
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ



ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΣ- ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΑ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΑ ΕΚΤΡΕΦΟΜΕΝΩΝ ΥΔΡΟΒΙΩΝ ΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΣΥΝΕΡΓΙΣΤΙΚΗΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣ
ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΚΑΙ ΠΑΡΑΣΙΤΩΝ ΚΑΙ Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥΣ ΣΤΟΝ
ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟ ΤΟΥ ΕΠΑΠΕΙΛΟΥΜΕΝΟΥ ΔΙΘΥΡΟΥ
ΜΑΛΑΚΙΟΥ *Pinna nobilis* (Linnaeus, 1758)**

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ

ΚΟΛΙΟΔΕΔΕ

ΙΧΘΥΟΛΟΓΟΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΜΠΙΤΧΑΒΑ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ

ΑΘΑΝΑΣΟΠΟΥΛΟΥ ΦΩΤΕΙΝΗ

ΓΟΥΡΖΙΩΤΗ ΕΥΓΕΝΙΑ

ΚΑΡΔΙΤΣΑ, ΙΑΝΟΥΑΡΙΟΣ 2024

UNIVERSITY OF THESSALY
FACULTY OF HEALTH SCIENCE
DEPARTMENT OF VETERINARY



MASTER'S DEGREE



AQUACULTURE - PATHOLOGICAL PROBLEMS OF FARMED AQUATIC ORGANISMS

**INVESTIGATION OF THE COMPATIBLE PRESENCE OF
BACTERIA AND PARASITES AND THEIR IMPACT ON
THE METABOLISM OF THE DISTURBENT BIVALVE
Pinna nobilis (Linnaeus, 1758)**

**KONSTANTINA
KOLIODEDE**

ICHTHYOLOGIST

COMITEE OF THREE

**BITHAVA KONSTANTINA
ATHANASOPOULOU FOTINI
GOURZIOTI EUGENIA**

KARDITSA, JANUARY 2024

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΜΠΙΤΧΑΒΑ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Επιβλέπουσα

Μέλος Συμβουλευτικής Επιτροπής, Εργαστήριο Εφαρμοσμένης Υδροβιολογίας, Τμήμα Ζωικής Παραγωγής Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΑΘΑΝΑΣΟΠΟΥΛΟΥ ΦΩΤΕΙΝΗ, Καθηγήτρια, Μέλος

Εργαστήριο Ιχθυοπαθολογίας Ιχθυολογίας & Υδατοκαλλιεργειών, Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΓΟΥΡΖΙΩΤΗ ΕΥΓΕΝΙΑ, Ερευνήτρια, Μέλος

Εθνικό Εργαστήριο Αναφοράς Νοσημάτων Ιχθύων και Καρκινοειδών, Τμήμα Παθολογίας Υδρόβιων Οργανισμών, Διεύθυνση Κτηνιατρικού Κέντρου Αθηνών, Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Contents

.....	2
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	5
Ευχαριστίες	9
Περίληψη	10
ABSTRACT.....	11
1. Γνωριμία με το δίθυρο <i>Pinna nobilis</i> (Linnaeus, 1758).....	13
1.1 Συστηματική κατάταξη <i>Pinna nobilis</i> (Linnaeus, 1758).....	14
1.2 Γεωγραφική εξάπλωση της <i>Pinna nobilis</i>	15
1.3 Στοιχεία βιολογίας και οικολογίας της <i>Pinna nobilis</i>	16
1.4 Ανατομία της <i>Pinna nobilis</i>	21
1.41 Κέλυφος.....	22
1.42 Βύσσος.....	23
1.43 Μανδύας	26
1.44 Μύες	26
1.48 Προστοματικός αδένας.....	29
1.49 Ωχροό όργανο	29
1.5 Βιοανοργανοποίηση (biomineralization) , κατασκευή και αναγέννηση κελύφους.....	31
1.6 Ενδοειδικές διαφορές στο σχήμα του κελύφους	35
1.7 Αναπαραγωγή της <i>Pinna nobilis</i>	35
1.8 Κύκλος ζωής της <i>Pinna nobilis</i>	39
1.9 Αύξηση, ανάπτυξη και ηλικία της <i>Pinna nobilis</i>	40

1.10 Δραστηριότητα ανοιγοκλεισίματος των κελυφών στην <i>Pinna nobilis</i> (Shell gaping behaviour).....	42
1.11 Επίδραση των υδροδυναμικών πιέσεων στους πληθυσμούς των <i>Pinna nobilis</i>	43
1.12 Διατροφή της <i>Pinna nobilis</i>	44
1.13 Επιβιοτικά είδη χλωρίδας και πανίδας στην <i>Pinna nobilis</i>	46
1.14 Η <i>Pinna nobilis</i> στην ζωή του ανθρώπου.....	49
1.15 Υδατοκαλλιέργεια <i>Pinna nobilis</i>	51
1.16 Προηγούμενες μελέτες για την <i>Pinna nobilis</i>	51
1.17 Μελέτες γενετικής δομής της πίννας	52
2. Διακύβευση για την προστασία του διθύρου <i>Pinna nobilis</i>	56
2.1 Διακύβευση και προστασία του είδους <i>Pinna nobilis</i> και των βιοτόπων του.....	57
2.2 Λιβάδια φανερόγαμων.....	58
2.3 Νομοθεσία για την <i>Pinna nobilis</i>	60
3. Παθολογία του διθύρου <i>Pinna nobilis</i>	62
3.1 Εισαγωγή.....	63
3.2 Ιστορικό μαζικής θνησιμότητας	64
3.3 <i>Haplosporidium Pinnae</i>	70
3.4 <i>Mycobacterium sp.</i>	75
3.5 <i>Vibrio sp.</i>	80
4. Κλιματική αλλαγή και <i>Pinna nobilis</i>	84
4.1 Κλιματική αλλαγή	85
4.2 Μεταβολές στις δομές	86
4.3 Σύνδεση της κλιματικής αλλαγής και της παθογένειας της <i>Pinna nobilis</i>	87
5. Μεταβολισμός και μεταβολικά ένζυμα	90

5.1 Μεταβολισμός	91
5.11 Γλυκόλυση	91
5.12 β-οξείδωση λιπαρών οξέων	92
5.13 Κύκλος του Krebs.....	93
5.2 Ένζυμα	96
6. Περιοχές δειγματοληψίας.....	99
6.1 Μαλιακός κόλπος	101
6.2 Κόλπος Καλλονής	104
7. Υλικά και Μέθοδοι	107
7.1 Ιστορικό ερευνών	108
7.2 Συλλογή δειγμάτων	108
7.3 Ιστοπαθολογική ανάλυση.....	109
7.4 Μοριακή ανίχνευση παθογόνων	110
7.5 Διαδικασία.....	113
7.51 Ζύγιση.....	113
7.52 Παρασκευή διαλυμάτων	113
Buffer ομογενοποίησης (200ml).....	114
Imidazole Buffer (200ml).....	114
Διαλύματα για την συνθετάση του κιτρικού οξέος CS.....	114
Διαλύματα για την αφυδρογονάση του β-Υδροξυάκυλο-CoA (HOAD)	115
Διαλύματα για την αφυδρογονάση του γαλακτικού οξέως (L-LDH).....	115
7.53 Ομογενοποίηση ιστών	117
7.54 Φυγοκέντρωση	118
7.55 Φασματοφωτόμετρο	118

CS (Συνθετάση του κιτρικού οξέος).....	119
HOAD (Αφυδρογονάση του β-Υδροξυάκυλο-CoA).....	120
L-LDH (Αφυδρογονάση του γαλακτικού οξέος)	121
Η μέγιστη δραστηριότητα των ενζύμων (V_{max})	123
8. ΓΡΑΦΗΜΑΤΑ	124
8.1 LDH.....	125
8.2 HOAD	129
8.3 CS.....	132
9. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	135
9.1 LDH.....	136
9.2 CS	137
9.3 HOAD	138
.....	139
10. Συζήτηση.....	139
11. Προτάσεις για επίλυση του προβλήματος.....	144
.....	148
.....	149
12. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	149

Ευχαριστίες

Όταν ξεκίνησα να γράφω τις ευχαριστίες ήταν η στιγμή που διαπίστωσα πως αυτό το ταξίδι όδευε προς το τέλος του. Όχι μόνο το ταξίδι προς την ολοκλήρωση της εργασίας, αλλά αυτό που ξεκίνησε λίγα χρόνια πριν: το μεταπτυχιακό. Θα ήθελα λοιπόν να ευχαριστήσω όλους όσους περπάτησαν μαζί μου...

Ξεκινώντας, οφείλω ένα ευχαριστώ στην κα Αθανασοπούλου που αν και κάτω από δύσκολες συνθήκες αποφάσισε να μας χαρίσει έναν τελευταίο κύκλο γνώσης. Μαζί με την κα Αθανασοπούλου, θα ήθελα να ευχαριστήσω και όλους τους διδάσκοντες: η μεταλαμπάδευση γνώσης είναι δύσκολη όταν απέναντί σου έχεις ενήλικες... Παρόλα αυτά, το επίπεδο των μαθημάτων ήταν υψηλό και με την βοήθειά τους εξελιχθήκαμε, αποκτώντας γνώσεις.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ είναι για την κα Μπιτχαβά, την επόπτριά μου, την κα Γουρζιώτη και την κα Αθανασοπούλου, ως μέλη της τριμελούς επιτροπής: με συγκίνησε πολύ η εμπιστοσύνη που μου έδειξαν όλο το διάστημα της προετοιμασίας και της συγγραφής της εργασίας.

Φυσικά από εδώ δεν θα μπορούσαν να λείψουν οι συνάδελφοι- συμφοιτητές: άνοιξε ένας κύκλος πολύ μεγάλος και πραγματικά αποδείξαμε πως σημασία έχει να μοιραζόμαστε στιγμές και εμπειρίες και να πηγαίνουμε όλοι μαζί μπροστά σαν μία ομάδα.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τους συναδέλφους στο εργαστήριο του ΑΠΘ, οι οποίοι ήταν δίπλα μου στην διαδικασία των πειραμάτων.

Δεν αρκεί μόνο η γνώση ενός αντικειμένου για να διεκπεραιωθεί μία διπλωματική. Οι συμβουλές του διευθυντή μου σε θέματα οργάνωσης κειμένου και μετάδοσης πληροφορίας με οδήγησαν σε ένα αποτέλεσμα που δεν θα το είχα, αν δεν ήταν αυτός.

Τέλος, την πιο μεγάλη ευγνωμοσύνη την νιώθω απέναντι στα πρόσωπα που στοιχειοθετούν το «δέντρο» μου:

Στις ρίζες μου, που μου δίδαξαν πως πρέπει πάντα να εξελισσόμαστε και μου κληροδότησαν πείσμα και υπομονή για να μην τα παρατάω

Στον κορμό μου, που με στηρίζει με αγάπη και μου δίνει δύναμη να ανεβαίνω όλο και πιο ψηλά

Στους καρπούς μου, που μου έχουν δώσει το βαρύ χρέος να τους παραδώσω έναν κόσμο καλύτερο για να μπορέσουν και αυτοί όταν έρθει η στιγμή τους, να φτιάξουν το δικό τους, ψηλότερο δέντρο.

Ευχαριστώ

Περίληψη

Η κλιματική αλλαγή έχει επιπτώσεις σε πολλούς οργανισμούς και η συμβολή της στα φαινόμενα μαζικής θνησιμότητας είναι αναμφισβήτητη. Φαινόμενα μαζικής θνησιμότητας έχουν παρουσιαστεί και στο δίθυρο *Pinna nobilis* (Linnaeus, 1758), την πύλα προκαλώντας σχεδόν την εξαφάνισή του.

Η πύλα είναι ενδημικό είδος της Μεσογείου και μάλιστα το μεγαλύτερο δίθυρο. Εκτός από την μεγάλη εμπορική και διατροφική της αξία, η οποία είναι γνωστή από την Αρχαιότητα, η ιδιότητα της να διηθεί το νερό, την καθιστά σημαντικό κομμάτι της πανίδας της Μεσογείου. Λόγω της ανθρώπινης εκμετάλλευσης, έφτασε την δεκαετία του 90 στα όρια της εξαφάνισης. Ωστόσο, με την αυστηρή νομοθεσία που εφαρμόστηκε, κατάφερε να δημιουργήσει νέους πληθυσμούς.

Για δεύτερη φορά όμως, βρίσκεται σε κίνδυνο αυτήν την φορά λόγω των περιστατικών μαζικής θνησιμότητας. Το 2016 παρουσιάζεται για πρώτη φορά μαζική θνησιμότητα στο Alicante της Ισπανίας. Τα επόμενα χρόνια καταγράφονται περιστατικά μαζικής θνησιμότητας σε όλη την λεκάνη της Μεσογείου, από τις δυτικές περιοχές προς τις ανατολικές. Οι πρώτες καταγραφές θνησιμοτήτων στην Ελλάδα ξεκινούν το 2019 στην Κρήτη, στον κόλπο της Καλλονής, στον Μαλιακό κόλπο και στον Θερμαϊκό.

Εντοπίζονται δύο κύριοι αιτιολογικοί παράγοντες: το *Haplosporidium pinnae* και το *Mycobacterium* sp.. Ενώ στην αρχή θεωρήθηκε υπεύθυνο μόνο το απλοσπορίδιο, επόμενες μελέτες καταδεικνύουν ότι η συνεργιστική επίδραση των δύο παθογόνων οργανισμών, σε συνδιασμό με την αύξηση της θερμοκρασίας και της αλατότητας εντείνει το φαινόμενο.

Σκοπός της εργασίας είναι η μελέτη των μεταβολικών ενζύμων L-LDH, CS και HOAD, τα οποία διαδραματίζουν ρόλο στην γλυκόλυση, τον κύκλο του Krebs και την οξείδωση των λιπιδίων, και η συσχέτισή τους με τα περιστατικά μαζικής θνησιμότητας. Για τις ανάγκες της έρευνας θα μελετηθούν δύο πληθυσμοί οι οποίοι είναι προσβεβλημένοι από τα παθογόνα. Κύριος στόχος είναι η στήριξη της υπόθεσης της συνεργιστικής επίδρασης των συγκεκριμένων παθογόνων στις μαζικές θνησιμότητες που λαμβάνουν χώρα στη Μεσόγειο και η καταγραφή προτάσεων για την αποτροπή της εξαφάνισης της πύλας.

Λέξεις κλειδιά: *Pinna nobilis*, είδος υπό εξαφάνιση, *Haplosporidium pinnae*, *Mycobacterium* sp., συνεργία, κλιματική αλλαγή, μεταβολισμός, μεταβολικά ένζυμα

ABSTRACT

Climate change affects many organisms and its contribution to mass mortality events is undeniable. Mass mortality phenomena have also been observed in the bivalve *Pinna nobilis* (Linnaeus, 1758), causing its near extinction.

Pinna nobilis is an endemic species of the Mediterranean Sea and the largest bivalve. In addition to its great commercial and nutritional value, which has been known since Ancient Greece, its ability to filter water makes it an important organism for the Mediterranean fauna. Due to human exploitation, it was on the verge of extinction in the 1990s. Thanks to strict legislation, it has managed to establish new populations and multiply.

For second time, however, pinna is on the brink of extinction and in the red list of endangered species, this time because of the incidents of mass mortality. In 2016, a mass mortality phenomenon occurred for the first time in Alicante, Spain. In following years, mass mortality events were recorded throughout the Mediterranean basin, from the western to the eastern regions. The first mortality record in Greece is observed in 2019 in Crete, followed by incidents at Gulf of Kalloni, Maliakos Gulf and Thermaikos.

Two main responsible pathogens were identified: *Haplosporidium pinnae* and *Mycobacterium* sp.. While initially only *Haplosporidium pinnae* was believed to be responsible, subsequent studies showed that the synergistic effect of the two pathogens, in combination with the increase of the temperature and the salinity, intensified the phenomenon.

The aim of this research is to study the metabolic enzymes L-LDH, CS and HOAD, which play an important role in glycolysis, the Krebs cycle and lipid oxidation, and their correlation with mass mortality events. For this research, two populations that were affected by the pathogens were studied. The main objective of the study is to support the hypothesis of the synergistic effect of these pathogens on the mass mortality events taking place in the Mediterranean Sea and to suggest proposals to prevent the extinction of pina.

Key words: *Pinna nobilis*, endangered species, *Haplosporidium pinnae*, *Mycobacterium* sp., synergism, climate change, metabolism, metabolic enzymes

1. Γνωριμία με το δίθυρο *Pinna nobilis* (Linnaeus, 1758)

Ο κάθε άνθρωπος σου λέει τα πιο ενδιαφέροντα πράγματα που ξέρει μέσα στην πρώτη μισή ώρα γνωριμίας. Μετά από αυτό, είτε επαναλαμβάνεται είτε σου προσφέρει παραλλαγές του ίδιου θέματος.

Pitigrilli (Dino Segre), 1893-1975, Ιταλός συγγραφέας

1.1 Συστηματική κατάταξη *Pinna nobilis* (Linnaeus, 1758)

Τα δίθυρα ανήκουν στα μαλάκια και ως εκ τούτου έχουν τα βασικά στοιχεία της δομής των μαλακίων. Το σώμα τους είναι πλευρικά πεπιεσμένο και κλεισμένο μέσα σε ένα όστρακο το οποίο αποτελείται από δύο θυρίδες που κλείνουν με την βοήθεια ισχυρών μυών. Το εσωτερικό των οστράκων καλύπτεται από τον μανδύα και, μέσα στην κοιλότητα που δημιουργείται υπάρχει το σώμα, το οποίο αποτελείται από ένα μικρό κεφάλι, τα βράγχια και το πόδι, ενώ δεν υπάρχει ζύστρο. Στα δίθυρα ανήκει και η πίννα (*Pinna nobilis*), ένα ενδημικό είδος της Μεσογείου από την εποχή της Μειόκαινου Β, το οποίο σύμφωνα με την κατάταξη διατήρησης, κινδυνεύει άμεσα με αφανισμό.

Στην οικογένεια Πιννίδες (Pinnidae) υπάρχουν συνολικά 58 καταγεγραμμένα είδη παγκοσμίως τα οποία ανήκουν σε τρία γένη: Το γένος *Pinna* με 27 είδη, το γένος *Atrina* με 30 είδη & τέλος το γένος *Stereptopinna* με 1 είδος (World register of marine species, 2023). Παρόλα αυτά, έχουν βρεθεί ακόμα αρκετά είδη των οποίων η συστηματική κατάταξη είναι αβέβαιη.

Συστηματική κατάταξη

Βασίλειο: Ζώα (*Animalia*)

Συνομοταξία: Μαλάκια (*Mollusca*)

Ομοταξία: Δίθυρα (*Bivalvia*)

Τάξη: Πτεριοειδή (*Pterioidea*)

Οικογένεια: Πιννίδες (*Pinnidae*)

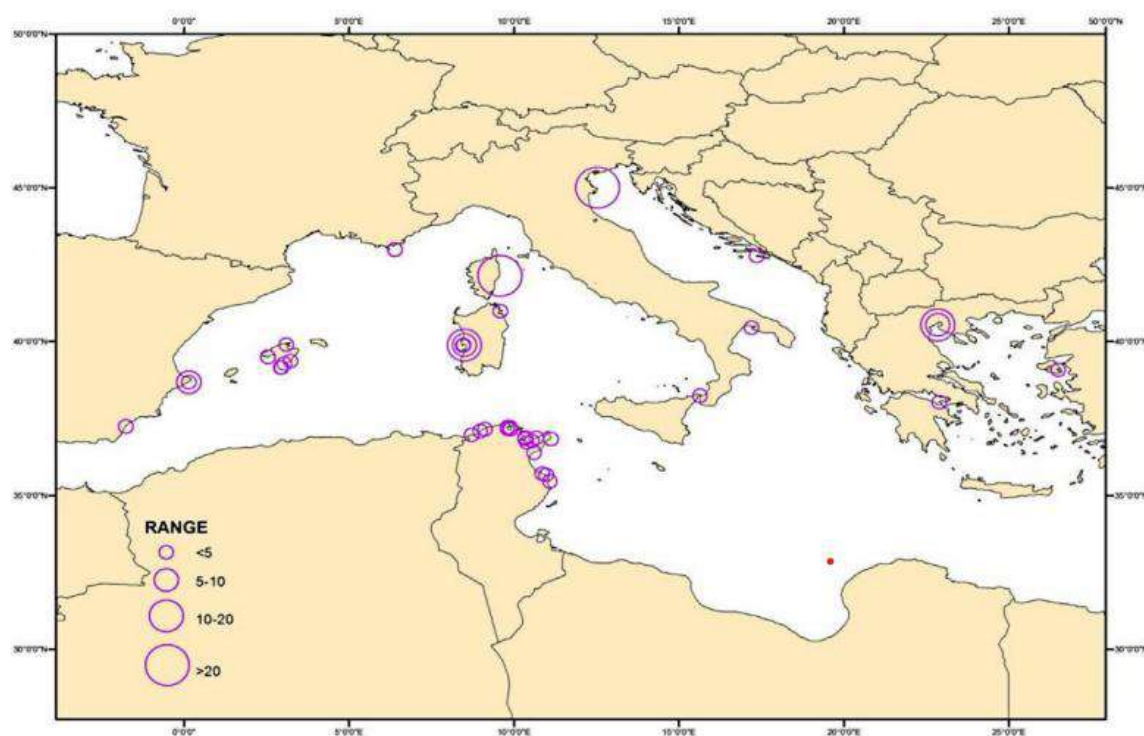
Γένος: Πίννα (*Pinna*)

Πίνακας 1 Συστηματική κατάταξη *Pinna nobilis* (wikipedia)

1.2 Γεωγραφική εξάπλωση της *Pinna nobilis*

Η πίνα είναι ένα ενδημικό είδος της Μεσογείου. Συναντάται σε παράκτιες περιοχές όπως οι ακτές της Ισπανίας, η Μαγιόρκα, η νοτιοανατολική ακτή της Γαλλίας, η Κορσική, η Σαρδηνία, η Σικελία και η λιμνοθάλασσα της Βενετίας (Sanna et al., 2013). Επίσης στην Αφρική απαντάται στις ακτές της Τυνησίας (Rabaoui et al., 2010). Σημαντικός πληθυσμός έχει βρεθεί να ενδημεί και στην Ελλάδα, στο Αιγαίο (Katsanevakis & Thessalou-Legaki, 2009; Katsares et al., 2008).

Οι μεγαλύτεροι πληθυσμοί είχαν καταγραφεί στην Ισπανία, στις Βαλεαρίδες νήσους και στη Murcia με 10 άτομα ανά 100cm², ενώ η θάλασσα της Αδριατικής έρχεται δεύτερη με 9 άτομα ανά 100cm². Στην Ελλάδα, στο στενό της Μεσσήνης είχαν καταγραφεί 6,89 άτομα ανά 100cm², ενώ στην Τυνησία 5. Τέλος, χαρακτηριστική ήταν η παρουσία της στην λίμνη της Βουλιαγμένης στον Κορινθιακό κόλπο με 0,45 άτομα ανά 100cm² (Katsanevakis, 2006).



Εικόνα 1 Κατανομή των πληθυσμών της πίνας στην Μεσόγειο θάλασσα (άτομα/100m³) Στοιχεία περιόδου 1992-2014 (Basso et al., 2015a)

1.3 Στοιχεία βιολογίας και οικολογίας της *Pinna nobilis*

Το είδος *Pinna nobilis* (fan mussel, πίνια) είναι το μεγαλύτερο περιόμορφο δίθυρο και ενδημεί στη Μεσόγειο. Το μέσο μήκος του φτάνει περίπου τα 80cm, καθιστώντας το έτσι ως ένα από τα μεγαλύτερα στον κόσμο (Zavodnik D., 1991), ενώ έχουν γίνει αναφορές για άτομα με μήκος ως 120cm (Katsanevakis, 2004).

Η πίνια είναι ένας εξαιρετικός βιολογικός δείκτης για την παρακολούθηση της ποιότητας των παράκτιων υδάτων λόγω της μακροβιότητας της και του τρόπου διατροφής της (Natalotto et al., 2015). Ως διηθηματοφάγος οργανισμός, φιλτράρει αποτελεσματικά το νερό συγκρατώντας αιωρούμενα οργανικά και ανόργανα σωματίδια, βοηθώντας στην καθαρότητα των υδάτων (Basso et al., 2015b; Trigos et al., 2015a). Επιπλέον, η παρουσία της στα διάφορα οικοσυστήματα όπου ενδημεί παίζει καθοριστικό ρόλο, διότι παρέχει ένα σκληρό υποστρώμα σε περιοχές με μαλακά υποστρώματα, δημιουργώντας έτσι μια επιπλέον επιφάνεια, η οποία μπορεί να αποικιστεί από διάφορους φυτικούς και ζωικούς οργανισμούς (Rabaoui et al., 2007a).

Η πίνια είναι ένα μακρόβιο είδος. Μπορεί να ζήσει περίπου 20 έτη, αν και στη Χαλκιδική ανακαλύφθηκε ένα άτομο ηλικίας 27 ετών (García-March et al., 2011), ενώ σε μια πρόσφατη μελέτη αναφέρθηκε ότι ζουν ως τα 45 έτη (Richardson et al., 1999a).

Η ιδανική θερμοκρασία για την ανάπτυξη της είναι από 10,3 έως 29,7 °C, με ακραία καταγραφή θερμικής ανοχής στους 38 °C.

Ο βιότοπος της πίνιας είναι οι παράκτιες ζώνες σε βάθη από 0,50 έως 60 m (García-March et al., 2008a), ενώ το σύνηθες βάθος στο οποίο ενδημεί είναι τα βάθη 0-3m (Millot, 1999). Έχει παρατηρηθεί ότι τα μεγάλα ενήλικα άτομα είναι σπάνιο να επιβιώσουν σε ρηχά νερά, ειδικά τους καλοκαιρινούς μήνες, κυρίως λόγω της αλιείας. Επομένως



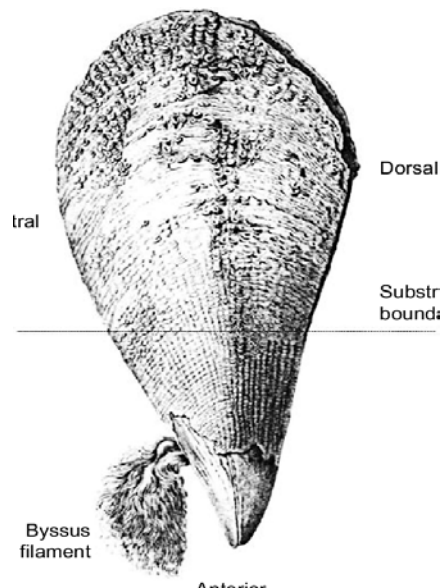
Εικόνα 2 Αποικία με νεκρά άτομα πίνιας όπου κρατάνε ακόμα την θέση τους (Özalp & Kersting, 2020)

σε ρηχά νερά ενδημούν κυρίως νεαρά άτομα, ενώ τα μεγαλύτερα άτομα απαντώνται συνήθως σε μεγαλύτερα βάθη (Katsanevakis, 2006).

Απαντάται ως επί το πλείστον σε αμμώδη υποστρώματα ή σε άμμο με λάσπη (Silietic T., 2003) και σε σημεία όπου υπάρχουν θαλάσσια λιβάδια της *Posidonia oceanica* (Richardson et al., 1999), *Cymodocea nodosa* (Centoducati et al., 2007), *Zostera marina* & *Nanozostera noltii* (Katsanevakis, 2006). Με μικρότερη συχνότητα έχουν βρεθεί πληθυσμοί πάνω σε γυμνή άμμο (Rabaoui et al., 2007a) ή λάσπη (Richardson et al., 1999a) σε βιογενείς σχηματισμούς, όπως κοράλλια (García-March et al., 2008a), σε χαλικώδη υποστρώματα (Richardson et al., 1999a) ή μεταξύ βράχων (García-March et al., 2008).

Ζει μερικώς θαμμένη μέσα σε υπόστρωμα (Richardson et al., 2004). Το ποσοστό το οποίο καλύπτεται το κέλυφος της πίνας από το υπόστρωμα ποικίλει και εξαρτάται από τον τύπο και την πυκνότητα του υποστρώματος (Corpa et al., 2010a, Corpa et al., 2010b) και το μέγεθος του οστράκου (Richardson et al., 1999a). Έτσι, η πίνα μπορεί να καλύπτεται από το 1/5 (Richardson et al., 1999a) έως και το 1/3 (García-March, Pérez-Rojas, et al., 2007b).

Όπως και άλλα περιόμορφα δίθυρα, έτσι και η πίνα στηρίζεται σταθερά στο υπόστρωμα συγκρατούμενη από τα πολυάριθμα νημάτια της βύσσου, τα οποία προσκολλώνται πάνω σε σταθερές δομές όπως πέτρες, κοράλλια, κομμάτια οστράκων και ρίζες Ποσειδωνίας (Corpa et al., 2010), όπως προαναφέρθηκε. Η μετακίνηση των ατόμων για μεγάλη απόσταση είναι σχεδόν απίθανη λόγω της ισχυρής σύνδεσής τους με το υπόστρωμα. Ωστόσο, έχει παρατηρηθεί πως τα μεγαλύτερα άτομα έχουν την δυνατότητα να εισχωρούν πιο βαθιά στο υπόστρωμα από ότι τα μικρότερα. Η προηγούμενη παρατήρηση έχει οδηγήσει στο συμπέρασμα, πως είτε τα άτομα βυθίζονται παθητικά στο υπόστρωμα με την πάροδο του χρόνου, είτε ότι συγκεντρώνεται ίζημα γύρω από αυτά, είτε ότι κατέχουν μια περιορισμένη ικανότητα για μετακίνηση. Έχει επίσης παρατηρηθεί πως η πίνα θα μπορούσε να επανεγκατασταθεί με επιτυχία μετά από μία πιθανή απόσπαση κάτω από κατάλληλες συνθήκες (Richardson et al., 1999a).



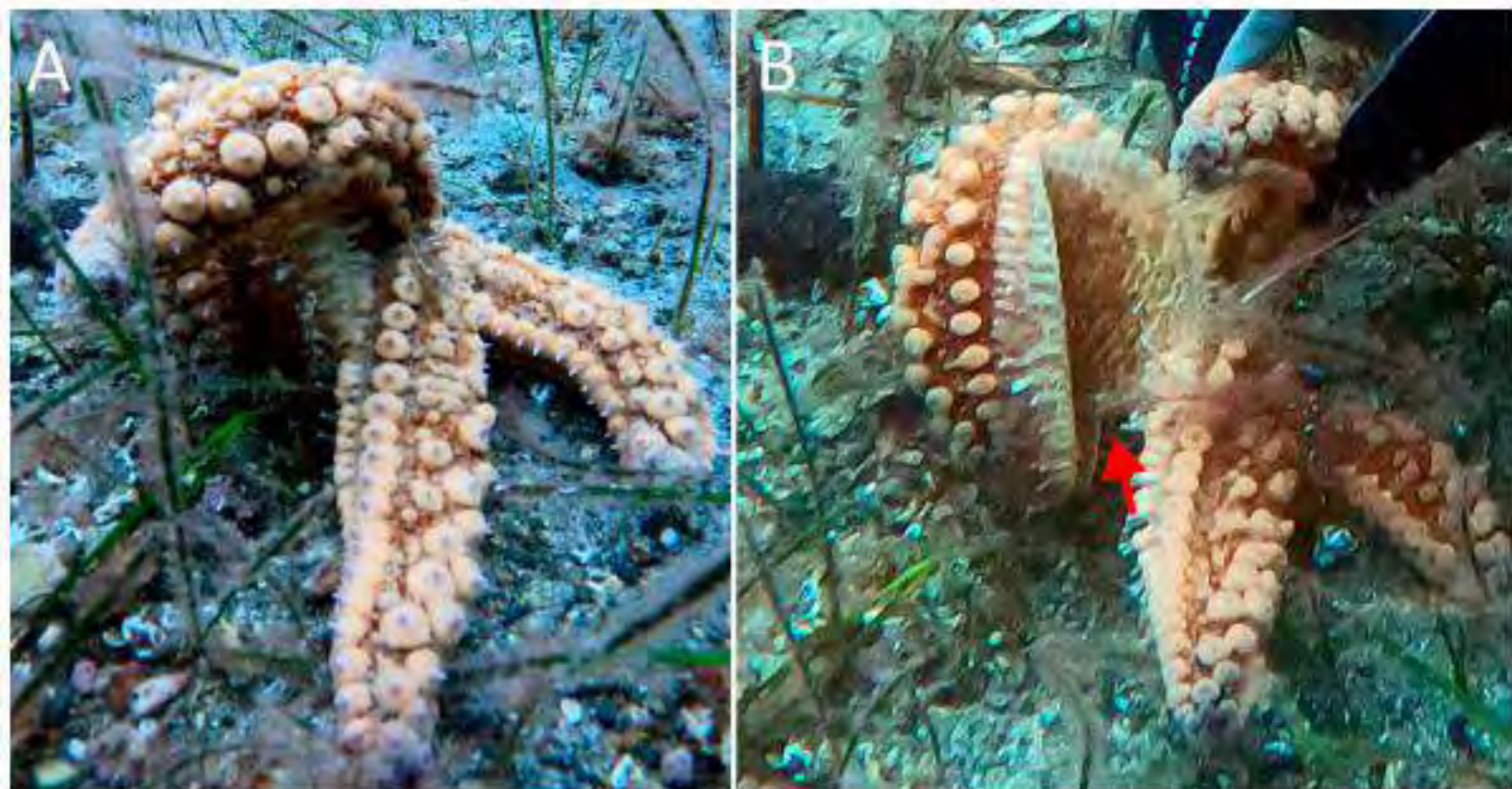
Εικόνα 3 Σκίτσο του Barbera, 1996 στο οποίο φαίνεται το σημείο όπου η πίνα είναι θαμμένη στο υπόστρωμα

Η συχνότερη αιτία φυσικής θνησιμότητας της πίνας παρόλα αυτά, είναι η αποκόλληση του κογχυλιού από το υπόστρωμα λόγω των κυμάτων και η αποτυχία επανεγκατάστασής της (García-March, Pérez-Rojas, et al., 2007b). Οι βασικοί θηρευτές της πίνας είναι τα είδη της οικογένειας *Sparidae*, κυρίως η τσιπούρα *Sparus aurata*, καθώς και το κοινό χταπόδι *Octopus vulgaris* της οικογένειας *Octopodidae* (Addis et al., 2009; García-March, Pérez-Rojas, et al., 2007b), χωρίς να αποκλείεται να είναι τροφή και για άλλα είδη, όπως καβούρια και σαρκοφάγα μαλάκια (Katsanevakis, 2007b).

Η πίνα τρέφεται μέσω διήθησης του νερού από το άνοιγμα των κελυφών στο οπίσθιο μέρος του σώματος. Η διατροφή της, ως διηθηματοφάγος οργανισμός, περιλαμβάνει επίφυτα της επιφάνειας του οστράκου, αιωρούμενες οργανικές ουσίες στο νερό και οργανικές ουσίες του ιζήματος (Cabanellas-Reboredo et al., 2010; Davenport et al., 2011). Σε έρευνα αποδείχτηκε πως η τροφή της πίνας προέρχεται κυρίως από την πελαγική ζώνη και όχι τόσο από την βενθική (Alomar et al., 2015) και γενικά προτιμά τα θραύσματα, τα οποία μάλιστα βρέθηκαν σε ποσοστό 48% μέσα στον στόμαχο των δειγμάτων που συλλέχθηκαν (Trigos et al., 2015b). Τέλος, τα κωπήποδα αποτελούν και αυτά μέρος της διατροφής της σε όλα τα στάδια της ζωής της πίνας (Davenport et al., 2011).

Η ηλικία της πίνας υπολογίζεται με βάση τα σημάδια που υπάρχουν στο κέλυφός της. Με ρυθμό ανάπτυξης που αγγίζει το 1mm/day, η πίνα κατέχει έναν από τους υψηλότερους ρυθμούς ανάπτυξης δίθυρων (Katsanevakis, 2007a). Για τα 3 πρώτα χρόνια της ζωής τους τα άτομα της πίνας αναπτύσσονται με ταχείς ρυθμούς, ενώ έπειτα ακολουθεί μία κάμψη (Katsanevakis, 2006). Κατά την διάρκεια ενός έτους υπάρχει περιοδικότητα στην ανάπτυξη της, η οποία σχετίζεται κυρίως με την θερμοκρασία. Ανάμεσα στο τέλος Φθινοπώρου και στις αρχές της Άνοιξης καταγράφεται μία εκτεταμένη φάση αργής ανάπτυξης, ενώ από την Άνοιξη ως τις αρχές του καλοκαιριού παρατηρείται μία γρήγορη φάση (Katsanevakis, 2007b).

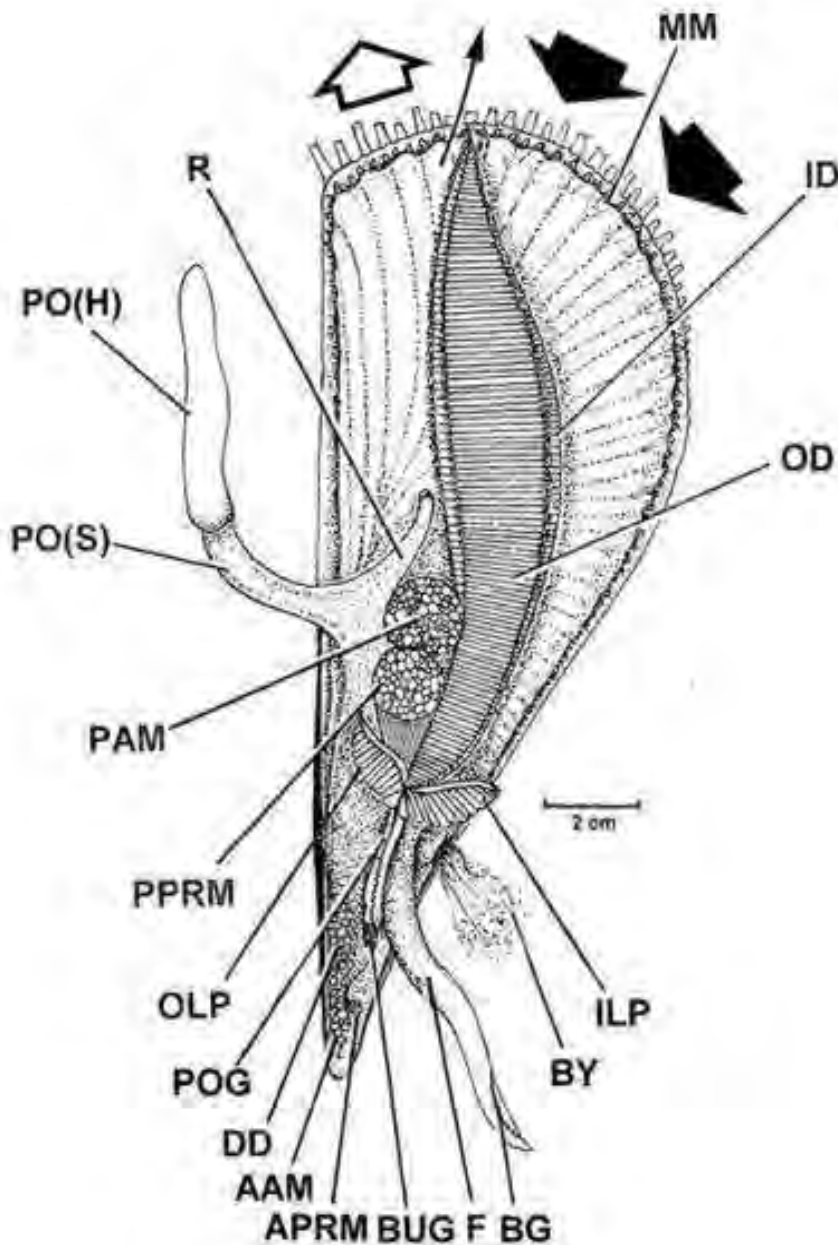
Εικόνα 4 Α Η *Marthasterias glacialis* τρέφεται με ένα νεαρό άτομο πίνας (Β) ο Το κόκκινο βέλος υποδεικνύει τη ρωγμή στο κέλυφος μέσω της οποίας το αγκαθωτό αστέρι εισήγαγε το έντερό του στο κέλυφος. (Çinar & Bilecenoglu, 2023)





Εικόνα 5 *Octopus vulgaris*, θηρευτής πίνας <https://www.cupoty.com/>

1.4 Ανατομία της *Pinna nobilis*



AAM: Πρόσθιος προσαγωγός
μυς

APRM: Πρόσθιος
συσπειρωτήρας μυς

BG: Αύλακας βύσσου

BUG: Στοματικός αδένας;

BY: Βύσσος

DD: Πεπτικά εγκολπώματα

F: Πόδι

ID: Εσωτερικό ημιβράγχιο

ILP: Εσωτερική χειλική κεραία

MM: Περιθώριο μανδύα

OD: Εξωτερικό ημιβράγχιο

OLP: Εξωτερική χειλική κεραία

PAM(1): Οπίσθιο τμήμα του
οπίσθιου προσαγωγού μυός

PAM(2): Πρόσθιο τμήμα του
οπίσθιου προσαγωγού μυός;

PO(H): Παλλικό όργανο

(κεφαλή)

· PO(S): Παλλικό όργανο (μίσχος)·

POG: Εγγύς στοματική αυλάκωση

PPRM: οπίσθιος συσπειρωτήρας μυς R: ορθός

Η πρώτη λεπτομερής ανατομική περιγραφή της *Pinna nobilis* έγινε από τους στους Czihak και Dierl το 1961, ενώ της *Pinna carnea* έγινε από τον Yonge το 1953 (Yonge, 1953b).

Η πένα απαρτίζεται από δύο μέρη: το κέλυφος και το μαλακό μέρος. Το σχήμα του κελύφους επηρεάζεται έντονα από μια σειρά προσαρμογών εξ' αιτίας του περιβάλλοντος στο οποίο ενδημεί. Αντίστοιχα, και το σώμα διαφοροποιείται από αυτό των άλλων μαλακίων λόγω του τρόπου ζωής και των οικοτόπων στους οποίους διαβιεί.

1.41 Κέλυφος

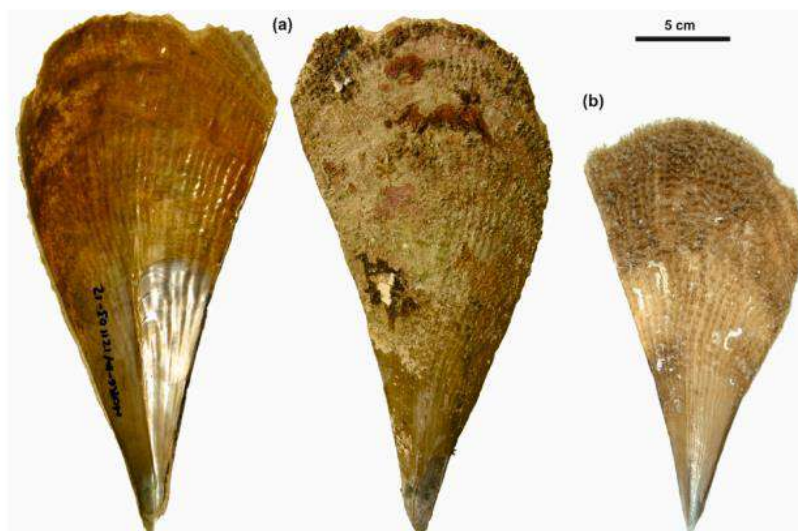
Γενικά, το κέλυφος των δίθυρων περιγράφεται μαθηματικά ως μια λογαριθμική σπείρα, η οποία δίνει την δυνατότητα αύξησης του μεγέθους του οστράκου χωρίς την αλλαγή του σχήματος του. Αναπτύχθηκε λοιπόν ένα μαθηματικό μοντέλο για να κατανοηθεί η συνιστώσα της ακτινικής ανάπτυξης και το σχήμα των μαλακίων. Αποτέλεσμα της μελέτης ήταν να οριστεί ένας θεωρητικός μορφοχώρος, ο οποίος είναι συνεπής με το φάσμα των μορφών που υπάρχουν στη φύση (Ubukata, 2001).

Το κέλυφος της πένας έχει τριγωνικό σχήμα, με ευρείες πλευρικές επιφάνειες. Σε αυτό το σχήμα οφείλεται και το ιδιωματικό όνομά της «fan mussel», καθώς θυμίζει φτερό ανεμιστήρα (García-March et al., 2007). Το πρόσθιο τμήμα είναι πιο μικρό και μυτερό, ενώ το οπίσθιο τμήμα του

κελύφους είναι

ιδιαίτερα ανεπτυγμένο

Εικόνα 6 α Η εσωτερικά και η εξωτερική πλευρά του κελύφους ενός ενήλικου ατόμου β η εξωτερική πλευρά ενός ανηλίκου (Nalepka et al., 2022)



με ευρύ και στρογγυλεμένο σχήμα. Η μείωση του πρόσθιου τμήματος και αντίστοιχα του πρόσθιου προσαγωγού μυός σχετίζεται με το γεγονός πως από εκείνη την πλευρά γίνεται η στερέωση της στο υπόστρωμα (Garcia March, 2006). Στο κέλυφος της πίνας αποδίδονται πολλές λειτουργίες, μεταξύ των οποίων η χρησιμότητα του ως σκελετός για την προσκόλληση μυών και η προστασία του μανδύα από τους θηρευτές. Παράλληλα συμβάλλει στη διατήρηση της λάσπης και της άμμου εκτός της κοιλότητας του μανδύα. Στα νεαρά άτομα παρατηρούνται επιμήκεις προεξοχές σχήματος U με αιχμηρές άκρες

εξωτερικά του κελύφους, σαν σπονδυλική στήλη. Καθώς το δίθυρο όμως μεγαλώνει, οι προεξοχές διαβρώνονται και εξαφανίζονται. Τα μεγαλύτερα άτομα έχουν την εξωτερική τους πλευρά σχεδόν λεία.

Το κέλυφος, αποτελείται από τρία στρώματα, όπως θα αναφερθούν αναλυτικά παρακάτω: ένα εξωτερικό κεράτινο περίοστρακο και δύο ασβεστοποιημένα στρώματα κάτω από αυτό. Το εσωτερικό στρώμα αποτελείται από αραγωνιτικό φίλντισι, το οποίο βρίσκεται μόνο στο πρόσθιο τμήμα του κελύφους (García-Carrascosa, et al., 2007).

1.42 Βύσσος

Η πίνα εγκαθίσταται στον πυθμένα με την βύσσο (Rabaoui et al., 2007a), η οποία παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Για να επιτευχθεί η εγκατάσταση του οστράκου, στο πρόσθιο-κοιλιακό τμήμα υπάρχει μία αυλάκωση από ασβεστίτη, από την οποία εξέρχονται τα νημάτια της βύσσου και παίρνουν μια πρόσθια θέση (Garcia- March, 2006). Τα νημάτια της βύσσου, αν και είναι πλούσια σε πρωτεΐνες, δεν αποτελούνται από κολλαγόνο ή πρωτεΐνες τύπου α ή β.



Εικόνα 7 Επεξεργασμένη βύσσο με ένα χαλκόχρυσο χρώμα (φωτογραφία: Eliot Stein) <https://www.bbc.com>

Βρίσκονται ενσωματωμένα στους οπίσθιους συσπειρωτήρες μύες του ποδιού, στην περιοχή της επαφής του με τις θύρες, σχηματίζοντας δύο ζεύγη ομάδων, το καθένα σε κάθε συσπειρωτήρα μυ και εξέρχονται όπως προαναφέρθηκε, από το πρόσθιο άκρο των θυρίδων. Ένα ενήλικο άτομο έχει συνήθως πάνω από 20.000 νημάτια μήκους έως 25cm το καθένα. Αξιοσημείωτο



Εικόνα 8 Η ανεπεξέργαστη βύσσος με οργανισμούς να είναι ακόμη μπλεγμένοι στις ίνες της
<https://muschelseide.ch/en/handicraft-aspects/>

χαρακτηριστικό της βύσσου είναι η εμφάνιση δύο διαφορετικών τύπων νημάτων ωοειδούς διατομής και λείας επιφάνειας: τα παχιά και τα λεπτά νημάτια. Τα παχιά νημάτια που προεξέχουν από το άτομο (100-150 mm μήκος και 0,04 mm πάχος) σχηματίζονται από την σύντηξη 4 λεπτών νημάτων (50-10 mm μήκος και 0,01-0,02 mm πάχος). Τα λεπτά νημάτια συγχωνεύονται πλευρικά κατά ζεύγη. Δύο από αυτά σχηματίζουν μια διασταύρωση όπου τα άλλα δύο ταιριάζουν για να σχηματίσουν το παχύ νήμα. Αυτό το μοναδικό χαρακτηριστικό της βύσσου επιτρέπει σε κάθε παχύ νήμα να συνδέεται σε τέσσερα διαφορετικά

σημεία, δύο μέσα σε κάθε οπίσθιο συσπειρωτήρα μυ (Garcia- March, 2007). Όπως και σε άλλα δίθυρα, η προσκόλληση στο υπόστρωμα επιτυγχάνεται με πλάκες προσκόλλησης. Στην πίνια οι πλάκες αυτές έχουν σχήμα κεφαλής βέλους και μέγεθος μεταξύ 0,2 και 0,5 mm. Η στερέωση γίνεται συνήθως κάτω από το πρόσθιο άκρο του κελύφους στην κοιλιακή επιφάνεια. Τα νημάτια σχηματίζουν ξεχωριστά ομάδες, που μειώνονται σε αριθμό με την απόσταση από το ζώο, και αποκλίνουν προς όλες τις κατευθύνσεις.

Τα νημάτια αυτά, δεν συνδέονται μόνο με το υπόστρωμα, ούτε είναι μόνο κολλημένα στις ρίζες και στα ριζώματα των φανερόγαμων (De Galuejack B., 1993), αλλά παράλληλα, είναι κολλημένα μεταξύ τους, όπως περιγράφηκε πιο πάνω και με τα συγκρίματα του υποστρώματος. Αυτού του είδους η επιπρόσθετη σύνδεση, βοηθάει στο να μπορεί να στηριχτεί το όστρακο ακόμα και αν χαθεί η σύνδεση με τις ρίζες της Ποσειδωνίας ή με τις άλλες σταθερές δομές (Garcia March, 2006). Με αυτόν τον τρόπο, επιτυγχάνεται η μεγάλη αντίσταση που παρουσιάζουν τα άτομα απέναντι στις υδροδυναμικές πιέσεις, με την μέγιστη τιμή να φτάνει τα 45 Newtons (García-March, Pérez-Rojas, et al., 2007b).

Λόγω του ότι η θέση της πίνας στο υπόστρωμα μεταβάλλεται ελαφρώς (κυρίως διότι εγκαθίσταται σε μαλακά υποστρώματα), οι κύριες τροποποιήσεις στις αναλογίες του σώματος

της πίνας σε σχέση με τα άλλα δίθυρα, συνδέονται άμεσα με τη σταθεροποίησή της από την βύσσο στο μαλακό υπόστρωμα. Τέλος, η βύσσος δεν απολιθώνεται. Ωστόσο, στα χείλη του οστράκου από όπου εξέρχεται σχηματίζεται μία εγκοπή. Με αυτόν τον τρόπο αναγνωρίζεται η παρουσία, αλλά και η θέση της στα απολιθωμένα δίθυρα.



Εικόνα 9 Η Chiara Vigo, υφάντρα του θαλάσσιου μεταξιού έξω από το μουσείο της βύσσου στην Σαρδηνία

Εικόνα 10 Μακροσκοπική εικόνα εσωτερικών οργάνων πίνας
G: βράγχια Go: γονάδα- Mu: μυς- M: μανδύας- By: byssus- K:
νεφρός.(Carella et al., 2019)

1.43 Μανδύας



Ο μανδύας της πίνας αποτελεί μέρος του οργανισμού που βρίσκεται εντός του κελύφους μαζί με τα υπόλοιπα όργανα. Έχει σκούρα κόκκινη απόχρωση και δεν συνδέεται με το κέλυφος όπως σε άλλα δίθυρα όπως για παράδειγμα στα Mytilidae, γεγονός το οποίο τον καθιστά ανασυρόμενο και χωρίς παλίνδρομη γραμμή (Garcia- March, 2006). Το χαρακτηριστικό αυτό (της απόσυρσης του μανδύα) είναι πολύ χρήσιμο, διότι δίνει στην πίνια την ικανότητα αναγέννησης του οπίσθιου μέρους του οστράκου σε περίπτωση που αυτό σπάσει.

1.44 Μύες

Ο οπίσθιος προσαγωγός μυς και ο οπίσθιος αναστολέας του ποδιού είναι τόσο κοντά σε που φαίνονται ως ένας μυς (Basso et al., 2015a). Ο οπίσθιος προσαγωγός μυς αποτελείται από σκούρες και ανοιχτές φάσεις. Οι φωτεινές φάσεις (μύες αποκλεισμού) έχουν βραδύτερη

συστολή, αλλά μπορούν να συγκρατήσουν μεγαλύτερη δύναμη (12 kg/cm²) και χρησιμεύουν για να διατηρήσουν το κέλυφος κλειστό. Οι σκοτεινές φάσεις (μύες εργασίας) μπορούν να συστέλλονται γρήγορα, αλλά δεν έχουν την ίδια δύναμη (0,5 kg/cm²). Υπάρχει ακόμα ένας μυς, σχετικά μικρός, όπου βοηθά στο να κρατηθεί το κέλυφος ερμητικά κλειστό σε περίπτωση ανάγκης (Yonge, 1953b). Η διαφορά χρώματος στους μύες, οφείλεται στην διαφορετική περιεκτικότητα σε διάφορες ενώσεις, διότι οι μύες αποκλεισμού χρησιμοποιούν περισσότερη εφεδρική ενέργεια επειδή η προσπάθειά τους διαρκεί περισσότερο (Czihak and Dierl, 1961). Επίσης, υπάρχουν μύες ως μια δευτερεύουσα στερέωση του μανδύα, η οποίοι χαρακτηρίζονται ως πρόσθιοι και οπίσθιοι ωχροί συσπειρωτές μύες (Kroeck M. & Montes J., 2005).

1.45 Βράγχια

Στο ενήλικο ζώο, στο εξωτερικό και στο εσωτερικό μέρος του κελύφους υπάρχουν κινούμενα νημάτια βράγχιων, τα οποία συνδέονται με περίπλοκο τρόπο, με αποτέλεσμα να φαίνονται συμπαγή. Η οργάνωση αυτών των νηματίων δημιουργεί μια περιοχή στο εσωτερικό του κελύφους που καταλήγει σε ένα μεγάλο χώρο και εκτείνεται ως τον ανώτερο μανδύα. Τα εξωτερικά νημάτια των βράγχιων είναι ιδιαίτερα πλούσια σε αδενικά κύτταρα με μεγάλα οξύφιλα εκκριτικά κοκκία, τα οποία παράγουν τη βλέννα που καλύπτει τα βράγχια, συνθέτοντας ένα βλεννογόνο δίχτυ με την βοήθεια του οποίου τελικά συλλαμβάνονται και φιλτράρονται τα θραύσματα από τα οποία τρέφεται (Czihak και Dierl, 1961).

