

Metodología de muestreo de suelo y ensayos a campo

Protocolos básicos comunes

2.^a Edición

Editores:

Diego J. Santos, Marcelo G. Wilson, Miriam M. Ostinelli



Metodología de muestreo de suelo y ensayos de campo: protocolos básicos comunes / Cristián Álvarez ... [et al.]; compilado por Diego José Santos; Marcelo Germán Wilson; Miriam Mabel Ostinelli; editado por Diego José Santos; Marcelo Germán Wilson; Miriam Mabel Ostinelli. - 2a ed. - Entre Ríos: Ediciones INTA, 2017.

Libro digital, PDF

Archivo Digital: descarga y online

ISBN 978-987-521-862-8

1. Suelos. 2. Biología del Suelo. 3. Carbono. I. Álvarez, Cristián II. Santos, Diego José, comp. III. Wilson, Marcelo Germán, comp. IV. Ostinelli, Miriam Mabel, comp. V. Santos, Diego José, ed. VI. Wilson, Marcelo Germán, ed. VII. Ostinelli, Miriam Mabel, ed.

CDD 550

Un especial agradecimiento a Rosa Ana Milocco del Grupo de Comunicaciones de INTA EEA Paraná por sus valiosísima ayuda e infinita paciencia para el diseño de esta publicación.



Ministerio de Agroindustria
Presidencia de la Nación



Programa Nacional Cereales y Oleaginosas

***“Hacia la transición agroecológica:
el suelo como foco”***

Programa Nacional Suelos

"2017 – Año de las Energías Renovables"

METODOLOGÍA DE MUESTREO DE SUELO Y ENSAYOS A CAMPO

Protocolos básicos comunes

2^{da} Edición

Diego J. Santos, Marcelo G. Wilson, Miriam M. Ostinelli

Editores

Se presenta este documento como respuesta a la iniciativa surgida en el Taller de PNCER 022411 organizado en INTA EEA Oliveros en septiembre de 2010, derivada de la necesidad de redactar protocolos básicos sobre metodología de muestreo de suelo a campo, que sean de uso común para todos los investigadores que trabajan en esta temática en Argentina.

Esta segunda edición es una versión revisada y, especialmente, ampliada de la primera. Gracias al esfuerzo de profesionales de INTA y Universidades de todo el país, se actualizaron los capítulos referidos a Carbono, Estructura y Agua del suelo, y se agregaron aquellos referidos a Disponibilidad de nutrientes y a Biología de suelo.

La presente publicación constituye un producto compartido entre los Programas Nacionales Cereales y Oleaginosas y Suelos del INTA.

"Los escenarios más propicios para la innovación en agricultura no se construyen sino con investigación que aborde la complejidad de los ambientes y sistemas productivos de manera integral y con continuidad. Es desde la convergencia de diferentes saberes y especialidades donde se generan las mejores soluciones y se proyectan las expectativas futuras. Bajo estas premisas, las páginas de este libro pretenden difundir los aportes científico-tecnológicos en el tema de metodología de muestreo de suelos, fruto del trabajo de profesionales de diferentes unidades del INTA en proyectos nacionales enmarcados en los Programas Nacionales de Cereales y Oleaginosas y de Suelos.

En esta segunda edición se ha cambiado la estructura del libro y ampliado los contenidos, alentados por el éxito de la primera edición. Esperamos que esta obra sirva a los diferentes actores del sector agropecuario como herramienta para mejorar la sustentabilidad integral de los sistemas productivos, y reflexionar sobre los caminos que con seguridad nos lleven a ello."

Ing. Agr. Guillermo H. Eyhérbide, MSc., PhD.
Coordinador Programa Nacional Cereales y
Oleaginosas INTA

"Este libro, fundamentado en la articulación existente entre los Programas Nacionales Cereales y Oleaginosas y Suelos de INTA, pone a disposición de los actores que conforman el Sector Agroalimentario Argentino las referencias de investigación de largo plazo referidas a las metodologías de suelo y ensayos a campo. Es una contribución original, de síntesis crítica, que tiende a disminuir la incertidumbre y el debate reinantes alrededor del tema.

Para su construcción, se puso en funcionamiento una experiencia colectiva con referentes provenientes de la Física, Química y Biología de suelos, quienes muestran de manera simple y precisa los procedimientos necesarios para el muestreo de suelos en función de los diferentes objetivos perseguidos.

Esta contribución también está destinada al esclarecimiento de políticas públicas, dado que se complementa estrechamente con el "Manual de indicadores de calidad del suelo para las ecorregiones de Argentina", que tiene como fin generar alertas tempranas de procesos de degradación de las tierras bajo diferentes sistemas productivos e instrumentar políticas de planificación para su uso sostenible.

Por último, agradezco al conjunto de contribuyentes de esta obra que respondieron rápidamente y que realizaron su trabajo en forma desinteresada. Estoy seguro que se está brindando un producto de calidad. Por ello, deseo que alcance su cometido."

