

ARTÍCULO

Consumo de oxígeno en *Perumytilus purpuratus* según el parasitismo por Digenea, y efectos de la temperatura y del ciclo de emersión-inmersión sobre la liberación de cercarias

Oxygen consumption in the mussel *Perumytilus purpuratus* according to the parasitism by Digenea, and effects of temperature and the emersion-submersion cycles on the shedding of cercariae

Mauricio Castro-Rojas¹, Katherine Cid-Moya¹ y Mario George-Nascimento¹

¹Departamento de Ecología, Facultad de Ciencias, Universidad Católica de la Santísima Concepción, Casilla 297, Concepción, Chile. mcastrorojas@ucsc.cl

Abstract. Digenea are common platyhelminth parasites in intertidal organisms; their free-living stages (miracidia and cercaria) are not free of experiencing the effects of physico-chemical variations of this environment, same as their hosts. Moreover, the hosts may show different physiological behavior depending on if they are or not parasitized. This study deals with the effects that a yet unidentified digenean may have upon the oxygen consumption of *Perumytilus purpuratus*, as well as the effects that may have the emersion-immersion cycles in the laboratory, on cercariae release. To do this, individuals of *P. purpuratus* were collected by hand from intertidal rocky platforms nearby the mouth of the Biobío River, Chile. In the laboratory, oxygen consumption was compared between hosts with and without parasites, and the shedding of cercariae was measured at 9, 17 y 22°C and compared between parasitized hosts exposed to opposite emersion-submersion cycles. There were no significant differences between parasitized and non-parasitized hosts in oxygen consumption. However, parasitized hosts showed scarce gonadic development, suggesting that metabolic products of the hosts are re-allocated towards parasite development. Cercariae shedding increased with water temperature and decreased exponentially with the duration of the submersion- emersion cycle, peaking 2 h after submersion. These results suggest that metabolic rate of the host increases with temperature and that cercariae release is induced by temperature and submersion of the host in seawater.

Key words: Fellodistomidae, host physiology, parasite ecophysiology, intertidal, Chile

Resumen. Los Digenea son platelmintos parásitos comunes en organismos intermareales, y en sus etapas de vida libre (miracidio y cercaria) están expuestos a distintas condiciones ambientales, al igual que sus hospedadores. Por otro lado, éstos últimos pueden presentar un comportamiento fisiológico diferente si están o no parasitados. En este estudio se evaluó el efecto de la parasitosis por un digeneo, aún no identificado, sobre el consumo de oxígeno del chorito *Perumytilus purpuratus*, y se analizó la influencia de la temperatura del agua y los ciclos de emersión-inmersión sobre la liberación de las cercarias de estos parásitos. Ejemplares de *P. purpuratus* fueron recolectados manualmente desde el roquerío intermareal de la desembocadura del río Biobío, Chile. En el laboratorio se comparó, en experimentos con distintos ejemplares, el consumo de oxígeno de individuos con y sin parásitos, y se midió la liberación de cercarias a 9, 17 y 22°C de temperatura del agua, y según ciclos opuestos de inmersión-emersión de duración variable. El consumo de oxígeno no mostró diferencias significativas entre choritos parasitados y no parasitados. Sin embargo, los ejemplares parasitados mostraron escaso desarrollo gonadal, lo que sugiere una reasignación de los productos metabólicos de los choritos hacia el parásito. La liberación de cercarias aumentó con la temperatura del agua y decreció exponencialmente con la duración de la inmersión-emersión, alcanzando valores máximos en las primeras 2 h de ocurrida la inmersión. Las secuencias opuestas de los ciclos de inmersión-emersión empleadas en los experimentos no influyeron significativamente en el número final de cercarias liberadas. Estos resultados sugieren que el metabolismo del hospedador aumenta con la temperatura, y que la inmersión y la temperatura del agua inducen la liberación de las cercarias.

Palabras clave: Fellodistomidae, fisiología del hospedador, ecofisiología de parásitos, intermareal, Chile

INTRODUCCIÓN

El parasitismo por Digenea (Platyhelminthes: Trematoda) es un fenómeno ampliamente extendido en moluscos, ya que éstos son generalmente su primer hospedador intermediario, y en algunos casos incluso pueden ser su segundo hospedador intermediario. En los moluscos ocurre la reproducción asexual del parásito, particularmente en la glándula digestiva y en las gónadas del hospedador, la que usualmente resulta en la producción y liberación de larvas cercarias al ambiente (Noble & Noble 1965). El parasitismo de digeneos en moluscos, generalmente altera el desarrollo, función de defensa, nutrición, metabolismo y reproducción del hospedador (Cheng 1967). De hecho, un resultado común de estas parasitosis es la castración total o parcial del hospedador. Por lo expuesto, pueden influir en varios aspectos de la historia de vida de sus hospedadores y determinar su distribución y abundancia (Fredensborg *et al.* 2005).