1.46 Κυκλοφορικό σύστημα

Η καρδιά χωρίζεται σε κόλπους με λεπτά τοιχώματα σε σχήμα πυραμίδας και διασχίζονται από μία μυϊκή ίνα. Από εκεί, το αίμα ρέει σε μια κοιλία με παχύ τοίχωμα, που επίσης διαπερνάται από μυϊκή ίνα. Το κυκλοφορικό σύστημα χωρίζεται σε μεγάλο και μικρό: το μεγάλο

κυκλοφορικό σύστημα έχει δύο διαδρομές, μία από την καρδιά στα βράγχια και πίσω, και η άλλη από την καρδιά προς το νεφρικό σύστημα, τα βράγχια και πίσω. Το μικρό κυκλοφορικό σύστημα πηγαίνει από την καρδιά στον μανδύα και πίσω. Το αίμα δεν πήζει και περιέχει ερυθροκύτταρα με πυρήνες. Αιμοσφαιρίνη δεν υπάρχει, αλλά είναι πιθανό τα άτομα χαλκού (Cu) στην αιμοκυανίνη να δρουν ως χρωστικός παράγοντας του αίματος. Το μαγγάνιο (Mn) ανιχνεύτηκε επίσης σε υψηλές αναλογίες και λειτουργεί ως αναπνευστική χρωστική ουσία στην ένωση (Czihak και Dierl, 1961). Στην πίνα, τα κύτταρα του αίματος συμμετέχουν στη ρύθμιση του μεταβολισμού μέσω της αποθήκευσης και της αποικοδόμησης του γλυκογόνου και συμβάλλουν επίσης στη διαδικασία αποτοξίνωσης μέσω της δέσμευσης ανόργανων στοιχείων στα λυσοσώματά τους (Ache, 1992). Επιπλέον, υπάρχουν κύτταρα τα οποία χαρακτηρίζονται από βακτηριακή φαγοκυτταρική δραστηριότητα, γεγονός που υποδηλώνει το ρόλο του κυκλοφορικού συστήματος στην αντιβακτηριακή άμυνα (Ache, 1992).

1.47 Δίαυλοι περιττωμάτων

Η πίνα διαθέτει διαύλους περιττωμάτων, οι οποίοι διέρχονται από το μανδύα ξεκινώντας από το στόμα και συνεχίζοντας μέχρι το οπίσθιο ραχιαίο άκρο των βραγχίων, με κατεύθυνση από την πρόσθια μεριά προς την οπίσθια. Οι διάυλοι αυτοί, ενώνονται στον εσωτερικό λοβό της άκρης του μανδύα, ολοκληρώνοντας τη διαίρεση μεταξύ των θαλάμων εισπνοής και εκπνοής. Από αυτούς τους διαύλους γίνεται η απομάκρυνση των ψευδοπεριττωμάτων και των άλλων υπολειμμάτων του θαλάμου εισπνοής και χρησιμεύουν στον καθαρισμό της κοιλότητας από την άμμο και άλλων υλικών που εισάγονται από πιθανούς κυματισμούς πριν προλάβουν να κλείσουν τα κελύφη (Garcia- March, 2006).

1.48 Προστοματικός αδένας

Ο προστοματικός αδένας στην πίνα έχει μέγεθος μπιζελιού, και βρίσκεται μπροστά από το άνοιγμα του στόματος με έναν πόρο στην άκρη του άνω χείλους. Η λειτουργία του είναι ασαφής, ενώ θεωρείται πιθανό ότι στην πίνα έχει τον ρόλο ενός σιελογόνου αδένα, αφού το άνοιγμα του στόματος βρίσκεται πρακτικά κάτω από το άνοιγμα του αδένα (Yonge, 1953a).

Εικόνα 11 Κέρνο ομοίωμα πίνας (Tëmkin & Poli, 2015)



1.49 Ωχροόργανο

Το ωχροόργανο είναι ένα χαρακτηριστικό όργανο της οικογένειας Pinnidae με αμφιλεγόμενη λειτουργία. Αρχικά θεωρούνταν ότι ήταν όργανο καθαρισμού, το οποίο ήταν υπεύθυνο για την αφαίρεση των σπασμένων κομματιών του κελύφους που παρέμεναν στην κοιλότητα (Yonge, 1953a). Ωστόσο, αργότερα θεωρήθηκε στην *Atrina pectinata* ότι πρόκειται για ένα εκκριτικό όργανο, με pH 2-4 με υποτιθέμενη αμυντική λειτουργία, προστατεύοντας το ζώο από την είσοδο των επιβιοτικών οργανισμών και των θηρευτών. Επιπλέον, διαπιστώθηκε ότι ο αδένας αυτός παράγει θειικό οξύ το οποίο βοηθά στη σύλληψη θηραμάτων εκτός από την λειτουργία του στον καθαρισμό του κελύφους (Morton & Puljas, 2019).

1.1410 Κλείθρο

Στην πένα, τα κελύφη ενώνονται μεταξύ τους στο οπίσθιο (άνω) μέρος του οστράκου, στην ραχιαία περιοχή με έναν ελαστικό σύνδεσμο και συναρθρώνονται με ένα σύστημα προεξοχών και εσοχών τα οποία υπάρχουν και στα δύο κελύφη σε αντιστοιχία. Ο χώρος αυτός της συνάρθρωσης ονομάζεται κλείθρο. Ο σύνδεσμος αυτός έχει την λειτουργία να συγκρατεί τα κελύφη ενωμένα μεταξύ τους. Το άνοιγμα και κλείσιμο των κελυφών επιτυγχάνεται την ανταγωνιστική δράση του ελαστικού συνδέσμου και των προσαγωγών μυών που προσκολλώνται στο εσωτερικό των κελυφών και κυρίως με την κάμψη του πίσω μέρους του κελύφους, το οποίο είναι πλούσιο σε πρωτεΐνες. Ο ελαστικός σύνδεσμος δρα σαν ελατήριο και κρατά τις θυρίδες ανοικτές όταν οι μύες ηρεμούν. Αντίστοιχα, σε περίπτωση κινδύνου όλα τα μαλακά μέρη αποσύρονται στο εσωτερικό του οστράκου και το όστρακο σφραγίζει με τη συστολή των προσαγωγών μυών. Η ιδιομορφία αυτή της πένας έχει ως μεγάλο πλεονέκτημα ότι ο οργανισμός μπορεί και επιβιώνει ακόμα και μετά από τυχόν απώλεια του πρόσθιου προσαγωγού μυ, αφού το οπίσθιο τμήμα μπορεί να συνεχίσει να κλείνει με τη δράση του οπίσθιου προσαγωγού μυ.



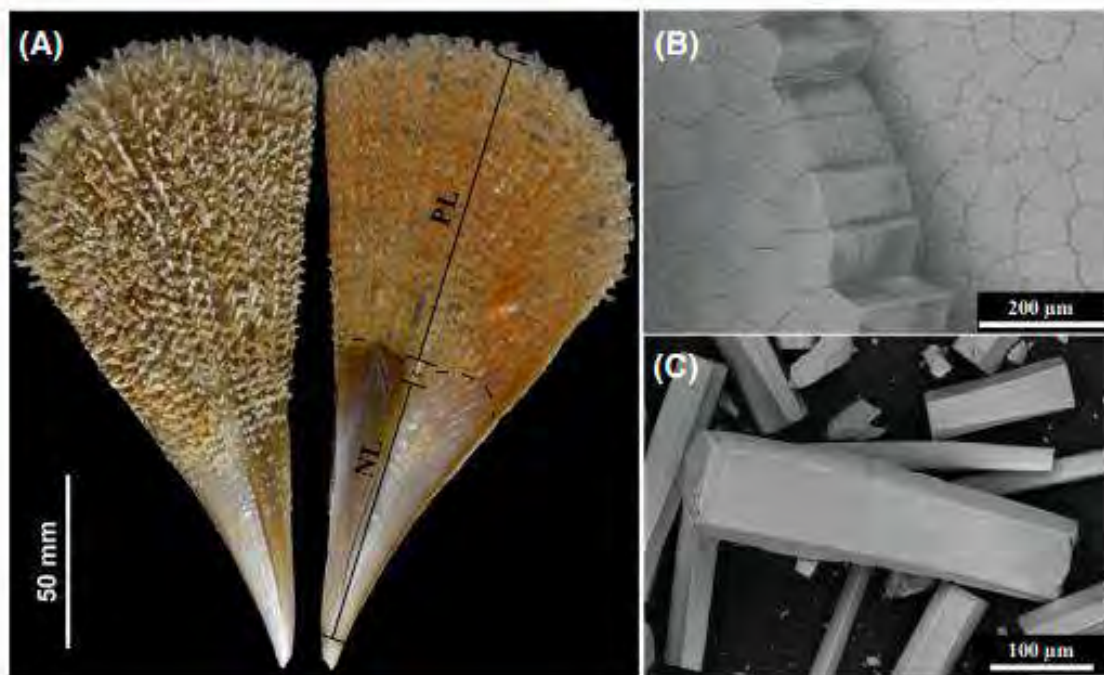
Εικόνα 12 Κλείθρο <https://academic-accelerator.com/>

1.5 Βιοανοργανοποίηση (biomineralization) , κατασκευή και αναγέννηση κελύφους

Οι πρωτεΐνες των οστράκων γενικά, προσφέρουν ελπιδοφόρες εφαρμογές στη βιοτεχνολογία. Χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι η σύνθεση βιομιμητικών υλικών υψηλών μηχανικών ιδιοτήτων, με εφαρμογή στην χειρουργική ιατρική, την ορθοπεδική και την οδοντιατρική. Θεωρούνται μάλιστα ως η νέα γενιά βιοενεργών παραγόντων, με εφαρμογές στην αναγέννηση διάφορων ιστών, όπως για παράδειγμα την αναγέννηση και επισκευή οστών (Marin & Luquet, 2005). Επομένως, η μελέτη της σύνθεσης των οστράκων είναι πολύ σημαντική για πολλούς άλλους κλάδους επιστημών.

Η κατασκευή του κελύφους αρχίζει από νωρίς στη ζωή ενός μαλακίου, και δεν σταματά καθ' όλη την διάρκεια της ζωής του, ως τον θάνατο του ατόμου. Η κατασκευή των κελυφών ξεκινά στο στάδιο των τροχοφόρων προνυμφών με το σχηματισμό μιας οργανικής μεμβράνης, η οποία συμβάλει στην φάση της ανοργανοποίησης. Κατά την διάρκεια της εξέλιξης του μαλακίου, αυτή η οργανική μεμβράνη μετατρέπεται σε περίοστρακο, ένα δερματοειδές εξωτερικό στρώμα. Μέσω των επιθηλιακών κυττάρων (από το κυτταρόπλασμα με αντλίες ιόντων) του μανδύα απελευθερώνονται όλες οι πρόδρομες ουσίες για την ανοργανοποίηση (ανόργανα ιόντα, κυρίως ασβέστιο και διττανθρακικά άλατα). Ταυτόχρονα, με την διαδικασία της εξωκυττάρωσης, εκκρίνονται και τα οργανικά συστατικά της μεσοκυττάριας ουσίας του κογχυλιού. Τα οργανικά συστατικά είναι κυρίως πρωτεΐνες, γλυκοπρωτεΐνες, όξινοι πολυσακχαρίτες, και χιτίνη. Στο υπερκορεσμένο εξωκυτταρικό υγρό οι οργανικές αυτές ουσίες αλληλοεπιδρούν με τα ανόργανα ιόντα. Έτσι, δημιουργείται ως τελικό προϊόν, το όστρακο: ένας σχηματισμός από ανόργανα στρώματα αραγωνίτη ή ασβεστίτη, με διαφορετικές μικροδομές σε δύο σαφώς καθορισμένα στρώματα (Marin & Luquet, 2005).

Στα ενήλικα άτομα, η αύξηση του κελύφους γίνεται από τις παρυφές του κογχυλιού, σε ένα σημείο το οποίο σφραγίζεται από το περίοστρακο και τον ασβεστοποιημένο μανδύα (Marin & Luquet, 2005).



Εικόνα 13 Δομή κελύφους (A) Εξωτερική και εσωτερική μακροσκοπική άποψη του κελύφους από νεαρό άτομο ηλικίας 1,5 έτους, 200 mm. Το στιλπνό κάτω μισό τμήμα είναι το στρώμα από αραγωνιτικό φύλντισι (NL), ενώ το ασβεστιτικό πρισματικό στρώμα (PL) αντιστοιχεί στο ανώτερο καφετί τμήμα του κελύφους. Τα δύο στρώματα διαχωρίζονται με διακεκομμένες γραμμές. Κλίμακα: 50 mm. (B) Το πρισματικό στρώμα του καθαρισμένου κελύφους δείγματος ηλικίας 2,5 ετών που παρατηρείται με SEM σε λειτουργία οπισθοσκέδασης και αποτελείται από πολυγωνικά ασβεστιτικά πρίσματα που στοιβάζονται μεταξύ τους με ένα λεπτό οργανικό περίβλημα. Κλίμακα: 200 μm. (C) Εικόνα SEM απομονωμένου πρίσματος που διακρίνονται οι νανοστοιβάδες- τα πρίσματα απομονώθηκαν με υποχλωριώδες νάτριο: 100 μm. (Khurshid et al., 2023)

Το όστρακο των μαλακίων αποτελείται από τρία κύρια στρώματα, τα δύο από τα οποία αποτελούνται από μορφές κρυστάλλωσης του ανθρακικού ασβεστίου: Ένα εξωτερικό υπόστρωμα ασβεστίτη, με μια μικροδομή από ασβεστιτικά πολυεδρικά πρίσματα (Εικ. 11 B, C) και ένα εσωτερικό υπόστρωμα από μαργαρώδες αραγωνίτη, το οποίο σχηματίζεται από στοιβαγμένα φύλλα και αυξάνεται σε πάχος πρόσθια. Τα δύο αυτά υποστρώματα συνδέονται μεταξύ τους με ένα στρώμα πρωτεΐνης, την κογχουλίνη της οποίας η ποσότητα διαφέρει ανάμεσα στις οικογένειες των *Pinnidae* (Yonge, 1953b). Η σύνδεση αυτών των υποστρωμάτων βελτιώνει την πέδηση θραύσης, διότι η ορυκτολογική αντίθεση μεταξύ των υποστρωμάτων βοηθά στο να αυξηθεί η πιθανότητα οριζόντιας εκτροπής των κάθετων καταγμάτων. Με λίγα λόγια, η συγκεκριμένη στρωμάτωση μπορεί να ελαχιστοποιήσει τις συνέπειες ενός σπασίματος κελύφους μετά από πρόσκρουση (Khurshid et al., 2023).

Ο ασβεστιτικός εξωσκελετός προστατεύει την πίνα από τους κινδύνους και αποτελείται από 95% ανόργανα στοιχεία και 5% οργανικά, τα οποία συμβάλλουν και αυτά στην αντίσταση κατά της θραύσης του οστράκου. Τα ασβεστιτικά πρίσματα είναι οργανωμένα σε κρυσταλλογραφικούς

άξονες στην επιφάνεια του κελύφους και παράλληλα με το πρίσμα Κάντε κλικ ή πατήστε εδώ για να εισαγάγετε κείμενο.. Ένα χαρακτηριστικό της οικογένειας των *Pinnidae*, είναι πως τα πρίσματα είναι μεγαλύτερα από των άλλων οικογενειών με διάμετρο περίπου 1mm.

Η επέκταση του υποστρώματος μαργαρώδους αραγωνίτη στο πρόσθιο μέρος του κελύφους έχει συστηματική αξία, αφού στο γένος *Pinna* υπάρχει τρόπιδα όπου εκεί δεν εναποτίθεται όπως συμβαίνει σε πιο πρωτόγονα γένη όπως η *P. atrina*. Επίσης, η κίνηση του κελύφους για το άνοιγμα και το κλείσιμο των θυρών, οφείλεται κατά ένα μεγάλο ποσοστό σε αυτό το υπόστρωμα, όπου παρέχει την ευελιξία στην κίνηση του.

Η κογχολίνη απαρτίζεται από δύο πρωτεϊνικά κλάσματα: το 35-KDa και το 17-KDa , όπως θα αναφερθούν παρακάτω (Marin et al., 2003). Το τελευταίο κατανέμεται τόσο στην επαφή μεταξύ του πρίσματος και της περιπρισματικής οργανικής υποδομής, όσο και μέσα στα πρίσματα, και επιδρά στο σχηματισμό κρυστάλλων CaCO_3 , καθιστώντας τους μεγαλύτερους στα *Pinnidae*. Στην περιοχή της εμφύτευσης των προσαγωγών μυών βρίσκονται κηλίδες που σχηματίζονται από τα τυπικά αραγωνιτικά πρίσματα του μυόστρακου (Taylor, 1969).

Η πίνα είναι ένα από τα λίγα μαλάκια των οποίων έχουν μελετηθεί σε ικανοποιητικό βαθμό οι πρωτεΐνες του οστράκου τους (Marin & Luquet, 2005), καθιστώντας την ένα καλό πρότυπο όχι μόνο για τη μελέτη της βιοανοργανοποίησης αλλά και για την ανάπτυξη χρήσιμων εφαρμογών. Αρχικά, οι (Marin et al., 2000) εντόπισαν την βλεννοπερλίνη, μια πρωτεΐνη η οποία ίσως εμπλέκεται στην επιλογή του αραγωνίτη (Garcia- March, 2006). Αργότερα, οι (Marin & Luquet, 2005) έκαναν μια έρευνα σε μοριακό επίπεδο, μελετώντας τα μακρομοριακά συστατικά του κογχυλιού της πίνας και περιέγραψαν τρεις πρωτεΐνες: την «mucoperlin», είναι ειδική πρωτεΐνη του εσωτερικού αραγωνιτώδους στρώματος, την κασπαρτίνη (caspartin) 17-kDa, η οποία είναι πλούσια σε ασαραγίνη και η καλπρύσμηνη (calprismmin 38-kDa). Οι δύο τελευταίες, λήφθηκαν άμεσα από το εξωτερικό πρισματικό στρώμα ασβεστίτη.

Η δομή των ορίων μεταξύ ασβεστίτη / αραγωνίτη, καθώς και μεταξύ αραγωνίτη / μυόστρακου, είναι μια πτυχή της μικροδομής του είδους η οποία χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της ηλικίας των ατόμων (Richardson et al., 1999a, 2004).

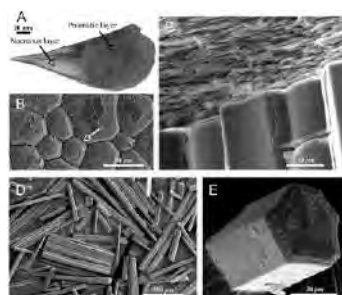
Η δυνατότητα της πίνας να ανασύρει τον λοβό της επιτρέπει, όπως προαναφέρθηκε, να ανακατασκευάσει ακόμα και ολόκληρο το οπίσθιο τμήμα του κελύφους, το οποίο αποτελείται αποκλειστικά από πρίσματα ασβεστίτη εάν αυτό υποστεί βλάβη, το οποίο είναι αρκετά συχνό

φαινόμενο. Η διαδικασία γίνεται με την εναπόθεση νέων στρωμάτων κελύφους που αναπτύσσονται σε οπίσθια κατεύθυνση (Yonge, 1953b). Μετά από έρευνες βρέθηκε πως η ανακατασκευή του κελύφους λαμβάνει χώρα σε δύο στάδια: στην ανάπτυξη των κελυφών μέχρι να κλείσουν και έπειτα την πάχυνση τους με σημαντική όμως επιβράδυνση της ανάπτυξης του οργανισμού, αν το άτομο δεν είναι ενήλικο (De Galuejack B., 1993).

Ο ρυθμός ανακατασκευής του κελύφους έχει υπολογιστεί περίπου σε 2,5cm/11d. Η γραμμή θραύσης ξεχωρίζει στην επιφάνεια κάθε κελύφους, αφού παραμένει ακανόνιστη (Yonge, 1953b). Συχνά έχουν παρατηρηθεί νεαρά άτομα με μεγάλες καταστροφές στο κέλυφος τους, τα οποία το έχουν ανακατασκευάσει απορρίπτοντας μεγάλο μέρος του κατεστραμμένου κελύφους.

Σπάνια περίπτωση, αλλά ωστόσο συμβαίνει, είναι η θραύση της πρόσθιας πλευράς του κελύφους, κυρίως λόγω της τριβής με το υπόστρωμα. Σε αυτήν την περίπτωση, ο μανδύας μετακινείται προς τα πίσω με την βοήθεια των προσαγωγών μυών και παράγει μια σειρά ελασμάτων στην πρόσθια κορυφή του κελύφους για την προστασία του πρόσθιου προσαγωγού μυός. Τελικά, εφόσον η στερέωση μπορεί να διατηρηθεί και τα κελύφη μπορούν να ανοίξουν, η πίνα μπορεί να επιβιώσει (Yonge, 1953b). Μάλιστα, η πίνα μπορεί να επιβιώσει ακόμα και μετά την απώλεια του πρόσθιου προσαγωγού, εφόσον ο μανδύας δεν έχει υποστεί σοβαρή βλάβη, τα κελύφη μπορούν να κλείσουν και τα φυσιολογικά ρεύματα αναπνοής και σίτισης μπορούν να διατηρηθούν (Mediterranean Richardson et al., 1997).

Τέλος, λόγω της εισαγωγής ξένων σωματιδίων, όπως κόκκοι άμμου, μπορεί να σχηματιστούν μαργαριτάρια από την κάλυψή τους με ανθρακικό ασβέστιο μέσα στην πίνα, τα οποία όμως δεν έχουν ιδιαίτερη εμπορική αξία.



Εικόνα 14 Δομή του κελύφους: (Α) μακροσκοπική άποψη της εσωτερικής επιφάνειας ενός δεξιού κελύφους από άτομο 2 ετών, (Β) μη καθαρισμένη επιφάνεια του πρισματικού στρώματος, εσωτερική άποψη. Τα πυκνά στοιβαγμένα πρίσματα διατηρούνται μεταξύ τους από μια λεπτή μεσοπρισματική μήτρα (βέλος), (C) μεταβατική ζώνη μεταξύ των πρισμάτων (κάτω) και της στιβάδας φιλντισι (πάνω), εγκάρσια τομή, (D) απομονωμένα πρίσματα από ενήλικο δείγμα και (E) μεμονωμένο πρίσμα, απομονωμένο με υποχλωριώδες νάτριο. Σημειώστε τη λεπτή διαστρωμάτωση κάθετα στον άξονα c του πρίσματος.

1.6 Ενδοειδικές διαφορές στο σχήμα του κελύφους.

Το κέλυφος της πίνας χαρακτηρίζεται από πολύ σημαντικές μορφολογικές διαφορές, τόσο μεταξύ των ενήλικων ατόμων, όσο και μεταξύ των νεαρών και ενηλίκων ατόμων. Στις περιγραφές του Linnaeus, το πλάτος και το χρώμα του κελύφους εξαρτάται από την ηλικία και τον βióτοπο του ατόμου. Τα νεότερα άτομα, με μήκος μεταξύ 20 και 30 cm, ονομάζονταν *P. nobilis*, ενώ τα μεγαλύτερα, με μήκος περίπου 60 cm, το οποίο είχε παχύτερο και πιο σκούρο κέλυφος, *P. squamosa*. Τα ενήλικα άτομα δεν φέρουν σπονδυλική στήλη, χαρακτηριστικό των νεαρών ατόμων (οι σχηματισμοί του εξωτερικού κελύφους U). Η πιο σημαντική ίσως διαφορά των δύο μορφολογιών είναι η κοιλιακή καμπυλότητα, λόγω της οποίας είναι πιο δύσκολο να διακριθούν και να καταγραφούν οι διαφορές στον χρωματισμό και στο μέγιστο πλάτος. Σημαντική παρατήρηση είναι πως παρόμοιες μορφολογικές διαφορές παρατηρούνται, ακόμη και μεταξύ ατόμων του ίδιου πληθυσμού. Με βάση όλα τα παραπάνω, καθίσταται απαραίτητη η μορφολογική επεξεργασία σε επίπεδο πληθυσμού του είδους, αφού ο βióτοπος (πχ μια παράκτια λιμνοθάλασσα σε σχέση με την ανοιχτή θάλασσα) επηρεάζει σημαντικά την μορφολογία (Yonge, 1953b).

1.7 Αναπαραγωγή της *Pinna nobilis*

Η πίνια είναι ένα διαδοχικά ερμαφρόδιτο είδος (De & Creolean, 1995), σε αντίθεση με τα άλλα είδη της οικογένειας όπως το *Atrina maura*, τα οποία είναι γονοχωριστικά (Butler A., 1993). Αυτό σημαίνει πως οι γονάδες, τόσο οι αρσενικές όσο και οι θηλυκές, ωριμάζουν διαδοχικά και ασύγχρονα στο ίδιο άτομο, με τέτοια συχνότητα ώστε να αποφεύγεται η αυτογονιμοποίηση (De Gaulejac, 1995). Κατά την αναπαραγωγική περίοδο τα ώριμα γεννητικά άτομα απελευθερώνουν τους γαμέτες τους εναλλάξ στο περιβάλλον, πρόκειται δηλαδή για εξωτερική γονιμοποίηση και η επιτυχία της εξαρτάται από την εγγύτητα άλλων ατόμων που ωτοκοούν συγχρόνως (Deudero et al., 2017a). Η αλλαγή του φύλλου εξαρτάται από την κατάσταση στην οποία βρίσκεται το άτομο, καθώς και τις περιβαλλοντικές συνθήκες. Οι γονάδες, οι οποίες είναι ακανθώδεις αδένες,

βρίσκονται ανάμεσα στα πεπτικά όργανα, με το χρώμα τους να ποικίλλει από ανοιχτό πορτοκαλί έως σκούρο κεραμιδί (Εικ. 13), το οποίο ωστόσο δεν είναι ενδεικτικό της σεξουαλικότητας ή της σεξουαλικής ωρίμανσης τους (Acarli, 2021).



Εικόνα15 Αναπαραγωγικά όργανα πίνας (Acarli, 2021).

Η αναπαραγωγική περίοδος εκτείνεται από τα τέλη του καλοκαιριού ως τις αρχές του φθινοπώρου σαν γενικός κανόνας ωστόσο, έχουν καταγραφεί διαφορετικές περιόδους ωοτοκίας στα διαφορετικά σημεία της Μεσογείου όπου απαντάται. Έτσι στην Γαλλία είναι την περίοδο Ιούνιος-Αύγουστος (26°C) (De Gaulejac, 1995), στην Ισπανία Μάιος-Αύγουστος (20-26°C) (Deudero et al., 2017b), ενώ στην Τουρκία Μάιος-Σεπτέμβριος (24-26°C) (Acarli, 2021). Τέλος, στην Μαγιόρκα η κορύφωση της αναπαραγωγής παρατηρείται από την τελευταία βδομάδα του Αυγούστου ως την πρώτη του Σεπτεμβρίου (Cabanellas-Reboredo et al., 2009). Οι διαφορές αυτές εξηγούνται ίσως λόγω του βάθους, την θέση του θερμοκλινούς, το γεωγραφικό πλάτος και άλλων παραγόντων. Όπως και να έχει, εύκολα αντιλαμβάνεται κανείς πως πρόκειται για ένα είδος το οποίο χρειάζεται υψηλές θερμοκρασίες για να αναπαραχθεί, καθιστώντας το έτσι ως ένα καλοκαιρινό αναπαραγωγικό είδος σύμφωνα με την ταξινόμηση του (Deudero et al., 2017a).

Ο αναπαραγωγικός κύκλος της πίνας επηρεάζεται, όπως είναι φυσικό, από διάφορους ενδογενείς και εξωγενείς παράγοντες. Τα ενεργειακά αποθέματα του κάθε ατόμου και η γενετική ωρίμανση, είναι χαρακτηριστικά παραδείγματα ενδογενών παραγόντων που μπορεί να επηρεάσουν την ωοτοκία (Lee et al., 2015; Wang et al., 2017). Η περιεκτικότητα των γονάδων σε 1n-9 μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως βαθμός ωρίμανσης των γονάδων της πίνας (Qiu et al., 2014). Είδη

μικροφυκών όπως το *Pavlova sp.* και το *Chroococcus sp.* έχουν βρεθεί να είναι αποτελεσματικές πηγές θρεπτικών συστατικών για την σεξουαλική ωρίμανση των ενήλικων ατόμων (Qiu et al., 2014).

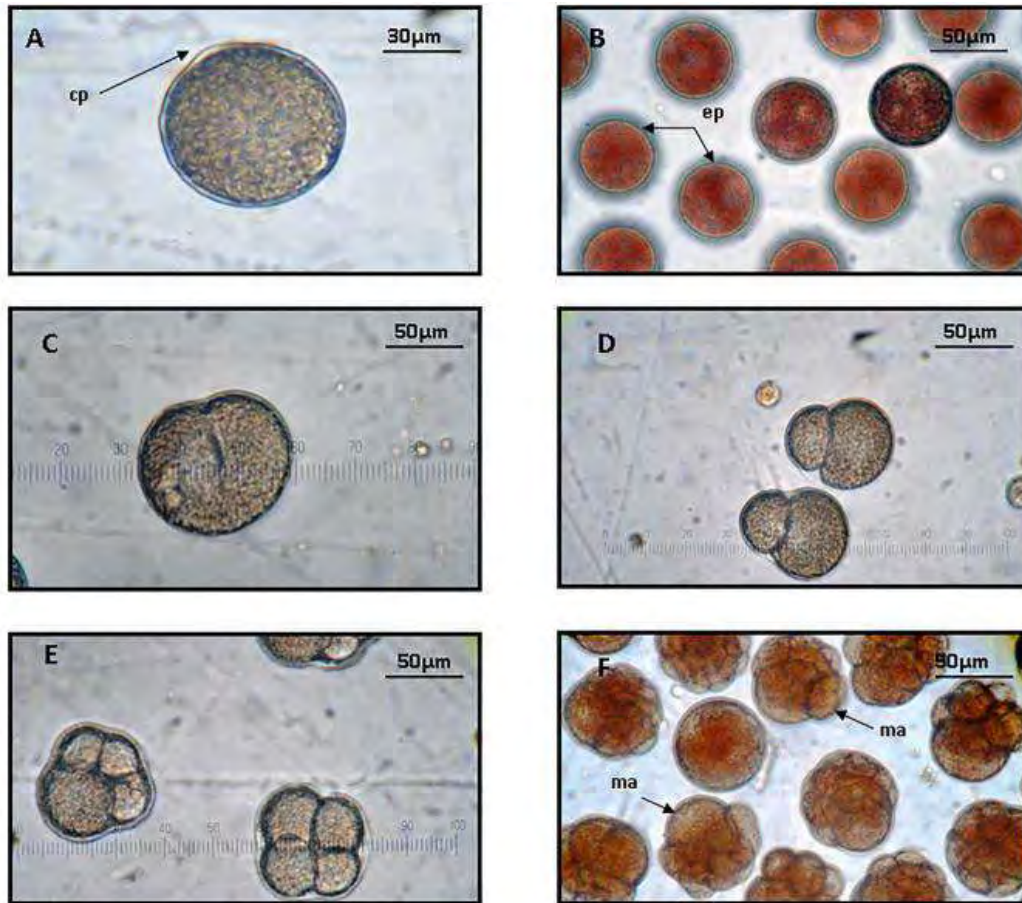
Ως σημαντικοί εξωγενείς παράγοντες κατά την διάρκεια της αναπαραγωγικής περιόδου, θεωρούνται οι θερμοκρασιακές διακυμάνσεις, η φωτοπερίοδος, η ποιότητα αλλά και η ποσότητα της τροφής (Baik, et al., 2001- Angel-Dapa et al., 2015- Qui et al., 2014- GongoraGomez et al., 2016a) (Palacios et al., 2005). Έχει αποδειχθεί τέλος πως η κατάσταση των γεννητόρων μπορεί να επηρεάσει την επιβίωση και την ανάπτυξη των λαρβών (Acarli, 2021).

Η σεξουαλική ωρίμανση έρχεται μετά τα δύο πρώτα χρόνια της ζωής της και ο αναπαραγωγικός κύκλος χωρίζεται σε τέσσερα στάδια:

- 1) σεξουαλική ανάπαυση, που χαρακτηρίζεται από λίγα πρώιμα, διαφανή, μικρά κύτταρα
- 2) σεξουαλική δραστηριότητα, που χαρακτηρίζεται από την έναρξη του αναπτυξιακού σταδίου και για τα δύο φύλα
- 3) απελευθέρωση των γεννητικών προϊόντων, η οποία χαρακτηρίζεται από εναλλασσόμενη ωοτοκία και γαμετογένεση, και τέλος
- 4) μερική ωρίμανση πριν από την επιστροφή στη σεξουαλική ηρεμία.

Οι κύκλοι διαδέχονται ο ένας τον άλλον κατά τη διάρκεια των θερμών μηνών του καλοκαιριού με σεξουαλική εναλλαγή των δύο φύλων για την περαιτέρω αποφυγή αυτογονιμοποίησης, όπως προαναφέρθηκε.

Η αποθηκευμένη και η καταναλισκόμενη ενέργεια ενός ενήλικου ατόμου παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην αναπαραγωγή. Τα επίπεδα της ενέργειας παρουσιάζουν διαφορές όχι μόνο ανάμεσα στα είδη, αλλά και ανάμεσα σε διαφορετικούς πληθυσμούς του ίδιου είδους (Pogoda et al., 2013). Όταν η τροφή είναι άμεσα διαθέσιμη, η ενέργεια συσσωρεύεται σε διάφορους ιστούς όπως στον μυ του προσωαγωγού, στο πεπτικό σύστημα και στον εσωτερικό μανδύα για να χρησιμοποιηθεί στην διαδικασία της γαμετογένεσης (Arrieche et al., 2010). Στην πύνα, ο μυς του προσωαγωγού αποθηκεύει τα μεγαλύτερα ποσοστά ενέργειας σε σχέση με άλλα όργανα (Silietic T., 2003; Yurimoto, 2015). Εξαιτίας του ενεργειακού κόστους για την παραγωγή αυγών και γονάδων καθώς και κατά την αναπαραγωγή, το είδος μπορεί να είναι ιδιαίτερα ευάλωτο τις περιόδους αυτές (Le Pennec M. et al., 1991).

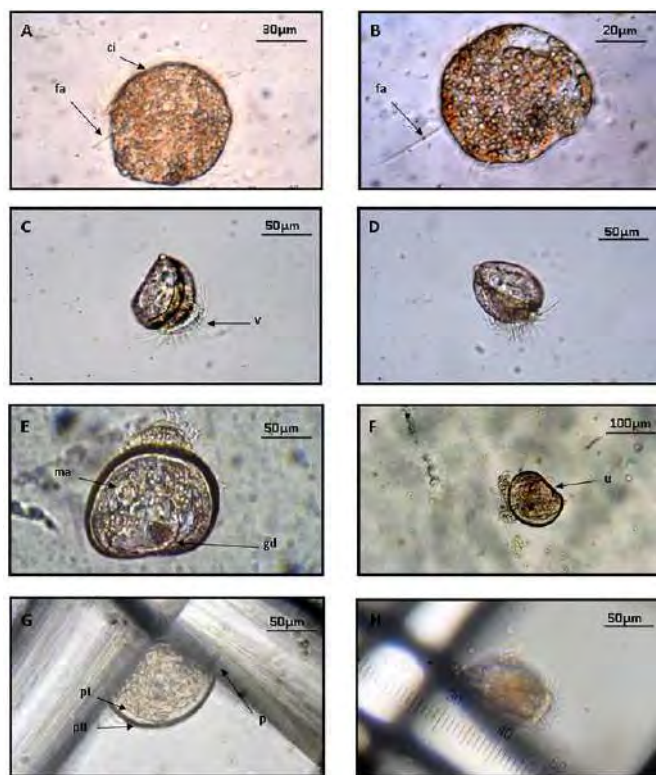


Εικόνα 76 Πρώιμα αναπτυξιακά στάδια του *Pinna nobilis*: (A) πρώτο πολικό σώμα (00:15)- (B) γονιμοποιημένα ωάρια με διπλή μεμβράνη (00:30)- (C) πρώτος εγκλεισμός (00:40)- (D) πρώτη πλήρης διαίρεση (01:00)- (E) 3η και 4η διαίρεση (03:00)- (F) τέλος της φάσης της κυτταρικής διαίρεσης (04:30)- cp. πολικό σώμα- ep. περιβυθτική μεμβράνη- ma. μακρομέρος- mi. μικρομέρος. (Trigos et al., 2017)

1.8 Κύκλος ζωής της *Pinna nobilis*

Ο κύκλος ζωής της πίνας δεν έχει μελετηθεί αρκετά, καθώς για τα ανήλικα άτομα δεν υπάρχουν πολλές πληροφορίες (Katsanevakis, 2007b). Το προνυμφικό στάδιο διαρκεί 5-10 ημέρες (Corra et al., 2010, Katsanevakis & Thessalou-Legaki, 2009). Οι πελαγικές προνύμφες τείνουν να κολυμπούν μέχρι την επιφάνεια του νερού, όπου η συγκέντρωση τροφής είναι υψηλή (Bayne' et al., 1987), ενώ παρουσιάζουν αρνητική φωτοτροπική συμπεριφορά κατά την διάρκεια της μεταμόρφωσης και της προσκόλλησης, αποφεύγουν δηλαδή το φως και προτιμούν προστατευμένα υποστρώματα σε σκιερές περιοχές (Baker & Mann, 1997).

Μετέπειτα, οι προνύμφες μεταμορφώνονται από το στάδιο των τροχοφόρων στο στάδιο "pediveliger" (το στάδιο του ποδίσκου), κινούνται και εγκαθίστανται στον πυθμένα (Garcia March, 2006). Η εγκατάσταση των νεαρών ατόμων πραγματοποιείται κυρίως κατά το τέλος του καλοκαιριού και τις αρχές του φθινοπώρου, αναλόγως την περιοχή που ενδημούν, όπως προαναφέρθηκε (Katsanevakis, 2007a). Δεν υπάρχουν μέχρι στιγμής αρκετά στοιχεία για τις διάφορες φάσεις της οντογένεσης όσων αφορά στα ποσοστά επιβίωσης σε κάθε στάδιο και για τους ρυθμούς επιβίωσης των πλαγκτονικών σταδίων. Ωστόσο, υπάρχουν πληροφορίες για την μείωση του ποσοστού θνησιμότητας των μεταλαρβικών σταδίων με την αύξηση της ηλικίας, γεγονός που οφείλεται κυρίως στην ανθεκτικότητα των ενήλικων ατόμων έναντι των θηρευτών τους (García-March, Pérez-Rojas, et al., 2007a). Εύκολα γίνεται αντιληπτό πως, όταν πληθυσμός αραιώνει, τα μικρά ποσοστά γονιμοποίησης μπορεί να αποτελέσουν κρίσιμο σημείο για την διάσωσή τους.



Εικόνα 17 Πρώιμα προνυμφικά στάδια : (Α) πρώιμο τροχώμορφο (22:00)- (Β) όψιμο τροχώμορφο (30:00)- (C και D) ισομετρική άποψη του όψιμου βελγίου (72:00)- (Ε και F) πρώιμο ομφαλοειδές (144:00), (G) πεντιβελίγγιο (168:00) (H) πλάγια όψη προσκολλημένης προνύμφης.

Ωστόσο, εδώ αξίζει να αναφερθεί η πρώτη μελέτη που έγινε για την αναπαραγωγή πίνας σε ελεγχόμενες συνθήκες (Trigos et al., 2018), η οποία περιλάμβανε τη διαδικασία από τη γονιμοποίηση του αυγού έως το στάδιο του ποδίσκου (pediveliger) και την δοκιμασία σε διαφορετικές δεξαμενές εκτροφής, πυκνότητα προνυμφών, συνθήκες φωτισμού και την τροφή με στόχο τον προσδιορισμό των βέλτιστων συνθηκών για την ανάπτυξη των προνυμφών. Η προνύμφη έφτασε στο στάδιο του ποδίσκου σε 7 ημέρες με μήκος 110 μm . Δυστυχώς, απέτυχε να μεταμορφωθεί στο τέλος των 22 ημερών. Το πρόβλημα φαίνεται να ήταν το παθογόνο *Vibrio* *sp.* το οποίο προκάλεσε θνησιμότητες πάνω από 80 % (Trigos et al., 2018).

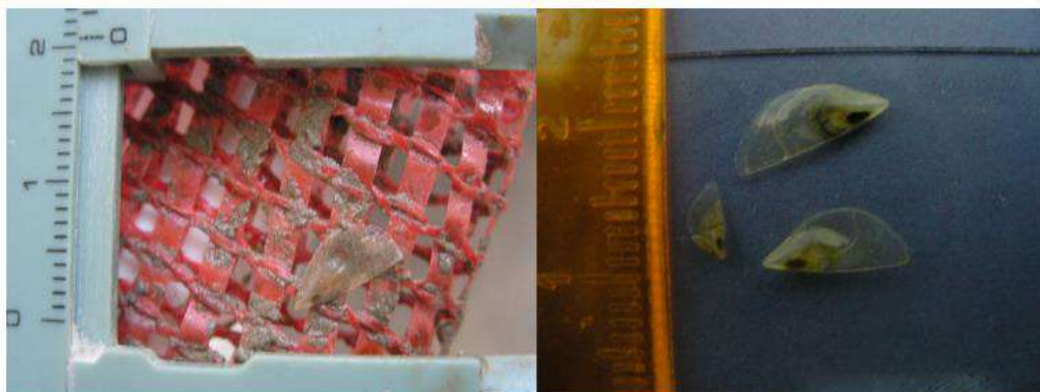
1.9 Αύξηση, ανάπτυξη και ηλικία της *Pinna nobilis*

Πτυχές όπως η ηλικία και η αύξηση της πίνας είναι φτωχά τεκμηριωμένες στη βιβλιογραφία, και μόνο λιγοστές έρευνες υπάρχουν για αυτά τα στοιχεία (García-March, García-Carrascosa, et al., 2007; Rabaoui et al., 2007b; Richardson et al., 1999c, 2004; Siletic T. & Pehada M., 2003).

Ωστόσο, η μελέτη της ηλικίας και των ποσοστών αύξησης των πληθυσμών είναι θεμελιώδους σημασίας για να αξιολογηθούν τα αποθέματα και η ανθεκτικότητα του είδους (Richardson et al., 2004). Οι διάφοροι συγγραφείς πρότειναν μεθόδους για την εκτίμηση της ηλικίας και του ρυθμού αύξησης από άδεια κογχύλια, χρησιμοποιώντας τα αποτυπώματα του πρόσθιου προσαγωγού μυός (posterior adductor muscle scars-PAMS), υποθέτοντας ένα παρόμοιο χρονικό κενό ανάμεσα σε κάθε ένα από αυτά (Garcia-March et al., 2011). Πλέον, έχει αποδειχθεί ότι οι εσωτερικές καταγραφές στο όστρακο αποτίθενται σε ετήσια βάση και είναι εμφανείς σε αντίθεση με την εξωτερική επιφάνεια των κελυφών στην οποία δεν υπάρχει κανένα εμφανές σημάδι αύξησης που να επιτρέπει τον καθορισμό της ηλικίας των ατόμων και το προσδιορισμό του ρυθμού αύξησης των κογχυλίων (Garcia-March et al., 2011).

Η πίνια έχει έναν αρκετά γρήγορο ρυθμό ανάπτυξης κατά την διάρκεια των 2-3 πρώτων ετών όπου ακολουθείται από μια αργή ανάπτυξη στη συνέχεια. Έχει παρατηρηθεί επίσης πως οι ρυθμοί ανάπτυξης διαφέρουν σε διάφορες περιοχές της Μεσογείου. Αυτό το φαινόμενο, συνδέεται άρρηκτα με τη διαθεσιμότητα της τροφής, τη θερμοκρασία, την ένταση των

παλιρροιών, τον τύπο του υποστρώματος και την υδροδυναμική των περιοχών. Αρκετές μελέτες έχουν επίσης αποδείξει πως υπάρχουν διαφορετικοί ρυθμοί αύξησης στα διάφορα βάθη ακόμα και μέσα στον ίδιο πληθυσμό, (García-March, Pérez-Rojas, et al., 2007a; Katsanevakis, 2006, 2007a; Rabaoui et al., 2009). Οι κύριες αιτίες για την μείωση του ρυθμού αύξησης της πίνας είναι οι έντονες διαταραχές του υποστρώματος και υψηλές υδροδυναμικές πιέσεις (García-March, García-Carrascosa, et al., 2007). Τέλος, ο ρυθμός αύξησης επηρεάζεται και από φυσικοχημικές παραμέτρους, όπως είναι η θερμοκρασία και η αλατότητα, με τις χαμηλές θερμοκρασίες και αλατότητες να επιφέρουν χαμηλότερους ρυθμούς ανάπτυξης πιέσεις (García-March, García-Carrascosa, et al., 2007).



Εικόνα 18 Συλλογή γόνου πίνας (Acarli, 2021)

1.10 Δραστηριότητα ανοιγοκλεισίματος των κελυφών στην *Pinna nobilis* (Shell gaping behaviour)

Είναι ευρέως αποδεκτό ότι η δραστηριότητα ανοίγματος και κλεισίματος (gaping) των κελυφών των κογχυλίων σχετίζεται με σημαντικές φυσιολογικές διαδικασίες, όπως η διατροφή, η αναπνοή και ο μεταβολισμός, και προσαρμόζεται κάθε φορά αφού αντιδρά στα εξωτερικά ερεθίσματα ακολουθώντας κυκλικούς ρυθμούς (García-March et al., 2008a). Οι εναλλαγές του ήλιου με το φεγγάρι (φως-σκοτάδι) είναι ο σημαντικότερος παράγοντας για τους καθημερινούς ρυθμούς. Ωστόσο, εξωγενείς περιβαλλοντικοί παράγοντες μπορούν επίσης να επηρεάσουν την δραστηριότητα των κελυφών. Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι η έκθεση των δίθυρων σε χαμηλές συγκεντρώσεις τοξικών στο νερό: Η δραστηριότητα ανοίγματος- κλεισίματος των κελυφών (gaping) διαφοροποιείται κατά την παρουσία τους. Αυτό το χαρακτηριστικό γνώρισμα έχει χρησιμοποιηθεί για να αναπτυχθούν ακριβή συστήματα προειδοποίησης για μολυσμένες εκχύσεις στις κοίτες ποταμών (García-March et al., 2008a).

Σε φυσικούς βιότοπους και χωρίς την παρουσία τοξικών προϊόντων, μπορεί να υπάρξει μια υψηλή ποικιλότητα στον αριθμό κινήσεων των βαλβίδων ανάλογα με την περίοδο έτους και την θερμοκρασία (García-March et al., 2008b). Η πίνα συγκαταλέγεται στα δίθυρα με χαμηλή δραστηριότητα θυρίδων με δύο κύριες συμπεριφορές και δύο δευτερεύουσες. Το νυχτερινό κλείσιμο των θυρίδων σχετιζόμενο με το ηλιοβασίλεμα και νυχτερινό άνοιγμα σχετιζόμενο με την ορατότητα του φεγγαριού και φωτεινότητα δίσκου μεγαλύτερη από 50%, ως κύριες και άλλες δυο λιγότερο συχνές συμπεριφορές που παρατηρήθηκαν ήταν τα κλειστά κελύφη την ημέρα και το άνοιγμα τους το βράδυ, χωρίς την παρουσία ορατού φεγγαριού.

Αυξημένη δραστηριότητα στα κελύφη παρατηρείται επίσης κατά την διάρκεια θαλασσοταραχών, όπου κλείνουν οι θυρίδες ως αντίδραση στα αυξανόμενα επίπεδα αιωρούμενων σωματιδίων. Έχει αποδειχθεί πως η υπερβολική συγκέντρωση αιωρούμενου ιζήματος στο νερό μπορεί να καταστρέψει το κροσσωτό επιθήλιο των δίθυρων (García-March, 2006). Η πίνα ως ένα υποπαλλοιρροιακό (subtidal) δίθυρο, δεν διατηρεί κλειστές τις θυρίδες του για μεγάλο χρονικό διάστημα (García-March, 2006).

Η πίνα αν και ενδημεί σε oligotροφικά περιβάλλοντα, φθάνει σε μεγάλα μεγέθη σε σύντομο χρονικό διάστημα (García-March, Pérez-Rojas, et al., 2007a; Richardson et al., 1997, 2004). Αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα πως υπάρχει υψηλή αποδοτικότητα των μεταβολικών οδών, παρόλη την καθημερινή απώλεια της ενέργειας που θα ξοδευόταν στην περίπτωση αλλαγής σε αναερόβιες συνθήκες αμέσως μετά από το κλείσιμο των θυρίδων. Η πιθανότητα η πίνα να κάνει οικονομία στην ενέργεια όταν έχει κλειστές τις θυρίδες, εξηγεί το παρατεταμένο κλείσιμο τους. (García- March, 2006). Αυτή ακριβώς η δυνατότητα ελέγχου της μεταβολικής δαπάνης κάτω από συνθήκες χαμηλής διάθεσης τροφών κατά τη διάρκεια μεγάλων χρονικών περιόδων κλεισίματος των βαλβίδων, θα έδινε μια εξήγηση για την γρήγορη αύξηση των πινών, καθώς επίσης και για την υψηλή απόδοση τους σε oligotροφικά περιβάλλοντα (García- March, 2006).

1.11 Επίδραση των υδροδυναμικών πιέσεων στους πληθυσμούς των *Pinna nobilis*

Η πίνα επηρεάζεται από τις υδροδυναμικές πιέσεις του υδάτινου περιβάλλοντος διαμορφώνοντας κατάλληλα τον προσανατολισμό της και την κατανομή των μεγεθών στα διάφορα βάθη σε σχέση με τα θαλάσσια λιβάδια, όπου και ενδημεί (García- March, 2006; Hendriks et al., 2011). Στην πίνα οι δυο πλάγιες πεπλατυσμένες επιφάνειες του οστράκου εκτίθενται σε υδροδυναμικές πιέσεις (Drag force-Fd) και είναι ανάλογες με το μέγεθός της. Οι υδροδυναμικές πιέσεις που ασκούνται είναι τόσο μεγάλες σε κάποιες περιπτώσεις, που μπορούν ακόμα και να αποκολλήσουν τα δίθυρα από το υπόστρωμα κατά τη διάρκεια θαλασσοταραχών, με αποτέλεσμα την θανάτωσή τους (García-March, Pérez-Rojas, et al., 2007a). Η δύναμη αντίστασης της πίνας σχετίζεται με τη σύνδεση των νημάτων της βύσσου. Δεν είναι ωστόσο γνωστό εάν η θραύση και η αποκόλληση των κογχυλίων ως αιτίες θνησιμότητας σχετίζονται με τις πιο υψηλές ταχύτητες νερού, ούτε εάν η εξαγωγή του οργανισμού από το όστρακο ή η βλάβη του μέσα σε αυτό σχετίζεται με τη συνεχή πίεση των μικρότερης ταχύτητας ρευμάτων νερού που παράγονται κατά τη διάρκεια μιας θαλασσοταραχής (García-March, Pérez-Rojas, et al., 2007a). Τα στοιχεία για τα όρια των αντιστάσεων απέναντι στην απόσπαση των κογχυλίων έδειξαν για τα μεν ζωντανά άτομα ένα εύρος τιμών αντίστασης (9-44,8 Newton), ενώ για τα νεκρά άτομα (7,4-47 Newton) καθορίζοντας έτσι ένα ανώτατο όριο αντοχής απέναντι στην

αποκόλληση ενός κογχυλιού στην τιμή των 45 Newton περίπου. Αυτό σημαίνει ότι οι μικρές αυξήσεις στην ταχύτητα νερού είναι ιδιαίτερα επικίνδυνες για τις πίνες.

Το μικρό μέγεθος και ο κατάλληλος προσανατολισμός του οστράκου ώστε να αποφεύγεται η έκθεση μεγάλης επιφάνειας στα ρεύματα με μεγάλες ταχύτητες, βοηθούν στο να επιτευχθεί μια



τιμή δυνάμεων «Fd» κάτω από το κατώτατο όριο απόσπασης του οστράκου. Επιπλέον, το βάθος είναι αυτό που καθορίζει τα μεγέθη και τους προσανατολισμούς των κογχυλιών, αφού σε μικρά βάθη τα ρεύματα είναι ταχύτερα (García-March, Pérez-Rojas, et al., 2007a). Επίσης, πρέπει εδώ να επισημανθεί πως η πίνα απουσιάζει από περιοχές

όπου τα ιζήματα τους υφίστανται έντονες διαταραχές (García-March, Pérez-Rojas, et al., 2007a), διότι τα υψηλά επίπεδα ρευστού βενθικού υλικού μπορεί να παρεμποδίσουν την κανονική εισαγωγή σωματιδίων μέσα στα όστρακα και να βλάψουν την αναπνευστική και διατροφική τους ικανότητα (Coppa et al., 2010; García-March et al., 2008a; Katsanevakis, 2006).

1.12 Διατροφή της *Pinna nobilis*

Η πίνα είναι οργανισμός που τρέφεται μέσω της διήθησης με αιωρούμενα οργανικά και ανόργανα υλικά, μικρο και μέσο- ζωοπλαγκτόν, φυτοπλαγκτόν, βακτήρια και ιούς, θρύμματα, και κόκκους γύρης, με διαφορετική επικράτηση, ανάλογα με την περιοχή και την εποχή (Davenport et al., 2011; Prado et al., 2021; Trigos et al., 2015). Εξαιτίας ακριβώς της διηθηματοφάγου διατροφής της, έχει αποδειχθεί ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην βελτίωση της ποιότητας των υδάτων, διαδραματίζοντας κατ'επέκτασιν και ζωτικό ρόλο στην οικολογία της Μεσογείου (Natalotto et al., 2015). Η σύλληψη της τροφής γίνεται από τα βράγχια τα οποία έχουν την διπλή λειτουργία σίτισης και αναπνοής. Τα σωματίδια που συλλαμβάνονται από τον

μανδύα και τα βράγχια καλύπτονται με βλέννα και στην συνέχεια μεταφέρονται με την βοήθεια των βλεφαρίδων στα χείλη, μέσω των οποίων επιλέγονται και επεξεργάζονται. Ενώ τα απορριπτόμενα σωματίδια μετακινούνται στα πλάγια των χειλιών, όσα είναι κατάλληλα για κατάποση μεταφέρονται στο στόμα, και καταλήγουν στο στομάχι, όπου και πέπτονται. Τα άπεπτα μέρη περνούν από τους διαύλους απεκκρίσεων και αποβάλλονται από τον πρωκτό (De Galuejack B., 1993).

Η πίνα δεν διαθέτει μηχανισμό σιφωνίου, όπως κάποια άλλα δίθυρα, αλλά μια παλίνδρομη κοιλότητα, από την οποία εισπνέει και εκπνέει μέσω βραγχίων με ελασματοειδής διακλαδώσεις. Αυτή η κοιλότητα που σχηματίζεται από τον μανδύα και την οπίσθια προέκταση του κελύφους λειτουργεί ως μηχανισμός σιφωνίου (Butler A., 1993). Η πίνα διατηρεί τα κελύφη ανοιχτά, έτσι ώστε να φιλτράρει το νερό γύρω της. Οι ανεπαρκώς ανοιχτές ή τελείως κλειστές βαλβίδες υποδηλώνουν ότι το φιλτράρισμα έχει επιβραδυνθεί ή έχει

σταματήσει. Ο ρυθμός διήθησης και ο ρυθμός ανοίγματος των βαλβίδων καθορίζονται από την συγκέντρωση σωματιδίων, την θερμοκρασία, την αλατότητα, και το στρες (Butler A., 1993).

