



MATERIALES
Y
MÉTODOS



4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Secciones estudiadas

En esta sección se describen desde el punto de vista micropaleontológico: a) secuencias aflorantes y un testigo, todos de edad holocena; y b) muestras superficiales recientes localizadas en los sectores interno, medio y externo del Estuario de Bahía Blanca (Fig. 4.1.1). A continuación se detalla la ubicación de las secciones bajo estudio y se indican las principales ciudades y puntos de referencia en el área (Fig. 4.1.1). Se incluyen las metodologías empleadas para el estudio de foraminíferos, el procesamiento de las muestras, análisis a nivel estadístico, caracterización cualitativa y cuantitativa del material recolectado.



Fig.4.1.1. Ubicación y edad de las secuencias bajo estudio. Estuario de Bahía Blanca. Bs.As.



4.1.1 Perfil ARROYO NAPOSTÁ (N1)

Las muestras analizadas provienen de un perfil ubicado a los 38°46'16''S y 62°13'58''O, a 3 km de la desembocadura del arroyo Napostá Grande y fueron extraídas en marzo del año 2006 (Fig. 4.1.1). El muestreo para análisis microfaunístico se realizó a intervalos regulares de 5 cm, obteniéndose un total de 26 muestras.

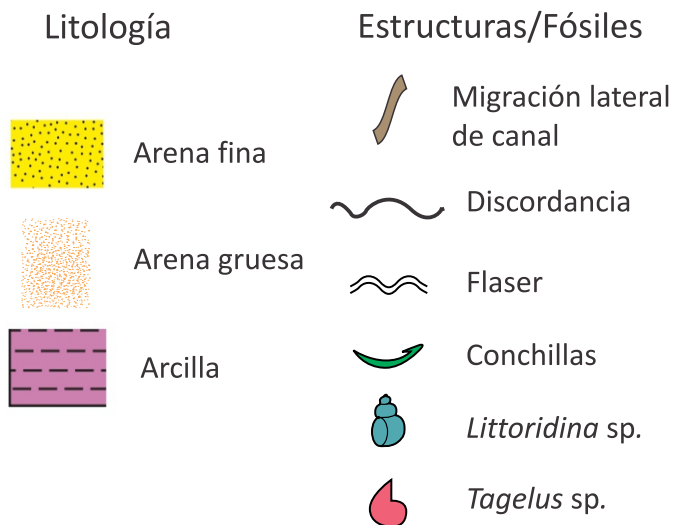
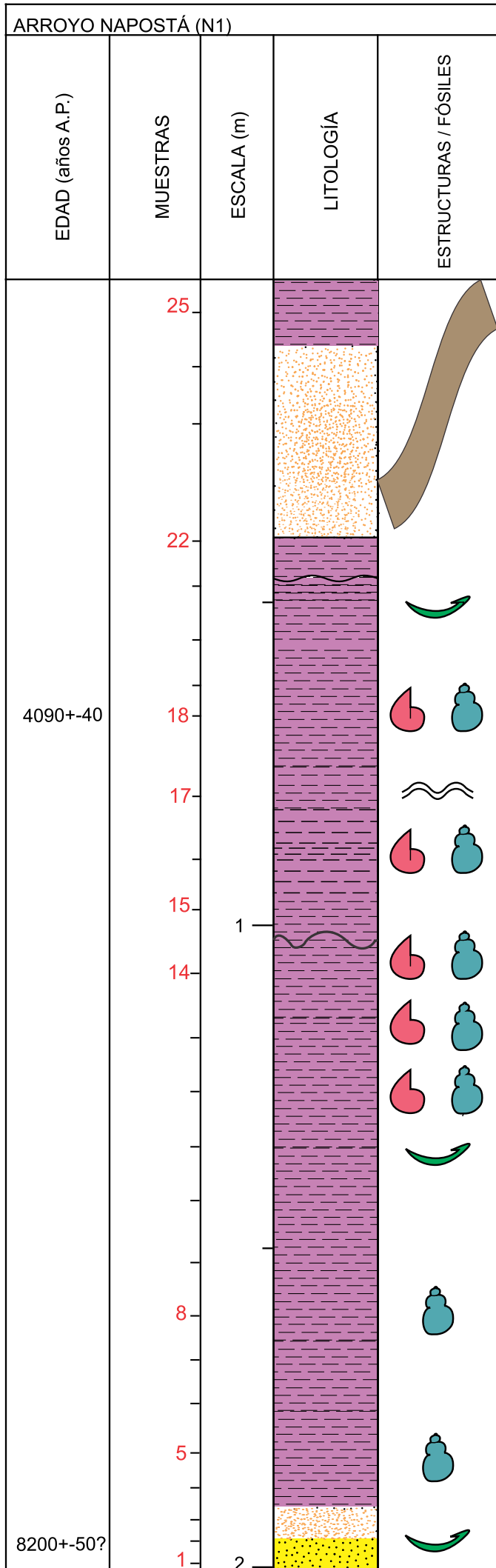
El perfil presentó un espesor total de 1,91 m. Los depósitos holocenos están constituidos por arenas finas y gruesas en la base, continúan sedimentos arcillosos laminares, finalizando con un paquete de arenas gruesas y arcillas en el tope (Fig. 4.1.1.1).

