



"Αφαίρεση βιολογικών επικαθίσεων με χρήση laser και αξιολόγηση της αποτελεσματικότητάς της μέσω φασματοσκοπίας φθορισμού επαγόμενου από LED (LED-induced fluorescence)"

"Laser-assisted removal of stone biodeterioration and evaluation of its effectiveness by LEDinduced fluorescence spectroscopy"

Νεφέλη Σταμούλη

Ph5295

Επιβλέπουσα: Δρ. Παρασκευή Πουλή

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

Ι. Ρακιτζής Πέτρος

ΙΙ. Δημήτριος Άγγλος

ΙΙΙ. Πέτρος Σαμαρτζής

# Περιεχόμενα

Περιεχόμενα	2
Ευχαριστίες	4
Περίληψη	5
Abstract	6
Εισαγωγή	7
Θεωρητικό υπόβαθρο	8
Κεφάλαιο 1	8
1.1 Βιολογικές επικαθίσεις στα μνημεία πολιτιστικής κληρονομιάς	8
1.2 Σχηματισμός βιοφίλμ (biofilm)	8
1.3 Είδη μικροοργανισμών	9
1.4 Περιβαλλοντικές συνθήκες βιοδιάβρωσης	11
1.5 Είδη Φθοράς	
Κεφάλαιο 2	13
Κβαντομηχανικές έννοιες	13
2.1 Φθορισμός	14
2.2 Κβαντική Απόδοση Φθορισμού	17
2.3 Καμπύλη Επαγωγικού Φθορισμού	
2.4 Απόσβεση Φθορισμού	19
2.5 Φθορισμός χρωστικών των επικαθίσεων	20
2.6 Διαβροχή φθοροφόρων	25
2.7 Τεχνικές LIF και LED-IF για την ανίχνευση φθοροφόρων	26
Κεφάλαιο 3	27
3.1 Lasers και Πολιτιστική Κληρονομιά	27
3.2 Φωτοαποδόμηση	27
3.3 Πυκνότητα Ενέργειας (Fluence)	28
3.4 Ρόλος του νερού στην φωτοαποδόμηση	
Υλικά και Μέθοδοι	31
Αντικείμενα Μελέτης	
Πειραματική Διάταξη	32
Πειραματική Διαδικασία	

Αποτελέσματα και Συζήτηση
Μελέτη οργανισμού-μοντέλου38
Μελέτη λίθου εποικισμένου με λειχήνες40
Μελέτη φθορισμού background και ανάλυση Raman41
Αξιολόγηση βιοδιάβρωσης μέσω της αναλυτικής τεχνικής φθορισμού επαγόμενου από πηγή LED (LED – IF)43
Μηχανικός καθαρισμός με νυστέρι52
Φάσματα LED – IF από ουσίες που πιθανό να περιέχονται στην προετοιμασία της τοιχογραφίας. 53
Συμπεράσματα και Μελλοντικές Μελέτες54
Βιβλιογραφία56
Παραρτήματα60
Παράρτημα Ι60
Υπολογισμός Πυκνότητας Ενέργειας60
Παράρτημα ΙΙ61
Προσαρμογή μοντέλου fitting στα φάσματα LED – IF61

# Ευχαριστίες

Πρώτα απ' όλα θα ήθελα να ευχαριστήσω την Δρ. Παρασκευή Πουλή για την καθοδήγηση της αλλά και για την εμπιστοσύνη της στις δυνατότητές μου. Πολύτιμη ήταν η βοήθεια της Δρ. Αναστασίας Γιακουμάκη, η οποία με καθοδήγησε στα πρώτα μου βήματα. Εξίσου σημαντικές ήταν οι συζητήσεις με την κ. Κρυσταλλία Μελεσανάκη καθ' όλη τη διάρκεια των πειραμάτων, καθώς και η επιμονή της στην λεπτομέρεια. Στη συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. Victor Pinon για την πολύτιμη βοήθειά του στην ανάλυση των δεδομένων και στην επίλυση προβλημάτων που προέκυψαν στην πορεία της εκπόνησης της παρούσας εργασίας. Θα ήθελα να ευχαριστήσω ακόμη τους Δρ. Άγγελο Φιλιππίδη, Δρ. Παναγιώτη Σιώζο, Δρ. Όλγα Κοκκινάκη, Δρ. Κώστα Χατζηγιαννάκη καθώς και Εύα Δημητρουλάκη και Μαριλένα Κωνσταντίνου για τις πολύτιμες συμβουλές και το ευχάριστο κλίμα που δημιούργησαν. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους καθηγητές του Φυσικού, Δρ. Πέτρο Ρακιτζή, και του χημικού Δρ. Δημήτριο Άγγλο και τον Ερευνητή του ΙΗΔΛ-ΙΤΕ Δρ. Πέτρο Σαμαρτζή που αποτέλεσαν την τριμελή εξεταστική επιτροπή συνέβαλαν με τις επιστημονικές τους γνώσεις.

Είμαι ευγνώμων για την συναισθηματική υποστήριξη και από την οικογένεια μου και τους φίλους μου. Έδειξαν ειλικρινές ενδιαφέρον το οποίο ήταν πολύ σημαντικό για εμένα.

# Περίληψη

Η παρούσα εργασία αποτελεί μελέτη της διαδικασίας καθαρισμού με laser για την αφαίρεση βιοδιάβρωσης από την επιφάνειας τοιχογραφίας. Συγκεκριμένα, οι δοκιμές καθαρισμού έλαβαν χώρα σε θραύσμα τοιχογραφίας από εκκλησία της Κύπρου. Για την ανίχνευση των βιολογικών στοιχείων στην επιφάνεια του θραύσματος έγινε χρήση φορητής διάταξης που επάγει τον φθορισμό τους μέσω πηγής LED. Τα φάσματα φθορισμού LED – IF μπόρεσαν να δώσουν ημιποσοτική πληροφορία για την παρουσία των φθοροφόρων πριν τον καθαρισμό. Διερευνήθηκαν οι πειραματικές συνθήκες για τη λήψη του φάσματος, λαμβάνοντας υπόψη τόσο τις πηγές LED (440 nm και 375 nm) όσο και τις μετρήσεις σε στεγνές και νωπές επιφάνειες. Αυτές οι προκαταρκτικές μελέτες αποσκοπούσαν στον προσδιορισμό των βέλτιστων συνθηκών που εξισορροπούν τη σταθερότητα και την αντικειμενικότητα των μετρήσεων. Ο φθορισμός, που είναι μια δυναμική διαδικασία που επηρεάζεται από τους φωτοσυνθετικούς οργανισμούς που προσαρμόζονται στις εξωτερικές συνθήκες, δημιουργεί προκλήσεις στην ποσοτικοποίηση. Τα πειράματα καθαρισμού με laser πραγματοποιήθηκαν με χρήση υπέρυθρου (1064 nm), ορατού μήκους κύματος (532 nm) καθώς και του συνδυασμού τους. Η αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας βασίστηκε στο λόγο R ο οποίος συνυπολογίζει τη συνεισφορά του σήματος φθορισμού από τη γλωροφύλλη και το υπόστρωμα μετά τον καθαρισμό. Γι' αυτό τον υπολογισμό έγινε χρήση της γλώσσας προγραμματισμού Python με στόχο την προσαρμογή ενός μοντέλου φθορισμού πολλαπλών κορυφών για την απομόνωση των σημάτων από γλωροφύλλη και το υπόστρωμα. Ο λόγος R επέτρεψε τη σύγκριση της αποτελεσματικότητας του καθαρισμού σε διαφορετικά σημεία, κατηγοριοποιώντας τα σε αποτελεσματικά, μερικώς αποτελεσματικά και αναποτελεσματικά ως προς την αφαίρεση των βιολογικών επικαθίσεων.

# Abstract

The present work is a study of the laser cleaning methodology of a biodeteriorated mural surface. The cleaning tests took place on a mural fragment from a church located in Cyprus. In order to detect the biological components on the fragment's surface, a portable device that induces fluorescence through an LED source was used. The fluorescence spectra (LED – IF) were able to provide semi-quantitative information on the presence of fluorophores before cleaning. The experimental conditions for spectrum acquisition were explored, considering both LED sources (440 nm and 375 nm) and measurements on dry and wet surfaces. These preliminary studies aimed to determine optimal conditions that balance stability and objectivity in measurements. Fluorescence, being a dynamic process influenced by photosynthetic organisms adapting to external conditions, posed challenges in quantification.

Laser cleaning experiments were conducted using infrared (1064 nm), visible (532 nm), and combined wavelengths. The evaluation of cleaning effectiveness was based on the development of the R ratio, incorporating fluorescence signals from chlorophyll and the substrate after cleaning. Python programming language was utilized for data processing, fitting a multi-peak fluorescence model to isolate signal values from chlorophyll and the substrate. The R ratio allowed for the comparison of cleaning efficiency across different points, categorizing them into effective, partially effective, and ineffective cleaning outcomes.

# Εισαγωγή

Η αφαίρεση ανεπιθύμητων στρωμάτων από έργα τέχνης ή αργαιολογικά αντικείμενα μέσω της χρήσης laser έχει αποδειχθεί ασφαλής, ακριβής (λόγω επιλεκτικής απορρόφησης της ακτινοβολίας) αλλά και αρκετές φορές αυτοπεριοριζόμενη διαδικασία. Επιπρόσθετα, η παραγωγή παραπροϊόντων, σε αντίθεση με κάποιες χημικές τεχνικές καθαρισμού, είναι εξαιρετικά μικρή. Τις τελευταίες δεκαετίες τα laser γρησιμοποιούνται για την αφαίρεση πληθώρας προβλημάτων συντήρησης όπως μαύρης κρούστας από μαρμάρινες επιφάνειες, βιοπατίνας από λίθινα υποστρώματα αλλά ακόμη και βερνικιών από πίνακες ζωγραφικής. Η συγκεκριμένη εργασία ερευνά τις συνθήκες αφαίρεσης βιοπατίνας από τοιχογραφία. Η λογική βασίζεται σε γρήση συγκεκριμένων μήκων κύματος laser που αλληλεπιδρούν και απορροφούνται ισχυρά από βιολογικές επικαθίσεις, που έχουν σχηματιστεί με το χρόνο σε ιστορικά μνημεία, αλλά δεν αλληλεπιδρούν τόσο με το λίθινο υπόστρωμα μπορεί να οδηγήσει σε αυτοπεριοριζόμενο καθαρισμό. Για τον έλεγχο ύπαρξης και προσδιορισμό των μικροοργανισμών που εποικίζουν τη λίθινη επιφάνεια αλλά και για την αξιολόγηση του καθαρισμού αξιοποιείται το φαινόμενο του φθορισμού επαγόμενου από LED (LED – Induced Fluorescence ή LED – IF). Κάθε μικροοργανισμός που περιέχει ενώσεις όπως η χλωροφύλλη, η φυκοκυανίνη κ.λ.π απορροφώντας φως στο κατάλληλο μήκος κύματος διεγείρεται και φθορίζει σε μεγαλύτερα μήκη κύματος καθώς αποδιεγείρεται. Η ανίχνευση του σήματος φθορισμού είναι και η ένδειξη ότι υπάρχουν μικροοργανισμοί. Ακόμη, αξιοσημείωτο είναι ότι επειδή οι μικροοργανισμοί απορροφούν και εκπέμπουν σε διαφορετικά μήκη κύματος μπορεί να γίνει διάκριση και προσδιορισμός τους.

Ο σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας ήταν η μελέτη παραμέτρων του laser που οδηγούν σε αφαίρεση των βιολογικών επικαθίσεων καθώς και η ανάπτυξη ενός λόγου R με στόχο την αξιολόγηση του καθαρισμού. Ο λόγος R βάσει των φασμάτων φθορισμού μετά τον καθαρισμό θα υπολογίζει πόσο αποτελεσματικός είναι ο καθαρισμός στο εκάστοτε σημείο.

# Θεωρητικό υπόβαθρο

# Κεφάλαιο 1

# 1.1 Βιολογικές επικαθίσεις στα μνημεία πολιτιστικής κληρονομιάς

Η χλωρίδα, η πανίδα, οι μικροοργανισμοί και οι ρύποι μπορούν να προκαλέσουν φθορά στα μνημεία πολιτιστικής κληρονομιάς. Πιο συγκεκριμένα, οι μικροοργανισμοί που επικοίζουν τα υποστρώματα των έργων τέχνης είναι ικανοί να τα καταστρέψουν μέσω διαφόρων διεργασιών που θα αναλυθούν περαιτέρω στη συνέχεια. Η αλλοίωση που θα υποστούν εξαρτάται ιδιαίτερα και από το είδος του υποστρώματος αλλά και από τις περιβαλλοντικές συνθήκες που επικρατούν [1].

# 1.2 Σχηματισμός βιοφίλμ (biofilm)

Το πρώτο βήμα του εποικισμού μίας επιφάνειας είναι ο σχηματισμός του βιοφίλμ. Αρχικά δημιουργείται ένα στρώμα το οποίο περιέχει οργανικά μόρια (πολυσακχαρίτες και πρωτεΐνες) τα οποία συντελούν σε καλύτερες συνθήκες προσκόλλησης. Στη συνέχεια, πάνω σε αυτό το στρώμα ξεκινούν να προσκολλώνται μικροβιακά κύτταρα. Όταν οι δυνάμεις προσκόλλησης γίνουν ισχυρές τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται και σχηματίζουν αποικίες. Από αυτές εκκρίνονται εξωκυτταρικές πολυμερείς ουσίες (EPS) που δημιουργούν ένα στρώμα απομόνωσης από το περιβάλλον. Το ώριμο πλέον στρώμα μαζί με τις αποικίες ονομάζεται βιοφίλμ και αντέχει σε μηχανικές φθορές με σκοπό να μην αποκολληθούν τα μικρόβια από το υπόστρωμα. Η απόσπαση κάποιων μικροβίων από το βιοφίλμ δημιουργεί νέες αποικίες και επεκτείνει το βιοφίλμ και σε άλλα σημεία του υποστρώματος.



Εικ. 1 – Στάδια ανάπτυξης βιοφίλμ $^{[2]}$ 

Οι εξωκυτταρικές πολυμερείς ουσίες ευθύνονται για την αύξηση της ποικιλίας και βιομάζας των βιοφίλμ αφού μπορούν κατά τη διάρκεια του σχηματισμού να προσκολληθούν κι άλλα είδη μικροοργανισμών. Γενικότερα, οι επιφάνειες των μνημείων πολιτιστικής κληρονομιάς περιέχουν ελάχιστα θρεπτικά συστατικά προς εκμετάλλευση των μικροοργανισμών. Για να συντηρηθούν επιλέγουν να μειώσουν το ρυθμό κυτταρικής αναπνοής χωρίς να επηρεαστούν όμως οι κύριες μεταβολικές τους διεργασίες.<sup>[3]</sup>

#### 1.3 Είδη μικροοργανισμών

Η συγκεκριμένη εργασία βασίζεται σε μικροοργανισμούς που είναι ικανοί να ευδοκιμήσουν σε λίθινα υποστρώματα αλλά ακόμα και τοιχογραφίες, γνωστούς και ως λιθοβιοτικούς. Οι λιθοβιοτικοί οργανισμοί μπορούν να εξαπλωθούν με διάφορους τρόπους στο αντικείμενο που προσβάλλουν. Αν παραμένουν στην επιφάνεια του υποστρώματος τότε ονομάζονται επιλιθικοί. Διαφορετικά, ονομάζονται ενδολιθικοί και εποικίζουν το λίθο στο εσωτερικό του δημιουργώντας ανεπανόρθωτη ζημιά εφόσον αλλοιώνουν ανεπιστρεπτί την επιφάνειά του. Οι ενδολιθικοί μικροοργανισμοί διακρίνονται σε χασμολιθικούς, κρυπτοενδολιθικούς και ευενδολιθικούς. Οι χασμολιθικοί ευδοκιμούν σε υπάρχουσες ρωγμές του λίθου, οι κρυπτοενδολιθικοί σε πόρους του και οι ευενδολιθικοί δημιουργούν πτυχώσεις στο σχήμα τους καθώς διέρχονται στα εσωτερικό του λίθου. <sup>[3]</sup>

Αναλόγως αν οι μικροοργανισμοί μπορούν να παράξουν την τροφή τους ή όχι διακρίνονται σε αυτότροφους και ετερότροφους αντίστοιχα. Οι μικροοργανισμοί που είναι ικανοί να φωτοσυνθέσουν είναι αυτότροφοι και μάλιστα είναι οι πρώτοι που προσβάλλουν το λίθο δημιουργώντας το βιοφίλμ. Ονομάζονται φωτοαυτότροφοι και σε αυτούς ανήκουν τα φύκη και τα κυανοβακτήρια. Οι φωτοαυτότροφοι οργανισμοί αφού αποικίσουν το λίθινο υπόστρωμα εκκρίνουν ουσίες με τις οποίες τρέφονται ετερότροφοι οργανισμοί, οι οποίοι αναπτύσσονται σε δεύτερη φάση. Μια σημαντική κατηγορία των ετερότροφων οργανισμών που συναντώνται συχνά σε περιβάλλοντα υψηλής υγρασίας όπως σε τοιχογραφίες εκκλησιών είναι οι χημειοοργανότροφοι οργανισμοί. Η συγκεκριμένη κατηγορία οξειδώνει οργανικές ενώσεις όπως τα παραπροϊόντα φωτοαυτότροφων οργανισμών ή ακόμα και νεκρό οργανικό υλικό για να επιβιώσει.

