

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL: Estudiar aspectos taxonómicos y ecológicos de los digeneos que parasitan al molusco *Heleobia australis* (d'Orbigny 1835) en el estuario de Bahía Blanca.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- a) Identificar las formas larvales de los digeneos que parasitan al molusco *Heleobia australis* en el estuario de Bahía Blanca;
- b) Establecer los posibles hospedadores de los estadios restantes del ciclo de vida de los digeneos;
- c) Evaluar los efectos morfológicos que causan las larvas de digeneos y el ambiente en el hospedador;
- d) Describir las infracomunidades y las comunidades componentes de las especies parásitas a nivel del primer hospedador intermediario.

INTRODUCCIÓN GENERAL

El parasitismo es una interacción biológica entre organismos de diferentes especies en la que uno de los organismos, el parásito, se beneficia metabólicamente de otro, el hospedador. El parasitismo es la forma de vida más común sobre la tierra (Windsor, 1998).

Los digeneos (Platyhelminthes: Trematoda) son los metazoos parásitos más abundantes y comunes, después de los nematodos. Enfermedades conocidas a nivel mundial como fasciolosis, esquistosomiasis y otras enfermedades humanas y veterinarias, son producidas por éstos. Los digeneos se caracterizan por la alternancia de generaciones, normalmente con generaciones asexuales en moluscos y una generación sexual en vertebrados, raramente en invertebrados.

En el ciclo de vida típico de un digeneo, la larva ciliada de vida libre, el **miracidio**, se libera del huevo y penetra en el primer hospedador intermediario, que suele ser un gasterópodo (algunos sanguinícolas parasitan poliquetos como primer hospedador intermediario). En algunos casos, el huevo es ingerido directamente por el molusco, libera al miracidio en el intestino y éste penetra el epitelio intestinal. Luego se transforma en una estructura simple, en forma de saco, llamada **esporocisto**. Dentro de él, se forman asexualmente un gran número de embriones, que dan origen a **esporocistos hijos** o **redias**. Las redias presentan mayor grado de complejidad que los esporocistos ya que desarrollan, a diferencia de éstos, una faringe y un saco intestinal. A partir de sus células germinales, la redia o el esporocisto hijo desarrollan **cercarias** que normalmente emergen del molusco y nadan hasta penetrar en el próximo hospedador o enquistar en el sustrato (Schmidt y Roberts, 2000).

Aparentemente, existen comportamientos específicos desencadenados por el hospedador que ayudan al encuentro de la cercaria con el invertebrado o vertebrado en el que penetrará. La cercaria llega de este modo al segundo hospedador intermediario, que normalmente forma parte de una trama trófica que incluye al hospedador definitivo (Combes et al., 2002). Generalmente la cercaria está provista de estructuras que ayudan a la penetración, como glándulas o estilete u órgano de penetración (Komiya, 1965). En algunos casos

(Sanguinicolidae y Schistosomatidae), la cercaria penetra en el hospedador definitivo, desarrollando el adulto, pero en la mayoría de los digeneos la cercaria enquistada en el medio o en un segundo y hasta en un tercer hospedador intermediario, dando lugar al desarrollo de una **metacercaria**.

Finalmente, la metacercaria ingresa al hospedador definitivo cuando éste se alimenta del segundo o tercer hospedador intermediario. Gracias a las condiciones fisicoquímicas del estómago e intestino del vertebrado, la metacercaria desenquista y da lugar al **adulto**, que se reproduce sexualmente, produciendo huevos que se liberan con las heces o la orina (Schmidt y Roberts, 2000).

Debido a que los digeneos presentan generalmente mayor especificidad por sus hospedadores moluscos que por los vertebrados, probablemente se establecieron primero como parásitos de moluscos y luego de vertebrados (Pearson, 1972). Sin embargo esta hipótesis es menos parsimoniosa que la hipótesis de la adquisición de hospedadores vertebrados primero (Cribb et al., 2001).