En general, las asociaciones de los digeneos con moluscos gasterópodos han sido las más estudiadas porque son las más extendidas y primitivas (Cribb *et al.* 2001), por lo que hay menos estudios parasitológicos en los moluscos bivalvos. El creciente interés por este tipo de sistemas de interacciones interespecíficas se ha centrado en el escenario del cambio climático global (Marcogliese 2001, Poulin 2006, Marcogliese 2008, Studer *et al.* 2010). Los parásitos con ciclos de vida complejos pueden verse particularmente afectados por los cambios climáticos, en especial por el efecto que tiene la temperatura sobre ellos mismos y sus hospedadores (Shim *et al.* 2013). En digeneos se postula que lo anterior está asociado a un incremento en la transmisión entre sus hospedadores, ya que la mayoría de los estudios indican un aumento en la liberación de cercarias desde sus hospedadores moluscos (Poulin 2006). Sin embargo, son diversos los factores ambientales que pueden influir sobre la producción y liberación de las cercarias, *e.g.*, pH, incremento de luz y de salinidad, ciclo de mareas (Marcogliese 2001, Mouritsen 2002, Fingerut *et al.* 2003, Koprivnikar & Poulin 2009a). Los registros más frecuentes se refieren al aumento de la producción de cercarias con el aumento de la temperatura, aunque hay considerable variación entre las especies de Digenea, y entre los individuos hospedadores (Meyrowitsch *et al.* 1991, Lo & Lee 1996, Lyholt & Buschmann 1996, Abdul-Salam *et al.* 1997, Cremonte *et al.* 2001, Fried *et al.* 2002, Fredensborg *et al.* 2005, Koprivnikar & Poulin 2009a, b; Morley 2011, Shim *et al.* 2013). El único estudio en Chile

del efecto del parasitismo por Digenea sobre el metabolismo de sus hospedadores mostró que los hospedadores parasitados tenían un mayor consumo de oxígeno que los no parasitados (Olmos & George-Nascimento 1997).

En esta investigación se evaluó si el parasitismo por larvas de digeneos afecta el consumo de oxígeno del chorito maico *Perumytilus purpuratus* (Lamarck, 1819) (Bivalvia: Mytilidae), y si la temperatura del agua y la secuencia y duración de los ciclos de emersión-inmersión afectan la liberación de cercarias. El chorito maico es una de las especies más comunes del intermareal rocoso medio de la costa de Chile (Broitman *et al.* 2001), y es hospedador de al menos 3 taxa de Digenea. Estos son *Prosohrhynchoides carvajali* Muñoz & Bott, 2011 (Bucephalidae), *Proctoeces* sp. Odhner, 1911 (Fellodistomidae), y otro digeneo fellodistómido no identificado (Muñoz *et al.* 2013a), y al que diversos autores han denominado *Proctoeces lintoni* Siddiqi & Cable 1960 (Aldana *et al.* 2009, Oliva *et al.* 2010), aunque aún no ha sido posible determinar taxonómicamente su identidad en forma definitiva (Muñoz *et al.* 2013a, b). Este último taxón es el de mayor prevalencia en *P. purpuratus* en la costa centro sur de Chile, alcanzando valores menores al 2% (Muñoz *et al.* 2013b), y es el parásito sujeto de este estudio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Entre marzo y mayo 2011 se recolectaron manualmente, durante marea baja, varios miles de ejemplares de *Perumytilus purpuratus* desde el roquerío intermareal ubicado al norte de la desembocadura del río Biobío (36°48'22"S - 73°10'38"O), en la región del mismo nombre, Chile. Los individuos fueron llevados al laboratorio en contenedores de plástico de 20 L con agua de mar, para su posterior revisión de parásitos. Luego, fueron mantenidos individualmente en recipientes de 150 mL con agua de mar a temperatura ambiente, en un rango entre los 14° a 17°C y con aireación constante, emulando ciclos de marea artificiales por períodos de 12 h sumergidos, 12 h emergidos. Los recipientes en que los choritos fueron mantenidos individualmente fueron dispuestos en grupos de 50 a 100 individuos por bandeja. La alimentación de los choritos se hizo con microalgas de *Dunaliella salina* cultivadas en laboratorio, en un medio salino enriquecido, con aireación constante y temperatura ambiente (*ca.*, 15°C).

La detección de choritos parasitados se realizó mediante la inspección a ojo desnudo del fondo del envase en que fue puesto cada espécimen, ya que de los hospedadores parasitados emergen cercarias con colas esféricas de color anaranjado, fácilmente visibles por su gran tamaño (Muñoz *et al.* 2013a). Los individuos no parasitados fueron llevados a su lugar de origen, a excepción de los que se emplearon en los experimentos de consumo de oxígeno.