Ακολουθεί και η ταξινομική ανάλυση των ειδών αφού στην πορεία αυτή η ορολογία θα χρησιμοποιείται.

#### Φύκη

9

Τα φύκη είναι πολυκυτταρικές ή μονοκύτταρες δομές ευκαρυωτικών κυττάρων ικανές να φωτοσυνθέσουν συλλέγοντας φως μέσω φωτοσυνθετικών χρωστικών όπως η χλωροφύλλη και τα καροτενοειδή στο εσωτερικό των χλωροπλαστών.<sup>[4]</sup>

#### Βακτήρια

Τα βακτήρια είναι μονοκύτταροι προκαρυωτικοί οργανισμοί και χωρίζονται σε φωτοαυτότροφα και ετερότροφα. Ιδιαίτερα σημαντικά είναι τα κυανοβακτήρια τα οποία συναντώνται συχνά σε αντικείμενα πολιτιστικής κληρονομιάς με γεωγραφικά πλάτη κοντά στον ισημερινό. <sup>[5]</sup>

#### Μύκητες

Οι μύκητες πολυκυτταρικές ή μονοκύτταρες δομές ευκαρυωτικών κυττάρων με άκαμπτα κυτταρικά τοιχώματα τα οποία περιέχουν χιτίνη. <sup>[4]</sup> Ως χημειοοργανοτροφοι οργανισμοί, τρέφονται με οργανική ύλη. Αναπτύσσονται είτε σε νηματώδεις δομές (υφές) που σχηματίζουν μυκήλιο είτε σε σφαιροειδή ή ωοειδή κύτταρα (ζύμες). <sup>[6]</sup>

#### Λειχήνες

Οι λειχήνες είναι συμβιωτική σύμπραξη μεταξύ ενός φωτοβιώτη και ενός μυκοβιώτη οργανισμού. Φωτοβιώτες είναι οι φωτοσυνθετικοί οργανισμοί, φύκη και κυανοβακτήρια ενώ μυκοβιώτες οι μύκητες. Για να σχηματιστεί ο λειχήνας συνυπάρχουν μύκητες μαζί με άλγη και/ή κυανοβακτήρια και η σύμπραξη αυτή έχει πολλά πλεονεκτήματα για την επιβίωση τους σε σχέση με το πώς αναπτύσσονται ανεξάρτητα. Ο μυκοβιώτης εκμεταλλεύεται τα θρεπτικά συστατικά που παράγει ο φωτοβιώτης και εποικίζει περεταίρω το υπόστρωμα που προσβάλλει.

Οι λειχήνες συνήθως σχηματίζουν στρωματοποιημένες, φυλλώδεις ή θαμνώδεις δομές (θάλλους/thalli). Αξίζει να σημειωθεί ότι διαθέτουν και ένα εξωτερικό προστατευτικό περίβλημα (cortex) που καλύπτει τους φωτοσυνθετικούς οργανισμούς (Εικ. 2). Πολλά είδη λειχήνων εκτός από το φωτοβιώτη και το μυκοβιώτη αποτελούνται και από ένα είδος ζύμης η οποία είναι συνυφασμένη μέσα στο προστατευτικό περίβλημα. <sup>[8]</sup> Οι φυλλώδεις λειχήνες αναπτύσσουν ριζίδια (rhizines) ώστε να προσκολλώνται καλύτερα στο υπόστρωμα, ενώ οι στρωματώδεις χρησιμοποιούν τις νηματώδεις υφές (medulla) από τους μύκητες για την σταθεροποίηση τους. <sup>[9]</sup> Τέλος, τα κυανοβακτήρια συνήθως βρίσκονται συσσωρευμένα σε ειδικές δομές εντός εσωτερικών ή επιφανειακών στρωμάτων του θαλλού (chephalodia). <sup>[10]</sup>



Εικ. 2 – Διάγραμμα τομής του θαλλού λειχήνα της οικογενείας Peltigera <sup>[11]</sup>

## Βρύα

Τα βρύα είναι φυτά με μη συμβατικό ριζικό σύστημα (ριζοειδή). Ευδοκιμούν σε κλίματα με υψηλή σχετική υγρασία και συγκρατούν το νερό με απόρροια τη φθορά του υποστρώματος. Αφαιρούνται εύκολα από τα υποστρώματα σε αντίθεση με τους λειχήνες.<sup>[44]</sup>





Εικ. 3 – α) Βρύα στο Βοτανικό Κήπο του Portici (αριστερά) <sup>[12]</sup> και β) λειχήνα Lobothallia radiosa (δεξιά) <sup>[4]</sup>

### 1.4 Περιβαλλοντικές συνθήκες βιοδιάβρωσης

Οι συνθήκες θερμοκρασίας, φωτός, υγρασίας και η διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών επηρεάζουν το ποσοστό εποικισμού μιας επιφάνειας. Η υγρασία λειτουργεί ως βοηθητικός παράγοντας στο σχηματισμό των βιοφίλμ, στον πολλαπλασιασμό των εποικιστών και άρα σε

περεταίρω φυσικές και χημικές φθορές. Τα φυσικά και τα χημικά χαρακτηριστικά των υλικών κατασκευής (σκληρότητα, πορώδες, επιφανειακό pH, χημική σύσταση) παίζουν επίσης ρόλο. Λόγω αυτής της περιπλοκότητας, ορίστηκε από τον Guillette η βιοδεκτικότητα ενός υλικού ως η ικανότητα του να κατακτηθεί από έναν ή περισσότερους ζωντανούς οργανισμούς. Για παράδειγμα, ένα αρκετά πορώδες υλικό είναι ικανό να αποθηκεύει νερό συντελώντας στην εύκολη ανάπτυξη μικροοργανισμών και συνεπώς έχει υψηλό δείκτη βιοδεκτικότητας. <sup>[12]</sup>

#### 1.5 Είδη Φθοράς

Η φθορά των αντικειμένων πολιτιστικής κληρονομιάς που προσβάλλονται από βιολογικές επικαθίσεις μπορεί να είναι βιογεωφυσική, βιογεωχημική ή/και απλά αισθητική. <sup>[12]</sup>

Στη βιογεωφυσική φθορά συγκαταλέγονται οι δραστηριότητες των μικροβίων, και των εξωτερικών συνθηκών που τις επηρεάζουν, κατά τις οποίες συμβαίνουν μηχανικές αλλαγές στη δομή των υλικών που απαρτίζουν το εκάστοτε αντικείμενο. Οι εποικιστές και τα βιοφίλμ, μέσω της υγροθερμικής διαστολής τους ασκούν τάσεις και δημιουργούν φυσικές αλλοιώσεις στο υπόστρωμα όπως η αποκόλληση των επιφανειακών στρώσεων του υποστρώματος, η δημιουργία περιοχών με διαφορετική σκλήρυνση και η φθορά των ορυκτών του υποστρώματος. Αυτές οι επιδράσεις διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στη φυσική υποβάθμιση των υλικών, επηρεάζοντας τη συνολική δομική τους ακεραιότητα και σταθερότητα.

Η βιοχημική φθορά αναφέρεται σε χημικές μεταβολές που προκαλούνται από βιολογικούς παράγοντες και οδηγούν στη διάβρωση και στην αλλαγή της χημικής δομής των ανόργανων υλικών. Η βιογενής απελευθέρωση διαβρωτικών οξέων ή αλλιώς βιοδιάβρωση είναι ένας από τους σημαντικούς μηχανισμούς βιοχημικής φθοράς. Ακόμη διάφορα βακτήρια παράγουν νιτρικό οξύ το οποίο διαλυτοποιεί το ασβέστιο που περιέχεται στα δομικά υλικά των μνημείων πολιτιστικής κληρονομιάς. Οι μύκητες και οι λειχήνες μέσω του μεταβολισμού τους παράγουν οργανικά οξέα ικανά να διαλυτοποιήσουν και να χηλικοποιήσουν στοιχεία όπως το κάλιο, το ασβέστιο και ο σίδηρος ή και οξέα ικανά να επιταχύνουν τη διαδικασία της διάβρωσης. Αυτές οι βιογεωχημικές αλληλεπιδράσεις οδηγούν σε μια πολύπλοκη αλληλεπίδραση αντιδράσεων που συμβάλλουν σημαντικά στη συνολική φθορά των υλικών.

Η αισθητική υποβάθμιση περιλαμβάνει αλλαγές στην οπτική εμφάνιση των υλικών που επηρεάζονται από βιολογικές χρωστικές και άλλες ουσίες. Ο βιογενής αποχρωματισμός, που οφείλεται σε χρωστικές ουσίες όπως η χλωροφύλλη, η φαιοφυτίνη και άλλες, συμβάλλει στην αισθητική υποβάθμιση των έργων τέχνης. Μπορεί όμως να προκληθεί και αισθητική φθορά σε δεύτερο στάδιο διότι οι σκουρόχρωμες κρούστες που σχηματίζονται στις επιφάνειες επιταχύνουν την αποδυνάμωση της δομικής μήτρας του υλικού, επηρεάζοντας την ικανότητα απορρόφησης θερμότητας και διατήρησης της υγρασίας.<sup>[13]</sup>

## Κεφάλαιο 2

#### Κβαντομηχανικές έννοιες

Στην παρούσα εργασία μείζον ζήτημα είναι η κατανόηση του φθορισμού ουσιών καθώς και της επίδρασης των laser σε αυτές τις ουσίες. Η αλληλεπίδραση ύλης – φωτός εξηγείται μέσω της κατανόησης των μοριακών τροχιακών. Τα ηλεκτρόνια που ανήκουν σε κάποιο μοριακό τροχιακά απορροφούν φωτόνια κατάλληλης ενέργειας και διεγείρονται σε ένα υψηλότερο ενεργειακά μοριακό τροχιακό. Η μέθοδος LCAO (Linear Combination of Atomic Orbitals) προσεγγίζει το μοριακό τροχιακό ως ένα γραμμικό συνδυασμό των ατομικών τροχιακών που απαρτίζουν τα άτομα του εκάστοτε μορίου. Τα ατομικά τροχιακά εκφράζουν την πιθανότητας εύρεσης του ηλεκτρονίου στο χώρο που περιβάλλει το άτομο και προκύπτουν από τη λύση της εξίσωσης Schrödinger.<sup>[14]</sup> Τα μοριακά τροχιακά, αναλόγως την αλληλοεπικάλυψη των ατομικών τροχιακών που συνδυάζονται, χωρίζονται σε τροχιακά τύπου σ, π και n. Στο διατομικό μοντέλο συναντώνται τα πρώτα δύο. Τα τροχιακά τύπου π προκύπτουν από πλευρική επικάλυψη ατομικών τροχιακών σε αντίθεση με τα τροχιακά τύπου σ που εμφανίζουν κυλινδρική συμμετρία ως προς το διαπυρηνικό άξονα. Ακόμη, τα ηλεκτρόνια που ανήκουν σε τροχιακό σ, ή αλλιώς ηλεκτρόνια π.

Τα μοριακά τροχιακά που προκύπτουν από το γραμμικό συνδυασμό χωρίζονται σε δεσμικά και αντί-δεσμικά αναλόγως αν συνεισφέρουν στη δημιουργία ή μη του δεσμού. Προσεγγιστικά, σε ένα δεσμικό τροχιακό το νέφος ηλεκτρονιακής πιθανότητας βρίσκεται ανάμεσα στους πυρήνες, ενώ σε ένα αντιδεσμικό καταλαμβάνει το χώρο εκτός της διαπυρηνικής περιοχής. <sup>[16]</sup>

13

#### 2.1 Φθορισμός

Ο φθορισμός, ένα φαινόμενο που περιλαμβάνει την απορρόφηση και την επακόλουθη εκπομπή φωτός από τα μόρια, συνδέεται στενά με τις ηλεκτρονιακές μεταβάσεις εντός των μοριακών τροχιακών. Όταν ένα μόριο απορροφά φως, τα ηλεκτρόνια διεγείρονται από χαμηλότερα ενεργειακά επίπεδα, συνήθως από δεσμικά τροχιακά, σε υψηλότερα επίπεδα είτε του ίδιου τροχιακού είτε του αντιδεσμικού τροχιακού. Η μετάβαση των ηλεκτρονίων μεταξύ αυτών των τροχιακών, συνοδεύεται από μεταβολές στην κατανομή του ηλεκτρονιακού νέφους. Στα δεσμικά τροχιακά, το νέφος πιθανότητας ηλεκτρονίων συγκεντρώνεται μεταξύ των πυρήνων, ευνοώντας τη σταθερότητα, ενώ στα αντιδεσμικά τροχιακά, εκτείνεται εκτός της διαπυρηνικής περιοχής, με αποτέλεσμα λιγότερη σταθερότητα. Κατά την επιστροφή του διεγερμένου ηλεκτρονίου στην αρχική του κατάσταση, η πλεονάζουσα ενέργεια εκπέμπεται ως φως. Τα μήκη κύματος του εκπεμπόμενου φωτός είναι ενδεικτικά των συγκεκριμένων ηλεκτρονιακών μεταβάσεων και των ενεργειακών διαφορών που εμπλέκονται. Αυτή η αλληλεπίδραση μεταξύ μοριακών τροχιακών και ηλεκτρονιακών μεταβάσεων αποτελεί τη βάση του φθορισμού, παρέχοντας ένα πολύτιμο εργαλείο για τη διερεύνηση μοριακών δομών.

Εν γένη, η εκπομπή φωτός οποιασδήποτε ουσίας σε διεγερμένη ηλεκτρονιακή κατάσταση ή αλλιώς φωταύγεια, χωρίζεται σε δύο κατηγορίες. Ο φθορισμός, που θα μας απασχολήσει ιδιαίτερα στη συγκεκριμένη εργασία, είναι η πρώτη κατηγορία και ο φωσφορισμός η δεύτερη. Όταν το ηλεκτρόνιο στη διεγερμένη κατάσταση είναι συζευγμένο με το ηλεκτρόνιο της θεμελιώδους με αντίθετο σπιν, τότε η μετάβασή του στη θεμελιώδη επιτρέπεται και συμβαίνει ακαριαία σε χρόνο 10<sup>8</sup> s<sup>-1</sup>.<sup>[14]</sup> Τα παραπάνω αναπαρίστανται εύκολα με ένα διάγραμμα Jablonski.



