

ΚΑΤΗΓΟΡΙΟΠΟΙΗΣΗ
ΦΑΣΜΑΤΩΝ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ
ΑΠΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ
ΕΠΙΚΑΘΗΣΕΙΣ ΣΕ
ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΑ
ΑΡΧΑΙΟΛΟΓΙΚΟΥ
ΕΝΔΙΑΦΕΡΟΝΤΟΣ ΜΕ ΤΗ
ΜΕΘΟΔΟ ΤΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ
ΚΥΡΙΩΝ ΣΥΝΙΣΤΩΣΩΝ

Άννα Σκαρλατίδου

ph4905@edu.physics.uoc.gr

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	5
Abstract.....	6
Κεφάλαιο 1: Φθορισμός	7
1.1 Κανόνας της Κατοπτρικής Εικόνας.....	8
1.2 Κανόνας του Kasha	9
1.3 Μετατόπιση Stokes.....	9
1.4 Κβαντική Απόδοση Φθορισμού και Χρόνος ζωής.....	9
1.5 Απόσβεση Φθορισμού (Quenching).....	11
1.6 Αυτοφθορισμός.....	12
1.7 Φθορισμός Επαγόμενος από Λείζερ (LIF)	12
1.8 Γενική Πειραματική Διάταξη Φθορισμού Επαγόμενου από Λείζερ.....	14
1.9 Επισκόπηση Φθορισμού σε υλικά της πολιτιστικής κληρονομιάς.....	15
Κεφάλαιο 2: Ανάλυση Κυρίων Συνιστωσών (Principal Component Analysis).....	17
2.1 Ορισμός και εξαγωγή των Κυρίων Συνιστωσών.....	17
2.2 Αναπαράσταση των δειγμάτων στον υπόχωρο των Κυρίων Συνιστωσών	19
2.3 Πίνακας Συνδιασποράς vs Πίνακας Συσχέτισης.....	20
2.4 Ανάλυση πίνακα σε ιδιάζουσες τιμές (Singular Value Decomposition/SVD).....	20
2.5 Διαγράμματα.....	21
2.5.1 Διάγραμμα Scree	21
2.5.2 Διάγραμμα Δειγμάτων	22
2.5.3 Διάγραμμα Biplot	23
2.6 Επισκόπηση της ανάλυσης κυρίων συνιστωσών σε αντικείμενα αρχαιολογικού ενδιαφέροντος.....	24
2.7 Τρόποι Επεξεργασίας Φασμάτων.....	24
Κεφάλαιο 3: Είδη βιολογικών επικαθήσεων που συναντώνται στα μνημεία	26

3.1 Περιβαλλοντικοί παράγοντες στη βιοδιάβρωση των μνημείων	26
3.2 Μηχανισμοί Βιοδιάβρωσης	27
3.2.1 Βιογεωφυσική Φθορά.....	27
3.2.2 Βιογεωχημική Φθορά	27
3.2.3 Αποχρωματισμός	28
3.3 Είδη Μικροοργανισμών.....	28
3.3.1 Βακτήρια.....	29
3.3.2 Φύκη	30
3.3.3 Μύκητες.....	30
3.3.4 Λειχήνες.....	31
3.3.5 Βρύα.....	31
3.4 Φθορισμός των χρωστικών προϊόντων των μικροοργανισμών	32
Κεφάλαιο 4: Υλικά και Μέθοδοι.....	34
4.1 Πειραματική Διάταξη	34
4.2 Αντικείμενα	35
4.3 Πειραματική Διαδικασία	39
Κεφάλαιο 5: Αποτελέσματα και Συζήτηση.....	40
5.1 Ποιοτική ανάλυση φασμάτων φθορισμού.....	42
.....	46
5.1 Ανάλυση αποτελεσμάτων για την πηγή LED στα 440 nm.....	46
5.1.1 Κανονικοποίηση στο διάστημα [0,1].....	46
5.1.2 Κανονικοποίηση με τη μέγιστη τιμή	51
5.1.3 Κανονικοποίηση με το άθροισμα των εντάσεων.....	56
5.1.4 Κανονικοποίηση με την τετραγωνική ρίζα του αθροίσματος των τετραγώνων των εντάσεων	60

5.2 Ανάλυση αποτελεσμάτων για την πηγή LED στα 375 nm.....	63
5.2.1 Κανονικοποίηση στο διάστημα [0,1].....	63
5.2.2 Κανονικοποίηση με τη μέγιστη ένταση.....	68
5.2.3 Κανονικοποίηση με το άθροισμα των εντάσεων.....	72
5.2.4 Κανονικοποίηση με την τετραγωνική ρίζα του αθροίσματος των τετραγώνων των εντάσεων	76
5.3 Συγκεντρωτικός πίνακας των αποτελεσμάτων	81
5.4 Συμπεράσματα.....	83
Βιβλιογραφία	85

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω πολύ την κ. Αναστασία Γιακουμάκη για την άψογη συνεργασία μας και τη σταθερή παρουσία της στη συγγραφή αυτής της εργασίας στηρίζοντας και καθοδηγώντας με. Με την υπομονή και καλή θέληση που μου έδειξε ήρθα σε επαφή με την διαδικασία της ανάλυσης πειραματικών δεδομένων και τη συγγραφή επιστημονικής εργασίας. Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή της εργασίας μου, Καθ. Πέτρο Ρακιτζή για την υποστήριξη του, καθώς και τα άλλα δύο μέλη της επιτροπής, τον Καθ. Δημήτριο Άγγλο και τον Δρ. Πέτρο Σαμαρτζή, που μου έδωσαν πολύτιμες επιστημονικές συμβουλές.

Περίληψη

Τα αρχαιολογικά και ιστορικά μνημεία αποτελούν ανεκτίμητα στοιχεία της πολιτιστικής κληρονομιάς και η συντήρησή τους συνιστά κύριο μέλημα για τη διατήρηση της ιστορικής μνήμης. Η έκθεση των μνημείων στις περιβαλλοντικές και κλιματικές συνθήκες πολλές φορές οδηγεί στον σχηματισμό επικαθήσεων βιολογικής σύστασης μεταξύ άλλων, που μπορεί να προκαλέσουν σημαντικές και σε κάποιες περιπτώσεις ανεπανόρθωτες φθορές. Λόγω της μοναδικότητας των μνημείων, η έγκαιρη και έγκυρη ταυτοποίηση των επικαθήσεων αυτών είναι αναγκαία. Με τον τρόπο αυτό, οι συντηρητές και άλλοι επιστήμονες θα μπορούν να δράσουν στοχευμένα και άμεσα για την απομάκρυνση ή άλλου είδους αντιμετώπιση αυτών των επικαθήσεων. Η ανάπτυξη και εφαρμογή διαγνωστικών τεχνικών που δε θέτουν σε κίνδυνο την ακεραιότητα του μνημείου και διέπονται από χαρακτηριστικά, όπως η μη-καταστρεπτικότητα, η δυνατότητα in-situ ανάλυσης και η απουσία δειγματοληψίας είναι απαραίτητη. Μια τεχνική που πληρεί αυτές τις προϋποθέσεις είναι και η φασματοσκοπία φθορισμού, η οποία δύναται να ταυτοποιήσει βιολογικές επικαθήσεις, στις οποίες εστιάζει η παρούσα εργασία.

Η παρούσα εργασία επικεντρώνεται στη χρήση της Ανάλυση Κυρίων Συνιστωσών (ΑΚΣ/PCA-Principal Component Analysis) σε φάσματα φθορισμού τα οποία καταγράφηκαν με μια φορητή διάταξη φασματοσκοπίας φθορισμού επαγόμενου από πηγή LED (LED-IF) με απώτερο σκοπό τον διαχωρισμό βιολογικών επικαθήσεων που απαντώνται σε θραύσματα δομικών υλικών (λίθοι, κεραμικά, κονιάματα) σε αρχαία και ιστορικά μνημεία του Ελλαδικού χώρου. Η ΑΚΣ κατασκεύασε ένα νέο σύστημα συντεταγμένων, τις Κύριες Συνιστώσες, και αναπαρέστησε τα αρχικά πολυδιάστατα φάσματα σε δυο ή τρεις μόνο διαστάσεις διατηρώντας τη μέγιστη δυνατή πληροφορία. Έτσι, έγινε δυνατή η παρατήρηση ομαδοποιήσεων των δειγμάτων μας βάσει της χλωροφύλλης (που προέρχεται από φύκη, βρύα ή και κυανοβακτήρια) και της αλλοφυκοκυανίνης (που προέρχεται μόνο από κυανοβακτήρια) σε 2 από τα 4 μοντέλα, ενώ τα άλλα 2 δεν έδειξαν τόσο ικανοποιητικές ομαδοποιήσεις.

Abstract

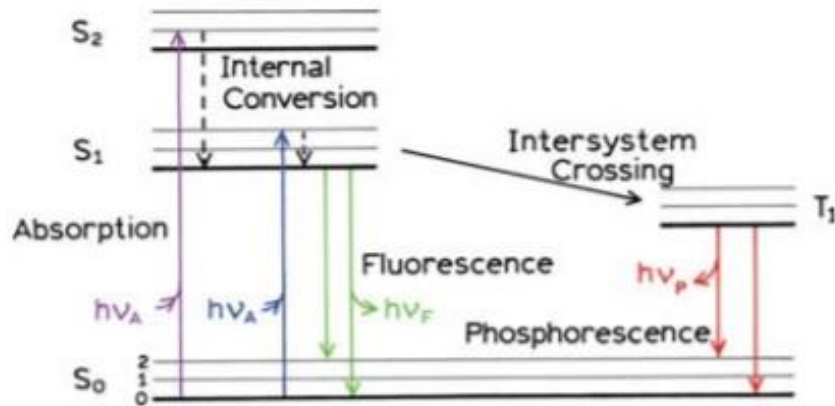
Archaeological and historical monuments are integral and valuable parts of our cultural heritage and their preservation is of major importance for the maintenance of the historical memory. The exposure of such monuments to environmental and climatic conditions often results in growth of substances of biological nature, among others, on their surfaces, which have a detrimental effect on the integrity of the monument and in some cases, cause irreversible damage to it. Due to the monuments' unique nature, the valid and timely identification of such deteriorogens is necessary. In that way, restorers and other scientists will be able to take the correct steps towards their treatment. The development and application of diagnostic techniques that are characterized by non-destructiveness, the ability of in situ analysis and the lack of sampling is essential. Such technique that meets these requirements is fluorescence spectroscopy, which can identify different types of biodeteriogens.

In the present work, Principal Component Analysis (PCA) was applied on fluorescence spectra, which were recorded with a portable spectrofluorimeter using a LED as excitation source (LED-IF), with the intention of distinguishing among biodeteriogens that are present on fragments of building materials (stones, ceramics, mortars) of ancient and historical monuments in Greece. PCA constructed a new coordinate system called the Principal Components, and projected the original multivariate spectra onto only two or three dimensions while preserving the maximum possible amount of information. Consequently, we were able to observe groupings among our samples based on the presence of chlorophyll (which is present in algae, moss or cyanobacteria) and allophycocyanin (present only in cyanobacteria) in two out of four models, while the other two didn't show satisfactory classification.

Κεφάλαιο 1: Φθορισμός

Φωταύγεια (luminescence) είναι η αυθόρμητη εκπομπή φωτός που δεν προέρχεται από θέρμανση.^[1] Υπάρχουν πολλών ειδών διαδικασίες φωταύγειας, όπως είναι η **φωτοφωταύγεια (photoluminescence)**. Στη διαδικασία της φωτοφωταύγειας, το μόριο ακτινοβολείται με φως και απορροφά φωτόνια με κατάλληλη ενέργεια με αποτέλεσμα την κατάληψη των διεγερμένων δονητικών καταστάσεων, που στη συνέχεια αποδιεγείρονται σε χαμηλότερες δονητικές καταστάσεις^[2]. Όταν η αποδιέγερση οδηγεί σε εκπομπή φωτονίων, τότε οφείλεται σε δύο φαινόμενα: το φθορισμό ή το φωσφορισμό.^[3]

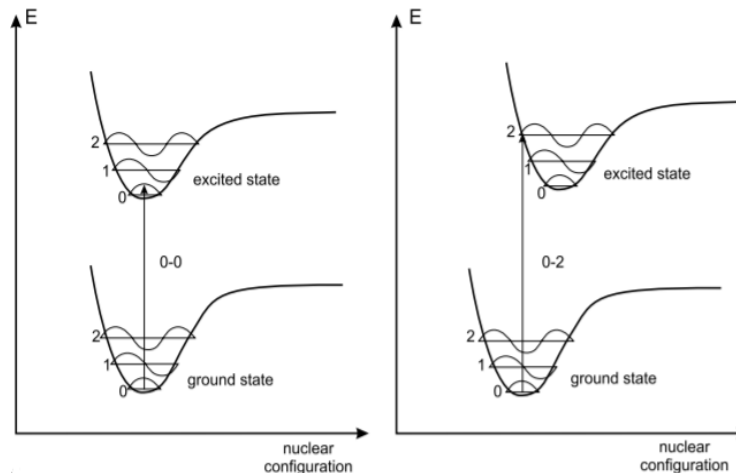
Όπως φαίνεται στο παρακάτω Σχήμα, το μόριο απορροφά στιγμιαία φωτόνια με την κατάλληλη συχνότητα συντονισμού και προάγεται από τη θεμελιώδη μονή στάθμη S_0 στην πρώτη ή δεύτερη διεγερμένη ηλεκτρονιακή μονή στάθμη S_1 ή S_2 σε οποιαδήποτε δονητική κατάσταση. Στις περισσότερες περιπτώσεις το μόριο χαλαρώνει από τη S_2 στη χαμηλότερη δονητική κατάσταση της S_1 μέσω μιας μη-ακτινοβολικής διαδικασίας, που ονομάζεται εσωτερική μετατροπή σε χρόνο $t=10^{-12}s$, και στη συνέχεια, αποδιεγείρεται σε κάποια δονητική κατάσταση της S_0 με εκπομπή φωτονίου. Αυτή η διαδικασία ονομάζεται φθορισμός με τυπικούς χρόνους ζωής μερικά νανοδευτερόλεπτα ($\tau_f=10^{-8}s$). Η διαφορά του με το φωσφορισμό έγκειται στους κανόνες επιλογής των μεταβάσεων, πιο συγκεκριμένα για να παρατηρηθεί φωσφορισμός, το μόριο περνάει από την μονή κατάσταση S_1 στην τριπλή T_1 μέσω δια-συστημικής διασταύρωσης και από εκεί αποδιεγείρεται στη S_0 με πιο αργούς ρυθμούς από τον φθορισμό ($\tau_p=10^{-3}-10^0s$), επειδή είναι απαγορευμένη η μετάβαση. Ο φθορισμός περιγράφεται από τους εξής κανόνες: τον κανόνα της κατοπτρικής εικόνας, τον κανόνα του Kasha και τη μετατόπιση Stokes οι οποίοι περιγράφονται στη συνέχεια.^[3]



Σχήμα 1 Διάγραμμα Jablonski ^[3]

1.1 Κανόνας της Κατοπτρικής Εικόνας

Σύμφωνα με την προσέγγιση Born-Oppenheimer, ο πυρήνας του μορίου μπορεί να θεωρηθεί ακίνητος σχετικά με την κίνηση των ηλεκτρονίων, λόγω της μεγάλης διαφοράς των μαζών τους. Έτσι, οι διεγέρσεις των ηλεκτρονίων σε στάθμες υψηλότερης ενέργειας συμβαίνουν σε χρόνους $t=10^{-15}$ s, που είναι πολύ μικροί συγκριτικά με την κίνηση του πυρήνα ($t=10^{-10}$ - 10^{-12} s) και άρα, θεωρείται πως η προαγωγή των ηλεκτρονίων συμβαίνει χωρίς κάποια αλλαγή στην θέση του πυρήνα. Αυτή είναι η αρχή Franck-Condon και έπεται ότι τα δονητικά επίπεδα των διεγερμένων καταστάσεων μοιάζουν με αυτά της θεμελιώδους με αποτέλεσμα το φάσμα εκπομπής του μορίου να είναι κατοπτρική εικόνα του φάσματος απορρόφησης. ^{[3],[4]}



Σχήμα 2 Αρχή Franck-Condon. Οι μεταβάσεις γίνονται χωρίς σημαντική αλλαγή στην θέση του πυρήνα.^[4]

1.2 Κανόνας του Kasha

Αφού το ηλεκτρόνιο του μορίου διεγερθεί σε υψηλότερη ηλεκτρονιακή και δονητική κατάσταση, η επιπλέον ενέργεια διαχέεται με αποτέλεσμα το φθοροφόρο να καταλήξει στη χαμηλότερη δονητική κατάσταση της διεγερμένης ηλεκτρονιακής, S_1 . Αυτή η χαλάρωση γίνεται σε χρόνο $t=10^{-12}$ s και είναι αποτέλεσμα της δυνατής αλληλοεπικάλυψης πολλών καταστάσεων με σχεδόν ίση ενέργεια. Λόγω αυτής της χαλάρωσης, τα φάσματα εκπομπής είναι συνήθως ανεξάρτητα από το μήκος κύματος της διεγείρουσας ακτινοβολίας.^[3]

1.3 Μετατόπιση Stokes

Το εκπεμπόμενο φωτόνιο έχει μεγαλύτερο μήκος κύματος, (και συνεπώς μικρότερη ενέργεια) από αυτό που απορροφήθηκε. Αυτό οφείλεται σε μη – ακτινοβολικές διαδικασίες που λαμβάνουν χώρα στο μεσοδιάστημα διέγερσης – αποδιέγερσης με αποτέλεσμα την απώλεια ενέργειας ως θερμότητα.^{[2],[3]}

1.4 Κβαντική Απόδοση Φθορισμού και Χρόνος ζωής

Κβαντική απόδοση φθορισμού είναι ο αριθμός των εκπεμπόμενων φωτονίων προς τον αριθμό των φωτονίων που απορροφήθηκαν.

$$Q = \frac{\# \text{ emitted photons}}{\# \text{ absorbed photons}} = \frac{\Gamma}{\Gamma + k_{nr}} \quad (1.1)$$

όπου Γ = ρυθμός εκπομπής φωτονίων [s^{-1}], k_{nr} = ρυθμός μη – ακτινοβολικών διαδικασιών.

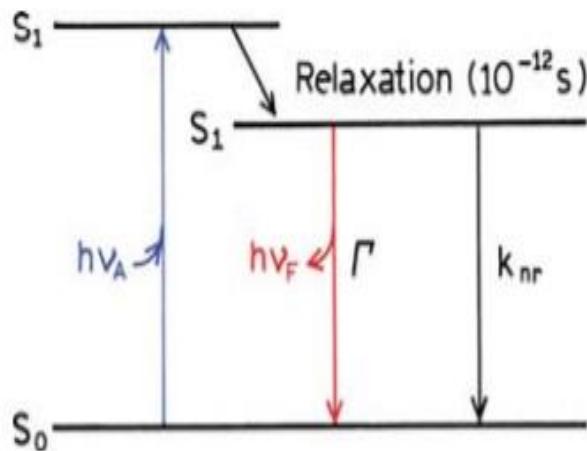
Η απόδοση Q παίρνει τιμές μικρότερες της μονάδας ($Q < 1$) και όσο περισσότερο πλησιάζει τη μονάδα, τόσο πιο έντονα θα εκπέμπει το μόριο^[3] και τόσο πιο εύκολη θα είναι η παρατήρηση και μελέτη του.

Η θερμοκρασία έχει επίδραση στην απόδοση, καθώς η αύξηση της εντείνει τις μη – ακτινοβολικές διαδικασίες, όπως κρούσεις, κινήσεις του μορίου, με αποτέλεσμα τη μείωση της απόδοσης.^[4]

Ο χρόνος ζωής φθορισμού τ_f είναι ο μέσος χρόνος που περνά το μόριο στη διεγερμένη κατάσταση πριν αποδιεγερθεί στην θεμελιώδη.

$$\tau_f = \frac{1}{\Gamma + k_{nr}} \quad (1.2)$$

ενώ αν $k_{nr}=0$, τότε $\tau_n = \frac{1}{\Gamma}$ ο φυσικός χρόνος ζωής. Στο Σχήμα 3 αναπαρίστανται σχηματικά ο χρόνος ζωής και η κβαντική απόδοση φθορισμού.^[3] Ο τ_f είναι μεγάλης σημασίας, καθώς καθορίζει το παράθυρο παρατήρησης δυναμικών φαινομένων του φθορίζοντος μορίου.^[4]



Σχήμα 3 Διάγραμμα Jablonski για την απεικόνιση της κβαντικής απόδοσης φθορισμού και του χρόνου ζωής^[3]

1.5 Απόσβεση Φθορισμού (Quenching)

Η απόσβεση φθορισμού συνδέεται με τη μείωση της έντασης του φθορισμού μέσω διάφορων μηχανισμών και χωρίζεται σε δυναμική ή στατική.

Η δυναμική απόσβεση αφορά τη σύγκρουση του φθοροφόρου με μόρια – αποσβεστές (quenchers) κατά το χρονικό διάστημα που το μόριο βρίσκεται στη διεγερμένη φάση, με το μοριακό οξυγόνο O_2 ανάμεσα τους ως πιο δραστικό. Απόρροια του φαινομένου αυτού είναι η αποδιέγερση του μορίου στη θεμελιώδη χωρίς να παρατηρηθεί φθορισμός. Είναι χρονοεξαρτημένη διαδικασία και περιγράφεται από την εξίσωση Stern – Volmer:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_q \tau_o [Q] \quad (1.3)$$

όπου F και F_0 είναι οι εντάσεις με την παρουσία και απουσία αποσβεστή αντίστοιχα, ο k_q είναι ο συντελεστής διμοριακής απόσβεσης, τ_o είναι ο χρόνος ζωής του φθοροφόρου απουσία του αποσβεστή και τέλος, $[Q]$ είναι η συγκέντρωση του αποσβεστή.

Επίσης, ισχύει η σχέση:

$$\frac{\tau_o}{\tau_f} = 1 + k_q \tau_o [Q] \quad (1.4)$$

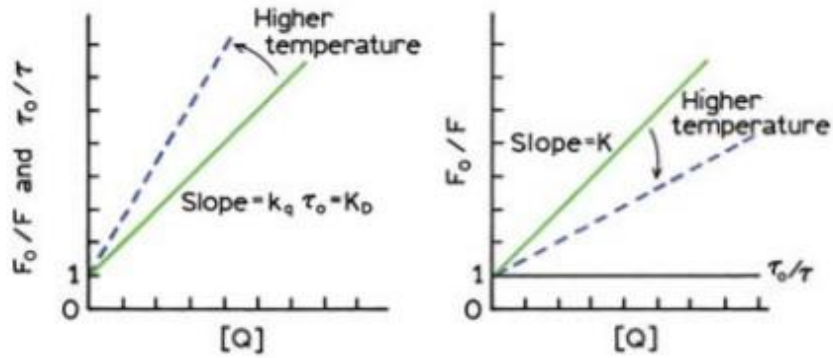
Όπως φαίνεται, ο χρόνος ζωής φθορισμού και η ένταση μειώνονται με την αύξηση του $[Q]$. Υψηλές θερμοκρασίες οδηγούν σε εντονότερη κίνηση των μορίων, δηλαδή πιο γρήγορη διάχυση και άρα, σε περισσότερες συγκρούσεις.

Η στατική απόσβεση φθορισμού είναι φαινόμενο που παρατηρείται όταν, το φθοροφόρο και ο αποσβεστής σχηματίζουν ένα μη φθορίζον σύμπλοκο, το οποίο βρίσκεται στη θεμελιώδη κατάσταση, που μετά την απορρόφηση φωτός αποδιεγείρεται αμέσως στην αρχική στάθμη χωρίς την εκπομπή φωτονίου. Περιγράφεται από την εξίσωση:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_s [Q] \quad (1.5)$$

όπου $K_s = \frac{[F-Q]}{[F][Q]}$ είναι η σταθερά στατικής απόσβεσης και εξαρτάται από τις συγκεντρώσεις του φθοροφόρου και του αποσβεστή.

Ο χρόνος ζωής φθορισμού δε μεταβάλλεται, καθώς η στατική απόσβεση είναι διαδικασία που αφορά τη θεμελιώδη κατάσταση. Τέλος, η αύξηση της θερμοκρασίας τη μετριάξει λόγω διάσπασης των συμπλόκων.^[3]



Σχήμα 4 Δυναμική και Στατική απόσβεση φθορισμού^[3]

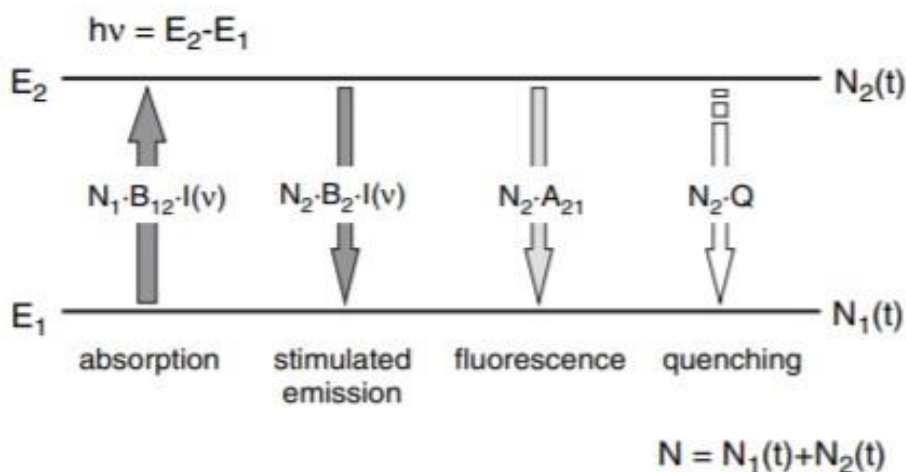
1.6 Αυτοφθορισμός

Ο αυτοφθορισμός είναι ο φθορισμός που προέρχεται από βιολογικές ουσίες.^[5] Οι ουσίες αυτές ονομάζονται φθοροφόρα και μερικές από αυτές είναι η χλωροφύλλη, τα αρωματικά αμινοξέα, το NADH, το κολλαγόνο κ.α. Ο αυτοφθορισμός αποτελεί ένα χρήσιμο εργαλείο για τη μελέτη μη φθορίζοντων ή πολύ ασθενώς φθορίζοντων ουσιών, όπως το DNA και τα λιπίδια, δεσμεύοντας και σημαδεύοντας τις με φθοροφόρα (fluorescent probes). Παράλληλα, τα φθοροφόρα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες, οι οποίοι ανάλογα με τις οπτικές ιδιότητες τους δεσμεύουν συγκεκριμένες ουσίες ενδιαφέροντος, που είναι δύσκολο να μελετηθούν φασματοσκοπικά και φανερώνουν πληροφορίες για λ.χ. τη συγκέντρωσή τους.^[3] Ωστόσο, ο αυτοφθορισμός ενδέχεται να υπερσκιάσει ή να συγχυστεί με φθορισμό που προκαλείται από τεχνητά φθοροφόρα.^[5]

1.7 Φθορισμός Επαγόμενος από Λείζερ (LIF)

Πολλές τεχνικές φασματοσκοπίας βασίζονται στο φαινόμενο του φθορισμού (π.χ. φθορίζων *in situ* υβριδισμός (FISH), κυτταρομετρία ροής)^[2] με εφαρμογές σε πολλούς επιστημονικούς κλάδους, όπως στη βιολογία, στην ιατρική, σε ελέγχους ποιότητας αλλά και στην πολιτιστική

κληρονομιά^[6]. Μια διαδεδομένη φασματοσκοπική τεχνική είναι ο φθορισμός επαγόμενος από λέιζερ, κατά την οποία ένα δείγμα ακτινοβολείται με φως από μια πηγή λέιζερ συγκεκριμένης συχνότητας/μήκους κύματος, απορροφούνται φωτόνια διεγείροντας το και στη συνέχεια, το δείγμα αποδιεγείρεται στη θεμελιώδη κατάσταση μέσω ακτινοβολικών διαδικασιών, όπως ο φθορισμός και η εξαναγκασμένη εκπομπή, και μη-ακτινοβολικών διαδικασιών, όπως οι αποσβέσεις. Στην παρακάτω εικόνα εξηγείται η διαδικασία με απλό τρόπο^[7]. Σε ένα σύστημα δύο ενεργειακών επιπέδων με πυκνότητες πληθυσμών N_1 για τη θεμελιώδη και N_2 για τη διεγερμένη απορροφούνται φωτόνια με ενέργεια $h\nu = E_2 - E_1$ με ρυθμό απορρόφησης $N_1 \cdot B_{12} \cdot I(\nu)$, όπου B_{12} =συντελεστής Einstein για απορρόφηση, $I(\nu)$ =πυκνότητα ενέργειας στην συχνότητα ν . Η αποδιέγερση στη θεμελιώδη γίνεται είτε με φθορισμό (ή αλλιώς αυθόρμητη εκπομπή) με ρυθμό $N_2 \cdot A_{21}$, όπου A_{21} =συντελεστής Einstein φθορισμού, είτε με εξαναγκασμένη εκπομπή με ρυθμό $N_2 \cdot B_2 \cdot I(\nu)$, όπου B_2 =συντελεστής Einstein εξαναγκασμένης εκπομπής^[8] είτε λόγω αποσβέσεων με ρυθμό $N_2 \cdot Q$.



Σχήμα 5 Αλληλεπίδραση ύλης-φωτός^[7]

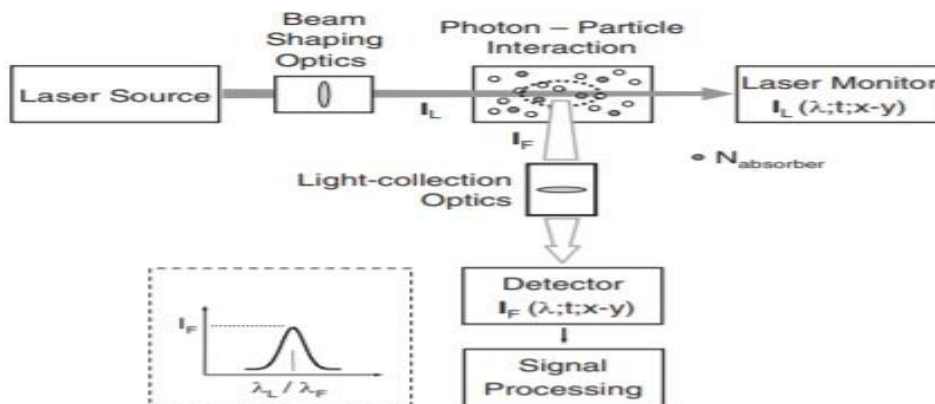
Πιο ειδικά, μερικά από τα πλεονεκτήματα της τεχνικής LIF είναι η μη επεμβατικότητα, καθώς πραγματοποιείται στην επιφάνεια του δείγματος, αλλά και η μη καταστρεπτικότητα, διότι δεν είναι αναγκαία η εκ των προτέρων προετοιμασία ή δειγματοληψία του εξεταζόμενου δείγματος. Παράλληλα, μπορεί να εφαρμοσθεί *in situ*, γεγονός που την καθιστά κατάλληλη για την ανάλυση πολύτιμων και μοναδικών αντικειμένων, όπως είναι αυτά της πολιτιστικής κληρονομιάς (μνημεία, λίθοι, πίνακες κτλ.). Το λέιζερ λόγω της μονοχρωματικότητας του δίνει τη δυνατότητα της

επιλεκτικής διέγερσης για τη στοχευμένη ανίχνευση συγκεκριμένων ειδών, έχει μεγάλο signal-to-noise ratio (SNR) ακόμα και σε μικρές ποσότητες του αναλυτή, και η κατευθυντικότητα της δέσμης καθιστά εφικτή την τοπική ή εξ αποστάσεως ανάλυση ενός δείγματος.^{[6],[9],[10]}

Ωστόσο, υπάρχουν και άλλες πηγές φωτός που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την επαγωγή φθορισμού, όπως οι δίοδοι εκπομπής φωτός (Light-Emitting Diode/LED), που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία. Αποτελούνται από συνδυασμό στερεών ημιαγωγών που σχηματίζουν επαφή pn και η επανασύνδεση ηλεκτρονίων-οπών οδηγεί στην εκπομπή φωτός, το μήκος κύματος του οποίου εξαρτάται από το ενεργειακό χάσμα του ημιαγωγού ($E_{\text{photon}} = hf \approx E_{\text{gap}}$). Τις τελευταίες δεκαετίες έχει σημειωθεί μεγάλη εξέλιξη στην τεχνολογία τους καλύπτοντας ένα ευρύ φάσμα, από βαθύ υπεριώδες (DUV, $\lambda < 300\text{nm}$) μέχρι υπέρυθρο (IR, $\lambda > 700\text{nm}$). Οι λάμπες LED, κυρίως αυτές στο κοντινό υπεριώδες και στο μπλε, χρησιμοποιούνται ως εναλλακτική για την επαγωγή φθορισμού, αφού έχουν μεγάλη διάρκεια ζωής, υψηλή εξωτερική κβαντική απόδοση και απόδοση ισχύος και σταθερότητα λειτουργίας. Η επιλογή της κατάλληλης λάμπας LED εξαρτάται από την αναλυόμενη ουσία, αφού κάθε φθοροφόρο έχει ξεχωριστή συχνότητα διέγερσης. Για να είναι περισσότερο αποτελεσματική η ανίχνευση ενός φθοροφόρου επιλέγονται λάμπες LED ή διατάξεις LED με στενό φασματικό εύρος (FWHM) ή χρησιμοποιούνται φίλτρα διέλευσης συχνοτήτων αποκόβοντας τα μήκη κύματος που δεν είναι ωφέλιμα μειώνοντας το θόρυβο κι επιτυγχάνοντας υψηλότερο SNR.^[11]

1.8 Γενική Πειραματική Διάταξη Φθορισμού Επαγόμενου από Λείζερ

Ανάλογα με τον στόχο του πειράματος, απαιτούνται προσαρμογές στην πειραματική διάταξη, αλλά μια τυπική διάταξη φαίνεται στο επόμενο σχήμα:



Σχήμα 6 Γενική Πειραματική Διάταξη του Φθορισμού Επαγόμενου από Λείζερ

Αρχικά, το λέιζερ αποτελεί ένα από τα κύρια συστατικά της διάταξης, αφού είναι η πηγή φωτός που χρειάζεται για τη διέγερση της εξεταζόμενης χημικής ένωσης. Υπάρχουν πολλών ειδών λέιζερ που μπορούν να χρησιμοποιηθούν, όπως είναι τα συνεχή ή τα παλμικά, ανάλογα με τις ανάγκες του πειράματος. Για τη διαμόρφωση της δέσμης χρησιμοποιούνται οπτικά μέσα, όπως συγκλίνοντες φακοί, που εστιάζουν την δέσμη λέιζερ στο επιθυμητό σημείο και συντελούν στην αύξηση της πυκνότητας ενέργειας (energy density), η οποία βοηθάει στην αυξημένη διέγερση του φθοροφόρου. Παράλληλα, χρησιμοποιούνται κάτοπτρα για την αλλαγή κατεύθυνσης της δέσμης όπου είναι αυτό επιθυμητό. Το σήμα φθορισμού συλλέγεται από ανιχνευτές φωτός, πιο συγκεκριμένα φωτοπολλαπλασιαστές ή φωτοδιόδους, και στη συνέχεια, το σήμα επεξεργάζεται από ειδικά λογισμικά και λαμβάνονται τα φάσματα σε ηλεκτρονικό υπολογιστή. Στη διάταξη είναι πιθανόν να περιλαμβάνονται μετρητές ισχύος και μήκους κύματος, αλλά και χωρικοί και χρονικοί αναλυτές της δέσμης λέιζερ.^[7]