La enorme variabilidad entre los ciclos de vida de digeneos posiblemente sea la clave del éxito de este grupo. A pesar de poseer ciclos de vida que involucran varios hospedadores y diferentes mecanismos de transmisión, los digeneos poseen estrategias adaptativas que facilitan este proceso: alta tasa de fecundidad de los adultos, reproducción asexual en el hospedador molusco, eficiencia en los mecanismos de detección del hospedador por parte de los miracidios y las cercarias, y el aumento de la susceptibilidad del segundo hospedador, inducida por el parásito, a ser consumido por el hospedador definitivo. Sin embargo, la abreviación del ciclo de vida es un carácter que ha surgido independientemente más de 20 veces en el grupo (Poulin y Cribb, 2002). Algunas especies de varias familias, incluida Microphallidae, eliminan el segundo hospedador intermediario. El hospedador definitivo se alimenta del único hospedador intermediario. Según Oliva y Huaquin (2000) los ciclos de vida abreviados son más comunes a mayores latitudes. Esto les permitiría a las

especies expandirse hacia aguas más frías reduciendo los estadios de vida libre y la dependencia a los hospedadores.

El conocimiento de los estadios larvales de digeneos es todavía escaso a nivel mundial. Dado que muchas especies de digeneos, se han descrito sólo a partir de su estadio adulto sin conocer su ciclo de vida, se corre el riesgo de no determinar correctamente una especie. Puede ocurrir que estadios adultos de diferentes especies no difieran significativamente y sí lo hagan sus estadios larvales, como es el caso de *Ascocotyle (Ascocotyle) secunda* Ostrowski de Núñez 2001 y *Ascocotyle (Ascocotyle) tertia* Ostrowski de Núñez 2001.

Existen varios estudios taxonómicos sobre estadios larvales de digeneos en ambientes marinos y estuariales de la Argentina (Graefe, 1968; Martorelli, 1986b; 1988; 1989a; 1990; 1991a; 1991b; Etchegoin, 1997; Etchegoin y Martorelli, 1997a; Martorelli y Cremonte, 1998; Martorelli y Morriconi, 1998; Cremonte, 1999; 2001; Cremonte et al., 2001; Cremonte, 2004; Alda y Martorelli, 2009). Sin embargo, al igual que en el resto del mundo, existen más trabajos relativos a los estadios adultos, parásitos de peces y aves (ver referencias en Kohn et al., 2007; Lunaschi et al., 2007).

Los aspectos ecológicos sobre la interacción entre digeneos larvales y sus hospedadores intermediarios se están estudiando desde hace varios años en América del Norte, Oceanía y Europa (Esch et al., 2010). En América del Sur, por el contrario, tales trabajos son escasos. En la Argentina, los estudios sobre parasitofauna de moluscos han sido mayoritariamente de índole taxonómica y sólo se han realizado estudios de algunos aspectos de la interacción entre larvas de digeneos y los gasterópodos de agua dulce *Drepanotrema* sp., *Biomphalaria occidentalis* Paraense 1981, *Biomphalaria peregrina* d'Orbigny 1835, *Potamolithus agapetus* Pilsbry 1911 y *Chilina dombeyana* (Bruguiere 1789) (Ostrowski de Núñez et al., 1991; Hamann et al., 1993; López Armengol y Martorelli, 1997; Flores y Semenas, 2008; Flores et al., 2010) y en los hidróbidos de la laguna costera de Mar Chiquita, *Heleobia conexa* (Gaillard 1974) y *H. australis* (Etchegoin, 1997; Merlo y Etchegoin, 2011; Merlo et al., 2010). Sin embargo, para el estuario de Bahía Blanca no existen aún trabajos publicados al respecto.

Caracterización del hospedador: *Heleobia australis* (d'Orbigny 1835)

Heleobia australis (Cochliopidae) es el único caracol hidróbido que habita en el estuario de Bahía Blanca (Elías et al., 2004). Esta especie tiene una amplia distribución geográfica, desde Río de Janeiro, Brasil, hasta San Antonio Oeste, Argentina (Gaillard y Castellanos, 1976), y es citada como un componente principal de las comunidades bentónicas de la costa Atlántica de Sudamérica (de Francesco e Isla, 2003).

