

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ
ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
«ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ-ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ & ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ»

«ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑΣ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΚΑΙ
ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΗΣ ΜΕ ΒΙΟΑΛΛΟΙΩΣΗ ΙΣΤΟΡΙΚΩΝ
ΧΕΙΡΟΓΡΑΦΩΝ»

ΜΑΝΑΣΗΣ ΧΡΗΣΤΟΣ

ΛΑΡΙΣΑ, ΙΟΥΛΙΟΣ 2012

«Μελέτη της ποικιλότητας βακτηρίων και συσχέτιση της με βιοαλλοίωση ιστορικών χειρόγραφων»

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Μόσιαλος Δημήτριος,

Επίκουρος Καθηγητής Βιοτεχνολογίας Μικροβίων
τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου
Θεσσαλίας

Μαρκουλάτος Παναγιώτης,

Καθηγητής Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας με έμφαση στη
Βιοτεχνολογία
τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου
Θεσσαλίας

Καρπούζας Δημήτριος,

Επίκουρος Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας &
Βιοτεχνολογίας
τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου
Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Μικροβιολογίας-Ιολογίας του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας το χρονικό διάστημα Μάρτιος 2011 – Απρίλιος 2012.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου, κ. Μόσιαλο Δημήτριο για την ευκαιρία και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε με την ανάθεση αυτής της διπλωματικής εργασίας.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω και τα άλλα δύο μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, τον κ. Μαρκουλάτο Παναγιώτη και κ Καρπούζα Δημήτριο.

Ιδιαίτερα, θέλω να ευχαριστήσω τη βιοχημικό-βιοτεχνολόγο κα Νικολούλη Αικατερίνη για την πολύτιμη βοήθεια της κατά την εκπόνηση του εργαστηριακού πειράματος, αλλά κυρίως για την άψογη, ευχάριστη και φιλική συνεργασία.

Ευχαριστώ τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου Μικροβιολογίας-Ιολογίας για την ευχάριστη συνεργασία.

Το πιο μεγάλο ευχαριστώ δικαιωματικά το αφιερώνω στην οικογένειά μου και κυρίως στην σύζυγό μου, που με στήριξε ψυχολογικά και συναισθηματικά ώστε να μπορέσω να ανταποκριθώ στις απαιτήσεις της διπλωματικής εργασίας παράλληλα με τις απαιτήσεις της δουλείας μου σε μια ιδιαίτερα δύσκολη οικονομική περίοδο.

Στον πατέρα μου, που «έφυγε» πρόσφατα

Στην μητέρα μου

Στην οικογένειά μου

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

| | |
|--|----|
| ΠΕΡΙΛΗΨΗ..... | 8 |
| ABSTRACT..... | 9 |
| 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ | |
| 1.1 Πολιτιστική κληρονομιά και φθορά..... | 10 |
| 1.2 Ορισμός της βιοαλλοίωσης..... | 11 |
| 1.3 Ταξινόμηση της βιοαλλοίωσης..... | 12 |
| 1.4 Υλικά που υφίστανται βιοαλλοίωση..... | 13 |
| 1.5 Μικροβιακή Ποικιλότητα..... | 14 |
| 1.6 Scripta manent...τα γραπτά μένουν | 15 |
| 1.7 Βιοαλλοίωση του χαρτιού..... | 15 |
| 1.8 Βακτήρια- παράγοντες βιοαλλοίωσης..... | 16 |
| 1.9 Ταυτοποίηση βακτηρίων με την χρήση του 16s rRNA γονιδίου..... | 19 |
| 2. ΣΚΟΠΟΣ | 21 |
| 3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ | |
| 3.1 Χειρόγραφα..... | 22 |
| 3.1.1 Δειγματοληψία..... | 24 |
| 3.2 Καλλιέργεια βακτηρίων -Υγρές και στερεές καλλιέργειες..... | 24 |
| 3.2.1 Στοκ γλυκερόλης..... | 25 |
| 3.3 Μοριακή ταυτοποίηση βακτηρίων..... | 26 |
| 3.3.1 Απομόνωση και λύση κυττάρων των βακτηρίων..... | 26 |
| 3.3.2 Προσδιορισμός συγκέντρωσης DNA με φασματοφωτομέτρηση..... | 26 |
| 3.3.3 Ενίσχυση της περιοχής 16S rRNA των βακτηρίων με PCR..... | 27 |
| 3.3.4 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 0.8% w/v..... | 28 |
| 3.3.5 Καθαρισμός των προϊόντων PCR..... | 28 |
| 3.3.6 Αλληλούχηση και ανάλυση των αλληλουχιών με προγράμματα Βιοπληροφορικής..... | 28 |
| 3.4 Ταυτοποίηση μη καλλιεργήσιμων βακτηρίων..... | 29 |

| | | |
|------------------------|--|----|
| 3.4.1 | Απομόνωση DNA απευθείας από το χαρτί..... | 29 |
| 3.4.2 | Ενίσχυση του <i>16S rRNA</i> γονιδίου Βακτηρίων του ολικού DNA που απομονώθηκε απευθείας από το χαρτί..... | 29 |
| 3.4.3 | Κλωνοποίηση των PCR προϊόντων βακτηρίων..... | 31 |
| 3.4.4 | Επιβεβαίωση θετικών κλώνων μετά την κλωνοποίηση..... | 34 |
| 3.4.4.1 | Επιβεβαίωση με PCR..... | 34 |
| 3.4.4.2 | Επιβεβαίωση με πέψη με ένζυμο περιορισμού..... | 35 |
| 3.4.4.3 | Κατασκευή <i>16S rRNA</i> βιβλιοθηκών..... | 36 |
| 3.4.4.4 | Αλληλούχηση κλώνων <i>16S rRNA</i> βιβλιοθηκών..... | 36 |
| 3.5 | Φυλογενετική ανάλυση κλώνων με εργαλεία βιοπληροφορικής..... | 37 |
| 3.5.1 | Επεξεργασία αλληλουχιών..... | 37 |
| 3.5.2 | Bellerophon..... | 37 |
| 3.5.3 | Ribosomal Database Project (RDP)..... | 38 |
| 3.5.4 | Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)..... | 39 |
| 3.5.5 | Mothur..... | 39 |
| 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ | | |
| 4.1 | Ενίσχυση του <i>16S rRNA</i> γονιδίου καλλιεργήσιμων βακτηρίων..... | 42 |
| 4.2 | Καθαρισμός των προϊόντων PCR καλλιεργήσιμων βακτηρίων..... | 42 |
| 4.3 | Ενίσχυση του <i>16S rRNA</i> γονιδίου βακτηρίων του ολικού DNA που απομονώθηκε απευθείας από το χαρτί..... | 44 |
| 4.4 | Κλωνοποίηση των PCR προϊόντων βακτηρίων του DNA που απομονώθηκε απευθείας από το χαρτί..... | 44 |
| 4.5 | Επεξεργασία αλληλουχιών καλλιεργήσιμων βακτηρίων..... | 45 |
| 4.6 | Φυλογενετική ανάλυση κλώνων με εργαλεία βιοπληροφορικής..... | 48 |
| 4.6.1 | Επεξεργασία αλληλουχιών βακτηριακής βιβλιοθήκης <i>16S rRNA</i> | 48 |
| 4.6.2 | Bellerophon..... | 49 |
| 4.6.3 | Ribosomal Database Project (RDP) και BLAST..... | 50 |
| 4.6.4 | Φυλογενετική ανάλυση BAC βιβλιοθήκης με το Mothur..... | 53 |
| 5. | ΣΥΖΗΤΗΣΗ | 56 |

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σε όλο τον κόσμο, υλικό αρχείων και μουσείων με πρώτη ύλη το χαρτί υφίσταται βιοαλλοίωση από μικροοργανισμούς. Η επίδραση των μικροοργανισμών στο χαρτί προκαλεί διαφορετικές μορφές αλλοίωσης ανάλογα με τον υπεύθυνο κάθε φορά οργανισμό. Μύκητες, άλγη και βακτήρια σχετίζονται με την αλλοίωση του χαρτιού προκαλούν τον σχηματισμό κρούστας και τον αποχρωματισμό του χαρτιού και καταστρέφουν αντικείμενα πολιτιστικής κληρονομιάς από χαρτί.

Στην παρούσα εργασία προσπαθήσαμε, για πρώτη φορά, να καθορίσουμε την ποικιλότητα των βακτηρίων σε Ελληνικά ιστορικά χειρόγραφα προερχόμενα από το Γενικό Αρχείο του Κράτους (Αθήνα). Είχαμε στη διάθεσή μας 5 δείγματα από χειρόγραφα του 19^{ου} και 20^{ου} αιώνα. Η ταυτοποίηση τόσο καλλιεργήσιμων βακτηρίων που αναπτύχθηκαν σε κατάλληλα θρεπτικά υποστρώματα όσο και βακτηρίων μέσω μεταγονιδιωματικής προσέγγισης πραγματοποιήθηκε με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR), ενισχύοντας το *16S rRNA* γονίδιο με τη χρήση ειδικών εκκινητών.

Σε επίπεδο γένους απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν τα ακόλουθα βακτήρια: *Staphylococcus sp.*, *Paenibacillus sp.*, *Micrococcus sp.*, *Kocuria sp.*, *Bacillus sp.* Σε προγενέστερες μελέτες τα παραπάνω βακτήρια αναφέρεται ότι παράγουν υδρολυτικά ένζυμα όπως είναι οι κυτταρινάσες (cellulase), οι λακάσες (laccase), οι ξυλανάσες (xylanase) και οι πεκτινάσες (pectinase). Οι κυτταρινάσες και οι ξυλανάσες υδρολύουν την κυτταρίνη και την ημικυτταρίνη του χαρτιού, οι λακάσες δρουν πάνω σε φαινόλες και αποδομούν τη λιγνίνη και οι πεκτινάσες αποδομούν την πηκτίνη του φυτικού κυτταρικού τοιχώματος. Τέλος σε επίπεδο είδους αναγνωρίστηκαν τα ακόλουθα οκτώ είδη: *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus hominis*, *Paenibacillus provencensis*, *Bacillus foraminis*, *Micrococcus yunnanensis*, *Micrococcus luteus*, *Kocuria turfanensis*, *Bacillus pumilus*.

ABSTRACT

All over the world, the paper material based archives and museum exhibits undergo qualitative biodeterioration by microorganisms. The degradation effect on paper varies, and it is related on the nature of the hosted microbe. Fungi, algae and bacteria have been found to degrade and deteriorate paper quality by creating on the outer surface biofilms, paper discoloration and finally they destroy paper based national heritage belongings.

Herein this thesis for first time, it was attempted to define the levels of bacterial diversity on historic handwritings of General State Archives of the Greek Government (taken from Athens). There was available 5 handwritings of 19th and 20th century. Bacterial growth from samples and culture isolation took place by using proper culture medium.

The identification of both culturable bacteria grown in suitable nutrient media and bacteria through met genomics prossengisis was carried out using polymerase chain reaction (PCR) reinforcing the *16S rRNA* gene using specific primers.

At the level of genus, isolation of the following bacteria through this work were found: *Staphylococcus sp.*, *Paenibacillus sp.*, *Micrococcus sp.*, *Kocuria sp.*. In previous research work, the above mentioned bacteria were found to product hydrolytic enzymes such as cellulases, laccases, xylanases and pectinases. The cellulase and xylanase hydrolize cellulose and hemicellulose of the paper, lacasses interact with phenols and degrade lignin and pectinases degrade the pectin of plant cell wall.

At the level of genus, isolation of the following bacteria through this work were found: *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus hominis*, *Paenibacillus provencensis*, *Bacillus foraminis*, *Micrococcus yunnanensis*, *Micrococcus luteus*, *Kocuria turfanensis*, *Paenibacillus provencensis*, *Bacillus pumilus*.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Πολιτιστική κληρονομιά και φθορά

Ο όρος “πολιτιστική κληρονομιά” αναφέρεται στο απόθεμα προϊόντων της τέχνης που έχει προκύψει στο φάσμα της ιστορίας της τέχνης 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 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. (Moncmanova, 1993; 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, επιταχύνονται οι αντιδράσεις και προκαλούνται χημικές αλλαγές στις επιφάνειες των υλικών. Διαμέσου ατελούς καύσης απελευθερώνεται στην ατμόσφαιρα διοξείδιο του θείου 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 που χρησιμοποιείται και από τον τρόπο χειρισμού της για την κατασκευή του τελικού αντικειμένου. Σχετίζεται με τον τρόπο διατήρησης και συντήρησης του τελικού αντικειμένου και με τον τρόπο που χρησιμοποιείται. (Koch *et al.*, 2001 ; Camuffo, 1986 ; 1992 ; 1994)

Επίσης αρκετά αντικείμενα πολιτιστικής κληρονομιάς βρίσκονται σε κίνδυνο βιοαλλοίωσης λόγω της παρουσίας και της δράσης ζωντανών οργανισμών.

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, τη βέλτιστη επιλογή υλικών και αποτελεί, επίσης, τη βάση για την επιλογή κατάλληλων μεθόδων προστασίας και διατήρησης.

1.2 Ορισμός της βιοαλλοίωσης

Η αλλοίωση αναφέρεται σε 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.

1.3 Ταξινόμηση της βιοαλλοίωσης

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

1. Φυσική ή μηχανική
2. Αισθητική
3. 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 εικόνα του, 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.

1.4 Υλικά που υφίστανται βιοαλλοίωση

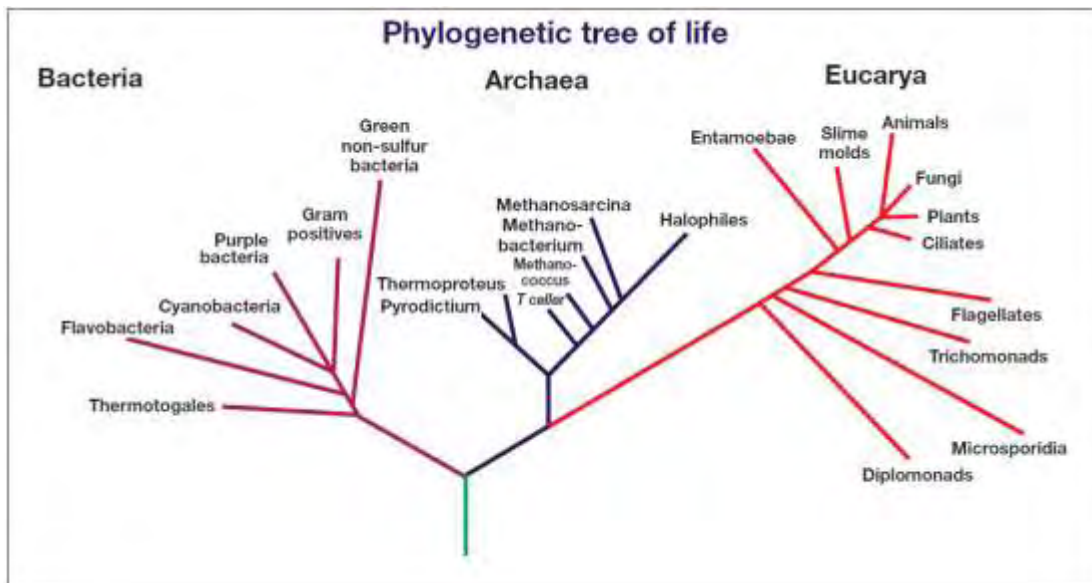
Στα υλικά που αποτελούν αντικείμενο βιοαλλοίωσης συμπεριλαμβάνονται (Bousher *et al.* 1995; Allsopp *et al.*, 2003 ; Koestler *et al.* 2003):

- Αποθηκευμένα γεωργικά προϊόντα
- Φάρμακα και καλλυντικά
- Πολυμερή, λάστιχα και πλαστικά
- Γυαλί
- Ξύλο
- Αρχαικό υλικό
- Χαρτοπολτός
- Δέρματα και Κλωστοϋφαντουργικά προϊόντα
- Καύσιμα και Λιπαντικά
- Μέταλλα
- Χρώματα
- Πέτρα, σκυρόδεμα 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.