1.9 Επισκόπηση Φθορισμού σε υλικά της πολιτιστικής κληρονομιάς

Ειδικά για την ανάλυση υλικών σε αντικείμενα πολιτιστικής κληρονομιάς, οι τεχνικές που εφαρμόζονται είναι σημαντικό να διέπονται από μια σειρά ιδιαίτερων χαρακτηριστικών, όπως η μη-καταστρεπτικότητα, η δυνατότητα εφαρμογής τους *in situ* και η απουσία δειγματοληψίας μεταξύ άλλων. Αρκετές είναι οι τεχνικές που υπακούουν σε αυτές τις προϋποθέσεις, όπως η φασματοσκοπία φθορισμού, η φασματοσκοπία Raman και η φασματοσκοπία ακτίνων X (XRF). Μια τεχνική που βασίζεται στον φθορισμό είναι ο Φθορισμός επαγόμενος από Λείζερ (LIF) σε συνδυασμό με LIDAR, κατά την οποία ένα δείγμα αναλύεται εξ αποστάσεως με τη χρήση παλμικού λέιζερ κατάλληλου μήκους κύματος. Το σήμα φθορισμού συλλέγεται από ένα τηλεσκόπιο και στη συνέχεια, εισέρχεται σε φασματογράφο με υψηλή διακριτική ικανότητα.^[12] Τις πρώτες εφαρμογές αυτής της διάταξης ηγήθηκε ομάδα Ιταλών ερευνητών πριν 20 χρόνια περίπου και έγιναν μετρήσεις στις προσόψεις του Βαπτιστηρίου και του Καθεδρικού ναού στην Πάρμα της Ιταλίας, όπου τα φάσματα φθορισμού φάνέρωσαν πληροφορίες για τη σύνθεση των επιστρώσεων των μνημείων, αλλά και την παρουσία βιολογικών επικαθήσεων.^[13] Λίγα χρόνια αργότερα, η ίδια τεχνική εφαρμόστηκε στην πρόσοψη του Καθεδρικού ναού στην πόλη Λουντ της Σουηδίας.^[14] Ακόμα, χάρη στη τεχνική LIF-LIDAR, έγινε διαχωρισμός μεταξύ των πράσινων φυκών και των κυανοβακτηρίων που προκαλούν βιοδιάβρωση στα μνημεία, και εξετάστηκε η

αποτελεσματικότητα βιοκτόνων.^[15] Παράλληλα, συναντώνται όλο και περισσότερες διατάξεις που αξιοποιούν πηγές LED για την επαγωγή φθορισμού (LED-IF), καθώς χαρακτηρίζονται από μεγάλες ισχύς, υψηλή απόδοση παραγωγής μονοχρωματικού φωτός και χαμηλό κόστος, αντικαθιστώντας τις ακριβές πηγές λέιζερ.^[55] Τέτοια φορητή διάταξη LED-IF χρησιμοποιήθηκε σε εύθραυστα έργα τέχνης για την ανάλυση βαφών και συγκολλητικών ουσιών.^[56] Τέλος, η τεχνική LED-IF έχει βρει εφαρμογές στην αξιολόγηση τροφίμων, στην ταξινόμηση και αξιολόγηση ποιότητας τσαγιών^[55] και στην φρεσκάδα των μήλων^[57], καθώς και στο περιβάλλον για την ανίχνευση πιθανών επικίνδυνων αερολυμάτων.^[58]

Κεφάλαιο 2: Ανάλυση Κυρίων Συνιστωσών (Principal Component Analysis)

Η Χημειομετρία είναι το εργαλείο, που χρησιμοποιείται στην αναλυτική χημεία και πιο ειδικά στην φασματοσκοπία, και επιστρατεύει μαθηματικές μεθόδους και στατιστική για την ανάλυση χημικών πειραμάτων, που περιγράφονται από πολλαπλές μεταβλητές. Η ανάλυση γίνεται πάνω σε έναν πίνακα δεδομένων \mathbf{X} με n δείγματα και p μεταβλητές, που μπορεί να περιέχει επαναλαμβανόμενες πληροφορίες. Μια τεχνική που μειώνει τέτοιες περιττές πληροφορίες είναι η Ανάλυση Κυρίων Συνιστωσών.^[16] Η Ανάλυση Κυρίων Συνιστωσών (ΑΚΣ) είναι από τις πιο βασικές τεχνικές της στατιστικής που ανήκει στην κατηγορία της ανάλυσης συστημάτων πολλαπλών μεταβλητών. Χρησιμοποιείται για την ανάλυση συνόλων δεδομένων, των οποίων τα δείγματα περιγράφονται από μεγάλο αριθμό αλληλένδετων μεταβλητών με σκοπό την μείωση των διαστάσεων διατηρώντας, παράλληλα, τη μέγιστη δυνατή ποσότητα πληροφορίας^[17]. Αυτό επιτυγχάνεται μετασχηματίζοντας γραμμικά τις αρχικές μεταβλητές του σετ δεδομένων σε μια νέα και πολύ μικρότερη ομάδα ασυσχέτιστων μεταβλητών, που ονομάζονται Κύριες Συνιστώσες (ΚΣ) και διατηρούν την περισσότερη πληροφορία των αρχικών μεταβλητών.^[18]

2.1 Ορισμός και εξαγωγή των Κυρίων Συνιστωσών

Έστω ότι \mathbf{x} διάνυσμα που αποτελείται από p μεταβλητές. Οι Κύριες Συνιστώσες ορίζονται ως γραμμικοί συνδυασμοί των αρχικών μεταβλητών, δηλαδή $\mathbf{z}_1 = \mathbf{a}_1^T \mathbf{x}$, όπου \mathbf{a}_1 είναι διάνυσμα με p σταθερές $a_{11}, a_{12}, \dots, a_{1p}$, έτσι ώστε

$$\mathbf{a}_1^T \mathbf{x} = a_{11}x_1 + a_{12}x_2 + \dots + a_{1p}x_p = \sum_{i=1}^{i=p} a_{1i} x_i. \quad (2.1)$$

Ο εκθέτης T συμβολίζει την πράξη της αναστροφής. Με την ίδια λογική, η v -οστή ΚΣ είναι η $\mathbf{z}_v = \mathbf{a}_v^T \mathbf{x}$, έχει μέγιστη διασπορά υπό τη συνθήκη ότι είναι ασυσχέτιστη με τις προηγούμενες $[1, v-1]$ και με τις επόμενες $[v+1, p]$ ΚΣ.

Οι ΚΣ εξάγονται μαθηματικά από τον τετραγωνικό, συμμετρικό πίνακα διασποράς-συνδιασποράς $\mathbf{\Sigma}$, ο οποίος έχει ως στοιχεία του τις συνδιασπορές $\text{cov}[x_i, x_j]$ και τις διασπορές των μεταβλητών $\text{var}[x_i, x_i]$ στην κύρια διαγώνιο. Για την εύρεση της πρώτης ΚΣ κατά την οποία

μεγιστοποιείται η διασπορά $\text{var}[\mathbf{a}_1^T \mathbf{x}] = \mathbf{a}_1^T \mathbf{\Sigma} \mathbf{a}_1$, το πρόβλημα ανέρχεται σε πρόβλημα μεγιστοποίησης χρησιμοποιώντας πολλαπλασιαστές Lagrange υπό τη συνθήκη $\mathbf{a}_1^T \mathbf{a}_1 = 1$, δηλαδή,

$$\mathbf{a}_1^T \mathbf{\Sigma} \mathbf{a}_1 - \lambda_1 (\mathbf{a}_1^T \mathbf{a}_1 - 1) = 0 \quad (2.2)$$

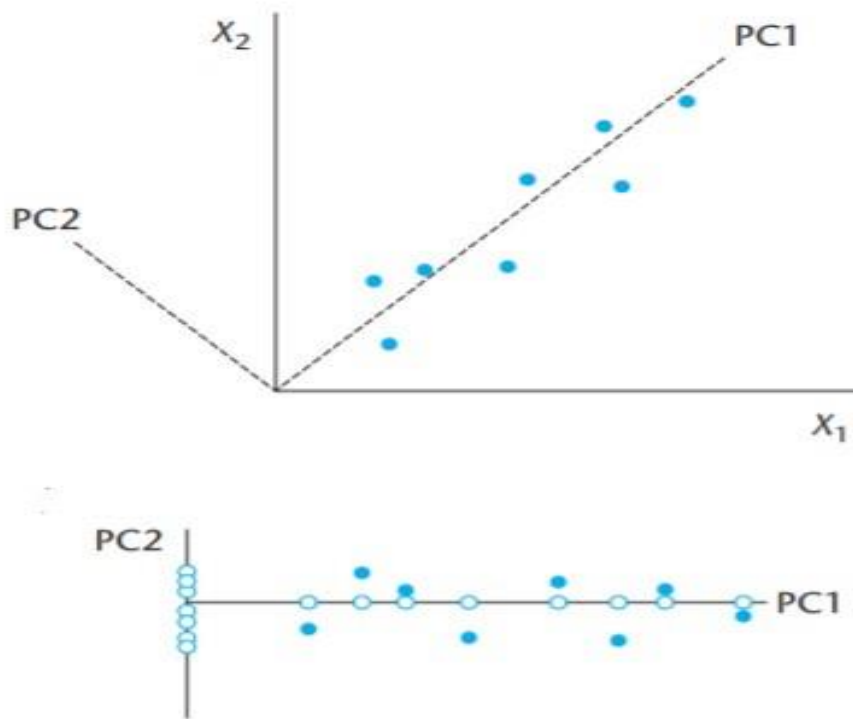
όπου λ_1 = πολλαπλασιαστής Lagrange. Διαφορίζοντας ως προς το \mathbf{a}_1^T προκύπτει ότι:

$$\mathbf{\Sigma} \mathbf{a}_1 - \lambda_1 \mathbf{a}_1 = 0 \quad (2.3) \quad \text{ή}$$

$$(\mathbf{\Sigma} - \lambda_1 \mathbf{I}) \mathbf{a}_1 = 0 \quad (2.4)$$

όπου \mathbf{I} = ταυτοτικός πίνακας. Η 2.4 είναι η χαρακτηριστική εξίσωση ιδιοτιμών και συμπεραίνουμε ότι η ποσότητα λ_1 είναι η ιδιοτιμή του πίνακα $\mathbf{\Sigma}$, ενώ το \mathbf{a}_1 το ιδιοδιάνυσμα του. Φαίνεται, λοιπόν, από την ποσότητα που θέλουμε να μεγιστοποιήσουμε ότι $\mathbf{a}_1^T \mathbf{\Sigma} \mathbf{a}_1 = \lambda_1 \mathbf{a}_1^T \mathbf{a}_1 = \lambda_1$, δηλαδή η ιδιοτιμή πρέπει να έχει τη μέγιστη δυνατή τιμή, και ότι το \mathbf{a}_1 είναι το ιδιοδιάνυσμα που αντιστοιχεί στην μέγιστη διασπορά $\text{var}[\mathbf{a}_1^T \mathbf{x}] = \lambda_1$ και συνθέτει την πρώτη ΚΣ. Με παρόμοιο τρόπο καταλήγουμε στην εξίσωση ιδιοτιμών για την 2^η ΚΣ με την επιπλέον συνθήκη μη-συσχέτισης της με την 1^η ΚΣ.

Γεωμετρικά, οι ΚΣ δείχνουν στην κατεύθυνση κατά την οποία το άθροισμα των τετραγώνων των κάθετων αποστάσεων ελαχιστοποιείται^[19] και είναι ουσιαστικά στροφές των αρχικών αξόνων κατά την κατεύθυνση της μέγιστης διασποράς των δειγμάτων (Σχ.7).^[20]



Σχήμα 7 Οι Κύριες Συνιστώσες δείχνουν ταυτόχρονα στην κατεύθυνση μέγιστης διασποράς των δειγμάτων (μπλε κουκκίδες) και στην κατεύθυνση που ελαχιστοποιείται το άθροισμα των τετραγώνων των κάθετων αποστάσεων (άσπρες κουκκίδες)^[20]

2.2 Αναπαράσταση των δειγμάτων στον υπόχωρο των Κυρίων Συνιστωσών

Έστω ότι έχουμε ένα σύνολο δεδομένων με n παρατηρήσεις δειγμάτων που περιγράφονται από p μεταβλητές, τα οποία κατασκευάζουν έναν $(n \times p)$ πίνακα δεδομένων \mathbf{X} . Όπως αποδείχθηκε παραπάνω, από τον $(p \times p)$ πίνακα συνδιασποράς

$$\mathbf{S} = \frac{1}{n-1} \mathbf{X}^T \mathbf{X} \quad (2.5)$$

εξάγονται οι ιδιοτιμές και τα ιδιοδιανύσματα \mathbf{a}_j , $j=1,2,\dots,p$, τα οποία είναι στήλες του $(p \times p)$ πίνακα \mathbf{A} . Η ποσότητα $\mathbf{a}_k^T \mathbf{x}$ είναι η k -οστή ΚΣ και η $z_{ik} = \mathbf{a}_k^T \mathbf{x}_i$, $i=1,\dots,n$ δείχνει τη θέση που έχει το i -οστό δείγμα στην k -οστή ΚΣ. Επομένως, μέσω του πολλαπλασιασμού του πίνακα \mathbf{X} με τον πίνακα ιδιοδιανυσμάτων \mathbf{A} παίρνουμε τον $(n \times p)$ πίνακα $\mathbf{Z} = \mathbf{X}\mathbf{A}$, που δίνει τις αναπαραστάσεις των θέσεων των δειγμάτων πάνω στις ΚΣ.

Μία από τις αλγεβρικές ιδιότητες των ΚΣ είναι ότι για κάποιον ακέραιο q , $1 \leq q \leq p$, ορίζεται ο γραμμικός μετασχηματισμός

$$y_i = \mathbf{B}^T \mathbf{x}_i, i=1, \dots, n \quad (2.6)$$

όπου \mathbf{B}^T είναι $(p \times q)$ πίνακας με ορθοκανονικές στήλες. Τότε, το ίχνος του πίνακα συνδιασποράς \mathbf{S}_y , $\text{tr}(\mathbf{S}_y)$, γίνεται μέγιστο για $\mathbf{B} = \mathbf{A}_q$, όπου $\mathbf{A}_q =$ οι πρώτες q στήλες του πίνακα \mathbf{A} , ενώ το $\text{tr}(\mathbf{S}_y)$ γίνεται ελάχιστο όταν $\mathbf{B} = \mathbf{A}_q^*$, με $\mathbf{A}_q^* =$ οι τελευταίες q στήλες του \mathbf{A} . Δηλαδή, το άθροισμα των διασπορών του \mathbf{S}_y είναι μέγιστο για τις πρώτες q ΚΣ και τα y_i αποτελούν προβολές των δειγμάτων $\mathbf{x}_i, i=1,2,\dots,n$, στον υπόχωρο διάστασης q , που σχηματίζουν οι πρώτες q ΚΣ.^[19]

2.3 Πίνακας Συνδιασποράς vs Πίνακας Συσχέτισης

Στις προηγούμενες παραγράφους χρησιμοποιήθηκε ο πίνακας συνδιασποράς, ωστόσο αντί αυτού προτείνεται η χρήση του πίνακα συσχέτισης, που δείχνει τις συσχετίσεις μεταξύ κανονικοποιημένων μεταβλητών του πίνακα \mathbf{X} , με το j -στό στοιχείο του να ισούται με

$$x_{ij}^* = \frac{x_{ij} - \bar{x}_j}{\sigma_j}, j = 1, 2, \dots, p, i = 1, 2, \dots, n, \quad (2.7)$$

όπου $\sigma_j =$ η διασπορά του x_j και $\bar{x}_j =$ μέσο της μεταβλητής j .^[21] Επομένως, οι ΚΣ που προκύπτουν θα εκφράζονται ως $\mathbf{z} = \mathbf{A}^T \mathbf{x}^*$, τα ιδιοδιανύσματα του \mathbf{A} εξάγονται πλέον από τον πίνακα συσχέτισης και δεν ισούνται με αυτές του πίνακα συνδιασποράς. Η ΑΚΣ είναι ευαίσθητη στις μονάδες μέτρησης των μεταβλητών και αυτές με τις μεγαλύτερες διασπορές τείνουν να κυριαρχήσουν στις πρώτες ΚΣ. Αυτός είναι ένας σημαντικός λόγος που προτιμάται ο πίνακας συσχέτισης, διότι με την κανονικοποίηση, οι μεταβλητές τοποθετούνται στην ίδια κλίμακα και είναι αδιάστατες.^[19]

2.4 Ανάλυση πίνακα σε ιδιάζουσες τιμές (Singular Value Decomposition/SVD)

Μια άλλη μέθοδος που χρησιμοποιείται για την εύρεση των Κυρίων Συνιστωσών είναι η ανάλυση πίνακα σε ιδιάζουσες τιμές. Σύμφωνα με αυτή, ο πίνακας \mathbf{X} παραγοντοποιείται με τον εξής τρόπο:

$$\mathbf{X} = \mathbf{U} \mathbf{A} \mathbf{L}^T \quad (2.8)$$

Οι \mathbf{U} και \mathbf{A} είναι πίνακες $(n \times r)$, $(p \times r)$ αντίστοιχα με ορθοκανονικές στήλες, έτσι ώστε $\mathbf{U}^T \mathbf{U} = \mathbf{I}$ και $\mathbf{A}^T \mathbf{A} = \mathbf{I}$, και η διάσταση του πίνακα \mathbf{X} είναι r . Οι r στήλες του \mathbf{U} ονομάζονται αριστερά-

ιδιάζοντα διανύσματα και είναι τα ιδιοδιανύσματα του \mathbf{XX}^T , οι r στήλες του \mathbf{A} ονομάζονται δεξιά-ιδιάζοντα διανύσματα και είναι τα ιδιοδιανύσματα του $\mathbf{X}^T\mathbf{X}$, και τέλος ο πίνακας \mathbf{L} έχει στη διαγώνιο του μη-μηδενικές ιδιάζουσες τιμές, που είναι οι τετραγωνικές ρίζες των μη-μηδενικών ιδιοτιμών των $\mathbf{X}^T\mathbf{X}$, \mathbf{XX}^T . Πιο ειδικά στην περίπτωση της ΑΚΣ, τα δεξιά-ιδιάζοντα διανύσματα είναι τα ιδιοδιανύσματα \mathbf{a}_k , και το γινόμενο $\mathbf{XA} = \mathbf{UL}$ είναι οι ΚΣ του \mathbf{X} , οι διασπορές των οποίων δίνονται από το τετράγωνο των ιδιαζουσών τιμών του \mathbf{X} , διαιρεμένες με $n-1$.

Παράλληλα, για έναν πίνακα ίδιου μεγέθους με τον \mathbf{X} , δηλαδή $(n \times p)$, αλλά μικρότερης διάστασης $m < r$, ισχύει ότι:

$$\mathbf{Y}_m = \mathbf{U}_m \mathbf{L}_m \mathbf{A}^T_m \quad (2.9)$$

Όπου οι \mathbf{U}_m και \mathbf{A}_m έχουν στοιχεία τις m στήλες των \mathbf{U} και \mathbf{A} με μεγέθη $(n \times m)$ και $(p \times m)$ αντίστοιχα, και ο \mathbf{L}_m έχει στην διαγώνιο του τις πρώτες μεγαλύτερες m ιδιοτιμές του \mathbf{L} . Στη δική μας περίπτωση που $\mathbf{Y}_m = \mathbf{X}_m$, οι n γραμμές του πίνακα \mathbf{X} ορίζουν ένα διάγραμμα διασποράς στον χώρο r -διαστάσεων. Για την αναπαράσταση των n γραμμών του \mathbf{X} στο χώρο m -διαστάσεων, η βέλτιστη προσέγγιση δίνεται από τις γραμμές του \mathbf{X}_m και οι m πρώτες ΚΣ ορίζουν τον υπόχωρο.^[21]

2.5 Διαγράμματα

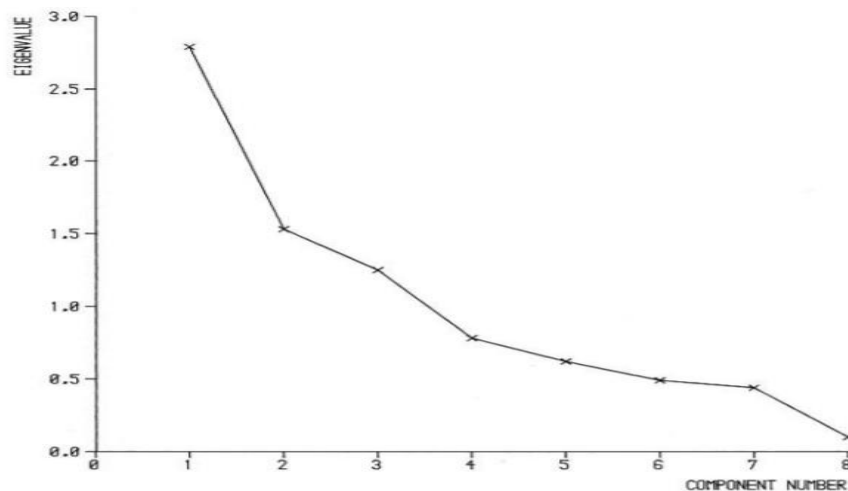
2.5.1 Διάγραμμα Scree

Ένα σημαντικό ζήτημα στην ΑΚΣ είναι πόσες ΚΣ αρκούν, για να μειωθούν οι διαστάσεις του προβλήματος και ταυτόχρονα να εξηγήσουν επαρκή ποσότητα διασποράς χωρίς σημαντική απώλεια πληροφορίας. Συνήθως, χρησιμοποιούνται εμπειρικοί κανόνες. Ένας από αυτούς είναι η επιλογή των ΚΣ με βάση το αθροιστικό ποσοστό της συνολικής διασποράς που συνεισφέρουν, λ.χ. αν επιθυμείται η συνεισφορά τους να είναι στο 80% της συνολικής διασποράς, τότε διατηρούνται οι ελάχιστες δυνατές ΚΣ που ξεπερνούν αυτό το όριο, δηλαδή

$$var_m = \frac{\sum_{i=1}^m \lambda_i}{\sum_{j=1}^p \lambda_j} \cdot 100\% \quad (2.10)$$

είναι το συνολικό ποσοστό διασποράς που εξηγείται από $m \ll p$ ΚΣ. Ανάλογα με τα στοιχεία του προβλήματος επιλέγεται και άλλο κατάφλι ποσοστού διασποράς, αλλά πολύ συχνά το εύρος

κυμαίνεται στα 70-90%. Μια άλλη μέθοδος είναι η κατασκευή του διαγράμματος Scree, που είναι γραφική παράσταση με τις ιδιοτιμές λ στον y-άξονα και τον αριθμό των ΚΣ στον x-άξονα.

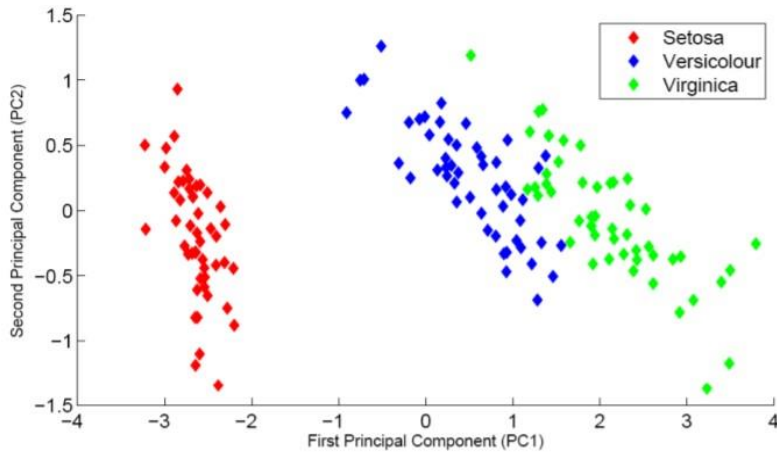


Σχήμα 8 Διάγραμμα Scree: Ιδιοτιμές λ - αριθμός ΚΣ

Ο βέλτιστος αριθμός ΚΣ που διατηρούνται είναι το σημείο του σχήματος, όπου η μείωση των ιδιοτιμών γίνεται ασυμπτωματική προς τον άξονα των ΚΣ. Εδώ χρησιμοποιείται ως κριτήριο η διαφορά $\lambda_{k-1} - \lambda_k$ με σκοπό την εύρεση του σημείου που αυτή γίνεται σταθερή για αρκετές ιδιοτιμές.^[19]

2.5.2 Διάγραμμα Δειγμάτων

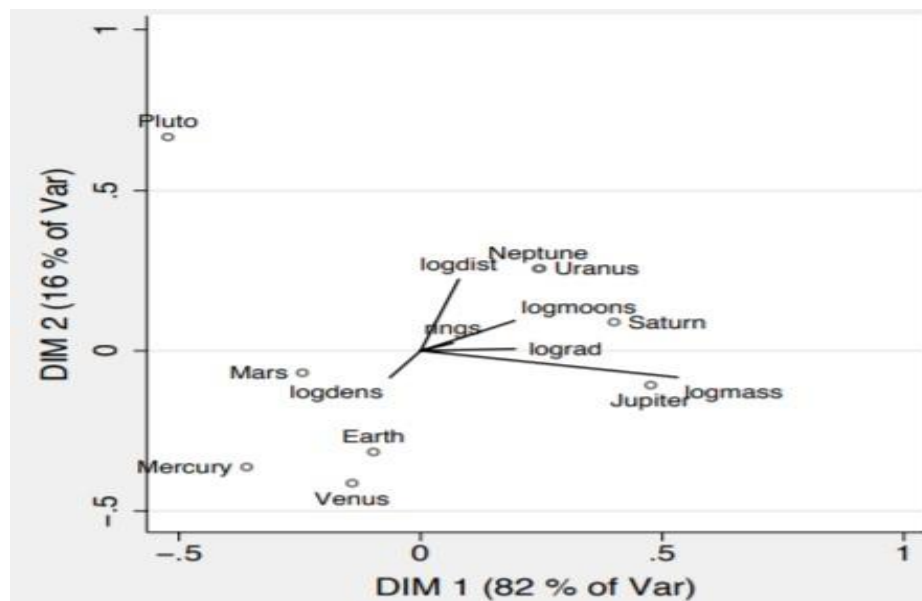
Όπως εξηγήθηκε πριν, τα δείγματα n που περιγράφονται από p μεταβλητές μπορούν να αναπαρασταθούν ως σημεία στον χώρο p -διαστάσεων. Με τη βοήθεια των ΚΣ, είναι δυνατή η κατασκευή γραφικών παραστάσεων των δειγμάτων πάνω στον υπόχωρο που συνθέτουν οι ΚΣ. Αυτές δίνουν μια εικόνα των δεδομένων μας σε χαμηλότερες διαστάσεις^[19], και ειδικότερα οι 2 ή 3 πρώτες ΚΣ δείχνουν ομαδοποιήσεις και ακραίες τιμές.^[22] Στο σχήμα 9 φαίνονται 3 ομαδοποιήσεις στον χώρο των πρώτων δύο ΚΣ και η καθεμία αντιστοιχεί σε διαφορετικό είδος του λουλουδιού Ίρις.



Σχήμα 9 Διάγραμμα Δειγμάτων: Τα δείγματα απεικονίζονται πάνω στις 2 πρώτες Κύριες Συνιστώσες. Φαίνονται οι ομαδοποιήσεις βάσει των ειδών του λουλουδιού Τρις^[23]

2.5.3 Διάγραμμα Biplot

Από τη μέθοδο SVD πηγάζει το διάγραμμα Biplot, το οποίο απεικονίζει τα δείγματα ως σημεία και τις μεταβλητές ως διανύσματα πάνω στον υπόχωρο των ΚΣ. Στο Σχήμα 10 απεικονίζεται ένα παράδειγμα διαγράμματος Biplot.



Σχήμα 10 Διάγραμμα Biplot: Οι κουκκίδες παριστάνουν τα δείγματα (εδώ: τους πλανήτες του ηλιακού συστήματος) και τα διανύσματα τις μεταβλητές (εδώ: πυκνότητα, απόσταση, φεγγάρια, δακτύλιοι, μάζα σε λογαριθμική κλίμακα)

Το συνημίτονο της γωνίας μεταξύ δύο διανυσμάτων φανερώνει τη συσχέτιση των μεταβλητών που αντιπροσωπεύουν. Αν η γωνία προσεγγίζει ή είναι 90° ή 270° , τότε οι δύο μεταβλητές δε συσχετίζονται, όπως οι logdist (απόσταση) και logmass (μάζα) του διαγράμματος.

Γωνίες κοντά στις 0° ή 180° δείχνουν έντονη συσχέτιση μεταξύ των μεταβλητών, με τη μεταβλητή πυκνότητας, logden, να συσχετίζεται αρνητικά με τις υπόλοιπες. Ακόμα, η προβολή του διανύσματος πάνω σε μία ΚΣ δείχνει τη συνεισφορά του εκάστοτε διανύσματος σε εκείνη την ΚΣ, λ.χ. η μάζα, logmass, έχει μεγάλη συνεισφορά στην 1^η ΚΣ και μικρή στη 2^η, και η κάθετη απόσταση του δείγματος από το διάνυσμα μιας μεταβλητής δίνει πληροφορίες για την τιμή του, με το Jupiter να έχει την μεγαλύτερη μάζα.^[24]

2.6 Επισκόπηση της ανάλυσης κυρίων συνιστωσών σε αντικείμενα αρχαιολογικού ενδιαφέροντος

Οι φασματοσκοπικές τεχνικές καθιστούν δυνατή την παρατήρηση ιδιοτήτων των εξεταζόμενων δειγμάτων μέσω της αλληλεπίδρασης φωτός – ύλης και έτσι, γίνεται η εξαγωγή των φασματικών δεδομένων. Ωστόσο, λόγω της πολυπλοκότητας αυτών των δεδομένων, όπως η ύπαρξη πιθανών θορύβων ή-, έντονα συσχετισμένες και περιττές πληροφορίες, πολλές φορές είναι δύσκολο να εξαχθούν άμεσα συμπεράσματα και επομένως, είναι αναγκαία η επιστράτευση μαθηματικών μεθόδων και αλγορίθμων για να διευκολυνθεί η ανάλυση. Η ανάλυση κυρίων συνιστωσών (ΑΚΣ) είναι μέθοδος που αφαιρεί τέτοιες περιττές πληροφορίες και απλοποιεί την ποσοτική ανάλυση^[59] και χρησιμοποιείται ευρέως σε εφαρμογές της πολιτιστικής κληρονομιάς.^[60] Ερευνητές χρησιμοποίησαν την ΑΚΣ για να επεξεργαστούν φάσματα φθορισμού που αποκτήθηκαν από το Κολοσσαίο στη Ρώμη και να δημιουργήσουν θεματικούς χάρτες των αναλυόμενων επιφανειών ανάλογα με τα χωρικά μοτίβα ή τις ιδιότητες τους και κατάφεραν, έτσι, να διακρίνουν τα διαφορετικά δομικά υλικά και τις παλαιότερες επεμβάσεις συντήρησης.^[61] Παράλληλα, η ΑΚΣ εφαρμόστηκε σε φάσματα XRF που αποκτήθηκαν από κονιάματα σε διαφορετικά στάδια συντήρησης από το Αρχαίο Θέατρο της Ταορμίνα και διαπιστώθηκε η ύπαρξη επικαθήσεων αλάτων στην επιφάνεια τους.^[62] Τέλος, η ΑΚΣ κατάφερε να διαχωρίσει έξι διαφορετικά γένη μύκητα από φάσματα Raman που αποκτήθηκαν από χωμάτινους τοίχους ιστορικών κτηρίων στο Σάο Πάολο της Βραζιλίας.^[63]

2.7 Τρόποι Επεξεργασίας Φασμάτων

Συχνά, παράγοντες, όπως η πειραματική διάταξη, ανομοιογένειες στην επιφάνεια του δείγματος κλπ., μπορούν να δημιουργήσουν διακυμάνσεις στις εντάσεις των κορυφών στα φάσματα^[25] και γι' αυτό είναι χρήσιμη η επεξεργασία τους με διάφορες διορθωτικές τεχνικές,

ώστε τέτοιες διακυμάνσεις και πιθανός θόρυβος να αφαιρούνται.^[26] Κάποιες από αυτές είναι οι οριζόντιες μετατοπίσεις κορυφών, η μετατόπιση του baseline, οι διακυμάνσεις στην κλίση.^[27]

Μια συνηθισμένη τεχνική που εφαρμόζεται είναι η κανονικοποίηση των φασμάτων, η οποία οδηγεί στην καλύτερη σύγκριση των φασμάτων.^[28] Η διαδικασία περιλαμβάνει τη διαίρεση κάθε μεταβλητής του φάσματος με μία σταθερά και αναλόγως με το ποια είναι αυτή η σταθερά προκύπτουν οι διαφορετικές μέθοδοι κανονικοποίησης. Ενδεικτικά, μερικές μέθοδοι είναι:

- 1) η διαίρεση με μια δεδομένη κορυφή του φάσματος,
- 2) η διαίρεση με την τετραγωνική ρίζα του αθροίσματος των τετραγώνων των εντάσεων,
- 3) αφαίρεση του μέσου φάσματος από κάθε μεταβλητή του αρχικού φάσματος και στη συνέχεια, διαίρεση με την τυπική απόκλιση.

Στην παρούσα εργασία, οι μέθοδοι κανονικοποίησης που εφαρμόστηκαν είναι τέσσερις: η κανονικοποίηση στο διάστημα $[0,1]$, η κανονικοποίηση με τη μέγιστη ένταση του φάσματος, η κανονικοποίηση με το άθροισμα των εντάσεων και τέλος με την τετραγωνική ρίζα του αθροίσματος των τετραγώνων των εντάσεων.

