

Facultad de Farmacia

*Evaluación de la presencia de
Amebas de Vida Libre en microplásticos de la isla de
Tenerife*



TRABAJO DE FIN DE GRADO

Andrea Barreiro Monroy

Tutores: Dr. Javier Hernández Borges y Dra. María Reyes Batlle

ÍNDICE

Resumen/Abstract.....	pg 3
1. Introducción	
1.1. Los microplásticos.....	pg 4
1.2. Las amebas de vida libre.....	pg 5
2. Objetivos.....	pg 8
3. Material y métodos	
3.1. Elección de la zona y toma de muestras.....	pg 9
3.2. Procesamiento de las muestras.....	pg 10
3.3. Aislamiento de amebas de vida libre.....	pg 12
3.4. Caracterización molecular de amebas de vida libre.....	pg 13
4. Resultados y discusión.....	pg 16
5. Conclusiones.....	pg 21
6. Bibliografía.....	pg 22
7. Glosario.....	pg 26

Resumen

Microplastics are small plastic particles (5 mm-1 μm size) that come from the degradation of bigger plastics or have already been manufactured with this size for specific uses.

Due to the degradation they suffer, microplastics can be accumulated in the environment, being a source of contamination. Moreover, they can be ingested by animals like birds or fishes. Besides, it has been recently studied that exists a certain relation between microplastics and microorganisms, being suitable habitats for their growth and development.

In the present work, it was studied the presence of free-living amoebas (FLA) in microplastics from sea water and sand collected in Playa Grande, Tenerife.

FLA, a group of protozoa, are widely distributed in the environment, being causal agents of some serious infections that can affect the Central Nervous System (CNS), such as blinding keratitis and granulomatous encephalitis.

We have isolated *Acanthamoeba* spp. from the microplastics extracted on the sand. It was observed the stellate morphology of this genus cysts. The sample was analyzed at the microscope and confirmed by the specific PCR.

These preliminary results show that, there could be a positive relation between the growth of FLA and microplastics, making them an ideal habitat for their development.

1. Introducción

1.1. Los microplásticos

El uso de plásticos ha aumentado exponencialmente en los últimos años (Our world in data, 2020). Este hecho, unido a las dificultades en el reciclaje de muchos de ellos, el empleo irracional que en determinados momentos se produce, su inadecuada recogida selectiva, así como su baja biodegradabilidad, han dado como resultado a su acumulación en el medio ambiente, sobre todo en el medio marino (Li et al., 2016).

A pesar de su gran estabilidad, los plásticos están sometidos a procesos de degradación, fundamentalmente abiótica (fotooxidación, termooxidación, degradación mecánica, entre otros) que hace que se fragmenten en partículas de pequeño tamaño, denominados microplásticos cuando adquieren un tamaño comprendido entre 5 mm y 1 μm (Crawford y Quinn, 2017). Sin embargo, también existen microplásticos que son manufacturados intencionadamente con ese tamaño para la elaboración de productos cosméticos, farmacéuticos o industriales. En este último caso se habla de *microplásticos primarios*, siendo los *secundarios* los señalados con anterioridad.

Una vez en el medio ambiente, los microplásticos también pueden sufrir una degradación minoritaria a través de procesos bióticos (Crawford y Quinn, 2017). Asimismo, estos pueden sufrir una degradación biótica, ya que se han generado cambios estructurales importantes que provocan un aumento de la superficie, haciéndolos susceptibles a la colonización microbiana o fúngica, creando recubrimientos (*biofilms*) alrededor del plástico y segregando, del mismo modo, ciertas sustancias (enzimas, ácidos, etc.) contribuyendo así a su degradación (da Costa et al., 2017).

Por otra parte, los microplásticos pueden ser ingeridos por multitud de seres vivos. Entre los efectos que pueden producir destacan la obstrucción del tracto digestivo, disminución del apetito y malnutrición (Stephanie L. Wright, et al., 2013). En el caso de los seres humanos, todavía no existen estudios concluyentes sobre sus efectos, si bien se está estudiando la migración de

componentes del propio plástico o contaminantes que estos pudieran tener (Rist et al., 2018).

Recientemente se ha podido constatar que los microplásticos de los ambientes acuáticos proporcionan nuevos hábitats para los organismos colonizadores de su superficie pudiendo actuar como vectores de transporte de los mismos (Kesy K et al., 2019; Mammo F.K. et al., 2020). Además, se han aislado bacterias mediante la secuenciación del gen ARNr molecular 16s, y se ha demostrado que algunas de estas cepas bacterianas presentaban resistencia gracias al contacto con los microplásticos (Pasqualina Laganà et al., 2018).

Entre las especies bacterianas que se encuentran en las biopelículas asociadas a microplásticos, está *Vibrio* spp, pudiendo los microplásticos actuar como vectores para estos patógenos potenciales (Kesy K et al., 2019).

1.2. Las amebas de vida libre

Las AVL son un grupo diverso de protozoos que se distribuyen ampliamente en el medio ambiente. Multitud de trabajos las han descrito en muestras de suelo, polvo, aire o agua, entre otros (Schuster y Visvesvara, 2004). Algunas AVL son agentes causales de distintos tipos de infecciones graves entre las que destacan aquellas que afectan al sistema nervioso central (SNC) ya que producen una mortalidad superior al 95 % (Siddiqui y Khan, 2012). También se encuentran otras infecciones como queratitis u otras lesiones cutáneas (Schuster y Visvevara, 2004).