Dr. Adrián Enrique Andriulo
Coordinador Programa Nacional Suelos
INTA

Autores

ALVAREZ, Cristian Osvaldo. INTA EEA Anguil

ANDRIANI, José. INTA EEA Oliveros

ANDRIULO, Adrián Enrique. INTA EEA Pergamino

ANGELINI, Hernán Pablo. INTA EEA Balcarce

BASANTA, María del Valle. INTA EEA Rafaela

BEDANO, José Camilo. Fac Cs Exactas, F. Químicas y Naturales, UNRC - CONICET

BENINTENDE, Silvia. FCA, UNER

CARFAGNO, Patricia. INTA Instituto de Suelos

CAZORLA, Cristian. INTA EEA Marcos Juárez

COVACEVICH, Fernanda. INBIOTEC-CONICET y FIBA

DE BATTISTA, Juan José. INTA EEA Concepción del Uruguay

DOMÍNGUEZ, Anahí. Fac Cs Exactas, F. Químicas y Naturales, UNRC - CONICET

EIZA, Maximiliano. INTA Instituto de Suelos

EYHERABIDE, Mercedes. INTA EEA Balcarce

FERNÁNDEZ, Romina. INTA EEA Anguil

FERRARI, Manuel. INTA EEA Pergamino

GALARZA, Carlos. INTA EEA Marcos Juárez

GIL, Rodolfo. INTA Instituto de Suelos

GUDELJ, Olga. INTA EEA Marcos Juárez

GUDELJ, Vicente. INTA EEA Marcos Juárez

LUPI, Ana María. INTA Instituto de Suelos

MICHELENA, Roberto. INTA Instituto de Suelos

MONDINO, Eduardo Ariel. INTA EEA Balcarce

OSTINELLI, Miriam Mabel. INTA Instituto de Suelos

QUIROGA, Alberto. INTA EEA Anguil

SAINZ ROZAS, Hernán. INTA EEA Balcarce

SALVAGIOTTI, Fernando. INTA EEA Oliveros

SÁNCHEZ, Héctor. INTA EEA Famaillá

SÁNCHEZ, María Cristina. INTA EEA Santiago del Estero

SASAL, María Carolina. INTA EEA Paraná

TABOADA, Miguel. INTA Instituto de Suelos

TORESANI, Silvia. FCA UNR

VARGAS GIL, Silvina. INTA IPAVER - CONICET

WILSON, Marcelo Germán. INTA EEA Paraná

Editores

SANTOS, Diego José. INTA EEA Paraná

WILSON, Marcelo Germán. INTA EEA Paraná

OSTINELLI, Miriam Mabel. INTA Instituto de Suelos

Índice general

Introducción.....	7
Carbono Orgánico del suelo.....	10
Estructura del suelo.....	21
Agua del suelo.....	53
Disponibilidad de nutrientes.....	70
Biología de suelo	91
Bibliografía.....	146

4. MESO Y MACROFAUNA DEL SUELO

BEDANO, José Camilo Bedano; DOMÍNGUEZ, Anahí.

4.1. INTRODUCCIÓN

El muestreo de la fauna del suelo depende en gran medida del objetivo con el que se realice. En este apartado nos centraremos en metodologías útiles para evaluar el efecto de usos de la tierra, de sistemas de manejo o de prácticas agrícolas, ganaderas o forestales sobre la fauna. Sin embargo, las metodologías descriptas también deberían ser útiles para responder otro tipo de preguntas de investigación en contextos similares. El abordaje propuesto implica el estudio de la fauna en los “sitios problema” que se quieren evaluar, más la inclusión de sitios de referencia, “positivos” y “negativos”. Conceptualmente, la fauna que habita el suelo de referencia positivo se define como la condición más cercana a la prístina, no disturbada, y luego las diferentes situaciones problema (usos, manejos, prácticas) son evaluadas contrastando con el sitio de referencia.

Las referencias positivas son sitios no disturbados, idealmente sistemas naturales, que como condición tengan el mismo tipo de suelo que los sitios “problema”. En la región Pampeana argentina es difícil encontrar sitios naturales de buen tamaño, con vegetación natural, lo que lleva a utilizar como referencia sitios con las condiciones más parecidas posibles a esos suelos ideales. Por ejemplo, en cercanías a las áreas de producción agrícola se pueden utilizar relictos de pastizales naturales, lotes abandonados por muchos años, borduras de cárcavas, o parques extensos, sin mayores disturbios por un tiempo prolongado.

Las referencias negativas dependen claramente del objetivo del estudio. Por ejemplo si se quieren evaluar distintos sistemas de manejo, pueden tomarse como referencia negativa sistemas donde la condición a evaluar esté maximizada, por ejemplo un suelo con monocultivo por muchos años, o sistemas con labranza intensiva.

La fauna del suelo representa aproximadamente un 25% del total de 1.5 millones de especies totales descritas en el mundo (Decaëns, 2010). La fauna se clasifica usualmente en base al diámetro corporal, en tres grupos: microfauna (menores a 0.1 mm), mesofauna (entre 0.1 y 2 mm) y macrofauna (mayores a 2 mm). Al tratarse de categorías basadas exclusivamente en el tamaño de los organismos, es importante considerar que sus límites son flexibles.

La microfauna incluye fundamentalmente a protozoos y nematodos, los cuales son abordados de manera especial en otro apartado del presente capítulo. En el presente apartado nos referiremos, entonces, al muestreo de meso y macrofauna.

La mesofauna incluye: ácaros (Arachnida: Acari), colémbolos (Hexapoda: Collembola), enquitreidos (Oligochaeta: Enchytraeidae), sínfilos y paurópodos (Myriapoda: Symphyla, Pauropoda) y proturos (Hexapoda: Protura). En el suelo, la mesofauna cumple un papel esencial en la descomposición de la materia orgánica y el ciclado de nutrientes mediante la transformación física de los restos vegetales, disminuyendo su tamaño y haciéndolos más accesibles para los microorganismos. Además, controlan las poblaciones de hongos y bacterias, ya sea a través de la alimentación sobre éstos, como a través de la dispersión por vía externa (sobre la superficie del cuerpo) o interna (ingestión de esporas) (Behan-Pelletier, 2003). Los grupos más diversos y de mayor abundancia en la mayoría de los suelos son los ácaros y colémbolos (Behan-Pelletier, 2003). Los ácaros son uno de los grupos más abundantes de invertebrados del suelo. Constituyen más del 80% de todos los artrópodos del suelo (Osler & Beattie, 2001). En el suelo están representados por cuatro taxa: el Orden Mesostigmata, los Subórdenes Oribatida y Prostigmata, y la Cohorte Astigmata (incluida actualmente en Oribatida). Los oribátidos son principalmente fungívoros y detritívoros, los Mesostigmata son predadores, los Prostigmata son principalmente fungívoros o predadores y los Astigmata son bacteriófagos (Coleman et al., 2004). Los distintos taxa responden de diferente manera a las perturbaciones relacionadas al cultivo. Los oribátidos son particularmente vulnerables a los disturbios (Lindberg, 2003). Sin embargo, participan fuertemente del proceso de descomposición por trituración e incorporación de materia orgánica. Sus deyecciones (pellets fecales)