Según Wilke et al. (2001), el género *Heleobia* Stimpson 1865 pertenece a la familia Cochliopidae Tryon 1866. Sin embargo, este género fue incluido durante muchos años dentro de la familia Hydrobiidae Troschel 1857 y existen algunos autores que aún lo hacen (Liu et al., 2001). Ambas familias pertenecen a la superfamilia Rissoidae Gray 1847 y se los conoce comúnmente como hidróbidos. Los hidróbidos han sido muy estudiados ya que están ampliamente distribuidos en estuarios y lagunas costeras de Europa y América (Hershler y Davis, 1980; Bodon et al., 1999; De Francesco e Isla, 2003; 2004a; 2004b; Martin, 2008). En Sudamérica, todos los hidróbidos estuariales conocidos pertenecen al género *Heleobia*, anteriormente conocido como *Littoridina* Souleyet 1852 (Gaillard y Castellanos, 1976). Davis et al. (1982) trasladaron todas las especies del género *Littoridina* al género *Heleobia*.

Los hidróbidos han sido ampliamente citados mundialmente como hospedadores intermediarios de digeneos (Deblock, 1980; Galaktionov y Skirnisson, 2007). En Argentina, se describieron varios parásitos de hidróbidos del género *Heleobia* (ver referencias en Tabla II del Capítulo I), incluyendo cercarias causantes de dermatitis humanas (Szidat, 1958). Varios parásitos que infectan hidróbidos utilizan crustáceos y vertebrados de importancia económica y ecológica como segundos hospedadores intermediarios y definitivos.

El ciclo de vida del primer hospedador intermediario es uno de los tantos factores que influyen sobre la distribución temporal de la comunidad larval de digeneos (Kube et al., 2002a). En el estuario de Bahía Blanca, no existen estudios sobre la dinámica poblacional o la historia de vida de *H. australis*. Sin embargo,

en la laguna costera tropical Imboassica, Brasil, el reclutamiento de *H. australis* ocurre en el otoño (mayo-junio) (Figueiredo-Barros et al., 2006). El reclutamiento de *H. australis* en la laguna costera de Mar Chiquita, Argentina, ocurre en el verano, de enero a marzo (de Francesco e Isla, 2004a). La nueva cohorte alcanza el tamaño de sub-adulto en aproximadamente tres meses y el tamaño promedio de los caracoles no varía considerablemente durante el resto del año. De Francesco e Isla (2004a) determinaron que el ciclo de vida de *H. australis* en la laguna costera de Mar Chiquita es de un año.

Caracterización del estuario de Bahía Blanca

El estuario de Blanca Bahía, ubicado en el sudoeste de la Provincia de Buenos Aires (Fig. 1), es el segundo estuario más grande en Argentina después del Río de la Plata.

