

Material y métodos

Muestreo

En la laguna Lacombe, partido de Chascomús, provincia de Buenos Aires, Argentina (35° 49' latitud Sur y 57° 49' longitud Oeste), se realizaron muestreos estacionales a partir de julio de 1996 hasta mayo de 1997 y mensuales desde agosto de 1997 hasta julio de 1998.

En la laguna Salada Grande, partido de General Lavalle, provincia de Buenos Aires, Argentina (36° 55' latitud Sur y 56° 58' longitud Oeste), se realizaron muestreos estacionales a partir de abril de 1996 hasta febrero de 1998.

Los pejerreyes fueron capturados mediante el tendido de un tren de redes agalleras con distintos tamaños de malla y con una distancia entre nudos de 14, 19, 21, 25, 29, 34 y 37 mm, respectivamente. Adicionalmente, se utilizaron redes de tiro o arrastre costero, con el fin de capturar a los ejemplares más pequeños que se concentran en la zona costera.

En cada localidad de muestreo, de cada ejemplar capturado fueron registrados los siguientes datos morfométricos: longitud standard (Lst), longitud de la cabeza (LC), peso total y sexo. Seguidamente se realizaron las necropsias conservando las cabezas y las vísceras en bolsas individuales y fijadas en formol al 10% para su posterior estudio en el laboratorio.

Muestreos complementarios

Se realizaron muestreos complementarios en las lagunas Salada Grande y Lacombe, con el fin de capturar a las especies de peces que podrían actuar como hospedadores definitivos y/o intermediarios de los parásitos que afectan a *O. bonariensis*. Se utilizaron redes de arrastre para capturar a los peces de talla pequeña y de hábitos costeros tales como *Oligosarcus jenynsi* (Günther, 1864), *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns, 1842) y *Jenynsia lineata* (Jenyns, 1842) y trampas tipo garlito modificadas (Colautti & Remes Lenicov, 1998b), colocadas a 20 m de la orilla con su eje perpendicular paralelo a la línea de costa, para capturar peces de gran talla tales como *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824) y *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794).

Otros muestreos complementarios de *O. bonariensis* fueron realizados en el embalse de Cruz del Eje, provincia de Córdoba (07/01/97) y en las lagunas Lobos, partido de Lobos (31/08/95, 06/10/95, 29/02/96, 25/3/99), De Gómez, partido de Junín (20/03/97), La Limpia, partido de Chascomús (28/09/95, 08/06/96) y Puán, partido de Puán (03/04/96) de la provincia de Buenos Aires. Las capturas se realizaron mediante el empleo de un tren de redes agalleras y técnicas de pesca deportiva.

Prospección helmintológica

Las prospecciones parasitológicas se llevaron a cabo bajo lupa binocular y se examinó minuciosamente el sistema nervioso central, el corazón, las branquias, el sistema digestivo y las glándulas anexas.

Cada especie parásita fue registrada indicando su hábitat y el número de individuos encontrados. En el caso particular de los quistes de protozoos y formas larvales de digeneos (metacercarias) presentes en branquias y corazón, sólo se consignó presencia o ausencia.

A partir de los muestreos efectuados en primavera de 1996 se procedió a dividir el tracto digestivo en tres sectores de igual tamaño, que se denominaron respectivamente anterior, medio y posterior, a fin de registrar el número y el grado de maduración de los helmintos presentes en cada uno de ellos.

Con el fin de realizar el estudio del patrón de maduración de los cestodes recolectados, se procedió a agruparlos según el criterio de Gil de Pertierra & Ostrowski de Núñez (1990) en:

Inmaduros: individuos que presentan sólo el escólex.

Maduros: individuos con estróbilo y sistema reproductor desarrollado, pero en los que aún no se ha iniciado la formación de huevos.

Grávidos: individuos que han iniciado la producción de huevos.

En cuanto a los helmintos localizados en el cerebro, se registraron como *Externos*, cuando estaban localizados por fuera del encéfalo, e *Internos*, cuando fueron extraídos de los ventrículos cerebrales.