Por otro lado, en los últimos años el potencial peligro de las AVL ha quedado determinado no sólo por las enfermedades que ellas mismas producen, sino por su capacidad de ser portadoras de otros microorganismos patógenos, actuando como depósitos y vehículos para su propagación (Balczun y Scheid, 2017). De este modo pueden actuar como portadoras de bacterias endosimbióticas (*Legionella* y patógenos similares), implicadas en brotes de neumonía en huéspedes debilitados (Schuster y Visvesvara, 2004).

Además de las relaciones con bacterias, también se ha demostrado la relación con ciertos virus, debido a que ambos se pueden encontrar en entornos acuáticos. Esta relación ha quedado demostrada con la presencia de los

llamados “virus gigantes”, como *Mimivirus*, *Pandoraviruses* y *Pithviruses*, los cuales se comportan como endocitobiontes de las amebas, que actúan como vehículos. En esta unión el ADN viral sufre replicación y transcripción dentro de la ameba (Scheid et al., 2015).

En cuanto a la fuente de alimentación de las AVL, son principalmente bacterias, pero estas han generado diversos mecanismos para evadir esta digestión y usar a las AVL como vehículos que las protejan frente a diversos factores físico-químicos (Greub y Raoul, 2004). De esta manera, se ha demostrado que las AVL contribuyen a la adhesión bacteriana en diferentes tipos de superficies, favoreciendo la formación de biopelículas (Davis et al., 1981; Preston et al., 2001).

Tradicionalmente, la clasificación de las AVL se ha hecho teniendo en cuenta las características morfológicas y metabólicas de trofozoítos (Page, 1988). Pero debido a la alta variabilidad entre las condiciones ambientales (humedad, temperatura, etc...) de los diferentes laboratorios, así como de los medios de cultivo usados y, gracias a los avances de la biología molecular, actualmente, su taxonomía se basa en la comparación de la secuenciación de ácidos nucleicos (Schoroeder et al., 2001).

Acanthamoeba es un patógeno ampliamente distribuido en la naturaleza, capaz de causar queratitis cegadora (QA: queratitis por *Acanthamoeba*) y encefalitis granulomatosa mortal (EGA: encefalitis granulomatosa amebiana). Los factores que contribuyen a las infecciones incluyen: la biología del parásito, la diversidad genética, la propagación ambiental y la susceptibilidad del huésped (Siddiqui y Khan, 2012).

En cuanto al ciclo de vida de *Acanthamoeba*, se puede decir que tiene dos etapas: una etapa activa de trofozoítos que exhibe crecimiento vegetativo, y otra de quiste latente con actividad metabólica mínima (Siddiqui y Khan, 2012). Se puede destacar la morfología estrellada con doble pared de su fase quística, que hace muy fácil su reconocimiento a nivel morfológico.

En Canarias se ha demostrado la presencia de AVL del género *Acanthamoeba* en multitud de muestras ambientales como fuentes de agua de

grifo o agua de mar, cuya identificación se basó en la morfología de las formas de quistes y trofozoítos y amplificación por PCR (*Polimerase Chain Reaction*) de sus secuencias genómicas (Lorenzo-Morales et al., 2005a). Con estas herramientas de biología molecular y, concretamente para el género *Acanthamoeba*, se ha determinado una región del gen 18s del ADN ribosómico (ADNr) de unos 500 pares de bases conocida como DF3 (Diagnostic Fragment 3) (Schroeder et al., 2001). Gracias a las diferencias nucleotídicas de este fragmento se han descrito, hasta el momento, 22 genotipos diferentes dentro del mismo género (Tice et al., 2016; Haniloo et al., 2017).

Diversos estudios demuestran que *Acanthamoeba* es el género de AVL más abundante del mundo, encontrándose ampliamente distribuido (Lorenzo-Morales et al., 2005b). Se pueden destacar los casos de Jamaica, donde se detectó *Acanthamoeba* en distintos tipos de aguas incluida el agua del mar (Todd et al., 2015); el Sudeste Asiático, en agua de piscina, en aguas termales, y en suelo (Bunsuwansakul C et al., 2019) o en el Mar negro en Turquía, tanto en agua de río como en agua de abasto (Koyun et al., 2020). En el caso particular del archipiélago canario, el género *Acanthamoeba* ha sido descrito en muestras de suelo de Gran Canaria (Reyes-Batlle et al., 2014) o El Hierro (Reyes-Batlle et al., 2016).

Por lo tanto, teniendo en cuenta estudios previos que demuestran la formación de biopelículas bacterianas en los microplásticos, y que las AVL favorecen la proliferación de dichas poblaciones bacterianas, resulta muy interesante conocer si estos microplásticos actúan a su vez como vehículos de estos protozoos parásitos.

2. Objetivos

El objetivo principal del presente Trabajo de Fin de Grado es el estudio de la presencia de AVL en microplásticos recogidos en Playa Grande, situada en el municipio de Arico, Tenerife. Como objetivos específicos se han establecido los siguientes:

- La caracterización molecular de las AVL aisladas a partir de las muestras analizadas.
- La evaluación de la posible actuación de los microplásticos como vectores de transporte de AVL en el medio marino.

3. Material y métodos

3.1. Elección de la zona de muestreo y toma de muestras

Los muestreos fueron planificados para cuatro meses (febrero, marzo, abril y mayo), pero, debido a las circunstancias excepcionales del presente curso académico, sólo fue posible realizar un único muestreo, en el mes de febrero (15 de febrero de 2020).

