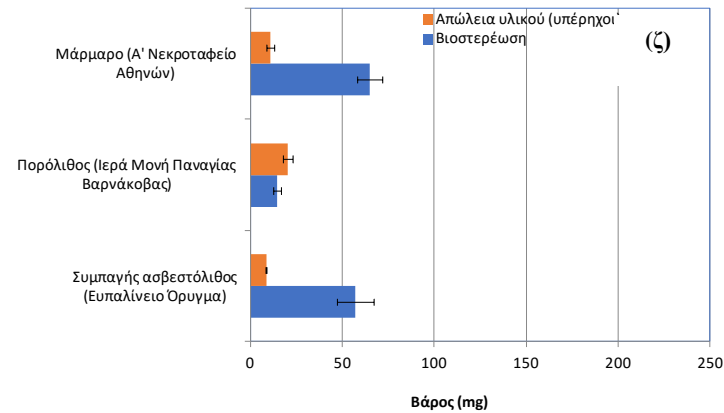
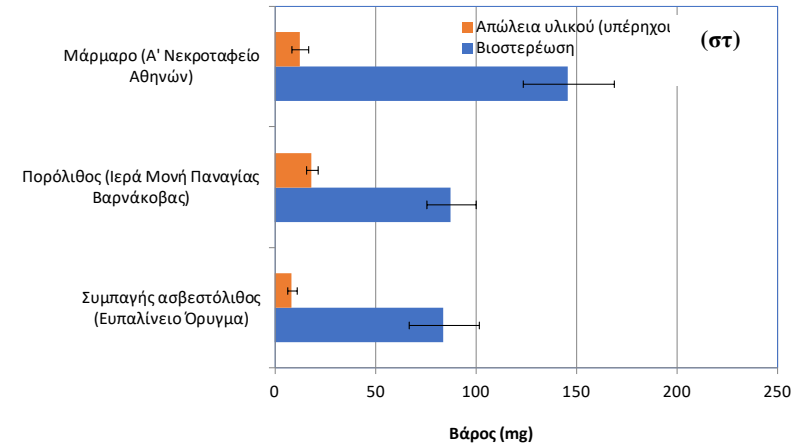
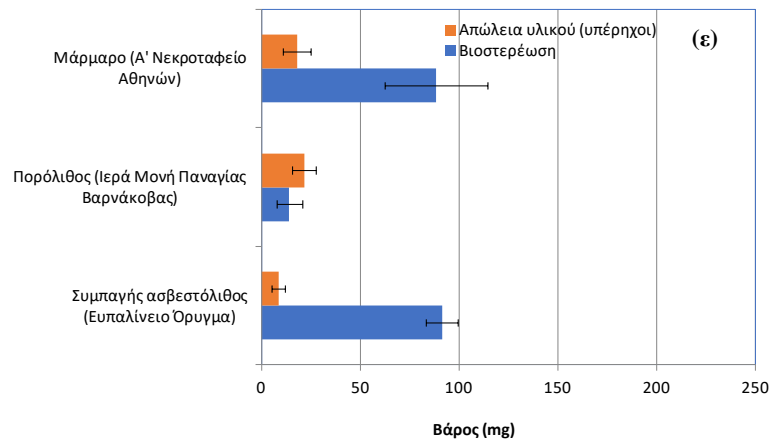
Στην περίπτωση των δειγμάτων που προέρχονται από το Ευπαλίνιο όρυγμα και την Ιερά Μονή Παναγίας Βαρνάκοβας, η εναπόθεση  $\text{CaCO}_3$  των αυτόχθονων βακτηρίων είναι αποτελεσματικότερη στα δείγματα των μνημείων από τα οποία απομονώθηκαν, έναντι των αλλόχθονων. Συγκεκριμένα, το βακτήριο *S.thermotorelans* που απομονώθηκε από το Ευπαλίνιο όρυγμα, εμφανίζει την υψηλότερη εναπόθεση ανθρακικού ασβεστίου, καθώς και την υψηλότερη βιοστερέωση υλικού στα δείγματα λίθινων επιφανειών του Ευπαλινείου ορύγματος (Διάγραμμα 25). Στην περίπτωση των δειγμάτων λίθινων επιφανειών από την Ιερά Μονή Παναγίας Βαρνάκοβας το αυτόχθονο βακτήριο *M. litoralis* παρουσιάζει τα βέλτιστα αποτελέσματα (Διάγραμμα 27). Παρόλα αυτά, όσο αφορά τα δείγματα του Α' Νεκροταφείου Αθηνών παρατηρείται διαφοροποίηση, καθώς το αυτόχθον βακτήριο *M. luteus* εμφανίζει την τέταρτη υψηλότερη επίδοση εναπόθεσης ανθρακικού ασβεστίου και βιοστερέωσης του υλικού (Διάγραμμα 29).

Επιπλέον, σε όλες τις περιπτώσεις παρατηρείται αύξηση του pH του μέσου καλλιέργειας (Διαγράμματα 24,26,28), το οποίο διατηρείται σε χαμηλότερα επίπεδα σε σχέση με τις τιμές pH κατά τη μελέτη του προφίλ ανάπτυξης των βακτηρίων. Το γεγονός αυτό οφείλεται στην υψηλή ρυθμιστική ικανότητα του θρεπτικού μέσου M-3P που χρησιμοποιείται.

Το είδος (τύπος) της λίθινης επιφάνειας, συμπαγής ασβεστόλιθος στο Ευπαλίνιο όρυγμα, πωρόλιθος στην Ιερά Μονή Παναγίας Βαρνάκοβας και μάρμαρο στο Α' Νεκροταφείο Αθηνών επηρεάζει σημαντικά την τάση πρόσφυσης (βιοστερέωση) του νεοσυντιθέμενου υλικού. Αξίζει να σημειωθεί, ότι παρατηρείται απομάκρυνση σημαντικής ποσότητας νεοσυντιθέμενου υλικού μετά την κατεργασία με υπερήχους των δειγμάτων πωρόλιθου της Ιεράς Μονής Παναγίας Βαρνάκοβας για το σύνολο των εξετασθέντων βακτηρίων, πλην του στελέχους *M. litoralis* που αποτελεί αυτόχθον βακτήριο. Στις περιπτώσεις του συμπαγούς ασβεστόλιθου (Ευπαλίνιο όρυγμα), καθώς και του μαρμάρου (Α' Νεκροταφείο Αθηνών) η τάση πρόσφυσης (βιοστερέωση) του νεοσυντιθέμενου υλικού είναι υψηλή ανεξαρτήτως του βακτηρίου που χρησιμοποιείται (Διάγραμμα 30).







**Διάγραμμα 30:** Εναπόθεση ανθρακικού ασβεστίου ανά τύπο λιθίνης επιφάνειας (μάρμαρο, πωρόλιθος και συμπαγής ασβεστόλιθος) από τα βακτήρια (α) *Sporosarcina thermotolerans*, (β) *Pseudomonas cichorii*, (γ) *Peribacillus frigoritolerans*, (δ) *Micrococcus luteus*, (ε) *Metabacillus litoralis*, (στ) *Myxococcus xanthus* ATCC 435 και (ζ) μίγμα των βακτηρίων

Επομένως, σύμφωνα με τα αποτελέσματα του Διαγράμματος 30, στην αποκατάσταση των επιδεικτικών μνημείων θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν τα κάτωθι βακτήρια:

- *Sporosarcina thermotolerans* για το Ευπαλίνειο όρυγμα
- *Metabacillus litoralis* για την Ιερά Μονή Παναγίας Βαρνάκοβας
- *Micrococcus luteus* για τα μνημεία Αφεντάκη και Δελιγιάννη του Α' Νεκροταφείου Αθηνών

## Κεφάλαιο 4: Συμπεράσματα

Τα έργα πολιτιστικής κληρονομιάς επηρεάζονται σε μεγάλο βαθμό από τη βιοδιάβρωση, φαινόμενο που εκδηλώνεται συνήθως από μικροβιακή ανάπτυξη σε επιφάνειες προκαλώντας αισθητικές, φυσικές και χημικές βλάβες. Η ένταση της βιοδιάβρωσης εξαρτάται από παράγοντες, όπως οι περιβαλλοντικές συνθήκες στις οποίες εκτίθενται τα έργα πολιτιστικής κληρονομιάς και τα βιολογικά είδη που τα αποικίζουν (Cirone et al., 2023).

Οι δειγματοληψίες βιολογικού υλικού πραγματοποιήθηκαν από το Ευπαλίνειο Όρυγμα το οποίο αποτελεί τυπικό παράδειγμα υπόγειας μνημειακής κατασκευής από λαξευμένο βράχο που βάλλεται από υγρασία (περιβάλλον ελεγχόμενου μικροκλίματος), η Ιερά Μονή Παναγίας Βαρνάκοβας που αποτελεί τυπικό παράδειγμα μνημείου που οι εξωτερικές του λίθινες όψεις παρουσιάζουν βιοδιάβρωση με επακόλουθη αισθητική υποβάθμιση, (περιβάλλον ήπιας ρυπασμένης ατμόσφαιρας) και δύο ταφικά μνημεία του Α΄ Νεκροταφείου Αθηνών (Κοιμωμένη του Χαλεπά και Κοιμωμένη του Βιτσάρη), τα οποία αποτελούν τυπικό παράδειγμα ανάγλυφων μαρμάρινων επιφανειών που εμφανίζουν μειωμένη περικρυσταλλική συνοχή στην επιφάνειά τους, λόγω της έκθεσής τους στα περιβαλλοντικά φορτία (περιβάλλον αστικής ρυπασμένης ατμόσφαιρας με ιδιαίτερο μικροκλίμα λόγω βλάστησης). Με εφαρμογή τεχνικών που βασίζονται στην καλλιέργεια των μικροοργανισμών (culture-dependent) απομονώθηκαν μικροοργανισμοί που μπορούν να καλλιεργηθούν στο εργαστήριο. Οι πλησιέστεροι συγγενείς των στελεχών που καλλιεργήθηκαν στο εργαστήριο και ταυτοποιήθηκαν με μοριακές τεχνικές, στο σύνολο των δειγμάτων που ελήφθησαν από τα τέσσερα μνημεία, ανήκουν σε ταξινομικές ομάδες (μύκητες, βακτήρια) που μπορούν να προκαλέσουν αλλοιώσεις στις επιφάνειες των μνημείων αλλά και να εμφανίσουν δυνητικά ευεργετικές ιδιότητες οι οποίες σχετίζονται κυρίως με την ικανότητα εναπόθεσης ανθρακικού ασβεστίου. Το σύνολο των απομονωθέντων μυκήτων ανήκουν στο φύλο Ascomycota και η πλειοψηφία αυτών στα γένη *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Coniosporium*, *Fusarium* και *Penicillium* που σχετίζονται με φαινόμενα βιοδιάβρωσης των μνημείων όπως φαίνεται και στον Πίνακα 28.

**Πίνακας 28:** Μύκητες που ταυτοποιήθηκαν στα τέσσερα επιδεικτικά μνημεία

Μνημείο	Είδος φθοράς στο μνημείο	Μύκητες
Αφεντάκη (Α΄ Νεκροταφείο Αθηνών)	Μαύρη βιοδιάβρωση, με μπεζ χροιά κατά τόπους & μειωμένη περικρυσταλλική συνοχή	<i>Coniosporium apollinis</i> , <i>Knufia petricola</i> , <i>Penicillium sanguiflumum</i> , <i>Talaromyces clemensii</i>
	Μαύρη βιοδιάβρωση, με μορφολογία συσσωματωμάτων κατά τόπους & μειωμένη περικρυσταλλική συνοχή σβώλους	<i>Penicillium crustosum</i>
	Φαιοκάστανη κρούστα	<i>Aspergillus sp.</i> , <i>Aureobasidium pullulans</i> , <i>Fusarium sp.</i> , <i>Neodidymelliopsis sp.</i> , <i>Pleosporales sp.</i>
	Μαύρη κρούστα	<i>Cladosporium parahalotolerans</i> , <i>Knufia marmoricola</i> , <i>Radulidium sp.</i>
	Φαινομενικά υγιής επιφάνεια	<i>Alternaria alternata</i>
	Έντονη μαύρη βιοδιάβρωση & μειωμένη περικρυσταλλική	<i>Aureobasidium pullulans</i> , <i>Cladosporium limoniforme</i> ,

Δελιγιάννη (Α' Νεκροταφείο Αθηνών)	συνοχή	<i>Pithomyces chartarum</i> , <i>Penicillium dipodomycicola</i> ,
	Φαιοκάστανη κρούστα Μαύρη βιοδιάβρωση & μειωμένη περικρυσταλλική συνοχή	<i>Apiospora marii</i> , <i>Alternaria alternata</i> , <i>Neosetophoma italica</i> , <i>Penicillium crustosum</i> , <i>Pseudopithomyces chartarum</i>
Ευπαλίνειο Όρυγμα	Μαύρη κρούστα	<i>Penicillium corylophilum</i>
	Λευκές αποθέσεις	<i>Penicillium sp.</i>
	Περιοχή ανακρυσταλλωμένου ασβεστίτη, πλούσια σε υγρασία, γκρίζας ημιδιαφανούς απόχρωσης	<i>Aspergillus sp.</i> , <i>Penicillium dipodomycicola</i>
Ιερά Μονή Παναγίας Βαρνάκοβας	Πωρόλιθος	<i>Lecanicillium psalliotae</i>
	Εξωτερική επιφάνεια με αποχρωματισμό	<i>Penicillium crustosum</i>

Το σύνολο των βακτηρίων που απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν από τα τέσσερα επιδεικτικά μνημεία παρουσιάζεται στον Πίνακα 29. Η βακτηριακή ποικιλότητα περιορίζεται στις τάξεις των *Actinomycetes*, *Bacilli* και *Gamma proteobacteria*.

**Πίνακας 29:** Βακτήρια που ταυτοποιήθηκαν στα τέσσερα επιδεικτικά μνημεία

Μνημείο	Είδος φθοράς στο μνημείο	Βακτήρια
Αφεντάκη (Α' Νεκροταφείο Αθηνών)	Μαύρη βιοδιάβρωση, με μπεζ χροιά κατά τόπους & μειωμένη περικρυσταλλική συνοχή	<i>Kocuria carniphila</i>
	Έντονη μαύρη βιοδιάβρωση & μειωμένη περικρυσταλλική συνοχή	<i>Rathayibacter sp.</i>
	Φαιοκάστανη κρούστα	<i>Actinotalea fermentans</i> , <i>Bacillus sp.</i> , <i>Rhodococcus sp.</i>
	Μαύρη κρούστα	<i>Arthrobacter sp.</i> , <i>Micrococcus luteus</i>
Δελιγιάννη (Α' Νεκροταφείο Αθηνών)	Φαινομενικά υγιής επιφάνεια	<i>Streptomyces sp.</i> , <i>Streptomyces dioscori</i>
	Πορτοκαλόχροα περιοχή & μειωμένη περικρυσταλλική συνοχή	<i>Xanthomonadales bacterium</i>
	Έντονη μαύρη βιοδιάβρωση & μειωμένη περικρυσταλλική συνοχή	<i>Arthrobacter agilis</i> , <i>Arthrobacter sp.</i> , <i>Kocuria turfanensis</i> , <i>Streptomyces griseovorticillatus</i>
	Φαιοκάστανη κρούστα	<i>Kocuria sp.</i> , <i>Kocuria turfanensis</i> , <i>Staphylococcus warneri</i>
	Μαύρη κρούστα	<i>Bacillus sp.</i> ,
Ευπαλίνειο Όρυγμα	Πράσινη διάβρωση	<i>Agromyces agglutinans</i> , <i>Metabacillus indicus</i> , <i>Solibacillus isronensis</i> , <i>Pseudomonas cichorii</i>
	Λευκές αποθέσεις	<i>Agrococcus jenensis</i> , <i>Bacillus nematocida</i> , <i>Metabacillus herbersteinensis</i> , <i>Sporosarcina thermotolerans</i>

	Ανακρυσταλλωμένος ασβεστίτης, υψηλή υγρασία, τμήμα λευκών υποπεριοχών	<i>Rahnella contaminans</i>
	Περιοχή βράχου δίπλα από τον ανακρυσταλλωμένο ασβεστίτη	<i>Rhodococcus baikonurensis</i> , <i>Rhodococcus wratislaviensis</i>
	Πωρόλιθος, σπογγοειδούς μορφολογίας	<i>Bacillus</i> sp., <i>Metabacillus</i> <i>herbersteinensis</i> , <i>Metabacillus</i> <i>litoralis</i> , <i>Paenibacillus insulae</i> , <i>Peribacillus frigitolerans</i> , <i>Sutcliffeiella halmapala</i> , <i>Streptomyces</i> <i>anulatus</i> , <i>Streptomyces</i> sp., <i>Streptomyces thinghirensis</i>
Ιερά Μονή Παναγίας Βαρνάκοβας	Πωρόλιθος	<i>Bacillus mesophilus</i> , <i>Fictibacillus</i> <i>halophilus</i> , <i>Metabacillus crassostreae</i> , <i>Metabacillus herbersteinensis</i> , <i>Metabacillus litoralis</i> , <i>Paenibacillus</i> <i>harenae</i> , <i>Paenibacillus prosopidis</i>

Τα απομονωθέντα βακτήρια ανά μνημείο αναπτύχθηκαν σε υγρές καλλιέργειες με στόχο των προσδιορισμό των κινητικών τους χαρακτηριστικών. Το κινητικό μοντέλο που χρησιμοποιήθηκε (λογιστικό) προσαρμόζεται ικανοποιητικά στα δεδομένα χρονικής μεταβολής της κυτταρικής ανάπτυξης. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε έλεγχος χαρακτηριστικών βιοδεικτών που σχετίζονται με την μικροβιακή παραγωγή ανθρακικού ασβεστίου (παρουσία των ενζύμων ουρεάση και καρβονική ανυδράση). Σκοπός ήταν η επιλογή αυτόχθονων βακτηρίων από κάθε μνημείο που εμφανίζουν τα βέλτιστα χαρακτηριστικά (κυτταρική ανάπτυξη, ρυθμός ανάπτυξης, ουρεολυτική δράση, υψηλή ενεργότητα καρβονικής ανυδράσης), προκειμένου να χρησιμοποιηθούν σε πειράματα εναπόθεσης ανθρακικού ασβεστίου σε δείγματα λίθινων επιφανειών των επιδεικτικών μνημείων. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης ανάπτυξης των βακτηρίων και των εξεταζόμενων βιοδεικτών, επιλέχθηκαν τα βακτήρια *S. thermotolerans* και *P. cichorii* που απομονώθηκαν από το Ευπαλίνιο όρυγμα, τα *P. frigitolerans* και *M. litoralis* από την Ιερά Μονή Παναγίας Βαρνάκοβας και το βακτήριο *M. luteus* από τα μνημεία Αφεντάκη και Δελιγιάννη στο Α΄ Νεκροταφείο Αθηνών, με σκοπό την αξιολόγηση της ικανότητας να εναποθέτουν ανθρακικό ασβέστιο σε δείγματα λίθινων επιφανειών των επιδεικτικών μνημείων, ενώ εφαρμόστηκε και μίγμα των παραπάνω βακτηρίων προκειμένου να ελεγχθεί πιθανή συνεργιστική δράση μεταξύ αυτών. Σε όλες τις εξετασθείσες περιπτώσεις επετεύχθη εναπόθεση ανθρακικού ασβεστίου. Το μίγμα των βακτηρίων ήταν το λιγότερο αποτελεσματικό στην εναπόθεση ανθρακικού ασβεστίου σε όλα τα δείγματα των λίθινων επιφανειών, γεγονός που υποδηλώνει έλλειψη συνεργιστικού μεταξύ των βακτηρίων. Τα αυτόχθονα βακτήρια ήταν αποτελεσματικότερα στην αποκατάσταση φθορών στις λίθινες επιφάνειες των μνημείων από τα οποία απομονώθηκαν. Το είδος (τύπος) της λίθινης επιφάνειας, πωρόλιθος στην Ιερά Μονή Παναγίας Βαρνάκοβας, συμπαγής ασβεστόλιθος στο Ευπαλίνιο Όρυγμα και μάρμαρο στο Α΄ Κοιμητήριο Αθηνών επηρεάζει σημαντικά την τάση πρόσφυσης (βιοστερέωση) του νεοσυντιθέμενου υλικού. Σημαντική ποσότητα νεοσυντιθέμενου υλικού απομακρύνθηκε από μετά την κατεργασία των δειγμάτων με υπερήχους στα δείγματα πορόλιθου Ιεράς Μονής Παναγίας Βαρνάκοβας. Στις περιπτώσεις

του συμπαγούς ασβεστόλιου καθώς και του μαρμάρου η τάση πρόσφυσης (βιοστερέωση) του νεοσυντιθέμενου υλικού ήταν υψηλή.