Εικ. 4 – Διάγραμμα Jablonski

Οι μονές ηλεκτρονιακές καταστάσεις της θεμελιώδους, πρώτης και δεύτερης διεγερμένης αναπαρίστανται με S<sub>0</sub>, S<sub>1</sub> και S<sub>2</sub> αντίστοιχα ενώ με 0,1,2 κλπ. οι δονητικές καταστάσεις. Αρχικά, λόγω της απορρόφησης ενός φωτονίου κατάλληλης ενέργειας (hv<sub>A</sub>), το ηλεκτρόνιο της S<sub>0</sub> διεγείρεται σε μία υψηλότερη δονητική κατάσταση της S<sub>1</sub> ή S<sub>2</sub>. Συνήθως ακολουθεί η εσωτερική μετατροπή κατά την οποία το ηλεκτρόνιο φτάνει στη χαμηλότερη δονητική κατάσταση της S<sub>1</sub> (μη ακτινοβολητική διαδικασία). Από εκεί, εκπέμπεται εν τέλει φωτόνιο χαμηλότερης ενέργειας (hv<sub>F</sub>) και το ηλεκτρόνιο αποδιεγείρεται στην θεμελιώδη κατάσταση. Το εκπεμπόμενο φωτόνιο έχει συνεπώς μεγαλύτερο μήκος κύματος λ<sub>F</sub> από το απορροφούμενο λ<sub>A</sub> και αυτή η διαφορά ονομάζεται Μετατόπιση Stokes. Υπάρχει περίπτωση το διεγερμένο ηλεκτρόνιο να επιστρέψει στη θεμελιώδη δίχως εκπομπή φωτονίου μέσω της θερμικής υποβάθμισης.

Οι ηλεκτρονιακές μεταβάσεις διέπονται από τους κανόνες επιλογής που προκύπτουν από την εξίσωση του Schrödinger. Μεταξύ δύο ενεργειακών επιπέδων, κατά τη μετάβαση η πολλαπλότητα M = 2S + 1, όπου S ο κβαντικός αριθμός του σπιν, πρέπει να είναι σταθερή. Ο συγκεκριμένος κανόνας απαγορεύει την μετάβαση από τριπλή (M = 3) σε μονή (M = 1) ηλεκτρονιακή κατάσταση. Όπως φαίνεται και από το διάγραμμα όμως, υπό κάποιες συνθήκες το διεγερμένο φωτόνιο μπορεί να αποδιεγερθεί από τριπλή διεγερμένη κατάσταση σε μονή θεμελιώδη εκπέμποντας ένα φωτόνιο ακόμα χαμηλότερης ενέργειας. Αυτό μπορεί να συμβεί διότι η τριπλή και η μονή διεγερμένη κατάσταση λόγω κάποιας αλληλοεπικάλυψης των καμπύλων δυναμικής τους ενέργειας επιτρέπουν στο μόριο να μεταπηδήσει από τη μονή στην τριπλή. Αυτή η διαδικασία ονομάζεται εσωτερική μεταπήδηση (Intersystem Crossing).<sup>[16]</sup> Επειδή

η αποδιέγερση στη θεμελιώδη μονή κατάσταση είναι απαγορευμένη ο ρυθμός αποδιέγερσης είναι αρκετά μεγαλύτερος ( $10^3$  to  $10^0$  s<sup>-1</sup>).



Λόγω της εσωτερικής μετατροπής, τα διεγερμένα μόρια συνήθως εκπέμπουν τα φωτόνια φθορισμού από την χαμηλότερη δονητική στάθμη της S<sub>1</sub>. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα το φάσμα φθορισμού μορφολογικά να είναι το ίδιο, ανεξαρτήτως από το μήκος κύματος διέγερσης του μορίου (Νόμος του Kasha). Μάλιστα, επειδή οι αποστάσεις των δονητικών σταθμών της S<sub>0</sub> και της S<sub>1</sub> είναι παρόμοιες, παρατηρείται μια συμμετρία μεταξύ του φάσματος απορρόφησης για την κορυφή διέγερσης από την S<sub>0</sub> στην S<sub>1</sub> και του φάσματος φθορισμού. (Νόμος Κατοπτρικής Εικόνας) <sup>[14]</sup>



Εικ. 6 – Φάσμα απορρόφησης (μπλε) και εκπομπής φθορισμού (κόκκινο) του περιλενιου (πάνω) και της κινίνης (κάτω).

Σημαντικό είναι να διευκρινιστεί ότι αρκετά μόρια δεν ακολουθούν ούτε τον Νόμο του Kasha ούτε τον Νόμο Κατοπτρικής Εικόνας.

#### 2.2 Κβαντική Απόδοση Φθορισμού

Ο πληθυσμός της διεγερμένης κατάστασης, αφού φτάσει στη χαμηλότερη δονητική κατάσταση της S<sub>1</sub>, μειώνεται με ρυθμό Γ λόγω της αποδιέγερσης των ηλεκτρονίων με εκπομπή φωτονίων φθορισμού και με ρυθμό k<sub>nr</sub> λόγω μη ακτινοβολητικής αποδιέγερσης στην S<sub>0</sub>.

Η κβαντική απόδοση φθορισμού μιας φθοροφόρας ουσίας ορίζεται ως το πηλίκο του πλήθους των εκπεμπόμενων φωτονίων προς το πλήθος των φωτονίων που απορροφήθηκαν από την ουσία.

$$Q = \frac{\Gamma}{\Gamma + k_{nr}}$$



Εικ. 7 – Διάγραμμα Jablonski με έμφαση στην έννοια της κβαντικής απόδοσης

#### 2.3 Καμπύλη Επαγωγικού Φθορισμού

Η φωτοσυνθετική διαδικασία εμπλέκει δύο συμπλέγματα πρωτεϊνών γνωστά ως φωτοσύστημα Ι και ΙΙ (PSI και PSII). Ο φθορισμός της Χλωροφύλλης (Chl α πιο συγκεκριμένα) που προέρχεται από το PSII ακολουθεί ένα μεταβαλλόμενο μοτίβο όταν εναλλάσσονται το φως με το σκοτάδι σε αντίθεση με το φθορισμό που προέρχεται από το PSI ο οποίος παραμένει σταθερός. Το δείγμα που μελετάται στη συγκεκριμένη εργασία βρίσκεται σε σκοτεινές συνθήκες όταν δεν ακτινοβολείται με φως. Κατά την μελέτη του ακτινοβολείται με φως που προκαλεί το φθορισμό της Χλωροφύλλης θα παρουσιαστεί στη συνέχεια, δεν είναι απολύτως σταθερή.

Η κβαντική απόδοση φθορισμού της Chl a μεταβάλλεται σε 2 φάσεις όταν παύει να βρίσκεται στο σκοτάδι. Η πρώτη φάση αύξησης διαρκεί λιγότερο από ένα δευτερόλεπτο ενώ η δεύτερη φάση ελάττωσης ολοκληρώνεται στην τάξη των λεπτών. Το φαινόμενο ονομάζεται Επαγωγικός Φθορισμός ή Φαινόμενο Kautsky.



Εικ. 8 – Καμπύλες επαγωγικού φθορισμού φύλλου μπιζελιού. Χρόνος – a) λογαριθμική κλίμακα και μη b). [18]

Παρατηρώντας μία τυπική καμπύλη επαγωγικού φθορισμού διακρίνουμε την γρήγορη φάση Ο-Ρ και την αργή Ρ-Τ. Μία σχετική σταθεροποίηση παρατηρείται στα 1-2 min. Η φύση αυτής της μεταβολής οφείλεται σε αποσβεστές που ο ίδιος φωτοσυνθετικός μηχανισμός περιέχει.

#### 2.4 Απόσβεση Φθορισμού

Η απόσβεση φθορισμού αναφέρεται στη μείωση της έντασης της εκπομπής φθορισμού από ένα φθοροφόρο και μπορεί να συμβεί μέσω διαφόρων διεργασιών όπως μοριακές αναδιατάξεις, μεταφορά ενέργειας, σχηματισμό συμπλόκων και απόσβεση λόγω κρούσεων. Κατά τη φωτοσύνθεση γίνεται απορρόφηση του φωτός από χρωστικές ουσίες, όπως η χλωροφύλλη, και ακολουθεί η μετατροπή αυτής της φωτεινής ενέργειας σε χημική ενέργεια. Οι φωτοαυτότροφοι μικροοργανισμοί που συναντώνται κατά την ανάπτυξη των βιοφίλμ πάνω στις λίθινες επιφάνειες φωτοσυνθέτουν και περιέχουν χρωστικές που φθορίζουν. Ο φθορισμός που εκπέμπεται από αυτές τις χρωστικές μπορεί να αποσβεστεί με διάφορους μηχανισμούς.

#### Μη Φωτοχημική Απόσβεση (Non-Photochemical Quenching)

Υπό συνθήκες υπερβολικού φωτισμού όπου η απορρόφηση του φωτός υπερβαίνει την ικανότητα της φωτοσύνθεσης ενεργοποιείται η μη φωτοχημική απόσβεση κατά την οποία η περίσσεια ενέργεια διαχέεται ως θερμότητα ή φθορισμός. Η διαδικασία αυτή εμπλέκει την απόσβεση του φθορισμού της χλωροφύλλης.<sup>[19]</sup>

# Μεταφορά Ενέργειας μέσω Ιδιοσυχνότητας (Resonance Energy Transfer)

Αναφέρεται στο μηχανισμό όπου η ενέργεια από μια διεγερμένη χρωστική ουσία μεταφέρεται σε μια γειτονική χρωστική ουσία, αποσβένοντας έτσι τον φθορισμό της πρώτης χρωστικής (δότης).

#### Ρίζες Οξυγόνου (ROS)

Όταν οι φωτοσυνθετικοί οργανισμοί υποβάλλονται σε στρες, η παραγωγή ROS μπορεί να αυξηθεί, οδηγώντας σε απόσβεση του φθορισμού. Οι ROS είναι γνωστό ότι προκαλούν οξειδωτικές βλάβες στις χρωστικές ουσίες και άρα αποσβένουν το φθορισμό τους.<sup>[20]</sup>

#### Κύκλος Ξανθοφυλλών

Σε συνθήκες υπερβολικού φωτός, η βιολαξανθίνη μετατρέπεται σε ζεαξανθίνη, μια διαδικασία που διευκολύνει στην απόσβεση της περίσσειας ενέργειας στη φωτοσυνθετική κεραία. Στην

ουσία η ζεαξανθίνη είναι πιθανότερο να πάρει την ενέργεια μιας διεγερμένης χλωροφύλλης από ότι η βιολαξανθίνη. Αποτέλεσμα αυτής της διαδικασίας είναι η μείωση του φθορισμού της χλωροφύλλης.<sup>[21][22]</sup>

Συμπερασματικά, η φύση έχει εξελίξει διάφορους μηχανισμούς για την προστασία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού, καθιστώντας το σήμα του φθορισμού εξαιρετικά ευαίσθητο στις μεταβαλλόμενες συνθήκες. Αυτό καθιστά προβληματική την προσπάθεια ποσοτικοποίησης του φθορισμού λόγω της ποικιλομορφίας των αλλαγών που μπορεί να προκύψουν.

## 2.5 Φθορισμός χρωστικών των επικαθίσεων

Η φωτοσυνθετική ικανότητα των φυκών και των κυανοβακτηρίων που συναντώνται στα μνημεία πολιτιστικής κληρονομιάς επιβάλλει την ύπαρξη χρωστικών εντός των κυττάρων τους με στόχο την απορρόφηση φωτός και τη σωστή διαχείρισή του. Στα φύκη συναντώνται οι χλωροφύλλες και τα καροτενοειδή ενώ στα κυανοβακτήρια οι φυκοχολίνες. Οι φωτοαυτότροφοι οργανισμοί περιέχουν και άλλες φθορίζουσες χρωστικές στο κομμάτι του μεταβολισμού τους όπως η ριβοφλαβίνη (βιταμίνη B2). Στα κυανοβακτήρια συναντώνται και οι χρωστικές, γνωστές ως φυκοχολίνες, οι οποίες περιέχουν την φυκοκυανίνη, την φυκοερυθρίνη και την αλλοφυκοκυανίνη.

Φάσμα απορρόφησης χρωστικών



Εικ. 9 – Φάσματα απορρόφησης χρωστικών που συναντώνται σε φωτοσυνθετικούς οργανισμούς [23]

#### Χλωροφύλλες και Καροτενοειδή

Οι χλωροφύλλες διαφοροποιούνται σε a, b, c, d, e και f και το κάθε είδος απορροφά σε διαφορετική περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος. Η κυριότερη είναι η χλωροφύλλη a (Chl a) και συναντάται σε όλους τους οργανισμούς που φωτοσυνθέτουν οξυγονικά. Οι υπόλοιπες έχουν διακοσμητικό ρόλο καθώς βοηθούν στην περισσότερη απορρόφηση φωτός. Αυτός είναι και ένας από τους λόγους που επιλέγθηκε για την αξιολόγηση του καθαρισμού, διότι δίνει επαρκή πληροφορία για οποιοδήποτε σημείο του δείγματος. Το φάσμα εκπομπής της, σε θερμοκρασία δωματίου, έχει μία έντονη κορυφή περίπου στα 685 nm που προέρχεται από τη Chl a στο σύμπλοκο συλλογής φωτός του PSII. Ακολουθεί μια ευρύτερη ζώνη φθορισμού μεταξύ 700-750 nm που είναι συνδυασμός του φθορισμού χλωροφυλλών του PSI και των διαφορετικών δονητικών καταστάσεων των ηλεκτρονίων της χλωροφύλλης του PSII. [18] Τα καροτενοειδή, αν και δεν φθορίζουν ιδιαίτερα, έχουν έναν ενδιαφέρον ρόλο στη φωτοσυνθετική διαδικασία. Όταν αντιδρούν η χλωροφύλλη σε τριπλή διεγερμένη κατάσταση (3Chl\*) και το οξυγόνο στην τριπλή θεμελιώδη (3O2) παράγονται ρίζες οξυγόνου επικίνδυνες ως προς το μηγανισμό της φωτοσύνθεσης. Η ύπαρξη καροτενοειδών προστατεύουν το φωτοσυνθετικό μηγανισμό αφού οι 3Chl\* αποδιεγείρονται μεταφέροντας την ενέργειά τους σε αυτά.

# Δομή χλωροφύλλης



Εικ. 10 – Χημική Δομή Χλωροφύλλης $^{[24]}$  Chl a – R1 = CH3 Chl b – R1 = CHO

# Δομή Καροτενοειδών



Εικ. 11 – Χημική δομή β-καροτένιου (πάνω) Και των οξυγονομένων παραγώγων του ή αλλιώς ξανθοφυλλών: Ζεαξανθίνη (μέση) και Βιολαξανθίνη (κάτω)



Εικ. 12 - Φάσμα απορρόφησης (αριστερά) και εκπομπής (δεξιά) φθορισμού Χλωροφύλλης a, b και β – καροτένιου σε αιθέρα <sup>[24]</sup>

#### Ριβοφλαβίνη (Βιταμίνη Β2) και ΝΑDPH

Η ριβοφλαβίνη, που βρίσκεται κυρίως στα φυτά ως μονονουκλεοτίδιο φλαβίνης (FMN) και δινουκλεοτίδιο αδενίνης φλαβίνης (FAD), μπορεί να συμβάλλει ασθενώς στο σήμα φθορισμού, συγκεκριμένα στην περιοχή των 525 nm.<sup>[25]</sup>



Εικ. 13 – Φάσμα απορρόφησης και φθορισμού NADPH και Ριβοφλαβίνης (σε νερό)– ουσιών που συναντώνται στους φωτοσυνθετικούς οργανισμούς.<sup>[25]</sup>



Εικ. 14 - Φάσμα απορρόφησης και φθορισμού και Ριβοφλαβίνης (σε νερό) και χημική δομή <sup>[26]</sup>



#### Κυανοβακτήρια

Τα κυανοβακτήρια για να επιβιώσουν σε συνθήκες βάθους όπου κυριαρχούν φωτόνια στο κόκκινο φως χρησιμοποιούν χρωστικές που απορροφούν όσο πιο κοντά στο κόκκινο μέρος του ορατού φάσματος ώστε να βοηθήσουν στη συλλογή φωτός και να μεταφέρουν αυτή την ενέργεια στις ειδικές για φωτοσύνθεση χλωροφύλλες. Οι χρωστικές αυτές ονομάζονται φυκοχολίνες (Phycobilins) και στοιβάζονται σε σειρά δημιουργώντας πρωτεΐνες (Phycobiliproteins PBPs)<sup>[30][31]</sup>. Οι φυκοχολίνες αναλόγως τα μήκη κύματος φωτός στα οποία απορροφούν χωρίζονται σε φυκοερυθρίνη (PE), φυκοκυανίνη (PC) και αλλοφυκοκυανίνη (APC).



