

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ
ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ –ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ,
ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ»



«ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΗΣ ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑΣ ΑΡΧΑΙΩΝ
ΤΟΙΧΟΓΡΑΦΙΩΝ ΠΟΥ ΕΜΦΑΝΙΖΟΥΝ ΒΙΟΑΛΛΟΙΩΣΗ ΑΠΟ
ΤΗΝ ΚΡΗΝΗ ΤΗΣ ΚΑΛΛΙΡΟΗΣ ΤΗΣ ΠΝΥΚΑΣ ΚΑΙ ΤΟ ΙΕΡΟ
ΤΟΥ ΠΑΝΟΣ»



ΖΑΧΑΡΕΓΚΑ ΦΩΤΕΙΝΗ

ΛΑΡΙΣΑ 2014

«Μελέτη της βακτηριακής ποικιλότητας σε αρχαίες
τοιχογραφίες που εμφανίζουν βιοαλλοίωση από την Κρήνη της
Καλλιρόης της Πνύκας και το Ιερό του Πανός»

«Study of the bacterial diversity on ancient mural paintings
from Kalliroi's Fountain and Pana's Sanctuary»

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

- ◆ **Μόσιαλος Δημήτρης (επιβλέπων):** Επίκουρος Καθηγητής
Βιοτεχνολογίας Μικροβίων του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας
του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

- ◆ **Μαρκουλάτος Παναγιώτης:** Καθηγητής Εφαρμοσμένης
Μικροβιολογίας με έμφαση στη Βιοτεχνολογία του Τμήματος
Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

- ◆ **Καρπούζας Δημήτρης:** Επίκουρος Καθηγητής Περιβαλλοντικής
Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας του Τμήματος Βιοχημείας &
Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Μικροβιολογίας-Ιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, υπό την επίβλεψη του επίκουρου καθηγητή κ. Μόσιαλου Δημήτρη.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Μόσιαλο Δημήτρη για την επιλογή του θέματος, καθώς μου έδωσε την ευκαιρία να ασχοληθώ με δύο από τα αγαπημένα μου αντικείμενα, την τέχνη και την μικροβιολογία. Είμαι ευγνώμων για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής αυτής εργασίας και γιατί η επιστημονική του κατάρτιση και οι συμβουλές του αποτελούν πλέον τα εφόδιά μου στον επιστημονικό στίβο.

Θα ήθελα επίσης να εκφράσω τις θερμές ευχαριστίες μου στα υπόλοιπα μέλη της συμβουλευτικής επιτροπής, κύριο Μαρκουλάτο Παναγιώτη, καθηγητή του Π.Θ. και κύριο Καρπούζα Δημήτριο, επίκουρο Καθηγητή του Π.Θ., αλλά και σε όλους τους διδάσκοντες του παρόντος μεταπτυχιακού προγράμματος καθώς αποτελούν πρότυπα πνευματικών ανθρώπων.

Δεν θα μπορούσα να ξεχάσω το προσωπικό του εργαστηρίου ιολογίας και μικροβιολογίας, για την πολύτιμη βοήθειά τους στην υλοποίηση του πειράματος και ιδιαίτερες ευχαριστίες προς στην υποψήφια διδάκτωρ, βιοχημικό-βιοτεχνολόγο Νικολούλη Κατερίνα, για την ανιδιοτελή βοήθεια που μου παρείχε στις καθημερινές δυσκολίες που προέκυπταν στον εργαστηριακό χώρο, καθώς και την φιλική και άψογη συνεργασία μας όλους αυτούς τους μήνες.

Από τα βάθη της καρδιάς μου, θα ήθελα να ευχαριστήσω στον σύντροφο της ζωής μου Δημήτρη, για την αμέριστη υποστήριξή του σε κάθε μου βήμα. Δικαιωματικά όμως, τις θερμότερες ευχαριστίες μου τις χρωστάω στην οικογένειά μου για την ανεξάντλητη υπομονή τους και την ευκαιρία που μου έδωσαν να ακολουθήσω το ποτάμι των γνώσεων σε δύσκολες οικονομικά συγκυρίες. Χωρίς την ηθική, συναισθηματική, αλλά και οικονομική τους στήριξη δεν θα τα είχα καταφέρει σε όλη την φοιτητική μου πορεία.

*Στην οικογένειά μου,
Σταμάτη, Κρυσταλλία
και Φρατζέσκα
Στον Δημήτρη μου
Στην κυρία Νίκη*

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

| | |
|---|----|
| ΠΕΡΙΛΗΨΗ | 13 |
| ABSTRACT | 15 |
| 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ | 17 |
| 1.1 Η πολιτιστική κληρονομιά βρίσκεται σε κίνδυνο | 17 |
| 1.2 Εισαγωγή στην έννοια της βιοαλλοίωσης | 19 |
| 1.2.1 Ορισμός της βιοαλλοίωσης | 19 |
| 1.2.2 Ταξινόμηση της βιοαλλοίωσης | 19 |
| 1.2.3 Υλικά που υφίστανται βιοαλλοίωση | 20 |
| 1.3 Μικροβιακή Ποικιλότητα | 21 |
| 1.4 Βιοαλλοίωση τοιχογραφιών | 22 |
| 1.5 Τα βακτήρια ως παράγοντες βιοαλλοίωσης των τοιχογραφιών | 24 |
| 1.6 Συνήθεις μέθοδοι χαρακτηρισμού της βακτηριακής χλωρίδας που σχετίζεται με την εμφάνιση βιοαλλοίωσης | 28 |
| 2. ΣΚΟΠΟΣ | 33 |
| 3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ | 34 |
| 3.1 Μνημεία | 34 |
| 3.1.1 Κρήνη της Καλλιρρόης της Πινύκας | 35 |
| 3.1.2 Ιερό του Πανός | 37 |
| 3.2 Δειγματοληψία | 39 |
| 3.3 Καλλιέργεια βακτηρίων | 43 |
| 3.3.1 Υγρές και στερεές καλλιέργειες | 43 |
| 3.3.2 Stock γλυκερόλης | 43 |
| 3.4 Μοριακή ταυτοποίηση καλλιεργήσιμων βακτηρίων | 44 |
| 3.4.1 Απομόνωση βακτηριακού DNA | 44 |
| 3.4.1.1 Απομόνωση βακτηριακού DNA με in house πρωτόκολλο | 45 |
| 3.4.1.2 Απομόνωση βακτηριακού DNA με τη χρήση εμπορικού kit | 45 |
| 3.4.2 Προσδιορισμός συγκέντρωσης DNA με φασματοφωτομέτρηση | 45 |

| | |
|--|----|
| 3.4.3 Ενίσχυση του 16S rRNA γονιδίου των καλλιεργήσιμων βακτηρίων με PCR. | 46 |
| 3.4.4 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 0.8% w/v..... | 47 |
| 3.4.5 Καθαρισμός των προϊόντων PCR..... | 47 |
| 3.4.6 Αλληλούχιση και ανάλυση των αλληλουχιών με προγράμματα | |
| Βιοπληροφορικής..... | 47 |
| 3.5 Μοριακή ταυτοποίηση βακτηρίων μέσω DNA προερχόμενο απευθείας από τις τοιχογραφίες..... | 48 |
| 3.5.1 Απομόνωση DNA από νιφάδες προερχόμενες απευθείας από τις τοιχογραφίες..... | 48 |
| 3.5.2 Ενίσχυση του βακτηριακού <i>16S rRNA</i> γονιδίου του ολικού DNA που απομονώθηκε απευθείας από τις νιφάδες των τοιχογραφιών με Gradient PCR..... | 49 |
| 3.5.3 Καθαρισμός των προϊόντων της PCR..... | 51 |
| 3.5.4 Κλωνοποίηση των PCR προϊόντων..... | 51 |
| 3.5.4.1 Αντίδραση λιγάσης με τον pGEM-T easy vector..... | 51 |
| 3.5.4.2 Μετασχηματισμός κυττάρων <i>E. coli</i> JM109 με τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια..... | 54 |
| 3.5.4.2.A Τα στάδια του μετασχηματισμού..... | 54 |
| 3.5.4.2.B Προετοιμασία Δεκτικών Κυττάρων <i>E. coli</i> στέλεχος JM109..... | 55 |
| 3.5.4.2.Γ Προετοιμασία τρυβλίων Petri με LB άγαρ, Αμπικιλίνη, IPTG και X-gal..... | 57 |
| 3.5.4.2.Δ Έλεγχος Αποικιών..... | 57 |
| 3.5.4.3 Επιβεβαίωση θετικών κλώνων μετά την κλωνοποίηση..... | 58 |
| 3.5.4.3.A Επιβεβαίωση με PCR..... | 58 |
| 3.5.4.3.B Επιβεβαίωση με πέψη με ένζυμο περιορισμού..... | 59 |
| 3.5.5 Κατασκευή <i>16S rRNA</i> βιβλιοθηκών..... | 60 |
| 3.5.6 Αλληλούχιση κλώνων <i>16S rRNA</i> βιβλιοθηκών..... | 61 |
| 3.5.7 Φυλογενετική ανάλυση κλώνων με εργαλεία βιοπληροφορικής..... | 61 |
| 3.5.7.1 Επεξεργασία αλληλουχιών..... | 61 |
| 3.5.7.2 Bellerophon..... | 61 |
| 3.5.7.3 Ribosomal Database Project (RDP)..... | 62 |
| 3.5.7.4 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)..... | 63 |

| | |
|---|-----------|
| 4. | |
| ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ..... | 64 |
| 4.1 Ανάλυση των αποτελεσμάτων των καλλιιεργήσιμων βακτηρίων..... | 64 |
| 4.1.1 Ενίσχυση του 16S rRNA γονιδίου με PCR και καθαρισμός των προϊόντων της PCR..... | 64 |
| 4.1.2 Ανάλυση των αλληλουχιών με προγράμματα Βιοπληροφορικής..... | 65 |
| 4.2 Ανάλυση των αποτελεσμάτων της μεταγενωμικής προσέγγισης..... | 75 |
| 4.2.1 Ενίσχυση του 16S rRNA γονιδίου του ολικού DNA που απομονώθηκε απευθείας από τις νιφάδες των τοιχογραφιών με Gradient PCR και καθαρισμός των προϊόντων της Gradient PCR..... | 75 |
| 4.2.2 Κλωνοποίηση των προϊόντων της Gradient PCR..... | 77 |
| 4.2.3 Φυλογενετική ανάλυση των κλώνων με εργαλεία βιοπληροφορικής..... | 78 |
| 4.2.3.1 Επεξεργασία αλληλουχιών της βακτηριακής 16S rRNA βιβλιοθήκης..... | 78 |
| 4.2.3.2 Bellerophon..... | 78 |
| 4.2.3.3 RDP και BLAST..... | 80 |
| 4.2.3.3.A Ανάλυση αλληλουχιών από την Κρήνη της Καλλιρόης της Πνύκας..... | 80 |
| 4.2.3.3.B Ανάλυση αλληλουχιών από το Ιερό του Πανός..... | 86 |
| 5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ..... | 91 |
| ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ..... | 99 |

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σε όλο τον κόσμο, ιστορικές τοιχογραφίες που εντοπίζονται σε ποικίλα περιβάλλοντα (εσωτερικού και εξωτερικού χώρου), υφίστανται βιοαλλοίωση από διάφορους μικροοργανισμούς. Βακτήρια, μήκυτες, άλγη, λειχήνες, καθώς και αρχαία έχουν ενοχοποιηθεί για διάφορους τύπους βλάβης στις χρωματισμένες επιφάνειες, οδηγώντας στην υποβάθμιση ή την καταστροφή του έργου τέχνης.

Οι ιστορικές τοιχογραφίες αποτελούν αναπόσπαστο τμήμα των μνημείων, στα οποία εντοπίζονται και κατά συνέπεια η φθορά τους συνιστά την απώλεια ενός σημαντικού μέρους της παγκόσμιας πολιτιστικής κληρονομιάς. Για την προστασία των ιστορικών τοιχογραφιών κρίνεται αναγκαίος ο πλήρης καθορισμός της μικροβιακής χλωρίδας, ώστε να σχεδιαστεί η κατάλληλη στρατηγική συντήρησης. Για τον λόγο αυτό, για πρώτη φορά στον Ελλαδικό χώρο έγινε μια προσπάθεια χαρακτηρισμού της βακτηριακής χλωρίδας τοιχογραφιών από δύο αρχαία μνημεία, την Κρήνη της Καλλιρόης της Πνύκας και το Ιερό του Πανός.

Η ταυτοποίηση τόσο των καλλιεργήσιμων βακτηρίων που αναπτύχθηκαν σε κατάλληλα θρεπτικά υποστρώματα, όσο και των βακτηρίων που εντοπίστηκαν μέσω μεταγονιδιωματικής προσέγγισης, πραγματοποιήθηκε με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR), ενισχύοντας το *16S rRNA* γονίδιο με τη χρήση ειδικών εκκινητών και μελετώντας την αλληλουχία του γονιδίου μέσω προγραμμάτων βιοπληροφορικής.

Μετά το πέρας των αναλύσεων, το *RDP classifier* κατέδειξε συνολικά είκοσι διαφορετικά βακτηριακά γένη, εκ των οποίων τα γένη *Euzeuya sp.*, *Haliangium sp.*, *Novosphingobium sp.*, *Gracilimonas sp.*, *Phycisphaera sp.*, *Gematimonas sp.*, *Hymenobacter sp.*, *Brevundimonas sp.*, *Propionibacterium sp.*, και *GpI* δεν έχουν εντοπιστεί ξανά σε ιστορικές τοιχογραφίες. Επιπλέον, ταυτοποιήθηκαν δεκαεπτά διαφορετικά βακτηριακά είδη, εκ των οποίων τα είδη *Massilia timonae*, *Cohnella formosensis*, *Kluyvera intermedia*, *Phenylobacterium composti* και *Cupriavidus metalidurans* επίσης δεν έχουν εντοπιστεί ξανά σε ιστορικές τοιχογραφίες. Επίσης, δύο κλώνοι σχετίζονται με δύο υπονήφια φύλλα (*candidate phylum*), τα οποία για πρώτη φορά εντοπίζονται σε τοιχογραφίες και δύο βακτήρια δεν μπόρεσαν να ταυτοποιηθούν με κανένα άλλο γνωστό εξελικτικό συγγενή. Τέλος, ταυτοποιήθηκαν και τρία βακτηριακά είδη (*Bacillus decolorationis*, *Bacillus herbersteinensis*, *Arthrobacter casteli*) που έχουν απομονωθεί αποκλειστικά από τοιχογραφίες.

ABSTRACT

All around the world, historic mural paintings are found in a variety of environments (indoor and outdoor), suffering from biodeterioration caused by various microorganisms. Bacteria, fungi, algae, lichens and archaia may result in structural and/or aesthetic deterioration of the artwork.

The historic murals are an integral part of the monuments and their deterioration constitutes the loss of a significant part of world cultural heritage. It is now well established that the identification of the whole microbial diversity present on painting surfaces is an essential requirement for the rational design of prevention and restoration strategies. For this reason and for the first time in Greece was made an attempt to characterize the bacterial flora from wall paintings of two ancient monuments, the Kalliroi's Fountain and the Pana's Sanctuary.

The identification of culturable bacteria were grown in appropriate nutrient media and also the bacteria identified through metagenomics relied on the technique of polymerase chain reaction (PCR), enhancing the 16S rRNA gene using specific primers and by examining the sequence through bioinformatics programs.

After the analysis, there were identified twenty different bacterial genera of which, *Euzedya* sp., *Haliangium* sp., *Novosphingobium* sp., *Gracilimonas* sp., *Phycisphaera* sp., *Gematimonas* sp., *Hymenobacter* sp., *Brevundimonas* sp. *Propionibacterium* sp. and GpI have never been detected in historical paintings. Likewise, there were identified eighteen different bacterial species, of which *Massilia timonae*, *Cohnella formosensis*, *Kluyvera intermedia*, *Phenylobacterium composti* and *Cupriavidus metalidurans* have also never been detected again on historical wall paintings. Two bacterial clones affiliated with two different candidate phylum and this was an unexpected result. Moreover, two bacteria clones shared no similarity to any known sequence. Finally, there were identified three bacterial species (*Bacillus decolorationis*, *Bacillus herbersteinensis*, *Arthrobacter casteli*) isolated exclusively from wall paintings.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Η πολιτιστική κληρονομιά βρίσκεται σε κίνδυνο

Ο άνθρωπος στην προσπάθειά του να επιβιώσει σε έναν τόπο, δημιουργεί έργα ανάλογης ποιοτικής στάθμης με το πολιτιστικό επίπεδο στο οποίο βρίσκεται. Πολλά από τα ίχνη αυτής της δημιουργίας διατηρούνται και μετά το πέρασμά του, συνιστώντας την παρακαταθήκη του για τις επόμενες γενιές.

Ο όρος "πολιτιστική κληρονομιά" αναφέρεται στο απόθεμα προϊόντων της τέχνης που έχει προκύψει στην πορεία της ιστορίας και τα οποία αποτελούν υλικά μέρη του πολιτισμού του κάθε λαού. Ο όρος αποδόθηκε το 1972, στο γενικό συνέδριο που διεξήγαγε ο Οργανισμός της Εκπαίδευσης, της Επιστήμης και του Πολιτισμού των Ενωμένων Εθνών (UNESCO, United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization). Ως πολιτιστική κληρονομιά ορίστηκαν τα μνημεία, οι ομάδες οικοδομημάτων και οι τοποθεσίες όπου αυτά εντοπίζονται. Με τον όρο μνημεία γίνεται αναφορά σε έργα αρχιτεκτονικής, έργα μνημειώδους γλυπτικής και ζωγραφικής, στοιχεία ή κατασκευές αρχαιολογικής φύσεως, επιγραφές που είναι καθολικής αξίας από την οπτική της τέχνης, της ιστορίας και της επιστήμης. Μετά το 1972, ο όρος "πολιτιστική κληρονομιά" επεκτάθηκε και καλύπτει εκτός από μνημειακά αντικείμενα και κινητά αντικείμενα, όπως συλλογές μουσείων, έργα τέχνης και κινητά αρχαιολογικά ευρήματα. (Jokilehto, 1999)

Η πολιτιστική κληρονομιά ωστόσο, βρίσκεται σε κίνδυνο. Η φθορά των υλικών, που απαρτίζουν τα πολιτιστικής αξίας αντικείμενα, είναι το αποτέλεσμα διαφορετικών φυσικών, χημικών και βιολογικών επιδράσεων. Η διαδικασία της αλλοίωσης από εξωτερικούς περιβαλλοντικούς παράγοντες είναι μία πολύπλοκη αλληλεπίδραση του κλίματος, των τοπικών μετεωρολογικών χαρακτηριστικών, των βιολογικών διαδικασιών και συχνά, πολύπλοκων χημικών διαδικασιών που προκύπτουν από την επίδραση ρύπων και φυσικών συστατικών του περιβάλλοντος χώρου (Koch *et al.*, 2001).

Στους φυσικούς παράγοντες περιλαμβάνονται η υγρασία, η θερμοκρασία, η ηλιακή ακτινοβολία, η κίνηση και πίεση του αέρα, οι κατακρημνίσεις, οι χημικές και βιοχημικές αντιδράσεις. Οι φυσικοί παράγοντες σε συνδυασμό με τους βιομηχανικούς, αγροτικούς και αστικούς ρύπους επάγουν την αλλοίωση των υλικών. Οι μετεωρολογικές συνθήκες επηρεάζουν τις διαδικασίες μεταφοράς, μετασχηματισμού, διασποράς και εναπόθεσης των ρύπων. Από την πλευρά τους, οι

κύκλοι των ρύπων μπορούν να επηρεάσουν τις φυσικές διαδικασίες στην ατμόσφαιρα. Οι αυξανόμενες συγκεντρώσεις διοξειδίου του άνθρακα (CO₂) και άλλων αερίων στην ατμόσφαιρα αλλάζουν τη χημεία του αέρα και επηρεάζουν τις χημικές αντιδράσεις στην επιφάνεια των αντικειμένων. Οι εκπομπές CO₂ μεταβάλλουν τη θερμοκρασία μέσω του φαινομένου του θερμοκηπίου και έτσι, επιταχύνονται οι αντιδράσεις και προκαλούνται χημικές αλλαγές στις επιφάνειες των υλικών. Διαμέσου ατελούς καύσης απελευθερώνεται στην ατμόσφαιρα διοξείδιο του θείου (SO₂), το οποίο ευθύνεται για τη δημιουργία του φαινομένου της όξινης βροχής. Η όξινη βροχή προκαλεί διάβρωση, αποσάθρωση των υλικών ενώ επιδρά και στις υαλογραφίες, αποχρωματίζοντας και θαμπώνοντας το γυαλί. (Camuffo, 1986 , 1992 , 1994; McNamara and Mitchell, 2005)

Τα χαρακτηριστικά και οι ιδιότητες των υλικών (υφή της επιφάνειας, το πορώδες αν πρόκειται για πέτρα, οι επιφανειακοί ηλεκτρολύτες αν πρόκειται για μέταλλο κ.ό.κ.) είναι τόσο σημαντικά όσο και οι περιβαλλοντικοί παράγοντες στη διαδικασία της φθοράς και στην επέκτασή της. Η επέκταση της φθοράς εξαρτάται από την ποιότητα της πρωτογενούς ύλης και από τον τρόπο χειρισμού της για την κατασκευή του τελικού αντικειμένου. Σχετίζεται επίσης, με τον τρόπο διατήρησης και συντήρησης του τελικού αντικειμένου και με τον τρόπο που αυτό χρησιμοποιείται (Koch *et al.*, 2001 ; Camuffo, 1986 ; 1992 ; 1994).

Επιπλέον, αρκετά αντικείμενα πολιτιστικής κληρονομιάς και οικονομικής σημασίας αντιμετωπίζουν τον κίνδυνο της βιοαλλοίωσης, μια ανεπιθύμητη διαδικασία η οποία είναι αποτέλεσμα της παρουσίας και της δράσης ζωντανών οργανισμών (Rojas *et al.*, 2009). Παρά το γεγονός ότι η ατμοσφαιρική ρύπανση αναγνωρίζεται ως σημαντικός παράγοντας της αλλοίωσης της πολιτιστικής περιουσίας, ο τομέας της βιοαλλοίωσης χρίζει πλέον περισσότερης προσοχής και έρευνας, μιας και μέσα από μελέτες έχει καταγραφεί σπουδαία ποικιλία οργανισμών που εντοπίζονται στα μνημεία και περιλαμβάνει γένη βακτηρίων, μυκήτων, αλγών, λειχήνων, βρύων και φυτών (Saiz-Jimenez, 1994, 2001; Tiano, 1994, 1998).

Η γνώση της επίδρασης του φυσικού περιβάλλοντος, των βιολογικών παραγόντων, των ανθρωπογενών ρύπων και των χαρακτηριστικών του υλικού είναι σημαντική για την καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών που προκαλούν φθορά, καθώς και τη βέλτιστη επιλογή υλικών ενώ, αποτελεί επίσης, τη βάση για την επιλογή κατάλληλων μεθόδων προστασίας και διατήρησης.

1.2 Εισαγωγή στην έννοια της βιοαλλοίωσης

1.2.1 Ορισμός της βιοαλλοίωσης

Η αλλοίωση περιγράφεται ως η αλλαγή της κατάστασης οποιουδήποτε υλικού από την αρχική του μορφή, που προκαλείται από αλληλεπιδράσεις μεταξύ του αντικειμένου και των εξωτερικών παραγόντων. Έχει πολλές διαστάσεις και εξαρτάται, μεταξύ άλλων, από τον τύπο της δομής, τα συστατικά στοιχεία, τα λειτουργικά χαρακτηριστικά του αντικειμένου και τις περιβαλλοντικές συνθήκες. Ένας ευρέως αποδεκτός ορισμός της βιοαλλοίωσης προτάθηκε από τον Hueck το 1968: *«κάθε μη επιθυμητή αλλαγή στις ιδιότητες ενός υλικού που προκαλείται από τις ζωτικές δραστηριότητες των οργανισμών»*. Ομοίως, ο Rose, το 1981, ορίζει τη βιοαλλοίωση ως τη διαδικασία μέσω της οποίας *«βιολογικοί παράγοντες, δηλαδή ζωντανοί οργανισμοί, είναι η αιτία της μείωσης στην ποιότητα ή στην αξία»*.

Είναι σημαντικό να γίνει διάκριση μεταξύ της βιολογικής καταστροφής - βιοαλλοίωσης (biodeterioration) και της βιοαποικοδόμησης (biodegradation) καθώς οι δύο όροι μπορεί να χρησιμοποιηθούν ως ισοδύναμοι. Σύμφωνα με τους Allsopp *et al.*, η βιοαποικοδόμηση σχετίζεται με τη χρήση των μικροοργανισμών στην τροποποίηση των υλικών με θετικό ή ωφέλιμο σκοπό ενώ η βιολογική καταστροφή - βιοαλλοίωση αφορά στην αρνητική επίδραση των δραστηριοτήτων των ζωντανών οργανισμών. (Allsopp *et al.*, 2006)

Οι πιο κοινοί ζωντανοί οργανισμοί που ευθύνονται για τη βιοαλλοίωση είναι οι θαλάσσιοι μικροοργανισμοί, τα έντομα όπως τερμίτες, οι μύκητες (soft rots, white and brown rots), τα άλγη, οι λειχήνες και τα βακτήρια.

1.2.2 Ταξινόμηση της βιοαλλοίωσης

Σύμφωνα με τους Gaylarde *et al.* (Gaylarde *et al.*, 2003) η βιοαλλοίωση μπορεί να ταξινομηθεί σε:

- ➔ Φυσική ή μηχανική
- ➔ Αισθητική
- ➔ Χημική

Η φυσική ή μηχανική βιοαλλοίωση αναφέρεται σε όλες τις δραστηριότητες που άμεσα επηρεάζουν τα υλικά συστατικά και τις μηχανικές ιδιότητες. Αυτό συχνά σχετίζεται με τη διαδικασία μέσω της οποίας οι ζωντανοί οργανισμοί διαταράσσουν

τη δομή, λόγω της ανάπτυξης τους ή της κίνησης τους, αλλά δε χρησιμοποιούν τα υλικά ως θρεπτική πηγή.

Η αισθητική βιοαλλοίωση προκαλείται από την παρουσία των οργανισμών, των νεκρών τους σωμάτων, των απεκκρίσεων ή των μεταβολικών τους προϊόντων σχηματίζοντας ένα μικροβιακό στρώμα στην επιφάνεια της δομής, το βιοφίλμ. Η παρουσία των μικροοργανισμών δεν επηρεάζει τη λειτουργία του υλικού αλλά μόνο την αισθητική του εμφάνιση.

Τέλος, η χημική βιοαλλοίωση μπορεί να διαιρεθεί σε δύο περιπτώσεις. Στην πρώτη περίπτωση, οι οργανισμοί χρησιμοποιούν τα δομικά συστατικά ως θρεπτική πηγή, πηγή άνθρακα και/ή πηγή ενέργειας τροποποιώντας με αυτό τον τρόπο τις ιδιότητες των υλικών. Στη δεύτερη περίπτωση, οι ζωντανοί οργανισμοί απεκκρίνουν τα προϊόντα – απόβλητα τους ή άλλες ουσίες (όπως H_2S , FeS) και επηρεάζουν αρνητικά τα υλικά.

Ενδεικτικά, τα βακτήρια που αναπτύσσονται στην επιφάνεια ενός έργου τέχνης όπως μια τοιχογραφία, είναι ικανά να προκαλέσουν τον αποχρωματισμό της, όχι μόνο λόγω της παρουσίας τους αλλά και της εναπόθεσης των μεταβολικών προϊόντων τους (Warscheid and Braams, 2000; Imperi *et al.*, 2007)

1.2.3 Υλικά που υφίστανται βιοαλλοίωση

Στα υλικά που αποτελούν αντικείμενο βιοαλλοίωσης συμπεριλαμβάνονται (Griffin *et al.*, 1991; Bock and Sand, 1993; Cifferi, 1999; Bousher *et al.*, 1995; Allsopp *et al.*, 2006; Koestler *et al.*, 2003):

- Αποθηκευμένα γεωργικά προϊόντα
- Φάρμακα και καλλυντικά
- Πολυμερή, λάστιχα και πλαστικά
- Γυαλί
- Ξύλο
- Αρχαικό υλικό
- Χαρτοπολτός
- Περγαμηνές
- Δέρματα και Κλωστοϋφαντουργικά προϊόντα
- Καύσιμα και Λιπαντικά
- Μέταλλα
- Χρώματα και ζωγραφισμένες επιφάνειες
- Πέτρα, σκυρόδεμα, υλικά τοιχοποιίας και κτήρια
- Κόλλες και στεγανωτικά υλικά

Η γενετική και μεταβολική ποικιλότητα των μικροοργανισμών καθώς και η ικανότητά τους να σχηματίζουν βιοφίλμ είναι δύο παράγοντες που εξηγούν την ικανότητα τους να προκαλούν βιοαλλοίωση στα προαναφερθέντα υλικά.

1.3 Μικροβιακή Ποικιλότητα

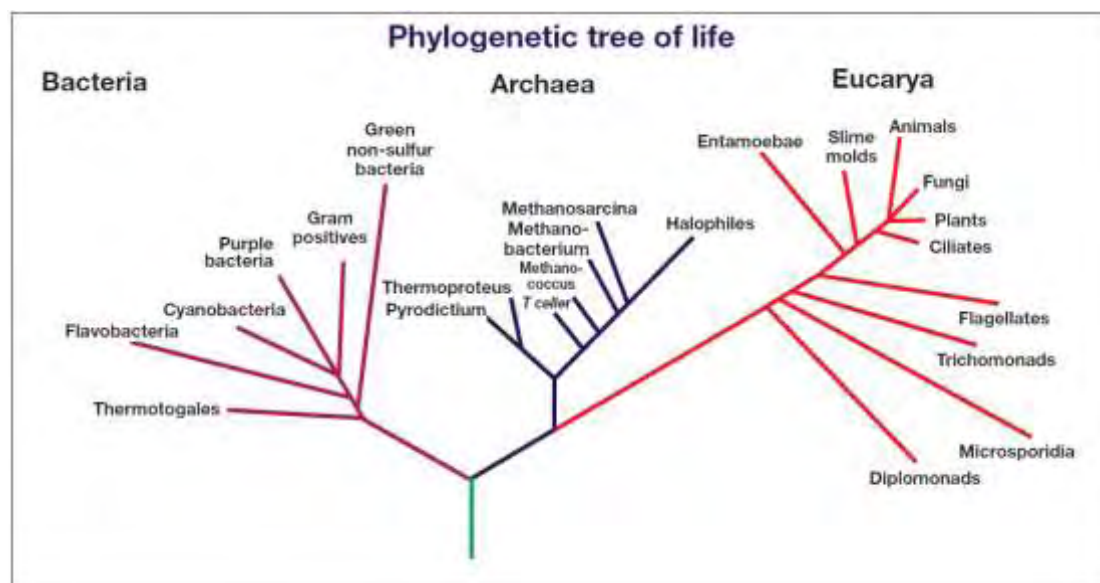
Το μεγαλύτερο μέρος της βιοποικιλότητας και βιομάζας στον πλανήτη είναι μικροβιακό (Hammond, 1995; Whitman *et al.*, 1998). Οι φυτικοί και ζωικοί οργανισμοί αποτελούν ελάχιστα μόνο από τα κλαδιά στο δέντρο της ζωής [Εικόνα 1]. Σύμφωνα με μελέτη των Ward *et al.* (1990) πάνω από το 80% των μικροοργανισμών του πλανήτη δεν έχει ακόμα ανακαλυφθεί. Τα στοιχεία αυτά εγείρουν ερωτήματα όπως, αν και κατά πόσο γνωρίζουμε τελικά την ποικιλότητα του βιόκοσμου της Γής και το βιοχημικό δυναμικό της. Με την χρήση των κλασικών μεθόδων, το ποσοστό των εργαστηριακά καλλιεργήσιμων μικροοργανισμών είναι κάτω από 1% και η ποικιλότητα που αντικατοπτρίζει αυτό το ποσοστό, υποεκτιμά κατά πολύ την ποικιλότητα των μικροοργανισμών στη φύση (Pace, 1996).

Η ποικιλότητα των μικροοργανισμών σχετίζεται όχι μόνο με την μορφολογία αλλά κυρίως με τον μεταβολισμό (π.χ Χημειοτρόφοι-Φωτοτρόφοι μικροοργανισμοί). Οι φυτικοί και ζωικοί οργανισμοί χρησιμοποιούν τον ήλιο ή οργανικό άνθρακα ως πηγές ενέργειας και το οξυγόνο ως δέκτη ηλεκτρονίων. Οι μικροοργανισμοί είναι ικανοί να χρησιμοποιούν πολλούς άλλους δότες και δέκτες ηλεκτρονίων όπως ο σίδηρος, το μαγνήσιο αλλά και ενώσεις του θείου και του αζώτου, γεγονός που τους επιτρέπει να αναπτύσσονται σε ενδιαιτήματα που δεν είναι ιδιαίτερα προσφιλή σε άλλους οργανισμούς.

Η ποικιλότητα των μικροσκοπικών μορφών ζωής σε συνδυασμό με την ικανότητά τους να επιβιώνουν σε διάφορες περιβαλλοντικές συνθήκες χρησιμοποιώντας ποικίλες πηγές ενέργειας, ευνοεί την ικανότητα τους να προκαλούν βιοαλλοίωση. Για παράδειγμα η παραγωγή οξέος από νιτροποιητικά βακτήρια (βακτήρια που αναπτύσσονται με την κατανάλωση ανόργανων ενώσεων του αζώτου), προκαλεί φθορά σε πέτρινα αντικείμενα. (Sand and Bock, 1991)

Αν λάβουμε υπόψη μας τα παραπάνω στοιχεία, από την οπτική γωνία της βιοαλλοίωσης, θα γίνει εύκολα κατανοητό ότι οι γνώσεις μας για την ποικιλία των βακτηρίων που εμπλέκονται στο φαινόμενο αυτό και τους μηχανισμούς που διέπουν την όλη διαδικασία, είναι λιγοστές. Το κενό αυτό προσπαθεί να καλύψει η

επιστημονική κοινότητα, με νέες μεθόδους που υπόσχονται να ανοίξουν ένα μεγαλύτερο παράθυρο στον πλούσιο μικροβιόκοσμο του πλανήτη μας και κάποιες από αυτές θα αναφερθούν σε επόμενο κεφάλαιο.



Εικόνα 1. Φυλογενετικό δέντρο, δείχνει τις τρεις επικράτειες των ζωντανών οργανισμών: Βακτήρια, Αρχαία, Ευκαρυώτες. (Woese, 1994)

1.4 Βιοαλλοίωση τοιχογραφιών

Είναι ευρέως γνωστό ότι οι τοιχογραφίες μπορεί να αλλοιωθούν από την παρουσία μικροοργανισμών, όπως βακτήρια, μύκητες, άλγη και λειχήνες. Αυτή η γνώση προέκυψε από αρκετές μελέτες στις οποίες οι επιστήμονες προσπαθούσαν να συνδέσουν την παρατηρηθείσα ζημιά, με την παρούσα μικροβιακή κοινότητα. Το ενδιαφέρον αυτό γεννήθηκε από την κοινή παραδοχή, πως οι ιστορικές τοιχογραφίες είναι αναπόσπαστα τμήματα των μνημείων στα οποία εντοπίζονται και η υποβάθμιση τους επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό τον πλούτο της παγκόσμια πολιτιστικής κληρονομιάς.

Η ανάπτυξη των μικροοργανισμών στις τοιχογραφίες, προκαλεί κυρίως δύο τύπους βλάβης την αισθητική και την δομική. Η αισθητική βλάβη αφορά τον αποχρωματισμό της χρωστικής, τους λεκέδες και το σχηματισμό ενός βιοφίλμ στη βαμμένη επιφάνεια. Ως δομική βλάβη χαρακτηρίζεται οι ρωγμές και η αποσύνθεση του στρώματος βαφής, ο σχηματισμός φυσαλίδων βαφής και αποικοδόμηση της κόλλας ή των συνδετικών μέσων, που οδηγεί σε αποκόλληση του στρώματος βαφής από το υπόστρωμα. Οι δύο μορφές βλάβης είναι στενά συνδεδεμένες, η δομική

βλάβη επηρεάζει βαθιά την αισθητική ποιότητα της ζωγραφικής και η αισθητική βλάβη μπορεί να προμηγνύει σοβαρές δομικές βλάβες (Ciferri, 1999).

Οι αιτίες που οδηγούν των αποικισμό των τοιχογραφιών από μικροοργανισμούς (βακτήρια, μύκητες, άλγη και λειχήνες) είναι ποικίλες. Η ανάπτυξη των μικροοργανισμών σε ένα μικροπεριβάλλον, όπως ένα έργο τέχνης, επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες που σχετίζονται με τις περιβαλλοντικές συνθήκες, καθώς και με τις ιδιότητες του υλικού στο οποίο αναπτύσσονται. Οι περιβαλλοντικές συνθήκες αφορούν, την σχετική υγρασία του χώρου, τις διακυμάνσεις της θερμοκρασίας, το φως, την συγκέντρωση του οξυγόνου και του διοξειδίου του άνθρακα στην ατμόσφαιρα (ατμοσφαιρική ρύπανση), ενώ οι ιδιότητες του υλικού αφορούν την φύση του, τις ιδιότητες της επιφάνειάς του, την περιεκτικότητά του σε οργανικά και ανόργανα συστατικά και το pH (Garg *et al.*, 1995; Ciferri, 1999; Valentin, 2003; Pangallo *et al.*, 2009).