### **Προτάσεις για μελλοντική έρευνα**

Η παρούσα Διπλωματική εργασία αποτελεί μία προκαταρκτική μελέτη των μικροοργανισμών που αναπτύσσονται στις λίθινες επιφάνειες μνημείων πολιτισμικής κληρονομιάς, με σκοπό την ανάδειξη των ωφέλιμων αυτόχθονων βακτηρίων με τη χρήση πρακτικών καλλιέργειας και μοριακών τεχνικών ανάλυσης και τη μετέπειτα κατευθυνόμενη αξιοποίηση τους για την εναπόθεση ανθρακικού ασβεστίου σε δείγματα των λίθινων επιφανειών των επιδεικτικών μνημείων. Προτάσεις για περαιτέρω έρευνα:

- ✓ Χρήση μεγαλύτερου εύρους θρεπτικών μέσων ανάπτυξης που θα οδηγούσαν σε απομόνωση και άλλων ειδών, όπως κυανοβακτήρια και μικροφύκη
- ✓ Μελέτη της ικανότητας των απομονωθέντων μυκήτων, να παράγουν οργανικά οξέα, δεδομένου ότι τα οξέα αυτά προκαλούν διάβρωση και αποχρωματισμούς στις λίθινες επιφάνειες των μνημείων
- ✓ Διερεύνηση της δυνατότητας χρήσης εκχυλισμάτων φυτικής προέλευσης για την αντιμετώπιση των μυκήτων που σχετίζονται με τη διάβρωση των μνημείων
- ✓ Μελέτη επιπρόσθετων βιολογικών δεικτών ποιοτικού και ποσοτικού ελέγχου της ικανότητας εναπόθεσης ανθρακικού ασβεστίου από τα βακτήρια, όπως η αμμωνιοποίηση

## Βιβλιογραφία

- Achal, V., & Pan, X. (2011). Characterization of urease and carbonic anhydrase producing bacteria and their role in calcite precipitation. *Current microbiology*, 62, 894-902.
- Achal, V., Mukherjee, A., Kumari, D., & Zhang, Q. (2015). Biomineralization for sustainable construction—A review of processes and applications. *Earth-science reviews*, 148, 1-17.
- Agrawal, S., Khumlianlal, J., & Devi, S. I. (2023). Uncovering the Fungal Diversity and Biodeterioration Phenomenon on Archaeological Carvings of the Badami Cave Temples: A Microcosm Study. *Life*, 14(1), 28.
- Altenburgera, P., Kämpferb, P., Makristathisc, A., Lubitza, W., & Bussea, H. J. (1996). Classification of bacteria isolated from a medieval wall painting. *Journal of biotechnology*, 47(1), 39-52.
- Anbu, P., Kang, C. H., Shin, Y. J., & So, J. S. (2016). Formations of calcium carbonate minerals by bacteria and its multiple applications. *Springerplus*, 5(1), 1-26.
- Andreolli, M., Lampis, S., Bernardi, P., Calò, S., & Vallini, G. (2020). Bacteria from black crusts on stone monuments can precipitate CaCO<sub>3</sub> allowing the development of a new bio-consolidation protocol for ornamental stone. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 153, 105031.
- Bontemps, Z., Alonso, L., Pommier, T., Hugoni, M., & Moënné-Loccoz, Y. (2022). Microbial ecology of tourist Paleolithic caves. *Science of the Total Environment*, 816, 151492.
- Botré, C., & Botré, F. (1989). Carbonic anhydrase and urease: an investigation in vitro on the possibility of a synergic action. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 997(1-2), 111-114.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Brisch, G., & Bent, M. (2006). The Travel Chronicles of Mrs J. Theodore Bent: Volume I: Greece and the Levantine Littoral: Mabel Bent's diaries of 1883-1898, from the archive of the Joint Library of the Hellenic and Roman Societies, London. *The Travel Chronicles of Mrs J. Theodore Bent*, 1-366.
- 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(8), 497-509.
- Carter, N. E. A., & Viles, H. A. (2005). Bioprotection explored: the story of a little known earth surface process. *Geomorphology*, 67(3-4), 273-281.
- Castro, M. J., Lopez, C. E., Narayanasamy, R., Marszalek, J. E., Luevanos-Escareno, M. P., Fajardo, G. J., & Balagurusamy, N. (2016). Potential of enzymes (urease and carbonic anhydrase) for a sustainable construction industry. *CHIMICA OGGI-CHEMISTRY TODAY*, 34(4), 56-59.
- Castro-Alonso, M. J., Montañez-Hernandez, L. E., Sanchez-Muñoz, M. A., Macias Franco, M. R., Narayanasamy, R., & Balagurusamy, N. (2019). Microbially induced calcium carbonate



precipitation (MICP) and its potential in bioconcrete: microbiological and molecular concepts. *Frontiers in Materials*, 6, 126.

Cattò, C., Mu, A., Moreau, J. W., Wang, N., Cappitelli, F., & Strugnelli, R. (2023). Biofilm colonization of stone materials from an Australian outdoor sculpture: Importance of geometry and exposure. *Journal of Environmental Management*, 339, 117948.

Chen, J., Blume, H. P., & Beyer, L. (2000). Weathering of rocks induced by lichen colonization—a review. *Catena*, 39(2), 121-146.

Cirone, M., Figoli, A., Galiano, F., La Russa, M.F., Macchia, A., Mancuso, R., Ricca, M., Rovella, N., Taverniti, M., Ruffolo, S.A. Innovative Methodologies for the Conservation of Cultural Heritage against Biodeterioration: A Review. *Coatings* 2023, 13, 1986.

Comite, V., Miani, A., Ricca, M., La Russa, M., Pulimeno, M., & Fermo, P. (2021). The impact of atmospheric pollution on outdoor cultural heritage: an analytic methodology for the characterization of the carbonaceous fraction in black crusts present on stone surfaces. *Environmental research*, 201, 111565.

Cozzolino, A., Adamo, P., Bonanomi, G., & Motti, R. (2022). The Role of Lichens, Mosses, and Vascular Plants in the Biodeterioration of Historic Buildings: A Review. *Plants*, 11(24), 3429.

Crispim, C. A., & Gaylarde, C. C. (2005). Cyanobacteria and biodeterioration of cultural heritage: a review. *Microbial ecology*, 49, 1-9.

De Leo, F., Marchetta, A., & Urzì, C. (2022). Black fungi on stone-built heritage: current knowledge and future outlook. *Applied Sciences*, 12(8), 3969.

De Muyndck, W., De Belie, N., & Verstraete, W. (2010). Microbial carbonate precipitation in construction materials: a review. *Ecological engineering*, 36(2), 118-136.

Delegou, E. T., Apostolopoulou, M., Ntoutsis, I., et al. (2019). The effect of fire on building materials: The case-study of the Varnakova Monastery Cells in central Greece. *Heritage*, 2(2), 1233-1259.

Dhami, N. K., Reddy, M. S., & Mukherjee, A. (2014). Synergistic role of bacterial urease and carbonic anhydrase in carbonate mineralization. *Applied biochemistry and biotechnology*, 172, 2552-2561.

Dievert, A. M., McQuaid, C. D., Zardi, G. I., Nicastro, K. R., & Froneman, P. W. (2022). Photoautotrophic Euendoliths and Their Complex Ecological Effects in Marine Bioengineered Ecosystems. *Diversity*, 14(9), 737.

Dyda, M., Decewicz, P., Romaniuk, K., Wojcieszak, et al. (2018). Application of metagenomic methods for selection of an optimal growth medium for bacterial diversity analysis of microbiocenoses on historical stone surfaces. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 131, 2-10.

Effendi, S. S. W., & Ng, I. S. (2019). The prospective and potential of carbonic anhydrase for carbon dioxide sequestration: A critical review. *Process Biochemistry*, 87, 55-65.

Eyssautier-Chuine, S., Vaillant-Gaveau, N., Charpentier, E., & Reffuveille, F. (2021). Comparison of biofilm development on three building and restoration stones used in French monuments. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 165, 105322.

Farooq, M., & Maknoon, S. D. (2020). Biodeterioration of archaeological monuments of Taxila, Pakistan: This article belongs to the special issue "Aerobiology for the Preservation of Human and Environmental Health" published in the Volume 36, Issue 1, March 2020. *Aerobiologia*, 36(3), 375-385.

Fassina, V. (1995). New findings on past treatments carried out on stone and marble monuments' surfaces. *Science of the total environment*, 167(1-3), 185-203.

Frank, J. A., Reich, C. I., Sharma, S., Weisbaum, J. S., Wilson, B. A., & Olsen, G. J. (2008). Critical evaluation of two primers commonly used for amplification of bacterial 16S rRNA genes. *Applied and environmental microbiology*, 74(8), 2461-2470.

Fu, T., Saracho, A. C., & Haigh, S. K. (2023). Microbially induced carbonate precipitation (MICP) for soil strengthening: a comprehensive review. *Biogeotechnics*, 100002.

Gabriel, C. R., & Northup, D. E. (2012). Microbial ecology: caves as an extreme habitat. In *Cave microbiomes: a novel resource for drug discovery* (pp. 85-108). New York, NY: Springer New York.

Gaylarde, C. C. (2020). Influence of environment on microbial colonization of historic stone buildings with emphasis on cyanobacteria. *Heritage*, 3(4), 1469-1482.

Gaylarde, C. C., & Baptista-Neto, J. A. (2021). Microbiologically induced aesthetic and structural changes to dimension stone. *Npj Materials Degradation*, 5(1), 33.

Gaylarde, C., & Little, B. (2022). Biodeterioration of stone and metal—Fundamental cycling processes with spatial and temporal scale differences. *Science of The Total Environment*, 823, 153193.

Giri, A., Banerjee, U. C., Kumar, M., & Pant, D. (2018). Intracellular carbonic anhydrase from *Citrobacter freundii* and its role in bio-sequestration. *Bioresource technology*, 267, 789-792.

Golovkina, D. A., Zhurishkina, E. V., Ivanova, L. A., et al. (2020). Calcifying bacteria flexibility in induction of CaCO<sub>3</sub> mineralization. *Life*, 10(12), 317.

Helmi, F. M., Elmitwalli, H. R., Elnagdy, S. M., & El-Hagrassy, A. F. (2016). Calcium carbonate precipitation induced by ureolytic bacteria *Bacillus licheniformis*. *Ecological Engineering*, 90, 367-371.

Herlemann, D. P., Labrenz, M., Jürgens, K., Bertilsson, S., Waniek, J. J., & Andersson, A. F. (2011). Transitions in bacterial communities along the 2000 km salinity gradient of the Baltic Sea. *The ISME journal*, 5(10), 1571-1579.

İnce, İ., Korkanç, M., & Hatır, M. E. (2020). Evaluation of weathering effects due to surface and deep moisture in a Roman rock tomb: Lukianos Monument Konya (Turkey). *Mediterranean Archaeology and Archaeometry*, 20(3), 121-121.

Islam, N., Roy, K., Barman, P., et al. (2024). Chemical and toxicological studies on black crust formed over historical monuments as a probable health hazard. *Journal of Hazardous Materials*, 464, 132939.

Isola, D., Bartoli, F., Morretta, S., & Caneva, G. (2023). The Roman Houses of the Caelian Hill (Rome, Italy): Multitemporal Evaluation of Biodeterioration Patterns. *Microorganisms*, 11(7), 1770.

Joseph, E.(2021). *Microorganisms in the Deterioration and Preservation of Cultural Heritage* (p. 367). Springer Nature.

Jroundi, F., Fernández-Vivas, A., Rodríguez-Navarro, C., Bedmar, E. J., & González-Muñoz, M. T. (2010). Bioconservation of deteriorated monumental calcarenite stone and identification of bacteria with carbonatogenic activity. *Microbial ecology*, *60*, 39-54.

Jroundi, F., Gonzalez-Muñoz, M. T., Garcia-Bueno, A., & Rodríguez-Navarro, C. (2014). Consolidation of archaeological gypsum plaster by bacterial biomineralization of gypsum. *Acta biomaterialia*, *10*(9), 3844-3854.

Jroundi, F., Schiro, M., Ruiz-Agudo, E., Elert, K., Martín-Sánchez, I., González-Muñoz, M. T., & Rodríguez-Navarro, C. (2017). Protection and consolidation of stone heritage by self-inoculation with indigenous carbonatogenic bacterial communities. *Nature Communications*, *8*(1), 279.

Kakakhel, M. A., Wu, F., Gu, J. D., Feng, H., Shah, K., & Wang, W. (2019). Controlling biodeterioration of cultural heritage objects with biocides: A review. *International Biodeterioration & Biodegradation*, *143*, 104721.

Keshari, N., & Adhikary, S. P. (2013). Characterization of cyanobacteria isolated from biofilms on stone monuments at Santiniketan, India. *Biofouling*, *29*(5), 525-536.

Khedr, W. E., Shaheen, M. N., Elmahdy, E. M., Bendary, M. A. E., Hamed, A. A., & Mohamedin, A. H. (2023). Silver and gold nanoparticles: eco-friendly synthesis, antibiofilm, antiviral, and anticancer bioactivities. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 1-13.

Komar, M., Nowicka-Krawczyk, P., Ruman, T., Nizioł, J., Dudek, M., & Gutarowska, B. (2023). Biodeterioration potential of algae on building materials-Model study. *International Biodeterioration & Biodegradation*, *180*, 105593.

Krajewska, B. (2009). Ureases I. Functional, catalytic and kinetic properties: A review. *Journal of molecular catalysis B: Enzymatic*, *59*(1-3), 9-21.

Krajewska, B. (2018). Urease-aided calcium carbonate mineralization for engineering applications: A review. *Journal of Advanced Research*, *13*, 59-67.

Kumar, D., Kaštánek, P., & Adhikary, S. P. (2018). Exopolysaccharides from cyanobacteria and microalgae and their commercial application. *Current Science*, *115*(2), 234-241.

Li, M., Fang, C., Kawasaki, S., Huang, M., & Achal, V. (2019). Bio-consolidation of cracks in masonry cement mortars by *Acinetobacter* sp. SC4 isolated from a karst cave. *International Biodeterioration & Biodegradation*, *141*, 94-100.

Liu, X., Qian, Y., Wu, F., Wang, Y., Wang, W., & Gu, J. D. (2022). Biofilms on stone monuments: biodeterioration or bioprotection?. *Trends in Microbiology*.

Lo Schiavo, S., De Leo, F., & Urzì, C. (2020). Present and future perspectives for biocides and antifouling products for stone-built cultural heritage: Ionic liquids as a challenging alternative. *Applied Sciences*, *10*(18), 6568.

Lors, C., Gassie, C., Guyoneaud, R., & Damidot, D. (2023). Impact of a biorepair treatment on the diversity of calcifying bacterial communities at the surface of cracked concrete walls. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *107*(1), 187-200.

- Martino, P. D. (2016, April). What about biofilms on the surface of stone monuments?. In *The open conference proceedings journal* (Vol. 7, No. 1).
- Martin-Pozas, T., Fernandez-Cortes, A., Cuezva, S., et al. (2023). New insights into the structure, microbial diversity and ecology of yellow biofilms in a Paleolithic rock art cave (Pindal Cave, Asturias, Spain). *Science of the Total Environment*, 897, 165218.
- Marvasi, M., Mastromei, G., & Perito, B. (2020). Bacterial calcium carbonate mineralization in situ strategies for conservation of stone artworks: from cell components to microbial community. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1386.
- Masselin, I., X. Chesseray, L. Durand-Bourlier, J. M. Lainé, P. Y. Syzaret, and D. Lemondant.. Effects of sonication on polymeric membranes. *J. Membr. Sci.* 2001, 181, 213–220.
- McNamara, C. J., & Mitchell, R. (2005). Microbial deterioration of historic stone. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 3(8), 445-451.
- Meng, S., Qian, Y., Liu, X., Wang, Y., Wu, F., Wang, W., & Gu, J. D. (2023). Community structures and biodeterioration processes of epilithic biofilms imply the significance of micro-environments. *Science of The Total Environment*, 876, 162665.
- Mihajlovski, A., Seyer, D., Benamara, H., Bousta, F., & Di Martino, P. (2015). An overview of techniques for the characterization and quantification of microbial colonization on stone monuments. *Annals of Microbiology*, 65, 1243-1255.
- Morton, L. H. G., & Surman, S. B. (1994). Biofilms in biodeterioration—a review. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 34(3-4), 203-221.
- Mottershead, D., & Lucas, G. (2000). The role of lichens in inhibiting erosion of a soluble rock. *The Lichenologist*, 32(6), 601-609.
- Nash, T. H. (Ed.). (1996). *Lichen biology*. Cambridge University Press.
- Nazel, T. (2016). Bioconsolidation of stone monuments. An overview. *Restoration of Buildings and Monuments*, 22(1), 37-45.
- Nigro, L., Mura, F., Toti, M. P., Cirigliano, A., & Rinaldi, T. (2022). Carbonatogenic bacteria on the 'Motya Charioteer' sculpture. *Journal of Cultural Heritage*, 57, 256-264.
- Ortega-Morales, B. O., Narváez-Zapata, J., Reyes-Estebanez, M., et al. (2016). Bioweathering potential of cultivable fungi associated with semi-arid surface microhabitats of Mayan buildings. *Frontiers in microbiology*, 7, 201.
- Paiva, D. S., Trovão, J., Fernandes, L., Mesquita, N., Tiago, I., & Portugal, A. (2023). Expanding the Microcolonial Black Fungi Aeminiaceae Family: *Saxispiralis lemnorm* gen. et sp. nov.(Mycosphaerellales), Isolated from Deteriorated Limestone in the Lemos Pantheon, Portugal. *Journal of Fungi*, 9(9), 916.
- Pantou, M. P., Strunnikova, O. K., Shakhnazarova, V. Y., Vishnevskaya, N. A., Papalouka, V. G., & Typas, M. A. (2005). Molecular and immunochemical phylogeny of *Verticillium* species. *Mycological research*, 109(8), 889-902.
- Park, C. B., & Lee, S. B. (1998). Ammonia production from yeast extract and its effect on growth of the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 3, 115-118.