La comparación del consumo de oxígeno de *P. purpuratus* se efectuó entre 12 individuos parasitados y 15 no parasitados, de similar longitud valvar máxima (entre 15 y 30 mm), y su medición se realizó en un equipo FIBOX® 3 de un canal de fibra óptica de medidor de oxígeno en cámaras de 145 mL de capacidad. La calibración del equipo se realizó entre muestras para cada medición; la primera calibración al 0% de oxígeno se realizó con saturación de NO₂ y la segunda, al 100% de oxígeno, con agua de mar filtrada con aireación constante a una temperatura de 15°C. Previo a las mediciones de consumo de oxígeno, los individuos fueron limpiados (extracción de epífitos), aclimatados por 1 semana en cámara fría a 15°C, con agua de mar filtrada, aireación constante y sin alimentación. Antes de las mediciones de consumo de O₂ se obtuvo el peso húmedo de los individuos en una balanza analítica. Luego de las mediciones de consumo de O₂, se verificó que los choritos parasitados y no parasitados estaban correctamente catalogados a través de la inspección de los ejemplares bajo lupa. Luego, los individuos fueron secados a 80°C durante 48 h en una estufa de secado (Memmert UF - single DISPLAY), y su peso seco fue medido en una balanza analítica con una sensibilidad de 0,001 g.

Para evaluar el efecto de la temperatura sobre la producción de cercarias, se contaron diariamente el número de cercarias liberadas en 13 choritos a temperatura ambiente (17°C), durante 5 días. Los organismos fueron sumergidos durante la noche y el conteo se realizó en la mañana del día siguiente. Los datos de liberación de cercarias fueron expresados como número de cercarias por chorito por día. Posteriormente, los mismos individuos fueron sometidos a temperatura de 22°C que fue alcanzada paulatinamente (1°C * h⁻¹, durante 5 h) para minimizar el estrés, y luego mantenida constante durante 5 días. Antes de someter a los individuos a 9°C, se les mantuvo por 36 h a temperatura ambiente utilizando el mismo procedimiento de bajar en un grado por intervalos de 1 h la temperatura del agua.

Para discernir si la liberación de cercarias está asociada al acto de inmersión o al tiempo en que el hospedador permanece sumergido, se midió el efecto de la extensión y de la secuencia de los ciclos de emersión-inmersión en 14 ejemplares parasitados que fueron expuestos a ciclos artificiales de 'marea' de distinta duración y dirección. Para ello, se usaron 2 secuencias opuestas de ciclos de inmersión-emersión en los mismos individuos. Los intervalos de tiempo que los organismos estuvieron emergidos-sumergidos fueron de 48, 24, 12, 6, 4, 2 y 1 h. Por ejemplo, en el primer experimento de la serie, los individuos estuvieron 48 h emergidos (Em) y 48 h sumergidos (Su). Luego, así también para cada una de los demás experimentos (24, 12, 6, 4, 2 y 1). Este experimento se llevó a cabo en 2 secuencias, una ascendente, que se refiere a que los ciclos de marea comenzaron desde 1 h (Em) y 1 h (Su) hasta completar la secuencia completa y una secuencia descendente, que comenzó con 48 h (Em) - 48 h (Su) hasta llegar a 1 h (Em) - 1 h (Su). Cada secuencia, ascendente y descendente, contempló 194 h de experimentación. La liberación de cercarias fue expresada como número de cercarias liberadas por individuo por hora (N* h⁻¹).

En el análisis estadístico de los datos se utilizó un análisis de la covarianza del consumo de oxígeno en función del peso seco del mitilido, según la condición de estar o no parasitado. En el caso del efecto de la temperatura sobre la liberación de cercarias, los datos fueron sometidos a un análisis de la varianza de medidas repetidas. Se aplicó la prueba HSD de Tukey para identificar cuáles tratamientos mostraban diferencias significativas (Zar 1999). Finalmente, se utilizó un análisis de la covarianza para evaluar la significancia estadística de las diferencias en la tasa de liberación de cercarias según el tiempo que los hospedadores estuvieron sometidos a 2 regímenes opuestos de emersión-inmersión. Todas las pruebas fueron realizadas con los datos transformados al logaritmo decimal.

RESULTADOS

Las pendientes de las regresiones de la tasa de consumo de oxígeno ($\mu\text{mol O}_2 \text{ min}^{-1}$) según el peso seco (g) no eran distintas de cero en los ejemplares con y sin parásitos ($F_{1,23} = 1,28, P = 0,27$). Además, no se encontraron diferencias entre los interceptos de dichas regresiones ($F_{1,24} = 0,001, P = 0,99$, Fig. 1). Por esto, la ecuación de la regresión lineal ($F_{1,25} = 0,12, R^2 = 0,005$) que describe esta relación para ambos grupos en conjunto (con los errores estándar de los parámetros entre paréntesis) es: