

Seguimiento de la comunidad de patógenos asociados a enfermedades de erizos de mar antes y después de la Borrasca Filomena.

Monitoring of the pathogen community
associated to sea urchin diseases before and
after the winter storm Filomena.

Camila Esperanza Salazar Forero
Máster en Biología Marina Biodiversidad y
Conservación

Marzo 2021

Contenido

ABSTRACT	2
RESUMEN	3
INTRODUCCIÓN.....	4
OBJETIVOS.....	7
MATERIAL Y MÉTODOS	8
<i>Procesamiento de las muestras.</i>	9
<i>Aislamiento de patógenos.</i>	12
<i>Identificación de las especies de amebas presentes en los cultivos.</i>	12
<i>Análisis estadísticos.</i>	13
RESULTADOS	13
<i>Aislamiento de Vibrio spp.</i>	14
<i>Aislamiento de Amebas.</i>	16
<i>Análisis estadísticos.</i>	19
DISCUSIÓN.....	23
CONCLUSIONES.....	28
AGRADECIMIENTOS.....	29
BIBLIOGRAFÍA.....	31

ABSTRACT

Sea urchins mass mortalities events have been studied in different parts of the world due to the ecological and economic impact that can cause on the fishing industry and ecosystems, as sea urchin populations play a key role in the habitat structure. In the Canary Islands, two events of mass mortality of *Diadema africanum* had been reported. The first in 2010 and second in 2018, which appeared to be related to the winter storms that took place during the month of February of those same years. These first studies have identified *Neoparamoeba branchiphila* as the causative agent of the disease, which possibly acts in synergy with *Vibrio alginolyticus* and/or other pathogens. In this study, the pathogen community was monitored before and after the passage of the Storm Filomena, that occurred during January 2021st, on the island of Tenerife, on different substrates (sand, algae and water) and also in the coelomic liquid of several species of sea urchins (*Diadema africanum*, *Arbacia lixula*, *Paracentrotus lividus* and *Sphaerechinus granularis*). The Storm Filomena had similar features with tropical cyclones and generated abundant rainfall, gusts of wind from the SW and waves of more than 2 meters. A total of six pathogens, *N. branchiphila*, *Vexillifera minutissima*, *Acanthamoeba* sp, *Vahlkampfia* sp, *V. alginolyticus*, and green colonies of *Vibrio* spp, were observed. Additionally it was verified that there was a significant change in the presence of pathogens for the water and the hosts *D. africanum* and *P. lividus*, which were increased with the passage of Filomena. Likewise, it was found that these communities of pathogens were different depending on the type of habitat/host and, it is proposed the possibility that *D. africanum* acts as a reservoir of *N. branchiphila*.

Keywords:

Pathogens community, sea urchin, mass mortalities, killer storms

RESUMEN

Las mortalidades en masa de los erizos de mar se han estudiado en diferentes zonas del mundo debido al impacto ecológico y económico que puede representar para la industria pesquera y los ecosistemas donde las poblaciones de erizos cumplen un papel fundamental en la estructura del hábitat. En Canarias se han registrado dos eventos de mortalidad masiva de *Diadema africanum*. El primero en 2010 y el segundo en 2018, los cuales parecen estar relacionados con las tormentas de invierno que tuvieron lugar durante el mes de febrero de esos años. Estos primeros estudios han permitido identificar a *Neoparamoeba branchiphila* como el agente causante de la enfermedad, quien posiblemente actúa en sinergia con *Vibrio alginolyticus* y/o con otros patógenos. En el presente estudio se realizó un seguimiento de la comunidad de patógenos antes y después del paso de la Borrasca Filomena (enero de 2021) en la isla de Tenerife, en diferentes sustratos (arena, algas, agua) y en el celoma de varias especies de erizos de mar (*Diadema africanum*, *Arbacia lixula*, *Paracentrotus lividus* y *Sphaerechinus granularis*). La Borrasca Filomena tuvo características próximas a las de un ciclón tropical y generó abundantes precipitaciones, rachas de viento provenientes del SW y olas de más de 2 metros. Se observó un total de seis patógenos, *V. alginolyticus*, colonias verdes de *Vibrio* spp., *N. branchiphila*, *Vexillifera minutissima* *Acanthamoeba* sp, *Vahlkampfia* sp., adicionalmente se comprobó que hubo un cambio significativo en la presencia de patógenos para el sustrato agua y los hospedadores *D. africanum* y *P. lividus*, los cuales aumentan con el paso de Filomena. Así mismo, se encontró que las comunidades de patógenos son diferentes dependiendo del tipo de hábitat/hospedador y se propone la posibilidad de que *D. africanum* actúe como reservorio de *N. branchiphila*.

Palabras claves:

Comunidad de patógenos, erizos, mortalidades masivas, tormentas asesinas.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años se ha observado que la frecuencia y severidad de los brotes de enfermedades en animales marinos está en aumento (Lafferty, et al., 2004; Harvell, et al., 1999; Feehan, et al., 2012; Nowak & Archibald, 2018), esta situación se ha relacionado con el desequilibrio de los ecosistemas generado por las actividades humanas y se prevé un incremento en el contexto actual de cambio climático (Harvell, et al., 2002). Los equinodermos son uno de los taxones donde se han documentado varios brotes de enfermedades que han estado asociados a eventos de mortalidades masivas (Tajimaa, et al., 2007; Hernández, et al., 2020; Sweet, 2020).

Las mortalidades en masa de erizos (Feehan, et al., 2012) debidas a agentes patógenos empezaron a reportarse desde 1970 (Maes & Jangoux, 1984; Tajimaa, et al., 2007) en cerca de 30 géneros de erizos y diferentes partes del mundo (Wang, et al., 2013). Sin embargo, los casos más estudiados son los del erizo de mar *Strongylocentrotus droebachiensis* en las costas de Nueva Escocia (Scheibling & Stephenson, 1984; Scheibling, et al., 2010; Feehan, et al., 2012) y en el Caribe en *Diadema antillarum* (Lessios, et al., 1984), esta última conocida por los fuertes efectos que desencadenó en la estructura de las comunidades bentónicas del Caribe, las cuales han tenido una recuperación muy lenta y no han vuelto a su estado inicial después de 30 años (Lessios, 2016). En el caso de Nueva Escocia, los fenómenos de mortalidad masiva son cíclicos y están asociados a una Paramoebiasis generada por tormentas, lo que se conoce como “Killer Storm” (Scheibling, et al., 2010; Scheibling & Lauzon-Guay, 2010; Feehan, et al., 2012).

Estos brotes de enfermedad se han asociado con fenómenos ambientales extremos como tormentas y el aumento de la temperatura del mar, que en sinergia facilitan la dispersión de agentes patógenos, los cuales han aumentado su presencia en los ecosistemas durante los últimos años por el calentamiento global (Tajimaa, et al., 2007; Scheibling, et al., 2010; Scheibling & Lauzon-Guay, 2010; Feehan, et al., 2012). Debido a que los erizos son herbívoros claves en el funcionamiento de las comunidades bentónicas, cualquier cambio en la densidad de estos puede poner en riesgo la estabilidad y estructura de los ecosistemas

benéficos por el efecto de cascada trófica que se genera en las comunidades locales (Fernandez, et al., 2006; Clemente, et al., 2014; Trowbridge, et al., 2019; Gizzi, et al., 2020).

A pesar del gran número de reportes de mortalidades en masa, en muchos estudios los agentes causales han sido poco estudiados y en la mayoría de los casos no se han logrado identificar debido a la dificultad que entraña el estudio microbiológico (Trowbridge, et al., 2019; Sweet, 2020). Sin embargo, se han considerado bacterias, hongos, protozoarios e incluso algas como agentes infecciosos (Wang, et al., 2013), probablemente potenciados por la interacción de múltiples agentes inductores de estrés tales como cambios de temperatura, tormentas y degradación ambiental (Trowbridge, et al., 2019).

En el Atlántico este se han registrado dos eventos de mortalidad que afectaron a la especie de erizo de mar *Diadema africanum* (Rodríguez, et al., 2013) posteriores a las tormentas Xynthia en febrero 2010 y Emma en febrero 2018. La primera mortalidad se registró desde octubre 2009 hasta abril 2010, en el que la población presentó una reducción del 65% sin comprometer el éxito reproductivo de la especie (Clemente, et al., 2014). En el segundo caso, la reducción de la población fue del 93,2% para Tenerife comparado con densidades previas al evento y de 93,1% en la Palma, donde no hubo recuperación después del primer evento (Hernández, et al., 2020). Estas mortalidades afectaron también al archipiélago de Madeira, donde a diferencia de lo ocurrido en La Palma y Tenerife, al parecer se ha dado cierta recuperación de las poblaciones después del segundo evento de mortalidad (Gizzi et al 2020). Estas mortalidades se han atribuido a la enfermedad de la calva del erizo (*Sea urchin bald disease*) por el parecido de las lesiones observadas en la epidermis de los equinoideos. En los estudios iniciales se sugirió que *Vibrio alginolyticus* era el agente patógeno principal, probablemente porque se recolectaron individuos en un estado avanzado de la enfermedad o incluso muertos y *V. alginolyticus* es un patógeno común en el medio marino. Sin embargo, no se descartó la posibilidad de una sinergia con otros organismos patógenos como la ameba *Neoparamoeba branchiphila* (Dyková, et al., 2011; Clemente, et al., 2014), similar a la especie *Paramoeba invadens* identificada como agente causante de la enfermedad de los erizos *Strongylocentrotus droebachiensis* en el Atlántico oeste.

En el segundo evento, posterior a la tormenta Emma de febrero 2018, en el celoma de los individuos enfermos se encontró únicamente *N. branchiphila*, que se postuló como el causante principal, facilitando posteriormente la actividad oportunista de bacterias como *Vibrio* spp., no obstante, no se han completado los postulados de Koch's, necesarios para determinar correctamente el proceso de infección y la posible sinergia de *N. branchiphila* y *V. alginolyticus* (Hernández, et al., 2020).

Ambos periodos de mortalidad estuvieron asociados a estados inusuales de mar agitado provenientes del suroeste, tormentas de febrero 2010 y de febrero 2018, sugiriendo que este tipo de tormentas promueven la paramoebiasis en el Atlántico este, lo que viene a apoyar la hipótesis de la "Killer Storm" como se observa también en el Atlántico oeste (Scheibling & Lauzon-Guay, 2010; Scheibling, et al., 2010; Feehan, et al., 2012), que supone una correlación positiva entre la intensidad de la tormenta y la propagación de la paramoebiasis (Hernández, et al., 2020). Los episodios del Atlántico Este presentaron temperaturas diferentes por lo que no hay una clara relación con los cambios en la temperatura de la superficie del mar (Hernández, et al., 2020).

Al ser las amebas organismos bentónicos que viven en ambientes estables, se han propuesto dos posibles hipótesis sobre cómo el movimiento generado por las tormentas puede generar dos tipos de procesos: (1) uno horizontal, donde las amebas son transportadas y se mezclan con residentes, y (2) otro vertical donde hay una mezcla de sedimentos que aumenta el número de patógenos en la columna de agua (Feehan, et al., 2012; Hernández, et al., 2020). En Nueva Escocia (Feehan, et al., 2016) concluyeron que la advección horizontal es el mecanismo más probable de introducción, seguido de la mezcla del movimiento vertical como forma de dispersión. Sin embargo, sugieren, que es importante pero requiere de gran esfuerzo examinar la distribución del patógeno en el medio ambiente (sedimentos y agua de mar) costero y mar adentro, antes, durante y después de la tormenta.

La isla de Tenerife suele estar afectada por los vientos alisios que generan olas de moderada energía con altura media anual de 1,4 m, pero durante los meses de octubre a marzo el oleaje se intensifica, el mar de fondo y los vientos originados en el Atlántico Norte se acerca a la isla desde NNW y NW produciendo olas de 2 a 3 metros. Debido a la orientación de las costas, las vertientes E y SE de las islas están más protegidas frente al mar de fondo y el

oleaje medio es menor que en otras orientaciones (Yanes, et al., 2006), favoreciendo la retención de larvas y el incremento en la temperatura del agua, lo que beneficia la transformación y asentamiento de larvas de erizos. Esto junto a la presión antrópica hicieron que Tenerife presentara las densidades poblacionales de *D. africanum* más altas en Canarias (Hernández, et al., 2008).

El último trabajo publicado ha asociado la mortalidad en masa de erizos con las tormentas de invierno anómalas que se originan en latitudes medias - bajas y golpean las islas desde el sur, suroeste, generando fuertes vientos, alta precipitación y olas por encima de 2 metros (Hernández, et al., 2020). Entre los días 6, 7 y 8 de enero llegó a Canarias la Borrasca Filomena, originada en el interior de los E.E.U.U. y la cual se desplazó por el Atlántico hasta situarse al norte de Canarias produciendo lluvias intensas y vientos generalizados de 70-80km/h en el archipiélago, generando olas de 4-5 metros (AEMET, 2021), condiciones que se consideraron apropiadas para obtener información sobre los cambios en la presencia de patógenos que podrían darse posterior a un evento de tormenta.

Por lo tanto, teniendo en cuenta que esta enfermedad del erizo ha provocado cambios drásticos en las poblaciones de *D. africanum* en el Atlántico Este, así como en las comunidades en las que está presente (Sangil & Hernández, *in review*) y que los dos eventos de mortalidad masiva están relacionados con las tormentas (Hernández, et al., 2020), se examinó la presencia del patógeno antes y después del paso de la Borrasca Filomena en diferentes sustratos (agua, arena y alga) y especies de erizos (*D. africanum*, *P. lividus*, *S. granularis* y *A. lixula*) con el fin de identificar la presencia de patógenos antes y después de la tormenta, lo que nos permitirá entender un poco mejor los mecanismos de introducción de los mismos y el fenómeno de las mortalidades masivas de erizos.

OBJETIVOS

Evaluar la presencia de patógenos en diferentes sustratos y hospedadores antes y después de la Borrasca Filomena.

- a) Identificar qué comunidad de patógenos se encuentra presente en diferentes sustratos y hospedadores.

- b) Determinar si hay cambios en la comunidad de patógenos según el periodo pre-post tormenta y tipo de sustrato/hospedador (agua, arena, algas, erizos).
- c) Identificar si alguna de las especies o sustratos estudiados actúa como reservorio de alguno de los patógenos.
- d) Establecer si la temporada de tormentas genera algún cambio en la presencia de los patógenos que pudiera estar relacionado con la “Killer-Storm” hipótesis propuesta por Hernández et al. 2020.

MATERIAL Y MÉTODOS

La isla de Tenerife (28°16'07'' Norte, 16°36'20'' Oeste) es parte del archipiélago canario, el cual se compone de siete islas y cuatro islotes de origen volcánico ubicados en el borde oriental del giro subtropical del Océano Atlántico Norte. La influencia de la corriente de canarias, los vientos alisios y la surgencia costera del noreste de África, le dan a las islas características propicias para ser una zona de transición costera. El grado de exposición al oleaje varía estacionalmente entre las islas y entre las diferentes orientaciones de cada una de ellas.

Se realizaron muestreos en cuatro localidades de la isla de Tenerife: Boca Cangrejo, Abades, La Caleta de Adeje y Punta de Teno (Figura 1), antes de la temporada de tormentas en el mes de agosto de 2020 y durante el mes de enero de 2021, algunos días después de finalizada la Borrasca Filomena, que produjo olas de 2-3 m provenientes del sur y suroeste (Figura 2) (<http://www.puertos.es/es-es/oceanografia/Paginas/portus.aspx>).

Con el fin de localizar y caracterizar la presencia de patógenos, se seleccionaron tres posibles sustratos: agua, arena y algas y también se evaluó la posibilidad de que algunas especies de erizos (*Diadema africanum*, *Arbacia lixula*, *Paracentrotus lividus* y *Sphaerechinus granularis*) se comportaran como hospedadores de los patógenos. Para cada localidad se recolectaron un bote de arena, una muestra pequeña de la comunidad de algas presentes y 1,5 litros de agua en tres puntos aleatorios. Adicionalmente, según disponibilidad, se recolectaron tres individuos de erizos por especie. Todo fue transportado en neveras y llevado al laboratorio del grupo de investigación *Ecología de Comunidades Marinas y Conservación* de la ULL (<https://wp.ull.es/jocarher/lab-facilities/>).

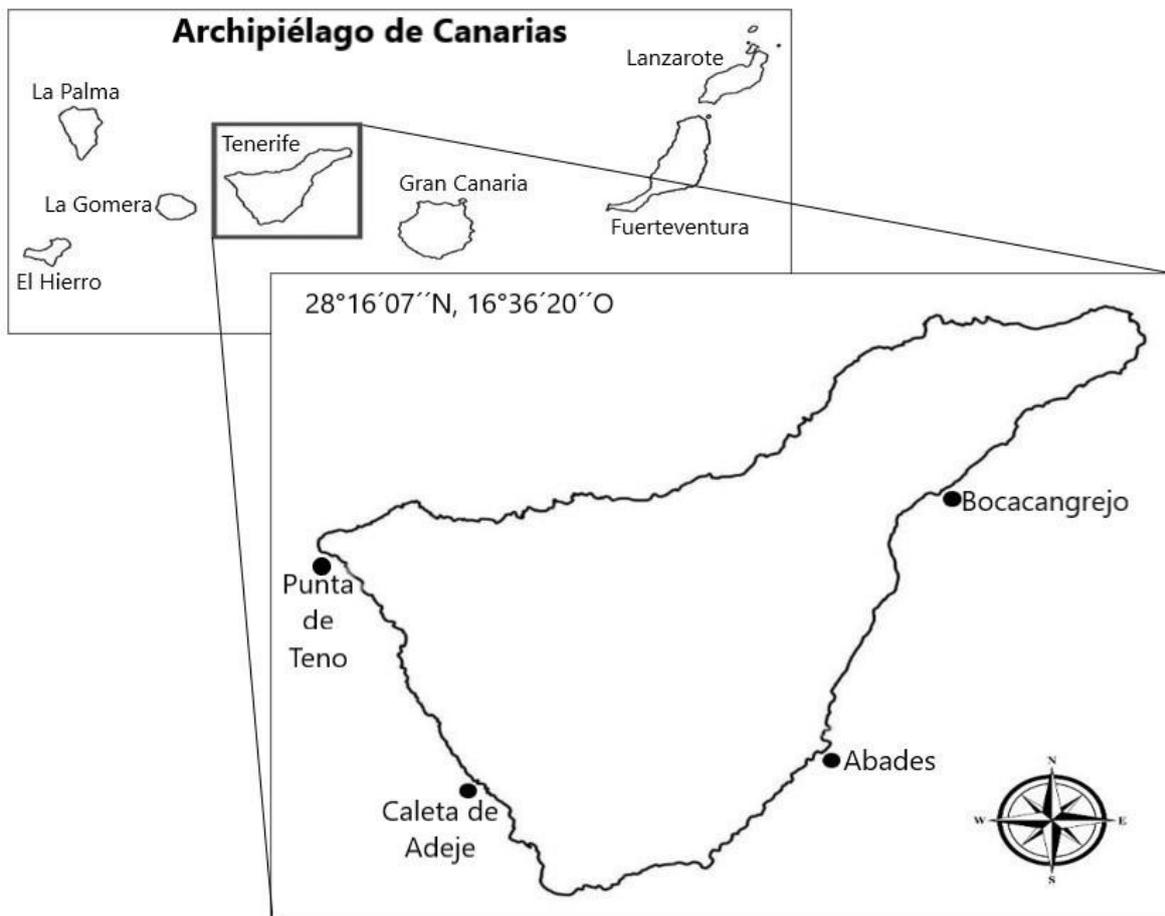


Figura 1. Puntos de muestreo en la isla de Tenerife.

Procesamiento de las muestras.

Cada muestra fue sembrada en dos cultivos diferentes: (1) En Agar Tiosulfato-Citrato-Bilis-Sucrosa (TCBS) MerckTM, medio selectivo para el aislamiento de *Vibrio*, cuyos componentes selectivos son sales biliares, tiosulfato, citrato y un pH alcalino de 8,6. Estos componentes inhiben el crecimiento de otras bacterias y las características saladas del medio promueven el crecimiento de *Vibrio* spp. El proceso de diferenciación está basado en la fermentación de sacarosa detectada por indicadores de pH (azul de timol y azul de bromotimol), los cuales viran a color amarillo por la reacción con sacarosa. Las cepas que fermentan sacarosa producen colonias amarillas, mientras que las que no, presentan colonias verdes. Los tamaños

de las colonias suelen variar, pero normalmente tiene un diámetro mínimo de 0,5 mm (Corry, et al., 1995). (2) El otro medio utilizado fue Agar no nutritivo (ANN) Agar granulado DIFCO™ al 2%, un medio sólido para el aislamiento de amebas que suele usarse con diversos fines y no garantiza el crecimiento exclusivo de amebas, ambos medios de cultivo se prepararon siguiendo las instrucciones del fabricante y usando agua Milli-Q®.

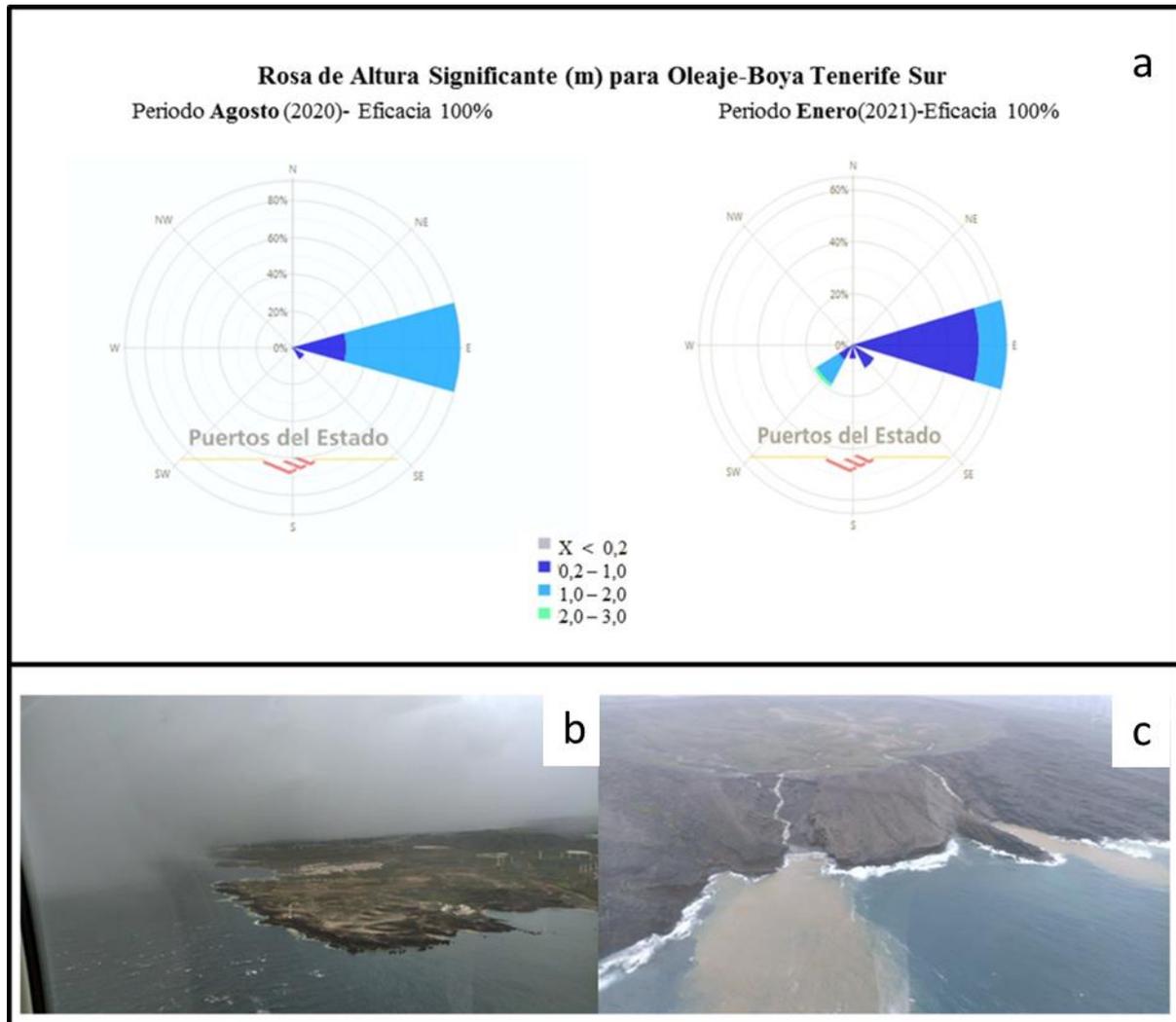


Figura 2. a) Rosa de altura significativa (m) para Oleaje de los meses de agosto 2020 (pretormenta) y enero 2021 (tormenta). Boya Tenerife Sur. b) Imagen de Pta. Rasca - Tenerife, donde se puede ver claramente el tiempo del oeste durante el periodo de la tormenta Filomena; c) Imagen de Montaña Pelada – Tenerife, donde se observan claramente los barrancos corriendo en el periodo postormenta. Fotografías aéreas de Ignacio Herranz Duarte

-*Muestras de agua:* haciendo uso de una rampa de vacío PALL modelo N°1540 y utilizando membranas de nitrocelulosa con un diámetro de poro de 0,45 μm , se filtraron los primeros 100 ml de cada botella. Bajo fuego y con pinzas la membrana fue separada del filtro y se

sembrada boca arriba en la placa de TCBS. Posteriormente, se filtró el agua restante y la membrana se colocó boca abajo en las placas de Petri con ANN, esto para facilitar el paso desde la membrana al medio de cultivo.

-*Muestras de la comunidad de algas*: de la muestra de alga, con ayuda de unas pinzas se arrancaba un trozo de las algas que se encontraran en la zona (Tabla 1) y este era sembrado directamente en ambos medios de cultivo.

-*Muestras de arena*: en cada bote de arena se introdujo un bastoncillo de algodón para la obtención de una pequeña muestra, la cual fue sembrada directamente en los dos medios de cultivo.

-*Muestras de celoma*: los erizos se colocaban boca arriba y utilizando una jeringuilla de insulina de 29 G × 1,27 cm, se extrajo hasta 1 ml de celoma de cada erizo. La jeringa se introdujo en la membrana peristomal en un ángulo que evitara el contacto con la linterna de Aristóteles (Dyková, et al., 2011), el líquido celómico fue sembrado en cada uno de los medios selectivos.

Tabla 1. Especies recolectadas para siembra en medios de cultivos.

Localidad	Agosto 2020	Enero 2021
Abades	<i>Dictyota sp.</i> <i>Lobophora schneideri</i> <i>Lobophora schneideri</i>	<i>Dictyota dichotoma</i> Rhodophyta Rhodophyta
Boca Cangrejo	<i>Asparagopsis taxiformis</i> <i>Jania sp</i> <i>Lobophora schneideri</i>	<i>Asparagopsis taxiformis</i> <i>Jania sp</i> <i>Lobophora schneideri</i>
La Caleta de Adeje	<i>Lobophora schneideri</i> <i>Corallina ferreyrae</i> <i>Codium sp.</i>	<i>Lobophora schneideri</i> <i>Lobophora schneideri</i> <i>Dictyota dichotoma</i>
Punta de Teno	<i>Lobophora schneideri</i> <i>Lobophora schneideri</i> <i>Lobophora schneideri</i>	Rhodophyta <i>Asparagopsis taxiformis</i> <i>Lobophora schneideri</i>

Todas las placas de cultivos fueron llevadas al laboratorio del grupo de investigación de Parasitología del Instituto Universitario de Enfermedades Tropicales y Salud Pública de Canarias, donde se incubaron y se llevó a cabo el seguimiento de los cultivos.

Aislamiento de patógenos.

Aislamiento de *Vibrio* spp.

Las muestras sembradas se llevaron a 37°C durante 24 horas, pasado este tiempo estas fueron observadas para saber si había presencia o no de colonias de *Vibrio* spp. En las muestras de agua las colonias fueron contabilizadas.

Aislamiento de Amebas.

Los medios sembrados se cultivaron a 20°C y se observaron semanalmente utilizando un microscopio invertido Leica DMIL en aumento de 10X y 20X para identificar la presencia de amebas, se tomaron fotografías con un Huawei P9 lite y el microscopio de imagen celular EVOS FL, adicionalmente se hicieron replicas para aislar las amebas y mantener los cultivos libres de hongos o bacterias.

Identificación de las especies de amebas presentes en los cultivos.

Para la extracción de ADN se realizaron dos procedimientos de preparación de muestras, en el primero se agregaron 2 ml de PAS (Page's amoeba Saline Solution) frío en la placa de Petri y con un cayado de vidrio el agar se raspó para despegar la ameba del mismo, posteriormente se colocaron 2 ml más de PAS y con pipeta se recogió el contenido en un tubo eppendorf para llevar a centrifugación durante 10 minutos a 1500 rpm, el sobrenadante se colectaba y se colocaba en el espacio para muestra del cartucho para el sistema automatizado Maxwell 16®. El otro procedimiento se utilizó cuando las amebas no se encontraban en toda la placa sino en un espacio reducido y en poca cantidad, en dichos casos, se extraía el trozo del agar dónde las amebas se encontraban y se colocaban directamente en el cartucho, para extracción de ADN en Maxwell 16®. En ambos casos después de 40 minutos se recogía el ADN de la cubeta con el buffer de elusión y se almacenaron a -20°C hasta su procesamiento en la PCR.

Para la amplificación de ADN por PCR, se utilizó un Termociclador Arktik™ (Thermo Scientific™) en el cual dependiendo de la muestra se realizaba el protocolo para FLA primers (Free living Amoeba) o el protocolo para VAHL primers, descrito en (Reyes-Batlle, et al., 2021) Para el mix de preparación se utilizó por muestra 5 µl Buffer, 1 µl dnTps, 0,5 µl de

primer forward y 0,5 µl de primer reverse, 0,25 µl de Taq y 32.75µl de agua. Por cada muestra se prepararon 2 volúmenes, el primero con 10 µl de ADN y el segundo con 4 µl de ADN y 10 µl de agua. Una vez las muestras eran amplificadas se procedía a la electroforesis en donde se ponían a correr las muestras en un gel de agarosa al 2% y se utilizaba como tampón TAE 1%. Para darle peso a los fragmentos se utilizó buffer de carga y para calcular los pesos moleculares de las muestras de ADN se utilizó el marcador PCR BIO Ladder IV. La electroforesis tuvo una duración de 45 min a 80 vatios. Una vez finalizado el tiempo los geles fueron observados con luz UV haciendo uso del sistema de imagen ChemiDoc™ XRS.

Análisis estadísticos.

Para los análisis estadísticos se utilizó el paquete estadístico PRIMER7 + PERMANOVA (Clarke, et al., 2014; Anderson, et al., 2008) donde se calcularon las similaridades entre las muestras utilizando la matriz de datos de presencia y ausencia de la comunidad de patógenos y aplicando el índice de distancias de Bray-Curtis. Esta matriz triangular de similaridades se utilizó posteriormente para obtener un dendrograma Cluster basado en las similaridades de las muestras con el que conseguimos determinar los agrupamientos principales en relación a la comunidad de patógenos. Mediante un análisis SIMPROF se determinó que los agrupamientos fueron significativos y estos fueron representados posteriormente en un gráfico MDS no métrico para su mejor visualización. Mediante un análisis multivariante por permutaciones (PERMANOVA) aplicado sobre la matriz triangular de similaridades se testeó el efecto de la estacionalidad (periodos pre y post tormenta) y el sustrato/hospedador, así como su interacción, en la comunidad de patógenos identificada. Ambos factores fueron tratados como fijos. Finalmente, se realizó un análisis PAIRWISE sobre la interacción para determinar la influencia de la tormenta en la variación temporal de la comunidad de patógenos para cada sustrato/hospedador estudiado.

RESULTADOS

En el muestreo realizado en agosto de 2020 se examinaron en total 156 cultivos, 78 en ANN y 78 en TCBS, mientras que para el muestreo de enero de 2021 fueron 152 cultivos, 76 en ANN y 76 en TCBS. Se encontraron en total seis patógenos diferentes: colonias amarillas (*Vibrio alginolyticus*), colonias verdes de *Vibrio* spp, y cuatro amebas de vida libre *Acanthamoeba* sp., *Vahlkampfia* sp., *Neoparamoeba branchiphila* y *Vexillifera minutissima*.

En la Figura 3 se puede ver que el muestreo realizado en enero después del paso de la borrasca tiene un mayor número de muestras con presencia de patógenos, especialmente en agua, donde se encuentran tres de los patógenos observados, colonias verdes de *Vibrio*, *V. alginolyticus* y *Acanthamoeba* sp.

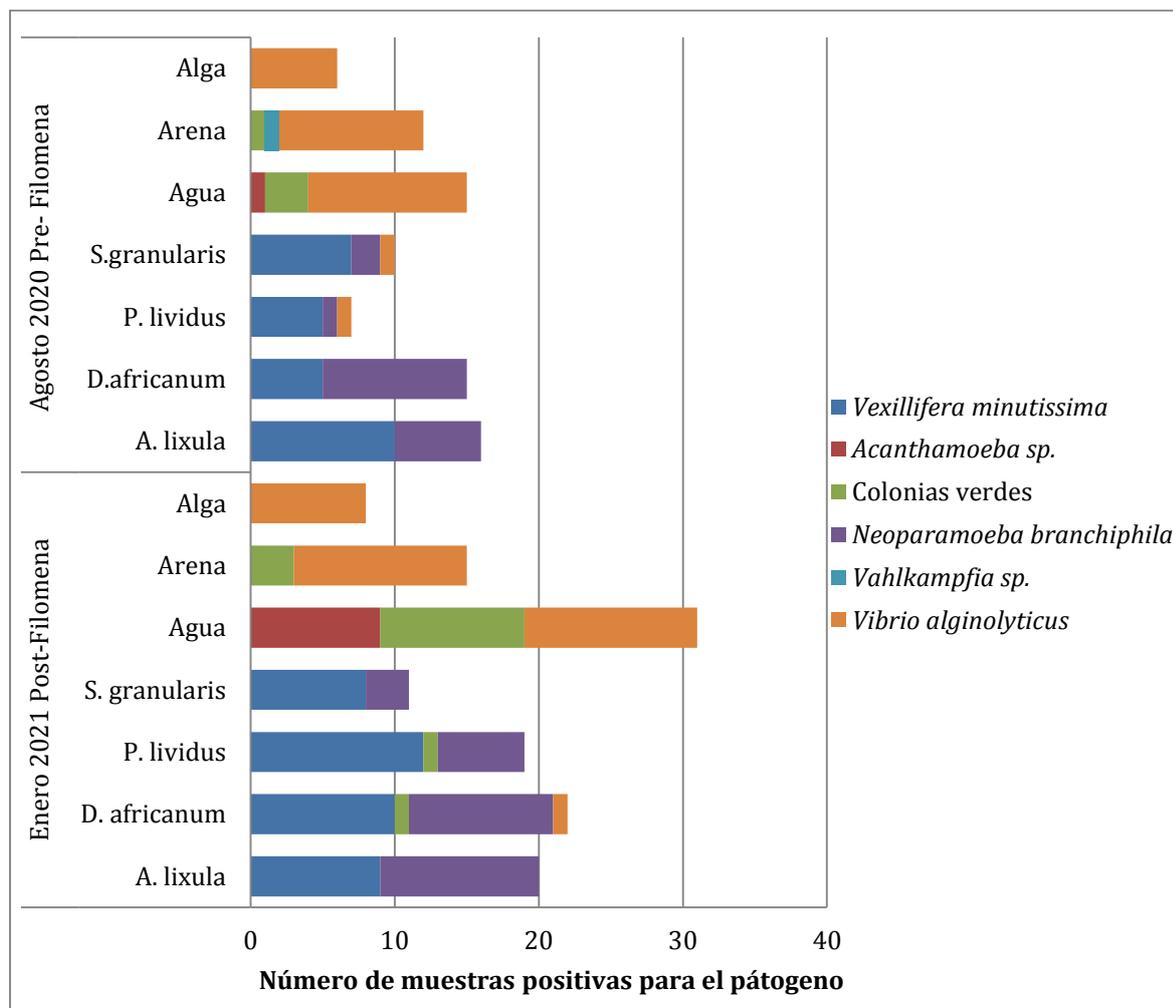


Figura 3. Presencia de patógenos antes y después de la Borrasca Filomena.

Aislamiento de Vibrio spp.

En 62 de las muestras analizadas 29 antes de la tormenta y 33 después de la tormenta, se observó la presencia de colonias amarillas en los tres sustratos y en tres especies de erizos de mar, estas colonias fueron identificadas como *V. alginolyticus*, en la Figura 4 se puede observar el número de muestras que dieron positivo para esta especie de bacteria. Adicionalmente, en una muestra de agua de Teno recolectada en agosto 2020 se encontró

Vibrio harveyi (Figura 4c). Además, se observó el crecimiento de colonias verdes que después de la tormenta aumentaron en un 13%, específicamente en muestras de agua, arena y dos erizos.

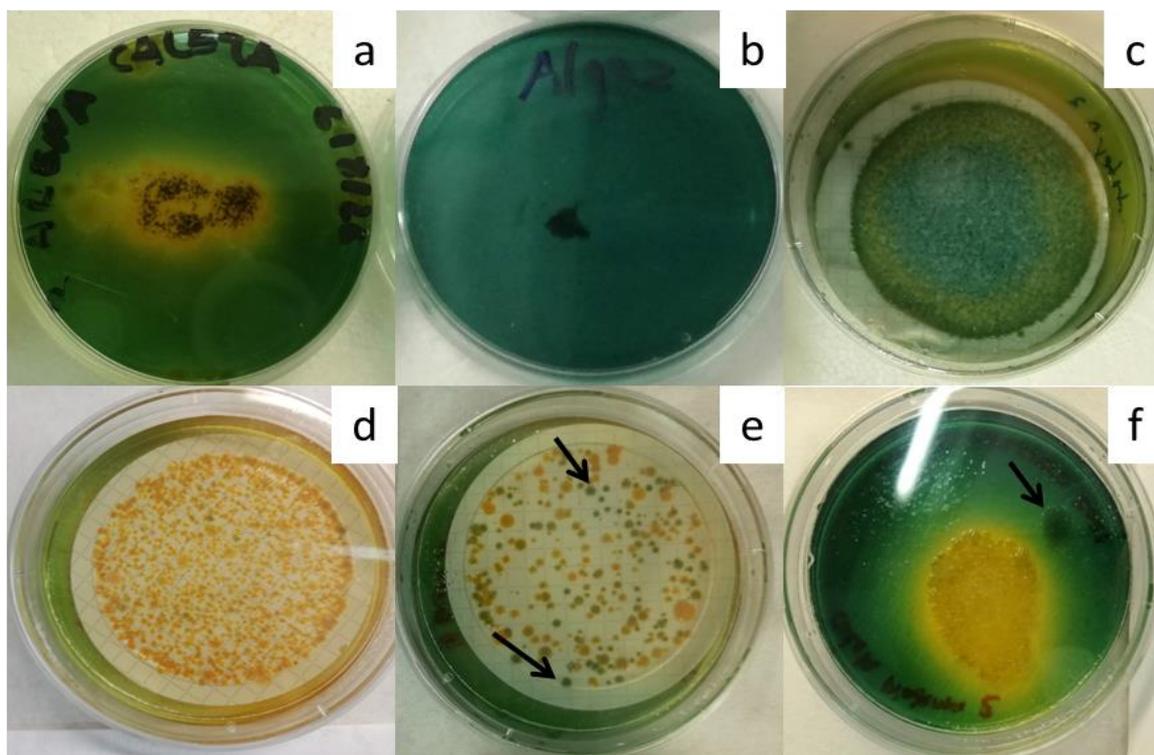
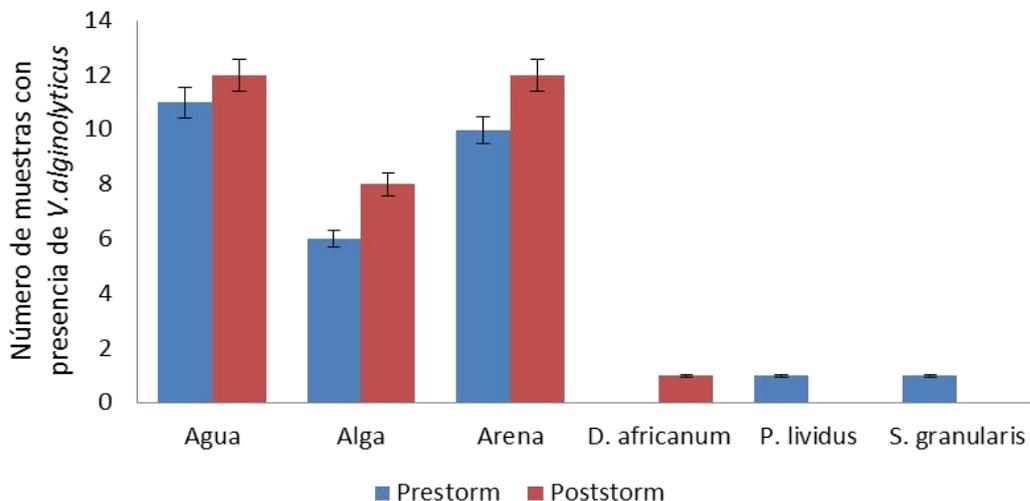


Figura 4. Aislamiento de especies de *Vibrio*: en la gráfica se observa la presencia de *Vibrio alginolyticus* en sustratos/hospedadores antes y después de Filomena, barras de error con porcentaje 5%. Fotografías de los cultivos: las colonias amarillas corresponden a *V. alginolyticus*. Pretormenta a) arena-Caleta; b) Negativo alga-Boca Cangrejo; c) *V. harveyi* en agua-Teno; Postormenta d) Agua-Teno; e) Agua-Abades; f) *Diadema africanum* – La Caleta de Adeje.

Aislamiento de Amebas.

Se realizó seguimiento en 156 placas de ANN en total (Figura 5), con respecto a la presencia de amebas en los diferentes sustratos antes de la tormenta, se encontraron quistes de *Vahlkampfia* sp. (Figura 5) en una muestra de arena de Abades y *Acanthamoeba* sp. en una muestra de agua de Caleta. *N. branchiphila* se observó en 19 placas sembradas con el celoma de erizos y *V. minutissima* en 27 placas, también de erizos. En la mayoría de las muestras de agua obtenidas después del paso de la borrasca filomena, se observó la presencia de *Acanthamoeba* sp. La secuenciación de una de las cepas aisladas permitió identificarla como genotipo T4, en la Figura 5 se puede ver la electroforesis obtenida para la muestra Agua-Teno1, a pesar de que el control positivo no corrió adecuadamente, el marcador molecular permite inferir que el fragmento amplificado está alrededor de las 500 pb específico para *Acanthamoeba*.

Las otras amebas encontradas en el mes de enero 2021 corresponden a *N. branchiphila* que fueron identificadas por los trofozoites y pseudoquistes (Figura 6b, 6c), esta ameba tuvo un aumento del 13% (Figura 6a) en comparación con las muestras obtenidas en agosto 2020. Por su lado *V. minutissima* presentó un aumento del 15% (Figura 6d).