Εικ. 16 – Φάσματα απορρόφησης και φθορισμού των φυκοχολίνων

Τα παραπάνω συνοψίζονται σε ένα πίνακα τιμών μεγίστων απορρόφησης και εκπομπής φθορισμού. Σημαντικό είναι να αναφερθεί ότι οι μπάντες φθορισμού μπορούν να διαφέρουν αναλόγως το pH, την θερμοκρασία, το stress κλπ. Επιπρόσθετα, τα φάσματα φθορισμού μεταβάλλονται όταν οι χρωστικές είναι απομονωμένες σε κάποιο διάλυμα σε σχέση με το όσο βρίσκονται εντός ενός σύνθετου βιολογικού οργανισμού.

Είδος χρωστικής	$\lambda_{abs}$	Max $\lambda_{abs}$	$\lambda_{em}$	Max $\lambda_{em}$	πηγή
	(nm)	(nm)	(nm)	(nm)	
Χλωροφύλλη a	360-500	420	675-690	685	[23] [24] [25]
	550-670	670	700-750	734	
β-καροτένιο	380-525	460	-	-	[23] [24] [25]
Ριβοφλαβίνη (FAD)	200-500	375 και 445	500-650	540-550	[25] [26] [27]
NADPH	310-390	330	410-560	450-465	[25]
Φυκοερυθρίνη ΡΕ	250-560	550	540-650	550-570	[23] [31]
Φυκοκυανίνη ΡC	250-650	630	590-710	610-620	[23] [31]
Αλλοφυκοκυανίνη	250-660	650	600-740	650-665	[23] [31]
APC					

Πίνακας Ι – Μήκη κύματος απορρόφησης και φθορισμού ουσιών που συναντώνται σε βιολογικές επικαθίσεις.

### 2.6 Διαβροχή φθοροφόρων

Η διαβροχή των βιολογικών επικαθίσεων όσο ακτινοβολούνται από κάποια πηγή ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας μπορεί να επηρεάσει το σήμα του φθορισμού τους. Τις περισσότερες φορές παρατηρείται αύξηση του σήματος των κορυφών της Chl α αλλά και άλλων χρωστικών. <sup>[28]</sup> Πιθανολογείται ότι η διαβροχή αλλάζει τις οπτικές ιδιότητες στο σημείο απορρόφησης με αποτέλεσμα την συνήθως καλύτερη απορρόφηση και άρα ισχυρότερο σήμα φθορισμού. Παράδειγμα οι Maksimov et al. έδειξαν ότι ο λειχήνας Peltigera aphthosa σε βρεγμένη κατάσταση έδινε υψηλότερο σήμα φθορισμού της χλωροφύλλης διότι η υφή του που καλύπτει τα κύτταρα των φυκών που περιέχει γίνεται περισσότερο διαπερατή στο φως και η χλωροφύλλη των μικροφύκων διεγείρεται κατά μεγαλύτερο ποσοστό. <sup>[29]</sup> Οι λειχήνες είναι

ικανοί να διακόπτουν τη φωτοσυνθετική τους ικανότητα όταν βρίσκονται σε ακατάλληλες συνθήκες. Η προσθήκη νερού είναι ικανή να ενεργοποιήσει κατευθείαν την φωτοσυνθετική τους ικανότητα ακόμα κι αν παρέμειναν σε τέτοιες συνθήκες αρκετό καιρό. Στην ουσία καταργούν το PSII όσο βρίσκονται σε αυτήν την κατάσταση.<sup>[10]</sup>



Εικ. 17 – P. Sulcata χρονική εξέλιξη σήματος φθορισμού αμέσως μετά τη διαβροχή.<sup>[10]</sup>

#### 2.7 Τεχνικές LIF και LED-IF για την ανίχνευση φθοροφόρων

Μία αρκετά διαδεδομένη τεχνική για την ανίχνευση ουσιών είναι η μέθοδος Φθορισμού Επαγόμενου από Laser (Laser – Induced Fluorescence or LIF) η οποία αξιοποιεί την μονοχρωματικότητα των πηγών laser με σκοπό να διεγείρει επιλεκτικά ουσίες που απορροφούν σε συγκεκριμένο μήκος κύματος και ύστερα εκπέμπουν φθορισμό. Είναι μία αρκετά χρήσιμη τεχνική για τον έλεγχο αποτελεσματικότητας τεχνικών καθαρισμού εποικισμένων επιφανειών διότι είναι ικανό να ανιχνεύσει σήμα φθορισμού ακόμα και σε χαμηλές συγκεντρώσεις του εποικιστή μικροοργανισμού.<sup>[32]</sup>

Μια εναλλακτική μορφή ανίχνευσης φθορισμού χρωστικών των βιολογικών επικαθίσεων είναι η αλλαγή της πηγής laser σε πηγή LED. Η μέθοδος αυτή είναι γνωστή ως Φθορισμός επαγόμενος από πηγή LED (LED – Induced Fluorescence or LED – IF). Οι πηγές LED σε αντίθεση με τα lasers έχουν μηδενική επικινδυνότητα ως προς τη χρήση. Συνεπώς είναι μια φιλική και εύχρηστη τεχνική για την ανίχνευση μικροοργανισμών σε αντικείμενα Πολιτιστικής Κληρονομιάς χωρίς να χρειάζεται να ληφθούν μέτρα προστασίας.<sup>[28]</sup> Ακόμη, οι πηγές LED έχουν μεγάλο φασματικό εύρος εκπομπής σε αντίθεση με τα lasers οπότε, με την κατάλληλη επιλογή φασματικής περιοχής και φίλτρου, προσφέρουν τη δυνατότητα ανίχνευσης περισσοτέρων από μία φθοροφόρες ουσίες ανά σημείο μελέτης.

# Κεφάλαιο 3

## 3.1 Lasers και Πολιτιστική Κληρονομιά

Η χρήση των laser για τον καθαρισμό επιφανειών από βιολογικές αλλοιώσεις ερευνάται τα τελευταία χρόνια. Η αποτελεσματικότητά τους στο συγκεκριμένο πεδίο του καθαρισμού οφείλεται στην απορρόφηση της ενέργειας από το ανεπιθύμητο στρώμα με στόχο την φωτοαποδόμηση του. Συνήθως χρησιμοποιούνται παλμικά laser Q-switched διότι οι σύντομοι παλμοί (τυπική διάρκεια παλμού 8-20 ns) συνεισφέρουν στο φαινόμενο της φωτοαποδόμησης όπως θα περιγραφεί στη συνέχεια.<sup>[34]</sup>

Σε πολλές μελέτες με κεντρικό θέμα την αφαίρεση λειχήνων γίνεται χρήση laser στο ορατό, το υπέρυθρο και το υπεριώδες μήκος κύματος καθώς και συνδυασμοί αυτών. Κάποιες συνθήκες επιτυγχάνουν να αφαιρέσουν το σώμα του λειχήνα όπως για παράδειγμα, η χρήση ορατού μήκους κύματος (532 nm) που φαίνεται να απορροφάται καλύτερα σε σχέση με το υπέρυθρο από το λειχήνα Verrucaria nigrescens σε μάρμαρο.<sup>[33]</sup> Αντιθέτως, η χρήση υπεριώδους ακτινοβολίας σε λειχήνες που εποικίζουν γρανίτη ή ψαμμίτη δεν αφαίρεσε ολοκληρωτικά το θαλλό του λειχήνα.<sup>[35]</sup>

#### 3.2 Φωτοαποδόμηση

Η φωτοαποδόμηση ορίζεται ως η εκτίναξη ύλης από στερεή επιφάνεια ως απόρροια ακτινοβολίας που προέρχεται από laser. Μπορεί να προκύψει μέσω δύο διαφορετικών μηχανισμών, αναλόγως την επίπτωση που θα έχει η απορροφούμενη ακτινοβολία στην ύλη. Η φωτοαποδόμηση είναι ένα μη γραμμικό και μη αντιστρεπτό φαινόμενο που συμβαίνει όταν η πυκνότητα ισχύος της ακτινοβολίας ξεπεράσει κάποια οριακή τιμή, που ορίζεται κάθε φορά από το υλικό της στρώσης προς αφαίρεση. Σε κάθε άλλη περίπτωση επικρατούν γραμμικά φαινόμενα που μπορούν να εξηγηθούν μέσω της χωρικής ανακατανομής της ενέργειας της δέσμης. Η απορρόφηση υπέρυθρης ή ορατής ακτινοβολίας προκαλεί φωτοθερμική αποδόμηση. Αρχικά η επιφανειακή θερμοκρασία του δείγματος στο σημείο αλληλεπίδρασης με το φως αυξάνεται για το χρονικό διάστημα διάρκειας του παλμού. Σε αυτή τη φάση το υλικό απορροφά ενέργεια. Η θερμοκρασία επιφάνειας είναι ανάλογη της απορροφητικότητας της επιφάνειας στο συγκεκριμένο μήκος κύματος (α), του χρόνου ακτινοβόλησης, της ισχύος ανά την επιφάνεια ακτινοβόλησης (Ι) καθώς και της δυνατότητας εξάπλωσης της θερμότητας εντός του υλικού (k). Όσο διαρκεί ο παλμός συμβαίνει η διαδικασία της απορρόφησης και αυξάνεται η θερμοκρασία της επιφάνειας. Στη συνέχεια η θερμότητα διαχέεται στα περιβάλλοντα μόρια του υλικού μεταφέροντας τους ενέργεια που θα αυξήσει την θερμοκρασία της ευρύτερης περιοχής κάτω από την επιφάνεια. Η άνοδος της θερμοκρασίας παράγει θερμοελαστικές πιέσεις εντός και επιφανειακά του υλικού οι οποίες εαν υπερβούν την αντοχή του εκάστοτε υλικού ωθούν στην καταστροφή και εκτίναξη του.

Ας θεωρήσουμε ένα ομογενές υλικό το οποίο ακτινοβολείται με δέσμη laser. Το υλικό αναλόγως τις ιδιότητές του θα απορροφήσει ένα μέρος της ενέργειας (Absorbance A), θα σκεδάσει ένα άλλο προς τα πίσω (Reflectance R) και το υπόλοιπο θα διαπεράσει τη στρώση του υλικού (Transmittance T). Συνολικά θα ισχύει A + R + T = 1. Ακόμα και αν το υλικό που ακτινοβολείται απορροφά έντονα την συγκεκριμένη δέσμη, πρέπει να ληφθεί υπόψη και η επιφάνεια που συνορεύει (π.χ. αυθεντική επιφάνεια), διότι υπάρχει περίπτωση να υφίσταται διάχυση λόγω της γειτονικής επιφάνειας (Εικ. 18 c).

#### 3.3 Πυκνότητα Ενέργειας (Fluence)

Συνεπώς, η μικρή διάρκεια παλμού και η υψηλή πυκνότητα ενέργειας της δέσμης συντελούν σε αποτελεσματική φωτοαποδόμηση. Για την επίτευξη αποτελεσματικής αποδόμησης, καθορίζεται η ελάχιστη τιμή πυκνότητας ενέργειας (για συγκεκριμένη διάρκεια παλμού) που οδηγεί σε αφαίρεση ύλης και ονομάζεται κρίσιμη πυκνότητα ενέργειας αφαίρεσης ή πυκνότητα ενέργειας κατωφλίου αφαίρεσης (ablation threshold). Ορίζεται συνεπώς το εξής πηλίκο, γνωστό ως Fluence, ενέργεια παλμού προς επιφάνεια αλληλεπίδρασης δέσμης-επιφάνειας.

$$F = \frac{E(J)}{S(cm^2)}$$

Κατά τη διάδοση της δέσμης στο υλικό η πυκνότητα ενέργειας εξασθενεί εκθετικά κατά τον άξονα διάδοσης z ως εξής:

$$F(z) = (1-R)F_0e^{-\mu z}$$

όπου  $F_0$  η αρχική πυκνότητα και μ ο συντελεστής ενεργούς απορρόφησης που ορίζεται επίσης μέσω του βάθους διείσδυσης  $\delta = 1/\mu$ .<sup>[34]</sup>



Εικ. 18 – Αναπαράσταση αλληλεπίδρασης δέσμης laser με a)απορροφητικό b)διαχυτικό c)απορροφητικό δίπλα σε διαχυτικό υλικό – Ομοιόμορφες περιπτώσεις.<sup>[34]</sup>



Εικ. 19 – Αναπαράσταση αλληλεπίδρασης δέσμης laser με a)απορροφητικό b)διαχυτικό c)απορροφητικό δίπλα σε διαχυτικό υλικό – Πραγματικές περιπτώσεις.<sup>[34]</sup>

Σε ένα πραγματικό δείγμα επικρατεί μεγάλη ποικιλομορφία στην περιοχή ακτινοβόλησης με αποτέλεσμα να υπάρχει μεγάλη δυσκολία προσδιορισμού της κατανομής της ενέργειας της δέσμης εντός του υλικού.

Ύστερα από κάποιες παραδοχές, προκύπτει από την εξίσωση διάχυσης ότι για μια ομογενή δέσμη έντασης I(t) σε μια ημιάπειρη επιφάνεια αγώγιμου υλικού με δ=0 η θερμοκρασία θα αυξηθεί κατά:

$$\Delta T(t,z) = \frac{\sqrt{D}}{K\sqrt{\pi}} \int_0^t (1-R) I_0(t-t') \frac{e^{-\frac{z^2}{4Dt'}}}{\sqrt{t'}} dt'$$

Όπου Κ η θερμική αγωγιμότητα και D η ικανότητα του υλικού να διαχέει την ενέργεια.

Η φωτοθερμική αποδόμηση μπορεί να επηρεαστεί και από το repetition rate. Εάν είναι πολύ υψηλό, οι διαδοχικοί παλμοί δεν αφήνουν χρόνο στο ακτινοβολημένο σημείο να αποβάλλει όλη τη θερμότητα με αποτέλεσμα την συσσώρευση όλο και περισσότερης ενέργειας. Συνεπώς, πρέπει να ελέγχεται και να αποφεύγεται διότι μπορεί να προκαλέσει μη αναμενόμενα αποτελέσματα.

Αξίζει να αναφερθεί ακόμη ότι η απορρόφηση υπεριώδους ακτινοβολίας οδηγεί σε χημικές αλλαγές διότι προκαλεί διάσπαση των ομοιοπολικών δεσμών των μορίων. Κατά τη φωτοχημική αποδόμηση, η ενέργεια που απορροφάται δεν αυξάνει τη θερμοκρασία του δείγματος αλλά την επενδύει σε χημικές αντιδράσεις κατά τις οποίες παράγονται προϊόντα μεγαλύτερου όγκου. Αυτή η αύξηση όγκου ασκεί πίεση που απελευθερώνεται μέσω εκτίναξης μέρους του υλικού.

### 3.4 Ρόλος του νερού στην φωτοαποδόμηση

Η διαβροχή της επιφάνειας προς ακτινοβόληση, εκτός του ότι αυξάνει την απορροφητικότητα του μέσου και το βάθος διείσδυσης, συνεισφέρει θερμικά. Σε πορώδη υλικά, ελαττώνει την μέγιστη θερμοκρασία που μπορεί να φτάσει η ακτινοβολούμενη περιοχή. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι το στρώμα νερού βελτιώνει τη θερμική αγωγιμότητα και αυξάνει τη μέση ειδική θερμότητα. Τέλος, το νερό παίζει σημαντικό ρόλο στη διάδοση των κυμάτων πίεσης και γι' αυτό το λόγο παρατηρούνται φαινόμενα εκτίναξης μικρών κομματιών της κρούστας όπως φαίνεται και στην παρακάτω εικόνα.



Εικ. 20 – Καθαρισμός υποβοηθούμενος από νερό. [34]

# Υλικά και Μέθοδοι

# Αντικείμενα Μελέτης

Το αντικείμενο προς μελέτη ήταν ένα θραύσμα τοιχογραφίας από την εκκλησία του Αγίου Θεοδώρου στη Χούλου της Κύπρου η οποία χρονολογείται περίπου στο 12° αιώνα.<sup>[37]</sup> Ως επικάθιση-μοντέλο για τη μελέτη του φθορισμού της χλωροφύλλης χρησιμοποιήθηκαν φύλλα φυτού ιβίσκου. Ακόμη μελετήθηκε φασματικά ασβεστολιθικό θραύσμα που φέρει έντονη και ποικίλη βιοδιάβρωση από το ναό του Επικούρειου Απόλλωνα.



Εικόνα 21 – αριστερά: θραύσμα τοιχογραφίας πριν τον καθαρισμό, (δεξιά) φύλλο ιβίσκου

Οι τοιχογραφίες συνήθως αποτελούνται από ανόργανα αλλά και οργανικά υλικά. Η κατασκευή τους εμπλέκει ποικιλία τεχνικών οι οποίες διαφοροποιούνται ανά τις ιστορικές περιόδους. Από τις πιο γνωστές είναι η μέθοδος Fresco, κατά την οποία υδατοδιαλυτές χρωστικές εφαρμόζονται σε υγρό σοβά ή ασβεστοκονίαμα. Κατά τη διάρκεια που ο υγρός σοβάς στεγνώνει, το υδροξείδιο του ασβεστίου αντιδρά με το διοξείδιο του άνθρακα και σχηματίζεται αδιάλυτο ανθρακικό ασβέστιο. Αυτή η διαδικασία ονομάζεται ασβεστοποίηση και σταθεροποιεί τις χρωστικές εντός του σοβά. Μια άλλη τεχνική, η secco fresco, χρησιμοποιεί στεγνό γύψο σε συνδυασμό με κάποιο οργανικό συνδετικό μέσο. Οι σύγχρονες τοιχογραφίες χρησιμοποιούν έλαια, τέμπερες ή ακρυλικά χρώματα.<sup>[3]</sup>

Οι μικροβιακές αποικίες αποτελούν απειλή για την ακεραιότητα τόσο των ανόργανων όσο και των οργανικών συστατικών των τοιχογραφιών, προκαλώντας ένα φάσμα προβλημάτων όπως

ρωγμές λόγω διαστολής, αποφλοίωση, αποκόλληση των εξωτερικών στρωμάτων, δυσχρωματισμούς και λεκέδες. <sup>[3]</sup> Ο πιθανός σχηματισμός οξαλικών αλάτων, που προέρχονται από τις μεταβολικές διεργασίες των αποικιών σε συνδυασμό με ασβεστίτη ή χρωστικές που περιέχουν μέταλλα μέσα στα ζωγραφικά στρώματα, αυξάνει την πολυπλοκότητα φθορών. Ειδικότερα, η διείσδυση υφών μυκήτων στη μικροδομή των κονιαμάτων αναδεικνύεται ως βασικός παράγοντας που ευθύνεται για ρωγμές και αποκολλήσεις σε συγκεκριμένες περιοχές του έργου τέχνης. <sup>[1]</sup>

Υπόγεια περιβάλλοντα, όπως σπήλαια και κατακόμβες, καθώς και εκτεθειμένα ξωκλήσια που χαρακτηρίζονται από υψηλή υγρασία και σχετικά σταθερές θερμοκρασίες, φιλοξενούν ευαίσθητες μικροβιακές αποικίες. Οι προκλήσεις προκύπτουν από τις μεταβολές των μικροκλιματικών συνθηκών που προκαλούνται από παράγοντες όπως η παρουσία επισκεπτών και ο τεχνητός φωτισμός, οδηγώντας σε βιοδιάβρωση.

### Πειραματική Διάταξη

Αξιολόγηση επικαθίσεων και καθαρισμού

I. LED – IF

Οι μετρήσεις εκπομπής φθορισμού έγιναν με ένα φορητό υβριδικό φασματόμετρο με πηγή διέγερσης LED και ειδικό φίλτρο αποκοπής ακτινοβολίας που χρησιμοποιείται για τη μείωση του FWHM. Δοκιμάστηκαν δύο συνδυασμοί: πηγή LED στα 440 nm με φίλτρο laser line στα 441.6 nm (FL441.6-10, Thorlabs, USA, FWHM 10 nm) και πηγή LED στα 375 nm με φίλτρο band-pass στα 370 nm (FB370-10, Thorlabs, USA, FWHM 10 nm). Τοποθετείται ασφαιρικός συγκλίνων φακός εστιακής απόστασης f που εστιάζει την ακτινοβολία στο δείγμα σε μέγεθος περίπου 2×2 mm<sup>2</sup>.<sup>[28]</sup> Το σήμα συλλέγεται μέσω οπτικής ίνας αφού περάσει μέσα από τηλεσκοπικό σύστημα φακών αναλύεται σε φασματογράφο AvaSpec-ULS2048CL-EVO (Avantes, Netherlands, πλάτος σχισμής εισόδου 50 μm, πλέγμα περίθλασης 300 γραμμές/mm). Μπορεί να γίνει άμεση επεξεργασία του σήματος μέσω του λογισμικού AvaSoft το οποίο δίνει την ένταση του φθορισμού του δείγματος για τα μήκη κύματος από 200 nm έως 1100 nm διακριτικής ικανότητας 2,5 nm. Με αυτόν τον τρόπο γίνεται η λήψη του αναμενόμενου φάσματος. Επιλέχθηκε ο χρόνος ολοκλήρωσης για την κάθε μέτρηση να είναι 500 msec. Όλες οι μετρήσεις έγιναν στο σκοτάδι.



Εικόνα 22- Διάταξη LED – ΙΓ στο εργαστήριο

## **ΙΙ.** Ψηφιακό Μικροσκόπιο

Το ψηφιακό μικροσκόπιο διαφοροποιείται από το οπτικό στο κομμάτι του προσοφθάλμιου φακού. Το ψηφιακό δεν διαθέτει προσοφθάλμιο φακό. Αντιθέτως συνδυάζει κάμερα μεγάλης μεγέθυνσης και οθόνη υπολογιστή για τη μελέτη του εκάστοτε αντικειμένου. Ο φωτισμός του δείγματος προέρχεται από πηγή LED στο εσωτερικό του.<sup>[38]</sup> Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε ψηφιακό μικροσκόπιο Dino-Lite (Dino-Lite Premier AM4113T-FV2W, Dino-Lite Europe). Το συγκεκριμένο μοντέλο διαθέτει 2 επιλογές φωτισμού: λευκό φως και υπεριώδες φως (375 nm).

# ΙΙΙ. Διάταξη καθαρισμού – Nd:YAG Laser

Για τις δοκιμές καθαρισμού με laser χρησιμοποιήθηκε ένα σύστημα Q-switched Nd:YAG (TRLi 850 Series, Litron Lasers). Η θεμελιώδης ακτινοβολία που εκπέμπει είναι στα 1064 nm, ενώ μέσω μιας εμπρόσθιας κεφαλής προσαρμοζόμενη στο laser εκπέμπει στα 532 nm (2<sup>η</sup> αρμονική). Η εκπομπή των δύο μηκών κύματος μπορεί να γίνει είτε ξεχωριστά είτε ταυτόχρονα. Η διάρκεια κάθε παλμού ήταν 10 ns. Η συχνότητα ακτινοβόλησης επιλέχθηκε στα 2 Hz.

Μετά την έξοδο τους από το σύστημα οι δέσμες προσπίπτουν σε μια σειρά οπτικών τα οποία δίνουν τη δυνατότητα επιλογής ποιά από τις 2 δέσμες θα ακτινοβολήσει το αντικείμενο. Επίσης επιτρέπουν την μεταβολή της πυκνότητας ενέργειας που προσπίπτει στο αντικείμενο.



Εικ. 23 – Διάταξη καθαρισμού laser - σχεδιάγραμμα και φωτογραφία

Συγκεκριμένα, η ενέργεια κάθε δέσμης μπορεί να ελεγχθεί μέσω της μετακίνησης των εξωτερικών εξασθενητών (attenuators στο σχήμα της διάταξης). Συγκλίνοντας φακός εστιακής απόστασης 50 cm εστιάζει τη δέσμη στο επιθυμητό σημείο. Το δείγμα κάθε φορά τοποθετείται πριν την εστία ώστε να μην επικρατούν ακραία φαινόμενα, στο σημείο εστίασης, και να σχηματίζεται ένα ευδιάκριτο αποτύπωμα της δέσμης πάνω στο δείγμα κατά τη διάρκεια της φωτοαποδόμησης.

Για την παρακολούθηση της ενέργειας της δέσμης έγινε χρήση ενεργόμετρου (Gentec-EO SOLO2, Gentec Electro-Optics, Canada).

#### Πειραματική Διαδικασία

Στην αρχή έγινε μελέτη του επικάθισης-μοντέλου με σκοπό την κατανόηση της μεταβολής του σήματος φθορισμού της Chl a η οποία συναντάται σε όλους τους φωτοαυτότροφους οργανισμούς.<sup>[18]</sup> Αυτός είναι και ο λόγος που η αξιολόγηση του καθαρισμού αποφασίστηκε να εστιαστεί στη συγκεκριμένη χρωστική. Ο φθορισμός του μελετήθηκε με συνεχή και με διακοπτόμενη ακτινοβολία LED με κορυφή στα 440 και στα 375 nm. Στο πλαίσιο αυτής της προκαταρκτικής εξοικείωσης μελετήθηκε ασβεστολιθικό πέτρωμα εποικισμένο με στρωματώδεις λειχήνες (crustose lichens) για την κατανόηση της μορφολογίας του σήματος φθορισμού των λειχήνων που επάγεται από τις συγκεκριμένες πηγές LED καθώς η εμφάνισή τους είναι ιδιαίτερα συχνή στα αρχαιολογικά αντικείμενα μεσογειακού κλίματος και όχι μόνο.

Στη δεύτερη φάση έγινε μελέτη του θραύσματος τοιχογραφίας. Λήφθηκαν φάσματα φθορισμού σε διάφορα σημεία της επιφάνειας μέσω της τεχνικής LED – IF. Έγινε διερεύνηση για την επιλογή συνθηκών λήψης φάσματος. Δοκιμάστηκαν και οι δύο πηγές LED καθώς και η λήψη φάσματος από στεγνή και από νωπή επιφάνεια. Οι συγκεκριμένες προκαταρκτικές μελέτες έγιναν για βρεθούν οι κατάλληλες συνθήκες που θα συνδυάζουν μια σχετική σταθερότητα και αντικειμενικότητα ως προς την εκάστοτε μέτρηση. Ο φθορισμός σαν φαινόμενο είναι μία δυναμική διαδικασία που η ποσοτικοποίησή του γίνεται ακόμα δυσκολότερη όταν εμπλέκονται φωτοσυνθετικοί οργανισμοί που αντιδρούν και προσαρμόζονται συνέχεια σε εξωτερικές διεργασίες. Συνεπώς, αν και επιλέχθηκαν οι συνθήκες διαβροχής, διότι αυξάνουν την ικανότητα ανίχνευσης των χρωστικών, η ποσοτικοποίηση της μέτρησης δεν μπορεί να θεωρείται ακριβής. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνεται από τα διαγράμματα χρονικής εξέλιξης της έντασης των κορυφών των φασμάτων που θα παρουσιαστούν στα Αποτελέσματα και Συζήτηση.

Για τον καθαρισμό με laser δοκιμάστηκαν δύο μήκη κύματος laser, το υπέρυθρο στα 1064 nm και το ορατό στα 532 nm καθώς και ο συνδυασμός τους. Αποφασίστηκε να παραληφθεί η διαδικασία δοκιμαστικών μετρήσεων με αυξανόμενο αριθμό παλμών καθώς λόγω ανομοιομορφίας της κρούστας του δείγματος αλλά και της υποκείμενης επιφάνειας σε πολλές περιπτώσεις δεν ήταν καν παρατηρήσιμοι ούτε για μεγάλες τιμές πυκνότητας ενέργειας, παρά το γεγονός ότι επιλέχθηκε μία ευρύτερη περιοχή μελέτης που παρουσίαζε σχετική ομοιομορφία χρώματος και υφής κρούστας . Έναντι των δοκιμαστικών παλμών έγινε παραμετρική μελέτη

35

μέσω καθαρισμού περιοχών με επιφάνεια της τάξης των 5mm x 5mm ώστε τα αποτελέσματα πέρα από ορατά να ανταποκρίνονται και περισσότερο στην πραγματική διαδικασία του καθαρισμού μέσω laser. Ακόμη αποφασίστηκε ότι η διαβροχή των επιφανειών είναι βοηθητική για τον συγκεκριμένο καθαρισμό και γινόταν μέσω τοπικού ψεκασμού ανά περίπου 15 παλμούς, αφότου δοκιμάστηκαν και κάποιες συνθήκες με διαβροχή μόνο κατά την έναρξη. Ο τρόπος υπολογισμού της πυκνότητας ενέργειας που μεταβάλλεται σε κάθε συνθήκη περιγράφεται στο Παράρτημα Ι.

Στη συνέχεια, λήφθηκαν φάσματα για κάθε περιοχή που είχε αλληλεπιδράσει με το laser. Έγινε προσπάθεια να καταγραφεί φασματικά κάθε ανομοιομορφία καθαρισμού. Παρατηρήθηκε σε πολλά σημεία, που έμοιαζαν αρκετά καθαρισμένα, πολύ υψηλό σήμα φθορισμού στην περιογή των 450-600 nm, το οποίο σε πολλές περιπτώσεις εμπλέκονταν με το σήμα φθορισμού της γλωροφύλλης α. Αποφασίστηκε ότι για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας του καθαρισμού έπρεπε να ληφθεί υπόψη η συγκεκριμένη κορυφή, η οποία από αυτό το σημείο και στη συνέγεια θα αποκαλείται φθορισμός υποστρώματος, και η πιο ευδιάκριτη κορυφή της χλωροφύλλης α, στα 685 nm, η οποία προέρχεται από το PSII. Έγιναν κάποιες εικασίες για την προέλευση αυτής της μπάντας υψηλού φθορισμού. Για την περίπτωση που κάποια ουσία που εμπλέκεται στην προετοιμασία της τοιγογραφίας φθορίζει τόσο έντονα, μελετήθηκαν φάσματα φθορισμού κάποιων ενδεχομένως πιθανών ουσιών. Ακόμη λήφθηκε φάσμα φθορισμού LED – IF από περιοχή που καθαρίστηκε μηχανικά με νυστέρι, ώστε να αποκλειστεί η υπόθεση ότι ο καθαρισμός με laser προκαλεί κάποια μεταβολή στο υπόστρωμα της τοιχογραφίας που προκαλεί σημαντικότατη αύξηση (10 έως 20 φορές) στο φθορισμό της. Συμπληρωματικά πραγματοποιήθηκε φασματική ανάλυση Raman η οποία μας έδωσε πληροφορία για το πίσω μέρος του θραύσματος.

Τέλος, αναπτύχθηκε ο λόγος R μέσω του οποίου υπολογίζεται η αποτελεσματικότητα του καθαρισμού. Η επεξεργασία των φασμάτων έγινε με γλώσσα προγραμματισμού Python. Αναπτύχθηκε κώδικας που συνυπολογίζει την ανάκλαση του LED, το φθορισμό του υποστρώματος, και τις δύο κορυφές της Chl a ώστε να προσαρμόσει ένα μοντέλο πολλών κορυφών φθορισμού, μέσω του οποίου θα απομονώνει τις τιμές των κορυφών του υποστρώματος και της Chl a. Η λογική του βασίζεται στο γεγονός ότι η κορυφή φθορισμού της χλωροφύλλης μετά τον καθαρισμό πρέπει ιδανικά να έχει χαμηλότερο σήμα. Από τα πειραματικά δεδομένα, κρίθηκε αναγκαίο να ληφθεί υπόψη η μπάντα φθορισμού που προέρχεται από την εμφάνιση λευκού χρώματος μετά από αφαίρεση της κρούστας. Η αύξηση του σήματος της συγκεκριμένης μπάντας συνδέεται με αφαίρεση της ανώτερης κρούστας. Συνεπώς, ο λόγος συνυπολογίζει τον φθορισμό της χλωροφύλλης και του υποστρώματος μετά τον καθαρισμό.

$$R = \frac{I_{chl(after)}}{I_{sub(after)}}$$

Η αιτία που δεν λαμβάνεται υπόψη ο φθορισμός πριν τον καθαρισμό είναι διότι δεν γίνεται να συγκριθεί η αποτελεσματικότητα βάσει του αρχικού φθορισμού καθώς το σήμα δεν ήταν ίδιο παντού. Δεν θα μπορούσε να γίνει κάποια ομαδοποίηση των τιμών του R σε αυτήν την περίπτωση. Η σύγκριση του φθορισμού της χλωροφύλλης προς το φθορισμό της αποκαλυπτόμενης επιφάνειας μπορεί να οριοθετήσει τον καθαρισμό ανά σημείο.

Για τον υπολογισμό των κορυφών έντασης φθορισμού έγινε προσαρμογή καμπύλων ώστε να αναλυθεί η συνεισφορά όλων των ουσιών που προκαλούν φθορισμό καθώς και της ανάκλασης που προέρχεται από την πηγή LED ταυτόχρονα. Η προσαρμογή πολλαπλών μοντέλων προσομοίωσης καμπύλων έγινε για την διευκόλυνση απόκτησης της τιμής έντασης κάθε ουσίας μεμονωμένα. Πιο συγκεκριμένα παρατηρήθηκε ότι η έντονη αύξηση του σήματος φθορισμού με κορυφή τα 525 nm επηρέαζε αρκετά τη φασματική περιοχή φθορισμού της χλωροφύλλης στα 685 nm.

Τέλος υπολογίστηκαν οι λόγοι για κάθε οπτικά διαφοροποιημένη περιοχή κάθε συνθήκης καθαρισμού. Μέσω σύγκρισης των τιμών που υπολογίστηκαν, με τις φωτογραφίες μικροσκοπίου παράλληλα με τα φάσματα φθορισμού προκύπτουν τρεις κατηγορίες τιμών: τιμή αποτελεσματικού καθαρισμού, τιμή μερικής αφαίρεσης κρούστας και τιμή μη αποτελεσματικού καθαρισμού.

# Αποτελέσματα και Συζήτηση

### Μελέτη επικάθισης-μοντέλου

Φύλλα ιβίσκου αποτέλεσαν τον οργανισμό – μοντέλο ώστε να αξιολογηθούν οι δύο πηγές LED στα 375 nm και στα 440 nm. Επίσης βοήθησαν στη μελέτη της χρονικής εξέλιξης του σήματος φθορισμού της χλωροφύλλης. Λόγω του έντονου σήματος και του αμελητέου θορύβου ήταν εύκολη η εξοικείωση με την επεξεργασία των φασμάτων και με την προσαρμογή καμπύλων στις αναμενόμενες κορυφές.

Σύγκριση φασμάτων φθορισμού επαγόμενο από LED

- i) Στα 375 nm με μέγιστη ισχύ 6 mW
- ii) Στα 440 nm με μέγιστη ισχύ 26 mW



Εικ. 24 – Φάσματα φθορισμού LED – ΙΓ από φύλλο ιβίσκου με πηγή διέγερσης LED στα 375 nm (αριστερά) και στα 440 nm (δεξιά). Συνεχής ακτινοβόληση

Το LED στα 440 nm έχει μέγιστη ισχύ σχεδόν τετραπλάσια από το LED στα 375 nm οπότε προτιμάται ιδιαίτερα για τη διέγερση των βιολογικών εποικισμών οι οποίοι φθορίζουν ασθενέστερα από το φύλλο ιβίσκου και τα φύλλα γενικότερα. Κατά τη συνεχή ακτινοβόληση, η ένταση του φθορισμού της Chl ελαττώνεται όλο και με πιο αργό ρυθμό. Η συμπεριφορά αυτή συμφωνεί με την καμπύλη επαγωγικού φθορισμού όπως παρουσιάστηκε και στο 2.3 Καμπύλη Επαγωγικού Φθορισμού. Όπως προαναφέρθηκε, το σήμα φθορισμού της Chl, μετά από τη γρήγορη φάση αύξησης της έντασης του, σταθεροποιείται περίπου στο 1 λεπτό από την έναρξη ακτινοβόλησης με φως, κατά τη μετάβαση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού από το σκοτάδι σε φως.

Για την πηγή διέγερσης έγινε μελέτη της χρονικής εξέλιξης της έντασης του φθορισμού. Ενδεικτικά για την πρώτη κορυφή των 680 nm φαίνεται στο παρακάτω διάγραμμα η ελάττωση φθορισμού συναρτήσει του χρόνου.



Εικ. 25 – Χρονική εξέλιξη έντασης χλωροφύλλης από φύλλο ιβίσκου. Πηγή διέγερσης LED 440 nm

Από το παραπάνω διάγραμμα προκύπτει το συμπέρασμα ότι η ποσοτικοποίηση του φθορισμού της χλωροφύλλης δεν είναι μία απλή υπόθεση αλλά χρειάζεται να αναπτυχθεί κάποια συγκεκριμένη μεθοδολογία ώστε η απόκτηση της φασματικής πληροφορίας να γίνεται όσο πιο αντικειμενικά γίνεται.



## Μελέτη λίθου εποικισμένου με λειχήνες

Εικ. 26 - Ομαδοποίηση φασμάτων LED – ΙΓ για τις κατηγορίες 1,2,3 και 4



Εικ. 27 – Φωτογραφία θραύσματος από τον Επικούρειο Απόλλωνα και κατηγοριών 1-a) 2-b) 3-c) και 4-d)

#### Κατηγοριοποίηση των λειχήνων χρωματικά – Παρατηρήσεις

Κατηγορία 1 – Ανοιχτό γκρι – μπεζ : αρκετά υψηλό σήμα στα 520 nm και στα 660-680 (APC και Chl) συνοδευόμενο από την ευρύτερη ζώνη στα 710-740 nm (Chl).

Κατηγορία 2 – Έντονο λευκό – υπόλευκο : πολύ υψηλό σήμα στα 520 nm και στα 660 (APC) με ώμο στα 680 συνοδευόμενο από την ευρύτερη ζώνη στα 710-740 nm (Chl).

<u>Κατηγορία 3</u> – Σκούρο γκρι : πολύ χαμηλό σήμα στα 520 nm με διακριτή κορυφή στα 660 (APC) και με ώμο στα 680 συνοδευόμενο από την ευρύτερη ζώνη στα 710-740 nm (Chl) αρκετά χαμηλού σήματος.

<u>Κατηγορία 4</u> – Γκρι με μαύρα στίγματα : σχετικά χαμηλό σήμα στα 520 nm με ευδιάκριτη κορυφή στα 660 (APC) και με ώμο στα 680 συνοδευόμενο από την ευρύτερη ζώνη στα 710-740 nm (Chl) χαμηλού σήματος.

Συνεπώς υπάρχει μια διαβάθμιση της έντασης φθορισμού αναλόγως το χρώμα του λειχήνα. Συγκριτικά με τα φάσματα της σκούρας καφέ κρούστας του θραύσματος τοιχογραφίας έχουν παρόμοια φασματική συμπεριφορά με την κατηγορία 4. Το σήμα φθορισμού στα 660 nm είναι υπαρκτό σε όλες τις κατηγορίες οπότε τα μαύρα στίγματα, ορατά και μη, είναι κυανοβακτήρια. Ακόμη, έγινε σύγκριση με το φάσμα φθορισμού του λίθου (μη εποικισμένη επιφάνεια) και αποκλείστηκε η περίπτωση ο φθορισμός στα 520 nm να έχει προέλευση τον ασβεστόλιθο. Τα φάσματα που αποκτήθηκαν δοκιμαστικά με την πηγή διέγερσης LED στα 375 nm είχαν γενικότερα χαμηλή ένταση και δεν θα παρουσιαστούν στην παρούσα εργασία. Λόγω της υψηλότερης ισχύος του το LED στα 440 nm κρίθηκε κατάλληλο για τη διέγερση των φθοροφόρων βιολογικών επικαθίσεων.

#### Μελέτη φθορισμού background και ανάλυση Raman

Στην παρούσα υποενότητα παρουσιάζεται το φάσμα φθορισμού από σημείο στην πίσω επιφάνεια του θραύσματος καθώς και φάσμα Raman που εμφανίζει τις κορυφές γύψου. Σ' αυτό το σημείο οφείλεται να τονιστεί ότι το πίσω μέρος του θραύσματος είναι διαφορετικής σύστασης από την επιφάνεια στην οποία έχουν αναπτυχθεί οι μικροοργανισμοί.

Φάσμα Raman - κάτω επιφάνεια θραύσματος - ένδειξη : γύψος



Εικ. 28 – Φάσμα Raman (αριστερά) και φωτογραφίες DinoLite με UV φωτισμό (δεξιά) του background

Στο φάσμα Raman της κάτω επιφάνειας παρατηρείται η εντονότερη κορυφή στα 1005 cm<sup>-1</sup> η οποία αντιστοιχεί στην συμμετρική δόνηση v1 των τετραέδρων SO4. Ο γύψος εμφανίζει διπλή δόνηση συμμετρικής κάμψης v2, στα 417 cm<sup>-1</sup> και 493 cm-1. Η κορυφή στα 1135 cm<sup>-1</sup> αποδίδεται στην ασύμμετρη δόνηση v3 και οι κορυφές στα 621 cm<sup>-1</sup> και 673 cm<sup>-1</sup> στις ασύμμετρες κάμψεις v4.



Εικ. 29 – Φάσμα LED – ΙF στεγνού και βρεγμένου πίσω μέρος θραύσματος

Ο ώμος φθορισμού πιθανό να οφείλεται στο γύψο. <sup>[39]</sup> Παρατηρείται αύξηση στο σήμα μετά τη διαβροχή λόγω της πιθανής μεταβολής της διαθλαστικότητας του υλικού που με τη σειρά της οδηγεί σε καλύτερη απορρόφηση του φωτός.

# Αξιολόγηση βιοδιάβρωσης μέσω της αναλυτικής τεχνικής φθορισμού επαγόμενου από πηγή LED (LED – IF)

#### Πριν τον καθαρισμό:

Για συγκεκριμένο σημείο (Spot 1) στο θραύσμα μελετήθηκε η χρονική εξέλιξη του σήματος φθορισμού στα 520 nm και στα 685 nm. Η κάθε μέτρηση απέχει από την προηγούμενη περίπου 4 δευτερόλεπτα.



Εικ. 31 – Διαγράμματα Μέγιστης Έντασης κορυφών συναρτήσει του χρόνου για στεγνό δείγμα (αριστερά) και βρεγμένο (δεξιά).

Από τα φάσματα διακρίνονται: μία κορυφή στα 520 nm, που ίσως προέρχεται από το κυτταρικό τοίγωμα μυκήτων λειγήνα ή από την προετοιμασία της τοιγογραφίας, τις κορυφές της γλωροφύλλης στα 680 και 730 nm περίπου και έναν ώμο (shoulder, ο οποίος στο στεγνό φάσμα είναι ευδιάκριτος ως κορυφή) στα περίπου 660 nm (προέλευση φυκοχολίνες κυανοβακτηρίων). Παρατηρείται μείωση σήματος της κορυφής των 520 nm μετά την προσθήκη νερού. [6] Παρόμοια συμπεριφορά παρατηρήθηκε και στη φασματική μελέτη/ κατηγοριοποίηση των λειχήνων σε θραύσμα από το ναό του Επικούρειου Απόλλωνα. Η αύξηση του σήματος των κορυφών Chl με τη διαβροχή είναι εμφανής στο διάγραμμα d με μέγιστο περίπου τα 40 sec και στη συνέχεια ακολουθεί μια μικρή πτώση. Συμπερασματικά είναι απαραίτητη μια τέτοια αναμονή πριν τη λήψη του φάσματος με σκοπό τη βελτιστοποίηση αντικειμενικότητας της μεθοδολογίας συνδυαστικά με την καθαρότητα σήματος διότι για κάποια σημεία το σήμα δίχως διαβροχή δεν έδινε αρκετή πληροφορία. Ύστερα από σάρωση του δείγματος τα περισσότερα φάσματα είχαν παρόμοια μορφολογία με αυτή της εικόνας 27 (Spot 1). Κάποια πορτοκαλί σημεία διαφοροποιήθηκαν αρκετά φασματικά. Τα φάσματα της γενικότερης καφέ σκούρας κρούστας φάνηκαν να έχουν κοινή μορφολογία φασμάτων LED – IF (Εικ. 32 δεξιά) και επιλέχθηκε η συγκεκριμένη ευρύτερη περιοχή προς καθαρισμό. Συνεπώς, το μοντέλο δεξιά



Εικ. 32 – Φάσματα πορτοκαλί περιοχών (δεξιά) και περιοχών σκούρας καφέ κρούστας (αριστερά).

#### Μετά τον καθαρισμό:

Στη συγκεκριμένη ενότητα παρουσιάζονται ενδεικτικές τιμές πυκνότητας ενέργειας που δοκιμάστηκαν σε περιοχές του δείγματος με όσο το δυνατόν ομοιόμορφη κρούστα για συγκρίσιμα αποτελέσματα. Παρατηρήθηκε ότι μετά από κάθε καθαρισμό, λόγω της ανομοιομορφίας και του πορώδους του υποκείμενου υλικού, καθώς και πιθανό λόγω της ανομοιογενούς και επιλεκτικής διάβρωσης του από τις επικαθίσεις δεν ήταν δυνατό ένα αποτέλεσμα καθαρισμού. Αντιθέτως εμφανίστηκαν συγκεκριμένα σημεία τα οποία παρά τους πολλούς παλμούς και τη συχνή διαβροχή δεν ήταν ικανά να φωτοαποδομηθούν επαρκώς.



Εικ. 33 – Πριν και μετά τον καθαρισμό πράσινα πλαίσια – ομοιογενής κρούστα – magenta πλαίσιο. Καθαρισμός με 532 nm, ροζ πλαίσια – καθαρισμός με 1064 nm, πορτοκαλί πλαίσια – συνδυασμός 532 και 1064 nm

Κάθε ενδεικτική περίπτωση συνοδεύεται από το φάσμα φθορισμού LED – IF μαζί με τις προσαρμοσμένες καμπύλες fitting μέσω των οποίων υπολογίζεται ο λόγος R. (βλέπε

Παράρτημα ΙΙ)

# Καθαρισμός - Δέσμη 532 nm

```
Πυκνότητα Ενέργειας F = 1.1 \text{ J/cm}^2
```

Περιοχή **Α** – **Διαβροχή** λίγο **πριν** αρχίσει η ακτινοβόληση. **Παλμοί** ανά σημείο περίπου **20** συμπεριλαμβάνοντας αλληλοεπικάλυψη. Αφαίρεση κρούστας χωρίς να εμφανιστεί ιδιαίτερα το υποκείμενο στρώμα.

Περιοχή **Β** – Διαβροχή λίγο πριν και ενδιάμεσα της ακτινοβόλησης (συνολικά **3 φορές**). Παλμοί ανά σημείο περίπου **50** συμπεριλαμβάνοντας αλληλοεπικάλυψη. Αφαίρεση αρκετής κρούστας με εμφάνιση του λευκού υποκείμενου στρώματος με κάποια υπολείμματα.