Las muestras se recogieron transcurridas, como máximo, dos horas desde la máxima pleamar, para así, reducir el riesgo de contaminación y, además, conservar los posibles microorganismos presentes.

Para la toma de muestras la playa se dividió en dos zonas, A y B (ver Figura 1), y se muestrearon, además de los microplásticos, tanto agua de mar como arena de playa como controles.



Figura 1. Imagen vía satélite tomada de Google Maps de Playa Grande (Arico, Tenerife) en la que se pueden apreciar las dos zonas de muestreo.

El muestreo se llevó a cabo de la siguiente manera en cada una de las zonas:

- *Muestras de agua control.* Se tomaron 1,5 L de agua de mar en botellas de plástico, previamente lavadas con esa misma agua, y a 2 metros de la orilla.
- *Muestras de microplásticos en el agua.* Con un colador limpio y previamente enjuagado con agua de mar, se tomaron muestras de microplásticos a 2

metros de la orilla y se guardaron en tubos Falcon® estériles de 50 mL y se sellaron con Parafilm®.

- *Muestras de arena control.* Se recogieron unos 15 mL de arena húmeda sin microplásticos en tubos Falcon ® estériles de 15 mL que se sellaron con Parafilm®.
- *Muestras de arena con microplásticos.* Con ayuda de un hisopo estéril se recogieron microplásticos que se encontraban en la arena en tubos Falcon® estériles de 50 mL, y se sellaron con Parafilm® intentando coger la mínima cantidad posible de arena.

3.2. Procesamiento de las muestras

Una vez recogidas las 4 muestras de cada zona (dos de la zona A y dos de la zona B) se procesaron el día 17 de febrero de la siguiente manera:

3.2.1. Muestras de agua control

Los 1,5 L de agua se filtraron mediante una rampa de vacío PALL modelo Nº1540 (ver Figura 2) a través de membranas de nitrocelulosa con un diámetro de poro de 0,45 µm para que las AVL quedaran retenidas.

Las membranas fueron sembradas boca abajo en placas de Petri con Agar no nutritivo (ANN) al 2 %.

3.2.2. Muestras de microplásticos flotantes

Aproximadamente 2-3 g de los microplásticos recogidos se introdujeron en un tubo Falcon ® con 20 mL de tampón salino de Amebas de PAGE (Polyacrylamide Gel Electrophoresis) o PAS estéril (*PAGE's Amoeba Saline Buffer*).

Este tubo se agitó durante 5 minutos en un vórtex para liberar las AVL que pudieran estar adheridas a los microplásticos.

Se extrajeron los microplásticos con pinzas estériles del tubo Falcon®. Se filtraron los 20 mL resultantes tal y como se hizo con el agua y se sembró de igual manera la membrana de nitrocelulosa en ANN (2 %).

3.2.3. Muestras de arena con microplásticos

Con ayuda de un plato de vidrio y pinzas estériles se extrajeron los microplásticos presentes en la arena, lavándolos con PAS estéril y recolectando unos 2-3 g de microplásticos. Una vez pesados se introdujeron en un tubo Falcon® con 20 mL de PAS estéril.

Estos microplásticos se extrajeron con pinzas estériles del tubo de PAS y se agitó durante 5 minutos con el vórtex. Se filtraron estos 20 mL como en los casos anteriores y se sembró de igual manera la membrana de nitrocelulosa en ANN (2 %).

3.2.4. Muestra de arena

Se pesó 1 g de arena de cada zona, se mezcló con PAS (20 mL) en un tubo Falcon® y se resuspendió durante 5 min con ayuda de un vórtex.

A continuación, se dejó depositar la arena durante 10 minutos y el líquido sobrenadante fue recogido cuidadosamente. Este se filtró y las membranas fueron sembradas boca bajo en placas de ANN (2 %).



Figura 2. Rampa de filtrado PALL modelo N°15402 utilizada para el filtrado de las muestras.

Las 8 placas de ANN obtenidas fueron monitorizadas diariamente con ayuda de un microscopio óptico invertido Leica DMIL (Figura 3) para la visualización de las AVL.



Figura 3. Microscopio invertido Leica DMIL utilizado para la visualización de las AVL.

3.3. Aislamiento de AVL

El aislamiento de AVL se llevó a cabo mediante la técnica de clonaje, para la cual primero se observó al microscopio hasta encontrar una zona con crecimiento de AVL. Con un rotulador se marcó el área donde hubo crecimiento y, se traspasó a una nueva placa de ANN. De esta manera, se separan las AVL de otros microorganismos o de otras AVL con morfología diferente. Para evitar una posible contaminación, todo el material utilizado se esterilizó y se mantuvo el mechero encendido y cerca durante todo el procedimiento.