Métodos helmintológicos

Los helmintos fueron extraídos de las vísceras fijadas en formol al 10% y preservados en alcohol 70° hasta su posterior procesamiento.

Los digeneos fueron comprimidos entre porta y cubreobjeto, sumergidos en alcohol 96° durante 24 horas, coloreados con carmín clorhídrico diluido en alcohol 96° (1:6), deshidratados en la serie alcohólica tradicional, diafanizados en xilol y montados con bálsamo de Canadá.

Los cestodes fueron coloreados con carmín clorhídrico diluido en alcohol 96° (1:6), deshidratados en la serie alcohólica tradicional, diafanizados en xilol y montados con bálsamo de Canadá. A fin de completar su estudio, se realizaron dos series de cortes histológicos transversales de 7 µm de espesor que fueron coloreadas con hematoxilina y eosina, deshidratados y montados en DPX (montaje para preparaciones histológicas)

El estudio de los nematodos se llevó a cabo mediante la confección de preparados transitorios utilizando como diafanizador alcohol glicerinado, lactofenol y/o cloral lactofenol, según el tamaño del ejemplar.

El estudio de los acantocéfalos se llevó a cabo mediante la confección de preparados permanentes y transitorios. Para la elaboración de las preparaciones fijas, los especímenes fueron coloreados con carmín acético, deshidratados y montados con bálsamo de Canadá. Las preparaciones transitorias se efectuaron utilizando alcohol glicerinado como diafanizador.

La extracción de los ooquistes de protozoos, detectados en la superficie del hígado, se realizó bajo lupa binocular y su estudio se llevó a cabo mediante la confección de preparados transitorios

utilizando como diafanizador alcohol glicerinado.

Algunos especímenes de digeneos, cestodes y nematodos fueron recolectados vivos, relajados en solución fisiológica caliente, fijados en formol al 5% y deshidratados en concentraciones crecientes de acetona. Luego fueron estudiados por medio de microscopia electrónica de barrido (MEB), usando la técnica de punto crítico, con dióxido de carbono como medio de desecación. Los especímenes fueron sometidos a un baño con oro y observados con un microscopio Jeol JSMT 100.

Las medidas están dadas en micras, salvo aclaración contraria. Se indica mínimo, máximo y entre paréntesis número de ejemplares medidos, media y desvío estándar. Los dibujos son originales y fueron realizados con la ayuda de una cámara de dibujo.

Los helmintos fueron depositados en la Colección Helmintológica del Museo de La Plata con los números: 3977 - 3985, 4069 - 4268, 4374 - 4549, 4557 - 4561, 4591 - 4597, 5286 - 5287, 5293 - 5295.

Los protozoos fueron depositados en la Colección de Protistas del Museo de La Plata con los números: 013 - 014.

Material tipo consultado

Tylodelphys destructor Szidat & Nani, 1951, Colección Helmintológica del Museo Argentino de Ciencias Naturales Bernardino Rivadavia, N° 27936a 77/1.

Estudio cuantitativo de los datos

Especies parásitas autogénicas: Las especies autogénicas se caracterizan por completar sus ciclos de vida dentro de los límites del ambiente acuático, por poseer un potencial de colonización limitado y por presentar distribución en parches (Esch *et al.*, 1990).

Especies parásitas alogénicas: Las especies alogénicas se caracterizan por completar sus ciclos de vida fuera de los límites del ambiente acuático, por utilizar organismos acuáticos como hospedadores intermediarios, por alcanzar la madurez sexual en aves y mamíferos y por poseer un potencial de colonización elevado, dado que pueden ser transferidos fácilmente de una localidad a otra por sus hospedadores definitivos (Esch *et al.*, 1990).

Los términos prevalencia, intensidad de infección, intensidad media, abundancia, abundancia media, hábitat, infrapoblación, infracomunidad y comunidad componente, se interpretan según Bush *et al.* (1997).

Prevalencia: Es el número de hospedadores infectados con uno o más individuos de una especie parásita (o grupo taxonómico), dividido por el número de hospedadores examinados. Usualmente se expresa como porcentaje.