- Pinheiro, A. C., Mesquita, N., Trovão, J., et al. (2019). Limestone biodeterioration: A review on the Portuguese cultural heritage scenario. *Journal of cultural heritage*, 36, 275-285.
- Prabhu, C., Wanjari, S., Puri, A., et al. (2011). Region-specific bacterial carbonic anhydrase for biomimetic sequestration of carbon dioxide. *Energy & Fuels*, 25(3), 1327-1332.
- Qian, C., Ren, L., Xue, B., & Cao, T. (2016). Bio-mineralization on cement-based materials consuming CO<sub>2</sub> from atmosphere. *Construction and Building Materials*, 106, 126-132.
- Reale, R., Campanella, L., Devreux, G., & Dell'Aglio, E. (2021). Study of microbial melanin decolorization from carbonatic stones surfaces. *Journal of Cultural Heritage*, 47, 21-27.
- Reeksting, B. J., Hoffmann, T. D., Tan, L., Paine, K., & Gebhard, S. (2020). In-depth profiling of calcite precipitation by environmental bacteria reveals fundamental mechanistic differences with relevance to application. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(7), e02739-19.
- Rodriguez-Navarro, C., Rodriguez-Gallego, M., Ben Chekroun, K., & Gonzalez-Muñoz, M. T. (2003). Conservation of ornamental stone by *Myxococcus xanthus*-induced carbonate biomineralization. *Applied and environmental microbiology*, 69(4), 2182-2193.
- Romero, S. M., Giudicessi, S. L., & Vitale, R. G. (2021). Is the fungus *Aspergillus* a threat to cultural heritage?. *Journal of Cultural Heritage*, 51, 107-124.
- Salvadori, O., & Municchia, A. C. (2016, April). The role of fungi and lichens in the biodeterioration of stone monuments. In *The Open Conference Proceedings Journal* (Vol. 7, No. 1).
- Sánchez, J. S., Alves, C., & Freire-Lista, D. M. (2023). Biomineral deposits and coatings on stone monuments as biodeterioration fingerprints. *Science of The Total Environment*, 168846.
- Sandybayeva, S. K., Kossalbayev, B. D., Zayadan, B. K., Sadvakasova, A. K., Bolatkhan, K., Zadneprovskaya, E. V., ... & Chang, J. S. (2022). Prospects of cyanobacterial pigment production: Biotechnological potential and optimization strategies. *Biochemical Engineering Journal*, 187, 108640.
- Sazanova, K. V., Zelenskaya, M. S., Vlasov, A. D., Bobir, S. Y., Yakkonen, K. L., & Vlasov, D. Y. (2022). Microorganisms in superficial deposits on the stone monuments in Saint Petersburg. *Microorganisms*, 10(2), 316.
- Scheerer, S., Ortega-Morales, O., & Gaylarde, C. (2009). Microbial deterioration of stone monuments—an updated overview. *Advances in applied microbiology*, 66, 97-139.
- Schröer, L., Boon, N., De Kock, T., & Cnudde, V. (2021). The capabilities of bacteria and archaea to alter natural building stones—A review. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 165, 105329.
- Seaward, M. R. D. (1997). Major impacts made by lichens in biodeterioration processes. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 40(2-4), 269-273.
- Sharma, T., Sharma, A., lei Xia, C., et al. (2022). Enzyme mediated transformation of CO<sub>2</sub> into calcium carbonate using purified microbial carbonic anhydrase. *Environmental Research*, 212, 113538.

- Shirtcliffe, N. J., Pyatt, F. B., Newton, M. I., & McHale, G. (2006). A lichen protected by a super-hydrophobic and breathable structure. *Journal of plant physiology*, *163*(11), 1193-1197.
- Sierra-Fernández, A., Gómez Villalba, L. S., Rabanal, M. E., & Fort González, R. (2017). New nanomaterials for applications in conservation and restoration of stony materials: A review.
- Skipper, P. J., Skipper, L. K., & Dixon, R. A. (2022). A metagenomic analysis of the bacterial microbiome of limestone, and the role of associated biofilms in the biodeterioration of heritage stone surfaces. *Scientific Reports*, *12*(1), 4877.
- Son, H. M., Kim, H. Y., Park, S. M., & Lee, H. K. (2018). Ureolytic/non-ureolytic bacteria co-cultured self-healing agent for cementitious materials crack repair. *Materials*, *11*(5), 782.
- Stanaszek-Tomal, E. (2020). Environmental factors causing the development of microorganisms on the surfaces of national cultural monuments made of mineral building materials. *Coatings*, *10*(12), 1203.
- Strousopoulos, P., Papakostas, C., Troussas, C., Krouska, A., Mylonas, P., & Sgouropoulou, C. (2023, June). SculptMate: Personalizing cultural heritage experience using fuzzy weights. In *Adjunct Proceedings of the 31st ACM Conference on User Modeling, Adaptation and Personalization* (pp. 397-407).
- Stupar, M., Grbić, M. L., Simić, G. S., Jelikić, A., Vukojević, J., & Sabovljević, M. (2014). A sub-aerial biofilms investigation and new approach in biocide application in cultural heritage conservation: Holy Virgin Church (Gradac Monastery, Serbia). *Indoor and Built Environment*, *23*(4), 584-593.
- Supriati, R. (2021, June). Lichens Diversity of Kabawetan District Kepahyang, Regency Bengkulu Province. In *3rd KOBICONGRESS, International and National Conferences (KOBICINC 2020)* (pp. 220-226). Atlantis Press.
- Tenore, A., Wu, Y., Jacob, J., Bittermann, D., Villa, F., Buttaro, B., & Klapper, I. (2023). Water activity in subaerial microbial biofilms on stone monuments. *Science of The Total Environment*, *900*, 165790.
- Uppadhyay, V., Ingle, K. K., Trivedi, S., & Upreti, D. K. (2016). Diversity and distribution of lichens from the monuments of Gwalior division, Madhya Pradesh with special reference to rock porosity and lichen growth. *Tropical Plant Research*, *3*(2), 384-389.
- Urzí, C., & Albertano, P. (2001). [28] Studying phototrophic and heterotrophic microbial communities on stone monuments. In *Methods in enzymology* (Vol. 336, pp. 340-355). Academic Press.
- Vaskevicius, L., Malunavicius, V., Jankunec, M., Lastauskiene, E., Talaikis, M., Mikoliunaite, L., ... & Gudiukaite, R. (2023). Insights in MICP dynamics in urease-positive *Staphylococcus* sp. H6 and *Sporosarcina pasteurii* bacterium. *Environmental Research*, *234*, 116588.
- Vlachopoulos, N. Eupalinos Tunnel-First Tunnel to be Excavated Simultaneously from Both Ends in the 6th Century BC. Vlachopoulos, N. Eupalinos Tunnel-First Tunnel to be Excavated Simultaneously from Both Ends in the 6th Century BC.

Wang, Y., & Liu, X. (2021). Sulfur-oxidizing bacteria involved in the blackening of basalt sculptures of the Leizhou Stone Dog. *International Biodeterioration & Biodegradation*, *159*, 105207.

Warscheid, T., & Braams, J. (2000). Biodeterioration of stone: a review. *International Biodeterioration & Biodegradation*, *46*(4), 343-368.

Wierzos, J., Ríos, A. D. L., & Ascaso, C. (2012). Microorganisms in desert rocks: the edge of life on Earth.

Wu, F., Ding, X., Zhang, Y., Gu, J. D., Liu, X., Guo, Q., ... & Feng, H. (2023). Metagenomic and metaproteomic insights into the microbiome and the key geobiochemical potentials on the sandstone of rock-hewn Beishiku Temple in Northwest China. *Science of The Total Environment*, 164616.

Yamamoto, Y. (2006). Lichen-derived culture and its application. *Proceedings of the 1st KOLRI International Symposium of Lichenology*, 19-23.

Zammit, G., Sánchez-Moral, S., & Albertano, P. (2011). Bacterially mediated mineralisation processes lead to biodeterioration of artworks in Maltese catacombs. *Science of the Total Environment*, *409*(14), 2773-2782.

Zhang, G., Gong, C., Gu, J., Katayama, Y., Someya, T., & Gu, J. D. (2019). Biochemical reactions and mechanisms involved in the biodeterioration of stone world cultural heritage under the tropical climate conditions. *International Biodeterioration & Biodegradation*, *143*, 104723.

Zhang, R., & Wang, J. (2023). Effect of regulating urease activity on the properties of bio-CaCO<sub>3</sub> precipitated on recycled aggregates. *Construction and Building Materials*, *403*, 133119.

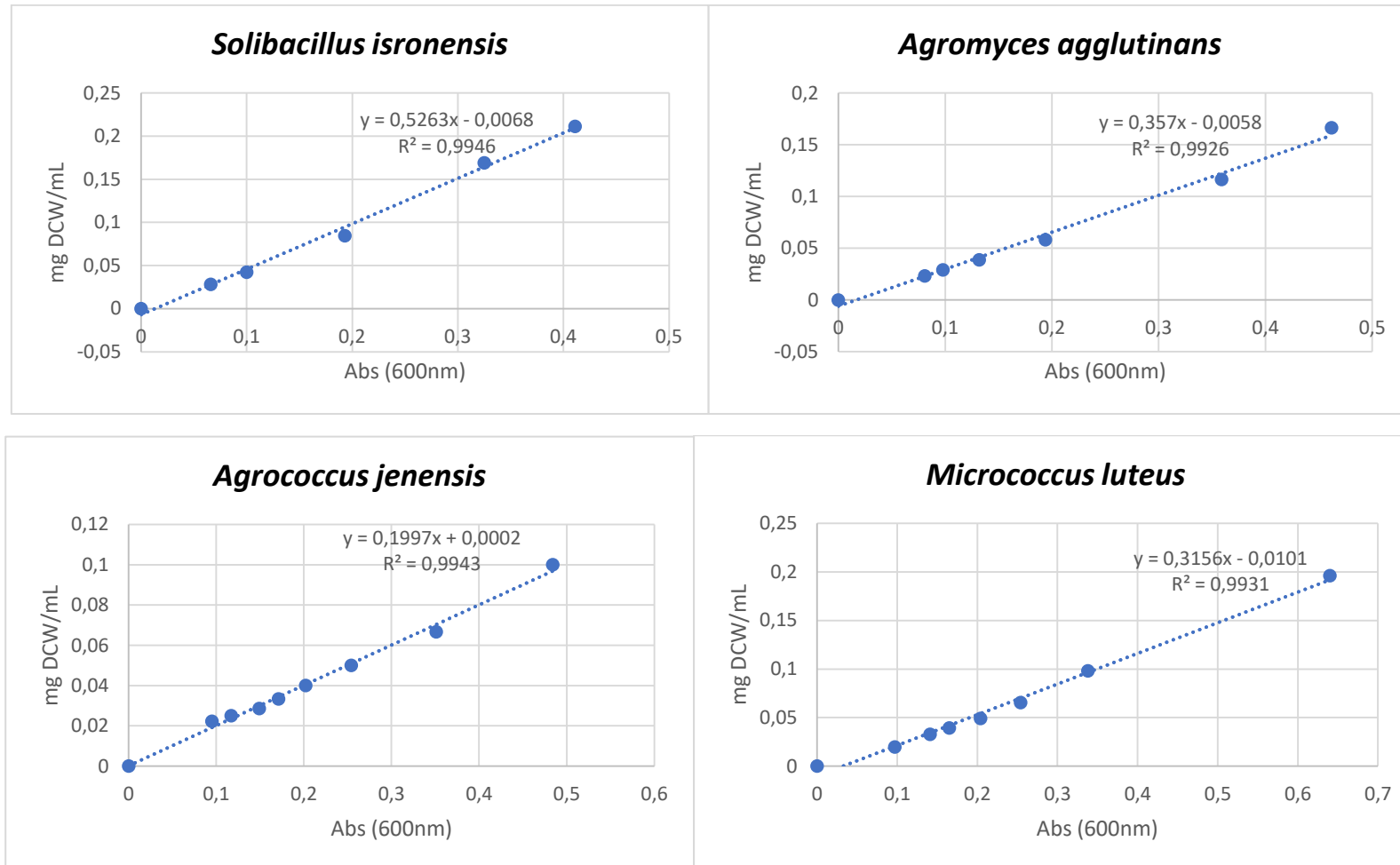
Zhao, A., Sun, J., & Liu, Y. (2023). Understanding bacterial biofilms: From definition to treatment strategies. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *13*, 1137947.

Zheng, T., & Qian, C. (2020). Influencing factors and formation mechanism of CaCO<sub>3</sub> precipitation induced by microbial carbonic anhydrase. *Process Biochemistry*, *91*, 271-281.

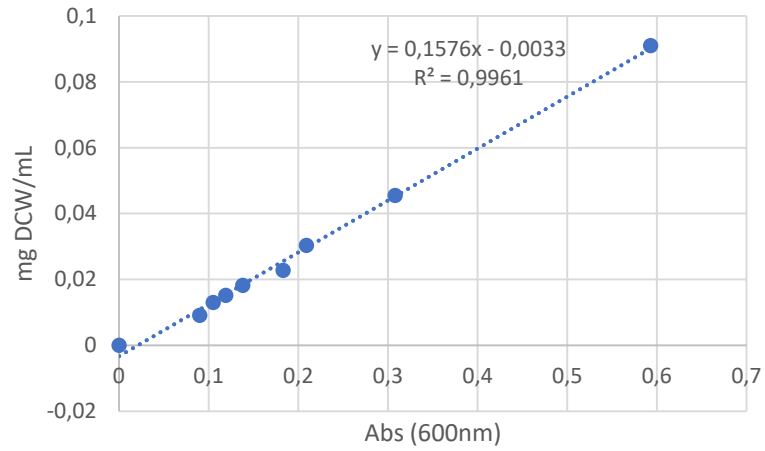
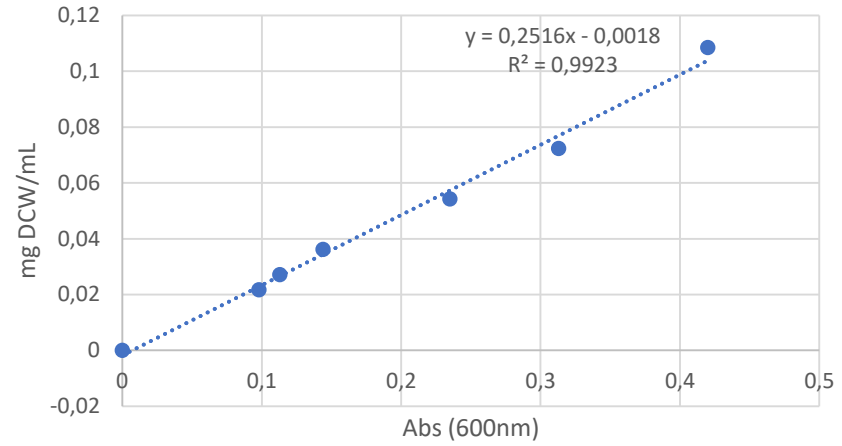
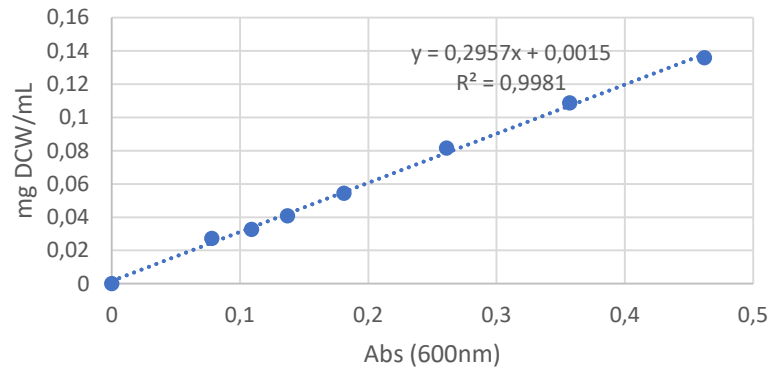
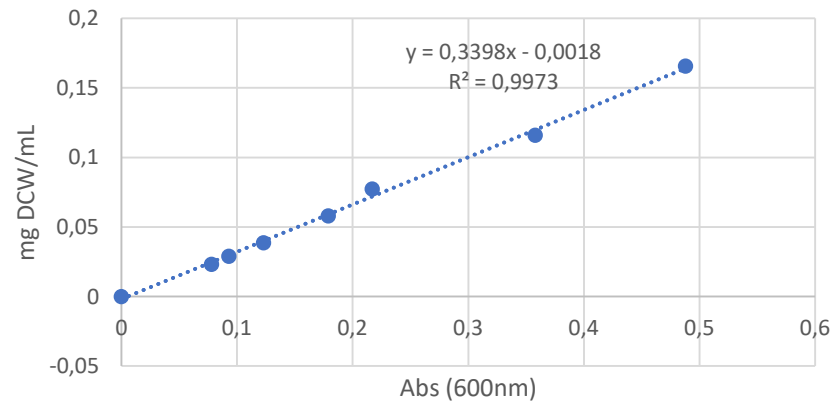
Zhu, T., & Dittrich, M. (2016). Carbonate precipitation through microbial activities in natural environment, and their potential in biotechnology: a review. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, *4*, 4.

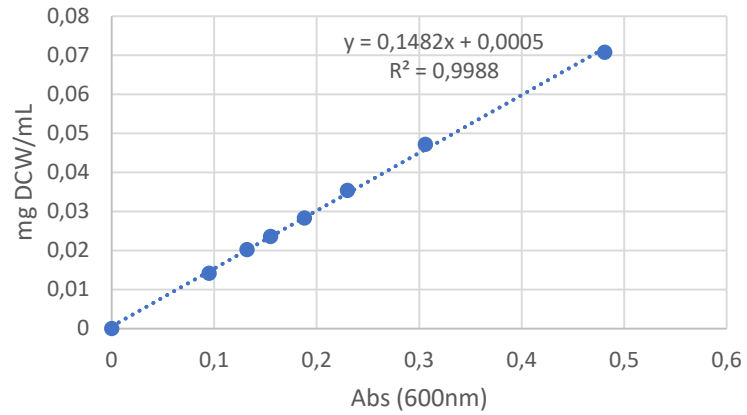
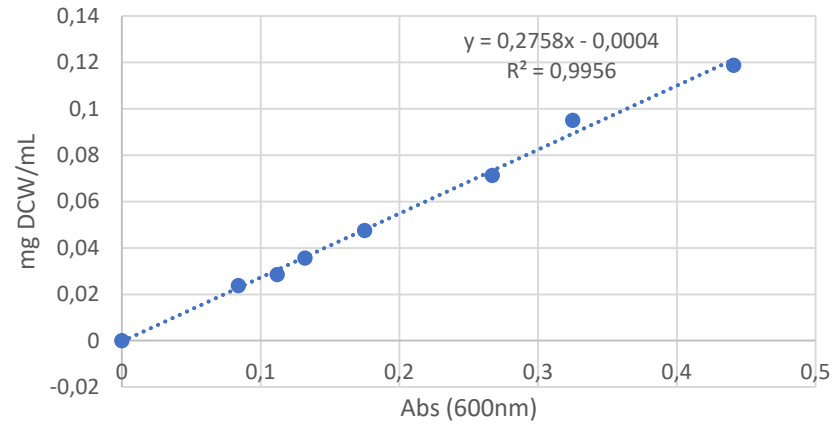
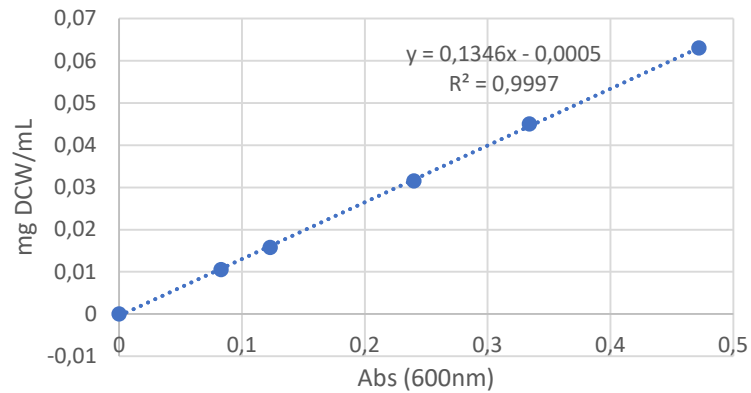
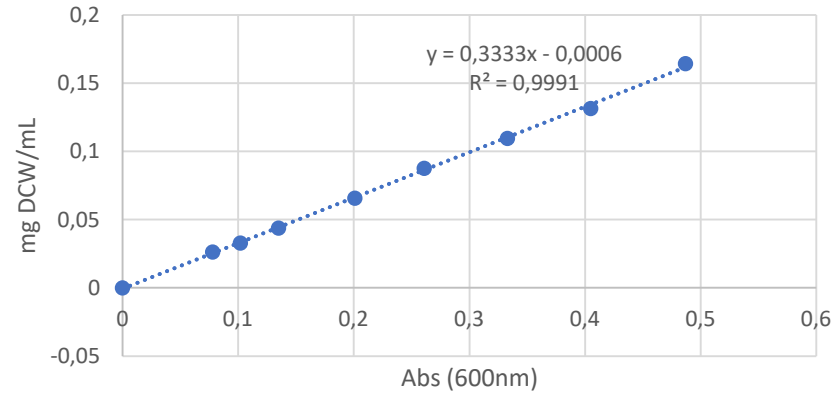
## Παράρτημα I