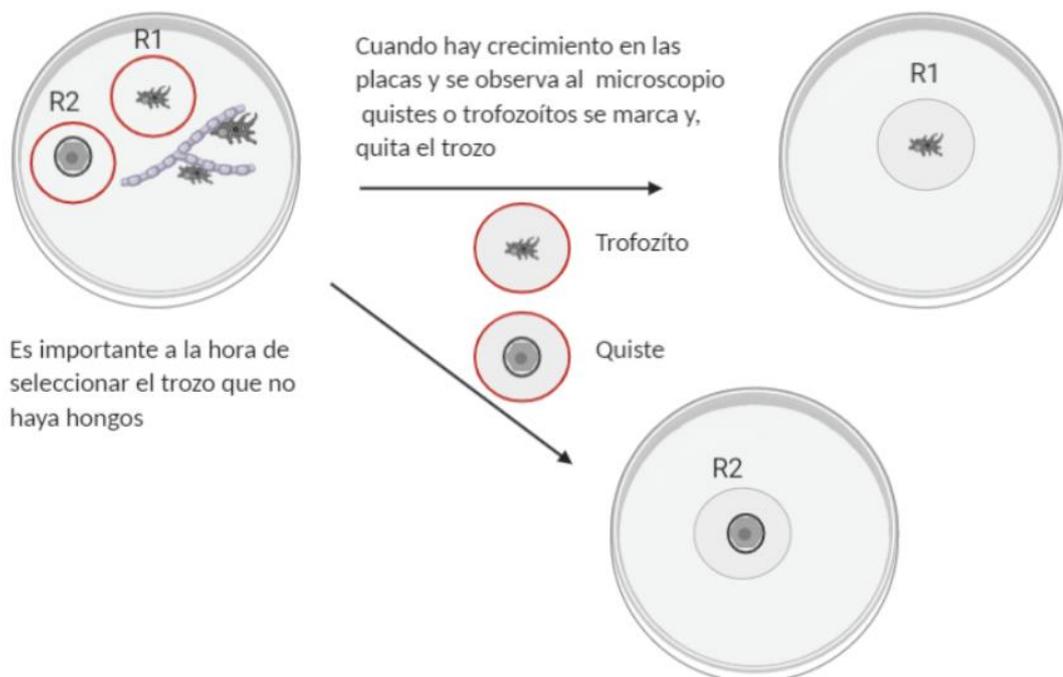


Figura 4. Esquema de la técnica de clonaje utilizada en este Trabajo de Fin de Grado.

3.4. Caracterización molecular de AVL

3.4.1. Extracción de ADN de las muestras positivas

En aquellas muestras en las que hubo un crecimiento abundante de un solo tipo morfológico de AVL se procedió a la extracción de su ADN, el cual queda esquematizado en la Figura 5:

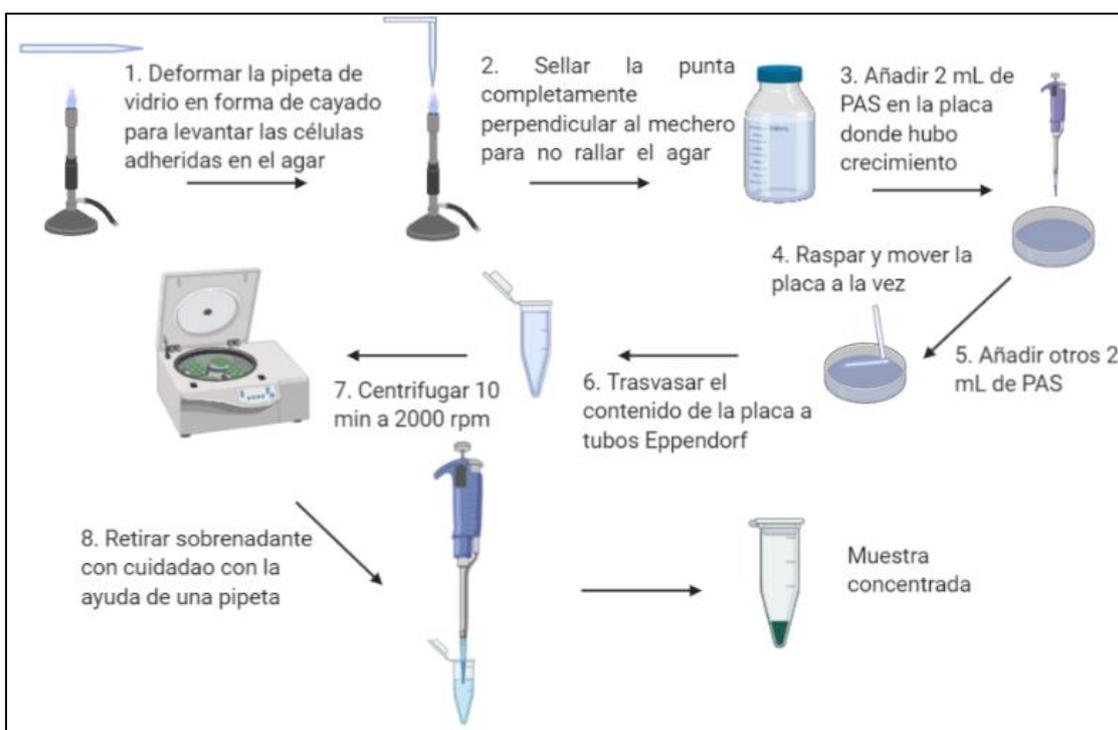


Figura 5. Esquema de la extracción de ADN de las muestras positivas llevada a cabo en el presente Trabajo de Fin de Grado.

Una vez se dispone de un concentrado de células, la muestra está preparada para realizar la extracción de ADN mediante el sistema automatizado Maxwell 16® (Figura 6) según el manual TM284 (Promega) y siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN obtenido es cuantificado haciendo uso del espectrofotómetro DS-11 DeNovix® (Figura 7) y se almacena a -20°C hasta su procesamiento en la PCR.



Figura 6. Aparato de purificación y extracción de ADN Maxwell 16®.