Intensidad: Es el número de individuos de una especie parásita en un único hospedador, es decir, es el número de individuos en una infrapoblación.

Intensidad media: es el número total de individuos de una especie parásita hallados en una muestra, dividido el número de hospedadores infectados con este parásito.

Abundancia: Es el número de individuos de una especie parásita en un único hospedador. A diferencia de la intensidad, esta definición incluye a los hospedadores no parasitados, en los cuales la abundancia es 0.

Abundancia media: es el número total de individuos de una especie parásita hallados en una muestra, dividido el número total de hospedadores examinados.

Hábitat: Es el ambiente local típico, en el cual el parásito fue encontrado.

Infrapoblación: Incluye a todos los individuos de una especie parásita en un único hospedador.

Metapoblación: Todas las infrapoblaciones de una especie parásita presentes en todos los hospedadores de una especie dada en un ecosistema (Según, Riggs *et al.*, 1987).

Infracomunidad: Es el conjunto de infrapoblaciones parásitas en un único hospedador.

Comunidad componente: Se refiere a todas las infrapoblaciones presentes en una población hospedadora.

Con el fin de realizar el estudio de la fauna parásita de *O. bonariensis* a nivel comunitario, se analizaron separadamente los datos parasitológicos provenientes de los hospedadores “post-larvales” de aquellos obtenidos de individuos “juveniles y adultos”. Esta separación se justifica por el tipo de alimentación en cada una de estas etapas de la vida del pejerrey y el ambiente donde fueron obtenidos. Los pejerreyes post-larvales miden hasta 60 mm de longitud estándar y se alimentan de diatomeas y microcrustáceos (copépodos y cladóceros). Los ejemplares juveniles y adultos, con una longitud estándar mayor a 115 mm, incorporan además de microcrustáceos, algas, detritos, gasterópodos y camarones de manera ocasional. Entre estas dos etapas existe una transición, que abarca individuos que miden entre 60 y 115 mm de longitud estándar, en cuya dieta decrece paulatinamente la importancia de las diatomeas y aumenta la de los cladóceros y algas filamentosas (Ringuelet *et al.*, 1980).

En las lagunas Salada Grande y Lacombe, los pejerreyes correspondientes a las etapas post-larval y de transición fueron capturados únicamente en la zona costera y presentaron similitud en la dieta (constituida por microcrustáceos). Por ello se los agrupó en una sola categoría denominada “individuos post-larvales”. Los ejemplares juveniles y adultos, que fueron capturados en sectores alejados de la costa, presentaron semejanza en la composición de la dieta (copépodos, cladóceros y ocasionalmente alimentos de reemplazo). Por estos motivos se consideró conveniente denominarlos “individuos juveniles y adultos” acorde a las categorías determinadas por Ringuelet *et al.* (1980).

Se estudió el espectro trófico del hospedador mediante el análisis cuali y cuantitativo de la dieta cuando el grado de digestión de las presas lo permitió. El análisis cuantitativo se realizó mediante la determinación de la proporción de cada item alimenticio en cada hospedador.

La relación entre las especies parásitas y las presas se calculó mediante el **índice de asociación de Dice**. Se aplicó un test de X^2 para evaluar su significancia (Combes, 1983).

$$D = \frac{2c}{2c + b + a}$$

Donde:

D = Índice de Dice

a = Número de hospedadores parasitados por la especie "a" y en los que no se encontró el ítem alimentario "b".

b = Número de hospedadores en los que se encontró el ítem alimentario "b" y no se halló parasitado por la especie "a".

c = Número de hospedadores parasitados por la especie "a" y en los que se encontró el ítem alimentario "b".

La determinación de especies principales, secundarias y satélites, se realizó mediante la comprobación de correlación positiva entre la prevalencia y la abundancia media y la verificación de la distribución de frecuencias de la prevalencia bi o trimodal (Hanski, 1982; Bush & Holmes, 1986a; Bush *et al.*, 1997; Semenas, 1999).