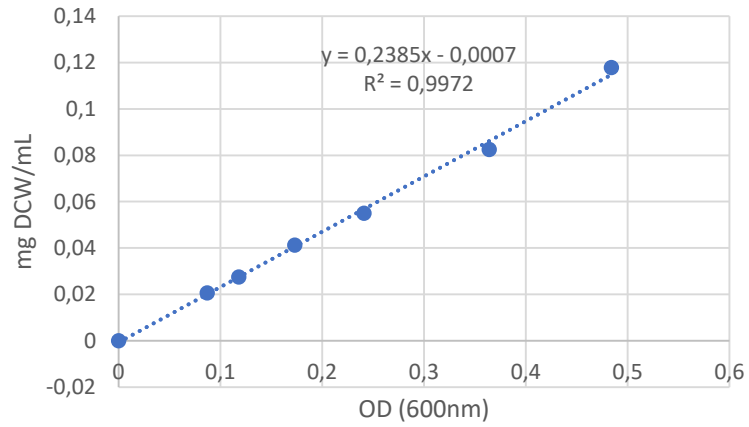
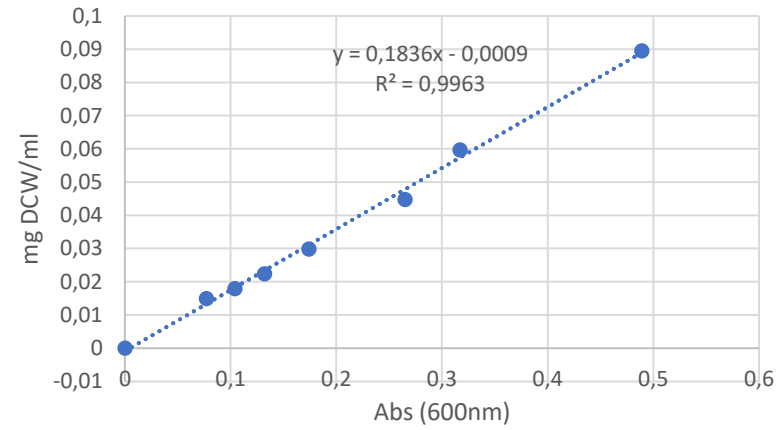
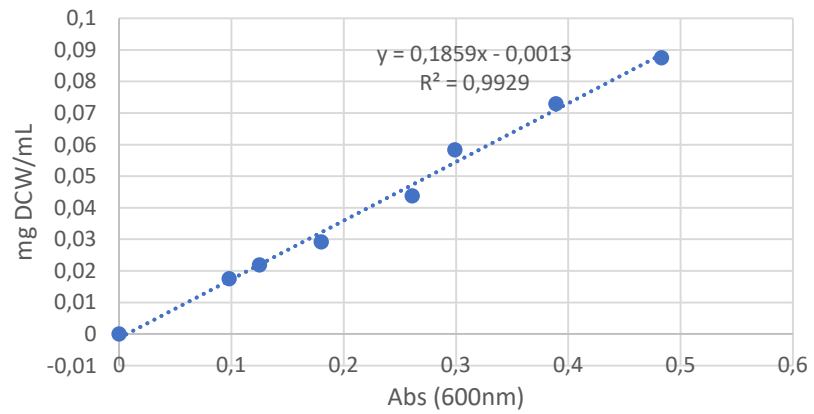
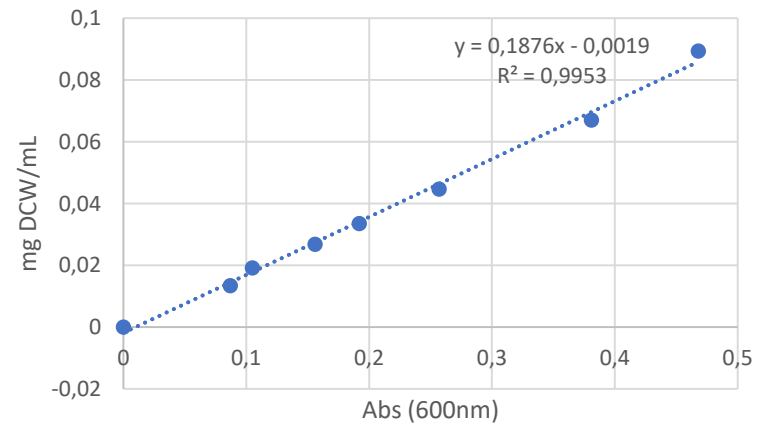
Καμπύλες αναφοράς ανάπτυξης βακτηρίων στο θρεπτικό μέσο Nutrient Broth (mg DCW/ml - Abs<sub>600nm</sub>)

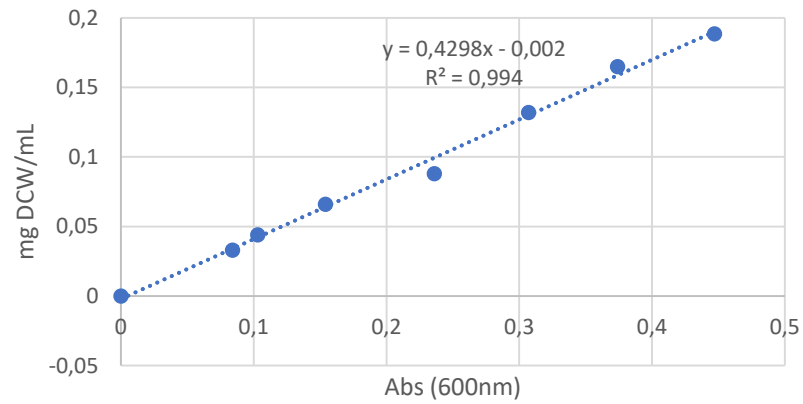
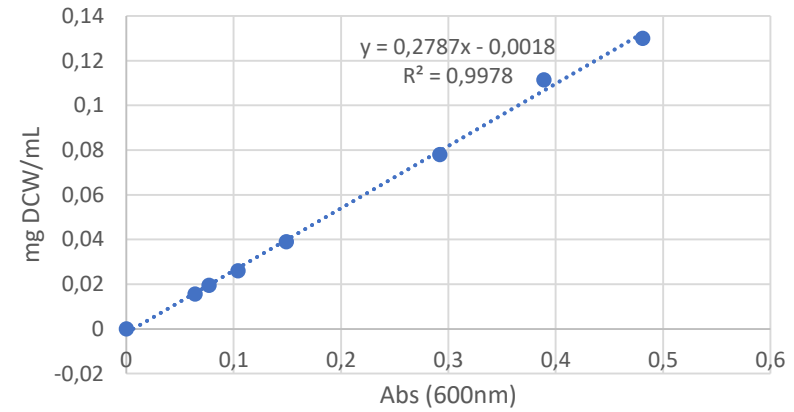
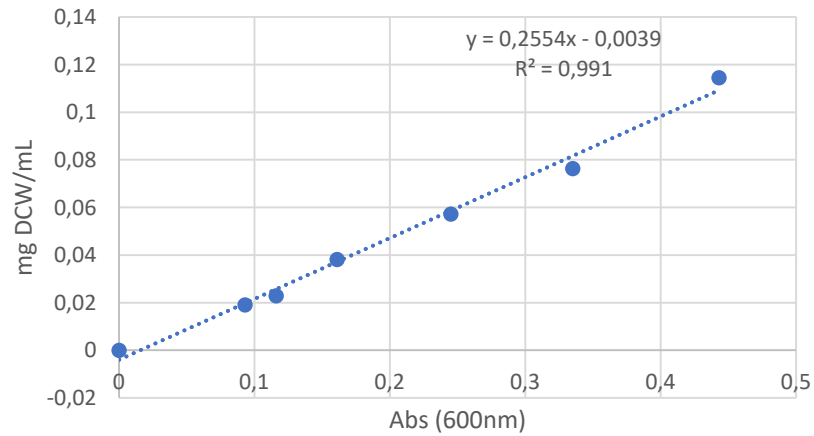
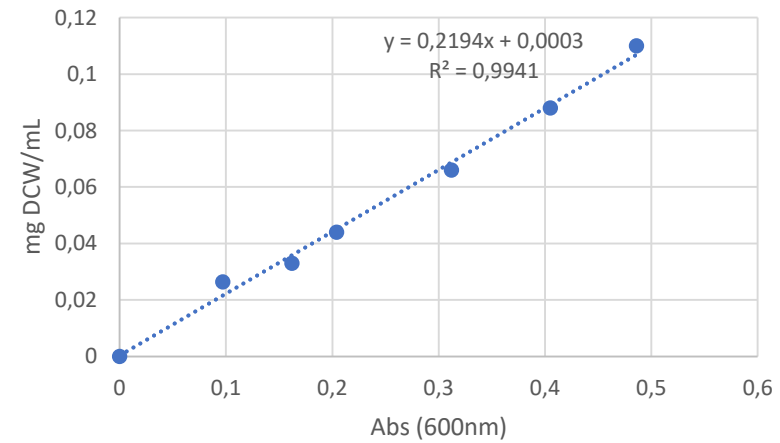


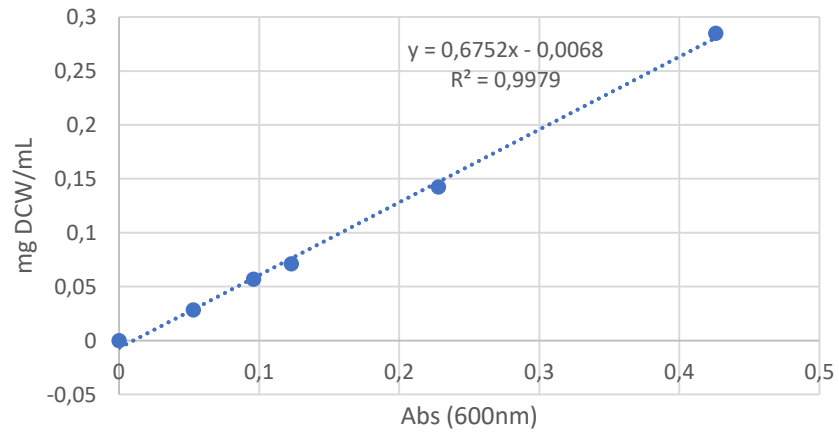
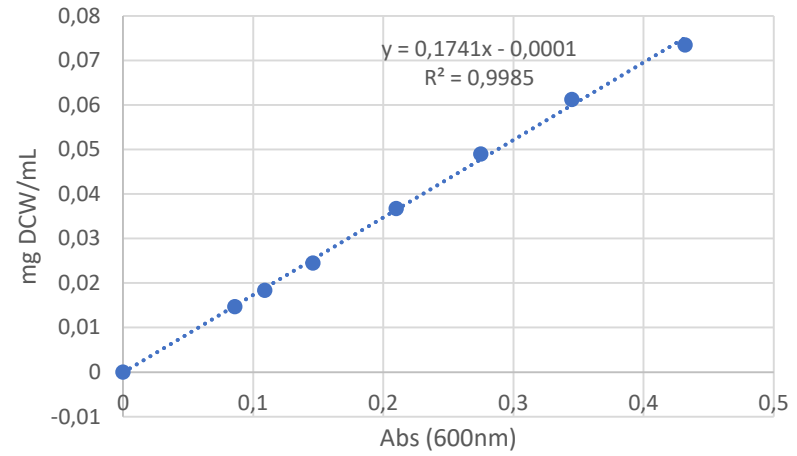
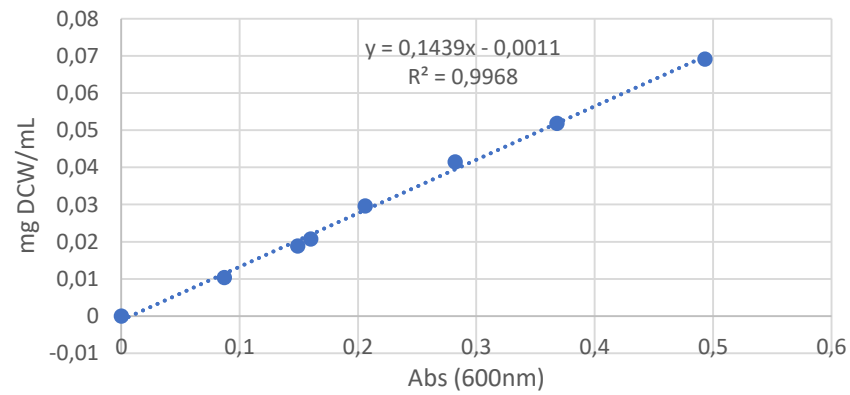
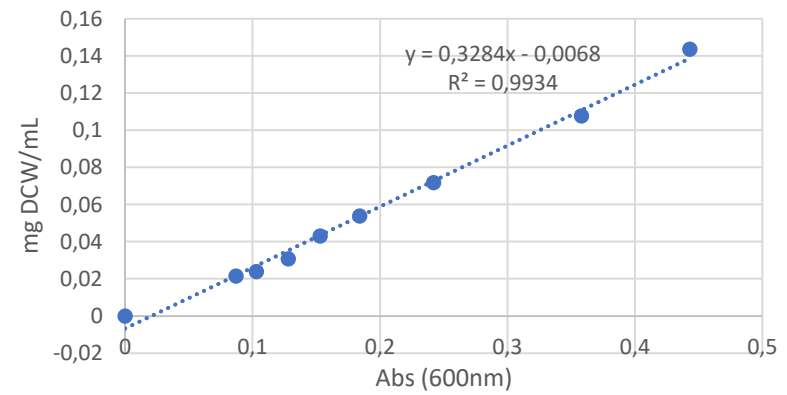


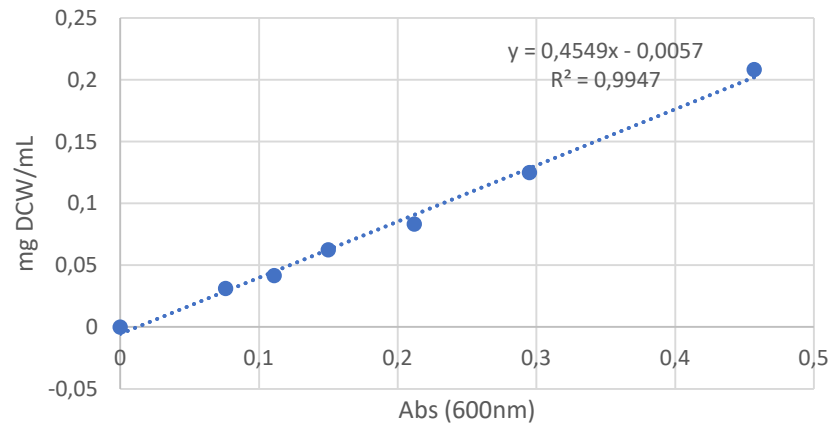
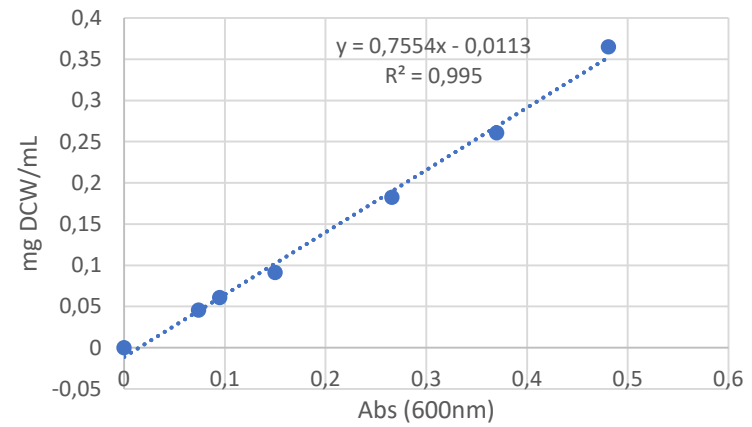
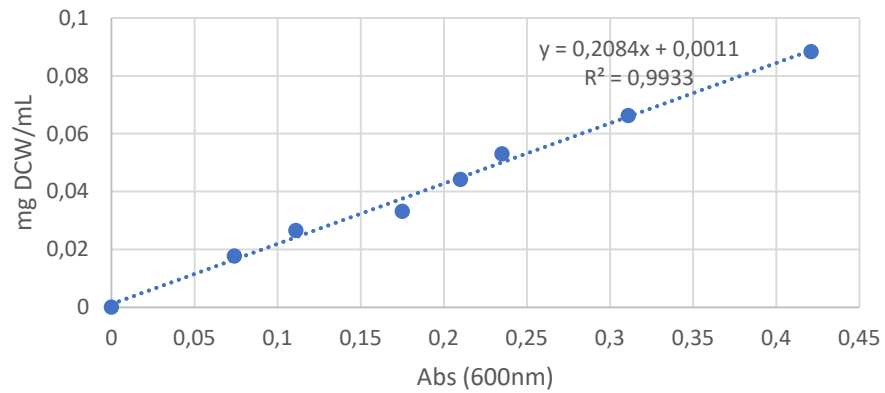
***Streptomyces sp.******Peribacillus frigitolerans******Sporosarcina thermotolerans******Pseudomonas cichorii***

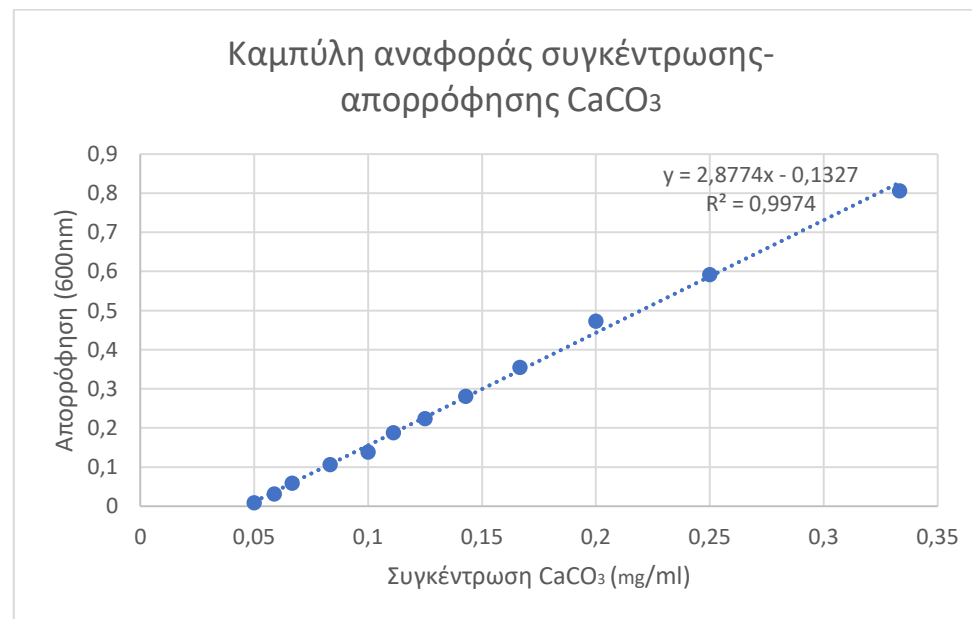
***Metabacillus litoralis******Myxococcus xanthus ATCC 435******Bacillus sp. (A4-3)******Metabacillus indicus***

***Bacillus sp. (D1-2)******Bacillus mesophilus******Bacillus sp. (VS4-4)******Streptomyces thinghirensis***

***Bacillus sp. (VS5-1)******Paenibacillus prosopidis******Rhodococcus wratislaviensis******Rhodococcus baikonurensis***

***Metabacillus crassostreae******Fictibacillus halophilus******Metabacillus herbersteinensis******Paenibacillus harenae***

***Sutcliffiella halmapala******Paenibacillus insulae******Streptomyces anulatus***



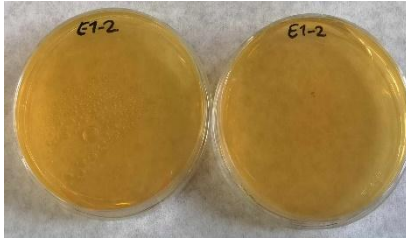
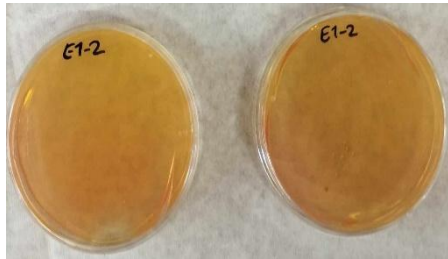
**Καμπύλη αναφοράς συγκέντρωσης ανθρακικού ασβεστίου-απορρόφησης**