Figura 7. Espectrofotómetro DS-11 DeNovix®.

3.4.2. Amplificación por PCR del ADN amebiano

Se realizó la reacción en cadena de la polimerasa (Polimerase Chain Reaction, PCR) haciendo uso del termociclador Arktik™ (ThermoFisher Scientific) (Figura 8) y de la pareja de cebadores específicos para el género *Acanthamoeba* (JDP1 y JDP2). Estos cebadores amplifican el fragmento específico del gen ARNr 18S conocido como DF3 de unas 423-551 pb (Schroeder et al., 2001) y que determina el genotipo de nuestra cepa de *Acanthamoeba*.



Figura 8. Termociclador Arktik™ (ThermoFisher Scientific).

Para un volumen final de 50 μ L se usaron entre 42 y 60 ng de ADN, 5 pmol de cada cebador y 0,25 unidades de Taq polimersa, siguiendo el siguiente programa termociclador: 5 minutos a 95 $^{\circ}$ C, 35 ciclos de 20 segundos a 95 $^{\circ}$ C, 30 segundos a 50 $^{\circ}$ C, 30 segundos a 72 $^{\circ}$ C y un ciclo final de 7 minutos a 72 $^{\circ}$ C.

Una vez completada la PCR los fragmentos de ADN se separaron por en gel de agarosa al 2 % (Figura 9) para revelar el resultado mediante un transiluminador UV para captura de imágenes Chemi-Doc (Biorad) (Figura 10).

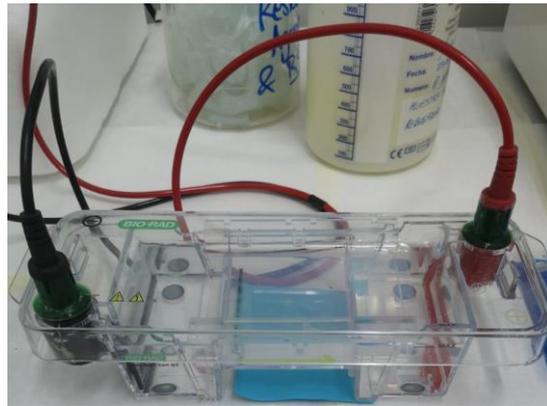


Figura 9. Cubeta BioRad® de electroforesis en gel sumergida en horizontal 4x20x tomada con Huawei P20.



Figura 10. Transiluminador UV para captura de imágenes Chemi-Doc (Biorad®).

4. Resultados y discusión

En el presente Trabajo de Fin de Grado la toma de muestras se realizó en Playa Grande, situada en el municipio de Arico, Tenerife, debido a que gracias a la orientación de la playa (noreste) y a su forma en U, así como a la constante presencia de vientos de componente nor-noreste, la playa recibe diariamente importantes cantidades de microplásticos. De hecho, se trata de la playa que presenta una mayor contaminación por microplásticos de toda Canarias (González Hernández et al., 2020).

Para determinar la existencia de AVL en el ecosistema de la playa se decidió evaluar la presencia de estos patógenos tanto en agua de mar como en la arena, ya que en ambas se encontraron microplásticos. Como controles se tomaron muestras de agua y arena, para así tener un blanco y poder descartar los microorganismos que se encuentren de forma natural en ambos medios.

Los pesos de los microplásticos fueron variables:

- Arena (zona A y B): 1 g
- Microplásticos arena A: 2,8 g
- Microplásticos arena B: 2,1 g
- Microplásticos agua A: 0,11 g
- Microplásticos agua B: 0,07 g

Debido al mal tiempo no fue posible la recolección de una mayor cantidad de microplásticos suspendidos en el agua, aun así, se siguió con el procedimiento habitual.

En las muestras de agua con microplásticos A y B y en la muestra de agua B se pudo observar crecimiento abundante de hongos (Figura 11). Pero solo la de microplásticos en arena zona B presentó crecimiento amebiano. Tanto en la placa original como en las sucesivas réplicas para su aislamiento, se apreciaron tanto trofozoítos (Figura 12) como quistes (Figura 13). Así como la morfología del trofozoíto puede ser un dato objetivo, en la Figura 13 se aprecia claramente morfología estrellada típica de los quistes de *Acanthamoeba* (Siddiqui y Khan 2012; Lorenzo-Morales et al., 2015).

Aquellas muestras en las que no se observó crecimiento amebiano tras una semana después de su siembra fueron desechadas.



Figura 11. Fotografía de crecimiento de hongos de 4x20x tomada con Huawei P20.

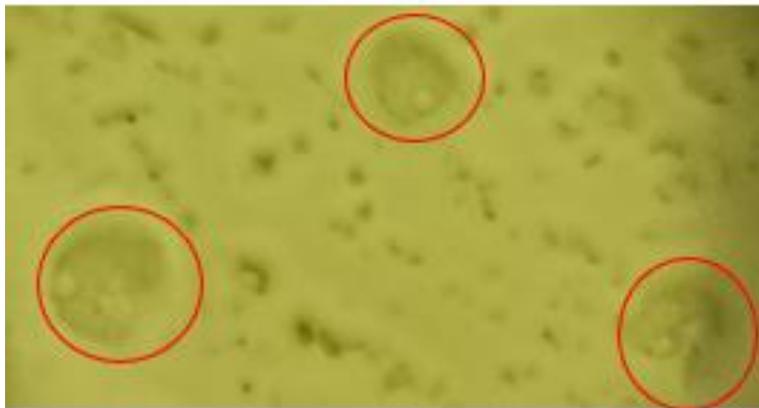


Figura 12. Fotografía de crecimiento de trofozoítos 4x20x tomada con Huawei P20.