Ο συνδυασμός των παραπάνω παραγόντων είναι καταλυτικός για την εμφάνιση του φαινομένου της βιοαλλοίωσης σε ιστορικές τοιχογραφίες, καθώς μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη συγκεκριμένων μικροοργανισμών, η δραστηριότητα των οποίων είναι ικανή να επιδεινώσει τις βλάβες που έχουν προκληθεί από τη φυσιολογική φθορά του χρόνου (Ciferri, 1999; Sterflinger and Guadalupe, 2013). Σε προηγούμενες μελέτες αλλοιωμένων τοιχογραφιών στην περιοχή της πόλης Ματέρα (περιοχή παγκόσμιας πολιτιστικής κληρονομιάς της UNESCO) στην βόρεια Ιταλία, αποδείχθηκε η συνεισφορά σχεδόν όλων των παραπάνω παραγόντων στην επίτευξη της βιοαλλοίωσης. Η υγρασία, το ηλιακό φως αλλά και η βραχώδεις επιφάνειες στις οποίες εντοπίστηκαν οι αλλοιωμένες τοιχογραφίες, δημιούργησαν τις ιδανικές συνθήκες για την ραγδαία και πυκνή ανάπτυξη φωτοαυτότροφης μικροχλωρίδας πάνω στη χρωματισμένη επιφάνεια (Pietrini and Ricci, 1993; Pietrini *et al.*, 2008; Roccardi *et al.*, 2008).

Οι μικροοργανισμοί που αναπτύσσονται σε μια τοιχογραφία, ιδίως αν πρόκειται για ετερότροφα βακτήρια ή μύκητες, συνήθως προμηθεύονται τα απαραίτητα οργανικά θρεπτικά συστατικά από μεταβολίτες αυτότροφων βακτηρίων, από την παρουσία νερού στον χώρο, από κόπρανα ζώων και αρθρόποδων, από αερομεταφερόμενη διασπορά οργανικών στοιχείων, αλλά και από ενώσεις στο ίδιο το στρώμα βαφής. Οι χρωστικές που χρησιμοποιήθηκαν για την δημιουργία ιστορικών τοιχογραφιών, συνήθως είχαν διαλυθεί σε νερό ή λάδι και εφαρμόστηκαν σε συνδυασμό με οργανικά συνδετικά υλικά όπως καζεΐνη, κρόκο αυγού και το γάλα

(τεχνική fresco). Οργανικές ουσίες μπορούν επίσης να καταστούν διαθέσιμες μετά από διαδικασίες συντήρησης αλλοιωμένων τοιχογραφιών, λόγω της χρήσης διάφορων φυσικών ή συνθετικών κολλών και υλικών στερέωσης (Ciferri, 1999; Casadio *et al.*, 2004; Rosi *et al.*, 2009).

Μέσα από μελέτες, έγινε γνωστό ότι τα ετερότροφα βακτήρια χρησιμοποιούν οργανικές ενώσεις από τα στρώματα χρωμάτων ως θρεπτικά συστατικά, παράγοντας οξέα, τα οποία προκαλούν αποχρωματισμό του στρώματος βαφής ή αλλοίωση της συνοχής του χρώματος (Urzi` and Realini 1998; Urzi` *et al.*, 2001). Ενώ οι νηματώδεις μύκητες και ακτινομύκητες μπορούν να διεισδύσουν στα στρώμα της τοιχογραφίας και να προκαλέσουν τη δομική καταστροφή του αντικειμένου της πολιτιστικής κληρονομιάς (Berner *et al.*, 1997; Urzi` *et al.*, 2003).

Για την μικροβιακή αλλοίωση ιστορικών τοιχογραφιών, έχουν ενοχοποιηθεί και κάποια γένη αρχαίων όπως, το *Halococcus* και το *Nitrospumilus*, τα οποία εντοπίστηκαν σε αρχαίες αλλοιωμένες τοιχογραφίες που έφεραν ροδαλό αποχρωματισμό (Imperi *et al.*, 2007). Τέλος, υπάρχουν μελέτες που καταδεικνύουν την επαφή των αρθρώσεων με τις τοιχογραφίες ως σημαντικό παράγοντα επέκτασης και διασποράς της βιοαλλοίωσης. Βρέθηκε πως η εναπόθεση σφαιριδίων κοπράνων των αρθρώσεων αποτελούν πηγή οργανικών θρεπτικών ουσιών για τα ετερότροφα βακτήρια και μύκητες, συμβάλλοντας έτσι στην ανάπτυξή τους. Επιπλέον, βρέθηκε πως καθώς τα αρθρώματα εγγίζουν το βιοφίλμ που έχει σχηματιστεί στις χρωματισμένες επιφάνειες, συμβάλλουν στη διασπορά των μικροοργανισμών και σε υγιείς επιφάνειες (Gorbushina and Petersen, 2000).

1.5 Τα βακτήρια ως παράγοντες βιοαλλοίωσης των τοιχογραφιών

Τα βακτήρια είναι μικροσκοπικοί, μονοκύτταροι, προκαρυωτικοί οργανισμοί, που συναντώνται σε κάθε είδους βióτοπο και σε πολύ μεγάλες συγκεντρώσεις. Το φυλογενετικό δένδρο των βακτηρίων περιέχει μόνο 26 φύλλα καλλιεργούμενων αντιπροσώπων, από τα περίπου 52 φύλλα που γνωρίζουμε ότι υπάρχουν, αλλά δεν έχουν ακόμα καλλιεργηθεί (Rappe and Giovannoni, 2003).

Όπως αναφέρθηκε και σε προηγούμενη ενότητα, οι τοιχογραφίες ανάλογα με τη χημική σύσταση των στοιχείων που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη δημιουργία τους, αλλά και το υπόστρωμα στο οποίο εντοπίζονται, περιέχουν ένα ευρύ φάσμα οργανικών και ανόργανων συστατικών που μπορούν να αξιοποιηθούν από μια

μεγάλη ποικιλία βακτηρίων (Ciferri, 1999; Nugari *et al.*, 2009). Εξαιτίας λοιπόν, της πολύπλοκης χημικής σύνθεσης που χαρακτηρίζει τα ζωγραφισμένα ενδιαιτήματα, είναι πολύ δύσκολο να προβλέψουμε τις βακτηριακές κοινότητες που αναπτύσσονται σε αυτά, καθώς και να καταγράψουμε ένα σαφή μηχανισμό με τον οποίο τα βακτήρια συντελούν στην αλλοίωση των τοιχογραφιών. Στις επόμενες παραγράφους ωστόσο, μέσω της εκτενούς βιβλιογραφικής ανασκόπησης και την παρουσίαση συγκεκριμένων παραδειγμάτων, γίνεται μια προσπάθεια να παρουσιαστούν τα βακτήρια που εντοπίζονται συχνότερα σε βιοαλλοιωμένες ιστορικές τοιχογραφίες και η συσχέτισή τους με την δημιουργία της βλάβης, αλλά και κάποιοι από τους πιθανούς μηχανισμούς με τους οποίους συμβάλουν στο φαινόμενο της βιοαλλοίωσης.

Ανάλογα με τη σύνθεση της επιφάνειας, της τοιχογραφίας αλλά και με τις επικρατούσες περιβαλλοντικές συνθήκες, βρέθηκε ότι η μικροβιακή αλλοίωση επιτυγχάνεται μέσω διαφόρων μηχανισμών. Μεταξύ τους οι μηχανισμοί είναι άρρηκτα συνδεδεμένοι καθώς είτε θα λαμβάνουν χώρα παράλληλα, είτε ο ένας θα προκύπτει από τις επιπτώσεις του άλλου. Σύμφωνα με τον Ciferri τρεις είναι οι κύριοι μηχανισμοί (Ciferri, 2000). Ως πρώτος μηχανισμός προτείνεται, η ανάπτυξη ενός βακτηριακού βιοφίλμ στην επιφάνεια της τοιχογραφίας, που έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό λεκέδων, κηλίδων ή κρούστας, συχνά διαφορετικών χρωμάτων και οφείλονται στην παραγωγή ενδοκυτταρικών ή εξωκυτταρικών χρωστικών ουσιών.

Ο δεύτερος μηχανισμός αφορά την παραγωγή μεταβολιτών (συχνά όξινης φύσης) και εξωκυτταρικών ενζύμων που συμβάλλουν περαιτέρω στη χημική και αισθητική υποβάθμιση του έργου τέχνης. Επιπλέον, πολλοί από αυτούς τους μεταβολίτες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως υποστρώματα για την ανάπτυξη άλλων μικροοργανισμών, αυξάνοντας έτσι το «μικροβιακό φορτίο» του αντικειμένου.

Τέλος, ο τρίτος μηχανισμός αφορά τη διείσδυση των βακτηρίων σε ρωγμές των χρωματικών στρωμάτων της τοιχογραφίας, που οδηγεί τελικά σε απολέπιση και απόσπαση τμημάτων της από το υπόστρωμα.

Η μικροβιακή αλλοίωση λαμβάνει χώρα, αρχικά, μέσω του σχηματισμού των βιοφίλμ, τα οποία είναι σύνθετες κοινότητες μικροοργανισμών προσκολλημένες σε μία επιφάνεια. Ο σχηματισμός βακτηριακών φίλμ ξεκινά με την αρχική προσκόλληση των βακτηρίων σε μια επιφάνεια. Υπό ευνοϊκές συνθήκες, η κυτταρική διαίρεση παράγει μάζες κυττάρων, τις μικροαποικίες (Costerton *et al.*, 1999). Όταν το μέγεθος του πληθυσμού είναι επαρκές ξεκινά η διακυτταρική επικοινωνία και η ωρίμανση του βιοφίλμ. Τα βακτηριακά βιοφίλμ παράγουν μεγάλα ποσά

εξωπολυμερών (EPS) τα οποία αποτελούνται κυρίως από πολυσακχαρίτες καθώς και από χρωστικές, λιπίδια και πρωτεΐνες (Christensen & Characklis, 1990). Τα εξωπολυμερή εξυπηρετούν πολλές λειτουργίες συμπεριλαμβανομένης της προστασίας των μικροοργανισμών από ξήρανση, αντιβιοτικά και απολυμαντικά ενώ συμβάλλουν και ως αποθήκες θρεπτικών συστατικών και ενέργειας (Costerton *et al.*, 1995).

Η συμβολή της παρουσίας βακτηριακών βιοφίλμ στην αλλοίωση ιστορικών τοιχογραφιών, επιβεβαιώνεται και σε σχετικά πρόσφατη μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε αλλοιωμένες τοιχογραφίες του 18^{ου} αιώνα, στην εκκλησία "Santissima Annunziata" (Σιένα, Ιταλία). Στη μελέτη αυτή, βρέθηκε πως το βακτηριακό είδος *Sphingomonas echinoides*, δημιουργούσε βιοφίλμ, το οποίο συγκρατούσε την υγρασία στην επιφάνεια της τοιχογραφίας και τα EPS που παρήγαγε ενοχοποιήθηκαν για την πυροδότηση ανάπτυξης άλλων μικροοργανισμών, συμβάλλοντας με αυτόν τον τρόπο στην επέκταση της ζημιάς (Milanesi *et al.*, 2006).

Η παρουσία αλάτων στις τοιχογραφίες και τα υποστρώματα αυτών, μπορεί επίσης, να επηρεάσει τις ιδιότητες των εξωπολυμερών (EPS) των βακτηριακών φιλμ, μειώνοντας το ιξώδες τους και προκαλώντας ανωμαλίες στις επιφάνειες, καθιστώντας τις τοιχογραφίες επιρρεπείς στην βιοαλλοίωση (Giullitte, 1995; Roldan *et al.*, 2003).

Ένα από τα παραδείγματα συνδυασμού της παρουσίας βιοφίλμ και των μεταβολικών δραστηριοτήτων των βακτηρίων είναι το φαινόμενο του "οξαλικού βιοφίλμ", το οποίο αποτελεί συχνό παθολογικό εύρημα σε αλλοιωμένες τοιχογραφίες. Σύμφωνα με έρευνα των Rosado *et al.* (Rosado *et al.*, 2013), τοιχογραφίες εξαιρετικής ομορφιάς που εντοπίζονται στη μονή "Nossa Senhora da Saudação" (Πορτογαλία), εμφάνισαν με την πάροδο των ετών χρωματική υποβάθμιση (διαφορετικών αποχρώσεων). Η μελέτη ενοχοποίησε την ανάπτυξη των βακτηριακών κοινοτήτων (κυρίως του Γένους των Βακίλων) στην επιφάνεια των τοιχογραφιών για το σχηματισμό βιοφίλμ, το οποίο είναι ουσιαστικά οξαλικό, προκαλείται από τη μεταβολική δραστηριότητα των βακτηρίων και οδηγεί σε χρωματικές αλλοιώσεις.

Πιο συγκεκριμένα, ο μηχανισμός πίσω από τον σχηματισμό του οξαλικού βιοφίλμ είναι ο εξής: Είναι γνωστό πως κάποιες χρωστικές, όπως ο μαλαχίτης, υφίστανται χρωματικές αλλοιώσεις και πως συχνά αυτές συνδέονται με την εμφάνιση οξαλικού βιοφίλμ. Τα βακτήρια, αλλά και άλλοι μικροοργανισμοί όπως, μύκητες, φύκη και οι λειχήνες έχουν ταχτοποιηθεί ως οι κύριοι υπεύθυνοι για τον σχηματισμό του οξαλικού. Στην πραγματικότητα, από τον μεταβολισμό αυτών των

μικροοργανισμών παράγεται οξαλικό οξύ ($\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$), το οποίο μπορεί να αντιδράσει με τον ασβεστίτη (CaCO_3) που υπάρχει στη χρωματισμένη επιφάνεια, σχηματίζοντας οξαλικό ασβέστιο (CaC_2O_4). Το οξαλικό ασβέστιο (CaC_2O_4) σε διάφορες καταστάσεις ενυδάτωσης κρυσταλλοποιείται, οδηγώντας στην αλλοίωση των χρωμάτων της τοιχογραφίας (Rosado *et al.*, 2013).

Όπως προαναφέρθηκε, η συμβολή των βακτηριακών μεταβολικών προϊόντων στην εμφάνιση της βιοαλλοίωσης σε τοιχογραφίες είναι γνωστή. Οι Saiz-Jimenez και Samson (1981), ανέλυσαν την μικροβιακή χλωρίδα μιας τοιχογραφίας στο μοναστήρι "Santa Maria de la Rabida" (Huelva, Ισπανία), η οποία εμφάνιζε δύο μορφές φθοράς: κρυσταλλικούς σχηματισμούς λευκού χρώματος και πρασινόμαυρες κηλίδες.

Οι επιστήμονες υπέθεσαν ότι η αλλοίωση της τοιχογραφίας συνέπεσε με τη δημιουργία μιας σειράς βιομηχανικών μονάδων κοντά στο μοναστήρι, την δεκαετία του 1970. Η εκπομπή και απόθεση περιβαλλοντικών ρύπων, ιδιαίτερα οξείδιο του θείου και συναφών ενώσεων, είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της περιεκτικότητας σε θείο, το οποίο οδήγησε στην ανάπτυξη αυτότροφων βακτηρίων που το αξιοποιούν ενεργειακά. Στην συγκεκριμένη μελέτη βρέθηκε μεγάλη συγκέντρωση βακτηρίων που μεταβολίζουν το θείο και γνωρίζοντας, πως η παραγωγή θειικού οξέος διαλύει το ανθρακικό ασβέστιο της τοιχογραφίας, έχοντας ως αποτέλεσμα την παραγωγή ιζηματώδους άνυδρου θειικού ασβεστίου (γύψος), οδήγησε τους επιστήμονες στην ενοχοποίηση αυτών των βακτηρίων για το σχηματισμό των λευκών κρυσταλλικών μορφωμάτων. Επιπλέον, τα παραπάνω βακτήρια θεωρήθηκαν ως οι αρχικοί "άποικοι" της τοιχογραφίας που παρείχαν με τη σειρά τους οργανικά θρεπτικά συστατικά σε άλλες ομάδες ετερότροφων μικροοργανισμών, που συνέβαλαν περαιτέρω στην υποβάθμιση της τοιχογραφίας (Saiz-Jimenez and Samson, 1981).

Εν κατακλείδι, σε ένα γενικό πλαίσιο, πολλοί ερευνητές προτείνουν τα χημειολιθότροφα και τα χημειοργανότροφα βακτήρια, ως τις πρώτες μικροβιακές κοινότητες που αναπτύσσονται σε μια ζωγραφισμένη επιφάνεια. Αυτές οι ομάδες βακτηρίων φαίνεται πως συμβάλλουν στο φαινόμενο της βιοαλλοίωσης τόσο μέσω της απελευθέρωσης οξέων, οδηγώντας σε χρωματικές αλλοιώσεις, όσο και μέσω της παροχής οργανικών ενώσεων σε ένα ευρύ φάσμα ετερότροφων βακτηρίων και άλλων μικροοργανισμών. Τέλος, μέσα στα συχνότερα βακτηριακά γένη που απομονώνονται από βιοαλλοιωμένες ιστορικές τοιχογραφίες περιλαμβάνονται τα γένη *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Micrococcus*,

Staphylococcus, *Nocardia*, *Mycobacterium* και *Sarcina* (Heyrman and Swings, 2001; Pepe *et al.*, 2010)

1.6 Μέθοδοι χαρακτηρισμού της μικροβιακής χλωρίδας που σχετίζεται με την εμφάνιση βιοαλλοίωσης

Οι ιστορικές τοιχογραφίες είναι έργα τέχνης με τεράστια αξία για την παγκόσμια πολιτιστική κληρονομιά και όπως και άλλα αντικείμενα τέχνης αποτελούν υπόστρωμα για την ανάπτυξη διαφόρων μικροοργανισμών. Ξεκινώντας από το υλικό υποστήριξης της ζωγραφικής, μέχρι τις κόλλες και τα χρώματα που χρησιμοποιήθηκαν για την δημιουργία τους, αποτελούν υλικά που ευνοούν την ανάπτυξη μικροοργανισμών. Η περιγραφή αυτών των κοινοτήτων και η κατανόηση του ρόλου τους στην βιοαλλοίωση, συνιστούν απαραίτητες γνώσεις για την αποκατάσταση και διατήρηση των εν λόγω αντικειμένων (Lupan and Popescu, 2012).

Οι παλαιότεροι ερευνητές που μελετούσαν φαινόμενα βιοαλλοίωσης σε μνημεία παγκόσμιας πολιτιστικής κληρονομιάς, χρησιμοποιούσαν μεθόδους εξαρτώμενες από την απομόνωση και την καλλιέργεια των μικροοργανισμών (culture-based techniques), ώστε να καθορίσουν την μικροβιακή κοινότητα. Οι τεχνικές αυτές βασίζονταν κατά κύριο λόγο στην απομόνωση των μικροοργανισμών και την καλλιέργειά τους σε εκλεκτικά θρεπτικά μέσα κατάλληλα για τον κάθε πιθανό μικροοργανισμό. Στη συνέχεια η μικροβιακή ανάλυση πραγματοποιούνταν με συνδυασμό διαφορετικών χρωστικών και μικροσκοπικών μεθόδων (Tikam and Pankaj, 2012).

Ωστόσο, οι τεχνικές που βασίζονται στην καλλιέργεια των μικροοργανισμών εμφανίζουν πολλούς περιορισμούς. Μερικές φορές οι "culture-based" τεχνικές, ενδέχεται να υπερεκτιμήσουν μια ομάδα μικροβίων σε σχέση με άλλες ομάδες, οδηγώντας σε μη ικανοποιητικά και ακριβή πειραματικά αποτελέσματα (Laiz *et al.*, 2003). Επιπλέον, είναι ευρέως αποδεκτό ότι οι "culture-based" τεχνικές ανιχνεύουν μόνο το 1% της μικροβιακής ποικιλότητας που υπάρχει σε δείγματα που συλλέγονται από μνημειακούς χώρους (Amaan *et al.*, 1995; Ward *et al.*, 1990; Gonzalez and Saiz - Jimenez 2004, 2005; Kiel and Gaylarde, 2007). Δυστυχώς, η ανικανότητα εργαστηριακής αναπαραγωγής των πολύπλοκων και δυναμικών προϋποθέσεων υπό τις οποίες τα μικρόβια αναπτύσσονται είναι άλλος ένας λόγος που έκανε τις "culture-based" μεθόδους αναξιόπιστες και ακατάλληλες για μελέτες βιοαλλοίωσης (Kyι,

2003; Herrera and Videla, 2009). Τέλος, η χρήση των εκλεκτικών θρεπτικών υποστρωμάτων μπορεί να οδηγήσει σε υποεκτίμηση της πραγματικής ποικιλομορφίας που ανιχνεύεται σε ένα περιβαλλοντικό δείγμα (Crispim and Gaylarde 2005).

Μερικοί ερευνητές έχουν αποδείξει ότι πολλοί μικροοργανισμοί, οι οποίοι παραμένουν ανεξερεύνητοι με τη χρήση των "culture-based" τεχνικών, θα μπορούσαν να ανιχνευθούν και να προσδιοριστούν χρησιμοποιώντας τεχνικές μοριακής βιολογίας (Rolleke *et al.*, 1996 , 1998, 1999 , 2000). Δεδομένου επίσης, ότι για την καλλιέργεια και τον προσδιορισμό όσο το δυνατόν περισσότερων μικροβίων από περιβαλλοντικό δείγμα, απαιτείται εκτεταμένης έκτασης δειγματοληψία (περισσότερη από το επιτρεπτό όριο που επιβάλλεται σε χώρους πολιτιστικής κληρονομιάς), γίνεται αντιληπτό πως οι παραπάνω περιορισμοί δημιουργούν συνεχή προβλήματα στους ερευνητές και κατά συνέπεια, η χρήση μοριακών τεχνικών φάνηκε να είναι η βιώσιμη λύση (Ferris *et al.*, 1996). Επιπλέον, οι μοριακές τεχνικές συνιστούν την πιο πολλά υποσχόμενη προσέγγιση με την οποία, μικροοργανισμοί που δεν μπορούν να καλλιεργηθούν και να προσδιοριστούν χρησιμοποιώντας τις "culture-based" μεθόδους είναι πλέον εφικτό να ταυτοποιηθούν (Crispim and Gaylarde, 2005). Ωστόσο, οι "culture-based" τεχνικές και η ανάπτυξη νέων εκλεκτικών θρεπτικών υλικών εξακολουθούν να βρίσκονται στο επιστημονικό προσκήνιο, λόγω του πλεονεκτήματος της απομόνωσης, καθαρής αποικίας μικροβίων, σε κύτταρα της οποίας μπορούν να πραγματοποιηθούν σειρά ερευνών επί των φυσιολογικών και μεταβολικών δραστηριοτήτων του μικροοργανισμού (Tikam and Pankaj, 2012).

Παράθυρο στη μοριακή ταυτοποίηση των μικροοργανισμών άνοιξε η δυνατότητα ενίσχυσης γενετικών τόπων που είναι βαθιά συντηρημένοι μεταξύ των ειδών. Τέτοιοι γενετικοί τόποι αποτελούν, το γονίδιο που κωδικοποιεί το 16S rRNA μόριο της μικρής υπομονάδας των προκαρυωτικών ριβοσωμάτων (30S), το γονίδιο που κωδικοποιεί το 18S rRNA μόριο της μικρής υπομονάδας των ευκαρυωτικών ριβοσωμάτων (40S) αλλά και οι περιοχές ITS (internally transcribed spacer) του ριβοσωμικού DNA (r-DNA). Αυτές οι ριβοσωμικές αλληλουχίες διαθέτουν εξελικτικά πολύ συντηρημένες περιοχές, οι οποίες χρησιμοποιούνται ως φυλογενετικοί δείκτες για τον προσδιορισμό και την διάκριση μεταξύ των μικροοργανισμών σε όλα τα φυλογενετικά επίπεδα (Woese, 1987; Anderson *et al.*, 2003).

Οι τεχνικές που στηρίζονται στην ανάλυση της 16S rDNA αλληλουχίας, άνοιξαν το δρόμο σε μια προσπάθεια των ερευνητών να καταγράψουν τις βακτηριακές κοινότητες που εντοπίζονται σε αλλοιωμένα μνημεία παγκόσμιας πολιτιστικής κληρονομιάς και να μελετήσουν τον πιθανό ρόλο αυτών, στην δημιουργία της φθοράς (Schabereiter-Gurtner *et al.*, 2004).

Σε μελέτες βιοαλλοίωσης τοιχογραφιών, έχουν χρησιμοποιηθεί πολλές στρατηγικές προκειμένου να κατηγοριοποιηθούν, να ταυτοποιηθούν και να καταγραφούν οι βακτηριακές κοινότητες που εντοπίζονται πάνω στα έργα τέχνης. Μια στρατηγική που έχει χρησιμοποιηθεί σε αρκετές μελέτες βιοαλλοιωμένων τοιχογραφιών είναι η δημιουργία 16S rRNA βιβλιοθηκών (Saiz-Jimenez and Laiz, 2000; Gorbushina *et al.*, 2002; Saarela *et al.*, 2004; Rolleke *et al.*, 1996, 1998; Schabereiter-Gurtner *et al.*, 2001b; Cappitelli *et al.*, 2009). Για την κατασκευή των 16S rRNA βιβλιοθηκών απομονώνεται αρχικά το ολικό DNA των δειγμάτων που συλλέχθηκαν (χωρίς να προηγηθεί καλλιέργεια των μικροοργανισμών) από τις τοιχογραφίες και ακολουθεί η ενίσχυση, μέσω PCR, του 16S rRNA γονιδίου με τη χρήση κατάλληλου ζεύγους εκκινητών. Η βιβλιοθήκη είναι έτοιμη όταν το ενισχυμένο γονίδιο κλωνοποιηθεί σε κατάλληλους φορείς. Εν συνεχεία οι κλώνοι αλληλουχούνται και οι αλληλουχίες που προκύπτουν, συγκρίνονται με αντίστοιχες αλληλουχίες σε βάσεις δεδομένων, με σκοπό τον εντοπισμό του κοντινότερου εξελικτικού συγγενή.

Η παραπάνω στρατηγική δεν είναι μονόδρομος και πολλές παραλλαγές της έχουν εφαρμοστεί με επιτυχία σε διάφορες μελέτες βακτηριακής χλωρίδας ιστορικών τοιχογραφιών. Για παράδειγμα, για την μελέτη φυλογενετικής ποικιλότητας βακτηρίων, σε παλαιολιθικές τοιχογραφίες που εντοπίζονται σε δύο ισπανικά σπήλαια, μετά την κατασκευή των 16S rRNA βιβλιοθηκών, οι κλώνοι αναλύθηκαν με την μέθοδο DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis). Στη μελέτη αυτή, πρώτα οι κλώνοι ομαδοποιήθηκαν βάση το DGGE προφίλ τους και στη συνέχεια ακολούθησε η αλληλούχιση κλώνων-αντιπροσώπων της κάθε DGGE ομάδας. Οι αλληλουχίες που προέκυψαν, συγκρίθηκαν με γνωστές αλληλουχίες της βάσης δεδομένων EMBL. Τα αποτελέσματα της έρευνας ήταν εντυπωσιακά και πρωτότυπα καθώς ένας από τους κλώνους που αλληλουχίστηκαν, βρέθηκε να έχει 96% ομοιότητα με μέλος του υποψήφιου βακτηριακού φύλου WS3. Τα μέλη του WS3, δεν έχουν καλλιεργηθεί μέχρι τώρα σε εργαστηριακές συνθήκες και η ύπαρξή τους είναι γνωστή μέσω της 16S rRNA μεταγενωμικής ανάλυσης. Μέχρι τη στιγμή της

συγκεκριμένης έρευνας, μέλη του υποψήφιου βακτηριακού φύλου WS3 δεν είχαν εντοπιστεί ξανά σε ιστορικές τοιχογραφίες, ενώ τα περιβάλλοντα που μέχρι πρότινος εντοπίζονταν ήταν αποκλείστηκα ανοξικά. Επιπλέον, δεκατέσσερις κλώνοι βρέθηκαν να σχετίζονται με μέλη του βακτηριακού φύλου *Acidobacteria*, που και αυτά δεν έχουν καλλιεργηθεί ποτέ σε εργαστήριο (Schabereiter-Grunter *et al.*, 2004). Είναι φανερά λοιπόν τα οφέλη μιας τέτοιας μεταγενωμικής προσέγγισης που βασίζεται στην αλληλουχία του *16S rRNA* γονιδίου και για το λόγο αυτό έχει χρησιμοποιηθεί και από άλλους ερευνητές (Cappitelli *et al.*, 2009; Schabereiter-Gurtner *et al.*, 2001b; Rolleke *et al.*, 1996, 1998; Gorbushina *et al.*, 2002).

Μια ακόμη παραλλαγή της παραπάνω στρατηγικής, δοκιμάστηκε με σκοπό την εφαρμογή των μοριακών τεχνικών (που δεν βασίζονται στην καλλιέργεια των βακτηρίων) για τον καθορισμό του αιτιολογικού παράγοντα, του ρόδινου αποχρωματισμού, των τοιχογραφιών στην κρύπτη της "Original Sin" (Ματέρα, Ιταλία). Προτού πραγματοποιηθεί η παραπάνω μελέτη, είχε προηγηθεί μια παρόμοια προσπάθεια με τη χρήση "culture-based" τεχνικών και τεχνικών μικροσκοπίας, μέσω της οποίας χαρακτηρίστηκαν αρκετά γένη βακτηρίων, ωστόσο στάθηκε αδύνατον να εντοπιστεί ο παράγοντας που προκαλούσε το ροδαλό "πέπλο" στις τοιχογραφίες. Στην πιο πρόσφατη προσπάθειά τους, οι ερευνητές εφάρμοσαν συνδυασμό τεχνικών μικροσκοπίας (SEM) φασματοσκοπίας (Raman spectroscopy) και μοριακών τεχνικών βασισμένες στην αλληλουχία του *16S rRNA* γονιδίου και τελικά κατάφεραν να υποδείξουν τον πιθανό αιτιολογικό παράγοντα. Μέσω της ανάλυσης SEM (Scanning Electron Microscopy analysis), εντοπίστηκε σε όλα τα δείγματα, ένα κυρίαρχο βακτήριο με συγκεκριμένη μορφολογία, στοιχείο που καθιστά τον μικροοργανισμό αυτό, ύποπτο για την εμφάνιση της ρόδινης βλάβης. Στη συνέχεια, ακολούθησε η εξαγωγή του ολικού DNA από τα εν λόγω δείγματα και η ενίσχυση του *16S rRNA* γονιδίου μέσω PCR με το κατάλληλο ζεύγος εκκινητών. Έπειτα τα προϊόντα της αντίδρασης ομαδοποιήθηκαν σε λειτουργικές ταξινομικές μονάδες, αυτή τη φορά όχι μέσω του DGGE προφίλ τους αλλά μέσω μιας άλλης τεχνικής διαλογής την ARDRA (Amplified rDNA restriction analysis). Έπειτα, επιλέχθηκε από ένας αντιπροσωπευτικός κλώνος, από κάθε λειτουργική ταξινομική μονάδα και στάλθηκε προς αλληλούχιση. Η ανάλυση των αλληλουχιών, μέσω της σύγκρισής τους με γνωστές αλληλουχίες που υπάρχουν στην βάση δεμένων RDP (Ribosomal Database Project), κατέδειξε πως οι μισές αλληλουχίες ήταν συγγενικές με *16S rDNA* αλληλουχίες καλλιεργήσιμων βακτηρίων, ενώ οι υπόλοιπες με μη καλλιεργημένα

περιβαλλοντικούς κλώνους. Οι κοινές σε όλα τα δείγματα αλληλουχίες, ήταν όλες συγγενικές με το βακτήριο *Rubrobacter radiotolerans*, το οποίο έχει εντοπιστεί ξανά σε μελέτες μικροβιακής ποικιλότητας τοιχογραφιών σε βιώσιμη αλλά μη καλλιεργήσιμη κατάσταση. Τέλος, η φασματοσκοπία Raman επιβεβαίωσε την ύπαρξη καροτενοειδών (οργανικές χρωστικές βακτηρίων), χαρακτηριστικών του *Rubrobacter radiotolerans* και συνεπώς το βακτήριο αυτό θεωρήθηκε ο πιθανότερος αιτιολογικός παράγοντας της φθοράς (Imperi *et al.*, 2007).

Με βάση τις παραπάνω αναφορές, γίνονται αντιληπτά τα οφέλη της μεταγενωμικής προσέγγισης σε μελέτες βακτηριακής ποικιλότητας αλλοιωμένων τοιχογραφιών. Ωστόσο υπάρχουν έρευνες, στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν τόσο οι "culture-based", όσο και οι "culture-independent" τεχνικές και αποδείχθηκε πως οι καθαρά μοριακές τεχνικές δεν ήταν πάντα σε θέση να αποκαλύψουν όλο το εύρος της βακτηριακής ποικιλότητας του έργου τέχνης. Φαίνεται λοιπόν, πως οι δύο αυτές προσεγγίσεις είναι συμπληρωματικές μεταξύ τους και ο συνδυασμός τους μπορεί να δώσει την καλύτερη δυνατή εικόνα του εύρους της μικροβιακής ποικιλότητας που εντοπίζεται σε ένα μικροπεριβάλλον, όπως μια τοιχογραφία (Donachie *et al.*, 2007; Pangalo *et al.*, 2012).

Συμπερασματικά, ο συνδυασμός και των δύο προσεγγίσεων, παράλληλα με τη χρήση εργαλείων βιοπληροφορικής καθώς και των μικροσκοπικών τεχνικών είναι η καλύτερη δυνατή στρατηγική για την μελέτη της μικροβιακής ποικιλότητας ιστορικών τοιχογραφιών και την συσχέτισή της με τις βλάβες.

Πίνακας 1. Συγκεντρωτικός πίνακας διαφορών μεταξύ μοριακών τεχνικών και τεχνικών καλλιέργειας

| | ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ | ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ |
|---|--|--|
| ΠΟΣΟΤΗΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ | Μικρή | Μέτρια |
| ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ | Καλλιεργήσιμων και μη καλλιεργησίμων μικροοργανισμών | Μόνο καλλιεργήσιμων μικροοργανισμών |
| ΔΙΑΚΡΥΣΗ ΖΩΝΤΑΝΩΝ-ΝΕΚΡΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ | Όχι | Ναι |

2. ΣΚΟΠΟΣ

Ο σκοπός της παρούσας ερευνητικής εργασίας είναι η διερεύνηση της βακτηριακής ποικιλότητας που εντοπίζεται σε αρχαίες τοιχογραφίες, που εμφανίζουν βιοαλλοίωση, από τα μνημεία της Κρήνης της Καλλιρόης της Πνύκας και του Ιερού του Πανός (Αθήνα).

Οι τοιχογραφίες και στα δύο μνημεία εμφανίζουν εκτεταμένες βλάβες βιοαλλοίωσης και στη μελέτη αυτή γίνεται για πρώτη φορά στον Ελλαδικό χώρο μια προσπάθεια ανίχνευσης και ταυτοποίησης των βακτηρίων που πιθανώς εμπλέκονται στο φαινόμενο. Για την επίτευξη αυτού του στόχου, επιλέχθηκε συνδυασμός δύο προσεγγίσεων βασισμένων στην ενίσχυση του *16s rRNA* γονιδίου μέσω PCR και τη χρήση κατάλληλου ζεύγους εκκινητών. Η μια, πρόκειται για μεταγονιδιωματική προσέγγιση, με εκχύλιση ολικού DNA απευθείας από νιφάδες των τοιχογραφιών, ενίσχυση του *16s rRNA* γονιδίου, κατασκευή βιβλιοθήκης *16s rRNA* κλώνων, αλληλούχιση τυχαία επιλεγμένων κλώνων και ανάλυση των αλληλουχιών με τη βοήθεια βάσεων δεδομένων και εργαλείων βιοπληροφορικής. Η άλλη, πρόκειται επίσης για μοριακή προσέγγιση, βασισμένη στην αλληλουχία του *16s rRNA* γονιδίου, με τη διαφορά ότι είχε προηγηθεί η καλλιέργεια όσων βακτηρίων ήταν σε θέση να αναπτυχθούν κάτω από εργαστηριακές συνθήκες.

Τα αποτελέσματα των παραπάνω αναλύσεων θα μας επιτρέψουν να βγάλουμε συμπεράσματα σχετικά με την ποικιλότητα των βακτηρίων που είχαν αποικίσει τις τοιχογραφίες και των δύο μνημείων, καθώς και τον πιθανό τους ρόλο στην αλλοίωσή τους.

Αυτού του είδους μελέτες έχουν απώτερο στόχο την καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών που διέπουν το φαινόμενο της βιοαλλοίωσης και παρέχουν πολύτιμες πληροφορίες για την σωστή επιλογή κατάλληλων μεθόδων προστασίας και διατήρησης των μνημείων παγκόσμιας πολιτιστικής κληρονομιάς και των έργων τέχνης που περιλαμβάνονται σε αυτά.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Μνημεία

Στην περιοχή που εκτείνεται μεταξύ των δυτικών παρυφών του Αρείου Πάγου και του λόφου της Πνύκας (Αθήνα) και ειδικότερα στα ριζά του λόφου της Πνύκας όπου περνάει η σημερινή λεωφόρος Απ. Παύλου, υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός από υπόσκαφα, λαξευμένα στο φυσικό βράχο, αρχαία υδροδοτικά έργα και άλλες κατασκευές. Σε αυτήν την περιοχή και με απόσταση μερικών μόνο μέτρων μεταξύ τους, εντοπίζονται τα μνημεία από τις τοιχογραφίες των οποίων ελήφθησαν τα προς μελέτη δείγματα της παρούσας ερευνητικής εργασίας. Πρόκειται για τα μνημεία της Κρήνης της Καλλιρόης της Πνύκας και του Ιερού του Πανός. Κανένα από τα δύο μνημεία δεν είναι ακόμη προσβάσιμα στο ευρύ κοινό.