proveen una gran superficie para la descomposición primaria por bacterias y hongos.

Los colémbolos también juegan un rol significativo en el funcionamiento del suelo ya que influyen en procesos claves como la descomposición de materia orgánica y el ciclo de los nutrientes (Filser et al., 2002; Petersen, 2002). Son importantes consumidores de residuos vegetales y hongos del suelo.

La macrofauna incluye: lombrices de tierra (Annelida: Oligochaeta: Haplotaxida: Lumbricina), hormigas (Arthropoda: Hexapoda: Hymenoptera: Formicidae), escarabajos (Arthropoda: Hexapoda: Coleoptera), termitas (Arthropoda: Hexapoda: Isoptera), arañas, escorpiones y opiliones (Arthropoda: Chelicerata: Arachnida), ciempiés (Arthropoda: Myriapoda: Chilopoda) y milpiés (Arthropoda: Myriapoda: Diplopoda), bichos bolita (Arthropoda: Crustacea: Isopoda), caracoles y babosas (Mollusca: Gastropoda), entre otros.

El estudio de estos organismos vinculado a los efectos del uso y manejo del suelo se ha revelado en los últimos tiempos como una herramienta poderosa para evaluar cambios en el ecosistema suelo. En parte, para los productores o técnicos allegados a la producción agropecuaria, su estudio representa una ventaja interesante en comparación a otros grupos biológicos, porque su tamaño conspicuo y su relativo buen conocimiento permite que un análisis taxonómico poco profundo, sea útil para construir una aproximación válida del estado de la comunidad macrofaunística en un determinado sitio. Por otra parte, desde un punto de vista académico-científico, estos organismos brindan una información enorme, no sólo vinculada a su propia capacidad para habitar y perdurar en ambientes antropizados, sino porque son fuertes indicadores de la capacidad del suelo para sostener su funcionamiento ecosistémico. Es por eso que se le brinda un interés más profundo a algunos grupos de organismos claves en el desarrollo de procesos ecosistémicos fuertemente vinculados además al sostenimiento en el tiempo de la productividad vegetal. Entre estos organismos, las lombrices de tierra han sido quizás el grupo más estudiado y del cual mejor se comprende su estrecha vinculación con ciertos procesos edáficos importantes. Considerando sus características ecológicas, las diferentes especies de lombrices han sido clasificadas en tres grupos: epigeas, endogeas y anécicas (Bouché, 1977; Edwards

& Bohlen, 1996). Las lombrices *epigeas* viven típicamente en la superficie del suelo o en las porciones superiores del suelo mineral, debajo de la hojarasca; tienen tasas reproductivas altas y crecen rápidamente. Las especies *anécicas* modifican el suelo mediante la formación de galerías verticales permanentes o semipermanentes, y se alimentan principalmente en la superficie del suelo de hojas muertas u otros materiales orgánicos en descomposición. Por último, las especies *endogeas* habitan los horizontes minerales del suelo. Consumen más suelo que las epigeas y que las anécicas; y se nutren de materia orgánica más humificada; aunque algunas especies pueden ocasionalmente movilizarse hasta la superficie y alimentarse en la hojarasca superficial. Las estrategias de vida características de estos tres grupos ecológicos determinan su influencia en los procesos ecosistémicos previamente mencionados. De este modo, las especies epigeas y anécicas tienen un mayor impacto en el proceso de descomposición de residuos vegetales, al triturar y fragmentar la materia orgánica, y en el caso de las anécicas, también al incorporar restos orgánicos a la porción mineral del suelo. En cambio, las especies endogeas están fuertemente vinculadas al proceso de generación de estructura del suelo, contribuyendo también (al igual que las anécicas) al desarrollo de la macroporosidad (Lavelle, 1997; Momo & Falco, 2009).

Muchos otros grupos de la macrofauna edáfica tienen también un rol importante en los procesos edáficos. Tal es el caso de las hormigas y las termitas, que, conjuntamente con las lombrices, integran lo que se conoce como el grupo de “ingenieros del ecosistema”. Este concepto se ha utilizado para describir a aquellos organismos que habitan el suelo y que son lo suficientemente grandes como para producir cambios físicos en él, afectando su estructura. Por otra parte, otros grupos, como los coleópteros, arácnidos y miriápodos, pueden estar fuertemente relacionados a los procesos iniciales de degradación de la materia orgánica (herbívoros y detritívoros); o bien afectar procesos ecosistémicos de forma indirecta, a través de la regulación de las poblaciones de organismos involucrados directamente en los procesos ecosistémicos, principalmente mediante depredación.