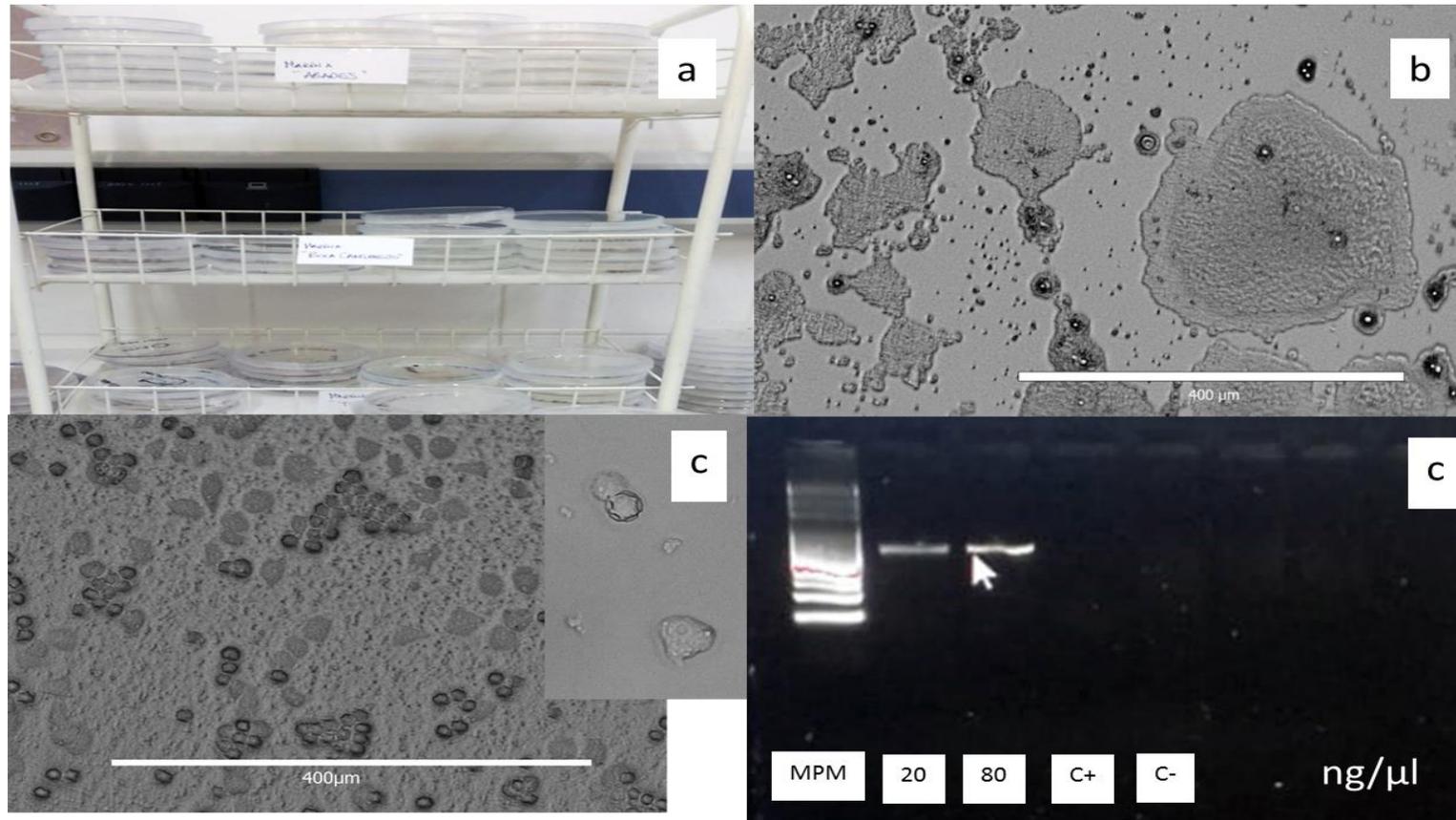


Figura 5. Cultivos de amebas: a) Placas de Petri con cultivos de amebas b) Quistes de *Vahlkampfia* sp.; c) Trofozoitos y quistes de *Acanthamoeba* genotipo T4; d) Electroforesis en gel de agarosa 2%, fragmentos amplificados del ADN de *Acanthamoeba* T4 con primers JDP1 y JDP2 a dos concentraciones de ADN (MPM: marcador de peso molecular, C+ y C- controles)

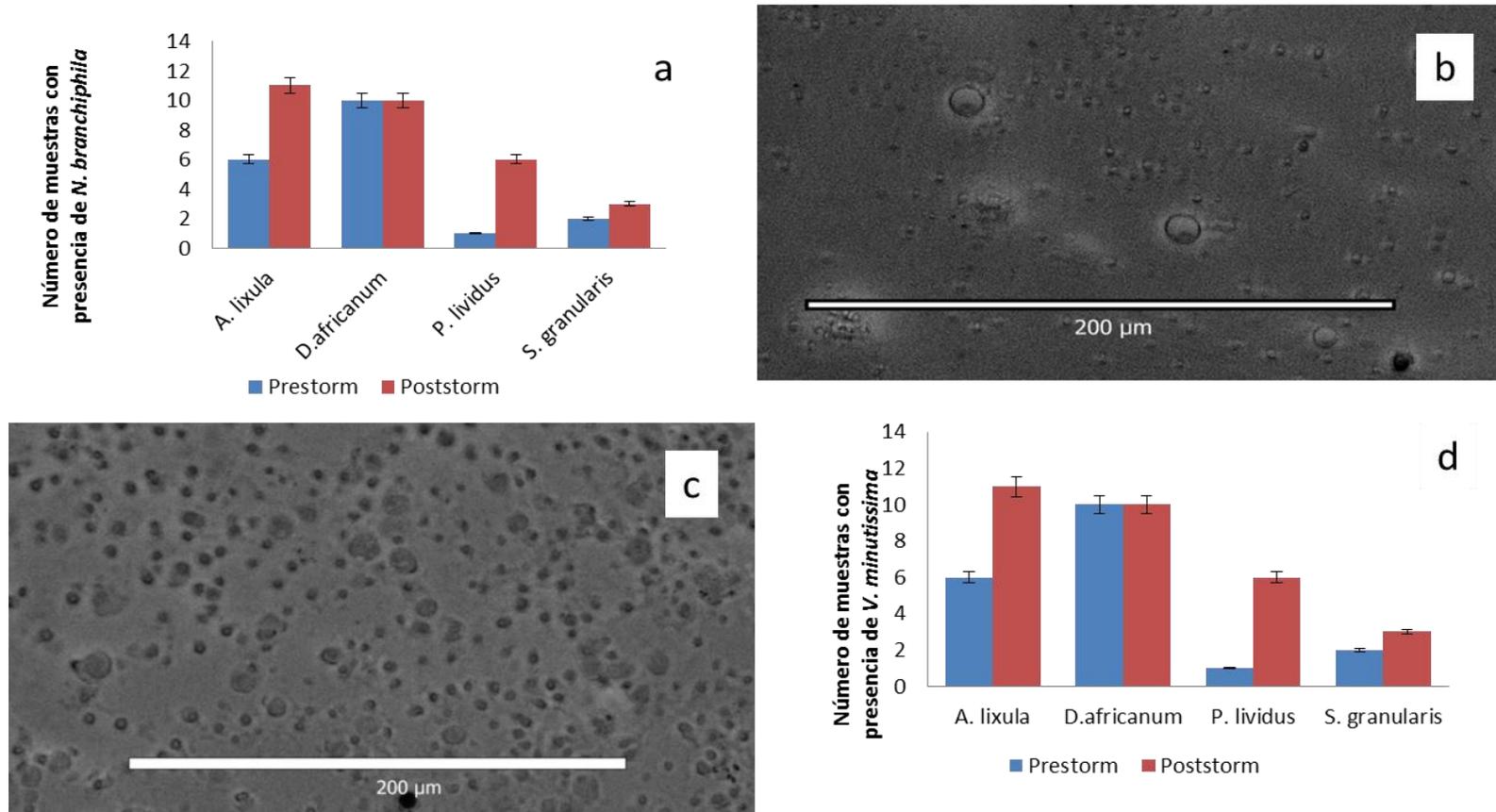


Figura 6. Amebas en erizos: a) Presencia de *Neoparamoeba branchiphila* en erizos antes y después de Filomena, barras de error con porcentaje 5%; b) Pseudoquistes de *N. branchiphila*; c) Trofozoítos de *N. branchiphila*; d) Presencia de *Vexillifera minutissima* en erizos antes y después de Filomena, barras de error con porcentaje 5%

Análisis estadísticos

Por medio de un análisis SIMPROF se obtuvo ordenación Cluster (Figura 7) a partir del cual se pudieron observar los agrupamientos en un MDS (Figura 8) Estos grupos están caracterizados por diferentes comunidades de patógenos. En general, en las especies de erizos estudiadas solo aparecen *V. minutissima* y *N. branchiphila*, mientras que para los sustratos agua, arena y alga se encuentran mayoritariamente las colonias de *Vibrio*. Adicionalmente, se encuentran observaciones atípicas que incluyen *Acanthamoeba* únicamente para agua, *Vahlkampfia* en una muestra de arena y *Vibrio* en cuatro erizos.

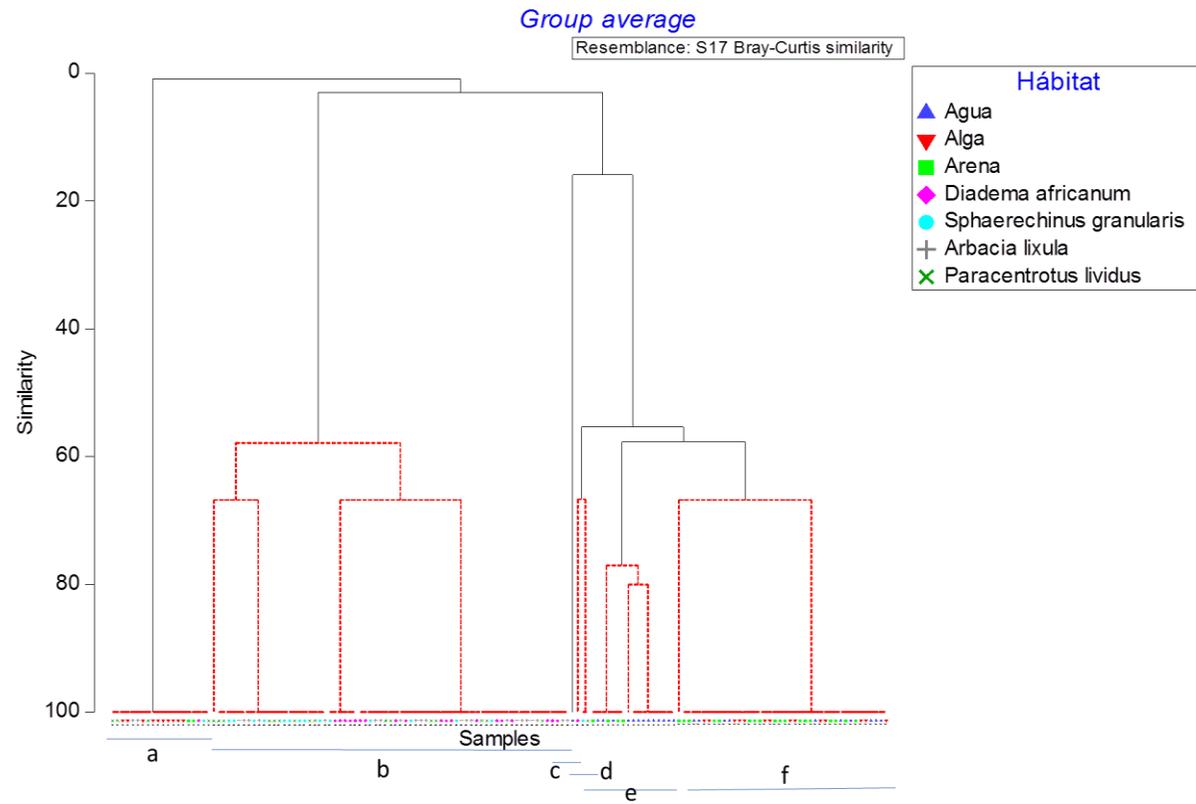


Figura 7. Ordenación cluster mostrando los grupos resultantes en rojo (letras) obtenidos mediante el análisis SIMPROF.