Γενικά η πίνα, προτιμά τα ολιγοτροφικά περιβάλλοντα και τα καθαρά νερά με μικρή αναμόχλευση ιζήματος. Οι Garcia-March et al. (2008) διαπίστωσαν ότι η τροφή της πίνας επηρεάζεται άμεσα από την ένταση και την κατεύθυνση του ρεύματος και όχι από παράγοντες όπως θερμοκρασία, διαλυμένο οξυγόνο, θολρότητα και χλωροφύλλη-α.



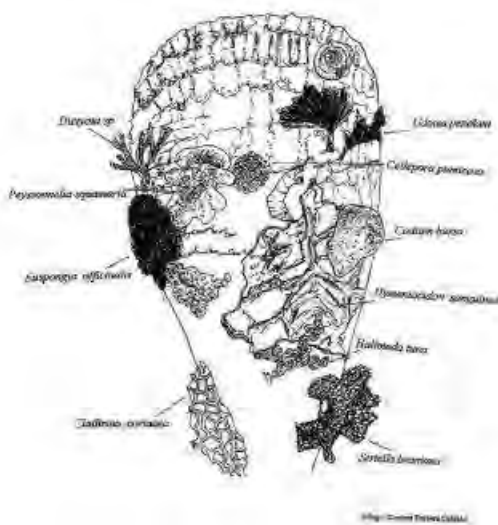
Εικόνα 19 *Posidonia pinnophylax* μέσα στο κέλυφος της πίνας



Εικόνα 20 *Pontonia pinnophylax*

1.13 Επιβιοτικά είδη χλωρίδας και πανίδας στην *Pinna nobilis*

Όπως προαναφέρθηκε, η πίνα διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στα οικοσυστήματα όπου ενδημεί, τα οποία είναι κυρίως μαλακά υποστρώματα, παρέχοντας ένα σκληρό υπόστρωμα (Rabaoui et al., 2009) σε διάφορους επιβιοτικούς οργανισμούς. Γενικά οι κύριοι επιβιοτικοί οργανισμοί είναι σε συγκέντρωση πάνω από 75% φύκη, μαλάκια, βρυόζωα και πολύχαιτοι. Όλοι αυτοί μαζί με την πίνα συγκροτούν από κοινού μια βιοκοινότητα, συμβάλλοντας έτσι στην αύξηση της βιοποικιλότητας των βενθικών κοινοτήτων (Addis et al., 2009; Rabaoui et al., 2009; Silietic T., 2003). Ο κύριος λόγος του εποικισμού του κελύφους της από επιβιοτικούς οργανισμούς είναι η τραχιά επιφάνειά τους σε μέρη όπου το σύνηθες υπόστρωμα είναι μαλακό (Rabaoui et al., 2009).



Εικόνα 21 Σκίτσο του Barbera (1996) των επιβιοτικών οργανισμών της πίνας

Όσον αφορά την πανίδα, τα είδη ποικίλουν ανάλογα την περιοχή όπου διαβιεί. Για παράδειγμα σε μία έρευνα στην Σικελία καταμετρήθηκαν 119 είδη (18 δίθυρα και 101 γαστερόποδα), με τα περισσότερα σε διάφορα στάδια ανάπτυξης. Τα γαστερόποδα *Rissoella inflata* και το *Bittium reticulatum* παρουσίασαν τη μεγαλύτερη συχνότητα (95%), αλλά και πυκνότητα. Τρίτο σε συχνότητα είδος ήταν το *Gibbula turbinoides*. Το πιο σημαντικό συμπέρασμα όμως ήταν πως στην συγκεκριμένη περιοχή, η ποικιλία των ειδών αυξάνονταν

γραμμικά σε σχέση με την αύξηση του μεγέθους των κογχυλιών. Οι διατροφικές συνήθειες των οργανισμών αυτών, επίσης παρουσίασαν ενδιαφέρον με τα παμφάγα να συναντώνται σε ποσοστό >60%. Αντίθετα η τροφική ομάδα των φυτοφάγων υπήρχε σε μικρότερο ποσοστό (~11%) (Giacobbe & Cosentino A., 2006).

Στην Τυνησία σε αντίστοιχη έρευνα, οι κύριοι επιβιοτικοί οργανισμοί ήταν μαλάκια με ποσοστό 39.73% και κυρίως τα είδη *Arca noae*, *Radiata pinctada*, *Modiolus barbatus*, *Ephippium anomia* και *Pisania striata*. Βρέθηκαν επίσης καρκινοειδή (15.07%), ασκίδια (7.53%), σφουγγάρια (6.85%), κνιδάρια (6.16%), εχινόδερμα (4.79%) και βρυόζωα (3.42%). Αντίθετα με την Σικελία,



Εικόνα 22 Επιβιοτικοί οργανισμοί πάνω σε
πίνα από την λίμνη Faro, Ιταλία (Donato et
al., 2021)

εδώ φάνηκε πως το μέγεθος της πίννας δεν έπαιξε κανένα ρόλο στη διαμόρφωση των επιβιοτικών βιοπληθυσμών (Rabaoui et al 2009). Το γεγονός αυτό μπορεί να εξηγηθεί ίσως από τον πρόωρο αποικισμό των ειδών αυτών πάνω σε νεαρά και γενικά μικρής ηλικίας άτομα πίννας (Rabaoui et al., 2009).

Η διαδικασία δόμησης των επιβιοτικών κοινοτήτων αναπτύσσεται κατά την διάρκεια μιας μάλλον μεγάλης χρονικής περιόδου, η οποία σίγουρα επηρεάζεται από την διατροφή και την λειτουργία της διήθησης της πίννας, ακόμα και από την παραγωγή περιττωμάτων και ψευδοπεριττωμάτων (Giacobbe, 2002).

Όσον αφορά την χλωρίδα που αποικίζει πάνω στην πίννα, επηρεάζεται και αυτή από το οικοσύστημα όπου ενδημεί.

Στην Σαρδηνία για παράδειγμα οι (Addis et al., 2009) σε μια έρευνα, κατέληξαν στα εξής επικρατέστερα είδη:

filamentous dark algae (DFA) της οικογένειας *Ceramiales*, filamentous green algae (GFA, τάξη *Cladophorales* και encrusting coralline red algae (ECR)- τα είδη *Lithophyllum sp.* και *Peyssonnelia spp.*

Τα γενικά συμπεράσματα των ερευνών, είναι πως οι επιβιοτικοί οργανισμοί εξαρτώνται από το υδρόβιο περιβάλλον στο οποίο απαντώνται οι πίννες (π.χ. θάλασσα ή λιμνοθάλασσα), από την γεωγραφική περιοχή και από τα ιδιαίτερα περιβαλλοντικά χαρακτηριστικά γνωρίσματα των βιοτόπων αυτών. Η επίδραση δηλαδή της γεωγραφικής περιοχής στον αποικισμό του κελύφους από επιβιοτικούς οργανισμούς, σχετίζεται με τις διαφορετικές συνθήκες που επικρατούν σε κάθε περιοχή, ως αποτέλεσμα των ιδιαίτερων κλιματικών συνθηκών (Rabaoui et al., 2009).

Εκτός από το εξωτερικό των κελυφών της, υπάρχουν αρκετοί οργανισμοί οι οποίοι διαβιούν ως συμβιωτές της πίννας, πληροφορία η οποία έρχεται από την εποχή του Αριστοτέλη. Οι κυριότεροι οργανισμοί είναι δεκάποδα του γένους *Pontonia* (*P. pinnophylax*) και *Pinnotheres* (*P. pinnotheres* και *P. pisum*) (Zavodnik D., 1991), όπως το καβούρι *Nepinnotheres pinnotheres*. Αυτά τα δεκάποδα προστατεύονται μέσα στο όστρακο της πίννας και σαν ανταπόδοση για το ασφαλές

περιβάλλον και την τροφή που τους προσφέρει, την προειδοποιούν για την ύπαρξη εξωτερικών κινδύνων «τσιμπώντας» την στον μανδύα για να κλείσει το όστρακο και να προφυλαχτεί. Έρευνα ανέδειξε ότι όσο μεγαλύτερο ήταν το όστρακο τόσο μεγαλύτερο ήταν και το αντίστοιχο δεκάποδο με το οποίο συμβίωνε (Rabaoui et al., 2009).



Εικόνα 23 Πίνα με ανοιχτά τα κελύφη της <https://bluetunisia.com/>

1.14 Η *Pinna nobilis* στην ζωή του ανθρώπου

Η πίνια ήταν γνωστή και είχε μελετηθεί από την εποχή του Αριστοτέλη. Μέρη της πίνιας χρησιμοποιούνταν τόσο στην κλωστοϋφαντουργία, όσο και στην φαρμακευτική/θεραπευτική, ενώ δεν γίνεται να παραληφθεί η διατροφική της αξία (Katsanevakis S. et al., 2008). Στην μυθολογία θεωρούνταν ότι τα νημάτια του βύσσου ήταν η πρώτη ύλη από την οποία κατασκευάστηκε το χρυσόμαλλο δέρας του Ιάσωνα.

Οι Αιγύπτιοι και οι Ρωμαίοι από τα νημάτια της βύσσου κατασκεύαζαν μεταξωτές κλωστές, το γνωστό «θαλάσσιο μετάξι», τις οποίες χρησιμοποιούσαν στην κλωστοϋφαντουργία για να υφάνουν εσάρπες και γάντια. Όπως αναφέρει μάλιστα ο Plinius (*Historia Naturalis*, Liber IX), το θαλάσσιο μετάξι χρησιμοποιούνταν μόνο από τις υψηλές τάξεις. Τα υφάσματα που κατασκευάζονταν



Εικόνα 24 Αντρικό γάντι άγνωστης προέλευσης, 18ος αι.; Λονδίνο, Μουσείο Φυσικής Ιστορίας, Τμήμα Ζωολογίας <https://archivesofthesea.com/>

από αυτό ήταν ανθεκτικά, ελαφριά και θερμά. Ως μειονέκτημα είχαν ότι προσβάλλονταν σχετικά εύκολα από τον σκώρο. Ενδιαφέρον παρουσιάζει επίσης το γεγονός ότι το θαλάσσιο μετάξι, είναι ανθεκτικό στην αλκοόλη και στον αιθέρα αλλά καταστρέφεται όταν βράζεται σε αλκαλικό διάλυμα.

Άλλοι πολιτισμοί, κυρίως της Ανατολής συνέλεγαν όστρακα, τα οποία τα χρησιμοποιούσαν για την παραγωγή κουμπιών, κοσμημάτων ή λαβών μαχαιριών από τον XIX αιώνα.



Εικόνα 25 Τέσσερις φάντρες από το εργαστήριο Italo Diana στο Sant'Antioco στη δεκαετία του 1930 <https://archivesofthesea.com/>

Αντίστοιχα και στην Νότια Ιταλία και στην Μάλτα, τα κελύφη της πίνιας χρησιμοποιούνταν για την κατασκευή κουμπιών, ενώ στην Μάλτα έχει χρησιμοποιηθεί και για την παρασκευή φαρμάκων. Στο όστρακο της πίνιας σπάνια σχηματίζονται μαργαριτάρια, τα οποία όμως δεν έχουν ιδιαίτερη οικονομική αξία, όπως προαναφέρθηκε.

Ως πηγή τροφής, η πίνα αποτελούσε υλικό για την παραδοσιακή μαγειρική σε ορισμένες περιοχές της Μεσογείου, ακόμα και ως σήμερα (Katsanevakis et al., 2011).



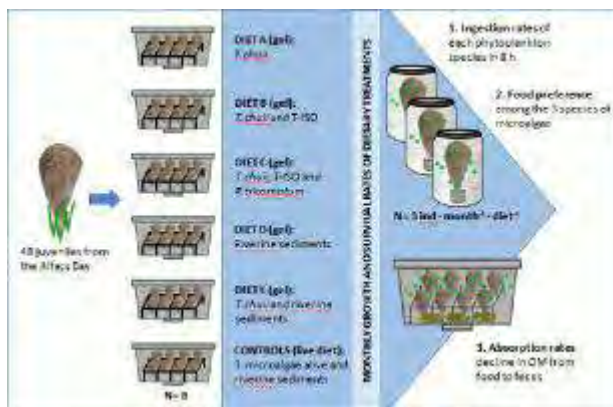
Εικόνα 26 Πιάτο με πίνα (Öndes et al., 2020)



Εικόνα 27 Πειρατής ζωγραφισμένος μέσα στο κέλυφος πίνας
<https://www.pinterest.com/>

1.15 Υδατοκαλλιέργεια *Pinna nobilis*

Είδη πίνας όπως τα *Pinna bicolor*, *Pinna rugosa*, *Atrina pectinata* και *Atrina maura* καταναλώνονται ευρέως στην Ασία και έχουν μεγάλη εμπορική αξία. Επιπλέον, η πένα βρίσκεται πλέον στα όρια της εξαφάνισης λόγω εκτός των άλλων και της παρουσίας ασθeneιών σε όλη την Μεσόγειο. Ως αποτέλεσμα, οι μελέτες που γίνονται για την παραγωγή υδατοκαλλιέργειας του είδους, όχι μόνο για καταναλωτικούς σκοπούς, αλλά και για την προστασία των φυσικών αποθεμάτων, το τελευταίο διάστημα πληθαίνουν. Οι μελέτες κυρίως στοχεύουν στην συλλογή προνυμφών από μέρη απαλλαγμένα από ασθένειες και την καλλιέργειά τους σε προστατευμένες συνθήκες (Acarlı, S., 2021).



Εικόνα 28 Σχεδιάγραμμα από καλλιέργεια πίνας (Prado, 2020)

1.16 Προηγούμενες μελέτες για την *Pinna nobilis*

Λόγω της εξαφάνισης των πληθυσμών της πίνας σήμερα, καθίστανται δύσκολες και δαπανηρές οι απαραίτητες επαναλαμβανόμενες έρευνες για την μελέτη της οικολογίας της (Richardson et al., 2004). Ωστόσο, έχουν εκπονηθεί αρκετές μελέτες στην προσπάθεια να δημιουργηθεί μία αξιοσημείωτη βιβλιογραφία (Basso et al., 2015d).

Την περίοδο 1978-1992, πριν ακόμα ληφθούν προστατευτικά μέτρα, εκπονήθηκαν 30 μελέτες για την πένα, (Addis et al., 2009). Μετά την οδηγία 92/43/EOK Annex IV, για την προστασία των βιοτόπων, σύμφωνα με στοιχεία που αντλήθηκαν από τα αρχεία της Aquatic Science and

Fisheries Abstracts database (ASFA), εκπονήθηκαν αρκετές μελέτες στο διάστημα 1992-2007. Οι έρευνες αυτές είχαν εστιαστεί αποκλειστικά σε διάφορες παράκτιες περιοχές της Μεσογείου με 30 από αυτές να έχουν πραγματοποιηθεί στη Γαλλία, 16 στην Ισπανία, 5 στην Ιταλία, 4 στην Ελλάδα, 3 στην Κροατία, 1 στην Τυνησία και 13 σε άλλα σημεία. Η επέκταση των ερευνών και σε άλλες περιοχές, όπως σε νησιά και σε χώρες της βορείου Αφρικής, ήταν πλέον απαραίτητες για την λήψη μιας συνολικής εικόνας για το ενδημικό αυτό είδος δίθυρου της Μεσογείου (Addis et al., 2009). Τα τελευταία χρόνια λόγω της μαζικής θνησιμότητας των πληθυσμών της πίνας σε όλη την λεκάνη της Μεσογείου, οι έρευνες έχουν εντατικοποιηθεί με στόχο όχι μόνο την καταγραφή των περιστατικών, αλλά και την λήψη αποφάσεων και μέτρων για την διάσωσή της.

1.17 Μελέτες γενετικής δομής της πίνας

Η ικανότητα ενός είδους να επιβιώσει από μελλοντικές περιβαλλοντικές αλλαγές μπορεί να εξαρτάται και από τη γενετική ποικιλομορφία των πληθυσμών του. Η γνώση της γενετικής παραλλακτικότητας και της κατανομής της πίνας στο χώρο και στο χρόνο είναι επομένως ζωτικής σημασίας για τη σωστή διάγνωση της κατάστασης, της διατήρησης και της βιωσιμότητας των πληθυσμών (Escudero et al., 2003).

Υπάρχουν ωστόσο λίγες μελέτες που αξιολογούν τη γενετική των πληθυσμών και τα πρότυπα συνδεσιμότητας της πίνας (Katsares et al., 2008; Rabaoui et al., 2010; Wesselmann et al., 2018). Ο κύριος στόχος αυτών των εργασιών ήταν να εξαχθούν συμπεράσματα σχετικά με τη γενετική παραλλακτικότητα των πληθυσμών της πίνας μετά την δημογραφική ανάκαμψη που καταγράφηκε ως συνέπεια του αυστηρού καθεστώτος προστασίας που ξεκίνησε τη δεκαετία του '90 λόγω της αποδυνάμωσης των πληθυσμών.

Οι μελέτες αυτές χρησιμοποιούσαν αρχικά δύο μιτοχονδριακούς δείκτες (υπομονάδα I της οξειδάσης του κυτοχρώματος c, γονίδια COI και 16S) και δύο πυρηνικούς δείκτες (18S και 28S). Ωστόσο, πρόσφατα, αναφέρθηκε η απομόνωση και η ανάπτυξη δέκα εξαιρετικά πολυμορφικών μικροδορυφόρων για την πίνια, οι οποίοι παρέχουν υψηλότερη ανάλυση για την πληθυσμιακές γενετικές μελέτες (González-Wangüemert et al., 2015).

Οι δείκτες μιτοχονδριακού DNA (mtDNA), COI και το ριβοσωμικό DNA 16S (16S) κατέδειξαν την έλλειψη γενετικής παραλλακτικότητας τεσσάρων πληθυσμών του Αιγαίου. Για το γονίδιο COI, βρέθηκε ένα υψηλό επίπεδο απλοτυπικής ποικιλομορφίας ενώ το γονίδιο 16S παρουσίασε χαμηλότερο επίπεδο. Παρόλο που βρέθηκαν υψηλές τιμές ενδοπληθυσμιακής απλοτυπικής ποικιλότητας, τα αποτελέσματα αποκάλυψαν την έλλειψη γενετικής διάρθρωσης μεταξύ των πληθυσμών του Αιγαίου (Katsares et al., 2008).

Οι (Rabaoui et al., 2010) περιέγραψαν πέντε πληθυσμούς από τη βόρεια, την ανατολική και τη νότια Τυνησία, χρησιμοποιώντας τον ίδιο μιτοχονδριακό δείκτη COI (Katsares et al., 2008). Τα αποτελέσματα έδειξαν μια φθίνουσα κλίση της γενετικής παραλλακτικότητας από Βόρεια προς Ανατολικά μεταξύ των πληθυσμών, η οποία εξηγήθηκε από το υδροδυναμικό καθεστώς των συγκεκριμένων περιοχών. Ακόμη και έτσι, οι φυλογενετικές αναλύσεις και οι πληθυσμιακές γενετικές στατιστικές αναλύσεις δεν υποστήριζαν καμία γενετική διαφοροποίηση που να σχετίζεται με μορφομετρικές παραλλαγές, πιθανότατα λόγω της φαινοτυπικής πλαστικότητας που σχετίζεται με συγκεκριμένους περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως ο τύπος του υποστρώματος και η υδροδυναμική, χωρίς βεβαίως να αποκλείεται η πιθανότητα μιας γενετικής συνιστώσας. Ως εκ τούτου, η αλληλουχία mtDNA COI δεν παρείχε αρκετά στοιχεία για τη διαφοροποίηση μεταξύ των πληθυσμών της Τυνησίας (Rabaoui et al., 2010).

Οι (Sanna et al., 2013) ερευνήσαν την γενετική παραλλακτικότητα της πίνας, αναλύοντας περιοχές από τη Δυτική αλλά και την Ανατολική Μεσόγειο, το Ιόνιο και την Αδριατική. Για την επίτευξη του στόχου τους, οι συγγραφείς ανέλυσαν δείγματα από 25 τοποθεσίες - που συλλέχθηκαν με τη χρήση για πρώτη φορά μιας μη θανατηφόρας μεθόδου δειγματοληψίας - χρησιμοποιώντας τους δύο μιτοχονδριακούς δείκτες (COI και 16S), προκειμένου να συγχωνεύσουν τις αλληλουχίες που έλαβαν με εκείνες που είχαν ήδη καταγραφεί από τους προηγούμενους ερευνητές (Katsares et al., 2008, Rabaoui et al., 2010). Τα αποτελέσματα υπέδειξαν μια πολύ καλή υγεία της πίνας, επισημαίνοντας υψηλά επίπεδα γενετικής παραλλακτικότητας με καλή γενετική συνδεσιμότητα μεταξύ των θαλάσσιων οικοπεριοχών. Πιστεύεται πως οι πληθυσμοί της πίνας ήταν δομημένοι σε δύο μεγάλες, ομοιογενείς ομάδες, εκ των οποίων η μία καλύπτει δύο μεσογειακές θαλάσσιες οικοπεριοχές (δυτική Μεσόγειος και Ιόνιο Πέλαγος), οι οποίες αποκλίνουν γενετικά από την άλλη. Η μία αποτελείται από τον υποπληθυσμό της Αδριατικής και η άλλη από εκείνους στο Αιγαίο Πέλαγος και τις ακτές της Τυνησίας (Sanna et al., 2013).

Νέοι εκκινητές για τον COI έδειξαν γενετική ασυνέχεια μεταξύ των πληθυσμών της Αδριατικής Θάλασσας και εκείνων από την υπόλοιπη Μεσόγειο. Αυτό μπορεί να οφείλεται στην ημίκλειστη φύση της Αδριατικής Θάλασσας, η οποία αντιπροσωπεύει μια σαφώς καθορισμένη φυλογεωγραφική περιοχή εντός της Μεσογείου (Patarnello et al., 2007). Παράλληλα, εκτός από την ιδιαίτερη γεωγραφική τους θέση, και τα δείγματα από τη λιμνοθάλασσα της Βενετίας θεωρήθηκαν "περιφερειακά απομονωμένα" (Frey, 1993). Η παρουσία μιας μόνο σημειακής μετάλλαξης που διαχωρίζει τα δείγματα του Αιγαίου και της Τυνησίας από εκείνα της Σαρδηνίας, της Κορσικής, τη Σικελία και τη λιμνοθάλασσα της Βενετίας, αποδεικνύει κοινή προέλευση της πίνας στη Μεσόγειο Θάλασσα (Sanna et al., 2013).

Οι (Wesselmann et al., 2018) επιβεβαιώνουν τα προηγούμενα αποτελέσματα αποδεικνύοντας υψηλά επίπεδα ποικιλομορφίας εντός της Μεσογείου με χαμηλή γενετική διαφοροποίηση μεταξύ των πληθυσμών. Η ανάλυση των μικροδορυφορικών γονότυπων μεταξύ των ισπανικών πληθυσμών έδειξε ένα μέτριο επίπεδο γενετικής διάρθρωσης. Αν και η μελέτη αυτή δημοσιεύθηκε το 2018 και ενώ είχε ήδη ξεκινήσει το φαινόμενο, κατά τη στιγμή της δειγματοληψίας οι συνέπειες της ασθένειας στους πληθυσμούς, δεν ήταν πιθανώς ακόμη εμφανείς.

Η χαμηλή γενετική παραλλακτικότητα μεταξύ των πληθυσμών υποδηλώνει ότι η πελαγική διασπορά των προνυμφών του είδους, η οποία επηρεάζεται από την υδρογεωγραφία, οδηγεί σε υψηλές γονιδιακές ροές και υψηλή συνδεσιμότητα μεταξύ των πληθυσμών (Katsares et al., 2008). Η χρήση κοινής γενετικής μεθοδολογίας για τον προσδιορισμό του πληθυσμού είναι απαραίτητη για τη διευκόλυνση των συγκρίσεων μεταξύ των περιοχών. Οι μικροδορυφορικοί δείκτες επέτρεψαν μεγαλύτερη ανάλυση της γενετικής παραλλαγής των πληθυσμών. Αυτοί οι δείκτες είναι χρήσιμοι επειδή είναι άφθονοι, ιδιαίτερα πολυμορφικοί και παρέχουν πληροφορίες σχετικά με την κατάσταση συγκεκριμένων τόπων, διευκολύνοντας μια σειρά πληθυσμιακών γενετικών συμπερασμάτων (Bruford & Wayne, 1993). Συνίσταται λοιπόν η χρήση των μικροδορυφόρων που απομονώθηκαν και αναπτύχθηκαν από τους (González-Wangüemert et al., 2015), αντί των μιτοχονδριακών (COI και 16S γονίδια) και πυρηνικών (18S και 28S) δεικτών για μελλοντικές γενετικές μελέτες που αφορούν στην συνδεσιμότητα και τα πρότυπα διασποράς της πίνας (Scarpa et al, 2021).

Ελπίζοντας ότι η τρέχουσα τάση προς εξαφάνιση μπορεί ακόμα να αντιστραφεί και ότι δεν είναι πολύ αργά, θα ήταν επίσης χρήσιμο να πραγματοποιηθεί μια εκτεταμένη μοριακή έρευνα μετά την επιδημία, για βαθύτερη κατανόηση των εξελικτικών δυνάμεων (π.χ. γενετική παρέκκλιση και φυσική επιλογή) που μπορεί να διέπουν τους μηχανισμούς διατήρησης και αποκατάστασης της γενετικής παραλλακτικότητας μετά την αιφνίδια μαζική θνησιμότητα των πληθυσμών της πίνας. Οι πρόσφατες μοριακές μελέτες (González-Wangüemert et al., 2019; Wesselmann et al., 2018), που πραγματοποιήθηκαν για την ανακατασκευή των προτύπων γενετικής συνδεσιμότητας με βάση την υδροδυναμική μοντελοποίηση, θα μπορούσαν να βοηθήσουν. Τέλος, η γενετική γνώση είναι ίσως απαραίτητη για τον σχεδιασμό κατάλληλων σχεδίων για την ανάκαμψη των πληθυσμών οι οποίοι έχουν υποστεί έντονη αποσύνθεση: π.χ., η αξιολόγηση της γενετικής δομής των πληθυσμών-δοτών (εάν έχουν απομείνει) θα βοηθούσε στην αποφυγή πιθανά φαινόμενα γενετικής ρύπανσης *sensu lato* (δηλ. εισαγωγή σε μια δεδομένη περιοχή άγριας γενετικής, παραλλαγών με διαφορετική γεωγραφική προέλευση) στην περιοχή υποδοχής, που μπορεί να εμποδίσει την ανάκαμψη του πληθυσμού (Scarpa et al, 2021).

The logo is circular with a white background and an orange border. Inside the circle, there are four orange segments. The text "Pinna SOS" is written in red, curved letters along the top and bottom of the circle. In the center, there is a blue and white striped background with a brown, shell-like shape in the middle. Below the shell, there are green, seaweed-like shapes.

2. Διακύβευση για την προστασία του διθύρου *Pinna nobilis*

Σε όλη τη διάρκεια της Ιστορίας, ο άνθρωπος έπρεπε να παλεύει με τη Φύση για να επιβιώσει. Σ' αυτόν τον αιώνα, έχει αρχίσει να συνειδητοποιεί ότι για να επιβιώσει, πρέπει να την προστατέψει.

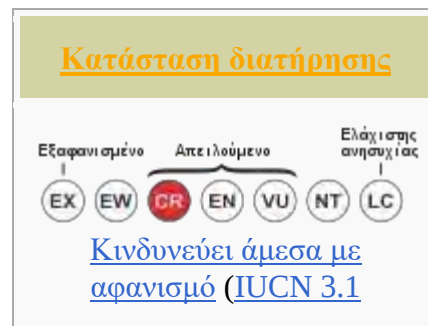
Ζαν-Υβ Κουστό Γάλλος ωκεανογράφος (1910-1997)

2.1 Διακύβευση και προστασία του είδους *Pinna nobilis* και των βιοτόπων του

Δυστυχώς, τις τελευταίες δεκαετίες παρατηρείται μία σταθερή μείωση των πληθυσμών της πίνας, όχι μόνο στην Ελλάδα, αλλά σε ολόκληρη την Μεσόγειο (Centoducati et al., 2007). Η μείωση των πληθυσμών που έχει καταγραφεί είναι δραματική: Για παράδειγμα σε περιοχές με πυκνότητα 15-16 άτομα /100m², καταγράφηκε μείωση σε 1 άτομο/100m² μέσα σε ένα χρόνο (Garcia March et al 2002). Σύμφωνα με

εκτιμήσεις του ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε, αυτή η μείωση οφείλεται στην ανθρωπογενή δραστηριότητα και πιο συγκεκριμένα, θα πρέπει να αποδοθεί:

- 1) Στη συρρίκνωση του χώρου που καταλαμβάνουν τα λιβάδια της *Posidonia oceanica* και των άλλων φανερόγαμων λόγω της ανθρωπίνης δραστηριότητας (κατασκευή λιμανιών, δημιουργία πλαζ κλπ.)
- 2) Στη ρύπανση των θαλάσσιων υδάτων από βιομηχανικά απόβλητα ή/και αστικά λύματα, που σκοτώνουν τις προνύμφες και μειώνουν την ετήσια παραγωγή του είδους επηρεάζοντας την ωοτοκία
- 3) Στις άγκυρες των σκαφών που σέρνονται στον πυθμένα αβαθών περιοχών και σπάνε τα κελύφη, καθιστώντας τες έτσι πιο ευάλωτες στους θηρευτές τους, πριν προλάβουν να αναδημιουργήσουν τα κελύφη τους
- 4) Στην αλιεία από ερασιτέχνες ή ακόμα και από επαγγελματίες είτε για κατανάλωση είτε για το εμπόριο των θυρίδων σε τουριστικές περιοχές ως διακοσμητικά (ακόμα και ως μέσο σερβιρίσματος!!) (Katsares et al., 2008). Είναι αξιοσημείωτο πως κελύφη πίνας πωλούνται ακόμα και σε πλατφόρμες, όπως το ebay, έναντι διόλου ευκαταφρόνητου ποσού.
- 5) Στην αλιεία με συρόμενα εργαλεία (δίχτυα τρατών, γρι-γρι, κλπ.) που παρασύρουν ή σπάζουν τα όστρακα του βυθού, καταστρέφοντας παράλληλα την χλωρίδα. (Katsares et al., 2008)



Η επιτακτική ανάγκη για την προστασία και τη διατήρηση της πίνας, επιβάλλουν τη διενέργεια περισσότερων ερευνών με στόχο την συλλογή στοιχείων για την γνώση της οικολογίας και βιολογίας αυτού του δίθυρου και των οικοτόπων στους οποίους διαβιεί, οι οποίες θα βοηθήσουν στη λήψη και την εφαρμογή κατάλληλων μέτρων για την εξασφάλιση της διαίωσισης του είδους, όπως εξάλλου και οι μελέτες πάνω στην γενετική δομής της, όπως προαναφέρθηκε.

2.2 Λιβάδια φανερόγαμων

Τα λιβάδια από φανερόγαμων, όπως των *Posidonia oceanica*, *Zostera marina*, *Zostera noltii* και *Cymodocea nodosa* (Rabaoui et al., 2007b) είναι διακυβευόμενα, ενδημικά είδη της Μεσογείου και είναι άρρηκτα συνδεδεμένα με τους πληθυσμούς των πινών, αφού ανήκουν στα φυσικά ενδιαιτήματα της πίνας (Hendriks et al., 2011). Η βυθομετρική κατανομή αυτών των πολυετών φυτών, καθορίζεται άμεσα από την επαρκή διείσδυση του φωτός στο βυθό. Έτσι, απαντώνται σε βάθη από 2- 50m. Μέσα στα πολλαπλά οφέλη των λιβαδιών στα οικοσυστήματα που ενδημούν είναι και η παραγωγή οργανικής ύλης και οξυγόνου, η σταθεροποίηση των ιζημάτων και η προσφορά ενός ιδανικού βιότοπου για τους διάφορους ιχθυοπληθυσμούς, μεταξύ των οποίων και για την πίνα. Οι ρυθμοί αύξησης ενός λιβαδιού *Posidonia oceanica* είναι εξαιρετικά αργοί (2cm/έτος). Εξαιτίας του αργού ρυθμού αύξησης τους σε συνδιασμό με τις ανθρωπογενείς παρεμβάσεις (κυρίως), τα λιβάδια φανερόγαμων έχουν ελαττωθεί σημαντικά την τελευταία 20ετία κατά 20- 30%. Είναι αναπόφευκτο λοιπόν, λόγω της ελάττωσης τους, το να απειλείται και η επιβίωση των πληθυσμών πίνας και κυρίως των μικρότερων ατόμων, αφού η επιβίωσή τους εξαρτάται άμεσα από αυτά (Hendriks et al., 2011).

Τα θαλάσσια λιβάδια μέσα στα οποία διαβιούν οι πίνες τις προστατεύουν, εκτός των άλλων και από την επίδραση των θαλάσσιων ρευμάτων. Τα λιβάδια μειώνουν την υδροδυναμική ενέργεια, και παρέχουν καταφύγιο για τις πίνες. Το ποσοστό της μείωσης των υδροδυναμικών πιέσεων εξαρτάται από χαρακτηριστικά, όπως η πυκνότητα των βλαστών



Εικόνα 29 Το λουλούδι της *posidonia oceanica* <https://archipelago.gr/>

και το μήκος των φύλλων (Garcia March, 2006; Hendriks et al., 2011). Επιπλέον, οι πίνες που διαβιούν κάτω από τους θόλους πυκνών λιβαδιών μπορούν να κρυφτούν και από τους θηρευτές τους (Hendriks et al., 2011). Γίνεται σαφές από τα παραπάνω όχι μόνο η ευεργετική επίδραση των θαλάσσιων λιβαδιών στους πληθυσμούς των πινών, αλλά και η αναγκαιότητά τους. Η μείωση των λιβαδιών παγκοσμίως που περιλαμβάνει την μείωση της πυκνότητας των βλαστών σε τέτοιο βαθμό ώστε το ύψος των θόλων δεν είναι αρκετό ώστε να μειώσει τις υδροδυναμικές πιέσεις, καθιστά τα δίθυρα ευάλωτα εκτός των άλλων και στη δράση υψηλών κυμάτων (Hendriks et al., 2011).

Με σκοπό την πρόληψη της εξαφάνισης και τη διατήρηση των απειλούμενων ειδών, η *Pinna nobilis* όπως και τα λιβάδια *Posidonia oceanica* έχουν συμπεριληφθεί σε ειδική οδηγία της Ευρωπαϊκής Ένωσης 92/43/ΕΟΚ (Annex IV), για την προστασία των φυσικών βιοτόπων και της άγριας χλωρίδας και πανίδας που προβλέπει την θεσμοθέτηση ευρωπαϊκού δικτύου περιοχών ειδικής περιβαλλοντικής διαχείρισης, γνωστό ως NATURA-2000.

Επίσης, προστατεύονται από το ειδικό Μεσογειακό πρωτόκολλο προστατευόμενων περιοχών (95/96 SPA ANNEX II) . Το 2006 η Ε.Ε. με τον Κανονισμό 1967/2006 θέσπισε αυστηρά μέτρα προστασίας των περιοχών με θαλάσσια φανερόγαμα (*Posidonia oceanica*, *Cymodocea nodosa*, *Zoostera marina* και *Zoostera noltii*) σε σχέση με αλιευτικές δραστηριότητες, και απαγορεύει

την αλιεία με «δίχτυα τράτας, δράγες, γρι-γρι, γρίπους συρόμενους από σκάφος, πεζότρατες ή παρόμοια δίχτυα πάνω από βυθούς με θαλάσσια βλάστηση, (εκτός των περιπτώσεων που τα συγκεκριμένα αλιευτικά εξαρτήματα δεν αγγίζουν τον βυθό). Ιδιαίτερα μάλιστα ο Κανονισμός αυτός εφαρμόζεται στις περιοχές του δικτύου Natura 2000.

2.3 Νομοθεσία για την *Pinna nobilis*

Η πίνα προστατεύεται από:

- Το προεδρικό διάταγμα 67/1981 για τα είδη που περιλαμβάνονται στον κατάλογο αυτού του προεδρικού διατάγματος 67/1981 απαγορεύεται η θανάτωση, η απόπειρα θανάτωσης, η κακοποίηση ο τραυματισμός, η πρόκληση βλάβης, η κατοχή, η σύλληψη, η ταρίχευση, η αγορά ή πώληση, η μεταφορά και η εξαγωγή πίνας (Katsanevakis S. et al., 2008).
- Την σύμβαση CITES για το εμπόριο από απειλούμενων ειδών 1973. Για αυτά τα είδη ισχύει ο κανονισμός 338/1997/ΕΟΚ (ΟJ L61/3.3.1997) που επικυρώθηκε από τον Ν. 2055/1992 (ΦΕΚ 105Α/30. 6. 1992) και συμπληρώθηκε με την /99098/5881/16-10-2006 κοινή απόφαση (ΚΥΑ) των Υπουργών Οικονομίας και Οικονομικών και Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων «εμπορία των ειδών της άγριας πανίδας και της αυτοφυούς χλωρίδας» (ΦΕΚ 1570/τ. Β΄ /26-10-2006).
- Την σύμβαση της Βέρνης 1979 (επικύρωση Ν. 1335 / 1983, ΦΕΚ 32 Α/ 14.03.1983) για τα είδη που περιλαμβάνονται στον κατάλογο του παραρτήματος 2 της Σύμβασης της Βέρνης απαγορεύεται η σύλληψη διατήρηση σε αιχμαλωσία ή θανάτωση πρόκληση ζημιών η καταστροφή των χώρων αναπαραγωγής ή ανάπαυσης η ενόχληση ιδιαίτερα κατά την περίοδο αναπαραγωγής ανάπτυξη των νόσων της διαχείμασης η καταστροφή και συλλογή αυγών η κατοχή και το εμπόριο των ειδών ζωντανών νεκρών.
- Οδηγία 92/43 για τη διατήρηση των φυσικών οικοτόπων καθώς και της άγριας πανίδας και χλωρίδας (επικύρωση ΚΥΑ 33318/28.12.1998, ΦΕΚ 1289Β/28.12.1998). Για τα είδη του παραρτήματος 4 της οδηγίας 92/ 43 προβλέπεται αυστηρή προστασία που απαγορεύει την κάθε μορφή σύλληψης ή θανάτωσης εκ προθέσεως την παρενόχληση εκ προθέσεως ιδίως κατά την περίοδο αναπαραγωγής και εξάρτησης διαχείμασης και μετανάστευσης εκ προθέσεως καταστροφής λόγοι αυγών βλάβη ή καταστροφή των

τόπων αναπαραγωγής ή ανάπαυσης κατοχή μεταφορά πώληση ανταλλαγή προσφορά για πώληση.

Στην Ελλάδα πλήρης εναρμονισμός για το είδος πίνα με την κοινοτική νομοθεσία έγινε το 2003 (ΠΔ 227/2003 ΦΕΚ 198/Α/11-08-). Η σχετική εγκύκλιος αυτή καθαυτή αναφέρει «Απαγορεύεται η αλιεία ή διατήρηση επί του σκάφους η μεταφόρτωση εκφόρτωση μεταφορά η αποθήκευση η έκθεση με σκοπό την πώληση η διάθεση προς πώληση η πώληση και η εμπορία οποιουδήποτε είδους οστράκου που δεν περιλαμβάνεται στα είδη οστράκων της παραγράφου 2 του παρόντος άρθρου».



Εικόνα 30 Λιβάδι *Posidonia oceanica* <https://archipelago.gr/>

3. Παθολογία του διθύρου *Pinna nobilis*

« Πολύ λυπάμαι που η πίνια έχει σχεδόν εξαφανιστεί. Πάντα συναντούσα πίνες στις καταδύσεις μου»

Λάμπρος Ξ.
ερασιτέχνης δύτης

3.1 Εισαγωγή

Οι μικροοργανισμοί που υπάρχουν στα θαλάσσια ενδιαιτήματα διαδραματίζουν αδιαμφισβήτητα σημαντικό ρόλο στην αλυσίδα του κάθε οικοσυστήματος (Casillo et al., 2018). Τα βακτήρια όπως είναι ήδη γνωστό εμπλέκονται σε πολλούς μηχανισμούς των οργανισμών όπως οι ανοσολογικές λειτουργίες, οι φυσιολογικές αποκρίσεις σε διάφορους παράγοντες, και η πρόσληψη θρεπτικών συστατικών (McFall-Ngai, 2002; Offret et al., 2019, 2020). Ωστόσο, μπορούν επίσης να δράσουν και παθογενετικά κάτω από ορισμένες συνθήκες οδηγώντας σε ασθένειες (Garnier et al., 2007). Οι στρεσογόνες συνθήκες όπως το αποτέλεσμα της κλιματικής αλλαγής και η ανθρωπογενής δραστηριότητα μπορεί να έχουν αρνητικό αντίκτυπο στις φυσιολογικές αντιδράσεις των οργανισμών, με αποτέλεσμα τις χαμηλές ανοσολογικές αποκρίσεις τους και παράλληλα μπορεί να ευνοούν τον πολλαπλασιασμό των βακτηρίων (Husmann et al., 2011; Matozzo & Marin, 2011). Για παράδειγμα, η αύξηση της θερμοκρασίας συνήθως ευνοεί την ανάπτυξη του *Vibrio spp.*, καθιστώντας το παθογόνο. Εξίσου σημαντική είναι και η παρατήρηση πως τα βακτήρια μπορούν να θεωρηθούν υπεύθυνα για την έκθεση του οργανισμού- ξενιστή σε δευτερογενείς λοιμώξεις, οι οποίες, μαζί με τον κύριο αιτιολογικό παράγοντα, αυξάνουν την παθογένεια εις βάρος του ξενιστή (Paul-Pont et al., 2010).

Όπως προαναφέρθηκε, η πίνα αποτελεί ένα από τα πιο σημαντικά είδη στη αλυσίδα της Μεσογείου. Δυστυχώς, ως συνέπεια κυρίως των ανθρώπινων δραστηριοτήτων και όχι τόσο των θηρευτών της, στις αρχές της δεκαετίας του '80, οι πληθυσμοί της σε όλη την Μεσόγειο άρχισαν να παρουσιάζουν μείωση και, όπως είναι ήδη γνωστό, τέθηκε σε καθεστώς πλήρους προστασίας. Παρόλες τις προσπάθειες, την τελευταία δεκαετία, η πίνα δεν κινδυνεύει πλέον μόνο από τους θηρευτές της και την ανθρωπογενή δραστηριότητα. Από το φθινόπωρο του 2016 μαστίζεται από μία επιδημία η οποία πιθανών να σχετίζεται με την κλιματική αλλαγή και η οποία την έχει φέρει στα πρόθυρα της εξαφάνισης. Το φαινόμενο αυτό ξεκίνησε δυτικά από τις μεσογειακές ακτές της Ισπανίας και η μαζική θνησιμότητα της εξαπλώθηκε γρήγορα προς τα ανατολικά (Vázquez-Luis et al., 2017).

Ενδιαφέρον παρουσιάζει η υπόθεση πως το μεγάλο μέγεθος της πίνας το οποίο την καθιστά κατάλληλη για επιβιοτικούς οργανισμούς (το οποίο δεν συμβαίνει σε άλλα δίθυρα που μοιράζονται το ίδιο ενδιαίτημα) ίσως είναι μία πηγή εισόδου παθογόνων. Μικροπληγές και

εκδορές που δημιουργούνται στον μανδύα της πίνας από τους συμβιωτές της θα μπορούσαν να θεωρηθούν σημεία εισόδου βακτηρίων και άλλων παθογόνων, αυξάνοντας έτσι την προδιάθεσή της για την εμφάνιση ασθενειών (Howard et al., 2004).

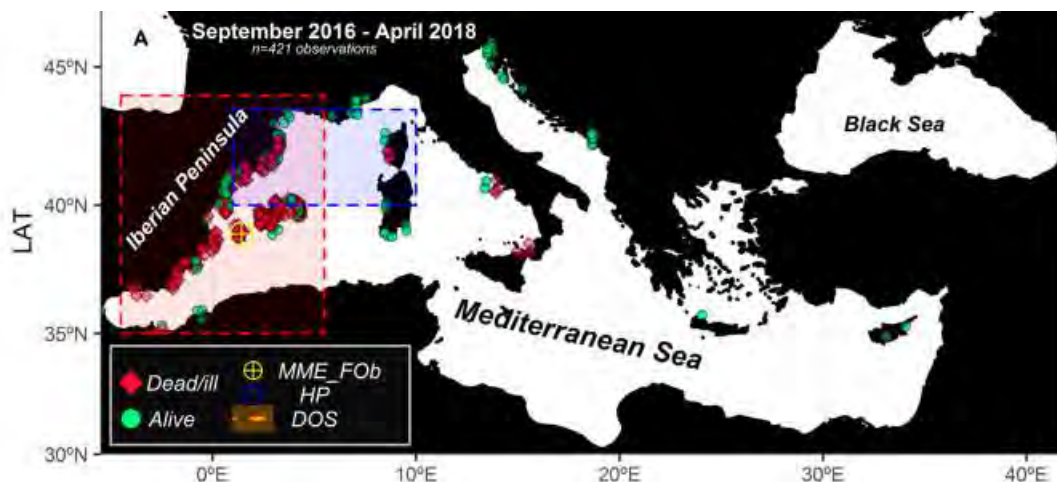
Στην παρούσα εργασία εξετάζεται η συνέργεια δύο παθογόνων: του *Haplosporidium pinnae* και των *Mycobacterium sp.*, ενώ αναφέρονται και άλλα βακτηριακά ευρήματα, όπως η ύπαρξη *Vibrio sp.* σε ήδη νοσούντα άτομα. Όπως θα αναφερθεί και παρακάτω, η ύπαρξη και των δύο παθογόνων (του *Haplosporidium pinnae* και των *Mycobacterium sp.*) έχει τεκμηριωθεί πριν την εμφάνιση της θνησιμότητας. Έτσι το ξέσπασμα της μαζικής θνησιμότητας οδήγησε στην υπόθεση μιας πιο σύνθετης παθογένειας στην οποία εμπλέκονται και τα δύο παθογόνα, τα οποία ενεργοποιούνται από περαιτέρω πιθανά κοινά μη ταυτοποιημένα αβιοτικά αίτια (κλιματική αλλαγή). Η παρούσα εργασία, εκτός των άλλων αναφέρει πληροφορίες σχετικά με την πολυπλοκότητα των πολυπαραγοντικών ασθενειών που υφίστανται τα τελευταία χρόνια στο υδάτινο περιβάλλον σε σχέση πάντα με την κλιματική αλλαγή και πως επηρεάζουν σε πολλά επίπεδα τους οργανισμούς, όπως στις αντιδράσεις του μεταβολισμού.

3.2 Ιστορικό μαζικής θνησιμότητας

Οι πρώτες παρατηρήσεις της μαζικής θνησιμότητας της πίνας αναφέρθηκαν Σεπτέμβριο-Οκτώβριο του 2016 στα νότια και νοτιοανατολικά της Ιβηρικής Χερσονήσου και πιο συγκεκριμένα στην Ανδαλουσία, την Περιφέρεια της Murcia και την Νότια Κοινότητα της Valencia, καθώς και στις Βαlearίδες Νήσους, στην Formentera και την Ibiza (Darriba, 2017; Vázquez-Luis et al., 2017). Η θνησιμότητα εξαπλώθηκε γρήγορα προς τα ανατολικά, επηρεάζοντας το 2017 τους πληθυσμούς της υπόλοιπης Ισπανίας, της Γαλλίας, της Ιταλίας και της Τυνησίας (Betti et al., 2021; Carella et al., 2019; Catanese et al., 2018a; Katsanevakis, 2019; Panarese et al., 2019). Το 2018, αναφέρθηκαν τα πρώτα περιστατικά στη Μάλτα, την Ελλάδα (Katsanevakis, 2019; Lattos, Giantsis, Karagiannis, & Michaelidis, 2020), την Κύπρο και την Τουρκία και, τέλος, το 2019, παρατηρήθηκαν τα πρώτα κρούσματα μαζικής θνησιμότητας

στην Αδριατική Θάλασσα, την Κροατία και την Βοσνία- Ερζεγοβίνη (Cabanellas-Reboredo et al., 2019; Čelebičić & Gradasevic, 2020; Katsanevakis, 2019; Kersting D. et al., 2019).

Το φαινόμενο αυτό είχε μεγάλο αντίκτυπο στην πληθυσμούς της πίνας σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα: Μέσα σε 18 μήνες (από το 2016 έως το 2018), η μαζική θνησιμότητα εξαπλώθηκε από τους πληθυσμούς της δυτικής Μεσογείου στην ανατολική Μεσόγειο (Kersting D. et al., 2019).



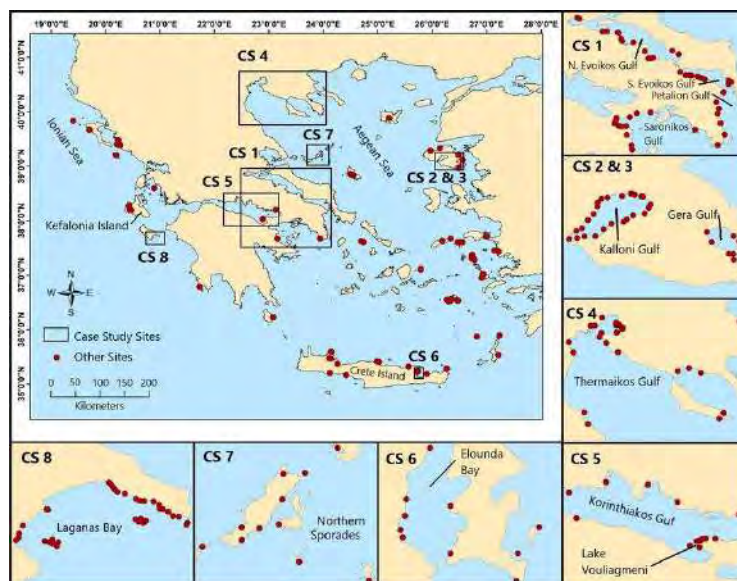
Εικόνα 31 Χάρτης της Μεσογείου με τα περιστατικά μαζικής θνησιμότητας την περίοδο 2016-2018 (Cabanellas-Reboredo et al., 2019)

Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα της ραγδαίας εξάπλωσης της μαζική θνησιμότητας αποτελεί η περίπτωση «Asinara Island», ένα ιταλικό εθνικό πάρκο το οποίο βρίσκεται βορειοδυτικά της Σαρδηνίας. Οι πληθυσμοί που υπήρχαν στον συγκεκριμένο οικοτόπο, εξαφανίστηκαν μέσα σε λίγους μήνες. Πράγματι, στις αρχές του 2018, κατά τη διάρκεια μιας απογραφής της πίνας που πραγματοποιήθηκε για το πρόγραμμα «Marine Strategy Monitoring Program», εντοπίστηκαν τα πρώτα σημάδια κατάρρευσης του πληθυσμού. Τον Ιούλιο του ίδιου έτους, σε λιγότερο δηλαδή από 7 μήνες η θνησιμότητα έφτασε περίπου το 50%, ενώ το Νοέμβριο βρέθηκε σχεδόν το 90% νεκρό (Scarpa et al, 2021).

Σήμερα, πολλοί από τους πληθυσμούς της πίνας στη Μεσόγειο θάλασσα έχουν μειωθεί κατά 80-100% (Katsanevakis, 2019; Kersting D. et al., 2019; Panarese et al., 2019; Šarić et al., 2020; Vázquez-Luis et al., 2017). Μέχρι τον Ιούνιο του 2017, περίπου το 90% των ισπανικών πληθυσμών είχε χαθεί και η θνησιμότητα έφτασε το 100% στις νότιες και κεντρικές μεσογειακές ακτές της Ιβηρικής Χερσονήσου και των Βαλεαρίδων Νήσων, εκεί από όπου

ξεκίνησε το φαινόμενο (Vázquez-Luis et al., 2017). Μετά από αυτά τα περιστατικά, η πίνα κρίθηκε ως «Κρίσιμα απειλούμενη» στην ισπανική νομοθεσία, με σοβαρό κίνδυνο εξαφάνισης (Orden TEC/1078/2018), ενώ παράλληλα συμπεριλήφθηκε στην Κόκκινη λίστα της IUCN List το 2019 (Kersting D. et al., 2019).

Όσον αφορά τους πληθυσμούς στην Ελλάδα, μέχρι το 2016-2017, δεν υπήρξε καμία καταγραφή ασυνήθιστης θνησιμότητας πληθυσμών στην Ανατολική Μεσόγειο. Όμως, μέχρι τα μέσα του 2018, είχαν ξεκινήσει ήδη να κυκλοφορούν οι πρώτες ανεπίσημες πληροφορίες για μαζικές θνησιμότητες στο Αιγαίο και έτσι κινητοποιήθηκε η ελληνική επιστημονική κοινότητα. Η μελέτη του κου Κατσανεβάκη (Katsanevakis, 2019) ήταν η πρώτη προσπάθεια να εκτιμηθεί η κατάσταση των πληθυσμών της πίνας στην Ελλάδα και κατά πόσο το παράσιτο *H. pinnae* έχει



Εικόνα 32 Σημεία δειγματοληψίας στην Ελλάδα (Zotou et al., 2020)

επεκτείνει την επικίνδυνη εξάπλωσή του στη Ανατολική Μεσόγειο, μολύνοντας τους ελληνικούς πληθυσμούς. Στην συνέχεια, εκπονήθηκαν πολλές μελέτες που αφορούν την μαζική θνησιμότητα των πινών σε διάφορες περιοχές του Αιγαίου (Lattos, Giantsis, Karagiannis, & Michaelidis, 2020), οι οποίες κατέδειξαν μαζικές θνησιμότητες της πίνας αρχικά στις περιοχές της Λέσβου και της Λήμνου όπως και στον Θερμαϊκό (Lattos, Giantsis, Karagiannis, & Michaelidis, 2020).

Τα σημάδια της ως τότε άγνωστης παθολογικής συμπτωματολογίας ήταν εμφανή και κοινά σε όλες σχεδόν τις περιοχές. Στα πρώτα στάδια, τα προσβεβλημένα άτομα παρουσίαζαν ένα ανώμαλο αργό κλείσιμο των κελυφών μετά από εξωτερική διέγερση. Σε σύντομο χρονικό διάστημα (προχωρημένη φάση της νόσου), ο μανδύας αποκολλιούνταν από τις θυρίδες, οι οποίες πλέον σε αυτό το στάδιο δεν μπορούσαν να κλείσουν πλήρως (Vázquez-Luis et al., 2017). Αποτέλεσμα ήταν τα άτομα να καθίστανται ιδιαίτερα ευάλωτα στη θήρευση. Στην τελική φάση της νόσου, ο μανδύας μετακινούνταν προς τα κάτω, στο πρόσθιο τμήμα του κελύφους. Τα άτομα σε αυτήν την κατάσταση δεν επιβίωναν περισσότερο από λίγες ημέρες. Στην αρχή της μαζικής θνησιμότητας, ήταν συνηθισμένο φαινόμενο η εύρεση ατόμων που στέκονταν ακόμα όρθια, με

τον μανδύα να έχει καταρρεύσει στο κάτω μέρος του κελύφους, με κενό κέλυφος, ή ακόμα και με κέλυφος αποικισμένο από άλλα είδη π.χ. το *O. vulgaris*, το οποίο χρησιμοποιεί συνήθως τα κελύφη ως κρησφύγετο. Όταν πλέον η επιδημία έπαιρνε μεγάλες διαστάσεις, συχνά βρίσκονταν άτομα με το κέλυφος αποκολλημένο εντελώς από τον πυθμένα, σε διάφορα στάδια κατάρρευσης, ακόμα και ξεβρασμένα στην ακτή (Scarpa et al, 2021).