Εικ. 34 - a) φωτογραφία ψηφιακού μικροσκοπίου καθαρισμένης περιοχής, b) φάσμα LED – IF σημείο A2, c) φάσμα LED – IF σημείο B3

Παρατηρείται από τη φωτογραφία και τα φάσματα που λήφθηκαν ότι η περιοχή Β είναι εν γένει λιγότερο εποικισμένη από την Α το οποίο επιβεβαιώνεται και από τα φάσματα φθορισμού. Για παράδειγμα το σημείο Α2 συνεχίζει να φθορίζει στην περιοχή της χλωροφύλλης με τις δύο γνωστές κορυφές λόγω ελάχιστης φωτοαποδόμησης της κρούστας. Το σημείο B3 έχει πολύ υψηλό σήμα φθορισμού στο εύρος των 500-580 nm το οποίο εξασθενεί στην περιοχή της χλωροφύλλης.

### Πυκνότητα Ενέργειας $F = 1.6 \text{ J/cm}^2$

Περιοχή **Α** – **Διαβροχή** λίγο **πριν** αρχίσει η ακτινοβόληση. **Παλμοί** ανά σημείο περίπου **10** συμπεριλαμβάνοντας αλληλοεπικάλυψη. Αφαίρεση κρούστας χωρίς να εμφανιστεί ιδιαίτερα το υποκείμενο στρώμα.

Περιοχή **Β** – Διαβροχή λίγο πριν και ενδιάμεσα της ακτινοβόλησης (συνολικά 2 φορές). Παλμοί ανά σημείο περίπου 40 συμπεριλαμβάνοντας αλληλοεπικάλυψη. Αφαίρεση αρκετής κρούστας με εμφάνιση του λευκού υποκείμενου στρώματος με εμφανή υπολείμματα



Εικ. 35 - a) φωτογραφία ψηφιακού μικροσκοπίου καθαρισμένης περιοχής, b) φάσμα LED – IF σημείο A1, c) φάσμα LED – IF σημείο B1

Παρατηρείται από τη φωτογραφία και τα φάσματα που λήφθηκαν ότι η περιοχή Β είναι εν γένει λιγότερο εποικισμένη από την Α το οποίο επιβεβαιώνεται και από τα φάσματα φθορισμού. Για παράδειγμα το σημείο Α1 συνεχίζει να φθορίζει στην περιοχή της χλωροφύλλης με τις δύο γνωστές κορυφές. Το σημείο B2 έχει πολύ υψηλό σήμα φθορισμού στο εύρος των 500-580 nm το οποίο εξασθενεί στην περιοχή της χλωροφύλλης.

Συμπερασματικά, η συχνή διαβροχή βοηθά στον καθαρισμό. Το σημείο στο οποίο η κρούστα άλλαξε χρώμα σε σχέση με το σημείο που αφαιρέθηκε επαρκώς η κρούστα βάσει φωτογραφιών επιβεβαιώνεται φασματικά με την τεχνική LED - IF. Ο λόγος R διαφέρει κατά μία τάξη μεγέθους στα δύο σημεία προς σύγκριση.

# Καθαρισμός – Δέσμη 1064 nm

#### Πυκνότητα Ενέργειας $F = 0.85 \text{ J/cm}^2$

Διαβροχή λίγο πριν και ενδιάμεσα της ακτινοβόλησης (συνολικά 2 φορές). Παλμοί ανά σημείο περίπου 20 συμπεριλαμβάνοντας αλληλοεπικάλυψη. Αφαίρεση αρκετής κρούστας με εμφάνιση του λευκού υποκείμενου στρώματος με λίγα υπολείμματα.



φάσμα LED – ΙΓ σημείο Β1

Παρατηρείται από τη φωτογραφία και τα φάσματα που λήφθηκαν ότι η περιοχή είναι εν γένει καθαρισμένη εκτός από κάποια σημεία. Για το σημείο 1 και 2 η κρούστα έχει φωτοαποδομηθεί γεγονός που επιβεβαιώνεται και από τα φάσματα φθορισμού. Έχουν έντονο σήμα φθορισμού στο εύρος των 500-580 nm το οποίο εξασθενεί στην περιοχή της χλωροφύλλης. Στο σημείο 1 της φωτογραφίας φαίνεται η επιμονή της επικάθισης στο δείγμα που έχει εισχωρήσει σε αρκετά βαθύτερο επίπεδο λόγω της πορώδους σύστασής του αλλά δεν ανιχνεύεται αντίστοιχο σήμα φθορισμού από το LED – IF. Οι τιμές του R είναι αρκετά κοντά στο μηδέν σε σχέση με άλλες περιπτώσεις.

# Καθαρισμός - Συνδυασμός δέσμεων 532 nm - 1064 nm

Αποφασίστηκε ότι αφού μεμονωμένες οι δέσμες των 532 nm και των 1064 nm αλληλεπιδρούν και αφαιρούν τουλάχιστον μέρη της κρούστας να χρησιμοποιηθεί ο συνδυασμός τους με συνεισφορά 50% από το κάθε μήκος κύματος (λόγος F<sub>1064</sub>:F<sub>532</sub> = 1:1). Ισχύει ότι F<sub>1064</sub> + F<sub>532</sub> = F<sub>total</sub>

Πυκνότητα Ενέργειας  $F_{total} = 1 \text{ J/cm}^2$  ( $F_{1064} = F_{532} = 0.5 \text{ J/cm}^2$ )

Διαβροχή ανά 20 περίπου παλμούς. Παλμοί ανά σημείο περίπου 60 συμπεριλαμβανόμενη η αλληλοεπικάλυψη. Αφαίρεση μερικής κρούστας χωρίς να εμφανιστεί ιδιαίτερα το υποκείμενο στρώμα.



Εικ. 37 - a) φωτογραφία ψηφιακού μικροσκοπίου καθαρισμένης περιοχής, b) φάσμα LED – IF σημείο 1, c) φάσμα LED – IF σημείο 2

Παρατηρείται από τη φωτογραφία και τα φάσματα που λήφθηκαν ότι η περιοχή 1 είναι εν γένει λιγότερο εποικισμένη από την 2 το οποίο επιβεβαιώνεται και από τα φάσματα φθορισμού καθώς και από τις τιμές του R. Η συνθήκη για το σημείο 1 φαίνεται να είναι μερικώς καθαρισμένη

49

αφού η χλωροφύλλη επιμένει, ενώ στο σημείο 2 έχει αφαιρεθεί ελάχιστη έως καθόλου επικάθιση.

Πυκνότητα Ενέργειας  $F_{total} = 1.2 \text{ J/cm}^2$  ( $F_{1064} = F_{532} = 0.6 \text{ J/cm}^2$ )

Διαβροχή λίγο πριν και ενδιάμεσα της ακτινοβόλησης (συνολικά 2 φορές). Παλμοί ανά σημείο περίπου 8-10 συμπεριλαμβάνοντας αλληλοεπικάλυψη. Αφαίρεση αρκετής κρούστας με εμφάνιση του λευκού υποκείμενου στρώματος με λίγα υπολείμματα.



Εικ. 38 - a) φωτογραφία ψηφιακού μικροσκοπίου καθαρισμένης περιοχής, b) φάσμα LED – IF σημείο 2, c) φάσμα LED – IF σημείο 3

Η συγκεκριμένη περίπτωση φαίνεται από τη φωτογραφία και τα φάσματα LED – IF ότι παρά τη σχετικά χαμηλή πυκνότητα ενέργειας και τους λίγους παλμούς αφαίρεσε αποτελεσματικά και σύντομα την περισσότερη κρούστα. Ο λόγος R είναι εξίσου αρκετά κοντά στο 0 συγκριτικά με τις περισσότερες συνθήκες. Πιθανόν να συμβάλλει σε αυτό το γεγονός της αρκετά λείας επιφάνειας που αποκαλύφθηκε και άρα της περισσότερο ομοιόμορφης ανακατανομής της ενέργειας αποτελεί το γεγονός ότι η ίδια συνθήκη εφαρμόστηκε

50

και σε άλλη περιοχή χωρίς να έχει τόσο ικανοποιητικά αποτελέσματα, παρά την ακτινοβόληση με ακόμα περισσότερους παλμούς.

Παρά την αύξηση της πυκνότητας ενέργειας δεν βρέθηκε η συνθήκη που θα εξαλείψει ομοιογενώς την κρούστα δίχως να προκαλέσει μεγάλη καταστροφή στο υπόστρωμα. Σκοπός εξάλλου είναι η ανάλυση σημείων μετά την ακτινοβόληση με την τεχνική LED - IF ώστε να γίνει η βαθμονόμηση του R.

Ενδεικτικά, παρουσιάζεται και η παρακάτω συνθήκη:

Πυκνότητα Ενέργειας  $F_{total} = 1.6 \text{ J/cm}^2$  ( $F_{1064} = F_{532} = 0.8 \text{ J/cm}^2$ )

Διαβροχή λίγο πριν και ενδιάμεσα της ακτινοβόλησης (συνολικά 2 φορές). Παλμοί ανά σημείο περίπου 8-10 συμπεριλαμβάνοντας αλληλοεπικάλυψη. Αφαίρεση αρκετής κρούστας με εμφάνιση του λευκού υποκείμενου στρώματος με κεντρικό υπόλειμμα που επέμενε.



Εικ. 39 - a) φωτογραφία ψηφιακού μικροσκοπίου καθαρισμένης περιοχής, b) φάσμα LED – IF σημείο 2, c) φάσμα LED – IF σημείο 3

Ύστερα από τη σύγκριση των τιμών R με τα αντίστοιχα φάσματα και φωτογραφίες αποφασίστηκε η εξής επιλογή τιμών για τη συγκεκριμένη τοιχογραφία:

Αποτελεσματικότητα αφαίρεσης κρούστας – αποκάλυψης λευκής επιφάνειας	Συνθήκη
Αποτελεσματική αφαίρεση – σήμα φθορισμού χλωροφύλλης ελάχιστο	0 < R < 0.1
Μερική αφαίρεση	$0.1 \le R \le 0.7$
Μη αποτελεσματική αφαίρεση	$R \ge 0.7$

#### Μηχανικός καθαρισμός με νυστέρι

Με αρκετή προσπάθεια αποκαλύφθηκε η λευκή υπο-επιφάνεια μετά από ξύσιμο με νυστέρι. Το φάσμα φθορισμού επιβεβαιώνει τον υψηλό φθορισμό στην περιοχή των 525 nm που εμφανίζεται μετά τον καθαρισμό με laser. Είναι λοιπόν ένα γενικό χαρακτηριστικό που δεν προκαλείται από την αλληλεπίδραση της επιφάνειας με το laser, αλλα πιθανά προϋπάρχει και χαρακτηρίζει υποκείμενο στρώμα (π.χ. προετοιμασία της τοιχογραφίας ή είναι αποτέλεσμα της επίδρασης των



μεταβολικών διεργασιών των βιολογικών).

Εικ. 40 – Φάσμα LED – ΙF περιοχής καθαρισμένης περιοχής με νυστέρι και φωτογραφίες της περιοχης με το ψηφιακο μικροσκοπιο Dino-Lite εξοπλισμενο με λευκό και UV (375nm) LED φωτισμό

# Φάσματα LED – IF από ουσίες που πιθανό να περιέχονται στην προετοιμασία της τοιχογραφίας.

Κατά την διερεύνηση πρόκλησης έντονου φθορισμού στα 520 nm λήφθηκαν φάσματα από τις εξής ουσίες που συχνά χρησιμοποιούνται σε τοιχογραφίες: SrS04, BaSO4, Ca(OH)2, και ZnO. Κανένα δεν φάνηκε να ταυτοποιείται ικανοποιητικά με το φάσμα φθορισμού της ακτινοβολημένης επιφάνειας.



Εικ. 41 – Φάσματα LED – IF από BaSO4, SrSO4, τεχνητή βάση τοιχογραφίας, Ca(OH)<sub>2</sub> και ZnO

Ενδέχεται να περιέχεται συνδυασμός αυτών μαζί με κάποιο φθορίζον συνδετικό μέσο το οποίο φθορίζει εξίσου έντονα στην συγκεκριμένη περιοχή όταν ακτινοβολείται με υπεριώδες ή μπλε φως.

# Συμπεράσματα και Μελλοντικές Μελέτες

Συνοψίζοντας προκύπτουν τα εξής συμπεράσματα.

Οι τιμές Fluence μικρότερες από 0.6 J/cm2 παρά την ελάχιστη αφαίρεση κρούστας δεν ήταν ικανές να αποκαλύψουν την υποκείμενη επιφάνεια. Από τις φωτογραφίες ψηφιακού μικροσκοπίου φαίνεται ότι σχετικά ικανοποιητικά αποτελέσματα μπορούν να ληφθούν για τιμές Fluence που ξεπερνούν τα 0.8 J/cm2. Για ακόμα μεγαλύτερες τιμές, ο καθαρισμός απαιτούσε όλο και λιγότερους παλμούς, χωρίς όμως να φωτοαποδομεί ομοιόμορφα την κρούστα καθώς σε κάποια σημεία είχε εισχωρήσει σε βαθύτερες περιοχές. Για τιμές Fluence που ξεπέρασαν τα 2.5 J/cm2 η αλληλεπίδραση με την υποκείμενη επιφάνεια που εμφανίζονταν ήταν αναπόφευκτη. Η συχνή διαβροχή κρίθηκε σημαντική για την ομοιομορφία της φωτοαποδόμησης.

Συμπερασματικά, ο βιολογικός παράγοντας σε πορώδη υλικά έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον διότι παρατηρείται μεγάλη ποικιλομορφία στον τρόπο ανάπτυξης και εξάπλωσης των μικροοργανισμών. Είναι ικανός να εισχωρήσει σε υπάρχουσες οπές ή και να δημιουργήσει νέες στο πέρασμα του. Το γεγονός αυτό μετατρέπει την εξάλειψη του σε μία αρκετά δύσκολη πρόκληση. Ο καθαρισμός με laser από μόνος του ίσως να μην είναι επαρκής. Προτείνεται η χρήση μηχανικού καθαρισμού πριν και μετά τον καθαρισμό με laser που θα αποσκοπεί στην ομαλοποίηση της κρούστας και στην τελική αφαίρεση των επίμονων υπολειμμάτων αντίστοιχα.

Ο λόγος R για τιμές μεταξύ 0 < R < 0.1 συνδέεται με την αποτελεσματική αφαίρεση της βιοπατίνας, για  $0.1 \le R < 0.7$  εκφράζει μερική αφαίρεση βιοπατίνας ενώ για τιμές μεγαλύτερες του 0.7 η φωτοαποδόμηση της βιοπατίνας είναι αναποτελεσματική. Οι τοιχογραφίες είναι μια ιδιαίτερη περίπτωση όταν πρόκειται για τη φασματική τους ανάλυση. Η μέθοδος προετοιμασίας της ζωγραφικής επιφάνειας αναμιγνύει διαφορετικά υλικά ανά τόπο και χρονική περίοδο διαφοροποιώντας το φθορισμό. Άρα δεν θα ήταν σωστή η υπόθεση ότι οι οριακές τιμές του λόγου R που υπολογίστηκαν για το θραύσμα της συγκεκριμένης εκκλησίας μπορούν να εφαρμοστούν για όλες τις τοιχογραφίες.