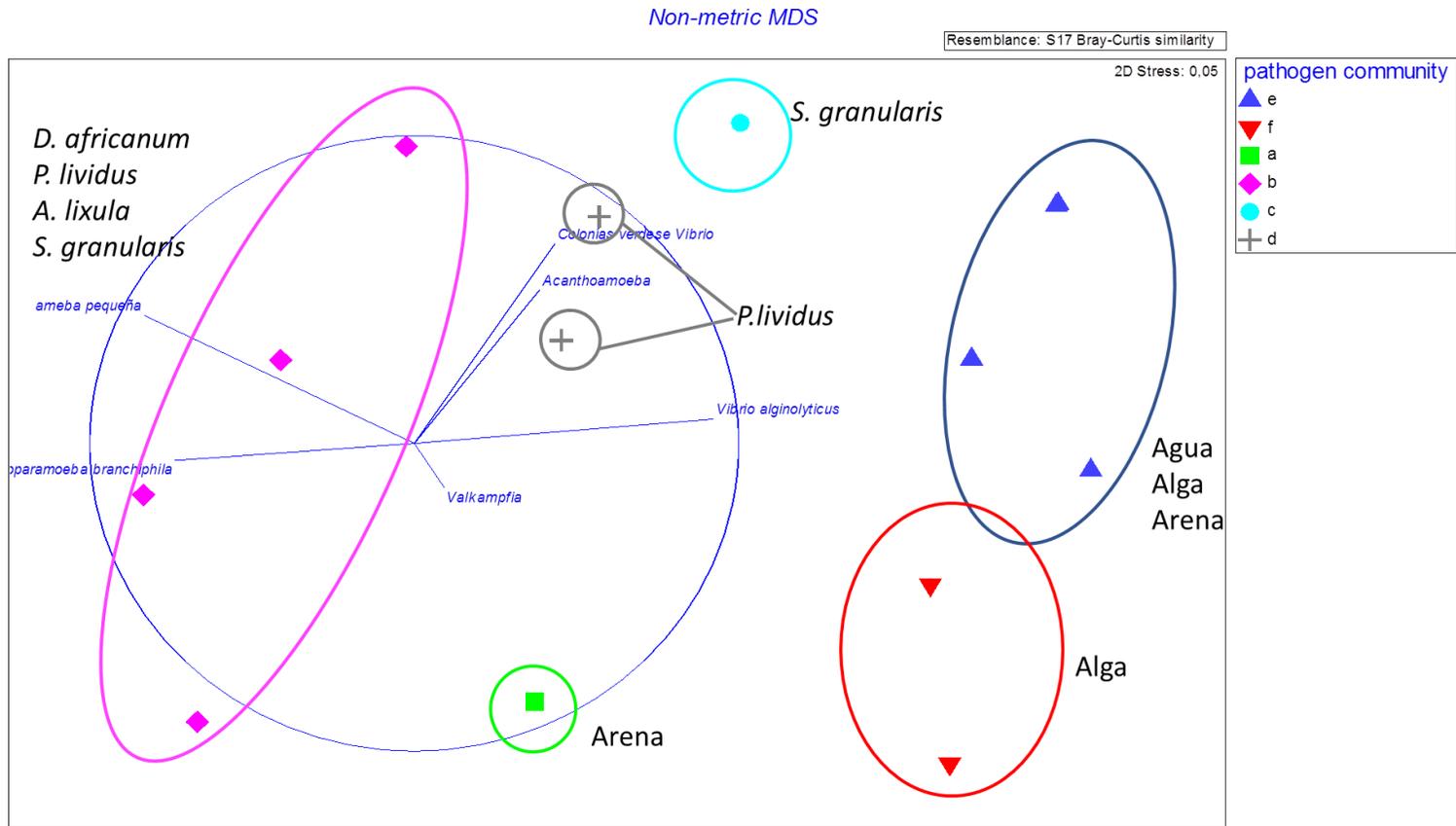


Figura 8. Ordenación MDS donde se muestran los grupos formados y las comunidades de patógenos dominantes.

El análisis por Permanova (Tabla 2) pone de manifiesto una interacción entre el factor pre y post tormenta con el factor sustrato-hospedadores. Es decir, que la borrasca Filomena produce una fluctuación significativa ($P=0,0002$) en la presencia de los patógenos a nivel de sustrato-hospedadores. En la Tabla 2b se puede observar que las diferencias significativas entre temporadas se dan específicamente en el sustrato Agua ($P=0,001$) y en los hospedadores *D. africanum* ($P=0,0124$) y *P. lividus* ($P=0,0174$). Observándose un aumento significativo en la comunidad de patógenos.

Tabla 2. a. Análisis Permanova de la comunidad de patógenos para los factores Temporada (Pre-Post tormenta), Sustrato/Hospedador y su interacción. **b.** Análisis PAIRWISE de la interacción entre los factores temporada (Pre-Post tormenta) por cada sustrato/hospedador.

a. Permanova	df	SS	MS	Pseudo-F	P(perm)
Temporada	1	3.3971	3.3971	10.784	0.0002
Sustrato/Hospedador	6	80.304	13.384	42.486	0.0002
Temporada X Sustrato/Hospedador	6	7.0664	1.1777	3.7386	0.0002
Residual	140	44.103	0.31502		
Total	153	135.42			

b. Pair-wise Tests	t	P(perm)	Unique perms
Agua	3.6142	0.001	20
Alga	0.8044	0.6867	5
Arena	1.1978	0.3315	5
<i>Diadema africanum</i>	2.4422	0.0124	24
<i>Sphaerechinus granularis</i>	0.95553	0.6305	6
<i>Arbacia lixula</i>	2.182	0.051	7
<i>Paracentrotus lividus</i>	2.1314	0.0174	52

DISCUSIÓN

En las muestras observadas se encontraron seis patógenos diferentes: *V. alginolyticus*, colonias verdes de *Vibrio* spp., *Acanthamoeba* sp, *Vahlkampfia* sp., *N. branchiphila* y *V. minutissima*. Se encontró que la presencia de estos patógenos es diferente dependiendo del sustrato/hospedador, por ejemplo *N. branchiphila* y *V. minutissima* se encuentran exclusivamente en erizos, mientras que *Vibrio* spp. suele estar presente en los sustratos agua, arena y algas. La Borrasca Filomena produjo cambios significativos en las comunidades de patógenos del sustrato agua y de los hospedadores *D. africanum* y *P. lividus*, aumentando su presencia en estos casos. Aunque se observaron cambios significativos en la presencia de patógenos en el sustrato agua y en los hospedadores *D. africanum* y *P. lividus*, durante el desarrollo de este estudio no se reportó ningún caso de mortalidad masiva, posiblemente porque aunque los temporales del mes de enero, especialmente la Borrasca Filomena, reportaron vientos de origen Sur y Sur occidente, estos no alcanzan los valores de anomalías reportados en (Hernández, et al., 2020).

En este estudio se observó que las comunidades de patógenos son diferentes dependiendo del tipo de sustrato/hospedador, como se mencionó previamente a excepción de la aparición de algunas colonias de *Vibrio* sp. en erizos, la mayoría de las muestras de agua, arena y algas tuvieron la presencia de *V. alginolyticus*, lo que podría significar un ambiente patógeno para los erizos ya que las bacterias del género *Vibrio* spp. se han asociado con el desarrollo de lesiones cutáneas en diferentes especies de equinoideos en el mundo (Becker, et al., 2008; Sweet, 2020). Específicamente *V. alginolyticus* fue la bacteria aislada de individuos enfermos durante la mortalidad de erizos presentada en 2009-2010 en el Atlántico Este (Clemente, et al., 2014) y con la que se cree existe una sinergia con *N. branchiphila* en el desarrollo de la enfermedad de la calva del erizo descrita para *Diadema africanum* en Canarias (Clemente, et al., 2014). Adicionalmente, también creemos importante señalar que en una muestra de agua se encontró *Vibrio harveyi*, una bacteria marina que se caracteriza por presentar colonias bioluminiscentes y que se ha asociado a enfermedades en vertebrados e invertebrados (Austin & Zhang, 2006).

Con respecto a las algas vale la pena mencionar que en varias muestras se observó presencia de *Vibrio* spp. pero fueron negativas para la presencia de amebas, esta situación puede deberse a la producción de metabolitos secundarios de las algas, los cuales pueden tener actividad antimicrobiana, antioxidante y citotóxica (Gamal, 2010; García-Davis, et al., 2018; Carroll, et al., 2019).

En cuanto a las amebas que se encontraron en las cuatro especies de erizos, únicamente se observó *V. minutissima*, ameba de origen marino que ha sido aislada de sedimentos del mar Báltico (Garstecki & Arndt, 2000) y *N. branchiphila* asociada con las mortalidades masivas de *D. africanum* en el Atlántico Este (Dyková, et al., 2011; Hernández, et al., 2020), comunidad patógena interesante ya que en branquias de Salmón Atlántico, se ha encontrado *Vexillifera* sp. acompañando *Neoparamoeba* sp. (Bermingham & Mulcahy, 2007). *N. branchiphila* no se observó en ninguna muestra de agua, arena o algas, lo que podría sugerir que la ameba no tiene una población establecida en ninguno de los puntos estudiados, lo que no descarta un proceso local de mezcla vertical que promueva la dispersión de patógenos una vez estos son introducidos por la advección horizontal provocada por tormentas, posiblemente de forma similar a lo que se observa en Nueva Escocia con *P. invadens* (Feehan, et al., 2016).

Además de estas dos comunidades que se observan con mayor claridad en el gráfico de MDS, es importante mencionar a la ameba *Acanthamoeba* sp. encontrada únicamente en muestras de agua, la cual es un parasito oportunista de vida libre distribuido ampliamente en el mundo y puede encontrarse en diversos tipos de ambientes como cuerpos de agua dulce, agua de mar, aire y varios tipos de suelos (Lorenzo-Morales, et al., 2005a). En Canarias, ha sido aislada previamente de diferentes muestras de agua de mar (Lorenzo-Morales, et al., 2005b).

En cuanto a las observaciones atípicas en las agrupaciones del análisis SIMPROF, en una muestra de arena antes de la Borrasca se encontraron quistes de *Vahlkampfia* sp. género asociado con infecciones en humanos y que puede encontrarse en variedad de ambientes acuáticos y terrestres (De Jonckheere, 2006; Reyes-Batlle, et al., 2021). También se dio crecimiento de *Vibrio* spp. en el fluido celómico de erizos, lo que podría darse como resultado de una pobre calidad del agua del ambiente (Martony, et al., 2018), tal como se

observó en las muestras de agua, que presentaron un aumento significativo en la comunidad de patógenos.

El análisis de la comunidad de patógenos por PERMANOVA indicó la existencia de una interacción entre las fluctuaciones entre los factores temporada y sustrato/hospedador, y estas son comprobadas mediante un análisis por pares que permitió identificar cambios significativos en la presencia de patógenos después de la tormenta para las especies *P. lividus* y *D. africanum* y para el sustrato agua en el cual se presentó un aumento del 51% tras el paso de la borrasca, probablemente por la mezcla vertical de sedimentos generada por el oleaje.

Aunque se presentaron cambios significativos en la presencia de patógenos después de la tormenta para las especies *P. lividus* y *D. africanum*, la presencia de *N. branchiphila* de manera continua en individuos de *D. africanum* en ambas temporadas podría indicar que la especie actúa como reservorio de la ameba. En Nueva Escocia, por ejemplo, se ha observado que individuos de *S. droebachiensis* que se recuperaron de la enfermedad cuando experimentalmente se redujo la temperatura al umbral de infección, desarrollaron nuevamente la enfermedad cuando la temperatura aumentó a 18°C (Scheibling & Stephenson, 1984; Feehan, et al., 2012), lo que hace pensar que el patógeno *Paramoeba invadens* (Jones, 1985; Jones & Scheibling, 1985; Feehan, et al., 2013) siguió alojado en los erizos durante algún tiempo. En nuestro caso no hay una clara correlación de la temperatura de la superficie con los eventos de mortalidad (Hernández, et al., 2020), pero eso no implica que *N. branchiphila* no se encuentre en estado de latencia en nuestras muestras o que la cantidad no sea suficiente para que se desarrolle la enfermedad, puesto que se ha visto también que en *S. droebachiensis* la incidencia de la infección por exposición a *P. invadens* es dependiente de la dosis (Jellet, et al., 1989), o que la interacción con un tercer o más patógenos sea necesaria.

La presencia de *N. branchiphila* en los erizos también podría estar relacionada con episodios recurrentes de mortalidades que han ido introduciendo al patógeno en las costas de Tenerife, tal como se describen (Feehan, et al., 2016) para las costas de Nueva Escocia y que posiblemente los individuos que han sobrevivido a estas mortalidades presenten cierta resistencia a la infección, (Scheibling, et al., 2010) como también se ha hipotetizado para *D. antillarum* en el Caribe (Beck, et al., 2014; Lessios, 2016). O quizás por la pérdida de virulencia que pueden presentar las especies del género *Neoparamoeba* spp. (Dyková, et al.,

2000) estos se han mantenido en individuos de erizos pero no producen los síntomas de la enfermedad. Debido a que en este estudio no se presentó un evento de mortalidad, los datos no permiten extrapolar ciertos procesos, pero expanden el panorama de investigación a nuevas preguntas. Ninguno de los erizos observados presentó síntomas de la enfermedad y aunque en Canarias solo se había observado *N. branchiphila* en erizos moribundos (Dyková, et al., 2011), esta ameba había sido previamente aislada de individuos sanos de los erizos de mar *P. lividus* y *Heliocidaris erythrogramma* (Dyková, et al., 2007).