A lo largo de toda la secuencia se observaron abundantes macrofósiles como, *Tagelus plebeius* (Lightfoot), *Littoridina australis* (d'Orbigny), *Pitar rostratus* (Koch) y *Nucula semiornata* (d'Orbigny). En los niveles correspondientes a las muestras 11, 13, 18 y 19 los ejemplares de *Tagelus plebeius* se hallaron en posición de vida y sin relleno sedimentario.

Por encima del nivel de la muestra 14 se observó una discontinuidad, sobre la misma se reconocieron niveles con estructuras *flaser* (m16, m17). Otra discontinuidad fue observada en el nivel de la muestra 21. Hacia el techo de la sección (m22) se detectó la presencia de un paleocauce y sobre éste un depósito de arenas gruesas con estructuras que indicarían una migración lateral del canal, para luego finalizar con un paquete de fangolitas.

Fig. 4.1.1.1. Descripción del perfil N1.

Perfil Arroyo Napostá (N1)





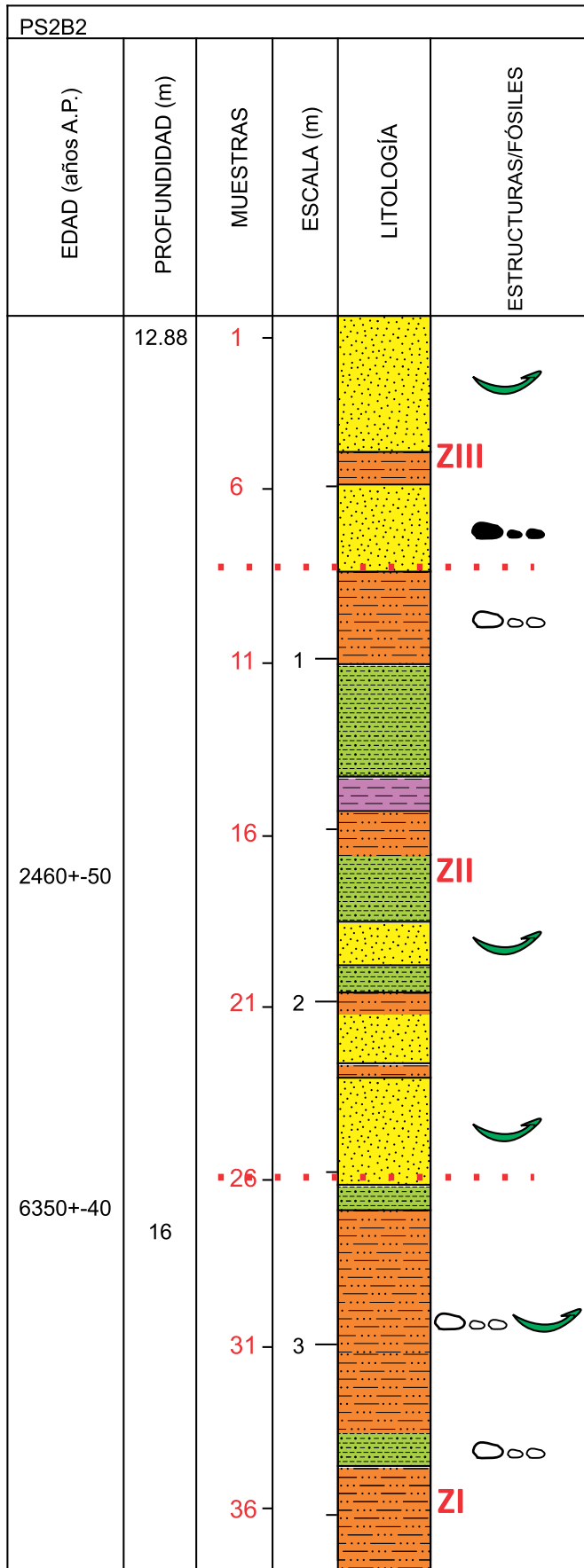
4.1.2 Testigo PS2B2

El material proviene de un testigo de 3,70 m de largo extraído en 1990 a una profundidad de 12,88 m bajo el nivel del mar ($39^{\circ}03'S-61^{\circ}47'O$), en el área externa del estuario de Bahía Blanca (Fig. 4.1.1) (Fig. 4.1.2.1).

Se han determinado tres secciones sedimentológicas granodecrecientes, limitadas por disconformidades (Gómez *et al.*, 2005, 2006). La sección inferior ZI (base-m26) se compone principalmente de limos arenosos con pequeñas intercalaciones de arcillas limosas, lentes de arena y conchillas. La sección media ZII (m26-m8) muestra una alternancia de arenas, limos arenosos, arcillas limosas y delgadas láminas de arcilla. Por último, la sección superior ZIII (m8-m1) se compone principalmente de arena con láminas arcillo-limosas e intercalaciones limo-arenosas con presencia de algunas lentes de arcilla y ocasionales conchillas (Gómez, *et al.*, 2005).

Fig. 4.1.2.1. Descripción del testigo PS2B2.