Con el fin de evaluar la distribución de las especies parásitas en el seno de la población hospedadora se utilizó:

- **Índice de dispersión** (Cancela Da Fonseca, 1966, Morales & Pino, 1987).

$$ID = S^2 / \bar{x}$$

Donde:

ID = Índice de dispersión

S^2 = Varianza

\bar{x} = Media

Cuando el valor de este índice es menor a 1, se considera correspondiente a una distribución espacial uniforme; cuando es igual a 1, corresponde a una disposición al azar; cuando es mayor a 1 se corresponde a una distribución espacial contagioso (Rabinovich, 1980; Morales & Pino, 1987).

La significancia estadística entre el valor del ID y la unidad, se realizó mediante el uso del error estándar (Blackman, 1942; Rabinovich, 1980).

Cuando el número de hospedadores fue grande (> 50), se utilizó la siguiente formula:

$$ES = \sqrt{\frac{2n}{(n-1)^2}}$$

Cuando el número de hospedadores fue pequeño (< 50), se utilizó la siguiente formula:

$$ES = \sqrt{\frac{2}{n-1}}$$

Donde: n = Número de hospedadores examinados.

- **Índice de dispersión de Morisita** (Brower & Zar, 1977; Southwood, 1978; Morales & Pino, 1987).

$$I_s = N \frac{\sum x^2 - \sum x}{(\sum x)^2 - \sum x}$$

Para comprobar si los valores del I_s son significativamente distintos de 1 se utilizó la Prueba de "F" (Brower & Zar, 1977).

$$F_o = \frac{I_s [(\sum x) - 1] + N - \sum x}{N - 1}$$

- **Coefficiente de agregación k** (Southwood, 1978; Morales & Pino, 1987).

Este coeficiente permite conocer el grado de contagio de un parásito en la población hospedadora. El valor de k es próximo a 8 en poblaciones con disposición espacial al azar, muy inferior a 8 en poblaciones sobredispersas y negativo en las que tienen disposición regular (Cabaret, 1982).

Su cálculo se realizó mediante dos métodos:

1) Estimación de k_1 , a partir de la media y varianza

$$k_1 = \frac{\bar{x}^2}{s^2 - \bar{x}}$$

Donde:

k_1 = Coeficiente de agregación

S^2 = Varianza

\bar{x} = Media

2) Estimación de k_3 , a través del método de máxima verosimilitud (Rabinovich, 1980).

$$N \ln \left(1 + \frac{\bar{x}}{k_3} \right) = \sum_x \frac{A(x)}{k_3 + x}$$

Donde:

N = Número total de muestras

\bar{x} = Media

$A(x)$ = Es la suma de todas las frecuencias de las muestras con más de x individuos.

Este método es el más adecuado, cuando se supone que la disposición espacial de los organismos puede ser descrita por la distribución binomial negativa (Rabinovich, 1980).

Para determinar la **Dominancia** se utilizó la formula:

$$D = (n / N) 100$$

Donde:

N = Número total de parásitos de todas las especies halladas.

n = número de parásitos de una especie.

Para comparar la Dominancia en las distintas estaciones del año se utilizó el **índice de Dominancia de Berger Parker** (Kennedy, 1990).

$$IDBP = \frac{N_{max}}{N_{total}}$$

Donde:

N_{max} = Abundancia máxima

N_{total} = Abundancia total

El valor máximo de este índice es 1, cuando la comunidad está compuesta por una sola especie.

Se utilizó el **índice de afinidad de Fager** (1957) a fin de determinar la existencia de asociación entre especies recurrentes, es decir especies que se presentan frecuentemente en conjunto, independientemente de sus abundancias (Morales & Pino, 1987).

$$I_{AB} = \frac{2J}{N_A + N_B}$$

Donde:

I_{AB} = Índice de Fager

J = Número de hospedadores donde las especies parásitas A y B están simultáneamente presentes.

N_A = Número de hospedadores donde la especie A está presente.

N_B = Número de hospedadores donde la especie B está presente.

Este índice oscila entre 0 y 1, siendo 1 el mayor valor de similitud posible.

Se utilizó el test de t para determinar si el índice de afinidad obtenido es significativo a un nivel α = 5% (Fager, 1957; Southwood, 1978).

$$t = \left[\frac{(N_A + N_B) (2J - 1)}{2 N_A N_B} - 1 \right] \sqrt{N_A + N_B - 1}$$

Para el cálculo de diversidad se utilizaron:

- **Índice de Shannon - Wiener (ISh)** (Krebs, 1994).

$$ISh = - \sum_{i=1}^S pi \log_2 pi$$

Donde:

pi = proporción de los individuos de la especie i en la muestra; $pi = \frac{ni}{N}$

ni = número de individuos de la i -ésima especie en la muestra.

N = número total de individuos en la muestra.

S = número total de especies en la muestra.

- **Diversidad máxima ($D. max$)** (Krebs, 1994).

$$D. max = \text{Log}_2 S$$

Donde:

S = número total de especies en la muestra.

- **Equitabilidad (E)** (Krebs, 1994).

$$E = ISh / D. max$$

La equitabilidad cuantifica la distribución de la abundancia de las especies parásitas de una comunidad y fluctúa entre 0 y 1 (se aproxima a 0 cuando una especie es ampliamente dominante en el seno de la comunidad y a 1 cuando todas las especies presentes tienen una distribución similar) (Krebs, 1994).

- **Índice de Simpson:** Es un índice no paramétrico que varía entre 0 y 1 (Pielou, 1975; Southwood, 1978; Krebs, 1994).

$$IS = 1 - \sum (pi)^2$$

- La predictibilidad de las infracomunidades fue evaluada teniendo en cuenta el número de especies centrales (Holmes, 1990a).

- La predictibilidad de las comunidades componentes de *O. bonariensis* en cada uno de los cuerpos de agua fue evaluada mediante la similitud de sus infracomunidades. Se utilizó la metodología propuesta por Holmes (1990a): se seleccionaron 10 pares de infracomunidades al azar, se calculó el **índice de similitud de Jaccard** en forma separada y posteriormente se obtuvo la media y el desvío estándar.

$$C_J = \frac{c}{(a + b - c)}$$

Donde:

C_J = Índice de similitud de Jaccard

c = número de especies comunes en ambas infracomunidades.

a = número de especies presentes en la infracomunidad a.

b = número de especies presentes en la infracomunidad b.

El valor de este índice oscila entre 0 y 1, siendo 1 el mayor valor de similitud posible (Southwood, 1978).

Además de utilizó este índice para evaluar la similitud entre las infracomunidades de *O. bonariensis* en ambas lagunas. Se utilizó la metodología propuesta por Holmes (1990a): se seleccionaron 10 infracomunidades al azar de cada laguna, se calculó el índice de similitud de Jaccard en forma separada y posteriormente se obtuvo la media y el desvío estándar.

Se utilizó **el índice de Jaccard (C_J)**, con el fin de determinar el grado de similitud entre las comunidades parásitas de *O. bonariensis* en ambas lagunas.

Donde:

c = número de especies comunes a ambas comunidades.

a = número de especies presentes en la comunidad 1.

b = número de especies presentes en la comunidad 2.

Estadísticos

Coefficiente de correlación de rangos de Spearman (r_s)

Es un test no paramétrico de correlación, que permite establecer el grado de asociación entre dos variables; el valor de r_s oscila entre - 1 y + 1 (Morales & Pino, 1987; Siegel, 1990).

Se utilizó para evaluar la asociación entre:

- La talla (Lst) del hospedador y el número de parásitos, la prevalencia, la intensidad media y la abundancia, para cada especie parásita.

- La talla (Lst) del hospedador y el índice de dispersión y coeficiente de agregación k_1 . Este análisis se realizó para aquellas especies parásitas que presentaron una prevalencia total superior al 5%.

- La talla (Lst) del hospedador y la riqueza específica (RE), índice de dominancia de Berger Parker (IDBP), índice de Shannon - Wiener (ISh), diversidad máxima (D. max), equitabilidad (E) e índice de Simpson (IS).

- El número de metacercarias de *A. mordax* localizadas en el encéfalo, nervio óptico y médula

espinal.