**Διάγραμμα 31:** Καμπύλη αναφοράς συγκέντρωσης ανθρακικού ασβεστίου συναρτήσει της απορρόφησης στα 600nm



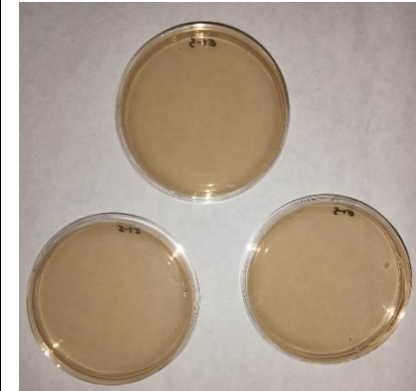
## Παράρτημα II



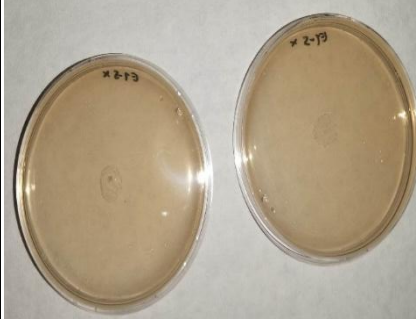
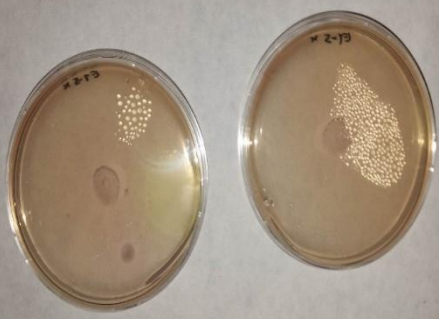


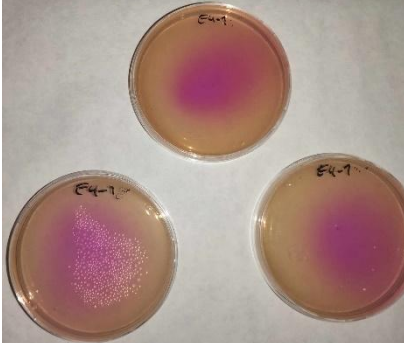
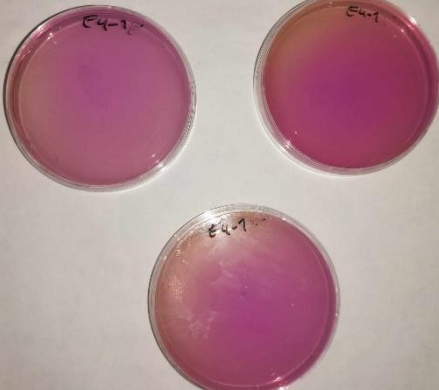
Ακολουθούν αναλυτικά τα αποτελέσματα των υγρών και στερεών καλλιέργειών του θρεπτικού μέσου ελέγχου της ουρεολυτικής δράσης των βακτηρίων παρουσία και απουσία ουρίας στις 24 και 48 ώρες επώασης για το σύνολο των επιδεικτικών μνημείων (Πίνακες 30-33).




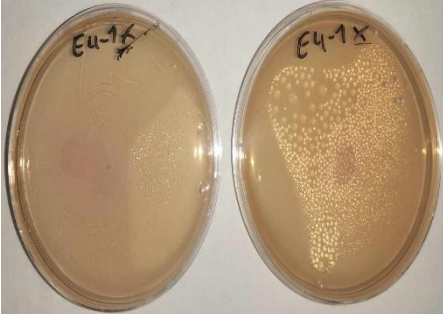
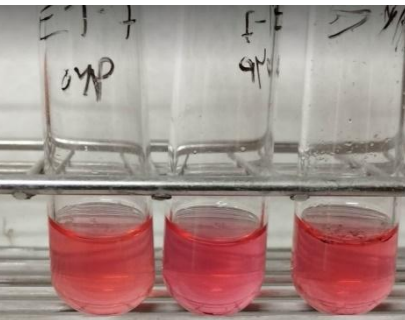
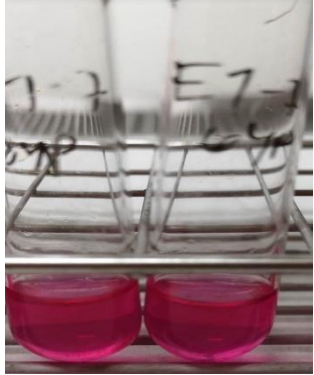
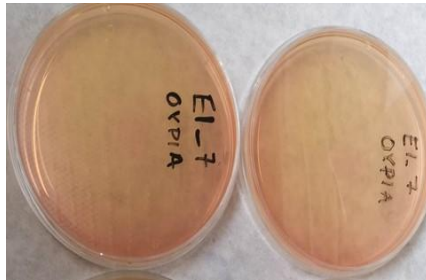
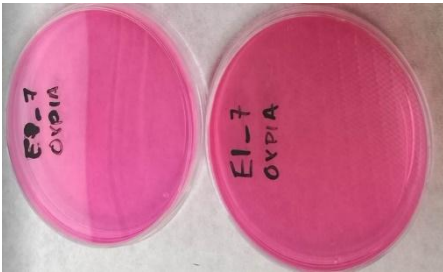
**Πίνακας 30:** Αποτελέσματα ελέγχου της ουρεολυτικής δράσης των βακτηρίων που απομονώθηκαν από το Ευπαλίειο όρυγμα



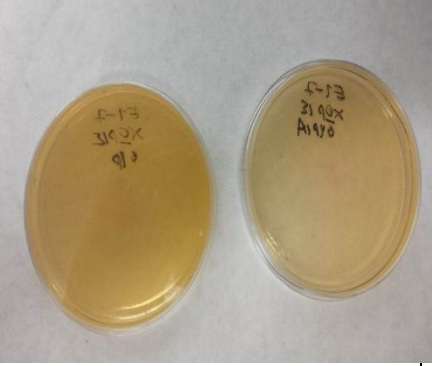



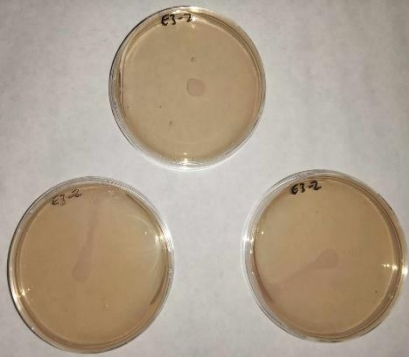
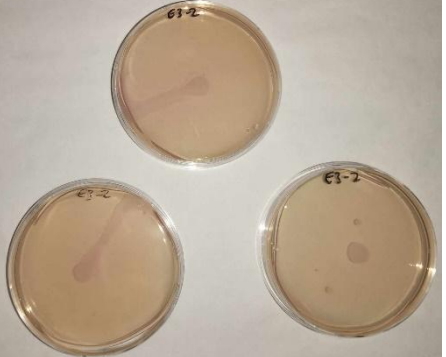
Κωδικός βακτηρίου ανά σημείο δειγματοληψίας και κοντινότερος συγγενής (% ομοιότητα) [Αριθμός πρόσβασης]	Παρουσία ή απουσία ουρίας	Υγρές Καλλιέργειες (δοκιμαστικοί σωλήνες)		Στερεές Καλλιέργειες (τρυβλία Petri με άγαρ)	
		24 ώρες	48 ώρες	24 ώρες	48 ώρες
<b>E1-2b</b> <i>Agromyces agglutinans</i> (99.6%) [NR_181007]	Παρουσία ουρίας				




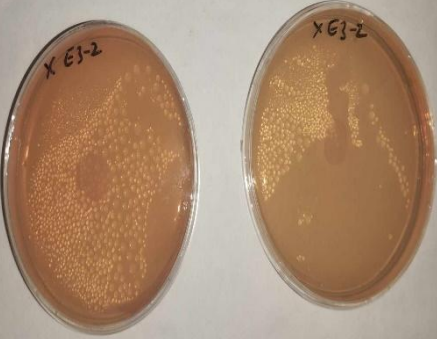
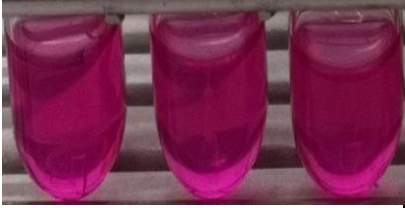

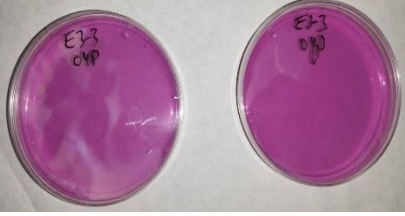





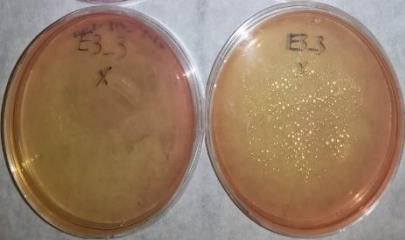

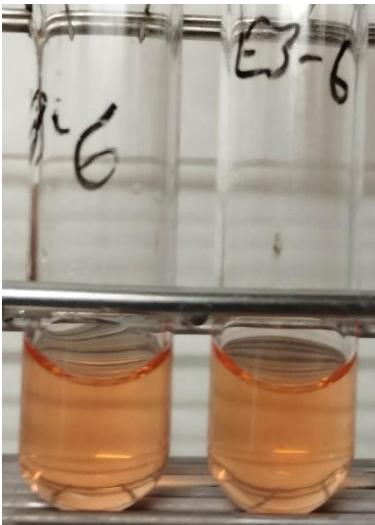
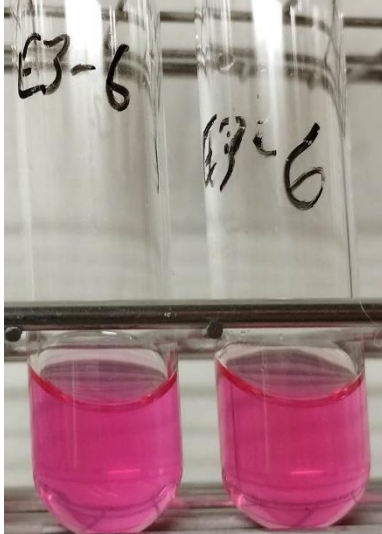
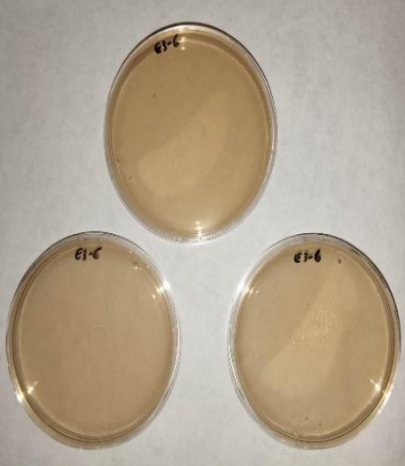
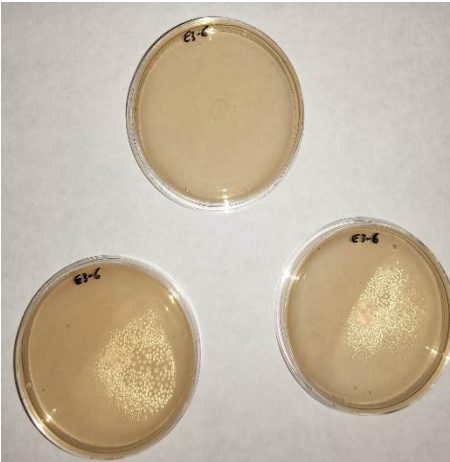
	<p>Απουσία ουρίας</p>				
<p><b>E1-3b &amp; E1-5b</b> <i>Metabacillus indicus</i> (98.9%) [NR_042974]</p>	<p>Παρουσία ουρίας</p>				

	<p>Απουσία ουρίας</p>				
<p><b>E1-4b</b> <i>Solibacillus isronensis</i> (83.9%) [NR_118049]</p>	<p>Παρουσία ουρίας</p>				

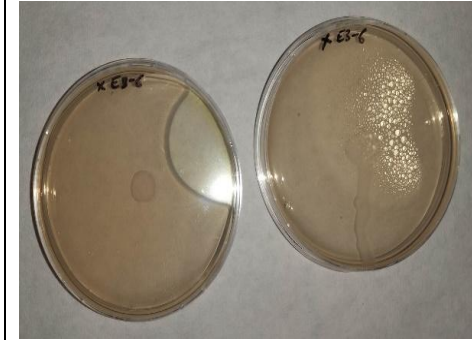
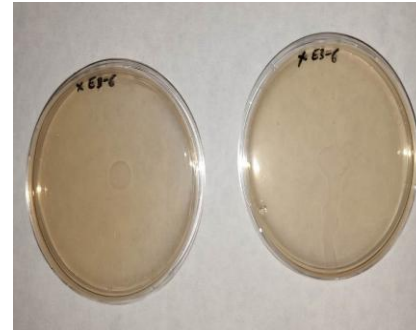
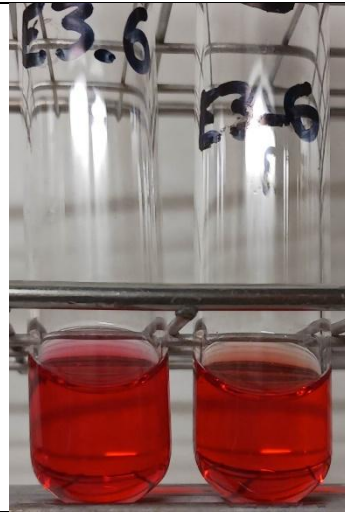
	Απουσία ουρίας				
<p><b>E1-7b</b> <i>Pseudomonas cichorii</i> (90.8%) [MT415198]</p>	Παρουσία ουρίας				

	Απουσία ουρίας				
<p><b>E3-2b</b> <i>Agrococcus jenensis</i> (99.2%) [NR_115028]</p>	Παρουσία ουρίας				

	Απουσία ουρίας				
<p><b>E3-3b</b> <i>Sporosarcina thermotolerans</i> (98.4%) [NR_116956]</p>	Παρουσία ουρίας				

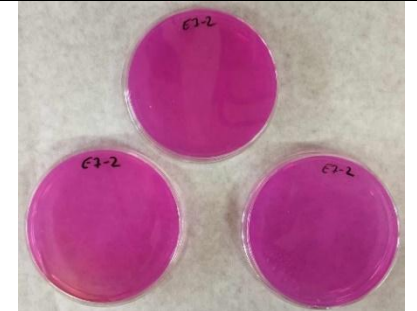
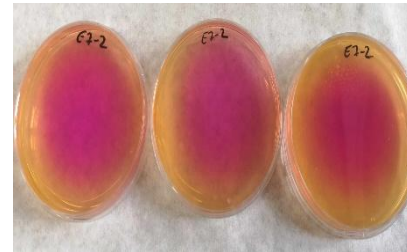
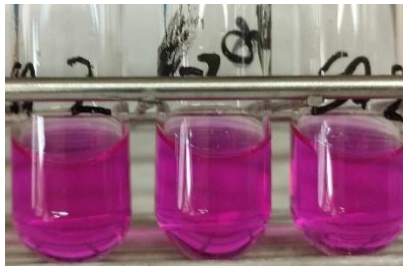
	Απουσία ουρίας				
<b>E3-5b &amp; E3-6b</b> <i>Metabacillus herbersteinensis</i> (99.6%) [NR_042286]	Παρουσία ουρίας				


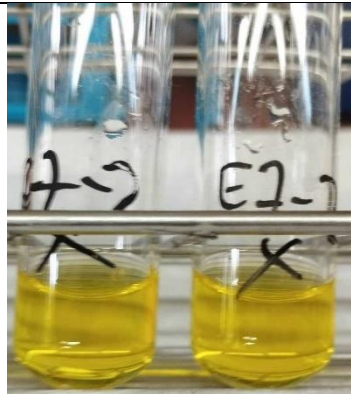
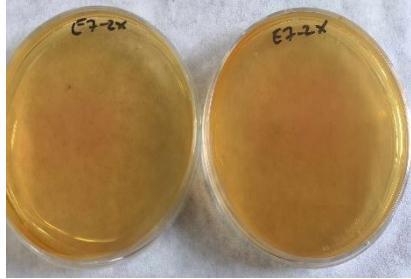
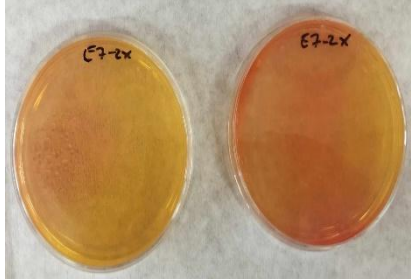



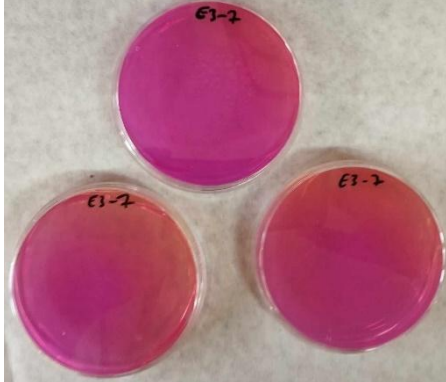
Απουσία  
ουρίας



**E7-2b**  
*Rhodococcus*  
*baikonurensis*  
(98.8%)  
[NR\_024784]

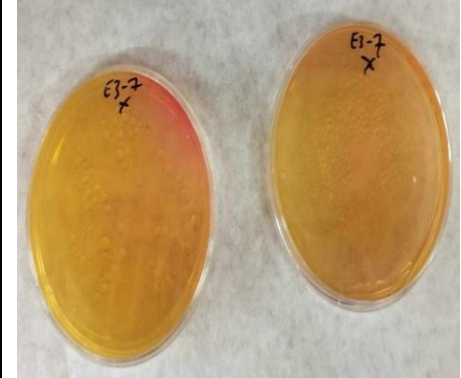
Παρουσία  
ουρίας



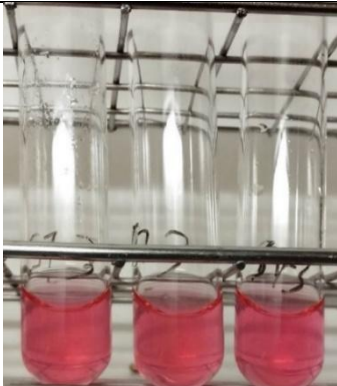

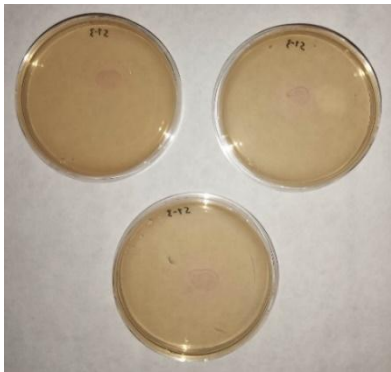
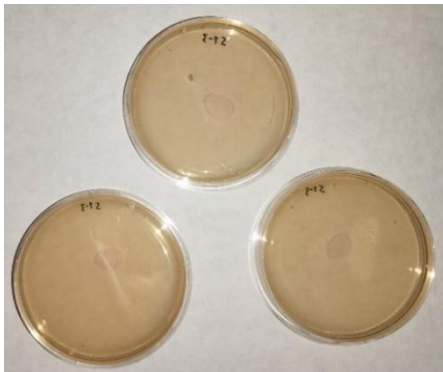
	Απουσία ουρίας				
<b>E7-3b</b> <i>Rhodococcus wratislaviensis</i> (93.3%) [NR_118605]	Παρουσία ουρίας				