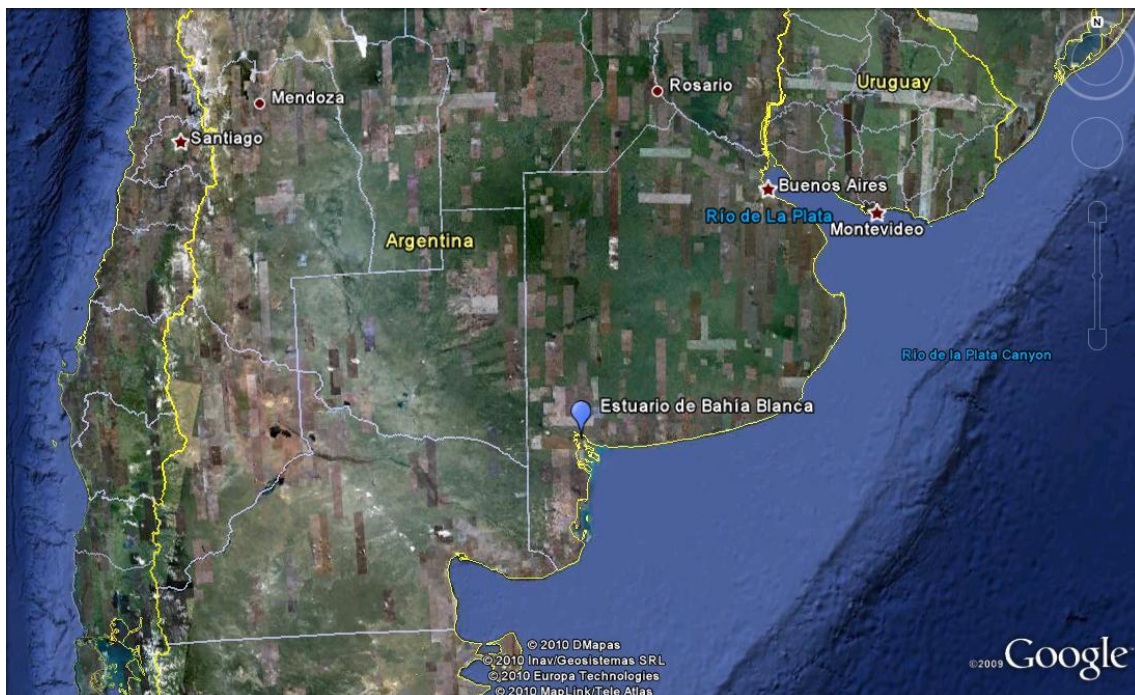


Figura 1. Ubicación del estuario de Bahía Blanca, Provincia de Buenos Aires, Argentina.

Sus dos ciudades principales, Bahía Blanca y Punta Alta, están localizadas cerca de la orilla este del estuario (Fig. 2). Ambas ciudades liberan efluentes de aguas residuales domésticas directamente al estuario. A lo largo de la misma orilla se encuentran varias terminales portuarias que exportan granos, derivados de petróleo y fertilizantes químicos. El canal principal de navegación es dragado desde la desembocadura hasta Puerto Galván.

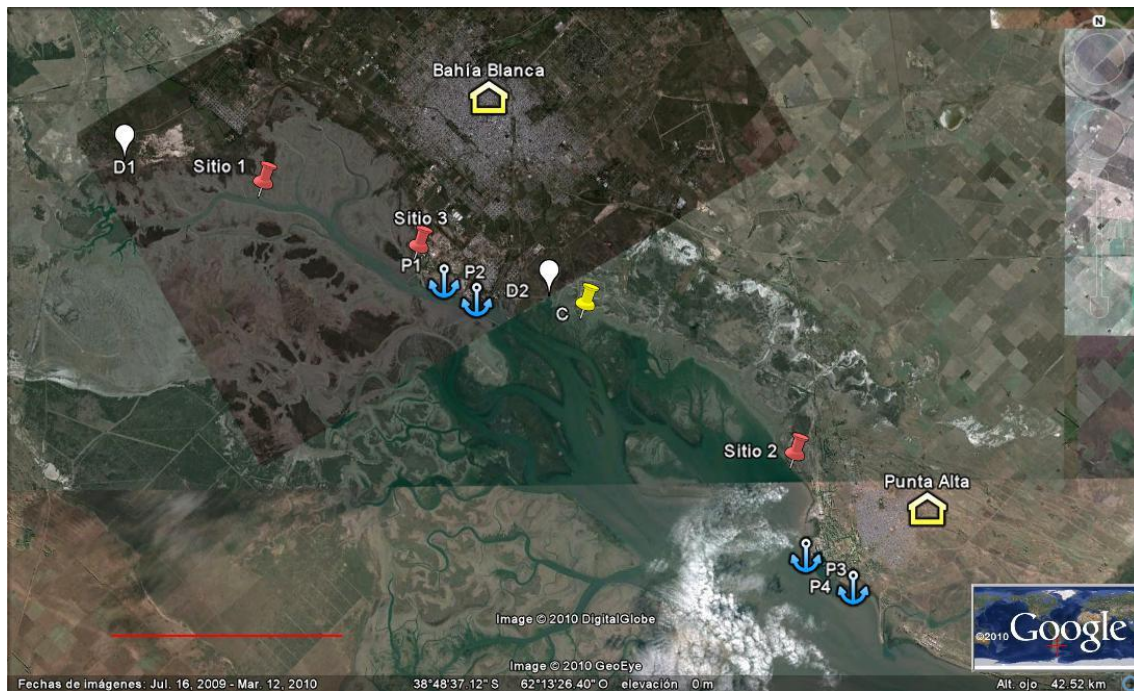


Figura 2. Ubicación de los sitios de muestreo: Sitio 1 (Puerto Cuatreros), Sitio 2 (Villa del Mar) y Sitio 3; las ciudades: Bahía Blanca y Punta Alta; los principales puertos: Puerto Galván (P1), Puerto Ingeniero White (P2), Puerto Belgrano (P3) y Puerto Rosales (P4); las principales descargas de agua dulce: Sauce Chico (D1) y Napostá Grande (D2) y la descarga de efluentes cloacales (C). Escala: 10 km.