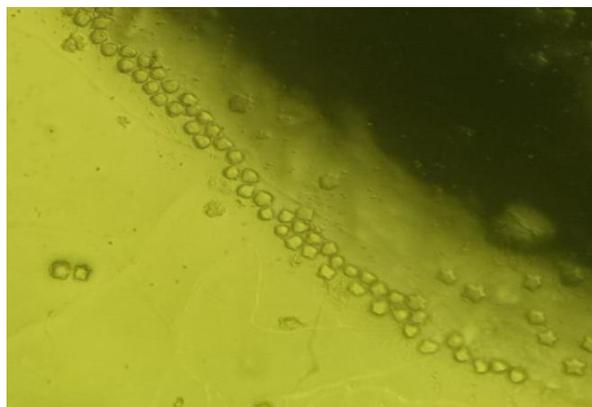


Figura 13. Fotografía 20x tomada con Huawei P20 de crecimiento de quistes de *Acanthamoeba* con morfología estrellada.

Tras la extracción de ADN de la muestra de microplásticos en arena B se llevó a cabo la PCR. Se usaron los cebadores específicos para este género ya que a nivel morfológico se pudo identificar como una cepa perteneciente a este grupo. En la siguiente figura se puede apreciar que la PCR fue positiva, cuyos controles positivo y negativo corroboran el éxito de la reacción.

Para *Acanthamoeba* es ideal una concentración de 40 ng/μL, aun así, se probaron con concentraciones inferiores (20 ng/μL) y superiores (60 ng/μL), como se puede apreciar en la Figura 14. En esta imagen, además, existe un marcador de peso molecular (MPM) que, marca el tamaño en pb de los fragmentos desde 100 a 1.500 pb. Por lo tanto, se confirma que el tamaño del fragmento amplificado está alrededor de los 500 pb, como ya se sabe que es el fragmento específico para *Acanthamoeba*. También se observa un control negativo (C-) y un control positivo de la cepa *Acanthamoeba castellanii* Neff (ATCC® 30010™) (C+).

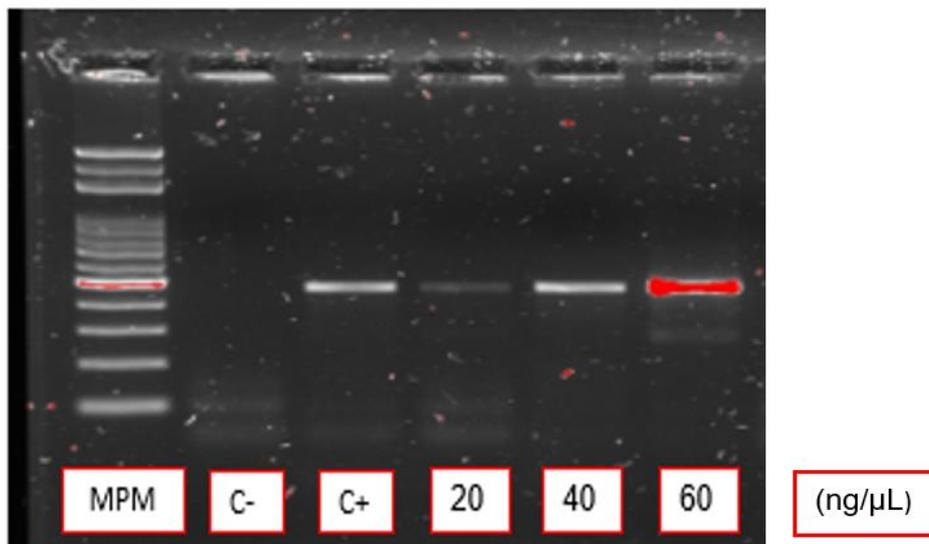


Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa (2%) en donde se aprecian los fragmentos amplificados de *Acanthamoeba* spp con los cebadores JDP1 y JDP2 a distintas concentraciones de ADN (Pocillo 1: Marcador Peso Molecular; Pocillo 2: C-; Pocillo 3: C+; Pocillo 4: 20 ng/μL; Pocillo 5: 40 ng/μL; Pocillo 6: 60 ng/μL).

En la siguiente tabla se resumen los resultados obtenidos:

Tabla 1: Relación de resultados obtenidos en ANN y PCR en las diferentes zonas de la playa.

Muestras	ANN	PCR	Amebas de vida libre (AVL)
Arena zona A	-	-	
Arena zona B	-	-	
Microplásticos en arena zona A	-	-	
Microplásticos arena zona B	+	+	<i>Acanthamoeba</i> spp.
Agua zona A	-	-	
Agua zona B	-	-	
Microplásticos en agua zona A	-	-	
Microplásticos en agua zona B	-	-	

Por tanto, solo fueron detectadas AVL en las muestras de microplásticos en arena, en concreto la PCR fue positiva para *Acanthamoeba* spp. y, al haber dado negativo en las muestras control (agua y arena), podría indicar una posible adherencia entre amebas y microplásticos.