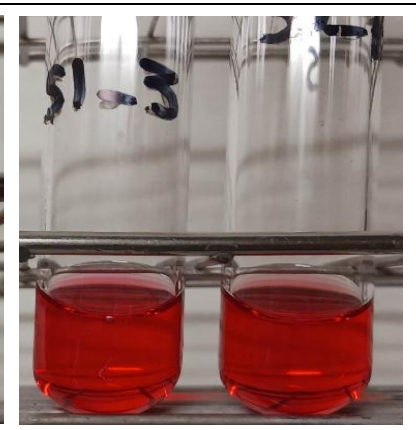
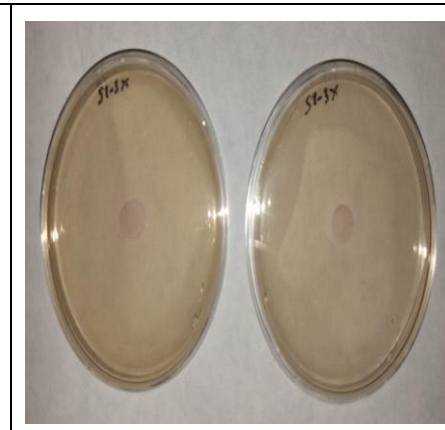
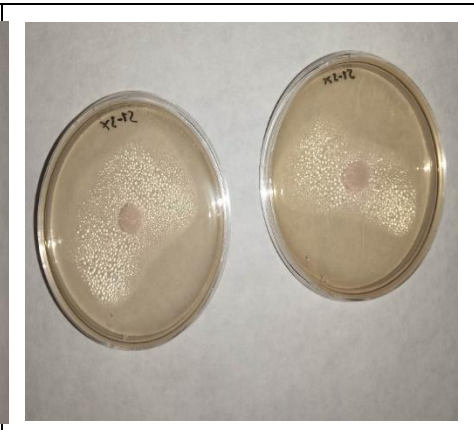
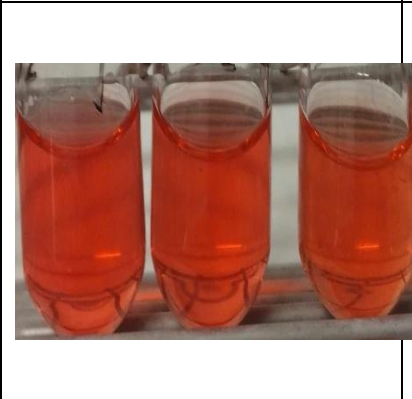

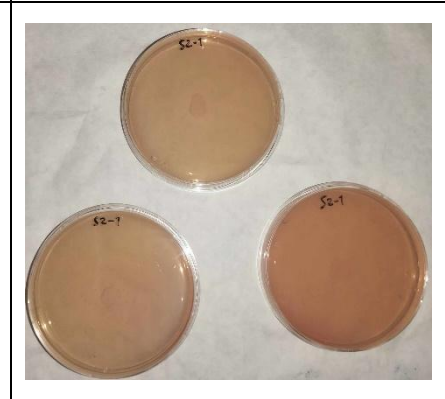
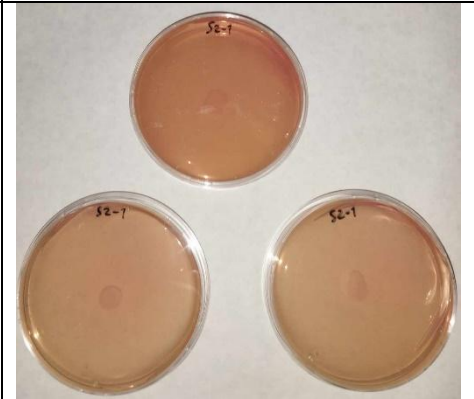


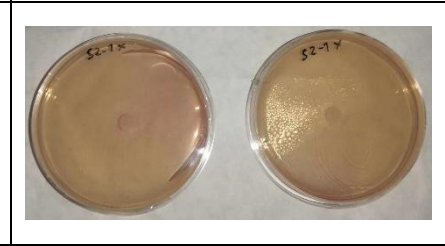
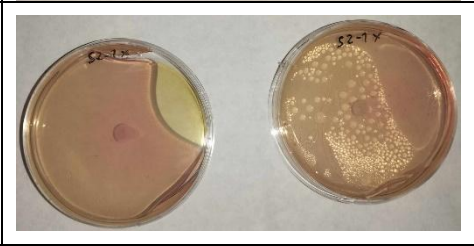




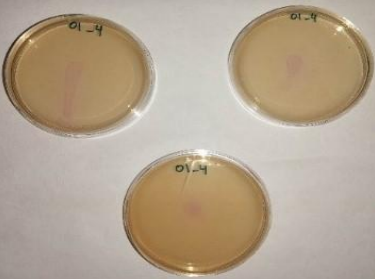
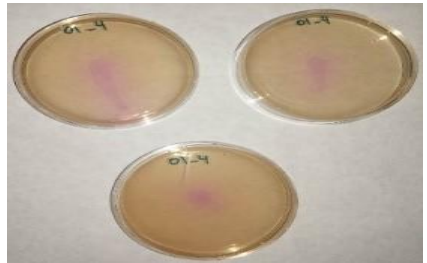




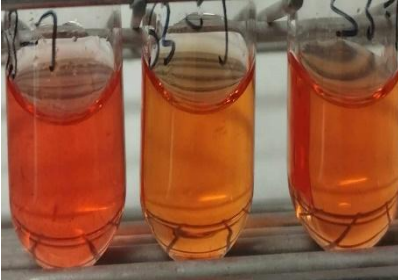
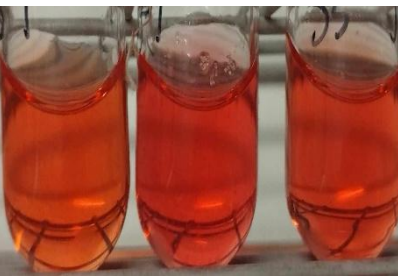
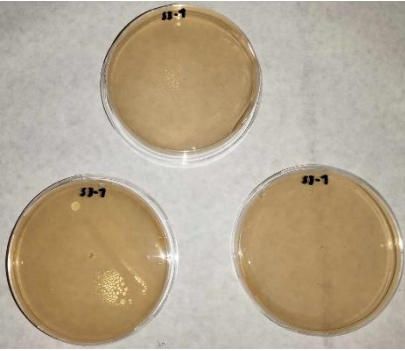
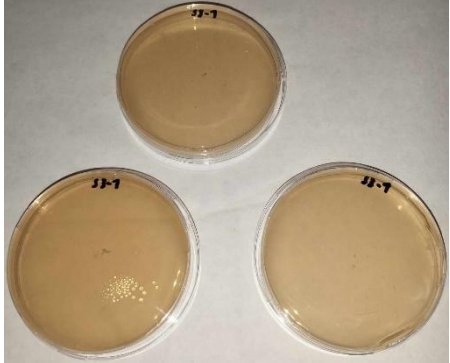
Απουσία  
ουρίας

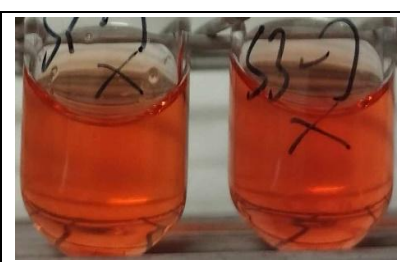

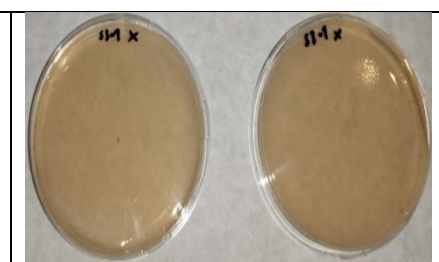
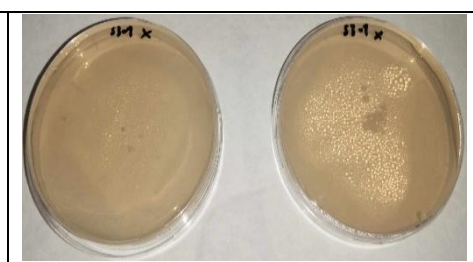
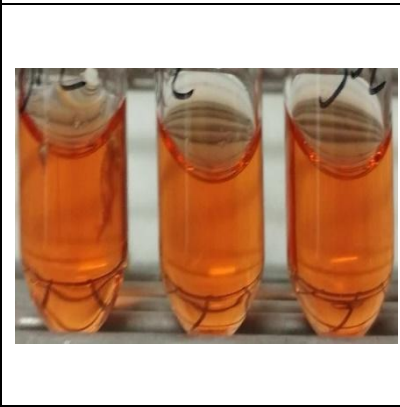
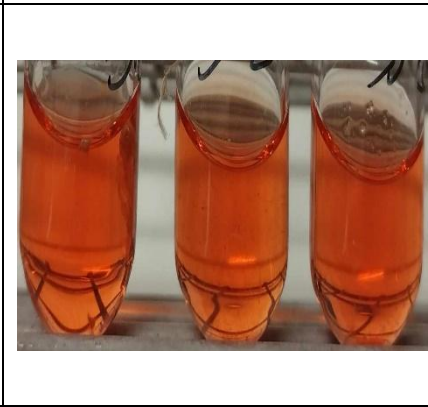
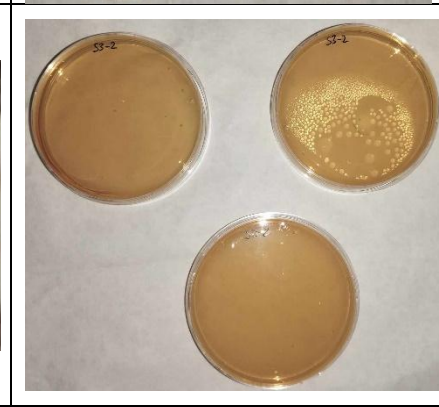
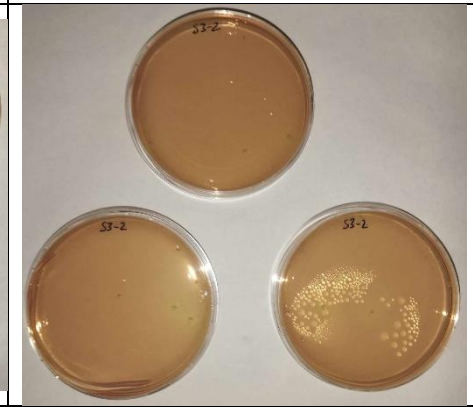


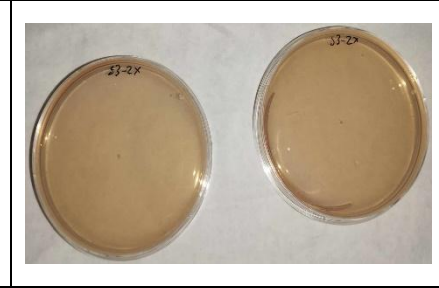
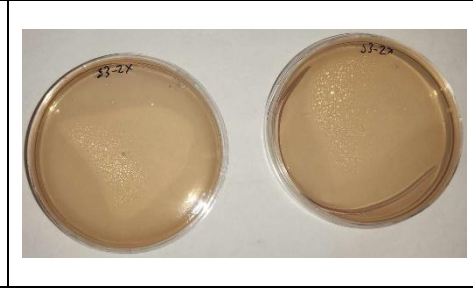


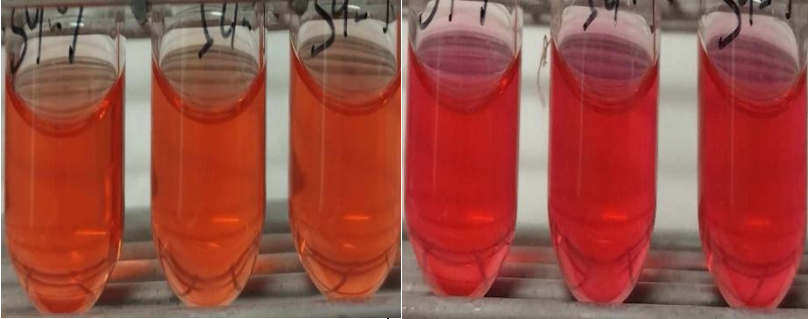
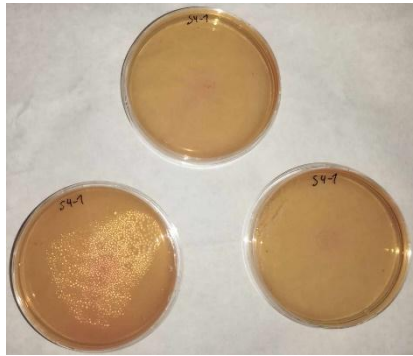
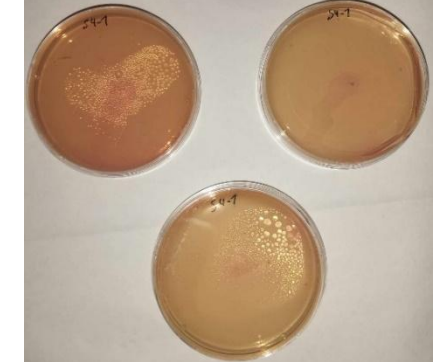


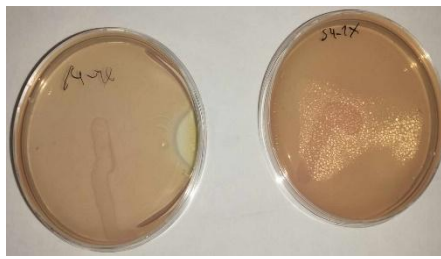
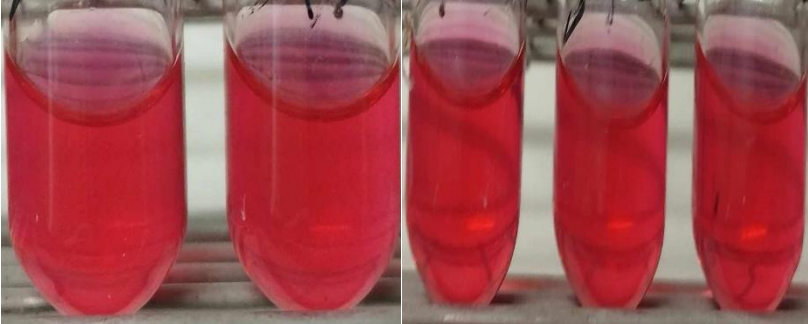
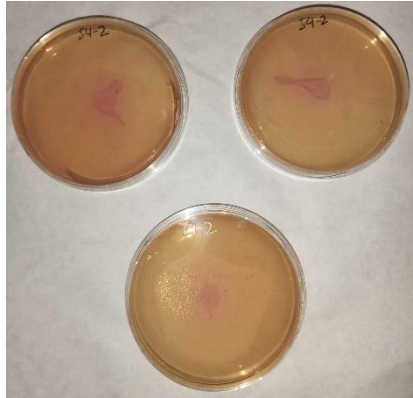
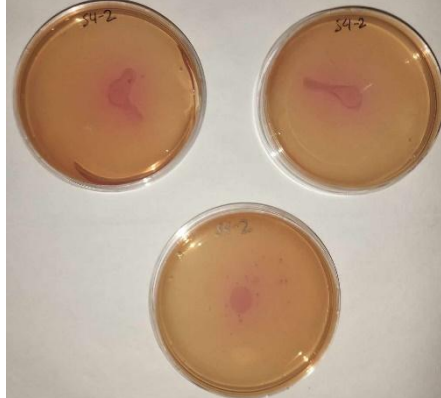
**Πίνακας 31:** Αποτελέσματα ελέγχου της ουρεολυτικής δράσης των βακτηρίων που απομονώθηκαν από την Ιερά Μονή Παναγίας Βαρνάκοβας

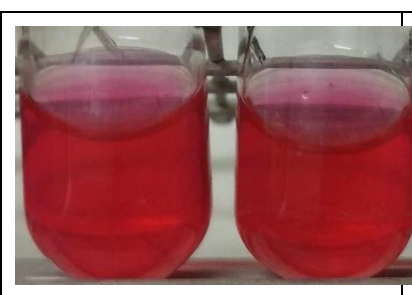
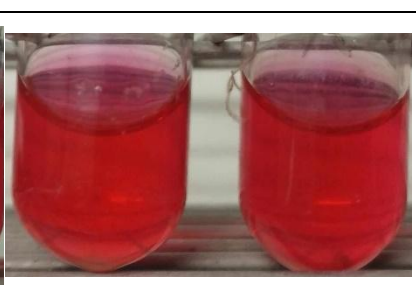
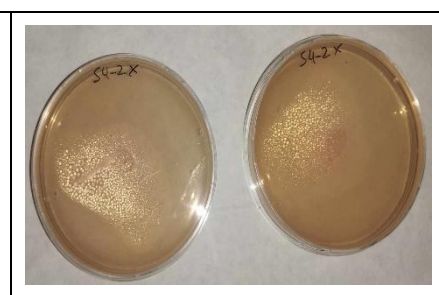
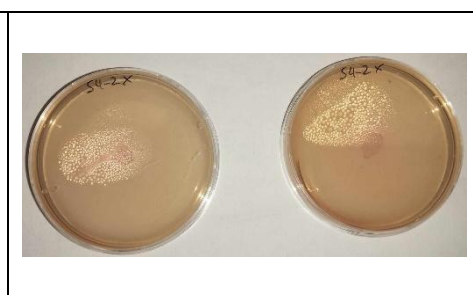


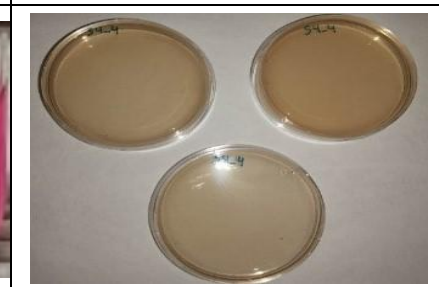
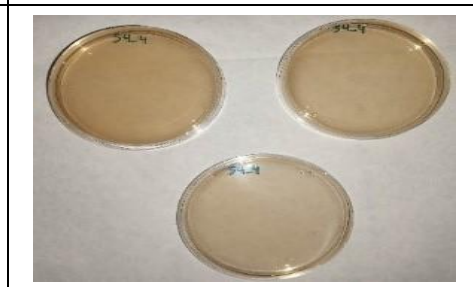




Κωδικός βακτηρίου ανά σημείο δειγματοληψίας και κοντινότερος συγγενής (% ομοιότητα) [Αριθμός πρόσβασης]	Παρουσία ή απουσία ουρίας	Υγρές Καλλιέργειες (δοκιμαστικοί σωλήνες)		Στερεές Καλλιέργειες (τρυβλία Petri με άγαρ)	
		24 ώρες	48 ώρες	24 ώρες	48 ώρες
<b>VS1-3b</b> <i>Peribacillus</i> <i>frigoritolerans</i> (100%) [NR_117474]	Παρουσία ουρίας				

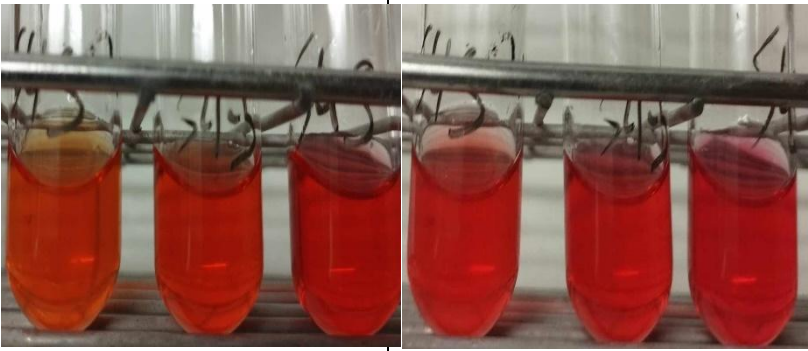
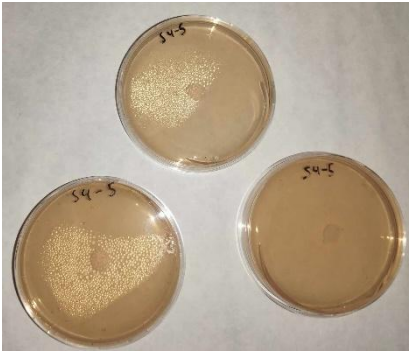
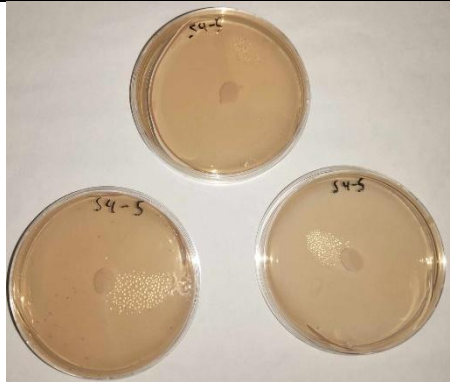