Μετά τις πρώτες αναφορές της μαζικής θνησιμότητας στην Ισπανία, ξεκίνησαν να εκπονούνται διάφορες επιστημονικές μελέτες με στόχο να βρεθούν τα παθογόνα τα οποία ενδεχομένως να εμπλέκονται στη θνησιμότητα των πληθυσμών, όπως θα αναφερθεί παρακάτω. Οι πρώτες επιδημιολογικές έρευνες απέδωσαν το φαινόμενο αυτό στη μόλυνση από ένα πρωτόζωο παράσιτο, το οποίο προσβάλλει το πεπτικό σύστημα της πίνας (Vázquez-Luis et al., 2017). Η παρουσία του στο πεπτικό σύστημα των νοσούντων ατόμων ήταν έντονη, σε πολλά στάδια του και με συμπτώματα όπως τις νωχελικές αντιδράσεις κλεισίματος του κελύφους και κυστίδια με υγρό στην σπλαχνική μάζα. Τελικά, το πρωτόζωο *Haplosporidium pinnæ* περιγράφηκε ως νέο είδος και αναφέρθηκε αρχικά ως ειδικός ξενιστής της πίνας (Catanese et al., 2018).

Το εύρημα αυτό ήταν συνεπές με αυτό που βρέθηκε από μελέτες σχετικά με διάφορα περιστατικά θνησιμότητας και σε άλλα δίθυρα. Πράγματι, τα πρωτόζωα εν γένει και τα ενδοπαράσιτα απλοσπορίδια πιο συγκεκριμένα, αναγνωρίζονται ευρέως ως αιτιολογικοί παράγοντες διαφόρων ασθενειών που προκαλούν μαζική θνησιμότητα σε πληθυσμούς δίθυρων (Burreson & Ford, 2004; Ford & Haskin, 1982; Laing et al., 2014) και γι' αυτό οι πρώτες μελέτες εστίασαν σε αυτά (Catanese et al., 2018a; Darriba, 2017; Katsanevakis, 2019; López-Sanmartín et al., 2019; Panarese et al., 2019; Vázquez-Luis et al., 2017).

Άλλες μελέτες αργότερα, σχετικά με τα αίτια της θνησιμότητας αναφέρονται όχι μόνο στο πρωτόζωο *Haplosporidium pinnæ* αλλά και στην παρουσία βακτηρίων των γενών *Mycobacterium spp.* και *Vibrio spp.* σε νεκρούς ή μολυσμένους πληθυσμούς ως περαιτέρω ή εναλλακτικούς αιτιολογικούς παράγοντες του φαινομένου (Carella et al., 2019; Lattos, Giantsis, Karagiannis, & Michaelidis, 2020; P. Prado et al., 2021; Šarić et al., 2020; Scarpa et al, 2021; Scarpa et al., 2020a). Πρόσφατες μελέτες (Lattos, Feidantsis, et al., 2021a), επιβεβαιώνουν την επίπτωση των παραπάνω παθογόνων οργανισμών στην θνησιμότητα των πληθυσμών. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι Scarpa & Sanna et al. (2020) εντόπισαν σε ετοιμοθάνατα ή νεκρά άτομα πίνας τρεις διαφορετικές ταξινομικές οντότητες του *Mycobacterium sp.* οι οποίες δεν είχαν περιγραφεί

ως τότε. Επιπλέον, σε νοσούντα άτομα πίνας βρέθηκαν αποικίες του βακτηρίου *Rhodococcus erythropolis* (Scarpa et al., 2020a) και του *Perkinsus* sp. (Carella et al., 2019), τα οποία σχετίζονται με το *Mycobacterium* sp., γεγονός το οποίο υποδηλώνει ότι θα πρέπει να δοθεί έμφαση στην ταυτοποίηση περισσότερων παθογόνων μικροοργανισμών που ενδεχομένως εμπλέκονται στη μαζική θνησιμότητα.

PATHOGENS ASSOCIATED WITH MMEs IN THE FIELD

2016 First MME of *P. nobilis* observed in Spain

2017 *Haplosporidium* sp. reported in animals from Alicante (Spain)

2018 A new *Haplosporidium* species, *H. pinnae*, is described in *P. nobilis* and reported in Italy and Greece

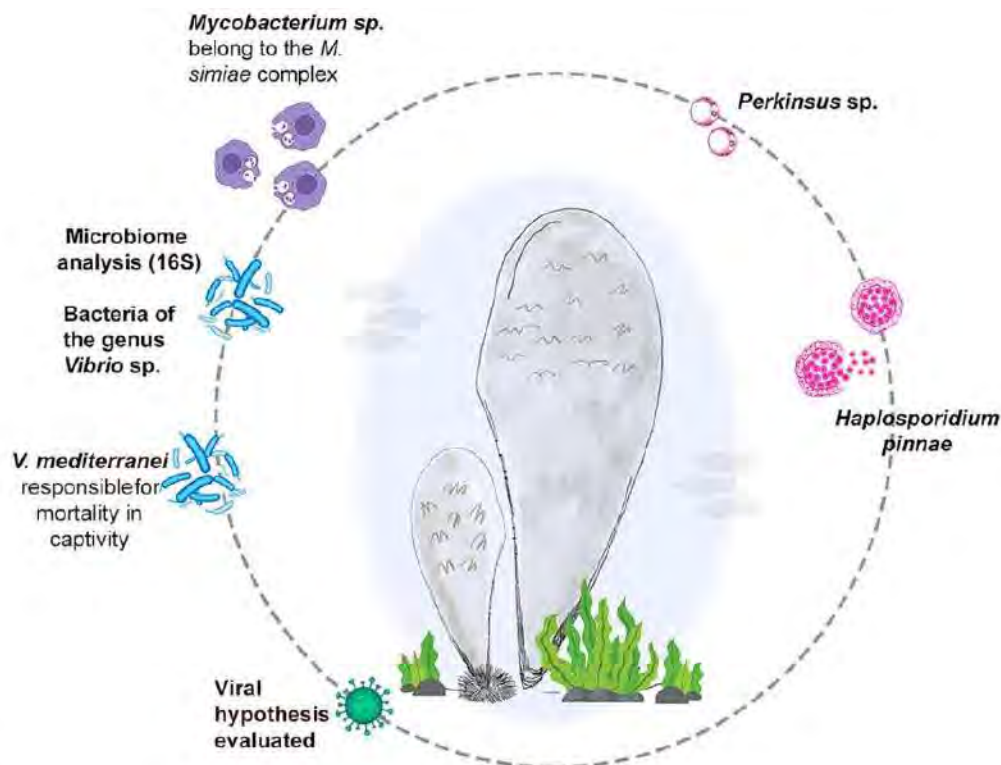
2019 *Mycobacterium* sp. (*Mycobacterium simiae* complex) is reported in Italy (Campania and Sicily) as the sole pathogen present in diseased animals

2020 *Mycobacterium* sp. is reported in Greece, in other parts of Italy and in Spain along with *H. pinnae*, *Vibrio* sp. and *Perkinsus* sp. (Sardinia, Italy)

Mycobacterium sp. and *H. pinnae* are reported in the Adriatic Sea, Croatia

H. pinnae is reported in other bivalve species in the island of Sardinia

2021 16S rRNA microbiome report of a specific gut bacteria in diseased animals



CURRENT SITUATION

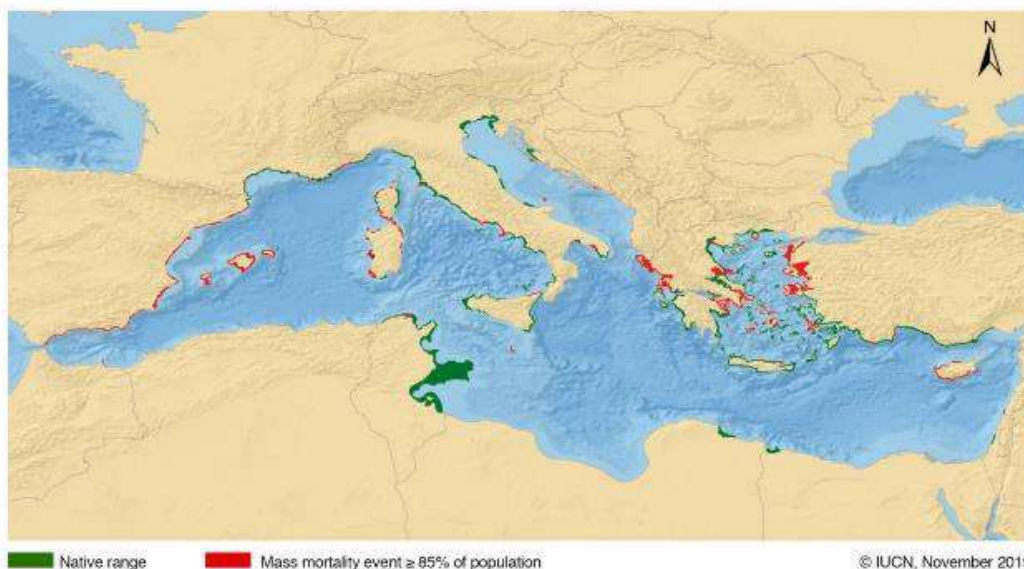
Since 2016 MMEs of *P. nobilis* were reported throughout the Mediterranean Sea. Currently, the species has become locally extinct in most of its previous range, and in 2019 was listed as Critically Endangered by IUCN's Red list (International Union for Conservation of Nature) in 2019

Εικόνα 33 Σχεδιάγραμμα με το ιστορικό των θνησιμοτήτων και τα παθογόνα (Carella et al., 2023)

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός, πως σε αρκετά νεκρά άτομα πίνας, βρέθηκαν μόνο βακτήρια και όχι ενδοπαράσιτα. Μάλιστα, σε έρευνες από τους (Scarpa et al., 2020a), τονίστηκε όχι μόνο η έλλειψη του απλοσποριδίου σε νοσούντα άτομα, αλλά και η παρουσία του σε ζώντα άτομα και μάλιστα υγιή (Scarpa et al, 2021). Οι πιο πρόσφατες έρευνες ωστόσο επισημαίνουν ότι η έναρξη της μαζικής θνησιμότητας της πίνας, σχετίζεται έντονα με την παρουσία του *H. pinnae*, το οποίο εμφανίζει εξέχοντα ρόλο σε σύγκριση με τους άλλους παθολογικούς παράγοντες που βρέθηκαν (Box et al., 2020; Catanese et al., 2018a; Grau et al., 2022). Επί του παρόντος, θεωρείται ως μία πολυπαραγοντική ασθένεια, που εντείνεται από τη συνδυασμένη δράση διαφόρων παθογόνων παραγόντων (Scarpa et al, 2021).

Τέλος, θα πρέπει να επισημανθεί ότι η νόσος δεν αφορά συγγενικά είδη, τα οποία δεν επηρεάστηκαν καθόλου από τα παθογόνα, ακόμη και σε περιπτώσεις, στις οποίες αυτά απομονώθηκαν από στους ιστούς τους (Scarpa et al., 2020a; Vázquez-Luis et al., 2017). Σε αυτήν την ένδειξη στηρίζεται και η θεωρία που προαναφέρθηκε κατά την οποία οι συμβιωτές της πίνας προκαλούν εκδορές στον μανδύα και από εκεί εισβάλλουν τα παθογόνα στον οργανισμό (Howard et al., 2004).

Σε αυτό το πλαίσιο παράλληλα, οι (Vázquez-Luis et al., 2017) διαπίστωσαν ενδείξεις φυσικού υβριδισμού μεταξύ του *P. nobilis* και του *P. rudis*, ο οποίος φαίνεται να παράγει άτομα με ικανότητα ανθεκτικότητας στην ασθένεια. Αυτό το πρόσφατο εύρημα, ακόμη και αν δεν μπορεί να αποτρέψει την εξαφάνιση του *P. nobilis*, θα μπορούσε να επιτρέψει ένα μέρος της γενετικής του κληρονομιάς να επιβιώσει σε νέους πληθυσμούς υβριδίων (Scarpa et al., 2022). Από τα παραπάνω προκύπτει πως θα ήταν χρήσιμο ανάμεσα στα επόμενα βήματα που θα πρέπει να γίνουν, να είναι και η εκπόνηση μιας εκτεταμένης μοριακής έρευνας μετά την επιδημία (Scarpa et al, 2021).



Εικόνα 34
Χάρτης με την
κατάσταση των
πληθυσμών
πίνας τον
Ιανουάριο 2021

<https://www.iucn.org/>

3.3 *Haplosporidium Pinnae*

Η τάξη των Harposporida περιλαμβάνει πάνω από 50 είδη, τα οποία ταξινομούνται στα γένη *Haplosporidium*, *Minchinia*, *Bonamia* και *Urosporidium* (Arzul & Carnegie, 2015; Azevedo & Hine, 2017). Αυτά τα είδη παρασιτούν σε υδρόβια ασπόνδυλα και μπορεί να είναι ιδιαίτερα παθογόνα. Για παράδειγμα, τα *Haplosporidium nelson*, *Bonamia ostreae* και *B. exitiosa* έχουν αναφερθεί ότι προκαλούν μαζική θνησιμότητα σε στρείδια (Engelsma et al., 2014).

Το *Haplosporidium nelson* είναι ένα από τα πρώτα είδη όπου παρατηρήθηκε σε δίθυρα και ιδιαίτερα στο στρείδι *Crassostrea virginica*, αφανίζοντας σχεδόν το 95% του ιθαγενούς πληθυσμού στο Delaware και στον κόλπο Chesapeake, στις ΗΠΑ (Burrison & Ford, 2004; Ford & Haskin, 1982). Ακόμα, και στην Ευρώπη έχουν παρατηρηθεί παρόμοια φαινόμενα σε πληθυσμούς στρειδιών (Pichot Y. et al., 1980).

Τα απλοσπορίδια του γένους *Bonamia* είναι ο αιτιολογικός παράγοντας της Bonamiosis, που έχει καταγραφεί ως ο κύριος παράγοντας υψηλής θνησιμότητας σε πληθυσμούς στρειδιών στην Ιταλία (Narcisi et al., 2010), στην Ισπανία και στις Κάτω Χώρες (Engelsma et al., 2014). Θα πρέπει επίσης να σημειωθεί ότι είδη που ανήκουν στο γένος *Bonamia* έχουν επίσης ανιχνευθεί σε στρείδια που προέρχονται από Βόρεια Καρολίνα των ΗΠΑ (Burrison & Ford, 2004), την

Αργεντινή (Kroeck M. & Montes J., 2005), την Αυστραλία (Carnegie et al., 2014) και τη Νέα Ζηλανδία (Cranfield et al., 2005), υποδεικνύοντας την υψηλή δραστηριότητα διασποράς των συγκεκριμένων παρασίτων (Lattos et al., 2020).

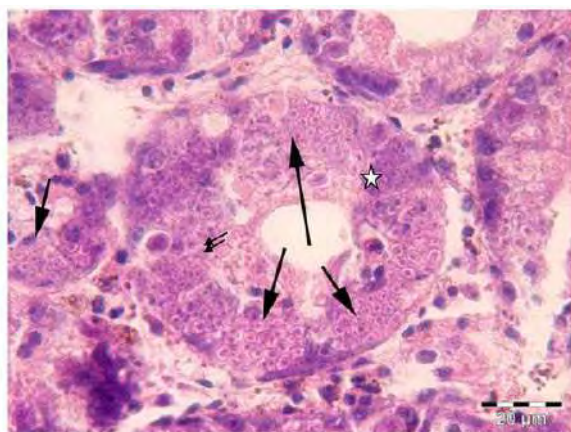
Όσον αφορά την πίνα, η πρώτη αναφορά θνησιμότητας λόγω του παρασίτου *Haplosporidium Pinnae*, ήταν στο Alicante της Ισπανίας, το φθινόπωρο του 2016, όπως έχει προαναφερθεί (Darriba, 2017; Vázquez-Luis et al., 2017). Η αρχική υπόθεση ήταν πως το συγκεκριμένο παράσιτο ήταν απλώς ένας συμβιωτής που τροποποίησε τη σχέση του με τον ξενιστή μετά από περιβαλλοντικές αλλαγές (κλιματική αλλαγή), οδηγώντας τελικά στην εμφάνιση της μαζικής θνησιμότητας (Darriba, 2017).

Η μοριακή και φυλογενετική ανάλυση που εκπονήθηκε (Catanese et al., 2018a), αποκάλυψε ότι το παράσιτο που προσβάλλει την πίνα περιλαμβάνεται στην ομάδα Haplosporida και συγγενεύει στενά με ένα άλλο απλοσπορίδιο παράσιτο το οποίο προκαλεί υψηλή θνησιμότητα στην καλλιεργούμενη γαρίδα *Penaeus vannamei* στην Καραϊβική Θάλασσα (Nunan I. et al., 2007) και στην Ινδονησία (Utari et al., 2012). Ωστόσο, εντοπίστηκαν πολλές διαφορές μεταξύ των δύο παρασίτων, τα οποία όμως φάνηκε να αποτελούν ξεχωριστή ομάδα από τα άλλα γένη απλοσποριδίων *Minchinia* και *Bonamia*, και πρότειναν ότι αυτά τα δύο είδη μπορεί να αντιπροσωπεύουν ένα ξεχωριστό νέο γένος εντός της τάξης Haplosporida.

Είναι πολύ πιθανό το παράσιτο αυτό να αποτελεί ξένο είδος στην Μεσόγειο, με πιθανή χρονολογία εισαγωγής του το 2016 ή και λίγο νωρίτερα. Αυτή η θεωρία συμφωνεί με την έρευνα των (Scarpa et al., 2020a), οι οποίοι βρήκαν το απλοσπορίδιο σε μεσογειακά δείγματα του *Ruditapes decussatus* το 2014. Αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα πως το απλοσπορίδιο είχε κάνει την εμφάνισή του στην λεκάνη της Μεσογείου λίγα χρόνια πριν την έξαρση της ασθένειας (Scarpa et al., 2020). Ακόμα μία έρευνα που ενισχύει αυτήν την θεωρία είναι αυτή των (Catanese et al., 2018), όπου διαπιστώθηκε πως η σπάνια μεταβλητότητα που ανιχνεύεται στην SSU rDNA αλληλουχία του *H. pinnae* θα μπορούσε να υποδηλώνει μια πρόσφατη άφιξη αυτού του παρασίτου στην ισπανικές μεσογειακές ακτές, γεγονός που θα ήταν σύμφωνο με την πρωτοφανή πρόσφατη μαζική θνησιμότητα. Ωστόσο, ελλείπει στοιχείων σχετικά με την γηγενή εξάπλωση του είδους, η οριστική αξιολόγηση της βιογεωγραφικής του κατάστασης είναι εκ των πραγμάτων αδύνατη (Essl et al., 2018). Νέες έρευνες με προσομοιώσεις μοντέλων της μετατόπισης των σωματιδίων που υπαγορεύεται από περιφερειακά επιφανειακά ρεύματα, ίσως

ρίζουν φως σε αυτήν την υπόθεση (Giménez-Romero et al., 2021). Πράγματι, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα ωκεάνια ρεύματα αποτελούν πιθανό παράγοντα που οδηγεί στην εξάπλωση αυτού του είδους των παρασίτων (Catanese et al., 2018a). Τέλος σοβαρή ανακάλυψη είναι πως, ενώ αρχικά είχε υποτεθεί πως το *H. Pinnae* είναι ειδικό για την πίνα, καθώς το συγγενικό είδος *P. rudis* δεν είχε επηρεαστεί στις πληγείσες περιοχές (Vázquez-Luis et al., 2017) τελικά δεν είναι (Catanese et al., 2018a).

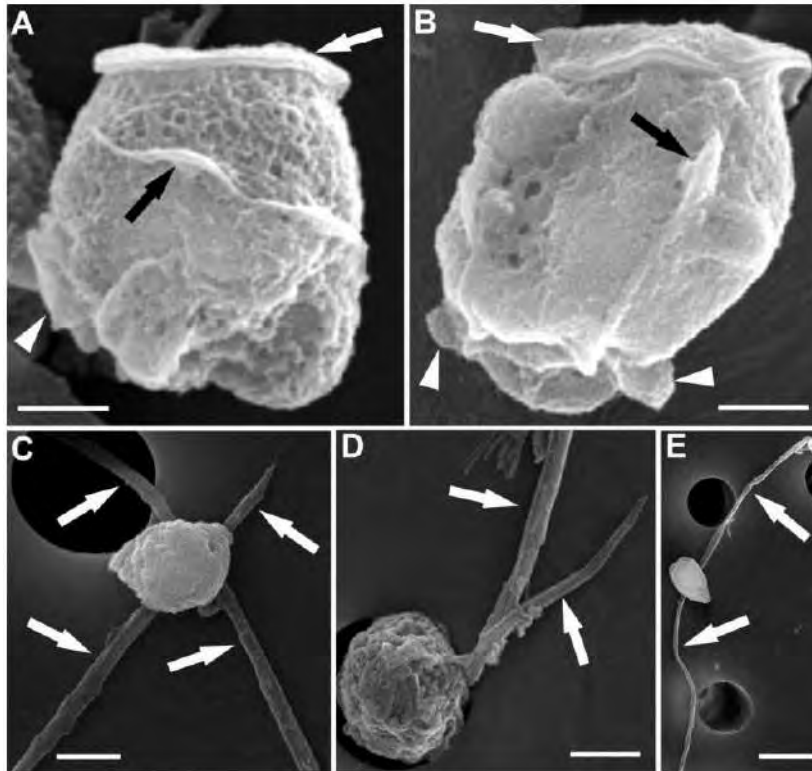
Μελέτες σχετικά με μαζική θνησιμότητα σε διάφορα είδη στη Μεσόγειο Θάλασσα υποδηλώνουν ότι υπάρχει σύνδεση μεταξύ των θνησιμοτήτων με τα άτυπα υψηλά επίπεδα θερμοκρασίας του θαλασσινού νερού και την παρατεταμένη στρωμάτωση της υδάτινης στήλης κατά τη διάρκεια των καλοκαιρινών μηνών (Cerrano C. et al., 2000; Garrabou et al., 2009). Αυτές οι συνθήκες προκαλούν παρατεταμένο στρες, το οποίο μειώνει την αντίσταση των οργανισμών-ξενιστών (στην συγκεκριμένη περίπτωση της πίνας) στα πολλαπλασιαζόμενα παθογόνα (Cerrano C. et al., 2000). Ίσως, οι υψηλές θερμοκρασίες του θαλασσινού νερού κατά τους καλοκαιρινούς μήνες μείωσαν τη φυσιολογική ικανότητα της πίνας να αντιστέκεται στα παράσιτα λόγω της υψηλής αναπνευστικής ζήτησης σε αυξημένες θερμοκρασίες (Trigos et al., 2015a). Δυστυχώς, τα περιβαλλοντικά ερεθίσματα που προκάλεσαν τον πολλαπλασιασμό και την μολυσματικότητα του απλοσποριδίου, όπως εξάλλου και η εισαγωγή του στην Μεσόγειο, είναι προς το παρόν άγνωστα (Arzul & Carnegie, 2015). Το πιθανότερο σενάριο είναι ο επιπολασμός τους να είναι εποχιακός και να εξαρτάται από περιβαλλοντικές παραμέτρους όπως τα υδάτινα ρεύματα και η αλατότητα (Burrison & Ford, 2004).



Εικόνα 35 Ιστολογική τομή μέσω του πεπτικού αδένος πίνας που έχει μολυνθεί με *Haplosporidium pinnae*. Φαίνεται το επιθήλιο των σωληναρίων του πεπτικού αδένος που καταλαμβάνεται από σποροκύστες του παρασίτου που περικλείουν σποροβλάστες και περισσότερα ή λιγότερα ώριμα σπόρια (βέλη). Διακρίνονται επίσης βαθιά χρωματισμένα πλασμίδια με διαμερισματοποίηση του κυτταροπλάσματος (αστέρι) καθώς και ελεύθερα μη πυρηνικά κύτταρα (διπλό βέλος). Χρώση (MHE).

Για τον μοριακό χαρακτηρισμό του απλοσποριδίου χρησιμοποιήθηκαν μοριακές δοκιμές, οι οποίες πραγματοποιήθηκαν με ενίσχυση PCR και αλληλούχιση ενός τμήματος της ριβοσωμικής μικρής υπομονάδας DNA (SSU rDNA) γονιδίου (Catanese et al., 2018a; Katsanevakis, 2019). Η Blastn suite(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) χρησιμοποιήθηκε ως μέτρο ελέγχου για να διασταυρωθεί η αλληλουχία του απλοσποριδίου με άλλες του ιδίου ή άλλων παρασίτων της GenBank (Catanese et al., 2018; Darriba, 2017; Katsanevakis, 2019).

Ένας πιθανός κύκλος ζωής του *H. pinnae* προτάθηκε από τους (Grau et al., 2022), με βάση τις προηγούμενες γνώσεις σχετικά με τον κύκλο ζωής παρόμοιων απλοσποριδίων με δύο κύριες φάσεις: το μονοπύρρηνο πλασμώδιο και μια φάση σποροποίησης που παράγει ανθεκτικά σπόρια, με ένα τυπικό άνοιγμα που καλύπτεται από ένα εξωτερικό καπάκι. Το στάδιο του πλασμωδίου διαιρείται με πλασμοτομία και μπορεί να υποστεί σποροποίηση. Τα σπόρια απελευθερώνονται στο περιβάλλον μετά το θάνατο του ξενιστή, αλλά δεν φαίνεται να είναι μολυσματικά στον ξενιστή στον οποίο παράγονται. Αυτό σημαίνει πως ίσως απαιτούν διαφορετικό ξενιστή για την ολοκλήρωση του κύκλου ζωής τους (Burreson & Ford, 2004). Η πλασμοειδής φάση του *H. pinnae* είναι κυρίως μονοπύρρηνη και έχει μήκος 2-3 μm με κεντρικό ή ελαφρώς έκκεντρο πυκνό πυρήνα. Τα πλασμώδια παρατηρούνται γενικά εντός των αιμοκύτταρων και στον συνδετικό ιστό του μανδύα και του πεπτικού αδένου του ξενιστή. Τα σπόρια εμφανίζονται στο επιθήλιο των σωληναρίων του πεπτικού αδένου, περιστασιακά στο εντερικό επιθήλιο, με τα μετασχηματισμένα πλασμώδια να έχουν ηωσινόφιλο κυτταρόπλασμα. Η επιθηλιακή διάταση που προκαλείται από τις σποροκύστες, οι οποίες έχουν διάμετρο 30 μm, προσκολλώνται στους αυλούς των πεπτικών σωληναρίων. Όταν ωριμάσουν, οι σποροκύστες απελευθερώνονται στον αυλό. Τα σπόρια έχουν μέγεθος το οποίο κυμαίνεται μεταξύ 3,6 και 5,7 μm μήκος και μεταξύ 2,7 και 4,5 μm πλάτος και αποβάλλονται από τον αυλό στο περιβάλλον μέσω του έντερου με τις κοπρανώδεις εκκρίσεις (Catanese et al., 2018; Panarese et al., 2019). Ωστόσο, ορισμένες πτυχές του κύκλου ζωής αυτού του παρασίτου παραμένουν ακόμη άγνωστες. Πληροφορίες πολύ σημαντικές σε σχέση με την προέλευσή του, τη μετάδοση και τα στάδια ζωής του, η παρουσία σε ενδιάμεσους ξενιστές ή η ανθεκτικότητα των σπορίων ή των κυττάρων στο περιβάλλον παραμένουν ακόμη άγνωστα (Burreson & Ford, 2004). Ως εκ τούτου, οι προσεγγίσεις για την ανίχνευση και την παρακολούθηση του παρασίτου στο θαλασσινό νερό και κατ' επέκτασιν στον τρόπο προσβολής της πίνας εξακολουθούν να λείπουν σήμερα, αν και υπάρχουν έρευνες που κινούνται προς αυτήν την κατεύθυνση.



Εικόνα 10 Ηλεκτρονικές σαρώσεις των σπορίων του *Haplosporidium pinnae*. A: Σπόρος που παρουσιάζει αναγωγές στην επιφάνεια, το λειτουργικό σώμα (λευκό βέλος) και αποκομμένα νημάτια (κεφαλή βέλους)- το μαύρο βέλος δείχνει μια κορυφογραμμή 1 μm . B: Ένας άλλος σπόρος που δείχνει μια κορυφογραμμή (μαύρο βέλος), το operculum (λευκό βέλος) και εξογκώματα (κεφαλή βέλους) 1 μm . C: Σπόρος με τέσσερα νημάτια που μοιάζουν με ταινία (βέλη) 2 μm . D: Σπόρος με δύο ταινιοειδή νημάτια (βέλη) που προεξέχουν από ένα κοινό εξόγκωμα του σπόρου 2 μm . E: Σπόρος με δύο μακριά ταινιοειδή νημάτια (βέλη) 5 μm . (Catanesi et al., 2018b)

Όπως προαναφέρθηκε, το ενδοπαράσιτο προκαλεί ήπια φλεγμονώδη (αιμοκυτταρική) αντίδραση, με λίγα αιμοκύτταρα παρόντα. Ωστόσο, υπάρχουν καταγραφές για σοβαρή φλεγμονή του συνδετικού ιστού του πεπτικού αδένου, με υπερτροφία και υπερπλασία των μελανομακροφάγων (σταθερά φαγοκύτταρα του συνδετικού ιστού ορισμένων δίθυρων) (Bureson & Ford, 2004). Η εξέταση των προσβεβλημένων ατόμων έδειξε την παρουσία κοιλοτήτων γεμάτες υγρό στο πεπτικό σύστημα, όπου προκαλούσαν τελικά ατροφία στα όργανα. Ένα ακόμα ανησυχητικό εύρημα των ιστοπαθολογικών μελετών στην περιοχή του Αιγαίου, το οποίο επιβεβαιώνεται και από άλλους ερευνητές, είναι η πολύ χαμηλή ή σε ορισμένες περιπτώσεις απύουσα αντίδραση των αιμοκυττάρων του ξενιστή (Katsanevakis, 2019).

Απύρνα και διπύρνα στάδια του *H. pinnae* παρατηρούνται σε όλο τον συνδετικό ιστό και στην αιμόλεμφο των προσβεβλημένων ατόμων, με σφαιρικά έως επιμήκη σχήματα και μέγιστο μήκος 3,5 μm . Τα στάδια σποροποίησης, συμπεριλαμβανομένων των σπορογόνων, των σποροκύστεων

και των σπορίων, καθώς και προσποροποίησης, μονοπύρρηνα κύτταρα, διπύρρηνα και πολυπύρρηνα πλασμάδια στο εσωτερικό των σωληναρίων του πεπτικού αδένος, είναι επίσης αρκετά συχνά (Catanese et al., 2018a).

3.4 *Mycobacterium sp.*

Παρ' όλα αυτά, το απλοσπορίδιο, πιθανών δεν είναι το μόνο παθογόνο που ευθύνεται για τα επεισόδια μαζικής θνησιμότητας της πίννας στη Μεσόγειο Θάλασσα, όπως προαναφέρθηκε. Οι (Carella et al., 2019) περιέγραψαν ένα δεύτερο παθογόνο που πρόσβαλε τους πληθυσμούς της πίννας στην Ιταλία. Οι ίδιοι μελέτησαν τα γεγονότα θνησιμότητας που συνέβησαν μεταξύ 2017 και 2018 και βρήκαν πως σε όλα τα δείγματα υπήρχε παρουσία των θετικών κατά Gram μυκοβακτηριδίων (Lattos et al., 2020). Σε μια πρόσφατη μελέτη μάλιστα, που στόχο είχε την σύγκριση δειγμάτων πριν και μετά την έξαρση της θνησιμότητας, βρέθηκαν ενδείξεις ότι το *Mycobacterium sp.* αποικούσε στην πίννα πολύ καιρό πριν από την εμφάνιση θνησιμότητας (Box et al., 2020).

Η οικογένεια Mycobacteriaceae ανήκει στα ακτινοβακτήρια και περιλαμβάνει 128 έγκυρα δημοσιευμένα είδη (Lattos, Giantsis, Karagiannis, & Michaelidis, 2020). Πιο συγκεκριμένα, περισσότερα από 100 είδη μυκοβακτηριδίων και 11 υποείδη έχουν αναγνωριστεί, τα περισσότερα από τα οποία σχετίζονται με πολλές μολύνσεις μεταξύ χερσαίων και υδρόβιων οργανισμών, ακόμα και στον άνθρωπο (Furlaneto et al., 2020; Hashish et al., 2018; Loret & Dumoutier, 2019; Polaček & Aleksić-Konačević, 2016). Έχουν ανιχνευτεί ακόμα και σε μη παστεριωμένο γάλα (Nour-Neamatollahie et al., 2017; Tortoli, 2014). Πρόκειται για αερόβιους οργανισμούς. Η μετάδοση τους μπορεί να γίνει με την επαφή ή την κατάποση μολυσμένου νερού, το οποίο είναι και η πιο κοινή οδός μόλυνσης του ανθρώπου (Loret & Dumoutier, 2019).

Με εξαίρεση το *Mycobacterium leprae*, το είδος δηλαδή το οποίο ευθύνεται για τη φυματίωση στον άνθρωπο και τα ζώα, το γένος αποτελεί μια ομάδα πολύ συγγενών μυκοβακτηριακών σειρών που είναι γνωστές ως μυκοβακτηριδιακό σύμπλεγμα φυματίωσης (MTBC). Τα MTBC ξεχωρίζουν από τα μη φυματιώδη μυκοβακτηρίδια (ΜΦΜ), τα περιβαλλοντικά μυκοβακτηρίδια.

Τα μη φυματιώδη μυκοβακτηρίδια είναι ελεύθεροι οργανισμοί, παρόντες από χερσαία μέχρι υδάτινα περιβάλλοντα και μπορούν να προκαλέσουν ένα ευρύ φάσμα μυκοβακτηριακών λοιμώξεων σε ανθρώπους και ζώα, τόσο σε εκτρεφόμενους όσο και σε άγριους πληθυσμούς με συχνότερες τις πνευμονικές λοιμώξεις. Όντως, κατά τη διάρκεια των χιλιάδων ετών εξέλιξής τους, τα μυκοβακτηρίδια έχουν υποστεί εκτεταμένη εξειδίκευση, κυρίως σε σπονδυλωτούς ξενιστές ή ακόμα και σε συγκεκριμένα περιβαλλοντικά οικοσυστήματα, τα οποία τους δίνουν την δυνατότητα να εξαπλώνονται σε διάφορους ξενιστές μέσα σε αυτά, όχι μόνο ως πρωτογενή παθογόνα, αλλά και ως ευκαιριακά.

Η μυκοβακτηρίωση είναι μια σοβαρή και γενικά θανατηφόρα χρόνια λοιμώδης νόσος και συνδέεται συχνά με απώλειες σε πληθυσμούς εκτρεφόμενων οργανισμών (Whipps C. et al., 2012). Τα μυκοβακτηρίδια είναι γνωστό ότι μολύνουν διάφορους υδρόβιους οργανισμούς εκτός των ιχθύων και επιβιώνουν και πολλαπλασιάζονται μέσα σε διάφορους ξενιστές (Reavill & Schmidt, 2012). Αυτό έχει ως συνέπεια, οι φορείς τους να είναι δυνητικά παρόντες σε όλο την τροφική αλυσίδα.

Τα τελευταία χρόνια, η εμφάνιση των περιστατικών μαζικών θανάτων λόγω μυκοβακτηριδιάσεων τόσο σε χερσαία όσο και σε υδρόβια είδη έχει αυξηθεί (Kent et al., 1985). Στα θαλάσσια περιβάλλοντα, τρία είδη μυκοβακτηρίων έχουν αναφερθεί ως οι πιο κύριοι αιτιολογικοί παράγοντες των λοιμώξεων: τα *M. marinum*, *M. fortuitum* και *M. Chelonae*, χωρίς αυτό να σημαίνει πως δεν ευθύνονται και άλλα είδη (Levi et al., 2003; Rhodes et al., 2005; Whipps C. et al., 2012). Στα ψάρια η μυκοβακτηρίωση μπορεί να προκληθεί από διάφορα είδη μυκοβακτηριδίων, όπως για παράδειγμα το *M. marinum* (Hashish et al., 2018; Whipps C. et al., 2012) και το *M. pseudosottsii*. Μη φυματιώδη μυκοβακτηρίδια, έχουν βρεθεί ακόμα και σε καλλιέργεια κινέζικων οξυρρύγχων (Zhang et al., 2018). Όσον αφορά στα μαλάκια, η πλειονότητα των περιστατικών μυκοβακτηριδίωσης είναι μέχρι στιγμής σε γαστερόποδα του γλυκού νερού. Στα θαλάσσια δίθυρα, έχουν εντοπιστεί κυρίως στο θαλάσσιο χτένι του Ατλαντικού *Placopecten magellanicus*, ενώ τα στρείδια του γένους *Crassostrea* έχουν αναφερθεί ως φορείς μόλυνσης που εμπλέκονται σε ανθρώπινες ασθένειες (Grimm et al., 2016).

Η λοίμωξη με μυκοβακτηρίδια συνήθως επιφέρει μια φλεγμονώδη κατάσταση, όπως προαναφέρθηκε. Η αμυντική αντίδραση ξεκινά γενικά με τη συσσώρευση μακροφάγων στις μολυσμένες εστίες, ενώ σταδιακά μετατρέπεται σε μία μορφή επιθηλιοειδών κυττάρων. Καθώς η

λοίμωξη εξελίσσεται, η αρχικά έντονη προφλεγμονώδης αντίδραση που παρατηρείται ρυθμίζεται από κατασταλτικούς μεσολαβητές που εξισορροπούν τη φλεγμονή.

Με εξαίρεση το *M. ulcerans*, τα μυκοβακτηρίδια είναι πρωτογενή ενδοκυτταρικά παράσιτα των φαγοκυττάρων. Τα φαγοσώματα στα οποία περιέχονται μυκοβακτηρίδια πιστεύεται ότι αντιστέκονται στις φυσιολογικές διαδικασίες της οξίνισης και των φαγο-λυσosomalικών σύντηξης (Clemens, 1996; Russel D., 2001), προωθώντας έτσι την επιβίωση των βακτηρίων. Ωστόσο, σύμφωνα με τα αποτελέσματα ερευνών τα οποία περιείχαν ηλεκτρονική μικροσκοπική δειγμάτων, τα μυκοβακτηρίδια που ανιχνεύθηκαν βρίσκονταν κυρίως στο κυτταρόπλασμα χωρίς να υπάρχουν ενδείξεις για μεμβράνες φαγοσωμάτων γύρω τους. Αυτό το εύρημα φαίνεται να είναι σύμφωνο με τα πρώιμα στοιχεία, που υποδηλώνουν ότι μυκοβακτηρίδια μπορεί τελικά να διαφύγουν από τα φαγοσώματα μετατοπιζόμενα στο κυτταρόπλασμα, όπως στις περιπτώσεις του *M. tuberculosis* και *M. marinum* (Philips, 2008). Έχει προταθεί ότι η κυτταρολογική μετατόπιση μπορεί να αντανάκλα ένα εξαρτώμενο μηχανισμό ιογένεσης των παθογόνων μυκοβακτηρίων από το στέλεχος, προσδίδοντας στα συγκεκριμένα στελέχη αύξηση της ιογένεσης. Ως αποτέλεσμα των παραπάνω, είναι η αντίσταση στην αυτοφαγία (Steffani-Vallejo et al., 2018).

Η πρώτη ανίχνευση *Mycobacterium sp.* στην πίνα καταγράφηκε στην διερεύνηση της μαζικής θνησιμότητας στην περιοχή της Καμπανίας, στη θάλασσα της Τυρρηνίας (Carella et al., 2019). Τα άτομα χαρακτηρίζονταν από φλεγμονώδη αντίδραση, η οποία είναι συνήθης στις μυκοβακτηριακές λοιμώξεις και επίσης από την παρουσία ειδών μυκοβακτηριδίου στο εσωτερικό των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος. Στη συνέχεια, διεξήχθη διαγνωστική έρευνα σε θνησιγενή άτομα και από άλλες περιοχές της Ιταλίας, όπως η Τοσκάνη, η Σαρδηνία και η Απουλία, και στη συνέχεια επεκτάθηκε στην Ισπανία, στην Καταλονία. Οι μελέτες αυτές έδειξαν ότι στην πρώιμη φάση της μαζικής θνησιμότητας, τα ετοιμοθάνατα άτομα είχαν συστηματική νόσο που σχετίζεται με μόλυνση από ένα είδος μυκοβακτηριδίου, το οποίο ανήκει στο σύμπλεγμα *simiae*. Μια περαιτέρω μοριακή μελέτη, η οποία χρησιμοποίησε τον γενετικό δείκτη *hsp65* και το ριβοσωμικό εσωτερικό μεταγραφικό διάστημα DNA για τη διαφοροποίηση του στελέχους υποστήριξε ότι το μυκοβακτηρίδιο που προσβάλλει την πίνα είναι κοντά στο σύμπλεγμα *Mycobacterium triplex*, ένα σύμπλεγμα μεταξύ του *M. simiae* με το *Mycobacterium sherrisii*, και απέχει φυλογενετικά από άλλα μυκοβακτηρίδια τα οποία έχουν αναφερθεί από άλλα είδη μαλακίων και άλλους θαλάσσιους οργανισμούς. Στην πραγματικότητα, το σύμπλεγμα *M. simiae* περιλαμβάνει αργά αναπτυσσόμενα μη φυματιώδη μυκοβακτηρίδια (MMM) (Van

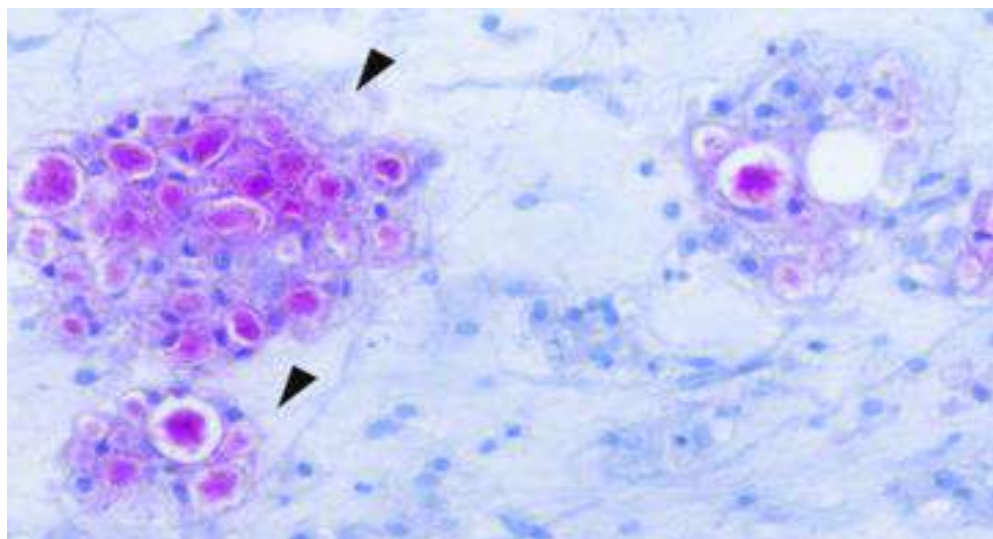
Ingen et al., 2009). Το είδος *M. sherrisii* περιγράφηκε πρόσφατα, χαρακτηρίστηκε και έχει πλέον επικυρωθεί επίσημα ως ένα νέο είδος (Selvarangan et al., 2004; van Ingen et al., 2011).

Όσον αφορά την πιθανή οδό μόλυνσης, μπορούν να γίνουν κάποιες εικασίες εξετάζοντας τη βιβλιογραφία σχετικά με άλλα είδη μυκοβακτηριδίων και τις λοιμώξεις που προκαλούν. Στη μυκοβακτηρίωση των σπονδυλωτών, η γενική οδός μόλυνσης μπορεί να είναι μέσω του πεπτικού συστήματος, του αναπνευστικού ή ακόμα και η κάθετη μετάδοση. Στην περίπτωση της πίνας, η πεπτική οδός θα μπορούσε να είναι να είναι η πιο πιθανή οδός μόλυνσης, δεδομένου του ότι οι κύριες βλάβες εντοπίστηκαν στο επίπεδο του πεπτικού αδένου. Από το πεπτικό, πιθανά το μυκοβακτηρίδιο να μπορεί να εξαπλώνεται και στα υπόλοιπα όργανα μέσω της αιμολέμφου. Αυτό το επιβεβαιώνει η παρουσία αιμοκυττάρων τα οποία είναι προσβεβλημένα με μυκοβακτηρίδια τόσο εντός του κυκλοφορικού. Αυτή η υποτιθέμενη παθογενετική οδός για την επιμόλυνση της πίνας είναι παρόμοια με πολλούς άλλους τύπους μυκοβακτηρίωσης που περιλαμβάνουν την εξάπλωση των μυκοβακτηρίων μέσω της αιματικής και της λεμφικής οδού σε ολόκληρο το σώμα, με αποτέλεσμα να μετατρέπονται σε συστηματική νόσο. Προηγούμενες περιγραφές μυκοβακτηριδίων στο χένι του Ατλαντικού *Placopecten magellanicus* αντιπροσωπεύονταν επίσης από μια φλεγμονώδη αντίδραση που αποτελούνταν από μεγάλα οζίδια με κεντρική νέκρωση σε όλο τον μανδύα, αλλά κυρίως στον προσαγωγό μυ. Άλλα συμπτώματα, όπως είναι η αιμοκυτταρική φλεγμονή, η μυϊκή νέκρωση και το ήπιο οίδημα ήταν επίσης ορατά σε άλλους ιστούς, και σε αρκετές περιπτώσεις παρατηρούνταν και στα πεπτικά σωληνάκια. Ωστόσο, οι φυλογενετικές αναλύσεις έδειξαν μεγάλες διαφορές μεταξύ αυτού του είδους και του είδους που περιγράφεται στην περίπτωση της πίνας.

Σε πολλές περιπτώσεις, ο τρόπος μετάδοσης δεν είναι σαφής. Το νερό και οι συναφείς βιοκλίμακες αποτελούν φυσικά ενδιαιτήματα για τα είδη *Mycobacterium spp.* : *M. marinum*, *M. fortuitum* και *M. chelonae*, οπότε η μετάδοση μέσω του νερού φαίνεται πιθανή. Στην πίνια, η προέλευση και η μετάδοση του μυκοβακτηριδίου παραμένουν άγνωστες, ωστόσο τα υδάτινα περιβάλλοντα αποτελούν το φυσικό ενδιαίτημα του *M. simiae complex*. Η νόσος είναι το αποτέλεσμα πολύπλοκων αλληλεπιδράσεων μεταξύ του ξενιστή, των αιτιολογικών παραγόντων και του περιβάλλοντος. Πολλές αιτίες συχνά συνεργάζονται για την πρόκληση ασθενειών (σύμπλεγμα αιτιών) και ορισμένες από αυτές είναι απαραίτητες (η απουσία τους αποτρέπει την εμφάνιση της νόσου), ενώ άλλες είναι προδιαθεσικές (προετοιμάζουν το έδαφος για τη δράση

του αναγκαία αιτία). Το σίγουρο είναι, όπως έχει ήδη προαναφερθεί πως η κλιματική αλλαγή έχει παίξει καθοριστικό ρόλο στην εξάπλωση των μυκοβακτηριδίων.

Όσον αφορά την πίνα δεν υπάρχουν παρά ελάχιστες πληροφορίες σχετικά τους παθογενετικούς μηχανισμούς του μυκοβακτηριδίου. Σε παθολογική εξέταση νοσούντων ατόμων, παρατηρούνται ακαθόριστες αλλοιώσεις, μη ειδικές οι οποίες περιλαμβάνουν γενικευμένο οίδημα ιστού, που χαρακτηρίζεται από διάχυτη διόγκωση των ιστών λόγω της συγκέντρωσης υγρών στο διάμεσο χώρο του μανδύα και των βράγχων (Carella et al., 2019). Μικροσκοπικά, τα βακτήρια φαίνονται να εντοπίζονται κυρίως εντός των ηωσινόφιλων και, σε ορισμένες περιπτώσεις, στα μελανομακροφάγα (Carella et al., 2019). Τα βακτήρια, όταν διαφεύγουν από το φαγόσωμα, εγκαθίστανται στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου του ξενιστή με τρόπο παρόμοιο με άλλα μυκοβακτηρίδια (Carella et al., 2019). Οι οξώδεις αλλοιώσεις που σχηματίζονται, κατανέμονται στο επίπεδο του συνδετικού ιστού των γονάδων και του πεπτικού και στη συνέχεια εξαπλώνονται και στα υπόλοιπα όργανα.



Εικόνα 37 Μυκοβακτηρίδια που υπάρχουν ως συσσωματώματα που γεμίζουν το ανοσοποιητικά κύτταρα (αιχμές βέλους) ή είναι παρόντα σε λίγα κύτταρα και προκαλούν ισχυρή φλεγμονώδη αντίδραση των αιμοκυττάρων στο σημείο της λοίμωξης που σχετίζεται με μελανομακροφάγα (BC) (Carella et al., 2019)

Έχουν περιγραφεί τρία διαφορετικά πρότυπα μόλυνσης με βάση την μορφολογία της φλεγμονώδους αντίδρασης που περιλαμβάνει κοκκιοκύτταρα και μελανομακροφάγα και την κατανομή της, η οποία ταξινομείται ως εστιακή, πολυεστιακή και διάχυτη. Η διάχυτη φλεγμονή διαφοροποιείται από την εστιακή φλεγμονή όταν η προσβεβλημένη περιοχή δεν έχει πολλαπλά κέντρα αιμοκυτταρικής διήθησης και τα αιμοκύτταρα είναι άφθονα και κατανεμημένα ευρέως σε

ένα μεγάλο τμήμα του ιστού (Carella et al., 2019). Η πολυεστιακή φλεγμονή σχηματίζει εγκόλπια και τα κοκκιοκύτταρα μπορεί να αναμειγνύονται με συσσωματώματα καστανών κυττάρων που βρίσκονται στον συνδετικό ιστό του πεπτικού αδένου και των γονάδων. Μέσα στα κοκκιοκύτταρα βρίσκονται τα οξεάντοχα βακτήρια (Carella et al., 2019).

Στην Ελλάδα, αν και οι θάλασσες αποτελούν τόπους πιθανής εξάπλωσης των συγκεκριμένων παθογόνων, η μόλυνση των θαλάσσιων δίθυρων από τα προαναφερθέντα παθογόνα είχε αναφερθεί αρχικά μόνο στο νησί της Λέσβου και έπειτα στον Μαλιακό κόλπο και σχετίζεται με ένα γεγονός μαζικής θνησιμότητας της πίνας (Katsanevakis, 2019).

3.5 *Vibrio* sp.

Όπως είναι ήδη γνωστό, τα δίθυρα είναι διηθηματοφάγοι οργανισμοί, δηλαδή προσλαμβάνουν την τροφή της μέσω της διήθησης. Εξαιτίας της συγκεκριμένης λειτουργίας, συσσωρεύουν μεγάλη ποσότητα βακτηριακού φορτίου. Επιπλέον, αποτελούν ξενιστές για την οικογένεια Vibrionaceae μεταξύ των άλλων βακτηριακών ειδών. Τα βακτήρια αυτά έχουν διαμορφώσει συμβιωτικές σχέσεις με τους ξενιστές τους γενικότερα. Διαδραματίζουν βασικό ρόλο στην πέψη, στην απορρόφηση θρεπτικών συστατικών, στους αμυντικούς μηχανισμούς κατά των μολυσματικών παθογόνων και στο σχηματισμό στρατηγικών αναπαραγωγής. Από την άλλη, δεν θα πρέπει να παραληφθεί ο ρόλος τους σε λειτουργίες, όπως ο κύκλος του άνθρακα και η οσμορρύθμιση (Romalde et al., 2014).

Μέχρι σήμερα, έχουν αναφερθεί 142 είδη τα οποία ανήκουν στην οικογένεια Vibrionaceae και ταξινομούνται σε επτά γένη, με το γένος *Vibrio* να αντιπροσωπεύει το πιο ευμετάβλητο (S. Prado et al., 2015; Sawabe et al., 2013). Αρκετά μέλη του γένους *Vibrio* έχουν περιγραφεί και χαρακτηριστεί ως αιτιολογικοί παράγοντες για επεισόδια μαζικής θνησιμότητας παγκοσμίως, επηρεάζοντας όλα τα στάδια ζωής των δίθυρων (Romalde et al., 2014).

Μεταξύ των παθογόνων *Vibrio* spp., το *Vibrio splendidus* έχει περιγραφεί πολλές φορές ως αιτιολογικός παράγοντας παθογενειών σε θαλάσσιους οργανισμούς, και ιδίως σε δίθυρα. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι το στρείδι του Ειρηνικού *Crassostrea gigas*, προκαλώντας

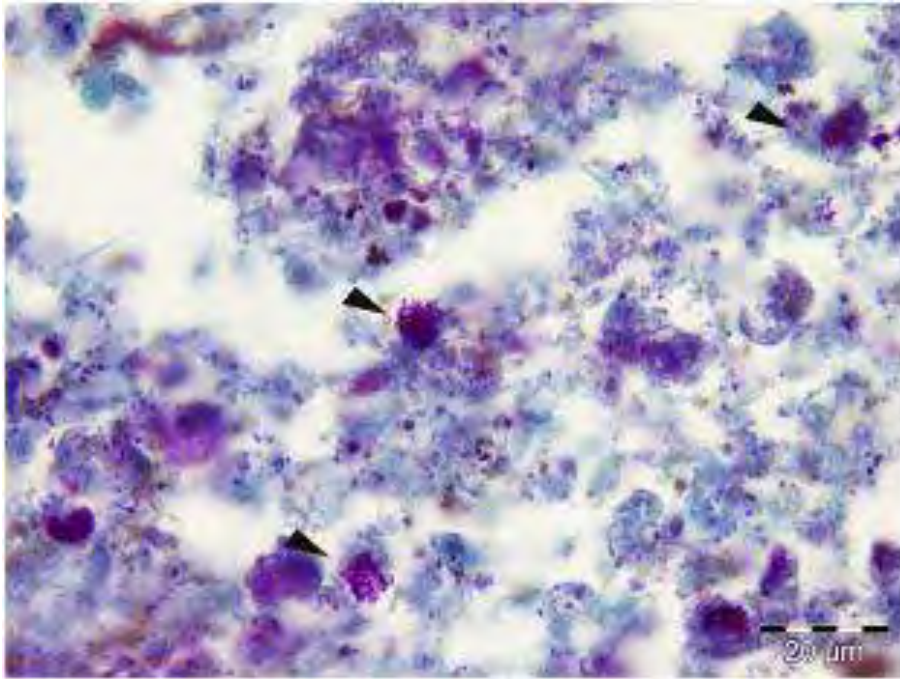
θνησιμότητα έως και 100% επί των μολυσμένων ατόμων (Gay Melanie et al., 2004; Le Roux et al., 2002; Saulnier et al., 2010). Επιπλέον, δεν γίνεται να παραλειφτούν οι συνέπειες που έχει προκαλέσει σε ένα ευρύ φάσμα άλλων μαλακίων όπως χτένια και μύδια, προκαλώντας βλαβερές συνέπειες όπως ακριβώς και στα στρείδια (Gómez-León et al., 2005; Kesarcodi-Watson et al., 2009; R. Liu et al., 2013; Nicolas J.L. et al., 1996; Oden et al., 2016). Η βιμπρίωση λόγω του *V. splendidus* συνδέεται με ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις, όπως η αποδιοργάνωση των μυϊκών ινών και έντονες φλεγμονώδεις αντιδράσεις (Gómez-León et al., 2005; Parisi et al., 2019).