El extremo noroeste del estuario es estrecho y consiste en un sistema complejo de canales enlazados separados por extensas planicies de marea, parches de humedales bajos e islas. La boca del estuario es más amplia y se abre en el Océano Atlántico. La circulación general del estuario es dominada por una onda de marea semidiurna (Perillo y Piccolo, 1991) cuyo rango promedio

aumenta desde la boca (2,2 m) hacia el extremo norte (3,5 m) (Perillo y Piccolo, 1991). En el estuario el aporte de agua dulce por el río Sauce Chico y el arroyo Napostá Grande es escaso (Fig. 2), es por esto que prevalecen las condiciones marítimas. Las concentraciones de salinidad fluctúan a lo largo del año, estas fluctuaciones son más pronunciadas en el extremo noroeste, por ejemplo en Puerto Cuatrerros la salinidad varía desde 22,8 ‰ hasta 41,0 ‰ en verano (Gayoso, 1998). La temperatura anual media superficial del agua es de 13 °C, variando de 21,6 °C en el verano a 8,5 °C en el invierno (Perillo et al., 2001).

Una de las principales características biológicas del estuario es la floración de fitoplancton durante el invierno que consiste principalmente en diatomeas centrales, predominantemente *Thalassiosira curvoiseriata* Takano 1981, que comprende aproximadamente el 90 % de la biomasa algal (Gayoso, 1998; Popovich y Gayoso, 1999). La concentración de clorofila a alcanza niveles de 54 µg L⁻¹ durante la floración de fitoplancton, con una productividad máxima de 200 mg C m⁻³ h⁻¹ (Perillo et al., 2001). La disponibilidad de nutrientes (NO₃⁻, NO₂⁻, NH₄⁺, PO₄³⁻, SiO₄⁴⁻) es por lo tanto mínima en el invierno (agosto-julio) y la disponibilidad máxima coincide con la ausencia de floraciones algales a finales de la primavera (noviembre) y otoño (mayo-junio). El nivel más alto de productividad primaria fue encontrado en la zona interna del estuario, es decir en Puerto Cuatrerros (Gayoso, 1998). Las características físicas y biológicas del estuario de Bahía Blanca han sido recopiladas por Perillo et al. (2001).

Pocas especies, pero con muchos individuos por especie, proliferan en el estuario, especialmente en zonas donde las condiciones de salinidad son muy fluctuantes. Debido a estas altas abundancias, muchas especies de peces y aves entran al estuario a alimentarse, desovar o para que los juveniles crezcan en condiciones de mayor protección (López Cazorla, 1989). Entre los organismos bentónicos predominan los poliquetos, seguidos por moluscos y crustáceos, que forman extensas áreas de cangrejales (Piccolo y Hoffmeyer, 2004). Se han registrado 19 especies de moluscos (15 de bivalvos y 4 de gasterópodos); entre ellos, *H. australis* es el organismo bentónico más abundante en la cabecera.

El estuario de Bahía Blanca es una zona muy productiva, con gran heterogeneidad de hábitats y abundancia de alimento, que alberga una alta riqueza de aves acuáticas, incluyendo especies marinas y costeras. Las aves residentes usan el estuario en mayor o menor medida durante todo el año, pero las migradoras, incluyendo especies neárticas, patagónicas y oportunistas, cumplen sólo una parte de su ciclo anual en la Argentina. Las aves migradoras neárticas nidifican en la tundra ártica y luego migran hacia el sur (zona de invernada) llegando a la Provincia de Buenos Aires en primavera; emprenden el viaje de regreso al hemisferio norte en marzo o abril. Algunas de estas especies permanecen todo el verano en esta región como el chorlo pampa, mientras que otras siguen hacia el sur, como el playerito rabadilla blanca y la beca de mar. Las migradoras patagónicas nidifican en la Patagonia y, luego de la temporada de cría (zona de invernada), migran hacia latitudes menores, llegando a la Provincia de Buenos Aires en el otoño. Algunos ejemplos son el sobrepuesto, el cauquén común, el petrel gigante y la gaviota cangrejera (*Larus atlanticus* Olrog 1958). Las especies oportunistas realizan desplazamientos más cortos y sin un patrón definido de migración, en búsqueda de condiciones favorables para alimentarse o reproducirse. Entre ellos se encuentran los macaes, patos y gallaretas (Petracci y Delhey, 2005).