1.5 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). Η ποικιλότητα των μικροοργανισμών σχετίζεται όχι μόνο με την μορφολογία αλλά κυρίως με τον μεταβολισμό. Οι φυτικοί και ζωικοί οργανισμοί χρησιμοποιούν ηλιακή ενέργεια ή οργανικό άνθρακα ως πηγές ενέργειας και οξυγόνο ως δέκτη ηλεκτρονίων. Οι μικροοργανισμοί είναι ικανοί να χρησιμοποιούν πολλούς άλλους δότες και δέκτες ηλεκτρονίων όπως ο σίδηρος, το μαγνήσιο, οι ενώσεις του θείου και του αζώτου. Η ποικιλότητα των μικροσκοπικών μορφών ζωής σε συνδυασμό με την ικανότητά τους να επιβιώνουν σε ποικίλες περιβαλλοντικές συνθήκες χρησιμοποιώντας διάφορες πηγές ενέργειας, ευνοεί την ικανότητά τους να προκαλούν βιοαλλοίωση. Η παραγωγή οξέος από νιτροποιητικά βακτήρια, για παράδειγμα, προκαλεί φθορά σε πέτρινα αντικείμενα. (Sand and Bock, 1991)



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

1.6 Scripta manent.....τα γραπτά μένουv

Από την αρχή της ανθρωπότητας, οι άνθρωποι προσπάθησαν να ανταλλάξουν τις ιδέες και τις γνώσεις τους και να τις μεταλαμπαδεύσουν και στις μελλοντικές γενιές. Από αυτή την άποψη, ο πολιτιστικός ρόλος που έπαιξε το χαρτί είναι εξαιρετικά σημαντικός. Το χαρτί χρησιμοποιήθηκε για ζωγραφιές, για βιβλία, για αρχαιακά έγγραφα, φωτογραφίες, εκτυπώσεις κ.ό.κ. Το χαρτί για πρώτη φορά κατασκευάστηκε στην Κίνα το 105 μ.Χ. από τον υπουργό Γεωργίας Τσάι-Λουέν και η ιστορία του μπορεί να διαιρεθεί σε δύο κύριες περιόδους. Η πρώτη περίοδος, πριν το 19^ο αιώνα, όπου το χαρτί ήταν χειροποίητο και η κυτταρίνη από λινάρι και βαμβάκι χρησιμοποιούνταν ως πρώτη ύλη. Η δεύτερη περίοδος, από το 19^ο αιώνα και μετά, όπου το χαρτί κατασκευάζεται μηχανικά από ξυλοπολτό. Σε αυτή την περίπτωση, το χαρτί περιέχει διάφορα άλλα συστατικά εκτός από κυτταρίνη: λιγνίνη, ημικυτταρίνη και πηκτίνη. Επιπλέον, το χαρτί συχνά καλύπτεται με κόλλα όπως ζελατίνη (gelatin) (η διαδικασία κάλυψης του χαρτιού με κόλλα είναι μία διαδικασία που το καθιστά αδιαπέραστο από μελάνι) ή με ανόργανα άλατα, χρωστικές και άλλες ουσίες για να προσδώσουν επιθυμητές ιδιότητες. Το χαρτί είναι ένα από τα υλικά που υφίστανται βιοαλλοίωση. (Cappitelli *et al.*, 2010)

1.7 Βιοαλλοίωση του χαρτιού

Σε έργα τέχνης που η πρώτη ύλη είναι το χαρτί (χειρόγραφα, βιβλία κ.ά.) πολλοί παράγοντες συνυπάρχουν και συμβάλλουν στην βιοαλλοίωση. Σε επίπεδο σχετικής υγρασίας (RH) μεγαλύτερο του 65% και σε θερμοκρασία υψηλότερη των 20 °C, η περιεκτικότητα του χαρτιού σε υγρασία αγγίζει το 8-10% με συνακόλουθη ενεργότητα νερού (όπου a_w , ο λόγος της τάσης ατμών του νερού στο υπόστρωμα και της τάσης ατμών του καθαρού νερού στην ίδια θερμοκρασία και σχετική υγρασία) μεγαλύτερη του 0.65. (Pinzari *et al.*, 2006) Στις συνθήκες αυτές τα ενδοσπόρια των μικροοργανισμών (μύκητες ,βακτήρια) μπορούν να βλαστήσουν και να αναπτυχθούν χρησιμοποιώντας το χαρτί ως μέσο ανάπτυξης, επηρεάζοντας άμεσα την δομική συνοχή του χαρτιού.

Η ανάπτυξη των μικροοργανισμών μπορεί να παρεμποδιστεί ελέγχοντας σε πρώτο στάδιο τη θερμοκρασία και τη σχετική υγρασία του περιβάλλοντος όπου είναι τοποθετημένα ή φυλάσσονται αντικείμενα ιστορικής αξίας από χαρτί. Η παραπάνω θέση υποστηρίχτηκε από την ερευνητική ομάδα των Jurado *et al.* (Jurado *et al.*, 2010) η οποία απέδειξε τη διατήρηση ιστορικών χειρόγραφων του 15^{ου}-16^{ου} αιώνα σε περιβάλλον με θερμοκρασία 16° C και σχετική υγρασία κάτω από 60%. Κατά την επισκευή αποκατάστασης του ναού του “San Esteban” στο Cuéllar της Ισπανίας ερευνήθηκαν ορισμένοι τάφοι. Ανάμεσα τους αυτός της Doña Isabel de Zuazo από το 16^ο αιώνα όπου βρέθηκαν μία σειρά από έγγραφα του 15^{ου}-16^{ου} αιώνα τα περισσότερα από τα οποία ήταν παπικά συγχωροχάρτια. Έχοντας κατά νου ότι αυτά τα κείμενα χρονολογούνται το 15^ο-16^ο αιώνα, η διατήρησή τους ήταν εκπληκτική. Η ερευνητική ομάδα των Jurado *et al.* πραγματοποίησε μικροβιολογική μελέτη των ιστορικών χειρόγραφων χρησιμοποιώντας τεχνικές απομόνωσης και μοριακής μικροβιολογίας σε συνδυασμό με SEM (scanning electron microscopy). Δεδομένου ότι οι συνθήκες που επικρατούσαν στον τάφο ήταν 16 °C θερμοκρασία και σχετική υγρασία μικρότερη του 60% (Montemartini *et al.* 2003) προτάθηκε ότι οι συνθήκες αυτές παρεμποδίζουν τη βιοαλλοίωση και καθιστούν ικανή τη διατήρηση των εγγράφων στην τρέχουσα κατάσταση τους.

Το χαρτί αποτελείται κυρίως από κυτταρίνη και άλλες ουσίες που το καθιστούν ένα πολύπλοκο και ετερογενές μέσο. Η κυτταρίνη από χημικής άποψης, είναι ένα γραμμικό πολυμερές γλυκόζης, μία υγροσκοπική ένωση η οποία επηρεάζεται από πολλούς χημικούς και βιολογικούς παράγοντες καθώς αποτελεί θρεπτικό υπόστρωμα που ευνοεί την ανάπτυξη μικροοργανισμών.

1.8 Βακτήρια- παράγοντες βιοαλλοίωσης

Τα βακτήρια είναι μικροσκοπικοί , μονοκύτταροι , προκαρυωτικοί οργανισμοί, που συναντώνται σε κάθε είδους βίοτοπο και σε πολύ μεγάλους αριθμούς. Το φυλογενετικό δένδρο των βακτηρίων περιέχει περίπου 20 φύλλα καλλιεργούμενων αντιπροσώπων και άλλα 20-30 που γνωρίζουμε ότι υπάρχουν, αλλά δεν έχουν ακόμα καλλιεργηθεί. Για την ταξινόμηση των βακτηρίων λαμβάνονται υπόψη διάφορα

χαρακτηριστικά τους όπως: το σχήμα, το μέγεθος, η δυνατότητα αποικίας, το είδος της τροφής, τα προϊόντα του μεταβολισμού, οι αντιδράσεις, η αντιγονική σύνθεσή τους καθώς και ο βαθμός ανοχής της περιβαλλοντικής αλλαγής.

Τα βακτήρια διακρίνονται σε δύο βασικές κατηγορίες: στα "θετικά κατά Γκραμ» (Gram-positive) και στα "αρνητικά κατά Γκραμ", (Gram-negative). Στην ομάδα των θετικών κατά Γκραμ περιλαμβάνονται οι ακτινομύκητες, οι βάκιλλοι και οι γαλακτοβάκιλλοι, οι στρεπτόκοκκοι, τα κλωστρίδια, καθώς και το φωτοσυνθετικό βακτήριο ηλιοβακτήριο, ενώ στην ομάδα των αρνητικών κατά Γκραμ περιλαμβάνονται τα πρωτεοβακτήρια. Αρνητικά εμφανίζονται επίσης τα κυανοβακτήρια, οι σπειροχαίτες και τα πρασινοβακτήρια.

Οι βακτηριακές κοινότητες ,που πιθανόν αναπτύσσονται και πολλαπλασιάζονται σε αντικείμενα πολιτιστικής κληρονομιάς ,προκαλούν βιοαλλοίωση με αποτέλεσμα τον αποχρωματισμό υλικών , σχηματισμό κρουστών στην επιφάνεια και την απέκκριση επιθετικών μεταβολικών προϊόντων όπως οργανικά ή ανόργανα οξέα με αποτέλεσμα την απώλεια της δομικής συνοχής.

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).

Για τη συντήρηση και την αποκατάσταση της πολιτιστικής μας κληρονομιάς είναι απαραίτητο να προσδιοριστεί και να ταυτοποιηθεί πλήρως η μικροβιακή

ποικιλότητα που προκαλεί την βιοαλλοίωση. Ιδιαίτερα τα τελευταία χρόνια, βακτηριακή ταυτοποίηση με μοριακές μεθόδους, συμπεριλαμβανομένης εκείνης της αλληλουχίας γονιδίων που κωδικοποιούν για το ριβοσωμικό 16S rRNA, αποτελεί αναπόσπαστο εργαλείο στις βακτηριακές κοινότητες μελέτης στα περιβαλλοντικά δείγματα (Giovannoni *et al.*, 1990; Ward *et al.*, 1990; Muyzer *et al.*, 1993; Ludwig and Schleifer, 1994; Amann *et al.*, 1995). Η εφαρμογή αυτών των μεθόδων στα αντικείμενα τέχνης αποκάλυψε παρουσία βακτηρίων, η οποία δεν ήταν ποτέ πριν προσδιορισμένη σε αυτά τα περιβάλλοντα.

Πιο συγκεκριμένα, το 2001 πραγματοποιήθηκε έρευνα με σκοπό τη ταυτοποίηση μικροοργανισμών που προκάλεσαν βιοαλλοίωση σε μεσαιωνικές τοιχογραφίες σε έργα πολιτιστικής κληρονομιάς στην Ιταλία (“Crypt of the Original Sin”, Matera, Italy). Η Κρύπτη, ανακαλύφθηκε κοντά στην πόλη Ματέρα (Ιταλία) το 1963 και περιέχει μια σημαντική σύνθεση βυζαντινής ζωγραφικής του 9^{ου} αιώνα και απεικονίζει σκηνές από την Γένεση, μαζί με πολλές εικόνες Αγίων και Αρχαγγέλων. Στις μεσαιωνικές τοιχογραφίες παρουσιάστηκαν φαινόμενα βιοαλλοίωσης προκαλώντας ρόδινο αποχρωματισμό. Η ρόδινη χρώση εξαπλώθηκε σε όλη την επιφάνεια της τοιχογραφίας προκαλώντας ανυπολόγιστη ζημιά στην υφή και στη δομή του έργου. Εφαρμόζοντας μοριακές τεχνικές που βασίζονται στην ενίσχυση του 16s rRNA προέκυψε ότι η βακτηριακή κοινότητα αποτελείται από :

α) Βακτήρια του γένους *Actinobacteria* και κυρίως του είδους *Rubrobacter radiotolerans* και

β) *Haloarchaea*.

Η φασματοσκοπία κατά Raman επιβεβαίωσε την σχέση μεταξύ των καροτενοειδών του *Rubrobacter radiotolerans* και των χρωστικών που ήταν υπεύθυνες για τη χρωματική αλλοίωση των τοιχογραφιών (Imperi *et al.*, 2007).

Με τη χρήση μοριακών τεχνικών μπορεί να προσδιοριστεί ένας αρκετά μεγάλος αριθμός βακτηρίων που αποικίζουν έργα πολιτιστικής κληρονομιάς (Gurtner *et al.*, 2000. Rölleke *et al.*, 1996). Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν προγενέστερες

μελέτες στις οποίες έχουν ταυτοποιηθεί τα ακόλουθα γένη βακτηρίων: *Actinobispora*, *Amycolata*, *Asiosporangium*, *Promicromonospora*, *Pseudonocardia*, *Rubrobacter*, *Streptomonospora*, *Saccharopolyspora*, *Sphaerobacter*, *Thermocrismum*, *Aquaspirillum*, *Chromohalobacter*, *Erythrobacter*, *Porphyrobacter*, *Salmonella*, των μελών της *Cytophagales* (Gurtner *et al.*, 2000; Schabereiter-Gurtner *et al.* 2001b.) καθώς και τα μέλη των αλόφιλων Αρχαίων (Piñar *et al.*, 2001a, 2001b, Rölleke *et al.*, 1998).

1.9 Ταυτοποίηση βακτηρίων με την χρήση του 16s rRNA γονιδίου

Η ταυτοποίηση των βακτηρίων που βρίσκονται σε έργα πολιτιστικής κληρονομιάς, γίνεται συνήθως με τη χρήση μοριακών τεχνικών και τεχνικών απομόνωσης. Η αποκατάσταση και διατήρηση της πολιτιστικής κληρονομιάς ειδικά με πρώτη ύλη το χαρτί, είναι προβληματική εξαιτίας της ανεπαρκούς γνώσης των μικροοργανισμών ή παραγόντων που προκαλούν την βιοαλλοίωση. Οι μοριακές τεχνικές δίνουν τη δυνατότητα να ανιχνευθούν βακτηριακά είδη που δεν είναι καλλιεργήσιμα, να αναλυθεί μεγάλος όγκος αλληλουχιών, καθώς επίσης και να γίνουν φυλογενετικές αναλύσεις (Imperi *et al.*, 2007).

Σε αυτές τις περιπτώσεις το DNA απομονώνεται απευθείας από τα δείγματα και προσδιορίζεται η ποικιλότητα των βακτηριακών ειδών (Imperi *et al.* 2007). Οι βιβλιοθήκες κλώνων κατασκευάζονται με βάση το βακτηριακό *16S rRNA* γονίδιο. Το *16S rRNA* μόριο αποτελεί μέρος της *30S* μικρής υπομονάδας των προκαρυωτικών ριβοσωμάτων, ενώ η αλληλουχία του είναι εξελικτικά συντηρημένη, δίνοντας έτσι τη δυνατότητα να μελετηθούν φυλογενετικές και εξελικτικές σχέσεις μεταξύ προκαρυωτών (Weisburg *et al.* 1991).

Για την μελέτη και την ανάλυση των *16S rRNA* βιβλιοθηκών έχουν αναπτυχθεί προγράμματα και βάσεις δεδομένων, που αναλύουν τις αλληλουχίες της βιβλιοθήκης και βοηθούν στην εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με τα επίπεδα κάλυψης της, την αντιπροσωπευτικότητά της, καθώς και με τις φυλογενετικές σχέσεις των κλώνων της (Garcia-Armisen *et al.* 2011; Kavroulakis & Ntougias 2011; Kormas *et al.* 2010). Μία από αυτές τις βάσεις δεδομένων είναι η “Ribosomal Database Project - RDP”

(<http://rdp.cme.msu.edu/>) που περιέχει *16S rRNA* αλληλουχίες Βακτηρίων και Αρχαίων και δίνει τη δυνατότητα μεταξύ άλλων, να βρεθούν οι κοντινότεροι συγγενείς των κλώνων της βιβλιοθήκης, αλλά και να ταξινομηθούν ιεραρχικά (Cole *et al.* 2009). Το πρόγραμμα “Bellerophon” χρησιμοποιείται για την ανίχνευση χιμαιρικών αλληλουχιών (χιμαιρες) σε μια βιβλιοθήκη κλώνων, που έχει δημιουργηθεί με βάση το *16S rRNA* (Huber *et al.* 2004). Οι χιμαιρες δημιουργούνται από δύο φυλογενετικά απομακρυσμένες πατρικές αλληλουχίες και αντιπροσωπεύουν μη υπάρχοντες μικροοργανισμούς (Hugenholtz & Huber 2003). Τέλος, το λογισμικό πρόγραμμα “Mothur” συγκεντρώνει εργαλεία που επιτρέπουν στον χρήστη να επεξεργαστεί τις αλληλουχίες του, να κάνει ομοπαράθεση με βάση πρότυπες αλληλουχίες *16S rRNA*, να υπολογίσει τις μεταξύ τους φυλογενετικές αποστάσεις, αλλά και να τις κατηγοριοποιήσει σε Λειτουργικές Ταξινομικές Μονάδες (Operational Taxonomic Units-OTUs) (Schloss *et al.*, 2009). Από τις παραπάνω αναλύσεις μπορούν να εξαχθούν συμπεράσματα σχετικά με το πόση ποικιλότητα παρουσιάζει μια βιβλιοθήκη κλώνων, το ποσοστό κάλυψης της από τους κλώνους καθώς και τις φυλογενετικές αποστάσεις μεταξύ τους.

2. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας ερευνητικής εργασίας είναι ο καθορισμός της ποικιλότητας των βακτηρίων σε Ελληνικά ιστορικά χειρόγραφα του 19^{ου}-20^{ου} αιώνα, που γίνεται για πρώτη φορά. Χρησιμοποιήθηκαν μοριακές τεχνικές σε καλλιεργήσιμα βακτήρια σε κατάλληλα θρεπτικά υποστρώματα, ενώ έγινε και μεταγονιδιωματική προσέγγιση με εκχύλιση ολικού DNA από ιστορικά χειρόγραφα και ενίσχυση *16s rRNA* γονιδίου. Οι μοριακές τεχνικές βασίζονται στην ενίσχυση του γονιδίου που κωδικοποιεί για το *16s rRNA* και αποτελούν αναπόσπαστο εργαλείο στη μελέτη βακτηριακών κοινοτήτων σε περιβαλλοντικά δείγματα (Giovannoni *et al.*, 1990; Ward *et al.*, 1990; Muyzer *et al.*, 1993; Ludwig and Schleifer, 1994; Amann *et al.*, 1995). Η ενίσχυση του *16S rRNA* γονιδίου δίνει τη δυνατότητα να ανιχνευθούν βακτηριακά είδη που δεν είναι καλλιεργήσιμα, να αναλυθεί μεγάλος όγκος αλληλουχιών. Τα αποτελέσματα των παραπάνω αναλύσεων θα μας επιτρέψουν να βγάλουμε συμπεράσματα σχετικά με την ποικιλότητα των βακτηρίων που είχαν αποικίσει το χαρτί, καθώς και τον ρόλο τους στην αλλοίωσή του.

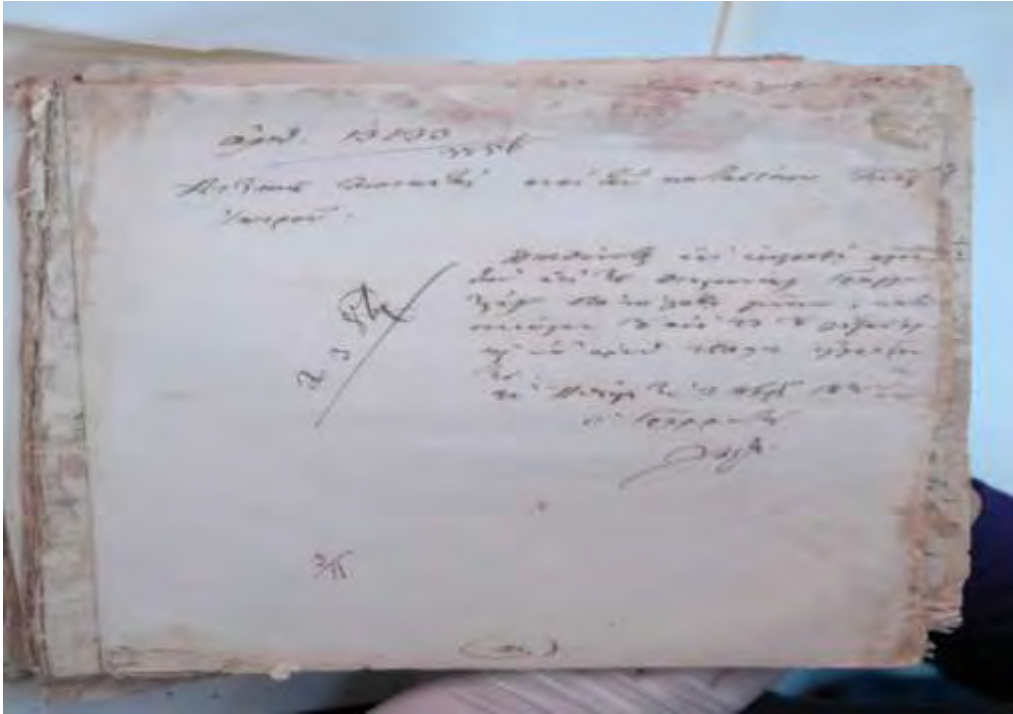
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Χειρόγραφα

Για την πραγματοποίηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας χρησιμοποιήθηκαν δείγματα από 5 χειρόγραφα προερχόμενα από το Γενικό Αρχείο του Κράτους (Αθήνα) , τα οποία παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα:

ΠΙΝΑΚΑΣ 1: Τα 5 χειρόγραφα που μελετήθηκαν.

| ΔΕΙΓΜΑΤΑ | ΧΡΟΝΟΛΟΓΙΑ | ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ |
|------------------------|------------|---|
| Δείγμα 1 (Εικόνα 2) | 1842 | ΟΘΩΝ ΓΡΑΜΜΑΤΕΙΑ ΥΠΟΥΡΓΕΙΟΥ ΕΣΩΤΕΡΙΚΩΝ 1833-1862 ΦΥΛΑΚΕΣ ΘΥΡ. 3/11 ΦΑΚΕΛΟΣ Α |
| Δείγμα 2 | 1919-1943 | ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΓΕΩΡΓΙΑΣ ΑΡΧΕΙΟ ΕΚΤΙΜΗΤΙΚΩΝ ΕΠΙΤΡΟΠΩΝ ΤΩΝ ΑΝΤΑΛΛΑΞΙΜΩΝ ΚΟΙΝΟΤΗΣ ΚΑΝΛΙΚΑ ΤΡΑΠΕΖΟΥΝΤΟΣ ΔΙΕΥΘΥΝΣΕΙΣ ΑΝΤΑΛΛΑΓΗΣ 1919-1943 |
| Δείγμα 3 (Εικόνα 3) | 1840 | ΟΘΩΝ ΓΡΑΜΜΑΤΕΙΑ ΥΠΟΥΡΓΕΙΟΥ ΕΣΩΤΕΡΙΚΩΝ ΕΣΩΤΕΡΙΚΗ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΔΙΟΙΚΗΣΕΩΝ ΣΤΕΡΕΑΣ ΕΛΛΑΔΑΣ ΘΥΡ. 1/1 (ΔΕΜΕΝΟ) |
| Δείγμα 4 | 1843 | ΕΘΝΟΣΥΝΕΛΕΥΣΗ ΔΙΟΙΚΗΣΙΣ ΑΚΑΡΝΑΝΙΑΣ ΘΥΡ. 6/10 ΦΑΚΕΛΟΣ 3 ΥΠΟΦΑΚΕΛΟΣ 2 |
| Δείγμα 5 | 1840 | ΓΡΑΜΜΑΤΕΙΑ ΤΗΣ ΕΠΙΚΡΑΤΕΙΑΣ ΕΠΙ ΤΩΝ ΕΣΩΤΕΡΙΚΩΝ ΓΕΝΙΚΩΝ ΑΡΧΕΙΩΝ ΕΣΩΤΕΡΙΚΗ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΔΙΟΙΚΗΣΕΩΣ ΣΥΡΟΥ – ΜΗΛΟΥ ΘΥΡ. 1/10 ΦΑΚΕΛΟΣ 2 |



Εικόνα 2 : Χειρόγραφο Δείγμα 1



Εικόνα 3 : Χειρόγραφο Δείγμα 3

3.1.1 Δειγματοληψία

Για την λήψη δειγμάτων από τα προαναφερθέντα χειρόγραφα χρησιμοποιήθηκαν αποστειρωμένοι βαμβακοφόροι στυλεοί από περιοχές με ορατή την αλλοίωση του υλικού. Η χρήση βαμβακοφόρου στυλεού θεωρείται «μη επιθετική» μέθοδος συλλογής δείγματος (Michaelsen *et al.*, 2009). Τμήμα του βιοαλλοιωμένου χαρτιού συλλέχτηκε, επίσης, με τη χρήση αποστειρωμένων νυστεριών. Στη συνέχεια, οι στυλεοί και τα κομμάτια χαρτιού φυλάχθηκαν σε αποστειρωμένα vials (γυάλινα μπουκαλάκια με πώμα) και falcons αντίστοιχα στους 4°C. Συνολικά συλλέχθηκαν 26 δείγματα, τα οποία καταγράφονται ως εξής :

Χειρόγραφο 1: 8 δείγματα

Χειρόγραφο 2: 3 δείγματα

Χειρόγραφο 3: 5 δείγματα

Χειρόγραφο 4: 4 δείγματα

Χειρόγραφο 5: 6 δείγματα

3.2 Καλλιέργεια βακτηρίων -Υγρές και στερεές καλλιέργειες

Οι στυλεοί με τους οποίους έγινε η δειγματοληψία, χρησιμοποιήθηκαν για τον ενοφθαλμισμό τρυβλίων με Nutrient Agar (στερεές καλλιέργειες) και επώστηκαν στους 30°C για 24 έως 48 ώρες.

Με τους ίδιους στυλεούς ενοφθαλμίσαμε και Tryptone Soy Broth (υγρές καλλιέργειες), το οποίο ευνοεί την ανάπτυξη των αερόβιων και αναερόβιων βακτηρίων. Μετά την επώασή τους για 24 έως 48 ώρες στους 30°C, πραγματοποιήθηκαν αραιώσεις των υγρών καλλιιεργειών από 10^{-3} έως 10^{-4} και επιστρώσαμε 100μl από κάθε καλλιέργεια σε Tryptone Soy Agar. Οι στερεές καλλιέργειες επώστηκαν στους 30°C για 24 έως 48 ώρες.

3.2.1 Στοκ γλυκερόλης

Τα διάφορα βακτήρια που προέκυψαν από τις υγρές και στερεές καλλιέργειες αποθηκεύτηκαν στους -80°C , μετά από κατάλληλη επεξεργασία τους με γλυκερόλη έτσι ώστε να είναι δυνατή η ανακαλλιέργειά τους, όποτε αυτό ήταν αναγκαίο. Η επεξεργασία των βακτηρίων με τη γλυκερόλη έγινε σύμφωνα με το παρακάτω 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 επώαστηκαν στους 30°C 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 Nutrient Broth και έγινε ανάμειξη με vortex.
- ◆ Έγινε 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 διατηρήθηκαν στους -80°C .

3.3 Μοριακή ταυτοποίηση καλλιεργήσιμων βακτηρίων

Η ταυτοποίηση των βακτηρίων που απομονώθηκαν από τους βαμβακοφόρους στυλεούς πραγματοποιήθηκε με μια σειρά πειραματικών διαδικασιών:

1. Απομόνωση και λύση κυττάρων των βακτηρίων.
2. Προσδιορισμός συγκέντρωσης DNA με φασματοφωτομέτρηση
3. Ενίσχυση της περιοχής *16S rRNA* των βακτηρίων με PCR χρησιμοποιώντας τα ζεύγη εκκινητών 27F και 1492R
4. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 0.8% w/v
5. Καθαρισμός των προϊόντων PCR
6. Αλληλούχηση και ανάλυση των αλληλουχιών με προγράμματα βιοπληροφορικής

3.3.1 Απομόνωση και λύση κυττάρων των βακτηρίων

Από το κάθε δείγμα που έχουμε σε stock γλυκερόλης στη διάθεσή μας, παίρνουμε μικρή ποσότητα κυττάρων με μια αποστειρωμένη οδοντογλυφίδα και την τοποθετούμε σε erpendorf που περιέχει 20μl SDS-NaOH. Επωάζουμε για 15 λεπτά στους 95°C και μετά προσθέτουμε 180μL αποστειρωμένου H₂O και πραγματοποιούμε ανάμειξη με πιπετάρισμα. Τέλος φυγοκεντρούμε για 5 λεπτά στις 4000rpm και διατηρούμε τα δείγματα στους -20°C.

3.3.2 Προσδιορισμός συγκέντρωσης DNA με φασματοφωτομέτρηση

Πραγματοποιήθηκε η διαδικασία της φασματοφωτομέτρησης (Spilker *et al.* 2004) για να προσδιορίσουμε ποσοτικά τη συγκέντρωση του DNA (ng/μl DNA) των βακτηρίων σε κάθε δείγμα.

Συγκεκριμένα προχωρήσαμε σε αραιώσεις DNA 1/100, δηλαδή σε erpendorf βάλαμε 2μL DNA και 198 μL αποστειρωμένο H₂O σε τελικό όγκο 200 μL.

Η συγκέντρωση ενός δείγματος με συντελεστή αραιώσης 100 και οπτική πυκνότητα OD_{260nm} υπολογίζεται με το παρακάτω τύπο :

$$C \text{ (mg/ml)} = OD_{260nm} \times \text{συντελεστής αραιώσης} \times 50$$

3.3.3 Ενίσχυση της περιοχής *16S rRNA* των 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'-GGTTACCTTGTACGACTT-3') (Turner et al. 1999). Η αντίδραση της PCR πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 25 μ l. Τα συστατικά της αντίδρασης φαίνονται στον Πίνακα 2 και οι συνθήκες της αντίδρασης περιγράφονται στον Πίνακα 3.

ΠΙΝΑΚΑΣ 2: Τα συστατικά της αντίδρασης PCR με το ζεύγος εκκινητών 27F και 1492R

| | Αρχικές Συγκεντρώσεις | Τελικές Συγκεντρώσεις | Σε τελικό όγκο V=25 μ L. |
|--|--------------------------|--------------------------|---------------------------------|
| dH₂O (water for injection) | | | 18,76 μ L |
| Buffer (GENEON) | 10X | 1X | 2,5 MI |
| dNTPS | 25mM | 200 μ M | 0,2 μ L |
| 27F primer | 26,9 μ M | 0.5 μ M | 0,46 μ L |
| 1492R primer | 32,6 μ M | 0.5 μ M | 0,38 μ L |
| Taq DNA pol (GENEON) | 5u/ μ l | 1 unit | 0.2 μ L |
| MgCl₂ | 25mM | 2mM | 0,5 μ L |
| DNA | | | 2 μ L |

Σε όλες τις αντιδράσεις PCR χρησιμοποιείται “Negative control” (χωρίς το DNA- μήτρα) για να επιβεβαιωθεί η ύπαρξη ή όχι επιμολύνσεων, καθώς επίσης και “Positive Control” για να επιβεβαιώνουμε την ορθή λειτουργία της PCR. Ως “Positive Control” χρησιμοποιήσαμε DNA του βακτηρίου *P. entomophila*.