Ένας άλλος παθογόνος παράγοντας είναι ο *V. harveyi*, αν και έχει αποδειχθεί ότι ανήκει στο μικροβίωμα των περισσότερων των μολυσμένων ξενιστών (X. J. Zhang et al., 2014). Στελέχη *V. harveyi* έχουν ανιχνευθεί σε πολλούς οργανισμούς, όπως καβούρια, τελεόστεα, καρκινοειδή και δίθυρα μαλάκια, προκαλώντας ανοσολογική και φυσιολογική καταστολή και θνησιμότητα (Alabi et al., 1999; Deepika et al., 2020; Firmino et al., 2019; Hashem & El-Barbary, 2013; X. Liu et al., 2014; Wei et al., 2019).

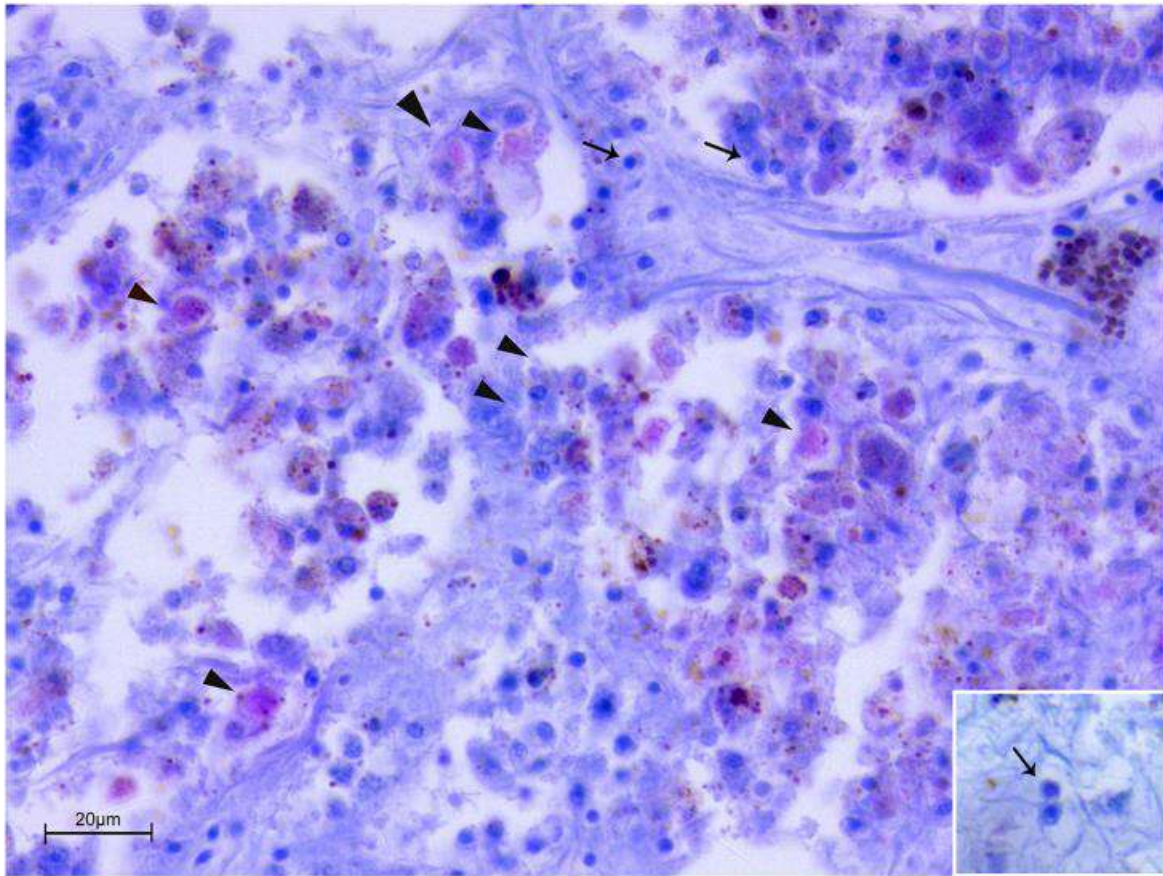
Το *V. mediterranei*, θεωρείται αναδυόμενο παθογόνο, καθώς αφθονεί σε υδάτινα περιβάλλοντα, μολύνοντας ξενιστές όπως τα κοράλλια και τα φύκια και προκαλεί θνησιμότητα συνεργιστικά με άλλα παθογόνα (Thompson et al., 2001; Yang et al., 2020). Αυτό το είδος ανιχνεύτηκε σε πλαγκτόν, ιζήματα και δείγματα θαλασσινού νερού από δύο παράκτιες περιοχές στη νότια Βαλένθια της Ισπανίας (Pujalte Maria-Jesus & Garay Esperanza, 1986). Αξίζει να σημειωθεί πως η παθογένεια του *V. mediterranei* περιγράφηκε για πρώτη φορά σε περιστατικό μαζικής θνησιμότητας στην περίπτωση του σκληρακτικού κοραλλιού *Oculina patagonica*, υπό την ονομασία *V. shiloi* ή *V. Shilonii* (Biotechnology et al., 2001).

Στην περίπτωση των μαζικών θνησιμοτήτων της πίνας στην Μεσόγειο, εντοπίστηκαν τα *Vibrio splendidus* και *V. mediterranei* (Pavlinec et al., 2020; P. Prado et al., 2020) και μάλιστα ήταν η πρώτη φορά που ανιχνεύτηκαν σε δίθυρα στην περιοχή του Αιγαίου, στα δείγματα που προήλθαν από τον Μαλιακό κόλπο και τον κόλπο της Καλλονής. Τα στελέχη του *V. splendidus*, τα οποία ήταν άφθονα στην πλειονότητα των εξετασθέντων δειγμάτων, έχει αναφερθεί ότι παρουσιάζουν την υψηλότερη ιογένεια τους σε χαμηλές θερμοκρασίες, ιδίως αν ληφθεί υπόψη η παρουσία γονιδίων ιογένεσης, ενώ η παθογένειά τους μειώνεται σε αυξημένες θερμοκρασίες (R. Liu et al., 2013, 2016). Τα γονίδια ιογένεσης ρυθμίζουν τη μετάδοση και το ρυθμό παραγωγής του παθογόνου (Andree et al., 2021). Η παρουσία γονιδίων ιογένεσης, ιδίως στα *V. splendidus* και *V.*

mediterranei, υποστηρίζει το σενάριο της συμβολής τους στη χειμερινή θνησιμότητα της πίνας στην περιοχή του Αιγαίου (Lattos, Feidantsis, et al., 2021b).



Εικόνα 38 *V. mediterranei* σε ιστό πίνας. Ιστοπαθολογική τομή με χρώση ZN.(P. Prado et al., 2020)



Εικόνα 39 Συνεργία από *Mycobacterium* sp. και *H. pinnae* σε δείγματα *P. nobilis* από την Καταλονία (χρώση ZN). Παρουσία μυκοβακτηριδίου που γεμίζει τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος (αιχμές βέλους) που σχηματίζουν οζίδια συνοδευόμενα από την παρουσία φάσεων πλασμιδίου του *H. pinnae* (βέλη) (Carella et al., 2019)



Εικόνα 40 Ο μανδύας νεκρού ατόμου προσβεβλημένου και με τα δύο παθογόνα (Scarpa et al., 2020b)



4. Κλιματική αλλαγή και *Pinna nobilis*

Ο άνθρωπος είναι κύριος του πεπρωμένου του και το πεπρωμένο του είναι η γη, που ο ίδιος την καταστρέφει μέχρι να μην του μείνει πια άλλο πεπρωμένο.

Φρίντα Κάλο Μεξικάνος ζωγράφος (1907-1954)

4.1 Κλιματική αλλαγή

Κλίμα ορίζεται η μέση καιρική κατάσταση μιας περιοχής, που προκύπτει από τις μακροχρόνιες παρατηρήσεις των διάφορων μετεωρολογικών στοιχείων. Από το κλίμα ορίζονται οι ζώνες της βλάστησης καθώς και η κατανομή των έμβιων όντων στον πλανήτη. Ο τύπος ενός κλίματος συνήθως καθορίζεται από την ταξινόμηση κατά Köppen, που υιοθετεί διαφορετικές κλιματικές ζώνες με βάση τη βλάστηση κάθε περιοχής. Οι μέσες τιμές της θερμοκρασίας, η υγρασία, οι βροχές, οι άνεμοι, το χιόνι καθώς και βίαια μετεωρολογικά φαινόμενα όπως είναι οι καταιγίδες, οι τυφώνες κλπ., είναι αυτές που ορίζουν το κλίμα και εξαρτώνται από την γωνία πρόσπτωσης των ακτίνων του Ήλιου πάνω στην Γη.

Η κλιματική αλλαγή κατά τη Διακυβερνητική Διάσκεψη για την Κλιματική Αλλαγή (Intergovernmental Panel on Climate Change -IPCC), αποτελεί μια κατάσταση του κλίματος κατά την οποία συμβαίνουν αλλαγές στο μέσο όρο και/ή τη μεταβλητότητα των ιδιοτήτων του. Οι μεταβολές αυτές αφορούν στατιστικά σημαντικές διακυμάνσεις ως προς τη μέση κατάσταση του κλίματος ή τη μεταβλητότά του, που εκτείνονται σε βάθος χρόνου. Οι κλιματικές αλλαγές οφείλονται σε φυσικές διαδικασίες και σε ανθρώπινες δραστηριότητες.

Είναι ευρέως γνωστό πως έχει σημαντικό αντίκτυπο και στα θαλάσσια οικοσυστήματα. Μεταξύ των κυριότερων επιπτώσεων της κλιματικής αλλαγής στα θαλάσσια οικοσυστήματα είναι η μειωμένη παραγωγικότητα των ωκεανών και η εξάπλωση παθογόνων μικροοργανισμών.

Όσον αφορά τους οργανισμούς και κατά κύριο λόγο τους θαλάσσιους, η κλιματική αλλαγή έχει άμεσες επιπτώσεις οι οποίες εντοπίζονται κυρίως στις μακρομοριακές κυτταρικές δομές και λειτουργίες τους και κατ' επέκτασιν στη φυσιολογία τους. Οι θερμοκρασιακές μεταβολές στο θαλάσσιο περιβάλλον επηρεάζουν την ανάπτυξη και τις φυσιολογικές αντιδράσεις των οργανισμών, όπως η ανοσολογική δραστηριότητα, και έχουν επίσης αντίκτυπο στην παθογένεια των βακτηρίων και των παρασίτων. Αυτά έχουν ως αποτέλεσμα μεταβολές στην ανάπτυξη, την αναπαραγωγή, την παθολογία και την επιβίωσή των οργανισμών. Οι οργανισμοί διαθέτουν συγκεκριμένους μηχανισμούς για να αποκρίνονται στις οικολογικές πιέσεις (με προσαρμογή του μεταβολισμού τους), ενώ έχει αναπτυχθεί πληθώρα βιοδεικτών και βιομαρτύρων για την εκτίμηση των περιβαλλοντικών επιπτώσεων. Οι βιοχημικές και μεταβολικές αποκρίσεις των οργανισμών χρησιμοποιούνται ευρέως ως δείκτες του στρες των οργανισμών. Είναι προφανές

πως το περιβαλλοντικό στρες επιδρά έμμεσα και στην υγεία του Οικοσυστήματος σε επίπεδο πληθυσμού ή βιοκοινότητας.

Σε παγκόσμιο επίπεδο, αρκετοί συγγραφείς έχουν επισημάνει ότι η Μεσόγειος Θάλασσα θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως φυσικό εργαστήριο για τη μελέτη γεωδυναμικών και παλαιοκλιματικών διεργασιών σε διάφορες κλίμακες και ως ένα μικροσκοπικό μοντέλο των ωκεανών του κόσμου έτσι ώστε να αποφευχθεί η μεγάλη καταστροφή (Krijgsman, 2002; Lejeusne et al., 2010).

4.2 Μεταβολές στις δομές

Η μεταβολή της θερμοκρασίας, η οποία είναι άμεση συνέπεια της κλιματικής αλλαγής, επηρεάζει τις δομές εντός του κυττάρου, στους ζώντες οργανισμούς, όπως αναφέρθηκε ήδη. Πιο συγκεκριμένα, η κλιματική αλλαγή επιδρά διαφορετικά σε διάφορες κυτταρικές δομές. Οι πρωτεΐνες, ως συστατικά του κυττάρου είναι ευαίσθητες στις υψηλές θερμοκρασίες. Οι ανώτερες διαμορφώσεις της δομής μιας πρωτεΐνης (δευτεροταγής, τριτοταγής και 2 τεταρτοταγής) σταθεροποιούνται σε μεγάλο βαθμό από ασθενείς αλληλεπιδράσεις, οι οποίες επηρεάζονται από αλλαγές της θερμοκρασίας (H. Pörtner, 2001; Portner, 2002; H. O. Pörtner & Knust, 2007). Η αύξηση της θερμοκρασίας εντός ορίων ανοχής έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της δραστηριότητας των πρωτεϊνών. Όταν ξεπεραστεί το όριο ανοχής, οδηγούνται σε αναστολή της λειτουργίας τους. Σε αντίθεση με τις πρωτεΐνες, των οποίων η δομή αποσταθεροποιείται σε χαμηλές θερμοκρασίες, στα νουκλεϊκά οξέα συμβαίνει το ακριβώς αντίθετο (H. Pörtner, 2001; Portner, 2002; H. O. Pörtner & Knust, 2007). Οι κυτταρικές μεμβράνες και κυρίως τα λιπιδικά τους τμήματα είναι επίσης ιδιαίτερα ευαίσθητα σε αλλαγές της θερμοκρασίας. Οι υψηλές θερμοκρασίες έχουν ως αποτέλεσμα τη μετατροπή του κυλινδρικού σχήματος των μεμβρανών σε κωνικό σχήμα, το οποίο δεν επιτρέπει τη σωστή διάταξη των λιπιδίων. Αντίθετα, οι χαμηλές θερμοκρασίες οδηγούν στην «φάση γέλης», με αποτέλεσμα τη δημιουργία ασθενών δεσμών μεταξύ των φωσfolιπιδίων, τη μείωση της ρευστότητάς τους και τον περιορισμό της κινητικότητας των πρωτεϊνών στο λιπιδικό στρώμα (H. Pörtner, 2001; Portner, 2002; H. O. Pörtner & Knust, 2007).

Τέλος, οι αλλαγές της θερμοκρασίας του σώματος συνοδεύονται από αλλαγές στο pH. Για την πλειοψηφία των οργανισμών, οι τιμές του pH στα εξωτερικά και ενδοκυτταρικά υγρά μειώνονται με την αύξηση της θερμοκρασίας (H. Pörtner, 2001; Portner, 2002; H. O. Pörtner & Knust, 2007).

4.3 Σύνδεση της κλιματικής αλλαγής και της παθογένειας της *Pinna nobilis*

Η υπερθέρμανση του πλανήτη επηρεάζει τα υδάτινα οικοσυστήματα, επιταχύνοντας την ανάπτυξη παθογόνων μικροοργανισμών και τοξικών μικροφυκών στα θαλάσσια ενδιαιτήματα, επηρεάζοντας και τα δίθυρα μαλάκια. Νέες εισβολές παρασίτων συνδέονται άμεσα με την αύξηση της θερμοκρασίας των ωκεανών (Zgouridou et al., 2022). Οι ανθρωπογενείς κυρίως επιπτώσεις οδηγούν σε αλλαγές στη δυναμική των επιδημιών μολυσματικών θαλάσσιων ασθενειών (Tracy et al., 2019). Η μείωση της βιοποικιλότητας, η μετανάστευση των ειδών και η μεταβολή των φυσικών ενδιαιτημάτων και της σύνθεσης των κοινοτήτων λόγω της ανθρώπινης δράσης και της κλιματικής αλλαγής, διευκολύνουν την εμφάνιση πανδημικών μολυσματικών θαλάσσιων ασθενειών, με σημαντικό οικονομικό και οικοσυστημικό κόστος (Harvell et al., 2019; Lafferty et al., 2015). Η πίνα θεωρείται ένα είδος-δείκτης, το οποίο θα μπορούσε να παρέχει πληροφορίες για το τι πρόκειται να συμβεί στην παγκόσμια οικολογία στο πλαίσιο της σημερινής υπερεκμετάλλευσης του περιβάλλοντος (Basso et al., 2015b). Στα πλαίσια αυτού του φαινομένου, εκπονήθηκαν εργασίες κατά τις οποίες φαίνεται πως τα φαινόμενα μαζικής θνησιμότητας στην πίνα συνδέονται άρρηκτα με την αύξηση της θερμοκρασίας.

Ενδεικτική μελέτη μπορεί να θεωρηθεί μια έρευνα του 2020 κατά την οποία, τα φαινόμενα της μαζικής θνησιμότητας συνδέθηκαν με την αύξηση της θερμοκρασίας στην Μεσόγειο (García-March et al., 2020). Πράγματι, τα αποτελέσματα που σχετίζονταν με τον ρυθμό θνησιμότητας και την θερμοκρασία έδειξαν πως υπάρχει ένα θερμοκρασιακό κατώφλι πάνω από το οποίο οι θνησιμότητες αυξάνονταν. Η σημαντικότερη παρατήρηση ήταν πως το θερμοκρασιακό κατώφλι για την ενεργοποίηση του απλοσποριδίου βρίσκεται μεταξύ των 12,3°C στους 14 °C (García-March et al., 2020). Μάλιστα, αξίζει να σημειωθεί πως η επιβίωση των μολυσμένων ατόμων

αυξανόταν αν η θερμοκρασία έπεφτε κάτω από τους 14 °C. Η παρατήρηση αυτή συμπίπτει και με άλλη μία έρευνα (Cabanellas-Reboredo et al., 2019), κατά την οποία παρατηρήθηκαν παρόμοια αποτελέσματα.

Αντίστοιχα, η θνησιμότητα της πίνας που οφείλονταν στο *V. mediterranei* που σχετιζόταν με τις θερμές θερμοκρασίες του καλοκαιριού, οδήγησε σε αύξηση της θνησιμότητας πάνω από τους 25 °C, ενώ το *V. splendidus*, παρουσιάζει την υψηλότερη ιογένεια τους σε χαμηλές θερμοκρασίες (R. Liu et al., 2013, 2016), διαδραματίζοντας ρόλο στην χειμερινή θνησιμότητα (Lattos, Bitchava, et al., 2021). Ωστόσο, λαμβάνοντας υπόψη ότι το *Vibrio* είναι ένα κοσμοπολίτικο γένος (Tarazona et al., 2014) και ότι η ιογένεια του εξαρτάται από την θερμοκρασία, τα βακτήρια φαίνεται να είναι ευκαιριακά και δεν είναι υπεύθυνα για την μαζική θνησιμότητα. Όσον αφορά τα μυκοβακτηρίδιο είναι πλέον γνωστό πως δρα συνεργιστικά αυξάνοντας την ιωτικότητα της νόσου (Lattos, Feidantsis, et al., 2023).

Στην Ελλάδα έγιναν έρευνες σε δύο πληθυσμούς πίνας (στον Μαλιακό κόλπο και στον Κόλπο της Καλλονής) που στόχο είχαν την μελέτη των εποχιακών αντιοξειδωτικών ενζυμικών δραστηριοτήτων, της hsp70 και τα επίπεδα mRNA καταλάσης κατά τη διάρκεια εκδηλώσεων μαζικής θνησιμότητας. Οι δειγματοληψίες έγιναν τους μήνες Φεβρουαρίου με μέσες θερμοκρασίες ($14 \pm 1,2$ °C και 15 ± 1 °C αντίστοιχα), τον Απρίλιο ($18 \pm 1,2$ °C και $17 \pm 1,3$ °C αντίστοιχα) και τον Ιούνιο ($24,5 \pm 1,5$ °C και $21,5 \pm 1,5$ °C αντίστοιχα) 2020 και τον Ιούλιο του ίδιου έτους ($26,5 \pm 1,7$ °C στη Φθιώτιδα και $24,5 \pm 1,7$ °C στη Λέσβο). Στις δειγματοληψίες του Ιουλίου δεν βρέθηκε κανένα ζωντανό δείγμα. Όλες οι βιοχημικές παράμετροι και η φυλογενετική ανάλυση υποδηλώνουν ότι η μόλυνση από το παθογόνο αυξάνει την ευαισθησία της πίνας στη θερμοκρασία του νερού, οδηγώντας στη συνέχεια σε μαζική θνησιμότητα. Αυτή η παρατήρηση ήταν εμφανής στα άτομα τα οποία συλλέχθηκαν στον Μαλιακό κόλπο στα οποία υπήρχαν και οι δύο παθογόνοι παράγοντες (Lattos, Papadopoulos, et al., 2023).

Σε άλλη μελέτη αποδείχτηκε πως αν και στους συγκεκριμένους πληθυσμούς δεν υπήρξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην εποχιακή θερμοκρασία του θαλασσινού νερού, η συνακόλουθη διαφορά των 1,5 °C (μέση τιμή των 26 °C στον Μαλιακό σε σύγκριση με 24,5 °C στην Καλλονή) έχει παίξει ρόλο στην παθογένεια του παρασίτου. Αυτό επιβεβαιώνεται από το γεγονός ότι οι πληθυσμοί που είχαν μολυνθεί μόνο από το *Mycobacterium spp.* συνεχίζουν τον

αποικισμό των refugia κυρίως με το να κατοικούν σε μεγαλύτερα βάθη, όπου οι διακυμάνσεις της θερμοκρασίας είναι ηπιότερες, και ως εκ τούτου ο πολλαπλασιασμός των παθογόνων αναμένεται να είναι σημαντικά χαμηλότερος (Lattos, Feidantsis, et al., 2023).



Εικόνα 41 Κελύφη από νεκρές πίνες <https://ilpiccolo.gelocal.it/>

5. Μεταβολισμός και μεταβολικά ένζυμα

Η Βιολογία είναι στην πραγματικότητα Χημεία, η Χημεία είναι στην πραγματικότητα Φυσική, η Φυσική είναι στην πραγματικότητα Μαθηματικά και τα Μαθηματικά είναι στην πραγματικότητα Φιλοσοφία.

Ανώνυμος

5.1 Μεταβολισμός

Μεταβολισμός χαρακτηρίζεται το αθροιστικό σύνολο των χημικών διεργασιών που γίνονται στα κύτταρα ενός ζωικού οργανισμού κατά τις οποίες είτε αποθηκεύεται ενέργεια (διαδικασία αναβολισμού), είτε απελευθερώνεται από τα μόρια ενέργεια (περίπτωση καταβολισμού). Κατά συνέπεια, ο μεταβολισμός επιδρά και στην αύξηση. Όλες οι μεταβολικές αντιδράσεις πραγματοποιούνται σε διάφορα χρονικά στάδια όπου δημιουργούνται ή διασπώνται βαθμιαία χημικές ενώσεις. Κάθε τέτοιο στάδιο της "μεταβολικής οδού" καταλύεται από διαφορετικό κάθε φορά ένζυμο, η δομή του οποίου κωδικοποιείται από συγκεκριμένο γονίδιο. Το τελικό προϊόν κάθε τέτοιας διαδικασίας ονομάζεται μεταβολίτης. Το πρώτο βήμα στον ενεργειακό καταβολισμό είναι η διάσπαση του γλυκογόνου ή των τριγλυκεριδίων σε απλούστερες ενώσεις. Το δεύτερο στάδιο του καταβολισμού των υδατανθράκων είναι η γλυκόλυση ενώ αυτού των τριγλυκεριδίων είναι η β οξείδωση των λιπαρών οξέων. Το τελικό, στάδιο είναι ο κύκλος του κιτρικού οξέος και η οξειδωτική φωσφορυλίωση.

5.11 Γλυκόλυση

Με τον όρο γλυκόλυση, χαρακτηρίζεται γενικά η βιοχημική διεργασία της διάσπασης σακχάρων και ιδιαίτερα της γλυκόζης. Η γλυκόλυση αποτελεί το πρώτο στάδιο της κυτταρικής αναπνοής, ανεξάρτητα της αναγκαίας παρουσίας ή όχι οξυγόνου και πραγματοποιείται τόσο στην αεροβική όσο και στην αναεροβική αναπνοή, των κυττάρων. Στα ευκαρυωτικά κύτταρα, η γλυκόλυση λαμβάνει χώρα στο κυτοσόλιο. Κατά τη γλυκόλυση η γλυκόζη μετατρέπεται σε δύο μόρια πυροσταφυλικού οξέος. Η γλυκολυτική πορεία διαιρείται σε τρία στάδια:

Στάδιο 1

- α) Η γλυκόζη φωσφορυλιώνεται από την ATP για να σχηματίσει την 6-φωσφορική γλυκόζη. Καταλύεται από την *εξοκινάση*.
- β) Η 6-φωσφορική γλυκόζη ισομεριώνεται προς 6-φωσφορική φρουκτόζη. Καταλύεται από την *ισομεράση της φωσφογλυκόζης*.
- γ) Η 6-φωσφορική φρουκτόζη φωσφορυλιώνεται από την ATP για να σχηματίσει την 1,6-διφωσφορική φρουκτόζη, η οποία διασπάται σε φωσφορική διυδροξυακετόνη και σε 3-φωσφορική γλυκεραλδεϋδη. Καταλύεται από την *αλδολάση*.

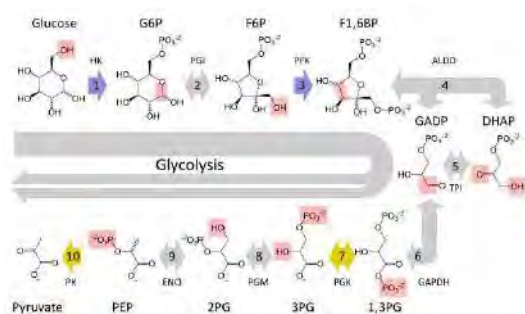
Στάδιο 2

- α) Η φωσφορική διυδροξυακετόνη συνεχίζει την πορεία μόνο αν μετατραπεί σε μία 3-φωσφορική γλυκεραλδεΐδη. Καταλύεται από την *ισομεράση των φωσφορικών τριοζών*.
- β) Τα δύο μόρια της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης, μετατρέπονται σε 1,3-διφωσφογλυκερικό. Καταλύεται από την *αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης*.

Στάδιο 3

- α) Το 1,3-διφωσφογλυκερικό σχηματίζεται σε 3-φωσφογλυκερικό. Καταλύεται από την *κινάση του φωσφογλυκερικού*.
- β) Το 3-φωσφογλυκερικό αναδιατάσσεται σε 2-φωσφογλυκερικό με τη βοήθεια της *μοντάσης του φωσφογλυκερικού*.
- γ) Το 2-φωσφογλυκερικό αφυδατώνεται σε φωσφο-ενολο-πυροσταφυλικό το οποίο καταλύεται από την *ενολάση*.
- δ) Τέλος, το φωσφο-ενολο-πυροσταφυλικό, μετατρέπεται σε μια σταθερή κετόνη, το πυροσταφυλικό. Καταλύεται από την *κινάση του πυροσταφυλικού*.

Στη συνέχεια από το πυροσταφυλικό μπορεί να σχηματιστεί : Γαλακτικό οξύ, Ακετυλο-Συνένζυμο Α ή Ακεταλδεΐδη.

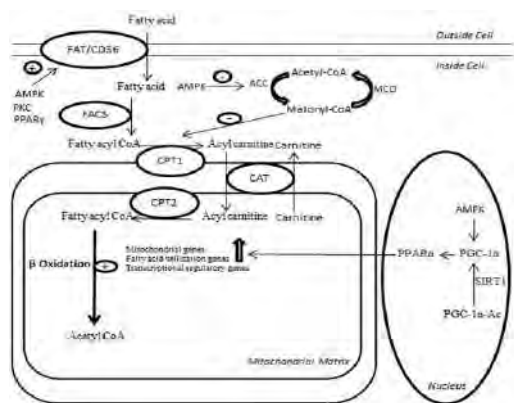


Εικόνα 42 Τα βήματα της γλυκόλυσης <https://www.thoughtco.com/>

5.12 β-οξείδωση λιπαρών οξέων

Τα λιπαρά οξέα διασπώνται σε ακετυλο-CoA με β-οξείδωση και παράγεται NADH. Η β-οξείδωση των λιπαρών οξέων είναι ο κυριότερος τρόπος απελευθέρωσης της ενέργειας από τα αποταμιευτικά λιπίδια. Τα ένζυμα της β-οξείδωσης βρίσκονται στα μιτοχόνδρια στους ζωικούς οργανισμούς και στους φυτικούς στα υπεροξειδισώματα. Αρχικές ενώσεις της β-οξείδωσης

είναι τα αντίστοιχα ακυλο-CoA, τα οποία παράγονται με τη δράση μιας ακυλοτρανφεράσης. Στο τέλος της β-οξείδωσης παράγεται ακέτυλο-CoA εισέρχεται στο κύκλο του κιτρικού οξέος ή στο γλυκοξυλικό κύκλο. Ένα μόριο παλμιτικού οξέος καταλήγει ύστερα από τη πλήρη οξείδωσή του σε 106 μόρια ATP.



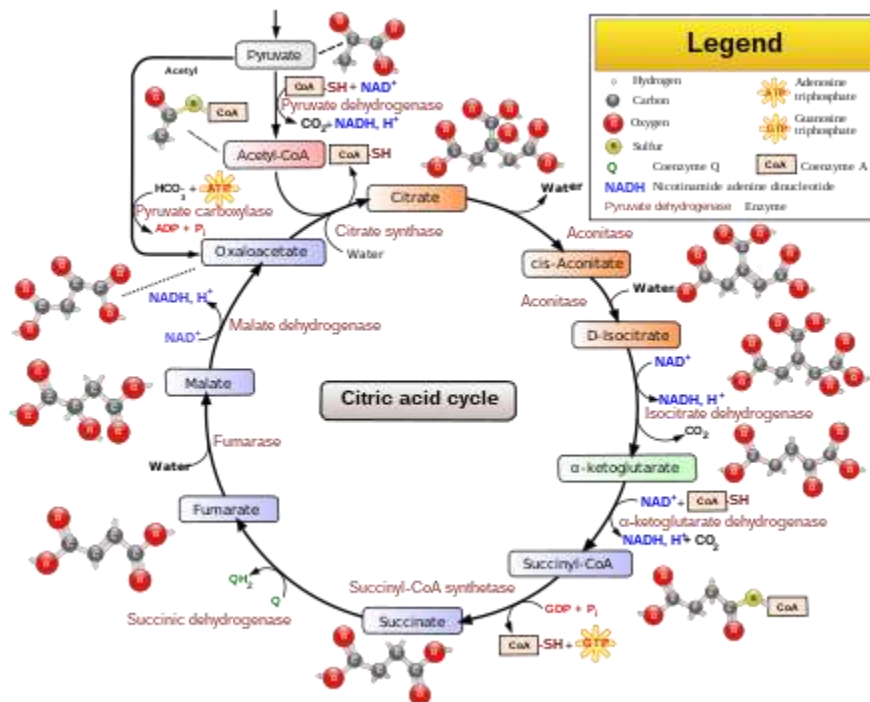
Εικόνα 43 Το μονοπάτι της β-οξείδωσης <https://lipidlibrary.aocs.org/>

5.13 Κύκλος του Krebs

Ο κύκλος του Krebs, είναι το τελικό στάδιο αποδόμησης των υδατανθράκων, των λιπών και των αμινοξέων που προσλαμβάνονται με τη τροφή. Αποτελεί σημαντικό μέρος της αερόβιας αναπνοής. Στα περισσότερα κύτταρα ο κύκλος του κιτρικού οξέος διεκπεραιώνει τα 2/3 του συνόλου των οξειδώσεων των ενώσεων του άνθρακα. Τα ένζυμα που απαιτούνται για τον κύκλο του κιτρικού οξέος βρίσκονται στα μιτοχόνδρια. Το πρώτο από αυτά τα ένζυμα καταλύει την αντίδραση που ενώνει την ακετυλομάδα του ακέτυλο-CoA με ένα μόριο οξαλοξικού οξέος για το σχηματισμό κιτρικού οξέος. Το κιτρικό οξύ οξειδώνεται σταδιακά και η ενέργεια οξείδωσης χρησιμοποιείται για να φτιαχτούν μόρια υψηλής ενέργειας. Τα τελικά μόρια αυτού του κύκλου είναι δύο μόρια διοξειδίου του άνθρακα και οξαλικό, το οποίο χρησιμοποιείται ξανά σε ένα νέο κύκλο. Σε αρκετά βήματα, ηλεκτρόνια μεταφέρονται από το υπόστρωμα σε άλλα μόρια, όπως το NADH και το FADH₂. Στη συνέχεια αυτά τα δύο μόρια μεταφέρουν τα υψηλής ενέργειας ηλεκτρόνια τους στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων ώστε να πραγματοποιηθεί η οξειδωτική φωσφορυλίωση. Αυτά τα ηλεκτρόνια στο τέλος αντιδρούν με το οξυγόνο και παράγουν νερό.

Ο κύκλος του κιτρικού οξέος λειτουργεί επίσης ως αφετηρία για άλλες αντιδράσεις βιοσύνθεσης επειδή παράγει σημαντικά ενδιάμεσα, όπως το οξαλοξικό και το α-κετογλουταρικό οξύ. Οι

ενώσεις αυτές παράγονται από τον καταβολισμό μεταφέρονται από τα μιτοχόνδρια στο κυτταρόπλασμα, όπου συμμετέχουν σε αντιδράσεις ως πρόδρομες ενώσεις για τη σύνθεση διάφορων μορίων, όπως για παράδειγμα τα αμινοξέα.



Εικόνα 44 Σχεδιάγραμμα του κύκλου του Krebs wikipedia

Ο κύκλος χωρίζεται σε οχτώ βήματα στα οποία συμμετέχουν διαφορετικά ένζυμα και μόρια.

- Αρχικά, με τη δράση του ενζύμου συνθεάση του κιτρικού η ακετυλομάδα του ακετυλο-CoA μεταφέρεται στο οξαλοξικό. Το ένζυμο αφαιρεί ένα πρωτόνιο από τη μεθυλική ομάδα του ακετυλο-CoA. Το φορτισμένο αρνητικό CH₂⁻ που δημιουργήθηκε, συνδέεται με ένα άνθρακα της καρβονυλικής ομάδας του οξαλοξικού και το συνένζυμο A απελευθερώνεται με υδρόλυση. Με την υδρόλυση απελευθερώνεται σημαντική ποσότητα ελεύθερης ενέργειας που προωθεί την αντίδραση.
- Σε μία αντίδραση ισομερίωσης, το ένζυμο ακοτινάση καταλύει την αφυδάτωση του κιτρικού παράγοντας cis-ακοτινικό. Το ίδιο ένζυμο έπειτα καταλύει την υδρόλυση του cis-ακοτινικού για τη δημιουργία ισοκιτρικού, δηλαδή έγινε ισομερίωση του κιτρικού σε ισοκιτρικό.
- Αυτό είναι το πρώτο βήμα οξείδωσης του κύκλου. Σε αυτό το βήμα, το ισοκιτρικό μετατρέπεται σε α-κετογλουταρικό σε μια αντίδραση οξειδωτικής αποκαρβοξυλίωσης.

Πρόκειται για μια πολύπλοκη αντίδραση που καταλύεται από την ισοκιτρική αφυδρογονάση και λαμβάνει χώρα σε τρία στάδια. Η υδροξυλομάδα του ισοκιτρικού οξειδώνεται σε κετόνη. Αυτή η αντίδραση παράγει ένα ασταθές προϊόν που απελευθερώνει διοξείδιο του άνθρακα, ενώ το NAD^+ ανάγεται NADH .

- Σε αυτό το στάδιο το συνένζυμο Α εισέρχεται ξανά στον κύκλο. Σε αυτό το βήμα, το ενζυμικό σύμπλοκο αφυδρογονάση του α-κετογλουταρικού, το οποίο μοιάζει πολύ με αυτό της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης που καταλύει τη μετατροπή του πυροσταφυλικού σε ακέτυλο- CoA , καταλύει μια σειρά αντιδράσεων. Και πάλι γίνονται τρεις διεργασίες. Το α-κετογλουταρικό χάνει μια καρβοξυλική ομάδα ως CO_2 , ενώ NAD^+ ανάγεται σε NADH . Το συνένζυμο Α συνδέεται με το προϊόν, το ηλεκτρικό και σχηματίζει το ηλεκτρυλο- CoA . Ο δεσμός μεταξύ του ηλεκτρικού του συνενζύμου Α είναι θειοεστερικός δεσμός υψηλής ενέργειας.
- Στο πέμπτο βήμα, το ηλεκτρυλο- CoA μετατρέπεται σε ηλεκτρικό. Το ένζυμο ηλεκτρυλο- CoA συνθάση καταλύει μια συζευγμένη αντίδραση στην οποία διασπάται ο θειοεστερικός δεσμός υψηλής ενέργειας και προστίθεται μια φωσφορική ομάδα στο GDP για σχηματισμό GTP . Στα βακτήρια και τα φυτά αντί GTP σχηματίζεται ATP .
- Στο τρίτο βήμα οξείδωσης του κύκλου, η ηλεκτρική αφυδρογονάση καταλύει την οξείδωση του ηλεκτρικού σε φουμαρικό οξύ και ανάγει τον παράγοντα FAD σε FADH_2 .
- Η προσθήκη νερού στο διπλό δεσμό του φουμαρικού δίνει μηλικό. Η αντίδραση καταλύεται από το ένζυμο φουμαράση.
- Στο τελικό βήμα του κύκλου, και το τελευταίο από τα τέσσερα βήματα οξείδωσης, η μηλική αφυδρογονάση καταλύει την αναγωγή NAD^+ σε NADH και την οξείδωση του μηλικού σε οξαλοξικού, με τη μετατροπή της υδροξυλομάδας σε μια ομάδα καρβονυλίου. Με αυτό τον τρόπο αναγεννάται το οξαλοξικό που χρησιμοποιήθηκε στο πρώτο βήμα του κύκλου.
- Μια πλήρης περιστροφή του κύκλου καταλήγει στην παραγωγή δύο μορίων διοξειδίου του άνθρακα, τριών μορίων NADH , ενός μορίου FADH_2 και ενός μορίου GTP , το οποίο ενζυμικά μπορεί να μετατραπεί σε ATP . Η οξειδωτική φωσφορυλίωση αποδίδει τρία μόρια ATP ανά μόριο NADH και δύο μόρια ATP ανά μόριο FADH_2 . Όμως, το κυτταροπλασματικό NADH που παράγεται κατά τη γλυκόλυση αποδίδει δύο μόρια ATP στην οξειδωτική φωσφορυλίωση διότι πρέπει να μεταβιβάσει τα ηλεκτρόνια στο FADH_2

του μιτοχονδρίου. Άρα από τα παραπάνω και έχοντας υπόψη ότι απαιτούνται δύο κύκλοι προκύπτει ότι από την πλήρη οξείδωση της γλυκόζης παράγονται 36 μόρια ATP, που αντιπροσωπεύει το 40% της δυνητικής ενέργειας της γλυκόζης.

5.2 Ένζυμα

Τα ένζυμα είναι ειδικές πολύπλοκες οργανικές ενώσεις, πρωτεϊνικής φύσεως οι οποίες αποτελούνται από πολυμερή αμινοξέων. Δρουν ως καταλύτες στις χημικές αντιδράσεις του μεταβολισμού των οργανισμών, επιταχύνοντας την χημική αντίδραση και μειώνοντας την ενέργεια ενεργοποίησης. Ονομάζονται και βιοκαταλύτες. Σχεδόν όλες οι χημικές αντιδράσεις στα κύτταρα απαιτούν τη ρυθμιστική δράση των ενζύμων. Όπως όλοι οι καταλύτες, έτσι και τα ένζυμα λειτουργούν αυξομειώνοντας την ενέργεια ενεργοποίησης μιας αντίδρασης. Ωστόσο, τα ένζυμα διαφέρουν από τους υπόλοιπους καταλύτες ως προς την εξειδίκευση, καθώς είναι πολύ πιο περιοριστικά εξειδικευμένα από αυτούς - κάθε ένζυμο μπορεί να καταλύσει μια συγκεκριμένη μόνο αντίδραση. Ορισμένα ένζυμα που συμμετέχουν σε διεργασίες του βασικού μεταβολισμού και τα οποία μετρήθηκαν φασματοφωτομετρικά στην παρούσα εργασία είναι τα παρακάτω:

- Η αφυδρογονάση γαλακτικού οξέος (L-LDH), είναι το κυτταροπλασματικό ένζυμο που καταλύει την αντιστρεπτή μετατροπή του γαλακτικού οξέος σε πυροσταφυλικό οξύ στον κύκλο της γλυκόλυσης. Το NAD⁺ ανάγεται σε NADH κατά τη διάρκεια της διαδικασίας και αντίστροφα. Η αρχική ταχύτητα σχηματισμού του NADH είναι ευθέως ανάλογη της καταλυτικής δραστηριότητας της LDH. Η γαλακτική αφυδρογονάση, είναι δείκτης του ρυθμού αναερόβιας οξείδωσης των υδατανθράκων μέσω της γλυκόλυσης

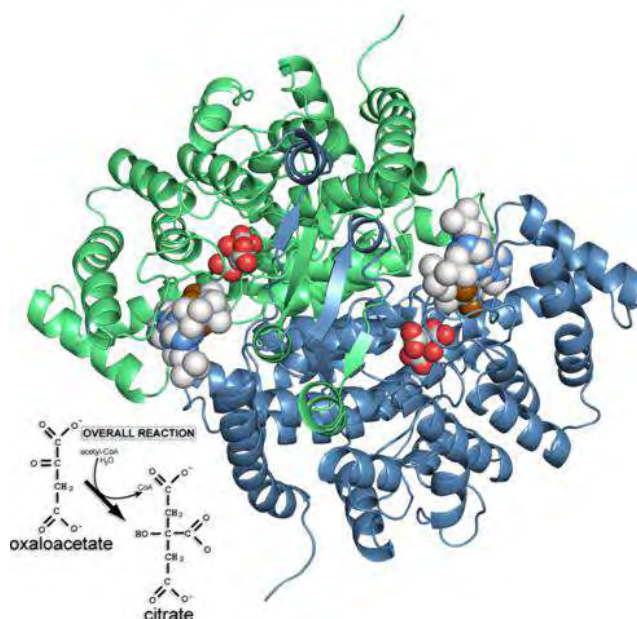


Εικόνα 45 Γαλακτική αφυδρογονάση, wikipedia

Σε περίπτωση διατάραξης της ομοιόστασης εντοπίζονται αυξημένα επίπεδα LDH στο αίμα, από περιβαλλοντικούς ή παθολογικούς παράγοντες. Σε περίπτωση παρουσίας υψηλών συγκεντρώσεων γαλακτικού οξέος στον οργανισμό, το ένζυμο αναστέλλεται μέσα από το φαινόμενο της αντίστροφης ανάδρασης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του ρυθμού μετατροπής του πυροσταφυλικού σε γαλακτικό. Η μεγαλύτερη ποσότητα του παραγόμενου πυροσταφυλικού οξέος εισέρχεται στα μιτοχόνδρια του κυττάρου και μεταβολίζεται στον κύκλο των τρικαρβοξυλικών οξέων (κύκλος Krebs) προς παραγωγή CO₂, H₂O και επιπρόσθετης ενέργειας. Σε συνθήκες φυσιολογικής οξυγόνωσης του κυττάρου, μικρό μόνο μέρος του παραγόμενου πυροσταφυλικού οξέος μετατρέπεται σε γαλακτικό οξύ με την καταλυτική δράση της γαλακτικής αφυδρογονάσης (LDH) (Γ.Τσουφάκης, 2001

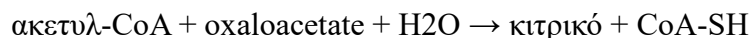
Το ένζυμο απαντάται σε πολλούς ιστούς, με τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις να εντοπίζονται στο μυοκάρδιο, τους νεφρούς, το ήπαρ και τους σκελετικούς μύες. Σε μικρότερες ποσότητες υπάρχει στα ερυθρά αιμοσφαίρια, το πάγκρεας, τον εγκέφαλο και τους πνεύμονες. Η συγκέντρωση του ενζύμου στους ιστούς είναι περίπου 500 φορές υψηλότερη απ' αυτή του ορού, και συνεπώς, κάθε καταστροφή κυττάρων στους παραπάνω ιστούς συνοδεύεται από σημαντική αύξηση των επιπέδων της γαλακτικής αφυδρογονάσης στον ορό του αίματος που δυστυχώς λόγω της ευρείας κατανομής στον οργανισμό, η μέτρησή της αποτελεί ένα μη ειδικό δείκτη κυτταρικής βλάβης.

- Το ένζυμο συνθετάση του κιτρικού (CS) υπάρχει σχεδόν σε όλα τα ζώντα κύτταρα και δρα στο πρώτο από τα οκτώ βήματα του κύκλου Krebs (κύκλος κιτρικού οξέος). Εντοπίζεται εντός των ευκαρυωτικών κυττάρων στα μιτοχόνδρια, αλλά κωδικοποιείται από πυρηνικό DNA (Wiegand, G., & Remington, S. J., 1986). Καταλύει την αντίδραση συμπύκνωσης του υπολείμματος οξικού από το ακετύλιο συνένζυμο Α και ένα μόριο οξαλοξικού οξέος για τον σχηματισμό του κιτρικού, δηλαδή βοηθά την ακετυλομάδα του ακετύλιο-CoA να μεταφερθεί



Εικόνα 46 Κιτρική συνθάση <https://proteopedia.org/>

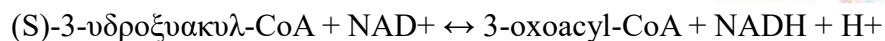
στο οξαλοξικό κατά την μετατροπή του κιτρικού οξέος σε ισοκιτρικό. Η δράση του σχετίζεται την κατάλυση της αντίδρασης συμπύκνωσης δύο ατόμων άνθρακα, χάρη στο ακετυλο-CoA και ένα μόριο τεσσάρων ατόμων άνθρακα οξαλοξικού οξέος, που περιέχει, για το σχηματισμό κιτρικού με έξι άτομα άνθρακα.



- Η αφυδρογονάση του β-υδροξυακυλο-CoA

(HOAD) ανήκει στην οικογένεια των οξειδορεδοκτασών, και πιο συγκεκριμένα σε εκείνα που δρουν στην ομάδα CH-OH του δότη με NAD⁺ ή NADP⁺ ως αποδέκτη.

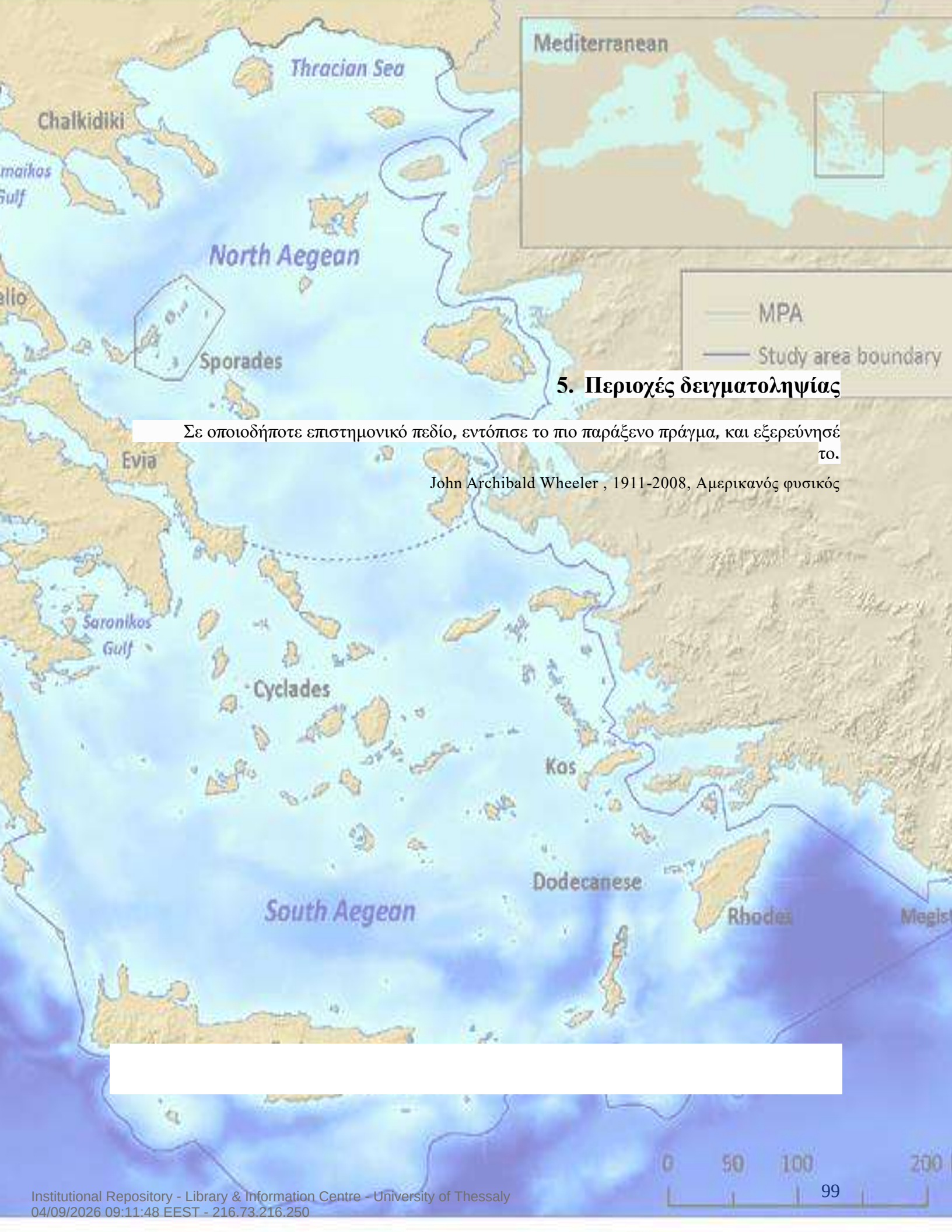
Συμμετέχει στο τρίτο βήμα της β-οξείδωσης των λιπαρών οξέων, στην οξείδωση του L-3-υδροξυακυλ CoA από NAD⁺.



(Lehninger, A. L., & Greville, G. D., 1953).

Εικόνα 47 αφυδρογονάση του β-υδροξυακυλο-CoA wikipedia

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η αποτύπωση της συνέργειας των δύο παθογόνων της πίναας, η παρουσία και η παθογένεια και των δύο έχει άμεση σχέση με την μεταβολή της θερμοκρασίας που έχει επιφέρει η κλιματική αλλαγή, στις τιμές των ενζύμων που καταλύουν μεταβολικές αντιδράσεις. Για την αποτύπωση της συνέργειας έχουν επιλεγεί δείγματα στα οποία έχουν ανιχνευθεί και τα δύο παθογόνα και συγκρίνονται με δείγματα στα οποία έχει ανιχνευθεί μόνο το ένα παθογόνο.



5. Περιοχές δειγματοληψίας

Σε οποιοδήποτε επιστημονικό πεδίο, εντόπισε το πιο παράξενο πράγμα, και εξερεύνησέ το.

John Archibald Wheeler , 1911-2008, Αμερικανός φυσικός

Οι δειγματοληψίες για την παρούσα εργασία έγιναν σε δύο περιοχές της Ελλάδας: στον Μαλιακό κόλπο στην Φθιώτιδα και στον κόλπο της Καλλονής στην Λέσβο.



Εικόνα 48 Χάρτης Ελλάδας. Με κόκκινο σημειώνονται οι περιοχές δειγματοληψίας (Lattos, Bitchava, et al., 2021)

6.1 Μαλιακός κόλπος

Πρόκειται για έναν κόλπο του Αιγαίου που βρίσκεται στην Ανατολική Στερεά. Εισχωρεί στον Νομό Φθιώτιδας από ανατολικά προς δυτικά 15- 22klm περίπου. Η ακριβέστερη οριοθέτηση τοποθετεί τα όριά του στα ακρωτήρια Χιλιομίλι (νοτιοανατολικά) και Καραβοφάναρα (βορειοανατολικά). Σε αυτό το σημείο έχει άνοιγμα 2,8klm χιλιόμετρα και είσοδο 15klm. Το μέγιστο βάθος του είναι 27m μέτρα. Το μοναδικό λιμάνι του Μαλιακού Κόλπου είναι η Στυλίδα στη βόρεια ακτή του.

Μέσα στον Μαλιακό Κόλπο δημιουργούνται μικροί όρμοι, όπως της Αγίας Τριάδας (νότια ακτή) και της Στυλίδας. Ο μοναδικός ποταμός που χύνεται στο Μαλιακό Κόλπο είναι ο Σπερχειός, ο οποίος με τις προσχώσεις του μειώνει τις τελευταίες δεκάδες χιλιάδες χρόνια αργά και σταθερά την έκταση του κόλπου. Επίσης υπάρχει ο χείμαρρος Δριστελόρρεμα, που πηγάζει από την Όθρυ και κάποιοι άλλοι χείμαρροι μικρότερης σημασίας. Από ανατολικά δέχεται την επίδραση θαλάσσιου ρεύματος που προέρχεται από το Δίαυλο των Ωρεών που με τη σειρά του επικοινωνεί με το Αιγαίο Πέλαγος. Το ρεύμα αυτό ακολουθεί πορεία από ανατολικά προς δυτικά και κινείται σχεδόν κυκλικά στη περιοχή του Μαλιακού με φορά αντίθετη από τους δείκτες του ρολογιού.

Ο συνδυασμός της εισόδου γλυκών νερών από το Σπερχειό ποταμό και των μικρότερων ρευμάτων με το θαλάσσιο ρεύμα από ανατολικά δημιουργεί ιδιαίτερες φυσικοχημικές συνθήκες, επηρεάζοντας έτσι το οικοσύστημα. Όσον αφορά τη θαλάσσια χλωρίδα, οι φυτοκοινωνίες στο εξωτερικό του κόλπου (ανατολικά κοντά στον Βόρειο Ευβοϊκό) είναι πλουσιότερες συγκριτικά με εκείνες στο εσωτερικό (δυτικά από το Χιλιομίλι), όπου η υδάτινη στήλη εμφανίζει μεγαλύτερη θολερότητα, προκαλούμενη από την είσοδο γλυκών νερών με αιωρούμενα σωματίδια και φερτές ύλες. Η κατανομή των βιοκοινωνιών επηρεάζεται και από το φαινόμενο της παλίρροιας κυρίως στη νότια αβαθή πλευρά του Μαλιακού.