Η κατασκευή του λόγου R έχει μια κατεύθυνση ως προς την ποσοτικοποίηση των φασμάτων φθορισμού που θα μπορούσε να αξιοποιηθεί από ένα προηγμένο λογισμικό το οποίο βάσει της τιμής του R θα μπορεί να λαμβάνει αποφάσεις για την εξέλιξη του καθαρισμού κατά τη διάρκειά

του. Αυτό το λογισμικό μπορεί να πλαισιωθεί μέσω μηγανικής μάθησης. Για καλύτερη ακρίβεια θα μπορούσε να συνδυαστεί με το φωτοακουστικό φαινόμενο το οποίο βοηθά στη διάκριση του κρίσιμου παλμού κατά τον οποίο ξεκινά η ακτινοβόληση της επιφάνειας που αποκαλύπτεται. Σε όλες αυτές τις περιπτώσεις όμως η κρίση του συντηρητή είναι αυτή που υπερισχύει και θα πρέπει να είναι το τελικό σκέλος στη λήψη μιας απόφασης. Συνεπώς, ενώ η μηχανική μάθηση μπορεί να συμβάλει στη βελτίωση της ανάληψης αποφάσεων στον τομέα του καθαρισμού, η εξέταση και η εφαρμογή των αποτελεσμάτων απαιτεί προσεκτική αξιολόγηση και συνεργασία με ειδικούς στον τομέα, προκειμένου να διασφαλιστεί η ακρίβεια, η αξιοπιστία και η ασφάλεια των αποφάσεων που λαμβάνονται. Συμπερασματικά, οι βιολογικές αλλοιώσεις μνημείων πολιτιστικής κληρονομιάς και έργων τέχνης είναι ένα σύνθετο πρόβλημα που επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες. Ο πλήρης και παντοτινός καθαρισμός τους από το βιολογικό παράγοντα είναι ένα ιδανικό σενάριο που στις περισσότερες περιπτώσεις φαντάζει ουτοπικό. Ακόμη και αν ο καθαρισμός με laser ή με κάποιο συνδυασμό μεθόδων, όπως laser και νυστέρι, προκύψει οπτικά αποτελεσματικός, η μήτρα των εξωκυτταρικών πολυμερικών ουσιών (EPS) είναι αρκετά δύσκολο να αφαιρεθεί παντελώς, δημιουργώντας εύφορο έδαφος για την ανάπτυξη νέων αποικιών σε μικρό χρονικό διάστημα. Θα ήταν σοφό οι συντηρητές να μην επαναπαύονται και να ελέγχουν συχνά τις επιφάνειες των μνημείων με ασφαλείς και εύκολα χρησιμοποιούμενες φορητές αναλυτικές τεχνικές ως προς την ανίχνευση αποικιών όπως αποδείχθηκε ο φθορισμός επαγόμενος από LED (LED – IF).

# Βιβλιογραφία

- Rosado, T., Gil, M., Mirão, J., Candeias, A., & Caldeira, A. T. (2013). Oxalate biofilm formation in mural paintings due to microorganisms – A comprehensive study. *International*
- Pal, M. K., & Lavanya, M. (2022). Microbial Influenced corrosion: Understanding bioadhesion and biofilm formation. *Journal of Bio- and Tribo-Corrosion*, 8(3). https://doi.org/10.1007/s40735-022-00677-x
- Joseph, E. (2021). Microorganisms in the deterioration and preservation of cultural heritage. In Springer eBooks. <u>https://doi.org/10.1007/978-3-030-69411-1</u>
- Özyiğitoğlu, G. (2019). Environmental significance of lichens and biodeterioration. In *Springer eBooks* (pp. 247–277). https://doi.org/10.1007/978-981-13-6358-0\_10
- Cutler, N. A., Oliver, A., Viles, H., Ahmad, S., & Whiteley, A. S. (2013). The characterisation of eukaryotic microbial communities on sandstone buildings in Belfast, UK, using TRFLP and 454 pyrosequencing. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 82, 124–133. https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.03.010
- Maksimov, E. G., Schmitt, F. J., Tsoraev, G. V., Ryabova, A. V., Friedrich, T., & Paschenko, V. (2014). Fluorescence quenching in the lichen Peltigera aphthosa due to desiccation. *Plant Physiology and Biochemistry*, *81*, 67–73. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.01.005
- Pitt, T. L., & Barer, M. R. (2012). Classification, identification and typing of micro-organisms. In *Elsevier eBooks* (pp. 24–38). https://doi.org/10.1016/b978-0-7020-4089-4.00018-4
- 8. Biodeterioration & Biodegradation, 85, 1–7. https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.06.013
- Spribille, T., Tuovinen, V., Resl, P., Vanderpool, D., Wolinski, H., Aime, M. C., Schneider, K., Stabentheiner, E., Toome-Heller, M., Thor, G., Mayrhofer, H., Johannesson, H., & McCutcheon, J. P. (2016). Basidiomycete yeasts in the cortex of ascomycete macrolichens. *Science*, *353*(6298), 488–492. https://doi.org/10.1126/science.aaf8287
- Veerman, J., Васильев, C. B., Paton, G. D., Ramanauskas, J., & Bruce, D. (2007).
  Photoprotection in the Lichen Parmelia sulcata: The Origins of Desiccation-Induced Fluorescence Quenching. *Plant Physiology*, *145*(3), 997–1005. <u>https://doi.org/10.1104/pp.107.106872</u>
- 11. Rikkinen, J. (2005). Cyanolichens: an Evolutionary Overview. In *Kluwer Academic Publishers* eBooks (pp. 31–72). <u>https://doi.org/10.1007/0-306-48005-0\_4</u>
- Cozzolino, A., Adamo, P., Bonanomi, G., & Motti, R. (2022). The role of lichens, mosses, and vascular plants in the biodeterioration of historic buildings: a review. *Plants*, *11*(24), 3429. https://doi.org/10.3390/plants11243429

- Gaylarde, C. C., Silva, M. R., & Warscheid, T. (2003). Microbial impact on building materials: an overview. *Materials and Structures*, 36(5), 342–352. <u>https://doi.org/10.1007/bf02480875</u>
- Τραχανάς, Σ. (2007). Κβαντομηχανική Ι, Μια βασική εισαγωγή για φυσικούς, χημικούς και μηχανικούς. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης.
- Lakowicz, J. R. (2007). Principles of fluorescence spectroscopy. Springer Science & Business Media.
- Atkins, P. W., & Paula, J. De. (2014). *Atkins Φυσικοχημεία* (Γ. Κωστόπουλος, Ed.; 9th ed.). Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης.
- Wikiwand Intersystem crossing. (n.d.). Wikiwand. https://www.wikiwand.com/en/Intersystem crossing
- Stirbet, A., & Govindjee. (2012). Chlorophyll a fluorescence induction: a personal perspective of the thermal phase, the J–I–P rise. *Photosynthesis Research*, *113*(1–3), 15–61. https://doi.org/10.1007/s11120-012-9754-5
- Ruban, A. V. (2016). Nonphotochemical Chlorophyll Fluorescence Quenching: Mechanism and Effectiveness in Protecting Plants from Photodamage. *Plant Physiology*, *170*(4), 1903–1916. <u>https://doi.org/10.1104/pp.15.01935</u>
- 20. Singh, V. P., Singh, S., Tripathi, D. K., Prasad, S. M., & Chauhan, D. K. (2017). Reactive oxygen species in plants: Boon Or Bane Revisiting the Role of ROS. John Wiley & Sons.
- Latowski, D., Kuczyńska, P., & Strzałka, K. (2011). Xanthophyll cycle a mechanism protecting plants against oxidative stress. *Redox Report*, *16*(2), 78–90. <u>https://doi.org/10.1179/174329211x13020951739938</u>
- 22. Γαλάτης, Β. (2003). Φυσιολογία Φυτών: από το μόριο στο περιβάλλον.
- 23. Roy, S., Llewellyn, C. A., Egeland, E. S., & Johnsen, G. (2011). Phytoplankton pigments : characterization, chemotaxonomy and applications in oceanography. http://ci.nii.ac.jp/ncid/BB07584432

- Steffen, R. (2004). *Time-resolved spectroscopic investigations of photosystem II*. https://doi.org/10.14279/depositonce-762
- 25. Chappelle, E. W., McMurtrey, J. E., & Kim, M. S. (1991). Identification of the pigment responsible for the blue fluorescence band in the laser induced fluorescence (LIF) spectra of green plants, and the potential use of this band in remotely estimating rates of photosynthesis. *Remote Sensing of Environment*, 36(3), 213–218. https://doi.org/10.1016/0034-4257(91)90058-e
- 26. Šubr, M., Praus, P., Kočišová, E., Procházka, M., Štěpánek, J., Kuzminova, A., Kylián, O., & Sureau, F. (2020). Magnetron-Sputtered Polytetrafluoroethylene-Stabilized Silver Nanoisland surface for Surface-Enhanced fluorescence. *Nanomaterials*, 10(4), 773. https://doi.org/10.3390/nano10040773
- Islam, S. D., Susdorf, T., Penzkofer, A., & Hegemann, P. (2003). Fluorescence quenching of flavin adenine dinucleotide in aqueous solution by pH dependent isomerisation and photoinduced electron transfer. *Chemical Physics*, 295(2), 137–149. https://doi.org/10.1016/j.chemphys.2003.08.013
- 28. Giakoumaki, A., Philippidis, A., Siozos, P., Pyrri, I., Anglos, D., & Pouli, P. (2022). Development of a methodology for the characterisation and assessment of biodeteriogens on archaeological surfaces by use of a portable LED-induced fluorescence instrument. *Heritage Science*, 10(1). https://doi.org/10.1186/s40494-022-00827-x
- Maksimov, E. G., Schmitt, F. J., Tsoraev, G. V., Ryabova, A. V., Friedrich, T., & Paschenko, V. (2014). Fluorescence quenching in the lichen Peltigera aphthosa due to desiccation. *Plant Physiology and Biochemistry*, *81*, 67–73. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.01.005
- Lamb, J. J., Røkke, G., & Hohmann-Marriott, M. F. (2018). Chlorophyll fluorescence emission spectroscopy of oxygenic organisms at 77 K. *Photosynthetica*, 56(SPECIAL ISSUE), 105–124. https://doi.org/10.1007/s11099-018-0791-y

- Singh, N. K., Sonani, R. R., Rastogi, R. P., & Madamwar, D. (2015). The phycobilisomes: an early requisite for efficient photosynthesis in cyanobacteria. *PubMed*, *14*, 268–289. https://doi.org/10.17179/excli2014-723
- 32. Lognoli, D., Lamenti, G., Pantani, L., Tirelli, D., Tiano, P., & Tomaselli, L. (2002). Detection and characterization of biodeteriogens on stone cultural heritage by fluorescence lidar. *Applied Optics*, 41(9), 1780. https://doi.org/10.1364/ao.41.001780
- Osticioli, I., Mascalchi, M., Pinna, D., & Siano, S. (2014). Removal of Verrucaria nigrescens from Carrara marble artefacts using Nd:YAG lasers: comparison among different pulse durations and wavelengths. *Applied Physics A*, *118*(4), 1517–1526. https://doi.org/10.1007/s00339-014-8933-y
- Schreiner, M., Strlič, M., & Salimbeni, R. (2008). Handbook of the Use of Lasers in Conservation and Conservation Science.
- 35. Sanz, M., Oujja, M., Ascaso, C., Pérez-Ortega, S., Souza-Egipsy, V., Fort, R., De Los Ríos, A., Wierzchos, J., Cañamares, M. V., & Castillejo, M. (2017). Influence of wavelength on the laser removal of lichens colonizing heritage stone. *Applied Surface Science*, 399, 758–768. https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2016.12.032
- 36. Cooper, M. (1998). Laser cleaning in conservation: An Introduction. Routledge.
- 37. Polignosi. (n.d.). ,. www.polignosi.com. <u>http://www.polignosi.com/cgibin/hweb?-A=37352&-</u> <u>V=limmata</u>
- Mokobi, F. (2022, October 18). Digital Microscope- Definition, principle, parts, types, examples, uses. Microbe Notes. https://microbenotes.com/digital-microscope/
- Masaru, T., Kono, T., & Yamashita, N. (2011). Photoluminescence properties of gypsum. *Journal of Mineralogical and Petrological Sciences*, *106*(3), 169–174. https://doi.org/10.2465/jmps.101018b

# Παραρτήματα

# Παράρτημα Ι

### Υπολογισμός Πυκνότητας Ενέργειας

Η πυκνότητα ενέργειας ορίζεται ως  $F = \frac{E(J)}{S(cm^2)}$ . Για να υπολογιστεί η επιφάνεια αλληλεπίδρασης S ακολουθήθηκε η εξής μεθοδολογία. Για κάθε μήκος κύματος γινόταν μέτρηση της μέγιστης δυνατής ενέργειας μέσω του ενεργόμετρου. Στη συνέχεια, με τη συγκεκριμένη ενέργεια ακτινοβολείται μία φορά μαύρο φωτογραφικό χαρτί ώστε να αποτυπωθούν τα χαρακτηριστικά της δέσμης και να μετρηθεί η επιφάνεια αλληλεπίδρασης. Η επιφάνεια αντιμετωπίζεται σαν έλλειψη.



Εικ. 42 - Φωτογραφίες ψηφιακού μικροσκοπίου : Αποτύπωμα δέσμης 532 nm a) οπτικό b) UV και αποτύπωμα δέσμης 1064 nm c) οπτικό d) UV

Ο μεγάλος και ο μικρός άξονας της ελλειψοειδούς επιφάνειας επιλέγεται όπως φαίνεται στις φωτογραφίες UV στα όρια αφαίρεσης του γυαλιστερού υλικού αλλά όχι εκτός αυτών. Η αμυδρή σκίαση εκτός των ορίων πρόκειται για δευτερογενές θερμικό φαινόμενο διάχυσης και όχι άμεσης αλληλεπίδρασης με τον παλμό. (Η επιλογή αυτή γίνεται με ένα βαθμό αυθαιρεσίας, καθώς δεν βρέθηκε ακριβής μεθοδολογία υπολογισμού σε βιβλιογραφία)

Το πηλίκο της μέγιστης ενέργειας προς το εμβαδόν της έλλειψης που αποτυπώνεται στο φωτογραφικό χαρτί ορίζεται και ως η μέγιστη πυκνότητα ενέργειας. Για να μειωθεί, ελαττώνεται η ενέργεια ακτινοβόλησης και θεωρείται ότι η επιφάνεια αλληλεπίδρασης παραμένει η ίδια.

# Παράρτημα ΙΙ Προσαρμογή μοντέλου fitting στα φάσματα LED – IF

Το μοντέλο πολλαπλών κορυφών αποτελείται από τέσσερις συναρτήσεις.

- Η πρώτη είναι η συνάρτηση που προσαρμόζεται στην καμπύλη που προέρχεται από την ανάκλαση του LED. Επειδή είναι κορεσμένη η κορυφή του, η προσαρμογή της συνάρτησης γίνεται στα φτερά.
- Η δεύτερη κορυφή κατά αύξουσα τιμή μήκους κύματος ανήκει στην ευρεία ζώνη φθορισμού της υποκείμενης επιφάνειας. Δοκιμάστηκε η προσαρμογή Γκαουσιανής – Λορεντζιανής (G-L ή ψευδο-Voigt) και η προσαρμογή ασύμμετρης LogNormal. Η δεύτερη φάνηκε να προσεγγίζει καλύτερα την καμπύλη.
- Στην τρίτη και την τέταρτη κορυφή έγινε προσαρμογή Γκαουσιανής Λορεντζιανής (G-L ή ψευδο-Voigt). Η G-L όπως και η LogNormal επιλέχθηκαν διότι αναλόγως την συνεισφοράς του γκαουσιανού/λορεντζιανού προφίλ η κάθε καμπύλη μπορούσε να προσαρμοστεί αναλόγως.

Η τιμή του R<sup>2</sup>, που θεωρητικά προσεγγίζει τη μονάδα στην καλύτερη περίπτωση fitting, δεν λαμβάνει ιδανικές τιμές σε πολλές από τις περιπτώσεις διότι αναφέρεται σε ολόκληρο το φάσμα. Αυτό δεν είναι πρόβλημα αφού το σημαντικό είναι να υπολογίζονται οι κορυφές με όση ακρίβεια είναι δυνατή. Ουσιαστικά, η διαδικασία αυτή γίνεται για να μην ληφθούν εντελώς αυθαίρετα οι τιμές των κορυφών φθορισμού και όχι με σκοπό την προσέγγιση κάποιου θεωρητικού μοντέλο αποδεδειγμένο από φυσικής άποψης.



Еік. 43 - fitting