El estuario de Bahía Blanca es especialmente importante para un grupo de aves migratorias, llamadas aves playeras, que reúne especies adaptadas a vivir en humedales y comparten las siguientes condiciones: alta supervivencia del adulto, baja tasa reproductiva, con un solo intento de cría por año y sitios puntuales de migración con alta productividad, donde las aves se alimentan intensamente, acumulando energía para continuar la migración. Estos aspectos hacen a estas aves muy susceptibles a las alteraciones ambientales, resultando en muchos casos en una drástica disminución de sus poblaciones. Entre las aves playeras, se desatacan el chorlito pecho canela, el chorlito doble collar y el chorlito ceniciento (Petracci y Delhey, 2005).

Sitios de muestreo

Las muestras se recolectaron en dos sitios del estuario de Bahía Blanca (Fig. 2, 3A y 3B): Sitio 1 ($38^{\circ} 44' S - 62^{\circ} 22' O$), localizado en Puerto Cuatreros, en la parte interna del estuario; y Sitio 2 ($38^{\circ} 51' S - 62^{\circ} 07' O$) ubicado en Villa del Mar, en el centro del estuario. La fluctuación de salinidad, la exposición al oleaje, la velocidad corriente, las actividades de dragado, la composición del bentos y de los sedimentos, y la cantidad de materia orgánica de origen antropogénico, así como otros factores de stress diferencian ambos sitios. El Sitio 1 se caracteriza por sedimentos de barro arcilloso y una fauna macrobentónica dominada por poliquetos, mientras que el Sitio 2 tiene una mayor proporción de sedimentos limo-arenoso y una rica composición macrobentónica dominada por crustáceos, moluscos y poliquetos (Elías, 1985). El Sitio 2 está cerca de un punto de descarga de aguas residuales y es muy utilizado por aves marinas y costeras para la alimentación (Petracci y Delhey, 2005).

Además se realizaron muestreos esporádicos en el Sitio 3 ($38^{\circ} 46' S - 62^{\circ} 18' O$), localizado en una playa cercana a Puerto Galván (Fig. 2). Este sitio fue elegido debido a que se encuentra al margen de una importante planta destiladora de gas (Mega) y presenta una alta influencia antropogénica. Sin embargo, en noviembre de 2007 se suspendieron los muestreos en este sitio debido al relleno con arena por parte de la empresa diezmando a la población de *H. australis* (Fig. 3C). Por esta razón, este sitio no fue incluido en algunos de los análisis.