4.2. FRECUENCIA ESPACIAL Y TEMPORAL

La frecuencia espacial del muestreo depende fuertemente del objetivo del estudio, y de un balance con los recursos económicos y el tiempo disponible. La variabilidad espacial en la abundancia de los grupos de meso y macrofauna es muy elevada, especialmente en los grupos que tienen comportamiento tipo gregario. La recomendación más aceptada tanto para meso como para macrofauna es la extracción de entre 5 y 10 muestras por unidad experimental (parcela, lote, parche, etc.), en una transecta de origen y dirección aleatorios. La separación entre muestras depende del tamaño de la unidad experimental. Si no existen restricciones de tamaño, se sugiere una separación de 20 m entre muestras. En caso de sitios más pequeños, se sugiere distribuir de manera equidistante la cantidad de muestras en el largo de la transecta.

En cuanto a las réplicas de cada tratamiento, si se pretenden aplicar métodos de estadística inferencial clásicos, se necesitará de un mínimo de 2 réplicas por cada tratamiento a evaluar, aunque es recomendable contar con al menos 3 réplicas.

La frecuencia temporal para la toma de muestras de meso y macrofauna depende nuevamente del balance entre los objetivos y la disponibilidad de tiempo y recursos. Si el objetivo fuera analizar la distribución temporal de la macro y mesofauna, entonces sería necesario realizar, por ejemplo, un muestreo en cada estación o un muestreo bimensual. Este caso puede relacionarse a estudios de la asociación de la fauna con el ciclo de un cultivo en particular. Sin embargo, si los objetivos del estudio son evaluar el efecto de diversos usos o manejos sobre la fauna, y utilizarla como indicadora de esos efectos, entonces es importante elegir el momento óptimo en el cual las comunidades biológicas se encuentren mejor representadas y se maximizan las diferencias entre sistemas. En el caso de la macrofauna, y especialmente en el caso de las lombrices, se considera que el momento óptimo es hacia el final de la temporada de lluvia (Edwards & Bohlen, 1996; Moreira et al., 2012), es decir hacia mediados-fines del otoño. En este momento del año es más probable encontrar una mayor proporción de lombrices en estado de madurez sexual, lo que resulta imprescindible para las determinaciones taxonómicas. Sin embargo, es importante considerar que esto

puede variar según las especies o familias (Momo & Falco, 2009). En el caso de la mesofauna, tanto en suelos naturales, de pastizales o bosques, como en suelos con cultivos, la época ideal del año para el muestreo es el verano tardío/principio de otoño, dado que las abundancias de los grupos alcanzan sus niveles máximos. Si se fuese a muestrear en un mismo proyecto tanto meso como macrofauna, en la región Pampeana, el mes de abril sería el óptimo para ambos grupos.

Otro aspecto importante que debe ser considerado en estudios en sitios manejados, es la distancia temporal a los disturbios. En general es importante, si se están analizando diferentes sistemas de manejo, que en todos ellos la distancia a las mayores perturbaciones incluidas en el sistema (por ej. labranza, aplicación de agroquímicos) sea similar entre sí y la máxima posible. De esta manera se evitan los efectos puntuales de prácticas específicas, y se tiene una respuesta a nivel del “sistema”.

4.3. PROFUNDIDADES

La profundidad de muestreo depende del objetivo del estudio y del tipo de suelo en cuestión. En este apartado, las recomendaciones surgen de trabajos realizados en suelos Molisoles de la región Pampeana, aunque pueden claramente ser usadas en otros suelos del país, con adaptaciones locales en cuanto a la profundidad máxima de muestreo. Por ejemplo si se tratase de suelos de escaso desarrollo pedogenético o suelos con presencia de material original rocoso sin meteorizar a escasa profundidad, lo que imposibilita el muestreo a las profundidades sugeridas.

4.3.1 Mesofauna:

En general la mayor actividad de la mesofauna se observa en los primeros 5 cm del suelo, incluyendo la capa de hojarasca (en suelos naturales) o rastrojos (en suelos con cultivos). En general, para evaluar el efecto de usos y manejos agropecuarios, se recomienda muestrear hasta los 10 cm de profundidad, separando cada muestra en tres submuestras: 1) hojarasca o rastrojos; 2) suelo mineral de 0 a 5 cm; y 3) suelo mineral de 5 a 10 cm. Por ejemplo, en caso de que el objetivo sea comparar la fauna del sistema de siembra directa con otros sistemas de manejo con labranza, es necesario que en el muestreo se consideren

las diferencias que existen entre estos dos sistemas en cuanto al manejo de los rastrojos, para evitar comparaciones incorrectas. En numerosos casos se sobrevalora la mesofauna de la siembra directa porque se muestrean solamente los primeros cm de profundidad, donde se acumula la mayor parte de la materia orgánica en este sistema, mientras que en sistemas con labranza, al ser enterrados los residuos orgánicos, la abundancia entre los 5 y 10 cm puede ser mayor que en superficie. Por lo tanto, es recomendable muestrear hasta los 10 cm y separar la muestra en al menos 3 profundidades.

4.3.2 Macrofauna:

La referencia básica para el desarrollo del protocolo de muestreo de macrofauna, es el trabajo de Anderson & Ingram (1993): *"Tropical Soil Biology and Fertility: A handbook of Methods"*. En el mismo, desarrollado para suelos tropicales, se sugiere muestrear hasta los 30 cm de profundidad. Sin embargo, es importante considerar los objetivos del estudio. Por ejemplo, si el objetivo es realizar un relevamiento detallado de todas las especies de macrofauna presentes en un sitio, será necesario muestrear hasta 30 cm e incluso a mayor profundidad. Sin embargo, esta decisión aumentará mucho el tiempo y los recursos necesarios para llevar adelante el muestreo, posiblemente reduciendo el número total de muestras o de sitios. En cambio, si los objetivos del estudio son realizar comparaciones entre numerosos sitios, y por lo tanto es importante minimizar el tiempo y los recursos empleados en muestrear cada uno de ellos, según nuestra experiencia previa en suelos templados en la región Pampeana argentina, el muestreo hasta 20 cm en general garantiza una buena aproximación de los patrones de abundancia y diversidad. Lo ideal es separar la muestra en tres submuestras: 1) hojarasca o rastrojos; 2) suelo mineral de 0 a 10 cm; y 3) suelo mineral de 10 a 20 cm. En el caso de ciertos grupos de lombrices, se recomienda un muestreo complementario en profundidad, que será detallado más adelante.