Για τη διόρθωση του baseline και της κλίσης, μέρος του φάσματος προσεγγίζεται από ένα πολυώνυμο και στη συνέχεια, υπολογίζονται οι παράγωγοι του,^[26] με την 1^η παράγωγο να διορθώνει τις κατακόρυφες μετατοπίσεις του baseline και τη 2^η να διορθώνει και τις κατακόρυφες μετατοπίσεις, αλλά και την κλίση. Η μέθοδος που χρησιμοποιείται συνήθως είναι ο αλγόριθμος Savitzky-Golay, ο οποίος ενσωματώνει την εξομάλυνση του φάσματος μειώνοντας τον θόρυβο.^[27]

Κεφάλαιο 3: Είδη βιολογικών επικαθήσεων που συναντώνται στα μνημεία

Τα ιστορικά κτήρια, τα μνημεία και τα έργα τέχνης αποτελούν αναπόσπαστα κομμάτια της πολιτιστικής κληρονομιάς και η συντήρησή τους απαιτεί τη συνεργασία επιστημόνων από διαφορετικά πεδία, όπως συντηρητές, χημικούς, φυσικούς, αρχαιολόγους κ.α.^[13,14,29] Όλα τα μνημεία με την πάροδο του χρόνου υφίστανται κάποια επιδείνωση της κατάστασής τους, που οφείλεται σε αβιοτικούς, ανθρωπογενείς και βιολογικούς παράγοντες.^[30] Πιο ειδικά, η επιδείνωση λόγω βιολογικών παραγόντων ορίζεται ως η τροποποίηση των ιδιοτήτων των υλικών των μνημείων εξαιτίας μεταβολικών δραστηριοτήτων και ανάπτυξης μικροοργανισμών.^[31] Η ικανότητα του υποστρώματος να αποικηθεί από μικροοργανισμούς ονομάζεται βιοδεκτικότητα και εξαρτάται από τις ιδιότητες του υποστρώματος, πιο συγκεκριμένα εξαρτάται από τη χημική σύνθεση, το πορώδες, την περιεκτικότητα σε υγρασία, το pH κ.α. Οι κλιματικές συνθήκες (θερμοκρασία, υγρασία, φως, οξυγόνο) σε συνδυασμό με τη βιοδεκτικότητα επηρεάζουν την ένταση της αποίκησης των μικροοργανισμών πάνω στο υπόστρωμα. Οι πιο συνήθεις μικροοργανισμοί που συναντώνται ανήκουν στις κατηγορίες των φωτοαυτότροφων, όπως τα κυανοβακτήρια, τα φύκη, βρύα και λειχήνες, και των ετερότροφων, όπως οι μύκητες.^{[32],[33]}

3.1 Περιβαλλοντικοί παράγοντες στη βιοδιάβρωση των μνημείων

Η ένταση και εξάπλωση της βιοδιάβρωσης εξαρτάται σημαντικά από τις περιβαλλοντικές συνθήκες, στις οποίες εκτίθεται το μνημείο, και ειδικότερα από τα επίπεδα υγρασίας.^[34] Στα ακραία κλίματα, όπως τα τροπικά, λόγω της υψηλής θερμοκρασίας και υγρασίας, οι μικροοργανισμοί τείνουν να αναπτυχθούν εντός της πέτρας (ενδολιθικά), ώστε να προστατευθούν από το φως του ηλίου, ενώ στα ήπια κλίματα τείνουν να συγκεντρωθούν στην επιφάνεια του (επιλιθικά).^[35] Πέραν του κλίματος, το μικρο-κλίμα, όπως ο προσανατολισμός των μνημείων, επηρεάζει την ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Στις αστικές περιοχές η ρύπανση του αέρα είναι κύριος συντελεστής στη φθορά των μνημείων, αφού η καύση ορυκτών καυσίμων αυξάνει την περιεκτικότητα του αέρα σε οξείδια του θείου (S) και αζώτου (N), τα οποία αντιδρώντας με το νερό οδηγούν στην παραγωγή θεικών και νιτρικών οξέων, σχηματίζοντας όξινη βροχή. Αυτά τα

οξειδία συνιστούν θρεπτικά συστατικά για κάποιους μικροοργανισμούς με αποτέλεσμα να ευδοκιμήσουν στις συνθήκες που επικρατούν στις πόλεις.^[36]

3.2 Μηχανισμοί Βιοδιάβρωσης

Οι μικροοργανισμοί που αναπτύσσονται πάνω στις επιφάνειες οργανώνονται με τη μορφή *βιολογικών λεπτών στρωμάτων (βιοφίλμ)*. Αυτά τα στρώματα αποτελούνται από τα κύτταρα των μικροοργανισμών, τα οποία είναι ενσωματωμένα σε εξωκυτταρικές πολυμερικές ουσίες που παράγονται από τα ίδια, βοηθούν στην προσκόλληση των μικροοργανισμών πάνω στην επιφάνεια και τους προστατεύουν από βιοκτόνα, υπεριώδη ακτινοβολία, αποξήρανση κ.α.^[36] Οι επιπτώσεις της επίδρασης της βιοδιάβρωσης είναι βιογεωχημικής, βιογεωφυσικής και αισθητικής φύσεως.^[37]

3.2.1 Βιογεωφυσική Φθορά

Τα βιοφίλμ, λόγω της κολλώδους υφής τους, προσκολλώνται στην επιφάνεια και μέσω της συστολής και διαστολής εξαιτίας των κύκλων υγρασίας-ξηρασίας ασκούν ισχυρές πιέσεις στο υπόστρωμα^[38]. Παράλληλα, οι νηματοειδείς μικροοργανισμοί, όπως οι μύκητες, μπορούν να διεισδύσουν εντός του δομικού υλικού μέσα από ρωγμές με αποτέλεσμα τον θρυμματισμό του επιφανειακού στρώματος.^[37] Οξέα, που παράγονται από μικροοργανισμούς, αντιδρούν με το υπόστρωμα και δημιουργούν δευτερεύοντα άλατα, τα οποία προκαλούν μηχανικές ζημιές. Όταν ένα τέτοιο άλας ενυδατωθεί με αποτέλεσμα τη διόγκωση του και βρίσκεται μέσα σε κάποια ρωγμή, τότε υπάρχει ο κίνδυνος ραγίσματος, ενώ σε χαμηλές θερμοκρασίες ενδέχεται να προκληθούν φθορές εξαιτίας του σχηματισμού κρυστάλλων πάγου.^[35]

3.2.2 Βιογεωχημική Φθορά

Τα ανόργανα και οργανικά οξέα που εκκρίνουν οι μικροοργανισμοί οδηγούν σε φθορές των μνημείων.^[37] Αρχικά, τα βιοφίλμ περιέχουν οργανικά οξέα, πεπτίδια, αμινοξέα, ανιονικά πολυμερή, τα οποία ευθύνονται για τη χηλικοποίηση των ιόντων των μετάλλων, δηλαδή την απόσπαση τους από την επιφάνεια του υλικού, με αποτέλεσμα τη διάβρωση του.^[36] Ένα παράδειγμα είναι το οξαλικό οξύ, το οποίο διαβρώνει λίθους που περιέχουν πυρίτιο (Si).^[35] Επιπλέον, τα ανόργανα οξέα συντελούν στην επιδείνωση των μνημείων. Τα θειικά και νιτρικά οξείδια που υπάρχουν στον ατμοσφαιρικό αέρα οξειδώνονται από συγκεκριμένα είδη βακτηρίων,

που τα μετατρέπουν στα ιδιαίτερος διαβρωτικά θειικά και νιτρικά οξέα επιταχύνοντας τη φθορά του μνημείου. Αυτά τα οξέα αντιδρούν με τα ανθρακικά άλατα της επιφάνειας δημιουργώντας νιτρικά και θειικά άλατα. Όταν τα θειικά άλατα έρθουν σε επαφή με το νερό σχηματίζουν ενυδατωμένα άλατα, όπως ο γύψος, που επικάθονται στην επιφάνεια με τη μορφή κρούστας.^[33] Τέλος, το διοξείδιο του άνθρακα CO₂ που παράγουν οι μικροοργανισμοί αποτελεί, αν και πιο αδύναμο σε σχέση με τα παραπάνω οξέα, διαβρωτικό στοιχείο.^[36]

3.2.3 Αποχρωματισμός

Η ανάπτυξη μικροοργανισμών επιφέρει και αλλαγές στην αισθητική των μνημείων δημιουργώντας αποχρωματισμούς. Αυτοί μπορεί να είναι αποτέλεσμα χρωστικών ουσιών που παράγουν τα μικρόβια, όπως μελανίνη από κάποια είδη μύκητα, καροτίνη από φύκη και φωτοσυνθετικές χρωστικές. Παράλληλα, λόγω της κολλώδους φύσης του βιοφίλμ, αυτό παγιδεύει αερομεταφερόμενα σωματίδια, αερολύματα, ανόργανα και οργανικά στοιχεία συμβάλλοντας στην αλλαγή του χρώματος του υποστρώματος.^{[35],[36]} Κατά το σχηματισμό του γύψου, όπως εξηγήθηκε παραπάνω, αιχμαλωτίζονται περιβαλλοντικοί ρύποι δημιουργώντας μια μαύρη ή καφέ κρούστα. Η αντίδραση του οξαλικού οξέος, προϊόν λειχήνων και μυκήτων, με το ανθρακικό ασβέστιο δημιουργεί το οξαλικό ασβέστιο, το οποίο λεκιάζει το μνημείο με πατίνες διάφορων χρωμάτων.^[32]

Η επίδραση των αποχρωματισμών δεν περιορίζεται μόνο στο αισθητικό κομμάτι, αλλά μπορεί να προκαλέσει μηχανικές φθορές. Πιο συγκεκριμένα, αποχρωματισμένες περιοχές απορροφούν περισσότερη ηλιακή ενέργεια με αποτέλεσμα τη δημιουργία τάσεων εξαιτίας συστολών/διαστολών που προκαλούνται από τη διαφορά θερμοκρασίας.^[36]

3.3 Είδη Μικροοργανισμών

Οι βιολογικοί παράγοντες που ευθύνονται για τη φθορά των μνημείων είναι αυτότροφοι ή ετερότροφοι και συνεπώς, αναπτύσσονται σε ανόργανα (λίθοι, κεραμικά, κονιάματα) και οργανικά (χαρτί, ξύλο, περγαμινές, υφάσματα) υλικά ανάλογα με τις διατροφικές τους ανάγκες. Τέτοιοι μικροοργανισμοί μπορεί να είναι βακτήρια, μύκητες, φύκη, βρύοφυτα κ.α. και περιγράφονται εκτενέστερα παρακάτω.^[31]

3.3.1 Βακτήρια

Τα βακτήρια χωρίζονται στις τρεις διατροφικές ομάδες των Φωτοαυτότροφων, Χημειολιθότοφων και Χημειοργανότροφων^[33]. Στην κατηγορία των χημειολιθότοφων ανήκουν τα βακτήρια που χρησιμοποιούν ανόργανα στοιχεία ως πηγή ενέργειας^[39] και πιο συγκεκριμένα, σε αυτήν ανήκουν τα βακτήρια που οξειδώνουν ενώσεις που περιέχουν άζωτο και θείο και τις μετατρέπουν στα αντίστοιχα οξέα προκαλώντας φυσικές φθορές στην πέτρα.^[35]

Στην ομάδα των Χημειοργανότροφων ανήκουν τα βακτήρια που χρησιμοποιούν οργανικές ενώσεις για την παραγωγή ενέργειας, όπως υδρογονάνθρακες, αμινοξέα, λιπαρά οξέα.^[40] Τέτοια είναι οι Ακτινομύκητες, οι οποίοι ευδοκιμούν σε υπόγεια μέρη με υψηλή σχετική υγρασία, σταθερές θερμοκρασίες και χαμηλή φωτεινότητα και συνήθως, προσβάλλουν έργα τέχνης εσωτερικού χώρου, όπως τοιχογραφίες.^[33]

Στην ομάδα των Φωτοαυτότροφων ανήκουν τα βακτήρια που απαιτούν μόνο ηλιακό φως και νερό για να αναπτυχθούν, με τα κυανοβακτήρια και τα φύκη να ανήκουν σε αυτά^[41] και να αποτελούν τους πρώτους αποίκους σε μια επιφάνεια. Πιο συγκεκριμένα, τα κυανοβακτήρια έχουν την δυνατότητα να επιβιώνουν σε ακραίες συνθήκες, όπως επαναλαμβανόμενους κύκλους ενυδάτωσης-ξηρασίας και υψηλά επίπεδα υπερϊώδους ακτινοβολίας, χάρη στο παχύ κυτταρικό περίβλημα τους^[35] και τη δυνατότητα παραγωγής προστατευτικών χρωστικών.^[33] Αν και ευδοκιμούν σε τροπικά κλίματα με πολύ νερό και φως αποτελώντας τον κύριο μικροοργανισμό στη Λατινική Αμερική ακολουθούμενο από τα φύκη, συναντώνται και σε μέρη με εύκρατα κλίματα, όπως η Ευρώπη, με υψηλό ποσοστό βιομάζας. Μάλιστα, έχει παρατηρηθεί ότι μπορούν να επιβιώσουν σε συνθήκες ρύπανσης^[42], αλλά και σε ξηρές και σκοτεινές συνθήκες και είναι δυνατή η ανάκτηση των φωτοσυνθετικών λειτουργιών τους αφού ενυδατωθούν. Τα κυανοβακτήρια σχηματίζουν βιοφίλμ, των οποίων το χρώμα εξαρτάται από τις περιβαλλοντικές συνθήκες και το στέλεχος του μικροοργανισμού.^[35] Ευθύνονται για την φθορά του μνημείου, με μηχανικό, χημικό και αισθητικό τρόπο, και αποτελούν διατροφική πηγή για άλλους μικροοργανισμούς.^[42]



Σχήμα 11 Μαύρη κρούστα από κυανοβακτήρια στους τοίχους καθεδρικού ναού στο Μεξικό^[42]

3.3.2 Φύκη

Τα φύκη είναι αυτότροφοι, ευκαρυωτικοί και κυρίως υδρόβιοι μικροοργανισμοί, ωστόσο υπάρχουν είδη που είναι ανθεκτικά στην ξηρασία και μπορούν να αναπτυχθούν στην ξηρά. Έχουν τη δυνατότητα να αποικίσουν επιλιθικά μια επιφάνεια αλλά και ενδολιθικά (μερικά χιλιοστά), όταν βρίσκονται σε ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες. Η ανάπτυξη των φυκών γίνεται βέλτιστη σε συνθήκες με 100% σχετική υγρασία και γι' αυτό αποτελούν τον επικρατέστερο μικροοργανισμό σε εύκρατα και υγρά κλίματα. Λόγω της αυτότροφης φύσης τους, είναι από τους πρώτους μικροοργανισμούς που αναπτύσσονται σε μνημεία και, όπως και τα κυανοβακτήρια, τα διαδέχονται άλλοι, πιο επιβλαβείς μικροοργανισμοί. Όσον αφορά στη φθορά που προκαλούν στα μνημεία, τα φύκη κυρίως ευθύνονται για αποχρωματισμούς, συνήθως πράσινους λόγω της παρουσίας χλωροφύλλης, αλλά έχουν παρατηρηθεί και κόκκινοι ή πορτοκαλί αποχρωματισμοί εξαιτίας της παρουσίας καροτίνης.^[43]

3.3.3 Μύκητες

Οι μύκητες χαρακτηρίζονται από τις μονοκύτταρες ή πολυκύτταρες υφές και έχουν τη δυνατότητα να αναπτυχθούν σε πολλών ειδών επιφάνειες. Ανήκουν στην κατηγορία των χημειοετερότροφων, δηλαδή μπορούν να χρησιμοποιήσουν ως πηγή ενέργειας νεκρά κύτταρα από προηγούμενους αποίκους και οργανική αζωτούχα ύλη προερχόμενη από απεκκρίσεις πουλιών, αερολύματα και σάπια φύλλα, και όχι απευθείας από το ανόργανο υπόστρωμα. Χάρη στην ολιγοτροφική φύση τους, μπορούν να επιβιώσουν σε δυσμενείς συνθήκες αξιοποιώντας μονάχα τα συστατικά της ατμόσφαιρας και της βροχής^[33]. Παράλληλα, έχει παρατηρηθεί η ανάπτυξη μυκήτων σε τοιχογραφίες, σε βιβλιοθήκες και σε αρχαία χρησιμοποιώντας τα ως πηγές ενέργειας.^[31] Η ομάδα των μαύρων μυκήτων όντας ανθεκτικοί σε συνθήκες υψηλής UV

ακτινοβολίας και ξηρασίας αναπτύσσονται σε εξωτερικές επιφάνειες και παρατηρούνται σε μέρη της Μεσογείου, ενώ οι νηματοειδής μύκητες βρίσκονται σε πιο βόρεια μέρη της Ευρώπης. Οι μύκητες προκαλούν φθορές στο μνημείο, τόσο με χημικό τρόπο όσο και με φυσικό. Εκκρίνουν οργανικά οξέα, όπως το οξαλικό, τα οποία μπορούν να διαλύσουν μέταλλα του υποστρώματος. Παράλληλα, οξειδώνουν και αναγάγουν κατιόντα μετάλλων από το κρυσταλλικό πλέγμα του υποστρώματος, πιο συγκεκριμένα μαγγάνιο και σίδηρο^[35], μεταφέροντας τα στα κύτταρα τους με αποτέλεσμα τη φθορά του λίθου.^[33] Η μηχανική φθορά που προκαλούν προέρχεται από την διείδυση τους εντός του υποστρώματος δημιουργώντας ρωγμές και χαραμάδες. Οι αποχρωματισμοί που προκαλούνται προέρχονται από προϊόντα μεταβολισμού, όπως η μελανίνη.^[35]

3.3.4 Λειχήνες

Οι λειχήνες είναι συμβιωτικοί οργανισμοί μεταξύ μυκήτων και φυκών ή μεταξύ μυκήτων και κυανοβακτηρίων. Μπορούν να επιβιώνουν σε ακραίες θερμοκρασίες και είναι πιο ανθεκτικές σε περιόδους ξηρασίας.^[33] Ωστόσο, η ατμοσφαιρική ρύπανση εμποδίζει την ανάπτυξη τους και έτσι, η ύπαρξη τους λειτουργεί και ως δείκτης για την καλή ποιότητα του αέρα. Ευθύνονται για μηχανική φθορά, αφού μπορούν να διειδύσουν στην πέτρα με τη βοήθεια των ριζοειδών τους, αλλά και για χημική, καθώς παράγουν οξέα, όπως το οξαλικό οξύ δημιουργώντας οξαλικά άλατα, και το ανθρακικό οξύ, το οποίο μπορεί να διαλύσει μέταλλα (μαγνήσιο και ασβέστιο από ασβεστόλιθο). Οι λειχήνες ίσως έχουν τη δυνατότητα να προστατεύσουν μνημεία από αβιοτικούς περιβαλλοντικούς παράγοντες, ωστόσο είναι εγγενώς εξαιρετικά καταστρεπτικές και η μηχανική αφαίρεση τους προκαλεί δομικές φθορές εξαιτίας της ισχυρής προσκόλλησης του θαλλού με το υπόστρωμα.^[35]

3.3.5 Βρύα

Τα βρύα είναι φωτοσυνθετικοί οργανισμοί και αναπτύσσονται σε επιφάνειες με μεγάλο απόθεμα από χούμο,^[33] ο οποίος αποτελείται από οργανική ύλη, που προέρχεται από συνεχείς διεργασίες αποσύνθεσης φυτικής και ζωικής ύλης.^[44] Μπορούν να επιβιώσουν σε υψηλές θερμοκρασίες και περιόδους ξηρασίας. Προκαλούν, κυρίως, αισθητική φθορά και πιο

συγκεκριμένα, πράσινους/γκρι αποχρωματισμούς. Επειδή διεισδύουν στο υπόστρωμα μέσω των ριζοειδών δομών τους, προκαλούν μηχανική φθορά. Ο θάνατος τους συντελεί στην αύξηση του χούμου και συνεπώς, στην εμφάνιση ανωτέρων φυτών.^{[31],[33]}



Σχήμα 12 Πράσινα βρύα, άσπρες και κίτρινες λειχήνες πάνω σε ταφόπλακα^[42]

3.4 Φθορισμός των χρωστικών προϊόντων των μικροοργανισμών

Επειδή ο βιολογικός παράγοντας συνεισφέρει έντονα στην επιδείνωση της κατάστασης των μνημείων, είναι σημαντική η ανίχνευση του. Για τον σκοπό αυτό, υπάρχουν μέθοδοι που χρησιμοποιούνται στο εργαστήριο, ωστόσο απαιτούν δειγματοληψία, πράγμα που μπορεί να θέσει την ακεραιότητα του μνημείου σε κίνδυνο.^[15] Χρήσιμη τεχνική αποτελεί η **φασματοσκοπία φθορισμού**, καθώς είναι μη-επεμβατική, μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε φορητές διατάξεις, ενώ δεν είναι απαραίτητη η δειγματοληψία.^[12]

Οι χρωστικές χωρίζονται σε τρεις κύριες κατηγορίες: Χλωροφύλλη, Φυκοχολίνες και Καροτενοειδή. Η χλωροφύλλη και οι φυκοχολίνες είναι συστήματα που επιτρέπουν την απορρόφηση φωτός, με την πρώτη να υπάρχει σε οργανισμούς που φωτοσυνθέτουν και τις δεύτερες στα κυανοβακτήρια, και έχουν υψηλές αποδόσεις φθορισμού ενώ, οι καροτενοειδείς χρωστικές έχουν μικρές αποδόσεις φθορισμού.^[45]

Στον πίνακα 1 παρατίθενται τα μήκη κύματος στα οποία παρατηρείται φθορισμός των εν λόγω χρωστικών. Η χλωροφύλλη α (*Chl a*) έχει δύο κύριες μπάντες φθορισμού με την πρώτη στα **685nm**, που αντιστοιχεί στο φωτοσύστημα II, και τη δεύτερη στα **720-735nm** των φωτοσυστημάτων I και II.^{[46],[47]} Η κβαντική απόδοση φθορισμού της είναι 0.32 σε διάλυμα

μεθανόλης, 0.33 σε διάλυμα διαιθυλαιθέρα και 0.35 σε διάλυμα πυριδίνης.^[64] Παράλληλα, πέραν της *Chl α*, φθορίζει και η *Chl β*^[45] με μπάνα φθορισμού στα **650nm**.^[48] Φθορισμός του *β-καροτένιου* παρατηρείται στα **490nm**.^[49]

Αναφορικά με τις φυκοχολίνες, χωρίζονται στις: *φυκοερυθρίνη (PE)*, *φυκοκυανίνη (PC)* και *αλλοφυκοκυανίνη (APC)*. Η PE φθορίζει γύρω στα **640nm**, η PC γύρω στα **644-653nm** και τέλος, η APC έχει μπάνα φθορισμού γύρω στα **660nm**.^{[45],[50]}

Άλλα φθοροφόρα που παρατηρούνται σε κάποιους οργανισμούς είναι τα αμινοξέα *τροπτοφάνη* και *τυροσίνη*, η βιταμίνη *ριβοφλαβίνη* και το συνένζυμο *NADPH*. Φθορισμός αυτών παρατηρείται στα μήκη κύματος **340-353nm**, **300-307nm**, **530nm**, **450-470nm** αντίστοιχα. Τέλος, η μπάνα φθορισμού της χρωστικής *μελανίνης* παρατηρείται στα **440nm**, **520nm**, **575nm**.^{[51],[52]}

Πίνακας 1 Μπάνα φθορισμού φθοροφόρων

Φθοροφόρο	λ_{em} (nm)	Πηγή
<i>Χλωροφύλλη α</i>	685, 720, 735	[46],[47]
<i>Χλωροφύλλη β</i>	650	[48]
<i>β-καροτένιο</i>	490	[49]
<i>Φυκοερυθρίνη</i>	575, 640	[45],[50]
<i>Φυκοκυανίνη</i>	644-653	
<i>Αλλοφυκοκυανίνη</i>	660	
<i>Μελανίνη</i>	440, 520, 575	[52]
<i>Ριβοφλαβίνη</i>	530	
<i>NADPH</i>	450-470	
<i>Τροπτοφάνη</i>	340-353	[51]
<i>Τυροσίνη</i>	300-307	
<i>Χιτίνη</i>	413, 452-458	

Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι τα φάσματα φθορισμού επηρεάζονται από τις συνθήκες, στις οποίες βρίσκεται το φθοροφόρο, δηλαδή θερμοκρασία, pH, παρουσία αποσβεστών κ.α.^[47]

Κεφάλαιο 4: Υλικά και Μέθοδοι

4.1 Πειραματική Διάταξη

Για την απόκτηση φασμάτων φθορισμού, τα αρχαιολογικά αντικείμενα, αρχικά, αναλύθηκαν στο εργαστήριο κάνοντας χρήση ενός υβριδικού φορητού συστήματος (LMNTII +), το οποίο συνδυάζει δύο φασματοσκοπικές τεχνικές: τη φασματοσκοπία εκπομπής πλάσματος επαγόμενου από λέιζερ (LIBS) και τη φασματοσκοπία διάχυτης ανάκλασης και έχει τροποποιηθεί, ώστε να γίνονται μετρήσεις LED-IF αντικαθιστώντας τη λάμπα αλογόνου, που χρησιμοποιείται για τις μετρήσεις διάχυτης ανάκλασης, με μια πηγή LED.^[53]

Για τα πειράματα LED-IF, χρησιμοποιήθηκαν δύο πηγές LED με μήκη κύματος $\lambda = 375$ nm και $\lambda = 440$ nm, ώστε να αξιολογηθεί η ικανότητα τους να επάγουν φθορισμό στα εξεταζόμενα υλικά. Χρησιμοποιώντας έναν μετρητή ισχύος FieldMate (Coherent, USA) μετρήθηκε ότι η πηγή LED με $\lambda = 375$ nm (M375L3, Thorlabs, USA) έχει μέγιστη ισχύ 6 mW και η πηγή LED με $\lambda = 440$ nm (M455L3, Thorlabs, USA) έχει μέγιστη ισχύ 26 mW. Για τη μείωση του FWHM της πηγής LED τοποθετήθηκε μπροστά από το LED με $\lambda = 375$ nm ένα φίλτρο διέλευσης συχνοτήτων στα 370 nm με FWHM = 10 nm και μπροστά από το LED με $\lambda = 440$ nm ένα φίλτρο αποκοπής στα 441.6 nm με FWHM = 10 nm.

Εν συνεχεία, ένας επιπεδόκυρτος φακός με εστιακή απόσταση $f = 20$ mm εστιάζει την ακτινοβολία από το LED πάνω στο δείγμα. Το μέγεθος της εστιασμένης δέσμης είναι περίπου 2×2 mm². Το σήμα φθορισμού συλλέγεται από σύστημα δύο συγκλινόντων φακών με εστιακές αποστάσεις $f_1 = 75$ mm και $f_2 = 25$ mm και μετά, αφού εισέλθει από οπτική ίνα διαμέτρου 200 μ m συλλέγεται από έναν φασματογράφο (AvaSpec ULS2048L Avantes, Netherlands) με φασματικό εύρος 200-1100 nm και διακριτική ικανότητα 2.4 nm (πλάτος σχισμής = 50 μ m, αριθμός σχισμών = 300 mm⁻¹). Ο χρόνος ολοκλήρωσης των LED-IF μετρήσεων είναι 200 – 300 ms.

4.2 Αντικείμενα

Τα αντικείμενα που αναλύθηκαν στην παρούσα εργασία με την τεχνική LED-IF προέρχονται από διάφορες αρχαιολογικές τοποθεσίες της Ελλάδας. Ανάμεσα τους είναι τέσσερα θραύσματα από ασβεστόλιθο, τα LS37, LS42, BS και DYL, και δύο θραύσματα κονιάματος, τα ZM6 και DY2. Τέλος, αποκτήθηκαν 7 αντικείμενα από την Εφορεία Αρχαιοτήτων της Πόλης των Αθηνών, από διάφορα μνημεία της Αθήνας στο πλαίσιο του έργου CALLOS (Conservation of Athens antiquities with Laser and Lidar technologies Open to Science and public (MIS- 5056208)). Ανάμεσα στα αντικείμενα της Αθήνας, υπάρχουν 2 κεραμικά, CER1 και CER2, 1 πωρόλιθος, POR3, και 4 δείγματα μαρμάρου, MAR1, MAR3, MAR5 και MAR6. Παρακάτω παρουσιάζονται οι εικόνες των δειγμάτων (Σχ.13, 14, 15, 16, 17). Επειδή η χλωροφύλλη είναι χρωστική, που είναι παρούσα σε πολλές βιολογικές επικαθήσεις, αποκτήθηκε φάσμα αναφοράς της χλωροφύλλης από φύλλο ιβίσκου.

Στα αρχαιολογικά αντικείμενα έγινε ανάλυση, ώστε να διαπιστωθεί το είδος του μικροοργανισμού που προκαλεί τη βιοδιάβρωση. Πιο συγκεκριμένα, στον παρακάτω πίνακα παρατίθενται τα ευρήματα των βιολόγων από το Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών για τα αντικείμενα στο πλαίσιο του έργου CALLOS και των συντηρητών του Ινστιτούτου Ηλεκτρονικής Δομής και Λέιζερ του ΙΤΕ για τα υπόλοιπα.

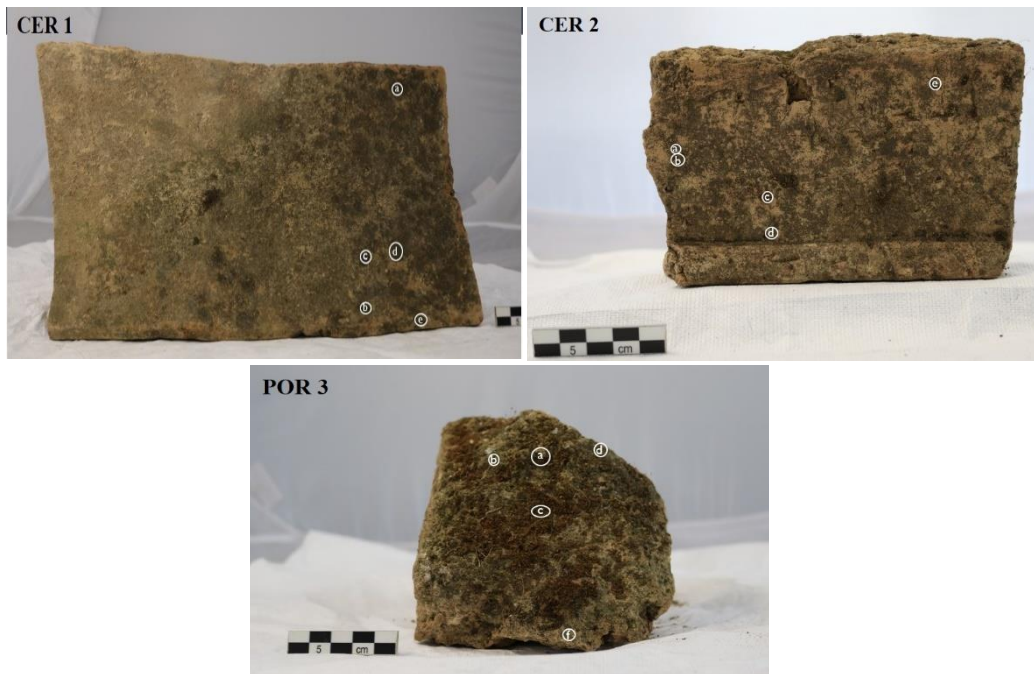
Πίνακας 2 Είδη μικροοργανισμών που προσβάλλουν τα υποστρώματα των αντικειμένων

Αρχαιολογικό αντικείμενο	Μικροοργανισμοί που προσβάλλουν το αντικείμενο
BS	Κυανοβακτήρια, φύκη/βρύα
LS37	Κυανοβακτήρια
LS42	Φύκη/βρύα
DY2	-
DYL	-
ZM6	Φύκη, βρύα
CER1	Φύκη, βρύα
CER2	Μύκητες, φύκη/βρύα

POR3	Φύκη, βρύα
MAR1	Μύκητες, βρύα/φύκη
MAR3	Μύκητες, βρύα/φύκη
MAR5	Μύκητες
MAR6	Μύκητες



Σχήμα 13 Τα δείγματα LS37, LS45, BS και DYL. Οι κόκκινοι κύκλοι δείχνουν τα σημεία, στα οποία έγιναν οι LED-IF μετρήσεις.



Σχήμα 14 Δυο διαφορετικά δείγματα από κεραμικό υλικό (CER 1, CER 2) και ένα δείγμα πωρόλιθου (POR 3) που προέρχονται από την Αθήνα (CALLOS). Οι κύκλοι παριστάνουν τα σημεία, από τα οποία πάρθηκαν οι LED-IF μετρήσεις.



Σχήμα 15 Τρία διαφορετικά δείγματα μαρμάρου (MAR 1, MAR 3, MAR 5, MAR 6) από μνημεία της Αθήνας (CALLOS). Στο δείγμα MAR 3 οι κύκλοι υποδεικνύουν τα σημεία, στα οποία πραγματοποιήθηκαν LED-IF μετρήσεις.



Σχήμα 16 Δείγματα κονιάματος (DY2 και ZM6)

4.3 Πειραματική Διαδικασία

Το κάθε δείγμα αναλύθηκε σε πολλαπλά σημεία τόσο στην επικάθηση όσο και στο υπόστρωμα και έτσι, αποκτήθηκαν συνολικά **116 φάσματα** με τη χρήση της πηγής LED στα 440 nm και **138 φάσματα** με την πηγή LED στα 375 nm (περισσότερα σημεία αναλύθηκαν με το LED στα 375 nm).

Στα φάσματα φθορισμού που αποκτήθηκαν έγινε μια προεπεξεργασία, η οποία περιγράφεται στη συνέχεια. Κατ'αρχήν, μελετήθηκαν δύο φασματικά εύρη για κάθε πηγή LED:

- Λάμπα LED στα 440 nm: 1^ο εύρος: 480 – 800 nm και 2^ο εύρος: 600 – 800 nm
- Λάμπα LED στα 375 nm: 1^ο εύρος: 428 – 800 nm και 2^ο εύρος: 600 – 800 nm.

Κάτω από τα μήκη κύματος των 480 nm και 428 nm παρεμβάλλεται το σήμα από τις πηγές LED στα 440 nm και 375 nm αντίστοιχα, ενώ πάνω από τα 800 nm δεν παρατηρείται σήμα φθορισμού και γι' αυτό δεν συμπεριλήφθηκαν στην ανάλυση.

Αφού επιλέχθηκαν τα κατάλληλα φασματικά εύρη, αφαιρέθηκε το baseline από κάθε φάσμα κι εξετάστηκαν διάφοροι τρόποι κανονικοποίησης:

1. στο διάστημα [0,1],
2. διαίρεση με τη μέγιστη τιμή,
3. διαίρεση με το άθροισμα των εντάσεων,
4. διαίρεση με την τετραγωνική ρίζα του αθροίσματος των τετραγώνων των εντάσεων.

Κατόπιν, τα φάσματα εισήχθησαν σε script στην Python για την εκτέλεση της Ανάλυσης Κυρίων Συνιστωσών με σκοπό την παρατήρηση ομαδοποιήσεων βάσει του είδους του φθοροφόρου που είναι παρόν στα δείγματα.

Κεφάλαιο 5: Αποτελέσματα και Συζήτηση

Όπως προαναφέρθηκε, τα φάσματα φθορισμού των δειγμάτων, μετά την προεπεξεργασία που εξηγήθηκε προηγουμένως, εισήχθησαν σε script στην Python, το οποίο αναπτύχθηκε στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας χρησιμοποιώντας τις βιβλιοθήκες Matplotlib, NumPy, Pandas και Scikit-learn για την εκτέλεση της Ανάλυσης Κυρίων Συνιστωσών. Πιο αναλυτικά, το script εισάγει τα φάσματα φθορισμού στην Python από αρχείο Excel και στη συνέχεια, υπολογίζει τις κύριες συνιστώσες (ΚΣ), τις συντεταγμένες των δειγμάτων πάνω στις ΚΣ, το μερίδιο διασποράς που φέρει κάθε ΚΣ, τη βαρύτητα των μεταβλητών στις ΚΣ και τέλος, τα διαγράμματα που αναλύθηκαν στο 2^ο κεφάλαιο. Η ΑΚΣ εφαρμόζεται σε $(n \times p)$ πίνακα \mathbf{X} με p αριθμό μεταβλητών και n αριθμό δειγμάτων. *Στην παρούσα εργασία τα μήκη κύματος αντιστοιχούν στις μεταβλητές του μοντέλου, ενώ τα φάσματα φθορισμού από την ανάλυση των αρχαιολογικών αντικειμένων στα δείγματα.*

Ο κώδικας που χρησιμοποιήθηκε είναι ο παρακάτω:

```
import pandas as pd

import matplotlib.pyplot as plt

from sklearn.decomposition import PCA

from sklearn import preprocessing

import numpy as np

df=pd.read_excel('excel_file.xlsx',index_col=0)

df1=df.transpose()

scaled_data=preprocessing.scale(df1) #data standardisation

pca=PCA(n_components=3)

p=pca.fit(scaled_data) #calculate loading scores and var for each PC

pca_data=pca.transform(scaled_data) #generates coordinates for a PCA graph

per_var=np.round(pca.explained_variance_ratio_*100,decimals=1) #list
```

```

labels=['PC'+str(x) for x in range(1,len(per_var)+1)]

plt.bar(x=range(1,len(per_var)+1),height=per_var,tick_label=labels)

plt.ylabel('Percentage explained variance')

plt.xlabel('Principal Component')

plt.title('Scree plot')

plt.show()

pca_df=pd.DataFrame(pca_data,columns=labels) #dataframe with PC score coordinates

plt.scatter(pca_df.PC1,pca_df.PC2,s=10)

plt.title('Score plot')

plt.ylabel('PC2-{}%'.format(per_var[1]))

plt.xlabel('PC1-{}%'.format(per_var[0]))

plt.grid()

for sample in pca_df.index:

    plt.annotate(sample,(pca_df.PC1.loc[sample],pca_df.PC2.loc[sample]))

plt.show()

wl=pd.ExcelFile('excel_file.xlsx').parse('Φύλλο1')

names=[]

names.append(wl['wavelength'])

loadings=pca.components_.T * np.sqrt(pca.explained_variance_)

loading_matrix=pd.DataFrame(loadings,columns=labels, index=names)

print(loading_matrix)

eigenvectors=pd.DataFrame(pca.components_.T,columns=labels,index=names)

wavelength=np.linspace(600,800,350)

```

```

plt.plot(wavelength,loading_matrix)

plt.axes().spines['bottom'].set_position(('data',0))

plt.xlim(xmin=600)

lezanta=['PC1','PC2', 'PC3']

plt.legend(lezanta)

plt.xlabel('wavelength (nm)')

plt.ylabel('loadings intensity')

plt.title('loadings plot')

plt.show()

```

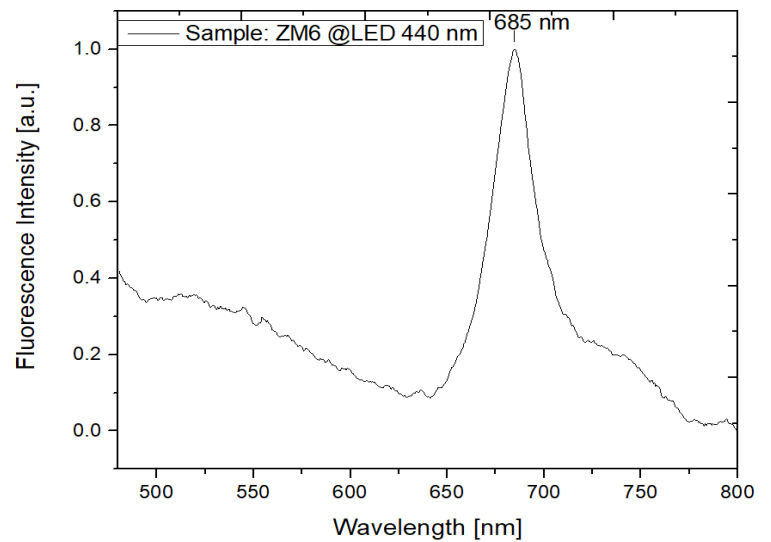
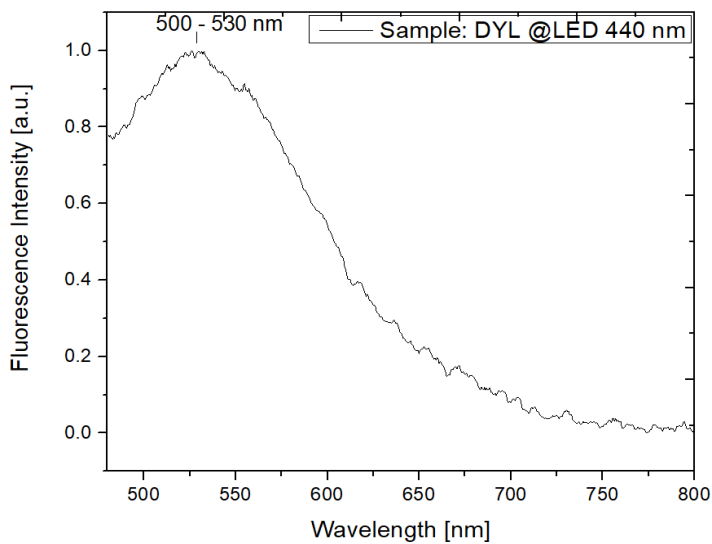
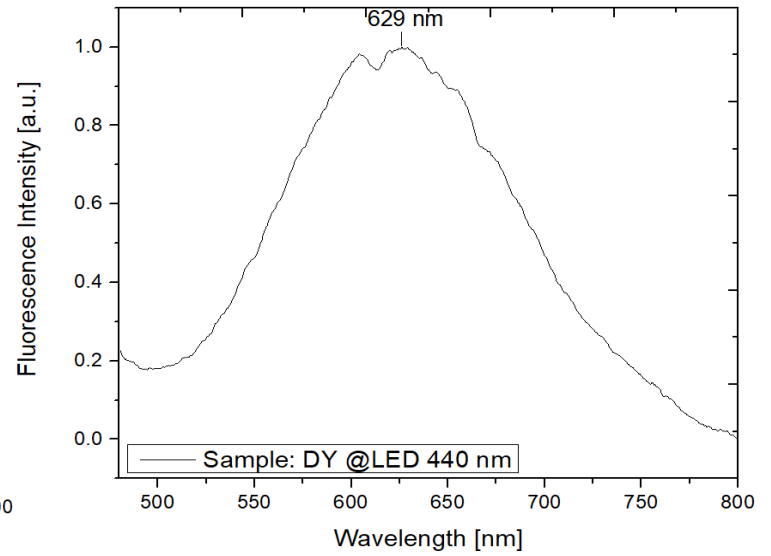
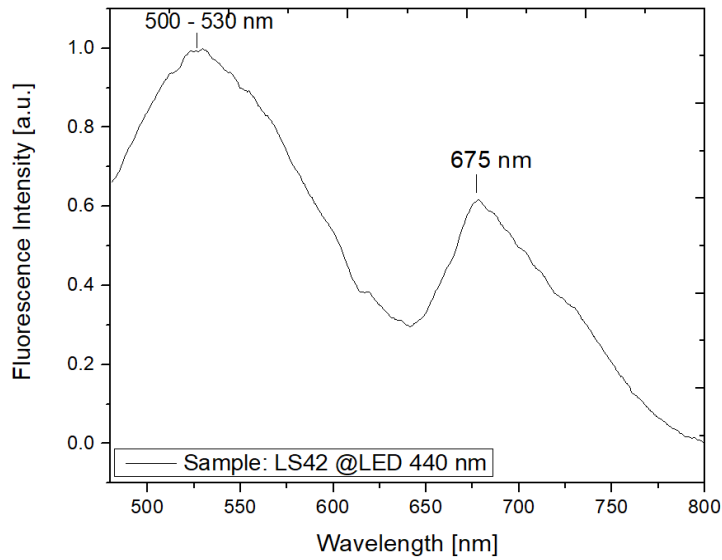
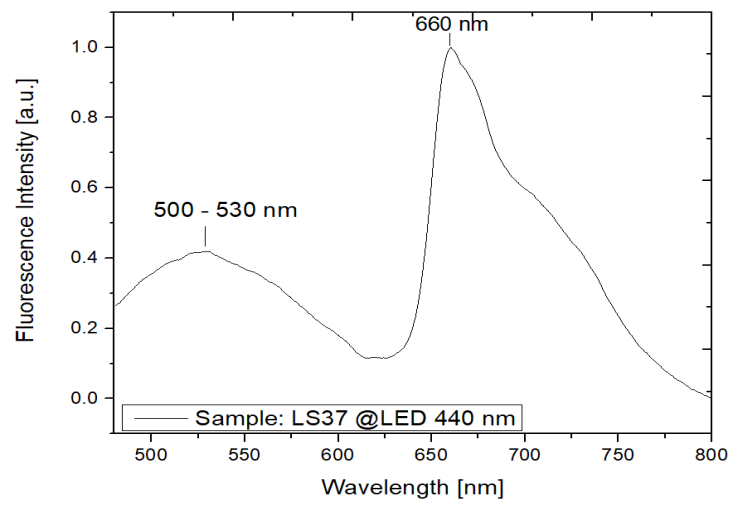
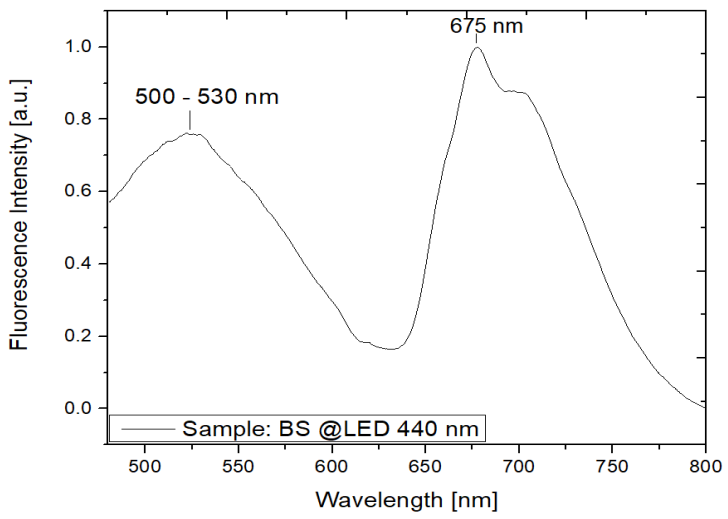
5.1 Ποιοτική ανάλυση φασμάτων φθορισμού

Από τα φάσματα φθορισμού των δειγμάτων, χαρακτηριστικά δείγματα των οποίων φαίνονται στα Σχήματα 17,18,19, έγινε ποιοτική ανάλυση και τα αποτελέσματα παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα. Πιο αναλυτικά, παρουσιάζονται οι κορυφές φθορισμού των αντικειμένων που αναλύθηκαν, το είδος της βιολογικής επικάλυψης που ταυτοποιείται, καθώς και οι αύξοντες αριθμοί ανάλυσης που αντιστοιχούν στα φάσματα φθορισμού όπως εισήχθησαν στην ΑΚΣ.

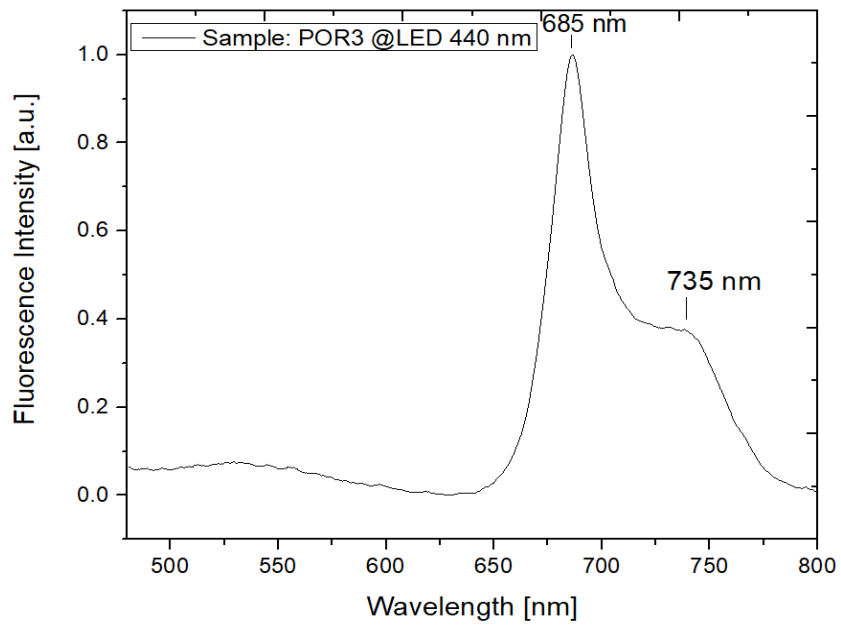
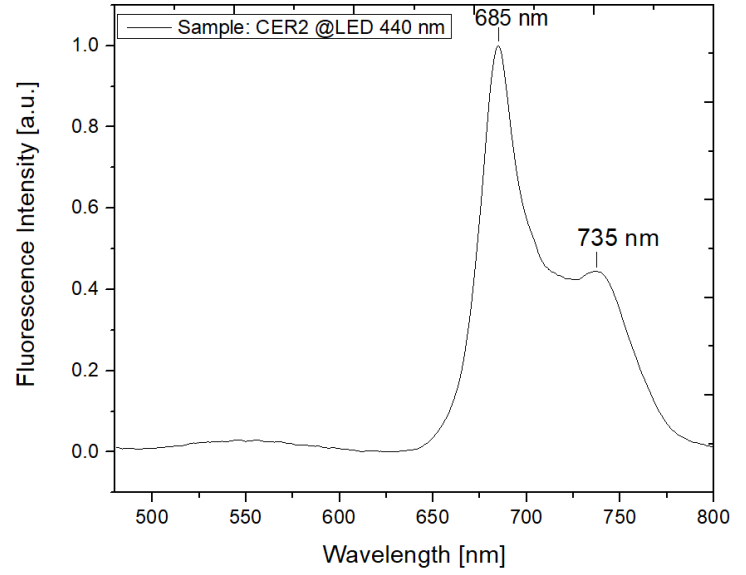
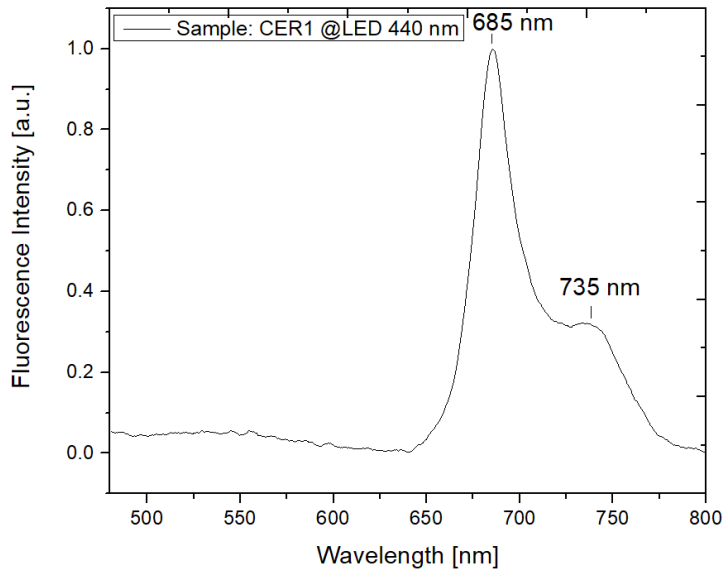
Πίνακας 3 Συγκεντρωτικός πίνακας αντικειμένων που αναλύθηκαν με αύξοντα αριθμό φάσματος όπως εισήχθη στην ΑΚΣ, κορυφές φθορισμού που ανιχνεύθηκαν και είδος βιολογικής επικάλυψης που ταυτοποιήθηκε

Δείγμα	Αριθμός δείγματος όπως εισήχθη στην ΑΚΣ (LED 375 nm)	Αριθμός δείγματος όπως εισήχθη στην ΑΚΣ (LED 440 nm)	Κορυφές φθορισμού (nm)	Βιολογική επικάλυψη
BS	92-111, 134-137	0-19	500 nm, 660 nm, 675 nm	αλλοφυκοκυανίνη, χλωροφύλλη
LS37	114-123	21-26, 37	500 nm, 660 nm	αλλοφυκοκυανίνη
LS42	124-133	27-36	500 nm, 675 nm	χλωροφύλλη

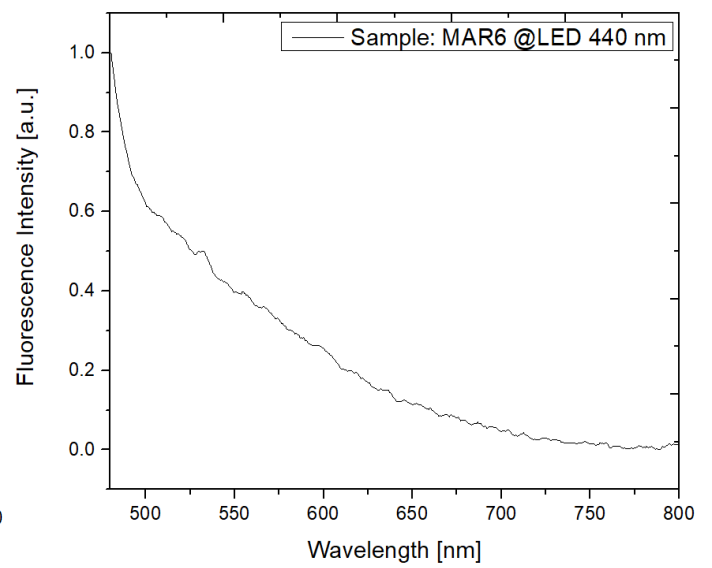
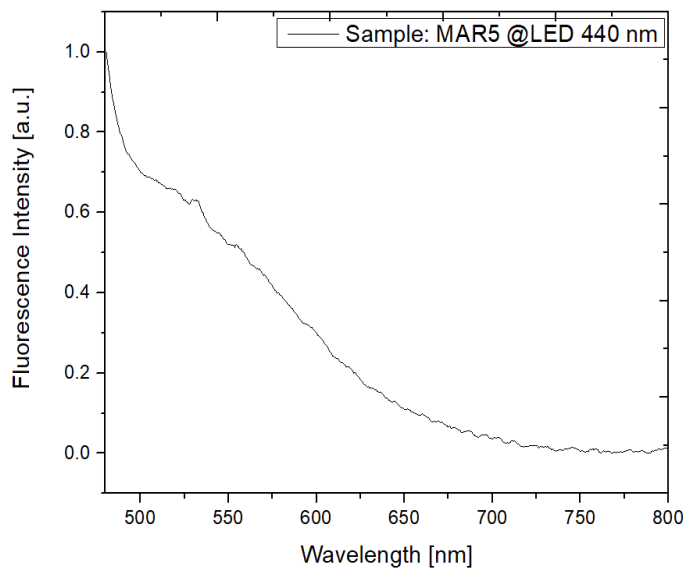
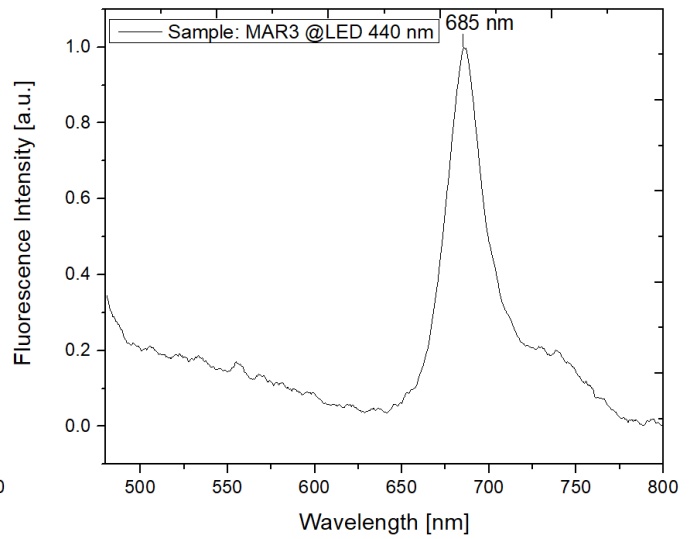
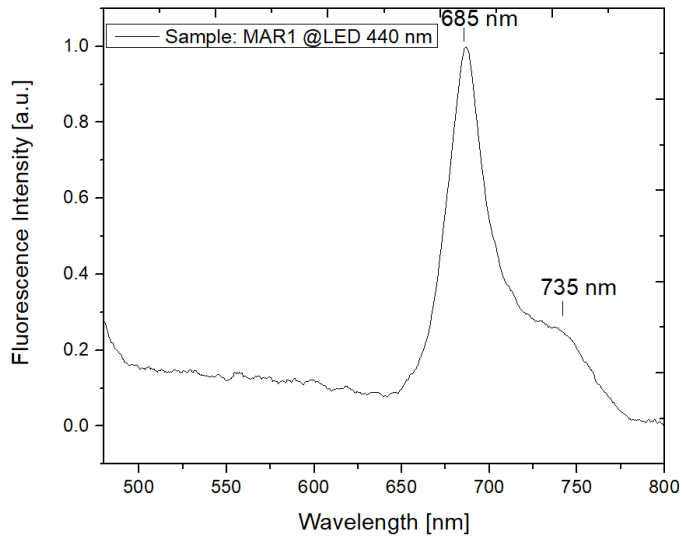
DY	-	38-41	629 nm	-
DYL	-	42-46	530 nm	-
ZM6	-	50-53	685 nm	χλωροφύλλη
CER1	42-48, 58	54-58	685 nm	χλωροφύλλη
CER2	49-57	59-63	685 nm	χλωροφύλλη
POR3	34-41	64-69	685 nm	χλωροφύλλη
MAR1	0-10, 59-66, 87	70-76, 97-107	500 nm, 685 nm	χλωροφύλλη
MAR3	11-18, 67-73, 88, 89	90-96, 108-115	500 nm, 685 nm	χλωροφύλλη
MAR5	19-24, 74-77, 90	77-80	500 nm	-
MAR6	25-33, 78-86, 91	81-89	440 nm, 480 nm	-



Σχήμα 17 Φάσματα φθορισμού των δειγμάτων BS, LS37, LS42, DY, DYL και ZM6



Σχήμα 18 Φάσματα φθορισμού των δειγμάτων CER1, CER2 και POR3



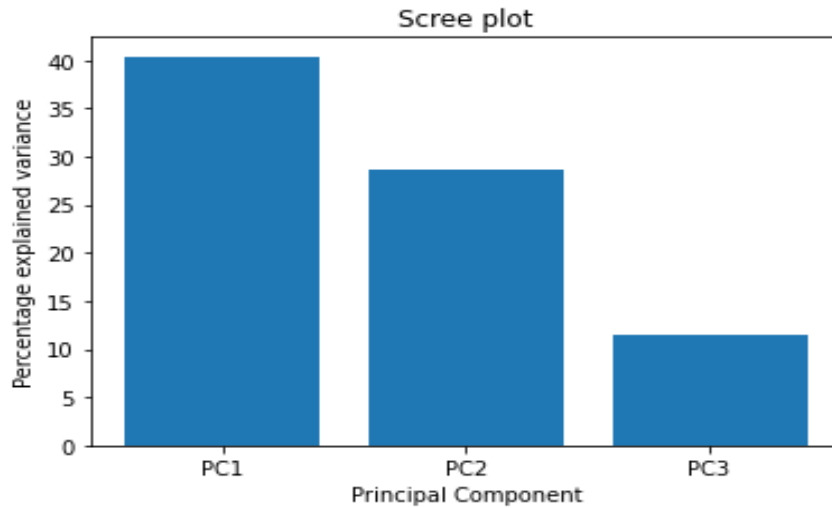
Σχήμα 19 Φάσματα φθορισμού των MAR1, MAR3, MAR5 και MAR6

5.1 Ανάλυση αποτελεσμάτων για την πηγή LED στα 440 nm

5.1.1 Κανονικοποίηση στο διάστημα [0,1]

- Φασματικό εύρος 480 – 800 nm

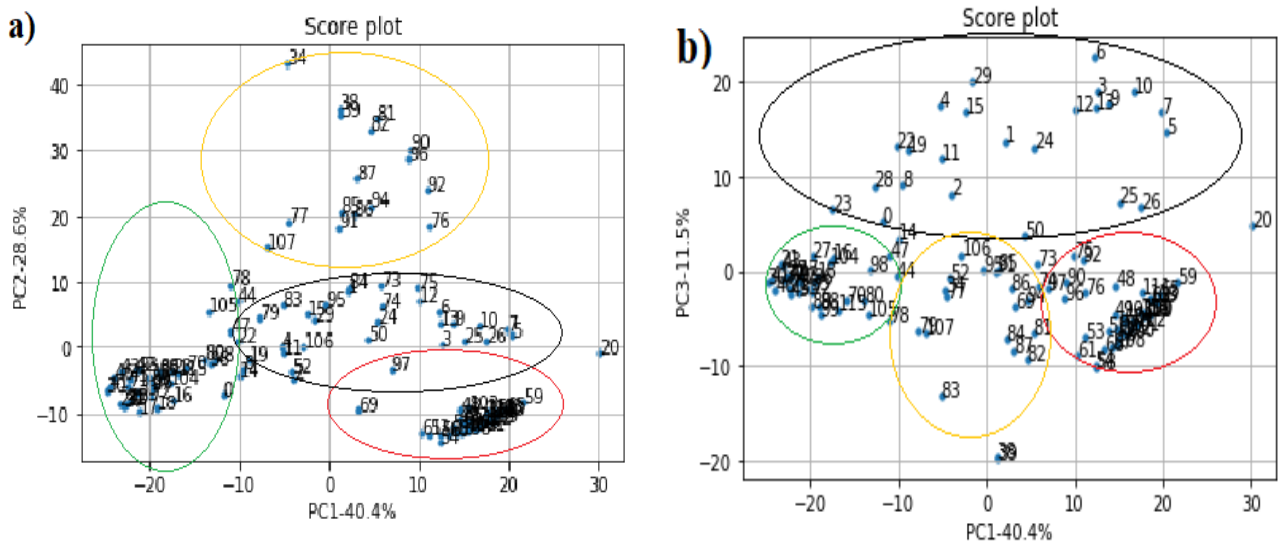
Αρχικά, το ποσοστό της διασποράς που αντιστοιχεί σε κάθε ΚΣ απεικονίζεται στο παρακάτω διάγραμμα Scree σε μορφή bar plot.



Σχήμα 20 Διάγραμμα Scree: Ποσοστό διασποράς που αντιστοιχεί στις κύριες συνιστώσες PC1, PC2 και PC3 για το εύρος 480 – 800 nm (Κανονικοποίηση στο [0,1])

Όπως φαίνεται, η πρώτη ΚΣ (PC1) περιγράφει το 40.4% της συνολικής διασποράς, η δεύτερη ΚΣ (PC2) περιγράφει το 28.6% της συνολικής διασποράς και η τρίτη ΚΣ (PC3) το 11.5%. Συνολικά περιγράφεται το 80.5% της συνολικής διασποράς.

Στη συνέχεια, κατασκευάστηκε το διάγραμμα συντεταγμένων των δειγμάτων (Σχήμα 22) πάνω στην πρώτη και δεύτερη κύρια συνιστώσα, PC1 και PC2, και στην πρώτη και τρίτη ΚΣ, PC1 και PC3, το οποίο απεικονίζει ομαδοποιήσεις των δειγμάτων βάσει πειραματικών τιμών. Για να γίνει αξιολόγηση των μοντέλων ΑΚΣ, έγινε ποιοτική ανάλυση σε όλα τα φάσματα και κατόπιν οι ομαδοποιήσεις/ελλείψεις σχεδιάστηκαν από τη γράφουσα με βάση/κριτήριο τα αποτελέσματα της ποιοτικής ανάλυσης.



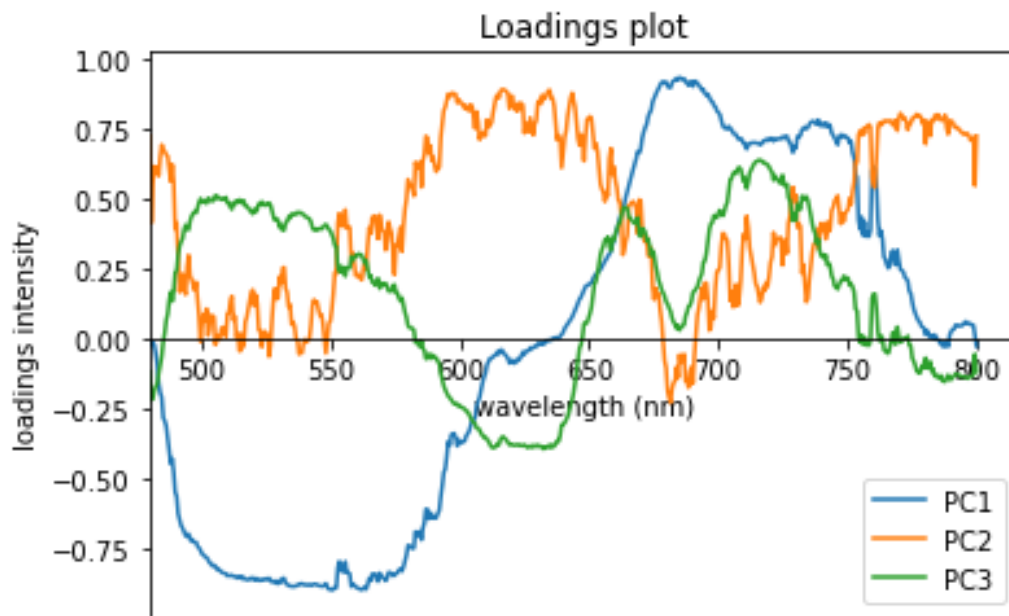
Σχήμα 21 Απεικόνιση 116 δειγμάτων στο χώρο των α) PC1 και PC2. β) PC1 και PC3.

Σύμφωνα με το Σχ. 21a, στην κόκκινη έλλειψη ομαδοποιήθηκαν τα δείγματα, τα οποία έχουν κορυφές φθορισμού χλωροφύλλης στα 685 nm και 735 nm. Στην μαύρη έλλειψη ομαδοποιήθηκαν τα δείγματα που παρουσίασαν πλατιά κορυφή φθορισμού γύρω στα 530 nm, η οποία δεν οφείλεται σε βιολογικό παράγοντα, και γύρω στα 660 nm και 675 nm. Η κορυφή στα 660 nm αποδίδεται στην αλλοφυκοκυανίνη, ενώ στα 675 nm στη χλωροφύλλη. Αυτή η μετατόπιση της χλωροφύλλης σε χαμηλότερα μήκη κύματος συγκριτικά με αυτή του φύλλου οφείλεται σε μειωμένο περιεχόμενο χλωροφύλλης και σε στρες του μικροοργανισμού λόγω έλλειψης θρεπτικών συστατικών.^[54] Στην πράσινη έλλειψη συγκεντρώθηκαν τα δείγματα, τα οποία έχουν επικρατέστερη μπάντα φθορισμού στα 530 nm. Τέλος, στην πορτοκαλί έλλειψη ανήκουν τα δείγματα που είτε δεν έχουν καμία μπάντα φθορισμού είτε είναι ακραίες τιμές. Το δείγμα 20 αντιστοιχεί στο φύλλο.

Στο Σχ. 21b παρατηρούμε ότι έγινε καλύτερος διαχωρισμός των δειγμάτων όσον αναφορά τις κορυφές φθορισμού στα 660 nm και 675 nm στην μαύρη έλλειψη και τις κορυφές φθορισμού στα 685 nm και 735 nm στην κόκκινη έλλειψη. Συνδυάζοντας τα σχήματα 21a και 21b είναι δυνατή η παρατήρηση του διαχωρισμού μεταξύ κυανοβακτηρίων (μαύρη έλλειψη) και χλωροφύλλης (κόκκινη έλλειψη).

Στο Σχ. 22 προβάλλονται οι βαρύτητες 555 μεταβλητών στις πρώτες τρεις ΚΣ. Οι μεταβλητές που αντιστοιχούν στα διαστήματα 484 – 585 nm και 672 – 710 nm συνεισφέρουν έντονα στην 1^η ΚΣ (PC1) και οι πληροφορίες τους εξηγούνται κυρίως από αυτή, καθώς έχουν μεγάλες τιμές

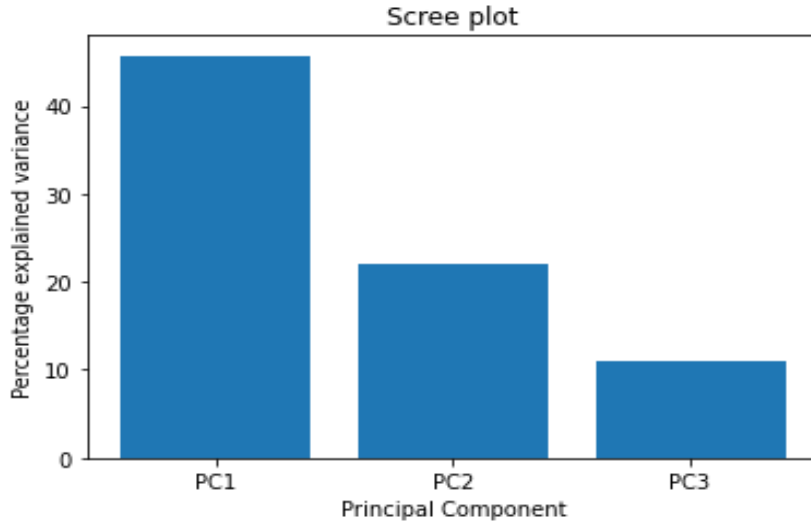
βαρύτητας $[-0.65, -0.9]$ και $[0.65, 0.9]$. Στη δεύτερη ΚΣ (PC2) οι μεταβλητές που έχουν τουλάχιστον 0.7 τιμές βαρύτητας ανήκουν στα διαστήματα 588 – 655 nm και 755 – 800 nm. Τέλος, η 3^η ΚΣ φέρει το 50% της πληροφορίας των μεταβλητών στα διαστήματα 500 – 530 nm και 705 – 735 nm.