Aunque el Real Decreto 463/2020, de 14 de marzo, por el que se declara el estado de alarma para la gestión de la situación de crisis sanitaria ocasionada por el COVID-19 impidió que se continuaran los muestreos planificados inicialmente, con el muestreo y los controles llevados a cabo en marzo, se confirma que, los microplásticos representan un medio ideal para vehicular AVL.

Otros autores demuestran que son un sustrato que favorece el crecimiento y reproducción de diferentes especies bacterianas (Pasqualina Laganà et al., 2018), lo cual hace que presenten las condiciones necesarias para la formación de biopelículas en las que existan interacciones de protozoos como las AVL y otros microorganismos.

Esto podría suponer un problema de salud pública, ya que las muestras fueron recogidas en zonas de contacto humano y animal. *Acanthamoeba* spp., como ya se ha comentado anteriormente, se encuentra bastante extendido en el

medio siendo descrito tanto en fuentes de agua (Lorenzo-Morales et al., 2005a) como de suelo (Reyes-Batlle et al., 2014; 2016). El peligro que representan *Acanthamoeba* spp. para la salud humana no solo es debido a las enfermedades que este género produce (EGA y QA), sino por su capacidad para albergar otros microorganismos patógenos en su interior (Siddiqui y Khan, 2012).

El ambiente que se ha estudiado en el presente trabajo es una playa de acceso público y concurrida, por lo que el contacto con la arena contaminada por microplásticos contaminados a su vez con AVL, hace que el riesgo de contacto directo con estos patógenos sea significativo. Por ello, se puede concluir que es necesario continuar con esta línea de investigación, aumentar los muestreos para poder evaluar de manera más detallada el papel de los microplásticos en la transferencia de organismos patógenos.

5. Conclusiones

De los resultados obtenidos en el presente Trabajo de Fin de Grado se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- Se detectó la presencia de AVL potencialmente patógenas, en muestras de arena de Playa Grande, en el municipio de Arico.
- Con el análisis llevado a cabo en este trabajo, se puede concluir que los microplásticos presentes en la arena podrían favorecer la proliferación de amebas del género *Acanthamoeba*, pero debido a la situación del presente curso no fue posible el análisis de más muestras, por lo que los datos no son representativos ni concluyentes.
- Es la primera vez que el género *Acanthamoeba* es detectado en arena de playa del municipio de Arico, Tenerife y también en microplásticos.
- Por tanto, estos resultados ponen de manifiesto la problemática en la acumulación de microplásticos en Playa Grande y su asociación con *Acanthamoeba*.

6. Bibliografía

Balczun C. and Scheid Patrick L., (2017). Free-Living Amoebae as Hosts for and Vectors of intracellular Microorganisms with Public Health Significance. *9*(4), 65

Bollaín Pastor C., Vicente Agulló D (2019) Presence of microplastics in water and the potential impact on public health. NCBI

Bunsuwansakul C., Mahboob T., Hounkong K., Laohaprapanon S., Chitapornpan S., Jawjit S., Yasiri A. Barusrux S., Bunluepuech K., Sawangjaroen N., Salibay C.C., Kaewjai C., Pereira M.L., Nissapatorn V. (2019) Acanthamoeba in Southeast Asia- Overview and Challenges. *57* (4), 341-357.

Crawford, C. B.,Quinn, B. (2017). Physiochemical Properties and Degradation. 57-100.

Da Costa, J.P., Duarte, A. C., Rocha-Santos, (2017). T.A.P. Chapter 1- Microplastics- Occurrence, Fate and Behaviour in the environment. In Characterization and Analysis of Microplastics. 19-37.

Davis MJ, French WJ & Schaad NW (1981). Axenic culture of the bacteria associated with phony disease of peach and plum leaf scald. *Curr Microbiol.* *6*, 309–314.

González Hernández M., Hernández Sánchez Cintia, González Sálamo Javier, López Darías Jessica, Hernández Borges Javier (2020). Monitoring of meso and microplastic debris in Playa Grande beach (Tenerife, Canary Islands, Spain) during a moon cycle.

Greub G., and Raoul, D. (2004). Microorganisms Resistant to Free-Living Amoeba, *Clinical Microbiology Reviews.* *17*(2), 413–433.

Haniloo, A, Pezeshki, A, Mahmmodzadeh, A, et al. (2017). Genotyping of Acanthamoeba spp. from water sources from Northwestern Iran. *Acta Parasitologica.* *62*(4), 790-795.

Jill M.Schroeder, Gregory C. Booton, [...], and Thomas J. Byers (2001) Use of Subgenic 18S Ribosomal DNA PCR and Sequencing for Genus and Genotype

Identification of Acanthamoebae from Humans with Keratitis and from Sewage Sludge. 39(5), 1903-1911.

Karen Duis, Anja Coors (2016) Microplastics in the aquatic and terrestrial environment: sources (with a specific focus on personal care products), fate and effects. 28(1), 2.

Kesy K, Oberbeckmann S., Kreikemeyer B., Labrenz M. (2019) Spatial Environmental Heterogeneity Determines Young Biofilm Assemblages on Microplastics in Baltic Sea Mesocosms.

Koyun i. Kolören Z., Karaman Ü, Tsiami A., Karanis (2020) Acanthamoeba spp. In river water samples from the Black Sea region, Turkey. 18 (2), 186-199.

Li WC, Tse HF, Fok L. (2016) Plastic waste in the marine environment: A review of sources, occurrence and effects. 1, 566-567.

Lisbeth Van Cauwenberghe, Ann Vanreusel, Jan Mees, Colin R.Janssen (2013) Microplastic pollution in deep-sea sediments. 182, 495-499.