ΠΙΝΑΚΑΣ 3: Συνθήκες αντίδρασης PCR για την ενίσχυση του *16S rRNA* γονιδίου των βακτηρίων.

| ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΕΣ | ΧΡΟΝΟΣ |
|--------------|--------|
| 94°C | 5min |
| 94°C | 1min |
| 57°C | 30sec |
| 72°C | 1.5min |
| 72°C | 10min |

} **30 cycles**

3.3.4 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). Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης βασίζεται στο διαχωρισμό τμημάτων DNA ανάλογα με το μέγεθος τους.

3.3.5 Καθαρισμός των προϊόντων PCR

Ο καθαρισμός των προϊόντων της PCR έγινε με το kit “NucleoSpin Extract II” (Macherey-Nagel, Germany). Ο τελικός όγκος έκλουσης ήταν 30μl.

3.3.6 Αλληλούχηση και ανάλυση των αλληλουχιών με προγράμματα βιοπληροφορικής

Τα καθαρισμένα προϊόντα της PCR αλληλουχήθηκαν από το τμήμα Ιστολογίας – Ιστοσυμβατότητας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, με τη χρήση του εκκινητή 27F. Η ανάλυση των αλληλουχιών και η ταυτοποίηση των βακτηρίων έγινε με τα εργαλεία βιοπληροφορικής BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) και RDP (Ribosomal Database Project).

3.4 Ταυτοποίηση μη καλλιεργήσιμων βακτηρίων

3.4.1 Απομόνωση ολικού DNA απευθείας από το χαρτί

Τμήματα του βιοαλλοιωμένου χαρτιού συλλέχθηκαν, όπως προαναφέρθηκε, με τη χρήση αποστειρωμένων νυστεριών και διατηρήθηκαν σε αποστειρωμένα falcons στους 4°C. Με τις μοριακές τεχνικές δίδεται η δυνατότητα να ανιχνευτούν όχι μόνο τα βιώσιμα βακτήρια, αλλά και τα παλαιότερα ενεργά στα οποία πιθανόν οφείλεται η βιοαλλοίωση του.

Η απομόνωση του DNA απευθείας από το χαρτί πραγματοποιείται με το kit “NucleoSpin Soil” (Macherey-Nagel, Germany). Το χειρόγραφο από τα οποία απομονώθηκε DNA είναι το Δείγμα 4.

3.4.2 Ενίσχυση του 16S rRNA γονιδίου Βακτηρίων του DNA που απομονώθηκε απευθείας από το χαρτί

Για την ενίσχυση του 16S rRNA γονιδίου των βακτηρίων χρησιμοποιήθηκαν οι παγκόσμιοι εκκινητές 27F και 1492R με αλληλουχία. Για την αντίδραση PCR χρησιμοποιήθηκε η πολυμεράση *ExTaq* (TAKARA Bio Inc.). Η συγκεκριμένη πολυμεράση προσφέρει υψηλή πιστότητα, σε σχέση με τις συμβατικές *Taq* DNA πολυμεράσες, καθώς επίσης και καλύτερη απόδοση όσον αφορά την ενίσχυση του DNA-στόχου. 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 απομονώσαμε με το kit Nucleospin Soil (Macherey-Nagel, Germany). Οι αρχικές και τελικές συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων καθώς και ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν που χρησιμοποιήθηκαν, φαίνονται στον παρακάτω Πίνακα 4:

ΠΙΝΑΚΑΣ 4: Οι αρχικές και τελικές συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων της PCR με την *ExTaq* DNA πολυμεράση (TAKARA) για την ενίσχυση του *16S rRNA* γονιδίου των βακτηρίων και οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν.

| ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ (TAKARA) | ΑΡΧΙΚΕΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ | ΤΕΛΙΚΕΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ | ΠΟΣΟΤΗΤΕΣ (μ l) V _{τελ} =25 μ l |
|--------------------------------|--------------------------|--------------------------|---|
| H ₂ O | | | 12.76 |
| PCR buffer | 10X | 1X | 2.5 |
| dNTPS | 2.5mM | 250 μ M | 2.5 |
| 27F primer | 26.9 μ M | 0.5 μ M | 0.46 |
| 1492R primer | 32.6 μ M | 0.5 μ M | 0.38 |
| <i>ExTaq</i> DNA polymerase | 5u/ μ l | 2units | 0.4 |
| DNA template | | | 6 |

Οι θερμοκρασίες αντίδρασης PCR για την ενίσχυση του *16S rRNA* γονιδίου των βακτηρίων αναφέρονται στον ακόλουθο πίνακα 5.

ΠΙΝΑΚΑΣ 5: Θερμοκρασίες αντίδρασης PCR για την ενίσχυση του *16S rRNA* γονιδίου των βακτηρίων.

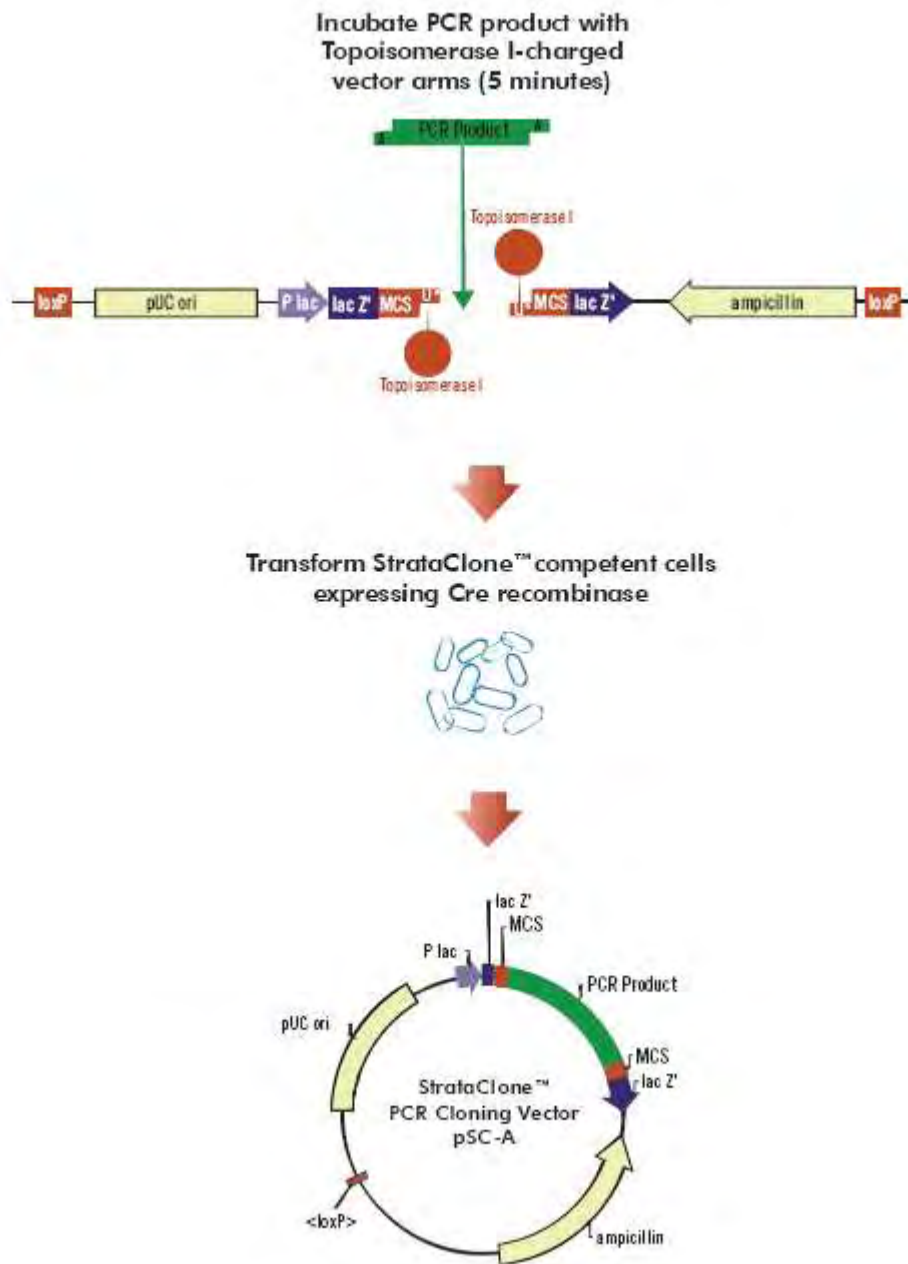
| ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΕΣ | ΧΡΟΝΟΣ |
|--------------|--------|
| 94°C | 5min |
| 94°C | 1min |
| 57°C | 30sec |
| 72°C | 1.5min |
| 72°C | 10min |

} **30 cycles**

Όλα τα PCR προϊόντα ελέγχθησαν 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.). Στη συνέχεια τα προϊόντα καθαρίστηκαν από το πήκτωμα αγαρόζης με τη χρήση του kit Nucleospin Extract II (Macherey-Nagel, Germany).

3.4.3 Κλωνοποίηση των PCR προϊόντων βακτηρίων

Η κλωνοποίηση των προϊόντων της PCR των βακτηρίων έγινε με τη χρήση του “Strataclone PCR Cloning” kit (Stratagene). Το kit βασίζεται στη συνδυασμένη δράση τοποϊσομεράσης I από τον ιό *Vaccinia* και στη δράση Cre ρεκομπινάσης του βακτηριοφάγου P1. Το Strataclone PCR Cloning vector mix περιέχει δύο τμήματα DNA που το καθένα φέρει στο ένα άκρο του την τοποϊσομεράση I και στο άλλο μια θέση αναγνώρισης *loxP*. Τα άκρα που φέρουν την τοποϊσομεράση I έχουν μια τροποποιημένη ουρά ουριδίνης (U*). Τα PCR προϊόντα που φέρουν μια αδερίνη στα 3' άκρα τους μπορούν να συνδεθούν ανάμεσα στα τμήματα του DNA, δίνοντας ένα γραμμικό μόριο που αποτελείται από τον vector και το PCR προϊόν. Κατόπιν το γραμμικό μόριο μετασχηματίζεται στα δεκτικά κύτταρα του kit, που είναι τροποποιημένα για να εκφράζουν την Cre ρεκομπινάση. Η Cre ρεκομπινάση καταλύει τον ανασυνδυασμό μεταξύ των θέσεων *loxP*, δημιουργώντας ένα κυκλικό μόριο DNA (pSC-A), το οποίο πλέον μπορεί να αντιγραφεί μέσα σε κύτταρα που μεγαλώνουν σε θρεπτικό μέσο με αμπικιλίνη. Επίσης ο pSC-A vector περιέχει μια γονιδιακή κασέτα *lacZ'* για την επιλογή μπλε-άσπρων αποικιών (Εικόνα 4).



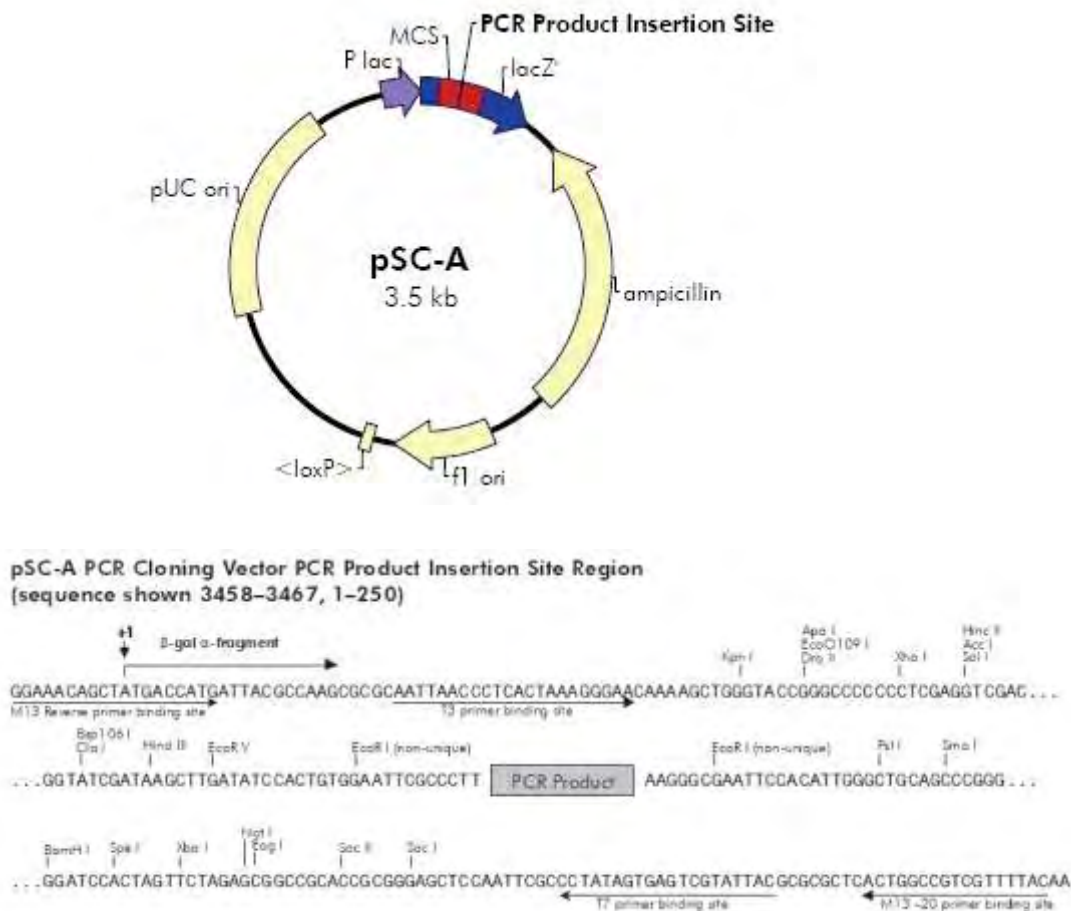
Εικόνα 4: Διαδικασία κλωνοποίησης με το “Strataclone PCR Cloning” kit (Stratagene).

Η διαδικασία έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες του kit και κλωνοποιήθηκαν τα PCR προϊόντα των Βακτηρίων και των Αρχαίων, που προέκυψαν από την PCR με θερμοκρασία υβριδισμού 57°C.

Μετά τον μετασχηματισμό των δεκτικών κυττάρων, ακολούθησε η μέθοδος επιλογής μπλε-άσπρων αποικιών με επίστρωση των κυττάρων σε θρεπτικό μέσο LB agar με

αμπικιλίνη και X-gal. Οι τελικές συγκεντρώσεις της αμπικιλίνης και του X-gal ήταν 100μg/ml και 40μg/ml, αντίστοιχα. Τα τρυβλία επωάστηκαν για 16 ώρες στους 37°C.

Οι μπλε και άσπρες αποικίες που εμφανίστηκαν στο τρυβλίο την επόμενη μέρα οφείλονται στο *lacZ'* γονίδιο που έχει pSC-A vector. Συγκεκριμένα, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 10, η ένθεση του PCR προϊόντος στη θέση του πολυσυνδέτη οδηγεί σε διάσπαση του *lacZ'* γονιδίου και καταργείται έτσι η δράση της β-γαλακτοσιδάσης που έχει την ικανότητα να μεταβολίζει το X-gal. Αντίθετα, στην περίπτωση των μπλε αποικιών, ο pSC-A vector δεν έχει πάρει το προϊόν κι έτσι το *lacZ'* γονίδιο είναι άθικτο και η β-γαλακτοσιδάση μπορεί να μεταβολίσει το X-gal, δίνοντας το χαρακτηριστικό μπλε χρώμα στις αποικίες.



Εικόνα 5: Περιοχή ένθεσης του PCR προϊόντος στον pSC-A vector.