Σχήμα 22 Διάγραμμα βαρύτητας 555 μεταβλητών στις κύριες συνιστώσες PC1, PC2 και PC3 (εύρος 480 – 800)

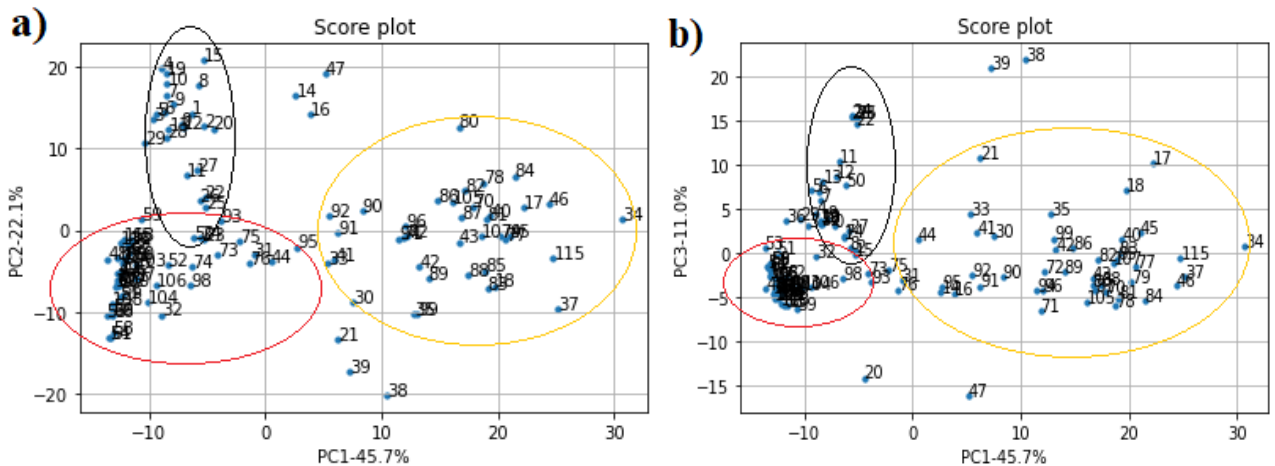
- **Φασματικό Εύρος 600 – 800 nm**

Για το συγκεκριμένο μοντέλο, το διάγραμμα Scree δείχνει ότι στην 1^η κύρια συνιστώσα (PC1) αντιστοιχεί το 45.7% της συνολικής διασποράς, στη 2^η (PC2) το 22.1% και τέλος στην 3^η (PC3) το 11%. Η συνολική διασπορά που εξηγείται από αυτές τις τρεις ΚΣ ανέρχεται στα 77.8%.



Σχήμα 23 Διάγραμμα Scree: Ποσοστό διασποράς που αντιστοιχεί στις PC1, PC2 και PC3 για το εύρος 600-800nm (κανονικοποίηση στο [0,1])

Στο παρακάτω διάγραμμα δειγμάτων (Σχ. 24) τοποθετήθηκαν τα δείγματα πάνω στον καινούριο υπόχωρο που σχηματίζουν οι ΚΣ.



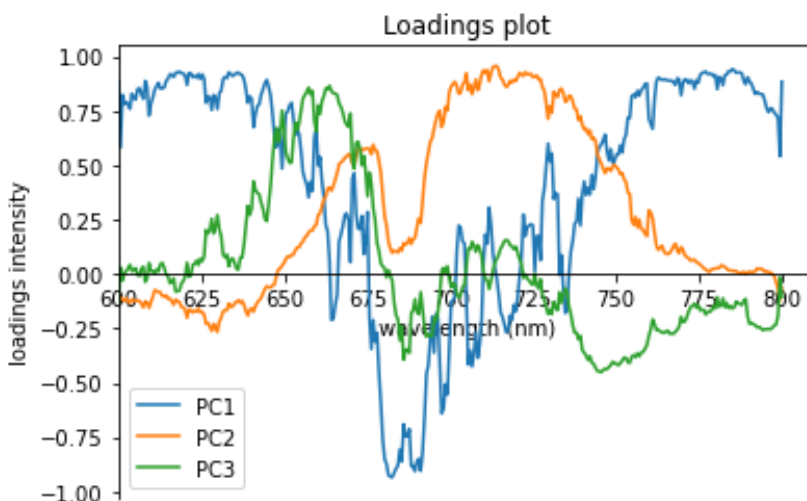
Σχήμα 24 Διάγραμμα δειγμάτων (Score plot): Απεικόνιση 116 δειγμάτων στο χώρο των a) PC1 και PC2. b) PC1 και PC3.

Παρατηρώντας το Σχ. 24a, στην κόκκινη έλλειψη ανήκουν τα δείγματα, τα οποία παρουσίασαν κορυφές φθορισμού χλωροφύλλης στα 685 nm και 730 – 740 nm. Αξίζει να σημειωθεί ότι η απόκλιση των δειγμάτων από το κέντρο της ομάδας, στην οποία ανήκουν, οφείλεται σε χαμηλότερο SNR. Στη μαύρη έλλειψη συγκεντρώθηκαν τα δείγματα με μπάντες

φθορισμού στα 660 nm (αλλοφυκοκυανίνη) και στα 675 nm (χλωροφύλλη). Στην κίτρινη έλλειψη αντιστοιχούν τα δείγματα που δεν εμφάνισαν καθόλου σήμα φθορισμού. Τέλος, τα δείγματα, τα οποία δεν ανήκουν σε κάποια ομάδα είναι ακραίες τιμές σύμφωνα με τις πειραματικές τους τιμές.

Σύμφωνα με το Σχ. 24b, οι ταξινομήσεις των δειγμάτων έμειναν ίδιες με αυτές στο Σχ. 24a. Πιο αναλυτικά, και εδώ η κόκκινη έλλειψη συμβολίζει την ομαδοποίηση των δειγμάτων βάσει της χλωροφύλλης (685 nm, 735 nm), η μαύρη έλλειψη αντιστοιχεί στην παρουσία αλλοφυκοκυανίνης (660 nm) και χλωροφύλλης (675 nm), ενώ η πορτοκαλί έλλειψη αναπαριστά την ταξινόμηση των δειγμάτων που δεν παρουσίασαν καθόλου σήμα φθορισμού. Παρόλο που δεν παρατηρήθηκαν έντονες διαφορές μεταξύ των διαγραμμάτων, η αξιοποίηση και των τριών ΚΣ δίνει μια καθαρότερη εικόνα όσον αφορά στο διαχωρισμό των δειγμάτων ανάλογα με την παρουσία χρωστικών.

Σύμφωνα με το διάγραμμα βαρύτητας (Σχ. 25), οι μεταβλητές των διαστημάτων 600 – 650 nm, 680 – 692 nm και 754 – 800 nm συνεισφέρουν έντονα στην 1^η ΚΣ και εξηγούνται σημαντικά από αυτή, με τιμές βαρύτητας [0.65,0.9], [-0.65, -0.9] και [0.65, 0.9] αντίστοιχα. Παρόμοια για τη 2^η ΚΣ, οι μεταβλητές του διαστήματος 696 – 740 nm παρουσιάζουν μεγάλη βαρύτητα με ελάχιστη τιμή 0.7. Οι μεταβλητές στο διάστημα 655 – 670 nm εξηγούνται σε μεγάλο βαθμό από την 3^η ΚΣ.

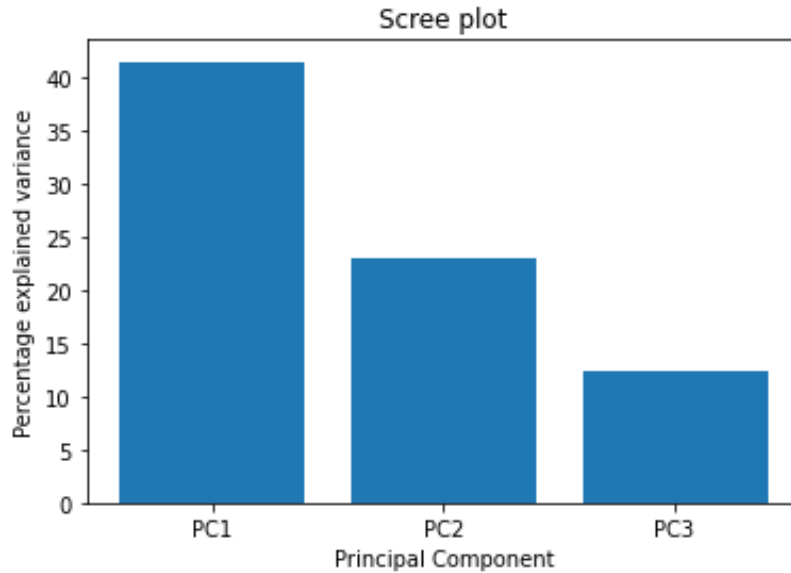


Σχήμα 25 Διάγραμμα Βαρύτητας 350 μεταβλητών στις κύριες συνιστώσες PC1 και PC2

5.1.2 Κανονικοποίηση με τη μέγιστη τιμή

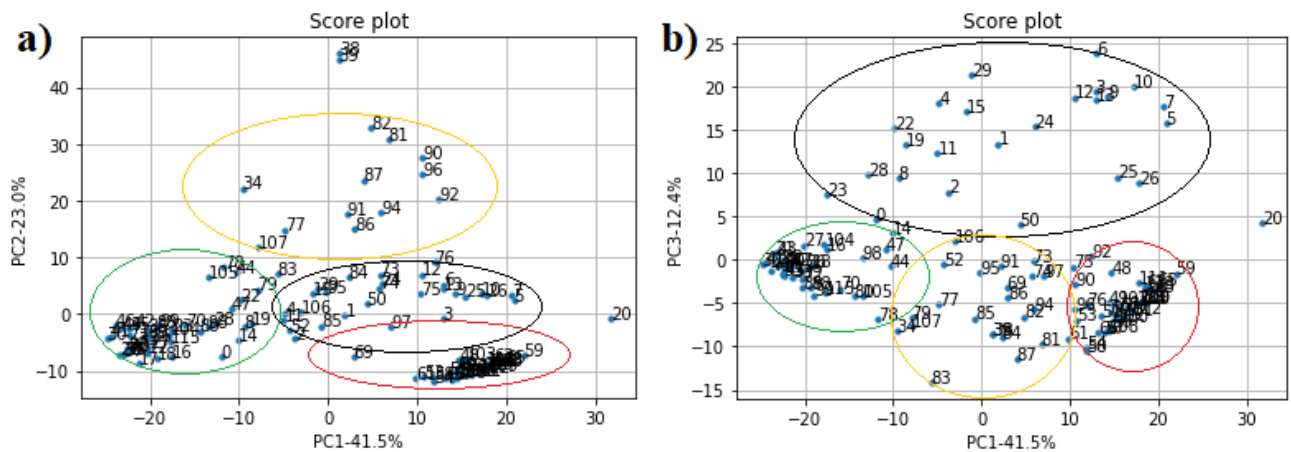
- Φασματικό Εύρος 480 – 800 nm

Το μοντέλο περιγράφει το 76.9% της συνολικής διασποράς. Πιο αναλυτικά, στην 1^η ΚΣ αντιστοιχεί το 41.5% της συνολικής διασποράς, στη 2^η ΚΣ το 23% και στην 3^η ΚΣ το 12.4%, όπως δείχνει το παρακάτω διάγραμμα Scree. (Σχ. 26)



Σχήμα 26 Διάγραμμα Scree: Ποσοστό διασποράς που αντιστοιχεί στις PC1, PC2 και PC3 για το εύρος 480-800nm (κανονικοποίηση με το μέγιστο)

Στα παρακάτω διαγράμματα δειγμάτων (Σχ. 27) παρατηρούνται οι ομαδοποιήσεις των δειγμάτων. Πιο αναλυτικά, στο διάγραμμα PC1-PC2 (Σχ. 27a), η κόκκινη έλλειψη αντιστοιχεί



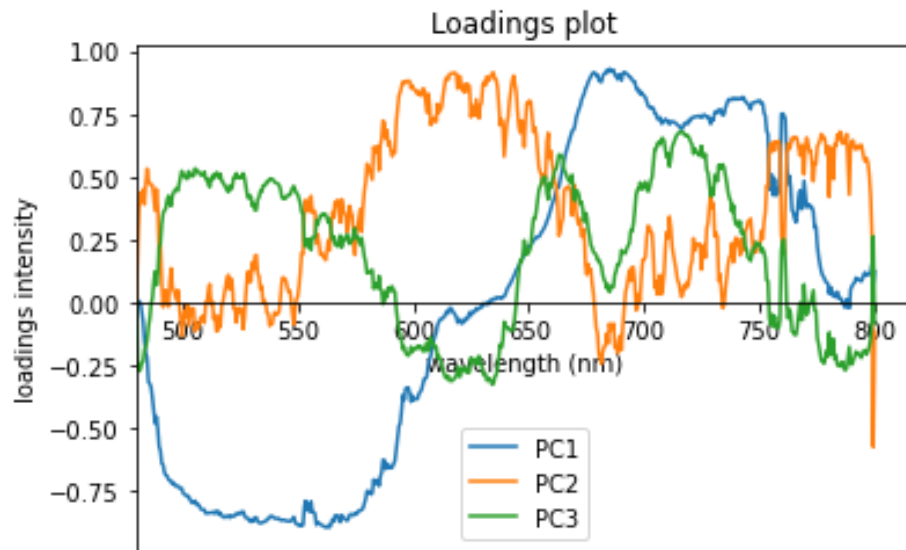
Σχήμα 27 Απεικόνιση 116 δειγμάτων στο χώρο των α) PC1 και PC2. β) PC1 και PC3.

στην ομαδοποίηση των δειγμάτων βάσει της παρουσίας χλωροφύλλης με κορυφές φθορισμού στα 685 nm και 735 nm. Στη μαύρη έλλειψη ταξινομήθηκαν τα δείγματα σύμφωνα με την παρουσία

αλλοφυκοκυανίνης (660 nm) και χλωροφύλλης (675 nm και 685 nm). Τέλος, τα δείγματα που εμφάνισαν έντονη και επικρατέστερη κορυφή φθορισμού στα 530 nm ομαδοποιήθηκαν στην πράσινη έλλειψη, ενώ αυτά που δεν έχουν καμιά κορυφή φθορισμού στην πορτοκαλί έλλειψη.

Στο Σχ. 27b (PC1-PC3) παρατηρούνται οι ίδιες ελλείψεις με τα ίδια κριτήρια διαχωρισμού όπως στο Σχ. 27a, αλλά εδώ η μαύρη έλλειψη περιέχει μόνο τα δείγματα με κορυφές αλλοφυκοκυανίνης και χλωροφύλλης (675 nm) και έτσι, διαχωρίστηκε επαρκώς η χλωροφύλλη με τα κυανοβακτήρια.

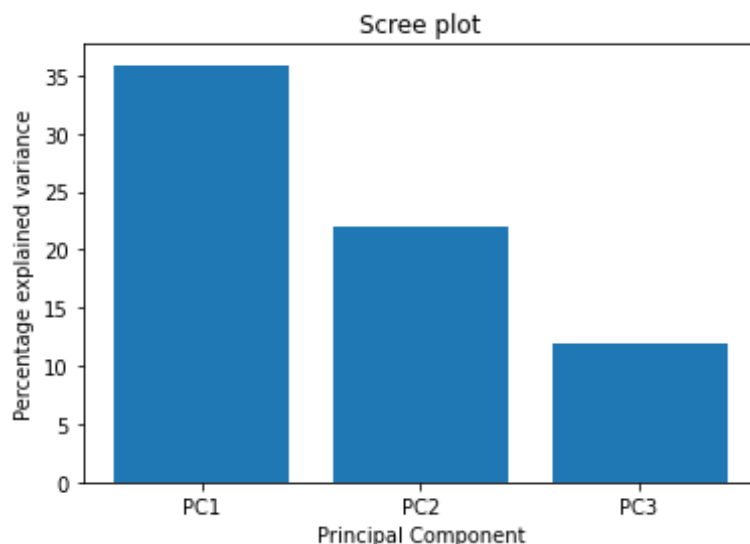
Οι μεταβλητές που συνεισφέρουν πιο έντονα στις ΚΣ φαίνονται στο παρακάτω διάγραμμα βαρύτητας (Σχ. 28). Επομένως, οι μεταβλητές στα διαστήματα 484 – 585 nm και 672 – 710 nm συνεισφέρουν έντονα στην 1^η ΚΣ (PC1), καθώς έχουν μεγάλες τιμές βαρύτητας. Οι μεταβλητές που ανήκουν στα διαστήματα 588 – 655 nm και 755 – 800 nm εξηγούνται κυρίως από την 2^η ΚΣ. Τέλος, η 3^η ΚΣ φέρει το 50% της πληροφορίας των μεταβλητών στα διαστήματα 500 – 530 nm και 705 – 735 nm.



Σχήμα 28 Διάγραμμα βαρύτητας 555 μεταβλητών στις κύριες συνιστώσες PC1, PC2 και PC3 (εύρος 480 – 800nm)

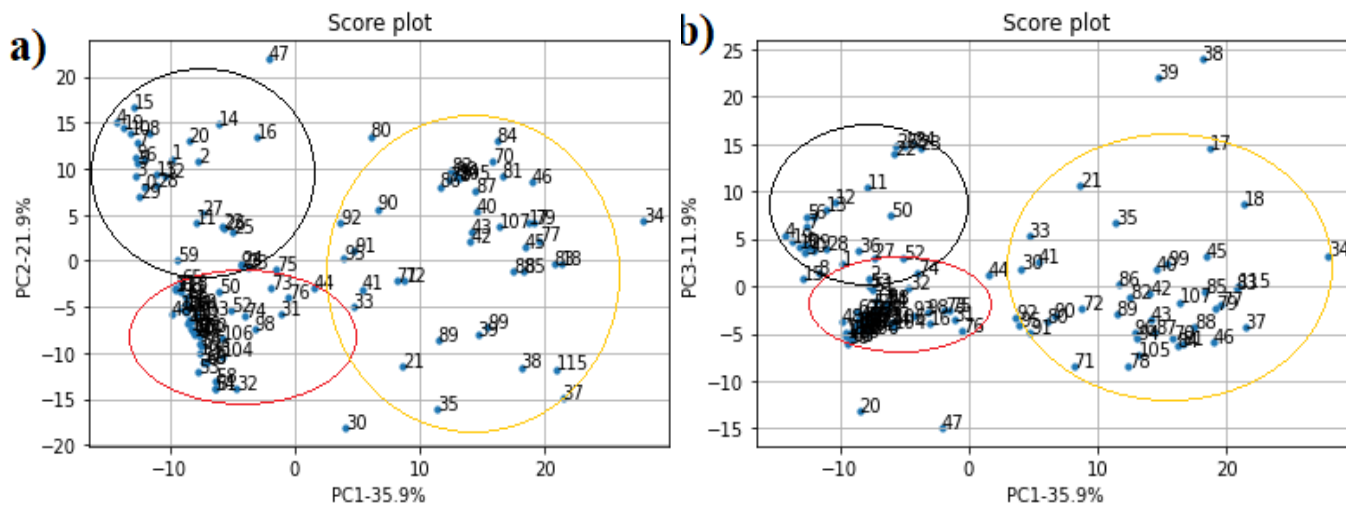
- **Φασματικό Εύρος 600 – 800 nm**

Η συνολική διασπορά που περιγράφεται από το μοντέλο ανέρχεται στο 69.7%. Η 1^η ΚΣ περιγράφει το 35.9% της συνολικής διασποράς, η 2^η ΚΣ το 21.9% και η 3^η το 11.9%. (Σχ. 29)



Σχήμα 29 Διάγραμμα Scree: Ποσοστό διασποράς που αντιστοιχεί στις PC1, PC2 και PC3 για το εύρος 600-800nm (κανονικοποίηση με τη μέγιστη ένταση)

Κατόπιν, προβλήθηκαν τα δείγματα στο χώρο των τριών ΚΣ και φαίνονται στο παρακάτω διάγραμμα δειγμάτων (Σχ. 30). Από το Σχ. 30a παρατηρούμε ότι δημιουργήθηκαν τρεις ομαδοποιήσεις



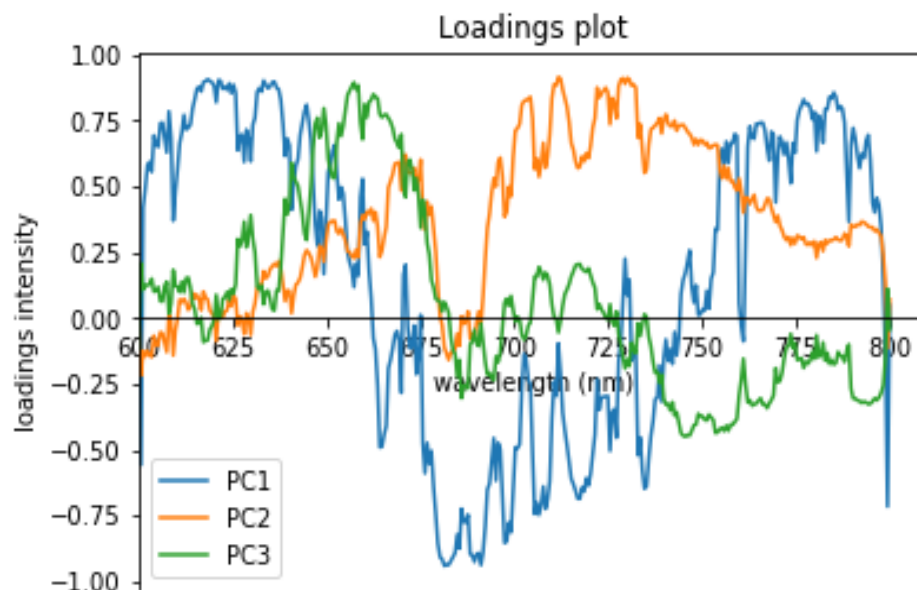
Σχήμα 30 Απεικόνιση 116 δειγμάτων στο χώρο των α) PC1 και PC2. β) PC1 και PC3.

στις PC1-PC2. Πιο συγκεκριμένα, τα δείγματα της κόκκινης έλλειψης ομαδοποιήθηκαν με βάση την παρουσία χλωροφύλλης (κορυφές φθορισμού στα 685 nm και 735 nm), ενώ στη μαύρη

έλλειψη με βάση την παρουσία αλλοφυκοκυανίνης (660 nm) και χλωροφύλλης (675 nm), που αντιστοιχούν στα κυανοβακτήρια. Στην πορτοκαλί έλλειψη κανένα δείγμα δεν είχε σήμα φθορισμού.

Στο διάγραμμα των PC1- PC3 (Σχ. 30b) παρατηρούνται οι ίδιες ελλείψεις με το Σχ.30a, ωστόσο στη μαύρη έλλειψη μερικά δείγματα που δεν αντιστοιχούν στα κυανοβακτήρια, δηλαδή στην χρωστική της αλλοφυκοκυανίνης, τοποθετήθηκαν μαζί. Επομένως, το διάγραμμα των PC1- PC2 διαχώρισε ικανοποιητικά τα κυανοβακτήρια και τη χλωροφύλλη και η 3^η ΚΣ δεν έδωσε κάποια επιπλέον πληροφορία.

Οι μεταβλητές που συνεισφέρουν έντονα στην 1^η ΚΣ ανήκουν στα διαστήματα 600 – 650 nm, 680 – 692 nm και 754 – 800 nm. Η 2^η ΚΣ εξηγεί τις μεταβλητές 696 – 740 nm και η 3^η ΚΣ τις μεταβλητές στο διάστημα 655 – 670 nm με μεγάλες τιμές βαρύτητας, όπως φαίνεται στο παρακάτω διάγραμμα (Σχ. 31).

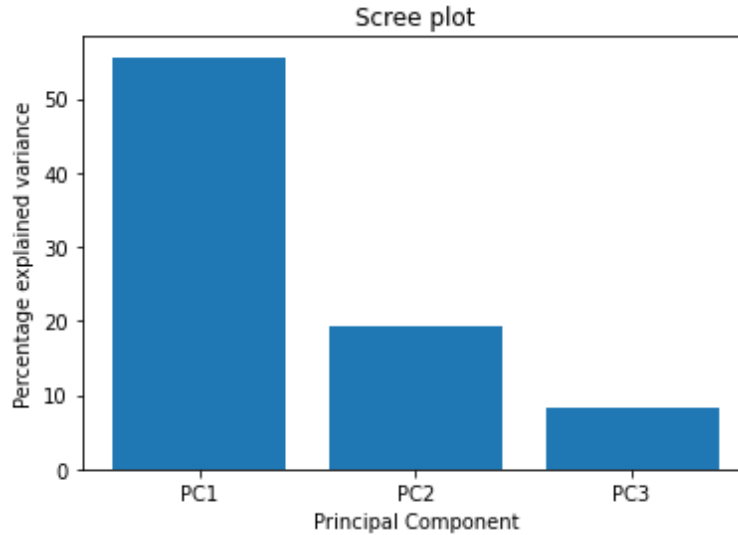


Σχήμα 31 Διάγραμμα βαρύτητας 350 μεταβλητών στις κύριες συνιστώσες PC1, PC2 και PC3 (εύρος 600 – 800)

5.1.3 Κανονικοποίηση με το άθροισμα των εντάσεων

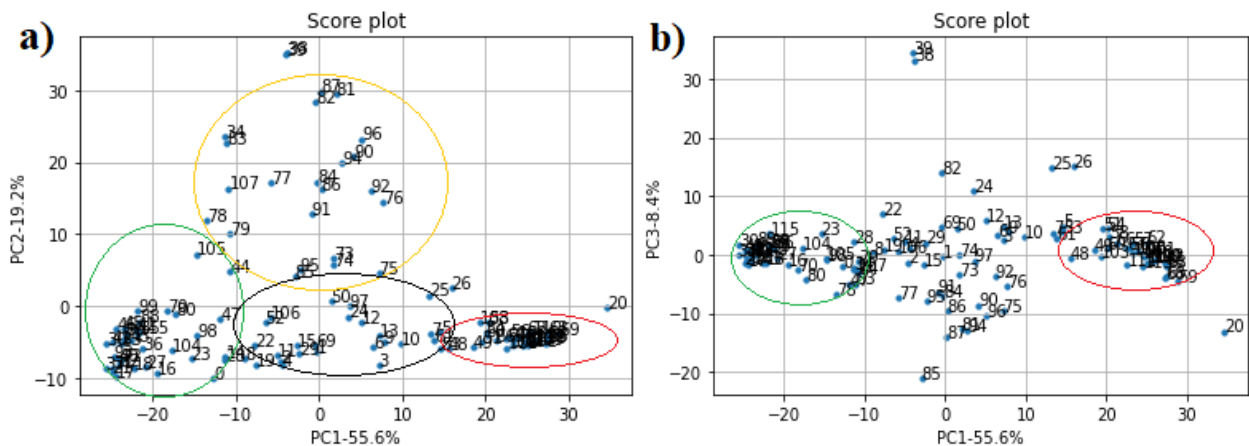
- Φασματικό Εύρος 480 – 800 nm

Το μοντέλο περιγράφει το 83.2% της συνολικής διασποράς. Πιο αναλυτικά η 1^η ΚΣ εξηγεί το 55.6%, η 2^η ΚΣ το 19.2% και η 3^η ΚΣ το 8.4%, όπως δείχνει το διάγραμμα Scree.



Σχήμα 32 Διάγραμμα Scree: Ποσοστό διασποράς που αντιστοιχεί στις PC1, PC2 και PC3 για το εύρος 480-800nm (κανονικοποίηση με το άθροισμα των εντάσεων)

Παρακάτω (Σχ. 33) βλέπουμε από το διάγραμμα δειγμάτων Σχ. 33a ότι στην κόκκινη έλλειψη

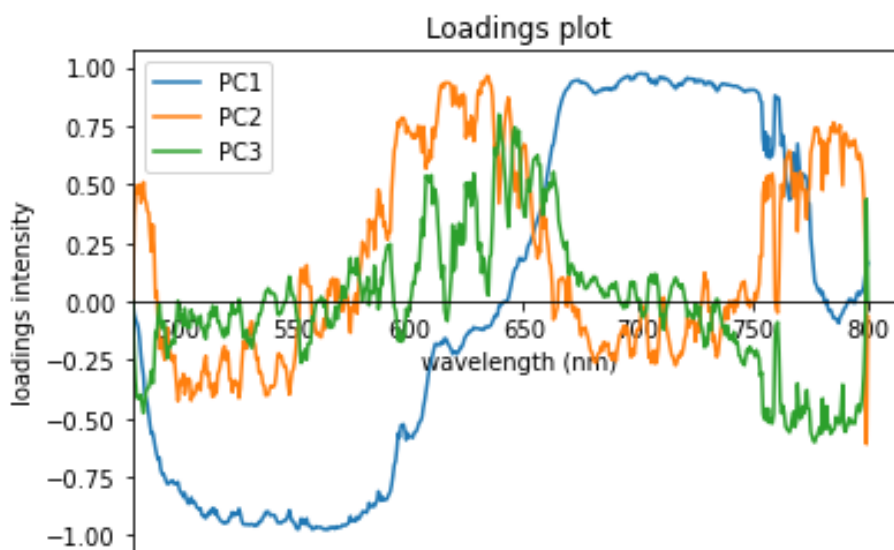


Σχήμα 33 Απεικόνιση 116 δειγμάτων στο χώρο των a) PC1 και PC2. b) PC1 και PC3.

συγκεντρώθηκαν τα δείγματα με βάση την παρουσία χλωροφύλλης (685 nm, 735 nm). Στην

πράσινη έλλειψη ανήκουν τα δείγματα που εμφάνισαν πολύ έντονη κορυφή στα 530 nm (μη – βιολογικό), ενώ στην πορτοκαλί όσα δεν έχουν καθόλου σήμα φθορισμού. Στη μαύρη έλλειψη ταξινομήθηκαν τα δείγματα βάσει της αλλοφυκοκυανίνης (660 nm) και της χλωροφύλλης (675 nm και 685 nm) και δεν παρατηρείται καθαρός διαχωρισμός των δειγμάτων με τη χρωστική αλλοφυκοκυανίνη. Στο Σχ. 33b δημιουργήθηκαν δύο διακριτές ελλείψεις: στην κόκκινη ανήκουν τα δείγματα που έχουν τη χαρακτηριστική κορυφή της χλωροφύλλης στα 685 nm και 735 nm, ενώ στην πράσινη αυτά που εμφανίζουν έντονη μπάντα φθορισμού στα 530 nm. Όπως φαίνεται και από τα δύο διαγράμματα, δεν έχουμε ικανοποιητικό διαχωρισμό των δειγμάτων βάσει των βιολογικών επικαθήσεων τους.

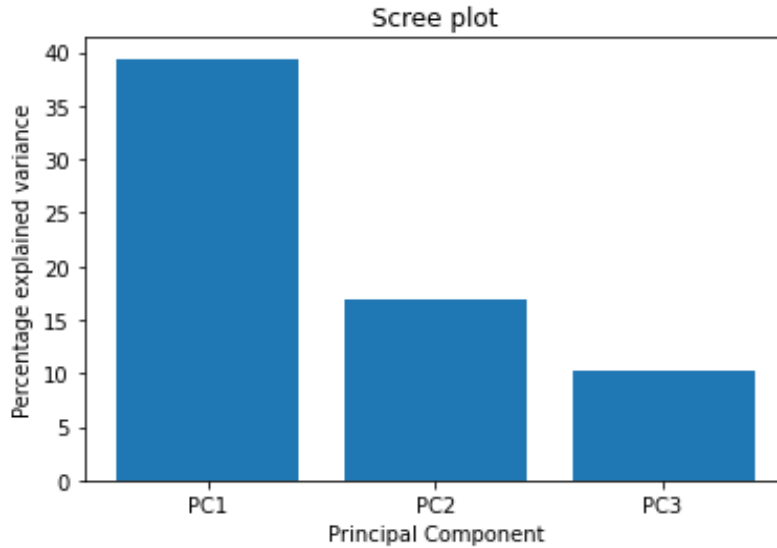
Τέλος, από το διάγραμμα βαρύτητας (Σχ. 34) διαπιστώνουμε ότι οι μεταβλητές στα διαστήματα 490 – 595 nm και 665 – 762 nm συνεισφέρουν έντονα στην 1^η ΚΣ με βαρύτητες που πλησιάζουν τη μονάδα. Οι μεταβλητές στο διάστημα 595 – 640 nm εξηγούνται από τη 2^η ΚΣ σε πολύ μεγάλο βαθμό με τιμές βαρύτητας που κυμαίνονται στο [0.65,0.95] και τέλος, οι μεταβλητές 638 – 650 nm εξηγούνται κατά 50% από την 3^η ΚΣ.



Σχήμα 34 Διάγραμμα βαρύτητας 555 μεταβλητών στις κύριες συνιστώσες PC1, PC2 και PC3 (εύρος 480 – 800nm)

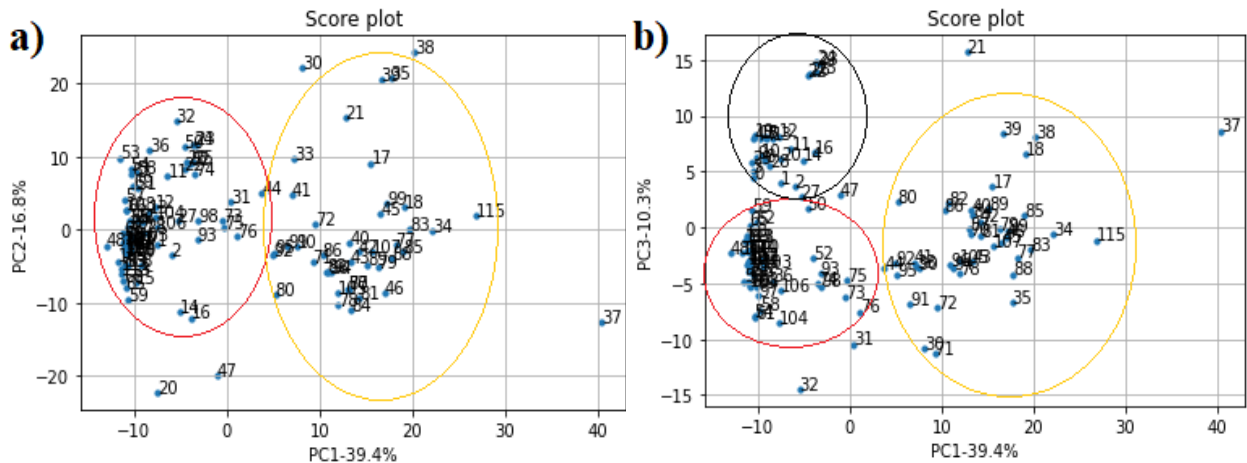
- **Φασματικό Εύρος 600 – 800 nm**

Στο παρακάτω διάγραμμα Scree (Σχ. 35) αποτυπώνεται η συνεισφορά της κάθε ΚΣ και η συνολική διασπορά που περιγράφει το μοντέλο, η οποία είναι 66.5%. Πιο αναλυτικά, η 1^η ΚΣ περιγράφει το 39.4%, η 2^η ΚΣ το 16.8% και η 3^η ΚΣ το 10.3%.



Σχήμα 35 Διάγραμμα Scree: Ποσοστό διασποράς που αντιστοιχεί στις PC1, PC2 και PC3 για το εύρος 600-800nm (κανονικοποίηση με το άθροισμα των εντάσεων)

Κατόπιν, κατασκευάστηκε το διάγραμμα δειγμάτων (Σχ. 36) και παρατηρήθηκαν οι εξής ομαδοποιήσεις.



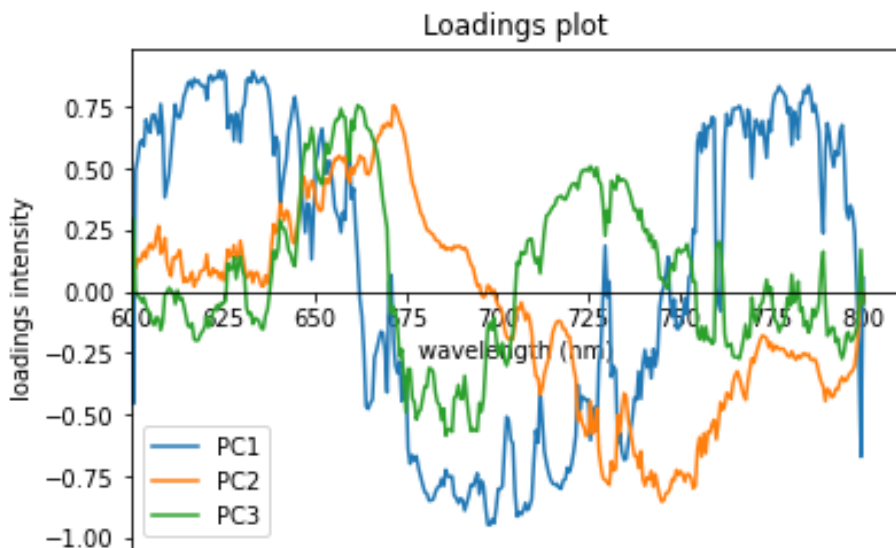
Σχήμα 36 Απεικόνιση 116 δειγμάτων στο χώρο των a) PC1 και PC2. b) PC1 και PC3.

Αναλύοντας το Σχ. 36α παρατηρούνται δύο κύριες ομαδοποιήσεις. Στην κόκκινη έλλειψη ταξινομήθηκαν τα δείγματα που εμφάνισαν κορυφές φθορισμού, οι οποίες αποδίδονται σε

βιολογικό παράγοντα και είναι οι χρωστικές χλωροφύλλη (675 nm, 685 nm και 735 nm) και αλλοφυκοκυανίνη (660 nm). Στην πορτοκαλί έλλειψη συγκεντρώθηκαν τα δείγματα που χαρακτηρίζονται από απουσία σήματος φθορισμού.

Προχωρώντας στην ανάλυση του Σχ. 36b, δημιουργήθηκαν τρεις κύριες ομαδοποιήσεις. Στην κόκκινη έλλειψη ανήκουν τα δείγματα που έχουν έντονη κορυφή φθορισμού της χλωροφύλλης στα 685 nm και 735 nm, ενώ στη μαύρη έλλειψη έγινε ομαδοποίηση των δειγμάτων βάσει της παρουσίας αλλοφυκοκυανίνης στα 660 nm και χλωροφύλλης στα 675 nm. Στην πορτοκαλί ομάδα ομαδοποιήθηκαν τα δείγματα που δεν εμφάνισαν καμία κορυφή φθορισμού. Παρατηρώντας και τα δύο διαγράμματα μπορούμε να συμπεράνουμε ότι έγινε ικανοποιητικός διαχωρισμός μεταξύ κυανοβακτηρίων (μαύρη έλλειψη) και χλωροφύλλης (κόκκινη έλλειψη) χάρη στην αξιοποίηση της 3^{ης} ΚΣ.

Τέλος, σύμφωνα με το διάγραμμα βαρύτητας (Σχ. 37), οι μεταβλητές στα διαστήματα 605 – 640 nm, 676 – 721 nm και 755 – 787 nm συνεισφέρουν έντονα στην 1^η ΚΣ. Η 2^η ΚΣ εξηγεί στο μεγαλύτερο ποσοστό τις μεταβλητές στα διαστήματα 668 – 675 nm και 729 – 755 nm, ενώ η 3^η ΚΣ τις μεταβλητές 655 – 667 nm.

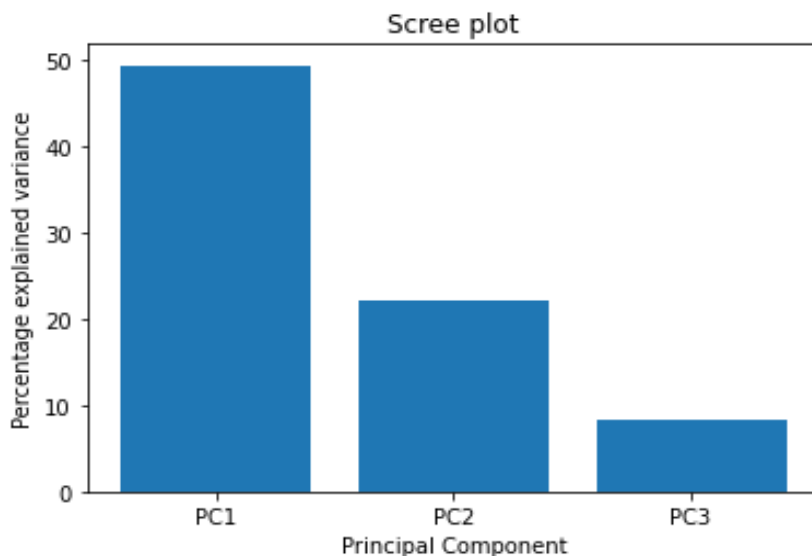


Σχήμα 37 Διάγραμμα βαρύτητας 350 μεταβλητών στις κύριες συνιστώσες PC1, PC2 και PC3 (εύρος 600 – 800nm)

5.1.4 Κανονικοποίηση με την τετραγωνική ρίζα του αθροίσματος των τετραγώνων των εντάσεων

- Φασματικό Εύρος 480 – 800 nm

Η συνολική διασπορά που περιγράφει το μοντέλο αντιστοιχεί στο 79.9%. Η 1^η ΚΣ περιγράφει το 49.4%, η 2^η ΚΣ το 22.1% και τέλος, η 3^η ΚΣ το 8.4%.

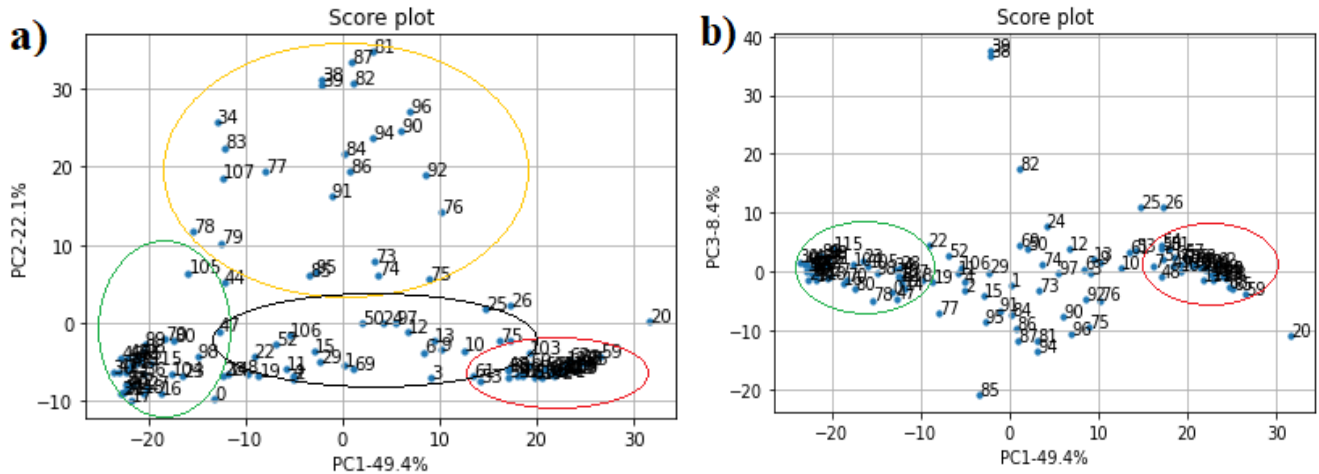


Σχήμα 38 Διάγραμμα Scree: Ποσοστό διασποράς που αντιστοιχεί στις PC1, PC2 και PC3 για το εύρος 480-800nm

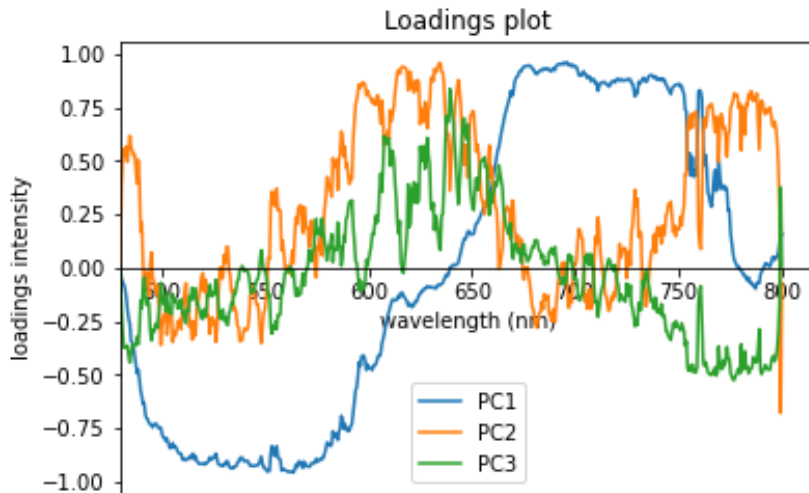
Από τα διαγράμματα δειγμάτων (Σχ. 39) βλέπουμε ότι τα αποτελέσματα είναι πολύ παρόμοια με αυτά της παραγράφου 5.1.3. Πιο αναλυτικά στο Σχ. 39a στην κόκκινη έλλειψη ομαδοποιήθηκαν τα δείγματα με βάση την παρουσία χλωροφύλλης, δηλαδή κορυφές φθορισμού στα 685 nm και 735 nm. Στην πράσινη έλλειψη συγκεντρώθηκαν τα δείγματα που εμφάνισαν πολύ έντονη και επικρατέστερη κορυφή φθορισμού στα 530 nm, ενώ στην πορτοκαλί έλλειψη αυτά που δεν έχουν καθόλου φθορισμό στα φάσματα τους. Στη μαύρη έλλειψη ανήκουν αυτά που έχουν κορυφές φθορισμού της αλλοφυκοκυανίνης στα 660 nm και χλωροφύλλης στα 675 nm και 685 nm.

Παράλληλα, το διάγραμμα δειγμάτων PC1-PC3 (Σχ. 39b) έδωσε δύο ελλείψεις, την κόκκινη που αντιστοιχεί στη χλωροφύλλη και την πράσινη που αντιστοιχεί σε κορυφή φθορισμού στα 530 nm μη βιολογικής προέλευσης. Είναι εμφανές και από τα δυο διαγράμματα ότι δεν έγινε ικανοποιητικός διαχωρισμός των χρωστικών χλωροφύλλης και αλλοφυκοκυανίνης.

Το παρακάτω διάγραμμα βαρύτητας (Σχ. 40) δείχνει τις συνεισφορές των μεταβλητών στις εκάστοτε ΚΣ. Πιο συγκεκριμένα, οι μεταβλητές στα διαστήματα 490 – 595 nm και 665 – 762 nm συνεισφέρουν έντονα στην 1^η ΚΣ, οι 595 – 640 nm στη 2^η ΚΣ και οι μεταβλητές 638 – 650 nm στην 3^η ΚΣ.



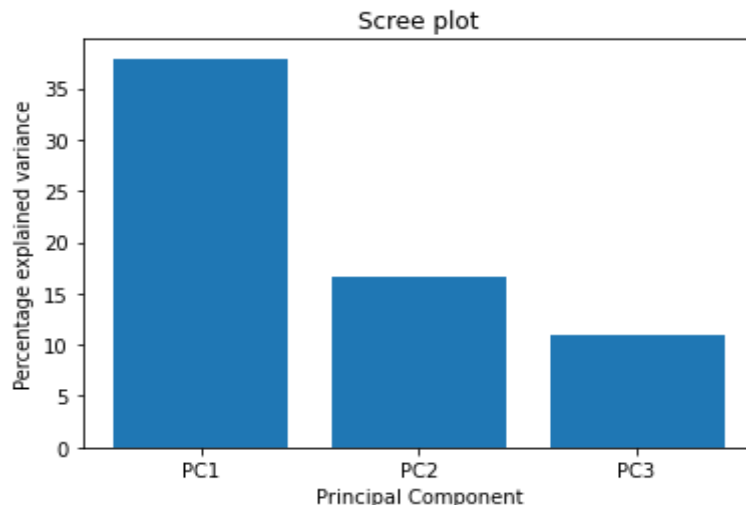
Σχήμα 39 Απεικόνιση 116 δειγμάτων στο χώρο των α) PC1 και PC2. β) PC1 και PC3.



Σχήμα 40 Διάγραμμα βαρύτητας 555 μεταβλητών στις κύριες συνιστώσες PC1, PC2 και PC3 (εύρος 480 – 800nm)

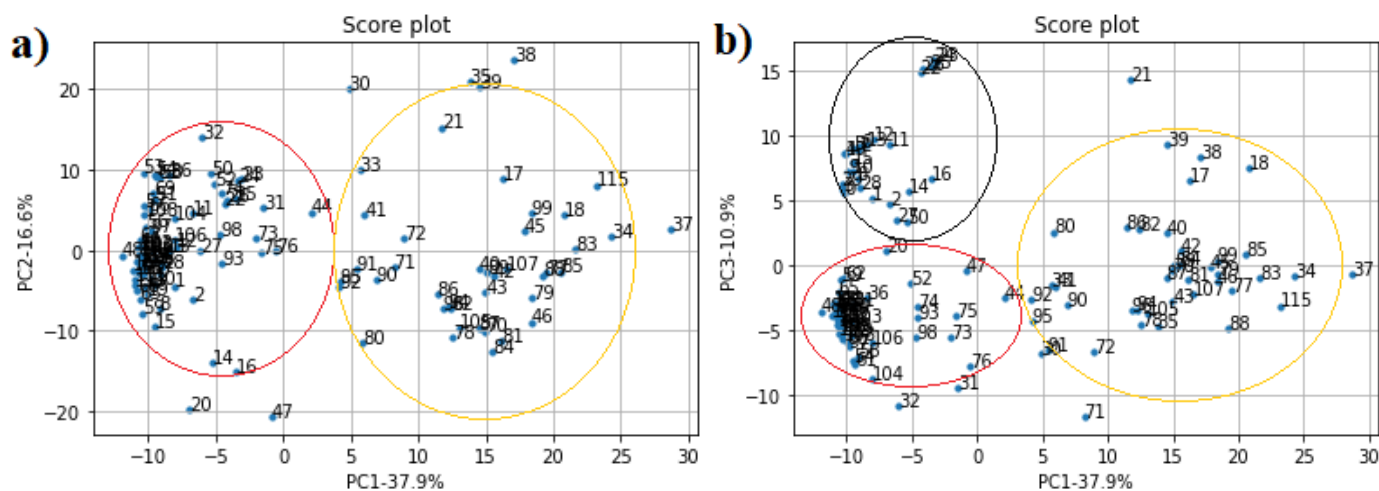
- **Φασματικό Εύρος 600 – 800 nm**

Από το παρακάτω διάγραμμα Scree βλέπουμε ότι το μοντέλο περιγράφει το 65.4% της συνολικής διασποράς. Η 1^η ΚΣ περιγράφει το 37.9%, η 2^η ΚΣ το 16.6% και η 3^η ΚΣ το 10.9%.



Σχήμα 41 Διάγραμμα Scree: Ποσοστό διασποράς που αντιστοιχεί στις PC1, PC2 και PC3 για το εύρος 600-800nm

Σύμφωνα με το διάγραμμα Σχ. 42a, στην κόκκινη έλλειψη ομαδοποιήθηκαν τα δείγματα που



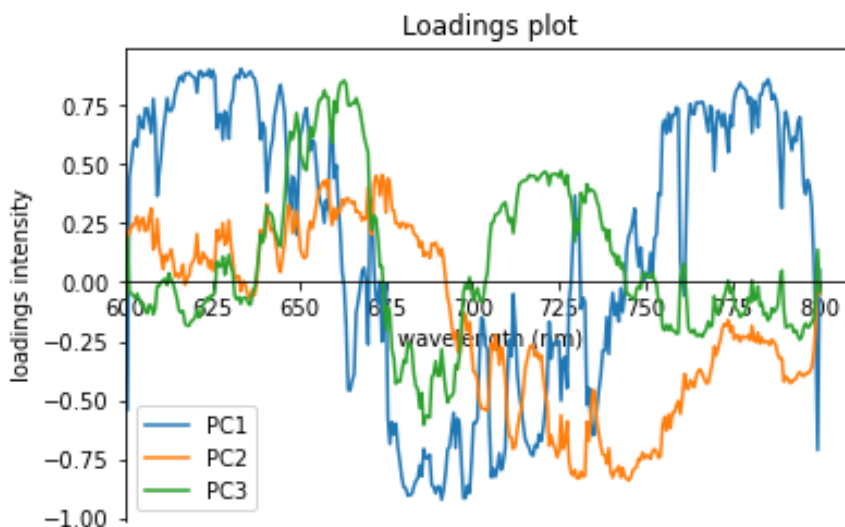
Σχήμα 42 Απεικόνιση 116 δειγμάτων στο χώρο των a) PC1 και PC2. b) PC1 και PC3.

έχουν κορυφές φθορισμού που αποδίδονται σε βιολογικό παράγοντα, είτε είναι η χλωροφύλλη (675nm, 685 nm) είτε είναι η αλοφυκοκυανίνη (660 nm). Στην πορτοκαλί έλλειψη ταξινομήθηκαν όσα δεν έχουν καθόλου σήμα φθορισμού.

Με την αξιοποίηση της 3^{15} ΚΣ (Σχ. 42b) τα δείγματα, τα οποία έχουν κορυφές φθορισμού από βιολογικό αίτιο, χωρίστηκαν στην κόκκινη έλλειψη που οφείλεται καθαρά στη χλωροφύλλη

(685 nm) και στη μαύρη έλλειψη που αντιστοιχεί στην αλλοφυκοκυανίνη (660 nm) και τη χλωροφύλλη (675 nm), δηλαδή στα κυανοβακτήρια.

Τέλος, από το διάγραμμα βαρύτητας βλέπουμε ότι οι μεταβλητές στα διαστήματα 605 – 640 nm, 676 – 721 nm και 755 – 787 nm συνεισφέρουν έντονα στην 1^η ΚΣ. Η 2^η ΚΣ εξηγεί στο μεγαλύτερο ποσοστό τις μεταβλητές στα διαστήματα 668 – 675 nm και 729 – 755 nm, ενώ η 3^η ΚΣ τις μεταβλητές 655 – 667 nm.



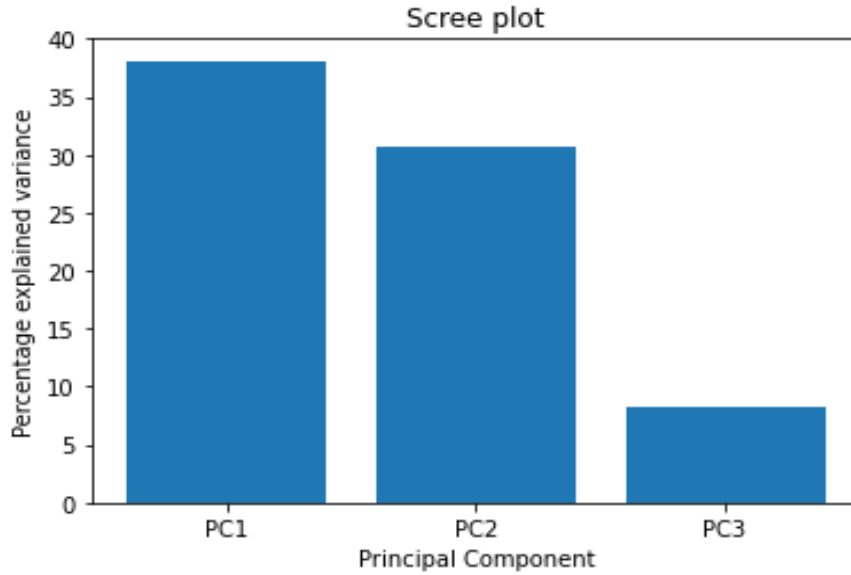
Σχήμα 43 Διάγραμμα βαρύτητας 350 μεταβλητών στις κύριες συνιστώσες PC1, PC2 και PC3 (εύρος 600 – 800nm)

5.2 Ανάλυση αποτελεσμάτων για την πηγή LED στα 375 nm

5.2.1 Κανονικοποίηση στο διάστημα [0,1]

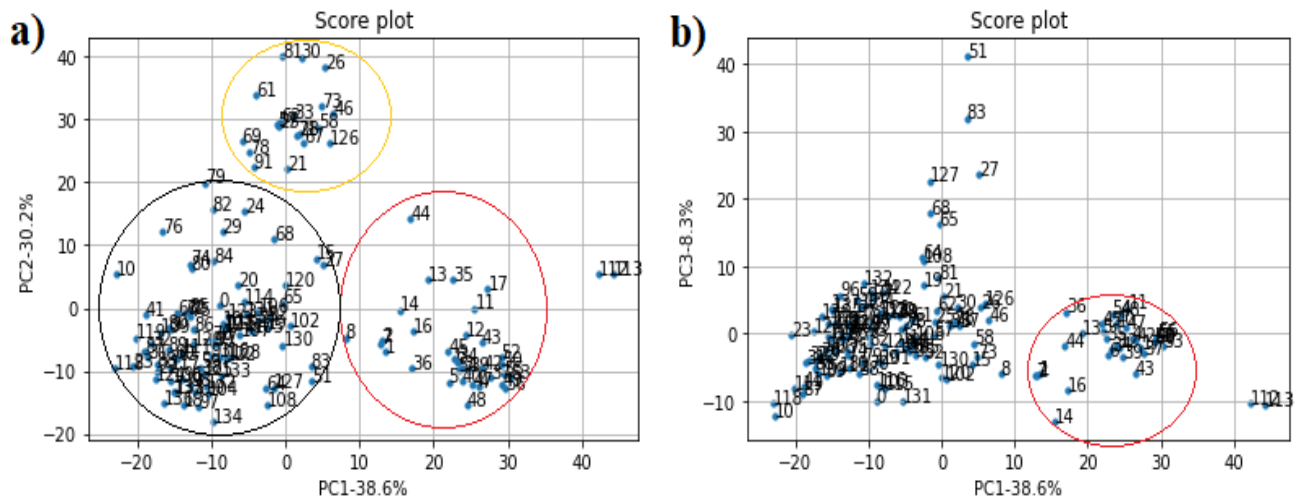
- Φασματικό Εύρος 428 – 800 nm

Αρχικά, από το Scree plot βλέπουμε ότι οι πρώτες τρεις ΚΣ περιγράφουν το 77.1% της συνολικής διασποράς και αναλυτικότερα, η 1^η ΚΣ περιγράφει το 38.6%, η 2^η ΚΣ το 30.3% και η 3^η το 8.3%.



Σχήμα 44 Διάγραμμα Scree: Ποσοστό διασποράς που εξηγεί η PC1, PC2 και η PC3 (είρος 428 - 800 nm)

Στο ακόλουθο διάγραμμα (Σχ. 45) παρουσιάζεται η κατανομή των δειγμάτων.

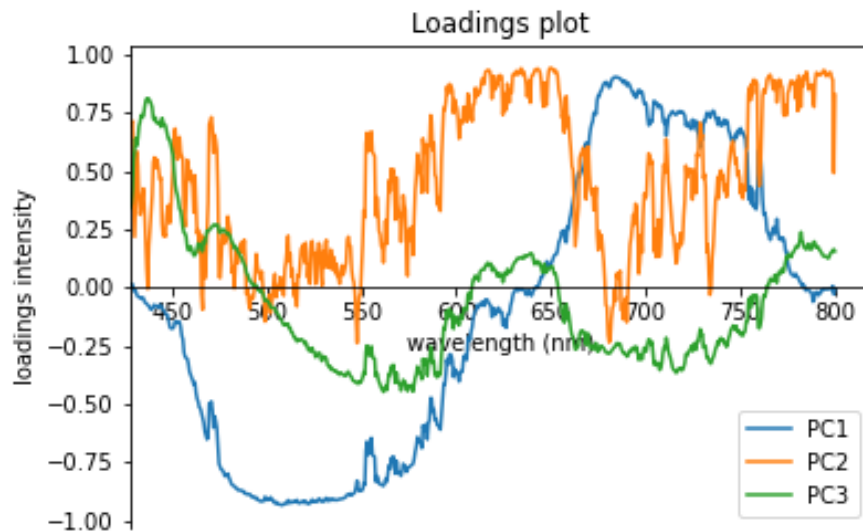


Σχήμα 45 Διάγραμμα Δειγμάτων: Απεικόνιση 138 δειγμάτων στο χώρο των α) PC1 και PC2. β) PC1 και PC3.

Σύμφωνα με το Σχ.45α, στην κόκκινη έλλειψη ομαδοποιήθηκαν τα δείγματα που έχουν έντονες μάντες φθορισμού χλωροφύλλης στα 685 nm και πιο ασθενείς στα 730 – 740 nm. Στη μαύρη έλλειψη ανήκουν τα δείγματα που η κορυφή στα 500 nm είναι πολύ εντονότερη από κάθε άλλη κορυφή που υπάρχει στο φάσμα τους, δηλαδή στα 685 nm, 675 nm, 660 nm, που υπάρχει

στο φάσμα τους. Στην πορτοκαλί έλλειψη ταξινομήθηκαν τα δείγματα που δεν έχουν καθόλου σήμα φθορισμού. Οι ακραίες τιμές 112, 113 ανήκουν στα φάσματα του φύλλου. Τέλος, όπως φαίνεται από το Σχ.45b, η 3^η ΚΣ δε βοήθησε ως προς την καλύτερη ομαδοποίηση των δειγμάτων και δεν δίνει κάποια επιπλέον χρήσιμη πληροφορία.

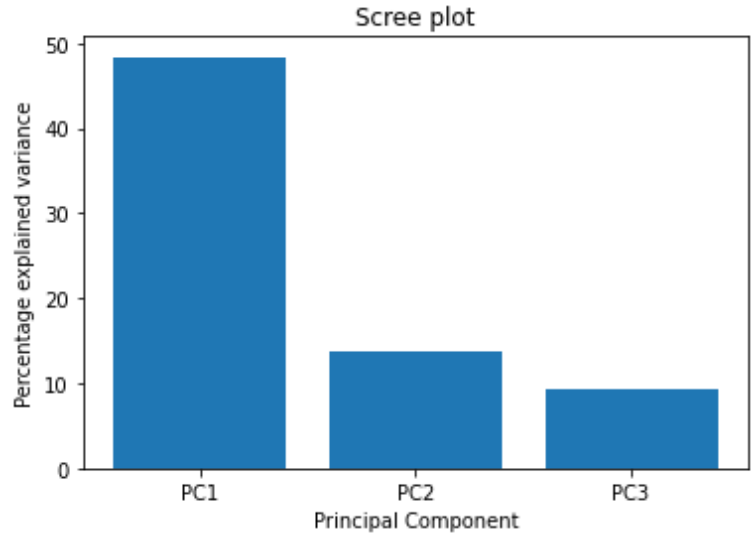
Από το διάγραμμα βαρύτητας (Σχ. 46) βλέπουμε ότι οι μεταβλητές στο διάστημα 467 – 596 nm και 672 – 755 nm έχουν μεγάλη βαρύτητα, [-0.65, -0.9] και [0.65, 0.9] αντίστοιχα στην PC1, ενώ οι μεταβλητές του διαστήματος 612 – 647 nm και 776 – 800 nm συνεισφέρουν έντονα στην PC2 με τιμές βαρύτητας [0.65,0.9]. Στην 3^η ΚΣ δεν παρατηρείται έντονη συνεισφορά των μεταβλητών.



Σχήμα 46 Διάγραμμα Βαρύτητας 657 μεταβλητών στις κύριες συνιστώσες PC1 και PC2

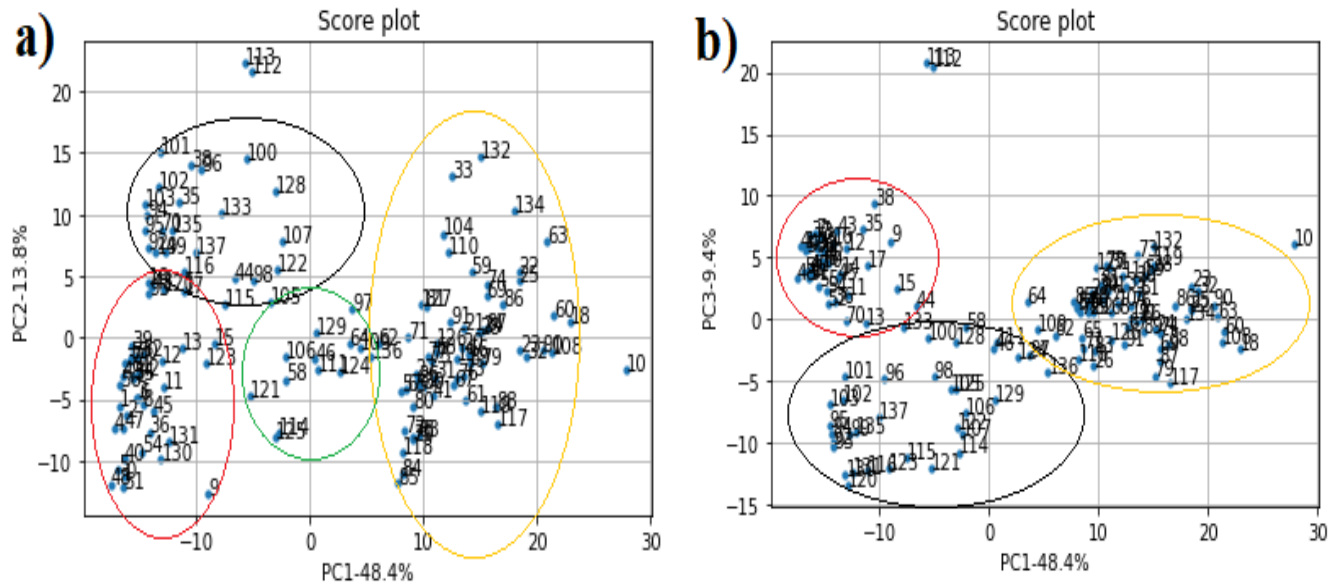
- **Φασματικό Εύρος 600 – 800 nm**

Το διάγραμμα Scree (Σχ. 47) δείχνει ότι η 1^η ΚΣ περιγράφει το 48.4% της συνολικής διασποράς, η 2^η ΚΣ το 13.8% και η 3^η ΚΣ το 9.4%, δηλαδή το 71.6% της συνολικής διασποράς.



Σχήμα 47 Διάγραμμα Scree των διασπορών των PC1 - PC3 στο εύρος 600 - 800 nm

Στη συνέχεια, κατασκευάστηκε το διάγραμμα δειγμάτων στο νέο χώρο των τριών ΚΣ, όπως φαίνεται στο Σχήμα 48.



Σχήμα 48: Απεικόνιση 138 δειγμάτων στο χώρο των α) PC1 και PC2. β) PC1 και PC3.

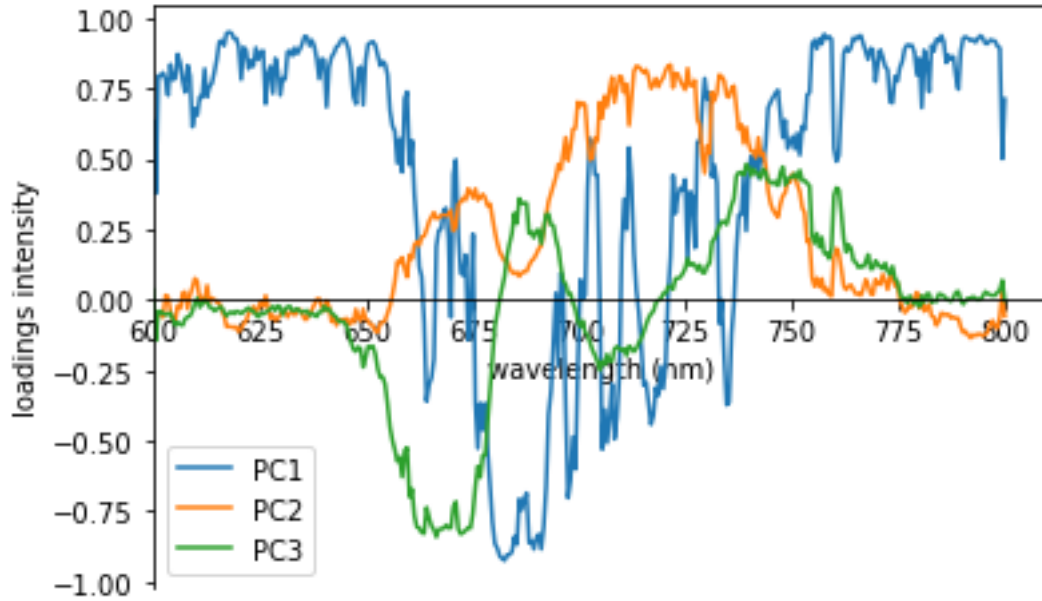
Αναλύοντας το Σχ. 48α, στη μαύρη ομάδα ομαδοποιήθηκαν τα δείγματα που εμφάνισαν μπάντες φθορισμού χλωροφύλλης στα 675 nm και ασθενή κορυφή στα 660 nm της

αλλοφυκοκυανίνης. Στην κόκκινη ομάδα συγκεντρώθηκαν τα δείγματα, τα περισσότερα εκ των οποίων έχουν μπάντα φθορισμού της χλωροφύλλης γύρω στα 685 nm και 730 – 740 nm. Ωστόσο, εκεί ομαδοποιήθηκαν και μερικά δείγματα που παρουσίασαν μπάντα φθορισμού στα 675 nm. Στην κεντρική πράσινη ομάδα ταξινομήθηκαν τα δείγματα που, παρόλο που έχουν κορυφές φθορισμού στα 675 nm ή στα 685 nm έχουν και χαμηλό SNR και τα φάσματα τους διαφοροποιούνται έντονα από αυτά της κόκκινης ή μαύρης ομάδας. Τέλος, στην πορτοκαλί ομάδα ανήκουν τα δείγματα που δεν έχουν καμία μπάντα φθορισμού, ενώ δεν αντιστοιχούν σε καμία ομάδα οι ακραίες τιμές, όπως τα δείγματα των φύλλων.

Σύμφωνα με το Σχ. 48b, στην κόκκινη ομάδα ταξινομήθηκαν τα δείγματα με φθοροφόρο την χλωροφύλλη με φθορισμό που παρατηρείται στα 685 nm και 730 – 740 nm, ενώ στη μαύρη ομάδα τα δείγματα, τα οποία εμφάνισαν μπάντες φθορισμού στα 675 nm (χλωροφύλλη) και ώμο στα 660 nm (αλλοφυκοκυανίνη). Στην πορτοκαλί ομάδα συγκεντρώθηκαν τα δείγματα που δεν εμφάνισαν καθόλου φθορισμό.

Συγκρίνοντας τα Σχ. 48a και Σχ. 48b, φαίνεται πως η ομαδοποίηση είναι καλύτερη στην περίπτωση του Σχ. 48b, καθώς τα δείγματα χωρίστηκαν σε ομάδες ανάλογα με το παρόν φθοροφόρο και δεν αποκλίνουν ιδιαίτερα από αυτές παρά τον υψηλό θόρυβο που υπάρχει σε πολλά φάσματα.

Τέλος, το Σχ. 49 αναπαριστά το διάγραμμα βαρύτητας των 350 μεταβλητών πάνω στις ΚΣ. Φαίνεται ότι οι μεταβλητές στα διαστήματα 600 – 656 nm, 679 – 692 nm και 754 – 800 nm έχουν μεγάλη βαρύτητα στην PC1. Οι μεταβλητές στο διάστημα 700 – 728 nm συνεισφέρουν έντονα στην PC2, ενώ οι μεταβλητές στο διάστημα 660 – 676 nm στην PC3. Η ένταση της βαρύτητας των παραπάνω μεταβλητών είναι τουλάχιστον $|0.65|$.

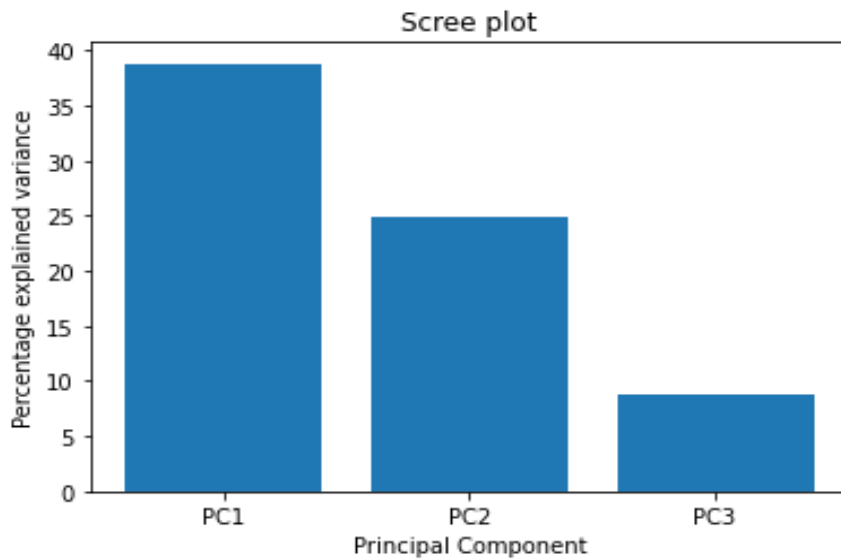


Σχήμα 49 Διάγραμμα Βαρύτητας 350 μεταβλητών στις PC1-PC3

5.2.2 Κανονικοποίηση με τη μέγιστη ένταση

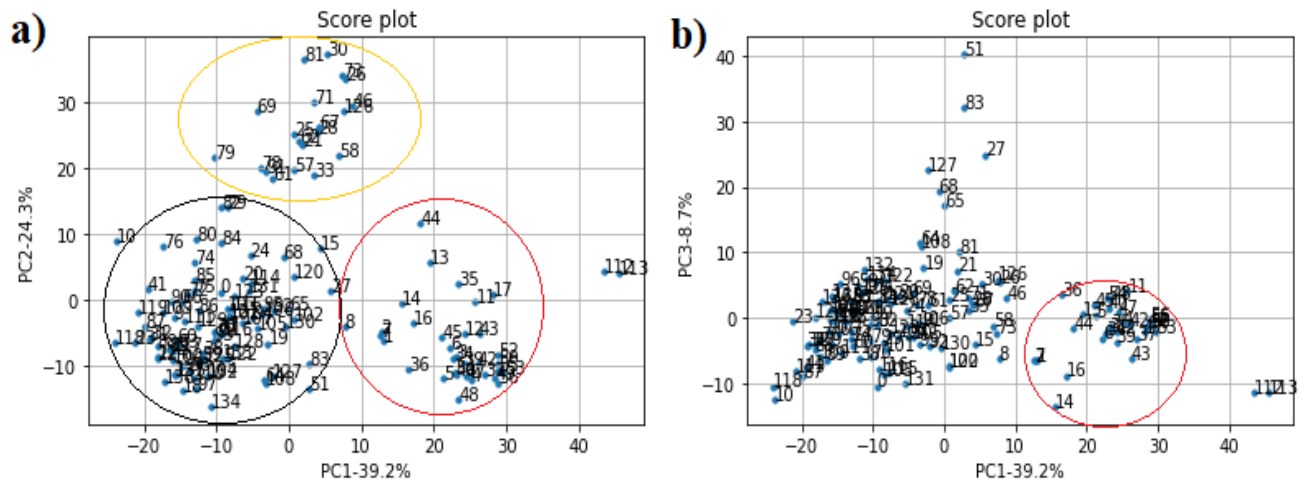
- Φασματικό Εύρος 428 – 800 nm

Το ποσοστό της συνολικής διασποράς που περιγράφεται από το μοντέλο είναι 72.2%. Η 1^η ΚΣ εξηγεί το 39.2%, η 2^η ΚΣ το 24.3% και η 3^η ΚΣ το 8.7%. (Σχ. 50)



Σχήμα 50 Διάγραμμα Scree: Ποσοστό διασποράς που εξηγεί η PC1, PC2 και η PC3 (εύρος 428 - 800 nm)

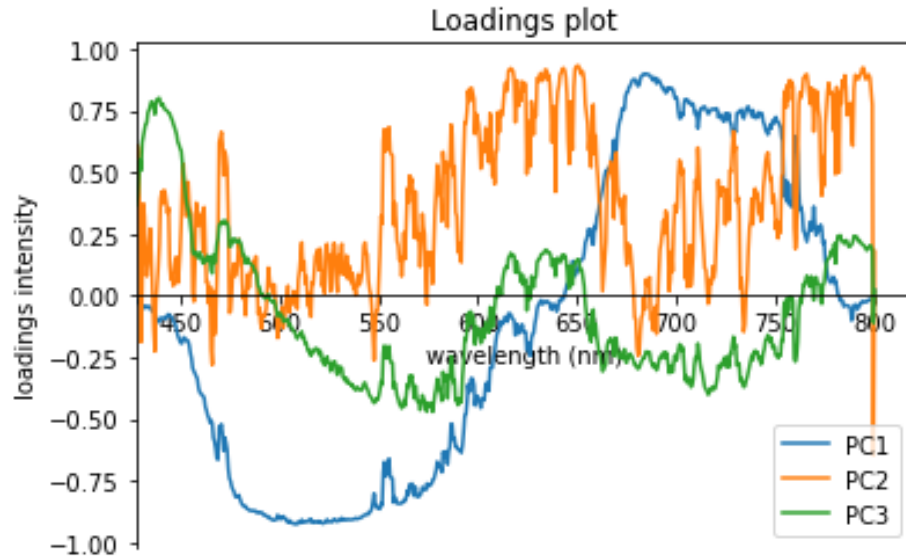
Από το παρακάτω διάγραμμα δειγμάτων (Σχ. 51a) παρατηρούμε ότι διακρίνονται 3



Σχήμα 51 Διάγραμμα Δειγμάτων: Απεικόνιση 138 δειγμάτων στο χώρο των α) PC1 και PC2. β) PC1 και PC3.

διαφορετικές ομαδοποιήσεις. Στην κόκκινη έλλειψη ταξινομήθηκαν τα δείγματα με βάση την παρουσία χλωροφύλλης (685 nm). Στη μαύρη έλλειψη συγκεντρώθηκαν τα δείγματα με κριτήριο την έντονη κορυφή φθορισμού στα 500 nm, παρόλο που πολλά από αυτά έχουν και κορυφές που αποδίδονται σε βιολογικό παράγοντα, όπως η αλλοφυκοκυανίνη και η χλωροφύλλη. Στην πορτοκαλί έλλειψη ανήκουν τα δείγματα που ομαδοποιήθηκαν βάσει της απουσίας σήματος φθορισμού. Τέλος, από το Σχ. 51b δεν μπορούμε να εξάγουμε κάποιο συμπέρασμα αναφορικά με τις ομαδοποιήσεις, καθώς παρατηρείται μόνο μια ομαδοποίηση με βάση τη χλωροφύλλη και τίποτε άλλο.

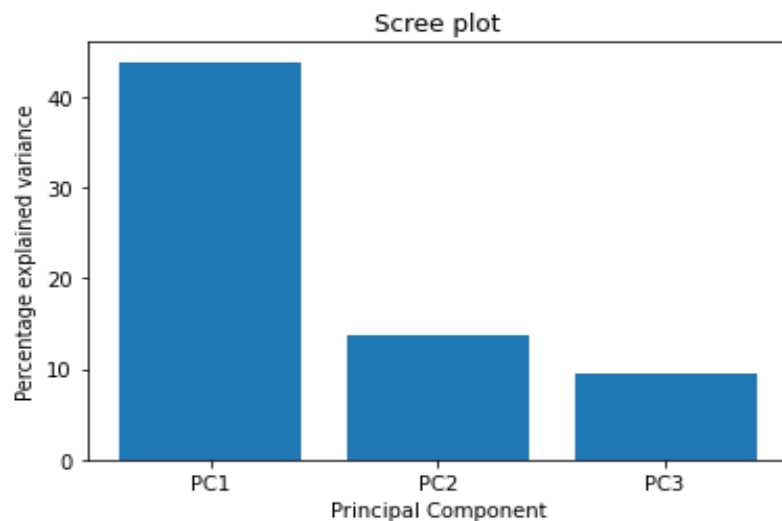
Οι μεταβλητές στα διαστήματα 467 – 596 nm και 672 – 755 nm έχουν μεγάλη βαρύτητα στην PC1, ενώ οι μεταβλητές του διαστήματος 612 – 647 nm και 776 – 800 nm συνεισφέρουν έντονα στην PC2 με τιμές βαρύτητας. Στην 3^η ΚΣ δεν παρατηρείται έντονη συνεισφορά των μεταβλητών.(Σχ. 52)



Σχήμα 52 Διάγραμμα Βαρύτητας 657 μεταβλητών στις κύριες συνιστώσες PC1 και PC2

- **Φασματικό Εύρος 600 – 800 nm**

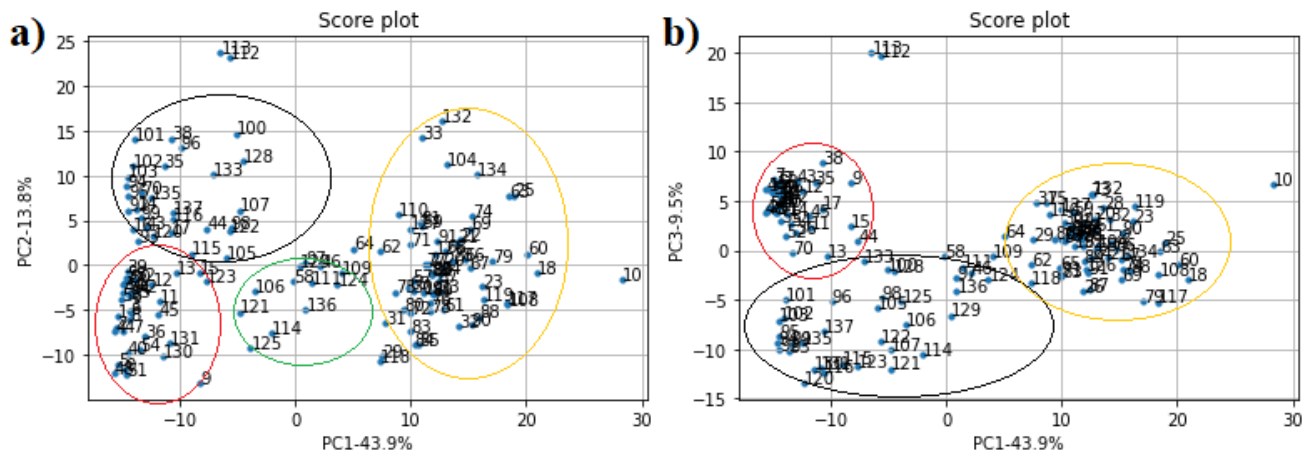
Το παρακάτω διάγραμμα Scree φανερώνει ότι το μοντέλο περιγράφει το 67.2% της συνολικής διασποράς. Η 1^η ΚΣ εξηγεί το 43.9%, 2^η ΚΣ το 13.8% και η 3^η ΚΣ το 9.5%.



Σχήμα 53 Διάγραμμα Scree: Ποσοστό διασποράς που εξηγεί η PC1, PC2 και η PC3 (εύρος 600 - 800 nm)

Στη συνέχεια, κατασκευάστηκε το διάγραμμα δειγμάτων (Σχ. 54). Αναλύοντας το Σχ. 54a, παρατηρούμε ότι δημιουργήθηκαν τέσσερις ομαδοποιήσεις. Στην κόκκινη έλλειψη ταξινομήθηκαν τα δείγματα με κριτήριο την παρουσία χλωροφύλλης (685 nm), ενώ στη μαύρη ομάδα με βάση την αλλοφυκοκυανίνη (660 nm) και τη χλωροφύλλη (675 nm). Στην πράσινη έλλειψη ανήκουν τα δείγματα που έχουν ακριβώς τα ίδια χαρακτηριστικά με τη μαύρη έλλειψη, ωστόσο χαρακτηρίζονται και από υψηλό θόρυβο και έτσι, διαφοροποιήθηκαν. Τέλος, η πορτοκαλί έλλειψη αντιστοιχεί σε απουσία σήματος φθορισμού.

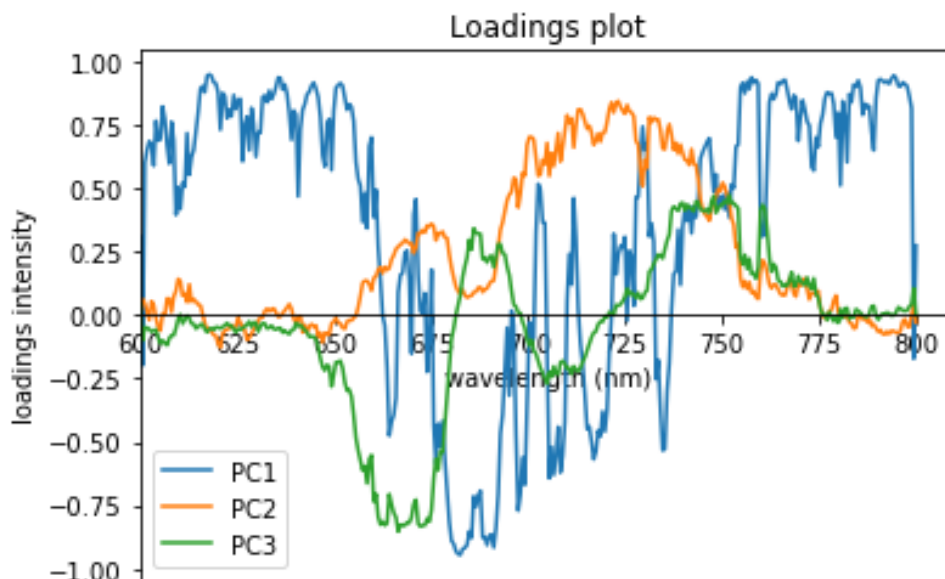
Το Σχ. 54b έχει τις ίδιες ελλείψεις με αυτό του Σχ. 54a με τη διαφορά ότι τα δείγματα που έχουν κορυφές αλλοφυκοκυανίνης και χλωροφύλλης ομαδοποιήθηκαν τώρα σε μία ενιαία έλλειψη. Επομένως, μπορεί να παρατηρηθεί ο διαχωρισμός των κυανοβακτηρίων και της



Σχήμα 54 Διάγραμμα Δειγμάτων: Απεικόνιση 138 δειγμάτων στο χώρο των α) PC1 και PC2. β) PC1 και PC3.

χλωροφύλλης.

Τέλος, παρατηρώντας το διάγραμμα βαρύτητας, οι μεταβλητές στα διαστήματα 600 – 656 nm, 679 – 692 nm και 754 – 800 nm συνεισφέρουν έντονα στην PC1. Οι μεταβλητές στο διάστημα 700 – 728 nm έχουν μεγάλη βαρύτητα στην PC2, ενώ οι μεταβλητές στο διάστημα 660 – 676 nm στην PC3. Η ένταση της βαρύτητας των παραπάνω μεταβλητών είναι τουλάχιστον $|0.65|$.

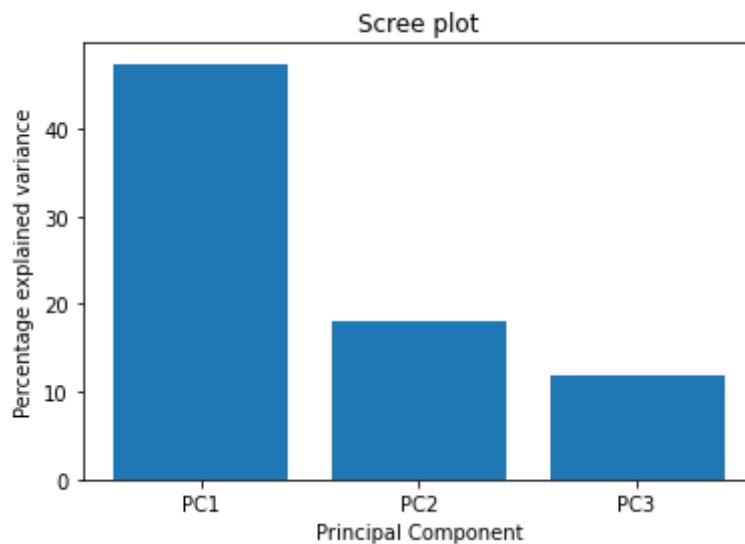


Σχήμα 55 Διάγραμμα Βαρύτητας 350 μεταβλητών στις κύριες συνιστώσες PC1 και PC2

5.2.3 Κανονικοποίηση με το άθροισμα των εντάσεων

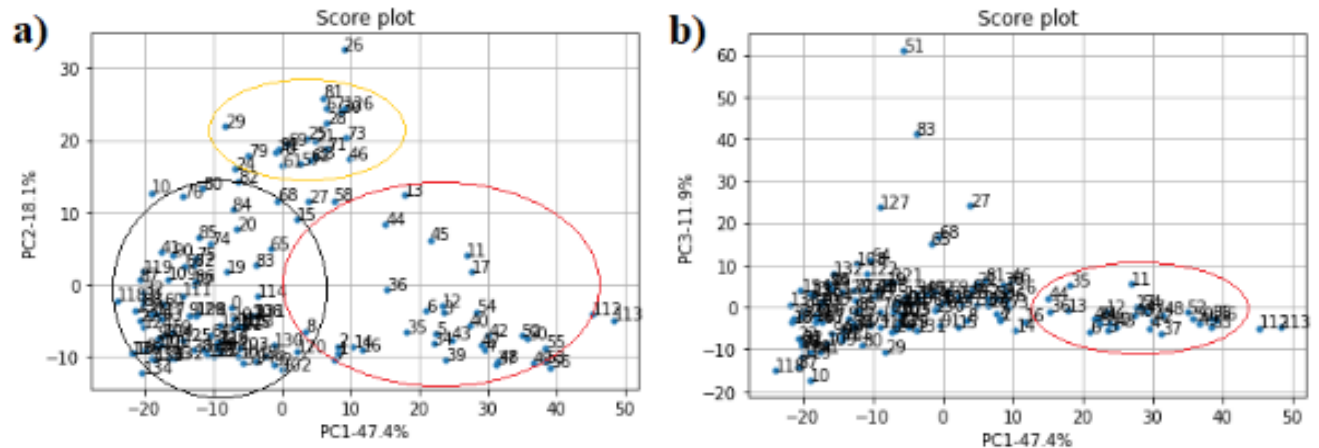
- Φασματικό Εύρος 428 – 800 nm

Το μοντέλο περιγράφει το 77.4% της συνολικής διασποράς. Αναλυτικότερα, η 1^η ΚΣ εξηγεί το 47.4%, η 2^η ΚΣ το 18.1% και η 3^η ΚΣ το 11.9%. (Σχ. 56)



Σχήμα 56 Διάγραμμα Scree: Ποσοστό διασποράς που εξηγεί η PC1, PC2 και η PC3 (εύρος 428 - 800 nm)

Παράλληλα, στο διάγραμμα δειγμάτων PC1-PC2 (Σχ. 57a) υπάρχουν τρεις ευδιάκριτες ομάδες. Στην κόκκινη έλλειψη ομαδοποιήθηκαν τα δείγματα που έχουν κορυφές φθορισμού που

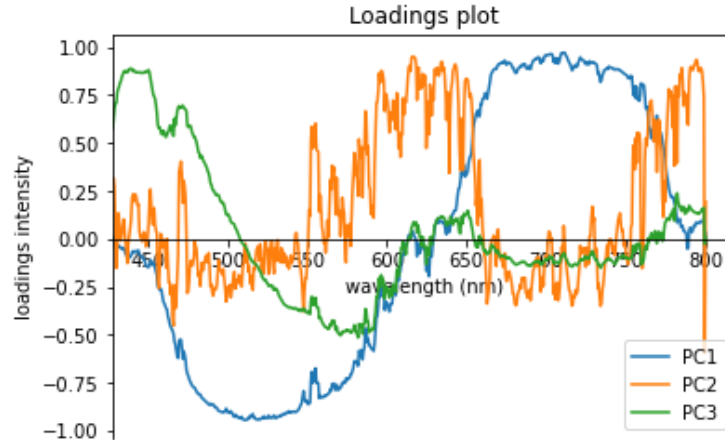


Σχήμα 57 Διάγραμμα Δειγμάτων: Απεικόνιση 138 δειγμάτων στο χώρο των α) PC1 και PC2. β) PC1 και PC3.

αποδίδονται στη χλωροφύλλη (685 nm), ενώ στη μαύρη έλλειψη η ταξινόμηση έγινε με βάση την πλατιά κορυφή φθορισμού στα 500 nm, ωστόσο πολλά από τα δείγματα εκεί έχουν κορυφές λόγω βιολογικού παράγοντα. Στην πορτοκαλί έλλειψη ομαδοποιήθηκαν τα δείγματα, στα οποία δεν υπάρχει σήμα φθορισμού.

Από το Σχ. 57b δεν μπορούμε να εξάγουμε κάποιο ουσιαστικό και χρήσιμο συμπέρασμα. Φαίνεται μόνο μια αμυδρή διαφοροποίηση των δειγμάτων με χλωροφύλλη.

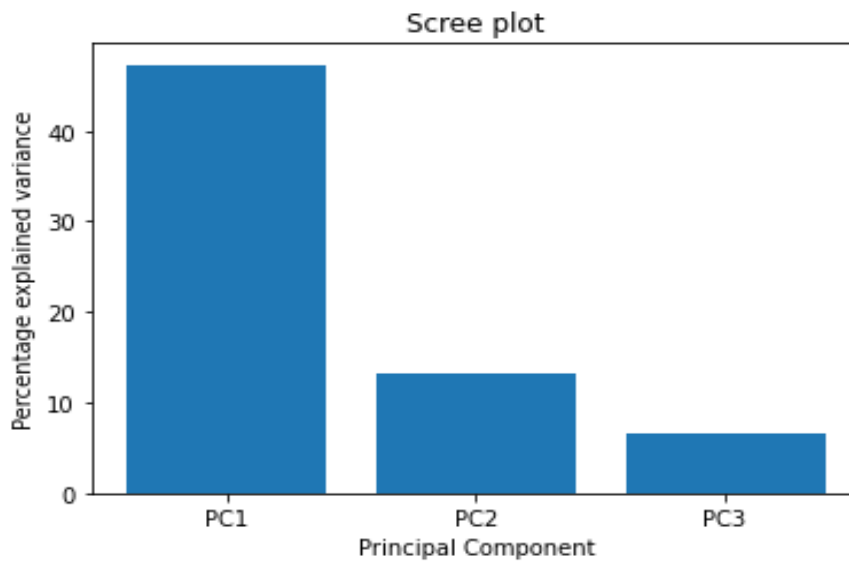
Τέλος, σύμφωνα με το διάγραμμα βαρύτητας (Σχ. 58), οι μεταβλητές στα διαστήματα 475 – 580 nm και 660 – 765 nm έχουν μεγάλη βαρύτητα στην 1^η ΚΣ. Η 2^η ΚΣ εξηγεί τις μεταβλητές στο διάστημα 595 – 655 nm και η 3^η ΚΣ τις μεταβλητές 429 – 470 nm.



Σχήμα 58 Διάγραμμα Βαρύτητας 657 μεταβλητών στις κύριες συνιστώσες PC1 και PC2

- **Φασματικό Εύρος 600 – 800 nm**

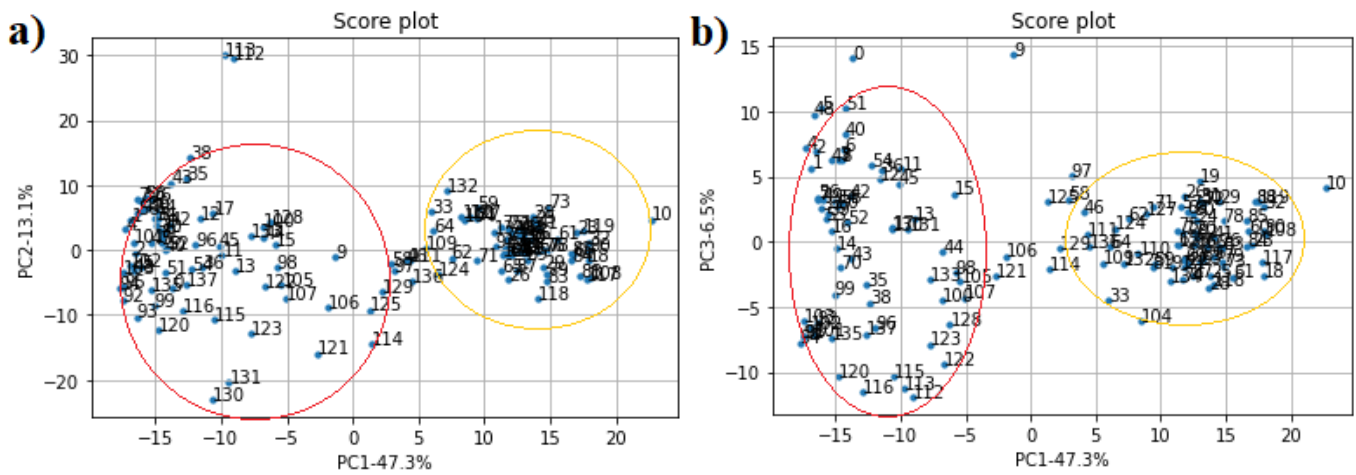
Το ποσοστό της συνολικής διασποράς που περιγράφει το μοντέλο είναι 66.9%. Η 1^η ΚΣ περιγράφει το 47.3%, 2^η ΚΣ το 13.1% και η 3^η ΚΣ το 6.5%, όπως φαίνεται από το παρακάτω διάγραμμα Scree.



Σχήμα 59 Διάγραμμα Scree: Ποσοστό διασποράς που εξηγεί η PC1, PC2 και η PC3 (εύρος 600 - 800 nm)

Παράλληλα, δημιουργήθηκαν δύο ευδιάκριτες ομάδες στο διάγραμμα δειγμάτων Σχ. 60α. Η κόκκινη έλλειψη αντιστοιχεί σε όσα δείγματα ομαδοποιήθηκαν με κριτήριο την παρουσία

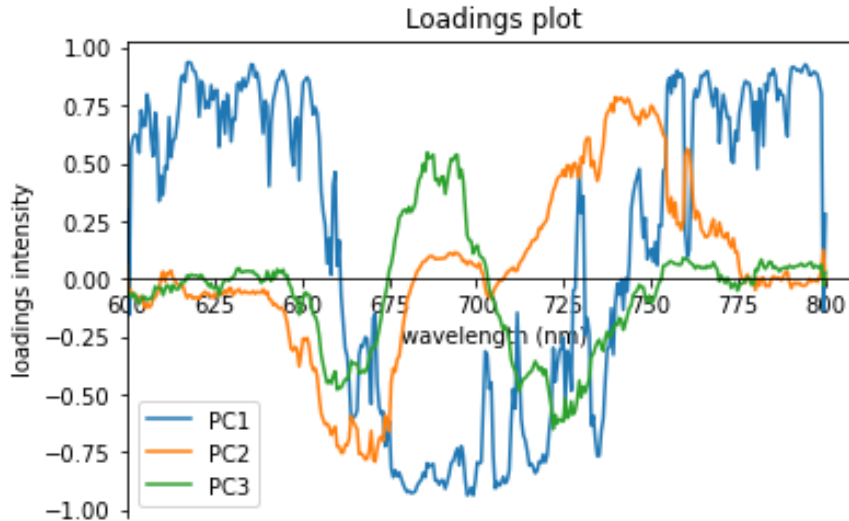
βιολογικού παράγοντα, δηλαδή της χλωροφύλλης και την αλλοφυκοκυανίνης. Στην πορτοκαλί έλλειψη ανήκουν αυτά, που δεν παρουσίασαν καθόλου σήμα φθορισμού.



Σχήμα 60 Διάγραμμα Δειγμάτων: Απεικόνιση 138 δειγμάτων στο χώρο των α) PC1 και PC2. β) PC1 και PC3.

Από το Σχ. 60b είναι εμφανές ότι δεν υπάρχει κάποια διαφορά στο περιεχόμενο των ελλείψεων, δηλαδή η κόκκινη εξακολουθεί να συμβολίζει την ομαδοποίηση βάσει βιολογικής παρουσίας, ενώ η πορτοκαλί αντιστοιχεί στην απουσία σήματος φθορισμού. Επομένως, δεν έχουμε ικανοποιητικά αποτελέσματα με τη συγκεκριμένη κανονικοποίηση.

Τέλος, η συνεισφορά των μεταβλητών φαίνεται στο παρακάτω διάγραμμα βαρύτητας. Οι μεταβλητές 605 – 655 nm, 675 – 720 nm και 755 – 800 nm συνεισφέρουν έντονα στην 1^η ΚΣ, οι μεταβλητές στα 660 – 674 nm και 738 – 752 nm στην 2^η ΚΣ, ενώ στην 3^η ΚΣ δεν παρατηρείται έντονα βαρύτητα των μεταβλητών.

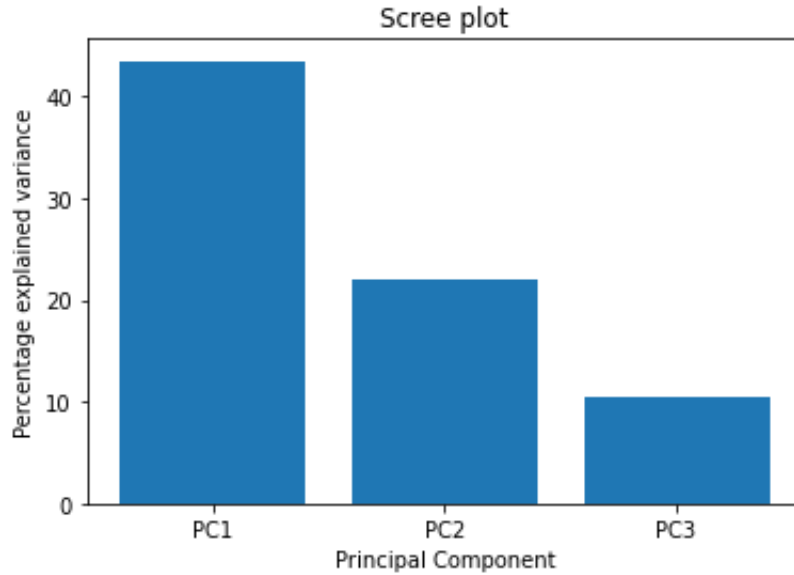


Σχήμα 61 Διάγραμμα Βαρύτητας 350 μεταβλητών στις κύριες συνιστώσες PC1 και PC2

5.2.4 Κανονικοποίηση με την τετραγωνική ρίζα του αθροίσματος των τετραγώνων των εντάσεων

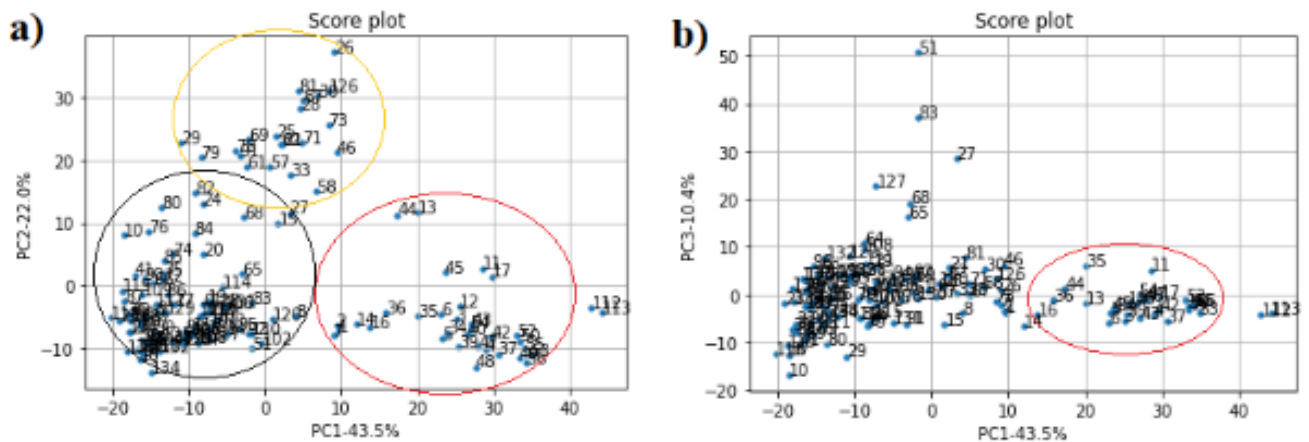
- Φασματικό Εύρος 428 – 800 nm

Το διάγραμμα Scree (Σχ. 62) δείχνει το ποσό της πληροφορίας που διατηρήθηκε στο μοντέλο. Πιο συγκεκριμένα, η 1^η ΚΣ εξηγεί το 43.5% της συνολικής διασποράς, η 2^η ΚΣ το 22% και η 3^η ΚΣ το 10.4%. Αθροιστικά το ποσοστό είναι 75.9%.