Οι αναφορές σχετικά με τις τοιχογραφίες που διακοσμούσαν τα δύο μνημεία είναι ελάχιστες έως μηδενικές. Εξ αιτίας της εκτεταμένης αλλοίωσης που τις χαρακτηρίζει στάθηκε αδύνατη η ακριβής περιγραφή των μοτίβων και η χρωματική υποβάθμιση που έχουν υποστεί δεν επιτρέπει την καθοριστική απόδοση των χρωμάτων που είχαν χρησιμοποιηθεί, ενώ μέχρι σήμερα δεν έχει γίνει καμία μικροσκοπική ή χημική μελέτη για τον πλήρη χαρακτηρισμό των χρωστικών και των συνδετικών μέσων που είχαν χρησιμοποιηθεί κατά τη δημιουργία τους.

Οι λεκέδες, οι χρωματισμένες κρούστες ή τα σημεία έντονου αποχρωματισμού αποτελούν κοινά παθολογικά ευρήματα στην επιφάνεια ιστορικών τοιχογραφιών και αποδίδονται στην μικροβιακή δραστηριότητα (Imperi *et al.*, 2007). Τα παραπάνω χαρακτηριστικά υπήρχαν διάχυτα σε όλη την έκταση των τοιχογραφιών και των δύο μνημείων. Έχοντας πλέον αδιάσειστες ενδείξεις πως τα μνημεία έφεραν στοιχεία βιοαλλοίωσης, προχωρήσαμε στον καθορισμό του βακτηριακού πληθυσμού με τη χρήση μοριακών τεχνικών, σε μια γενικότερη προσπάθεια χαρακτηρισμού της μικροβιακής ποικιλότητας που ενδεχομένως συμμετέχει στο φαινόμενο.

Η παρούσα ερευνητική εργασία είναι πρωτότυπη για τα Ελληνικά δεδομένα, καθώς είναι η πρώτη φορά που επιχειρείται η μελέτη βιοαλλοιωμένων τοιχογραφιών σε δύο αρχαιολογικού ενδιαφέροντος μνημεία παγκόσμιας πολιτιστικής κληρονομιάς, από τα αμέτρητα που μας κληροδότησαν οι αρχαίοι πρόγονοι.

3.1.1 Η Κρήνη της Καλλιρρόης της Πνύκας

Σύμφωνα με την αρχαιολόγο, κυρία Τατιάνα Πούλου (Α΄ Εφορεία Προϊστορικών και Κλασικών Αρχαιοτήτων), κατά τις ανασκαφές του Γερμανικού Αρχαιολογικού Ινστιτούτου των ετών 1891-1898, στη δυτική πλευρά της Ακρόπολης, ήρθε στο φως ένα πολυσύνθετο υδροδοτικό δίκτυο λαξευμένο στο φυσικό βράχο, αποτελούμενο από αγωγούς, κανάλια, φρεάτια, δεξαμενές και στοές. Η μελέτη του δικτύου αυτού από τους Dörpfeld και Gräber αποτελεί έως σήμερα την μοναδική μελέτη του εκτεταμένου υδροδοτικού συστήματος που ανάγεται στην αρχαϊκή περίοδο και πραγματοποιήθηκε στα χρόνια του Πεισίστρατου.

Σημαντικό τμήμα του προαναφερθέντος δικτύου αποτελεί το δυτικό τμήμα του, «ο κλάδος της Πνυκός», ο οποίος τροφοδοτούσε την κατά Dörpfeld «Κρήνη Καλλιρρόη» ή κατά Kastenbein την «Κρήνη της Πνύκας». Ο Γερμανός αρχαιολόγος Dörpfeld, σε μια εποχή που τα μνημεία αυτά δεν είχαν αποκαλυφθεί από την Αμερικανική Αρχαιολογική Σχολή, ταύτισε λανθασμένα όπως αποδείχθηκε αργότερα, το Ελευσίνιο και το Ωδείο. Αναζήτησε λοιπόν την αρχαία πηγή Καλλιρρόη και την Εννεάκρουνο στην περιοχή ανατολικά του λόφου της Πνύκας και νότια του Αρείου Πάγου, με βάση όσα έγραφε ο Πανσανίας και έτσι η μεγάλη υπόσκαφη κρήνη που εντοπίζεται στα βράχια της Πνύκας ταυτίζεται λανθασμένα με την πηγή Καλλιρρόη. Η είσοδος της κρήνης αυτής έχει σήμερα πρόσβαση από τον πεζόδρομο της Αποστόλου Παύλου και έχει επικρατήσει να την αποκαλούν «Κρήνη Καλλιρρόη της Πνύκας» [Εικόνα 3.α].

Σύμφωνα με τον Dörpfeld (Dörpfeld, 1892) η «Κρήνη Καλλιρρόη», όπως την χαρακτήριζε, πρόκειται για κρηναία εγκατάσταση, η οποία διατηρείται σε άριστη σχεδόν κατάσταση. Αποτελείται από συγκοινωνούσες δεξαμενές, φρεάτια και διαδρόμους προσπέλασης, διαμορφώνοντας ένα πολύπλοκο υδροδοτικό σύνολο. Η κάτοψη του μνημείου, όπως την παρουσίασε ο ανασκαφέας παρατίθεται στην παρακάτω εικόνα [Εικόνα 2].

Κατά τον Dörpfeld, για πρώτη φορά επιχρίονται οι εσωτερικοί τοίχοι του μνημείου (θάλαμος Υ), όταν παροχετεύεται εκεί νερό από την παρακείμενη «Εννεάκρουνο» και σε μεταγενέστερη εποχή το επίχρισμα ανανεώθηκε. Η δεξαμενή αυτή παρέμεινε σε χρήση πολύ καιρό και Κατά τη ρωμαϊκή περίοδο ο τετράγωνος θάλαμος κοσμήθηκε με ψηφιδωτό δάπεδο που ανάγεται στην εποχή του Αδριανού (2^{ος} μ.Χ. αι.).

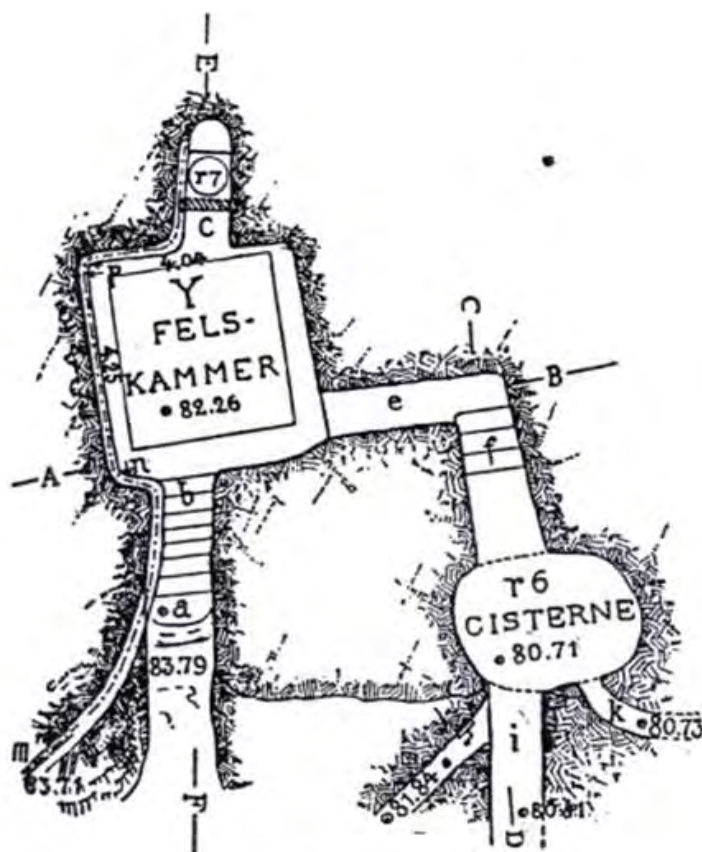


Abb. 1. Grundriss der älteren Wasseranlage.
Felskammer an der Pnyx.

Εικόνα 2. Κάτοψη της Κρήνης Καλλιρόης της Πνύκας. Στην παραπάνω εικόνα παρουσιάζεται η κάτοψη του μνημείου με τις περιγραφές του Dörpfeld, όπου: **a)** Ίχνη εισόδου από θύρα, **Y)** Μεγάλο τετράγωνο δωμάτιο (περίπου 4μ x 4μ) λαξευμένο στο φυσικό βράχο. Ο θάλαμος αυτός έχει τοξωτά διαμορφωμένη οροφή και στους τοίχους του εντοπίζονται τα ίχνη των τοιχογραφιών, **c)** Ακριβώς απέναντι από την είσοδο, στον άξονα του διαδρόμου και ελαφρώς βορειότερα, αποκαλύφθηκε κόγχη βάθους 1.80m, **r7)** Πηγάδι βάθους περίπου 2m, **r6)** ελλειψοειδής θάλαμος ο οποίος προφανώς ήταν μια δεύτερη υδροσυλλεκτική δεξαμενή

Κατά την διάρκεια του Β΄ Παγκοσμίου Πολέμου ο θάλαμος της κρήνης «Καλλιρόης» χρησιμοποιήθηκε, από τον τότε Έφορο Αρχαιοτήτων Γιάννη Μηλιάδη, ως κρύπτη αρχαιοτήτων που προέρχονταν από το Μουσείο της Ακροπόλεως και το Εθνικό Αρχαιολογικό Μουσείο. Η είσοδος του θαλάμου της κρήνης (**Y**) καθώς και της υδροσυλλεκτικής δεξαμενής (**r6**) σφραγίστηκαν με σκυρόδεμα.



Εικόνα 3. α) Η είσοδος του μνημείου όπως επί τις οδού Απ. Παύλου, όπως είναι σήμερα β) Βορειοδυτικός τοίχος του θαλάμου Υ, όπως σώζεται σήμερα. Διακρίνονται ίχνη ερυθρής απόχρωσης επί του τοίχου (με εμφανείς χρωματικές αλλοιώσεις) και λείψανα του ψηφιδωτού του 2^{ου} μ.Χ. αι. γ) Ο θάλαμος της δεύτερης υδροσυλλεκτικής δεξαμενής (r6), όπως σώζεται σήμερα.

3.1.2 Το Ιερό του Πανός

Σύμφωνα με την αρχαιολόγο, κυρία Τατιάνα Πούλου (Α΄ Εφορεία Προϊστορικών και Κλασικών Αρχαιοτήτων), στο πλαίσιο του έργου Ενοποίησης Αρχαιολογικών Χώρων της Αθήνας, αποκαλύφθηκε σκαμμένος στον φυσικό βράχο, τεχνητός θάλαμος προσβάσιμος από λαξευτό θυραίο άνοιγμα. Η ανασκαφή μέσα στο θάλαμο έφερε στο φώς στο βόρειο τοίχωμά του ανάγλυφο, σμιλευμένο απευθείας στο φυσικό βράχο με παράσταση Πανός, Νύμφης και σκύλου. Η παρουσία του

ανάγλυφου οδήγησε στην ταύτιση του μνημείου με ένα άγνωστο και μη μαρτυρημένο στους αρχαίους συγγραφείς, αστικό ιερό του Πανός.

Στο βραχώδες μέτωπο αριστερά της εισόδου, αποκαλύφθηκαν τοιχογραφίες και μπροστά τους ψηφιδωτό δάπεδο που συνδέονται με κατασκευές της ύστερης αρχαιότητας. Λόγω της εκτεταμένης αλλοίωσης, στάθηκε αδύνατος ο χαρακτηρισμός των μοτίβων των τοιχογραφιών.

Μέχρι σήμερα, δεν υπάρχουν δημοσιευμένες αναφορές για το συγκεκριμένο μνημείο, ούτε επίσημη ιστορική μελέτη.



Εικόνα 4. Λεπτομέρειες του Ιερού του Πανός, όπως σώζονται σήμερα. **α)** Ανάγλυφη παράσταση του καθιστού Πανός και της Νύμφης, στο εσωτερικό του μνημείου (λάξευμα πάνω στον φυσικό βραχώδη τοίχο) **β)** Τχνη ερυθρών μοτίβων που κοσμούσαν την βραχώδη επιφάνεια, εξωτερικά της εισόδου του μνημείου. Είναι εμφανή τα στοιχεία βιοαλλοίωσης, η οποία σε αυτή την περίπτωση εκδηλώνεται με λεκέδες πράσινης απόχρωσης. Ακριβώς από κάτω παρατηρείται λεπτομέρεια του ψηφιδωτού δαπέδου. **γ)** Η είσοδος του μνημείου επί της οδού Αποστόλου Παύλου.

3.2 Δειγματοληψία

Η συλλογή των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα έρευνα, πραγματοποιήθηκε απευθείας από τους χώρους των μνημείων καθώς, το προς μελέτη υλικό αποτελούσαν οι τοιχογραφίες που εντοπίζονται σε αυτά. Τα ακριβή σημεία συλλογής ήταν ως επί το πλείστον σημεία στα οποία διακρίνονταν κάποιας μορφής τοιχογραφία, η οποία ωστόσο εμφάνιζε εκτεταμένα στοιχεία βιοαλλοίωσης με αποτέλεσμα να μην διακρίνονται μορφές ή μοτίβα παρά μόνο αποχρώσεις βαφής. Όλα τα ακριβή σημεία συλλογής υποδείχθηκαν από αρμόδια συντηρήτρια αρχαιοτήτων, της Α' Εφορείας Προϊστορικών και Κλασικών Αρχαιοτήτων και βρίσκονταν διάσπαρτα σε όλους τους χώρους των μνημείων.

Για την δειγματοληψία χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικοί μέθοδοι, οι οποίες είναι οι εξής:

1. Λήψη επιχρίσματος με την χρήση αποστειρωμένων βαμβακοφόρων στυλεών (Kyι, 2003). Κάποια επιχρίσματα φυλάχθηκαν σε κενά αποστειρωμένα falcons και κάποια σε αποστειρωμένα falcons που περιείχαν PBS (Phosphate buffered saline). Όλα αποθηκεύθηκαν στους 4°C. Το PBS πρόκειται για ένα ρυθμιστικό διάλυμα στο φαίνεται πως διατηρούνται για μεγάλα χρονικά διαστήματα τόσο τα Gram+ όσο και Gram- βακτήρια (Liao and Shollenberger, 2003).
2. Απόξεση τμημάτων τοιχογραφίας με την χρήση αποστειρωμένου νυστεριού (Schabereiter-Gurtner *et al.*, 2001a; Herrera *et al.*, 2004) και φύλαξη των νιφάδων σε αποστειρωμένα falcons, στους -20 °C.

Οι δύο παραπάνω μέθοδοι συνδυάστηκαν στα περισσότερα σημεία δειγματοληψίας. Τα σημεία, οι μέθοδοι λήψης καθώς και ο συνολικός αριθμός δειγμάτων από κάθε μνημείο, παρατίθενται στους πίνακες που ακολουθούν [**Πίνακας 2 και 3**].

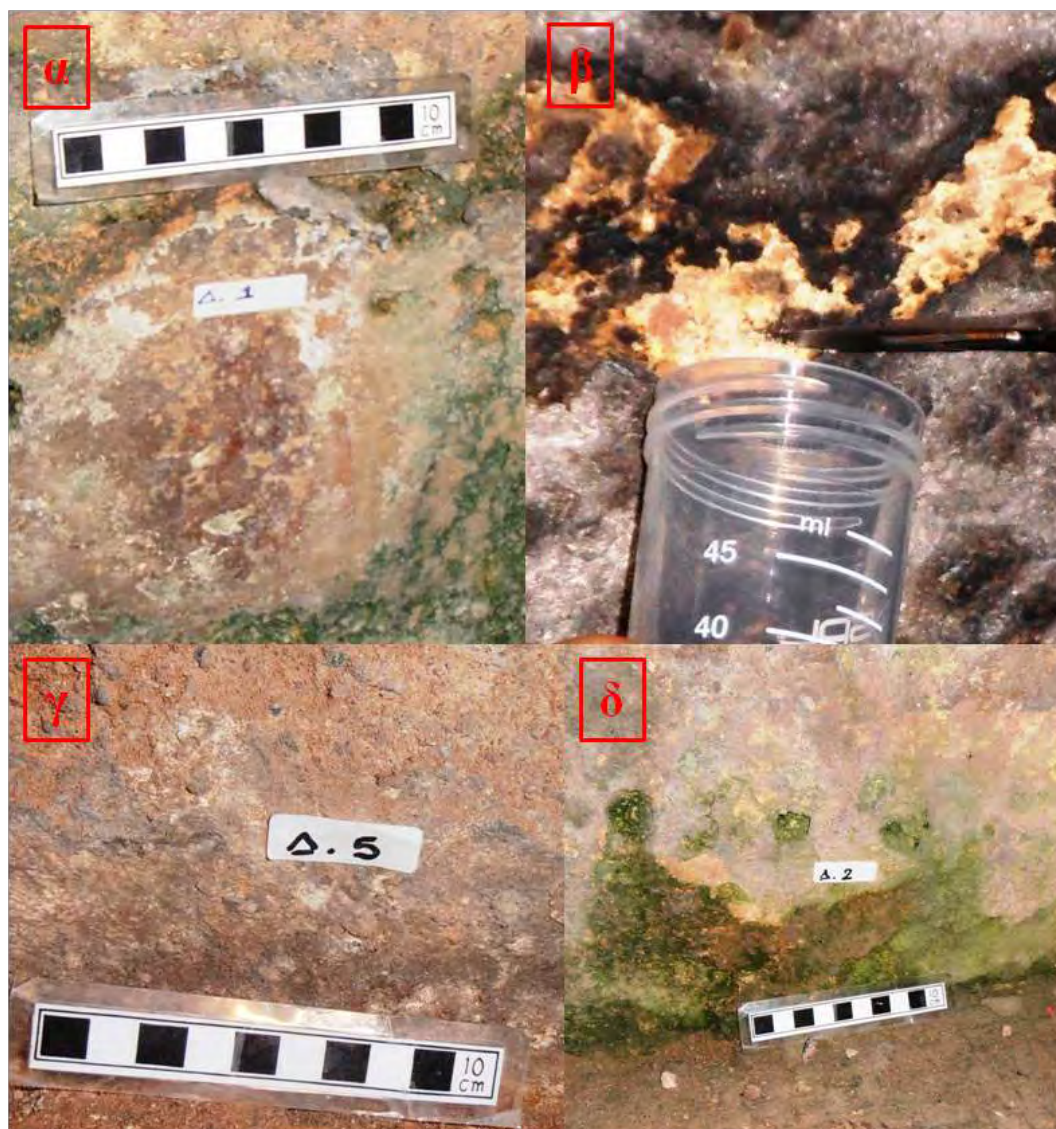
Πίνακας 2. Σύνολο δειγμάτων από το μνημείο της Κρήνης της Καλλιρόης.

| ΚΡΗΝΗ ΚΑΛΛΙΡΟΗΣ ΤΗΣ ΠΝΥΚΑΣ | | | |
|-----------------------------------|----------------|-------------------------------------|-----------------------------------|
| ΣΗΜΕΙΑ | ΑΠΟΞΕΣΗ | ΣΥΛΛΟΓΗ ΣΕ falcon ME PBS | ΣΥΛΛΟΓΗ ΣΕ ΚΕΝΟ falcon |
| Δ.1 | ✓ | ✓ | ✓ |
| Δ.2 | ✓ | ✓ | ✓ |
| Δ.3 | ✓ | ✓ | ✓ |
| Δ.4 | ✓ | ✓ | ✓ |
| Δ.5 | ✓ | - | ✓ |
| Δ.6 | ✓ | - | ✓ |
| ΣΥΝΟΛΟ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ | 16 | | |

Πίνακας 3. Σύνολο δειγμάτων από το Ιερό του Πανός.

| ΙΕΡΟ ΤΟΥ ΠΑΝΟΣ | | | |
|-----------------------------|----------------|-------------------------------------|-----------------------------------|
| ΣΗΜΕΙΑ | ΑΠΟΞΕΣΗ | ΣΥΛΛΟΓΗ ΣΕ falcon ME PBS | ΣΥΛΛΟΓΗ ΣΕ ΚΕΝΟ falcon |
| Δ.1 | ✓ | - | ✓ |
| Δ.2 | ✓ | - | - |
| Δ.3 | ✓ | ✓ | - |
| ΣΥΝΟΛΟ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ | 5 | | |

Στις εικόνες που ακολουθούν παρουσιάζονται ενδεικτικά κάποια από τα σημεία δειγματοληψίας και για τα δύο μνημεία [Εκόνα 5 και 6]. Για οικονομία χώρου η Κρήνη της Καλλιρόης της Πνύκας συμβολίζεται ως Κ.Κ, ενώ το Ιερό του Πανός με Ι.Π.



Εικόνα 5. α) Δ.1 Κ.Κ: Σημείο δειγματοληψίας που βρίσκεται στο κάτω μέρος του βορειοδυτικού τοίχου του θαλάμου Υ. Διακρίνεται υπόνοια ερυθρής απόχρωσης. β) Δ.3 Κ.Κ: Σημείο δειγματοληψίας που βρίσκεται στη δυτική πλευρά του θαλάμου Υ, συγκεκριμένα στο άνω τμήμα της κόγχης. Οι αρχαιολόγοι εντόπισαν στην κόγχη περιοχές με μπλε απόχρωση, στο σημείο αυτό όμως έχει καλυφτεί από μαύρη πατίνα, πιθανώς αποτέλεσμα βακτηριακής δραστηριότητας. Παρατηρείται επίσης η συλλογή νιφάδων τοιχογραφίας με τη χρήση αποστειρωμένου νυστεριού. γ) Δ.5 Κ.Κ: Σημείο δειγματοληψίας που εντοπίζεται στη νοτιοδυτική παρειά του θαλάμου Υ, λίγο πάνω από το έδαφος. Δεν διακρίνεται συγκεκριμένο χρώμα παρά μια διάχυτη γκριζωπή πατίνα. δ) Δ.2 Κ.Κ: Σημείο δειγματοληψίας που βρίσκεται στον δυτικό τοίχο του θαλάμου Υ, λίγο πάνω από το έδαφος. Όπως και στα περισσότερα σημεία δειγματοληψίας δεν διακρίνεται συγκεκριμένο χρώμα ή μοτίβο, παρατηρείται ωστόσο πρασινωπό φίλμ που αποτελεί ένδειξη μικροβιακής αλλοίωσης.



Εικόνα 6. α) Δ.1 Ι.Π: Σημείο δειγματοληψίας που βρίσκεται στην εξωτερική τοιχογραφία, αριστερά της εισόδου του μνημείου. Παρατηρούνται πρασινωπά στοιχεία πιθανώς αποτέλεσμα μικροβιακής δραστηριότητας. β) Δ.3 Ι.Π: Σημείο δειγματοληψίας που βρίσκεται στην εξωτερική τοιχογραφία, αριστερά της εισόδου του μνημείου, λίγο πάνω από το δάπεδο. Εντοπίζεται ακαθόριστο μοτίβο ερυθρού χρώματος. Παρατηρούνται επίσης, πρασινωπά στοιχεία πιθανώς αποτέλεσμα μικροβιακής δραστηριότητας. γ) Ι.Π: Στην εικόνα παρουσιάζεται τμήμα του τοίχου, αριστερά της εισόδου του μνημείου. Παρατηρούνται ποικιλία χρωμάτων και ακαθόριστα μοτίβα, καθώς και σημεία που χαρακτηρίζονται από μικροβιακή παρουσία, όπως το πρασινωπό “πέπλο” πάνω από τα αρχικά χρώματα.

3.3 Καλλιέργεια βακτηρίων

3.3.1 Υγρές και στερεές καλλιέργειες

Για την απομόνωση των βακτηρίων που μπορούν να καλλιεργηθούν και πιθανώς προκαλούν το φαινόμενο της βιοαλλοίωσης στις τοιχογραφίες που μελετάμε, χρησιμοποιήθηκαν τόσο στερεά, όσο και υγρά θρεπτικά μέσα.

Πιο συγκεκριμένα, όλοι οι στυλεοί με τους οποίους έγινε η δειγματοληψία χρησιμοποιήθηκαν για τον ενοφθαλμισμό τρυβλίων με Nutrient Agar και επώαστηκαν στους 30°C για 24 έως 48 ώρες. Το Nutrient Agar είναι ένα κοινό, μη εκλεκτικό στερεό θρεπτικό υλικό που έχει χρησιμοποιηθεί σε παρόμοιες μελέτες στο παρελθόν (Herrera *et al.*, 2004; Tikam *et al.*, 2012).

Τους ίδιους στυλεούς, αμέσως μετά τον ενοφθαλμισμό στο Nutrient agar, τους εμβαπτίσαμε σε αποστειρωμένα vials (γυάλινα μπουκαλάκια με πώμα) που περιείχαν από 5ml Nutrient broth. Τα vials επώαστηκαν στους 30°C για 24 έως 48 ώρες, με ανάδευση. Αυτό το στάδιο δεν πραγματοποιήθηκε για τους στυλεούς που αρχικά είχαν αποθηκευθεί σε falcons με PBS.

Μετά το πέρας της επώασης των υγρών καλλιιεργειών, ακολούθησε σειρά αραιώσεων από 10^{-3} έως 10^{-4} . Από κάθε αραιώση επιστρώθηκαν 100μl σε τρυβλία με TSA agar (Tryptone soy agar), τα οποία επώαστηκαν στους 30°C για 24 έως 48 ώρες.

Όλες οι παραπάνω διαδικασίες πραγματοποιήθηκαν κάτω από στείρες συνθήκες που εξασφαλίζονται με τη φλόγα του λύχνου. Όλα τα θρεπτικά υποστρώματα ήταν της εταιρίας LabM, η σύστασή τους καθώς και ο τρόπος παρασκευής τους παρουσιάζονται στο παράρτημα [Π.1].

3.3.2 Stock γλυκερόλης

Τα διάφορα βακτήρια που απομονώθηκαν από τις υγρές και στερεές καλλιέργειες, επεξεργάστηκαν με γλυκερόλη, έτσι ώστε να είναι δυνατή η αποθήκευσή τους στους -80°C. Με τον τρόπο αυτό, καθίσταται δυνατή η ανακαλλιέργεια οποιουδήποτε βακτηρίου, όποτε αυτό κριθεί αναγκαίο. Η παρασκευή των λεγόμενων stock γλυκερόλης έγινε σύμφωνα με το ακόλουθο πρωτόκολλο:

- Υγρό θρεπτικό μέσο Nutrient Broth (5ml) τοποθετήθηκε σε vials (γυάλινα μπουκαλάκια με πώμα). Το θρεπτικό μέσο αποστειρώθηκε και εκεί τελικά μεταφέρθηκαν με αποστειρωμένες οδοντογλυφίδες οι πρόσφατα αναπτυγμένες αποικίες των βακτηρίων.

- Οι υγρές καλλιέργειες επωάστηκαν στους 30°C με ανάδευση, για 24h.
- Σε αποστειρωμένα erpendorf μεταφέρθηκε 1,5 ml από την κάθε καλλιέργεια και έγινε φυγοκέντρωση στις 12.000 rpm για 3min.
- Στη συνέχεια απορρίφθηκε το υπερκείμενο και προστέθηκε 1ml φρέσκου LB Broth και έγινε ανάμειξη με vortex.
- Ακολούθησε μεταφορά σε cryovials και έπειτα προσθήκη γλυκερόλης, 300-350μl (τελική συγκέντρωση γλυκερόλης 15-20%). Πραγματοποιήθηκε πολύ καλή ανάμειξη με vortex.
- Τα cryovials παρέμειναν σε θερμοκρασία δωματίου για 1h και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν και διατηρήθηκαν στους -80°C.

3.4 Μοριακή ταυτοποίηση καλλιεργήσιμων βακτηρίων

Η ταυτοποίηση των βακτηρίων που απομονώθηκαν από τους βαμβανοφόρους στυλεούς και από τα δύο μνημεία, πραγματοποιήθηκε με μια σειρά πειραματικών διαδικασιών που περιλαμβάνουν αρχικά, την απομόνωση του βακτηριακού DNA και προσδιορισμό της συγκέντρωσής του με φασματοφωτομέτρηση. Ακολουθεί η ενίσχυση της *16S rRNA* περιοχής των βακτηρίων, που πραγματοποιήθηκε μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) χρησιμοποιώντας το ζεύγος εκκινητών, 27F και 1492R. Το συγκεκριμένο ζεύγος εκκινητών έχει χρησιμοποιηθεί και στο παρελθόν σε παρόμοιες μελέτες (Imperi *et al.*, 2007; Schabereiter-Gurtner *et al.*, 2001a). Στη συνέχεια τα προϊόντα της PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αгарόζης για επιβεβαίωση και καθαρίστηκαν, ώστε να είναι κατάλληλα για αλληλούχιση. Τέλος οι αλληλουχίες που προέκυψαν από την αντίδραση αλληλούχισης, αναλύθηκαν με τη χρήση προγραμμάτων βιοπληροφορικής, μέσω των οποίων υποδεικνύεται και η πιθανή ταυτότητα της εκάστοτε αλληλουχίας. Στις επόμενες ενότητες αναφέρονται αναλυτικά όλες οι παραπάνω διαδικασίες.

3.4.1 Απομόνωση βακτηριακού DNA

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν δύο μέθοδοι για την εξαγωγή DNA από τα βακτηριακά κύτταρα, με διαφορετική αποτελεσματικότητα η κάθε μία. Στην πρώτη μέθοδο η απομόνωση του βακτηριακού DNA επιτεύχθηκε μέσω ενός in house πρωτοκόλλου, ενώ στη δεύτερη και αποτελεσματικότερη, μέσω εμπορικού kit. Και

στις δύο μεθόδους είχε προηγηθεί ανακαλλιέργεια των βακτηρίων από τα stock γλυκερόλης σε Nutrient agar με σκοπό τα κύτταρα να είναι φρέσκα.

3.4.1.1 Απομόνωση βακτηριακού DNA με in house πρωτόκολλο

Το πρωτόκολλο αυτό, συνίσταται από την εξής διαδικασία: Από το κάθε δείγμα που έχει ανακαλλιεργηθεί στο Nutrient agar, μεταφέρεται μικρή ποσότητα κυττάρων με μια αποστειρωμένη οδοντογλυφίδα, σε eppendorf που περιέχει 20μl SDS-NaOH. Έπειτα ακολουθεί επώαση για 15 λεπτά στους 95°C και μετά προσθήκη 180μL αποστειρωμένου H₂O. Η ανάμειξη επιτυγχάνεται με πιπετάρισμα. Τέλος, τα δείγματα φυγοκεντρούνται για 5 λεπτά στις 4000rpm και διατηρούνται στους -20°C.

3.4.1.2 Απομόνωση βακτηριακού DNA με τη χρήση εμπορικού kit

Το kit που χρησιμοποιήθηκε για την εξαγωγή βακτηριακού DNA είναι το "NucleoSpin Tissue" της εταιρίας MACHEREY-NAGEL, το οποίο έχει χρησιμοποιηθεί σε αντίστοιχες μελέτες χαρακτηρισμού της βακτηριακής ποικιλότητας σε βιοαλλοιωμένες τοιχογραφίες (Rosado *et al.*, 2013). Το πρωτόκολλο του kit διαφοροποιείται ανάλογα με την προέλευση των κυττάρων (π.χ κύτταρα ζωικού ιστού, βακτηρίων, μυκήτων κ.α), ωστόσο η βασική αρχή είναι η ίδια και στηρίζεται στην λύση των κυττάρων με ένα διάλυμα πρωτεϊνάσης K και SDS, δέσμευση του DNA στις στήλες πυριτίου με την προσθήκη χαοτροπικών αλάτων και αιθανόλης, ενώ οι προσμείξεις απομακρύνονται με δύο διαδοχικές πλύσεις με διαφορετικά ρυθμιστικά διαλύματα. Τέλος, καθαρό γονιδιωματικό DNA εκλύεται υπό συνθήκες χαμηλής ιονικής ισχύος σε ένα ελαφρώς αλκαλικό ρυθμιστικό διάλυμα έκλυσης. Το παραπάνω πρωτόκολλο απαιτεί 1ml υγρής καλλιέργειας, οπότε και προηγείται ανακαλλιέργεια από το Nutrient agar σε Nutrient Broth.

3.4.2 Προσδιορισμός συγκέντρωσης DNA με φασματοφωτομέτρηση

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του DNA πραγματοποιείται μέσω της φασματοφωτομέτρησης η οποία έχει ως εξής:

- Αρχικά πραγματοποιούνται αραιώσεις 1:100, δηλαδή σε ένα eppendorf προστέθηκαν 2μl DNA και 198μL αποστειρωμένο H₂O σε τελικό όγκο 200 μL.
- Η συγκέντρωση του DNA υπολογίζεται με τον τύπο:

$$C (\mu\text{g/ml}) = O.D_{260} \times 50 \times 100$$

Όπου:

C= η συγκέντρωση του DNA, **O.D₂₆₀** = η απορρόφηση στα 260nm, **50** = παράγοντας δίκλωνου DNA (1 O.D στα 260nm ισοδυναμεί σε 50μg/ml dsDNA); **100**= παράγοντας αραιώσης

3.4.3 Ενίσχυση του 16S rDNA γονιδίου των καλλιεργήσιμων βακτηρίων με PCR

Για την ενίσχυση του 16S rDNA γονιδίου των βακτηρίων χρησιμοποιήθηκαν οι παγκόσμιοι εκκινητές 27F με αλληλουχία (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') (Lane *et al.*, 1991) και 1492R με αλληλουχία (5'-GGTTACCTTGTTCAGACTT-3') (Turner *et al.*, 1999). Όλα τα αντιδραστήρια είναι της εταιρίας Kapa Biosystems. Η αντίδραση της PCR πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 25 μl. Όλες οι συγκεντρώσεις και οι ποσότητες της αντίδρασης παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα [Πίνακας 4].

Πίνακας 4. Οι ποσότητες και τα συστατικά της αντίδρασης PCR για την ενίσχυση του 16S rRNA γονιδίου των Βακτηρίων

| ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ (Kapa Biosystems) | ΑΡΧΙΚΕΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ | ΤΕΛΙΚΕΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ | ΠΟΣΟΤΗΤΕΣ/ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ για V _{τελ} =25 μl |
|------------------------------------|--------------------------|--------------------------|--|
| PCR buffer | 5X | 1X | 5 μl |
| dNTPs | 25mM | 250μM | 0,25 μl |
| 27F primer | 26.9μM | 0.5μM | 0,46 μl |
| 1492R primer | 32.6μM | 0.5μM | 0,38 μl |
| MgCl ₂ | 25mM | 2 mM | 2 μl |
| Taq DNA polymerase | 5u/μl | 1u/μl | 0,2 μl |

Οι συνθήκες στις οποίες πραγματοποιήθηκε η αντίδραση της PCR παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα. Να σημειωθεί ότι η αντίδραση αρχικά δοκιμάστηκε στους 25 κύκλους και τελικά στους 30, όπου προέκυψαν και τα καλύτερης ποιότητας προϊόντα.

Πίνακας 5. Θερμοκρασίες αντίδρασης PCR για την ενίσχυση του *16S rRNA* γονιδίου των Βακτηρίων

| ΣΤΑΔΙΑ | ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΕΣ | ΧΡΟΝΟΣ |
|-------------------|--------------|--------|
| Αρχική αποδιάταξη | 94°C | 5min |
| Αποδιάταξη | 94°C | 1min |
| Υβριδισμός | 57°C | 30sec |
| Επιμήκυνση | 72°C | 1.5min |
| Τελική επιμήκυνση | 72°C | 10min |

} **30 κύκλοι**

Σε όλες τις αντιδράσεις PCR χρησιμοποιείται "Negative control" (χωρίς το DNA-μήτρα) για να επιβεβαιωθεί η ύπαρξη ή όχι επιμολύνσεων.

3.4.4 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 0.8% w/v

Όλα τα PCR προϊόντα ελέχθησαν μέσω ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης. Η συγκέντρωση της αγαρόζης ήταν 0.8% και ο μάρτυρας μοριακού βάρους ήταν 2-Log DNA Ladder (0.1-10kb) (New England Biolabs Inc). Για την ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιήθηκαν 6 μ l από κάθε προϊόν της PCR.

3.4.5 Καθαρισμός των προϊόντων PCR

Ο καθαρισμός των προϊόντων της PCR έγινε με το kit "NucleoSpin Gel and PCR Clean-up" (Macherey-Nagel, Germany). Ο τελικός όγκος έκλουσης ήταν 30 μ l.

3.4.6 Αλληλούχιση και ανάλυση των αλληλουχιών με προγράμματα

Βιοπληροφορικής

Τα καθαρισμένα προϊόντα της PCR, αλληλουχίστηκαν από την εταιρία Cemla (Τμήμα Ιστολογίας – Ιστοσυμβατότητας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας). Ο εκκινητής που χρησιμοποιήθηκε για την αντίδραση ήταν ο 1492R, προσαρμοσμένος στην απαιτούμενη συγκέντρωση (5 μ mol/ μ L/αντίδραση). Η αρχική επεξεργασία των αλληλουχιών έγινε με το πρόγραμμα "Sequence Scanner™ v1.0" (Applied Biosystems), με τη βοήθεια του οποίου απομακρύνθηκαν τα τμήματα της

αλληλουχίας που δεν είχαν καλή ποιότητα ανάγνωσης. Στη συνέχεια οι καθαρές πλέον αλληλουχίες μετατράπηκαν σε αρχείο με την κατάληξη .fasta μέσω του "Fasta Converter" και η ταυτοποίηση των βακτηρίων έγινε με τα εργαλεία βιοπληροφορικής BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) και RDP (Ribosomal Database Project).

3.5 Μοριακή ταυτοποίηση βακτηρίων μέσω DNA προερχόμενο απευθείας από τις τοιχογραφίες

Η μεταγενωμική προσέγγιση, για την μελέτη της μικροβιακής ποικιλότητας σε τοιχογραφίες που εμφανίζουν ίχνη βιοαλλοίωσης, έχει υιοθετηθεί τα τελευταία χρόνια από πολλούς επιστήμονες. Ανάμεσα στα πλεονεκτήματα αυτής της στρατηγικής, είναι η δυνατότητα ταυτοποίησης μικροοργανισμών που δεν έχουν καλλιεργηθεί ξανά σε εργαστηριακές συνθήκες, η δυνατότητα αποκάλυψης στελεχών που δεν έχουν εντοπιστεί ξανά σε αντίστοιχα περιβάλλοντα, καθώς και η ταυτοποίηση μικροοργανισμών που εντοπίζονταν παλαιότερα στο συγκεκριμένο περιβάλλον όμως δεν είναι πλέον βιώσιμοι, πιθανώς λόγω αλλαγής των περιβαλλοντικών συνθηκών (Schabereiter-Gurtner *et al.*, 2001b). Στις ενότητες που ακολουθούν παρουσιάζεται αναλυτικότερα η στρατηγική που εφαρμόστηκε στην παρούσα μελέτη.

3.5.1 Απομόνωση DNA από νιφάδες προερχόμενες απευθείας από τις τοιχογραφίες

Όπως προαναφέρθηκε στην διαδικασία της δειγματοληψίας, μικροσκοπικές νιφάδες τοιχογραφίας, αποσπάστηκαν με τη χρήση αποστειρωμένων νυστερών και αποθηκεύθηκαν σε αποστειρωμένα falcons στους -20°C. Από αυτά, επιλέχθηκαν τρία δείγματα νιφάδων για κάθε μνημείο και αναμείχθηκαν αντίστοιχα μεταξύ τους. Στη συνέχεια και κάτω από στείρες συνθήκες και καθώς ήταν ακόμη παγωμένα, κονιορτοποιήθηκαν με τη χρήση γουδιού. Ως αποτέλεσμα της κονιορτοποίησης ήταν ένα ομογενοποιημένο δείγμα για κάθε μνημείο, με τη μορφή πούδρας, το οποίο μοιράστηκε σε αποστειρωμένα eppendorfs και αποθηκεύτηκε στους -80°C μέχρι τη χρήση τους. Το βάρος του υλικού που προέκυψε για την Κρήνη της Καλλιρόης της Πνύκας ήταν 350mg ενώ για το Ιερό του Πανός μόλις 175mg.

Για την απομόνωση του ολικού DNA από τα ανωτέρω δείγματα χρησιμοποιήθηκε το kit "NucleoSpin Soil" της εταιρίας MACHEREY-NAGEL. Πριν από την εφαρμογή του kit τα δείγματα που είχαν αποθηκευθεί στους -80°C , αφέθηκαν να ξεπαγώσουν για 3 λεπτά στον πάγο. Στη συνέχεια επαναδιαλύθηκαν σε 300μl διαλύματος πρωτεΐνης K, αναμείχθηκαν πολύ καλά με vortex και επώστηκαν για 15 ώρες στους 37°C με ανάδευση. Το διάλυμα της πρωτεΐνης K αποτελείται από 12.5mg/ml πρωτεΐνη K (HT Biotechnology Ltd.), EDTA σε συγκέντρωση 0.01M και 5% SDS. Μετά την επώαση, αφαιρέθηκε όσο το δυνατόν μεγαλύτερη ποσότητα του διαλύματος πρωτεΐνης K και ακολούθησε η απομόνωση του DNA με βάση τις οδηγίες του kit.

3.5.2 Ενίσχυση του βακτηριακού *16S rRNA* γονιδίου του ολικού DNA που απομονώθηκε απευθείας από τις νιφάδες των τοιχογραφιών με Gradient PCR

Στην διαδικασία της Gradient PCR χρησιμοποιούνται διαφορετικές θερμοκρασίες υβριδισμού των εκκινητών, προκειμένου να προσδιοριστεί η βέλτιστη δυνατή. Επίσης όταν οι θερμοκρασίες υβριδισμού είναι πιο χαμηλές είναι πιθανότερο να υβριδοποιηθούν οι εκκινητές στο *16S rRNA* γονίδιο κάποιων ειδών, παρά σε πιο αυστηρές συνθήκες, προσφέροντας έτσι μεγαλύτερη ποικιλότητα.

Οι εκκινητές στην Gradient PCR, είναι οι ίδιοι που χρησιμοποιήθηκαν και για την ενίσχυση του *16S rRNA* γονιδίου των καλλιεργήσιμων βακτηρίων, δηλαδή ο 27F (Lane *et al.*, 1991) και ο 1492R (Turner *et al.*, 1999). Ωστόσο, για την αντίδραση της Gradient PCR χρησιμοποιήθηκε η πολυμεράση *ExTaq* (TAKARA Bio Inc.). Η συγκεκριμένη πολυμεράση είναι εξαιρετικά ευαίσθητη και προσφέρει υψηλή πιστότητα, σε σχέση με τις συμβατικές *Taq* DNA πολυμεράσες. Επιπλέον έχει την ικανότητα να προσθέτει μια "αδενίνη" στα 3' άκρα των PCR προϊόντων, καθιστώντας τα κατάλληλα για απευθείας κλωνοποίηση σε T-vector.

Η αντίδραση της PCR έγινε σε τελικό όγκο 25μl και χρησιμοποιήθηκε το DNA-μήτρα που απομονώθηκε με το kit "Nucleospin Soil" (Macherey-Nagel, Germany). Στους παρακάτω πίνακες παρουσιάζονται τόσο οι ποσότητες όσο και οι συνθήκες στις οποίες πραγματοποιήθηκε η Gradient PCR και είναι οι ίδιες και για τα δύο μνημεία.

ΠΙΝΑΚΑΣ 6. Οι αρχικές και τελικές συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων της Gradient PCR με την *ExTaq* DNA πολυμεράση (TAKARA) για την ενίσχυση του *16S rRNA* γονιδίου των βακτηρίων και οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν.

| ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙ Α (TAKARA Bio Inc.) | ΑΡΧΙΚΕΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙ Σ | ΤΕΛΙΚΕΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙ Σ | ΠΟΣΟΤΗΤΕΣ / ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ για $V_{\text{τελ}}=25 \mu\text{l}$ |
|--|------------------------------|------------------------------|--|
| PCR buffer | 10X | 1X | 2,5 μl |
| dNTPs | 25mM | 250 μM | 2,5 μl |
| 27F primer | 26.9 μM | 0.5 μM | 0,46 μl |
| 1492R primer | 32.6 μM | 0.5 μM | 0,38 μl |
| <i>ExTaq</i> DNA polymerase | 5u/ μl | 2u/ μl | 0,4 μl |
| H ₂ O | | | 12,76 μl |
| DNA template | | | 6 μl |

ΠΙΝΑΚΑΣ 7. Θερμοκρασίες και χρόνοι της Gradient PCR για την ενίσχυση του *16S rRNA* γονιδίου των Βακτηρίων.

| ΣΤΑΔΙΑ | ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΕΣ | ΧΡΟΝΟΣ | } 35 κύκλοι |
|-------------------|--------------|--------|-------------|
| Αρχική αποδιάταξη | 94°C | 5min | |
| Αποδιάταξη | 94°C | 1min | |
| Υβριδισμός | 49 °C - 58°C | 30sec | |
| Επιμήκυνση | 72°C | 1.5min | |
| Τελική επιμήκυνση | 72°C | 10min | |

Όλα τα προϊόντα της Gradient PCR ελέγχθηκαν μέσω ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης. Η συγκέντρωση της αγαρόζης ήταν 0.8% και ο μάρτυρας μοριακού βάρους ήταν ο 2-Log DNA Ladder (0.1-10kb) (New England Biolabs Inc.)

3.5.3 Καθαρισμός των προϊόντων της PCR

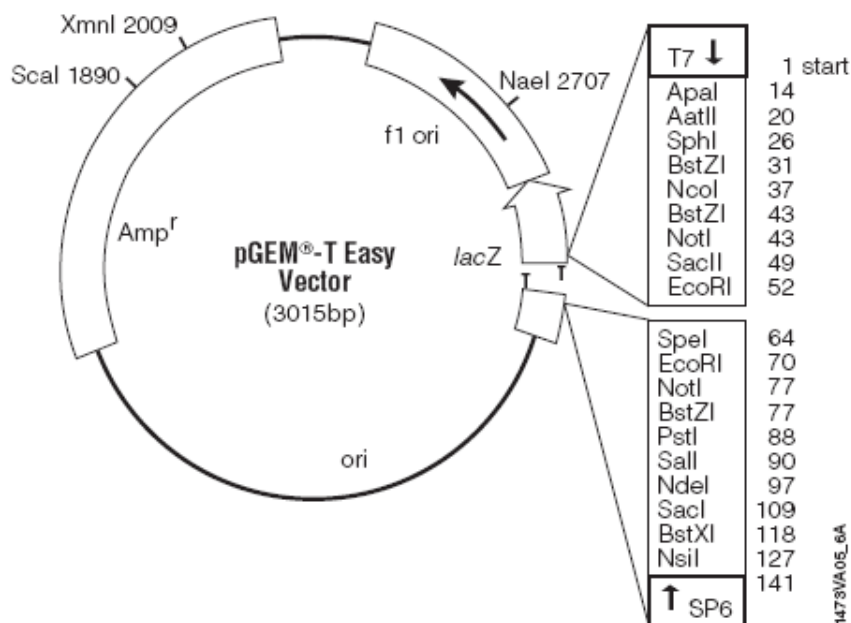
Ο καθαρισμός των προϊόντων της Gradient PCR έγινε με το kit "NucleoSpin Gel and PCR Clean-up" (Macherey-Nagel, Germany) απευθείας από το gel ώστε να διασφαλιστεί η λήψη όσο το δυνατόν ποιοτικότερου και καθαρότερου προϊόντος. Ο τελικός όγκος έκλουσης ήταν 30μl. Τα καθαρισμένα προϊόντα που είχαν προκύψει από όλες τις θερμοκρασίες υβριδισμού για κάθε μνημείο ενώθηκαν σε ένα (pooling) προκειμένου να χρησιμοποιηθούν αργότερα για κλωνοποίηση.

3.5.4 Κλωνοποίηση των PCR προϊόντων

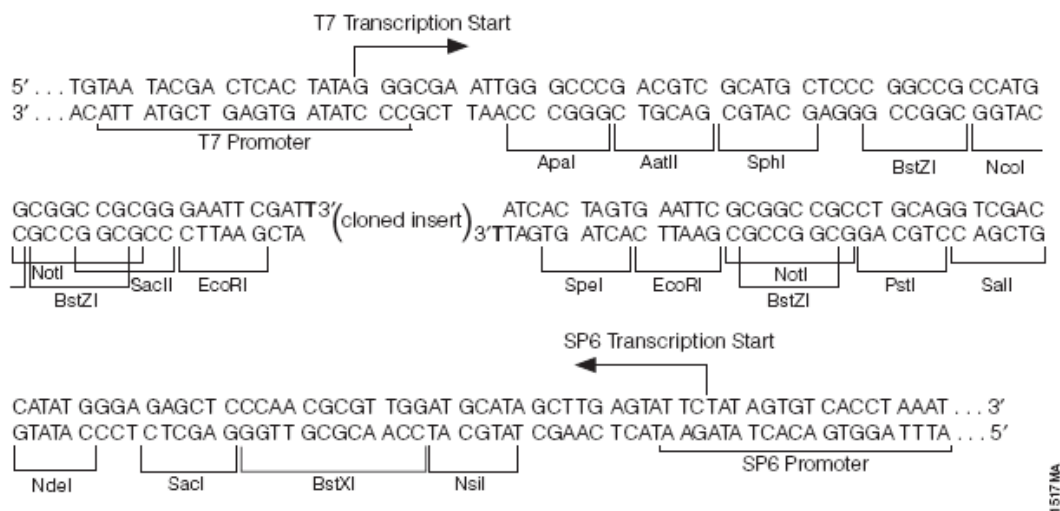
Ο στόχος της κλωνοποίησης είναι η κατασκευή μιας βιβλιοθήκης που θα περιέχει όλες τις αλληλουχίες των βακτηριακών 16S rRNA γονιδίων. Ο απώτερος σκοπός είναι η λεπτομερέστερη φυλογενετική ανάλυση των βακτηρίων που υπήρχαν στα δείγματα των τοιχογραφιών και των δύο μνημείων. Παρακάτω παρουσιάζονται αναλυτικά όλες οι διαδικασίες που πραγματοποιήθηκαν για την επίτευξη της κλωνοποίησης.

3.5.4.1 Αντίδραση λιγάσης με τον pGEM-T easy vector

Η κλωνοποίηση των προϊόντων της Gradient PCR και των δύο μνημείων, έγινε με τη χρήση του "pGEM-T easy Vector System" (Promega). Ο pGEM-T easy vector είναι γραμμικό μόριο, που στα 3' άκρα του φέρει μια ελεύθερη θυμιδίνη (T). Οι ελεύθερες θυμιδίνες αυξάνουν σε μεγάλο βαθμό την αποτελεσματικότητα της σύνδεσης του PCR ενθέματος, γιατί αποτρέπουν την επανακυκλοποίηση του πλασμιδίου. Ο pGEM-T easy vector δίνει τη δυνατότητα επιλογής ανασυνδυασμένων κλώνων μέσω μπλε-άσπρων αποικιών, αφού φέρει το *lacZ'* γονίδιο στην περιοχή του πολυσυνδέτη [Εικόνα 7]. Επιπλέον φέρει πολλαπλές θέσεις αναγνώρισης ενζύμων περιορισμού για να μπορέσει να γίνει σε δεύτερο χρόνο η εξαγωγή του ενθέματος από το πλασμίδιο. Τέλος, ένθεν κι ένθεν της περιοχής του πολυσυνδέτη φέρει τις αλληλουχίες των εκκινητών T7 και SP6 της RNA πολυμεράσης προκειμένου να γίνει η αλληλούχιση του ενθέματος [Εικόνα 8].



Εικόνα 7. Ο πλασμιδιακός χάρτης του pGEM-T easy, όπου διακρίνονται οι θέσεις αναγνώρισης ενζύμων περιορισμού (πηγή της εικόνας είναι ο εργαστηριακός οδηγός του kit της Promega "Cloning PCR Products with pGEM-T and pGEM-T Easy Vectors").



Εικόνα 8. Η περιοχή του πολυσυνδέτη του pGEM-T easy vector και οι αλληλουχίες των εκκινητών T7 και SP6 της RNA πολυμεράσης.

Η αντίδραση λιγάσης με τον pGEM-T easy vector απαιτεί να χρησιμοποιηθεί ο βέλτιστος μοριακός λόγος “ενθέματος : πλασμιδίου” (insert:vector). Η αναλογία που χρησιμοποιείται συνήθως είναι 3:1. Στη συνέχεια θα πρέπει να υπολογιστεί η ποσότητα (ng) του ενθέματος που απαιτείται για να είναι επιτυχημένη η αντίδραση λιγάσης. Αυτό γίνεται με βάση τον τύπο:

$$\{\text{ng φορέα} \times \text{μέγεθος ενθέματος (kb)}\} / \text{μέγεθος φορέα(kb)} \times \text{λόγος ενθέματος/φορέα} = \text{ng ενθέματος}$$

Ο pGEM-T easy vector έχει μέγεθος 3,015kb και παρέχεται από τον παρασκευαστή σε ποσότητα 50ng/μl. Αφού υπολογιστεί η ποσότητα του ενθέματος, μπορεί να πραγματοποιηθεί η αντίδραση λιγάσης, σύμφωνα με το πρωτόκολλο που φαίνεται στον Πίνακα 4. Σύμφωνα με τα παραπάνω δεδομένα προέκυψε πως πρέπει να προστεθούν στην αντίδραση 4μl από τα προϊόντα της Gradient PCR για την Κρήνη της Καλλιρόης της Πνύκας και 3μl από τα προϊόντα της Gradient PCR για το Ιερό του Πανός. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε και μια αντίδραση ελέγχου (*Positive control*). Στο *Positive control* χρησιμοποιήθηκε το Control Insert του προμηθευτή για να ελέγξουμε την απόδοση της αντίδρασης λιγάσης, αλλά και το κατά πόσο η διαδικασία έγινε σωστά. Το Control Insert πρόκειται για ένα τμήμα DNA 542bp που έχει μεταλλαχθεί ώστε να περιέχει πολλαπλά κωδικόνια τερματισμού στα έξι αναγνωστικά πλαίσια ανάγνωσης, εξασφαλίζοντας χαμηλό ποσοστό μπλε αποικιών.

Πίνακας 8. Ποσότητες αντιδραστηρίων για την αντίδραση λιγάσης με τον pGEM-T vector

| ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ (PROMEGA) | STANDARD REACTION | | POSITIVE CONTROL |
|---------------------------------------|-------------------|--------------|------------------|
| 2X Rapid Ligation Buffer | 5μl | | 5μl |
| pGEM-T vector (50ng) | 1μl | | 1μl |
| PCR product | 4μl από K.K | 3 μl από I.Π | - |
| Control Insert DNA | - | | 2μl |
| T4 DNA Ligase (3 Weiss units/μl) | 1μl | | 1μl |
| H ₂ O to a final volume of | 10μl | | 10μl |

- ➔ Πριν από την αντίδραση το 2X Rapid Ligation Buffer αναμιγνύεται πολύ καλά με vortex
- ➔ Οι αντιδράσεις στήνονται, όπως φαίνεται στον Πίνακα 4
- ➔ Γίνεται πολύ καλή ανάμειξη με πιπετάρισμα
- ➔ Ακολουθεί επώαση στους 4°C για 24 ώρες, για να επιτευχθεί ο μέγιστος αριθμός ανασυνδυασμένων πλασμιδίων

3.5.4.2 Μετασχηματισμός κυττάρων *E. coli* JM109 με τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια

3.5.4.2.A Τα στάδια του μετασχηματισμού

Για τον μετασχηματισμό χρησιμοποιήθηκαν τα κύτταρα *E. coli* JM109 που είχαν επεξεργαστεί με χλωριούχο ρουβίδιο και είχαν αποθηκευτεί στους -80°C. Τα στάδια της διαδικασίας του μετασχηματισμού φαίνονται παρακάτω:

- Τα tubes με τα κύτταρα να ξεπαγώνουν για 5 λεπτά μέσα σε πάγο
- Στα κύτταρα προστίθενται 5μl από το ligation mix και αναδεύονται 2-3 φορές με ελαφρύ πιπετάρισμα
- Επώαση στον πάγο για 20 λεπτά
- Μετασχηματισμός των κυττάρων με heat-shock, επωάζοντάς τα για 50 δευτερόλεπτα σε υδατόλουτρο στους 42°C ακριβώς
- Αμέσως τα κύτταρα επιστρέφονται στον πάγο και τα επωάζονται για 2 λεπτά
- Προστίθενται στα κύτταρα 900μl LB broth και επωάζονται για 1 ώρα στους 37°C με ανάδευση
- Μετά το πέρας της επώασης, επιστρώνονται 100μl σε τρυβλία με LB/αμπικιλίνη/IPTG/X-gal. Οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον παρακάτω πίνακα [Πίνακας 10]. Τα τρυβλία επωάστηκαν στους 37°C για 18 ώρες.

Πίνακας 9. Αρχικές και τελικές συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων για την επιλογή μπλε-άσπρων αποικιών

| ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ | ΑΡΧΙΚΕΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ | ΤΕΛΙΚΕΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ |
|---------------|-----------------------|-----------------------|
| Αμπικιλίνη | 100mg/ml | 100μg/ml |
| IPTG | 100mM | 0.5mM |
| X-gal | 40mg/ml | 80μg/ml |

3.5.4.2.B Προετοιμασία Δεκτικών Κυττάρων *E. coli* στέλεχος JM109

Προκειμένου να γίνουν δεκτικά τα κύτταρα *E. coli* JM109, επεξεργάστηκαν με χλωριούχο ρουβίδιο (RbCl). Αρχικά έγινε ανακαλλιέργεια μιας αποικία κυττάρων *E. coli* JM109 σε 5ml LB broth και η οποία επώαστηκε για 16 ώρες στους 37°C με ανάδευση. Τα κύτταρα *E. coli* JM109 που χρησιμοποιήθηκαν ήταν της εταιρείας Promega (JM109 Competent Cells, High Efficiency).

- Η υγρή καλλιέργεια ενοφθαλμίστηκε σε 200ml LB broth (αραίωση 1:100) και επώαστηκε στους 37°C με ανάδευση μέχρι η οπτική πυκνότητα στα 600nm να φτάσει 0.5
- Ακολούθησε επώαση της καλλιέργειας σε πάγο για 15 λεπτά
- Από κάθε καλλιέργεια, μοιράστηκαν 50ml σε 2 falcon και φυγοκεντρήθηκαν για 10 λεπτά στις 4500rpm στους 4°C
- Ακολούθησε απόρριψη του υπερκείμενου και μοιράστηκαν άλλα 50ml στα ίδια falcon και ξαναφυγοκεντρήθηκαν για 10 λεπτά στις 4500rpm στους 4°C
- Απορρίψαμε το υπερκείμενο και επαναδιαλύσαμε το ίζημα σε 12ml διαλύματος Tfb I με πιπετάρισμα
- Επώασαμε στον πάγο για 15 λεπτά
- Φυγοκεντρήσαμε για 5 λεπτά στις 4000rpm στους 4°C
- Ακολούθησε απόρριψη του υπερκείμενου και επαναδιάλυση του ιζήματος σε 2.4ml διαλύματος Tfb II με πιπετάρισμα
- Τέλος, μοιράστηκαν 200μl σε παγωμένα erpendorfs και τα αποθηκεύθηκαν στους -80°C

Τα διαλύματα Tfb I και Tfb II παρασκευάστηκαν όπως φαίνεται στους παρακάτω πίνακες [Πίνακες 11 & 12]. Στις παρενθέσεις επισημαίνονται οι τελικές συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων. Ο τελικός όγκος του Tfb I ήταν 200ml και του Tfb II ήταν 50ml.

Πίνακας 11. Οι ποσότητες των αντιδραστηρίων του διαλύματος Tfb I. Το Tfb I είχε τελικό όγκο 200ml.

| ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ Tfb I | ΠΟΣΟΤΗΤΕΣ |
|---|-----------|
| H ₂ O | 170ml |
| RbCl (100mM) | 2.99gr |
| MnCl ₂ -4H ₂ O (50mM) | 2gr |
| Potassium Acetate (30mM) | 5.88gr |
| CaCl ₂ -2H ₂ O (10mM) | 0.3gr |
| Glycerol (15% final) | 30ml |

Πίνακας 12. Οι ποσότητες των αντιδραστηρίων του διαλύματος Tfb II. Το Tfb II είχε τελικό όγκο 50ml

| ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ Tfb II | ΠΟΣΟΤΗΤΕΣ |
|---|-----------|
| H ₂ O | 40ml |
| RbCl (10mM) | 0.06gr |
| 0.2M MOPS (10mM final) | 2.5ml |
| CaCl ₂ -2H ₂ O (10mM) | 0.55gr |
| Glycerol (15% final) | 7.5ml |

Μετά την παρασκευή τους τα διαλύματα αποστειρώθηκαν με φίλτρο και αποθηκεύτηκαν στους 4°C, προστατευμένα από το φως. Επίσης για το MOPS χρησιμοποιήθηκαν 0.837gr που διαλύθηκαν σε 20ml H₂O για να έχει τελικά συγκέντρωση 0.2M.

Χρησιμοποιώντας HCl ρυθμίστηκε το pH του στο 6.5 και στη συνέχεια το αποστειρώσαμε με φίλτρο και το αποθηκεύσαμε στους 4°C.

3.5.4.2.Γ Προετοιμασία τρυβλίων Petri με LB άγαρ, Αμπικιλίνη, IPTG και X-gal

Το LB άγαρ παρασκευάζεται σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή και ακολουθεί αποστείρωση για 23 min. Μετά την ολοκλήρωση της αποστείρωσης το θρεπτικό υλικό παραμένει σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να ψυχθεί. (Απαιτείται προσοχή ώστε να μην πήξει πριν προστεθεί στα τρυβλία Petri.) Όταν η θερμοκρασία του θρεπτικού υλικού προσεγγίσει τους 45-50 °C προστίθενται αμπικιλίνη (Cαρχ.= 100mg/mL), IPTG (Cαρχ.=100mM) και X-gal (Cαρχ.= 40mg/mL) σε συγκεντρώσεις 100μg/mL, 0.5mM και 80μg/mL αντίστοιχα. Αναδεύονται με προσοχή ώστε να αποφευχθεί η δημιουργία αφρού. Το θρεπτικό υλικό με την αμπικιλίνη, το IPTG και το X-gal μοιράζεται σε τρυβλία με σταθερή ροή μέχρι να καλυφτεί η επιφάνειά τους. Ακολουθεί η σταθεροποίηση του θρεπτικού υλικού παρουσία λύχνου για την αποφυγή επιμόλυνσης. Όταν σταθεροποιηθεί, σε κάθε τρυβλίο προστίθενται 100μL καλλιέργειας και επιστρώνονται με κυκλικές κινήσεις μέσω αποστειρωμένης γυάλινης πιπέτας. Ακολουθεί overnight επώαση στους 37 °C.

3.5.4.2.Δ Έλεγχος Αποικιών

Η επιλογή των μετασχηματισμένων κλώνων αυτών δηλαδή που έχουν προσλάβει το πλασμίδιο, ανασυνδυασμένο ή μη, πραγματοποιείται με την παρουσία του αντιβιοτικού (Αμπικιλίνη στη συγκεκριμένη περίπτωση) που υπάρχει στο θρεπτικό μέσο των τρυβλίων. Η επιλογή των βακτηρίων που έχουν προσλάβει ανασυνδυασμένο πλασμίδιο βασίζεται στο γονίδιο β-γαλακτοσιδάση του οπερονίου lac. Το ένζυμο β-γαλακτοσιδάση υδρολύει την ουσία X-gal παράγοντας μια αδιάλυτη μπλε χρωστική. Η επιτυχής ένθεση του DNA στο φορέα pGEM T-Easy (εικόνα 5) διακόπτει την κωδική αλληλουχία της β-γαλακτοσιδάσης. Οι ανασυνδυασμένοι κλώνοι αναγνωρίζονται με έλεγχο του χρώματος των αποικιών. Πρόκειται για λευκές αποικίες καθώς η ένθεση προκαλεί την αδρανοποίηση της β-γαλακτοσιδάσης. Οι αποικίες που περιέχουν φορείς στους οποίους δεν έχει γίνει ένθεση DNA αποκτούν μπλε χρώμα.

3.5.4.3 Επιβεβαίωση θετικών κλώνων μετά την κλωνοποίηση

Εφόσον γίνει η διάκριση των λευκών από τις μπλέ αποικίες, κρίνεται απαραίτητος ο περαιτέρω έλεγχος των λευκών-θετικών αποικιών με ενίσχυση του ενθέματος με PCR και με πέψη με περιοριστική ενδονουκλεάση, ώστε να επιβεβαιωθεί η παρουσία του ενθέματος στα ανασυνδυασμένα πλασμίδια.

Στα τρυβλία όπου έχουν αναπτυχθεί οι αποικίες, σημειώνονται 8 εκ των λευκών και αποσπώνται με τη βοήθεια αποστειρωμένης οδοντογλυφίδας σε στείρες συνθήκες. Το επίχρισμα από κάθε οδοντογλυφίδα χρησιμοποιείται απευθείας για την επιβεβαίωση ύπαρξης του ενθέματος μέσω Colony PCR. Ωστόσο, κάθε αποικία πρώτου χρησιμοποιηθεί για την PCR ενοφθαλμίστηκε σε ένα τρυβλίο με LB agar/Amp/X-gal/IPTG χωρισμένο σε 8 τμήματα (ένα τμήμα για κάθε αποικία). Η καλλιέργεια επώαζεται overnight στους 37 °C και την επομένη οι αναπτυγμένες αποικίες ενοφθαλμίζονται σε LB Broth. Οι υγρές καλλιέργειες που προκύπτουν χρησιμοποιούνται για την επιβεβαίωση ύπαρξης του ενθέματος μέσω πέψης με περιοριστικό ένζυμο. Οι παραπάνω διαδικασίες πραγματοποιήθηκαν ξεχωριστά και για τα δύο μνημεία.

3.5.4.3.A Επιβεβαίωση με PCR

Για να επιβεβαιώσουμε πως το γονίδιο-στόχος μπήκε στον pGEM-T Easy vector, επιλέχθηκαν 8 τυχαίες λευκές αποικίες από κάθε μνημείο και ακολούθησε Colony PCR. Η διαδικασία της Colony PCR είναι απλή και η μόνη διαφορά από την κλασική PCR είναι ότι δεν έχει προηγηθεί διαδικασία εξαγωγής του DNA από τα βακτηριακά κύτταρα. Μόλις παρασκευαστεί το Master mix της αντίδρασης, μοιράζεται στα PCR tubes που περιέχουν όλα την ίδια ποσότητα H₂O και τότε με αποστειρωμένη οδοντογλυφίδα συλλέγεται μια λευκή αποικία, ενοφθαλμίζεται στο τρυβλίο με LB agar/Amp/X-gal/IPTG και αμέσως μετά ενοφθαλμίζεται και στο PCR tube. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται για όλες τις λευκές αποικίες που έχουν σημειωθεί και από τα δύο μνημεία.

Όλα τα αντιδραστήρια της Colony PCR είναι της εταιρίας Kara Biosystems. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 25 μl. Στους πίνακες που ακολουθούν παρατίθενται οι ποσότητες και οι συνθήκες της Colony PCR.

Η ύπαρξη του επιθυμητού ενθέματος κατά τη διαδικασία της Colony PCR ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR σε πήκτωμα αгарόζης 0,8%.

Πίνακας 13. Οι αρχικές και οι τελικές συγκεντρώσεις καθώς και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του βακτηριακού 16S rDNA (επιθυμητό ένθεμα) μέσω της Colony PCR, με σκοπό την επιβεβαίωση της ύπαρξής του στα ανασυνδυασμένα πλασμίδια.

| ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ (Kapa Biosystems) | ΑΡΧΙΚΕΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ | ΤΕΛΙΚΕΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ | ΠΟΣΟΤΗΤΕΣ/ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ για $V_{\text{τελ}}=25 \mu\text{l}$ |
|------------------------------------|--------------------------|--------------------------|--|
| PCR buffer | 5X | 1X | 5 μl |
| dNTPs | 25mM | 250 μM | 0,25 μl |
| 27F primer | 26.9 μM | 0.5 μM | 0,46 μl |
| 1492R primer | 32.6 μM | 0.5 μM | 0,38 μl |
| MgCl ₂ | 25mM | 2 mM | 2 μl |
| <i>Taq</i> DNA polymerase | 5u/ μl | 1u/ μl | 0,2 μl |
| H ₂ O | | | 16,71 μl |

Πίνακας 14. Συνθήκες χρόνου και θερμοκρασίας κατά την αντίδραση της Colony PCR για την επιβεβαίωση της ύπαρξης του βακτηριακού 16S rDNA (επιθυμητό ένθεμα) στα ανασυνδυασμένα πλασμίδια.

| ΣΤΑΔΙΑ | ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΕΣ | ΧΡΟΝΟΣ |
|-------------------|--------------|--------|
| Αρχική αποδιάταξη | 94°C | 5min |
| Αποδιάταξη | 94°C | 1min |
| Υβριδισμός | 57°C | 30sec |
| Επιμήκυνση | 72°C | 1.5min |
| Τελική επιμήκυνση | 72°C | 10min |

} **35 κύκλοι**

3.5.4.3.B Επιβεβαίωση με πέψη με ένζυμο περιορισμού

Οι αποικίες που είχαν "σωθεί" πριν την Colony PCR, ενοφθαλμίστηκαν με αποστειρωμένες οδοντογλυφίδες σε vials που περιείχαν 5ml LB broth (με αμπικιλίνη (5 μl αμπικιλίνη/5ml LB broth), παρουσία λύχνου. Οι υγρές καλλιέργειες επώαστηκαν στους 37°C overnight με ανάδευση. Με την ολοκλήρωση της επώασης ακολούθησε

απομόνωση των πλασμιδίων με το kit "Nucleospin Plasmid" (Macherey-Nagel, Germany).

Όπως φαίνεται και από τον πλασμιδιακό χάρτη του pGEM-T Easy vector υπάρχουν, ένθεν κι ένθεν του ενθέματος, θέσεις αναγνώρισης για το ένζυμο περιορισμού EcoRI. Βάση αυτού, πραγματοποιήθηκε μια αντίδραση πέψης για να επιβεβαιωθεί η ύπαρξη του ενθέματος στα πλασμίδια. Για την πέψη χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο EcoRI (TAKARA BIO Inc.) με συγκέντρωση 15u/μl. Η αντίδραση πέψης έγινε σε τελικό όγκο 20μl και το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε παρουσιάζεται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 15: Ποσότητες των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν για την πέψη με το ένζυμο EcoRI

| ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ (TAKARA) | ΠΟΣΟΤΗΤΕΣ (μl) |
|---------------------------|-------------------|
| H ₂ O | 7 |
| Buffer H | 2 |
| plasmid DNA | 10 |
| EcoRI | 1 |

Η αντίδραση επώαστηκε για 3 ώρες στους 37°C. Μετά το πέρας του χρόνου επώασης, η πέψη ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 0,8%.

3.5.5 Κατασκευή 16S rRNA βιβλιοθηκών

Εφόσον το ποσοστό επιτυχίας της κλωνοποίησης ελεγχθεί με τις ανωτέρω διαδικασίες και είναι ικανοποιητικό, ακολουθεί η κατασκευή των 16S rRNA βιβλιοθηκών. Σε ένα microtiter plate με 96 πηγαδάκια (wells), μοιράζονται από 200μl LB broth με αμπικιλίνη (100μg/ml) και γλυκερόλη (25%) σε κάθε ένα από αυτά. Χρησιμοποιώντας αποστειρωμένες οδοντογλυφίδες, συλλέχθηκαν οι λευκές αποικίες από τα αρχικά τρυβλία και ενοφθαλμίστηκε κάθε πηγαδάκι με έναν κλώνο. Τα microtiter plates επώαστηκαν στους 37°C για 24 ώρες (χωρίς ανάδευση) και αποθηκεύτηκαν στους -80°C. Οι 16S rRNA βιβλιοθήκες που συλλέχθηκαν φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 16: Βιβλιοθήκες 16S rRNA Βακτηρίων

| MNHMEIO | MICROTITTER PLATE |
|----------------------------|-------------------|
| Κρήνη Καλλιρόης της Πνύκας | 2 |
| Ιερό του Πανός | 2 |

3.5.6 Αλληλούχιση κλώνων *16S rRNA* βιβλιοθηκών

Για κάθε μνημείο, από τις 16S rRNA βιβλιοθήκες πραγματοποιήθηκαν 48 υγρές καλλιέργειες σε 3ml LB broth με αμπικιλίνη (100μg/ml) και επωάστηκαν στους 37°C για 16 ώρες με ανάδευση. Στη συνέχεια έγινε απομόνωση του πλασμιδιακού DNA με τη χρήση του kit "Nucleospin Plasmid" (Macherey-Nagel, Germany) και εστάλη για αλληλούχιση στην εταιρία Cemla (Τμήμα Ιστολογίας – Ιστοσυμβατότητας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας). Η αλληλούχιση όλων των κλώνων έγινε με τον εκκινητή T7.

3.5.7 Φυλογενετική ανάλυση κλώνων με εργαλεία βιοπληροφορικής

3.5.7.1 Επεξεργασία αλληλουχιών

Για να ξεκινήσει η ανάλυση των κλώνων που αλληλουχίστηκαν έπρεπε πρώτα να αφαιρεθούν οι βάσεις που ανήκουν στο πλασμίδιο κλωνοποίησης και να κρατηθεί μόνο η περιοχή που ανήκει στο *16S rRNA* γονίδιο.

Η επεξεργασία των αλληλουχιών έγινε με το πρόγραμμα "Sequence Scanner" (<http://sequencescanner.software.informer.com/>) και στη συνέχεια οι αλληλουχίες μετατράπηκαν σε μορφή fasta (προέκταση .fasta) με το πρόγραμμα "DNA baser" (<http://www.dnabaser.com/>). Από την παραπάνω επεξεργασία αποκλείστηκαν οι αλληλουχίες που δεν είχαν καλή ποιότητα ανάγνωσης, καθώς και εκείνες που είχαν μόνο την αλληλουχία του πλασμιδίου (χωρίς ένθεμα). Τελικά δημιουργήθηκε ένα αρχείο fasta, το Bacteria.fasta, το οποίο περιείχε όλες τις αλληλουχίες του *16S rRNA*, που είχαν προέλθει από Βακτήρια (θερμοκρασίες υβριδισμού 50-58°C).

3.5.7.2 Bellerophon

Όλοι οι κλώνοι ελέχθησαν για την παρουσία χμαιοτικών *16S rRNA* αλληλουχιών με το πρόγραμμα "Bellerophon" (<http://compbio.anu.edu.au/bellerophon/bellerophon.pl>). Το πρόγραμμα "Bellerophon" χρησιμοποιείται για την

ανίχνευση χιμαιρικών αλληλουχιών (χίμαιρες) σε μια βιβλιοθήκη κλώνων, που έχει δημιουργηθεί με βάση το *16S rRNA* (Huber *et al.* 2004). Οι χίμαιρες δημιουργούνται από δύο φυλογενετικά απομακρυσμένες πατρικές αλληλουχίες και αντιπροσωπεύουν μη υπάρχοντες μικροοργανισμούς (Hugenholtz & Huber 2003).

Το συγκεκριμένο πρόγραμμα απαιτεί την εισαγωγή όλων των αλληλουχιών της βιβλιοθήκης σε ένα ενιαίο αρχείο fasta, έτσι ώστε να εμπεριέχονται και οι πατρικές αλληλουχίες και να μπορέσει να εντοπίσει πιθανές χίμαιρες. Οι παράμετροι που χρησιμοποιούμε στο πρόγραμμα είναι:

- Huber-Hugenholtz correction
- 200 bp window
- Align sequences
- PCR library

Τα αποτελέσματα στέλνονται στο ηλεκτρονικό ταχυδρομείο. Όταν το preference score είναι >1 , τότε υπάρχει πιθανότητα ύπαρξης χιμαιρικής αλληλουχίας. Το πρόγραμμα υποδεικνύει επίσης, εκτός από την πιθανή χιμαιρική αλληλουχία, και τις πατρικές αλληλουχίες, αλλά και τα ποσοστά ομοιότητας της κάθε μίας με την χιμαιρική.

Ωστόσο, οι αλληλουχίες αυτές θα πρέπει να ελεγχθούν για να διαπιστώσουμε αν είναι όντως χιμαιρικές ή αν πρόκειται για απόκλιση του προγράμματος. Κάθε φορά που το πρόγραμμα υποδεικνύει τις πιθανές χίμαιρες, θα πρέπει αυτές να αφαιρούνται και η ανάλυση να επαναλαμβάνεται. Η ανάλυση σταματά όταν δεν εντοπίζεται καμία χιμαιρική αλληλουχία στη βιβλιοθήκη.

3.5.7.3 Ribosomal Database Project (RDP)

Στη βάση δεδομένων "RDP" χρησιμοποιήθηκαν 2 εργαλεία:

α) RDP Classifier (<http://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp>)

β) Sequence Match (http://rdp.cme.msu.edu/seqmatch/seqmatch_intro.jsp).

Οι παράμετροι που χρησιμοποιούμε στο RDP Classifier είναι:

- Επιλέγω γονίδιο: 16S rRNA
- Εισαγωγή αλληλουχιών σε μορφή fasta
- Το μέγεθος αλληλουχιών πρέπει να είναι πάνω από 250bp

Οι παράμετροι που χρησιμοποιούμε στο Sequence Match είναι:

- Εισαγωγή αλληλουχιών σε μορφή fasta

- Strain: Both
- Source: Both
- Size: Both
- Quality: Good
- Taxonomy: Nomenclatural
- KNN matches: 20

Το εργαλείο *RDP classifier*, είναι σε θέση να ταξινομήσει ριβοσωμικές αλληλουχίες μήκους >400b μέχρι και το ταξινομικό επίπεδο του Γένους (Genus) ακρίβεια πάνω από 88,7% (Wang *et al.*, 2007). Στα αποτελέσματα που προκύπτουν δίνεται η ταυτότητα της αλληλουχίας, το *similarity score* και το *seqmatch score*. Το *similarity score* δείχνει το ποσοστό ομοιότητας της αλληλουχίας που εξετάζουμε σε σχέση με τις αλληλουχίες που διαθέτει η βάση RDP. Το *seqmatch score* δίνει τον αριθμό των олиγομερών 7bp που είναι κοινά μεταξύ της αλληλουχίας μας και μιας RDP αλληλουχίας διαιρεμένου με τον μικρότερο αριθμό μοναδικών олиγομερών που υπάρχουν σε κάθε μια από τις δύο αλληλουχίες. Όσο η τιμή του τείνει στο 1, τόσο μεγαλύτερη είναι η ομοιότητα της αλληλουχίας με τον κοντινότερο συγγενή που εντόπισε.

3.5.7.4 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)

Με το πρόγραμμα BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) και πιο συγκεκριμένα με το "blastn", συγκρίθηκαν οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες με τις αλληλουχίες που είναι καταχωρημένες στη συγκεκριμένη βάση δεδομένων, μέσω τοπικής ομοπαράθεσης. Η εισαγωγή των αλληλουχιών στο blastn έγινε και πάλι σε μορφή fasta και οι παράμετροι ορίστηκαν ως εξής:

- Database: Others (nr etc) – Nucleotide collection (nr/nt)
- Optimize for: Highly similar sequences (megablast)

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν αξιολογήθηκαν σύμφωνα με το *MaxScore*.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

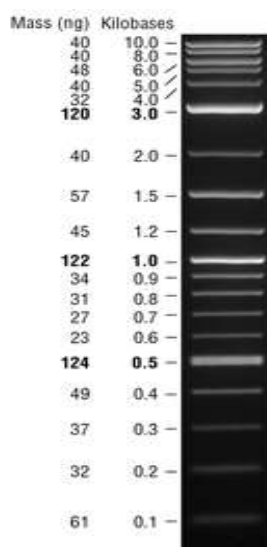
4.1 Ανάλυση των αποτελεσμάτων των καλλιιεργήσιμων βακτηρίων

Με την ολοκλήρωση των καλλιιεργειών, τόσο από το Nutrient άγαρ, όσο και από το TSA, απομονώθηκαν εικοσιπέντε βακτηριακές αποικίες βάση διαφορετικού χρώματος, υφής και μεγέθους. Από αυτές, οι εικοσιτέσσερις απομονώθηκαν από τα δείγματα προερχόμενα από την Κρήνη της Καλλιρόης της Πνύκας και μόλις μια από το Ιερό του Πανός. Το Ιερό του Πανός αποδείχθηκε εξαιρετικά φτωχό σε καλλιιεργήσιμη βακτηριακή ποικιλότητα. Το αποτέλεσμα αυτό ωστόσο, αφορά μόνο την περίοδο της δειγματοληψίας και μπορεί να διαφοροποιηθεί ανάλογα με τις συνθήκες που επικρατούν στο περιβάλλον του μνημείου και με τους παράγοντες που αναφέρθηκαν στην ενότητα «Βιοαλλοίωση τοιχογραφιών».

Τα βακτηριακά στελέχη των παραπάνω αποικιών, επεξεργάστηκαν με μεθόδους που θα περιγραφούν παρακάτω, με σκοπό την ταυτοποίησή τους, αλλά και τη συσχέτισή τους με το φαινόμενο της βιοαλλοίωσης.

4.1.1 Ενίσχυση του 16S rRNA γονιδίου με PCR και καθαρισμός των προϊόντων της PCR

Μετά το πέρας της αντίδρασης για την ενίσχυση του *16S rRNA* γονιδίου των βακτηρίων, 6μl από κάθε προϊόν, ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αгарόζης 0,8% w/v. Ως μάρτυρας μοριακού βάρους χρησιμοποιήθηκε ο 2-Log DNA Ladder (0.1-10 kb) (New England Biolabs Inc) [Εικόνα 9]. Το αναμενόμενο προϊόν υπολογίζεται στις 1500bp [Εικόνα 10].

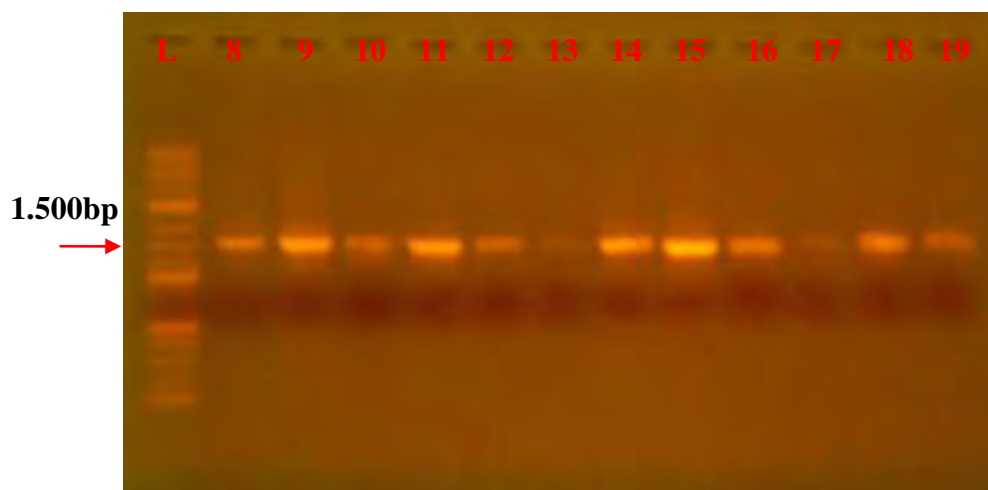


Εικόνα 9. 1.0 μg του 2-Log DNA Ladder οπτικοποιημένο με τη χρήση βρωμιούχου αιθιδίου, σε 1.0% TBE gel αгарόζης.



Εικόνα 10. Ενίσχυση του *16S rRNA* γονιδίου καλλιεργήσιμων βακτηρίων. Στο πήκτωμα απεικονίζονται, από αριστερά προς δεξιά: ο μάρτυρας μοριακού βάρους, το ενισχυμένο *16S rRNA* (1500bp) γονίδιο, 5 βακτηρίων που απομονώθηκαν από την Κρήνη της Καλλιρόης της Πνύκας και το αρνητικό control. Στο αρνητικό control δεν εντοπίζεται ζώνη DNA κάτι που επιβεβαιώνει την μη επιμόλυνση της αντίδρασης.

Μόλις ολοκληρώθηκε η ενίσχυση του *16S rRNA* γονιδίου και η ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της αντίδρασης, των εικοσιτεσσάρων συνολικά βακτηρίων, ακολούθησε ο καθαρισμός τους με το kit "NucleoSpin Gel and PCR Clean-up" (Macherey-Nagel, Germany). Η διαδικασία αυτή κρίνεται απαραίτητη, ώστε τα προϊόντα της PCR να καταστούν κατάλληλα για αλληλούχιση. Μετά τον καθαρισμό, φορτώνονται ξανά 4μl από κάθε καθαρισμένο προϊόν, για να διαπιστωθεί ότι η διαδικασία έγινε σωστά [Εικόνα 11].

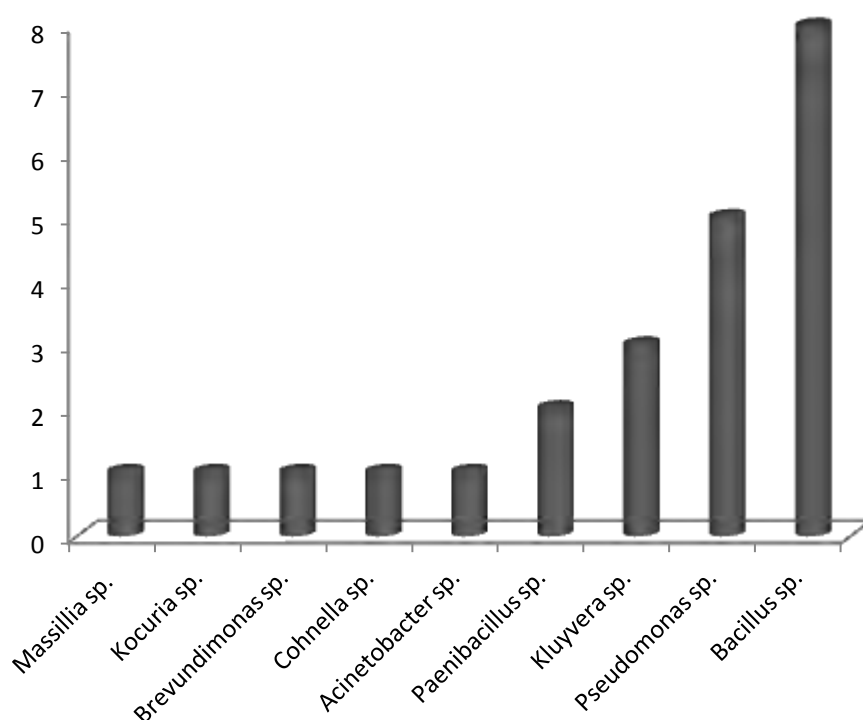


Εικόνα 11. Καθαρισμός των προϊόντων της PCR. Στο πήκτωμα απεικονίζονται από αριστερά προς τα δεξιά: ο μάρτυρας μοριακού βάρους, δώδεκα από τα καθαρισμένα προϊόντα της PCR (από το 8 ως το 19), από τα οποία το τελευταίο (19) ανήκει στο μοναδικό βακτήριο που απομονώθηκε από το Ιερό του Πανός.

4.1.2 Ανάλυση των αλληλουχιών με προγράμματα Βιοπληροφορικής

Και τα 24 καθαρισμένα προϊόντα της PCR, στάλθηκαν προς αλληλούχιση με τον εκκινητή 1492R και προέκυψαν τμήματα DNA από 507bp-739bp. Κατά την ανάλυση των αλληλουχιών με το "Sequence Scanner™ v1.0" (Applied Biosystems), απορρίφθηκε μια εκ των εικοσιτεσσέρων λόγω κακής ποιότητας ανάγνωσης. Όλες οι αλληλουχίες αναλύθηκαν μία προς μία με τα προγράμματα RDP και BLAST.

Με τη χρήση του εργαλείου RDP *Classifier* (της βάσης ριβοσωμικών αλληλουχιών RDP) όλες οι αλληλουχίες των καλλιεργήσιμων βακτηρίων ταξινομήθηκαν σε εννέα διαφορετικά βακτηριακά γένη. Τα βακτηριακά γένη καθώς και ο αριθμός των αλληλουχιών που εντάσσονται σε αυτά παρουσιάζονται στο παρακάτω γράφημα [Γράφημα 1].



Γράφημα 1. Στον οριζόντιο άξονα παρουσιάζονται τα εννέα διαφορετικά γένη στα οποία ταξινομούνται οι αλληλουχίες των καλλιεργήσιμων βακτηρίων και στον οριζόντιο άξονα ο αριθμός των αλληλουχιών που περιλαμβάνεται σε κάθε γένος.

Οι 22 από τις 23 αλληλουχίες ανήκουν σε βακτήρια που απομονώθηκαν από την Κρήνη της Καλλιρόης της Πνύκας και με βάση τα αποτελέσματα της ανάλυσης με το RDP και το BLAST προκύπτουν τα εξής:

I. *Bacillus* sp. : Επτά από τις αλληλουχίες ταξινομήθηκαν στο γένος *Bacillus* sp., ενώ τέσσερεις από αυτές ταυτοποιήθηκαν και σε επίπεδο είδους με τη βοήθεια του BLAST. Δύο αλληλουχίες ανήκουν στο είδος *Bacillus cereus*, μια αλληλουχία στο είδος *Bacillus amyloliquefacien* και μία στο είδος *Bacillus thuringiensis*.

| ΔΕΙΓΜΑ | RDP (Classifier) | BLAST DESCRIPTION | IDENTITY (%) | QUERY COVERAGE (%) | GENBANK ACCESSION NUMBER |
|--------|---------------------|--|-----------------|--------------------------|--------------------------------|
| S_2 | <i>Bacillus</i> sp. | <i>Bacillus</i> sp. NM2 | 99,8 | 100 | KJ162135.1 |
| S_10 | <i>Bacillus</i> sp. | <i>Bacillus thuringiensis</i> strain S10602 | 100 | 100 | KF956558.1 |
| S_11 | <i>Bacillus</i> sp. | <i>Bacillus</i> sp. K4-10 | 100 | 100 | KJ161417.1 |
| S_14 | <i>Bacillus</i> sp. | <i>Bacillus</i> sp. G4-1 | 100 | 100 | GQ927166.1 |
| S_19 | <i>Bacillus</i> sp. | <i>Bacillus amyloliquefacien</i> strain V3 | 100 | 100 | KJ123715.1 |
| S_4 | <i>Bacillus</i> sp. | <i>Bacillus cereus</i> strain MVK04 | 100 | 100 | KJ399985.1 |
| S_20 | | | | | |

Το γένος *Bacillus* sp. ανήκει στην συνομοταξία Firmicutes και η περιγραφή του έγινε από τον Cohn το 1872 (Cohn, 1872). Τα μέλη του γένους είναι Gram-θετικά, ραβδοειδή βακτήρια με ευρεία διασπορά στη φύση. Σύμφωνα με τη βάση δεδομένων LPSN (Euzéby, 1997), στο λήμμα *Bacillus* περιλαμβάνονται 288 είδη του γένους. Στην παρούσα μελέτη καλλιεργήθηκαν και απομονώθηκαν πέντε βακτήρια που ταξινομήθηκαν σύμφωνα με το RDP Classifier στο γένος *Bacillus* sp. και τέσσερα από αυτά ταυτοποιήθηκαν, με τη βοήθεια του BLAST, με τα είδη *Bacillus amyloliquefacien* (S_19), *Bacillus cereus* (S_4,S_20) και *Bacillus thuringiensis* (S_10), με ποσοστό ομοιότητας ίσο με 100% (ID=100%). Το είδος *Bacillus amyloliquefacien* έχει απομονωθεί κυρίως από χώμα και βιομηχανικές ζυμώσεις αμυλάσης (Priest *et al.*, 1987). Τα είδη *Bacillus cereus* και *Bacillus thuringiensis* είναι εξαιρετικά συγγενικά μεταξύ τους, σε βαθμό που τίθεται το δίλημμα πως θα έπρεπε να αντιμετωπίζονται ως ένα και το αυτό (Helgason *et al.*, 2000). Και τα δύο είδη αποτελούν βακτήρια του εδάφους και έχουν απομονωθεί από ποικίλα περιβάλλοντα (Helgason *et al.*, 2000; Phyllis *et al.*, 1989).

II. *Pseudomonas* sp.: Πέντε αλληλουχίες ταξινομήθηκαν στο γένος *Pseudomonas* sp., ενώ καμία από αυτές δεν μπόρεσε να ταυτοποιηθεί σε επίπεδο είδους.

| ΔΕΙΓΜΑ | RDP (Classifier) | BLAST DESCRIPTION | IDENTITY (%) | QUERY COVERAGE (%) | GENBANK ACCESSION NUMBER |
|--------|----------------------------------|---|-----------------|--------------------------|--------------------------------|
| S_3 | <i>Pseudomonas</i> <i>sp.</i> | <i>Pseudomonas</i> sp. <i>JD19</i> | 100 | 100 | KJ191406.1 |
| S_5 | <i>Pseudomonas</i> <i>sp.</i> | <i>Uncultured</i> <i>Pseudomonas</i> sp. | 100 | 100 | HG934348.1 |
| S_6 | <i>Pseudomonas</i> <i>sp.</i> | <i>Pseudomonas</i> sp. <i>F-278</i> | 100 | 100 | HG764746.1 |
| S_9 | <i>Pseudomonas</i> <i>sp.</i> | <i>Pseudomonas</i> sp. <i>F-278</i> | 100 | 100 | HG764746.1 |
| S_21 | <i>Pseudomonas</i> <i>sp.</i> | <i>Pseudomonas</i> sp. <i>JD23</i> | 100 | 100 | KJ191409.1 |

Σύμφωνα με τη βάση δεδομένων LPSN, η ψευδομονάδα είναι ένα γένος Gram-αρνητικών αερόβιων γάμμα-πρωτεοβακτηρίων, που ανήκει στην οικογένεια *Pseudomonadaceae* και περιέχει 213 πλήρως αναγνωρισμένα είδη (Euzéby, 1997). Τα μέλη του γένους επιδεικνύουν μεγάλη μεταβολική ποικιλότητα, και ως εκ τούτου είναι σε θέση να αποικίσουν ένα ευρύ φάσμα υποστρωμάτων (Madigan, 2005). Δεδομένου ότι οι ψευδομονάδες έχουν την ικανότητα να μεταβολίζουν μια ποικιλία θρεπτικών συστατικών, σε συνδυασμό με την ικανότητα να σχηματίζουν βιοφίλμ καθίστανται δυνατές να επιβιώσουν σε μια ποικιλία από απροσδόκητα ενδιαιτήματα. Μια απλή πηγή άνθρακα, όπως υπολείμματα σαπουνιού, είναι το κατάλληλο μέρος για να ευδοκιμήσουν. Άλλα απίθανα μέρη όπου έχουν βρεθεί περιλαμβάνουν αντισηπτικά, όπως ενώσεις τεταρτοταγούς αμμωνίου, και εμφιαλωμένο μεταλλικό νερό (Ryan, 2004).

III. *Kluyvera sp.*: Τρεις αλληλουχίες ταξινομήθηκαν στο γένος *Kluyvera sp.* και ταυτοποιήθηκαν με το είδος *Kluyvera intermedia*, ενώ με ποσοστό ομοιότητας 100% ταυτίζονται όλες με ίδιο στέλεχος.

| ΔΕΙΓΜΑ | RDP (Classifier) | BLAST DESCRIPTION | IDENTITY (%) | QUERY COVERAGE (%) | GENBANK ACCESSION NUMBER |
|--------|-------------------------------|---|-----------------|--------------------------|--------------------------------|
| S_12 | | | | | |
| S_17 | <i>Kluyvera</i> <i>sp.</i> | <i>Kluyvera intermedia</i> <i>strain 256</i> | 100 | 100 | NR_028802.1 |
| S_23 | | | | | |

Το γένος *Kluyvera sp.* προτάθηκε ως ένα νέο γένος που προηγουμένως περιλάμβανε μια ομάδα βακτηρίων γνωστή ως *Enteric Group 8*. Τα μέλη του γένους *Kluyvera sp.* περιγράφονται ως Gram-αρνητικά, ραβδοειδή βακτήρια που ανάγουν το νιτρικό σε νιτρώδες και ζυμώνουν τα σάκχαρα παράγοντας μεγάλες ποσότητες ακετογλουταρικού οξέως και άλλων αερίων. Βακτήρια που ανήκουν στο γένος αυτό, έχουν απομονωθεί από έδαφος, νερό, αποχετεύσεις, τρόφιμα και ανθρώπινα κλινικά δείγματα (Farmer *et al.*, 1981). Το είδος *Kluyvera intermedia* είναι το νεότερο συνώνυμο του είδους *Enterobacter intermedius*, περιγράφεται ως ένα Gram-αρνητικό, δυνητικά αναερόβιο, χημειοργότροφο βακτήριο και με τους δύο τύπους μεταβολισμού (αναπνή και ζύμωση). Οι αποικίες που δημιουργεί είναι κυκλικές, κυρτές, γκριζωπές και λείες στο Nutrient agar και οι βέλτιστες θερμοκρασίες ανάπτυξης του είναι 30°C-37°C. Το είδος *Kluyvera intermedia* έχει απομονωθεί από μαλάκια, υδάτινες επιφάνειες, έδαφος αλλά και ανθρώπινα κλινικά δείγματα συμπεριλαμβανομένων των κοπράνων, του αίματος, τις πληγές, τη χολή και την χοληδόχο κύστη (Pavan *et al.*, 2005)

IV. *Paenibacillus sp.*: Δύο από τις εικοσιτρείς αλληλουχίες ταξινομήθηκαν στο γένος *Paenibacillus sp.* και μία από αυτές ταυτοποιήθηκε με το είδος *Paenibacillus lautus*, με ποσοστό ομοιότητας 100% στις 619 βάσεις.

| ΔΕΙΓΜΑ | RDP (Classifier) | BLAST DESCRIPTION | IDENTITY (%) | QUERY COVERAGE (%) | GENBANK ACCESSION NUMBER |
|--------|--------------------------|---|-----------------|--------------------------|--------------------------------|
| S_13 | <i>Paenibacillus sp.</i> | <i>Paenibacillus sp.</i> <i>ITCr59</i> | 100 | 100 | FR823415.1 |
| S_16 | <i>Paenibacillus sp.</i> | <i>Paenibacillus lautus</i> <i>strain UTM106</i> | 100 | 100 | KF952567.1 |

Το γένος *Paenibacillus sp.* προτάθηκε αρχικά από τους Ash *et al.* (Ash *et al.*, 1993) σε μια προσπάθεια αναταξινόμησης μιας ομάδας βακτηρίων που μέχρι τότε εντάσσονταν στο γένος *Bacillus sp.*, η αναταξινόμηση βασίστηκε κυρίως στα αποτελέσματα της ανάλυσης του *16S rRna* γονιδίου. Η εκτενής περιγραφή του γένους έγινε από τους Shida *et al.* (Shida *et al.*, 1997). Τα μέλη του *Paenibacillus sp.* είναι αερόβια ή δυνητικά αναερόβια Gram-θετικά βακτήρια και έχουν απομονωθεί από διάφορα περιβάλλοντα όπως χώμα, νερό, ρίζες φυτών, προνύμφες εντόμων, παγετώνες καθώς και από κλινικά δείγματα (Lal and Tabacchioni, 2009; McSpadden 2004; Montes *et al.*, 2004; Ouyang *et al.*, 2008). Επιπλέον, μέλη του γένους *Paenibacillus sp.* βρέθηκε πως αποχρωματίζουν αζωτούχες χρωστικές (Meehan *et al.*, 2001). Στην παρούσα μελέτη η μία από τις δύο αλληλουχίες που ταξινομήθηκαν στο *Paenibacillus sp.*, ταυτοποιήθηκε με το είδος *Paenibacillus lautus*, με ποσοστό ομοιότητας 100%. Το *Paenibacillus lautus*, αρχικά είχε ταξινομηθεί ως *Bacillus lautus* και πρόκειται για ένα βακτηριακό είδος που απομονώθηκε τόσο από περιβαλλοντικά δείγματα όπως χώμα, όσο και από κλινικά δείγματα (Nakamura, 1984). Το 1996 ωστόσο, οι Heynderickx *et al.*, αναταξινόμησαν το *Bacillus lautus* στο γένος *Paenibacillus sp.* έτσι, το είδος *Paenibacillus lautus* περιγράφεται ως κινητό, δυνητικά αναερόβιο, Gram-θετικό, ραβδοειδές βακτήριο, που σχηματίζει ελλειψοειδή σπόρια. Είναι ικανό να αναπτύσσεται σε κοινά θρεπτικά υλικά όπως το Nutrient agar δημιουργώντας κυκλικές, ελαφρώς κυρτές, γκριζωπές αποικίες (Heynderickx *et al.*, 1996). Τα παραπάνω μορφολογικά χαρακτηριστικά των αποικιών *Paenibacillus lautus*, επιβεβαιώνουν ως ένα βαθμό την ταυτοποίηση που έγινε με τη βοήθεια του BLAST.

V. *Acinetobacter sp.*: Μία από τις εικοσιτρείς αλληλουχίες ταξινομήθηκε στο γένος *Acinetobacter sp.* και ταυτοποιήθηκε με την βοήθεια του BLAST με το είδος *Acinetobacter lwoffii*, με ποσοστό ομοιότητας 100% στις 595 βάσεις.

| ΔΕΙΓΜΑ | RDP (Classifier) | BLAST DESCRIPTION | IDENTITY (%) | QUERY COVERAGE (%) | GENBANK ACCESSION NUMBER |
|--------|--------------------------|---|--------------|--------------------|----------------------------|
| S_22 | <i>Acinetobacter sp.</i> | <i>Acinetobacter lwoffii</i> strain GY-24 | 100 | 100 | KC816553.1 |

Στην παρούσα μελέτη καλλιεργήθηκε ένα βακτήριο το οποίο σύμφωνα με το RDP Classifier, ταξινομήθηκε στο γένος *Acinetobacter sp.* και ταυτοποιήθηκε με το είδος *Acinetobacter lwoffii*, με ποστό ομοιότητας 100%. Τα μέλη του γένους *Acinetobacter sp.* είναι υποχρεωτικά αερόβιοι, Gram-αρνητικοί κοκκοβάκιλοι και δημιουργούν λείες, βλεννώδεις, γκριζωπές αποικίες στα στερεά θρεπτικά υλικά (Berezin and Towner, 1996). Το είδος *Acinetobacter lwoffii* είχε ταξινομηθεί αρχικά ως *Moraxella lwoffii* και έχει απομονωθεί από κλινικά δείγματα ανθρώπων και ποντικών, ενώ αποτελεί ένας από τους πιο διαδεδομένους παράγοντες αλλοίωσης των τροφίμων (Berezin and Towner, 1996; Philippe *et al.*, 1986; Zavros *et al.*, 2002; Towner, 1996)

VI. *Brevundimonas sp.*: Μία από τις εικοσιτρείς αλληλουχίες ταξινομήθηκε στο γένος *Brevundimonas sp.*, ενώ δεν μπόρεσε να ταυτοποιηθεί περεταίρω στο επίπεδο του είδους.

| ΔΕΙΓΜΑ | RDP (Classifier) | BLAST DESCRIPTION | IDENTITY (%) | QUERY COVERAGE (%) | GENBANK ACCESSION NUMBER |
|--------|--------------------------|---|--------------|--------------------|----------------------------|
| S_15 | <i>Brevundimonas sp.</i> | <i>Brevundimonas sp.</i> U1369-101122-SW160 | 100 | 100 | JQ082144.1 |

Το γένος *Brevundimonas sp.* προτάθηκε το 1994 από τους Segers *et al.*, σύμφωνα με τους οποίους, περιλαμβάνει κοντά ραβδοειδή αερόβια βακτήρια. Τα μέλη του γένους *Brevundimonas sp.* είναι ετερότροφα βακτήρια με μεταβολισμό που ακολουθεί αυστηρά την αναπνευστική οδό. Το εύρος των ιδανικών θερμοκρασιών ανάπτυξης είναι 30°C-37°C (Segers *et al.*, 1994; Abraham *et al.*, 1999). Είδη του γένους *Brevundimonas sp.*, έχουν απομονωθεί από περιβαλλοντικά δείγματα

χώματος, βιολογικών καθαρισμών και υδάτινων βιοτόπων, καθώς και από κλινικά δείγματα (Yoon J.-H. *et al.*, 2007; Ryu *et al.*, 2007; Abraham *et al.*, 2010; Estrela and Abraham, 2010).

VII. *Cohnella sp.*: Μια εκ των εικοσιτριών αλληλουχιών ταξινομήθηκε στο γένος *Cohnella sp.* και ταυτοποιήθηκε με το είδος *Cohnella formosensis*, με ποσοστό 98,6% στις 588 βάσεις.

| ΔΕΙΓΜΑ | RDP (Classifier) | BLAST DESCRIPTION | IDENTITY (%) | QUERY COVERAGE (%) | GENBANK ACCESSION NUMBER |
|--------|---------------------|---------------------------------------|-----------------|--------------------------|--------------------------------|
| S_8 | <i>Cohnella sp.</i> | <i>Cohnella formosensis strain CC</i> | 99 | 100 | NR_109515.1 |

Το γένος *Cohnella sp.*, προτάθηκε πρώτη φορά το 2006 από τους Kampfer *et al.* (Kampfer *et al.*, 2006) και περιγράφηκε και από τους Garcia-Fraile *et al.* το 2008 (Garcia-Fraile *et al.*, 2008). Τα μέλη του γένους *Cohnella sp.* είναι Gram-θετικά ή Gram αρνητικά, αερόβια και δυνητικά αναερόβια, ραβδοειδή βακτήρια που παράγουν ενδοσπόρια. Σύμφωνα με τη βάση δεδομένων LPSN (Euzéby, 1997), στο λήμμα *Cohnella* περιλαμβάνονται 22 γνωστά είδη του γένους, τα περισσότερα από τα οποία είναι ξυλανολυτικά και έχουν απομονωθεί από περιβαλλοντικά δείγματα όπως χώμα, ρίζες φυτών, υγρότοπους και τρεχούμενο νερό (Khianngam *et al.*, 2010). Στην παρούσα μελέτη καλλιεργήθηκε και απομονώθηκε ένα βακτήριο, το οποίο ταυτοποιήθηκε με το είδος *Cohnella formosensis*, με ποσοστό ομοιότητας 98,6%. Το είδος αυτό απομονώθηκε από την επιφάνεια της ρίζας του φυτού *Medicago sativa* L στην Ταιβάν και πρόκειται για ένα αερόβιο Gram-θετικό, ξυλανολυτικό βακτήριο (Hameed *et al.*, 2013).

VIII. *Kocuria sp.*: Μία από τις εικοσιτρείς αλληλουχίες ταξινομήθηκε στο γένος *Kocuria sp.* και ταυτοποιήθηκε με το είδος *Kocuria rosea*, με ποσοστό ομοιότητας 100% στις 507 βάσεις.

| ΔΕΙΓΜΑ | RDP (Classifier) | BLAST DESCRIPTION | IDENTITY (%) | QUERY COVERAGE (%) | GENBANK ACCESSION NUMBER |
|--------|-------------------|------------------------------------|-----------------|--------------------------|--------------------------------|
| S_7 | <i>Kocuria sp</i> | <i>Kocuria rosea</i> , strain 5 | 100 | 100 | KF923415.1 |

Τα μέλη του γένους *Kocuria sp* είναι Gram-θετικά κοκκοειδή βακτήρια. Όλα τα μέλη του γένους είναι αερόβια και χημειοργανότροφα (Stackebrand *et al.*, 1995). Σύμφωνα με τη βάση δεδομένων LPSN (Euzéby, 1997), στο λήμμα *Kocuria* περιλαμβάνονται 19 γνωστά είδη του γένους. Στην παρούσα μελέτη, καλλιεργήθηκε και απομονώθηκε ένα βακτήριο που ταυτοποιήθηκε με το είδος *Kocuria rosea*, με ποσοστό ομοιότητας 100%. Η παραπάνω ταυτοποίηση με τη βοήθεια του BLAST, επιβεβαιώνεται ως ένα βαθμό και από τα μορφολογικά χαρακτηριστικά της αποικίας που είχε αναπτυχθεί κατά την καλλιέργειά του βακτηρίου στο Nutrient agar. Οι ροζ, κυκλικές, ελαφρώς κυρτές και λείες αποικίες είναι χαρακτηριστικές του είδους (Stackebrand *et al.*, 1995). Έχει βρεθεί πως το είδος *Kocuria rosea* είναι ικανό να προκαλέσει τον αποχρωματισμό ευρέως διαδεδομένων χρωστικών όπως ο μαλαχίτης, αζωτούχων χρωστικών, χρωστικών τριφαινυλομεθανίου και βιομηχανικών χρωστικών (π.χ cotton blue, methyl orange, reactive blue 25, direct blue-6, reactive yellow 81, and red HE4B) (Parshetti *et al.*, 2006).

IX. *Massilia sp.*: Μία από τις εικοσιτρείς αλληλουχίες ταξινομήθηκε στο γένος *Massilia sp.* και ταυτοποιήθηκε με το είδος *Massilia timonae*, με ποσοστό ομοιότητας 99,6% στις 609 βάσεις.

| ΔΕΙΓΜΑ | RDP (Classifier) | BLAST DESCRIPTION | IDENTITY (%) | QUERY COVERAGE (%) | GENBANK ACCESSION NUMBER |
|--------|---------------------|-------------------------|-----------------|--------------------------|--------------------------------|
| S_1 | <i>Massilia sp.</i> | <i>Massilia timonae</i> | 99,6 | 100 | EU730926.1 |

Στην παρούσα μελέτη καλλιεργήθηκε και απομονώθηκε ένα βακτήριο, του οποίου η 16S rDNA αλληλουχία ταξινομήθηκε σύμφωνα με το RDP Classifier στο γένος *Massilia sp.* και παρουσίασε 99,6% ποσοστό ομοιότητας με το είδος *Massilia timonae*. Το είδος *Massilia timonae* περιγράφηκε για πρώτη φορά από τους La Scola *et al.* το 1998, όταν ένα αργά αναπτυσσόμενο, ραβδοειδές, Gram-αρνητικό βακτήριο απομονώθηκε από αιμοκαλλιέργεια ανοσοκατεσταλμένου ασθενούς. Μετά από φαινοτυπικές και γενοτυπικές μελέτες, οι ερευνητές πρότειναν την ύπαρξη ενός νέου

βακτηριακού είδους, το *Massilia timonae*, που εντάσσεται σε ένα νέο βακτηριακό γένος το *Massilia sp.* (La Scola *et al.*, 1998). Πρόκειται λοιπόν για ένα αυστηρά αερόβιο βακτήριο με πρωτεολυτική δράση, του οποίου οι αποικίες σε στερεά θρεπτικά υλικά είναι υπόλευκες και νηματοειδείς, ενώ δημιουργεί ζελατινώδη μορφώματα στα υγρά θρεπτικά υλικά. Οι βέλτιστες θερμοκρασίες ανάπτυξης είναι 25-35°C (La Scola *et al.*, 1998; Lindquist *et al.*, 2003). Μέχρι σήμερα μέλη του γένους *Massilia sp.* έχουν απομονωθεί τόσο σε κλινικά δείγματα, όσο και σε περιβαλλοντικά δείγματα όπως χώμα και πόσιμο νερό (Lindquist *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2006; Gallego *et al.*, 2006). Το είδος *Massilia timonae*, που απομονώθηκε από αλλοιωμένα ιστορικά έγγραφα, βρέθηκε πως έχει βιοαλλοιωτική δράση (Kraková *et al.*, 2012).

Μια από τις συνολικά 24 αλληλουχίες καλλιεργήσιμων βακτηρίων, προήρθε από βακτήριο που απομονώθηκε από το Ιερό του Πανός και από την ανάλυσή της με το RDP Classifier και το Blast προέκυψαν τα εξής:

| ΔΕΙΓΜΑ | RDP (Classifier) | BLAST DESCRIPTION | IDENTITY (%) | QUERY COVERAGE (%) | GENBANK ACCESSION NUMBER |
|--------|---------------------|-------------------------------------|-----------------|--------------------------|--------------------------------|
| S_18 | <i>Bacillus sp.</i> | <i>Bacillus cereus</i> strain C5 | 100 | 100 | KJ156984.1 |

Το είδος αυτό, περιγράφηκε και παραπάνω, καθώς απομονώθηκε και από την Κρήνη της Καλλιρόης της Πνύκας.

Συνοπτικά, από τις 23 αλληλουχίες καλλιεργήσιμων βακτηρίων που μελετήθηκαν, όλες ταυτοποιήθηκαν σε επίπεδο γένους ενώ, οι 13 από αυτές ταυτοποιήθηκαν και στο επίπεδο του είδους, με ποσοστά ομοιότητας $99\% < ID < 100\%$. Τα είδη που απομονώθηκαν και καλλιεργήθηκαν είναι τα εξής: *Bacillus cereus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus thuringiensis*, *Massilia timonae*, *Kocuria rosea*, *Cohnella formosensis*, *Acinetobacter lwoffii*, *Paenibacillus lautus*, *Kluyvera intermedia*.