3.4.4 Επιβεβαίωση θετικών κλώνων μετά την κλωνοποίηση

3.4.4.1 Επιβεβαίωση με PCR

Για να επιβεβαιώσουμε πως το γονίδιο-στόχος μπήκε στον pSC-A vector, επιλέξαμε 8 τυχαίες λευκές αποικίες και κάναμε “Colony PCR”. Για την συγκεκριμένη διαδικασία χρησιμοποιήθηκε η *Taq* DNA polymerase, Recombinant (HyTest Ltd.) και η αντίδραση έγινε και πάλι σε τελικό όγκο 25μl. Για την Colony PCR, αρχικά παρασκευάζουμε το Master mix και το μοιράζουμε στα tubes. Στη συνέχεια παίρνουμε με αποστειρωμένη οδοντογλυφίδα μια λευκή αποικία, την σώζουμε σε ένα τρυβλίο με LB/αμπικιλίνη/X-gal και έπειτα ενοφθαλμίζουμε στο PCR tube. Όταν ολοκληρωθεί η διαδικασία και για τις 8 αποικίες, επωάζουμε το τρυβλίο στους 37°C. Το πρωτόκολλο, καθώς και οι συνθήκες της αντίδρασης φαίνονται παρακάτω (Πίνακας 8 & 9).

Οι αρχικές και τελικές συγκεντρώσεις για την Colony PCR και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν για το βακτηριακό *16S rRNA* γονίδιο φαίνονται στον Πίνακα 6.

ΠΙΝΑΚΑΣ 6: Οι αρχικές και τελικές συγκεντρώσεις και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων της Colony PCR (HyTest Ltd.) για την ενίσχυση του *16S rRNA* γονιδίου των βακτηρίων.

| ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ (HYTEST LTD) | ΑΡΧΙΚΕΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ | ΤΕΛΙΚΕΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ | ΠΟΣΟΤΗΤΕΣ (μl) |
|-------------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------|
| H ₂ O | | | 20.21 |
| PCR buffer | 10X | 1X | 2.5 |
| dNTPS | 25mM | 250μM | 0.25 |
| 27F primer | 26.9μM | 0.5μM | 0.46 |
| 1492R primer | 32.6μM | 0.5μM | 0.38 |
| MgCl ₂ | 50mM | 2mM | 1 |
| <i>Taq</i> DNA polymerase | 5u/μl | 1unit | 0.2 |

Οι θερμοκρασίες αντίδρασης της Colony PCR για την επιβεβαίωση του βακτηριακού *16S rRNA* γονιδίου αναφέρονται στον πίνακα 7.

ΠΙΝΑΚΑΣ 7: Θερμοκρασίες αντίδρασης Colony PCR για την επιβεβαίωση του βακτηριακού *16S rRNA* γονιδίου.

| ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΕΣ | ΧΡΟΝΟΣ |
|--------------|--------|
| 94°C | 5min |
| 94°C | 1min |
| 57°C | 30sec |
| 72°C | 1.5min |
| 72°C | 10min |

} 30 cycles

3.4.4.2 Επιβεβαίωση με πέψη με ένζυμο περιορισμού

Από τις αποικίες που επιβεβαιώθηκαν σαν θετικές από την Colony PCR, κάναμε υγρές καλλιέργειες σε LB broth/αμπικιλίνη/X-gal και τις επώασαμε στους 37°C. Από αυτές τις καλλιέργειες απομονώσαμε τα πλασμίδια με το kit Nucleospin Plasmid (Macherey-Nagel, Germany). Όπως φαίνεται και από τον πλασμιδιακό χάρτη του pSC-A υπάρχουν, ένθεν κι ένθεν του ενθέματος, θέσεις αναγνώρισης για το ένζυμο περιορισμού EcoRI. Βασιζόμενοι σε αυτό, πραγματοποιήσαμε μια αντίδραση πέψης για να επιβεβαιώσουμε πως τα πλασμίδια είχαν όντως ένθεμα. Για την πέψη χρησιμοποιήσαμε 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 Πίνακα 8.

ΠΙΝΑΚΑΣ 8: Ποσότητες των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν για την πέψη με το ένζυμο EcoRI

| ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ (TAKARA) | ΠΟΣΟΤΗΤΕΣ (μ l) |
|---------------------------|-------------------------|
| 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%.

3.4.4.3 Κατασκευή *16S rRNA* βιβλιοθηκών

Σε ένα microtiter plate (96 wells) βάζουμε 200 μ l LB broth με αμπικιλίνη (100 μ g/ml) και γλυκερόλη (25%). Χρησιμοποιώντας αποστειρωμένες οδοντογλυφίδες, επιλέξαμε τις λευκές αποικίες και ενοφθαλμίσαμε κάθε πηγαδάκι με έναν κλώνο. Τα microtiter plates επώαστηκαν στους 37°C για 24 ώρες (χωρίς ανάδευση) και αποθηκεύτηκαν στους -80°C.

3.4.4.4 Αλληλούχηση κλώνων *16S rRNA* βιβλιοθηκών

Από κάθε *16S rRNA* βιβλιοθήκη κάναμε 48 υγρές καλλιέργειες σε 3ml LB broth και αμπικιλίνη (100 μ g/ml) και τις επώασαμε 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 αλληλούχηση στο Τμήμα Ανοσολογίας της Ιατρικής Σχολής Λάρισας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Η αλληλούχηση όλων των κλώνων έγινε με τον εκκινητή T7.

3.5 Φυλογενετική ανάλυση κλώνων με εργαλεία βιοπληροφορικής

3.5.1 Επεξεργασία αλληλουχιών

Για να ξεκινήσει η ανάλυση των κλώνων που έχουμε αλληλουχήσει, έπρεπε πρώτα να αφαιρέσουμε τις βάσεις που ανήκουν στο πλασμίδιο κλωνοποίησης και να κρατήσουμε την περιοχή που ανήκει στο *16S rRNA* γονίδιο. Η επεξεργασία των αλληλουχιών έγινε με το πρόγραμμα “Sequence Scanner” (<http://sequence-scanner.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 μπόρεσαν να “διαβαστούν” σωστά, καθώς και εκείνες που είχαν μόνο την αλληλουχία του πλασμιδίου (χωρίς ένθεμα).

3.5.2 Bellerophon

Όλοι οι κλώνοι ελέχθησαν για την παρουσία χιμαιρικών *16S rRNA* αλληλουχιών με το πρόγραμμα “Bellerophon” (<http://comp-bio.anu.edu.au/bellerophon/bellerophon.pl>). 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 και έχουν τη μορφή που φαίνεται στο Παράρτημα (III). 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.

3.5.3 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

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 ολιγομερών 7bp που είναι κοινά μεταξύ της αλληλουχίας μας και μιας RDP αλληλουχίας διαιρεμένου με

τον μικρότερο αριθμό μοναδικών ολιγομερών 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.

3.5.4 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)

Με το πρόγραμμα BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) συγκρίναμε τις 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)

3.5.5 Mothur

Το πρόγραμμα Mothur χρησιμοποιήθηκε για να κάνουμε ομοπαράθεση των 16S rRNA αλληλουχιών των δύο βιβλιοθηκών, όπως επίσης και για να κατηγοριοποιήσουμε τους κλώνους σε Λειτουργικές Ταξινομικές Μονάδες (Operational Taxonomic Units-OTUs) και να υπολογίσουμε τις φυλογενετικές τους αποστάσεις. Για την ανάλυση με το πρόγραμμα Mothur ακολουθήσαμε το παρακάτω πρωτόκολλο:

- Κατεβάζουμε και εγκαθιστούμε στον δίσκο C:/ του υπολογιστή το πρόγραμμα από την ηλεκτρονική διεύθυνση http://www.mothur.org/wiki/Download_mothur
- Στον φάκελο του προγράμματος “φορτώνουμε” τα 2 αρχεία που θα επεξεργαστούμε (Bacteria.fasta)

- Πληκτρολογούμε:
summary.seqs(fasta=Bacteria.fasta) και στο αρχείο που προκύπτει παρατηρούμε πλειονηφικά πού κυμαίνονται τα ζεύγη βάσεων των αλληλουχιών
- Πληκτρολογούμε:
align.seqs(candidate=Bacteria.fasta,template=silva.bacteria.fasta,align=goth,search=kmer)

Το αρχείο silva.bacteria.fasta θα πρέπει να το κατεβάσουμε από την διεύθυνση http://www.mothur.org/wiki/Silva_reference_files και να το “φορτώσουμε” στον φάκελο του προγράμματος

- Πληκτρολογούμε:
screen.seqs(fasta=Bacteria.align,minlength=200)

Με αυτή την εντολή θα αποκλειστούν όλες οι αλληλουχίες που μετά την ομοπαράθεση έχουν λιγότερα από 200 ζεύγη βάσεων. Προκύπτει έτσι το αρχείο Bacteria.good.align.fasta, το οποίο χρησιμοποιούμε στην επόμενη εντολή.

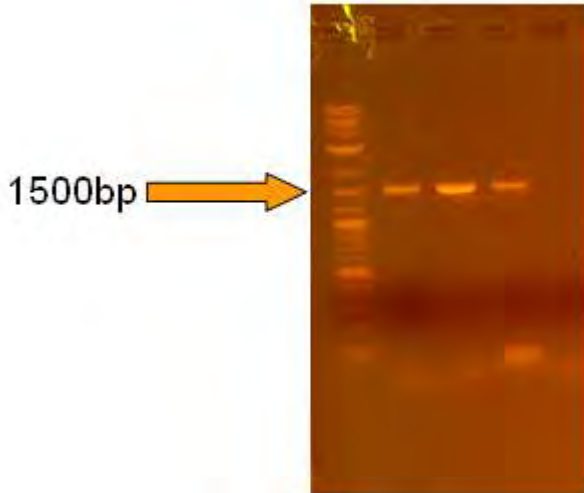
- Για να ελέγξουμε και πάλι τα αποτελέσματα, πληκτρολογούμε:
summary.seqs(fasta=Bacteria.good.align)
- Στη συνέχεια επεξεργαζόμαστε περαιτέρω με trimming τις αλληλουχίες, πληκτρολογώντας:
filter.seqs(fasta=Bacteria.good.align, trump=., vertical=T)
- Για να υπολογίσουμε τις φυλογενετικές αποστάσεις, πληκτρολογούμε:
dist.seqs(fasta=Bacteria.good.filter.fasta, calc=eachgap, output=lt)
 - Για να κάνουμε το clustering, πληκτρολογούμε:
cluster(phylip=Bacteria.good.filter.phylip.dist, cutoff=0.10, precision=100)

- Για να υπολογίσουμε το ποσοστό κάλυψης της βιβλιοθήκης, αλλά και τους δείκτες Chao 1 και Shannon, πληκτρολογούμε:
summary.single(list=Bacteria.good.filter.phylip.an.list, calc=coverage-chao-shannon)
- Για να δημιουργήσουμε ένα συγκεντρωτικό αρχείο με τις αλληλουχίες ταξινομημένες στην κάθε Λειτουργική Ταξινομική Μονάδα, πληκτρολογούμε:
get.otulist(list=Bacteria.good.filter.phylip.an.list)
- Για να κάνουμε την rarefaction ανάλυση, πληκτρολογούμε:
rarefaction.single(list=Bacteria.good.filter.phylip.an.list, freq=1) και
rarefaction.single(list=Bacteria.good.filter.phylip.an.list, calc=chao, freq=1)
- Τα αρχεία που προκύπτουν από τις 2 τελευταίες εντολές τα χρησιμοποιούμε για να κάνουμε τις καμπύλες Rarefaction και Chao 1.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Ενίσχυση του *16S rRNA* γονιδίου καλλιεργήσιμων βακτηρίων

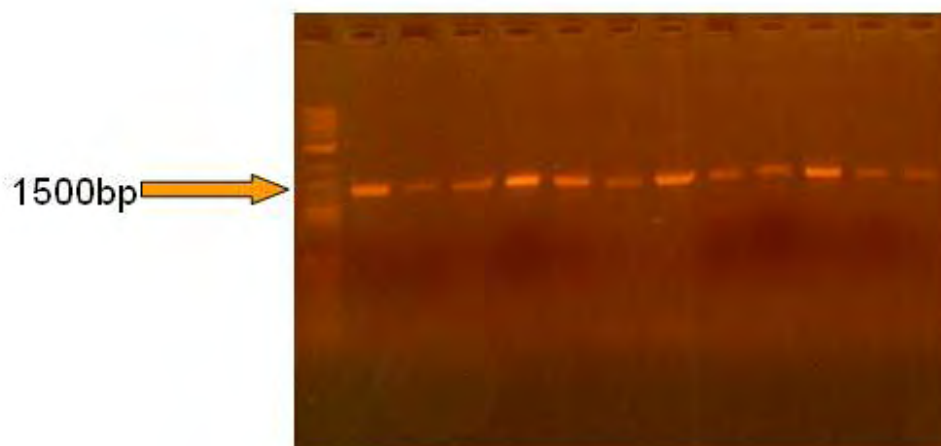
Η ενίσχυση του *16S rRNA* γονιδίου των βακτηρίων με τους εκκινητές 27F και 1492R έδωσε προϊόν 1500bp, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 6. Η θερμοκρασία υβριδισμού ήταν 57°C και χρησιμοποιήθηκε αρνητικό control, για να διασφαλίσουμε πως η αντίδραση έγινε σωστά και πως ενισχύθηκε μόνο το επιθυμητό γονίδιο. Χρησιμοποιήσαμε επίσης σαν θετικό control χρωμοσωμικό DNA του βακτηρίου *Pseudomonas entomophila*.



Εικόνα 6: Ενίσχυση του *16S rRNA* γονιδίου καλλιεργήσιμων βακτηρίων. Από αριστερά προς δεξιά φαίνονται: ο μάρτυρας μοριακού βάρους, το *16S rRNA* γονίδιο από δύο διαφορετικά δείγματα (1500bp), το θετικό control, το αρνητικό control.

4.2 Καθαρισμός των προϊόντων PCR καλλιεργήσιμων βακτηρίων

Τα προϊόντα της PCR που προέκυψαν από τα καλλιεργήσιμα βακτήρια, «καθαρίστηκαν» με τη χρήση του Nucleospin Extract II (Macherey-Nagel, Germany). Στη συνέχεια ηλεκτροφορήσαμε σε πηκτή αγαρόζης 0,8% w/v 4μl από το κάθε δείγμα για να ελέγξουμε τον καθαρισμό. Τα αποτελέσματα για τα 12 από τα 15 PCR δείγματα που καταφέραμε να απομονώσουμε φαίνονται στην Εικόνα 7.



Εικόνα 7: Καθαρισμός των 12 PCR προϊόντων που προέκυψαν από τα καλλιεργήσιμα βακτήρια.