4.4. TAMAÑO DE MUESTRA

4.4.1. Mesofauna:

El procedimiento básico implica la extracción de muestras de suelo que posteriormente se trasladan al laboratorio para la extracción de la mesofauna mediante un sistema de embudos denominado Berlese, que será descrito más adelante. Se recomienda extraer un mínimo de 5 muestras por sitio (ver recomendaciones en el apartado sobre “Frecuencia espacial”). Las muestras para la extracción de la mesofauna se toman mediante un extractor metálico cilíndrico, tipo sacabocados (Figura 9), que permite obtener un volumen de suelo conocido, para luego hacer estimaciones de densidad de la fauna. Los muestreadores pueden tener diversas características constructivas, sin embargo lo esencial es que al ser hincados en el suelo, no produzcan la compactación del suelo dentro del cilindro. Para esto es fundamental que tenga filo en su borde inferior y que el diámetro del cilindro en su parte inferior, donde tiene el filo y se produce el corte del suelo, sea levemente menor al diámetro del cilindro receptor de la muestra, ubicado al interior del sacabocado (Figura 9a). Esto previene la compactación, y evita que la mesofauna quede impedida de ser extraída de la muestra mediante el sistema de Berlese. Lo aconsejable es que cada cilindro receptor tenga 5 cm de diámetro por 5 cm de alto, y se ubique un par de ellos dentro del sacabocado para contener las muestras (Figura 9c) y que, una vez retirados los cilindros del sacabocado con el suelo en su interior, puedan ser separados entre sí, cortando la muestra de suelo mediante el uso de un cuchillo, y así obtener las dos muestras de suelo de 5 cm cada una (Figura 9d). En la muestra que corresponde a los primeros 5 cm quedará la hojarasca o el rastrojo correspondiente, el cual deberá ser separado manualmente. En definitiva, se obtendrán las tres submuestras requeridas por cada punto, correspondientes a 1) hojarasca o rastrojos; 2) suelo mineral de 0 a 5 cm; y 3) suelo mineral de 5 a 10 cm.

4.4.2. Macrofauna

El procedimiento básico consiste en la extracción de muestras de suelo que son revisadas manualmente (lo que se conoce en inglés como *handsorting*) para la

extracción de todos los macroinvertebrados visibles a ojo desnudo. Se procede a la extracción de un monolito de suelo de 25 x 25 de lado por 20 cm de profundidad (Figura 10a-e). Se recomienda extraer un mínimo de 5 monolitos por sitio (ver recomendaciones en el apartado sobre “Frecuencia espacial”). Para ello se utiliza un marco cuadrado, de madera o de metal, de 25 x 25 cm, que se coloca sobre la superficie del suelo. En primera instancia, con una pala ancha en posición vertical se delimita el borde del marco ejerciendo presión con el pie, hasta alcanzar los primeros 10 cm, cortando además la hojarasca o rastrojos superficiales. Luego con una pala de punta se cava una zanja de aproximadamente 15 -20 cm de ancho alrededor del marco. Nuevamente con la pala ancha, pero en posición horizontal, se hace un corte del monolito por su parte inferior, a los 10 cm de profundidad, quedando la muestra de 25 x 25 x 10 cm sobre la pala (Figura 10d). Se extrae y coloca cuidadosamente sobre un nylon apoyado en una mesa de campo o directamente en el suelo, y se procede a separar la hojarasca o rastrojos en una bandeja plástica blanca. Si fuese necesario se cortan los vegetales vivos con tijera de podar. Luego se procede a la revisión exhaustiva de la muestra de hojarasca para obtener toda la macrofauna presente. Posteriormente, se vuelve a colocar el marco en el punto de muestreo y se procede a obtener la segunda muestra, correspondiente a los 10-20 cm, mediante similar procedimiento.

Las muestras obtenidas son colocadas en diferentes bandejas de plástico blancas de al menos 30 x 30 cm, para ser revisadas del mismo modo que la hojarasca en busca de la macrofauna. Se sugiere trabajar a campo en un grupo de 5-6 personas. Una o dos personas son las encargadas de realizar la extracción de los monolitos, mientras que 4 trabajan en una mesa de campo, revisando exhaustivamente cada muestra. Los elementos necesarios son pinzas entomológicas, pinceles de diferentes tamaños, y tubos con alcohol para la conservación de los ejemplares (ver apartado “Acondicionamiento, envasado y transporte de la muestra”). El tiempo que se dedique a la revisión de cada muestra depende de los objetivos del estudio. De acuerdo a nuestra experiencia, cada capa del monolito puede ser revisada por 4 personas en aproximadamente 15-20 minutos en suelos agrícolas. En el caso de suelos prístinos, las mayores abundancias de organismos, especialmente de hormigas o termitas, pueden

demandar mayor tiempo para la revisión. Es importante encontrar un equilibrio entre el tiempo y la minuciosidad de la revisión de cada muestra, especialmente considerando que organismos pequeños, por ejemplo algunos grupos de Coleoptera, podrán ser subestimados en cuanto a su abundancia si la muestra se revisa demasiado rápido. Si se desea hacer una caracterización detallada de toda la comunidad macrofaunística en sitios prístinos, será necesario dedicarle más tiempo a la muestra, mientras que si el objetivo principal es establecer diferencias entre tratamientos agrícolas, con 15 minutos por capa (por 4 personas) es suficiente para encontrar patrones de abundancia y diversidad.

Dado que las lombrices son un grupo muy importante en cuanto a su valor indicador, es necesario realizar algunas consideraciones especiales para su muestreo. El método TSBF recientemente descrito se conoce como “muestreo pasivo”, es decir que las lombrices son separadas físicamente del suelo, en contraposición al “muestreo comportamental”. En este caso, las lombrices son estimuladas a emerger por algún método químico o físico. El muestreo comportamental tiene por objetivo compensar algunas debilidades de la recolección manual, principalmente la menor eficiencia en el caso de las especies anécicas, ya que pueden huir hacia porciones inferiores del suelo mientras se está delimitando el monolito. A su vez, la aplicación de un método comportamental únicamente, estaría subestimando las poblaciones de lombrices epigeas y endogeas. Es por eso que sugerimos utilizar una solución irritante, colocada en el hueco dejado en el suelo luego de extraer cada monolito, para complementar la extracción manual con aquellos organismos que emerjan luego de la colocación de la solución irritante. Dentro de las sustancias más utilizadas para este muestreo, las primeras y más difundidas, fueron formaldehído y permanganato de potasio (Gun, 1992). Sin embargo, ambos son tóxicos y contaminantes, tanto para la biota del suelo como para los operadores. Es por eso que en las últimas décadas se han investigado diferentes opciones ambientalmente seguras. Entre éstas, la más difundida es el uso de mostaza. Se ha comprobado incluso que tiene mayor eficiencia que el uso de formaldehído (Gun, 1992; Chan & Munro, 2001). Se recomienda preparar la solución irritante del siguiente modo (Eisenhauer et al., 2008): Para un sitio en el que se han extraído 5 monolitos de 25 x 25 x 20 cm, se necesitan 250 gs de polvo seco de

mostaza, que se colocan en 12.5 l de agua, se agita vigorosamente y se deja reposar por 24 hs. Inmediatamente antes de la utilización, se debe extraer 2.5 l de la solución madre, a los que se le añaden otros 2.5 l de agua para obtener la concentración definitiva. Se agita vigorosamente y se coloca la mitad del total de 5 l (2.5 l) en el hueco que queda en el suelo inmediatamente después de retirar el monolito (Figura 10f). Se colectan todos los individuos que emergen por 15 minutos, y luego se colocan los restantes 2,5 l y se colectan los nuevos individuos esperando otros 15-20 minutos. Se debe repetir esta operación para cada monolito. Es decir, se utilizan 5 l de agua por cada monolito de 25 x 25 cm, con una concentración de mostaza de 10 g/l.

Es importante recordar que éste método si bien es muy eficiente para la colecta de especies anécicas (Chan & Munro, 2001; Eisenhauer et al., 2008) no lo es para las especies endogeas y epigeas por lo cual no es posible reemplazar con él de ningún modo el muestreo manual. Además, su utilización puede evitarse en caso de que muestreos manuales más exhaustivos de tipo cualitativos, indiquen la ausencia de especies anécicas en la zona que se está muestreando. Finalmente, a pesar de la existencia de una norma ISO en la que se recomienda un protocolo de separación manual de macrofauna seguido de aplicación de solución de formaldehído (0.5% solución acuosa de formalina; Römbke et al., 2006), en el presente manual recomendamos evitarlo, tanto por la contaminación hacia organismos no blanco como para evitar la necesidad de que los operarios manipulen esta sustancia a campo, sin equipo de protección.

Por último, nos parece necesario mencionar brevemente que para el caso de algunos integrantes de la macrofauna, especialmente hormigas y coleópteros, existen otros métodos de muestreo que maximizan la colecta de aquellas especies que no habitan usualmente el interior del suelo mineral sino que registran su mayor actividad en la superficie del mismo (hojarasca/rastrojos). El uso de trampas de caída (*pitfall*) y/o de trampas Winkler (Moreira et al., 2012) puede ser interesante si el objetivo del trabajo incluye evaluar de manera más exhaustiva la riqueza de estos grupos; en caso contrario se recomienda únicamente el muestreo por el método de los monolitos. Las trampas de caída presentan la desventaja de que proveen una medida de la actividad de la fauna, y no es posible realizar una estimación de abundancia, por lo que los datos son cualitativos. Consisten en

pequeños envases relativamente profundos, de superficie interna lisa, que se entierran de modo tal que la parte superior del recipiente quede a ras del suelo. Existen diversos modelos y diversos métodos para la captura, por ejemplo hay trampas con y sin cebo. En general, se coloca en los recipientes unos 2 cm de agua y unas gotas de detergentes, que inmovilizarán a los artrópodos que caigan. Luego en el caso de las trampas con cebo, este puede ser muy variado, depende de los grupos y ambientes y sesgará la captura hacia los organismos atraídos por el cebo que se elija. El tiempo de permanencia de las trampas a campo depende de los organismos en estudio, clima, ambiente y objetivo.

El método de Winkler se puede considerar como una modificación para campo de un embudo de Berlese, ya que se basa en el mismo principio: colocar una muestra de hojarasca dentro de la trampa y obligar a que los insectos caigan a un frasco colector gracias a las condiciones adversas de sequía a las que la muestra es sometida (Fernández, 2003). Para ello, se recolecta toda la hojarasca de un cuadrado de 1m² de superficie, desde afuera hacia adentro, con cuidado de no perder organismos. La hojarasca recolectada es tamizada a campo para eliminar los fragmentos más grandes, mientras que la porción más fina de la hojarasca permanece en el fondo de la bolsa del tamiz, se transfiere a bolsas plásticas y se transporta a un sitio cubierto. Allí las muestras son colocadas en bolsas de red de 4 mm de apertura y éstas en el interior de las trampas Winkler, y se mantienen por al menos 48-72 hs para coleccionar la mayor cantidad posible de organismos (Agosti et al., 2000; Moreira et al., 2012). Para mayor información sobre estos métodos se recomienda consultar la bibliografía citada.

4.5. PRECAUCIONES ESPECIALES

En el caso de la macrofauna, excepto las lombrices, recomendamos realizar la fijación de los ejemplares a campo, tal como se describe en el apartado próximo. En el caso de las lombrices, en cambio, recomendamos llevar al campo recipientes plásticos de aproximadamente 100 ml de capacidad en los que se colocará parte del suelo correspondiente a cada muestra, revisada previamente, hasta llenar aproximadamente la mitad del recipiente, y luego las lombrices encontradas en dicha muestra. Luego se las transportará al laboratorio donde se procederá a la fijación de los organismos, como se detalla en el apartado

siguiente. Es importante durante el trabajo de campo mantener estos recipientes a la sombra en un lugar fresco, y que los tiempos de transporte al laboratorio sean lo más acotados posibles. Asimismo, se recomienda no colocar más de 20 individuos en cada recipiente. En caso de campañas de muestreo largas, se deberá tener cuidado extremo en cuanto a la temperatura y aireación de estos frascos, o bien optar por la fijación a campo, para lo que se recomienda realizarlo por la tardecita/noche, luego de los muestreos, en un lugar con ciertas comodidades como una mesada para apoyar.

4.6 ACONDICIONAMIENTO, ENVASADO Y TRANSPORTE DE LA MUESTRA

4.6.1. Mesofauna

Seguidamente a la extracción de cada muestra del cilindro correspondiente, estas se deben colocar en bolsas de plástico rotuladas, de tamaño adecuado, y disponer en contenedores rígidos para evitar la compactación entre muestras. Por ejemplo resultan muy adecuadas las cajas plásticas transparentes tipo organizadores de tornillos, con compartimentos separados (de tamaño adecuado para el volumen de la muestra) y manijas (Figura 9e). Se debe evitar por completo la exposición de las muestras al sol, por ejemplo guardándolas en heladeras de camping o cajas de cartón. De esta manera se deben trasladar las muestras al laboratorio para ser procesadas en el equipo de Berlese.

El sistema recomendado para la extracción de los organismos de la mesofauna, desde una muestra de hojarasca o suelo, es el “embudo de Berlese” que, como ha sufrido una serie de modificaciones a lo largo del tiempo, puede ser llamado en algunos casos “Berlese modificado” o “Berlese-Tullgren” (Figura 11). El principio que lo rige es generar un gradiente térmico y lumínico que fuerza la migración de los organismos mediante movilidad propia desde la muestra de suelo hacia un recipiente colector.

En la práctica, se pueden construir embudos de Berlese de maneras muy diferentes, desde unos muy rudimentarios y económicos, en base a botellas de plástico de agua o gaseosas, hasta más sofisticados y caros, con materiales

inoxidables, y dispuestos en baterías para extraer numerosas muestras simultáneas. El sistema básico consta de un embudo sobre el que se coloca una malla de 2 mm de abertura (tela mosquitera, por ejemplo) y encima se dispone la muestra de suelo, preferentemente ubicada en un recipiente con abertura en sus dos extremos, como por ejemplo un caño de PVC, de 10 cm de largo (Figura 11). Por encima de la muestra se coloca una fuente de calor y luz, generalmente un foco de 40 w. El foco no debe estar a menos de 10 cm de la muestra y debe encenderse recién después de 24 hs de colocada la muestra, para evitar que la velocidad de secado de la muestra sea mayor a la velocidad de migración de la fauna. En la parte inferior del embudo, se debe colocar un recipiente receptor con alcohol al 70 % (por ejemplo un recipiente de polipropileno de 60 ml con tapa a rosca). La mesofauna huirá de la desecación y la luz excesiva y caerá a través de la malla y por el embudo, hasta el frasco colector. Un detalle que mejora la calidad de la muestra de mesofauna extraída, es la inclusión de un trozo de tela quesera entre la malla y la muestra de suelo, para prevenir la caída accidental de suelo al recipiente colector. En este caso la malla rígida (de plástico o metal) puede ser de mayor abertura, dado que es la tela la que contiene la muestra (Figura 11 d, e).

El tiempo de extracción en el Berlese depende de la cantidad de suelo y de la humedad del mismo, pero en general entre los 7 a 10 días se logra extraer la fauna. Durante estos días es preciso controlar que el contenido de alcohol del frasco colector no disminuya demasiado como para provocar la desecación de los organismos.

Luego de obtenida la muestra de organismos en el tubo colector, se debe proceder a la limpieza de la muestra, actividad que se desarrolla bajo lupa binocular. Consiste en volcar el contenido en una caja de Petri de aprox. 10 cm de diámetro y separar la mesofauna de las partículas orgánicas y de suelo mineral, mediante el uso de herramientas entomológicas finas como agujas afiladas y minucias. Para mayor información referente a la separación de la mesofauna en sus diversos grupos taxonómicos se recomienda la lectura del capítulo de Martínez & Narciso (2009). Allí se detalla un procedimiento de análisis preliminar y sencillo de una muestra de mesofauna del suelo. En el mismo libro existen claves taxonómicas para subórdenes de ácaros (Martínez, 2009a), ácaros

mesostigmatas (Maggi et al., 2009), ácaros prostigmatas (Fredes & Sotes, 2009) ácaros oribátidos (Martínez, 2009b) y colémbolos (Bernava, 2009).

Los enquitréidos son un grupo especial, dado que por su diámetro se clasifican como mesofauna, pero no son muestreados ni extraídos del suelo de manera eficiente por las metodologías descritas para mesofauna o macrofauna. La principal dificultad es que son relativamente pequeños, por lo que los métodos para macrofauna no son eficaces, y tampoco lo es el embudo de Berlese. Además, dado que la identificación taxonómica se realiza en especímenes vivos, esta necesidad dificulta aún más el muestreo. De manera sucinta, el muestreo a campo es similar al descrito para mesofauna, pero luego se realiza una extracción en húmedo (método de O'Connor). En el trabajo de Jänsch et al. (2005) se puede profundizar sobre el muestreo, extracción e identificación de los enquitréidos.

4.6.2. Macrofauna (excepto lombrices)

Todos los invertebrados colectados manualmente a campo serán colocados en tubos herméticos con alcohol al 96 %. Durante muchos años se ha utilizado alcohol diluido al 70%, sin embargo, dado el incremento de estudios genéticos utilizados con fines taxonómicos y filogenéticos que se están realizando sobre numerosos grupos de macrofauna, recomendamos usar alcohol sin diluir para así preservar el material genético de los organismos. Una vez transportados al laboratorio se hará una primera revisión del material para limpiarlo, ya que el muestreo a campo suele asociarse a una contaminación relativamente alta de los tubos con suelo, material vegetal etc. Es importante realizar esta limpieza de los tubos lo antes posible.

4.6.3. Lombrices Procedimiento para la fijación de lombrices adaptado de Mischis, C; Bartz, M; Brown, G; y James, S. (comunicación personal).

La conservación de las lombrices requiere de mayores precauciones que el resto de la macrofauna. Por ello se recomienda transportar los organismos vivos, en recipientes con suelo, para poder realizar el procedimiento de fijación en el

laboratorio (o en alguna instalación que brinde mayores comodidades que las que se suelen tener a campo, en caso de que no sea posible trasladar las muestras al laboratorio en un tiempo prudencial). En general, este procedimiento se ha realizado siempre mediante la utilización de formol. Sin embargo, dado que éste destruye el ADN de los organismos, recomendamos, al igual que en el caso del resto de la macrofauna, preservar a los organismos en alcohol etílico sin diluir, para poder realizar el análisis del material genético en caso que sea necesario. Únicamente en el caso de que en alguna de las muestras existan elevadas abundancias de organismos que pertenezcan a la misma especie, se recomienda conservar algunos especímenes en formol, dado que esta sustancia preserva de mejor manera a los organismos, y ello facilita la identificación taxonómica, especialmente en lo que respecta a la morfología interna.

Independientemente del método que se elija, todos los ejemplares deben limpiarse con agua (por ej. utilizando un pincel) para eliminar la mayor parte de suelo que puedan llevar adherida.

Fijación con alcohol:

Los ejemplares se introducen en un recipiente rectangular pequeño (aprox. 20 x 10 cm), con agua, al que se le comienza a añadir de a poco alcohol al 96% sin diluir, hasta que el animal empieza a disminuir sus movimientos. En ese momento se saca de la solución y se coloca sobre una superficie plana con papel absorbente empapado en alcohol sin diluir, y se lo acondiciona de modo que queden en una posición de mayor rectitud posible. Luego de aproximadamente 15 minutos, el animal es colocado en un tubo hermético con alcohol al 96% sin diluir. Para las especies de tamaño mediano, como las típicas de la región Pampeana, son útiles los tubos de polipropileno para centrífuga de 50 ml. Se recomienda colocar el tubo en posición horizontal por aproximadamente 48 hs para facilitar la fijación “estirada” de los ejemplares. Es importante que el volumen de alcohol por tubo sea al menos el triple del volumen ocupado por las lombrices. Además, durante las primeras horas el intercambio de fluidos internos de la lombriz con el alcohol circundante enturbia la solución, por lo que es importante cambiar el alcohol cada 48 hs hasta que permanezca transparente.

Fijación con formol:

En este caso la solución inicial en la que se coloca a los organismos está constituida por un 50% de alcohol al 96%, sin diluir, y un 50% de formol al 10%. Se procede del mismo modo que en el caso anterior, excepto que se utiliza, tanto en el papel absorbente como en el tubo definitivo, formol al 10%. Recordar siempre que la manipulación del formol debe realizarse bajo campana y con máscara de protección.

“La primera edición de esta publicación fue generada por un grupo de profesionales de la investigación pública agropecuaria de Argentina en respuesta a la necesidad de contar con protocolos básicos para el muestreo de suelos, a campo, para *uso común* por parte de investigadores y profesionales agropecuarios que trabajan en esta temática.

Esta segunda edición es una versión revisada y, particularmente, *ampliada*, de la primera. Gracias al esfuerzo de profesionales de INTA y Universidades de todo el país, se actualizaron los capítulos referidos a muestreo para Carbono, Estructura y Agua, y se agregaron aquellos referidos a Fertilidad Química y a Biología del Suelo.

Finalmente, es de destacar que la presente publicación resulta del trabajo conjunto de los Programas Nacionales Cereales y Oleaginosas y Suelos del INTA”

Diego J. Santos, Marcelo G. Wilson, Miriam M. Ostinelli



Ministerio de Agroindustria
Presidencia de la Nación