



Manual de técnicas y
protocolos para el
relevamiento y estudio de
anfibia de Argentina

Laura Pereyra
Eduardo Etchepare
Marcos Vaira
Editores

Manual de técnicas y
protocolos para el
relevamiento y estudio de
anfibios de Argentina
Parte I

Manual de técnicas y
protocolos para el
relevamiento y estudio de
anfibios de Argentina
Parte I

Laura C. Pereyra
Eduardo Etchepare
Marcos Vaira
Editores

Universidad Nacional de Jujuy
2021

Prohibida la reproducción total o parcial del material contenido en esta publicación por cualquier medio o procedimiento, comprendidos la reprografía y el tratamiento informático, sin permiso expreso del Editor.

Pereyra, Laura

Manual de técnicas y protocolos para el relevamiento y estudio de anfibios de Argentina / Laura Pereyra ; Marcos Vaira ; Eduardo Etchepare ; compilación de Laura Pereyra ; Marcos Vaira ; Eduardo Etchepare. - 1a ed. - San Salvador de Jujuy : Editorial de la Universidad Nacional de Jujuy - EDIUNJU, 2021.

Libro digital, PDF

Archivo Digital: descarga

ISBN 978-950-721-587-2

I. Manual Técnico. I. Vaira, Marcos. II. Etchepare, Eduardo. III. Título.
CDD 597.802

Ilustración de Tapa: *Ceratophrys ornata* - Marisel Morales (basada en una fotografía de Gabriela Agostini)



© 2021 Laura Cecilia Pereyra - Eduardo Etchepare - Marcos Vaira

© 2021 Editorial de la Universidad Nacional de Jujuy

Avda. Bolivia 1685 - CP 4600

San Salvador de Jujuy - Pcia. de Jujuy - Argentina

Tel. (0388) 4221511 e-mail: editorial@unju.edu.ar

2021 1ra Edición

Queda hecho el depósito que previene la Ley 11.723

Impreso en Argentina - Printed in Argentina

ISBN: ISBN 978-950-721-587-2

CONTENIDOS

Prólogo	9
Presentación del Manual	12
Parte I	
1. Introducción general	17
2. Diseño de muestreo	23
2.1 La pregunta y los objetivos del estudio	24
2.2 ¿Dónde y cuándo? Definiendo la escala espacial y temporal del estudio	25
2.3 ¿Cuánto? Definiendo el tamaño de la muestra	26
2.4 ¿Cómo? Diseños de muestreo estandarizados	27
3. Técnicas de relevamiento de la diversidad de anuros	33
3.1 Relevamiento de oviposturas y embriones	34
3.2 Relevamiento de renacuajos	42
3.3 Relevamiento de postmetamórficos	55
3.4 Monitoreo acústico pasivo (MAP)	72
4. Técnicas de relevamiento y estudios específicos	87
4.1 Identificación y marcado de individuos	88
4.2 Esqueletocronología	112
4.3 Estudios anatómicos	132
4.4 Estudios bioacústicos	142
4.5 Estudios tróficos	164
4.6 Estudios experimentales	185
4.7 Técnicas para la determinación de parámetros termo-fisiológicos	222
4.8 Registro de anomalías macroscópicas y microscópicas en adultos y larvas de anfibios anuros	250

4.9 Registro de parásitos. Protocolos en campo y laboratorio	266
4.10 Registro de hongos. Protocolos en campo y laboratorio	304
4.11 Técnicas para el relevamiento de anfibios en ambientes contaminados	326
4.12 Áreas prioritarias para la conservación	348
4.13 Ciencia ciudadana: más que una herramienta para la recolección de datos	363
5. Procedimientos y preparación de material para incorporar a una colección biológica	374
6. Casos de estudio	403
6.1 Monitoreo de anfibios en los Parques Nacionales Patagónicos: Protocolos <i>ad hoc</i> para especies de vertebrados de valor especial	404
6.2 Especies poco frecuentes, elusivas o desaparecidas: caso de estudio de las ranas marsupiales del género <i>Gastrotheca</i> de Argentina	409
6.3 Gigante de las Pampas. Un programa de Ciencia Ciudadana aplicado a la conservación del Escuerzo (<i>Ceratophrys ornata</i>)	414

4.5 ESTUDIOS TRÓFICOS

Marta I. Duré^{1,2}, Javier A. López^{1,4}, Rafael C. Lajmanovich^{1,3}, Paola M. Peltzer^{1,3}, Andrés M. Attademo^{1,3}, Eduardo F. Schaefer^{1,5} & Carolina Antoniazzi^{1,4}

¹ Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Godoy Cruz 2290 (C1425FQB), Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

² Centro de Ecología Aplicada del Litoral CECOAL-CONICET-UNNE, Ruta 5, km 2.5, W 3400 AMD, Corrientes, Argentina.

³ Laboratorio de Ecotoxicología. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (FBCB-CONICET), Ciudad Universitaria (3000), Santa Fe, Argentina.

⁴ Instituto Nacional de Limnología (INALI: CONICET-UNL). Ciudad Universitaria, Paraje el Pozo, (3000) Santa Fe, Argentina; Departamento de Ciencias Naturales, Facultad de Humanidades y Ciencias, Universidad Nacional del Litoral (UNL). Paraje el Pozo, (3000) Santa Fe, Argentina.

⁵ Instituto de Investigaciones Geohistóricas - Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (IIGHI, CONICET- UNNE). Av. Castelli 930 (H3504AAO) Resistencia - Chaco - Argentina.

4.5.1. Ecología Trófica- Antecedentes

Los anfibios son eslabones importantes en el flujo de energía de los ecosistemas acuáticos y terrestres debido a su ciclo de vida bifásico⁽¹⁾. Por esto, los estudios destinados a analizar las interrelaciones tróficas y preferencias alimentarias, a nivel poblacional o comunitario, brindan información importante para determinar la composición de gremios o ensambles y resultan de vital importancia para entender aspectos fundamentales tanto de sus historia de vida como de la forma en que las diferentes especies de anfibios comparten y explotan sus recursos⁽²⁻⁴⁾.

Numerosos estudios han demostrado la importancia del alimento para la evolución y organización de las comunidades de anuros, tanto adultos como juveniles, en diferentes ecosistemas. Pueden comportarse como depredadores generalistas (aquellos que consumen una gran variedad de presas) o especialistas (con preferencia por un ítem alimentario) y dietas que se encuentran entre estos dos extremos. El resultado de este comportamiento se traduce en una relación costo-beneficio (búsqueda, captura y manipulación, *versus* ganancia energética). Dicha elección se ajusta, además, a fluctuaciones y sincronizaciones espacio-temporales en los períodos de actividad de los anuros y sus presas, lo que puede depender tanto de factores naturales como antrópicos (cultivos, deforestación, contaminación), o una combinación de los mismos⁽⁵⁻⁸⁾.

Por otra parte, además de la oferta trófica, existen otros factores que influyen en la selección de una presa^(4,9-18). Estos son: tipo, número y volumen de presas consumidas, relación entre el tamaño de las presas y del depredador, cambios ontogénicos y potencial aumento de la capacidad antidepredatoria, a partir de alcaloides provenientes de las presas^(4,15,16,19-22).

En el último Plan de Acción para la Conservación de los Anfibios de la República Argentina⁽²³⁾, uno de sus componentes, destinado a evaluar y categorizar el estado actual de las poblaciones de anuros de nuestro país, identifica como uno de los problemas a resolver “la escasez de información básica sobre distribución y aspectos fundamentales de historias de vida (estimaciones de abundancia, fluctuaciones naturales / estacionales, aspectos tróficos, características reproductivas, etc.) de las especies Insuficientemente Conocidas (IC) o descritas recientemente”. Sobre esta base, resulta imperioso detectar cuáles son las regiones (o provincias) donde se observa un vacío de información con respecto a esta temática, identificando géneros y especies con datos tróficos insuficientes o sin datos para el país.

En Argentina, existen en la actualidad alrededor de 20 especies categorizadas como insuficientemente conocidas, y se han reportado datos tróficos para,

aproximadamente, el 43% de las especies citadas para el país. En lo que respecta a estudios sobre dieta, se observa un predominio de estudios del tipo descriptivo convencional, puntuales, sin referencia a variaciones temporales (estacional), ontogenéticas o espaciales (entre hábitats o incluso regiones diferentes), y en la mayoría de los casos sin evaluar la disponibilidad de presas.

4.5.1a -Larvas: se han realizado diversos estudios analizando la composición y ecología trófica, a nivel intra e interespecífico, en ambientes lénticos de Argentina⁽²⁴⁻³⁰⁾. La mayor parte de ellos en especies de las ecoregiones del Espinal, Chaco Húmedo y Deltas e Islas del Río Paraná región del Litoral Fluvial, donde abordan el estudio de especies puntuales^(27,31,32) siendo escasos los análisis comparativos interespecíficos^(25,30,33,34).

En general, las larvas de anuros son detritívoras, herbívoras, suspensívoras y micrófagas^(24,25,31, 35-38). Los renacuajos incluyen en sus dietas elementos de comunidades acuáticas planctónicas, bentónicas, neustónicas y perifíticas, tales como microinvertebrados, protozoos, macrófitas, algas unicelulares coloniales, cianobacterias, bacterias, granos de polen, hongos, detritus y materia orgánica disuelta y, en algunas especies, huevos, larvas, juveniles de anuros, peces, pequeños artrópodos y restos plásticos^(27,30,34,39-43). Estudios recientes incorporan el análisis de las proporciones de isótopos de N y C y muestran que, dependiendo de la especie, oferta trófica y características del cuerpo de agua que habitan, los renacuajos pueden ocupar desde los niveles más bajos en las redes tróficas hasta los más elevados, con señales isotópicas que los ubican como consumidores primarios, omnívoros y hasta como carnívoros^(34,46,47).

4.5.1b -Postmetamorfos y adultos: En su mayoría, los anuros adultos son carnívoros. Por lo general, éstos consumen una gran cantidad de invertebrados, principalmente artrópodos incluyendo, arácnidos, crustáceos y, especialmente, insectos^(2,5,8,18,35,48-61). En algunas especies, se ha desarrollado el canibalismo, la oofagia, ictiofagia, anurofagia, ofiofagia, o mastozofagia. Pueden comportarse como depredadores oportunistas o generalistas, donde el contenido de la dieta refleja la disponibilidad de presas en el ambiente. Sin embargo, algunas de ellas están especializadas en algún tipo particular de invertebrado^(11-16,35,50). Toft⁽²⁾ identifica dos patrones en la alimentación; los “especialistas en hormigas y termitas” y los “no especialistas en hormigas”, que consumen otros grupos de invertebrados. En este contexto, la disponibilidad de presas es uno de los factores de mayor influencia en la actividad

trófica de los anfibios. Johnson⁽⁶²⁾ define la disponibilidad trófica como la cantidad de un recurso accesible a un animal en un periodo y lugar determinado. En este sentido, muchos investigadores coinciden en que, en la medida de lo posible, debe incorporarse en los análisis la información sobre la disponibilidad de alimento^(4,11-15,56,61); con la finalidad de describir y comparar la alimentación de una especie en un determinado sitio considerando sus preferencias tróficas⁽⁶³⁾.

Los estudios tróficos resultan fundamentales para determinar el estatus de las especies en cada región, ya que las características alimentarias y las interacciones establecidas entre ellas, son parte esencial para la caracterización de cada especie tanto a nivel poblacional como comunitario. Además, conocer este aspecto fundamental en sus historias de vida, ayuda a identificar las potenciales especies, o grupos de especies, amenazados o en peligro y prever su respuesta ante un determinado tipo de disturbio, entre ellos: la fragmentación del hábitat, contaminación, desecación, fuego, entre otros⁽⁸⁾.

En Argentina numerosos estudios descriptivos y comparativos han sido realizados en adultos, mencionando a Basso⁽⁶⁴⁾, Lajmanovich^(65, 66), Peltzer y Lajmanovich^(5,51,67,68), Duré et al.⁽⁵⁴⁾, Attademo et al.^(6,56,57), López et al.^(58-61,69), Peltzer et al.⁽⁷⁾, describiendo su rol como importantes depredadores de artrópodos y ocasionalmente de vegetales. En este sentido, es necesario mencionar que los anfibios adultos actúan como controladores naturales de invertebrados considerados perjudiciales para el hombre, tal como lo describen algunos trabajos realizados en cultivos de soja, arroz y zonas urbanas^(5,6,56,57).

4.5.2. Técnicas

4.5.2.1 Metodología utilizada para la obtención de contenidos

4.5.2.1a -Larvas

Históricamente, la ecología trófica de renacuajos se analizó mediante el estudio de los contenidos del tracto digestivo^(24-26,32,33,37,38,70-72), y en su mayoría esta metodología sigue desarrollándose en distintos trabajos⁽⁷³⁾.

Una vez capturados, se deben seleccionar los ejemplares que no evidencien signos de un estado físico inusual (salvo que esto fuera parte del objetivo del estudio). Estos deben ser sacrificados lo más rápidamente posible, preferentemente *in situ*. Para ello, se puede implementar la administración de una sobredosis de anestésico en solución acuosa (1 ml de una solución saturada de benzocaína en etanol / 1 L de agua) y luego fijarlos *in situ* en formalina bufferada al 10%^(74,75), para detener los procesos digestivos y evitar así la des-

composición del material. Es de suma importancia remarcar, que siempre que sea necesario sacrificar ejemplares, sea cual fuere el estadio de su ciclo de vida, es necesario contar con un protocolo de procedimientos aprobado por un Comité de Ética o CICUAL (Comisión Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio).

En laboratorio, se debe extraer el tracto digestivo mediante una incisión desde la cloaca hasta el disco oral, bajo lupa. Para el análisis, se puede considerar el contenido del tracto intestinal completo^(76,77) o la primera porción del mismo, evaluando previamente que no existan diferencias de los ítems presas en los distintos sectores⁽³⁷⁾. Cada intestino se dividirá, mediante cortes longitudinales, en una placa de Petri con la finalidad de extraer su contenido. A esto se le añadirá una cantidad conocida de formaldehído al 4% y se colocará en un microtubo o eppendorf⁽⁷⁶⁾.

Para la observación y determinación de la composición alimentaria se deberán analizar, bajo microscopio óptico, tres alícuotas del tubo eppendorf previamente montadas en un portaobjetos. El volumen de las alícuotas dependerá de la cantidad de contenido presente en cada tracto digestivo, el cual puede variar entre 0,05 a 0,2 ml.

Estos estudios tienen algunas limitaciones a la hora de comprender ciertos aspectos de la ecología trófica de las larvas, ya que los materiales ingeridos no siempre son asimilados o puede no ser el material primario que se digiere. Además, los distintos elementos de la dieta son digeridos a distintas velocidades y representan sólo una instantánea de la composición trófica en el momento de la recolección⁽⁷⁸⁾.

Algunas opciones de reciente uso son el análisis bioquímico de los contenidos digestivos y estudios de tejidos mediante biomarcadores tales como ácidos grasos⁽⁷⁹⁾, o isótopos estables^(30,44,80). Los isótopos estables del carbono ($\delta^{13}\text{C}$) y nitrógeno ($\delta^{15}\text{N}$) son una alternativa eficaz para entender los flujos de energía y las posiciones tróficas de los renacuajos en las redes tróficas, porque indican la asimilación de los nutrientes^(81,82).

Por otra parte, en renacuajos de anfibios herbívoros que obtienen una nutrición significativa de fuentes autótrofas, se debe considerar la importancia de la microbiota intestinal ya que, probablemente, sean estos microorganismos los encargados de los procesos de degradación y asimilación de nutrientes⁽⁸³⁾. Para larvas de especies Neotropicales se puede mencionar el estudio de Lajmanovich et al.⁽⁸⁴⁾ que, a través de técnicas microbiológicas tradicionales, describieron la microbiota intestinal de larvas *Rhinella arenarum*; compuesta principalmente por coliformes (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, y *Enterococcus*).

bacter spp.), y otros reconocidos géneros bacterianos como *Vibrio*, *Aeromonas* y *Pseudomonas*.

Con el fin de evaluar, en forma preliminar, la composición bacteriana del intestino de renacuajos, utilizando técnicas convencionales de microbiología en condiciones de esterilidad, se extrae el intestino de las larvas y macera en solución fisiológica, para posteriormente realizar las diluciones convenientes y sembrarlo en placas de Petri para su recuento y/o identificación. El medio de cultivo que se emplee dependerá de la información que se quiera obtener. Se podrá realizar un análisis cualitativo que permita identificar las principales especies de bacterias presentes en la microbiota, o un análisis cuantitativo que estime en qué proporciones se encuentran los distintos grupos de microorganismos bacterianos dentro de la comunidad intestinal. El análisis cualitativo implica la siembra del contenido intestinal en un medio no-selectivo, como agar nutritivo, a partir del cual se aíslan distintas colonias para su identificación individual a través de distintas pruebas bioquímicas y posterior caracterización fenotípica. Por su parte, para el análisis cuantitativo, el contenido intestinal es directamente sembrado en medios selectivos (en los que sólo crecen un tipo específico de microorganismos) para valorar la cantidad de unidades formadoras de colonias que crecen en cada uno de ellos.

En la mayoría de las investigaciones recientes sobre la microbiota intestinal de larvas de anfibios, la identificación se realiza por la secuenciación del ADN directamente del intestino (metagenómica), e incluyen un espectro más amplio de taxones que se analizan a mayor escala⁽⁸⁵⁻⁸⁷⁾.

4.5.2.1b -Postmetamorfos y adultos

Uno de los métodos utilizados para la obtención de contenidos estomacales en anuros involucra el sacrificio de individuos con la finalidad de extraerles el estómago y/o el intestino y así acceder al contenido que se encuentre en los mismos. Ésta metodología es hoy aceptable sólo cuando los ejemplares sean utilizados también para otros estudios o hayan sido preservados con la finalidad de integrar una colección científica. Actualmente, se prefieren otras técnicas en las que no sea necesario recurrir a la eutanasia, tal es el caso del lavaje estomacal o "*Stomach Flushing*".

En el caso de que se recurra a la evisceración de individuos, los anfibios deberán ser eutanizados y preservados en formalina al 10%. Con la finalidad de evitar que los procesos digestivos actúen sobre el contenido, perdiendo valiosa información; es aconsejable que este procedimiento no exceda las dos

horas posteriores a la captura. Para la extracción del tracto digestivo se debe realizar una incisión en el abdomen en forma de “C” o en forma de “T ⊥” lo que deberá hacerse con sumo cuidado, preservando el resto de los órganos para futuros estudios. Al abrir el tracto digestivo sobre una caja de Petri, se retirarán cuidadosamente las presas y todo el contenido, resguardando que las mismas no pierdan antenas, patas u otras estructuras cruciales para su identificación. Se puede utilizar agua destilada con ayuda de una piseta para lavar todo el contenido de las paredes internas del tracto. Es de suma importancia remarcar, que siempre que sea necesario sacrificar ejemplares, sea cual fuere el estadio de su ciclo de vida, es necesario contar con un protocolo de procedimientos aprobado por un Comité de Ética o CICUAL (Comisión Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio).

El lavaje estomacal (stomach flushing): es una técnica ampliamente difundida y, en la actualidad, recomendada para la extracción de presas ingeridas ya que permite obtener contenidos y conocer la cantidad exacta de estómagos llenos de la muestra total, evitando así el sacrificio de un alto número de individuos innecesariamente. El protocolo recomendado con la descripción detallada de la técnica es el propuesto por Solé et al.⁽⁸⁸⁾. Se utiliza una pinza para abrir la boca del ejemplar a estudiar a los fines de introducir una sonda plástica (tipo vesical) conectada a una jeringa previamente cargada con agua mineral, o de la misma laguna según corresponda. Las sondas de diferentes medidas, de acuerdo al tamaño del animal, se pueden adquirir en ortopedias, científicas y comercios del rubro de insumos hospitalarios. Una vez terminado este paso, se introduce la cánula por la boca con mucho cuidado, sin lastimar el animal, hasta llegar al estómago. Lentamente se incorpora el agua, preferentemente con el ejemplar boca abajo, y se espera a que el bolo alimenticio salga despedido. Luego se colectará, fijará (formalina 10% o alcohol 70%) y rotulará el material gastrointestinal obtenido.

4.5.2.1.1b Consejos prácticos a considerar para reducir los riesgos del lavado estomacal en ejemplares anuros metamórficos, juveniles, subadultos y adultos: Es necesario remarcar que la técnica del lavado estomacal es sencilla, económica, y muy segura para los ejemplares examinados; siempre y cuando sea practicada por personas entrenadas, y con las herramientas adecuadas. No obstante, es fundamental maximizar los cuidados con individuos de pequeño tamaño, como ser metamórficos y juveniles de todas las especies, y subadultos y adultos de especies de pequeño porte.

Las siguientes sugerencias se basan en la realización de lavado estomacal a más de 3000 ejemplares anuros de más de veinte especies y de todos

los estadios de desarrollo. Tanto de pequeño porte (*Pseudopaludicola* spp.; *Elachistocleis* spp.; *Physalaemus* spp.) como de gran tamaño (*Rhinella dip-tycha*; *Leptodactylus luctator*; *Leptodactylus laticeps*) (Schaefer y Duré, obs. pers.).

- Utilizar **bolillos metálicos pequeños**, como fórceps, para facilitar la apertura de la boca en lugar de pinzas. Son herramientas rígidas de punta esférica, que permiten efectuar presión en la comisura bucal de anuros, forzando la apertura de la boca, sin causar lesiones. Se consiguen en artísticas, algunas ferreterías y estéticas (**Figura 4.5.1a,b,c**).
- Es necesario resaltar, que en la mayoría de las especies de pequeño y mediano porte, la boca se puede abrir simplemente con la ayuda de la punta de la cánula ya encastrada en la jeringa. Sin embargo, en

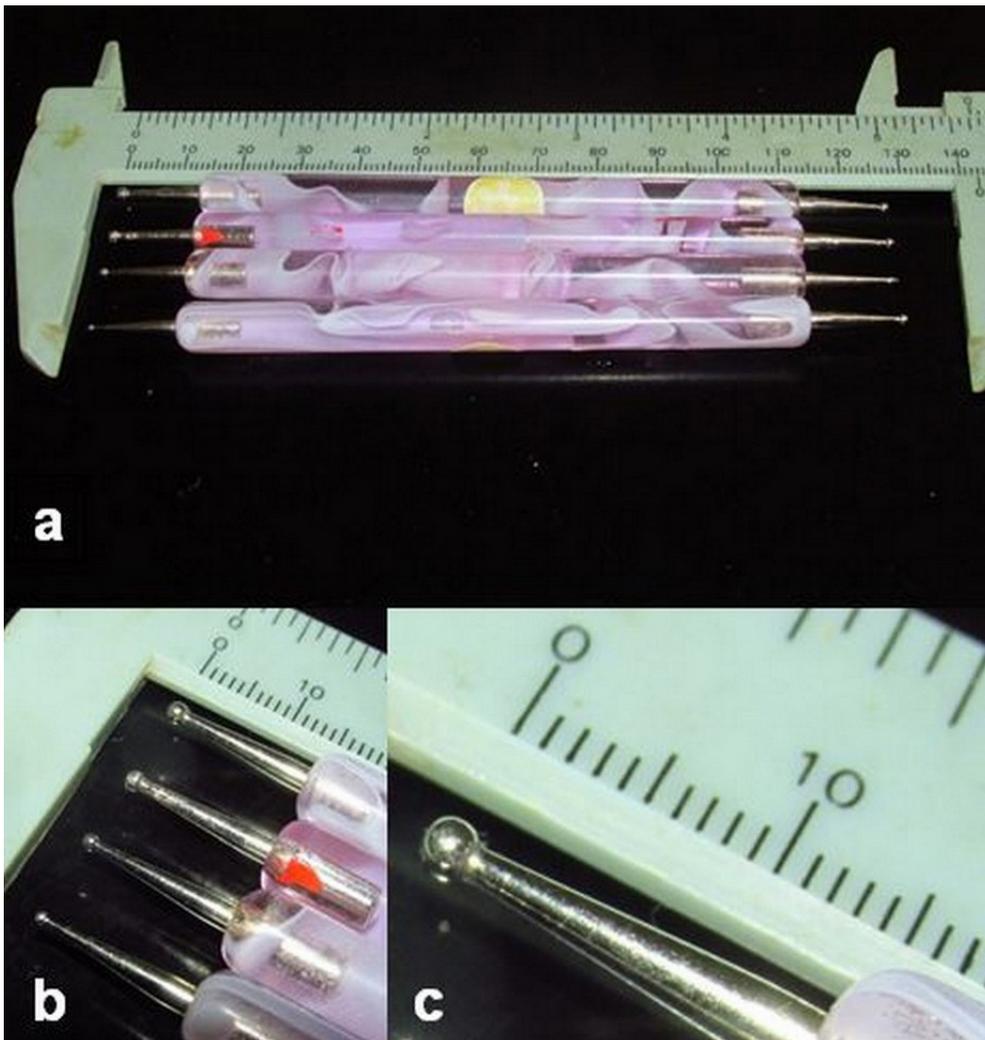


Figura 4.5.1. a- Bolillos metálicos con diferentes puntas esféricas; b-c- Detalle de las puntas. Foto: E. Schaefer.

casos de especies grandes, capaces de morder con mucha fuerza (*Rhinella diptycha*; *Leptodactylus luctator*; *Leptodactylus laticeps*; *Lepidobatrachus* spp.; *Ceratophrys* spp.), será necesario que otro operario facilite la apertura de la boca con ayuda de un bolillo hasta que el encargado de realizar el lavado estomacal inserte la cánula adecuadamente.

- Utilizar tips o puntas de micropipetas automáticas como cánula para realizar el “flushing”, especialmente a individuos pequeños. Las mismas se pueden acoplar a jeringas descartables. Es fundamental **Quitar el filo** de la punta de los tips usando fuego hasta lograr que la punta quede redondeada y suave. De no hacerlo, el filo del tip en su formato original es extremadamente peligroso debido a que las probabilidades de perforar el tubo digestivo del ejemplar analizado son muy altas. Este procedimiento transforma el tip en una cánula de punta esférica (**Figura 4.5.2a,b**). Otra ventaja importante de usar tips previamente desafilados es, aparte de ser una opción muy económica, que pueden acoplarse unas sobre otras para lograr la longitud deseada (**Figura 4.5.2c**). La exposición al fuego debe realizarse durante un segundo o menos, hasta lograr la punta adecuada sin obstruir el orificio. Se puede soplar desde el extremo opuesto para que el flujo de aire impida que el plástico reblandecido cierre por completo el orificio de salida. En general, el orificio de entrada de los tips tiene un diámetro demasiado grande para acoplarse ajustado al extremo de salida (pivote) de las jeringas descartables comunes, ese problema se soluciona cortando aproximadamente 5mm de la base de los tips, con la finalidad de disminuir su diámetro, logrando así un acople perfecto (**Figura 4.5.2d,e**). Es importante remarcar, que los tips son útiles en anuros pequeños (*Pseudopaludicola* spp., *Physalaemus* spp., *Adenomera* spp., *Leptodactylus latinasus*, *Elachistocleis* spp., y otros de porte similar). Para anuros de mayor tamaño, debido a que el volumen del tubo digestivo es mucho mayor, deben usarse cánulas que permitan un flujo de agua suficientemente abundante como para estimular la regurgitación.
- Para realizar lavados estomacales de anuros de gran tamaño (*Rhinella diptycha*; *Leptodactylus luctator*; *Leptodactylus laticeps*, otros) se recomienda usar el extremo posterior de una sonda NELATON® de goma roja. El ensamble con el orificio de salida de la jeringa (pivote) deberá adaptarse mediante tubos de diámetro variable encastrables entre sí. En la **Figura 4.5.3a,b** se observan encastrados hechos con capuchones de agujas hipodérmicas y un tubo Eppendorf perforado. Para este tipo de anuros deberán usarse jeringas de 60 ml, o de ma-

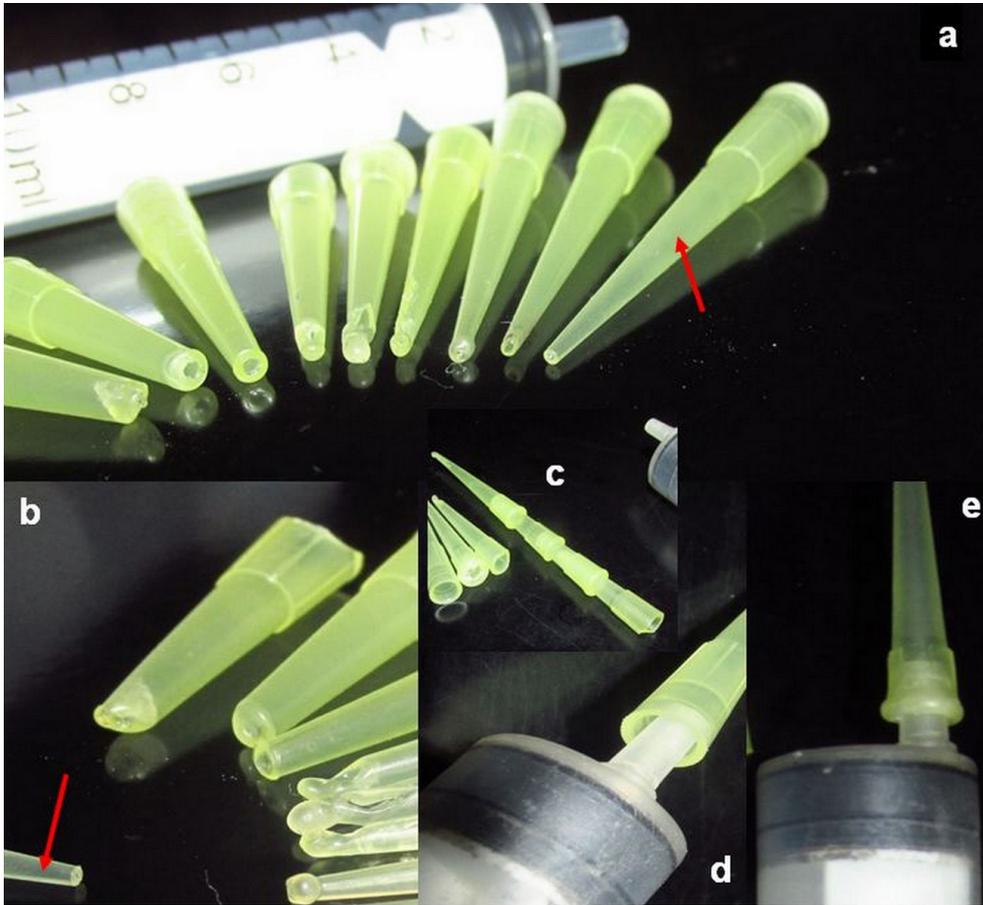


Figura 4.5.2. a- Tips para micropipetas con puntas modificadas por calor (la flecha marca el tip original sin modificaciones); b- Detalles de las puntas modificadas comparadas con la punta original (flecha); c- Tips modificados y encastrados formando una cánula única de mayor longitud; d- Tip original sin modificar la base no encastra adecuadamente en el pivote de la jeringa y e- Tip con base cortada y diámetro modificado con calor encastrando adecuadamente en la jeringa. Foto: E. Schaefer.

por volumen, a los fines de que la descarga de agua sea suficiente para estimular la regurgitación. En algunos casos será necesario descargar más de una jeringa completa.

- Independientemente del tamaño del ejemplar a analizar, una vez colocada la cánula en la boca, el individuo estudiado deberá ubicarse boca abajo y, sin presionar excesivamente, dejar que el peso del animal facilite la lenta inserción de la cánula dentro del tubo digestivo. De ser necesario, el operario podrá ejercer un mínimo empuje en dirección a la cánula a medida que va descargando agua. La aplicación del líquido deberá realizarse de manera continua pero sin exceso de fuerza. El objetivo es llenar el estómago de agua sin dañarlo. Durante este procedimiento, el animal debe ser sostenido boca abajo, siempre sujetado por la mano menos hábil del operario, mientras que la jeringa con la cánula es sostenida y accionada con su mano hábil. La sugerencia de mantener al ejemplar estudiado boca abajo se debe a que la fuerza de gravedad facilita el proceso de regurgitación del bolo alimenticio.

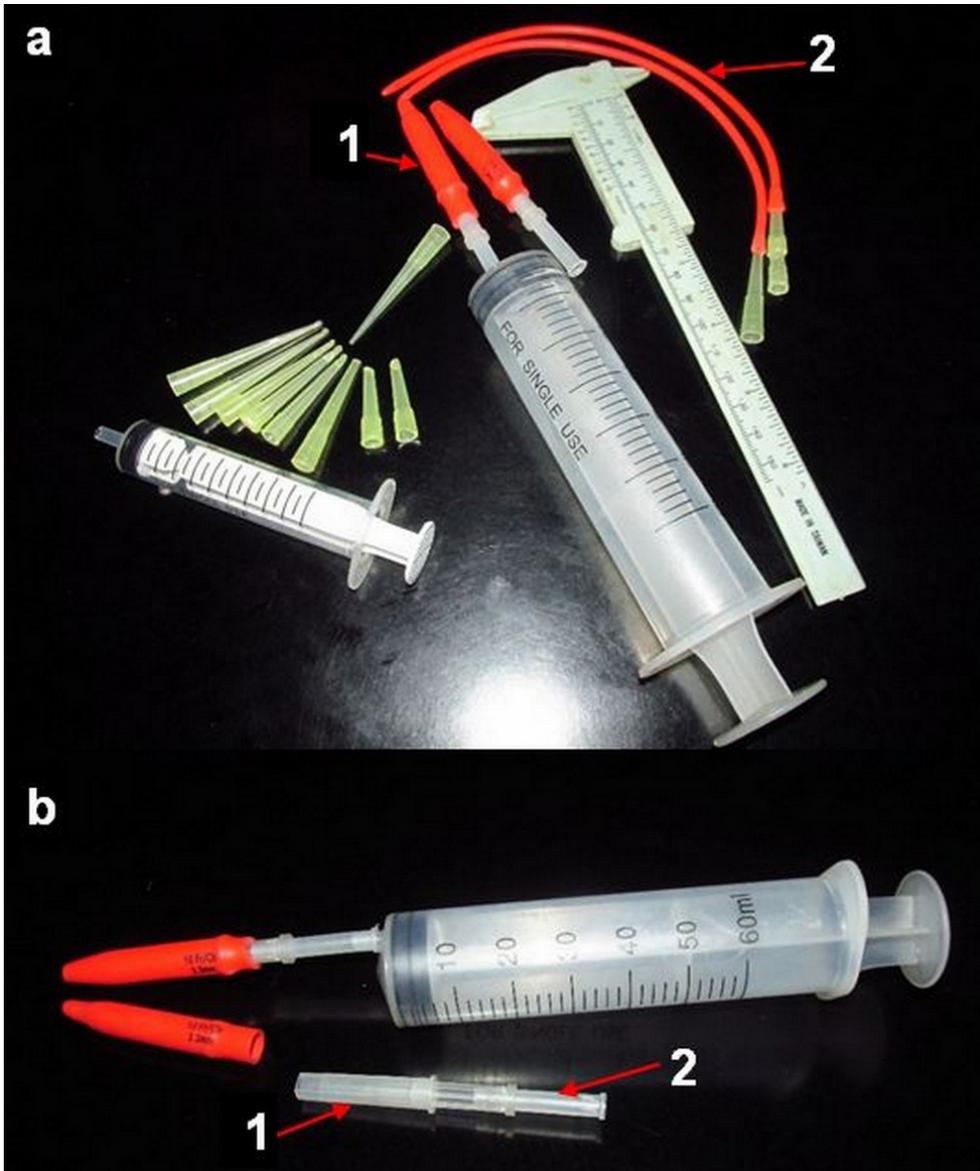


Figura 4.5.3. a- Equipo básico de cánulas para anuros de pequeño, mediano y gran porte; (1-extremo posterior de sonda Nelaton con encastres; 2- Extremo anterior de sonda Nelaton®; b- Extremo posterior de sonda Nelaton adaptado a jeringa de 60 ml para flushing a especies de tamaño grande (1- Capuchón de aguja hipodérmica; 2-Eppendorf perforado). Foto: E. Schaefer.

4.5.2.2 Identificación y medición de las presas

4.5.2.2a -Larvas

Cada ítem debe ser identificado con la mayor precisión taxonómica posible, y ser cuantificado de acuerdo con la técnica descrita por Hill et al.⁽⁸⁹⁾. En el caso de las algas, se pueden utilizar portaobjetos o cámaras de sedimentación, donde se colocarán las muestras de las alícuotas obtenidas y se analizarán bajo un microscopio óptico o invertido, según corresponda, normalmente a un aumento de 400x. El cálculo de la densidad de algas puede hacerse siguiendo a Villafañe y Reid⁽⁹⁰⁾. La técnica de contar (e identificar) al menos

un centenar de taxa dominantes o ítems tróficos⁽⁹¹⁾, permitirá obtener también la frecuencia relativa de cada especie/ítem consumido. La identificación de presas animales se realizará con la muestra de la alícuota colocada en portaobjetos o cámara de sedimentación, para proceder a su identificación y recuento bajo microscopio / lupa, normalmente con un aumento de 200x. En el caso del contenido animal, se recomienda la identificación de todos los ejemplares presentes en la muestra (todos los presentes en el cubreobjeto).

La identificación de los ítems debe basarse en bibliografía especializada de la región donde se lleve a cabo el estudio^(92,93). El análisis de los contenidos se puede analizar desde un enfoque taxonómico⁽³⁷⁾ o funcional⁽³⁰⁾. En el segundo caso se puede utilizar las agrupaciones de base ecomorfológicas que realizaron Kruk et al.⁽⁹⁴⁾ para algas del fitoplancton (especies que se encuentran libres en la columna de agua). Sin embargo, estos grupos pueden ser adaptados también para algas perifíticas y fitobentónicas (especies adheridas a un sustrato como planta o que se encuentran en el fondo del cuerpo de agua). Por ejemplo: GF1: algas pequeñas (134 μm^2); GF2: algas con sílice y flagelo; GF3: algas filamentosas; GF4: algas medianas (791 μm^2); GF5: algas unicelulares flageladas; GF6: algas no flageladas con exoesqueletos silíceo; GF7: algas grandes coloniales con mucílago (3062 μm^2). De esta forma, una vez definidas las categorías taxonómicas o grupo funcional con las que se trabajará, se estimará la abundancia relativa o densidad de las mismas en el tracto de cada larva, la frecuencia de ocurrencia del ítem alimenticio en la población de larvas y el volumen de cada taxa. Para la estimación del volumen, bajo el microscopio se deben registrar las dimensiones medias de al menos, 30 especímenes por ítem considerado, para poder realizar su estimación a través de la forma geométrica que mejor representa la forma del cuerpo del taxa (formas celulares en el caso de las algas)⁽⁹⁵⁾.

4.5.2.2b -Adultos

El contenido del estómago, intestino o ambos (contenido gastrointestinal) será colocado en una caja de Petri con un poco de agua y luego se irán separando las presas por grupo y tamaño. Cada una de ellas será identificada taxonómicamente hasta la resolución propuesta por el investigador, en función de los objetivos del trabajo. Debido a la diversidad de grupos que normalmente conforman la dieta de los anfibios (insectos, colémbolos y otros hexápodos, miriápodos, arácnidos, crustáceos, vertebrados, etc.), para su identificación deben utilizarse guías y claves taxonómicas de cada grupo y región estudiada. Por lo general, la mayor parte de los estudios clasifican los ítems alimentarios a nivel de Orden o Familia, siendo menos frecuentes

aquellos que logran determinar cada una a nivel de género o especie. Esto se debe a que, si bien los anuros ingieren sus presas enteras (**Figura 4.5.4a-d**), en muchas oportunidades se pierden estructuras clave para su correcta identificación durante el proceso de deglución y digestión (**Figura 4.5.5a,d**). Teniendo en cuenta posteriores correlaciones entre tipo de presas y tamaño del anfibio, algunos estudios incluyen la identificación de ítems alimentarios cuyo cuerpo presente más del 70% del cuerpo sin digerir, esto a los efectos de evitar sub o sobreestimaciones de aportes volumétricos y numéricos de cada uno de ellos y su correspondiente relación, errónea, con variables morfológicas del depredador. Otros, deciden identificar la mayor cantidad de presas posibles, para ello se sirven de la reconstrucción de ítems parcialmente digeridos (**Figura 4.5.5a.b**), o piezas clave para cada grupo (élitros, patas, alas, etc.) en base a ejemplares similares hallados completos en ese u otros contenidos estomacales.

Una metodología empleada para efectuar una estimación del tamaño de las presas parcialmente digeridas, es la de cotejar los restos encontrados en los tractos digestivos con presas completas colectadas mediante relevamientos de oferta alimentaria, en el mismo microhábitat en que se capturaron los anuros. De esta forma, en muchas ocasiones, pueden usarse las medidas (largo, ancho o volumen) de las presas colectadas como oferta trófica para inferir el tamaño de las encontradas en la dieta. En todo caso, siempre debe tenerse especial cuidado, principalmente en aquellos anuros generalistas en

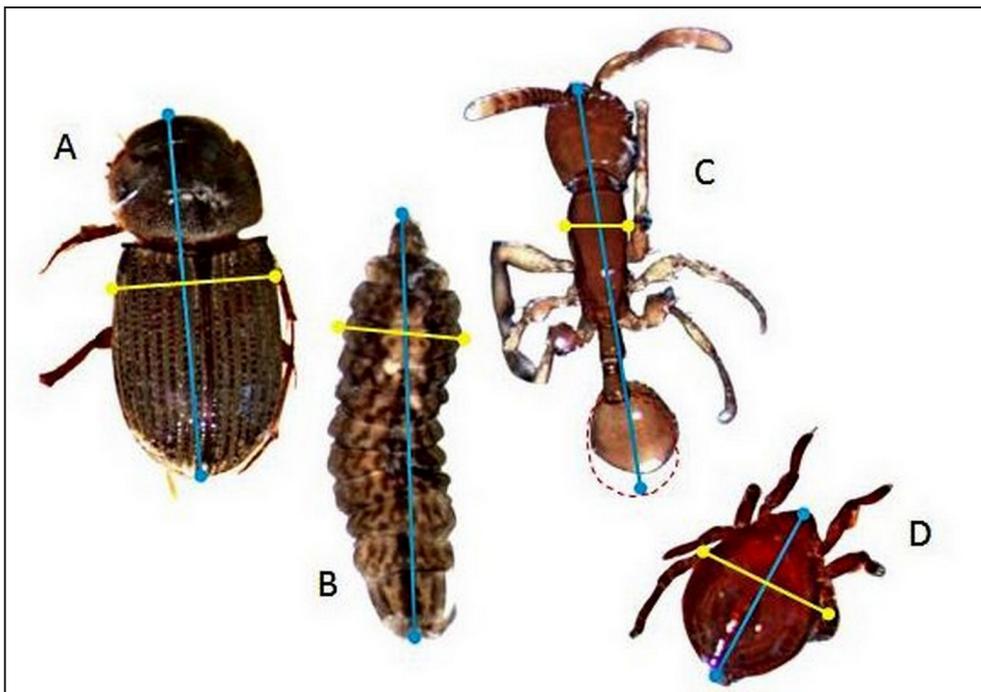


Figura 4.5.4. A-D: Medición de largo (línea azul) y ancho (línea amarilla) de los ítems presa con diferentes tamaños y proporciones corporales. **C:** en línea punteada roja se muestra la estimación de la longitud real del cuerpo al acondicionar aquellos ejemplares recuperados en posiciones corporales que dificultan su medición. Foto: M. Duré.

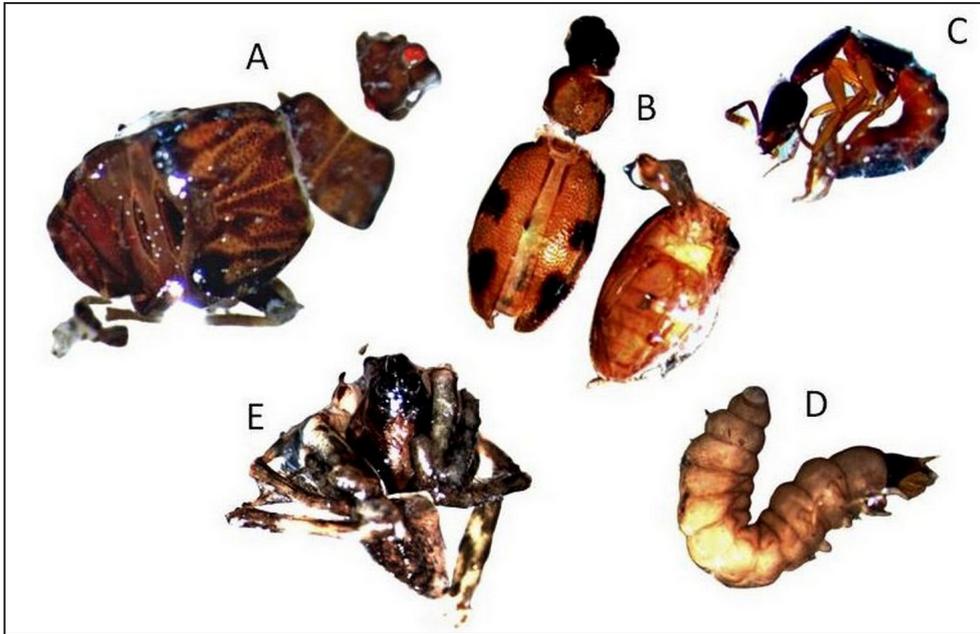


Figura 4.5.5. Detalle de reconstrucción (A,B) y ejemplos de dificultad de medición por posturas corporales complejas (C-E) de los ítems presa recuperados de contenidos estomacales de anuros. Foto: M. Duré.

su alimentación, que presentan una alta diversidad de ítems alimentarios lo que complejiza su correcta identificación y cotejo con presas fragmentadas. Cuando el anfibio es especialista en algún tipo de presas, como hormigas o termitas, contar con la oferta trófica puede resultar de utilidad para reconstruir los fragmentos desarticulados de los tractos digestivos y asignar medidas de tamaño a esas presas ingeridas. Como se mencionó anteriormente, debe considerarse que al utilizar esta metodología se puede incurrir en una sobre estimación del volumen presente en un tracto digestivo, ya que en los mismos buena parte de las presas ya han sido digeridas o bien eliminadas (defecado), por lo que se desaconseja implementarlo si el objetivo del trabajo es establecer relaciones entre volumen por ítem o total por estómago con respecto al tamaño de los anuros.

La identificación de las presas se realizará bajo lupa estereoscópica y, en algunos casos, para presas muy pequeñas o para el reconocimiento de ciertas estructuras de valor taxonómico de las presas se utilizará microscopio óptico. Es importante limpiar bien cada ítem alimentario antes de proceder a su identificación y medición. Para algunas presas será necesario, además, realizar un trabajo meticuloso que incluye acomodar, desenvolver o reconstruir el cuerpo (**Figura 4.5.5a-e**) antes de su identificación. Para ello puede servirse de agua, pinceles, pinzas y agujas histológicas. Algunos ítems son recuperados en posiciones difíciles de medir (**Figura 4.5.5c-e**), por lo que se deberán tener especial cuidado al tomar su longitud y ancho (**Figura 4.5.4c**), unificando este procedimiento para todas las presas. Una vez identificadas y medidas, se volcará toda la información en planillas y el contenido de esto-

macal de cada ejemplar será acondicionado, fijado en alcohol 70% y guardado nuevamente en tubos eppendorf o recipientes adecuados a su volumen. Es fundamental que sean cuidadosamente rotulados con información básica como: especie, número de ejemplar/colecta, fecha y sitio de captura.

Para la obtención del largo y ancho de cada presa, se recomienda el uso de un calibre digital o escalas de medición incorporadas en oculares. Estas medidas se obtendrán sin considerar antenas, apéndices ni ornamentaciones^(4,96). En muchos estudios consideran el ancho máximo del cuerpo, lo que podría influir luego en una sobrestimación del volumen en aquellas presas que presentan formas triangulares o con abdómenes y tórax con marcada diferencia de tamaño. Por lo que se recomienda que, en esos casos, el investigador seleccione la porción del cuerpo cuyo ancho sea el más representativo en todo el ejemplar. Con la información de largo y ancho del cuerpo se calculará luego el volumen (mm^3) por individuo con ayuda de fórmulas como la del esferoide/elipsoide (descrita en la **Parte II** de este Manual).

El desplazamiento de un líquido (agua) en una probeta es otra alternativa. Éste método puede ser desventajoso cuando se presentan presas pequeñas o estructuras (élitros) debido a la dificultad de romper la tensión superficial del agua, lo que resulta en una subestimación del volumen. En esos casos, una alternativa factible es agrupar todas las presas de cada taxón y estimar así el volumen total, luego dividirlo por el número de ejemplares sumergidos, y obtener de esta manera el volumen individual promedio para cada ítem presa.

Al determinar las presas sistemáticamente (tipo de presa/ítem alimentario), cuantitativamente (número y porcentaje numérico), morfométrica y volumétricamente (largo, ancho, volumen y su porcentaje) y establecer el número de tractos en los que aparece cada ítem sobre la muestra total analizada (frecuencia de ocurrencia) ya tendremos información fundamental para describir la estructura de la dieta. Un dato relevante a destacar es el número (o porcentaje) de tractos digestivos sin contenidos, ya que esta información, relacionada a la frecuencia de consumo de cada ítem presa, aportará luego información valiosa para establecer la estrategia empleada para la captura de las presas (forrajero activo o al acecho).

4.5.2.3 Estimación de la oferta de alimento

4.5.2.3a -Larvas

Para el muestreo de la oferta trófica, deberán considerarse las diferentes comunidades acuáticas de las que obtienen su alimento: fitoplancton, perifiton, zooplancton, zoobentos y fitobentos, en réplicas por microhábitats.

Para asegurar su independencia, cada muestra debe ser tomada con cierta distancia una de otra (p.e. 5 m, siempre y cuando las dimensiones del cuerpo de agua lo permitan). Las muestras de fitoplancton pueden ser recolectadas con una botella Ruttner de 100 ml y luego fijadas con Lugol (disolución de yodo molecular I₂ y yoduro potásico KI en agua destilada) acidificado (1%). Las algas del perifiton pueden ser obtenidas de diferentes secciones sumergidas de las macrófitas más abundantes del sitio (tallos y hojas). Para ello, se procederá a cortar porciones de tallos y hojas sumergidas colonizadas por perifiton, las cuáles serán transportadas al laboratorio en bolsas con agua destilada. En el laboratorio, la comunidad perifítica será separada del sustrato mediante el raspado por medio de una hoja de afeitar sobre una bandeja colectora. Se traspasará el perifiton a un recipiente con tapa donde fue fijado con lugol acidificado⁽⁹¹⁾. Para la toma de muestras de zooplancton se podrá emplear un tubo muestreador rígido diseñado para ser utilizado en mesocosmos y en cuerpos de agua someros⁽⁹⁷⁾, o cualquier recipiente para extraer agua de la columna. El agua (volumen conocido) deberá ser filtrada empleando una red de 55µm de abertura de malla, para la colecta del zooplancton. Las muestras pueden ser fijadas con formaldehído al 4% y teñidas con eritrosina. Para analizar la composición y abundancia del zoobentos se deben extraer muestras del sedimento; por ejemplo, con ayuda de un muestreador tubular o "Corer" de diámetro conocido. Las muestras serán filtradas con un tamiz de 200 µm de abertura de malla y fijadas en formaldehido al 10%. Los invertebrados deberán ser teñidos con eritrosina para una mejor observación y extraídos manualmente del sedimento bajo lupa (a 10x), para luego conservarlos en etanol al 70%. Por último, para analizar la composición y abundancia del fitobentos, pueden utilizarse dispositivos artificiales (p.e. baldosas cerámicas blancas lisa de 20 cm²), ubicadas sobre el fondo del cuerpo de agua donde se reproducen los anfibios, para su colonización. Los mismos deberán permanecer sumergidos al menos durante un mes. Luego se recolectarán y se analizarán en laboratorio las algas y otros organismos que colonizan el sustrato, refiriendo siempre las abundancias a la superficie analizada (p.e. ind/ml, ind/cm²) para poder estimar densidades y analizar⁽⁹⁸⁾.

4.5.2.3b -Adultos / postmetamorfos

Para el muestreo de la oferta trófica, debe considerarse el microhábitat de forrajeo de la o las especies de anfibios bajo estudio. Cada técnica utilizada tiene ventajas y desventajas por lo que resulta complejo elegir un único método cuando se trabaja con ensambles de varias especies de anuros que se alimentan en distintos estratos o microhábitats. Entre las más utilizadas se encuentran las trampas de caída, redes, aplicación de insecticidas, redes

acuáticas⁽⁹⁹⁾, trampas de luz o pegajosas. En cualquier caso, la/s técnica/s de muestreo de la oferta trófica utilizada/s, deben colectar de manera no selectiva (según su abundancia relativa en el microhábitat donde forrajea el anuro) todos los taxones identificados en la dieta de los anfibios. Por ejemplo, para especies “trepadoras” como los hílidos, que suelen alimentarse sobre la vegetación palustre, macrófitas o vegetación herbácea y arbustiva que rodea los cuerpos y cursos de agua, puede seleccionarse una metodología de recorrido de transectas barriendo con red entomológica sobre el microhábitat donde se capturaban los anfibios. Los muestreos con red entomológica pueden ser utilizados para obtener información cuali-cuantitativa para comparar comunidades de insectos^(100,101). Para que los datos sean representativos de la oferta trófica de las especies “trepadoras”, se puede avanzar a través de la transecta golpeando con el aro de la red la vegetación palustre y macrófitas donde sean colectados los anfibios, y describiendo con la misma una figura de ocho acostado. Los muestreos pueden realizarse durante un espacio temporal predeterminado de manera de estandarizar el esfuerzo. Esta metodología es ampliamente utilizada en los trabajos de ecología alimentaria de anfibios en los que se evalúa la selectividad trófica^(8,13,15,16,56). Para estimar la oferta de alimento de especies de anfibios que suelen alimentarse sobre el sustrato (ej. leptodactílidos, bufónidos, microhílidos, etc.) se deben muestrear las presas potenciales que deambulan por ese microhábitat. Un método sugerido para esta tarea es la utilización de trampas de caída^(14,56,102,103), donde se obtiene gran variedad de artrópodos edáficos o del mantillo y epi-edáficos o marchadores.

Bibliografía

1. Stebbins, R.C. & Cohen, N.W. 1995. A Natural History of Amphibians. Princeton University Press, New Jersey.
2. Toft, C.A. 1980. Feeding ecology of thirteen syntopic anurans in a seasonal tropical environment. *Oecologia* 45: 131-141.
3. Flowers, M.A. & Graves B.M. 1995. Prey selectivity and size-specific diet changes in *Bufo cognatus* and *B. woodhousii* during early postmetamorphic ontogeny. *Journal of Herpetology* 29: 608-612.
4. Parmelee, J.R. 1999. Trophic ecology of a tropical anuran assemblage. *Scientific papers, Natural History Museum, The University of Kansas* 11: 1-59.
5. Peltzer, P.M. & Lajmanovich, R.C. 2002. Preliminary studies of food habits of *Lysapsus limellus* (Anura, Pseudidae) in lentic environments of Parana river, Argentina. *Bulletin de la Société Herpétologique de France* 101: 53-58.
6. Attademo, A.M.; Peltzer, P.M. & Lajmanovich, R. 2005. Amphibians occurring in soybean and implications for biological control in Argentina. *Agriculture, Environment and Ecosystems* 106: 389-394.
7. Peltzer, P.M.; Attademo, A.M.; Lajmanovich, R.C.; Junges, C.M.; Beltzer, A.H. & Sanchez, L.C. 2010. Trophic dynamics of three sympatric anuran species in soybean agroecosystem from Santa Fe Province, Argentina. *Herpetological Journal* 20: 261-269.
8. López J.A.; Scarabotti, P.A. & Ghirardi, R. 2015. Amphibian trophic ecology in increasingly

- human-altered wetlands. *Herpetological Conservation and Biology* 10: 819-832.
9. Basso, N. 1990. Estrategias adaptativas en una comunidad subtropical de anuros. *Cuadernos de Herpetología*. Series Monográficas N° 1.
 10. Lajmanovich, R.C. 1996. Dinámica trófica de juveniles de *Leptodactylus ocellatus* (Amphibia: Anura), en una isla del Paraná, Argentina. *Cuadernos de Herpetología* 10: 11-23.
 11. Hirai, T. & Matsui, M. 1999. Feeding Habits of the pond frog, *Rana nigromaculata*, inhabiting rice field in Kyoto Japan. *Copeia* 1999: 940-947.
 12. Hirai, T. & Matsui, M. 2000. Ant specialization in diet of the narrowmouthed toad, *Microhyla ornata*, from Amamioshima Island of the Ryukyu Archipelago. *Current Herpetology* 19: 27-34.
 13. Hirai, T. & Matsui, M. 2000. Myrmecophagy in a Ranid Frog *Rana rugosa*: Specialization or weak avoidance to ant eating? *Zoological Science* 17: 459-466.
 14. Hirai, T. & Matsui, M. 2000. Feeding habits of the Japanese Tree Frog, *Hyla japonica*, in the reproductive season. *Zoological Science* 17: 977-982.
 15. Hirai, T. & Matsui, M. 2001. Food habits of an endangered Japanese frog, *Rana porosa brevipedata*. *Ecological Research* 16: 737-743.
 16. Hirai T. & Matsui M. 2001. Food partitioning between two syntopic ranid frogs, *Rana nigromaculata* and *R. rugosa*. *Herpetological Journal* 11: 109-115.
 17. Kupfer, A.; Nabhitabhata, J. & Himstedt, W. 2005. From water into soil: trophic ecology of a caecilian amphibian (Genus *Ichthyophis*). *Acta Oecologica* 28: 95-105.
 18. López, J.A.; Scarabotti, P.A.; Medrano, M.C. & Ghirardi, R. 2009. Is red spotted green frog (*Hypsiboas punctatus*, Anura: Hylidae) selecting its preys? Prey availability importance when analyzing trophic selectivity. *Revista de Biología Tropical* 57: 847-857.
 19. Lima, P.A. 1998. The effects of size on the diets of six sympatric species of post metamorphic litter anurans in central Amazonia. *Journal of Herpetology* 32: 392-399.
 20. Lima, A.P. & Magnusson, W.E. 1998. Partitioning seasonal time: interactions among size, foraging activity and diet in leaf-litter frogs. *Oecologia* 116: 259-266.
 21. Hirai, T. 2002. Ontogenetic change in the diet of the pond frog, *Rana nigromaculata*. *Ecological Research* 17: 639-644.
 22. Daly, J.W.; Garraffo, H.M.; Spande, T.F.; Yeh, H.J.; Peltzer, P.M.; Cacivio, P.; Baldo, J.D. & Faivovich, J. 2008. Indolizidine 239Q and Quinolizidine 275I. Major alkaloids in two Argentinian bufonid toads (*Melanophryniscus*). *Toxicon* 52: 858-870.
 23. Vaira, M.; Akmentins, M.S. & Lavilla, E.O. (eds.). 2018. Plan de Acción para la conservación de los Anfibios de la República Argentina. *Cuadernos de Herpetología* 32 (supl. 1): 1-56.
 24. Lajmanovich, R.C. 1997. Alimentación de larvas de anuros en ambientes temporales del sistema del río Paraná, Argentina. *Doñana Acta Vertebrata*, 24: 191-202.
 25. Lajmanovich, R.C. 2000. Interpretación ecológica de una comunidad larvaria de anfibios anuros. *Interciencia* 25: 71-79.
 26. Echeverría, D.D. & Conforti, V. 2000. Euglenoids living in the intestines of microhylid tadpoles of Argentina. *Alytes* 18: 81-89.
 27. Arias, M.; Peltzer, P.M. & Lajmanovich, R.C. 2002. Diet of the giant tadpole *Pseudis paradoxa platensis* (Anura, Pseudidae). *Phyllomedusa, Journal of Neotropical Herpetology* 1: 97-100.
 28. Vera Candiotti, F.; Lavilla, E. & Echeverría, D. 2004. Feeding mechanisms in two treefrogs, *Hyla nana* and *Scinax nasicus* (Anura: Hylidae). *Journal of Morphology* 26: 206-224.
 29. Vera Candiotti, F. 2005. Morphology and feeding in tadpoles of *Ceratophrys cranwelli* (Anura: Leptodactylidae). *Acta Zoologica* 86: 1-11.
 30. Antoniazzi, A.E.; López, J.A.; Lorenzón, R.E.; Saigo, M.; Devercelli, M.; Maneyro, R. & Marchese, M. 2020. Trophic ecology of tadpoles in floodplain wetlands: combining gut contents, selectivity and stable isotopes to study feeding segregation of syntopic species. *Hydrobiologia* 847: 3013-3024.
 31. Lajmanovich, R.C. 1994. Contribución al conocimiento de la alimentación de larvas de la rana criolla *Leptodactylus ocellatus* (Amphibia, Leptodactylidae) en el Paraná medio, Argentina. *Studies on Neotropical Fauna and Environment* 29: 55-61.
 32. Lajmanovich, R.C. & Faivovich, J. 1998. Dieta larval de larvas de *Phyllomedusa tetraploidea* Pombal & Haddad, 1992 en la provincia de Misiones, Argentina. *Alytes* 15: 7-14.
 33. Echeverría, D.D.; Volpedo, A.V. & Mascitti, V.I. 2007. Diet of tadpoles from a pond in Iguazú National Park. *Gayana* 71: 8-14.

34. Vera Candiotti, F. 2007. Anatomy of anuran tadpoles from lentic water bodies: systematic relevance and correlation with feeding habits. *Zootaxa* 1600: 1-175.
35. Duellman, W.E. & Trueb, L. 1986. *Biology of Amphibians*. McGraw-Hill Book Company, New York.
36. Díaz-Paniagua, C. 1985. Larval diets related to morphological characters of five anuran species in the biological reserve of Doñana (Huelva, Spain). *Amphibia-Reptilia* 6: 307-322.
37. Rossa-Feres, D.C.; Jim, J. & Fonseca, M.G. 2004. Diets of tadpoles from a temporary pond in southeastern Brazil (Amphibia, Anura). *Revista Brasileira de Zoologia* 21: 745-754.
38. Dutra, S.L. & Callisto, M. 2005. Macroinvertebrates as tadpole food: importance and body size relationships. *Revista Brasileira de Zoologia* 22: 923-927.
39. Inger, R.F. 1986. Diet of tadpoles living in a Bornean rain forest. *Alytes* 5: 153-164.
40. Kupferberg, S.J.; Marks, J.C. & Power, M.E. 1994. Effects of variation in natural algal and detrital diets on larval anuran (*Hyla regilla*) life history traits. *Copeia* 1994: 446-457.
41. Kupferberg, S.J. 1997. Facilitation of periphyton production by tadpole grazing: functional differences between species. *Freshwater Biology* 37: 427-439.
42. Schiesari, L.; Werner, E.E. & Kling, G.W. 2009. Carnivory and resource-based niche differentiation in anuran larvae: implications for food web and experimental ecology. *Freshwater Biology* 54: 572-586.
43. Asrafuzzaman, S.; Mahapatra, S.; Rut, J. & Sahoo, G. 2018. Dietary assessment of five species of anuran tadpoles from northern Odisha, India. *Journal of Threatened Taxa* 10: 12382-12388.
44. Dalu, T.; Weyl, O.L.F.; Froneman, P.W. & Wasserman, R.J. 2015. Trophic interactions in an austral temperate ephemeral pond inferred using stable isotope analysis. *Hydrobiologia* 768: 81-94.
45. Schalk, C.M.; Montaña, C.G.; Winemiller, K.O. & Fitzgerald, L.A. 2017. Trophic plasticity, environmental gradients and food-web structure of tropical pond communities. *Freshwater Biology* 62: 519-529.
46. Vera Candiotti, F. 2006. Ecomorphological guilds in anuran larvae: an application of geometric morphometric methods. *Herpetological Journal* 16: 149-162.
47. Haad, M.B.; Vera Candiotti, F. & Baldo, D. 2011. Shape variation in lentic and lotic tadpoles of *Melanophryniscus* (Anura: Bufonidae). *Studies on Neotropical Fauna and Environment* 46: 91-99.
48. Toft, C.A. 1981. Feeding ecology of Panamanian Litter Anurans: Patterns in diet and foraging mode. *Journal of Herpetology* 15: 139-144.
49. Toft, C.A. 1985. Resource partitioning in amphibians and reptiles. *Copeia* 1985: 1-21.
50. Toft, C.A. 1995. Evolution of diet specialization in poison dart frogs (Dendrobatidae). *Herpetologica* 5: 202-216.
51. Peltzer, P.M. & Lajmanovich, R.C. 2000. Dieta de *Hyla nana* (Anura: Hylidae) en charcas temporarias del Río Paraná, Argentina. *Boletín de la Asociación Española de Herpetología* 11: 71-73.
52. Duré, M.I. & Kehr, A.I. 2004. Influence of microhábitat on the trophic ecology of two leptodactylids from northeastern Argentina. *Herpetologica* 60: 295-303.
53. Peltzer, P.M.; Lajmanovich, R.C. & Cacicivio, P.M. 2000. Food habits of *Phyllomedusa hypochondrialis azurea* (Anura, Hylidae) in temporary ponds of Chaco, Argentina. *Bulletin de la Société Herpétologique de France* 93: 5-11.
54. Duré, M.I.; Schaefer, E.F.; Hamann, M.I. & Kehr, A.I. 2004. Consideraciones ecológicas sobre la dieta, reproducción y el parasitismo de *Pseudopaludicola boliviana* (Anura: Leptodactylidae) de Corrientes, Argentina. *Phyllomedusa* 3: 121-131.
55. Duré, M.I.; Kehr, A.I. & Schaefer, E.F. 2009. Niche overlap and resource partitioning among five sympatric bufonids from northeastern Argentina. *Phyllomedusa* 8: 27-39.
56. Attademo, M.; Peltzer, P.M. & Lajmanovich, R.C. 2007. Feeding habits of *Physalaemus biligonigerus* (Anura, Leptodactylidae) from soybean field of Córdoba Province, Argentina. *Russian Journal of Herpetology* 14: 1-6.
57. Attademo, A.M.; Cejas, W.; Peltzer, P.M. & Lajmanovich R.C. 2007. Phenology in diet of *Chaunus arenarum* (Anura: Bufonidae) in a soybean field of Córdoba province, Argentina. *Revista Española de Herpetología* 21: 41-48.
58. López, J.A.; Peltzer, P.M. & Lajmanovich, R.C. 2002. *Hyla punctata* (NCN). Diet. *Herpetological Review* 33: 125-126.

59. López, J.; Peltzer, P.M. & Lajmanovich R. 2005. Dieta y solapamiento del subnicho trófico de nueve especies de leptodactílidos en el Parque General San Martín (Argentina). *Revista Española de Herpetología* 19: 19-31.
60. López J.A.; Arias, M.M.; Peltzer, P.M. & Lajmanovich, R.C. 2005. Dieta y variación morfométrica de *Leptodactylus ocellatus* (Linnaeus, 1758) (Anura: Leptodactylidae) en tres localidades del centro-este de Argentina. *Boletín de la Asociación Herpetológica Española* 16: 32-39.
61. López, J.A.; Ghirardi, R.; Scarabotti, P.A. & Medrano, M.C. 2007. Feeding ecology of *Elachistocleis bicolor* (Anura, Microhylidae) in a riparian locality of Middle Paraná river. *Herpetological Journal* 17: 48-53.
62. Johnson, D.H. 1980. The comparison of usage and availability measurements for evaluating resource preference. *Ecology* 61: 65-71.
63. Lawlor, L.R. 1980. Overlap, similarity, and competition coefficients. *Ecology* 61: 245-251.
64. Basso, N. 1990. Estrategias adaptativas en una comunidad subtropical de anuros. Cuadernos de Herpetología. Series Monográficas N° 1.
65. Lajmanovich, R.C. 1994. Hábitos alimentarios de *Bufo paracnemis* (Amphibia Bufonidae) en el Paraná medio, Argentina. *Revue D'Hydrobiologie Tropicale* 27: 107-112.
66. Lajmanovich, R.C. 1995. Relaciones tróficas de bufónidos (Anura: Bufonidae) en ambientes del río Paraná, Argentina. *Alytes* 13: 87-103.
67. Peltzer, P.M. & Lajmanovich, R.C. 1999. Análisis trófico de dos poblaciones de *Scinax nasicus* Cope, 1862 (Anura: Hylidae), Argentina. *Alytes* 16: 84-96.
68. Peltzer, P.M. & Lajmanovich, R.C. 2001. *Hyla raniceps* (NCN). Diet. *Herpetological Review* 32: 247-248.
69. López, J.; Peltzer, P. & Lajmanovich, P. 2004. *Physalaemus riograndensis* (NCN). Diet. *Herpetological Review* 34: 360.
70. Vera Candiotti, F. & Lajmanovich, R.C. 1998. Contribución al conocimiento de la alimentación de larvas de *Phyllomedusa hypochondrialis azurea* (Amphibia: Hylidae) en ambientes temporales de la provincia de Santa Fe, Argentina. *Boletín de la Sociedad Biológica de Concepción* 69: 87-93.
71. Do Prado, V.H.; Fonseca, M.G.; De Almeida, F.V.; Junior, O.N. & Rossa-Feres, D.D.C. 2009. Niche occupancy and the relative role of micro-habitat and diet in resource partitioning among pond dwelling tadpoles. *South American Journal of Herpetology* 4: 275-285.
72. Schriever, T.A. & Williams, D.D. 2013. Ontogenetic and individual diet variation in amphibian larvae across an environmental gradient. *Freshwater Biology* 58: 223-236.
73. Bionda, C.; Luque, E.; Gari, N.; Salas, N.; Lajmanovich, R. & Martino, A. 2013. Diet of tadpoles of *Physalaemus biligonigerus* (Leiuperidae) from agricultural ponds in the central region of Argentina. *Acta Herpetologica* 8: 141-146.
74. Shaffer, H.B.; Alford, R.A.; Woodward, B.D.; Richards, S.J.; Altig, R.G. & Gascon, C. 1994. Quantitative Sampling of Amphibian Larvae: 130-141. En: Heyer, R.W. et al., (eds.) *Measuring and Monitoring Biological Diversity: Standard Methods for Amphibians*. Smithsonian Institution, Washington D.C.
75. Close, B.; Banister, K.; Baumans, V.; Bernoth, E.M.; Bromage, N.; Bunyan, J.; Erhardt, W.; Flecknell, P.; Gregory, N.; Hackbarth, H.; Morton, D. & Warwick, C. 1997. Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 2. *Laboratory animals* 31: 1-32.
76. Santos, F.J.M.; Protazio, A.S.; Moura, C.W.N. & Junca, F.A. 2015. Diet and food resource partition among benthic tadpoles of three anuran species in Atlantic Forest tropical streams. *Journal of Freshwater Ecology* 31: 53-60.
77. Antoniazzi C.E. 2018. Larvas de anuros: posición trófica y efecto en la estructuración de las comunidades acuáticas de los humedales. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, de la Universidad Nacional de Córdoba.
78. Altig, R. & Johnston, G.F. 1989. Guilds of anuran larvae: Relationships among developmental modes, morphologies and habits. *Herpetological Monographs* 2: 81-109.
79. Torres-Ruiz, M.; Wehr, J.D. & Perrone, A.A. 2007. Trophic relations in a stream food web: importance of fatty acids for macroinvertebrate consumers. *Journal of the North American Benthological Society* 26: 509-522.
80. Caut, S.; Angulo, E.; Díaz-Paniagua, C. & Gomez-Mestre, I. 2013. Plastic changes in tadpole trophic ecology revealed by stable isotope analysis. *Oecologia* 173: 95-105.

81. Post, D.M. 2002. Using stable isotopes to estimate trophic position: models, methods, and assumptions. *Ecology* 83: 703-718.
82. Fry, B. 2007. *Stable Isotope Ecology*. Springer Science & Business Media, New York.
83. Altig, R.; Whiles, M.R. & Taylor, C.L. 2007. What do tadpoles really eat? Assessing the trophic status of an understudied and imperiled group of consumers in freshwater habitats. *Freshwater Biology* 52: 386-395.
84. Lajmanovich, R.C.; Emiliani, F. & Peltzer, P.M. 2001. Bacterias coliformes y otras bacterias de interés sanitario en larvas de *Bufo arenarum* Hensel, 1887 (Anura, Bufonidae) en Santa Fe (Argentina). *Alytes* 18: 197-208.
85. Wang, X.; Bo, X.; Yao, Q.; Wu, M. & Wang, H. 2019. The effect of fluorine exposure on morphological indicators and intestinal microbial community in *Bufo gargarizans* tadpoles. *Ecological Indicators* 98: 763-771.
86. Evariste, L.; Barret, M.; Mottier, A.; Mouchet, F.; Gauthier, L. & Pinelli, E. 2019. Gut microbiota of aquatic organisms: a key endpoint for ecotoxicological studies. *Environmental Pollution* 248: 989-999.
87. Xie, L.; Zhang, Y.; Gao, J. & Li, X., Wang, H. 2020. Nitrate exposure induces intestinal microbiota dysbiosis and metabolism disorder in *Bufo gargarizans* tadpoles. *Environmental Pollution* 264: 114712.
88. Solé, M.; Beckham, O.; Pelz, B.; Kwet, A. & Wolf, E. 2005. Stomach flushing for diet analysis in anurans: an improved protocol evaluated in a case study in Araucaria forests, southern Brazil. *Studies on Neotropical Fauna and Environment* 40: 23-28.
89. Hill, B.H.; Stevenson, R.J.; Herlihy, A.T.; McCormick, F.H.; Kaufmann, P.R. & Johnson, C.B. 2000. Use of periphyton assemblage data as an index of biotic integrity. *Journal of the North American Benthological Society* 19: 50-67.
90. Villafañe, V.E. & Reid, F.M.H. 1995. Métodos de Microscopia para la Cuantificación del Fitoplancton: 169-185. *En: Alveal, K.; Ferrario, M.E.; Oliveira, E.C. & Sar, E. (eds.). Manual de Métodos Ficológicos*. Universidad de Concepción, Chile.
91. Baffico, G.D. & Úbeda, C.A. 2006. Larval diet of the frog *Alsodes gargola* (Leptodactylidae: Telmatobinae) and some ecological considerations on its role in alpine and mountain aquatic environments in Patagonia. *Amphibia-Reptilia* 27: 161-168.
92. Lopretto, E.C. & Tell, G. 1995. *Ecosistemas de aguas continentales. Metodologías para su estudio*. Ediciones Sur. Argentina.
93. Bellinger, E.G. & Sigeo, D.C. 2010. *Freshwater Algae: Identification and Use as Bioindicators*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd.
94. Kruk, C.; Huszar, V.L.M.; Peeters, E.T.H. M.; Bonilla, S.; Costa, L.; Lurling, E.T.H. M.; Reynolds, C.S. & Scheffer, M. 2010. A morphological classification capturing functional variation in phytoplankton. *Freshwater Biology* 55: 614-627.
95. Hillebrand, H.; Dürselen, C.D.; Kirschtel, D.; Pollinger, U. & Zohary, T. 1999. Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. *Journal of Phycology* 35: 403-424.
96. Magnusson, W.E.; Lima, A.P.; Alves Da Silva, W.; Carmozina, D.E. & Araujo, M. 2003. Use of geometric forms to estimate volume of invertebrates in ecological studies of dietary overlap. *Copeia* 2003: 13-19.
97. Paggi, A.C.; Fernández, H.R. & Domínguez, E. 2001. Diptera: Chironomidae: 167-193. *En: Hernández, H.R. & Domínguez, E. (eds.). Guía Para la Determinación de los Artrópodos Bentónicos Sudamericanos*. Investigaciones de la UNT, Serie.
98. Lajmanovich, R.C. & Fernández, V.C. 1995. Alimentación de larvas de *Bufo arenarum* Hensel (Amphibia: Bufonidae) en ambientes del río Paraná, Argentina. *Boletín del Museo de Historia Natural de Chile* 45: 7-18.
99. Pianka, E.R. 1973. The structure of lizard communities. *Annual Review of Ecology and Systematics* 4: 53-74.
100. Hayward, K.J. 1971. *Guía para el Entomólogo Principiante*. Universidad Nacional de Tucumán. Fundación e Instituto Miguel Lillio, Tucumán.
101. Janzen, D.H. 1973. Sweet simples of tropical foliage insects: description of study sites, with data on species abundances and size distribution. *Ecology* 54: 658-708.
102. Bennett, D.P. & Humphries, D.A. 1978. *Introducción a la Ecología de Campo*. España.
103. Peña, L.E. 1998. *Introducción al Estudio de los Insectos de Chile*. Impresos Universitaria. Santiago de Chile.