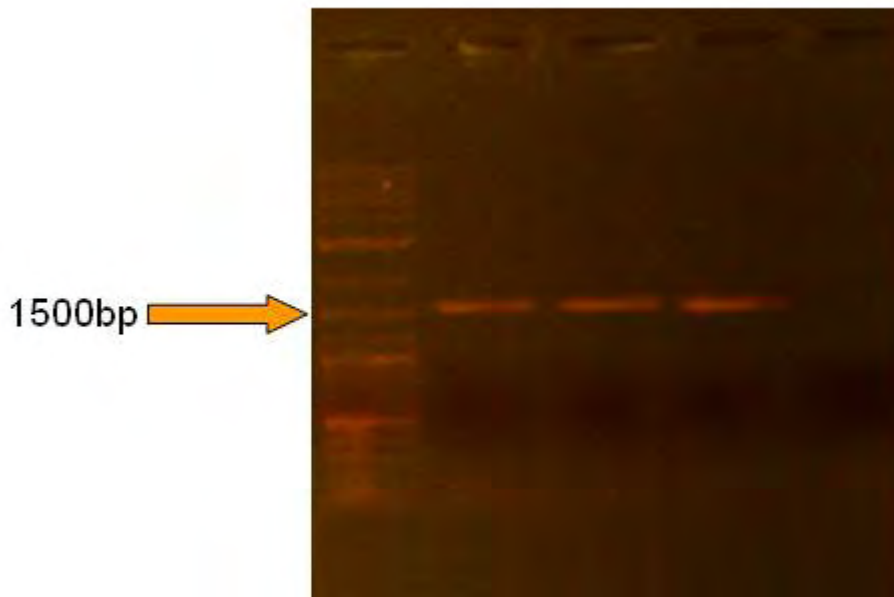
Στον Πίνακα 9 φαίνονται οι κωδικοί όλων των καλλιεργήσιμων βακτηρίων που απομονώθηκαν από τα χειρόγραφα, ενώ με διαφορετικό χρώμα (μωβ) αντιπροσωπεύονται τα 15 δείγματα από τα οποία καταφέραμε να ενισχύσουμε το *16S rRNA* γονίδιο. Μετά τον καθαρισμό τα 15 δείγματα εστάλησαν για αλληλούχηση.

ΠΙΝΑΚΑΣ 9 : Κωδικοί όλων των καλλιεργήσιμων βακτηρίων που απομονώθηκαν από τα 5 χειρόγραφα.

| ΔΕΙΓΜΑ 1 | ΔΕΙΓΜΑ 2 | ΔΕΙΓΜΑ 3 | ΔΕΙΓΜΑ 4 | ΔΕΙΓΜΑ 5 |
|----------|----------|----------|----------|----------|
| Δ1M2A | Δ2M4 | Δ3M1B | Δ4M4B | Δ5M1A |
| Δ1M4B | Δ2M5 | Δ3M4 | Δ4M4A | Δ5M2E |
| Δ1M4A | Δ2M1A | Δ3M3A | Δ4M2A | Δ5M2A |
| Δ1M5 | | Δ3M1A | Δ4M3A | Δ5M2F |
| Δ1M3A | | Δ3M3B | | Δ5M3A |
| Δ1M1C | | | | Δ5M4A |
| Δ1M1A | | | | |
| Δ1M1B | | | | |

4.3 Ενίσχυση του *16S rRNA* γονιδίου βακτηρίων του ολικού DNA που απομονώθηκε απευθείας από το χαρτί

Το DNA που απομονώσαμε απευθείας από το δείγμα 4 χρησιμοποιήθηκε για να γίνει PCR αντίδραση με το ένζυμο ExTaq (TAKARA) και με τους εκκινητές 27F και 1492R. Χρησιμοποιήσαμε και πάλι σαν θετικό control χρωμοσωμικό DNA του βακτηρίου *Pseudomonas entomophila* και τα αποτελέσματα της αντίδρασης φαίνονται στην Εικόνα 8 .

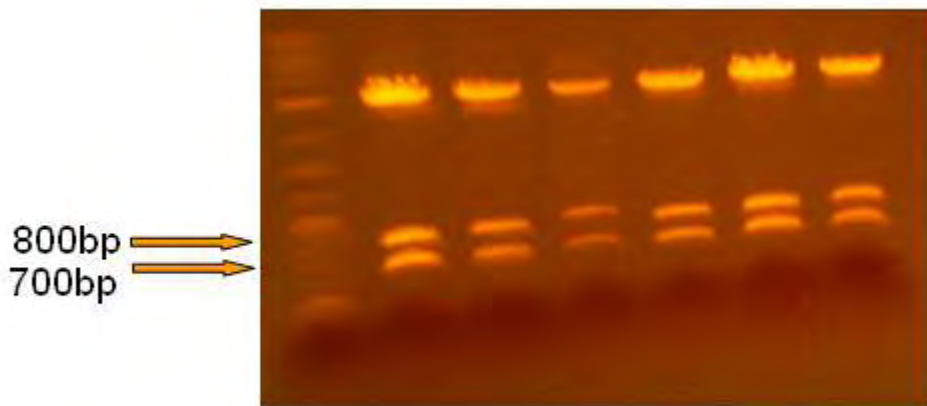


Εικόνα 8 : Ενίσχυση του *16S rRNA* γονιδίου του DNA που απομονώθηκε απευθείας από το χαρτί. Από αριστερά προς δεξιά φαίνονται: ο μάρτυρας μοριακού βάρους, το *16S rRNA* γονίδιο από δύο αντιδράσεις PCR για το δείγμα 4 (1500bp), το θετικό control, το αρνητικό control.

4.4 Κλωνοποίηση των PCR προϊόντων βακτηρίων του DNA που απομονώθηκε απευθείας από το χαρτί

Τα PCR προϊόντα που προέκυψαν κλωνοποιήθηκαν σε κατάλληλους T-vectors, που έδιναν τη δυνατότητα επιλογής μπλε-άσπρων αποικιών. Σε κάθε τρυβλίο μετά την επώαση υπήρχαν περίπου 50 άσπρες και 30 μπλε αποικίες. Ωστόσο πριν προχωρήσουμε στην κατασκευή *16S rRNA* βιβλιοθηκών, ήταν απαραίτητο να ελέγξουμε ενδεικτικά κάποιες από τις άσπρες αποικίες για να είμαστε βέβαιοι πως

είχαν το ένθεμα. Για να γίνει αυτό χρησιμοποιήσαμε 2 τρόπους. Ο πρώτος ήταν να κάνουμε Colony PCR με τους εκκινητές που είχαμε χρησιμοποιήσει για την αρχική ενίσχυση. Ο δεύτερος ήταν να απομονώσουμε τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια από τους τυχαίους κλώνους και να κάνουμε πέψη με ένα ένζυμο περιορισμού. Τα αποτελέσματα της πέψης με EcoRI ανασυνδυασμένων πλασμιδίων που περιείχαν βακτηριακό ένθεμα φαίνονται στην Εικόνα 9. Αξίζει να σημειωθεί πως το πρότυπο ζωνών είναι κοινό για όλους τους κλώνους και μάλιστα φαίνεται πως υπάρχει και μια θέση αναγνώρισης μέσα στο *16S rRNA* γονίδιο για το ένζυμο EcoRI.



Εικόνα 9: Πέψη 6 τυχαίων ανασυνδυασμένων πλασμιδίων που έφεραν το βακτηριακό *16S rRNA*. Διακρίνουμε το γραμμικό πλασμίδιο (3kb) και πιο χαμηλά τα πρότυπα ζωνών του ενθέματος.

4.5 Επεξεργασία αλληλουχιών καλλιεργήσιμων βακτηρίων

Η αλληλούχηση των 15 PCR προϊόντων έγινε με τον εκκινητή 27F και προέκυψαν τμήματα DNA από 550-700bp. Όλες οι αλληλουχίες αναλύθηκαν μία προς μία με τα προγράμματα RDP και BLAST. Στον Πίνακα 10 φαίνονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τα δύο προγράμματα. Συγκεκριμένα φαίνεται η ταξινόμηση των καλλιεργήσιμων βακτηρίων σε επίπεδο γένους σύμφωνα με το RDP και σε επίπεδο είδους σύμφωνα με το BLAST.

ΠΙΝΑΚΑΣ 10: Ταξινόμηση των καλλιεργήσιμων βακτηρίων σύμφωνα με το RDP και το BLAST.

| ΔΕΙΓΜΑ | RDP (Classifier) | BLAST (%) |
|------------------|---------------------------|--|
| Δ1M4B (642bp) | <i>Paenibacillus</i> sp. | <i>Paenibacillus provencensis</i> (100) |
| Δ1M1A (591bp) | <i>Bacillus</i> sp. | <i>Bacillus pumilus</i> (100) |
| Δ1M2A (628bp) | <i>Staphylococcus</i> sp. | <i>Staphylococcus hominis</i> (100) |
| Δ1M5 (547bp) | <i>Bacillus</i> sp. | <i>Bacillus foraminis</i> (99) |
| Δ1M1C (612bp) | <i>Micrococcus</i> sp. | <i>Micrococcus luteus</i> (100) |
| Δ1M1B (593bp) | <i>Staphylococcus</i> sp. | <i>Staphylococcus epidermidis</i> (100) |
| Δ2M4 (590bp) | <i>Staphylococcus</i> sp. | <i>Staphylococcus hominis</i> (100) |
| Δ2M5 (597bp) | <i>Staphylococcus</i> sp. | <i>Staphylococcus epidermidis</i> (100) |
| Δ3M1B (591bp) | <i>Staphylococcus</i> sp. | <i>Staphylococcus epidermidis</i> (100) |
| Δ3M1A (596bp) | <i>Staphylococcus</i> sp. | <i>Staphylococcus epidermidis</i> (100) |

| | | |
|------------------|---------------------------|--|
| Δ3M3A (627bp) | <i>Kocuria</i> sp. | <i>Kocuria turfanensis</i> (99) |
| Δ4M3A (595bp) | <i>Staphylococcus</i> sp. | <i>Staphylococcus epidermidis</i> (100) |
| Δ4M4B (594bp) | <i>Micrococcus</i> sp. | <i>Micrococcus yunnanensis</i> (100) |
| Δ5M1A (598bp) | <i>Staphylococcus</i> sp. | <i>Staphylococcus epidermidis</i> (100) |
| Δ5M4A (614bp) | <i>Micrococcus</i> sp. | <i>Micrococcus luteus</i> (100) |

Με βάση τα αποτελέσματα από την ταξινόμηση των καλλιεργήσιμων βακτηρίων σύμφωνα με το RDP και το BLAST, προκύπτει τα εξής :

Staphylococcus sp. : Οκτώ δείγματα βακτηρίων ανήκουν στο γένος *Staphylococcus* sp. Το γένος του σταφυλόκοκκου περιλαμβάνει 31 διαφορετικά είδη βακτηρίων. Ο Σταφυλόκοκκος είναι ένα Gram - θετικό βακτήριο που ζει στο ανθρώπινο σώμα σαν μέρος της φυσικής χλωρίδας του δέρματος. Τα περισσότερα είναι ακίνδυνα και ζουν κυρίως στο δέρμα και στους βλεννογόνους αδένες του ανθρώπου. Είναι πιθανόν η παρουσία του *Staphylococcus* sp. στα ιστορικά χειρόγραφα ,να οφείλετε στην επαφή των χεριών με το χαρτί.

Micrococcus sp.: Τρία είδη βακτηρίων του γένους *Micrococcus* sp. απομονώθηκαν από το χαρτί και καλλιεργήθηκαν. Το είδος *Micrococcus yunnanensis* σύμφωνα με προγενέστερες μελέτες εκλύει υδρολυτικά ένζυμα όπως κυτταρινάσες οι οποίες καταστρέφουν την κυτταρίνη και προκαλούν βιοαλλοίωση στο χαρτί (Siddikee *et. al.*, 2010)

Bacillus sp. : Δύο είδη βακτηρίων του γένους *Bacillus* sp. απομονώθηκαν και καλλιεργήθηκαν τα είδη *Bacillus pumilus* και *Bacillus foraminis*. Από τα δύο είδη το *Bacillus pumilus* είναι ένα Gram- θετικά , αερόβιο , που απελευθερώνει ξυλανάσες ένζυμα τα οποία υδρολύουν την κυτταρίνη του χαρτιού και προκαλούν βιοαλλοίωση. Ιδιαίτερα οι ξυλανάσες που παράγονται από το *Bacillus pumilus* χρησιμοποιούνται για τη λεύκανση του χαρτοπολτού στη βιομηχανία στη διαδικασία της λεύκανσης (Marta *et. al.*, 2000)

Kocuria sp. : Ένα είδος βακτηρίου του γένους *Kocuria* sp. απομονώθηκε και καλλιεργήθηκε . Το γένος *Kocuria* sp. περιλαμβάνει 16 είδη Gram- θετικά , αερόβια βακτήρια εκ των οποίων ορισμένα παράγουν υδρολυτικά ένζυμα όπως λακάσες και ξυλανάσες που υδρολύουν την κυτταρίνη και την ημικυτταρίνη του χαρτιού.

Paenibacillus sp. : Ένα είδος του γένους *Paenibacillus* sp απομονώθηκε και καλλιεργήθηκε. Σε επίπεδο γένους το *Paenibacillus* sp χρησιμοποιήθηκε στη βιομηχανία για την λεύκανση χαρτοπολτού. (Abhay Raj *et al.*, 2007). Το είδος *Paenibacillus provencensis* απομονώθηκε για πρώτη φορά από δείγμα ανθρώπινων ούρων και είναι Gram- αρνητικά βακτήριο. Η Φυλογενετική ανάλυση η οποία βασίζεται στη σύγκριση της *16S rRNA* γονιδιακής αλληλουχίας με άλλα στελέχη , έδειξε ότι παρουσιάζει ομοιότητες με *Paenibacillus xylanilyticus* XIL14 (T) (95,3 και 95,4%), όπου με προγενέστερες μελέτες εκκρίνει ένζυμα κυρίως ξυλανάσες , τα οποία βιοαποικομιδούν το χαρτί (Rivas *et al.*, 2005).

4.6 Φυλογενετική ανάλυση κλώνων με εργαλεία βιοπληροφορικής

4.6.1 Επεξεργασία αλληλουχιών βακτηριακής βιβλιοθήκης 16S rRNA

Ο αριθμός των κλώνων που εστάλησαν για αλληλούχηση ήταν 96. Η αλληλούχηση έγινε με έναν εκκινητή (T7) και προέκυψαν τμήματα DNA από 550-700bp. Το πρώτο στάδιο της επεξεργασίας των αλληλουχιών ήταν να αφαιρεθεί το πλασμιδιακό κομμάτι και να αξιολογηθεί η ποιότητα της αλληλούχησης. Εξετάζοντας το χρωματογράφημα κάθε αλληλουχίας **απορρίφθηκαν 22 κλώνοι.**

4.6.2 Bellerophon

Οι αλληλουχίες που συγκεντρώσαμε μετατράπηκαν σε ένα ενιαίο αρχείο fasta (προέκταση .fasta) για να μπορέσουμε να ελέγξουμε αν κάποιες από αυτές είναι χμιαϊκές. Οι χμιαϊκές 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 χμιαϊκή αλληλουχία αλλάζει από τη μια πατρική στην άλλη ονομάζεται “σημείο τομής” (breakpoint). Οι χμιαϊρες πρέπει να αφαιρούνται από τις μελέτες μικροβιακών κοινοτήτων γιατί αντιπροσωπεύουν μη-υπάρχοντες οργανισμούς.

Το πρόγραμμα “Bellerophon” υποδεικνύει πιθανές χμιαϊρες *16S rRNA* αλληλουχιών, οι οποίες όμως είναι απαραίτητο να ελεγχθούν κατόπιν, για να διαπιστωθεί αν πρόκειται όντως για χμιαϊκές αλληλουχίες. Η ανίχνευση των χμιαϊκών 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 μητρών των αποστάσεων (distance matrices) για n αλληλουχίες δίνεται από τον τύπο:

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

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

Για να βρούμε την αλληλουχία με την μεγαλύτερη συμβολή στην τιμή dme , υπολογίζουμε τον λόγο 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:

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

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 ελέγξουμε τις υποδεικνυόμενες χίμαιρες, χωρίζουμε την αλληλουχία στο σημείο τομής (breakpoint) που δίνει η ανάλυση. Στη συνέχεια ελέγχουμε 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.

Η ανάλυση των 74 αλληλουχιών βακτηριακού *16S rRNA* που έγινε με το συγκεκριμένο πρόγραμμα υπέδειξε 30 χίμαιρες. Ωστόσο, όταν αυτές ελέγχθηκαν διαπιστώθηκε πως καμία από αυτές δεν ήταν πραγματικά χιμαιρική.