Testigo PS2B2



Litología

- Arcilla-limosa
- Arena
- Limo-arenoso
- Arcilla

Estructuras/Fósiles

- Conchillas
- Lentes de arena
- Lentes de arcilla

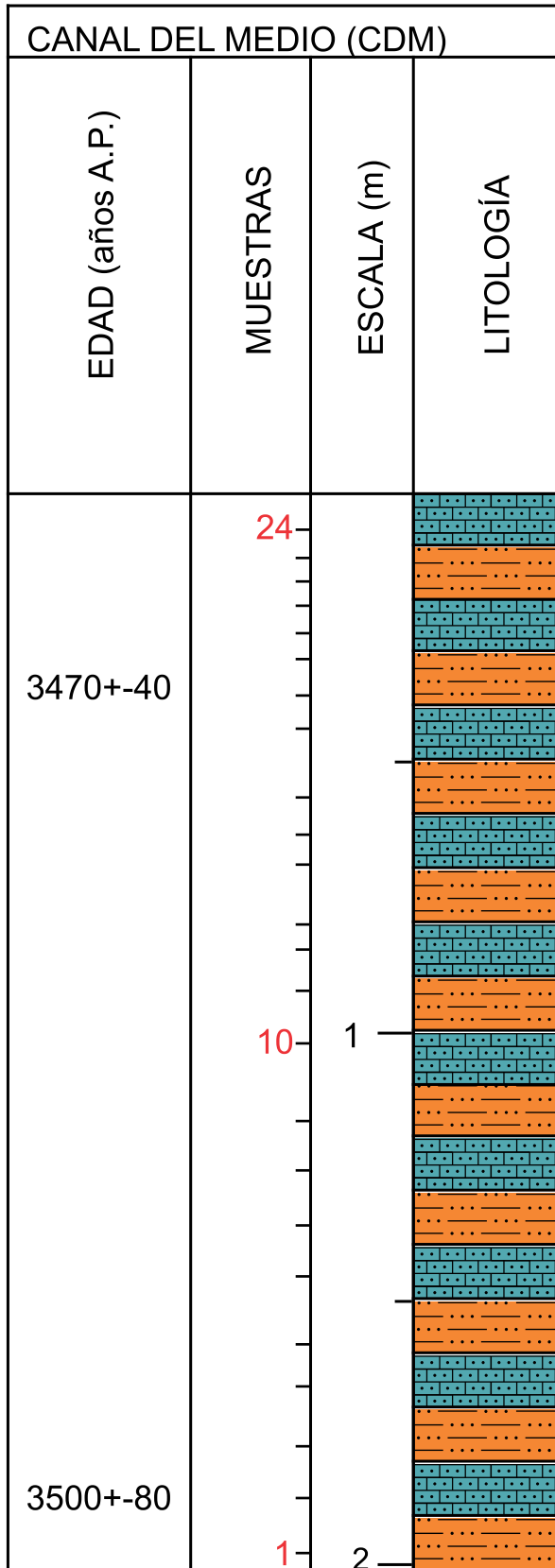


4.1.3 Perfil CANAL DEL MEDIO (CDM)

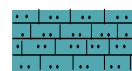
La sección aflora en la zona interior del estuario de Bahía Blanca ($38^{\circ}49'S$ - $62^{\circ}17'O$) y corresponde al sector erosivo de un meandro de marea (Fig. 4.1.1) (Fig. 4.1.3.1). Las muestras estudiadas fueron extraídas de un perfil de 2 m de espesor. La cota de la secuencia está referida al nivel medio del mar (NMM), encontrándose la amplitud de marea en el orden de los 4 m. En este sector el NMM se ubica a aproximadamente 2 m por encima del nivel de la bajamar. En cuanto a su litología, toda la sección está compuesta por una alternancia cíclica de limos arenosos y arcillosos que se desarrollan en forma continua (Borel y Gómez, 2006).

Fig. 4.1.3.1. Descripción del perfil CdM.

Perfil Canal del Medio (CdM)