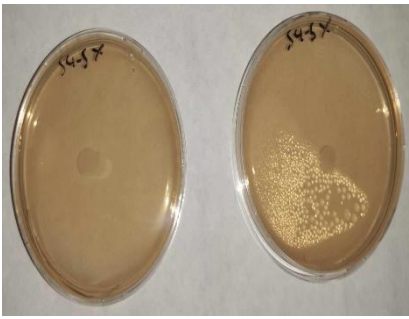
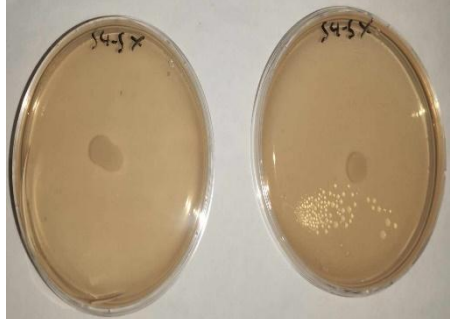
	Απουσία ουρίας				
<b>VS2-1b</b> <i>Sutcliffiella halmapala</i> (99.7%) [NR_026144]	Παρουσία ουρίας				
	Απουσία ουρίας				

<b>VS2-2b &amp; VO1-4b</b> <i>Metabacillus litoralis</i> (98.9%) [NR_043015]	Παρουσία ουρίας	 		
	Απουσία ουρίας	 		
<b>VS3-1b</b> <i>Streptomyces thinghirensis</i> (98.5%) [NR_116901]	Παρουσία ουρίας	 		

	Απουσία ουρίας				
<b>VS3-2b</b> <b>VO1-1b</b> <b>VO1-5b</b> <b>VO4-1b</b> Metabacillus herbersteinensis (99.7%) [NR_042286]	Παρουσία ουρίας				
	Απουσία ουρίας				

<b>VS4-1b</b> <i>Paenibacillus insulae</i> (98.9%) [NR_165679]	Παρουσία ουρίας 		
	Απουσία ουρίας 		
<b>VS4-2b</b> <i>Streptomyces anulatus</i> (100%) [OQ073700]	Παρουσία ουρίας 		

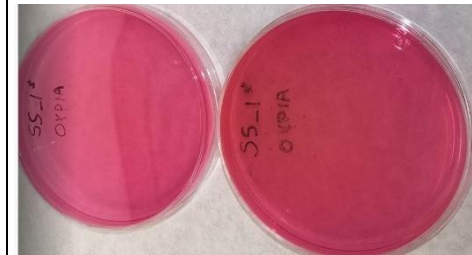
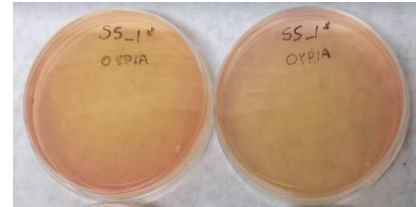
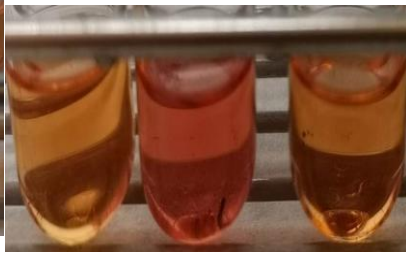
	Απουσία ουρίας				
<b>VS4-4b</b> Bacillus sp. (99.4%) [AJ316317]	Παρουσία ουρίας				
	Απουσία ουρίας				

<b>VS4-5b</b> Streptomyces sp. (99.6%) [MW568637]	Παρουσία ουρίας			
	Απουσία ουρίας			

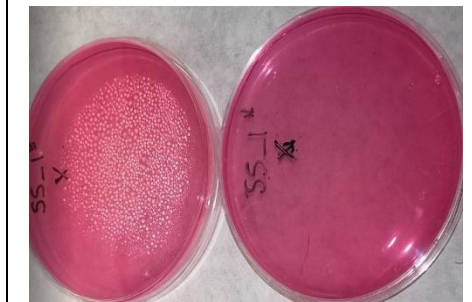
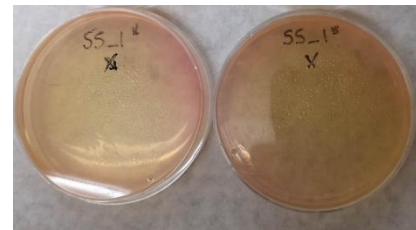



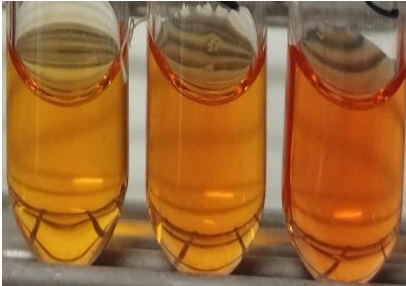
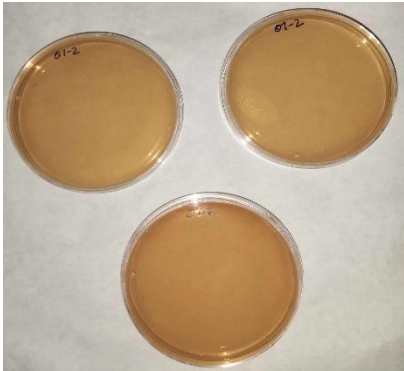
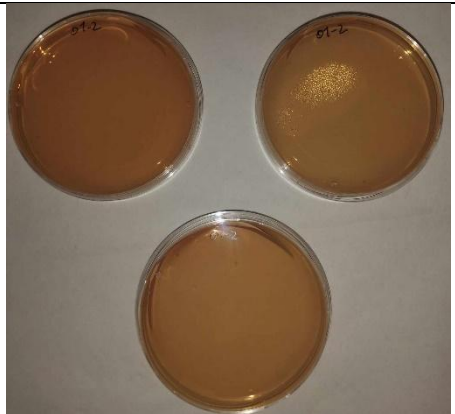


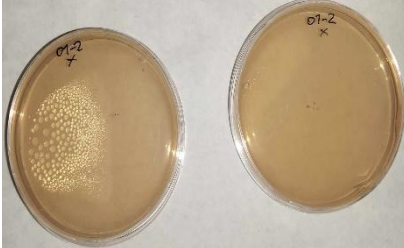
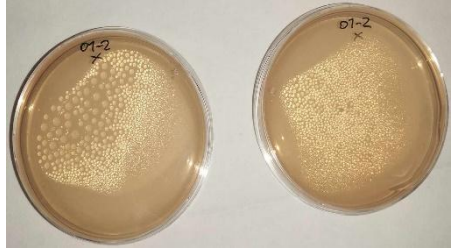



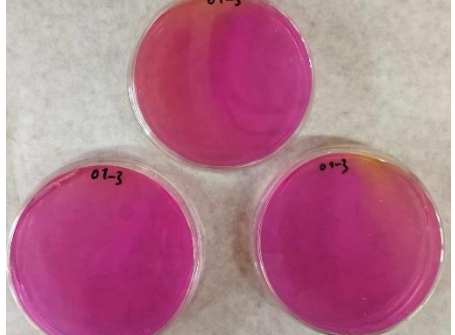
**VS5-1b**  
Bacillus sp.  
(99.7%)  
[MG257924]



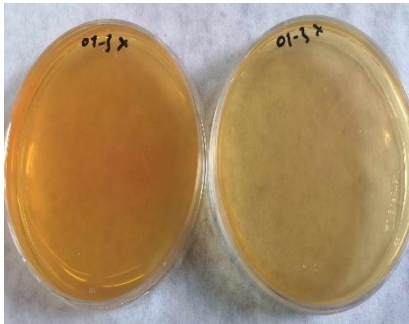
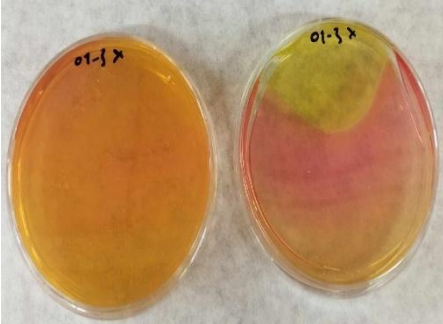
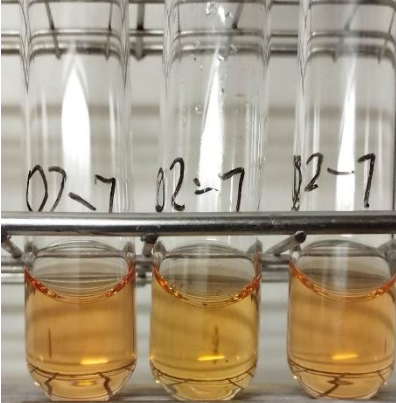
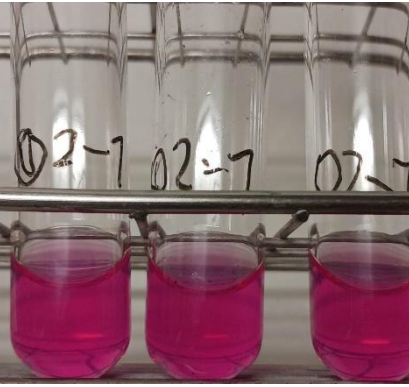
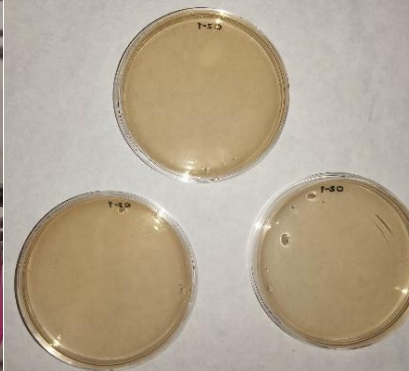
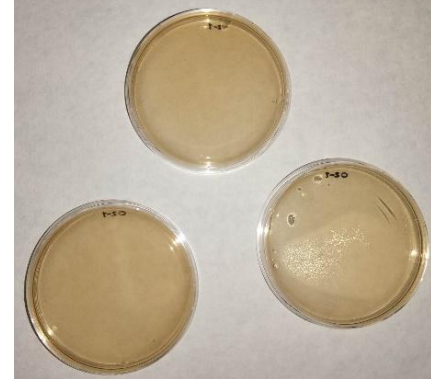
Παρουσία  
ουρίας



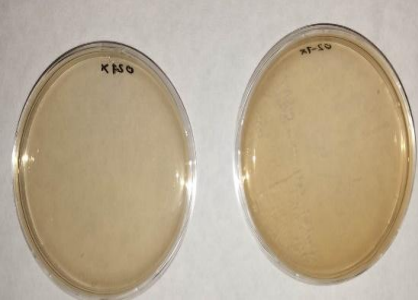
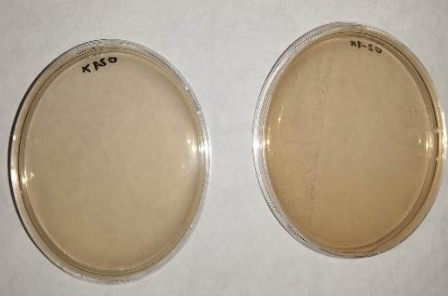
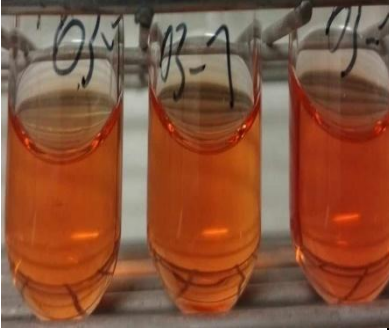
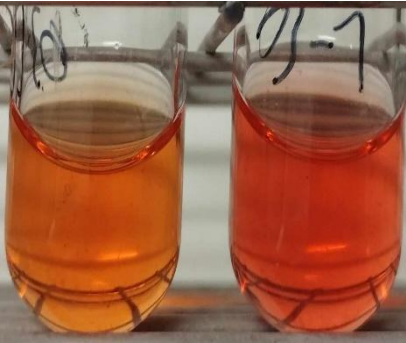
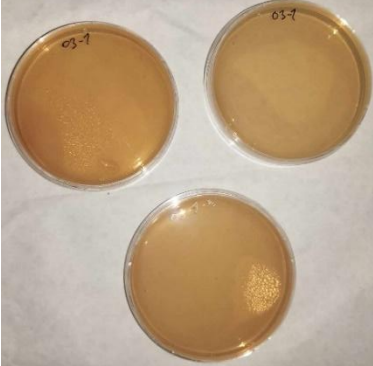
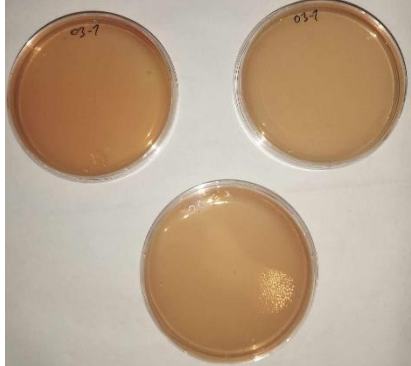


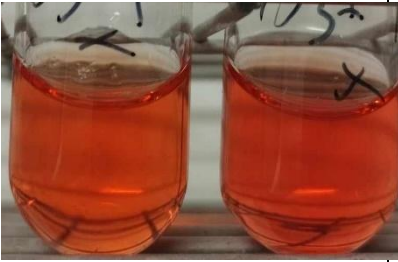

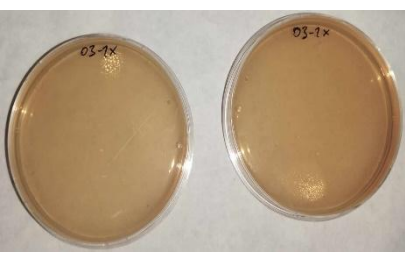
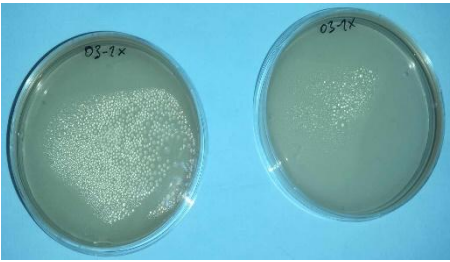






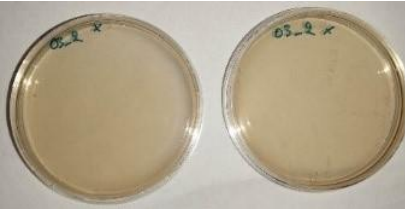

Απουσία  
ουρίας



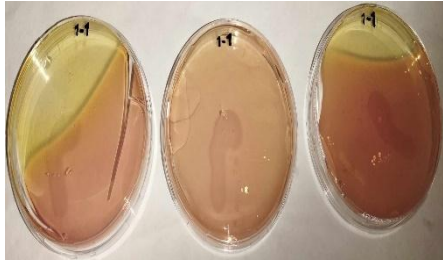
<p><b>VO1-2b</b> <i>Metabacillus crassostreae</i> (98.6%) [NR_178471]</p>	<p>Παρουσία ουρίας</p>				
	<p>Απουσία ουρίας</p>				
<p><b>VO1-3b</b> <i>Fictibacillus halophilus</i> (95.9%) [NR_149289]</p>	<p>Παρουσία ουρίας</p>				

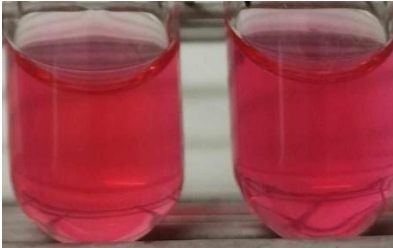
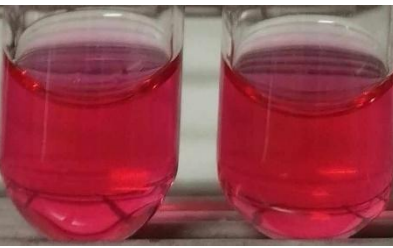


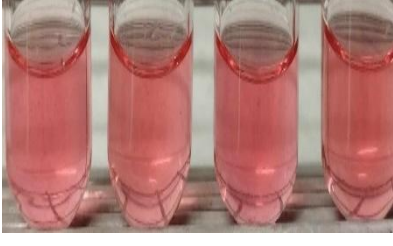







	Απουσία ουρίας				
<b>VO2-1b</b> <i>Paenibacillus harenae</i> (92.8%) [NR_043220]	Παρουσία ουρίας				

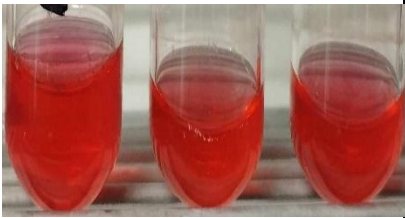

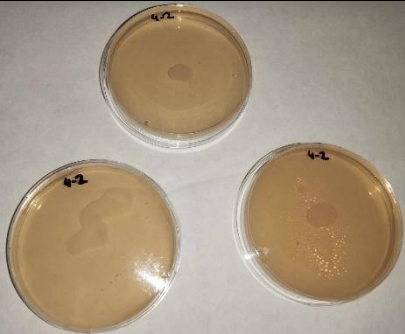
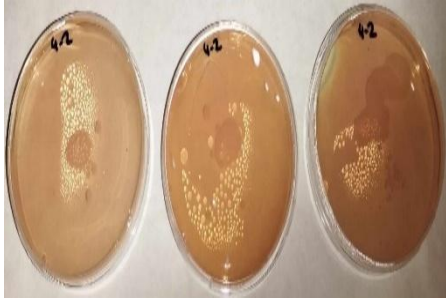
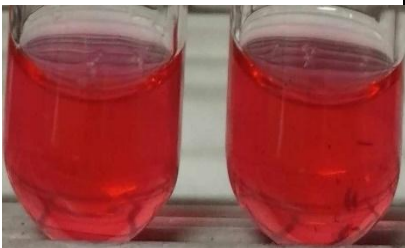
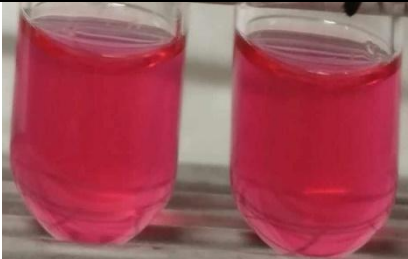
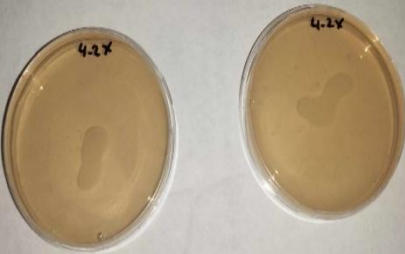



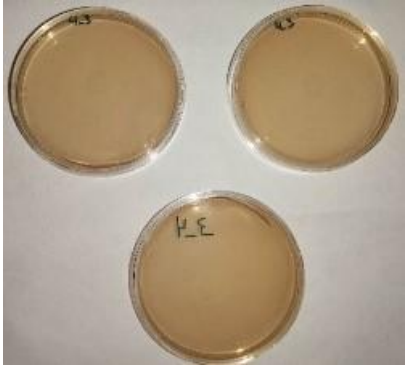
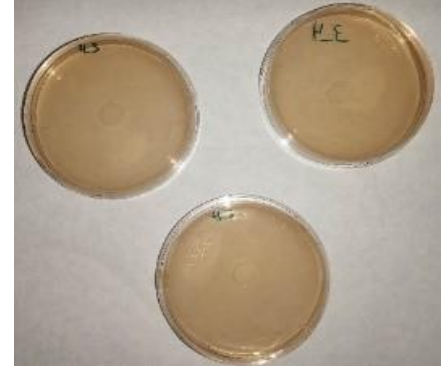
	Απουσία ουρίας				
<b>VO3-1b</b> <i>Paenibacillus prosopidis</i> (96.2%) [NR_116828]	Παρουσία ουρίας				

	Απουσία ουρίας				
<b>VO3-2b</b> <i>Bacillus mesophilus</i> (97.8%) [NR_149175]	Παρουσία ουρίας				
	Απουσία ουρίας				




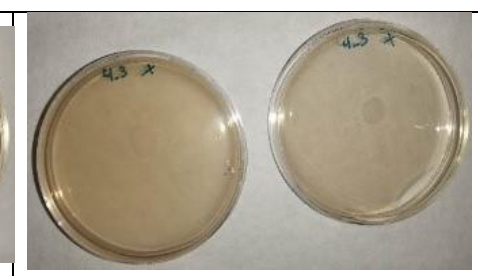

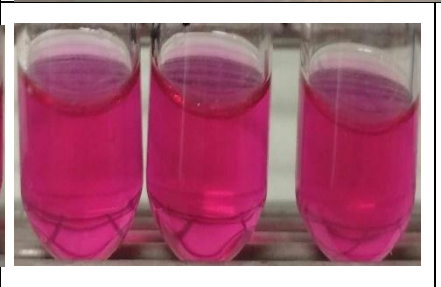
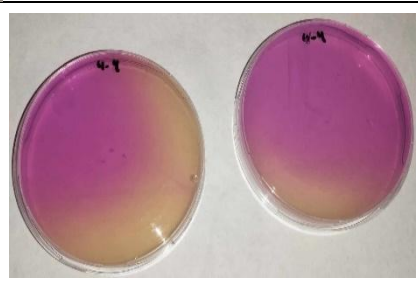
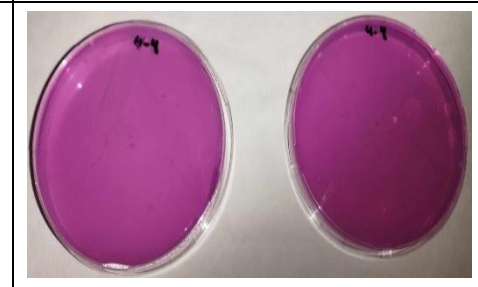


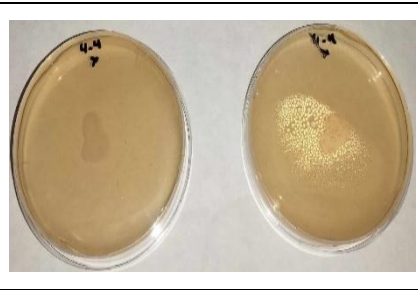
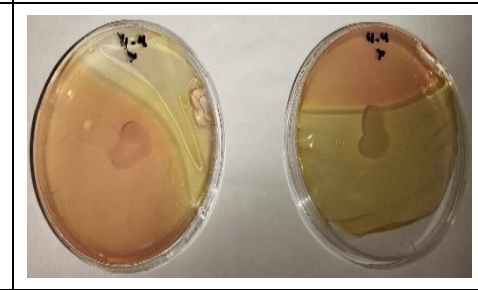
**Πίνακας 32:** Αποτελέσματα ελέγχου της ουρεολυτικής δράσης των βακτηρίων που απομονώθηκαν από τη "Κοιμωμένη του Χαλεπά" του μνημείου Αφεντάκη στο Α' Νεκροταφείο Αθηνών


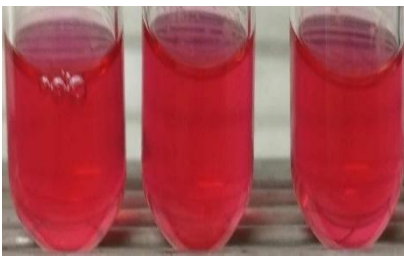
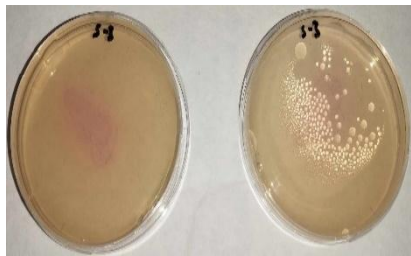
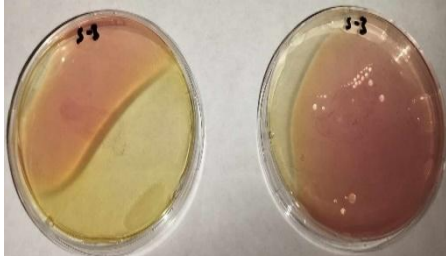


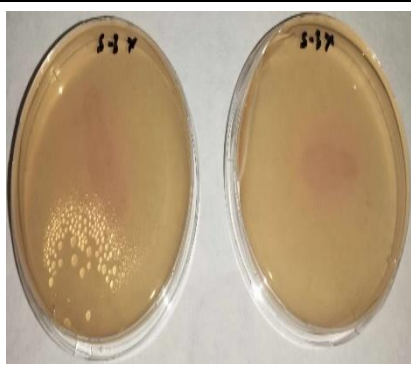
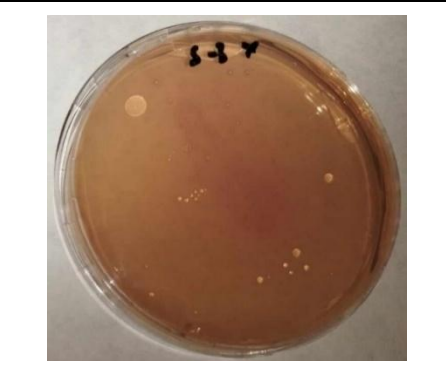
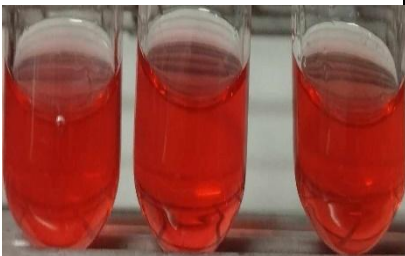
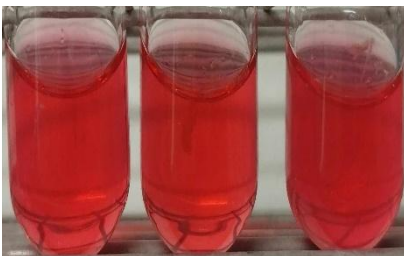
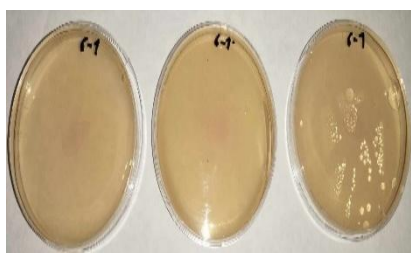
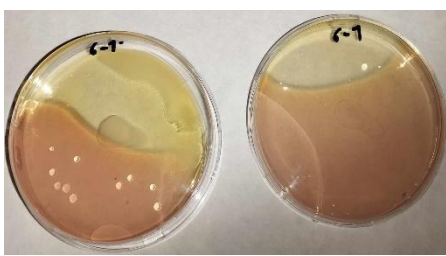
Κωδικός βακτηρίου ανά σημείο δειγματοληψίας και κοντινότερος συγγενής (% ομοιότητα) [Αριθμός πρόσβασης]	Παρουσία ή απουσία ουρίας	Υγρές Καλλιέργειες (δοκιμαστικοί σωλήνες)		Στερεές Καλλιέργειες (τρυβλία Petri με άγαρ)	
		24 ώρες	48 ώρες	24 ώρες	48 ώρες
<b>A1-1b</b> <i>Arthrobacter sp.</i> (95%) [AP018697]	Παρουσία ουρίας				

	Απουσία ουρίας				
<b>A1-4b</b> <i>Micrococcus luteus</i> (99.4%) [HQ717326]	Παρουσία ουρίας				
	Απουσία ουρίας				

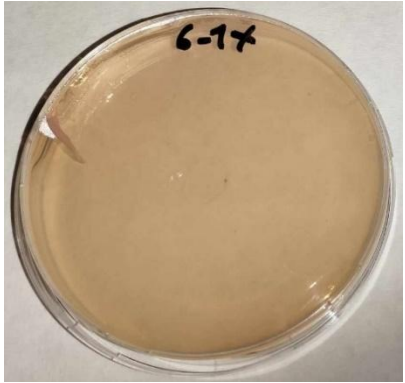
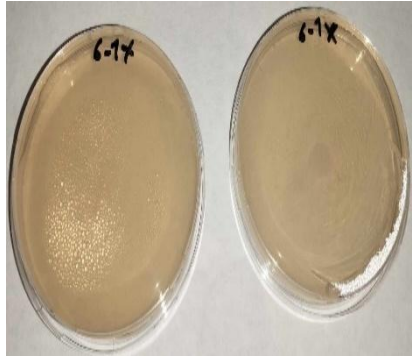
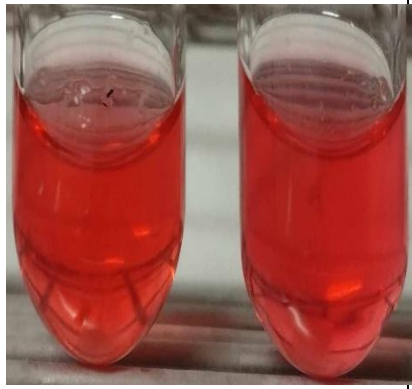
<b>A4-2b</b> <i>Actinotalea fermentans</i> (99.7%) [MH130308]	Παρουσία ουρίας				
	Απουσία ουρίας				
<b>A4-3b</b> <i>Bacillus</i> sp. (100%) [HM804391]	Παρουσία ουρίας				





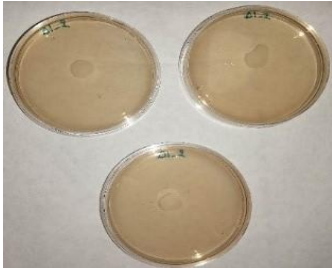
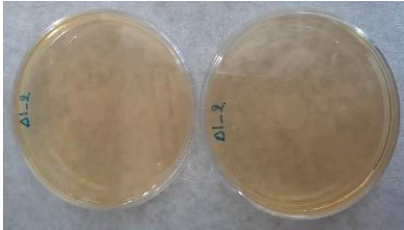
	Απουσία ουρίας				
<b>A4-4b</b> <i>Rhodococcus</i> sp. (100%) [LR536418]	Παρουσία ουρίας				
	Απουσία ουρίας				




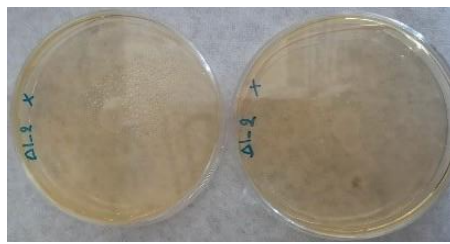


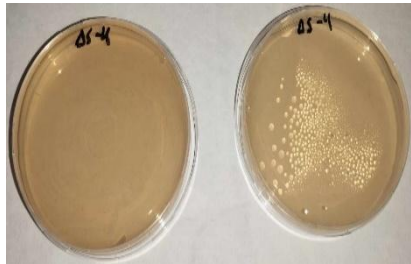
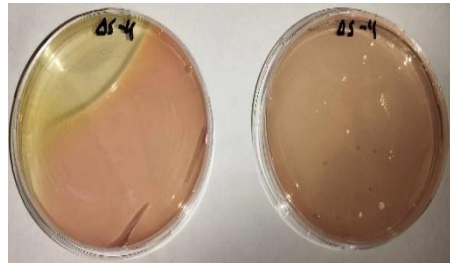




<b>A5-3b</b> <i>Rathayibacter</i> sp. (90.3%) [JX869540]	Παρουσία ουρίας				
	Απουσία ουρίας				
<b>A6-1b</b> <i>Kocuria carniphila</i> (100%) [MT393681]	Παρουσία ουρίας				

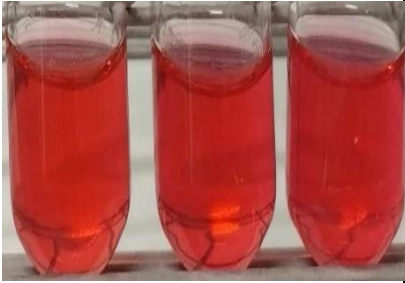
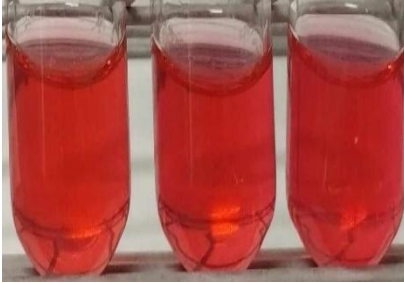
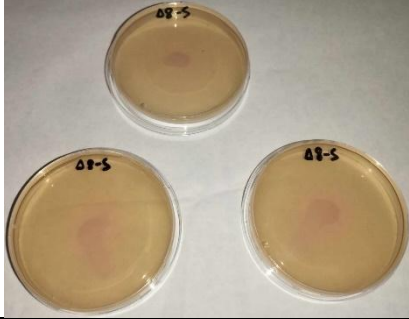
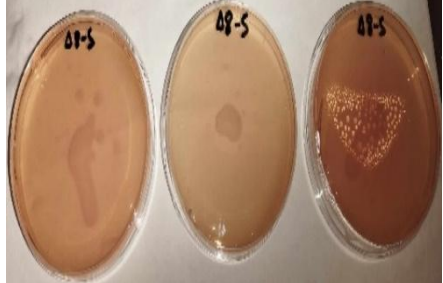


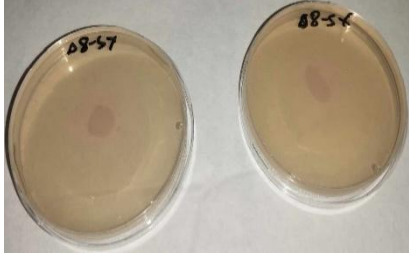




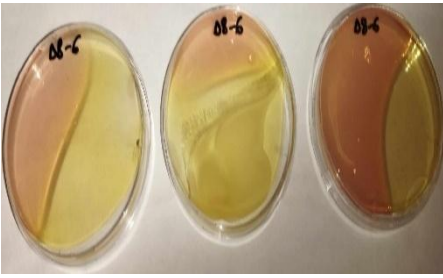
Απουσία  
ουρίας



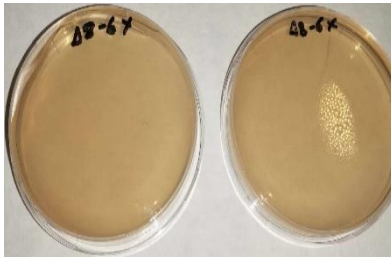

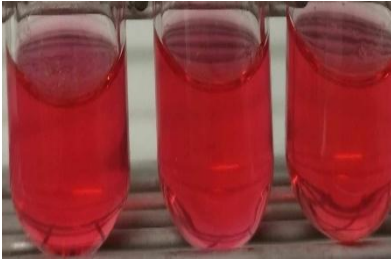

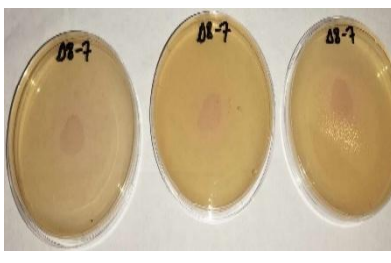
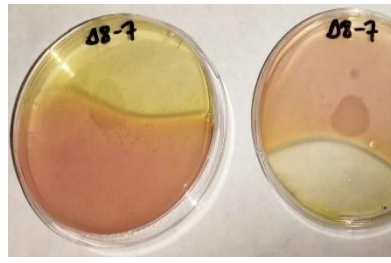
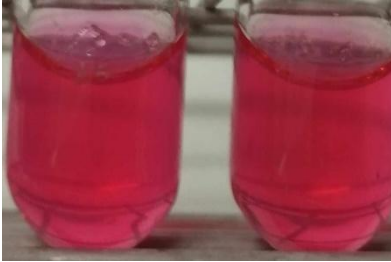

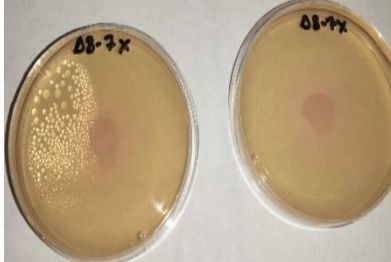
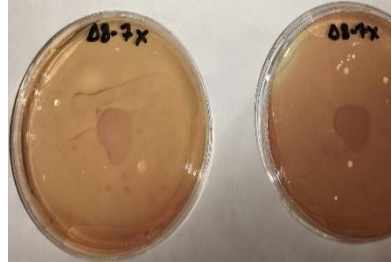


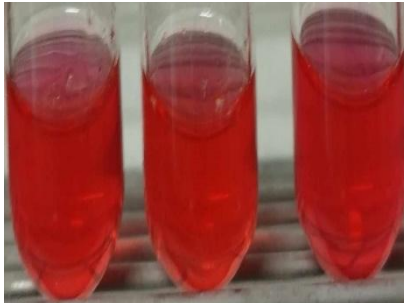
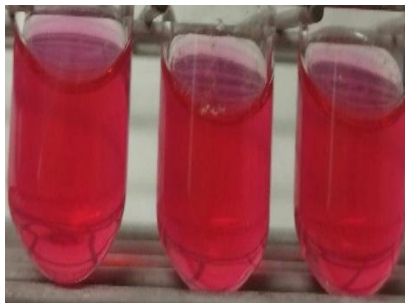
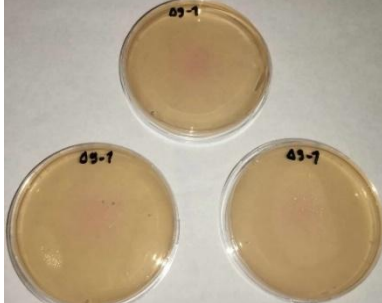
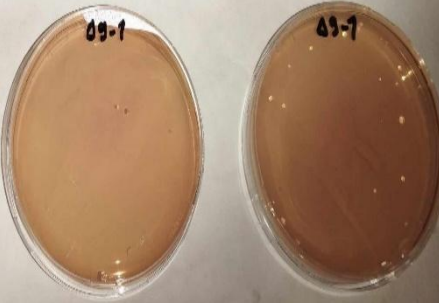
**Πίνακας 33:** Αποτελέσματα ελέγχου της ουρεολυτικής δράσης των βακτηρίων που απομονώθηκαν από τη “Κοιμωμένη του Βισσάρη” του μνημείου Δελιγιάννη στο Α΄ Νεκροταφείο Αθηνών

Κωδικός βακτηρίου ανά σημείο δειγματοληψίας και κοντινότερος συγγενής (% ομοιότητα) [Αριθμός πρόσβασης]	Παρουσία ή απουσία ουρίας	Υγρές Καλλιέργειες (δοκιμαστικοί σωλήνες)		Στερεές Καλλιέργειες (τρυβλία Petri με άγαρ)	
		24 ώρες	48 ώρες	24 ώρες	48 ώρες
<b>D1 -2b</b> <i>Bacillus</i> sp. (100%) [MT582155]	Παρουσία ουρίας				

	Απουσία ουρίας				
<b>D5-4b</b> <i>Kocuria</i> sp. (100%) [MT568619]	Παρουσία ουρίας				
	Απουσία ουρίας				

<b>D8 – 5b</b> <i>Arthrobacter agilis</i> (98.2%) [MT397140]	Παρουσία ουρίας				
	Απουσία ουρίας				
<b>D8 – 6b</b> Uncultured clone (99.2%) [MG744664]	Παρουσία ουρίας				

	Απουσία ουρίας				
<b>D8 – 7b</b> <i>Arthrobacter</i> sp. (99.8%) [MT749865]	Παρουσία ουρίας				
	Απουσία ουρίας				

<b>D9 – 1b</b> <i>Xanthomonadales</i> bacterium (100%) [KX027360]	Παρουσία ουρίας				
	Απουσία ουρίας	