Lorenzo-Morales J, Lindo JF, Martínez E, Calder D, Figueruelo E, Valladares B, Ortega-Rivas A. (2005b) Pathogenic Acanthamoeba strains from water sources in Jamaica, West Indies. NCBI.

Lorenzo-Morales J, Ortega-Rivas A, Foronda P, Martínez E, Valladares B (2005a). Isolation and identification of pathogenic Acanthamoeba strains in Tenerife, Canary Islands, Spain from water sources. *Parasitology Research*. 95(4), 273-277.

Mammo F.K., Amoah I.D., Gani K.M., Pillay L., Ratha S.K., Bux F., Kumari S. (2020). Microplastics in the environment: Interactions with microbes and chemical contaminants. Elsevier.

Manual técnico Maxwell ® 16 DNA Purification System.

Our World in data: Microplastics in the surface ocean, 1950 to 2050.

Page, FC. (1988). A new key to fresh water and soil Gymnamoebae. Freshwater Biological Association Ambleside, Cumbria, UK. 122pp.

Pasqualina Laganà, Gabriella Caruso, Ilaria Corsi, Elisa Bergami, Valentina Venuti, Domenico Majolino, Rosabruna La Ferla [...] (2018). Do plastics serve as possible vector for the spread of antibiotic resistance? First insights from bacteria associated to a polystyrene piece from King George Island (Antarctica). *222* (1), 89-100.

Preston, T.M., Richards, H., Wotton, R.S., 2001. Locomotion and feeding of *Acanthamoeba* at the water-air interface of ponds. *FEMS Microbiol. Lett.* *194* (2), 143-147.

Rist S., Almorth B.C., Hartmann N.B., Karlsson T.M. (2018) A critical perspective on early communications concerning human health aspects of microplastics. *626*, 720-726.

Reyes Batle M., D. Todd, Martín Navarro C., López Arencibia Atteneri [...] (2014). Isolation and characterization of *Acanthamoeba* strains from soil samples in Gran Canaria, Canary Islands, Spain. *113*, 1383-1388.

Reyes Batle M., Zamora Herrera Jonadab, Vargas Mesa Alejandro, Valerón Tejera Marco A., Wagner Carolina [...] (2016). *Acanthamoeba* genotypes T2, T4, and T11 in soil sources from El Hierro island, Canary Islands, Spain. *115*, 293-2956.

Scheid P. (2015). Viruses in close associations with free-living amoebae. *114* (11), 3959-67.

Siddiqui R., Khan N.A. (2012). Biology and pathogenesis of *Acanthamoeba*.

Schroeder, J. M., Booton, G. C., Hay, J., Niszl, I. A., Seal, D. V., Markus, M. B., ... Byers, T. J. (2001). Use of Subgenomic 18S Ribosomal DNA PCR and Sequencing for Genus and Genotype Identification of *Acanthamoebae* from Humans with Keratitis and from Sewage Sludge. *Journal of Clinical Microbiology.* *39*(5), 1903–1911.

Schuster FL, Visvesvara GS (2004). Opportunistic amoebae: challenges in prophylaxis and treatment. *7*(1),41-52.

Sharon A. Huws, Robert J. Morley, Martin V. Jones, Michael R.W. Brown, Anthony W. Smith (2008). Interactions of some common pathogenic bacteria with *Acanthamoeba polyphaga*. *282*(2), 258-265.

Stephanie L.Wright, Richard C.Thompson, Tamara S.Galloway (2013).The physical impacts of microplastics on marine organisms: A review. *178*, 483-492.

Tice, AK., Shadwick, LL., Fiore – Donno, AM., Geisen, S., Kang, S., Schuler, GA., Spiegel, FW., Wilkinson, KA., Bonkowski, M., Dumack, K., Lahr, DJ., Voelcker, E., ClauB, S., Zhand, J., Brown, MW. (2016). Expansion of the molecular and morphological diversity of Acanthamoebidae (Centramoebida, Amoebozoa) and identification of a novel life cycle type withis the group. *Biology Direct*. *11*(1), 69.

Todd CD, Reyes-Batlle M, Piñero JE, Martínez-Carretero E, Valladares B, Streete D, Lorenzo-Morales J, Lindo JF. (2015) Isolation and molecular characterization of Acanthamoeba genotypes in recreational and domestic water sources from Jamaica, West Indies. *J Water Health*. *13*(3):909-19

Trabelsi H., F. Dendana, A. Sellami, F. Cheikhrouhou, S. Neji, F. Makni, A. Ayadi (2012). Pathogenic free-living amoebae: Epidemiology and clinical review. *60* (6), 399-405.

Vicent Thomas, Gerald McDonnel, Stephen P. Denyer, Jean-Yves Maillard (2010). Free-living amoebae and their intracellular pathogenic microorganisms: risk for water quality. *34*(3), 231-259.

7. Glosario

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ANN: Agar no nutritivo

AVL: Amebas de vida libre

C+: Control positivo de *Acanthamoeba Neff*

C-: Control negativo (agua)

EGA: Encefalitis granulomatosa amebiana

MPM: Marcador de peso molecular

PAGE: Polyacrylamide gel electrophoresis

PAS: Tampón salino específico de amebas (*PAGE's Amoeba Saline*)

PB: Pares de base

PCR: Reacción en cadena polimerasa

QA: Queratitis por *Acanthamoeba*