Prueba de rangos con signo de Wilcoxon

Es una prueba no paramétrica que permite comparar dos muestras, donde la hipótesis nula (H_0) es que ambas muestras proceden de poblaciones que tienen la misma distribución (Sokal & Rohlf, 1980).

Se utilizó para evaluar:

- Las diferencias de prevalencia, intensidad media, abundancia media y porcentajes de dominancia entre ambos sexos, considerando las distintas estaciones.

- Las diferencias del índice de dispersión y k_1 entre ambos sexos, considerando las distintas estaciones. Este análisis se realizó para aquellas especies parásitas que presentaron una prevalencia total superior al 5%.

- Las diferencias en el número de metacercarias de *A. mordax* ubicadas en el interior de los ventrículos cerebrales (Internas) y las localizadas por fuera del encéfalo (Externas).

- Las diferencias en la proporción de los distintos ítems alimentarios en ambos sexos.

Análisis de varianza por rangos de Kruskal-Wallis

Es una prueba no paramétrica que permite comparar k muestras independientes, donde la H_0 supone que las k muestras proceden de la misma población o de poblaciones idénticas con respecto a los promedios (Siegel, 1990).

Se utilizó para evaluar:

- La distribución diferencial de los cestodes en el intestino (teniendo en cuenta infecciones monoespecíficas y considerando el número de individuos en cada infrapoblación).

- La distribución diferencial de los cestodes en el intestino en infrapoblaciones con bajas y altas intensidades de infección.

- La distribución diferencial de los estadios de desarrollo de los cestodes (inmaduros, maduros y grávidos) en el intestino.

- La distribución diferencial de los estadios de desarrollo de los cestodes (inmaduros, maduros y grávidos) en el intestino en infrapoblaciones con bajas y altas intensidades de infección.

- Las diferencias en la proporción de los distintos ítems alimentarios en las distintas estaciones del año.

- Las diferencias en la proporción de los distintos ítems alimentarios en las distintas tallas de hospedadores.

Prueba χ^2 para k muestras independientes

Esta prueba permite evaluar la significancia de las diferencias de k grupos independientes (Siegel, 1990).

Se utilizó para evaluar:

- La bondad de ajuste entre las frecuencias observadas y las calculadas basadas en la distribución binomial negativa (Este análisis se realizó para las especies parásitas que presentaron una prevalencia total mayor al 5%).

- Las diferencias en el porcentaje de cada estadio de desarrollo de *C. macdonaghi* en las distintas estaciones del año.

Test de probabilidad exacta de Fisher

Es un test no paramétrico que permite comparar dos muestras independientes, cuando los valores de las dos muestras pertenecen, respectivamente, a dos clases mutuamente excluyentes (Siegel, 1990).

Se utilizó para comparar:

- La prevalencia de las especies parásitas entre las estaciones consecutivas del año, a fin de detectar la presencia de variaciones estacionales.

- La prevalencia de las especies parásitas en cada estación del primer año de muestreo con su correspondiente del segundo año, a fin de detectar la presencia de patrones estacionales.

- La prevalencia estacional de las metapoblaciones parásitas comunes a ambas lagunas.

En todos los casos se consideró el número de hospedadores parasitados y no parasitados por cada especie parásita en cada estación del año (Este análisis se realizó para las especies parásitas que presentaron una prevalencia total mayor al 5%).

Prueba U de Mann-Whitney

Es una prueba no paramétrica que permite comparar dos muestras independientes (Siegel, 1990).

Se utilizó para comparar:

- La abundancia de las especies parásitas entre las estaciones consecutivas del año, a fin de detectar la presencia de variaciones estacionales.

- La abundancia de las especies parásitas en cada estación del primer año de muestreo con su correspondiente del segundo año, a fin de detectar la presencia de patrones estacionales.

- La abundancia estacional de las metapoblaciones parásitas comunes a ambas lagunas.

En todos los casos se consideró el número de helmintos por hospedador en cada estación del año (Este análisis se realizó para las especies parásitas que presentaron una prevalencia total mayor al 5%).