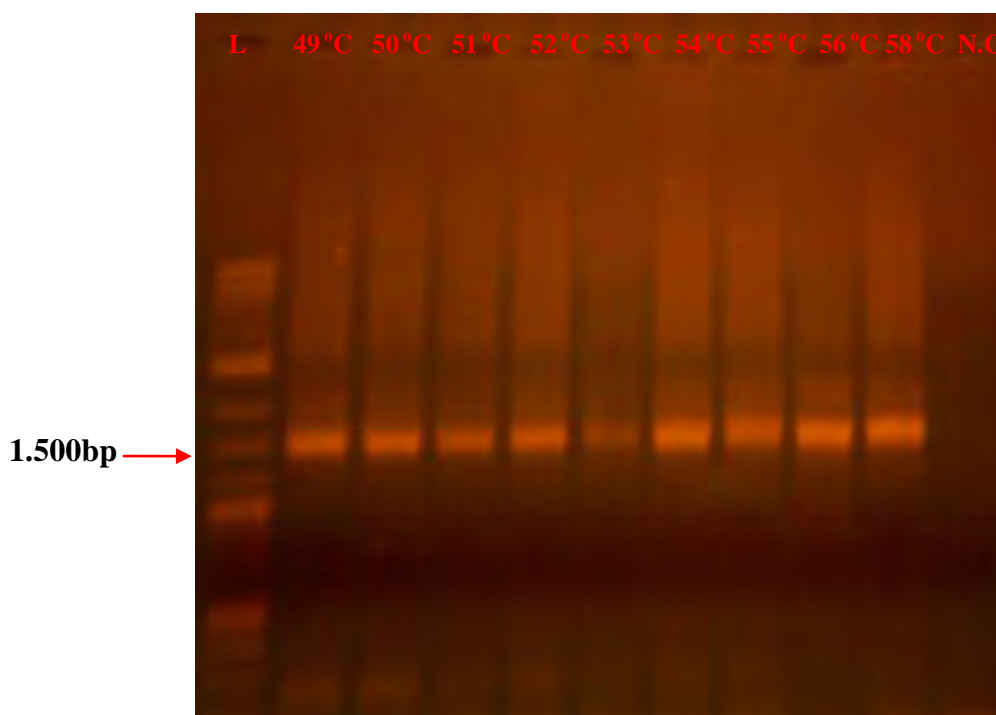
Είναι φανερό, πως οι περισσότερες αλληλουχίες ανήκουν στο γένος *Bacillus sp.*, όπως και το μοναδικό καλλιεργήσιμο βακτήριο που απομονώθηκε από το Ιερό του Πανός. Η κυριαρχία των μελών του γένους *Bacillus sp.* επί της υπόλοιπης βακτηριακής χλωρίδας των μνημείων, τουλάχιστον όσον αφορά τα καλλιεργήσιμα βακτήρια, μπορεί να εξηγηθεί από την ικανότητα των Βακίλλων να επιβιώνουν με την μορφή σπορίων. Μικρός πληθυσμός Βακίλλων που είναι παρόντες σε μια

χρονική στιγμή σε ένα μικροπεριβάλλον, μπορεί α δώσει εξαιρετικά μεγάλο αριθμό σπορίων, τα οποία θα επιβιώσουν μέχρι να δημιουργηθούν οι κατάλληλες για να βλαστήσουν (Gorbushina *et al.*, 2004).

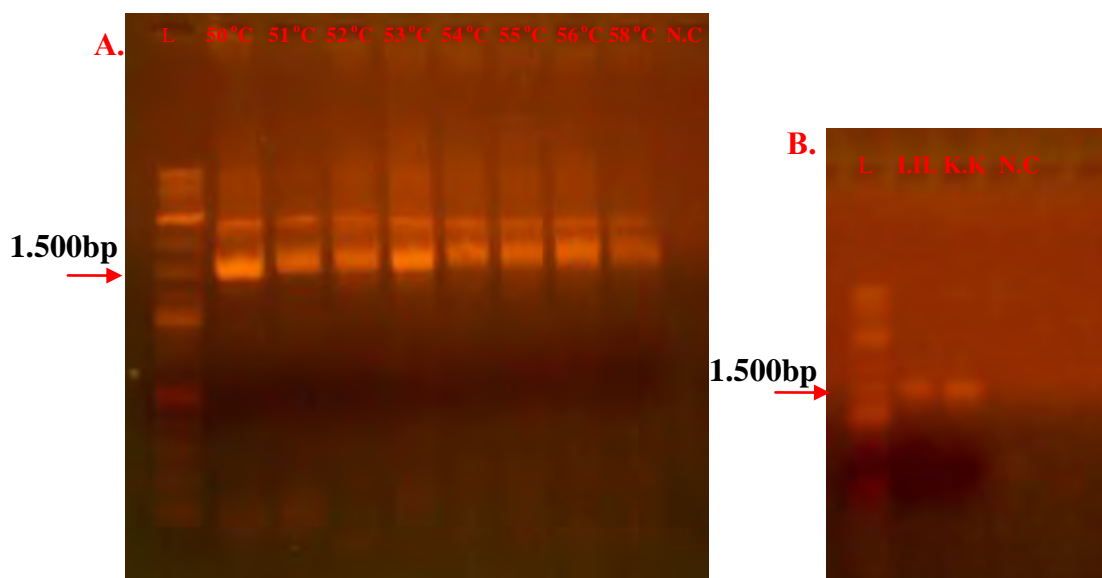
4.2 Ανάλυση των αποτελεσμάτων της μεταγενωμικής προσέγγισης

4.2.1 Ενίσχυση του 16S rRNA γονιδίου του ολικού DNA που απομονώθηκε απευθείας από τις νιφάδες των τοιχογραφιών με Gradient PCR και καθαρισμός των προϊόντων της Gradient PCR

Η Gradient PCR τόσο για την Κρήνη της Καλλιρόης της Πνύκας, όσο και για το Ιερό του Πανός έγινε σε θερμοκρασίες από 49°C μέχρι 58°C. Και για τα δύο μνημεία η αντίδραση των 57°C πραγματοποιήθηκε σε διαφορετικό θερμοκυκλοποιητή (λόγω αδυναμίας του μηχανήματος να υποστηρίξει τη διαβάθμιση και των δέκα θερμοκρασιών) και τα προϊόντα ηλεκτροφορήθηκαν χωριστά από τα υπόλοιπα.



Εικόνα 12. Gradient PCR του *16S rRNA* γονιδίου των Βακτηρίων από το Ιερό του Πανός. Από αριστερά προς δεξιά φαίνονται: ο μάρτυρας μοριακού βάρους, το *16S rRNA* γονίδιο στις θερμοκρασίες από 49°C ως 58°C, εκτός από τους 57°C και το αρνητικό control



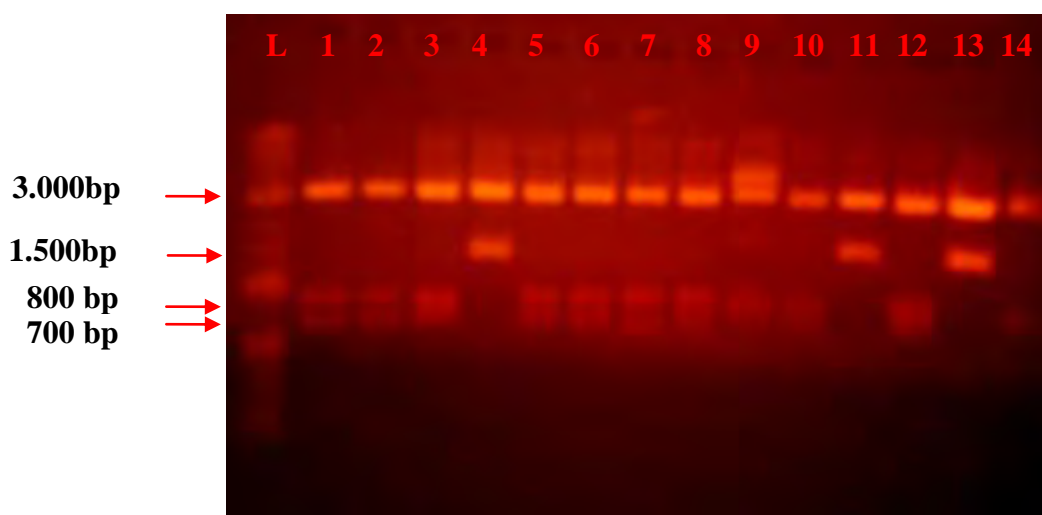
Εικόνα 13. Α) Gradient PCR του *16S rRNA* γονιδίου των Βακτηρίων από την Κρήνη της Καλλιρρόης της Πνύκας . Από αριστερά προς δεξιά φαίνονται: ο μάρτυρας μοριακού βάρους, το *16S rRNA* γονίδιο στις θερμοκρασίες από 50°C ως 58°C, εκτός από τους 57°C και 49 °C (λόγω έλλειψης χώρου στο πήκτωμα) και το αρνητικό control.

Β) PCR του *16S rRNA* γονιδίου των Βακτηρίων στους 57°C. Από αριστερά προς δεξιά φαίνεται: ο μάρτυρας μοριακού βάρους, το προϊόν της PCR για το Ιερό του Πανός (Ι.Π), το προϊόν της PCR για την Κρήνη της Καλλιρρόης της Πνύκας (Κ.Κ) και το αρνητικό control.

Στις παραπάνω εικόνες [Εικόνα 12, Εικόνα 13] παρατηρείται ότι τα προϊόντα και των δύο μνημείων σε όλες τις θερμοκρασίες, πλην τους 57°C (βέλτιστη θερμοκρασία), μαζί με την επιθυμητή ζώνη DNA στα 1.500bp εμφανίζουν και ζώνες παραπροϊόντων. Για τον λόγο αυτό όλα τα προϊόντα, εκτός από αυτά που προκύψαν από τους 57°C, καθαρίστηκαν με το kit "NucleoSpin Gel and PCR Clean-up" (Macherey-Nagel, Germany), απευθείας από το πήκτωμα αγαρόζης. Για να πάρουμε όσο το δυνατόν περισσότερο και καθαρότερο από το επιθυμητό προϊόν, φορτώθηκαν 19μl από το κάθε ένα, σε πήκτωμα αγαρόζης 0,8% w/v, μαζί με τον μάρτυρα μοριακού βάρους 2-Log DNA Ladder (0.1-10 kb) (New England Biolabs Inc) και ηλεκτροφορήθηκαν μέχρι να διαχωριστούν καλά οι ζώνες του μάρτυρα. Έπειτα το πήκτωμα μεταφέρθηκε σε τράπεζα UV και με αποστειρωμένο νυστέρι αποσπάστηκαν οι επιθυμητές ζώνες. Στη συνέχεια εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο καθαρισμού όπως αναγράφεται στις οδηγίες του kit.

4.2.2 Κλωνοποίηση των προϊόντων της Gradient PCR

Τα καθαρισμένα προϊόντα από όλες τις θερμοκρασίες της Gradient PCR, αναμείχθηκαν σε δύο ενιαία δείγματα (pooling), ένα για κάθε μνημείο. Και τα δύο δείγματα χρησιμοποιήθηκαν για την κλωνοποίηση του ενισχυμένου *16S rRNA* γονιδίου των βακτηρίων, σε κατάλληλους T-vectors, που έδιναν τη δυνατότητα επιλογής μπλε-άσπρων αποικιών. Σε κάθε τρυβλίο μετά την επώαση υπήρχαν περίπου 120 άσπρες και 30 μπλε αποικίες, γεγονός που καταδεικνύει την πολύ καλή απόδοση των μετασχηματισμένων κυττάρων (*E.coli*-JM109). Ωστόσο, πριν ακολουθήσει η κατασκευή των *16S rRNA* βιβλιοθηκών, ήταν απαραίτητο να γίνει ενδεικτικός έλεγχος κάποιων από των λευκών αποικιών, ώστε να επιβεβαιωθεί η ύπαρξη του ενθέματος. Αυτό έγινε με δύο μεθόδους. Η πρώτη ήταν η εφαρμογή της Colony PCR με τους εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν και στην την αρχική ενίσχυση. Η δεύτερη ήταν η απομόνωση των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων, από τους τυχαίους λευκούς κλώνους και η πέψη με ένα ένζυμο περιορισμού. Προς ενδεικτικό έλεγχο, επιλέχθηκαν 8 λευκές αποικίες από κάθε μνημείο και σε αυτές εφαρμόστηκαν και οι δύο μέθοδοι. Τα αποτελέσματα της πέψης με *EcoRI* των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων που περιείχαν βακτηριακό ένθεμα φαίνονται στην παρακάτω εικόνα [Εικόνα 14]. Αξίζει να σημειωθεί πως το πρότυπο ζωνών είναι δεν το ίδιο για όλους τους κλώνους και αυτό είναι μια πρώτη ένδειξη της βακτηριακής ποικιλότητας.



Εικόνα14. Πέψη τυχαίων πλασμιδίων που έφεραν το βακτηριακό *16S rRNA*. Στο πήκτωμα παρατηρούνται από αριστερά προς τα δεξιά: ο μάρτυρας μοριακού βάρους, τα 8 πρώτα πρότυπα πλασμιδίων που ανήκουν στα δείγματα της Κρήνης της Καλλιρόης της Πνύκας και τα υπόλοιπα 6 που ανήκουν στο Ιερό του Πανός (λόγω έλλειψης χώρου στο gel, δύο πλασμίδια του Ιερού του Πανός, ηλεκτροφορήθηκαν χωριστά). Οι ζώνες που παρατηρούνται στις 3kbp αντιπροσωπεύουν τον φορέα pGEM T-Easy και πιο χαμηλά τα πρότυπα ζωνών του ενθέματος.

Στην παραπάνω εικόνα [**Εικόνα 13**] παρατηρούμε πως σε όλα εκτός από το 4, 11 και το 12 φαίνεται πως υπάρχει και μια θέση αναγνώρισης μέσα στο *16S rRNA* γονίδιο για το ένζυμο EcoRI και το άθροισμα του αριθμού βάσεων των ζωνών που προκύπτουν από την πέψη (δύο ζώνες από ~700 και ~800bp) ισούται με το μέγεθος του τμήματος DNA που ενισχύθηκε (1500bp). Ενώ στα 4, 11 και 12 η αλληλουχία του ενθέματος δεν περιέχει θέση κοπής για το ένζυμο και έτσι προκύπτει η αναμενόμενη ζώνη στις 1.500 bp. Όπως προαναφέρθηκε τα πρότυπα αυτά, αποτελούν μια πρώτη ένδειξη της βακτηριακής ποικιλότητας ωστόσο, πιο αξιόπιστα συμπεράσματα θα προκύψουν από την ανάλυση των αποτελεσμάτων της αλληλούχισης.

4.2.3 Φυλογενετική ανάλυση των κλώνων με εργαλεία βιοπληροφορικής

4.2.3.1 Επεξεργασία αλληλουχιών της βακτηριακής 16S rRNA βιβλιοθήκης

Ο αριθμός των κλώνων που εστάλησαν για αλληλούχιση ήταν 96, δηλαδή 48 κλώνοι από την Κρήνη της Καλλιρόης της Πνύκας και 48 κλώνοι από το Ιερό του Πανός. Η αλληλούχιση των κλώνων, έγινε με τον εκκινητή T7, ο οποίος προτείνεται και από τις οδηγίες του kit "pGEM-T easy Vector System" (Promega). Από την Κρήνη Καλλιρόης της Πνύκας προέκυψαν τμήματα DNA από 507 bp έως 764bp, ενώ από το Ιερό του Πανός από 530bp έως 739 bp. Το πρώτο στάδιο της επεξεργασίας των αλληλουχιών ήταν να αφαιρεθεί το πλασμιδιακό κομμάτι και να αξιολογηθεί η ποιότητα της αλληλούχισης. Εξετάζοντας το χρωματογράφημα κάθε αλληλουχίας απορρίφθηκαν 5 κλώνοι από το Ιερό του Πανός και 6 από την Κρήνη της Καλλιρόης της Πνύκας.

4.2.3.2 Bellerophon

Οι αλληλουχίες που συγκεντρώθηκαν, μετατράπηκαν σε ένα ενιαίο αρχείο fasta (προέκταση .fasta) για να εξεταστεί αν κάποιες από αυτές είναι χιμαιρικές. Οι χιμαιρικές αλληλουχίες δημιουργούνται συνήθως από δύο φυλογενετικά απομακρυσμένες πατρικές αλληλουχίες. Κατά τη διαδικασία της PCR είναι δυνατόν ένα πρόωρα τερματισμένο αντίγραφο να επαναυβριδοποιηθεί σε ένα "ξένο" DNA κλώνο και να ολοκληρωθεί η αντιγραφή του στους επόμενους κύκλους, βασιζόμενη στην δεύτερη πατρική αλληλουχία. Το σημείο στο οποίο η χιμαιρική αλληλουχία αλλάζει από τη μια πατρική στην άλλη ονομάζεται "σημείο τομής" (breakpoint). Οι

χίμαιρες πρέπει να αφαιρούνται από τις μελέτες μικροβιακών κοινοτήτων γιατί αντιπροσωπεύουν μη-υπάρχοντες οργανισμούς.

Το πρόγραμμα "Bellerophon" υποδεικνύει πιθανές χίμαιρες *16S rDNA* αλληλουχιών, οι οποίες όμως είναι απαραίτητο να ελεγχθούν κατόπιν, για να διαπιστωθεί αν πρόκειται όντως για χιμαιρικές αλληλουχίες. Η ανίχνευση των χιμαιρικών αλληλουχιών βασίζεται στον υπολογισμό των φυλογενετικών αποστάσεων των αλληλουχιών. Οι αποστάσεις υπολογίζονται για όλα τα ζεύγη αλληλουχιών και αναφέρονται στα τμήματα που βρίσκονται αριστερά και δεξιά ενός υποθετικού σημείου τομής. Η ολική διακύμανση των μητρώων των αποστάσεων (distance matrices) για n αλληλουχίες δίνεται από τον τύπο:

$$dme = \sum_i^n \sum_j^n \left| dm^{left}[i][j] - dm^{right}[i][j] \right|$$

όπου η τιμή $dm[i][j]$ υποδηλώνει την απόσταση μεταξύ των αλληλουχιών i και j .

Για να βρεθεί η αλληλουχία με την μεγαλύτερη συμβολή στην τιμή dme , υπολογίζεται ο λόγος της dme τιμής όλων των αλληλουχιών της βιβλιοθήκης προς την dme τιμή μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας (π.χ. της i).

Ο παραπάνω λόγος ονομάζεται *preference score* και εκφράζεται ως εξής:

$$preference[i] = \frac{dme}{dme[i]}.$$

Όταν η τιμή του *preference score* είναι >1 , τότε υποδεικνύεται η ύπαρξη πιθανής χίμαιρας. Οι τιμές των *preference scores* εξαρτώνται από το σύνολο των δεδομένων που εξετάζουμε και μπορούν να συγκριθούν μόνο μεταξύ αυτών των δεδομένων.

Για να εξεταστούν οι υποδεικνυόμενες χίμαιρες, χωρίζεται η αλληλουχία στο σημείο τομής (breakpoint) που δίνει η ανάλυση. Στη συνέχεια ελέγχονται ξεχωριστά τα δύο κομμάτια με το RDP Classifier και το RDP SeqMatch. Αν τα αποτελέσματα συμπίπτουν με το αποτέλεσμα που προκύπτει από ολόκληρη την αλληλουχία, τότε

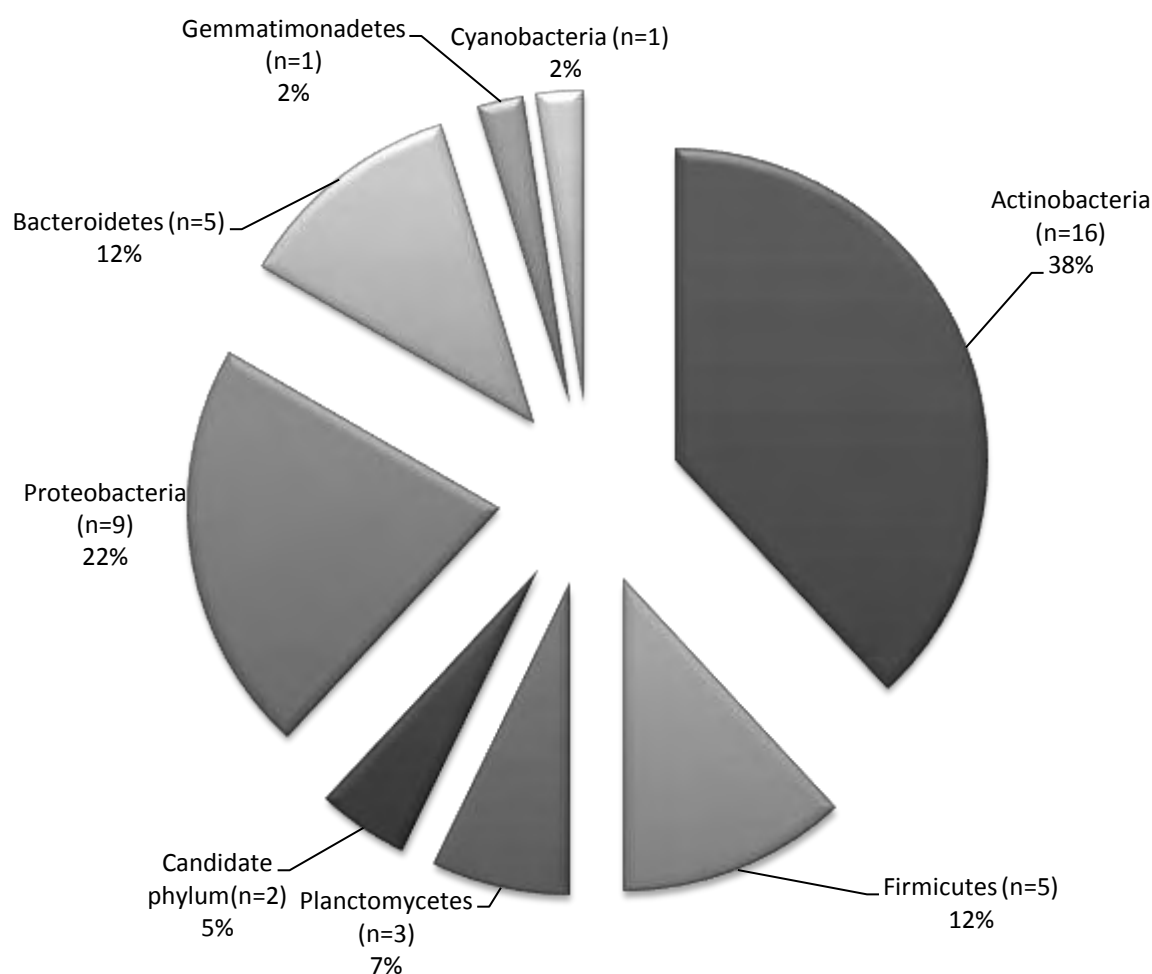
δεν πρόκειται για χίμαιρα. Στην αντίθετη περίπτωση η αλληλουχία αφαιρείται από την ανάλυση.

Με την ανάλυση των αλληλουχιών βακτηριακού 16S rDNA που έγινε με το συγκεκριμένο πρόγραμμα διαπιστώθηκε πως καμία αλληλουχία δεν ήταν χιμαιρική.

4.2.3.3 RDP και BLAST

4.2.3.3.A Ανάλυση αλληλουχιών από την Κρήνη της Καλλιρόης της Πνύκας

Όλες οι αλληλουχίες Βακτηρίων αναλύθηκαν μία προς μία με τα προγράμματα RDP και BLAST. Με βάση τα αποτελέσματα που πήραμε από το RDP, η βιβλιοθήκη *16S rRNA* της Κρήνης της Καλλιρόης της Πνύκας περιείχε βακτήρια που ταξινομούνται σε επτά διαφορετικές μείζονες ομάδες καθώς, και σε δύο υποψήφια φύλα (candidate phylum). Στον παρακάτω γράφημα φαίνεται αναλυτικά ο αριθμός των κλώνων που αντιστοιχεί σε κάθε ομάδα [Γράφημα 2].



Γράφημα 2. Αποτελέσματα της *16S rRNA* βιβλιοθήκης της Κρήνης της Καλλιρόης της Πνύκας, όπου n= ο αριθμός των κλώνων που αντιστοιχεί σε κάθε μείζονα ομάδα.

Παρατηρούμε ότι ο αριθμός των κλώνων που ανήκουν στα Actinobacteria είναι αρκετά μεγαλύτερος συγκριτικά με τον αριθμό των κλώνων που εντοπίστηκαν στις υπόλοιπες συνομοταξίες, ενώ ακολουθούν τα Proteobacteria. Με βάση τα αποτελέσματα της ανάλυσης με το RDP Classifier και το BLAST, προκύπτουν τα εξής:

I. Actinobacteria

Δεκαέξι από τις αλληλουχίες που εξετάστηκαν, ανήκουν στα ακτινοβακτήρια. Από αυτές, 1 ταυτοποιήθηκε σε επίπεδο είδους, 6 σε επίπεδο γένους, ενώ οι υπόλοιπες σε επίπεδο οικογένειας (1 κλώνος), τάξης (7 κλώνοι) ή απλά κλάσης (1 κλώνος).

II. Proteobacteria

Εννέα από τις αλληλουχίες που εξετάστηκαν, ταξινομήθηκαν στη συνομοταξία Proteobacteria και ανήκουν στα α -, β -, γ -, δ - πρωτεοβακτήρια. Από αυτές, 2 ταυτοποιήθηκαν σε επίπεδο είδους, 3 σε επίπεδο γένους, ενώ οι υπόλοιπες σε επίπεδο τάξης (1 κλώνος) ή απλά κλάσης (3 κλώνοι).

III. Firmicutes

Πέντε από τις αλληλουχίες που εξετάστηκαν, ταξινομήθηκαν στη συνομοταξία Firmicutes. Όλες ανήκαν στο γένος *Bacillus sp.* ενώ, δύο από αυτές, ταυτοποιήθηκαν σε επίπεδο είδους.

IV. Bacteroidetes

Πέντε από τους κλώνους που αναλύθηκαν ανήκουν στην συνομοταξία Bacteroidetes. Τέσσερεις από αυτούς ταυτοποιήθηκαν με το γένος *Gracilimonas sp.*, ενώ ένας από αυτούς, σύμφωνα με το RDP classifier, ταξινομήθηκε στο γένος *Salinibacter sp.*, ενώ στο BLAST παρουσίασε 97% ομοιότητα με τις γνωστές μέχρι στιγμής αλληλουχίες.

V. Planctomycetes

Τρείς από τους κλώνους που αναλύθηκαν εντάσσονται στην συνομοταξία Planctomycetes. Από αυτές, οι δύο ταξινομήθηκαν στο επίπεδο της τάξης και συγκεκριμένα ανήκουν στην ίδια τάξη (Planctomycetales), ενώ μια ταυτοποιήθηκε με το είδος *Phycisphaera sp.*.

VI. Gemmatimonadetes

Ένας από τους κλώνους που αναλύθηκαν ανήκει στην συνομοταξία Gemmatimonadetes και σύμφωνα με το RDP classifier ταξινομήθηκε στο γένος *Gemmatimonas sp.*.

VII. Cyanobacteria

Ένας από τους κλώνους που αναλύθηκαν ανήκει στην συνομοταξία Cyanobacteria και ταξινομήθηκε σύμφωνα με το RDP *classifier* στο γένος *GpI*, το οποίο δεν έχει μέχρι σήμερα καλλιεργηθεί σε εργαστηριακές συνθήκες.

VIII. Candidate division

Δύο από του κλώνους που αναλύθηκαν ανήκουν στην κατηγορία *candidate division* ή *candidate phylum*. Η κατηγορία αυτή, περιγράφει μια ταξινομική μονάδα των προκαρυωτικών οργανισμών για την οποία δεν υπάρχουν καλλιεργήσιμοι εκπρόσωποι αλλά, τα στοιχεία για την ύπαρξη του γενεαλογικού κλάδου έχουν προκύψει μέσω της μεταγονιδιωματικής ανάλυσης του *16S rRNA* γονιδίου προκαρυωτών, που απομονώθηκαν από περιβαλλοντικά και όχι μόνο, δείγματα (Hugenholtz *et al.*, 1998).

Στον παρακάτω πίνακα [Πίνακας 17.] παρουσιάζονται τα παραπάνω αποτελέσματα με κάθε σχετική λεπτομέρεια.

Πίνακας 17. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται λεπτομερώς τα αποτελέσματα από την ανάλυση των κλώνων της βιβλιοθήκης από την Κρήνηνη της Καλλιρόης της Πνύκας. Τα αποτελέσματα ομαδοποιήθηκαν με βάση την μείζονα ομάδα στην οποία ταξινομήθηκε η αλληλουχία.

| RDP CLASSIFIER | ΑΡΙΘΜΟΣ ΚΛΩΝΩΝ | BLAST DESCRIPTION | GENBANK ACCESSION NUMBER | IDENTITY (%) |
|------------------------------|-------------------|-------------------------------------|--------------------------------|-----------------|
| <u>Actinobacteria</u> | | | | |
| Actinobacteria | 1 | Uncultured actinobacterium clone | JF706669.1 | 97,1 |
| Actinomycetales | 3 | Uncultured bacterium clone | KF037326.1 | 93,8 |
| | | Uncultured bacterium clone | AY917754.1 | 97,2 |
| | | Uncultured bacterium clone | KF037326.1 | 98,2 |
| | | Uncultured bacterium clone | JQ738726.1 | 97,9 |
| Solirubrobacterales | 3 | Uncultured actinobacterium clone | JF706669.1 | 97,1 |
| | | Uncultured bacterium clone | KC554214.1 | 97,9 |

| | | | | |
|----------------------------------|---|---|-----------------------------|-----------------------------|
| Acidimicrobiales | 1 | Uncultured actinobacterium clone | FJ895043.1 | 98,9 |
| <i>Crossiella sp.</i> | 2 | Uncultured <i>Crossiella sp.</i> | DQ228713.2 | 99,6 |
| <i>Rubrobacter sp.</i> | 2 | Uncultured bacterium clone | KF037571.1 | 98,4 |
| | | Uncultured bacterium clone | KF037527.1 | 97,7 |
| <i>Euzebya sp.</i> | 1 | Uncultured Nitriliruptor sp. | JQ401304.1 | 95,5 |
| <i>Propionibacterium sp</i> | 1 | <i>Propionibacterium acnes</i> | CP003293.1 | 97,9 |
| <i>Arthrobacter castelli</i> | 1 | <i>Arthrobacter castelli</i> strain | NR_042249.1 | 99 |
| Proteobacteria | | | | |
| Alphaproteobacteria | 1 | Uncultured bacterium clone | 98,6 | JF266307.1 |
| Gammaproteobacteria | 2 | Uncultured gamma proteobacterium clone | 92,8 | AY694642.1 |
| | | Uncultured gamma proteobacterium clone | 98,2 | EF612422.1 |
| Rhodospirillales | 1 | Uncultured Rhodospirillales bacterium clone | 96,5 | HM438079.1 |
| <i>Dongia sp.</i> | 1 | Uncultured bacterium isolate | 98,5 | HQ121112.1 |
| <i>Haliangium sp.</i> | 1 | Uncultured bacterium isolate | 99,8 | HQ120274.1 |
| <i>Novosphingobium sp.</i> | 1 | <i>Novosphingobium sp.</i> | 99,2 | JX458453.1 |
| <i>Cupriavidus metallidurans</i> | 1 | <i>Cupriavidus metallidurans</i> | 99,8 | NR_074704.1 |
| <i>Phenylobacterium composti</i> | 1 | <i>Phenylobacterium composti</i> | 99,3 | NR_044377.1 |

Firmicutes

| | | | | |
|--------------------------------|---|--------------------------------|------|-----------------------------|
| <i>Bacillus sp.</i> | 3 | Uncultured Bacillus sp. clone | 98,5 | EF636829.1 |
| | | Uncultured Bacillus sp. Clone | 95,8 | EF636833.1 |
| | | Bacillus racemilacticus strain | 97,2 | KC494303.1 |
| <i>Bacillus decolorationis</i> | 1 | Bacillus decolorationis | 99,7 | NR_025473.1 |
| <i>Bacillus cereus</i> | 1 | Bacillus cereus strain | 99 | KF475814.1 |

Bacteroidetes

| | | | | |
|-------------------------|---|----------------------------|------|----------------------------|
| <i>Gracilimonas sp.</i> | 4 | Uncultured bacterium clone | 97,4 | FN298048.1 |
| <i>Salinibacter sp.</i> | 1 | Salinibacter sp. | 97 | AY987851.1 |

Planctomycetes

| | | | | |
|-------------------------|---|----------------------------|----|----------------------------|
| <i>Phycisphaera sp.</i> | 1 | Uncultured bacterium clone | 97 | JQ769836.1 |
|-------------------------|---|----------------------------|----|----------------------------|

Gemmatimonadetes

| | | | | |
|-------------------------|---|-----------------------------------|----|----------------------------|
| <i>Gemmatimonas sp.</i> | 1 | Uncultured Gemmatimonas sp. clone | 97 | JQ401086.1 |
|-------------------------|---|-----------------------------------|----|----------------------------|

Cyanobacteria

| | | | | |
|------------------|--|----------------------------|----|----------------------------|
| <i>GpI</i> genus | | Uncultured bacterium clone | 97 | FJ230807.1 |
|------------------|--|----------------------------|----|----------------------------|

Candidate phylum

| | | | | |
|------------------|--|---|------|----------------------------|
| <i>genus OD1</i> | | Uncultured candidate division OD1 bacterium clone | 94,1 | AY193202.1 |
| <i>genus TM7</i> | | Uncultured candidate division TM7, clone | 92 | AM935276.1 |

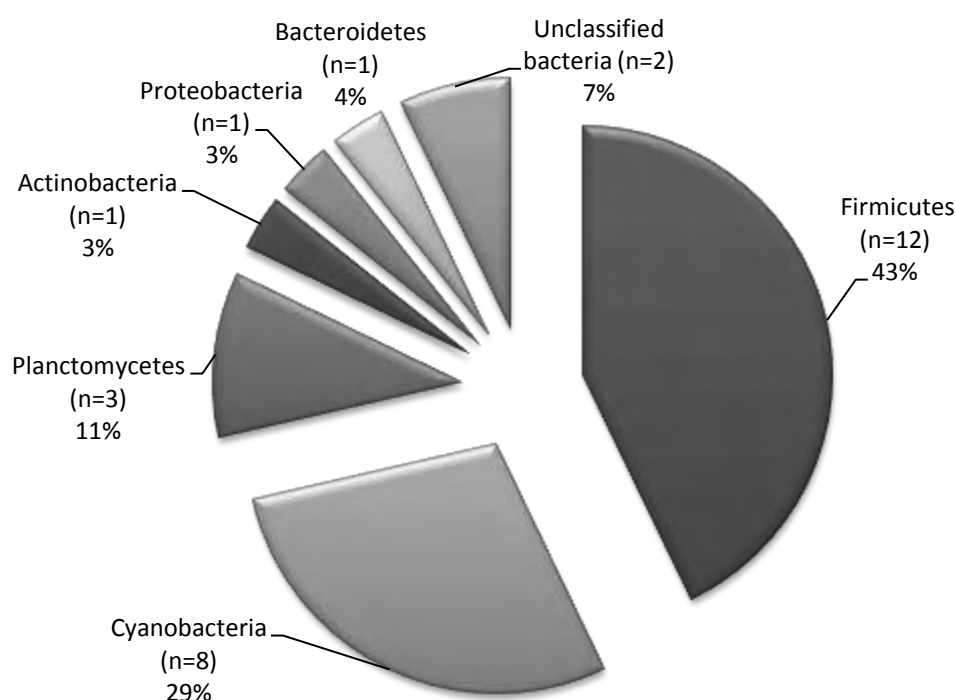
Συνοπτικά, για την *16S rRNA* βιβλιοθήκη των κλώνων που προέρχονται από την Κρήνη της Καλλιρρόης της Πνύκας, 5 κλώνοι ταυτοποιήθηκαν μόνο μέχρι το επίπεδο της κλάσης (class), 10 κλώνοι ταυτοποιήθηκαν μέχρι το επίπεδο της τάξης (order) και 1 κλώνος μέχρι το επίπεδο της οικογένειας (family).

Σύμφωνα με το RDP *classifier* προέκυψαν 20 κλώνοι, οι οποίοι ταξινομούνται στα εξής γένη: *Crossiella* sp., *Rubrobacter* sp., *Euzeuya* sp., *Dongia* sp., *Haliangium* sp., *Novosphingobium* sp., *Bacillus* sp., *Propionibacterium* sp., *Gracilimonas* sp., *Salinibacter* sp., *Phycisphaera* sp., *Gematimonas* sp. και GpI.

Τα βακτηριακά είδη (species) που ταυτοποιήθηκαν με ποσοστά ομοιότητας από 99% < ID < 99,8%, είναι τα εξής: *Arthrobacter casteli*, *Cupriavidus metalidurans*, *Phenylobacterium composti*, *Bacillus decolorationis* και *Bacillus cereus*.

4.2.3.3.B Ανάλυση αλληλουχιών από το Ιερό του Πανός

Όλες οι αλληλουχίες Βακτηρίων αναλύθηκαν μία προς μία με τα προγράμματα RDP και BLAST. Με βάση τα αποτελέσματα που πήραμε από το RDP, η βιβλιοθήκη *16S rRNA* του Ιερού του Πανός, περιείχε βακτήρια που ταξινομούνται σε έξι διαφορετικές μείζονες ομάδες, ενώ δύο κλώνοι χαρακτηρίστηκαν ως *unclassified bacteria*. Άξιο αναφοράς είναι πως 15 κλώνοι σύμφωνα με το RDP classifier και τα αποτελέσματα του BLAST, ταξινομήθηκαν ως χλωροπλάστες (κυρίως Streptophyta και Chlorophyta, αλλά και Bacillariophyta), παρά τους ειδικούς εκκινητές, για το βακτηριακό *16S rRNA* γονίδιο, που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη. Το φαινόμενο αυτό έχει συμβεί και σε άλλες περιβαλλοντικές μελέτες και οφείλεται στην στενή εξελικτική συγγένεια των χλωροπλάστων με τα κυανοβακτήρια (Møller *et al.*, 2013; Cavalier-Smith, 2000). Οι παραπάνω αλληλουχίες εξαιρέθηκαν από την υπόλοιπη ανάλυση. Στον παρακάτω γράφημα φαίνεται αναλυτικά ο αριθμός των κλώνων που αντιστοιχεί σε κάθε μείζονα ομάδα [Γράφημα 3].



Γράφημα 3. Αποτελέσματα της *16S rRNA* βιβλιοθήκης του Ιερού του Πανός, όπου n= ο αριθμός των κλώνων που αντιστοιχεί σε κάθε μείζονα ομάδα

Παρατηρούμε ότι ο αριθμός των κλώνων που ανήκουν στον γενεαλογικό κλάδο των Firmicutes είναι κατά πολύ μεγαλύτερος συγκριτικά με τον αριθμό των κλώνων που εντοπίστηκαν στις υπόλοιπες συνομοταξίες, ενώ ακολουθούν τα Cyanobacteria. Με βάση τα αποτελέσματα της ανάλυσης με το RDP Classifier και το BLAST προκύπτουν τα εξής:

I. Firmicutes

Δώδεκα από τους κλώνους που αναλύθηκαν, ανήκουν στην συνομοταξία των Firmicutes. Από αυτές, 2 ταξινομήθηκαν μέχρι το επίπεδο της τάξης, 5 ταξινομήθηκαν μέχρι το επίπεδο του γένους, ενώ 5 ταυτοποιήθηκαν με τρία διαφορετικά είδη του γένους των Βακίλων. Πιο αναλυτικά, τα αποτελέσματα της ανάλυσης παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

II. Cyanobacteria

Οκτώ από τις αλληλουχίες που αναλύθηκαν ανήκουν στα κυανοβακτήρια. Από αυτές, 4 ταξινομήθηκαν μόνο μέχρι το επίπεδο της κλάσης, ενώ οι υπόλοιπες τρεις ταξινομήθηκαν σύμφωνα με το RDP classifier σε τρία διαφορετικά γένη.

III. Planctomycetes

Τρεις από τις αλληλουχίες που αναλύθηκαν ανήκαν στην συνομοταξία των Planctomycetes. Από αυτές, 2 ταξινομήθηκαν στο επίπεδο της οικογένειας και 1 ταξινομήθηκε σύμφωνα με το RDP classifier στο γένος *Gemmata sp.*

IV. Actinobacteria

Μία από τις αλληλουχίες που αναλύθηκαν, εντάχθηκε στην συνομοταξία των Actinobacteria και ταυτοποιήθηκε με το γένος *Geodermatophilus sp.*, παρουσιάζοντας ποσοστό ομοιότητας 98,7% και ποσοστό κάλυψης της αλληλουχίας 100% [[NR_074530.1](#)].

V. Proteobacteria

Μία από τις αλληλουχίες που αναλύθηκαν, εντάχθηκε στην συνομοταξία των Proteobacteria και ταυτοποιήθηκε με το γένος *Brevundimonas sp.*, παρουσιάζοντας ποσοστό ομοιότητας 99,2% και ποσοστό κάλυψης της αλληλουχίας 98% [[EF093132.1](#)].

VI. Bacteroidetes

Μία από τις αλληλουχίες που αναλύθηκαν, εντάχθηκε στην συνομοταξία των Proteobacteria και ταυτοποιήθηκε με το γένος *Hymenobacter sp.* παρουσιάζοντας ποσοστό ομοιότητας 98,2% και ποσοστό κάλυψης της αλληλουχίας 99% [[FR691446.1](#)]. Το γένος αυτό ανήκει στα α- πρωτεοβακτήρια.

VII. Unclassified bacteria

Δύο από τις αλληλουχίες που αναλύθηκαν, χαρακτηρίστηκαν ως unclassified bacteria και δεν μπόρεσαν να ταυτοποιηθούν περαιτέρω. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται λεπτομερώς όλα τα αποτελέσματα των αναλύσεων [Πίνακας 18.]

Πίνακας 18. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται λεπτομερώς τα αποτελέσματα από την ανάλυση των κλώνων της βιβλιοθήκης από το Ιερό του Πανός. Τα αποτελέσματα ομαδοποιήθηκαν με βάση την μείζονα ομάδα στην οποία ταξινομήθηκε η αλληλουχία.

| RDP CLASSIFIER | ΑΡΙΘΜΟΣ ΚΛΩΝΩΝ | BLAST DESCRIPTION | GENBANK ACCESSION NUMBER | IDENTITY (%) |
|--------------------------------------|-------------------|---------------------------------------|--------------------------------|-----------------|
| <u>Firmicutes</u> | | | | |
| Bacillales | 2 | Uncultured Bacillus sp. | EF600602.1 | 93,1 |
| | | Uncultured bacterium | AY328609.1 | 96, 9 |
| <i>Bacillus sp.</i> | 5 | Bacillus sp. | AM900775.1 | 98,7 |
| | | Uncultured Bacillus sp. | FN666216.1 | 99,3 |
| | | Uncultured Bacillus sp. Clone (x2) | GU012036.1 | 98,1 |
| | | Uncultured bacterium clone | KC172229.1 | 99,2 |
| | | | | |
| <i>Bacillus herbersteinensis</i> | 3 | Bacillus herbersteinensis strain | NR_042286.1 | 99 |
| <i>Bacillus cibi</i> | 1 | Bacillus cibi strain | KF055024.1 | 99,8 |
| <i>Bacillus pichinotyi</i> | 1 | Bacillus pichinotyi strain | KF453786.1 | 99 |
| <u>Cyanobacteria</u> | | | | |
| Cyanobacteria | 4 | Uncultured cyanobacterium clone | HQ189046.1 | 99,6 |
| | | Uncultured cyanobacterium clone | JQ402338.1 | 93,5 |
| | | Uncultured cyanobacterium clone | HQ189046.1 | 98,7 |
| | | Uncultured cyanobacterium clone | DQ181682.1 | 98 |

| | | | | |
|-------------------------------------|---|--|-----------------------------|------|
| <i>GpI</i> genus | 2 | Uncultured cyanobacterium clone | JQ402660.1 | 98,4 |
| <i>Chroococcus</i> sp. | 2 | Chroococcus sp. | FR798926.1 | 99 |
| <u>Planctomycetes</u> | | | | |
| Planctomycetales | 2 | Uncultured bacterium clone | JQ402660.1 | 94,5 |
| <i>Gemmata</i> sp. | 1 | Uncultured Planctomycetaceae bacterium clone | KF287746.1 | 97 |
| <u>Actinobacteria</u> | | | | |
| <i>Geodermatophilus</i> sp. | 1 | Geodermatophilus sp. strain | NR_074530.1 | 98,7 |
| <u>Proteobacteria</u> | | | | |
| <i>Brevundimonas</i> sp. | 1 | <i>Brevundimonas</i> sp. | EF093132.1 | 99,2 |
| <u>Bacteroidetes</u> | | | | |
| <i>Hymenobacter</i> sp. | 1 | <i>Hymenobacter</i> sp. | FR691446.1 | 98,2 |
| <u>Unclassified bacteria</u> | | | | |
| <i>unclassified_Bacteria</i> | 2 | Uncultured bacterium clone | JQ218052.1 | 100 |
| | | Uncultured bacterium isolate | HQ118809.1 | 97 |

Συνοπτικά, για την *16S rRNA* βιβλιοθήκη των κλώνων που προέρχονται από το Ιερό του Πανός, 4 κλώνοι ταυτοποιήθηκαν μόνο μέχρι το επίπεδο της κλάσης (class), 2 κλώνοι ταυτοποιήθηκαν μέχρι το επίπεδο της τάξης (order) και 2 κλώνοι μέχρι το επίπεδο της οικογένειας (family).

Σε επίπεδο γένους (genus), σύμφωνα με το RDP classifier, 13 κλώνοι ταξινομήθηκαν ως εξής: *Paenibacillus sp.*, *Bacillus sp.*, *Brevundimonas sp.*, *Hymenobacter sp.*, *Gemmata sp.*, *Geodermatophilus sp.*, *Chroococcus sp.* και GpI.

Τα βακτηριακά είδη (species) που ταυτοποιήθηκαν με ποσοστά ομοιότητας από 99% < ID < 99,8%, είναι τα εξής: *Bacillus cibi*, *Bacillus pichirotyi* και *Bacillus herbersteinensis*.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το φαινόμενο της βιοαλλοίωσης μπορεί να οριστεί ως "οποιαδήποτε ανεπιθύμητη αλλαγή σε ένα υλικό, η οποία έχει προκληθεί από τις ζωτικές δραστηριότητες των οργανισμών" (Allsopp, 2011). Τα βακτήρια, τα αρχαία, οι μύκητες και οι λειχήνες, καθώς και κάποια παρασιτικά έντομα είναι από τους κλασικούς παράγοντες βιοαλλοίωσης και προκαλούν προβλήματα στη διατήρηση της πολιτιστικής κληρονομιάς.

Μια καλά εδραιωμένη γνώση είναι το γεγονός ότι οι ιστορικές τοιχογραφίες αποτελούν περιβάλλοντα προσφιλή στην ανάπτυξη μικροοργανισμών, που συνήθως εμπλέκονται στο φαινόμενο της βιοαλλοίωσης, συμβάλλοντας στην καταστροφή των χρωμάτων και των υλικών υποστήριξή τους. Οι ιστορικές τοιχογραφίες αποτελούν αναπόσπαστα τμήματα των μνημείων, στα οποία εντοπίζονται και κατά συνέπεια η φθορά τους συνιστά την απώλεια ενός σημαντικού μέρους της παγκόσμιας πολιτιστικής κληρονομιάς (Pepe *et al.*, 2010).

Τα βακτήρια και ειδικά τα χημειολιθοαυτότροφα και τα φωτοαυτότροφα, φαίνεται πως αποτελούν τους πρώτους αποικιστές των τοιχογραφιών, ενώ έπεται και η ανάπτυξη ετερότροφων βακτηρίων και άλλων μικροοργανισμών. Η ανάπτυξη των βακτηρίων σε μια τοιχογραφία προκαλεί τόσο δομικές, όσο και αισθητικές βλάβες, ενώ μερικά από τα επιβλαβή φαινόμενα που προκαλούνται είναι η δημιουργία χρωματιστών βιοφίλμ, η αποικοδόμηση των οργανικών υλικών στερέωσης του χρώματος και ο αποχρωματισμός ή η αποικοδόμηση των χρωστικών ουσιών (Gurtner *et al.*, 2000).

Η διερεύνηση και η κατανόηση της μικροβιακής ποικιλότητας που παρίσταται σε αντικείμενα τέχνης είναι σημαντική για την ανάπτυξη της ορθής στρατηγικής για την διατήρηση και την αποκατάσταση του έργου τέχνης (Gurtner *et al.*, 2000). Στην παρούσα ερευνητική εργασία, έγινε για πρώτη φορά στον Ελλαδικό χώρο μια προσπάθεια ανάδειξης της βακτηριακής ποικιλότητας από αλλοιωμένες τοιχογραφίες δύο αρχαίων μνημείων. Η Κρήνη της Καλλιρόης της Πνύκας και το Ιερό του Πανός είναι τα μνημεία στα οποία εντοπίζονται οι αλλοιωμένες τοιχογραφίες που μελετήθηκαν. Τα δύο αυτά μνημεία όπως περιγράφονται και στις ενότητες **3.1.1** και **3.1.2**, παρά τη διαφορετική αρχική τους χρήση, παρουσιάζουν πολλά κοινά μεταξύ τους. Αρχικά, πρόκειται για δύο χώρους που απέχουν ελάχιστα μέτρα μεταξύ τους, συνεπώς εκτίθενται στις ίδιες κλιματικές συνθήκες, που αποτελούν καθοριστικό

παράγοντα για τα βακτήρια που μπορούν να επιβιώσουν. Επιπλέον, και τα δύο μνημεία είναι λαξευμένα στον φυσικό βράχο τον οποίο διακοσμούν οι τοιχογραφίες που μελετήθηκαν. Το φυσικό, βραχώδες υπόστρωμα των τοιχογραφιών είναι ικανό από μόνο του να αποτελέσει σημαντικό παράγοντα παροχής θρεπτικών ουσιών σε πλειάδα βακτηρίων. Τέλος, και για τα δύο μνημεία γνωρίζουμε ελάχιστα για τα μοτίβα των τοιχογραφιών και των χρωστικών που χρησιμοποιήθηκαν καθώς είναι εξαιρετικά αλλοιωμένες και καμία άλλη μελέτη δεν έχει προηγηθεί επί αυτών.

Για τη μελέτη της βακτηριακής ποικιλότητας των αλλοιωμένων τοιχογραφιών και των δύο μνημείων, εφαρμόστηκαν μοριακές τεχνικές που στηρίζονται στην ενίσχυση του βακτηριακού *16S rDNA* και στην ανάγνωση της αλληλουχίας του, τόσο μέσω της μεταγονιδιωματικής προσέγγισης και την κατασκευή βιβλιοθηκών DNA-κλώνων, όσο και μέσω πειραμάτων καλλιέργειας. Με την παραπάνω στρατηγική έγινε δυνατή η ολοκληρωμένη μελέτη της βακτηριακής ποικιλότητας, διότι μέσω της καλλιέργειας διακρίθηκαν τα ζωντανά βακτήρια, ενώ μέσω της μεταγονιδιωματικής προσέγγισης ταυτοποιήθηκαν τόσο τα βακτήρια που δεν μπορούν να καλλιεργηθούν σε εργαστηριακές συνθήκες, όσο και τα βακτήρια που άλλοτε υπήρχαν στις τοιχογραφίες και πιθανώς συνέβαλλαν στην εμφάνιση του φαινομένου της βιοαλλοίωσης. Μετά το πέρας των πειραματικών διαδικασιών και των αναλύσεων προκύπτουν τα στοιχεία που θα αναλυθούν στις επόμενες παραγράφους.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της αλληλούχισης των καλλιεργήσιμων βακτηρίων για την Κρήνη της Καλλιρόης της Πνύκας, σε επίπεδο γένους απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν μέλη των *Bacillus sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Paenibacillus sp.* και *Brevundimonas sp.* και σε επίπεδο είδους απομονώθηκαν και καλλιεργήθηκαν τα εξής βακτήρια: *Bacillus cereus*, *Bacillus amyloliquefacien*, *Bacillus thuringiensis*, *Massilia timonae*, *Kocuria rosea*, *Cohnella formosensis*, *Acinetobacter lwoffii*, *Paenibacillus lautus*, *Kluyvera intermedia*, ενώ από το Ιερό του Πανός απομονώθηκε και καλλιεργήθηκε μόνο το είδος *Bacillus cereus*.

Είδη του γένους των Βακίλων (*Bacillus thuringiensis*, *Bacillus cereus*), του γένους *Kocuria sp.* (*Kocuria rosea*) και του γένους *Acinetobacter sp.* (*Acinetobacter lwoffii*), αλλά και μέλη του γένους *Brevundimonas sp.*, *Paenibacillus sp.* και *Pseudomonas sp.* έχουν επίσης απομονωθεί και καλλιεργηθεί από βιοαλλοιωμένες τοιχογραφίες (Heyrman *et al.*, 1999; Gurtner *et al.*, 2000; Schabereiter-Gurtner *et al.*, 2001a; Laiz *et al.*, 2002; Pepe *et al.*, 2010; Pangalo *et al.*, 2009b, 2012).

Οι περισσότερες αλληλουχίες καλλιεργήσιμων βακτηρίων από την Κρήνη της Καλλιρόης της Πνύκας ανήκαν στο γένος *Bacillus* sp., όπως και το μοναδικό είδος βακτηρίου που καλλιεργήθηκε από το Ιερό του Πανός. Η επικράτηση των ειδών του γένους *Bacillus* sp. και των συγγενικών με αυτό, έναντι των άλλων βακτηρίων έχει παρατηρηθεί και σε άλλες αντίστοιχες μελέτες καλλιέργειας βακτηρίων από ιστορικές αλλοιωμένες τοιχογραφίες, οι οποίες καταλήγουν στο συμπέρασμα πως μέσω της καλλιέργειας ταυτοποιούνται κυρίως βακτήρια που παράγουν σπόρια (Laiz *et al.*, 2003; Gorbushina *et al.*, 2004)

Σύμφωνα με τους Gonzales *et al.*, τα μέλη του γένους *Bacillus* sp. που απομονώθηκαν από αλλοιωμένες, βραχώδεις, τοιχογραφίες είναι ικανά να αποικοδομήσουν τον αιματίτη, μια διαδεδομένη, ορυκτή χρωστική (ερυθρής απόχρωσης), των αρχαίων χρόνων και ίσως είναι ένας από τους πιθανούς τους ρόλους στο φαινόμενο της βιοαλλοίωσης (Gonzales *et al.*, 1999). Έχει βρεθεί πως το είδος *Kocuria rosea* είναι ικανό να προκαλέσει τον αποχρωματισμό ευρέως διαδεδομένων χρωστικών όπως ο μαλαχίτης και κάποιες αζωτούχες χρωστικές, μέλη του γένους *Paenibacillus* sp. επίσης βρέθηκε πως αποχρωματίζουν αζωτούχες χρωστικές (Parshetti *et al.*, 2006; Meehan *et al.*, 2001) και ίσως με αυτόν τον τρόπο, τα παραπάνω βακτήρια, συμμετέχουν στην αλλοίωση των τοιχογραφιών.

Τέλος, τα είδη *Massilia timonae*, *Cohnella formosensis* και *Kluyvera intermedia* σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, δεν έχουν απομονωθεί ξανά από τοιχογραφίες. Ωστόσο, το χημειοργανότροφο βακτηριακό είδος *Massilia timonae* έχει απομονωθεί από βιοαλλοιωμένες βραχώδεις επιφάνειες σπηλαίων και κατακομβών, που φέραν μαύρες κηλίδες και πράσινη κρούστα (De Leo *et al.*, 2012). Η Κρήνη της Καλλιρόης της Πνύκας είναι ένα μνημείο λαξευμένο στον φυσικό βράχο και οι τοιχογραφίες που μελετάμε αποτελούν διακοσμητικό στοιχείο αυτού του περιβάλλοντος, το οποίο φαίνεται να παρέχει τις κατάλληλες προϋποθέσεις για την ανάπτυξη του *Massilia timonae*, που ενδέχεται να συμμετέχει στην διαδικασία της βιοαλλοίωσης με αδιευκρίνιστο ακόμη μηχανισμό.

Πέρα από τις αναλύσεις που βασιστήκαν στην καλλιέργεια των βακτηρίων που απομονώθηκαν από τις τοιχογραφίες των δύο μνημείων, στην παρούσα ερευνητική εργασία εφαρμόστηκε και μεταγενωμική προσέγγιση, τα πλεονεκτήματα της οποίας έχουν αναφερθεί και προηγουμένως. Όπως προέκυψε λοιπόν, από την ανάλυση των κλώνων των βακτηριακών 16S rRNA βιβλιοθηκών που κατασκευάστηκαν μία για κάθε μνημείο, τα βακτήρια φαίνεται να ομαδοποιούνται

συνολικά σε επτά μείζονες ομάδες. Τόσο για την Κρήνη της Καλλιρόης της Πνύκας, όσο και το Ιερό του Πανός τα βακτήρια ομαδοποιήθηκαν στις εξής μείζονες ομάδες: Actinobacteria, Firmicutes, Planctomycetes, Proteobacteria, Bacteroidetes και Cyanobacteria, καθώς και Gemmatimonadetes η οποία αντιπροσωπεύει βακτήρια μόνο από την Κρήνη της Καλλιρόης της Πνύκας, ενώ από το Ιερό του Πανός προέκυψαν δύο κλώνοι που δεν μπόρεσαν να ταυτοποιηθούν με κανένα, μέχρι σήμερα, γνωστό βακτήριο.

Όσον αφορά την Κρήνη της Καλλιρόης της Πνύκας, παρατηρείται πως οι κλώνοι που αντιστοιχούν στα μέλη των ακτινοβακτηρίων υπερέχουν αριθμητικά των υπολοίπων, ενώ ακολουθούν τα πρωτεοβακτήρια. Τα ακτινοβακτήρια παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον σε τέτοιου είδους μελέτες, καθώς μέλη αυτής της ομάδας τεκμηριώθηκαν ως παράγοντες βιοαλλοίωσης μέσω της εναπόθεσης οργανικών και ανόργανων μεταβολικών τους προϊόντων πάνω στην επιφάνεια των τοιχογραφιών (Schabereiter-Grunter *et al.*, 2004). Επίσης μέλη της ομάδας των πρωτεοβακτηρίων είναι συχνά παρόντα σε περιβάλλοντα όπως αυτού του μνημείου (Somavilla *et al.*, 1978; Laiz *et al.*, 1999; Canaveras *et al.*, 2001).

Όσον αφορά τους κλώνους από το Ιερό του Πανός, αριθμητικά υπερείχε η ομάδα των Firmicutes και ακολουθούσαν τα κυανοβακτήρια. Τα κυανοβακτήρια είναι φωτοσυνθετικοί οργανισμοί και έχει βρεθεί πως προσκολλώνται και αναπτύσσονται στις ζωγραφισμένες επιφάνειες παρέχοντας με τη σειρά τους τις κατάλληλες προϋποθέσεις για την ανάπτυξη ετερότροφων βακτηρίων (Ciferri, 1999). Η τοιχογραφία που μελετήθηκε από το Ιερό του Πανός, βρίσκεται εξωτερικά της εισόδου του μνημείου, συνεπώς στη διάρκεια των αιώνων έχει εκτεθεί στο φως του ήλιου, γεγονός που εξηγεί την έντονη παρουσία των κυανοβακτηρίων στον χώρο αυτό.

Συνολικά, από τους κλώνους τις Κρήνη της Καλλιρόης της Πνύκας ταυτοποιήθηκαν τα παρακάτω γένη: *Crossiella sp.*, *Rubrobacter sp.*, *Euzedya sp.*, *Dongia sp.*, *Haliangium sp.*, *Novosphingobium sp.*, *Bacillus sp.*, *Gracilimonas sp.*, *Salinibacter sp.*, *Phycisphaera sp.*, *Propionibacterium sp.*, *Gematimonas sp.* και *GpI*. Σε επίπεδο είδους προέκυψαν τα εξής αποτελέσματα: *Arthrobacter casteli*, *Cupriavidus metalidurans*, *Phenylobacterium composti*, *Bacillus decolorationis*, *Bacillus cereus*. Από τους κλώνους του Ιερού του Πανός, σε επίπεδο γένους (genus) ταυτοποιήθηκαν 13 κλώνοι και κατηγοριοποιούνται ως εξής: *Paenibacillus sp.*, *Bacillus sp.*, *Brevundimonas sp.*, *Hymenobacter sp.*, *Gemmata sp.*, *Geodermatophilus*

sp., *Chroococcus sp.* και *GpI*, ενώ σε επίπεδο είδους ταυτοποιήθηκαν τα εξής βακτήρια: *Bacillus cibi*, *Bacillus pichiroti* και *Bacillus herbersteinensis*.

Βακτήρια που ανήκουν στα γένη *Crossiella sp.*, *Rubrobacter sp.*, *Bacillus sp.*, *Paenibacillus sp.*, *Dongia sp.*, *Salinibacter sp.*, *Geodermatophilus sp.*, *Gemmata sp.* και *Chroococcus sp.* έχουν απομονωθεί από τοιχογραφίες που παρουσιάζουν συμπτώματα βιοαλλοίωσης (Stomeo *et al.*, 2008; Saarela *et al.*, 2004; Laiz *et al.*, 2009; Diaz-Herrera *et al.*, 2014; Gorbushina *et al.*, 2004; Zucconi *et al.*, 2012), ενώ βακτήρια που ανήκουν στα γένη *Euzedya sp.*, *Haliangium sp.*, *Novosphingobium sp.*, *Gracilimonas sp.*, *Phycisphaera sp.*, *Gematimonas sp.*, *Hymenobacter sp.*, *Brevundimonas sp.* και *GpI* δεν έχουν εντοπιστεί σε τοιχογραφίες, μέχρι τη στιγμή της συγγραφής αυτής της εργασίας.

Τα βακτήρια του γένους *Rubrobacter sp.* και βακτήρια που σχετίζονται με το γένος αυτό (*Rubrobacter*-related bacteria), έπειτα από σειρά πειραμάτων, ενοχοποιήθηκαν για τη δημιουργία ροδαλού φίλμ στην επιφάνεια ιστορικών τοιχογραφιών. Για το φαινόμενο αυτό, ευθύνονται τα καροτενοειδή που παράγουν τα βακτήρια και με τον τρόπο αυτό, φαίνεται πως συμβάλουν στην χρωματική υποβάθμιση της τοιχογραφίας (Imperi *et al.*, 2007). Για τη δημιουργία ροδαλού φίλμ σε χρωματισμένη επιφάνεια, εξαιτίας της παρουσίας των καροτενοειδών, ενοχοποιήθηκε και το γένος *Salinibacter sp.* αλλά και μέλη του γένους *Arthrobacter sp.* (De Felice *et al.*, 2010; Imperi *et al.*, 2007). Τα καροτενοειδή είναι χρωστικές που βρίσκονται σε πολλούς οργανισμούς και τα βακτήρια παράγουν μια πολύ μεγάλη ποικιλία από αυτά (Takaichi, 2009), συμβάλλοντας με αυτό το προϊόν τους στην βιοαλλοίωση ιστορικών τοιχογραφιών.

Το γένος *Chroococcus sp.*, που ανήκει στα κυανοβακτήρια, απομονώθηκε από τοιχογραφία που έφερε χαρακτηριστικά συμπτώματα βιοαλλοίωσης και ενοχοποιήθηκε για το σμαραγδί "πέπλο" στην επιφάνεια του έργου τέχνης (Zucconi *et al.*, 2012). Αντίστοιχα συμπτώματα ήταν διάχυτα στην τοιχογραφία του Ιερού του Πανός, από όπου και εντοπίστηκε το συγκεκριμένο γένος.

Όσον αφορά τα γένη *Euzedya sp.*, *Gracilimonas sp.*, *Phycisphaera sp.*, *Gematimonas sp.* και *Haliangium sp.*, είναι όλα βακτήρια που αναπτύσσονται σε περιβάλλοντα με υψηλή αλατότητα (Ma and Gong, 2013; Fudou *et al.*, 2002). Η ανίχνευση αλατόφιλων ή αλατοανθεκτικών βακτηρίων από τοιχογραφίες έχει καταγραφεί στο παρελθόν και από άλλες μελέτες, χωρίς ωστόσο να περιλαμβάνονται τα προαναφερθέντα γένη (Laiz *et al.*, 2000; Heyrman *et al.*, 2001). Η ανάπτυξη

τέτοιων βακτηρίων σχετίζεται με την υψηλή συγκέντρωση άλατος στα τοιχώματα, ωστόσο δεν έχει αποσαφηνιστεί αν έχουν κάποιο ρόλο ή όχι στο φαινόμενο της βιοαλλοίωσης (Gorbushina *et al.*, 2004).

Από τα βακτηριακά είδη που ταυτοποιήθηκαν και από τα δύο μνημεία, άξια αναφοράς είναι τα είδη *Bacillus decolorationis* και *Bacillus herbersteinensis*, που πρωταπομονώθηκαν και πρωτοκαλλιεργήθηκαν από τοιχογραφίες στο παρεκκλήσι του Κάστρου Herberstein στην Στυρία (Αυστρία) (Heyrman *et al.*, 2003; Wieser *et al.*, 2005). Το *Arthrobacter casteli*, είναι επίσης ένα νέο είδος του γένους *Arthrobacter sp.*, που πρωταπομονώθηκε και πρωτοκαλλιεργήθηκε τόσο από τοιχογραφίες του τάφου Servilia (Νεκρόπολη της Carmona, Ισπανία), όσο και τις τοιχογραφίες στο εκκλησάκι Saint-Catherine (κάστρο Herberstein, Αυστρία) (Heyrman *et.al.*, 2005). Είναι φανερό λοιπόν πως ορισμένα βακτηριακά είδη βρίσκουν το κατάλληλο υπόστρωμα για την ανάπτυξή τους πάνω στις τοιχογραφίες και το αξιοσημείωτο είναι πως τα είδη αυτά έχουν απομονωθεί μόνο από αντίστοιχα ενδιαιτήματα, σε διαφορετικές ωστόσο γεωγραφικές περιοχές. Είναι σχεδόν δεδομένο πως αυτά τα βακτήρια ανήκουν στην μικροχλωρίδα των τοιχογραφιών, ωστόσο δεν έχει διευκρινιστεί ο πιθανός τους ρόλος στην εμφάνιση της βιοαλλοίωσης.

Τα μέλη του γένους *Propionibacterium sp* είναι κυρίως βακτήρια του δέρματος (ανθρώπων και ζώων) (Cummins and Johnson, 1974). Βακτήρια του δέρματος έχουν ταυτοποιηθεί και σε άλλες τοιχογραφίες και πιθανός η παρουσία τους σχετίζεται με την ανθρώπινη επισκεψιμότητα (Gorbushina *et al.*, 2004). Το *Phenylobacterium composti* είναι ένα βακτηριακό είδος που απομονώθηκε από λίπασμα, προερχόμενο από απόβλητα βαμβακιού. Πρόκειται για ένα Gram-αρνητικό βακτηρίδιο με βέλτιστες θερμοκρασίες ανάπτυξης τους 15°C με 45 °C, ενώ τα μέλη του γένους *Phenylobacterium sp.* χαρακτηρίζονται ως αποικοδομητές των συστατικών των ξενοβιοτικών (Weon *et.al.*, 2008). Ούτε το συγκεκριμένο είδος, αλλά ούτε κάποιο άλλο μέλος του γένους *Phenylobacterium sp.* έχει απομονωθεί μέχρι σήμερα από τοιχογραφία.

Το είδος *Cupriavidus metalidurans* είναι ένα χημειολιθότροφο, Gram-αρνητικό, αερόβιο βακτηρίδιο. Το όνομά του υποδηλώνει την ικανότητά του να επιβιώνει σε περιβάλλοντα με υψηλές συγκεντρώσεις βαρέων μετάλλων (Vandamme and Coenye 2004). Δεν έχει απομονωθεί μέχρι τη στιγμή της συγγραφής από ιστορικές τοιχογραφίες.

Από την ανάλυση των κλώνων της Κρήνης της Καλλιρόης της Πνύκας, δύο από τους κλώνους ταξινομήθηκαν σε δύο μείζονες ομάδες που αποτελούν υποψήφια βακτηριακά φύλα (candidate phylum). Ο ένας κλώνος, ταξινομήθηκε σύμφωνα με RDP classifier ως μέλος του κλάδου TM7 και ο άλλος ως μέλος του κλάδου ODI. Τα μέλη του TM7, εμφανίζουν ευρεία διασπορά στη φύση και έχουν απομονωθεί τόσο από το περιβάλλον, όσο και από κλινικά δείγματα (Hugenholtz *et al.*, 2001; Godon *et al.*, 1997; Lazarevic *et al.*, 2010; Rastogi *et al.*, 2009). Άξιο αναφορά είναι πως μέλη του TM7 εντοπίστηκαν ως παράσιτα σε είδος κατσαρίδας (Berlanga *et al.*, 2009). Οι κατσαρίδες ανήκουν στα αρθρόποδα και σύμφωνα με τους Gorbushina and Petersen (Gorbushina and Petersen, 2000) τα αρθρόποδα συμβάλλουν στη διασπορά των μικροοργανισμών από τα βιοφίλμ που έχουν σχηματιστεί στις τοιχογραφίες, στις υγιείς επιφάνειες. Ωστόσο, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία δεν έχει βρεθεί ξανά σε τοιχογραφία, βακτήριο μέλος του TM7, συνεπώς είναι άγνωστο αν συμμετέχει στην αλλοίωση των τοιχογραφιών.

Τα μέλη του υποψήφιου φύλου ODI εμφανίζουν εξίσου ευρεία διασπορά στη φύση (Harris *et al.*, 2004), ωστόσο δεν έχουν ξαναεντοπιστεί σε περιβάλλοντα όπως οι τοιχογραφίες. Τόσο τα μέλη του κλάδου ODI, όσο και τα μέλη του TM7, μέχρι τη στιγμή της συγγραφής δεν έχουν καλλιεργήσιμους αντιπροσώπους σε εργαστηριακές συνθήκες.

Τέλος, από την ανάλυση των αλληλουχιών, προέκυψαν και κλώνοι με πολύ χαμηλά ποσοστά ομοιότητας (<97%) με τον κοντινότερο συγγενή τους. Όπως συνέβη και σε άλλες αντίστοιχες μελέτες, οι κλώνοι αυτοί πιθανώς να αντιπροσωπεύουν νέους γενεαλογικούς κλάδους (Gorbushina *et al.*, 2004; Peppe *et al.*, 2010), ενώ οι δύο κλώνοι από το Ιερό του Πανός που δεν μπόρεσαν να ταυτοποιηθούν με κανένα μέχρι στιγμής γνωστό βακτήριο σε κανένα ταξινομικό επίπεδο, πιθανώς αντιπροσωπεύουν μη μελετημένα βακτήρια.

Από την παρούσα ερευνητική εργασία, έγινε γνωστή σε ένα μεγάλο βαθμό η βακτηριακή ποικιλότητα των τοιχογραφιών των δύο μνημείων και ακολούθησε μια προσπάθεια συσχέτισής της με το φαινόμενο της βιοαλλοίωσης. Ωστόσο, ελάχιστες είναι οι γνώσεις μας τόσο για την ποικιλότητα των οργανισμών στη φύση, όσο και τον ρόλο τους στο φαινόμενο της βιοαλλοίωσης. Για πιο ασφαλή συμπεράσματα θα πρέπει να ακολουθήσουν πειράματα διερεύνησης και της υπόλοιπης μικροχλωρίδας των τοιχογραφιών και των δύο μνημείων, καθώς οι μύκητες και τα μικροάλλα αποτελούν εν δυνάμει βιοαλλοιωτικοί παράγοντες.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. **Abraham W.R.**, Strompl C., Meyer H., Lindholst S., Moore E.R.B., Christ R., Vancanneyt M., Tindall B.J., Bennasar A., Smit J., Tesar M., (1999). Phylogeny and polyphasic taxonomy of *Caulobacter* species. Proposal of *Maricaulis* gen. nov. with *Maricaulis maris* (Poindexter) comb. nov. as the type species, and emended description of the genera *Brevundimonas* and *Caulobacter*. *Int J Syst Bacteriol* **49**,1053–1073
2. **Abraham W.R.**, Estrela A.B., Nikitin D.I., Smit J., Vancanneyt M., (2010) *Brevundimonas halotolerans* sp. nov., *Brevundimonas poindexteriae* sp. nov. and *Brevundimonas staley* sp. nov., prosthecate bacteria from aquatic habitats.
Int J Syst Evol Microbiol **60**(8):1837-1843
3. **Allsopp D.**, (2011) Worldwide wastage: the economics of biodeterioration. *Microbiol Tod* **38**:150-153
4. **Allsopp D.**, Seal K., Gaylarde C., (2006) *Introduction to biodeterioration*, 2nd Ed., Cambridge University Press, Cambridge, U.K.
5. **Amaan R.I.**, Ludwig W., Schleifer K.H., (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **59**:143-169
6. **Anderson I.C.**, Campbell C.D., Prosser J.I., (2003) Potential bias of fungal 18S rDNA and internal transcribed spacer polymerase chain reaction primers for estimating fungal biodiversity in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **5**:36–47
7. **Ash C.**, Priest F.G., Collins M.D., (1993) Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test. Proposal for the creation of a new genus *Paenibacillus*. *Antonie van Leeuwenhoek* **64**:253-260
8. **Berezin E.** and Towner K.J., (1996) *Acinetobacter* spp. as Nosocomial Pathogens: Microbiological, Clinical, and Epidemiological Features. *Clin Microbiol Rev.* **9**(2):148-165
9. **Berlanga M.**, Paster B.J., Guerrero R., (2009) The taxophysiological paradox: changes in the intestinal microbiota of the xylophagous cockroach *Cryptocercus punctulatus* depending on the physiological state of the

- host. *International microbiology : the official journal of the Spanish Society for Microbiology* **12**(4): 227-36
10. **Berner M.**, Wanner G., Lubitz W., (1997) A comparative study of the fungal flora present in Medieval wall paintings in the chapel of the castle Herberstein and in the Paris Church of St. Goergen in Styria, Austria. *Int Biodeter Biodegrad* **40**:53–61
 11. **Bock E.** and Sand W., (1993) The microbiology of masonry biodeterioration. *J. Appl. Bacteriol.* **74**:503-514.
 12. **Bousher A.**, Malini C., Edyvean R., (1995) Biodeterioration and biodegradation 9: The 9th International Biodeterioration and Biodegradation Symposium. Rugby, UK: Institution of Chemical Engineers
 13. **Canaveras J.C.**, Sanchez-Moral S., Soler V., Saiz-Jimenez C., (2001) Microorganisms and microbially induced fabrics in cave walls. *Geomicrobiol. J.* **18**:223-240.
 14. **Camuffo, D.**, (1986) Deterioration Processes of Historical Buildings, pp.189-221 in: T. Schneider (editor): "*Acidification and its Policy Implications*", Elsevier, Amsterdam
 15. **Camuffo, D.**, (1992) Acid Rain and Deterioration of Monuments: How Old Is the Phenomenon? *Atmospheric Environment*, 26B, pp.241-247
 16. **Camuffo, D.**, (1994) Effects of Air Pollution on Historic Buildings and Monuments. Scientific Basis for Conservation: Case Studies in the Deterioration of Stone Monuments in Italy. *European Cultural Heritage Newsletter on Research*, **8** (1): 7-15
 17. **Cappitelli F.**, Abbruscato P., Foladori P., Zanardini E., Ranalli G., Principi P., Villa F., Polo A., Sorlini C., (2009) Detection and elimination of cyanobacteria from frescoes: the case of the St. Brizio Chapel (Orvieto Cathedral, Italy). *Microb. Ecol.* **57**:633-639
 18. **Casadio F.**, Giangualano I., Pique' F., (2004) Organic materials in wall paintings: the historical and analytical literature. *Rev Conserv* **5**:63-80
 19. **Cavalier-Smith T.**, (2000) Membrane heredity and early chloroplast evolution. *Trends In Plant Science* **5**(4):175-182
 20. **Ciferri O.**, (1999) Microbial degradation of paintings. *Appl Environ Microbiol* **65**: 879-885

21. **Costerton J.W.**, Lewandowski Z., Caldwell D.E., (1995) Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* **49**: 711-45
22. **Costerton J.W.**, Stewart P.E., Greenberg E.P., (1999) Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* **284**: 1318-22
23. **Christensen B.E.**, Characklis W.G., (1990) Physical and chemical properties of biofilms. In: Characklis W.G. and Marshall K.C. (Eds). *Biofilms*. New York, NY: John Wiley and Sons, Inc.
24. **Crispim C.A.**, Gaylarde C.C., (2005) Cyanobacteria and biodeterioration of cultural heritage: a review. *Microb Ecol* **49**:1–9
25. **Cummins C.S.**, Johnson J.L., (1974) *Corynebacterium parvum* : a Synonym for *Propionibacterium acnes* ? *J Gen Microbiol* **80**:433-442
26. **De Felice B.**, Pasquale V., Tancredi N., Scherillo S., Guida M., (2010) Genetic fingerprint of microorganisms associated with the deterioration of an historical tuff monument in Italy. *Journal of Genetics* **8**(2):253-257
27. **De Leo F.**, Iero A., Zammit G., Urzì C. E., (2012) Chemoorganotrophic bacteria isolated from biodeteriorated surfaces in cave and catacombs. *Int. J. Speleol.* **41**(2):125-136
28. **Diaz-Herraiz M.**, Jurado V., Cuezva S., Laiz L., Pallecchi P., Tiano P., Sanchez-Moral S., Saiz-Jimenez C., (2014) Deterioration of an Etruscan tomb by bacteria from the order *Rhizobiales*. *SCIENTIFIC REPORTS* **4**:3610
29. **Donachie S.P.**, Foster J.S., Brown M.V., (2007) Culture clash: challenging the dogma of microbial diversity. *ISME J.* **1**:97–99
30. **Dörpfeld W.** (1892) “Die Ausgrabungen an der Enneakrunos.” *MDAI(A)* **17**: 439-45.
31. **Estrela A.B.**, Abraham W.R., (2010) *Brevundimonas vancouverensis* sp. nov., isolated from blood of a patient with endocarditis. *Int J Syst Evol Microbio* **60**(9):2129-2134
32. **Euzéby J.P.**, (1997) List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a Folder Available on the Internet. *Int J Syst Bacteriol* **47**(2): 590–2
33. **Farmer J.J.**, Fanning G.R., Huntley-Carter G.P., Holmes B., Hickman F.W., Richard C., Brenner D.J., (1981) *Kluyvera*, a new (redefined) genus in the family Enterobacteriaceae: identification of *Kluyvera ascorbata* sp. nov. and *Kluyvera cryocrescens* sp. nov. in clinical specimens. *J Clin Microbiol.* **13**(5): 919-933.