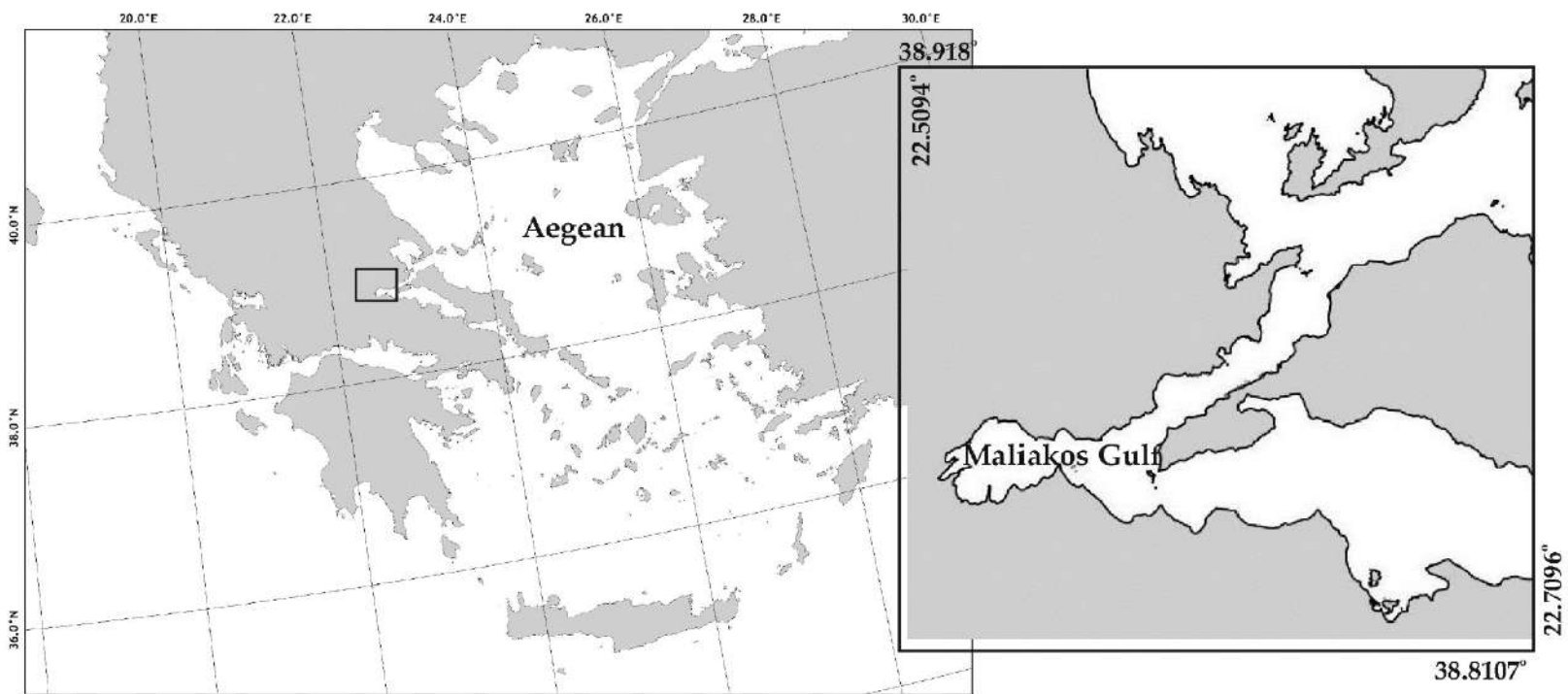
Στην βόρεια πλευρά του Μαλιακού σε σχετικά μικρό βάθος, συνήθως ανάμεσα σε αποικίες φανερογάμων, παρατηρούνταν οι αποικίες της πίνας. Στον εξωτερικό Μαλιακό, ανατολικά και νότια από το Χιλιομίλι και τον Καραβόμυλο υπάρχουν διάσπαρτα λιβάδια ποσειδωνίας. Συνολικά στον εξωτερικό και στον εσωτερικό Μαλιακό έχουν καταγραφεί 124 είδη ψαριών, 20

είδη γαρίδων και καβουριών (καρκινοειδή) και 6 είδη κεφαλόποδων (χταπόδια, σουπιές, καλαμάρια).

Η Αγία Τριάδα είναι ο μοναδικός παράλιος οικισμός στη νότια ακτή του Μαλιακού, αν θεωρηθεί ως όριο το Χιλιομίλι. Στη βόρεια ακτή υπάρχουν αρκετοί οικισμοί: από δυτικά προς ανατολικά, την Αγία Μαρίνα, τη Στυλίδα, τα Μελίσσια, τους Πεταράδες και το Πανόραμα. (<https://el.wikipedia.org>).

Μέσω της λεκάνης απορροής του Σπερχειού, ο Μαλιακός επηρεάζεται από τα χερσαία οικοσυστήματα και από τις ανθρωπογενείς δραστηριότητες που αναπτύσσονται στην ευρύτερη περιοχή με πιθανές αρνητικές επιδράσεις στους θαλάσσιους οργανισμούς. Φερτά υλικά αλλά και ουσίες εισέρχονται στο θαλάσσιο σύστημα από τις εκβολές του Σπερχειού. Έχει υπολογιστεί ότι κάθε χρόνο στο Δέλτα του Σπερχειού φτάνουν πάνω από 1.000.000 κυβικά μέτρα φερτών υλικών, αυξάνοντας την θολερότητα στο νερό με ότι συνεπακόλουθα έχει αυτό το γεγονός: μείωση της φωτοσύνθεσης, μείωση της παραγωγικότητας, μείωση των συγκεντρώσεων διαλυμένου οξυγόνου και ανοξία. Τα φυτοφάρμακα και χημικά που καταλήγουν στον κόλπο, οδηγούν σε βιοσυσσώρευσή τους μέσα στην τροφική αλυσίδα. Τέλος, η υπεραλίευση και παράνομη συλλογή θαλάσσιων οργανισμών για εμπορικούς σκοπούς διαταράσσουν την ισορροπία του οικοσυστήματος με μακροχρόνιες επιπτώσεις, αφού η αναγέννηση των πληθυσμών των ειδών είναι μια μακροχρόνια διαδικασία.

Εικόνα 49 Χάρτης Μαλιακού κόλπου (Tsamadias et al., 2023)



6.2 Κόλπος Καλλονής

Ο κόλπος Καλλονής της Λέσβου αποτελεί τον μεγαλύτερο από τους δύο φυσικούς κόλπους του νησιού με προσανατολισμό ΝΔ-ΒΑ. Βρίσκεται στο κέντρο του και συνδέεται με το Αιγαίο Πέλαγος μέσω ενός στενού διαύλου. Έχει επίμηκες σχήμα με μήκος περίπου 20km και πλάτος 10km. Πρόκειται για έναν ρηχό κόλπο με μέσο βάθος τα 10m, μέγιστο τα 25m προς την έξοδο του και έκταση που μετρά περίπου 110km². Συνδέεται με το Αιγαίο Πέλαγος με έναν στενό διάυλο μήκους 4km και πλάτους 1-2km. Στο Βόρειο τμήμα του κόλπου εκβάλλουν σημαντικοί χείμαρροι της περιοχής, οι οποίοι αποθέτουν φερτά υλικά, συμβάλλοντας έτσι στην διατήρηση των αβαθών νερών.

Η ανταλλαγή νερών μεταξύ του κόλπου και του Αιγαίου εξαρτάται κυρίως από τα παλιρροιακά ρεύματα, Γι' αυτό και το φαινόμενο είναι εντονότερο τους χειμερινούς μήνες. Η κυκλοφορία του νερού στο εσωτερικό του κόλπου επηρεάζεται έντονα από τους ανέμους. Το νερό εισέρχεται από νότια και ανατολική πλευρά του, ενώ εξέρχεται από την βόρεια και δυτική. Στην πορεία δημιουργούνται δύο δίνες: η μία δεξιόστροφη στην περιοχή της Αχλαδεράς και μία αριστερόστροφη στην έξοδο, νότια των Παρακοίλων.

Ο κόλπος Καλλονής έχει αναγνωριστεί όχι μόνο σε εθνικό, αλλά και σε διεθνές επίπεδο για τη σημασία και την ανάγκη προστασίας του. Έχει ενταχθεί σε καθεστώς ειδικής προστασίας από το Δίκτυο NATURA 2000 λόγω του ότι εκεί σχηματίζονται υγροβιότοποι μεγάλης οικολογικής σημασίας, όπως οι Αλυκές της Καλλονής και της Σκάλας Πολυχνίτου, το έλος Παρακοίλων, Νυφίδας Πολυχνίτου και Σκάλας Καλλονής, οι εκβολές ποταμών Μάκαρα, Εννιά Καμάρες, Τσινιάς, Μυλοπόταμου, Αχλαδεράς και Βούβαρης.

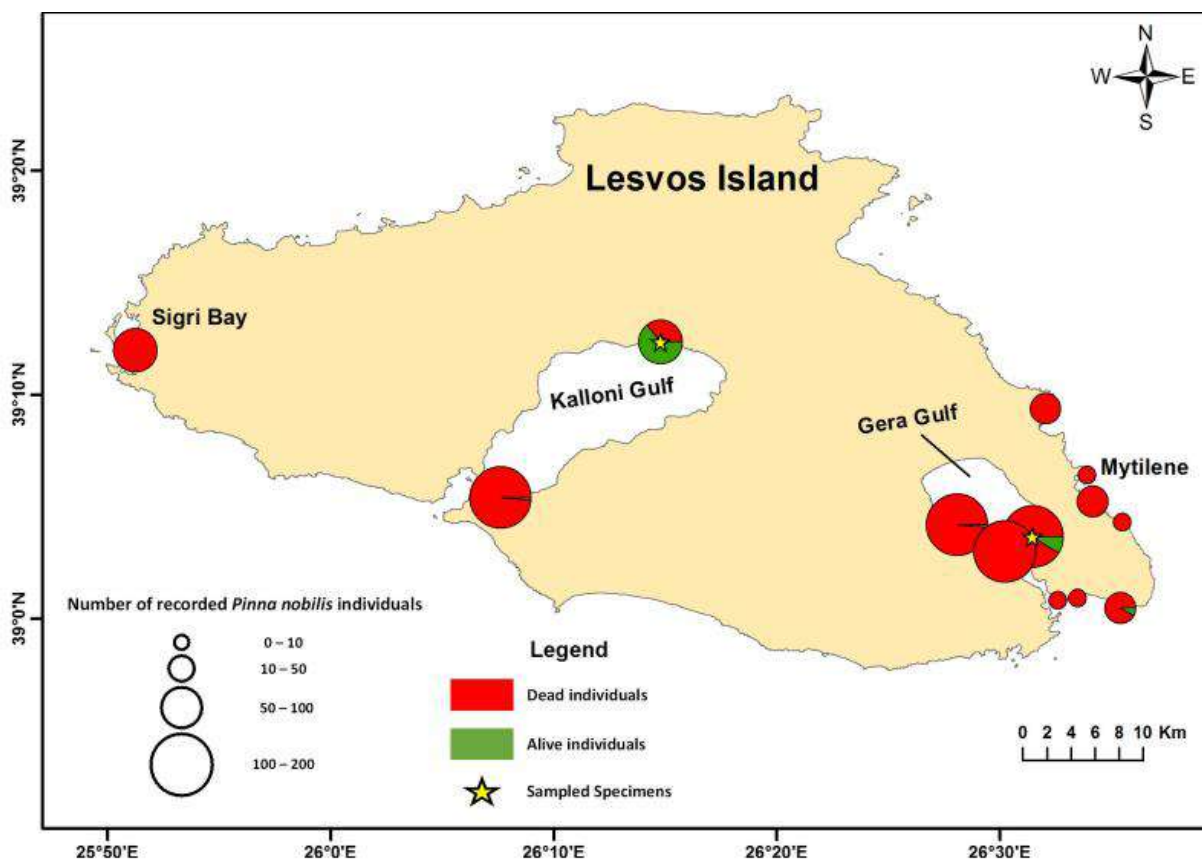
Στην υδρολογική λεκάνη του κόλπου Καλλονής βρίσκονται καλλιεργούμενες εκτάσεις με οπωροκηπευτικά, βοσκοτόπια και δασικές εκτάσεις με πεύκα και ελαιόδενδρα. Το χώμα, το νερό και η ποικιλία μικροοργανισμών που αναπτύσσονται γύρω από τους υγρότοπους, κάνουν τις περιοχές γύρω από αυτούς ιδιαίτερα εύφορες και κατάλληλες για καλλιέργεια.

Το θαλάσσιο περιβάλλον του κόλπου Καλλονής είναι πλούσιο σε φυτοπλαγκτόν και αποτελεί ιδανικό καταφύγιο για την αναπαραγωγή ιχθυοπανίδας και άλλων υδρόβιων οργανισμών, καθιστώντας τον έτσι σε ένα από τα σημαντικότερα αλιευτικά σημεία της Ελλάδας. Στον κόλπο

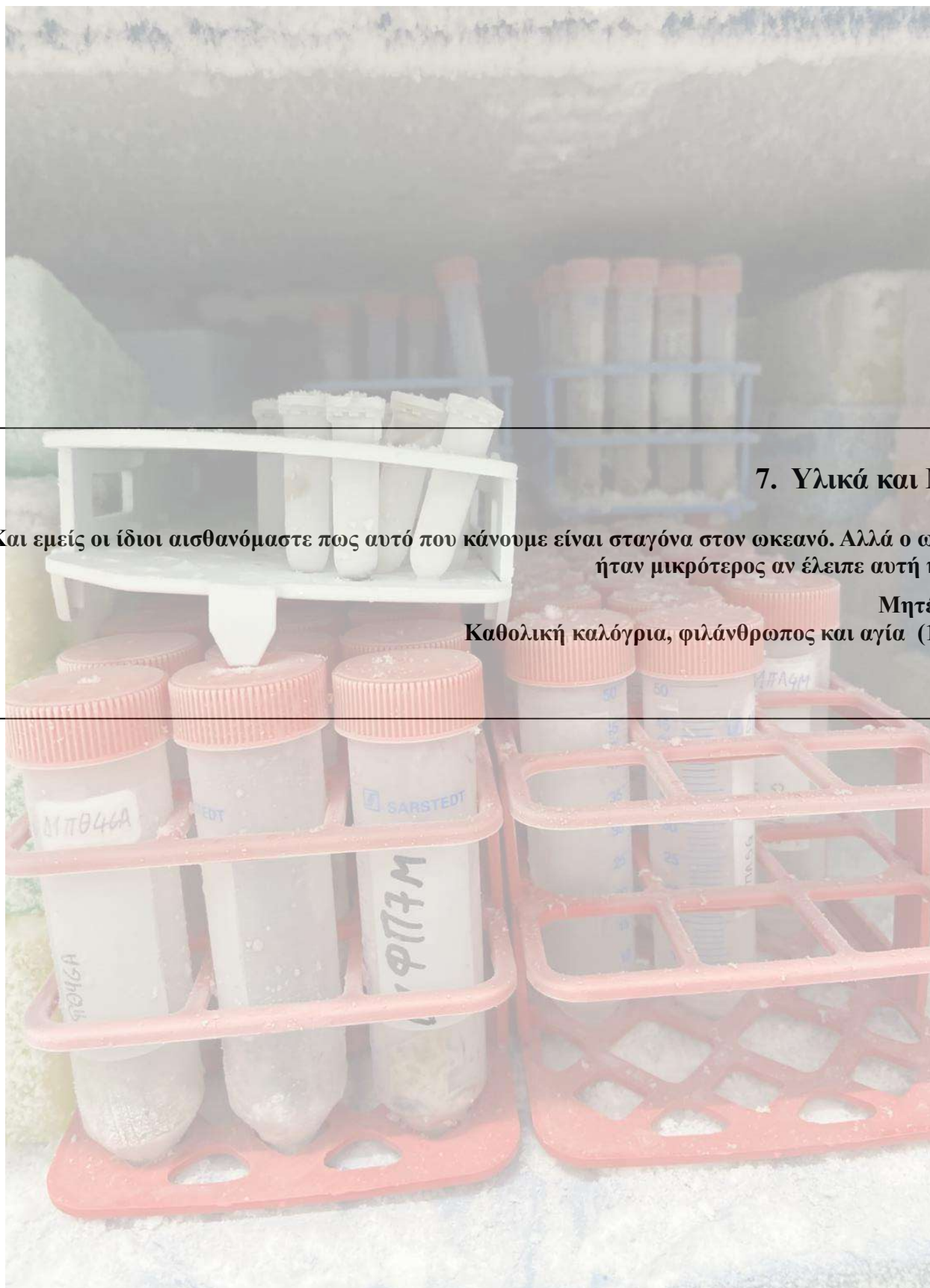
απαντώνται σε αφθονία οστρακοειδή, όπως τα χτένια, κυδώνια και στρείδια και άλλα είδη ψαριών, όπως οι γλώσσες, οι κέφαλοι και ιδιαίτερα οι φημισμένες σαρδέλες Καλλονής (ή παπαλίνα).

Ο κόλπος της Καλλονής φιλοξενούσε και έναν μεγάλο πληθυσμό πίνας πριν την μαζική θνησιμότητα, ο οποίος υπολογίζεται ότι ανερχόταν σε πάνω από 1.000.000 άτομα, ενώ αν και εκτιμάται ότι πλέον έχει περιοριστεί σε μερικές εκατοντάδες άτομα, εικάζεται πως είναι το μοναδικό σημείο του Αιγαίου όπου πλέον διαβιούν και ένας από τους σημαντικότερους εναπομείναντες πληθυσμούς στην Μεσόγειο. Αντίστοιχα, στον Κόλπο της Γέρας του οποίου ο πληθυσμός είχε εκτιμηθεί σε 215.000 άτομα περίπου πριν το φαινόμενο, σήμερα έχει εξαφανιστεί.

Θα πρέπει να τονιστεί ότι στο νησί της Λέσβου, όπου ανιχνεύθηκε μόνο το *Mycobacterium* spp, αν και αρκετοί πληθυσμοί υπέστησαν μαζική θνησιμότητα, υπήρχαν και κάποιοι που όχι μόνο απέμειναν, αλλά αναπαράχθηκαν κιόλας. Στον κόλπο του Μαλιακού, εκεί δηλαδή που ανιχνεύτηκαν και τα δύο παθογόνα, το ποσοστό θνησιμότητας ήταν 100%. Όντως, σε μετέπειτα καταδύσεις, δεν βρέθηκαν επιζώντες πληθυσμοί (Lattos, Feidantsis, et al., 2023).



Εικόνα 50 Χάρτης της Λέσβου Με κόκκινο είναι οι περιοχές που βρέθηκαν νεκροί πληθυσμοί και με πράσινο ζώντες (Katsanevakis, 2019)



7. Υλικά και Μέθοδοι

Και εμείς οι ίδιοι αισθανόμαστε πως αυτό που κάνουμε είναι σταγόνα στον ωκεανό. Αλλά ο ωκεανός θα ήταν μικρότερος αν έλειπε αυτή η σταγόνα.

Μητέρα Τερέζα
Καθολική καλόγρια, φιλόanthropos και αγία (1910-1997)

7.1 Ιστορικό ερευνών

Η πρώτη έρευνα στην Ελλάδα η οποία αναφερόταν στο φαινόμενο των μαζικών θνησιμοτήτων της πίνας διεξήχθη από το Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο το 2020. Αφορούσε στην ανίχνευση των δύο παθογόνων για πρώτη φορά σε ελληνικά ύδατα σε τρεις διαφορετικές τοποθεσίες: τον Θερμαϊκό, τον Κόλπο της Καλλονής και το νησί της Λήμνου (Lattos, Giantsis, Karagiannis, & Michaelidis, 2020). Ακολούθησαν άλλες δύο έρευνες, των οποίων η παρούσα εργασία αποτελεί συνέχεια.

Στην πρώτη μελέτη επιβεβαιώθηκε η παρουσία του *Vibrio mediterranei* και του *Vibrio splendidus* για πρώτη φορά στις ελληνικές θάλασσες και η εμπλοκή τους στην χειμερινή θνησιμότητα της πίνας κυρίως στις περιπτώσεις κατά τις οποίες απουσίαζε το *Haplosporidium pinnae* (Lattos, Bitchava, et al., 2021).

Στην δεύτερη, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι υπάρχει μειωμένη φυσιολογική απόδοση των ατόμων που φιλοξενούν και τα δύο παθογόνα σε σύγκριση με εκείνα που φιλοξενούν μόνο το *H. pinnae*. και μάλιστα πως ο συνεργιστικός ρόλος των παθογόνων ενισχύεται από την επίδραση της εποχικότητας (Lattos, Feidantsis, et al., 2023).

Εκτός από αυτές τις δύο έρευνες υπήρξαν και άλλες που έγιναν για την διερεύνηση του φαινομένου στην Ελλάδα (Katsanevakis, 2007a, 2019; Lattos, Giantsis, Karagiannis, & Michaelidis, 2020).

7.2 Συλλογή δειγμάτων

Οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν στις δύο περιοχές (Μαλιακός κόλπος και Κόλπος Καλλονής), κατά τους μήνες Φεβρουάριο, Απρίλιο Ιούνιο σύμφωνα με τους όρους της άδειας που έλαβε από το ελληνικό Υπουργείο Περιβάλλοντος και Ενέργειας (κωδικός: MEE//GDDDP89926/1117). Όλα τα άτομα του δείγματος είχαν παρόμοιο μήκος (42-50 cm). Από κάθε δειγματοληψία συλλέχθηκαν πέντε (n=5) διαφορετικά άτομα. Αξίζει να σημειωθεί πως στη δειγματοληψία του Ιουνίου, συλλέχθηκαν πέντε ετοιμοθάνατα άτομα από κάθε θέση σε

μέση θερμοκρασία θαλασσινού νερού 24 °C στον Μαλιακό κόλπο και 22 °C στον κόλπο Καλλονής. Τρεις εβδομάδες αργότερα, Τον Ιούλιο και οι δύο πληθυσμοί είχαν καταρρεύσει σε μέσες θερμοκρασίες θαλασσινού νερού 26 °C και 24,5 °C αντίστοιχα και δυστυχώς δεν βρέθηκαν ζώντα άτομα κατά τη διάρκεια των καταδύσεων (Lattos, Bitchava, et al., 2021).

Οι μετρήσεις της επιφανειακής θερμοκρασίας του θαλασσινού νερού πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση πολυπαραμετρικού μετρητή ποιότητας νερού (μοντέλο WQC-24, DKK-TOA Company, Τόκιο, Ιαπωνία), ενώ καταγράφηκαν και άλλες φυσικοχημικές παράμετροι, όπως, η αλατότητα, το διαλυμένο οξυγόνο και το pH (Lattos, Bitchava, et al., 2021).

Τα άτομα από τις δειγματοληψίες τεμαχίστηκαν άσηπτα για να κρατηθεί δείγμα από τον μανδύα και τα βράχια και αφού τοποθετήθηκε κάθε ιστός ξεχωριστά, αποθηκεύτηκε σε υγρό άζωτο για περαιτέρω ανάλυση. Παράλληλα, κρατήθηκε ιστός από τον πεπτικό αδένα, έτσι ώστε να γίνει και από εκεί η ιστοπαθολογική και η μοριακή ανίχνευση των παθογόνων.

7.3 Ιστοπαθολογική ανάλυση

Τα δείγματα ιστών που προορίζονταν για ιστοπαθολογικές διαδικασίες, σταθεροποιήθηκαν για 48 ώρες στο διάλυμα Davidson (Shaw and Battle, 1957). Μετά από αφυδάτωση μέσω διαλυμάτων διαβαθμισμένων αλκοολών, τα δείγματα ενσωματώθηκαν σε κερί παραφίνης και τεμαχίστηκαν στα 4-5 μm με τη χρήση περιστροφικού μικροτόμου. Η χρώση των δειγμάτων με αιματοξυλίνη και ηωσίνη πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Howard et al. (2004) προκειμένου να εξεταστεί η παρουσία του απλοσποριδίου, καθώς επίσης και με χρώση Ziehl-Neelsen σύμφωνα με τους Howard et al. (2004) για την ταυτοποίηση μυκοβακτηριδίων (Lattos et al., 2020). Παρουσία απλοσποριδίου ανιχνεύτηκε σε όλα τα δείγματα, ενώ τα μυκοβακτηρίδια ταυτοποιήθηκαν μόνο στα δείγματα του Μαλιακού κόλπου (Lattos et al., 2023).

Κόλπος Καλλονής		Μήνας	<i>Mycobacterium spp.</i>	<i>H. pinnae</i>	Μαλιακός κόλπος		Μήνας	<i>Mycobacterium spp.</i>	<i>H. pinnae</i>
Μανδύας	Βράγχια				Μανδύας	Βράγχια			
Δ1ΠΛ1Μ	Δ1ΠΛ1G	Φεβ-20	+	-	Δ1ΠΦ1Μ	Δ1ΠΦ1G	Φεβ-20	+	+
Δ1ΠΛ2Μ	Δ1ΠΛ2G	Φεβ-20	+	-	Δ1ΠΦ2Μ	Δ1ΠΦ2G	Φεβ-20	+	+
Δ1ΠΛ3Μ	Δ1ΠΛ3G	Φεβ-20	+	-	Δ1ΠΦ3Μ	Δ1ΠΦ3G	Φεβ-20	+	+
Δ1ΠΛ4Μ	Δ1ΠΛ4G	Φεβ-20	+	-	Δ1ΠΦ4Μ	Δ1ΠΦ4G	Φεβ-20	+	+
Δ1ΠΛ5Μ	Δ1ΠΛ5G	Φεβ-20	+	-	Δ1ΠΦ7Μ	Δ1ΠΦ7G	Φεβ-20	+	+
Δ2ΠΛ1Μ	Δ2ΠΛ1G	Απρ-20	+	-	Δ2ΠΦ1Μ	Δ2ΠΦ1G	Απρ-20	+	+
Δ2ΠΛ2Μ	Δ2ΠΛ2G	Απρ-20	+	-	Δ2ΠΦ2Μ	Δ2ΠΦ2G	Απρ-20	+	+
Δ2ΠΛ3Μ	Δ2ΠΛ3G	Απρ-20	+	-	Δ2ΠΦ3Μ	Δ2ΠΦ3G	Απρ-20	+	+
Δ2ΠΛ4Μ	Δ2ΠΛ4G	Απρ-20	+	-	Δ2ΠΦ4Μ	Δ2ΠΦ4G	Απρ-20	+	+
Δ2ΠΛ5Μ	Δ2ΠΛ5G	Απρ-20	+	-	Δ2ΠΦ5Μ	Δ2ΠΦ5G	Απρ-20	+	+
Δ3ΠΛ1Μ	Δ3ΠΛ1G	Ιουν-20	+	-	Δ3ΠΦ1Μ	Δ3ΠΦ1G	Ιουν-20	+	+
Δ3ΠΛ2Μ	Δ3ΠΛ2G	Ιουν-20	+	-	Δ3ΠΦ2Μ	Δ3ΠΦ2G	Ιουν-20	+	+
Δ3ΠΛ3Μ	Δ3ΠΛ3G	Ιουν-20	+	-	Δ3ΠΦ3Μ	Δ3ΠΦ3G	Ιουν-20	+	+
Δ3ΠΛ4Μ	Δ3ΠΛ4G	Ιουν-20	+	-	Δ3ΠΦ4Μ	Δ3ΠΦ4G	Ιουν-20	+	+

Πίνακας 2 Λίστα με την κωδικοποίηση των δειγμάτων. με + χαρακτηρίζονται τα θετικά αποτελέσματα στο παθογόνο, ενώ με – τα αρνητικά

7.4 Μοριακή ανίχνευση παθογόνων

Για τη μοριακή διάγνωση, ένα τμήμα περίπου 20 mg του προσαγωγού μυός, του πεπτικού αδένος και του μανδύα από κάθε δείγμα ομογενοποιήθηκε και υποβλήθηκε σε απομόνωση DNA. Το kit DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, Γερμανία) χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση του γονιδιωματικού DNA, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η παρουσία των γενών *Haplosporidium* και *Mycobacterium* εξετάστηκε σε όλα τα δείγματα, ανεξάρτητα από τα ιστολογικά αποτελέσματα, με PCR με τα ζεύγη εκκινητών Hap-F1/Hap-R2 (Renault et al., 2000) για το απλοσπορίδιο και mycgen-f/mycgen-r (Boddinghaus et al., 1990) για τα μυκοβακτηρίδια.

Το kit Platinum™ Taq DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Η.Π.Α.) χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση, τροποποιημένο για 20 µl συνολικούς όγκους αντίδρασης, συμπεριλαμβανομένου 1 µl γονιδιωµατικού DNA (περίπου 50 ng/µl) του κάθε δείγματος, ενώ οι συνθήκες ήταν οι εξής: Το πρώτο βήμα μετουσίωσης έγινε για 3min στους 95 °C. Στην συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν 36 κύκλοι διάρκειας 30sec στους 95 °C, 45sec στους 55 °C και 50sec στους 72 °C. Το τελικό βήμα επιμήκυνσης διήρκτησε 8min στους 72 °C.

Το ριβοσωµικό DNA της µικρής υπομονάδας (SSU rDNA) του *Haplosporidium pinnae* (GenBank Accession Number: MK393389, 290 bp) συντέθηκε για να συµπεριληφθεί ως θετικός έλεγχος στην PCR Hap-F1/Hap-R2. Το DNA του *Mycobacterium tuberculosis* (MBC034, Vircell, Ισπανία) συµπεριλήφθηκε ως θετικός έλεγχος στην mycgen-f/mycgen-r PCR. Τέλος, χρησιμοποιήθηκε απεσταγµένο νερό ως αρνητικός έλεγχος και στις δύο PCR.

Τα αµπλικόνια καθαρίστηκαν χρησιµοποιώντας το NucleoSpin PCR Clean-up Kit (Macherey-Nagel, Γερµανία) σύµφωνα µε τις οδηγίες του κατασκευαστή και αλληλουχήθηκαν και στα δύο σκέλη, εφαρµόζοντας τη µέθοδο αλληλούχησης Big Dye Terminator v3.1 µε τη χρήση των εµπρόσθιων και των αντίστροφων εκκινητών σε έναν αυτόµατο αλληλουχιογράφο τριχοειδών ABI Prism 3730XL. Η επεξεργασία και η ευθυγράµµιση των επιµέρους αλληλουχιών πραγµατοποιήθηκε στο λογισµικό MEGA έκδοση 7 µε την εφαρµογή της λειτουργίας MUSCLE (Kumar et al., 2016). Η φυλογενετική σχέση των νέων αλληλουχιών σε σύγκριση µε τις πιο συγγενικές, που είναι διαθέσιµες στη GenBank, αξιολογήθηκαν µε τη µέθοδο της µέγιστης προσέγγιση της µέγιστης φειδωλότητας (MP) που αξιολογεί την υποστήριξη µε βάση 500 επαναλήψεων bootstrap, που πραγµατοποιήθηκε στο λογισµικό MEGA έκδοση 7.

Προκειµένου να γίνει η ποσοτικοποίηση το DNA τόσο του *H. pinnae* όσο και του *Mycobacterium sp.*, διενεργήθηκε qPCR σε ένα CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (BioRad, Ηνωµένο Βασίλειο). Το SensiFAST™ SYBR No-ROX mix kit (Bioline Reagents Ltd, UK) χρησιµοποιήθηκε ακολουθώντας τους συνιστώµενους όγκους αντιδραστηρίων του κατασκευαστή, µαζί µε 4 pmol καθενός από τα προαναφερθέντα ζεύγη εκκινητών. Το προφίλ της Real-Time PCR περιελάµβανε τα εξής βήµατα: Αρχικό βήµα 3min στους 95 °C , ακολουθούµενο από 38 κύκλους 94 °C για 5sec, 58 °C για 10sec και 72 °C για 20sec.

Πραγµατοποιήθηκαν τέσσερις επαναλήψεις ανά δείγµα, εφαρµόζοντας πανοµοιότυπες συνθήκες. Οι σχετικές πρότυπες καµπύλες κατασκευάστηκαν από σειριακές αραιώσεις (10-105) των θετικών

ελέγχων που περιγράφηκαν προηγουμένως και οι θετικοί έλεγχοι αραιωμένοι σε παρασιτικό αρνητικό DNA της πίνας, με την απεικόνιση των τιμών (CT) έναντι γνωστών συγκεντρώσεων DNA. Η επιλογή της ανάγνωσης της πλάκας στο βήμα των 58 °C περιλάμβανε και τον ποσοτικός προσδιορισμό, ο οποίος βασίστηκε στη διαφορά των τιμών CT (Lattos et al., 2020).

Η παρουσία των δύο παθογόνων στα δείγματα επιβεβαιώθηκε μοριακά. Οι αναζητήσεις BLAST της αλληλουχίας των ενισχυμένων τμημάτων στον δικτυακό τόπο του NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) επιβεβαίωσαν ότι το SSU rDNA του απλοσποριδίου ανήκει στο *Haplosporidium pinnae*, ωστόσο, το 16 S rRNA των μυκοβακτηριδίων απέτυχε να ταυτοποιηθεί σε επίπεδο είδους. Μόνο ένας απλότυπος αναγνωρίστηκε για κάθε παθογόνο, ο οποίος κατατέθηκε στη βάση δεδομένων GenBank με τον κωδικό αριθμό καταχώρησης MN689716 για το *Haplosporidium pinnae* και MN689715 για το *Mycobacterium sp.* Ο απλότυπος του *H. pinnae* παρουσίασε ποσοστό άνω του 99,5%. ομοιότητα αλληλουχίας με τα ομοειδή παράσιτα από την Ιταλία και την Ισπανία και η φυλογενετική ανάλυση ομαδοποίησε όλους τους απλοτύπους του *H. pinnae* στην ίδια ομάδα. Οι αναζητήσεις BLAST και η φυλογενετική ανάλυση του *Mycobacterium sp.* ομαδοποίησαν τον νέο ελληνικό απλότυπο μεταξύ συγγενών παθογόνων προερχόμενα από διάφορους ξενιστές, πολύ στενά συνδεδεμένα με 100% αλληλουχική ομοιότητα με είδη *Mycobacterium* που αναγνωρίστηκαν σε δείγματα πίνας από την Τυρρηνική Θάλασσα.

Στη συνέχεια, έγινε επιλογή δειγμάτων και χωρίστηκαν σε δύο κατηγορίες: Στα δείγματα που ήταν θετικά στο ένα παθογόνο (κόλπος Καλλονής) και στα δείγματα που ήταν θετικά και στα δύο παθογόνα (Μαλιακός κόλπος). Για την διερεύνηση της υπόθεσης, χρησιμοποιήθηκαν ιστοί από τον μανδύα και από τα βράγχια των συγκεκριμένων ατόμων.

Οι συγκεκριμένοι ιστοί ομογενοποιήθηκαν με συγκεκριμένα ρυθμιστικά διαλύματα, έτσι ώστε να υπολογιστεί η δραστηριότητα σε σπεκτροφωτόμετρο της δραστηριότητας των ενζύμων:

- Συνθετάση του κιτρικού οξέος (CS)
- Αφυδρογονάση του β-υδροξυακυλο-CoA (HOAD)
- Αφυδρογονάση του γαλακτικού οξέος (L-LDH)

Η διαδικασία, περιγράφεται αναλυτικά παρακάτω.

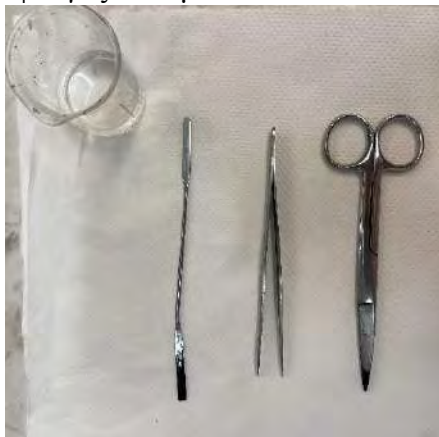
7.5 Διαδικασία

7.51 Ζύγιση

Τα αρχικά δείγματα στα οποία είχε γίνει η ταυτοποίηση διατηρούνταν σε υπερκατάψυξη στου -80 °C. Από αυτά λήφθηκε 0,05gr ιστού και τοποθετήθηκε σε ependorf 2ml. Καθ' όλη την διάρκεια της διαδικασίας τόσο τα αρχικά, όσο και τα τελικά δείγματα των 0,05gr βρίσκονταν τοποθετημένα σε πάγο, έτσι ώστε να μην αλλοιωθούν. Η ζύγιση έγινε με ζυγαριά ακριβείας και για το κόψιμο και την τοποθέτηση των δειγμάτων στα ependorf χρησιμοποιήθηκαν λαβίδες και ψαλίδια τα οποία αποστειρώνονταν με την χρήση φλόγας ανάμεσα από κάθε δείγμα. Τα νέα δείγματα



Εικόνα 51 Στιγμιότυπα από την ζύγιση



Εικόνα 52 Τα εργαλεία ζύγισης

τοποθετήθηκαν και αυτά στην υπερκατάψυξη μέχρι την προετοιμασία των υλικών του επόμενου σταδίου.

7.52 Παρασκευή διαλυμάτων

Αφού προετοιμάστηκαν οι ιστοί, ακολούθησε η παρασκευή των διαλυμάτων που θα χρησιμοποιούνταν. Παρακάτω, αναφέρονται αναλυτικά τα διαλύματα, καθώς και οι ποσότητες που παρασκευάστηκαν για την επεξεργασία των 60 δειγμάτων.

Buffer ομογενοποίησης (200ml)

Το διάλυμα ομογενοποίησης των ιστών για τον προσδιορισμό της ενζυμικής δραστηριότητας αποτελείται από:

- 1ml EDTA (0.074gr)
- 2mM $MgCl_2$ (0.033gr)
- 50mM ιμιδαζολίου (0.68gr)
- Απιονισμένο νερό

Παρασκευάστηκε στους 24 °C και είχε pH 7.6. Για να φτάσει το διάλυμα την συγκεκριμένη τιμή, ρυθμίστηκε με HCl και έπειτα, διατηρήθηκε στο ψυγείο μέχρι την χρήση του.

Imidazole Buffer (200ml)

- Το buffer ιμιδαζόλης, το οποίο χρησιμοποιήθηκε και στα 3 ένζυμα, περιέχει:
- 50mM ιμιδαζολίου (1.36gr)

Απιονισμένο νερό

Είχε pH 7, το οποίο ρυθμίστηκε με HCl και στην συνέχεια, διατηρήθηκε στο ψυγείο μέχρι την χρήση του.

Διαλύματα για την συνθετάση του κιτρικού οξέος CS

- DTNB 0.25mM (παρασκευάστηκαν 1,4ml διαλύματος με 0,00693gr δραστικής ουσίας. Διατηρήθηκε στο ψυγείο).
- Ακετυλ-CoA 0.4mM (παρασκευάστηκαν 8ml διαλύματος με 0,023gr δραστικής ουσίας. Διατηρήθηκε στην κατάψυξη)
- Oxaloacetate 0.5mM (παρασκευάστηκαν 1,4ml διαλύματος με 0,0045gr δραστικής ουσίας. Διατηρήθηκε στην κατάψυξη)
- KCN 1mM (παρασκευάστηκαν 10ml διαλύματος με 0,0325gr δραστικής ουσίας. Διατηρήθηκε στο ψυγείο)

Διαλύματα για την αφυδρογονάση του β-Υδροξυάκυλο-CoA (HOAD)

- NaDH 0.15mM (παρασκευάστηκαν 1,4ml διαλύματος με 0,0149gr δραστικής ουσίας. Διατηρήθηκε στην κατάψυξη)
- EDTA 1mM (παρασκευάστηκαν 1,4ml διαλύματος με 0,0259gr δραστικής ουσίας. Διατηρήθηκε στο ψυγείο)
- Ακετοακυλο-CoA 0.1mM (παρασκευάστηκαν 8ml διαλύματος με 0,00776gr δραστικής ουσίας. Διατηρήθηκε στην κατάψυξη)
- KCN 1mM (παρασκευάστηκαν 10ml διαλύματος με 0,0325gr δραστικής ουσίας. Διατηρήθηκε στο ψυγείο)

Διαλύματα για την αφυδρογονάση του γαλακτικού οξέως (L-LDH)

- NADH 0.15mM (παρασκευάστηκαν 1,4ml διαλύματος με 0,0149gr δραστικής ουσίας. Διατηρήθηκε στην κατάψυξη)
- Pyruvate 1mM (παρασκευάστηκαν 1,4ml διαλύματος με 0,0077gr δραστικής ουσίας. Διατηρήθηκε στο ψυγείο)
- KCN 1mM (παρασκευάστηκαν 10ml διαλύματος με 0,0325gr δραστικής ουσίας. Διατηρήθηκε στο ψυγείο)



Εικόνα 53 Χημικά αντιδραστήρια

Σε όλα τα διαλύματα χρησιμοποιήθηκε απιονισμένο νερό.

7.53 Ομογενοποίηση ιστών

Για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας των ενζύμων, οι ιστοί χρειάστηκαν να ομογενοποιηθούν. Για τον λόγο αυτό βγήκαν από την υπερκατάψυξη και τοποθετήθηκαν σε απλή κατάψυξη ψυγείου. Από εκεί έβγαιναν μόνο για την προσθήκη του διαλύματος και κατά την διάρκεια της ομογενοποίησης και επανατοποθετούνταν αμέσως στην κατάψυξη. Στο κάθε δείγμα προστέθηκαν 200μl διαλύματος ομογενοποίησης, δηλαδή η αναλογία ιστού- διαλύματος ήταν 1:4. Αυτή η αναλογία χρησιμοποιήθηκε για τις CS & HOAD. Η ομογενοποίηση των δειγμάτων έγινε με πλαστικό ομογενοποιητή μέσα στο ependorf. Η διαδικασία για το κάθε δείγμα κράτησε περίπου 60sec, έτσι ώστε να πολτοποιηθεί όσο καλύτερα γίνεται.



Εικόνα 54 Στιγμιότυπο από την ομογενοποίηση

Στην συνέχεια, το ομογενοποίημα χωρίστηκε, διότι για την L-LDH, η αναλογία ιστού- διαλύματος έπρεπε να είναι 1:5. Για να επιτευχθεί αυτό, μεταφέρθηκαν σε νέα ependorf 90μl του ήδη ομογενοποιημένου δείγματος και προστέθηκαν ακόμα 22,5μl διαλύματος.

7.54 Φυγοκέντρωση



Για τις CS & HOAD, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 5min σε 7.000g στους 5 °C . Στην περίπτωση της L-LDH, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 15min σε 13.000g στους 5°C. Το μηχάνημα ήταν ψυχόμενη φυγόκεντρο. Μετά την φυγοκέντρωση, τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε πάγο για την καλύτερη διατήρησή τους και με τέτοιο τρόπο, έτσι ώστε να μην διαταραχθεί το υπερκείμενο, το οποίο χρησιμοποιήθηκε στο παρακάτω βήμα για την μέτρηση της δραστηριότητας των ενζύμων.

Εικόνα 55 Στιγμιότυπο από την φυγοκέντρωση

7.55 Φασματοφωτόμετρο

Αρχικά, ρυθμίστηκε το φωτόμετρο σε συγκεκριμένη θερμοκρασία, μήκος κύματος και κύκλους για κάθε ένζυμο. Στην συνέχεια, ετοιμάστηκαν τα δείγματα: Μέσα στις ειδικές κυψελίδες του φωτόμετρου προστέθηκαν όλα τα αντιδραστήρια στις απαιτούμενες ποσότητες με καθορισμένη σειρά, με τελευταίο το υπερκείμενο που προέκυψε από την φυγοκέντρωση του ομογενοποιημένου ιστού. Για κάθε ένζυμο προετοιμάστηκε και ένας μάρτυρας- δείγμα (blind), στο οποίο εκτός από το διάλυμα του ιστού δεν έμπαινε και ένα αντιδραστήριο. Ο μάρτυρας έμπαινε πρώτος στην αντίστοιχη για αυτόν κυψελίδα του φωτόμετρου, και μετρούνταν, έτσι ώστε να καλιμπραριστεί το μηχάνημα. Αφού προετοιμαζόταν το κάθε δείγμα, αναδευόταν με πλαστικό αναδευτήρα και στην συνέχεια τοποθετούνταν στις κυψελίδες του φωτόμετρου για να ξεκινήσει η μέτρηση. Παρακάτω αναφέρονται αναλυτικά οι ρυθμίσεις του φωτόμετρου, η σειρά, και η ποσότητα των

αντιδραστηρίων. Η φωτομέτρηση και προσδιορισμός της δραστηρότητας του ενζύμου έγινε σύμφωνα με τους Passonneau & Lowry (1993).

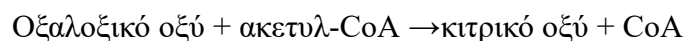
CS (Συνθετάση του κιτρικού οξέος)

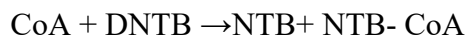
Φωτομέτρηση για 2min (30sec/cycle), 5cycles, 412nm, 20 °C, Vτελ 1ml

	Caρχ	Vαρχ	Cτελ
Imidazole Buffer	100mM	0.5ml	50mM
KCN	50mM	0.02ml	0.25mM
DNTB	12.5mM	0.02ml	0.25mM
Ακετυλ-CoA	40mM	0.01ml	0.4mM
Oxaloacetate*	25mM	0.02ml	0.5mM
Distilled water		0.410ml	-
Sample		0.02ml	-

Πίνακας 3 Τα αντιδραστήρια και οι ποσότητες τους για την μέτρηση της CS

Η μέγιστη δραστηρότητα του ενζύμου προσδιορίστηκε φωτομετρικά στα 412nm ($\epsilon_{412}=13,6$), σύμφωνα με τις αντιδράσεις:





Το CoA μειώνει στοιχειομετρικά το αντιδραστήριο του Ellman διθειο1,4- νιτροβενζοϊκό οξύ (DNTB), αυξάνοντας έτσι την απορρόφηση λόγω παραγωγής του 2-νιτρο-5-θειο-βενζοϊκού οξέος (NTB), το οποίο έχει έντονο κίτρινο χρώμα. Ο χρόνος αντίδρασης ήταν 2min.

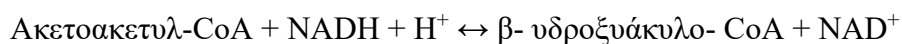
HOAD (Αφυδρογονάση του β-Υδροξυάκυλο-CoA)

Φωτομέτρηση για 2min (30sec/cycle), 5cycles, 340nm, 20 °C, Vτελ 1ml

	Caρχ	Vαρχ	Cτελ
Imidazole Buffer	100mM	0.5ml	50mM
KCN	50mM	0.02ml	0.25mM
NADH	15mM	0.01ml	0.15mM
EDTA	50mM	0.02ml	1mM
Ακτετοακετλ-CoA*	10mM	0.01ml	0.1mM
Distilled water		0.420ml	-
Sample		0.02ml	-

Πίνακας 4 Τα αντιδραστήρια και οι ποσότητες για την μέτρηση HOAD

Η μέγιστη δραστηριότητα του ενζύμου προσδιορίστηκε φωτομετρικά στα 340nm από την πτώση της απορρόφησης λόγω της οξείδωσης του NADH, σύμφωνα με την αντίδραση:



Ο χρόνος αντίδρασης ήταν 2min

L-LDH (Αφυδρογονάση του γαλακτικού οξέος)

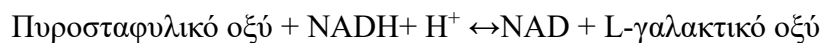
Φωτομέτρηση για 5min (30sec/cycle), 10cycles, 340nm, 20 °C, Vτελ 1ml

	Caρχ	Vαρχ	Cτελ
Imidazole Buffer	100mM	0.5ml	50mM
KCN	50mM	0.02ml	0.25mM
NADH	15mM	0.01ml	0.15mM
Pyruvate*	50mM	0.02ml	1mM
Distilled water		0.450ml	-
Sample		0.002ml	-

Πίνακας 5 Τα αντιδραστήρια και οι ποσότητες για την μέτρηση της L-LDH

Σημείωση: Όσα αντιδραστήρια σημειώνονται με * δεν μπαίνουν στο δείγμα- μάρτυρα

Η μέγιστη δραστητικότητα του ενζύμου προσδιορίστηκε φωτομετρικά στα 340nm($\epsilon_{340}=6,22$) από την μεταβολή (πτώση) της απορρόφησης εξαιτίας της οξείδωσης του NADH σύμφωνα με την αντίδραση:



Ο χρόνος αντίδρασης ήταν 5min.

Η μέγιστη δραστικότητα των ενζύμων (V_{max})

σε $\mu\text{moles/g}$ υγρού βάρους ιστού/ min υπολογίστηκε σύμφωνα με τον τύπο:

$$U_{max} = \frac{\Delta OD_{\text{δείγμ}} - \frac{\Delta OD_{\text{τυφλού}}}{\Delta t}}{\varepsilon} * \frac{1}{V_{\text{δείγμ}}} * \frac{m_{\text{ιστού}} + V_{\text{διαλ ομογενοποίησης}}}{m_{\text{ιστού}}}$$

Όπου:

$\Delta OD_{\text{δείγμ}}$ η οπτική πυκνότητα του δείγματος

$\Delta OD_{\text{τυφλού}}$ η οπτική πυκνότητα του μάρτυρα

Δt ο χρόνος φωτομέτρησης

ε ο συντελεστής απορρόφησης στο συγκεκριμένο μήκος κύματος

$V_{\text{δείγμ}}$ ο όγκος του δείγματος

$m_{\text{ιστού}}$ η μάζα του ιστού και

$V_{\text{διαλ ομογενοποίησης}}$ ο όγκος του διαλύματος ομογενοποίησης που χρησιμοποιήθηκε.

Στο επόμενο κεφάλαιο παρατίθενται τα γραφήματα των αποτελεσμάτων.

6. ΓΡΑΦΗΜΑΤΑ

Πάντα κατ' αριθμόν γίνονται.

Πυθαγόρας
Αρχαίος Έλληνας φιλόσοφος (580-490 π.Χ.)

Τα αποτελέσματα του φασματοφωτόμετρου αναλύθηκαν στο στατιστικό πρόγραμμα Minitab, ενώ τα γραφήματα δημιουργήθηκαν σε Excel. Τέλος υπολογίστηκε ο μέσος όρος των τομών και η τυπική απόκλιση στο Excel.

8.1 LDH

Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του ενζύμου LDH σε θηκόγραμμα στον μανδύα (Γράφημα 1) και στα βράγχια (Γράφημα 2) ανά περιοχή.



Γράφημα 1: Θηκόγραμμα που παρουσιάζει τη μέγιστη δραστικότητα του ενζύμου του μανδύα στην περιοχή Φ (αριστερά) και Λ (δεξιά)

Η μέση τιμή της μέγιστης δραστικότητας της LDH στην Φθιώτιδα για τον μανδύα είναι $0,60 \pm 0,54$ U/min.g.wet.wt, ενώ για την Λέσβο είναι $1,64 \pm 1,86$ U/min.g.wet.wt. Όπως παρατηρείται στο θηκόγραμμα, η μέγιστη δραστικότητα της LDH στον μανδύα στα δείγματα του κόλπου Καλλονής, είναι μεγαλύτερη από ότι στα δείγματα για την περιοχή του Μαλιακού κόλπου.



Γράφημα 2: : Θηκόγραμμα που παρουσιάζει τη μέγιστη δραστικότητα του ενζύμου στα βράγχια στην περιοχή Φ (αριστερά) και Λ (δεξιά)

Η μέση τιμή της μέγιστης δραστικότητας της LDH στην Φθιώτιδα για τα βράγχια είναι $3,25 \pm 2,2$ U/min.g.wet.wt, ενώ για την Λέσβο είναι μικρότερη με μέση τιμή $2,15 \pm 2,2$ U/min.g.wet.wt.

Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του ενζύμου LDH σε θηκόγραμμα στην Φθιώτιδα (Γράφημα 3 και 4) και την Λέσβο (Γράφημα 5 και 6) ανά μήνα δειγματοληψίας.



Γράφημα 3: Θηκόγραμμα που παρουσιάζει τη μέγιστη δραστικότητα του ενζύμου του μανδύα στην Φθιώτιδα ανά δειγματοληψία.

Για τον μανδύα στην περιοχή της Φθιώτιδας τον Φεβρουάριο η μέγιστη δραστικότητα του ενζύμου LDH ήταν 0.635 ± 0.34 U/min.g.wet.wt, τον Απρίλιο 0.57 ± 0.69 U/min.g.wet.wt και τον Ιούνιο 1.48 ± 1.87 U/min.g.wet.wt. Η



Γράφημα 4 Θηκόγραμμα που παρουσιάζει τη μέγιστη δραστηριότητα του ενζύμου στα βράγχια στην Φθιώτιδα ανά δειγματοληψία.

Για τα βράγχια στην περιοχή της Φθιώτιδας τον Φεβρουάριο η μέγιστη δραστηριότητα του ενζύμου LDH ήταν $3,33 \pm 2,55$ U/min.g.wet.wt, τον Απρίλιο $3,69 \pm 1,37$ U/min.g.wet.wt και τον Ιούνιο $5,03 \pm 5,60$ U/min.g.wet.wt



Γράφημα 5: Θηκόγραμμα που παρουσιάζει τη μέγιστη δραστηριότητα του ενζύμου του μανδύα στην Λέσβο ανά δειγματοληψία.

Για τον μανδύα στην περιοχή της Λέσβου τον Φεβρουάριο η μέγιστη δραστηριότητα του ενζύμου LDH ήταν $1,944 \pm 2,16$ U/min.g.wet.wt, τον Απρίλιο $1,33 \pm 1,44$ U/min.g.wet.wt και τον Ιούνιο $4,67 \pm 4,86$ U/min.g.wet.wt



Γράφημα 6: Θηκόγραμμα που παρουσιάζει τη μέγιστη δραστικότητα του ενζύμου στα βράγχια στην Λέσβο ανά δειγματοληψία.

Για τα βράγχια στην περιοχή της Λέσβου τον Φεβρουάριο η μέγιστη δραστικότητα του ενζύμου LDH ήταν $2,45 \pm 2,20$ U/min.g.wet.wt, τον Απρίλιο $2,18 \pm 2,28$ U/min.g.wet.wt και τον Ιούνιο $4,12 \pm 6,59$ U/min.g.wet.wt

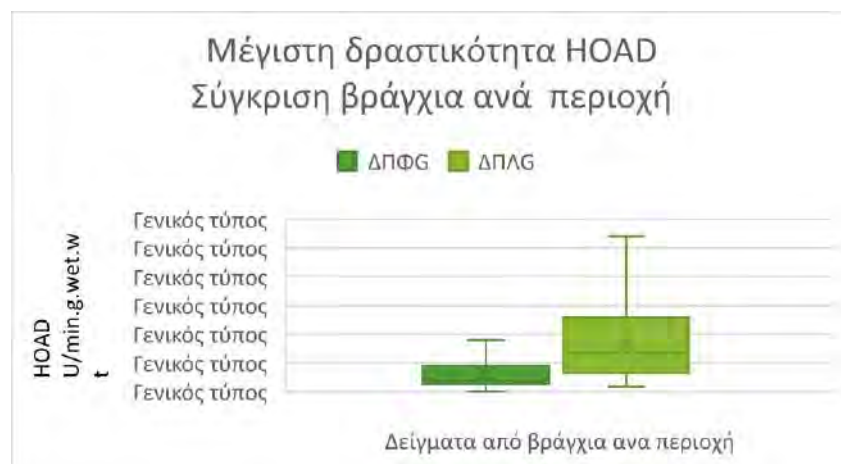
8.2 HOAD

Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του ενζύμου HOAD σε θηκόγραμμα στον μανδύα (Γράφημα 7) και στο G (Γράφημα 8) ανά περιοχή.