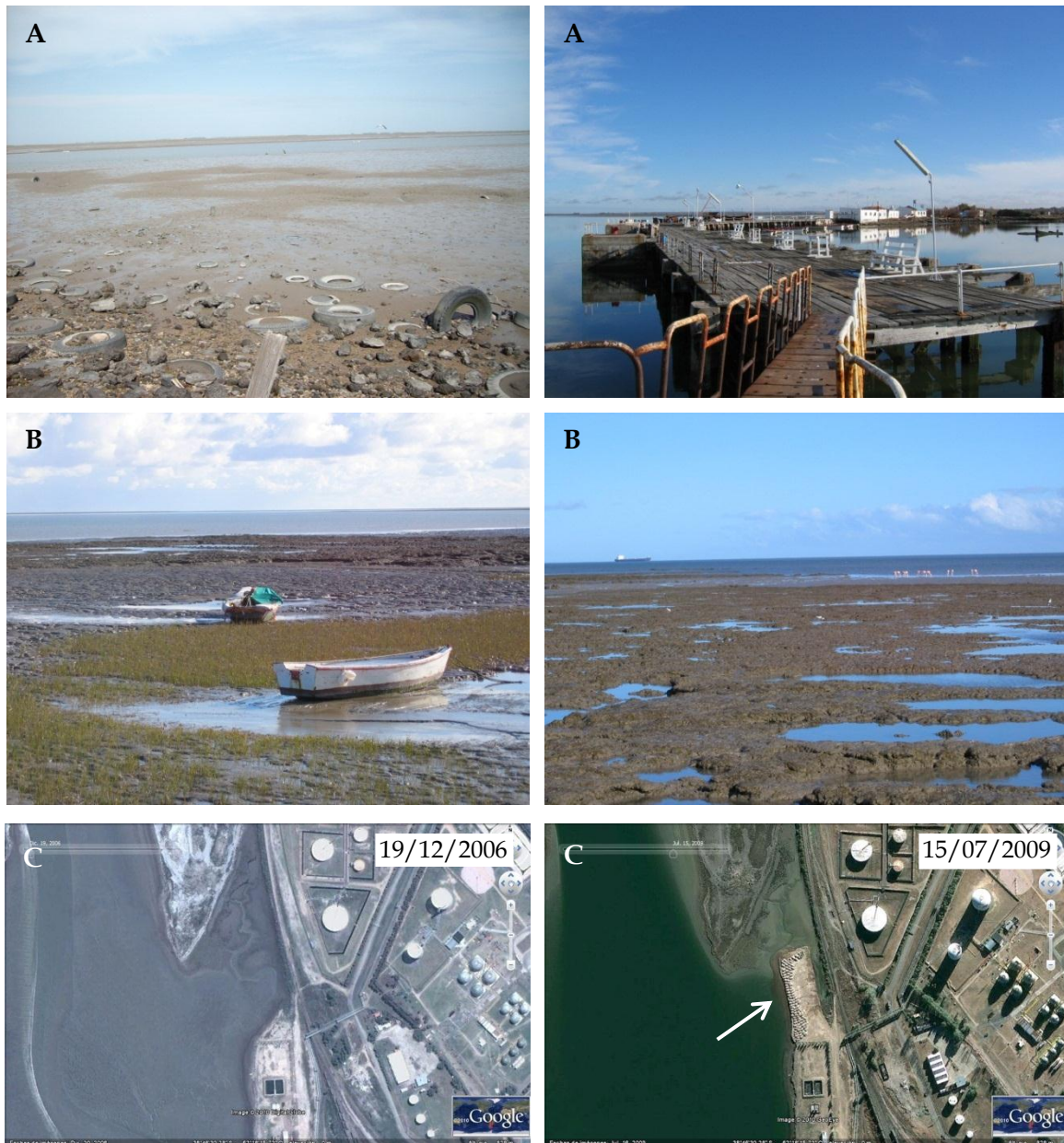


Figura 3. Sitios de muestreo. **A.** Puerto Cuatrerros (Sitio 1); **B.** Villa del Mar (Sitio 2); **C.** Playa cercana a Mega (Sitio 3) antes y después del relleno con arena.

Toma de muestras y trabajo de laboratorio

Desde julio de 2006 hasta julio de 2008 se realizaron 16 muestreos en el estuario de Bahía Blanca, dos en cada estación del año. Además se realizaron 3 muestreos pilotos, en marzo, abril y mayo de 2006, con el fin de seleccionar los lugares de muestreo y adquirir conocimientos sobre el área, técnica de muestreo y reconocimiento de las larvas de digeneos en el laboratorio. Sin tener en cuenta

estos muestreos pilotos, se recolectaron 2.984, 3.223 y 1.297 individuos de la especie *H. australis* en el Sitio 1, Sitio 2 y Sitio 3, respectivamente. En el mes de septiembre de 2007 sólo se muestreó en el Sitio 2 debido a la intensidad de las lluvias que impidieron la entrada a Puerto Cuatreros. La Tabla I muestra las fechas de muestreo para cada sitio.

Tabla I. Fechas de muestreo para cada sitio: Sitio 1 (Puerto Cuatreros), Sitio 2 (Villa del Mar) y Sitio 3 (playa cercana a Puerto Galván). *Muestreos pilotos.

	mar-06 *	abr-06 *	may-06 *	jul-06	sept-06	nov-06	dic-06	ene-07	mar-07	abr-07	jun-07	jul-07	sept-07	nov-07	dic-07	ene-08	feb-08	abr-08	jul-08
Sitio 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sitio 2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sitio 3			+	+	+	+	+	+				+	+						