34. **Ferris M.J.**, Ruff-Roberts A.L., Kopczynski E.D., Bateson M.M., Ward D.M., (1996) Enrichment culture and microscopy conceal diverse thermophilic *Synechococcus* populations in a single hot spring microbial mat habitat. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:1045-1050
35. **Fudou R.**, Jojima Y., Iizuka T., Yamanaka S., (2002) *Haliangium ochraceum* gen. nov., sp. nov. and *Haliangium tepidum* sp. nov.: novel moderately halophilic myxobacteria isolated from coastal saline environments. *J Gen Appl Microbiol.* **48**(2):109-16.
36. **Gallego V.**, Sanchez-Porro C., Garcia M.T., Ventosa A., (2006) *Massilia aurea* sp. nov., isolated from drinking water. *Intl J System Evol Microbiol* **56**:2449-2453
37. **Garcia-Fraile P.**, Velazquez E., Mateos P.F., Martinez-Molina E., Rivas R., (2008) *Cohnella phaseoli* sp. nov., isolated from root nodules of *Phaseolus coccineus* in Spain and emended description of the genus *Cohnella*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **58**:1855-1859.
38. **Gaylarde C.**, Ribas, Silva M., Warscheid Th., (2003) "Microbial impact on building materials: An overview." *Mater. Struct.*, **36**: 342-352
39. **Garg, K.L.**, Jain K.K., Mishra A.K., (1995) Role of fungi in the deterioration of wall paintings. *The Science of the Total Environment* **167**: 255-271
40. **Giullitte O.**, (1995) Bioreceptivity: a new concept for building ecology studies. *The Science of the Total Environment* **167**: 215–220
41. **Godon J.J.**, Zumstein E., Dabert P., Habouzit F., Moletta R., (1997) Molecular microbial diversity of an anaerobic digester as determined by small-subunit rDNA sequence analysis. *Appl EnvMicrobiol* **63** (7):2802-13.
42. **Gonzalez I.**, Laiz L., Hermosin B., Guerrero B., Incerti C., Saiz-Jimenez, C., (1999) Microbial communities of the rock paintings of Atlanterra shelter (South Spain). *J. Microbiol. Methods.* **36**:123-127
43. **Gonzalez J.M.**, Saiz-Jimenez C., (2004) Microbial diversity in biodeteriorated monuments as studied by denaturing gradient gel electrophoresis. *J. Sep. Sci.* **27**:174-180
44. **Gonzalez J.M.**, Saiz-Jimenez C., (2005) Application of molecular nucleic acid-based techniques for the study of microbial communities in monuments and artworks. *Int. Microbiol.* **8**:189-194

45. **Gorbushina A.A.**, Petersen K., (2000) Distribution of microorganisms on ancient wall paintings as related to associated faunal elements. *Int Biodeterior Biodegrad* **46**, 277-284
46. **Gorbushina A.A.**, Lialikova N.N., Vlasov D.I., Khizhniak T.V., (2002) Microbial communities on the monuments of Moscow and St. Petersburg: biodiversity and trophic relations. *Mikrobiologiya* **71**:409-417
47. **Gorbushina A.A.**, Heyrman J., Dorniedena T., Gonzalez-Delvallec M., Krumbeina W.E., Laizc L., Petersena K., Saiz-Jimenezc C., Swings J., (2004) Bacterial and fungal diversity and biodeterioration problems in mural painting environments of St. Martins church (Greene–Kreiansen, Germany). *Intern Biodeter Biodegrad* **53**:13-24
48. **Griffin P.S.**, Indictor N., Koestler R.J., (1991) The biodeterioration of stone: a review of deterioration mechanisms, conservation case histories, and treatment. *Int. Biodeterior.* **28**:187-207
49. **Gurtner C.**, Heyrman J., Piñar G., Lubitz W., Swings J., and Rölleke S., (2000) Comparative analyses of the bacterial diversity on two different biodeteriorated wall paintings by DGGE and 16S rDNA sequence analysis. *Int Biodeter Biodegr* **46**:229-239
50. **Hameed A.**, Hung M.H., Lin S.Y., Hsu Y.H., Liu Y.C., Shahina M., Lai W.A., Huang H.C., Young L.S., Young C.C., (2013) *Cohnella formosensis* sp. nov., a xylanolytic bacterium isolated from the rhizosphere of *Medicago sativa* L. *Int J Syst Evol Microbiol* **63**:2806-2812
51. **Hammond P.M.**, (1995) Described and estimated species numbers: an objective assessment of current knowledge. In: Allsopp D., Colwell R.R., and Hawksworth D.L. (Eds). Microbial diversity and ecosystem function. Wallingford, UK: CAB International Hawksworth D.L. and Rossman, A.Y. 1997. Where are all the undescribed fungi? *Phytopathology* **87**: 888-891.
52. **Harris J.K.**, Kelley S.T., Pace R., (2004) New Perspective on Uncultured Bacterial Phylogenetic Division OP11. *APPL ENVIRON MICROBIOL* **70**(2):845-849
53. **Herrera L.K.**, Videla H.A., (2009) Surface analysis and materials characterization for the study of biodeterioration and weathering effects on cultural property. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **63**:813–822

54. **Herrera L.K.**, Arroyave C., Guiamet P., Gomez de Saravia S., Videla H., (2004) Biodeterioration of peridotite and other constructional materials in a building of the Colombian cultural heritage. *Int Biodeterior Biodegrad* **54**:135-141
55. **Heyndrickx M.**, Vandemeulebroecke A., Scheldeman P., Kertters K., De Vos P., Logan N.A., Aziz A.M., Ali N., Berkeley R.C.W., (1996) Polyphasic Reassessment of the Genus *Paenibacillus*, Reclassification of *Bacillus lautus* (Nakamura 1984) as *Paenibacillus lautus* comb. nov. and of *Bacillus peoriae* (Montefusco et al. 1993) as *Paenibacillus peoriae* comb. nov., and Emended Descriptions of *P. lautus* and of *P. peoriae* *Int J Syst Bacteriol* **46**(4):988-1003
56. **Heyrman J.**, Mergaert J., Denys R., and Swings J., (1999) The use of fatty methyl ester analysis (FAME) for the identification of heterotrophic bacteria present on three mural paintings showing severe damage by microorganisms. *FEMS Microbiol Lett* **181**:55-62
57. **Heyrman J.**, Swings J., (2001) 16S rDNA Sequence Analysis of Bacterial Isolates from Biodeteriorated Mural Paintings in the Servilia Tomb(Necropolis of Carmona, Seville, Spain) *System. Appl. Microbiol.* **24**: 417–422
58. **Heyrman J.**, Balcaen A., Rodriguez-Diaz M., Logan N.A., Swings J., De Vos P., (2003) *Bacillus decolorationis* sp. nov., isolated from biodeteriorated parts of the mural paintings at the Servilia tomb (Roman necropolis of Carmona, Spain) and the Saint-Catherine chapel (Castle Herberstein, Austria). *Int J System Evol Microbiol* **53**:459-463
59. **Heyrman J.**, Verbeeren J., Schumann P., Swings J., De Vos P., (2005)
60. Six novel *Arthrobacter* species isolated from deteriorated mural paintings. *Int J System Evol Microbiol* **55**:1457-1464
61. **Huber T.**, Faulkner G., Hugenholtz P., (2004) Bellerophon: a program to detect chimeric sequences in multiple sequence alignments. *Bioinformatics.* **20**(14):2317-2319
62. **Hugenholtz P.**, Goebel B.M., Pace N.R., (1998) Impact of Culture-Independent Studies on the Emerging Phylogenetic View of Bacterial Diversity. *Journal of bacteriology* **180**(18):4765-4774
63. **Hugenholtz P.**, Tyson G. W., Webb R. I., Wagner A. M., Blackall L.L., (2001) Investigation of Candidate Division TM7, a Recently Recognized

- Major Lineage of the Domain Bacteria with No Known Pure-Culture Representatives. *Appl Env Microbiol* **67**(1):411-419
64. **Hugenholtz P.**, Huber T., (2003) Chimeric 16S rDNA sequences of diverse origin are accumulating in the public databases. *Int. J. Syst. Evol Microbiol.* **53**:289-9
 65. **Imperi F.**, Caneva G., Cancellieri L., Ricci M.A., Sodo A., Visca P., (2007) The bacterial aetiology of rosy discoloration of ancient wall paintings. *Environmental Microbiology* **9**(11): 2894-2902
 66. **Jokilehto**, (1999) A Century of Heritage Conservation. *Journal of Architectural Conservation* **5**(3): 14-33
 67. **Kampfer P.**, Rossello-Mora R., Falsen E., Busse H.-J., Tindall B.J., (2006). *Cohnella thermotolerans* gen. nov., sp. nov., and classification of 'Paenibacillus hongkongensis' as *Cohnella hongkongensis* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**: 781-786.
 68. **Khianngam S.**, Tanasupawat S., Akaracharanya A., Kim K.K., Lee K.L., Lee A.S., (2010) *Cohnella thailandensis* sp. nov., a xylanolytic bacterium from Thai soil. *Int J Syst Evol Microbiol* **60**:2284-2287
 69. **Kiel G.**, Gaylarde C.C., (2007) Diversity of salt-tolerant culturable aerobic microorganisms on historic buildings in Southern Brazil. *World J Microbiol Biotechnol* **23**:363–366
 70. **Koestler R.J.**, Koestler V.H., Charola A.E., Nieto-Fernandez F.E., (2003) Art, biology, and conservation: biodeterioration of works of art. New York, NY: The Metropolitan Museum of Art.
 71. **Koch G.H.**, Brongers M.P.H., Thompson N.G., Virmani Y.P., Payer J.H., (2001) Corrosion Cost and Preventive Strategies in the United States. Report FHWA-RD-01-156, Federal Highway Administration
 72. **Kraková L.**, Chovanová K., Selim A.S., Šimonovičová A., Puškarová A., Maková A., Pangallo D., (2012) A multiphasic approach for investigation of the microbial diversity and its biodegradative abilities in historical paper and parchment documents. *Int Biodeter Biodegrad* **70**:117-125
 73. **Kyi C.P.**, (2003) The significance of appropriate sampling and cultivation techniques in the effective assessment of biodeterioration. *AICCM Bull* **28**:89-92

74. **Laiz L.**, Groth I., Gonzalez I., Saiz-Jimenez C., (1999) Microbiological study of the dripping water in Altamira Cave (Santillana del Mar, Spain). *J. Microbiol. Methods*. **36**:129-138
75. **Laiz L.**, Recio D., Hermosin B., Saiz-Jimenez C., (2000) Microbial communities in salt excretions. In: Ciferri O., Tiano P., Mastromei G., (Eds.) *Of Microbes and Art-The Role of Microbial Communities in the Degradation and Protection of Cultural Heritage*. Kluwer Academic, Dordrecht, Plenum Publishers, New York, pp. 77-88.
76. **Laiz L.**, Hermosin B., Caballero B., Saiz-Jimenez C., (2002) Facultatively oligotrophic bacteria in Roman mural paintings. In *Protection and Conservation of the Cultural Heritage of the Mediterranean Cities*. Galan, E., and Zezza F., (Eds) Lisse: Balkema Publications, pp. 173-178
77. **Laiz L.**, Pinar G., Lubitz W., Saiz-Jimenez C., (2003) The colonization of building materials by microorganisms as revealed by culturing and molecular methods. In: Saiz-Jimenez C. (Eds) *Molecular biology and cultural heritage*. Swets & Zeitlinger BV, Lisse, pp 23-28
78. **Laiz L.**, Pinar G., Lubitz W., Saiz-Jimenez C., (2003) Monitoring the colonization of monuments by bacteria: cultivation versus molecular methods. *Environ. Microbiol.* **5**:72-74.
79. **Laiz L.**, Miller A. Z., Jurado V., Akatova E., Sanchez-Moral S., Gonzalez J. M., Dionísio A., Macedo M. F., Saiz-Jimenez C., (2009) Isolation of five *Rubrobacter* strains from biodeteriorated monuments. *Naturwissenschaften*. **96**:71-79
80. **Lal S.**, Tabacchioni S., (2009) Ecology and biotechnological potential of *Paenibacillus polymyxa*: a minireview. *Indian J Microbiol.* **49**:2-10.
81. **Lane D.J.**, (1991) 16S/23S rRNA sequencing. In: Nucleic acid techniques in bacterial systematics. Stackebrandt, E., and Goodfellow, M., (Eds.) John Wiley and Sons, New York, NY, pp.115-175
82. **La Scola B.**, Birtles R.J., Mallet M.M., Rault D., (1998) *Massilia timonae* gen. nov., sp. nov., Isolated from Blood of an Immunocompromised Patient with Cerebellar Lesions. *Journal of Clinical Microbiology* **36**(10):2847-2852
83. **Lazarevic V.**, Whiteson K., Hernandez D., Francois P., Schrenzel J., (2010) Study of inter- and intra-individual variations in the salivary microbiota. *BMC Genomics* **11**: 523.

84. **Liao C.H.**, Shollenberger L.M., (2003) Survivability and long-term preservation of bacteria in water and in phosphate-buffered saline. *Letters in Applied Microbiol.* **37**: 45-50
85. **Lindquist D.**, Murrill D., Burran B.P., Winans G., Janda J.M., Probe W., (2003) Characteristics of *Massilia timonae* and *Massilia timonae*-Like Isolates. *Journal of Clinical Microbiology* **41**(1):192-196
86. **Lupan I.**, Popescu O., (2012) Metagenomics and future perspectives for biodeterioration and biodegradation studies. *Annals of RSCB* **17**(2): 37-42
87. **Ma B.**, Gong J., (2013) A meta-analysis of the publicly available bacterial and archaeal sequence diversity in saline soils. *World J Microbiol Biotechnol* **29**(12):2325-2334
88. **Madigan M.**, Martinko J., (Eds), (2005) *Brock Biology of Microorganisms* **11**:177-188. Prentice Hall
89. **McNamara C.J.**, Mitchell R., (2005) Microbial deterioration of historic stone *Front Ecol Environ*; **3**(8): 445-451
90. **McSpadden Gardener B.B.**, (2004) Ecology of *Bacillus* and *Paenibacillus* spp. *Agricultural Systems. Phytopathology* **94**:1252-1258
91. **Meehan C.**, Bjourson A.J., McMullan G., (2001) *Paenibacillus azoreducens* sp. nov., a synthetic azo dye decolorizing bacterium from industrial wastewater. *Int J Syst Bacteriol* **51**:1681-1685
92. **Milanesi C.**, Baldi F., Bornic S., Vignania R., Ciampolinic F., Faleria C., Crestia M., (2006) Biodeterioration of a fresco by biofilm forming bacteria. *Int Biodeter Biodegrad* **57**: 168-173
93. **Møller A.K.**, Søborg A.D., Al-Soud W.A., Sørensen S.J., Kroer N., (2013) Bacterial community structure in High-Arctic snow and freshwater as revealed by pyrosequencing of 16S rRNA genes and cultivation. *Polar Research* **32**, 17390
94. **Montes M.J.**, Mercade E., Bozal N., Guinea J., (2004) *Paenibacillus antarcticus* sp. nov., a novel psychrotolerant organism from the Antarctic environment. *Int J Syst Evol Microbiol.* **54**:1521-1526
95. **Nugari M.P.**, Pietrini A.M., Caneva G., Imperi F., Visca P., (2009) Biodeterioration of mural paintings in a rocky habitat: The Crypt of the Original Sin (Matera, Italy). *Int Biodeter Biodegrad* **63**: 705-711

96. **Økstad E.O.A.**, Caugant A.D., Johansen H. A., Fouet A., Mock M., Hegna I., Kolstø A.B., (2000) *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*-One Species on the Basis of Genetic Evidence. *Appl Environ Microbiol.* **66**(6):2627-2630
97. **Ouyang J.**, Pei Z., Lutwick L., Dalal S., Yang L., Cassai N., Sandhu K., Hanna B., Wieczorek R.L., Bluth M., Pincus M.R., (2008) Case report: *Paenibacillus thiaminolyticus*: a new cause of human infection, inducing bacteremia in a patient on hemodialysis. *Ann Clin Lab Sci.* **38**:393-400.
98. **Pace N.R.**, (1996) New perspective on the natural microbial world: molecular microbial ecology. *ASM News* **62**:463-469
99. **Pangallo D.**, Chovanová K., Simonovicová A., Ferianc P., (2009) Investigation of microbial community isolated from indoor artworks and air environment: identification, biodegradative abilities, and DNA typing. *Canadian Journal of Microbiology* **55**:277-287
100. **Pangallo D.**, Chovanova K., Drahovskac H., De Leo F., Urzi C., (2009b) Application of fluorescence internal transcribed spacer-PCR (f-ITS) for the cluster analysis of bacteria isolated from air and deteriorated fresco surfaces. *Int. Biodeter. Biodegrad.* **63**:868-872
101. **Pangallo D.**, Krakova L., Chovanova K., Simonovicova A., De Leo F., Urzi C., (2012) Analisis and comparison of the microflora isolated from fresco surface and from surrounding air environment through molecular and biodegradative assays. *World Microbiol Biotechnol* **28**(5):2015-2027
102. **Parshetti G.**, Kalme S., Saratale G., Govindwar S., (2006) Biodegradation of Malachite Green by *Kocuria rosea* MTCC 1532. *Acta. Chim. Slov.* **53**:492-498
103. **Pavan M.E.**, Franco R.J., Rodriguez J.M., Gadaleta P., Abbott S.L., Janda J.M., Zorzopulos J., (2005) Phylogenetic relationships of the genus *Kluyvera*: transfer of *Enterobacter intermedius* Izard et al. 1980 to the genus *Kluyvera* as *Kluyvera intermedia* comb. nov. and reclassification of *Kluyvera cochleae* as a later synonym of *K. intermedia*. *Int J System and Evol Microbiol.* **55**:437-442
104. **Pepe O.**, Sannino L., Palomba S., Anastasio M., Blaiotta G., Villani F., Moschetti G., (2010) Heterotrophic microorganisms in deteriorated medieval

- wall paintings in southern Italian churches. *Microbiological Research* **165**:21-32
105. **Philippe J.M.**, Grimont Bouvet and Patric A.D., (1986) Taxonomy of the Genus *Acinetobacter* with the Recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov. *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov. *Acinetobacter johnsonii* sp. nov. and *Acinetobacter junii* sp. nov. and Emended Descriptions of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwofii*. *Int J System Bacteriol* **36**(2):228-240
 106. **Phyllis A.W.**, Travers M., Travers S. R., (1989) Worldwide Abundance and Distribution of *Bacillus thuringiensis* Isolates. *Appl Environ Microbiol* **55**(10): 2437-2442
 107. **Pietrini A.M.**, Ricci, S., (1993) Occurrence of a calcareous blue-green alga, *Scytonema julianum* (Kuetz.) Meneghini, on the frescoes of a church carved from the rock in Matera, Italy. *Cryptogamic Botany* 3/2, 290–295
 108. **Pietrini, A.M.**, Ricci, S., Nugari, M.P., 2008. Churches and crypts. In: Caneva, G., Nugari, M.P., Salvadori, O. (Eds.), *Plant Biology for Cultural Heritage. Biodeterioration and Conservation*. Getty Conservation Institute, New York, pp. 179–183
 109. **Priest F.G.**, Goodfellow M., Shute L.A., Berkeley R.C.W., (1987) *Bacillus amyloliquefaciens* **sp. nov. norn. rev.** *Int J Syst Bacteriol* **37**(1):69-71
 110. **Rappe M.S.**, SJ., Giovannoni SJ. (2003) The uncultured microbial majority. *Annu. Rev. Microbiol* **57**:369-94
 111. **Rastogi G.**, Stetler L.D., Peyton B.M., Sani R.K., (2009) Molecular analysis of prokaryotic diversity in the deep subsurface of the former Homestake gold mine, South Dakota, USA. *The Journal of Microbiology* **47**(4):371-384
 112. **Roccardi, A.**, Ricci S., Pietrini A.M., (2008) Semienclosed environments. In: Caneva, G., Nugari, M.P., Salvadori, O. (Eds.), *Plant Biology for Cultural Heritage. Biodeterioration and Conservation*. Getty Conservation Institute, New York, pp. 206–210
 113. **Ryan K.J.**, Ray C.G., (Eds), (2004), Sherris “Plague and Other Bacterial Zoonotic Diseases” *Medical Microbiology* **126**:481-491 (4th ed.). McGraw Hill.
 114. **Ryu S.H.**, Park M., Lee J.R., Yun Y.P., Jeon O.C., (2007) *Brevundimonas aveniformis* sp. nov., a stalked species isolated from activated sludge. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**(7):1561-1565

115. **Rojas J.A.**, Cruz C., Mikán J.F., Villalba L.S., Cepero de García M.C., Restrepo S., (2009) Isoenzyme characterization of proteases and amylases and partial purification of proteases from filamentous fungi causing biodeterioration of industrial paper. *Inter Biodeter & Biodegrad* **63**:169-175
116. **Roldan M.**, Clavero E., Hernandez-Marine M., (2003) Aerophytic biofilms in dim habitats. In: Salz Jimenez C. (Ed.), *Molecular Biology and Cultural Heritage, Proceedings of International Congress, Sevilla*. Balkema Publishers, Lisse (NL), pp. 163-169
117. **Rolleke S.**, Muyzer G., Wawer C., Wanner G., Lubitz W., (1996) Identification of bacteria in the biodegraded wall painting by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:2059-2065
118. **Rolleke S.**, Witte A., Wanner G., Lubitz W., (1998) Medieval wall painting-a habitat for archaea: identification of archaea by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of PCR amplified gene fragments coding 16S rRNA in a medieval wall painting. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **41**:85-92
119. **Rolleke S.**, Gurtner C., Drewello U., Drewello R., Lubitz W., Weissmann R., (1999) Analysis of bacterial communities on historical glass by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR amplified gene fragments coding for 16S rRNA. *J Microbiol Methods* **36**:107-114
120. **Rolleke S.**, Gurtner C., Pinar G., Lubitz W., (2000) Molecular approaches for the assessment of microbial deterioration of objects of art. In: Ciferri O., Tiano P., Mastromei G. (Eds) *Proceedings of International Conference on Microbiology and Conservation (ICMC)*. Kluwer/Plenum, New York, pp 39-47
121. **Rosado T.**, Gil M., Mirão J., Candeias A., Caldeira A.T., (2013) Oxalate biofilm formation in mural paintings due to microorganisms-A comprehensive study. *Int Biodeter Biodegrad* **85**:1-7
122. **Rose A.H.**, (1981) *Microbial Biodeterioration*. Academic Press, London
123. **Rosi F.**, Daveri A., Miliari C., Verri G., Benedetti P., Pique F., Brunetti B.G., Sgamellotti A., (2009) Non-invasive identification of organic materials in wall paintings by fiber optic reflectance infrared spectroscopy: a statistical multivariate approach. *Anal Bioanal Chem* **395**:2097-2106

124. **Saarela M.**, Alakomi H.L., Suihko M.L., Maunuksela L., Raaska L., Mattila-Sandholm T., (2004) Heterotrophic microorganisms in air and biofilm from Roman catacombs, with special emphasis on actinobacteria and fungi. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **54**:27-37
125. **Saiz-Jimenez C.**, Samson R.A., (1981) Microorganisms and environmental pollution as deteriorating agents of the frescoes of the monastery of 'Santa Maria De la Rabida', Huelva, Spain. In *ICOM Committee for Conservation, 6th Triennial Meeting of the International Council of Museums*, pp. 81/15/5/1-14. Ottawa, Canada
126. **Saiz-Jimenez C.**, (1994) Biodeterioration of stone in historic buildings and monuments. In: *Biodeterioration Research 4: Mycotoxins, Wood Decay, Plant Stress, Biocorrosion, and General Biodeterioration*, G.C. Llewellyn, W.W. Dashek
127. **Saiz-Jimenez C.**, Laiz L., (2000) Occurrence of halotolerant/halophilic bacterial communities in deteriorated monuments. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **46**:319-326
128. **Saiz-Jimenez C.**, (2001) The biodeterioration of building materials. In: *Microbiologically Influenced Corrosion*, vol. 2, J. Stoecker, ed. NACE, Houston. (in press). and C.E. O'Rear, eds. Plenum, New York, pp 587-603
129. **Sand W.**, Bock E., (1991) Biodeterioration of ceramic materials by biogenic acids. *International Biodeterioration* **27**(2): 175-183
130. **Segers P.**, Vancanneyt M., Pot B., Torck U., Hoste B., Dewettinck D., Falsen E., Kersters K., De Vos P. (1994). Classification of *Pseudomonas diminuta* Leifson and Hugh 1954 and *Pseudomonas vesicularis* Bursing, Döhl, and Freytag 1953 in *Brevundimonas* gen. nov. as *Brevundimonas diminuta* comb. nov. and *Brevundimonas vesicularis* comb. nov., respectively. *Int J Syst Bacteriol* **44**:499-510
131. **Schabereiter-Gurtner C.**, Pinar G., Lubitz W., Rolleke S., (2001a) An advanced molecular strategy to identify bacterial communities on art objects. *J Microbiol Methods* **45**:77-87
132. **Schabereiter-Gurtner C.**, Pinar G., Vybiral D., Lubitz W., Rolleke S. (2001b) Rubrobacter related bacteria associated with rosy discoloration of masonry and lime wall paintings. *Arch. Microbiol.* **176**:347-354

133. **Schabereiter-Gurtner C.**, Saiz-Jimenez C., Piñar G., Lubitz W., Rölleke S., (2002) Phylogenetic 16S rRNA analysis reveals the presence of complex and partly unknown bacterial communities in Tito Bustillo cave, Spain, and on its Palaeolithic paintings. *Env. Microbiol.* **4**(7):392-400
134. **Schabereiter-Gurtner C.**, Saiz-Jimenez C., Pinar G., Lubitz W., Rolleke S., (2004) Phylogenetic diversity of bacteria associated with Paleolithic paintings and surrounding rock walls in two Spanish caves (Llonin and La Garma). *Microbiol. Ecol.* **47**:235-247
135. **Shida O.**, Takagi H., Kadowaki K., Nakamura L.K., Komagata K., (1997). Transfer of *Bacillus alginolyticus*, *Bacillus chondroitinus*, *Bacillus curdlanolyticus*, *Bacillus glucanolyticus*, *Bacillus kobensis*, and *Bacillus thiaminolyticus* to the genus *Paenibacillus* and emended description of the genus *Paenibacillus*. *Int J Syst Bacteriol* **47**:289-298
136. **Somavilla J.F.**, Khayyat N., Arroyo V., (1978) A comparative study of the microorganisms present in the Altamira and La Pasiega Caves. *Int. Biodeter. Bull.* **14**:103-109
137. **Stackebrand E.**, Koch C., Gvozdiak O., Schumann P., (1995) Taxonomic Dissection of the Genus *Micrococcus*: *Kocuria* gen. nov., *Nesterenkonia* gen. nov., *Kytococcus* gen. nov., *Dermacoccus* gen. nov., and *Micrococcus* Cohn 1872 gen. emend. *Int J Syst Bacteriol* **45**(4):682-699
138. **Sterflinger K.**, Piñar G., (2013) Microbial deterioration of cultural heritage and works of art — tilting at windmills? *Appl Microbiol Biotechnol* **97**: 9637-9646
139. **Stomeo F.**, Portillo M.C., Gonzalez J.M., Laiz L., Saiz-Jimenez C., (2008) *Pseudonocardia* in white colonizations in two caves with Paleolithic paintings. *Int. Biodeter. Biodegrad.* **62**(4):483-486
140. **Takaichi S.**, Mochimaru M., Maoka T., (2006) Presence of free myxol and 4-hydroxymyxol and absence of myxol glycosides in *Anabaena variabilis* ATCC 29413, and proposal of a biosynthetic pathway of carotenoids. *Plant Cell Physiol* **47**:11-216
141. **Tiano P.**, (1994) Biodeterioration of stone monuments: a critical review. In: Recent Advances in Biodeterioration and Biodegradation, vol. 1, K.L. Garg, N. Garg, K.G. Mukerji, (Eds) Naya Prokash, Calcutta, pp. 301-322

142. **Tiano P.**, (1998) Biodeterioration of monumental rocks: decay mechanisms and control methods. *Sci. Technol. Cult. Herit.* **7**:13-32
143. **Tikam C.D.**, Pankaj K.A., (2012) Evaluation of potential of molecular and physical techniques in studying biodeterioration. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* **11**:71–104
144. **Towner K.J.**, (1996) Biology of *Acinetobacter* spp. In: Bergogne-Bérézin EJ-GM, Towner KJ, (Eds.) *Acinetobacter: Microbiology, Epidemiology, Infections, Management*. pp. 13–36. CRC Press. Boca Raton, FL.
145. **Turner S.**, Pryer K.M., Miao V.P., Palmer J.D., (1999) Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. *J Eukaryot Microbiol* **46**(4):327-38
146. **Urzi` C.**, Brusetti L., Salamone P., Sorlini C., Stackebrandt E., Daffonchio D., (2001) Biodiversity of Geodermatophilaceae isolated from altered stones and monuments in the Mediterranean basin. *Environ Microbiol* **3**:471-479
147. **Urzi` C.**, De Leo F., Donato P., La Cono V. (2003) Multiple approaches to study the structure and diversity of microbial communities colonizing artistic surfaces. In: Saiz-Jimenez C (Eds) *Molecular biology and cultural heritage*. Balkema, Lisse, pp 187-194
148. **Urzi` C.**, La Cono V., Stackebrandt E., (2004) Design and application of two oligonucleotide probes for the identification of Geodermatophilaceae strains using fluorescence in situ hybridization (FISH). *Environ Microbiol* **6**:678-685
149. **Valentin N.**, (2003) Microbial contamination and insect infestation inorganic materials. COALITION: a concerted action from the European Commission (EVK4-CT-1999-2001) on molecular microbiology as an innovative conservation strategy for indoor and outdoor cultural assets Newsletters 6:2-5. Online at /http:// www.geomic.uni-oldenburg.de/projekte/coalition/S.
150. **Vandamme P.** and Coenye T., (2004) Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: a tale of lost and found. *Int J System Evol Microbiol* **54**:2285-2289
151. **Wang Q.**, Garrity G.M., Tiedje J.M., Cole J.R., (2007) Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 5261-5267
152. **Ward D.M.**, Weller R., Bateson M.M. (1990) 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. *Nature* **345**:63-65

153. **Warscheid T.**, Braams J., (2000) Biodeterioration of stone: a review. *Int Biodeter. Biodegrad.* **46**:343-368
154. **Weon H.Y.**, Kim B.Y., Kwon S.W., Go S.J., Koo B.S., Stackebrandt E., (2008) *Phenylobacterium composti* sp. nov., isolated from cotton waste compost in Korea. *Int J System Evol Microbiol* **58**(10):2301-2304
155. **Whitman W.B.**, Coleman D.C., Wiebe W.J., (1998) Prokaryotes: the unseen majority. *Proc Nat.l Acad. Sci. USA* **95**: 6578-83
156. **Wieser M.**, Worliczek H., Kampfer P., Busse H.J., (2005) *Bacillus herbersteinensis* sp. nov.. *Int J System Evol Microbiol* **55**:2119-2123
157. **Woese C.R.**, (1987) Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* **51**:221–271
158. **Woese C.R.**, (1994) There must be a prokaryote somewhere: microbiology's search for itself. *Microbiol. Rev.* **58**:1-9
159. **Yoon J.-H.**, Kang S.-J., Lee J.-S. Oh T.-K., (2007) *Brevundimonas lenta* sp. nov., isolated from soil. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**(10):2236-2240
160. **Yu-Qin Zhang**, Wen-Jun Li, Ke-Yun Zhang, Xin-Peng Tian, Yi Jiang,2 Li-Hua Xu, Cheng-Lin Jiang, Ren Lai, (2006) *Massilia dura* sp. nov., *Massilia albidiflava* sp. nov., *Massilia plicata* sp. nov. and *Massilia lutea* sp. nov., isolated from soils in China. *Intl J System Evol Microbiol* **56**:459-463
161. **Zavros Y.**, Rieder G., Ferguson A., Merchant J.L., (2002) Gastritis and Hypergastrinemia Due to *Acinetobacter lwoffii* in Mice. *Infection And Immunity.* **70**(5): 2630-2639
162. **Zucconi L.**, Gagliardi M., Isolaa D., Onofri S., Andaloro M.C., Pelosi C., Pogliani P., Selbmann L., (2012) Biodeterioration agents dwelling in or on the wall paintings of the Holy Saviour's cave (Vallerano, Italy). *Int. Biodeter. Biodegrad.* **70**:40-46

ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΕΣ ΠΗΓΕΣ

1. <http://whc.unesco.org/>

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Π.1

Nutrient Agar

| Formula | g/litre |
|-----------------|---------|
| Peptone | 5.0 |
| Beef Extract | 3.0 |
| Sodium chloride | 8.0 |
| Agar No. 2 | 12.0 |

Tryptone Soy Agar

| Formula | g/litre |
|------------------------------|---------|
| Tryptone (Casein Digest USP) | 15.0 |
| Soy Peptone | 5.0 |
| Sodium chloride | 8.0 |
| Agar No. 2 | 12.0 |

Πίνακας 2 Nutrient Broth

| Formula | g/litre |
|-----------------|---------|
| Beef Extract | 1.0 |
| Yeast Extract | 2.0 |
| Peptone | 5.0 |
| Sodium chloride | 5.0 |

LB Agar

| Formula | g/litre |
|-----------------|----------------|
| Tryptone | 10.0 |
| Yeast Extract | 5.0 |
| Sodium chloride | 5.0 |
| Agar | 15.0 |

LB Broth

| Formula | g/litre |
|-----------------|----------------|
| Tryptone | 10.0 |
| Yeast Extract | 5.0 |
| Sodium chloride | 5.0 |

Π.1: Η σύσταση των θρεπτικών μέσων που χρησιμοποιήθηκαν σε όλα τα στάδια της παρούσας ερευνητικής εργασίας. Όλα τα θρεπτικά υλικά είναι της εταιρίας Lab M.