Γράφημα 7: Θηκόγραμμα που παρουσιάζει τη μέγιστη δραστικότητα του ενζύμου του μανδύα στην Φθιώτιδα (αριστερά) και την Λέσβο (δεξιά)

Η μέση τιμή της μέγιστης δραστικότητας της HOAD στην Φθιώτιδα για τον μανδύα είναι $2,76 \pm 2,49$ U/min.g.wet.wt, ενώ για την Λέσβο είναι $3,65 \pm 4,79$ U/min.g.wet.wt



Γράφημα 8: Θηκόγραμμα που παρουσιάζει τη μέγιστη δραστικότητα του ενζύμου στα βράγχια στην Φθιώτιδα (αριστερά) και την Λέσβο (δεξιά)

Η μέση τιμή της μέγιστης δραστικότητας της HOAD στην Φθιώτιδα για τα βράγχια είναι $2,99 \pm 2,56$ U/min.g.wet.wt, ενώ για την Λέσβο είναι $8,29 \pm 6,77$ U/min.g.wet.wt

Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του ενζύμου HOAD σε θηκόγραμμα στην περιοχή Φ (Γράφημα 9 και 10) και στην περιοχή Λ (Γράφημα 11 και 12) ανά δειγματοληψία.



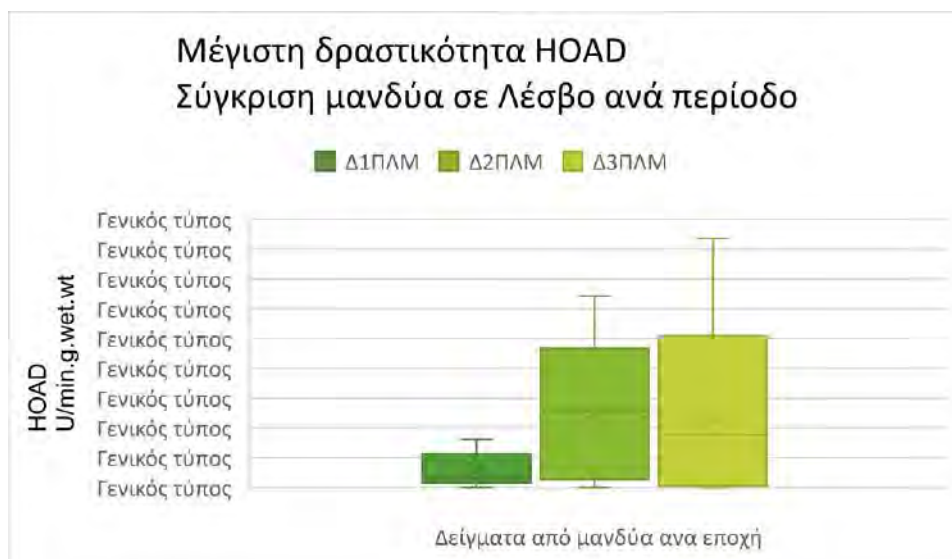
Γράφημα 9: Θηκόγραμμα που παρουσιάζει τη μέγιστη δραστικότητα του ενζύμου του μανδύα στην Φθιώτιδα ανά δειγματοληψία.

Για τον μανδύα στην περιοχή της Φθιώτιδας τον Φεβρουάριο η μέγιστη δραστικότητα του ενζύμου HOAD ήταν $4,35 \pm 2,28$ U/min.g.wet.wt, τον Απρίλιο $1,39 \pm 1,81$ U/min.g.wet.wt και τον Ιούνιο $2,27 \pm 1,53$ U/min.g.wet.wt



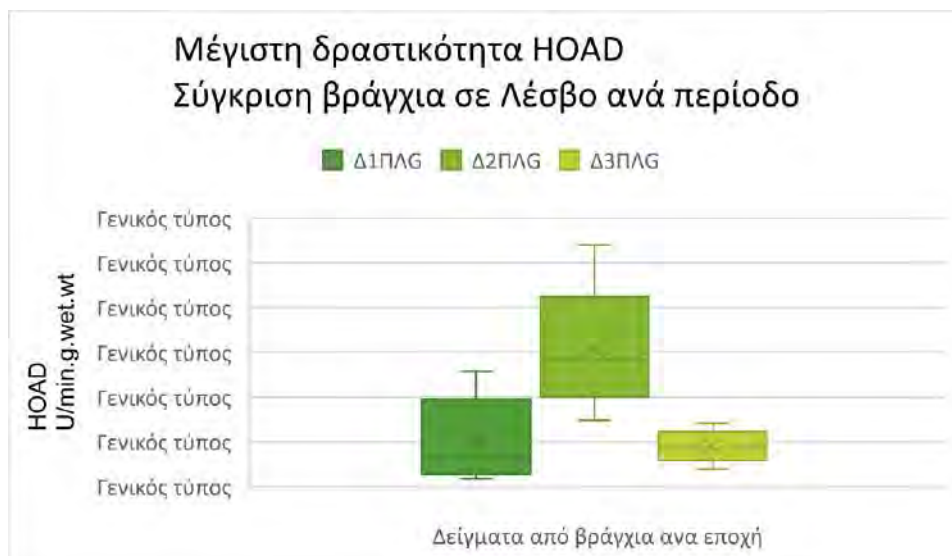
Γράφημα 10: Θηκόγραμμα που παρουσιάζει τη μέγιστη δραστικότητα του ενζύμου στα βράγχια στην Φθιώτιδα ανά δειγματοληψία.

Για τα βράγχια στην περιοχή της Φθιώτιδας τον Φεβρουάριο η μέγιστη δραστικότητα του ενζύμου HOAD ήταν 1.78 ± 0.89 U/min.g.wet.wt, τον Απρίλιο 3.04 ± 2.38 U/min.g.wet.wt και τον Ιούνιο 4.46 ± 1.68 U/min.g.wet.wt



Γράφημα 11: Θηκόγραμμα που παρουσιάζει τη μέγιστη δραστικότητα του ενζύμου του μανδύα στην Λέσβο ανά δειγματοληψία.

Για τον μανδύα στην περιοχή της Λέσβου τον Φεβρουάριο η μέγιστη δραστικότητα του ενζύμου HOAD ήταν 1.15 ± 1.11 U/min.g.wet.wt, τον Απρίλιο 4.97 ± 4.54 U/min.g.wet.wt και τον Ιούνιο 4.82 ± 6.14 U/min.g.wet.wt



Γράφημα 12: Θηκόγραμμα που παρουσιάζει τη μέγιστη δραστικότητα του ενζύμου στα βράγχια στην Λέσβο ανά δειγματοληψία.

Για τα βράγχια στην περιοχή της Λέσβου τον Φεβρουάριο η μέγιστη δραστικότητα του ενζύμου HOAD ήταν 5.10 ± 4.34 U/min.g.wet.wt, τον Απρίλιο 15.33 ± 6.45 U/min.g.wet.wt και τον Ιούνιο 4.16 ± 3.23 U/min.g.wet.wt

8.3 CS

Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του ενζύμου CS σε θηκόγραμμα στον μανδύα (Γράφημα 13) και στα βράγχια (Γράφημα 14) ανά περιοχή.



Γράφημα 13: Θηκόγραμμα που παρουσιάζει τη μέγιστη δραστικότητα του ενζύμου του μανδύα στην περιοχή Φ (αριστερά) και Λ (δεξιά)

Η μέση τιμή της μέγιστης δραστικότητας της CS στην Φθιώτιδα για τον μανδύα είναι $0,67 \pm 0,54$ U/min.g.wet.wt, ενώ για την Λέσβο είναι $1,13 \pm 1,23$ U/min.g.wet.wt



Γράφημα 14: Θηκόγραμμα που παρουσιάζει τη μέγιστη δραστικότητα του ενζύμου στα βράγχια στην Φθιώτιδα (αριστερά) και την Λέσβο (δεξιά)

Η μέση τιμή της μέγιστης δραστικότητας της CS στην Φθιώτιδα για τα βράγχια είναι $1,33 \pm 1,32$ U/min.g.wet.wt, ενώ για την Λέσβο είναι $1,52 \pm 1,86$ U/min.g.wet.wt

Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του ενζύμου CS σε θηκόγραμμα στην Φθιώτιδα (Γράφημα 15 και 16) και την Λέσβο (Γράφημα 17 και 18) ανά δειγματοληψία.



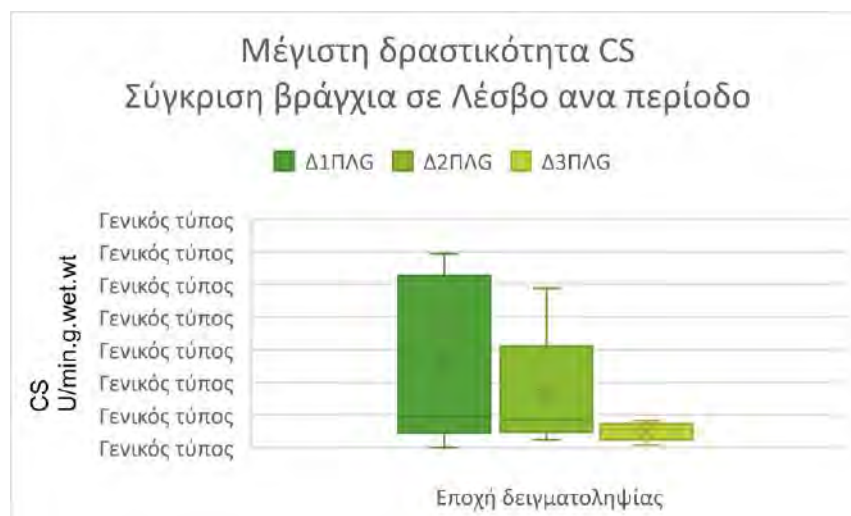
Γράφημα 15: Θηκόγραμμα που παρουσιάζει τη μέγιστη δραστικότητα του ενζύμου του μανδύα στην Φθιώτιδα ανά δειγματοληψία.

Για τον μανδύα στην περιοχή της Φθιώτιδας τον Φεβρουάριο η μέγιστη δραστικότητα του ενζύμου CS ήταν $0,93 \pm 0,44$ U/min.g.wet.wt, τον Απρίλιο $0,55 \pm 0,51$ U/min.g.wet.wt και τον Ιούνιο $0,54 \pm 0,56$ U/min.g.wet.wt



Γράφημα 16: Θηκόγραμμα που παρουσιάζει τη μέγιστη δραστικότητα του ενζύμου στα βράγχια στην Φθιώτιδα ανά δειγματοληψία.

Για τα βράγχια στην περιοχή της Φθιώτιδας τον Φεβρουάριο η μέγιστη δραστικότητα του ενζύμου CS ήταν $2,55 \pm 1,48$ U/min.g.wet.wt, τον Απρίλιο $1,13 \pm 0,58$ U/min.g.wet.wt και τον Ιούνιο $0,49 \pm 0,25$ U/min.g.wet.wt



Γράφημα 17: Θηκόγραμμα που παρουσιάζει τη μέγιστη δραστικότητα του ενζύμου στα βράγχια στην Λέσβο ανά δειγματοληψία.

Για τα βράγχια στην περιοχή της Λέσβου τον Φεβρουάριο η μέγιστη δραστικότητα του ενζύμου CS ήταν $2,47 \pm 1,48$ U/min.g.wet.wt, τον Απρίλιο $1,6 \pm 1,67$ U/min.g.wet.wt και τον Ιούνιο $0,31 \pm 0,31$ U/min.g.wet.wt



Γράφημα 18: Θηκόγραμμα που παρουσιάζει τη μέγιστη δραστικότητα του ενζύμου στα βράγχια στην Λέσβο ανά δειγματοληψία.

Για τα βράγχια στην περιοχή της Λέσβου τον Φεβρουάριο η μέγιστη δραστικότητα του ενζύμου CS ήταν $1,19 \pm 1,50$ U/min.g.wet.wt, τον Απρίλιο $0,69 \pm 1,14$ U/min.g.wet.wt και τον Ιούνιο $1,51 \pm 0,80$ U/min.g.wet.wt



7. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Κόπου, κάτι απίστευτο περιμένει να γίνει γνωστό.

Καρλ Σαγκάν
Αμερικανός αστρονόμος (1934-1996)

Παρόμοιες μετρήσεις που να αφορούν τα μεταβολικά ένζυμα σε θαλάσσιους οργανισμούς έχουν διεξαχθεί την τελευταία δεκαετία κυρίως, λόγω της κλιματικής αλλαγής. Οι έρευνες περιλαμβάνουν ένα ευρύ φάσμα θαλάσσιων οργανισμών, όπως ιχθύες, δίθυρα και καρκινοειδή (Chan et al., 2023; Collins et al., 2019; Doucet-Beaupré et al., 2010; Dowd & Somero, 2013; Feidantsis et al., 2021; Laganà et al., 2007, 2014; Wongso et al., 1999).

9.1 LDH

Όπως προαναφέρθηκε, το ένζυμο γαλακτική αφυδρογονάση (LDH) καταλύει την αντιστρεπτή μετατροπή του γαλακτικού οξέος στον κύκλο της γλυκόλυσης και είναι δείκτης του ρυθμού της αναερόβιας οξείδωσης των υδατανθρακών μέσω της γλυκόλυσης. Από τα υπόλοιπα ένζυμα τα οποία καταλύουν στον κύκλο της γλυκόλυσης, η LDH σχετίζεται περισσότερο με περιόδους περιβαλλοντικής υποξίας (Laganà et al., 2014). Σε έρευνα που είχε γίνει στην πύλα για την αναερόβια και μεταβολική πλαστικότητα πριν την εμφάνιση μαζικών θνησιμοτήτων αποδείχτηκε πως η δραστηριότητα της μηλικής αφυδρογονάσης (MDH) ήταν συνήθως πολύ υψηλότερη από εκείνη της LDH (Laganà et al., 2014). Αυτή είναι ίσως και η μόνη έρευνα που είχε γίνει πάνω σε μεταβολικά ένζυμα πριν την εμφάνιση των φαινομένων στην πύλα.

Σε περίπτωση διατάραξης της ομοιόστασης εντοπίζονται αυξημένα επίπεδα LDH στο αίμα. Από τα γραφήματα, παρουσιάζει ενδιαφέρον πως οι τιμές οι οποίες καταγράφηκαν στα βράγχια στην περιοχή της Φθιώτιδας ήταν υψηλότερες με μέση τιμή $3,25 \pm 2,2$ U/min.g.wet.wt, από αυτές στον κόλπο της Καλλονής με μέση τιμή $2,15 \pm 2,2$ U/min.g.wet.wt.

Όσον αφορά τις τιμές που καταγράφηκαν σε σχέση με την εποχικότητα, και στις δύο περιοχές, αλλά και στους δύο ιστούς οι τιμές ήταν μεγαλύτερες στην δειγματοληψία του Ιουνίου, γεγονός που καταδεικνύει την διατάραξη της ομοιόστασης στους οργανισμούς στην αύξηση της θερμοκρασίας.

9.2 CS

Όπως προαναφέρθηκε, το ένζυμο συνθετάση του κιτρικού οξέως (CS) δρα στο πρώτο από τα οκτώ βήματα του κύκλου Krebs (κύκλος κιτρικού οξέος), το τελικό στάδιο αποδόμησης των υδατανθράκων, των λιπών και των αμινοξέων που προσλαμβάνονται με τη τροφή και αποτελεί μέρος της αερόβιας αναπνοής. Είναι σημαντικό να ληφθεί υπόψη ότι η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης της συνθάσης του κιτρικού (CS) δεν είναι καλά κατανοητή σε ζωικά μοντέλα (Gaster et al., 2012). Χαμηλές τιμές του CS καταδεικνύουν την χαμηλή μεταβολική δραστηριότητα. Όντως, ως προαιρετικό αναερόβιο δίθυρο η πίνια, όπως και το *Mytilus spp.* ενεργοποιούν αναερόβια μεταβολικά μονοπάτια κατά τη διάρκεια της λειτουργικής υποξίας, όταν δηλαδή κλείνουν τα κελύφη τους (Chap et al., 2023). Σε έρευνες που έγιναν σε μύδια *M. californianus* δεν υπήρξε καμία μεταβολή στη δραστηριότητα του ενζύμου κατά τη διάρκεια οξείας παλίρροιας (Dowd & Somero, 2013). Παρομοίως, μια άλλη έρευνα έδειξε επίσης ότι η συνθάση κιτρικού οξέως στο *M. galloprovincialis* δεν επηρεάστηκε από μέτριο θερμικό σοκ (Collins et al., 2019).

Οι τιμές μάλιστα που καταγράφηκαν ήταν παρόμοιες, όπως φάνηκε και από τα παραπάνω γραφήματα, αν και οι τιμές του Μαλιακού κόλπου ήταν ελαφρώς μικρότερες με μέση τιμή $0,67 \pm 0,54$ U/min.g.wet.wt, ενώ για τον κόλπο της Καλλονής είναι $1,13 \pm 1,23$ U/min.g.wet.wt, όσον αφορά τον μανδύα. Αντίστοιχα, και στα βράγχια, ο Μαλιακός κόλπος έχει ελαφρώς μικρότερη μέση τιμή σε σχέση με τον κόλπο της Καλλονής: $1,33 \pm 1,32$ U/min.g.wet.wt, έναντι $1,52 \pm 1,86$ U/min.g.wet.wt.

Συγκρίνοντας τις διαφορετικές εποχές δειγματοληψίας, στον Μαλιακό η μέση τιμή στην δειγματοληψία του Ιουνίου είναι μικρότερη από τις δύο άλλες εποχές, κυρίως στα βράγχια. Όσον αφορά τον κόλπο Καλλονής, επίσης η τιμή που καταγράφηκε στα βράγχια τον Ιούνιο ήταν μικρότερη από τις άλλες δύο δειγματοληψίες.

9.3 HOAD

Η β-οξείδωση των λιπαρών οξέων, στην οποία συμμετέχει η HOAD είναι ο κυριότερος τρόπος απελευθέρωσης της ενέργειας από τα αποταμιευτικά λιπίδια.

Η μέση τιμή στα βράγχια του Μαλιακού ήταν χαμηλότερη από την μέση τιμή του Κόλπου της Καλλονής: $2,99 \pm 2,56$ U/min.g.wet.wt, έναντι $8,29 \pm 6,77$ U/min.g.wet.wt αντίστοιχα.

Όσον αφορά στην εποχικότητα, οι μέσες τιμές είναι παρόμοιες με εξαίρεση την δειγματοληψία του Απριλίου στην Καλλονή όπου η μέγιστη δραστητικότητα της HOAD ήταν $15,33 \pm 6,45$ U/min.g.wet.wt.

Αξίζει να σημειωθεί πως είναι η πρώτη φορά που γίνονται μετρήσεις των μεταβολικών ενζύμων στην πίνα και μάλιστα τα δείγματα προέρχονταν από νοσούντα άτομα. Ως εκ τούτου δεν υπάρχει κάποια βάση φυσιολογικών τιμών για να γίνει σύγκριση των αποτελεσμάτων και να διεξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα. Οι μεταβολές ωστόσο που σημειώθηκαν στις τιμές των διαφορετικών δειγματοληψιών επιτρέπουν την συσχέτιση της αύξησης της θερμοκρασίας με το φαινόμενο των μαζικών θνησιμοτήτων. Επιπλέον, και οι διαφορετικές τιμές στα μεταβολικά ένζυμα ανάμεσα στις δύο περιοχές ίσως δείχνουν πως η παρουσία και των δύο παθογόνων στην περιοχή του Μαλιακού διαδραμάτισε κάποιο ρόλο. Προτείνεται να γίνει εκτενέστερη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων για να κριθούν αν οι διαφορές μεταξύ των τιμών τόσο ανά περιοχή όσο και ανά εποχή δειγματοληψίας, είναι στατιστικά σημαντικές.

The background of the page is a photograph of a bird's nest made of twigs and dried grass, nestled among tall, green grass blades. The nest is positioned in the center-right of the frame. The text is overlaid on this image.

8. Συζήτηση

Καλύτερα να συζητήσεις ένα θέμα χωρίς να καταλήξεις κάπου παρά να καταλήξεις κάπου χωρίς να το συζητήσεις.

Ζοζέφ Ζουμπέρ
Γάλλος γνωμικογράφος (1754-1824)

Οι επιζωοτίες, οι οποίες είναι όλο και πιο συχνές στα οστρακοειδή τα τελευταία 30 χρόνια, οδηγούν συχνά σε γεγονότα μαζικής θνησιμότητας, ιδίως σε περιπτώσεις που τα παθογόνα είναι νεοεισαχθέντα στο περιβάλλον του ξενιστή (Carella et al., 2023). Ενώ οι μολυσματικές ασθένειες των ψαριών, συμπεριλαμβανομένων των αιτιολογικών παραγόντων και των μηχανισμών μετάδοσής τους, έχουν μελετηθεί εκτενώς, λίγα είναι γνωστά για τους παθογόνους παράγοντες των οστρακοειδών, ιδίως των δίθυρων (Feist et al., 2019).

Στα υδρόβια ζώα, οι πολύπλοκες αλληλεπιδράσεις μεταξύ βακτηρίων, ιών και παρασίτων επηρεάζονται και από τους μη μολυσματικούς περιβαλλοντικούς παράγοντες. Το αποτέλεσμα τέτοιων πολυπαραγοντικών λοιμώξεων σε συνδυασμό με τους περιβαλλοντικούς παράγοντες είναι δύσκολο να ανιχνευτεί, πόσο μάλλον να ελεγχθεί (Colleen A. Burge, 2017; Vaumourin et al., 2015). Πλέον οι διεπιστημονικές προσεγγίσεις, που περιλαμβάνουν ταυτόχρονες επιδημιολογικές και οικολογικές μελέτες σε διάφορα επίπεδα της βιολογικής οργάνωσης (από το μοριακό έως τον πληθυσμό), είναι απαραίτητες για να κατανοηθεί πλήρως η σχέση ξενιστή-παθογόνου (Byers, 2020; Gorgoglione et al., 2020).

Η *Pinna nobilis*, είναι το μεγαλύτερο δίθυρο της Μεσογείου και ενδημεί στις παράκτιες περιοχές σε βάθη από 0,5-60m. Και, ενώ η ανθρώπινη δραστηριότητα πάντα ήταν η κύρια αιτία θανάτωσής της πίνας, η προστασία της από τις αρχές του '90 επέτρεψε την ανάκαμψη σε λιγότερο από μία δεκαετία. Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια, παρατηρήθηκαν εκτεταμένες μαζικές θνησιμότητες της πίνας σε όλη σχεδόν την Μεσόγειο. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα τη συμπερίληψή του στο παράρτημα II της Σύμβασης της Βαρκελώνης (1992), στο παράρτημα IV της οδηγίας της ΕΕ για τους οικοτόπους (2007), και τον επαναπροσδιορισμό του είδους ως "απειλούμενου με εξαφάνιση" από τη Διεθνή Ένωση για τη Διατήρηση της Φύσης (IUCN). Το φαινόμενο, το οποίο πρωτοεμφανίστηκε στην Ισπανία το 2016, συνεχίζει να αποδεκατίζει τους πληθυσμούς της πίνας μέχρι και σήμερα.

Οι μαζικές θνησιμότητες, έχει αναφερθεί ότι μπορεί να μειώσουν έναν πληθυσμό σε σύντομο χρονικό διάστημα όταν συνδυαστούν με συγκεκριμένες περιβαλλοντικές συνθήκες, (McDowell & Sousa, 2019) ή αύξηση της θερμοκρασίας (McDowell & Sousa, 2019). Στην Μεσόγειο μεγάλης κλίμακας θερμοκρασιακές ανωμαλίες, που αντιστοιχούν σε αυξήσεις της συχνότητας και της έντασης των θαλάσσιων καυσώνων, αναφέρθηκαν το 1999 και στην συνέχεια την 5ετία 2015-2019. Η αύξηση αυτή επηρέασε πολλά μικροβενθικά κυρίως είδη, όπως εχινόδερμα και

άλλα είδη της κοραλλιογενής κοινότητας στην Ιταλία, τη Γαλλία και την Ισπανία (Albano et al., 2021; Byers, 2020).

Επιστρέφοντας στην περίπτωση της πίνας, μια σαφής κατανόηση της αιτιολογίας των συνεχιζόμενων μαζικών θνησιμοτήτων θεωρείται πλέον απαραίτητη. Οι διαγνωστικές έρευνες επιβεβαιώνουν την ταυτόχρονη παρουσία διαφόρων παθογόνων παραγόντων σε μολυσμένα άτομα: Πρώτα ταυτοποιήθηκε το *Haplosporidium pinnae* και ακολούθησε το *Mycobacterium* spp.. Οι έρευνες πριν το 2019 δεν πιστοποιούσαν παρά μόνο την ύπαρξη του απλοσποριδίου, έτσι αρχικά θεωρήθηκε αυτό υπαίτιο για τα περιστατικά μαζικής θνησιμότητας (Bureson & Ford, 2004; Cabanellas-Reboredo et al., 2019; Lattos, Giantsis, Karagiannis, Theodorou, et al., 2020). Ωστόσο, άλλοι ερευνητές ανέφεραν την παρουσία του μυκοβακτηρίου μαζί με αυτή του απλοσποριδίου, σε δείγματα τα οποία είχαν συλλεχθεί από πληγείσες περιοχές σε ολόκληρη την λεκάνη της Μεσογείου (Carella et al., 2020; Lattos, Giantsis, Karagiannis, & Michaelidis, 2020; P. Prado et al., 2021; Šarić et al., 2020). Ιστοπαθολογικές μελέτες σε δείγματα από τον Θερμαϊκό Κόλπο, Ελλάδα, έδειξαν την ταυτόχρονη παρουσία *Mycobacterium* spp. με *H. Pinnae* σε συλλεχθέντα άτομα (Lattos, Giantsis, Karagiannis, & Michaelidis, 2020). Περαιτέρω μοριακές διαγνωστικές αναλύσεις για το *P. rudis*, και άλλων ειδών δίθυρων που πραγματοποιήθηκαν στη Σαρδηνία (Scarpa et al., 2020a), κατέδειξαν ότι το *H. pinnae* ήταν παρόν σε άλλα δίθυρα, γεγονός που καταρρίπτει την αρχική υπόθεση πως ήταν αποκλειστικό παθογόνο της πίνας. Επιπλέον, σε ορισμένες περιπτώσεις, ανιχνεύτηκαν τα *Vibrio mediterranei* και *Perkinsus* spp. γεγονός που υποδηλώνει ότι η έκθεση σε διαφορετικά παθογόνα θα μπορούσε να αυξήσει την πολυπλοκότητα της παθογένειας της νόσου (Carella et al., 2023).

Όσον αφορά τις περιβαλλοντικές συνθήκες, καταγράφηκαν και συγκεντρώθηκαν τα στοιχεία των πληγέντων περιοχών σε όλη την λεκάνη της Μεσογείου. Η ανάλυση των στοιχείων, έδειξε πως η έκφραση της νόσου ήταν άρρηκτα συνδεδεμένη με θερμοκρασίες άνω των 13,5°C και με αλατότητα εύρους μεταξύ 36,5‰ και 39,7‰ (Cabanellas-Reboredo et al., 2019). Αυτό υποδηλώνει ότι η αλληλεπίδραση μεταξύ αυτών των παραγόντων θα μπορούσε να επηρεάσει την έκβαση των φαινομένων (Carella et al., 2020). Όλες αυτές οι παρατηρήσεις μαζί υπογραμμίζουν τη σημασία της περιβαλλοντικής παρακολούθησης για την εκτίμηση των κινδύνων θνησιμότητας των πληθυσμών και την εξέταση πιθανών ανακουφιστικών μέτρων.

Στο Αιγαίο Πέλαγος, η μόλυνση εξαπλώθηκε σε όλα τα ενδιαιτήματα μέχρι τα τέλη της άνοιξης του ίδιου έτους, περιορίζοντας την κατανομή των επιζώντων πληθυσμών μόνο στον κόλπο της Καλλονής στην Λέσβου και στον Μαλιακό κόλπο. Παρά την πτώση της θερμοκρασίας το χειμώνα του 2019, η θνησιμότητα του είδους συνεχίστηκε, αν και σε ρυθμό χαμηλότερο από αυτόν των καλοκαιρινών μηνών του προηγούμενου έτους (Lattos, Bitchava, et al., 2021). Η ιστοπαθολογία των θνησιγενών ζώων έδειξε σοβαρότερες αλλοιώσεις σε δείγματα που παρουσίαζαν ταυτόχρονες μολύνσεις τόσο από *Mycobacterium* spp. όσο και από *H. Pinnae* (Šarić et al., 2020).

Ενδιαφέρον παρουσιάζει η παρακολούθηση ενός πληθυσμού πίνας στον Θερμαϊκό (μία περιοχή με εξαιρετικά μεγάλη σημασία για την παραγωγή δίθυρων), στον οποίο υπήρξε ταυτόχρονη παρουσία των παθογόνων σε κάποια δείγματα στα οποία όμως δεν παρατηρήθηκαν κλινικά συμπτώματα (Lattos, Giantsis, Karagiannis, & Michaelidis, 2020). Η μαζική θνησιμότητα στην συγκεκριμένη περιοχή σημειώθηκε κατά τη διάρκεια μιας παρατεταμένης περιόδου αυξημένης θερμοκρασίας του θαλασσινού νερού το φθινόπωρο, προκαλώντας την κατάρρευση όλων των πληθυσμών σε βάθος από 4-10m.

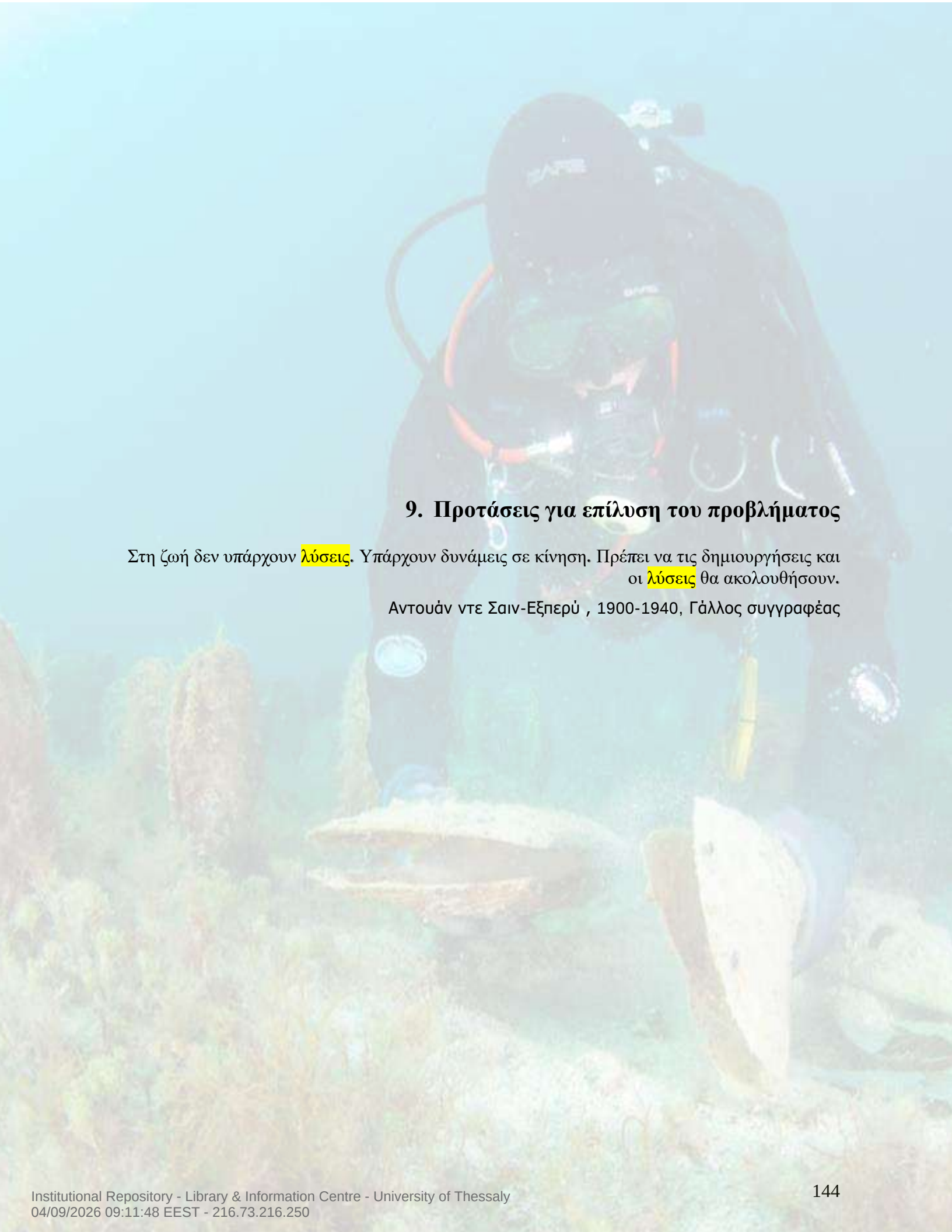
Πλέον περιστατικά θνησιμότητας έχουν καταγραφεί και σε άλλες περιοχές που μέχρι τώρα δεν είχαν, όπως η Αδριατική θάλασσα, όπου θεωρούνταν ένα από τα τελευταία καταφύγια με άτομα ελεύθερα από την ασθένεια (Čizmek et al., 2020), η θάλασσα του Μαρμαρά και οι βόρειες ακτές της Αφρικής.

Η ταυτόχρονη ανίχνευση και των δύο παθογόνων και η παρουσία τους εντός του φλεγμονωδών αλλοιώσεων, παρατηρήθηκε στις περισσότερες από τις εξεταζόμενες περιπτώσεις. Η απουσία του φαινομένου σε περιοχές όπου αυτά τα παθογόνα δεν ανιχνεύθηκαν (Šarić et al., 2020), υποστηρίζει την υπόθεση ότι πρόκειται για συνέργεια των δύο παθογόνων. Δεδομένου ότι η γνώση πάνω στον κύκλο ζωής του απλοσποριδίου είναι ελλιπής, ίσως να υπάρχουν πρόσθετοι βιοτικοί παράγοντες, όπως η παρουσία ή η απουσία εναλλακτικών ξενιστών, που πιθανά να διαδραματίζουν κάποιο ρόλο στην εμφάνιση του φαινομένου (Fey et al., 2015).

Δείκτες στρες όπως οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ, τα μονοπάτια ανοσολογικής απόκρισης, η απόπτωση και η αυτοφαγία διερευνήθηκαν σε προσβεβλημένα άτομα στην Ελλάδα (Lattos, Feidantsis, et al., 2021b). Η ανάλυση των Hsp70/Hsp90 έδειξε ότι στα άτομα που ανιχνεύθηκαν και τα δύο παθογόνα έχουν αυξημένα επίπεδα των μεταγραφών που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες

στρες, υποδεικνύοντας μια αυξημένη κυτταρική απόκριση στρες σε σύγκριση με τα άτομα που μολύνθηκαν μόνο με *Mycobacterium* (Carella et al., 2020).

Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, έρχονται να ενισχύσουν την θεωρία της συνεργιστικής δράσης των παθογόνων στην εμφάνιση των μαζικών θνησιμοτήτων, ωστόσο θα ήταν σκόπιμο να γίνουν περαιτέρω στατιστικές αναλύσεις για την καλύτερη ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Το γεγονός ότι τα μεταβολικά ένζυμα είχαν διαφορετικές τιμές στα άτομα από την περιοχή του Μαλιακού κόλπου από τα άτομα από την περιοχή της Καλλονής, δείχνει ότι η παρουσία των δύο παθογόνων παίζει ρόλο στις βασικές μεταβολικές αντιδράσεις: τον κύκλο του Krebs, στον κύκλο της γλυκόλυσης και στην β-οξείδωση των λιπαρών οξέων.



9. Προτάσεις για επίλυση του προβλήματος

Στη ζωή δεν υπάρχουν λύσεις. Υπάρχουν δυνάμεις σε κίνηση. Πρέπει να τις δημιουργήσεις και οι λύσεις θα ακολουθήσουν.

Αντουάν ντε Σαιν-Εξπερύ , 1900-1940, Γάλλος συγγραφέας

Αρχικά στην εργασία αναφέρθηκε η πίνα ως ένας οργανισμός ο οποίος βοηθά στον καθαρισμό των υδάτων λόγω της διηθηματοφάγου σίτισης του, επομένως η σημαντικότητα του στο οικοσύστημα της Μεσογείου είναι εξακριβωμένη και η ανάγκη για την διάσωσή της είναι επιτακτική. Παρακάτω παρατίθενται κάποιες προτάσεις για την στήριξη των εναπομεινάντων πληθυσμών.

Προκειμένου να ληφθούν ειδικά μέτρα για την αναχαίτιση της επιδημίας και την αποτελεσματική προστασία των εναπομεινάντων πληθυσμών, είναι ζωτικής σημασίας να συμπληρωθεί το κενό στην παθογένεια των δύο παραγόντων, του *Mycobacterium spp.* και του *Haplosporidium pinnae* και κυρίως των επιπτώσεων στον οργανισμό λόγω της συνέργειάς τους (Scarpa et al, 2021). Η ελλιπής γνώση, οφείλεται σε ένα μεγάλο ποσοστό στις διαφορετικές προσεγγίσεις για την ανάλυση των αποτελεσμάτων. Είναι λοιπόν απαραίτητο να βρεθεί και να ακολουθηθεί ένα πρωτόκολλο ανίχνευσης των παθογόνων με την χρήση αξιόπιστης μεθοδολογίας ανίχνευσης, όπως είναι η μοριακή (Carella et al., 2020). Επιπλέον, θα πρέπει να αναπτυχθεί μία μέθοδος δειγματοληψίας μη θανατηφόρα, ώστε να διασωθούν τα εναπομείναντα άτομα.

Μία βάση δεδομένων πλήρων ακολουθιών γονιδιώματος, μεταγραφωμάτων και μεταγονιδιωμάτων θα βοηθήσει στο να εντοπιστούν όλοι οι παράγοντες ιογένεσης, να αναπτυχθούν καλύτερες μοριακές μέθοδοι ανίχνευσης, στην απόκτηση γνώσης των μοριακών μηχανισμών τόσο του παθογόνου όσο και της ανοσολογικής απόκρισης του ξενιστή, και την κατανόηση της φυλογένεσης των παθογόνων και των ξενιστών. Υπό αυτή την έννοια, συνιστάται η δημιουργία μιας εξειδικευμένης βάσης δεδομένων που περιλαμβάνει γονιδιώματα από τα παθογόνα *Mycobacterium spp.*, *Vibrio spp.* και *Haplosporidium pinnae* που έχουν συλλεχθεί από τα διάφορα επεισόδια θνησιμότητας σε διαφορετικές γεωγραφικές τοποθεσίες. Θα πρέπει επίσης γίνει απομόνωση και καλλιέργεια των παθογόνων, ώστε να καθοριστεί η ιογένεια και η παθογένειά τους για την πίνα. Ωστόσο θα πρέπει να υπερκεραστούν εμπόδια, όπως η έλλειψη κυτταρικών σειρών δίθυρων μαλακίων, η οποία περιορίζει σημαντικά τη μελέτη της πειραματικής μετάδοσης των παθογόνων και τον καθορισμό της αλληλεπίδρασης ξενιστή-παθογόνου. Επιπλέον, οι κλασικές ορολογικές μέθοδοι δεν είναι κατάλληλες για διαγνωστικούς σκοπούς, δεδομένου ότι τα μαλάκια δεν παράγουν αντισώματα (Carella et al., 2023).

Ταυτόχρονα, περαιτέρω έρευνες θα πρέπει να γίνουν στα λεγόμενα είδη-δείκτες (διηθηματοφάγοι οργανισμοί π.χ. *Mytilus galloprovincialis* και *R. decussatus*, όπου φιλοξενούν τα ίδια παθογόνα με την πύνα) (Scarpa et al., 2020a). Έτσι, αφενός, θα ελαττωθεί το ποσοστό σφάλματος που υπάρχει λόγω του χαμηλού αριθμού των διαθέσιμων ζωντανών ατόμων προς ανάλυση, αφετέρου θα μπορούσαν να καλύψουν το κενό στις βασικές τιμές των μεταβολικών ενζύμων στους υγείς οργανισμούς, έτσι ώστε να υπάρξει σύγκριση των αποτελεσμάτων της παρούσας εργασίας και να συμβάλλουν έτι σε ένα ολοκληρωμένο αποτέλεσμα.

Οι περιβαλλοντικές συνθήκες μπορούν να αποτελέσουν πηγή αυξανόμενου στρες για τους οργανισμούς. Για να κατανοηθούν καλύτερα οι συνθήκες κάτω από τις οποίες εμφανίζεται το φαινόμενο, είναι απαραίτητο να συλλεχθούν πληροφορίες σχετικά με τις περιβαλλοντικές συνθήκες πριν και κατά την διάρκεια της μαζικής θνησιμότητας. Η διαφώτιση της συσχέτισης μεταξύ των αβιοτικών παραγόντων του εκάστοτε ενδιαίτηματος και της εμφάνισης των φαινομένων είναι επίσης σημαντική και για τον εντοπισμό πιθανών καταφυγίων που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για τη μετεγκατάσταση και την εισαγωγή (προηγουμένως επιβεβαιωμένων) υγίων ατόμων.

Εκτός από τις περιβαλλοντικές συνθήκες που πρέπει να μελετηθούν, απαιτούνται μελέτες και για τις επιπτώσεις της ρύπανσης πάνω στην πύνα, όπως έγινε με την περίπτωση της πετρελαιοκηλίδας του Don Pedro το 2007 στην Ibiza (Capó et al., 2015). Το κλασικό ενδιαίτημα των πινών είναι οι παράκτιες περιοχές, στις οποίες οι επιπτώσεις από την ανθρωπογενή δραστηριότητα είναι πολύ μεγάλες. Η αύξηση των ρύπων θα μπορούσε να προκαλέσει μεγαλύτερη πίεση στα άτομα και να μειώσει την αντοχή τους έναντι στα παθογόνα (Carella et al., 2023).

Επιπλέον αφού είναι επιβεβαιωμένο πως η θερμοκρασία και η αλατότητα παίζουν σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση και την σφοδρότητα της θνησιμότητας, διαχειριστικά σχέδια όπως η ελεγχόμενη απελευθέρωση γλυκού νερού σε κόλπους όπου ζουν πίνες, όπου είναι δυνατόν, για την εξισορρόπηση πιθανών αυξήσεων της αλατότητας πάνω από 36,5 g/L κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού, θα βοηθούσαν στην ελάττωση των επιπτώσεων.

Επιπρόσθετα, θα πρέπει να προφυλαχθούν με κάθε τρόπο τα ζώντα άτομα σε όλη την λεκάνη της Μεσογείου. Σε αυτό βοηθάει η ισχύουσα νομοθεσία, αλλά ίσως θα έπρεπε να γίνουν και περισσότερα βήματα προς την ενημέρωση του κοινού, όχι μόνο των επιστημόνων. Επιπλέον,

προγράμματα επιτήρησης με την συμμετοχή όλων των μερών δηλ. κυβερνήσεις, μη κυβερνητικοί οργανισμοί, ακαδημαϊκοί εταίροι, κτηνιατρικοί συνεργάτες και το ευρύ κοινό θα βοηθούσε στην ακριβέστερη καταγραφή όχι μόνο των μαζικών θνησιμοτήτων, αλλά και των επιζήσαντων πληθυσμών. Για το ευρύ κοινό, θα μπορούσαν να υπάρχουν μέσα ενημέρωσης τα οποία θα προάγουν την ενημέρωση και την ευαισθητοποίηση του. Έτσι, θα συνέβαλαν στην αποφυγή της παράνομης αλιείας και πώληση των πινών για οποιονδήποτε σκοπό.

Στους επιζήσαντες πληθυσμούς, θα πρέπει να εκπονηθούν μελέτες πάνω στους μηχανισμούς ανθεκτικότητας που ίσως έχουν αναπτύξει. Επιπλέον σημαντικό βήμα είναι η δημιουργία εκκολαπτηρίου για την πίνα, έτσι ώστε να παράγονται υγιής οργανισμοί και να επανεισάγονται στα φυσικά ενδιαιτήματα, όπως αναφέρθηκε παραπάνω.

Η πίνα είναι ένας οργανισμός, ο οποίος βρέθηκε δύο φορές στο χείλος της εξαφάνισης. Αυτό θα πρέπει να ανησυχήσει την επιστημονική κοινότητα, όχι μόνο τις ειδικότητες που ασχολούνται με τους θαλάσσιους οργανισμούς, αλλά και άλλες όπως φυσικοί, χημικοί και μοριακοί βιολόγοι για να ληφθούν μέτρα, όχι μόνο για το μέλλον και την σωτηρία της πίνας, αλλά και για όλους τους οργανισμούς που επηρεάζονται από την κλιματική αλλαγή.



PINNA NOBILIS

**CALL TO ACTION FOR
CENTRAL AND WESTERN
MEDITERRANEAN
COUNTRIES**



10. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Να αγωνίζεσαι, να ψάχνεις, να βρίσκεις και να μην υποκύπτεις.

Alfred Tennyson
Άγγλος ποιητής (1809-1892)

- Acarli, S. (2021). Population, Aquaculture and Transplantation Applications of Critically Endangered Species *Pinna nobilis* (Linnaeus 1758) in the Mediterranean Sea. *Marine Science and Technology Bulletin*, 10(4), 350–369. <https://doi.org/10.33714/masteb.627562>
- Ache, H. N. (1992). *Caracterisation des hemocytes d'un mollusque bivalve marin, la nacre, Pinna nobilis L. 1758*.
- Addis, P., Secci, M., Brundu, G., Manunza, A., Corrias, S., & Cau, A. (2009). Density, size structure, shell orientation and epibiontic colonization of the fan mussel *Pinna nobilis* L. 1758 (Mollusca: Bivalvia) in three contrasting habitats in an estuarine area of Sardinia (W Mediterranean). *Scientia Marina*, 73(1), 143–152. <https://doi.org/10.3989/scimar.2009.73n1143>
- Alabi, A. O., Jones, D. A., & Latchford, J. W. (1999). The efficacy of immersion as opposed to oral vaccination of *Penaeus indicus* larvae against *Vibrio harveyi*. In *Aquaculture* (Vol. 178).
- Albano, P. G., Steger, J., Bošnjak, M., Dunne, B., Guifarro, Z., Turapova, E., Hua, Q., Kaufman, D. S., Rilov, G., & Zuschin, M. (2021). Native biodiversity collapse in the eastern Mediterranean. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 288(1942). <https://doi.org/10.1098/rspb.2020.2469>
- Alomar, C., Vázquez-Luis, M., Magraner, K., Lozano, L., & Deudero, S. (2015). Evaluating stable isotopic signals in bivalve *Pinna nobilis* under different human pressures. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 467, 77–86. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2015.03.006>
- Andree, K. B., Carrasco, N., Carella, F., Furones, D., & Prado, P. (2021). *Vibrio mediterranei*, a potential emerging pathogen of marine fauna: investigation of pathogenicity using a bacterial challenge in *Pinna nobilis* and development of a species-specific PCR. *Journal of Applied Microbiology*, 130(2), 617–631. <https://doi.org/10.1111/jam.14756>
- Arrieche, D., Maeda-Martínez, A. N., Farías-Sánchez, J. A., & Saucedo, P. E. (2010). Desempeño biológico del callo de hacha *Atrina maura* y el mejillón *Mytella strigata* en diferentes regímenes de flujo de agua. *Ciencias Marinas*, 36(3), 237–248. <https://doi.org/10.7773/cm.v36i3.1704>

- Arzul, I., & Carnegie, R. B. (2015). New perspective on the haplosporidian parasites of molluscs. *Journal of Invertebrate Pathology*, 131, 32–42. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.07.014>
- Azevedo, C., & Hine, M. P. (2017). Haplosporidia. In *Handbook of the Protists: Second Edition* (pp. 823–850). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-28149-0_16
- Baker, P., & Mann, R. L. (1997). *The postlarval phase of bivalve mollusks: A review of functional ecology and new records of postlarval drifting of Chesapeake Bay bivalves* (Vol. 61, Issue 2). <https://scholarworks.wm.edu/vimsarticles/1541>
- Basso, L., Vázquez-Luis, M., García-March, J. R., Deudero, S., Alvarez, E., Vicente, N., Duarte, C. M., & Hendriks, I. E. (2015a). The Pen Shell, *Pinna nobilis*: A Review of Population Status and Recommended Research Priorities in the Mediterranean Sea. In *Advances in Marine Biology* (Vol. 71, pp. 109–160). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.amb.2015.06.002>
- Bayne', B. L., Hawkins', A. J. S., & Navarro, E. (1987). Feeding and digestion by the mussel (*Bivalvia* : Mollusca) in mixtures of silt low concentrations. In *Mar. Biol. Ecol. Vol. III*.
- Betti, F., Venturini, S., Merotto, L., Cappanera, V., Ferrando, S., Aicardi, S., Mandich, A., Castellano, M., & Povero, P. (2021). Population trends of the fan mussel *Pinna nobilis* from Portofino MPA (Ligurian Sea, Western Mediterranean Sea) before and after a mass mortality event and a catastrophic storm. *European Zoological Journal*, 88(1), 18–25. <https://doi.org/10.1080/24750263.2020.1850891>
- Biotechnology, and, Wise, G. S., Kushmaro, A., Banin, E., Loya, Y., Stackebrandt, E., & Rosenberg, E. (2001). *Vibrio shiloi* sp. nov., the causative agent of bleaching of the coral *Oculina patagonica*. In *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (Vol. 51).
- Box, A., Capó, X., Tejada, S., Catanese, G., Grau, A., Deudero, S., Sureda, A., & Valencia, J. M. (2020). Reduced antioxidant response of the fan mussel *pinna nobilis* related to the presence of haplosporidium pinnae. *Pathogens*, 9(11), 1–14. <https://doi.org/10.3390/pathogens9110932>

- Bruford, M. W., & Wayne, R. K. (1993). Microsatellites and their application to population genetic studies. In *Current Opinion in Genetics and Development* (Vol. 3).
- Burreson, E. M., & Ford, S. E. (2004). A review of recent information on the Haplosporidia, with special reference to *Haplosporidium nelsoni* (MSX disease). In *Aquatic Living Resources* (Vol. 17, Issue 4, pp. 499–517). <https://doi.org/10.1051/alr:2004056>
- Butler A., V. N. , D. G. B. (1993). Ecology of the pteroid bivalves *P. nobilis* *bicolor* Gmelin & *P. nobilis* L. *Mar.Life.31-237-45-1993-Ecologie-Pn-Pb*.
- Byers, J. E. (2020). *Marine Parasites and Disease in the Era of Global Climate Change*. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-031920>
- Cabanellas-Reboredo, M., Blanco, A., Deudero, S., & Tejada, S. (2010). Efectos de la invasión de la macroalga invasora *Lophocladia lallemandii* en la dieta y el trofismo de *Pinna nobilis* (Mollusca: Bivalvia) y sus huéspedes *Pontonia pinnophylax* y *Nepinnotheres pinnotheres* (Crustacea: Decapoda). *Scientia Marina*, 74(1), 101–110. <https://doi.org/10.3989/scimar.2010.74n1101>
- Cabanellas-Reboredo, M., Deudero, S., Alós, J., Valencia, J. M., March, D., Hendriks, I. E., & Álvarez, E. (2009). Recruitment of *Pinna nobilis* (Mollusca: Bivalvia) on artificial structures. *Marine Biodiversity Records*, 2. <https://doi.org/10.1017/s1755267209001274>
- Cabanellas-Reboredo, M., Vázquez-Luis, M., Murre, B., Álvarez, E., Deudero, S., Amores, Á., Addis, P., Ballesteros, E., Barrajón, A., Coppa, S., García-March, J. R., Giacobbe, S., Casaldueiro, F. G., Hadjioannou, L., Jiménez-Gutiérrez, S. V., Katsanevakis, S., Kersting, D., Mačić, V., Mavrič, B., ... Hendriks, I. E. (2019). Tracking a mass mortality outbreak of pen shell *Pinna nobilis* populations: A collaborative effort of scientists and citizens. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49808-4>
- Capó, X., Tejada, S., Box, A., Deudero, S., & Sureda, A. (2015). Oxidative status assessment of the endemic bivalve *Pinna nobilis* affected by the oil spill from the sinking of the Don Pedro. *Marine Environmental Research*, 110, 19–24. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2015.07.013>
- Carella, F., Aceto, S., Pollaro, F., Miccio, A., Iaria, C., Carrasco, N., Prado, P., & De Vico, G. (2019). A mycobacterial disease is associated with the silent mass mortality of the pen shell

- Pinna nobilis along the Tyrrhenian coastline of Italy. *Scientific Reports*, 9(1).
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-37217-y>
- Carella, F., Elisabetta, A., Simone, F., Fulvio, S., Daniela, M., Prado, P., Rossella, P., Marino, F., Eleonora, F., Tobia, P., & De Vico, G. (2020). In the Wake of the Ongoing Mass Mortality Events: Co-occurrence of Mycobacterium, Haplosporidium and Other Pathogens in Pinna nobilis Collected in Italy and Spain (Mediterranean Sea). *Frontiers in Marine Science*, 7.
<https://doi.org/10.3389/fmars.2020.00048>
- Carella, F., Palić, D., Šarić, T., Župan, I., Gorgoglione, B., Prado, P., Andree, K. B., Giantsis, I. A., Michaelidis, B., Lattos, A., Theodorou, J. A., Luis Barja Perez, J., Rodriguez, S., Scarpa, F., Casu, M., Antuofermo, E., Sanna, D., Otranto, D., Panarese, R., ... Vico, G. De. (2023). Multipathogen infections and multifactorial pathogenesis involved in noble pen shell (Pinna nobilis) mass mortality events: Background and current pathologic approaches. *Veterinary Pathology*, 60(5), 560–577. <https://doi.org/10.1177/03009858231186737>
- Carnegie, R. B., Hill, K. M., Stokes, N. A., & Bureson, E. M. (2014). The haplosporidian Bonamia exitiosa is present in Australia, but the identity of the parasite described as Bonamia (formerly Mikrocytos) roughleyi is uncertain. *Journal of Invertebrate Pathology*, 115(1), 33–40. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2013.10.017>
- Casillo, A., Lanzetta, R., Parrilli, M., & Corsaro, M. M. (2018). Exopolysaccharides from marine and marine extremophilic bacteria: Structures, properties, ecological roles and applications. In *Marine Drugs* (Vol. 16, Issue 2). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/md16020069>
- Catanese, G., Grau, A., Valencia, J. M., Garcia-March, J. R., Vázquez-Luis, M., Alvarez, E., Deudero, S., Darriba, S., Carballal, M. J., & Villalba, A. (2018b). Haplosporidium pinnae sp. nov., a haplosporidan parasite associated with mass mortalities of the fan mussel, Pinna nobilis, in the Western Mediterranean Sea. *Journal of Invertebrate Pathology*, 157, 9–24.
<https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.07.006>
- Čelebičić, M., & Gradasevic, N. (2020). IS PINNA NOBILIS L. CRITICALLY ENDANGERED IN NEUM BAY, BOSNIA AND HERZEGOVINA? *View project*.
<https://www.researchgate.net/publication/346788565>