4.6.3 Ribosomal Database Project (RDP) και BLAST

Οι 74 βακτηριακές αλληλουχίες ελέγχθηκαν μία προς μία με τα προγράμματα RDP και BLAST. Στον Πίνακα 11 φαίνονται η ταξινόμηση των κλώνων σύμφωνα με το RDP Classifier, ο κοντινότερος συγγενής τους με βάση το BLAST, καθώς και το ποσοστό ομοιότητάς τους. Οι αλληλουχίες που ταξινομήθηκαν σύμφωνα με το RDP Classifier σε επίπεδο φύλου δεν παρουσιάζονται στον ΠΙΝΑΚΑ 11.

ΠΙΝΑΚΑΣ 11: Ταξινόμηση των κλώνων σύμφωνα με το RDP Classifier, ο κοντινότερος συγγενής τους με βάση το BLAST, καθώς και το ποσοστό ομοιότητάς τους.

| ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΕΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΕΣ | ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ (RDP Classifier) | ΚΟΝΤΙΝΟΤΕΡΟΣ ΣΥΓΓΕΝΗΣ(BLAST) | ACCESSION NUMBER | IDENTITY (%) |
|------------------------------------|--|---|-----------------------------|-------------------------|
| 1 | <i>Bacillus</i> sp. 597bp | <i>Bacillus aryabhatai</i> | JN051485.1 | 99 |
| 2 | <i>Bacillus</i> sp. 643bp | Uncultured bacterium clone | HM125421.1 | 99 |
| 3 | <i>Bacillus</i> sp. 628bp | <i>Bacillus</i> sp. B48 | HQ433471.2 | 98 |
| 4 | <i>Bacillus</i> sp. 620bp | <i>Bacillus niacini</i> | EU221359.1 | 99 |
| 5 | <i>Bacillus</i> sp. 648bp | <i>Bacillus soli</i> | EU221347.1 | 99 |
| 6 | <i>Paenibacillus</i> sp. 629bp | <i>Paenibacillus</i> sp. H10-05 | AM162315.1 | 99 |
| 7 | <i>Bacillus</i> sp. 634bp | <i>Bacillus longiquaesitum</i> | AM747040.1 | 98 |
| 8 | <i>Bacillus</i> sp. 595bp | <i>Bacillus niacini</i> strain NBK36 | GQ980245.1 | 99 |
| 9 | <i>Bacillaceae</i> family 627bp | <i>Halobacillus</i> sp. | AB185150.1 | 100 |
| 10 | <i>Bacillales</i> order 601bp | <i>Bacillus longiquaesitum</i> | AM747040.1 | 99 |

| | | | | |
|----|------------------------------------|--|----------------------------|----|
| 11 | <i>Bacillus</i> sp. 727bp | Uncultured <i>Bacillus</i> sp. clone | EU071493.1 | 98 |
| 12 | <i>Bacillus</i> sp. 664bp | <i>Bacillus</i> sp. Ult-42 | GU733391.1 | 99 |
| 13 | <i>Bacillus</i> sp. 582bp | <i>Bacillus niacini</i> strain Y2S4 | EU221374.1 | 99 |
| 14 | <i>Anaerobacillus</i> sp. 566bp | Uncultured bacterium clone Bms_CK325 | HQ697807.1 | 96 |
| 15 | <i>Bacillus</i> sp. 539bp | Uncultured bacterium clone LC3 | AY559426.1 | 98 |
| 16 | <i>Bacillales</i> order 539bp | <i>Bacillus jeotgali</i> strain B36 | GU397390.1 | 96 |
| 17 | <i>Bacillus</i> sp. 582bp | Uncultured <i>Bacillus</i> sp. clone WeeA_F02 | JN032380.1 | 99 |
| 18 | <i>Bacillus</i> sp. 537bp | Uncultured <i>Bacillus</i> sp. clone EHFS1_S09a | EU071493.1 | 99 |
| 19 | <i>Bacillus</i> sp. 663bp | Uncultured bacterium clone Uday0-57 | HQ011564.1 | 98 |
| 20 | <i>Streptococcus</i> sp. 643bp | <i>Streptococcus</i> sp. F1 | FJ405281.1 | 99 |
| 21 | <i>Devosia</i> sp. 557bp | <i>Devosia</i> sp. Asd M4A1 | FM955869.1 | 99 |
| 22 | <i>Bacillus</i> sp. 619bp | Uncultured <i>Bacillus</i> sp. clone EHFS1_S09a | EU071493.1 | 99 |
| 23 | <i>Lysobacter</i> sp. 716bp | Uncultured <i>Lysobacter</i> sp. clone SeqSEEZ102 | JN367125.1 | 98 |

| | | | | |
|----|------------------------------------|---|----------------------------|-----|
| 24 | <i>Staphylococcus</i> sp. 620bp | <i>Staphylococcus</i> sp. TRC5 | JN860204.1 | 99 |
| 25 | <i>Bacillus</i> sp. 661bp | Uncultured <i>Bacillus</i> sp. clone UHAS4.19 | JN037927.1 | 98 |
| 26 | <i>Bacillus</i> sp. 582bp | Uncultured <i>Bacillus</i> sp. clone UHAS4.19 | JN037927.1 | 98 |
| 27 | <i>Cohnella</i> sp. 665bp | <i>Cohnella soli</i> strain 5GH36-9 | EF368009.1 | 98 |
| 28 | <i>Bacillus</i> sp. 582bp | <i>Bacillus niacini</i> strain J2S5 | EU221359.1 | 98 |
| 29 | <i>Bacillus</i> sp. 507bp | Uncultured bacterium clone F2_44X | GQ263093.1 | 99 |
| 30 | <i>Bacillus</i> sp. 623bp | Uncultured bacterium clone 98B-1_B08_T7 | HM998741.1 | 100 |

Από τη παραπάνω ταξινόμηση των κλώνων σύμφωνα με το RDP Classifier προκύπτει ότι σε επίπεδο είδους με ποσοστό ID \geq 99% ταυτοποιήθηκαν 12 είδη:

Bacillus aryabhatai , *Bacillus niacini* , *Bacillus soli* , *Bacillus niacini* , *Bacillus longiquaesitum*,

Σε επίπεδο γένους όπου το ποσοστό ταυτοποίησης είναι $97\% < ID < 99\%$ προκύπτουν τα γένη: *Bacillus* sp. , *Cohnella* sp. *Paenibacillus* sp., *Halobacillus* s.p., *Streptococcus* sp. , *Devosia* sp.

4.6.4 Φυλογενετική ανάλυση BAC βιβλιοθήκης με το Mothur

Η ομοπαράθεση των 74 αλληλουχιών της BAC βιβλιοθήκης έγινε με το αρχείο “silva.bacteria”, το οποίο περιέχει 14.956 αλληλουχίες βακτηριακού 16S rRNA. Για την ομοπαράθεση χρησιμοποιήθηκε η εντολή “kmer”, βάσει της οποίας η αναζήτηση της «κοντινότερης» αλληλουχίας για κάθε υποψήφια αλληλουχία της βιβλιοθήκης μας

γίνεται με τη χρήση δμερών, καθώς και ο αλγόριθμος “gotoh”, ο οποίος αξιολογεί τις βάσεις που ταιριάζουν με +1, τα mismatch με -1 και τα κενά με -2. Για να συνεχίσουμε την ανάλυση, αφαιρούμε τις αλληλουχίες που έχουν μήκος μικρότερο των 200bp και απομένουν τελικά 51 αλληλουχίες. Στη συνέχεια οι 51 αλληλουχίες ομαδοποιήθηκαν σε Λειτουργικές Ταξινομικές Μονάδες (OTUs). Η Λειτουργική Ταξινομική Μονάδα περιέχει αλληλουχίες που διαφέρουν μεταξύ τους κατά ένα συγκεκριμένο ποσοστό (π.χ. 3%). Για την ομαδοποίηση χρησιμοποιήθηκε η παράμετρος “average neighbor”, η οποία εντοπίζει τις δύο πιο όμοιες αλληλουχίες και τις ομαδοποιεί με βάση τον μέσο όρο των διαφορών που υπάρχουν ανάμεσα σε αυτές και στις υπόλοιπες αλληλουχίες. Η τιμή cutoff που χρησιμοποιήθηκε για τις αποστάσεις μεταξύ των αλληλουχιών ήταν 0.10 (10% διαφορά μεταξύ των αλληλουχιών). Τα OTUs που προέκυψαν για την BAC βιβλιοθήκη ήταν τα 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, καθώς και οι αλληλουχίες που ήταν μοναδικές (unique) μέσα στη βιβλιοθήκη.

Επιπλέον με βάση τις γενετικές αποστάσεις των αλληλουχιών υπολογίστηκε ο βαθμός κάλυψης της βιβλιοθήκης, καθώς και οι δείκτες ποικιλότητας Chao1, και Shannon index (H').

Το ποσοστό κάλυψης της βιβλιοθήκης “Good’s C” υπολογίζεται με βάση τον τύπο $[1 - (n_1/N)]$, όπου n_1 είναι ο αριθμός των OTUs που αντιπροσωπεύονται από έναν μόνο κλώνο της βιβλιοθήκης και N είναι ο συνολικός αριθμός των κλώνων που εξετάζονται (73 στην περίπτωση της BAC βιβλιοθήκης) (Chao 1984).

Ο δείκτης ποικιλότητας Chao1 υπολογίζεται με βάση τον τύπο

$S_{Chao1} = S_{obs} + n_1(n_1 - 1) / (2(n_2 + 1))$, όπου S_{obs} είναι ο αριθμός των παρατηρούμενων OTUs, n_1 ο αριθμός των OTUs που έχουν μόνο μία αλληλουχία και n_2 ο αριθμός των OTUs που έχουν μόνο δύο αλληλουχίες (Chao 1987). Ο υπολογισμός του δείκτη ποικιλότητας Chao1 γίνεται με διάστημα εμπιστοσύνης 95% (confidence interval, CI). Ο δείκτης Shannon index (H') υπολογίζει την ποικιλότητα των ειδών, λαμβάνοντας υπόψη τη σχετική αφθονία των ειδών που υπάρχουν στη βιβλιοθήκη. Υψηλές τιμές του δείκτη H' καταδεικνύουν ποικιλότητα της βιβλιοθήκης, ενώ τιμή 0 του δείκτη αντιπροσωπεύει μια βιβλιοθήκη με ένα μόνο είδος.

Στον Πίνακα 12 φαίνονται τα OTUs που προέκυψαν για την βακτηριακή βιβλιοθήκη, ο αριθμός των OTUs που αντιπροσωπεύονται μόνο από μία αλληλουχία (singletons) και τέλος ο αριθμός των OTUs που αντιπροσωπεύονται μόνο από δύο αλληλουχίες (doubletons).

Στον Πίνακα 13 παρατίθενται οι τιμές των δεικτών ποικιλότητας και το ποσοστό κάλυψης της βιβλιοθήκης που προέκυψαν για κάθε OTU. Παρατηρούμε ότι στην περίπτωση του 0.03, δηλαδή για αλληλουχίες που είναι ομαδοποιούνται σε επίπεδο γένους (97% ομοιότητα) το ποσοστό κάλυψης της βιβλιοθήκης είναι 74.5% και οι δείκτες Chao1 και Shannon H' έχουν τιμές 856 και 2.08, αντίστοιχα.

ΠΙΝΑΚΑΣ 12: Τα OTUs των 74 αλληλουχιών της BAC βιβλιοθήκης. Στη δεύτερη στήλη φαίνεται ο αριθμός των OTUs που αντιπροσωπεύονται από έναν κλώνο της βιβλιοθήκης και στην τρίτη στήλη ο αριθμός των OTUs που αντιπροσωπεύονται από δύο κλώνους.

| OTUs | Singletons | Doubletons |
|-------------|-------------------|-------------------|
| Unique | 33 | 1 |
| 0.01 | 23 | 1 |
| 0.02 | 14 | 3 |
| 0.03 | 13 | 1 |
| 0.04 | 12 | 1 |
| 0.05 | 10 | 2 |
| 0.06 | 10 | 1 |

ΠΙΝΑΚΑΣ 13: Στον πίνακα φαίνεται το ποσοστό κάλυψης της βιβλιοθήκης για όλα τα OTUs, καθώς επίσης και οι δείκτες ποικιλότητας Chao1 και Shannon H'.

| OTUs | Coverage % | Chao1 | Shannon H' |
|--------|------------|-------|------------|
| Unique | 35.2 | 301 | 3.32 |
| 0.01 | 54.9 | 153 | 2.73 |
| 0.02 | 72.5 | 42.75 | 2.37 |
| 0.03 | 74.5 | 56 | 2.08 |
| 0.04 | 76.4 | 48 | 1.78 |
| 0.05 | 80.3 | 29 | 1.76 |
| 0.06 | 80.3 | 35 | 1.63 |

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η βιοαλλοίωση ορίζεται ως η διαδικασία μέσω της οποίας «βιολογικοί παράγοντες, δηλαδή ζωντανοί οργανισμοί, είναι η αιτία της μείωσης στην ποιότητα ή στην αξία ενός αντικειμένου». (Rose, 1981) 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.

Οι βακτηριακές κοινότητες, που πιθανόν αναπτύσσονται και πολλαπλασιάζονται σε αντικείμενα πολιτιστικής κληρονομιάς, προκαλούν βιοαλλοίωση. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τον αποχρωματισμό υλικών, σχηματισμό κρουστών στην επιφάνεια και την απέκκριση βλαβερών μεταβολικών προϊόντων όπως οργανικά ή ανόργανα οξέα, προκαλώντας ανυπολόγιστη ζημιά σε ανεκτίμητης αξίας έργα πολιτιστικής κληρονομιάς

Σύμφωνα με προγενέστερες μελέτες έχουν ταυτοποιηθεί βακτήρια, σε επίπεδο γένους και είδους, όπου εκκρίνουν υδρολυτικά ένζυμα και προκαλούν βιαλλοιώσεις στο χαρτί αλλά και σε έργα πολιτιστικής κληρονομιάς και αναφέρονται ακολούθως:

Bacillus sp. (Marcia *et al.*,1999), *Paenibacillus sp* (Abhay Raj *et al.*,2005), *Kocuria sp.*, *Halobacillus sp.* (Ripka 2005), *Bacillus pumilus* (Marta *et al.*, 2000), *Micrococcus yunnanensis* (Siddikee *et al.*,2010) *Bacillus aryabhatai* (Siddikee *et al.*,2010).

Η παρούσα διπλωματική εργασία αποτελεί τη πρώτη προσπάθεια για τη μελέτη της βακτηριακής ποικιλότητας σε Ελληνικά ιστορικά χειρόγραφα του 19^{ου} και 20^{ου} αιώνα και προσπαθήσαμε να βγάλουμε κάποια πρωταρχικά συμπεράσματα σχετικά με τη βακτηριακή ποικιλότητα και τη βιοαλλοίωση που προκαλεί. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήσαμε μοριακές τεχνικές σε καλλιεργήσιμα βακτήρια, ενώ έγινε και μεταγονιδιωματική προσέγγιση με εκχύλιση ολικού DNA από τα ιστορικά χειρόγραφα. Οι μοριακές τεχνικές βασίζονται στην ενίσχυση του γονιδίου που κωδικοποιεί για το *16S rRNA* και αποτελούν αναπόσπαστο εργαλείο στη μελέτη βακτηριακών κοινοτήτων σε περιβαλλοντικά δείγματα. Η ενίσχυση του *16S rRNA* γονιδίου δίνει τη δυνατότητα να ανιχνευθούν βακτηριακά είδη που δεν είναι καλλιεργήσιμα, να αναλυθεί μεγάλος όγκος αλληλουχιών, καθώς επίσης και να γίνουν φυλογενετικές αναλύσεις.