Σχήμα 62 Διάγραμμα Scree: Ποσοστό διασποράς που εξηγεί η PC1, PC2 και η PC3 (εύρος 428 - 800 nm)

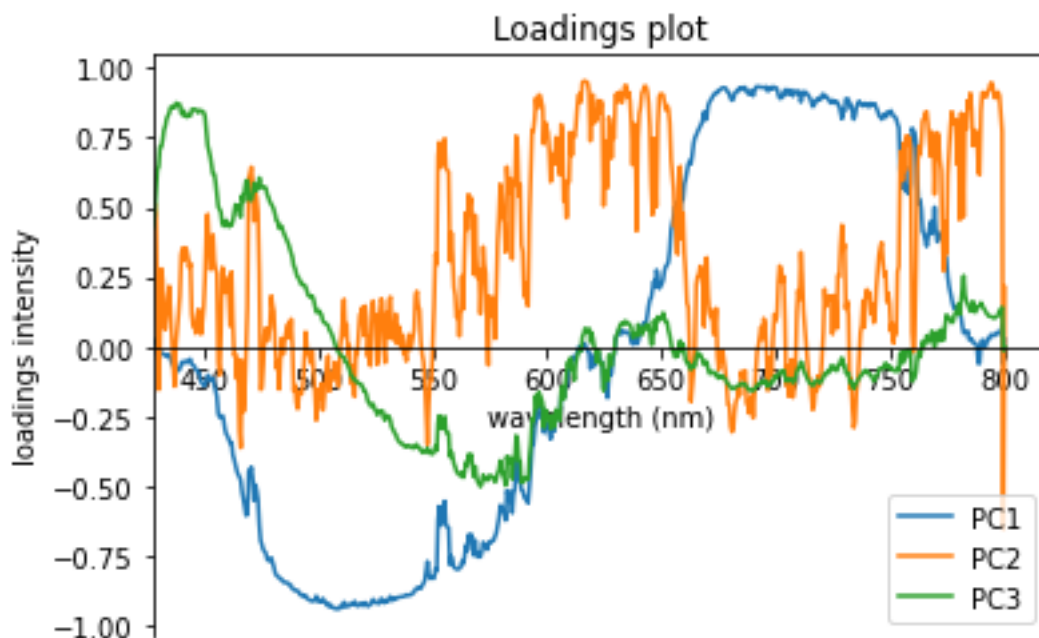
Από το διάγραμμα δειγμάτων Σχ. 63α φαίνονται οι εξής ομαδοποιήσεις. Στην κόκκινη έλλειψη ταξινομήθηκαν τα δείγματα με βάση την παρουσία χλωροφύλλης (κορυφή φθορισμού στα 685 nm). Στη μαύρη έλλειψη ταξινομήθηκαν τα δείγματα με κριτήριο την κορυφή φθορισμού στα 500 nm, που δεν αποδίδεται σε βιολογικό παράγοντα, παρόλο που πολλά από αυτά έχουν επίσης κορυφές φθορισμού της χλωροφύλλης και της αλλοφυκοκυανίνης. Η πορτοκαλί έλλειψη αντιστοιχεί σε μηδενικό σήμα φθορισμού.



Σχήμα 63 Διάγραμμα Δειγμάτων: Απεικόνιση 138 δειγμάτων στο χώρο των α) PC1 και PC2. β) PC1 και PC3.

Σύμφωνα με το Σχ. 63b, η μόνη σχετικά ευδιάκριτη ομαδοποίηση είναι αυτή της κόκκινης έλλειψης, που έγινε βάσει χλωροφύλλης. Από το υπόλοιπο σχήμα, δεν παρατηρούμε κάποια χρήσιμη ομαδοποίηση.

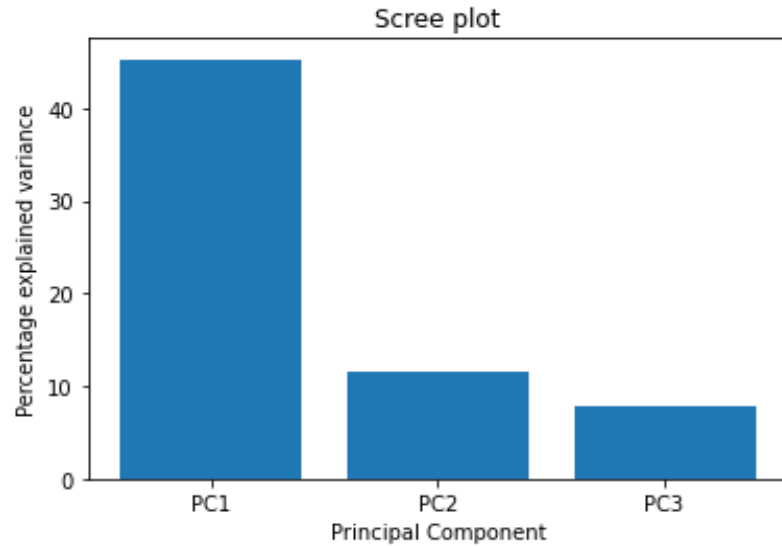
Το παρακάτω διάγραμμα βαρύτητας δείχνει ότι οι μεταβλητές στα διαστήματα 475 – 580 nm και 660 – 765 nm συνεισφέρουν έντονα στην 1^η ΚΣ. Η 2^η ΚΣ εξηγεί τις μεταβλητές στο διάστημα 595 – 655 nm και η 3^η ΚΣ τις μεταβλητές 429 – 470 nm.



Σχήμα 64 Διάγραμμα Βαρύτητας 657 μεταβλητών στις κύριες συνιστώσες PC1 και PC2

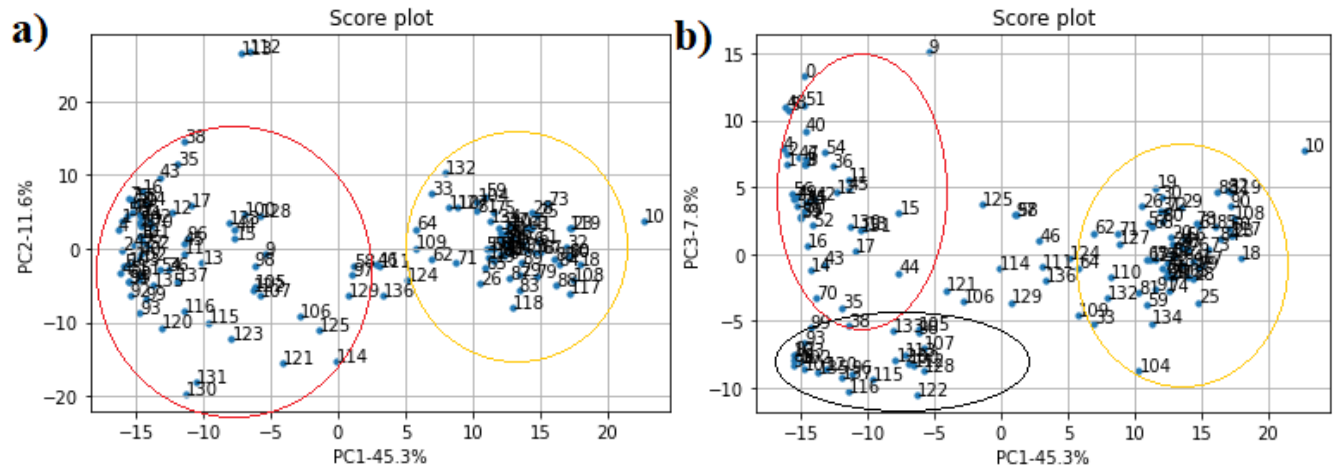
- **Φασματικό εύρος 600 – 800 nm**

Το παρόν μοντέλο περιγράφει το 64.7% της συνολικής διασποράς. Η 1^η ΚΣ περιγράφει το 45.3%, η 2^η ΚΣ το 11.6% και η 3^η ΚΣ το 7.8%, όπως παρουσιάζεται στο παρακάτω διάγραμμα Scree.



Σχήμα 64 Διάγραμμα Scree: Ποσοστό διασποράς που εξηγεί η PC1, PC2 και η PC3 (είρος 600 - 800 nm)

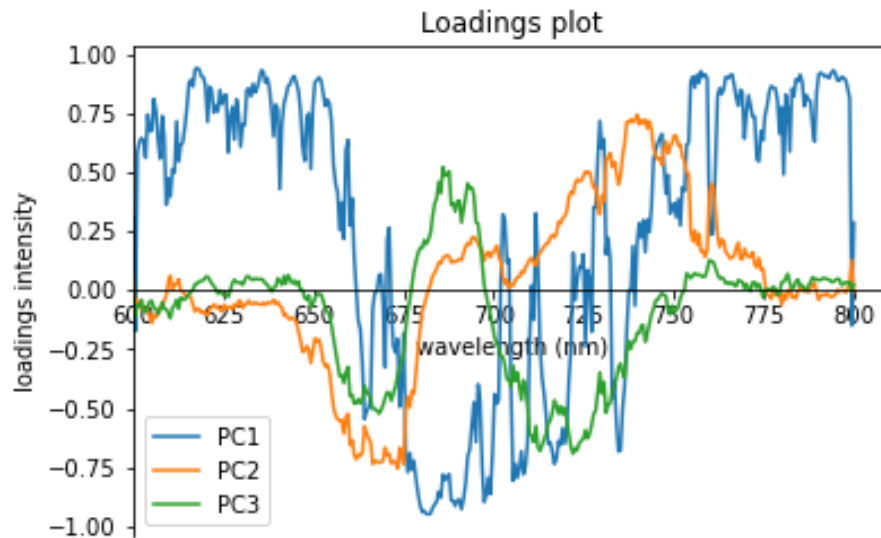
Μέσω των παρακάτω διαγραμμάτων δειγμάτων παρατηρήθηκαν οι ακόλουθες ομαδοποιήσεις. Αρχικά, σύμφωνα με το Σχ. 65a, διακρίνουμε δύο ελλείψεις, την κόκκινη, στην οποία ταξινομήθηκαν όσα δείγματα έχουν κορυφές φθορισμού που αποδίδονται σε βιολογικό αίτιο, και την πορτοκαλί που αντιστοιχεί σε απουσία σήματος φθορισμού.



Σχήμα 65 Διάγραμμα Δειγμάτων: Απεικόνιση 138 δειγμάτων στο χώρο των α) PC1 και PC2. β) PC1 και PC3.

Ωστόσο, από το Σχ. 65b βλέπουμε ότι μπορούμε να ξεχωρίσουμε ακόμη μία έλλειψη. Στη μαύρη έλλειψη συγκεντρώθηκαν τα δείγματα βάσει της αλλοφυκοκυανίνης και της χλωροφύλλης, που είναι χαρακτηριστικές χρωστικές των κυανοβακτηρίων. Στην κόκκινη έλλειψη ανήκουν αυτά που έχουν μόνο χλωροφύλλη, ενώ στην πορτοκαλί αυτά που δεν έχουν καμία κορυφή φθορισμού.

Τέλος, οι μεταβλητές 605 – 655 nm, 675 – 720 nm και 755 – 800 nm συνεισφέρουν έντονα στην 1^η ΚΣ, οι μεταβλητές στα 660 – 674 nm και 738 – 752 nm έχουν έντονη βαρύτητα στη 2^η ΚΣ, ενώ στην 3^η ΚΣ δεν παρατηρείται έντονα βαρύτητα των μεταβλητών, όπως φαίνεται από το παρακάτω διάγραμμα.



Σχήμα 68 Διάγραμμα Βαρύτητας 350 μεταβλητών στις κύριες συνιστώσες PC1 και PC2

5.3 Συγκεντρωτικός πίνακας των αποτελεσμάτων

Στον παρακάτω πίνακα παρατίθενται συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα των διάφορων μοντέλων της ΑΚΣ.

Πίνακας 4 Αποτελέσματα των μοντέλων ΑΚΣ για κάθε μέθοδο κανονικοποίησης

	Μέθοδος Κανονικοποίησης			
	Διάστημα [0,1]	Μέγιστη τιμή	Άθροισμα εντάσεων	Τετραγωνική ρίζα αθροίσματος τετραγώνων εντάσεων
LED 440 nm, 480 – 800 nm	PC1 – PC2: 4 ελλείψεις: α) 685 nm, β) 530 nm, γ) 660 nm, 675 nm, 685 nm, δ) απουσία φθορισμού	PC1 – PC2: 4 ελλείψεις: α) 685 nm, β) 530 nm, γ) 660 nm, 675 nm, 685 nm, δ) απουσία φθορισμού	PC1 – PC2: 4 ελλείψεις: α) 685 nm, β) 530 nm, γ) 660 nm, 675 nm, 685 nm, δ) απουσία φθορισμού	PC1 – PC2: 4 ελλείψεις: α) 685 nm, β) 530 nm, γ) 660 nm, 675 nm, 685 nm, δ) απουσία φθορισμού
	PC1 – PC3: 4 ελλείψεις: α) 685 nm, β) 530 nm, γ) 660 nm, 675 nm, δ) απουσία φθορισμού	PC1 – PC3: 4 ελλείψεις: α) 685 nm, β) 530 nm, γ) 660 nm, 675 nm, δ) απουσία φθορισμού	PC1 – PC3: 2 ελλείψεις: α) 685 nm, β) 530 nm	PC1 – PC3: 2 ελλείψεις: α) 685 nm, β) 530 nm
LED 440 nm, 600 – 800 nm	PC1 – PC2: 3 ελλείψεις: α) 685, 675 nm, β) 660 nm, 675 nm, γ) απουσία φθορισμού	PC1 – PC2: 3 ελλείψεις: α) 685, 675 nm, β) 660 nm, 675 nm, γ) απουσία φθορισμού	PC1 – PC2: 2 ελλείψεις: α) 685 nm, 675 nm, 660 nm, β) απουσία φθορισμού	PC1 – PC2: 2 ελλείψεις: α) 685 nm, 675 nm, 660 nm, β) απουσία φθορισμού
	PC1 – PC3:	PC1 – PC3:	PC1 – PC3:	PC1 – PC3:

	3 ελλείψεις: α) 685, 675 nm, β) 660 nm, 675 nm, γ) απουσία φθορισμού	3 ελλείψεις: α) 685, 675 nm, β) 660 nm, 675 nm, 685 nm, γ) απουσία φθορισμού	3 ελλείψεις: α) 685 nm, β) 660 nm, 675 nm, γ) απουσία φθορισμού	3 ελλείψεις: α) 685 nm, β) 660 nm, 675 nm, γ) απουσία φθορισμού
LED 375 nm, 428 – 800 nm	PC1 – PC2 : 3 ελλείψεις: α) 685 nm, β) 500 nm, 660 nm, 675 nm, γ) απουσία φθορισμού	PC1 – PC2 : 3 ελλείψεις: α) 685 nm, β) 500 nm, 660 nm, 675 nm, γ) απουσία φθορισμού	PC1 – PC2 : 3 ελλείψεις: α) 685 nm, β) 500 nm, 660 nm, 675 nm, γ) απουσία φθορισμού	PC1 – PC2 : 3 ελλείψεις: α) 685 nm, β) 500 nm, 660 nm, 675 nm, γ) απουσία φθορισμού
	PC1 – PC3: 1 έλλειψη: 685 nm	PC1 – PC3: 1 έλλειψη: 685 nm	PC1 – PC3: 1 έλλειψη: 685 nm	PC1 – PC3: 1 έλλειψη: 685 nm
LED 375 nm, 600 – 800 nm	PC1 – PC2: 4 ελλείψεις: α) 685 nm, 675 nm, β) 660 nm, 675 nm, γ) 660 nm, 675 nm, δ) απουσία φθορισμού	PC1 – PC2: 4 ελλείψεις: α) 685 nm, 675 nm, β) 660 nm, 675 nm, γ) 660 nm, 675 nm, δ) απουσία φθορισμού	PC1 – PC2: 2 ελλείψεις: α) 660 nm, 675 nm, 685 nm, β) απουσία φθορισμού	PC1 – PC2: 2 ελλείψεις: α) 660 nm, 675 nm, 685 nm, β) απουσία φθορισμού
	PC1 – PC3: 3 ελλείψεις: α) 685 nm, β) 660 nm, 675 nm, γ) απουσία φθορισμού	PC1 – PC3: 3 ελλείψεις: α) 685 nm, β) 660 nm, 675 nm, γ) απουσία φθορισμού	PC1 – PC3: 2 ελλείψεις: α) 660 nm, 675 nm, 685 nm, β) απουσία φθορισμού	PC1 – PC3: 3 ελλείψεις: α), 685 nm, β) 660 nm, 675 nm, γ) απουσία φθορισμού

5.4 Συμπεράσματα

Τα μοντέλα της ΑΚΣ παρουσιάζουν διαφορές ανάλογα με την πηγή LED που χρησιμοποιήθηκε για να επαχθεί φθορισμός, το φασματικό εύρος που επιλέχθηκε για το εκάστοτε μοντέλο και η μέθοδος κανονικοποίησης, αλλά γενικά επιτυγχάνεται διαχωρισμός μεταξύ των διαφορετικών ειδών βιοδιάβρωσης.

Αρχικά, όσον αφορά στην πηγή LED στα 440 nm και το φασματικό εύρος 480 – 800 nm, παρατηρούμε ότι οι τρόποι κανονικοποίησης που έδωσαν τις πιο ευδιάκριτες ομαδοποιήσεις και σχεδόν πανομοιότυπα αποτελέσματα είναι η κανονικοποίηση στο διάστημα [0,1] και η διαίρεση με τη μέγιστη ένταση του φάσματος, καθώς διαχωρίστηκαν τα δείγματα, τα οποία είχαν κορυφές φθορισμού της αλλοφυκοκυανίνης και χλωροφύλλης, δηλαδή τα κυανοβακτήρια, με αυτά που είχαν μόνο κορυφές χλωροφύλλης. Η κανονικοποίηση με το άθροισμα των εντάσεων και την τετραγωνική ρίζα του αθροίσματος των τετραγώνων των εντάσεων δεν έδωσαν ικανοποιητικές ομαδοποιήσεις των δειγμάτων βάσει των κορυφών φθορισμού. Αναλύοντας τα μοντέλα της ΑΚΣ στο φασματικό εύρος 600 – 800 nm, όλες οι μέθοδοι κανονικοποίησης έδωσαν τους επιθυμητούς διαχωρισμούς των δειγμάτων με κριτήριο τι είδους κορυφή φθορισμού εμφάνισαν στα φάσματα τους. Ίσως τον πιο καθαρό διαχωρισμό να τον έδωσαν οι κανονικοποιήσεις με το άθροισμα των εντάσεων και την τετραγωνική ρίζα του αθροίσματος των τετραγώνων των εντάσεων.

Για την πηγή LED στα 375 nm και το φασματικό εύρος 420 – 800 nm, καμία μέθοδος κανονικοποίησης δεν κατάφερε να διαχωρίσει τα κυανοβακτήρια, δηλαδή την αλλοφυκοκυανίνη, με τη χλωροφύλλη. Ωστόσο, για τα μοντέλα της ΑΚΣ στο φασματικό εύρος 600 – 800 nm, παρατηρούμε ότι όλες οι μέθοδοι κανονικοποίησης έδωσαν ικανοποιητικές ομαδοποιήσεις αναφορικά με το είδος της χρωστικής που είναι παρόν στα δείγματα, αλλά αυτές που ξεχώρισαν είναι η κανονικοποίηση στο [0,1] και η κανονικοποίηση με τη μέγιστη ένταση.

Συγκρίνοντας τα φασματικά εύρη κάθε πηγής LED μεταξύ τους, διαπιστώνουμε ότι τα μοντέλα στο εύρος 600 – 800 nm έδωσαν καλύτερα αποτελέσματα, διότι δεν προσμετρούνται οι κορυφές φθορισμού μη – βιολογικού παράγοντα στα 500 nm για την πηγή LED στα 375 nm και η κορυφή στα 530 nm για την πηγή LED στα 440 nm. Επομένως, και οι δυο πηγές LED κατάφεραν να διαχωρίσουν τα κυανοβακτήρια με τη χλωροφύλλη.

Όσον αφορά στο διαχωρισμό των μυκήτων, αυτός δεν ήταν εφικτός, καθώς στα φάσματα φθορισμού δεν ανιχνεύθηκε κάποιο φθοροφόρο που είναι χαρακτηριστικό των μυκήτων.

Συμπερασματικά, η ΑΚΣ αποτελεί έναν εύκολο και γρήγορο τρόπο κατηγοριοποίησης μεγάλων όγκων δεδομένων, όπως είναι τα φάσματα. Στην προκειμένη περίπτωση, οι πληροφορίες που εξάγονται από την ομαδοποίηση των φασμάτων φθορισμού δειγμάτων αρχαιολογικού ενδιαφέροντος μπορούν να αποτελέσουν χρήσιμο εργαλείο για τους συντηρητές που αναλαμβάνουν τον καθαρισμό τους.

Αξίζει να σημειωθεί ότι η πειραματική διάταξη που χρησιμοποιήθηκε στο παρόν πείραμα είναι φορητή και επομένως, μπορεί να εφαρμοσθεί *in situ* χωρίς να είναι αναγκαία η μεταφορά του αντικειμένου σε εργαστήριο ή κάποια εκ των προτέρων προετοιμασία του δείγματος. Επιτυγχάνεται μεγάλος όγκος μετρήσεων και η απόκτηση των φασμάτων γίνεται σε πολύ μικρό χρονικό διάστημα. Μια μελλοντική βελτίωση της διάταξης θα ήταν η βελτίωση του SNR, είτε χρησιμοποιώντας πηγή LED με μεγαλύτερη ισχύ είτε αυξάνοντας τους χρόνους ολοκλήρωσης για την απόκτηση των φασμάτων. Για τον καλύτερο διαχωρισμό της κορυφής φθορισμού στα 660 nm με αυτήν στα 675 nm, η χρήση φασματομέτρου με μεγαλύτερη διακριτική ικανότητα θα μπορούσε επίσης να λειτουργήσει καλύτερα.

Βιβλιογραφία

- [1] Luminescence. (2021, October 16). In Wikipedia. <https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Luminescence&oldid=1050169944>
- [2] Díaz García, M. E., & Badía Laíño, R. (2019). Fluorescence| Overview. *Encyclopedia of Analytical Science*.
- [3] Lakowicz, J. R. (2006). Principles of Fluorescence Spectroscopy (3rd ed.). Springer Science+Business Media.
- [4] Valeur, B. (2001). *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*. Wiley-VCH Verlag GmbH
- [5] Rost, F. (2017). Fluorescence Microscopy, Applications. *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*, 627-631. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803224-4.00147-3>
- [6] Atanassova, V., Karatodorov, S., Yankov, G., Zahariev, P., & Tsvetkova, E. (2013). LASER-INDUCED FLUORESCENCE SPECTROSCOPY-A CONTEMPORARY APPROACH TO CULTURAL HERITAGE. *Advances in Bulgarian Science*, 5-10.
- [7] Telle, H. H., Gonzalez Urena, A., Donovan, R. J. (2007). *Laser Chemistry: Spectroscopy, Dynamics and Applications*. John Wiley & Sons.
- [8] Einstein Probabilistic Units. (2022, January 23). In Wikiversity. https://en.wikiversity.org/w/index.php?title=Einstein_Probabilistic_Units&oldid=2370598.
- [9] Zare, R. N. (2012). *My Life with LIF: A Personal Account of Developing Laser-Induced Fluorescence*. *Annual Review of Analytical Chemistry*, 5(1), 1–14. doi:10.1146/annurev-anchem-062011-143148
- [10] Fotakis, C., Anglos D., Zafiroopoulos, V., Georgiou, S., Tornari, V. (2006). *Lasers in the preservation of cultural heritage: principles and applications*. CRC Press.
- [11] Mukunda, D. C., Joshi, V. K., & Mahato, K. K. (2020). *Light emitting diodes (LEDs) in fluorescence-based analytical applications: a review*. *Applied Spectroscopy Reviews*, 1–38. doi:10.1080/05704928.2020.1835939

- [12] Raimondi, V., Cecchi, G., Lognoli, D., Palombi, L., Grönlund, R., Johansson, A., ... Hällström, J. (2009). *The fluorescence lidar technique for the remote sensing of photoautotrophic biodeteriogens in the outdoor cultural heritage: A decade of in situ experiments*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 63(7), 823–835. doi:10.1016/j.ibiod.2009.03.006
- [13] Raimondi, V., Cecchi, G., Pantani, L., & Chiari, R. (1998). Fluorescence lidar monitoring of historic buildings. *Applied optics*, 37(6), 1089-1098. doi:10.1364/ao.37.001089
- [14] Weibring, P., Johansson, T., Edner, H., Svanberg, S., Sundnér, B., Raimondi, V., ... Pantani, L. (2001). *Fluorescence lidar imaging of historical monuments*. *Applied Optics*, 40(33), 6111. doi:10.1364/ao.40.006111
- [15] 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. doi:10.1364/ao.41.001780
- [16] Geladi, P. (2003). *Chemometrics in spectroscopy. Part 1. Classical chemometrics*. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 58(5), 767–782. doi:10.1016/s0584-8547(03)00037-5
- [17] Abdi, H., & Williams, L. J. (2010). *Principal component analysis*. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics*, 2(4), 433–459. doi:10.1002/wics.101
- [18] Dunteman, G. H. (1989). *Principal components analysis* (No. 69). Sage.
- [19] Jolliffe, I.T. (2002). *Principal Component Analysis* (2nd ed.). Springer.
- [20] Miller, J.N., Miller, J.C. (2010). *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry* (6th ed.). Pearson education.
- [21] Jolliffe, I. T., & Cadima, J. (2016). *Principal component analysis: a review and recent developments*. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 374(2065), 20150202. doi:10.1098/rsta.2015.0202
- [22] Wold, S., Esbensen, K., & Geladi, P. (1987). *Principal component analysis*. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 2(1-3), 37–52. doi:10.1016/0169-7439(87)80084-9

[23] Tharwat, A. (2016). *Principal component analysis - a tutorial*. *International Journal of Applied Pattern Recognition*, 3(3), 197. doi:10.1504/ijapr.2016.079733

[24] Kohler, U., & Luniak, M. (2005). *Data Inspection using Biplots*. *The Stata Journal: Promoting Communications on Statistics and Stata*, 5(2), 208–223. doi:10.1177/1536867x0500500206

[25] KARKI, V., SARKAR, A., SINGH, M., MAURYA, G. S., KUMAR, R., RAI, A. K., & AGGARWAL, S. K. (2016). Comparison of spectrum normalization techniques for univariate analysis of stainless steel by laser-induced breakdown spectroscopy. *Pramana*, 86(6), 1313–1327. doi:10.1007/s12043-015-1180-8

[26] Afseth, Nils & Segtnan, Vegard & Wold, Jens. (2007). Raman Spectra of Biological Samples: A Study of Preprocessing Methods. *Applied spectroscopy*. 60. 1358-67. 10.1366/000370206779321454.

[27] Oliveri, P., Malegori, C., Simonetti, R., & Casale, M. (2018). The Impact of Signal Pre-Processing on the Final Interpretation of Analytical Outcomes – A tutorial. *Analytica Chimica Acta*. doi:10.1016/j.aca.2018.10.055

[28] Mishra, P., Biancolillo, A., Roger, J. M., Marini, F., & Rutledge, D. N. (2020). New data preprocessing trends based on ensemble of multiple preprocessing techniques. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 116045. doi:10.1016/j.trac.2020.116045

[29] Colao, F., Fantoni, R., Fiorani, L., Palucci, A., & Gomoiu, I. (2005). Compact scanning lidar fluorosensor for investigations of biodegradation on ancient painted surfaces. *Journal of optoelectronics and advanced materials*, 7(6), 3197-3208.

[30] Santo, A. P., Cuzman, O. A., Petrocchi, D., Pinna, D., Salvatici, T., & Perito, B. (2021). Black on white: Microbial Growth Darkens the External Marble of Florence Cathedral. *Applied Sciences*, 11(13), 6163. doi: 10.3390/app11136163

[31] Ranalli, G., Zanardini, E., & Sorlini, C. (2009). *Biodeterioration – Including Cultural Heritage*. *Encyclopedia of Microbiology*, 191–205. doi:10.1016/b978-012373944-5.00132-2

[32] Negi, A., & Sarethy, I. P. (2019). *Microbial Biodeterioration of Cultural Heritage: Events, Colonization, and Analyses*. *Microbial Ecology*, 78(4), 1014–1029. doi:10.1007/s00248-019-01366-y

[33] Dakal, T.C., & Cameotra, S.S. (2012). *Microbially induced deterioration of architectural heritages: routes and mechanisms involved*. *Environmental Sciences Europe*, 24(1), 36. doi:10.1186/2190-4715-24-36

[34] Warscheid, T., & Braams, J. (2000). *Biodeterioration of stone: a review*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 46(4), 343–368. doi:10.1016/s0964-8305(00)00109-8

[35] Scheerer, S., Ortega-Morales, O., & Gaylarde, C. (2009). *Chapter 5 Microbial Deterioration of Stone Monuments—An Updated Overview*. *Advances in Applied Microbiology*, 97–139. doi:10.1016/s0065-2164(08)00805-8

[36] Mihajlovski, A., Seyer, D., Benamara, H., Bousta, F., & Di Martino, P. (2014). *An overview of techniques for the characterization and quantification of microbial colonization on stone monuments*. *Annals of Microbiology*, 65(3), 1243–1255. doi:10.1007/s13213-014-0956-2

[37] Bhatnagar, P., Khan, A. A., Jain, S. K., & Rai, M. K. (2010). *Biodeterioration of Archaeological Monuments and Approach for Restoration*. Chapter In *Geomicrobiology* (pp. 255–302). CRC Press.

[38] Silverman, M. P. (1979). *Chapter 7.2 Biological and Organic Chemical Decomposition of Silicates*. *Biogeochemical Cycling of Mineral-Forming Elements*, 445–465. doi:10.1016/s0166-1116(08)71067-7

[39] Kelly, D. P. (1981). *Introduction to the Chemolithotrophic Bacteria*. *The Prokaryotes*, 997–1004. doi:10.1007/978-3-662-13187-9_79

[40] Saiz-Jimenez, C. (1994). *Biodeterioration of Stone in Historic Buildings and Monuments*. *Mycotoxins, Wood Decay, Plant Stress, Biocorrosion, and General Biodeterioration*, 587–604. doi:10.1007/978-1-4757-9450-2_45

[41] Crispim, C. A., & Gaylarde, C. C. (2004). *Cyanobacteria and Biodeterioration of Cultural Heritage: A Review*. *Microbial Ecology*, 49(1), 1–9. doi:10.1007/s00248-003-1052-5

[42] Gaylarde, C. C. (2020). *Influence of Environment on Microbial Colonization of Historic Stone Buildings with Emphasis on Cyanobacteria*. *Heritage*, 3(4), 1469–1482. doi:10.3390/heritage3040081

[43] Cutler, N., & Viles, H. (2010). *Eukaryotic Microorganisms and Stone Biodeterioration*. *Geomicrobiology Journal*, 27(6-7), 630–646. doi:10.1080/01490451003702933

[44] Humus. (2022, January 15). In Wikipedia. <https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Humus&oldid=1065863619>

[45] Lamb, J. J., Røkke, G., & Hohmann-Marriott, M. F. (2018). *Chlorophyll fluorescence emission spectroscopy of oxygenic organisms at 77 K*. *Photosynthetica*, 56(1), 105–124. doi:10.1007/s11099-018-0791-y

[46] Franck, F., Juneau, P., & Popovic, R. (2002). *Resolution of the Photosystem I and Photosystem II contributions to chlorophyll fluorescence of intact leaves at room temperature*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1556(2-3), 239–246. doi:10.1016/s0005-2728(02)00366-3

[47] Cerovic, Z. G., Samson, G., Morales, F., Tremblay, N., & Moya, I. (1999). Ultraviolet-induced fluorescence for plant monitoring: present state and prospects. *Agronomie*, 19(7), 543–578.

[48] Israsena Na Ayudhya, T., Posey, F. T., Tyus, J. C., & Dingra, N. N. (2015). *Using a Microscale Approach To Rapidly Separate and Characterize Three Photosynthetic Pigment Species from Fern*. *Journal of Chemical Education*, 92(5), 920–923. doi:10.1021/ed500344c

[49] 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. doi:10.1016/0034-4257(91)90058-e

[50] Govindjee. (2011). *Adventures with cyanobacteria: a personal perspective*. *Frontiers in Plant Science*, 2. doi:10.3389/fpls.2011.00028

[51] Pöhlker, C., Huffman, J. A., & Pöschl, U. (2012). Autofluorescence of atmospheric bioaerosols—fluorescent biomolecules and potential interferences. *Atmospheric Measurement Techniques*, 5(1), 37-71. doi:10.5194/amt-5-37-2012

[52] Bergmann, T., Beer, S., Maeder, U., Burg, J. M., Schlupp, P., Schmidts, T., ... Fiebich, M. (2011). *Development of a skin phantom of the epidermis and evaluation by using fluorescence techniques* Proc SPIE 7906. doi:10.1117/12.874676

[53] Siozos, P., Philippidis, A., & Anglos, D. (2017). *Portable laser-induced breakdown spectroscopy/diffuse reflectance hybrid spectrometer for analysis of inorganic pigments*. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 137, 93–100. doi:10.1016/j.sab.2017.09.005

[54] Subhash, N., & Mohanan, C. N. (1997). *Curve-fit analysis of chlorophyll fluorescence spectra: Application to nutrient stress detection in sunflower*. *Remote Sensing of Environment*, 60(3), 347–356. doi:10.1016/s0034-4257(96)00217-9

[55] Dong, Y., Liu, X., Mei, L., Feng, C., Yan, C., & He, S. (2014). *LED-induced fluorescence system for tea classification and quality assessment*. *Journal of Food Engineering*, 137, 95–100. doi:10.1016/j.jfoodeng.2014.03.02

[56] Mounier, A., Lazare, S., Le Bourdon, G., Aupetit, C., Servant, L., & Daniel, F. (2016). LED μ SF: a new portable device for fragile artworks analyses. Application on medieval pigments. *Microchemical Journal*, 126, 480-487.

[57] Gao, F., Dong, Y., Xiao, W., Yin, B., Yan, C., & He, S. (2016). *LED-induced fluorescence spectroscopy technique for apple freshness and quality detection*. *Postharvest Biology and Technology*, 119, 27–32. doi:10.1016/j.postharvbio.2016.04

[58] Pan, Y. L., Boutou, V., Chang, R. K., Ozden, I., Davitt, K., & Nurmikko, A. V. (2003). Application of light-emitting diodes for aerosol fluorescence detection. *Optics letters*, 28(18), 1707-1709.

[59] Beattie, J. R., & Esmonde-White, F. W. L. (2021). *Exploration of Principal Component Analysis: Deriving Principal Component Analysis Visually Using Spectra*. *Applied Spectroscopy*, 75(4), 361–375. doi:10.1177/0003702820987847

[60] Colantonio, C., Pelosi, C., D'Alessandro, L., Sottile, S., Calabrò, G., & Melis, M. (2018). *Hypercolorimetric multispectral imaging system for cultural heritage diagnostics: an innovative study for copper painting examination. The European Physical Journal Plus, 133(12)*. doi:10.1140/epjp/i2018-12370-9

[61] Palombi, L., Lognoli, D., Raimondi, V., Cecchi, G., Hällström, J., Barup, K., ... & Svanberg, S. (2008). Hyperspectral fluorescence lidar imaging at the Colosseum, Rome: Elucidating past conservation interventions. *Optics express, 16(10)*, 6794-6808.

[62] Brai, M., Casaletto, M. P., Gennaro, G., Marrale, M., Schillaci, T., & Tranchina, L. (2010). Degradation of stone materials in the archaeological context of the Greek–Roman Theatre in Taormina (Sicily, Italy). *Applied Physics A, 100(3)*, 945-951. doi: 10.1007/s00339-010-5678-0

[63] Fazio, A. T., López, M. M., Temperini, M. L. A., & de Faria, D. L. A. (2018). *Surface enhanced Raman spectroscopy and cultural heritage biodeterioration: Fungi identification in earthen architecture from Paraíba Valley (São Paulo, Brazil)*. *Vibrational Spectroscopy, 97*, 129–134. doi:10.1016/j.vibspec.2018.06.002

[64] LATIMER, P., BANNISTER, T. T., & RABINOWITCH, E. (1956). *Quantum Yields of Fluorescence of Plant Pigments. Science, 124(3222)*, 585–586. doi:10.1126/science.124.3222.585