Con respecto a los patógenos observados vale la pena comentar que una de las cepas aisladas de *Acanthamoeba* sp. la cual se identificó por la forma irregular de los trofozoítos y los quistes que tienen doble pared con forma hexagonal o de estrella (Lorenzo-Morales, et al., 2005b), fue secuenciada e identificada como genotipo T4, el cual suele encontrarse ampliamente distribuida en ambientes compartidos con humanos y se ha asociado a diversas patologías tanto en humanos como en algunos animales (Martinez, 1991; Macivera, et al., 2013). A pesar de que no se encontraron reportes que asocien *Acanthamoeba* spp. como patógeno en erizos (Tajimaa, et al., 2007; Becker, et al., 2008; Wang, et al., 2013), *Acanthamoeba* spp. es parte de la comunidad patógena del agua la cual junto con *Vibrio* spp. presentó cambios con el paso de la borrasca, lo que demuestra que efectivamente los eventos de tormenta influyen en la propagación de patógenos (Gizzi, et al., 2020).

Si bien la identificación de patógenos en el medio marino es tarea difícil, el trabajo con Amebas de Vida Libre implica varios retos que dificultan en mayor medida la investigación en este grupo. En primer lugar, debe tenerse en cuenta que las amebas son muy diversas y tienen distribución cosmopolita, pueden aislarse de casi cualquier entorno y tienen la capacidad de infectar diferentes animales. Al tener un ciclo de vida con dos etapas, los estudios morfológicos están basados en la identificación de trofozoítos (etapa de alimentación) y quistes (inactividad metabólica) (Walochnik, 2018). La observación de estos suele requerir horas de experiencia frente a un microscopio, sin contar también con que muchas veces al usar medios de agar el enfoque de la imagen suele ser complicado. La observación de quistes es ampliamente utilizada en la identificación de las amebas, sin embargo, muchas veces no está respaldada por datos moleculares (Walochnik, 2018). Aquí se encuentra otra de las dificultades, cuando se trabaja con amebas marinas, se requiere gran cantidad de células para la extracción de ADN y muchas veces la obtención y el

mantenimiento de cultivos axénicos es complicado pues al aislarla de su medio natural, la ameba suele venir acompañada de bacterias (Nowak & Archibald, 2018). En algunos casos es importante considerar la relación simbiótica entre la ameba y la bacteria, pues se ha reportado la presencia intracelular de *Vibrio* spp. en *N. perurans* y aunque se desconoce el tipo de relación que hay, se vislumbran otras formas de manejar los cultivos (Mac Phail, et al., 2020). Asimismo, la disponibilidad de datos sobre marcadores moleculares y la disponibilidad de cepas aisladas de invertebrados almacenadas en colecciones es muy poca (Dyková, et al., 2011; Dyková, et al., 2007) lo que dificulta aún más el trabajo molecular. Además, el hecho de utilizar un agar generalista facilita el crecimiento no solo de bacterias sino de hongos que se encuentren asociados al medio donde se aísla la ameba, por lo que el seguimiento y mantenimiento debe ser constante y que en el caso de este estudio en ocasiones fue difícil por la actual situación de pandemia. En los medios de cultivos se encontraron varios pseudoquistes de *Neoparamoeba* sp. los cuales surgen como respuesta al estrés osmótico generado por los medios de cultivo (Lima, et al., 2017), por lo que se recomendaría que los medios de cultivo se realicen con agua de mar y en oscuridad.

El estudio de los agentes causantes de los brotes de las enfermedades en el medio marino suele ser complicado debido a las dificultades para detectar los patógenos potenciales en los tejidos del hospedador que están rodeados por agua (Feehan , et al., 2013), la sola presencia de un patógeno no implica el desarrollo o identificación de la enfermedad por lo que hacen faltan estudios histológicos y de comprobación mediante los postulados de Koch's (Martony , et al., 2018). Quizás ver las enfermedades del medio marino como la interacción de varios agentes permita comprender mejor la enfermedad (Sweet, 2020). En este sentido y con respecto a las cuatro muestras del celoma de erizos, dos en agosto y dos en enero, en las que dio crecimiento de colonias de *V. alginolyticus*, solo una de estas muestras tenía la presencia de la ameba. Aun así ninguno de los individuos presentaban síntomas de la enfermedad al momento de su captura, lo cual puede presentarse en algunos casos (Clemente, et al., 2014). Pero hace difícil la valoración de la influencia de ambos patógenos en la enfermedad. La presencia de bacterias en el fluido celómico de erizos podría ser resultado también de una pobre calidad del agua del ambiente (Martony , et al., 2018) tal como se observó en las muestras de agua donde la comunidad patógena presentó un cambio significativo con la borrasca Filomena. De igual forma, la presencia de *N. branchiphila* en individuos sanos se

observó y podría indicar que *N. branchiphila* no es el único desencadenante de la enfermedad y que por lo tanto debe haber otros agentes involucrados en el desarrollo de esta (Dyková, et al., 2011; Clemente, et al., 2014; Hernández, et al., 2020). Quizás en próximos estudios valga la pena verificar la actividad patogénica de *V. minutissima* ya que al menos en peces el género *Vexillifera* spp. no sólo ha demostrado capacidad para colonizar branquias, sino que ha demostrado competencia patógena (Bermingham & Mulcahy, 2007). Vale la pena mencionar que *N. branchiphila* fue aislada por primera vez de branquias de peces (Dyková, et al., 2005), por lo que podría evaluarse la presencia de *N. branchiphila* y *V. minutissima* en las branquias de peces en las zonas de estudio. Así mismo, que se evalué la enfermedad del erizo utilizando los postulados ecológicos de Koch's (Sweet, 2020) donde se evalúe la interacción de más de dos patógenos, así como la existencia de un hospedador intermediario.

Para finalizar, el hecho de que la temporada de tormentas de invierno, incluida la borrasca Filomena, esté relacionada con un cambio positivo en la presencia de patógenos, confirma que los cambios ambientales asociados al calentamiento global podrían estar beneficiando la presencia de patógenos de erizos de mar claves en la estructura y composición de los ecosistemas rocosos en Canarias (Hernández, et al., 2008). Ante esta situación se da con urgencia la necesidad de realizar un seguimiento continuo de los patógenos en el medio marino de Canarias en paralelo con el seguimiento de los fenómenos climáticos que puedan beneficiarlos como periodos tormentosos, aumento de la temperatura, entre otros. En un contexto de cambio climático donde las actividades antrópicas afectan negativamente los ecosistemas, entender las dinámicas de las enfermedades en organismos marinos y el papel de estas como inductores de cambios en los ecosistemas es fundamental para el desarrollo de planes de manejo y propuestas de conservación.

CONCLUSIONES

- a) Las comunidades de patógenos son diferentes dependiendo del tipo de sustrato-hospedador. Amebas pequeñas y *Neoparamoeba branchiphila* aparecen únicamente en erizos, mientras que en agua, arena y alga es más común la presencia de *Vibrios* spp.
- b) Existe una interacción entre la temporada de invierno, el sustrato-hospedador y la Borrasca Filomena, la cual produce cambios significativos en la presencia de

patógenos en el sustrato agua y en los hospedadores *Diadema africanum* y *Paracetrotus lividus*.

- c) La presencia de *Neoparamoeba branchiphila* fue exclusiva del celoma de las cuatro especies de erizos evaluadas. *Vibrio alginolyticus* se encontró mayoritariamente en agua, arena, algas y solo se observó puntualmente en 3 muestras de erizos.
- d) En los sustratos y hospedadores estudiados no solo se encontraron las dos especies de interés, sino que además, asociado exclusivamente al agua se encontró *Acanthamoeba* sp. En muestras de agua, arena y dos erizos se observaron colonias verdes de *Vibrio*. En erizos se observó *Vexillifera minutissima* muchas veces acompañando a *Neoparamoeba branchiphila* y en una muestra de Arena *Vahlkampfia* sp.
- e) La presencia constante de *Neoparamoeba branchiphila* en *Diadema africanum* refleja que estos erizos son reservorio de la ameba.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría agradecer a la Fundación Carolina y a la Universidad de la Laguna, por brindarme la oportunidad de continuar con mi desarrollo personal y profesional en un lugar privilegiado como Tenerife, estoy segura que todo lo aprendido aquí me dará más y mejores oportunidades en el futuro y regresaré a mi país con los nuevos enfoques y perspectivas que buscaba antes de Venir.

Ahora bien, gracias principalmente a mis tutores Jacob Lorenzo Morales y José Carlos Hernández por ser personas capaces de transmitir tanto amor y pasión por lo que hacen, nunca en la vida imaginé que iba a estudiar los patógenos asociados a las enfermedades de erizos y mucho menos que las amebas me iban a interesar tanto como ahora. Gracias por la paciencia, por responder mis miles de preguntas, por la disposición y acompañamiento. Gracias por brindarme herramientas en campo, en laboratorio y en uno de los procesos que suelen considerarse más difíciles pero gratificantes, la escritura.

Gracias al grupo de *Ecología de Comunidades Marinas y Conservación de la ULL*, a José Carlos, a Sara González, a Estefanía González y a María Camila Medina por su apoyo en la

recolección de muestras en campo, especialmente por soportar el frío del agua en los días fríos. Gracias a todo el equipo del laboratorio 11 y 12 del *Instituto Universitario de Enfermedades Tropicales y Salud Pública de Canarias*, quienes desde el principio me apoyaron en la preparación, siembra y seguimiento de los cultivos. A Jacob por responderme dudas y a María por su paciencia, enseñanza y apoyo constante en todo el trabajo de laboratorio, para mí una inspiración como investigadora.

Gracias a Stella Forero y Helman Salazar por ser mi más grande inspiración y por su apoyo incondicional para cumplir mis sueños y metas, sin ellos no sería lo que soy. A mi familia y amigos que en la distancia siempre han estado presentes y son la fuerza que muchas veces se requiere para continuar trabajando por mejorar el mundo. A Ricardo por sus palabras de aliento, su paciencia y por leer varias veces mis escritos. A todos ellos dedico todos mis esfuerzos y logros.

BIBLIOGRAFÍA

AEMET, 2021. *Informe sobre el episodio meteorológico de fuertes nevadas y precipitaciones ocasionadas por Borrasca Filomena y Posterior Ola de Frío*. [En línea]

http://www.aemet.es/documentos/es/conocerlas/recursos_en_linea/publicaciones_y_estudios/estudios/Informe_episodio_filomena.pdf

[Último acceso: 09 03 2021].

Anderson, M. J., Gorley, R. N. & Clarke, K. R., 2008. *PERMANOVA+ for PRIMER: Guide to software and Statistical Methods*. Plymouth, UK: PRIMER-E.

Austin, B. & Zhang, X. H., 2006. *Vibrio harveyi*: a significant pathogen of marinevertebrates and invertebrates. *Letters in Applied Microbiology*, 43(2), pp. 119-124.

Becker, P. T., Egea, E. & Eeckhaut, I., 2008. Characterization of bacterial communities associated with the bald sea urchin disease of the echinoid *Paracentrotus lividus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, Volumen 98, pp. 136-147.