- Centoducati, G., Tarsitano, E., Bottalico, A., Marvulli, M., Lai, O. R., & Crescenzo, G. (2007). Monitoring of the endangered *Pinna nobilis* Linné, 1758 in the Mar Grande of Taranto (Ionian Sea, Italy). *Environmental Monitoring and Assessment*, 131(1–3), 339–347. <https://doi.org/10.1007/s10661-006-9479-z>
- Cerrano C., Bavestrello G., Bianchi N., Cattaneo-vietti R., Bava S., Morganti C., Morri C., Picco P., Sara G., Schiaparelli S., Siccardi A., & Sponga F. (2000). A catastrophic mass- mortality episode of gorgonians and other organisms in the Ligurian Sea (North-western Mediterranean), summer 1999. *Ecology Letters*, 3, 284–293.
- Chan, G., Gracey, A. Y., Solares, E., Wehrle, B. A., & Connor, K. M. (2023). Cycles of heat exposure elevate metabolic enzyme genes and alters digestion in mussels. *Frontiers in Marine Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmars.2023.1120695>
- Çinar, M. E., & Bilecenoglu, M. (2023). The Predation of *Pinna nobilis* (Mollusca) Juveniles by the Spiny Sea Star *Marthasterias glacialis* (Echinodermata) in the Sea of Marmara. *Sustainability*, 15(22), 15719. <https://doi.org/10.3390/su152215719>
- Čižmek, H., Čolić, B., Gračan, R., Grau, A., & Catanese, G. (2020). An emergency situation for pen shells in the Mediterranean: The Adriatic Sea, one of the last *Pinna nobilis* shelters, is now affected by a mass mortality event. *Journal of Invertebrate Pathology*, 173. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2020.107388>
- Clemens, D. L. (1996). *Characterization of the Mycobacterium tuberculosis phagosome*.
- Colleen A. Burge, A. S.-M. and N. D. R. (2017). Ecology of emerging infectious diseases of invertebrates. *Institute of Marine and Environmental Technology, University of Maryland Baltimore County, Baltimore, MD, U*.
- Collins, C. L., Burnett, N. P., Ramsey, M. J., Wagner, K., & Zippay, M. L. (2019). *Physiological responses to heat stress in an invasive mussel Mytilus galloprovincialis depend on tidal habitat*.
- Coppa, S., Guala, I., De Lucia, G. A., Massaro, G., & Bressan, M. (2010). Density and distribution patterns of the endangered species *Pinna nobilis* within a *Posidonia oceanica* meadow in the Gulf of Oristano (Italy). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 90(5), 885–894. <https://doi.org/10.1017/S002531540999141X>

- Cranfield, H. J., Dunn, A., Doonan, I. J., & Michael, K. P. (2005). *Bonamia exitiosa* epizootic in *Ostrea chilensis* from Foveaux Strait, southern New Zealand between 1986 and 1992. *ICES Journal of Marine Science*, 62(1), 3–13. <https://doi.org/10.1016/j.icesjms.2004.06.021>
- Darriba, S. (2017). First haplosporidan parasite reported infecting a member of the Superfamily Pinnoidea (*Pinna nobilis*) during a mortality event in Alicante (Spain, Western Mediterranean). *Journal of Invertebrate Pathology*, 148, 14–19. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2017.05.006>
- Davenport, J., Ezgeta-Balić, D., Peharda, M., Skejić, S., Ninčević-Gladan, Ž., & Matijević, S. (2011). Size-differential feeding in *Pinna nobilis* L. (Mollusca: Bivalvia): Exploitation of detritus, phytoplankton and zooplankton. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 92(2), 246–254. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2010.12.033>
- De, B., & Creocan, G. (1995). *Successive hermaphroditism with asynchronous maturation of Pinna nobilis (L.) (Bivalvia : Pterioidea)*. <https://www.researchgate.net/publication/292821595>
- De Galuejack B. (1993). Ecology of the pteroid bivalves *Pinna Bicolor* Gmelin and *Pinna nobilis* L. *Mar. Life*, 3(1–2), 3745.
- De Gaulejac. (1995). *Successive hermaphroditism with asynchronous maturation of Pinna nobilis (L.) (Bivalvia : Pterioidea)*. <https://www.researchgate.net/publication/292821595>
- Deepika, A., Sreedharan, K., & Rajendran, K. V. (2020). Responses of some innate immune-genes involved in the toll-pathway in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) to *Vibrio harveyi* infection and on exposure to ligands in vitro. *Journal of the World Aquaculture Society*, 51(6), 1419–1429. <https://doi.org/10.1111/jwas.12723>
- Deudero, S., Grau, A., Vázquez-Luis, M., Álvarez, E., Alomar, C., & Hendriks, I. E. (2017a). Reproductive investment of the pen shell *Pinna nobilis* (Bivalvia, Pinnidae) Linnaeus, 1758 in Cabrera National Park, Spain. *Mediterranean Marine Science*, 18(2), 271–284. <https://doi.org/10.12681/mms.1645>
- Deudero, S., Grau, A., Vázquez-Luis, M., Álvarez, E., Alomar, C., & Hendriks, I. E. (2017b). Reproductive investment of the pen shell *Pinna nobilis* (Bivalvia, Pinnidae) Linnaeus, 1758

- in Cabrera National Park, Spain. *Mediterranean Marine Science*, 18(2), 271–284.
<https://doi.org/10.12681/mms.1645>
- Donato, G., Vázquez-Luis, M., Nebot-Colomer, E., Lunetta, A., & Giacobbe, S. (2021). Noble fan-shell, *Pinna nobilis*, in Lake Faro (Sicily, Italy): Ineluctable decline or extreme opportunity? *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 261.
<https://doi.org/10.1016/j.ecss.2021.107536>
- Doucet-Beaupré, H., Dubé, C., Breton, S., Pörtner, H. O., & Blier, P. U. (2010). Thermal sensitivity of metabolic enzymes in subarctic and temperate freshwater mussels (Bivalvia: Unionoida). *Journal of Thermal Biology*, 35(1), 11–20.
<https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2009.10.002>
- Dowd, W. W., & Somero, G. N. (2013). Behavior and survival of *Mytilus* congeners following episodes of elevated body temperature in air and seawater. *Journal of Experimental Biology*, 216(3), 502–514. <https://doi.org/10.1242/jeb.076620>
- Engelsma, M. Y., Culloty, S. C., Lynch, S. A., Arzul, I., & Carnegie, R. B. (2014). Bonamia parasites: A rapidly changing perspective on a genus of important mollusc pathogens. *Diseases of Aquatic Organisms*, 110(1–2), 5–23. <https://doi.org/10.3354/dao02741>
- Escudero, A., Iriondo, J. M., & Torres, M. E. (2003). Spatial analysis of genetic diversity as a tool for plant conservation. *Biological Conservation*, 113(3), 351–365.
[https://doi.org/10.1016/S0006-3207\(03\)00122-8](https://doi.org/10.1016/S0006-3207(03)00122-8)
- Essl, F., Bacher, S., Genovesi, P., Hulme, P. E., Jeschke, J. M., Katsanevakis, S., Kowarik, I., Kühn, I., Pyšek, P., Rabitsch, W., Schindler, S., Van Kleunen, M., Vilà, M., Wilson, J. R. U., & Richardson, D. M. (2018). Which taxa are alien? criteria, applications, and uncertainties. In *BioScience* (Vol. 68, Issue 7, pp. 496–509). Oxford University Press.
<https://doi.org/10.1093/biosci/biy057>
- Feidantsis, K., Michaelidis, B., Raitsos, D., & Vafidis, D. (2021). Seasonal metabolic and oxidative stress responses of commercially important invertebrate species — Correlation with their habitat. *Marine Ecology Progress Series*, 658, 27–46.
<https://doi.org/10.3354/meps13565>

- Feist, S. W., Thrush, M. A., Dunn, P., Bateman, K., & Peeler, E. J. (2019). The aquatic animal pandemic crisis. *OIE Revue Scientifique et Technique*, 38(2), 437–457.
<https://doi.org/10.20506/rst.38.2.2997>
- Fey, S. B., Siepielski, A. M., Nusslé, S., Cervantes-Yoshida, K., Hwan, J. L., Huber, E. R., Fey, M. J., Catenazzi, A., & Carlson, S. M. (2015). Recent shifts in the occurrence, cause, and magnitude of animal mass mortality events. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(4), 1083–1088.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1414894112>
- Firmino, J., Furones, M. D., Andree, K. B., Sarasquete, C., Ortiz-Delgado, J. B., Asencio-Alcudia, G., & Gisbert, E. (2019). Contrasting outcomes of *Vibrio harveyi* pathogenicity in gilthead seabream, *Sparus aurata* and European seabass, *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture*, 511. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734210>
- Ford' And, S. E., & Haskin, H. H. (1982). History and Epizootiology of *Haplosporidium nelsoni* (MSX), an Oyster Pathogen in Delaware Bay, 1957-1980. In *JOURNAL OF INVERTEBRATE PATHOLOGY* (Vol. 40).
- Frey, J. K. (1993). Society of Systematic Biologists Modes of Peripheral Isolate Formation and Speciation. In *Biology* (Vol. 42, Issue 3).
- Furlaneto, I. P., da Conceição, M. L., Conceição, E. C., Lopes, M. L., Rodrigues, Y. C., Macelino, B. R., Gomes, H. M., Suffys, P. N., Guimarães, R. J. de P. S. e., da Silva, M. G., Duarte, R. S., da Costa Francez, L., Casseb, A. do R., Câmara, V. de M., Pereira, W. L. A., da Costa, A. R. F., & Lima, K. V. B. (2020). Molecular epidemiology of mycobacteria among herds in Marajó Island, Brazil, reveals strains genetically related and potential zoonotic risk of clinical relevance. *Infection, Genetics and Evolution*, 77.
<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.104044>
- Garcia- March. (2006). *This protocol is a Management tool, done through the MedPAN-Interreg IIIC-project MALTA ENVIRONMENT AND PLANNING AUTHORITY (MEPA)*.
- Garcia- March. (2007). *Protocol to study and monitor Pinnanobilis population within protected areas*.

- García March, J. R. V. N. (2006). *Protocol to study and monitor Pinna nobilis populations within marine protected areas*.
- García-March, J. R., García-Carrascosa, A. M., Peña Cantero, A. L., & Wang, Y. G. (2007). Population structure, mortality and growth of *Pinna nobilis* Linnaeus, 1758 (Mollusca, Bivalvia) at different depths in Moraira bay (Alicante, Western Mediterranean). *Marine Biology*, 150(5), 861–871. <https://doi.org/10.1007/s00227-006-0386-1>
- García-March, J. R., Marquez-Aliaga, A., Wang, Y. G., Surge, D., & Kersting, D. K. (2011). Study of *Pinna nobilis* growth from inner record: How biased are posterior adductor muscle scars estimates? *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 407(2), 337–344. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2011.07.016>
- García-March, J. R., Pérez-Rojas, L., & García-Carrascosa, A. M. (2007a). Influence of hydrodynamic forces on population structure of *Pinna nobilis* L., 1758 (Mollusca: Bivalvia): The critical combination of drag force, water depth, shell size and orientation. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 342(2), 202–212. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2006.09.007>
- García-March, J. R., Sanchís Solsona, M. Á., & García-Carrascosa, A. M. (2008a). Shell gaping behaviour of *Pinna nobilis* L., 1758: Circadian and circalunar rhythms revealed by in situ monitoring. *Marine Biology*, 153(4), 689–698. <https://doi.org/10.1007/s00227-007-0842-6>
- García-March, J. R., Sanchís Solsona, M. Á., & García-Carrascosa, A. M. (2008b). Shell gaping behaviour of *Pinna nobilis* L., 1758: Circadian and circalunar rhythms revealed by in situ monitoring. *Marine Biology*, 153(4), 689–698. <https://doi.org/10.1007/s00227-007-0842-6>
- García-March, J. R., Tena, J., Henandis, S., Vázquez-Luis, M., López, D., Téllez, C., Prado, P., Navas, J. I., Bernal, J., Catanese, G., Grau, A., López-Sanmartín, M., Nebot-Colomer, E., Ortega, A., Planes, S., Kersting, D., Jimenez, S., Hendriks, I., Moreno, D., ... Deudero, S. (2020). Can we save a marine species affected by a highly infective, highly lethal, waterborne disease from extinction? In *Biological Conservation* (Vol. 243). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2020.108498>

- Garnier, M., Labreuche, Y., Garcia, C., Robert, M., & Nicolas, J. L. (2007). Evidence for the involvement of pathogenic bacteria in summer mortalities of the pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Microbial Ecology*, 53(2), 187–196. <https://doi.org/10.1007/s00248-006-9061-9>
- Garrabou, J., Coma, R., Bensoussan, N., Bally, M., Chevaldonné, P., Cigliano, M., Diaz, D., Harmelin, J. G., Gambi, M. C., Kersting, D. K., Ledoux, J. B., Lejeusne, C., Linares, C., Marschal, C., Pérez, T., Ribes, M., Romano, J. C., Serrano, E., Teixido, N., ... Cerrano, C. (2009). Mass mortality in Northwestern Mediterranean rocky benthic communities: Effects of the 2003 heat wave. *Global Change Biology*, 15(5), 1090–1103. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2008.01823.x>
- Gaster, M., Nehlin, J. O., & Minet, A. D. (2012). Impaired TCA cycle flux in mitochondria in skeletal muscle from type 2 diabetic subjects: Marker or maker of the diabetic phenotype. In *Archives of Physiology and Biochemistry* (Vol. 118, Issue 3, pp. 156–189). <https://doi.org/10.3109/13813455.2012.656653>
- Gay Melanie, Renault Tristan, Pons Anne- Marie, & Le Roux Frederique. (2004). Two *Vibrio splendidus* related strains collaborate to kill *Crassostrea gigas* taxonomy and host alterations. *Diseases of Aquatic Organisms*, 62, 65–74.
- Giacobbe, S. (2002). Epibiontic mollusc communities on *Pinna nobilis* L. (Bivalvia, Mollusca). *Journal of Natural History*, 36(12), 1385–1396. <https://doi.org/10.1080/00222930110056892>
- Giacobbe, S., & Cosentino A. (2006). *Shell ornament in Pinna nobilis and Pinna rudis (Bivalvia Pteriomorpha)*.
- Giménez-Romero, À., Grau, A., Hendriks, I. E., & Matias, M. A. (2021). *Modelling Parasite-produced Marine Diseases: The case of the Mass Mortality Event of Pinna nobilis*. <https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2021.109705>
- Gómez-León, J., Villamil, L., Lemos, M. L., Novoa, B., & Figueras, A. (2005). Isolation of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio splendidus* from aquacultured carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) larvae associated with mass mortalities. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(1), 98–104. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.1.98-104.2005>

- González-Wangüemert, M., Basso, L., Balau, A., Costa, J., Renault, L., Serrão, E. A., Duarte, C. M., & Hendriks, I. E. (2019). Gene pool and connectivity patterns of *Pinna nobilis* in the Balearic Islands (Spain, Western Mediterranean Sea): Implications for its conservation through restocking. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 29(2), 175–188. <https://doi.org/10.1002/aqc.2976>
- González-Wangüemert, M., Costa, J., Basso, L., Duarte, C. M., Serrão, E. A., & Hendriks, I. (2015). Highly polymorphic microsatellite markers for the Mediterranean endemic fan mussel *Pinna nobilis*. *Mediterranean Marine Science*, 16(1), 31–35. <https://doi.org/10.12681/mms.949>
- Gorgoglione, B., Bailey, C., Bass, D., Saraiva, M., Adamek, M., Noguera, P., Ciulli, S., Palíková, M., Aguirre-Gil, I., Bigarré, L., & Haenen, O. (2020). Co-infections and multiple stressors in fish. In *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol* (Vol. 40, Issue 1).
- Grau, A., Villalba, A., Navas, J. I., Hansjosten, B., Valencia, J. M., García-March, J. R., Prado, P., Follana-Berná, G., Morage, T., Vázquez-Luis, M., Álvarez, E., Katharios, P., Pavludi, C., Nebot-Colomer, E., Tena-Medialdea, J., Lopez-Sanmartín, M., Peyran, C., Čížmek, H., Sarafidou, G., ... Catanese, G. (2022). Wide-Geographic and Long-Term Analysis of the Role of Pathogens in the Decline of *Pinna nobilis* to Critically Endangered Species. *Frontiers in Marine Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmars.2022.666640>
- Grimm, C., Huntsberger, C., Markey, K., Inglis, S., & Smolowitz, R. (2016). Identification of a *Mycobacterium* sp. as the causative agent of orange nodular lesions in the Atlantic sea scallop *Placopecten magellanicus*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 118(3), 247–258. <https://doi.org/10.3354/dao02961>
- Harvell, C. D., Montecino-Latorre, D., Caldwell, J. M., Burt, J. M., Bosley, K., Keller, A., Heron, S. F., Salomon, A. K., Lee, L., Pontier, O., Pattengill-Semmens, C., & Gaydos, J. K. (2019). *Disease epidemic and a marine heat wave are associated with the continental-scale collapse of a pivotal predator (Pycnopodia helianthoides)*. <https://www.science.org>
- Hashem, M., & El-Barbary, M. (2013). *Vibrio harveyi* infection in Arabian Surgeon fish (*Acanthurus sohal*) of red sea at hurghada, Egypt. *Egyptian Journal of Aquatic Research*, 39(3), 199–203. <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2013.10.006>

- Hashish, E., Merwad, A., Elgaml, S., Amer, A., Kamal, H., Elsadek, A., Marei, A., & Sitohy, M. (2018). Mycobacterium marinum infection in fish and man: Epidemiology, pathophysiology and management; a review. In *Veterinary Quarterly* (Vol. 38, Issue 1, pp. 35–46). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/01652176.2018.1447171>
- Hendriks, I. E., Cabanellas-Reboredo, M., Bouma, T. J., Deudero, S., & Duarte, C. M. (2011). Seagrass Meadows Modify Drag Forces on the Shell of the Fan Mussel *Pinna nobilis*. *Estuaries and Coasts*, 34(1), 60–67. <https://doi.org/10.1007/s12237-010-9309-y>
- Howard, D. W., Lewis, E. J., & Keller, B. J. (2004). Histological techniques for marine bivalve mollusks and crustaceans. In *NOAA Technical Memorandum NOS NCCOS* (Vol. 5).
- Husmann, G., Philipp, E. E. R., Rosenstiel, P., Vazquez, S., & Abele, D. (2011). Immune response of the Antarctic bivalve *Laternula elliptica* to physical stress and microbial exposure. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 398(1–2), 83–90. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2010.12.013>
- Katsanevakis, S. (2006). Population ecology of the endangered fan mussel *Pinna nobilis* in a marine lake. *Endangered Species Research*, 1, 51–59. <https://doi.org/10.3354/esr001051>
- Katsanevakis, S. (2007a). Growth and mortality rates of the fan mussel *Pinna nobilis* in Lake Vouliagmeni (Korinthiakos Gulf, Greece): A generalized additive modelling approach. *Marine Biology*, 152(6), 1319–1331. <https://doi.org/10.1007/s00227-007-0781-2>
- Katsanevakis, S. (2007b). Growth and mortality rates of the fan mussel *Pinna nobilis* in Lake Vouliagmeni (Korinthiakos Gulf, Greece): A generalized additive modelling approach. *Marine Biology*, 152(6), 1319–1331. <https://doi.org/10.1007/s00227-007-0781-2>
- Katsanevakis, S. (2019). The cryptogenic parasite *Haplosporidium pinnae* invades the Aegean Sea and causes the collapse of *Pinna nobilis* populations. *Aquatic Invasions*, 14(2), 150–164. <https://doi.org/10.3391/ai.2019.14.2.01>
- Katsanevakis S., Lefkaditou E., Galinou-Mitsoudi S., Koutsoubas D., & Zenetos A. (2008). *Molluscan species of minor commercial interest in Hellenic seas: Distribution, exploitation and conservation status*.
- Katsanevakis, S., Poursanidis, D., Issaris, Y., Panou, A., Petza, D., Vassilopoulou, V., Chaldaiou, I., & Sini, M. (2011). “Protected” marine shelled molluscs: Thriving in Greek seafood

- restaurants. *Mediterranean Marine Science*, 12(2), 429–438.
<https://doi.org/10.12681/mms.42>
- Katsanevakis, S., & Thessalou-Legaki, M. (2009). Spatial distribution, abundance and habitat use of the protected fan mussel *Pinna nobilis* in Souda Bay, Crete. *Aquatic Biology*, 8(1), 45–54. <https://doi.org/10.3354/ab00204>
- Katsares, V., Tsiora, A., Galinou-Mitsoudi, S., & Imsiridou, A. (2008). Genetic structure of the endangered species *Pinna nobilis* (Mollusca: Bivalvia) inferred from mtDNA sequences. *Biologia*, 63(3), 412–417. <https://doi.org/10.2478/s11756-008-0061-8>
- Kent, P. T., George, B. S., & Kubica~, P. (1985). *Public Health Mycobacteriology A Guide For The level In laboratory*.
- Kersting D., Cizmek H., Moulound B., & Jimenez C. (2019). The Noble Pen Shell (*Pinna nobilis*) now critically endangered. IUCN Factsheet. *The IUCN List of Threatened Species*.
- Kesarcodi-Watson, A., Kaspar, H., Lategan, M. J., & Gibson, L. (2009). Two pathogens of greenshell™ mussel larvae, *perna canaliculus*: *Vibrio splendidus* and a *V. coralliilyticus*/neptunius-like isolate. *Journal of Fish Diseases*, 32(6), 499–507.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2009.01006.x>
- Khurshid, B., Jackson, D. J., Engilberge, S., Motreuil, S., Broussard, C., Thomas, J., Immel, F., Harrington, M. J., Crowley, P. B., Vielzeuf, D., Perrin, J., & Marin, F. (2023). Molecular characterization of accripin11, a soluble shell protein with an acidic C-terminus, identified in the prismatic layer of the Mediterranean fan mussel *Pinna nobilis* (Bivalvia, Pteriomorpha). *FEBS Open Bio*, 13(1), 10–25. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.13497>
- Krijgsman, W. (2002). *The Mediterranean: Mare Nostrum of Earth sciences*.
www.elsevier.com/locate/epsl
- Kroeck M., & Montes J. (2005). Occurrence of the haemocyte parasite *Bonamia* sp. in flat oysters *Ostrea puelchana* firmed in San Antonio Bay (Argentina). *Diseases of Aquatic Organisms*, 63, 231–235.
- Lafferty, K. D., Harvell, C. D., Conrad, J. M., Friedman, C. S., Kent, M. L., Kuris, A. M., Powell, E. N., Rondeau, D., & Saksida, S. M. (2015). Infectious diseases affect marine

- fisheries and aquaculture economics. *Annual Review of Marine Science*, 7, 471–496.
<https://doi.org/10.1146/annurev-marine-010814-015646>
- Laganà, G., Barreca, D., Giacobbe, S., & Bellocco, E. (2014). Anaerobiosis and metabolic plasticity of *Pinna nobilis*: Biochemical and ecological features. *Biochemical Systematics and Ecology*, 56, 138–143. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2014.05.020>
- Laganà, G., Giacobbe, S., Bellocco, E., Mannucci, C., Galtieri, A., Ficarra, S., Kotyk, A., & Leuzzi, U. (2007). Lactate and malate dehydrogenase in the fan-shell associated shrimp, *Pontonia pinnophylax* (Otto): Effects of temperature and urea. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 349(1), 27–34. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2007.03.017>
- Laing, I., Dunn, P., Peeler, E. J., Feist, S. W., & Longshaw, M. (2014). Epidemiology of *Bonamia* in the UK, 1982 to 2012. *Diseases of Aquatic Organisms*, 110(1–2), 101–111.
<https://doi.org/10.3354/dao02647>
- Lattos, A., Bitchava, K., Giantsis, I. A., Theodorou, J. A., Batargias, C., & Michaelidis, B. (2021). *The Implication of Vibrio Bacteria in the Winter Mortalities of the Critically Endangered Pinna nobilis*. <https://doi.org/10.3390/microorganisms>
- Lattos, A., Feidantsis, K., Georgoulis, I., Giantsis, I. A., Karagiannis, D., Theodorou, J. A., Staikou, A., & Michaelidis, B. (2021a). Pathophysiological responses of *pinna nobilis* individuals enlightens the etiology of mass mortality situation in the mediterranean populations. *Cells*, 10(11). <https://doi.org/10.3390/cells10112838>
- Lattos, A., Feidantsis, K., Georgoulis, I., Giantsis, I. A., Karagiannis, D., Theodorou, J. A., Staikou, A., & Michaelidis, B. (2021b). Pathophysiological responses of *pinna nobilis* individuals enlightens the etiology of mass mortality situation in the mediterranean populations. *Cells*, 10(11). <https://doi.org/10.3390/cells10112838>
- Lattos, A., Feidantsis, K., Giantsis, I. A., Theodorou, J. A., & Michaelidis, B. (2023). Seasonality in Synergism with Multi-Pathogen Presence Leads to Mass Mortalities of the Highly Endangered *Pinna nobilis* in Greek Coastlines: A Pathophysiological Approach. *Microorganisms*, 11(5). <https://doi.org/10.3390/microorganisms11051117>
- Lattos, A., Giantsis, I. A., Karagiannis, D., & Michaelidis, B. (2020). First detection of the invasive Haplosporidian and Mycobacteria parasites hosting the endangered bivalve *Pinna*

- nobilis in Thermaikos Gulf, North Greece. *Marine Environmental Research*, 155.
<https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2020.104889>
- Lattos, A., Giantsis, I. A., Karagiannis, D., Theodorou, J. A., & Michaelidis, B. (2020). Gut symbiotic microbial communities in the iucn critically endangered pinna nobilis suffering from mass mortalities, revealed by 16s rna amplicon ngs. *Pathogens*, 9(12), 1–21.
<https://doi.org/10.3390/pathogens9121002>
- Lattos, A., Papadopoulos, D. K., Giantsis, I. A., Feidantsis, K., Georgoulis, I., Karagiannis, D., Carella, F., & Michaelidis, B. (2023). Investigation of the highly endangered Pinna nobilis' mass mortalities: Seasonal and temperature patterns of health status, antioxidant and heat stress responses. *Marine Environmental Research*, 188.
<https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2023.105977>
- Le Pennec M., Beninger P.G., Dorange G., & Paulet Y.M. (1991). Trophic sources and pathways to the developing gametes of Pecten maximus (Bivalvia: Pectenidae). *Journal of the Marine Biological Association of the U.K.*, 71, 451-463.
- Le Roux, F., Gay, M., Lambert, C., Waechter, M., Poubalanne, S., Chollet, B., Nicolas, J.-L., & Berthe, F. (2002). *Comparative analysis of Vibrio splendidus-related strains isolated during Crassostrea gigas mortality events*. www.elsevier.com/locate/aquativ
- Lejeusne, C., Chevaldonné, P., Pergent-Martini, C., Boudouresque, C. F., & Pérez, T. (2010). Climate change effects on a miniature ocean: the highly diverse, highly impacted Mediterranean Sea. In *Trends in Ecology and Evolution* (Vol. 25, Issue 4, pp. 250–260).
<https://doi.org/10.1016/j.tree.2009.10.009>
- Levi, M. H., Bartell, J., Gandolfo, L., Smole, S. C., Costa, S. F., Weiss, L. M., Johnson, L. K., Osterhout, G., & Herbst, L. H. (2003). Characterization of Mycobacterium montefiorensis sp. nov., a novel pathogenic mycobacterium from moray eels that is related to Mycobacterium triplex. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(5), 2147–2152.
<https://doi.org/10.1128/JCM.41.5.2147-2152.2003>
- Liu, R., Chen, H., Zhang, R., Zhou, Z., Hou, Z., Gao, D., Zhang, H., Wang, L., & Song, L. (2016). Comparative transcriptome analysis of Vibrio splendidus JZ6 reveals the

- mechanism of its pathogenicity at low temperatures. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(7), 2050–2061. <https://doi.org/10.1128/AEM.03486-15>
- Liu, R., Qiu, L., Yu, Z., Zi, J., Yue, F., Wang, L., Zhang, H., Teng, W., Liu, X., & Song, L. (2013). Identification and characterisation of pathogenic *Vibrio splendidus* from Yesso scallop (*Patinopecten yessoensis*) cultured in a low temperature environment. *Journal of Invertebrate Pathology*, 114(2), 144–150. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2013.07.005>
- Liu, X., Ji, C., Zhao, J., Wang, Q., Li, F., & Wu, H. (2014). Metabolic profiling of the tissue-specific responses in mussel *Mytilus galloprovincialis* towards *Vibrio harveyi* challenge. *Fish and Shellfish Immunology*, 39(2), 372–377. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.05.033>
- López-Sanmartín, M., Catanese, G., Grau, A., Valencia, J. M., García-March, J. R., & Navas, J. I. (2019). Real-Time PCR based test for the early diagnosis of *Haplosporidium pinnæ* affecting fan mussel *Pinna nobilis*. *PLoS ONE*, 14(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212028>
- Loret, J. F., & Dumoutier, N. (2019). Non-tuberculous mycobacteria in drinking water systems: A review of prevalence data and control means. In *International Journal of Hygiene and Environmental Health* (Vol. 222, Issue 4, pp. 628–634). Elsevier GmbH. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2019.01.002>
- Marin, F., Corstjens, P., De Gaulejac, B., De Vrind-De Jong, E., & Westbroek, P. (2000). Mucins and molluscan calcification: Molecular characterization of mucoperlin, a novel mucin-like protein from the nacreous shell layer of the fan mussel *Pinna nobilis* (Bivalvia, Pteriomorpha). *Journal of Biological Chemistry*, 275(27), 20667–20675. <https://doi.org/10.1074/jbc.M003006200>
- Marin, F., De Groot, K., & Westbroek, P. (2003). Screening molluscan cDNA expression libraries with anti-shell matrix antibodies. *Protein Expression and Purification*, 30(2), 246–252. [https://doi.org/10.1016/S1046-5928\(03\)00105-0](https://doi.org/10.1016/S1046-5928(03)00105-0)
- Marin, F., & Luquet, G. (2005). Molluscan biomineralization: The proteinaceous shell constituents of *Pinna nobilis* L. *Materials Science and Engineering C*, 25(2), 105–111. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2005.01.003>

- Matozzo, V., & Marin, M. G. (2011). Bivalve immune responses and climate changes: is there a relationship? In *Article in Invertebrate Survival Journal*.
<https://www.researchgate.net/publication/228480224>
- McDowell, W. G., & Sousa, R. (2019). Mass Mortality Events of Invasive Freshwater Bivalves: Current Understanding and Potential Directions for Future Research. In *Frontiers in Ecology and Evolution* (Vol. 7). Frontiers Media S.A.
<https://doi.org/10.3389/fevo.2019.00331>
- McFall-Ngai, M. J. (2002). Unseen forces: The influence of bacteria on animal development. In *Developmental Biology* (Vol. 242, Issue 1, pp. 1–14). Academic Press Inc.
<https://doi.org/10.1006/dbio.2001.0522>
- Mediterranean Richardson, T. C., Kennedy, H., Duarte, C., & Proud, S. (1997). The Occurrence of *Pontonia Pinnophylax* (Decapoda: Natantia: Pontoninae) in *Pinna Nobilis* (Mollusca: Bivalvia: Pinnidae) from the Mediterranean. In *mar. biol. Ass. U.K* (Vol. 77).
- Millot, C. (1999). Circulation in the Western Mediterranean Sea. In *Journal of Marine Systems* (Vol. 20).
- Morton, B., & Puljas, S. (2019). An improbable opportunistic predator: The functional morphology of *Pinna nobilis* (Bivalvia: Pterioidea: Pinnidae). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 99(2), 359–373.
<https://doi.org/10.1017/S0025315418000267>
- Nalepka, K., Berent, K., Checa, A. G., Machniewicz, T., Harris, A. J., Nalepka, P., Strag, M., Maj, Ł., Szkudlarek, A., Bieda, M., & Sztwiertnia, K. (2022). Ribs of *Pinna nobilis* shell induce unexpected microstructural changes that provide unique mechanical properties. *Materials Science and Engineering: A*, 829. <https://doi.org/10.1016/j.msea.2021.142163>
- Narcisi, V., Arzul, I., Cargini, D., Mosca, F., Calzetta, A., Traversa, D., Robert, M., Joly, J. P., Chollet, B., Renault, T., & Tiscar, P. G. (2010). Detection of *Bonamia ostreae* and *B. exitiosa* (haplosporidia) in *Ostrea edulis* from the Adriatic Sea (Italy). *Diseases of Aquatic Organisms*, 89(1), 79–85. <https://doi.org/10.3354/dao02167>
- Natalotto, A., Sureda, A., Maisano, M., Spanò, N., Mauceri, A., & Deudero, S. (2015). Biomarkers of environmental stress in gills of *Pinna nobilis* (Linnaeus 1758) from Balearic

- Island. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 122, 9–16.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.06.035>
- Nicolas J.L., Corre S., Gauthier G., Robert R., & Ansquer D. (1996). *Bacterial problems associated with scallop Pecten maximus larval culture*.
- Nour-Neamatollahie, A., Ebrahimzadeh, N., Siadat, S. D., Vaziri, F., Eslami, M., Akhavan Sepahi, A., Khanipour, S., Masoumi, M., Sakhaee, F., Ghazanfari Jajin, M., Bahrmand, A., & Fateh, A. (2017). Distribution of non-tuberculosis mycobacteria strains from suspected tuberculosis patients by heat shock protein 65 PCR–RFLP. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 24(6), 1380–1386. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.02.001>
- Nunan I., Lightner D., Pantoja C., Stokes N., & Reece K. (2007). Characterization of a rediscovered haplosporidian parasite from cultured Penaeus Vannamei. *Diseases of Aquatic Organisms*, 74(67–75).
- Oden, E., Burioli, E. A. V., Trancart, S., Pitel, P. H., & Houssin, M. (2016). Multilocus sequence analysis of Vibrio splendidus related-strains isolated from blue mussel Mytilus sp. during mortality events. *Aquaculture*, 464, 420–427.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.07.024>
- Offret, C., Paulino, S., Gauthier, O., Château, K., Bidault, A., Corporeau, C., Miner, P., Petton, B., Pernet, F., Fabioux, C., Paillard, C., & Le Blay, G. (2020). *The marine intertidal zone shapes oyster and clam digestive bacterial microbiota*.
<https://doi.org/10.1093/femsec/fiaa078/5827529>
- Offret, C., Rochard, V., Laguerre, H., Mounier, J., Huchette, S., Brillet, B., Le Chevalier, P., & Fleury, Y. (2019). Protective Efficacy of a Pseudoalteromonas Strain in European Abalone, Haliotis tuberculata, Infected with Vibrio harveyi ORM4. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 11(1), 239–247. <https://doi.org/10.1007/s12602-018-9389-8>
- Öndes, F., Kaiser, M. J., & Güçlüsoy, H. (2020). Human impacts on the endangered fan mussel, Pinna nobilis. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 30(1), 31–41.
<https://doi.org/10.1002/aqc.3237>

- Özalp, H. B., & Kersting, D. K. (2020). A pan-Mediterranean extinction? *Pinna nobilis* mass mortality has reached the Turkish straits system. In *Marine Biodiversity* (Vol. 50, Issue 5). Springer. <https://doi.org/10.1007/s12526-020-01110-7>
- Palacios, E., Racotta, I. S., Kraffe, E., Marty, Y., Moal, J., & Samain, J. F. (2005). Lipid composition of the giant lion's-paw scallop (*Nodipecten subnodosus*) in relation to gametogenesis: I. Fatty acids. *Aquaculture*, 250(1–2), 270–282. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.04.070>
- Panarese, R., Tedesco, P., Chimienti, G., Latrofa, M. S., Quaglio, F., Passantino, G., Buonavoglia, C., Gustinelli, A., Tursi, A., & Otranto, D. (2019). Haplosporidium pinnae associated with mass mortality in endangered *Pinna nobilis* (Linnaeus 1758) fan mussels. *Journal of Invertebrate Pathology*, 164, 32–37. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2019.04.005>
- Parisi, M. G., Maisano, M., Cappello, T., Oliva, S., Mauceri, A., Toubiana, M., & Cammarata, M. (2019). Responses of marine mussel *Mytilus galloprovincialis* (Bivalvia: Mytilidae) after infection with the pathogen *Vibrio splendidus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology*, 221, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2019.03.005>
- Patarnello, T., Volckaert, F. A. M. J., & Castilho, R. (2007). Pillars of Hercules: Is the Atlantic-Mediterranean transition a phylogeographical break? In *Molecular Ecology* (Vol. 16, Issue 21, pp. 4426–4444). <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03477.x>
- Paul-Pont, I., De Montaudouin, X., Gonzalez, P., Jude, F., Raymond, N., Paillard, C., & Baudrimont, M. (2010). Interactive effects of metal contamination and pathogenic organisms on the introduced marine bivalve *Ruditapes philippinarum* in European populations. *Environmental Pollution*, 158(11), 3401–3410. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2010.07.028>
- Pavlinec, Ž., Zupičić, I. G., Oraić, D., Petani, B., Mustać, B., Mihaljević, Ž., Beck, R., & Zrnčić, S. (2020). Assessment of predominant bacteria in noble pen shell (*Pinna nobilis*) collected in the Eastern Adriatic Sea. *Environmental Monitoring and Assessment*, 192(9). <https://doi.org/10.1007/s10661-020-08541-6>

- Philips, J. A. (2008). Mycobacterial manipulation of vacuolar sorting. In *Cellular Microbiology* (Vol. 10, Issue 12, pp. 2408–2415). <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2008.01239.x>
- Pichot Y., Comps M., Tige G., Grizel H., & Rabouin M. (1980). Recherches sur bonamia ostreace gen. N sp N parasite nouveau de L’huitre *Ostrea edulis* L. *Rev. Trav. Peches Marit.*, 43(1), 131140.
- Pogoda, B., Buck, B. H., Saborowski, R., & Hagen, W. (2013). Biochemical and elemental composition of the offshore-cultivated oysters *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas*. *Aquaculture*, 400–401, 53–60. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.02.031>
- Polaček, V., & Aleksić-Kovačević, S. (2016). Mycobacteriosis in pigs - An underrated threat. In *Acta Veterinaria* (Vol. 66, Issue 4, pp. 429–443). Walter de Gruyter GmbH. <https://doi.org/10.1515/acve-2016-0037>
- Pörtner, H. (2001). Climate change and temperature-dependent biogeography: Oxygen limitation of thermal tolerance in animals. In *Naturwissenschaften* (Vol. 88, Issue 4, pp. 137–146). <https://doi.org/10.1007/s001140100216>
- Portner, H. O. (2002). Climate variations and the physiological basis of temperature dependent biogeography: systemic to molecular hierarchy of thermal tolerance in animals. In *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* (Vol. 132).
- Pörtner, H. O., & Knust, R. (2007). Climate change affects marine fishes through the oxygen limitation of thermal tolerance. *Science*, 315(5808), 95–97. <https://doi.org/10.1126/science.1135471>
- Prado, P., Carrasco, N., Catanese, G., Grau, A., Cabanes, P., Carella, F., García-March, J. R., Tena, J., Roque, A., Bertomeu, E., Gras, N., Caiola, N., Furones, M. D., & Andree, K. B. (2020). Presence of *Vibrio mediterranei* associated to major mortality in stabled individuals of *Pinna nobilis* L. *Aquaculture*, 519. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734899>
- Prado, P., Grau, A., Catanese, G., Cabanes, P., Carella, F., Fernández-Tejedor, M., Andree, K. B., Añón, T., Hernandis, S., Tena, J., & García-March, J. R. (2021). *Pinna nobilis* in suboptimal environments are more tolerant to disease but more vulnerable to severe weather phenomena. *Marine Environmental Research*, 163. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2020.105220>

- Prado, S., Dubert, J., & Barja, J. L. (2015). Characterization of pathogenic vibrios isolated from bivalve hatcheries in Galicia, NW Atlantic coast of Spain. Description of *Vibrio tubiashii* subsp. *europaensis* subsp. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, 38(1), 26–29. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2014.11.005>
- Pujalte Maria-Jesus, & Garay Esperanza. (1986). Proposal of *vibrio mediterranei* sp. nov. A new member of genus *Vibrio*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 278–281.
- Rabaoui, L., Tlig Zouari, S., Katsanevakis, S., & Ben Hassine, O. K. (2007a). Comparison of absolute and relative growth patterns among five *Pinna nobilis* populations along the Tunisian coastline: An information theory approach. *Marine Biology*, 152(3), 537–548. <https://doi.org/10.1007/s00227-007-0707-z>
- Rabaoui, L., Tlig-Zouari, S., Cosentino, A., & Ben Hassine, O. K. (2009). Associated fauna of the fan shell *Pinna nobilis* (Mollusca: Bivalvia) in the northern and eastern Tunisian coasts. *Scientia Marina*, 73(1), 129–141. <https://doi.org/10.3989/scimar.2009.73n1129>
- Rabaoui, L., Tlig-Zouari, S., Katsanevakis, S., & Ben Hassine, O. K. (2010). Modelling population density of *pinna nobilis* (Bivalvia) on the eastern and southeastern coast of Tunisia. *Journal of Molluscan Studies*, 76(4), 340–347. <https://doi.org/10.1093/mollus/eyq023>
- Reavill, D. R., & Schmidt, R. E. (2012). Mycobacterial Lesions in Fish, Amphibians, Reptiles, Rodents, Lagomorphs, and Ferrets with Reference to Animal Models. In *Veterinary Clinics of North America - Exotic Animal Practice* (Vol. 15, Issue 1, pp. 25–40). <https://doi.org/10.1016/j.cvex.2011.10.001>
- Rhodes, M. W., Kator, H., McNabb, A., Deshayes, C., Reyrat, J. M., Brown-Elliott, B. A., Wallace, R., Trott, K. A., Parker, J. M., Lifland, B., Osterhout, G., Kaattari, I., Reece, K., Vogelbein, W., & Ottinger, C. A. (2005). *Mycobacterium pseudoshottsii* sp. nov., a slowly growing chromogenic species isolated from Chesapeake Bay striped bass (*Morone saxatilis*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(3), 1139–1147. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63343-0>
- Richardson, C. A., Kennedy, H., Duarte, C. M., Kennedy, D. P., & Proud, S. V. (1999a). Age and growth of the fan mussel *Pinna nobilis* from south-east Spanish Mediterranean seagrass

- (*Posidonia oceanica*) meadows. *Marine Biology*, 133(2), 205–212.
<https://doi.org/10.1007/s002270050459>
- Richardson, C. A., Kennedy, H., Duarte, C. M., Kennedy, D. P., & Proud, S. V. (1999b). *Age and growth of the fan mussel Pinna nobilis from south-east Spanish Mediterranean seagrass (Posidonia oceanica) meadows.*
- Richardson, C. A., Peharda, M., Kennedy, H., Kennedy, P., & Onofri, V. (2004). Age, growth rate and season of recruitment of *Pinna nobilis* (L) in the Croatian Adriatic determined from Mg:Ca and Sr:Ca shell profiles. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 299(1), 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2003.08.012>
- Romalde, J. L., Diéguez, A. L., Lasa, A., & Balboa, S. (2014). New *Vibrio* species associated to molluscan microbiota: A review. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 4, Issue JAN). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00413>
- Russel D. (2001). *Mycobacterium tuberculosis* here today and here tomorrow. *Macmillan Magazines Ltd*, 2.
- Sanna, D., Cossu, P., Dedola, G. L., Scarpa, F., Maltagliati, F., Castelli, A., Franzoi, P., Lai, T., Cristo, B., Curini-Galletti, M., Francalacci, P., & Casu, M. (2013). Mitochondrial DNA Reveals Genetic Structuring of *Pinna nobilis* across the Mediterranean Sea. *PLoS ONE*, 8(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067372>
- Šarić, T., Župan, I., Aceto, S., Villari, G., Palić, D., De Vico, G., & Carella, F. (2020). Epidemiology of noble pen shell (*Pinna nobilis* L. 1758) mass mortality events in adriatic sea is characterised with rapid spreading and acute disease progression. *Pathogens*, 9(10), 1–21. <https://doi.org/10.3390/pathogens9100776>
- Saulnier, D., de Decker, S., Haffner, P., Cobret, L., Robert, M., & Garcia, C. (2010). A large-scale epidemiological study to identify bacteria pathogenic to Pacific Oyster *Crassostrea gigas* and correlation between virulence and metalloprotease-like activity. *Microbial Ecology*, 59(4), 787–798. <https://doi.org/10.1007/s00248-009-9620-y>
- Sawabe, T., Ogura, Y., Matsumura, Y., Feng, G., Rohul Amin, A. K. M., Mino, S., Nakagawa, S., Sawabe, T., Kumar, R., Fukui, Y., Satomi, M., Matsushima, R., Thompson, F. L., Gomez-Gil, B., Christen, R., Maruyama, F., Kurokawa, K., & Hayashi, T. (2013). Updating the

Vibrio clades defined by multilocus sequence phylogeny: Proposal of eight new clades, and the description of *Vibrio tritonius* sp. nov. *Frontiers in Microbiology*, 4(DEC).

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00414>

Scarpa et al. (2021). FROM DARK TO LIGHT AND BACK AGAIN: IS PINNA NOBILIS, THE LARGEST MEDITERRANEAN BIVALVE, ON THE BRINK OF EXTINCTION? *Veterinaria*, 1. <https://doi.org/10.51607/22331360.2021.70.1.1>

Scarpa, F., Coupé, S., Prévot, J.-M., Giantsis, I., Luis, M. V., Foulquié, M., Casu, M., Lattos, A., Michaelidis, B., Sanna, D., Rafael, J., March, G., Tena-Medialdea, J., Vicente, N., Bunet, R., Giantsis, I. A., García-March, R., & Tena-Medialdea, J. (2022). *Toll-like receptor polymorphism in fan mussels Toll-like receptor polymorphism in fan mussels: does the resistance of Pinna nobilis to Haplosporidium pinnae only depends on its hybridization with Pinna rudis?* <https://doi.org/10.22541/au.166942457.78014997/v1>

Scarpa, F., Sanna, D., Azzena, I., Mugetti, D., Cerruti, F., Hosseini, S., Cossu, P., Pinna, S., Grech, D., Cabana, D., Pasquini, V., Esposito, G., Cadoni, N., Atzori, F., Antuofermo, E., Addis, P., Sechi, L. A., Prearo, M., Peletto, S., ... Casu, M. (2020a). Multiple non-species-specific pathogens possibly triggered the mass mortality in pinna nobilis. *Life*, 10(10), 1–18. <https://doi.org/10.3390/life10100238>

Selvarangan, R., Wu, W. K., Nguyen, T. T., Carlson, L. D. C., Wallis, C. K., Stiglich, S. K., Chen, Y. C., Jost, K. C., Prentice, J. L., Wallace, R. J., Barrett, S. L. R., Cookson, B. T., & Coyle, M. B. (2004). Characterization of a Novel Group of Mycobacteria and Proposal of *Mycobacterium sherrisii* sp. nov. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(1), 52–59. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.1.52-59.2004>

Siletic T., & Pehada M. (2003). *Population study of Pinna nobilis L. in Malo and Veliko Jezero of the Mljet National Park (Adriatic Sea).*

Siletic T., P. M. (2003). *Population study of the fan shell Pinna nobilis L. in Malo and Veliko Jezero of the Mljet National Park (Adriatic Sea).* <https://www.researchgate.net/publication/285796169>

- Steffani-Vallejo, J. L., Brunck, M. E., Acosta-Cruz, E. Y., Montiel, R., & Barona-Gómez, F. (2018). Genomic insights into *Mycobacterium simiae* human colonization. *Standards in Genomic Sciences*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/s40793-017-0291-x>
- Tarazona, E., Lucena, T., Arahál, D. R., Macián, M. C., Ruvira, M. A., & Pujalte, M. J. (2014). Multilocus sequence analysis of putative *Vibrio mediterranei* strains and description of *Vibrio thalassae* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, 37(5), 320–328. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2014.05.005>
- Taylor. (1969). *THE SHELL STRUCTURE AND MINERALOGY OF THE BIVALVIA*.
- Tëmkin, I., & Poli, G. S. (2015). *The art and science of Testacea utriusque Siciliae by Giuseppe Saverio Poli THE ART AND SCIENCE OF TESTACEA UTRIUSQUE SICILIAE*. <https://www.researchgate.net/publication/273060188>
- Thompson, F. L., Hoste, B., Thompson, C. C., Huys, G., & Swings, J. (2001). The Coral Bleaching *Vibrio shiloi* Kushmaro et al. 2001 is a Later Synonym of *Vibrio mediterranei* Pujalte and Garay 1986. In *System. Appl. Microbiol* (Vol. 24). <http://www.urbanfischer.de/journals/sam>
- Tortoli, E. (2014). Microbiological features and clinical relevance of new species of the genus *Mycobacterium*. *Clinical Microbiology Reviews*, 27(4), 727–752. <https://doi.org/10.1128/CMR.00035-14>
- Tracy, A. M., Pielmeier, M. L., Yoshioka, R. M., Heron, S. F., & Drew Harvell, C. (2019). Increases and decreases in marine disease reports in an era of global change. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 286(1912). <https://doi.org/10.1098/rspb.2019.1718>
- Trigos, S., García-March, J. R., Vicente, N., Tena, J., & Torres, J. (2015a). Respiration rates of the fan mussel *Pinna nobilis* at different temperatures. *Journal of Molluscan Studies*, 81(2), 217–222. <https://doi.org/10.1093/mollus/eyu075>
- Trigos, S., Vicente, N., Prado, P., & Espinós, F. J. (2018). Adult spawning and early larval development of the endangered bivalve *Pinna nobilis*. *Aquaculture*, 483, 102–110. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.10.015>

- Tsamadias, I. E., Rizou, D. D., Moutopoulos, D. K., Lattos, A., Giantsis, I. A., Michaelidis, B., & Theodorou, J. A. (2023). Morphometric Analysis of the Critically Endangered Fan Mussel (*Pinna nobilis* L.) in Maliakos Gulf (Central Aegean). *Diversity*, 15(9).
<https://doi.org/10.3390/d15090948>
- Ubukata, T. (2001). Stacking increments: A new model and morphospace for the analysis of bivalve shell growth. *Historical Biology*, 15(4), 303–321.
<https://doi.org/10.1080/0891296021000024475>
- Utari, H. B., Senapin, S., Jaengsanong, C., Flegel, T. W., & Kruatrachue, M. (2012). A haplosporidian parasite associated with high mortality and slow growth in *Penaeus* (*Litopenaeus*) *vannamei* cultured in Indonesia. *Aquaculture*, 366–367, 85–89.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.09.005>
- Van Ingen, J., Bendien, S. A., De Lange, W. C. M., Hoefsloot, W., Dekhuijzen, P. N. R., Boeree, M. J., & Van Soolingen, D. (2009). Clinical relevance of non-tuberculous mycobacteria isolated in the Nijmegen-Arnhem region, The Netherlands. *Thorax*, 64(6), 502–506.
<https://doi.org/10.1136/thx.2008.110957>
- van Ingen, J., Tortoli, E., Selvarangan, R., Coyle, M. B., Crump, J. A., Morrissey, A. B., Dekhuijzen, P. N. R., Boeree, M. J., & van Soolingen, D. (2011). *Mycobacterium sherrisii* sp. nov., a slow-growing non-chromogenic species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61(6), 1293–1298. <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.024752-0>
- Vaumourin, E., Vourc'h, G., Gasqui, P., & Vayssier-Taussat, M. (2015). The importance of multiparasitism: examining the consequences of co-infections for human and animal health. *Parasites and Vectors*, 8(1). <https://doi.org/10.1186/s13071-015-1167-9>
- Vázquez-Luis, M., Álvarez, E., Barraón, A., García-March, J. R., Grau, A., Hendriks, I. E., Jiménez, S., Kersting, D., Moreno, D., Pérez, M., Ruiz, J. M., Sánchez, J., Villalba, A., & Deudero, S. (2017). S.O.S. *Pinna nobilis*: A mass mortality event in western Mediterranean Sea. *Frontiers in Marine Science*, 4(JUL). <https://doi.org/10.3389/fmars.2017.00220>
- Wei, Z., Xin, L., Zhang, W., Bai, C., Wang, C., & Li, C. (2019). Isolation and characterization of *Vibrio harveyi* as a major pathogen associated with mass mortalities of ark clam, *Scapharca*

- broughtonii, in summer. *Aquaculture*, 511.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734248>
- Wesselmann, M., González-Wangüemert, M., Serrão, E. A., Engelen, A. H., Renault, L., García-March, J. R., Duarte, C. M., & Hendriks, I. E. (2018). Genetic and oceanographic tools reveal high population connectivity and diversity in the endangered pen shell *Pinna nobilis*. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23004-2>
- Whipps C., Lieggi C., & Wagner R. (2012). Mycobacteriosis in zebra fish. *ILAR Journal*, 53(2).
- Wongso, S., Ushio, H., & Yamanaka, H. (1999). Glycolytic Enzymes in the Tissues of Three Species of Scallop (Bivalvia: Pectinidae)*1. In *Fisheries Science* (Vol. 65, Issue 1).
- World register of marine species. (2023). *Molluscabase eds. Pinna nobilis Linnaeus, 1758*.
- Yang, R., Liu, Q., He, Y., Tao, Z., Xu, M., Luo, Q., Chen, J., & Chen, H. (2020). Isolation and identification of *Vibrio mediterranei* 117-T6 as a pathogen associated with yellow spot disease of *Pyropia* (Bangiales, Rhodophyta). *Aquaculture*, 526.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735372>
- Yonge. (1953a). Form and habit in *Pinna carnea* Gmelin . *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 237(648), 335–374.
<https://doi.org/10.1098/rstb.1953.0006>
- Yonge, C. M. (1953b). Form and habit in *Pinna carnea* Gmelin . *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 237(648), 335–374.
<https://doi.org/10.1098/rstb.1953.0006>
- Yurimoto, T. (2015). Seasonal changes in glycogen contents in various tissues of the edible bivalves, pen shell *Atrina lischkeana*, ark shell *Scapharca kagoshimensis*, and manila clam *Ruditapes philippinarum* in west Japan. *Journal of Marine Biology*, 2015.
<https://doi.org/10.1155/2015/593032>
- Zavodnik D., H.-BrenkoM. , L. M. (1991). *Population study of the fan shell Pinna nobilis L. in Malo and Veliko Jezero of the Mljet National Park (Adriatic Sea)*.
<https://www.researchgate.net/publication/285796169>

- Zgouridou, A., Tripidaki, E., Giantsis, I. A., Theodorou, J. A., Kalaitzidou, M., Raitsos, D. E., Lattos, A., Mavropoulou, A. M., Sofianos, S., Karagiannis, D., Chaligiannis, I., Anestis, A., Papadakis, N., Feidantsis, K., Mintza, D., Staikou, A., & Michaelidis, B. (2022). The current situation and potential effects of climate change on the microbial load of marine bivalves of the Greek coastlines: an integrative review. *Environmental Microbiology*, 24(3), 1012–1034. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15765>
- Zhang, S., Huang, J., Di, J., Du, H., Xu, Q., Zhou, Q., Congiu, L., & Wei, Q. (2018). The genome sequence of a new strain of *Mycobacterium ulcerans* ecovar *Liflandii*, emerging as a sturgeon pathogen. *Aquaculture*, 489, 141–147. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.02.001>
- Zhang, X. J., Bai, X. S., Yan, B. L., Bi, K. R., & Qin, L. (2014). *Vibrio harveyi* as a causative agent of mass mortalities of megalopa in the seed production of swimming crab *Portunus trituberculatus*. *Aquaculture International*, 22(2), 661–672. <https://doi.org/10.1007/s10499-013-9695-9>
- Zotou, M., Gkrantounis, P., Karadimou, E., Tsirintanis, K., Sini, M., Poursanidis, D., Azzolin, M., Dailianis, T., Kytinou, E., Issaris, Y., Gerakaris, V., Salomidi, M., Lardi, P., Ramfos, A., Akrivos, V., Spinos, E., Dimitriadis, C., Papageorgiou, D., Lattos, A., ... Katsanevakis, S. (2020). *Pinna nobilis* in the Greek seas (NE Mediterranean): On the brink of extinction? *Mediterranean Marine Science*, 21(3), 558–574. <https://doi.org/10.12681/MMS.23777>