Los moluscos fueron colectados durante la marea baja en la franja intermareal mediante un tamiz de 1,19 mm de malla (Fig. 4A y 5A) y transportados luego al laboratorio del CEPAVE en la ciudad de La Plata. Allí fueron colocados en acuarios con agua de origen a temperatura ambiente. Se seleccionó una sub-muestra para cada fecha y sitio de muestreo (199 ± 18 individuos para el Sitio 1, 201 ± 26 individuos para el Sitio 2, 185 ± 50 individuos para el Sitio 3). Se tomaron medidas de la conchilla del caracol utilizando un ocular micrométrico (0,2 mm de precisión) incorporado a una lupa estereoscópica Marca Hokenn Optik Modelo ZTX E ZOOM, utilizando el mínimo aumento. Parte de los caracoles recolectados en los meses de noviembre de 2007 y en julio de 2008 fueron medidos utilizando un método más preciso y exacto. A cada individuo se lo fotografió con una cámara digital Marca Canon Modelo PowerShot A80 incorporada a la misma lupa utilizando el mínimo aumento. Luego, se midieron utilizando el programa ImageTool. Las medidas registradas en ambos casos fueron el largo total y el ancho total. Luego, se determinó la presencia de parásitos, el sexo de los caracoles por la presencia de

pene en los machos y la presencia de hembras maduras e inmaduras por presencia y ausencia de ovocitos.

Los otros hospedadores intermediarios fueron recolectados en el Sitio 1, Puerto Cuatreros. Los cangrejos *Cyrtograpsus angulatus* Dana 1851 (N = 65; Fig. 4B) y *Neohelice granulata* (Dana 1851) (N = 36; Fig. 4C) fueron recolectados en 7 fechas de muestreos durante 2008 (marzo, abril, julio, septiembre y noviembre) y en 2009 (febrero y abril). Los cangrejos fueron recolectados usando redes y trampas (Fig. 5B y 5C). Periódicamente y de la misma manera, se recolectaron sergéstidos *Peisos petrunkevitchi* Burkenroad 1945 (N = 28) y camarones *Artemesia longinaris* Bate 1888 (N = 26). Los cirripedios *Balanus glandula* Darwin 1854 y *Balanus amphitrite* Darwin 1854 (N = 2.025), el mejillón *Brachidontes rodriguezii* (d'Orbigny 1842) (N = 43) y la ostra *Ostrea spreta* d'Orbigny 1846 (N = 144) fueron extraídos manualmente. Anfípodos (N = 167), isópodos (N = 120) y copépodos (N = 100) fueron recolectados utilizando redes de plancton. Todos ellos fueron transportados vivos al laboratorio y mantenidos en acuarios con agua del lugar hasta su examinación. Para la recolección de los poliquetos, se extrajo sedimento con una pala y se lo transportó al laboratorio en un balde de 20 l (Fig. 5D). Allí se separaron filtrando el sedimento con un tamiz de 1,19 mm de malla (Fig. 5A). Se revisaron 311 individuos del género *Nereis* Linnaeus 1758. Se recolectaron 10 pejerreyes [*Odontesthes argentinensis* (Valenciennes 1835)] y 7 saraquitas (*Ramnogaster arcuata* (Jenyns 1842)) en Puerto Cuatreros utilizando redes (Fig. 5C). Los mismos se fijaron y se almacenaron en formalina 10 %.

En marzo de 2008, se recolectó un ejemplar del tero real, *Himantopus melanurus* Vieillot 1817 (Fig. 4D), encontrado en una laguna costera (38° 49' S - 62° 06' O). La misma forma parte de un conjunto de lagunas costeras ubicadas a 3,5 km de Villa del Mar y que presenta conexión con este sitio por medio de canales de marea. El individuo fue encontrado muerto y se mantuvo congelado hasta su examinación.

La metodología seguida para el estudio de los digeneos hallados, se describe en los capítulos I y II, según se trate de estadios intramolusco o

metacercarias y adultos, respectivamente. En el capítulo II se describen las infestaciones experimentales realizadas. Además, se realizaron cortes histológicos para localizar la ubicación de cada especie de digeneo (Ver Cap. I y II).



Figura 4. Algunos hospedadores de digeneos del estuario de Bahía Blanca. **A.** *Heleobia australis*; **B.** *Cyrtograpsus angulatus*; **C.** *Neohelice granulata*; **D.** *Himantopus melanurus*.



Figura 5. Material de muestreo. **A.** Tamiz utilizado para la recolección de caracoles y poliquetos; **B.** Trampa utilizada para la recolección de cangrejos y camarones; **C.** Red tipo mediomundo para la recolección de peces y camarones; **D.** Pala y balde utilizados para la recolección y transporte de poliquetos.