Beck, G., Miller, R. & Ebersole, J., 2014. Mass mortality and slow recovery of *Diadema antillarum*: Could compromised immunity be a factor?. *Marine Biology*, Volumen 161, pp. 1001-1013.

Bermingham, M. L. & Mulcahy, M. F., 2007. *Neoparamoeba* sp. and other protozoans on the gills of Atlantic salmon *Salmo salar* smolts in seawater. *Disease of Aquatic Organisms*, Volumen 76, p. 231–240.

Carroll, A. y otros, 2019. Marine natural products. Nat. Prod. Rep.. *Natural Products Reports*, Volumen 36, pp. 122-173.

Clarke, K. R., Gorley, R. N., Somerfield, P. J. & Warwick, R. M., 2014. *Change in marine communities: an approach to statistical analysis and interpretation*. 3rd ed. Plymouth, UK: PRIMER-E.

Clemente, S. y otros, 2014. Sea Urchin *Diadema africanum* mass mortality in the subtropical eastern Atlantic: role of waterborne bacteria in a warming ocean. *Marine Ecology Progress Series*, 506(1-14).

Corry, J. E. L., Curtis, G. W. & Baird, R. M. edits., 1995. Thiosulphate citrate Bile-salt sucrose (TCBS) agar. En: *Progress in Industrial Microbiology*. s.l.:Elsevier, pp. 450-452.

De Jonckheere, J. F., 2006. De Jonckheere J. F. Isolation and molecular identification of vahlkampfiid amoebae from an island (Tenerife, Spain). *Acta Protozoologica*, Volumen 45, pp. 91-96.

Dyková, I., Figueras, A. & Peric, Z., 2000. Dis Aquat Org 43: 217–223, 2000. *Disease of Aquatic Organisms* 43: 217–223, 2000, Volumen 43, p. 217–223.

Dyková, I., Kostka, M. & Pecková, H., 2011. Three New Species of the Amoebozoan Genus *Vexillifera* Schaeffer, 1926. *Acta Protozoologica*, Volumen 50, pp. 57-65.

Dyková, I. y otros, 2011. *Neoparamoeba branchiphila* infections in moribund sea urchins *Diadema* aff. *antillarum* in Tenerife, Canary Islands, Spain. *DISEASES OF AQUATIC ORGANISMS*, Volumen 95, pp. 225-231.

Dyková, I. y otros, 2005. *Neoparamoeba branchiphila* n. sp., and related species of the genus *Neoparamoeba* Page, 1987: morphological and molecular characterization of selected strains. *Journal of Fish Diseases*, Volumen 28, p. 49–64.

- Dyková, I. y otros, 2007. Phylogeny of Neoparamoeba strains isolated from marine fish and invertebrates as inferred from SSU rDNA sequences. *Diseases of Aquatic Organisms*, Volumen 74, pp. 57-65.
- Feehan, C. y otros, 2013. Validating the identity of *Paramoeba invadens*, the causative agent of recurrent mass mortality of sea urchins in Nova Scotia, Canada. *Diseases of Aquatic organisms*, Volumen 103, pp. 209-227.
- Feehan, C. J., Scheibling, R. E., Brown, M. S. & Thompson, K. R., 2016. Marine epizootics linked to storms: Mechanisms of pathogen introduction and persistence inferred from coupled physical and biological time-series. *Limnology and Oceanography*, Volumen 61, p. 316–329.
- Feehan, C., Scheibling, R. & Lauzon-Guay, J.-S., 2012. An outbreak of sea urchin disease associated with a recent hurricane: Support for the "killer storm hypothesis" on a local scale. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, Volumen 413, pp. 159-168.
- Fernandez, C. y otros, 2006. Effect of an exceptional rainfall event on the sea urchin (*Paracentrotus lividus*) stock and seagrass distribution in a Mediterranean coastal lagoon. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, Volumen 68, pp. 259-270.
- Gamal, A. A. E., 2010. Biological importance of marine algae. *Saudi Pharmaceutical Journal*, Volumen 18, pp. 1-25.
- García-Davis, S. y otros, 2018. Anti-Acanthamoeba Activity of Brominated Sesquiterpenes from *Laurencia johnstonii*. *Marine Drugs*, Volumen 16, p. 443.
- Garstecki, T. & Arndt, H., 2000. Seasonal abundances and community structure of benthic rhizopods in shallow lagoons of the southern Baltic Sea. *European Journal of Protistology*, 36(1), pp. 103-115.
- Gizzi, F. y otros, 2020. Before and after a disease outbreak: Tracking a keystone species recovery from a mass mortality event. *Marine Environmental Research*, 156(104905).
- Harvell, C. D. y otros, 1999. Emerging Marine Diseases Climate Links and Anthropogenic Factors. *Science*, 285(5433), pp. 1505-1510.
- Harvell, C. D. y otros, 2002. Climate Warming and Disease Risks for Terrestrial and Marine Biota. *Science*, 296(5576), pp. 2158-2162.
- Hernández, J. C., Clemente, S., Sangil, C. & Brito, A., 2008. The key role of the sea urchin *Diadema antillarum* in controlling macroalgae assemblages throughout the Canary Islands (eastern subtropical Atlantic): an spatio-temporal approach. *Marine Environmental Research*, 66(2), p. 259.
- Hernández, J. C., Sangil, C. & Lorenzo-Morales, J., 2020. Uncommon southwest swells trigger sea urchin disease outbreaks in Eastern Atlantic archipelagos. *Ecology and Evolution*, Volumen 00, pp. 1-8.
- Jellet, J. F., Novitsky, J. A. & Cantley, J. A., 1989. Non-occurrence of free-living *Paramoeba invadens* in water and sediments of Halifax Harbour, Nova Scotia, Canada. *Marine Ecology Progress Series*, Volumen 56, pp. 205-209.
- Jones, G., 1985. *Paramoeba invadens* n.sp. (Amoebida, Paramoebidae); a Pathogenic amoeba from the Sea Urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis*, in Eastern Canada. *Journal of Protozoology*, 32(4), pp. 564-569.
- Jones, G. M. & Scheibling, R. E., 1985. *Paramoeba* sp. (Amoebida, Paramoebidae) as the possible causative agent of sea urchin mass mortality in Nova Scotia. *Journal of Parasitology*, Volumen 71, p. 559–565.

- Lafferty, K. D., Porter, J. W. & Ford, S., 2004. Are Diseases Increasing In the Ocean?. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, Volumen 35, pp. 31-54.
- Lessios , H. A., Robertson , D. R. & Cubit , J. D., 1984 . Spread of diadema mass mortality through the Caribbean. *Science*, 226(4672), pp. 335-7..
- Lessios, H., 2016. The Great Diadema antillarum Die-Off: 30 Years Later. *The Annual Review of Marine Science*, Volumen 8, pp. 1.1-1.17.
- Lima, P. C., Taylor, R. S. & Cook, M., 2017. Pseudocyst formation in the marine parasitic amoeba *Neoparamoeba perurans*: a short-term survival strategy to abrupt salinity variation. *Journal of fish diseases*, 40(8), pp. 1109-1113.
- Lorenzo-Morales , J. y otros, 2005b. Isolation and identification of pathogenic *Acanthamoeba* strains in Tenerife, Canary Islands, Spain from water sources. *Parasitology Reserach*, Volumen 95, pp. 273-277.
- Lorenzo-Morales, J. y otros, 2005a. Pathogenic *Acanthamoeba* strains from water sources in Jamaica, West Indies.. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 99(8), pp. 751-758.
- Mac Phail, D. y otros, 2020. *Vibrio* species are predominantly intracellular within cultures of *Neoparamoeba perurans*, causative agent of Amoebic Gill Disease(AGD). *Aquaculture*, pp. 1-25.
- Macivera, S. K., Asifa, M., Simmena, M. W. & Lorenzo-Morales, J., 2013. A systematic analysis of *Acanthamoeba* genotype frequency correlated with source and pathogenicity: T4 is confirmed as a pathogen-rich genotype. *European Journal of Protistology*, Volumen 49, pp. 217-221.
- Maes , P. & Jangoux , M., 1984. The bald-sea-urchin disease: a biopathological approach. *Helgolander Meeresunters* , Volumen 37, pp. 217-224.
- Martinez, A. J., 1991. Infection of the Central Nervous System Due to *Acanthamoeba*. *Reviews of Infectious Diseases*, Volumen 13, p. S399–S402.
- Martony , M. y otros, 2018. Establishing a Diagnostic Technique for Coelomocentesis in the Long-Spined Sea Urchin *Diadema antillarum*. *Journal of Aquatic Animal Health* , 30(4), pp. 325-331.
- Nowak, B. F. & Archibald, J. M., 2018. Opportunistic but Lethal: The Mystery of Paramoebae. *Trends in Parasitology* , 34(5), pp. 404-419.
- Reyes-Battle, M. y otros, 2021. Free living amoebae isolation in irrigation waters and soils of an insular arid agroecosystem. *Science of The Total Environment*, 753(20), p. 141833.
- Rodríguez , A., Hernández , J. C., Clemente , S. & Coppard, S. E., 2013. A new species of *Diadema* (Echinodermata: Echinoidea: Diadematidae) from the eastern Atlantic Ocean and a neotype designation of *Diadema antillarum* (Philippi, 1845). *Zootaxa* , 3636(1), pp. 144-170.
- Scheibling , R. E. & Stephenson , R. L., 1984. Mass mortality of *Strongylocentrotus droebachiensis* (Echinodermata: Echinoidea) off Nova Scotia, Canada. *Marine Biology* , Volumen 78, pp. 153-164.
- Scheibling , R. & Lauzon-Guay, J.-S., 2010. Killer storms: North Atlantic hurricanes and disease outbreaks in sea urchins. *Limnology and Oceanography* , 55(6), pp. 2331-2338.
- Scheibling, R., Feehan, C. & Lauzon-Guay, J. S., 2010. Disease outbreaks associated with recent hurricanes cause mass mortality of sea urchin in Nova Scotia. *Marine Ecology Progress Series*, Volumen 408, p. 109–116.

Sweet, M., 2020. Sea urchin diseases: Effects from individuals to ecosystems. En: J. M. Lawrence, ed. *Sea Urchins: Biology and Ecology*. s.l.:Elsevier B.V.

Tajimaa, K., Machado Cunha da Silva, J. R. & Lawrence, J. M., 2007. Disease in Sea Urchins. En: J. M. Lawrence, ed. *Edible Sea Urchins: Biology and Ecology*. s.l.:Elsevier Science B.V., pp. 167-182.

Trowbridge, C. D. y otros, 2019. No "Silver bullet": Multiple factors control population dynamics of European purple sea urchins in Lough Hyne Marine Reserve, Ireland. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 226(106271).

Walochnik, J., 2018. Amoebae. En: M. Florin-Christensen & L. Schnittger, edits. *Parasitic Protozoa of Farm Animals and Pets*. Cham: Springer.

Wang, Y. N., Chang, Y. Q. & Lawrence, J. M., 2013. Disease in Sea Urchins. En: J. M. Lawrence, ed. *Sea Urchins: Biology and Ecology*. s.l.:Elsevier B.V., pp. 179-186.

Yanes, A., Marzol, M. V. & Romero, C., 2006. Characterization of sea storms along the coast of Tenerife, the Canary Islands. *Journal of Coastal Research SI 48 124-128*, Volumen SI48, pp. 124-128.

<http://www.puertos.es/es-es/oceanografia/Paginas/portus.aspx> consultada el: 3 de marzo 2021