Όπως προέκυψε από την ανάλυση των κλώνων της βακτηριακής βιβλιοθήκης που κατασκευάσαμε, οι περισσότεροι κλώνοι ανήκουν στο γένος *Bacillus sp.*, ενώ εντοπίστηκαν επίσης και μέλη των γενών *Streptococcus sp.*, *Devosia sp.*, *Lysobacter sp.*, *Staphylococcus sp.* και *Cohnella sp.*

Από την ομαδοποίηση των 74 αλληλουχιών της βιβλιοθήκης σε OTUs με ποσοστό διαφοράς 3% μεταξύ των αλληλουχιών (διαχωρισμός των κλώνων σε επίπεδο γένους), τα 13 OTUs αντιπροσωπεύονται από έναν μόνο κλώνο. Το ποσοστό κάλυψης της βιβλιοθήκης που προκύπτει είναι 74.5%, ενώ οι δείκτες Chao 1 και Shannon index έχουν τιμές 56 και 2.08. Ενώ το ποσοστό κάλυψης της βιβλιοθήκης είναι χαμηλό, οι δείκτες ποικιλότητας Chao 1 και Shannon index υποδηλώνουν μέτρια ποικιλότητα της βιβλιοθήκης.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της αλληλούχησης των καλλιεργήσιμων βακτηρίων σε επίπεδο είδους απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν τα ακόλουθα βακτήρια :*Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus hominis*, *Paenibacillus*

provencensis, *Bacillus foraminis*, *Micrococcus yunnanensis*, *Micrococcus luteus*, *Kocuria turfanaensis*. *Paenibacillus provencensis* ,*Bacillus pumilus*.

Βασιζόμενοι σε βιβλιογραφικά δεδομένα άλλων μελετών, παρατηρήσαμε ότι ορισμένα από τα παραπάνω βακτήρια προκαλούν βιοαλλοιώσεις σε έργα πολιτιστικής κληρονομιάς ,αλλά και στο χαρτί. Συγκεκριμένα , ο *Bacillus pumilus* είναι ένα Gram-θετικό αερόβιο βακτήριο παράγει το ένζυμο ξυλανάση σε αλκαλικές συνθήκες με αποτέλεσμα να βρίσκει μεγάλο πεδίο δράσης στη βιομηχανία λεύκανσης χαρτοπολτού γνωστής ως «prebleaching proccecion» (Abhay Raj *et al.*,2005). Επίσης από το γένος *Micrococcus sp.* το είδος *Micrococcus yunnanensis* σύμφωνα με βιβλιογραφικές πηγές εκκρίνει ένζυμα όπως πρωτεάσες, κιτινάσες ,πεκτινάσες και δύναται να προκαλέσει αλλοιώσεις στο χαρτί (Siddikee *et al.*,2010).

Παράλληλα, σε επίπεδο γένους τα **Paenibacillus sp. και Bacillus sp.** μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη βιομηχανία για την λεύκανση χαρτοπολτού. Επίσης σε επίπεδο γένους το **Halobacillus sp.** προκάλεσε βιοαλλοιώσεις και ρόδινο μεταχρωματισμό σε έργα πολιτιστικής κληρονομιάς .Συγκεκριμένα απομονώθηκε από τοιχογραφίες που βρίσκονται στο «Castle of Herberstein, Styria (Austria)» καθώς επίσης και σε μεσαιωνική λίθο στο «Chapel of St. Virgil, Vienna, Austria» (Ripka 2005).

Είναι προφανές ότι τα είδη των βακτηρίων που ταυτοποιήσαμε ,όπως προκύπτει και από προγενέστερες μελέτες, εκκρίνουν υδρολυτικά ένζυμα κυτταρινάσες (cellulase), λακάσες(laccase), ξυλανάσες(xylanase) πεκτινάσες (pectinase), προκαλώντας βιοαλλοίωση του χαρτιού. Για να μπορέσουμε να πιστοποιήσουμε πλήρως την επίδραση των βακτηρίων κατά την εφαρμογή τους στο χαρτί ,οφείλουμε να εξειδικεύσουμε ακόμη περισσότερο τη μελέτη αυτών. Συγκεκριμένα, να μελετήσουμε τα βακτήρια για την παραγωγή των ενζύμων ,υπό ποιες συνθήκες εκκρίνονται και σε ποιες συγκεντρώσεις παράγονται. Στη συνέχεια , να προχωρήσουμε στην άμεση εφαρμογή τους στο χαρτί και να καταγράψουμε το είδος και το μέγεθος της βιοαλλοίωσης που προκαλεί το καθένα είδος βακτηρίου αντίστοιχα. Έτσι, μπορούμε να αξιολογήσουμε το είδος και μέγεθος της βιοαλλοίωσης που προκαλούν στο χαρτί, καθώς και τις συνθήκες που αυξάνουν το ποσοστό αυτής .Αυτό μπορεί να επιτευχθεί, αφού έχουμε ταυτοποιήσει καλλιεργήσιμα βακτήρια που προκαλούν βιοαλλοιώσεις και βρίσκονται αποθηκευμένα υπο μορφή στοκ.

Μελλοντικά, εφόσον αποδείξουμε ότι παράγονται τα συγκεκριμένα ένζυμα υπο συγκεκριμένες συνθήκες και καταστρέφουν το χαρτί ,μπορούμε να αναπτύξουμε τα εξής:

- 1) Συγκεκριμένα πρωτόκολλα μοριακών μεθόδων ανίχνευσης των συγκεκριμένων βακτηρίων με απώτερο σκοπό την άμεση ταυτοποίησή τους έγκαιρα και έγκυρα, προσφέροντας άμεση ενημέρωση για τη βακτηριακή ποικιλότητα ,που αναπτύσσεται σε μουσεία ,αρχαιοφυλάκια και σε έργα πολιτιστικής κληρονομιάς.
- 2) Στρατηγικές καταστολής της ανάπτυξής τους στο χαρτί ,ώστε να περιορίζουμε άμεσα την εξάπλωσή τους και το μέγεθος της βιοαλλοίωσης με την εφαρμογή βιοκτόνων , περιορίζοντας σημαντικά τη ζημιά σε έργα ανεκτίμητης αξίας της πολιτιστικής κληρονομιάς.

Τα Ελληνικά ιστορικά χειρόγραφα που χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα διπλωματική εργασία , αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι της Ελληνικής πολιτιστικής κληρονομιάς Το Γενικό Άρχειο του Κράτους(Γ.Α.Κ.) έχει ως αποστολή την εποπτεία , διάσωση , συγκέντρωση, καταγραφή , μικροφωτογράφιση, ταξινόμηση και ευρετηρίαση του αρχειακού υλικού της χώρας ,που αναφέρεται στην ιστορία και στην πολιτιστική κληρονομιά του Ελληνικού έθνους.

Συμπερασματικά στην συγκεκριμένη διπλωματική εργασία για πρώτη φορά ταυτοποιήθηκε η βακτηριακή ποικιλότητα Ελληνικών ιστορικών χειρογράφων του Γ.Α.Κ. και δίνονται πληροφορίες για πιθανές αιτίες της βιοαλλοίωσης τους .

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abhay Raj and M. M. Krishna Reddy and Ram Chandra and Hemant J.(2007) Purohit and Atya Kapley, Biodegradation of kraft-lignin by *Bacillus* sp. isolated from sludge of pulp and paper mill
- Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH. 1995 Mar;59(1):143-69 Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation
- Allsopp, D., Seal, K., Gaylarde, C. (2006) *Introduction to biodeterioration*,
- Bousher A, Malini C, and Edyvean R. 1995. Biodeterioration and biodegradation 9: The 9th International Biodeterioration and Biodegradation Symposium. Rugby, UK: Institution of Chemical Engineers
- Cole JR, Wang Q, Cardenas E, Fish J, Chai B, Farris RJ, Kulam-Syed-Mohideen AS, McGarrell DM, Marsh T, Garrity GM, Tiedje JM. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. (2009) Nucleic Acids Res. 37(Database issue):D141-5
- Camuffo, D., (1986) Deterioration Processes of Historical Buildings, pp.189-221 in: T. Schneider (editor): "*Acidification and its Policy Implications*", Elsevier, Amsterdam
- Camuffo, D., (1992) Acid Rain and Deterioration of Monuments: How Old Is the Phenomenon? *Atmospheric Environment*, 26B, 241-247
- 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.
- Cappitelli F., Pasquariello G., Tarsitani G., Sorlini Cl., (2010) Scripta manent? Assessing microbial risk to paper heritage. In: Trends in Microbiology, 18, pp. 538–542
- Christensen BE and Characklis WG. (1990) Physical and chemical properties of biofilms. In: Characklis WG and Marshall KC (Eds). Biofilms. New York, NY: John Wiley and Sons, Inc.
- Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, (1995) Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* 49: 711–45.

- Costerton JW, Stewart PE, and Greenberg EP. (1999) Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284: 1318–22.
- Garcia-Armisen T, Vercammen K, Passerat J, Triest D, Servais P, Cornelis P. Antimicrobial resistance of heterotrophic bacteria in sewage-contaminated rivers. (2011) Water Res. 45(2):788-96
- Gaylarde, C., Ribas Silva, M., and Warscheid, Th. (2003) “Microbial impact on building materials: An overview.” *Mater. Struct.*, 36, 342– 352
- Giovannoni, S.J., Britschgi, T.B., Moyer, C.L. and K.G. Field. 1990. “Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton.” *Nature* **345**: 60 – 63
- Gurtner, C., Heyrman, J., Piñar, G., Lubitz, W., Swings, J., Rölleke, S. (2000). Comparative analyses of the bacterial diversity on two different biodeteriorated wallpaintings by DGGE and 16S rDNA sequence analysis. *International Biodeterioration and Biodegradation* **46**, 229-239
- Hammond PM. (1995) Described and estimated species numbers: an objective assessment of current knowledge. In: Allsopp D, Colwell RR, and Hawksworth DL (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.
- Huber T, Faulkner G, Hugenholtz P. Bellerophon: a program to detect chimeric sequences in multiple sequence alignments. (2004) Bioinformatics. 20(14):2317-9
- Hugenholtz P, Huber T. Chimeric 16S rDNA sequences of diverse origin are accumulating in the public databases. (2003) *Int J Syst Evol Microbiol.* 53 (Pt 1):289-93
- Francesco Imperi,^{1,2} Giulia Caneva,¹ Laura Cancellieri,¹ Maria A. Ricci,³ Armida Sodo³ and Paolo Visca^{1,2*} The bacterial aetiology of rosy discoloration of ancient wall paintings
- Jurado v., Porca E., Pastrana M.P., Cuezva S., Fernandez-Cortes A., Saiz-Jimenez C., (2010) Microbiological study of bulls of indulgence of the 15th–16th centuries *Science of the Total Environment* 408, 3711–3715

- Koestler RJ, Koestler VH, Charola AE, and Nieto-Fernandez FE. (2003) Art, biology, and conservation: biodeterioration of works of art. New York, NY: The Metropolitan Museum of Art.
- 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 .
- Kavroulakis N, Ntougias S. Bacterial and β -proteobacterial diversity in *Olea europaea* var. *mastoidis*- and *O. europaea* var. *koroneiki*-generated olive mill wastewaters: Influence of cultivation and harvesting practice on bacterial community structure (2011) *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27 (1), pp.57-66
- Kormas KA, Vardaka E, Moustaka-Gouni M, Kontoyanni V, Petridou E, Gkelis S, Neofitou C. Molecular detection of potentially toxic cyanobacteria and their associated bacteria in lake water column and sediment (2010) *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26 (8), pp.1473-1482
- Ludwig, W. and K.H. Schleifer. 1994. Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. *FEMS Microbiol. Rev.* 15: 155-173.
- Márcia M.C.N. Soares; Roberto da Silva; Eleni Gomes Screening of bacterial strains for pectinolytic activity: characterization of the polygalacturonase produced by *Bacillus* sp (August 26, 1999)
- Marta Cristina Teixeira Duarte^{1*}; Ana Carolina Alcazar Pellegrino¹; Edilberto Princi Portugal¹; Alexandre Nunes Ponezi¹; Telma Teixeira Franco “characterization of alkaline xylanases from *Bacillus pumilus*”
- McNamara C.J., Mitchell R., (2005) Microbial deterioration of historic stone *Front Ecol Environ*; 3(8): 445–451
- McNamara, C. J., Breuker, M., Helms, M., Perry, T. D., & Mitchell, R. (2004). Biodeterioration of Incalac used for the protection of bronze monuments. *Journal of Cultural Heritage*, 5, 361–364

- Michaelsen, A., Pinae, G., Montanari, M. and Pinzari, F. (2009), “Biodeterioration and Restoration of a 16th-century book using a combination of conventional and molecular techniques: a case study”, *International Biodeterioration and Biodegradation*, Vol. 63, pp. 161-8.
- Montemartini Corte, A., A. Ferroni, and V. S. Salvo. (2003) Isolation of fungal species from test samples and maps damaged by foxing, and correlation between these species and the environment. *International Biodeterioration and Biodegradation* 51(3): 167-73.
- Muyzer, G., E.C. de Waal and A.G. Uitterlinden. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:695-700.
- Muyzer, G., E.C. de Waal and A.G. Uitterlinden. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:695-700.
- Pinzari, F., Pasquariello, G., De Mico, A., (2006) Biodeterioration of paper: a SEM study of fungal spoilage reproduced under controlled conditions. *Macromolecular Symposia* 238, 57–66.
- Katrin Ripka Wien, Dezember 2005 Identification of microorganisms on stone and mural paintings using molecular methods
- Piñar, G.; Gurtner, C.; Lubitz, W.; Rölleke, S. (2001a). Identification of *Archaea* in 55 objects of art by DGGE analysis and shot gun cloning. *Methods in Enzymology* **336**, 356-366.61.
- Piñar, G.; Saiz-Jimenez, C.; Schabereiter-Gurtner, C.; Blanco-Valera, **M.T.**; Lubitz, W. and Rölleke, S. (2001b). Archeal communities in two disparate deteriorated ancient wall paintings: detection, identification and temporal monitoring by denaturing gradient gel electrophoresis. *FEMS Microbiology Ecology* **37** (2001) 45-54
- Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, Lesniewski RA, Oakley BB, Parks DH, Robinson CJ, Sahl JW, Stres B, Thallinger

- GG, Van Horn DJ, Weber CF. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol.* 2009 Dec;75(23):7537-41
- Rivas R;García-Fraile P;Mateos PF;Martínez-Molina E;Velázquez E;(2006) *Paenibacillus cellulosilyticus* sp. nov., a cellulolytic and xylanolytic bacterium isolated from the bract phyllosphere of *Phoenix dactylifera*
 - **Rölleke, S.(1996)** Molekularbiologischer Nachweis von Eubakterien und Archaea in mittelalterlichen Wandgemälden, Dissertation, Vienna 1996
 - Rölleke, 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. *International Biodeterioration and Biodegradation* **41**, 85-92.
 - Rose A.H., (1981) *Microbial Biodeterioration*. Academic Press, London
 - Sand W and Bock E. (1991) Biodeterioration of mineral materials by microorganisms – biogenic sulfuric and nitric acid corrosion of concrete and natural stone. *Geomicrobiol J* 9: 129–38..
 - Schabereiter-Gurtner, C.; Piñar, G.; Vybiral, D.; Lubitz, W.; Rölleke, S. (2001b).Rubrobacter related bacteria associated with rosy discoloration of masonry and lime wall paintings. *Arch.Microbiol.* 176:347-354
 - Siddikee MA, Chauhan PS, Anandham R, Han GH, Sa T Isolation, (2010) characterization, and use for plant growth promotion under salt stress, of ACC deaminase-producing halotolerant bacteria derived from coastal soil.
 - Ward, D.M., R. Weller and M.M. Bateson. 1990. 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. *Nature.* 345:63-65
 - Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. (1991) *J Bacteriol.* 173(2):697-703
 - Whitman WB, Coleman DC, and Wiebe WJ., (1998) Prokaryotes: the unseen majority. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 6578–83.

- Woese CR. (1994) There must be a prokaryote somewhere: microbiology's search for itself. *Microbiol Rev* 58: 1–9.