Litología



Limo-arcilloso



Limo-arenoso



4.1.4 Perfil CANAL TRES BRAZAS (C3B)

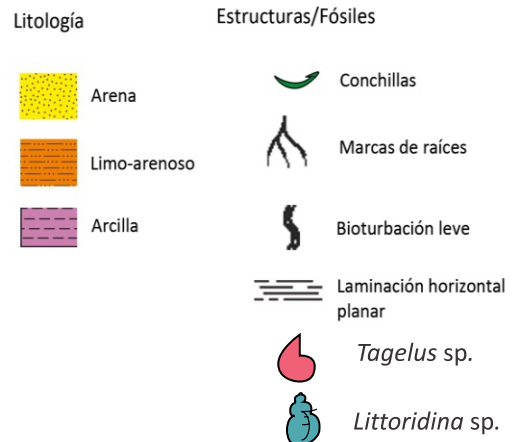
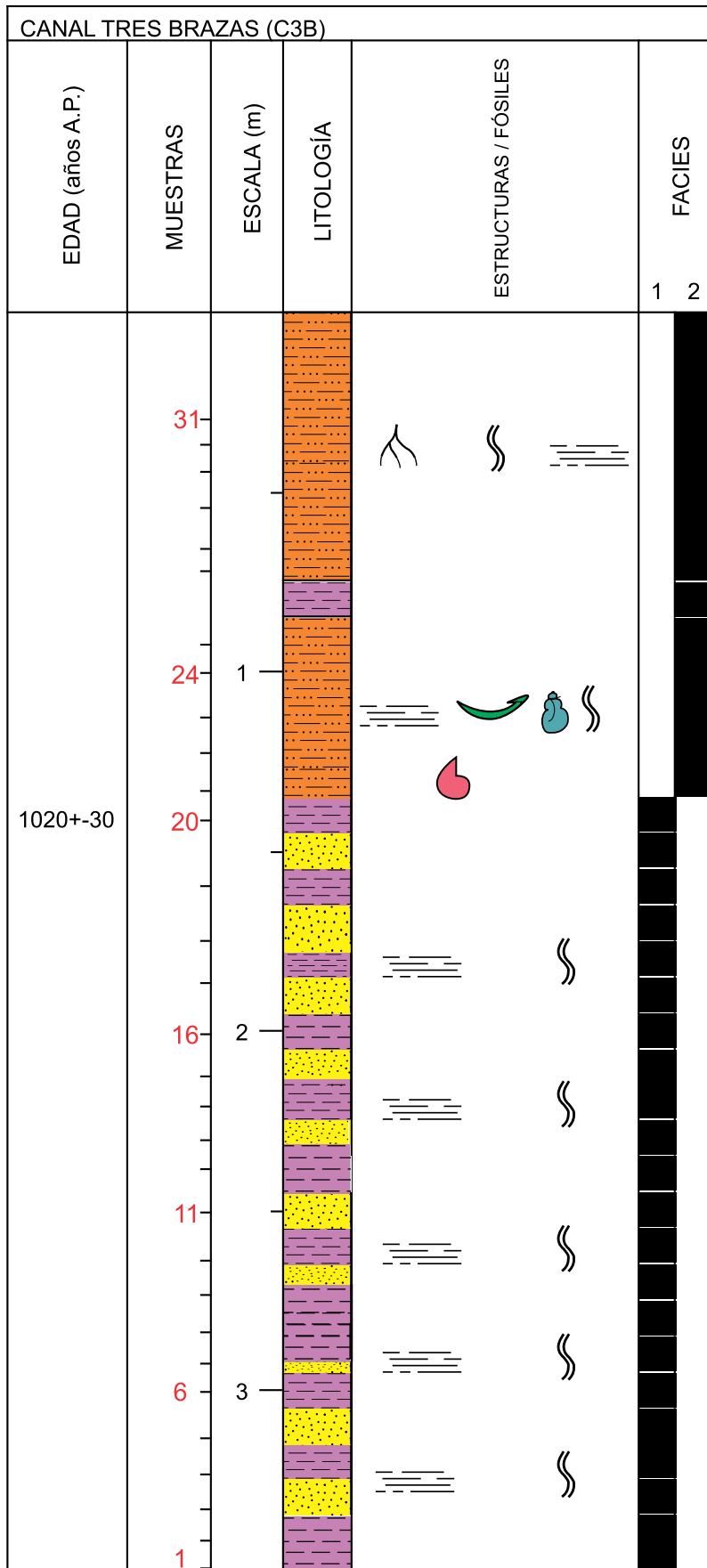
En esta sección se tomaron muestras de afloramiento de un afluyente de tercer orden del Canal Tres Brazas (38°55'S-62°14'O) en la zona media del estuario de Bahía Blanca (Fig. 4.1.1) (Fig. 4.1.4.1). La sección posee 3,5 m de espesor desde el nivel de la marea baja a la parte superior. El NMM (nivel medio del mar) se encuentra a 1,50 m del nivel de bajamar.

En base a su litología, dos facies pueden ser reconocidas. La Facies 1 se caracteriza por una sucesión de arenas finas con intercalaciones de limos arenosos y arcillas laminadas, con espesores entre 5 y 13 cm. Pueden reconocerse signos de bioturbación a lo largo de toda la facies (Martínez, 2002).

La Facies 2 comienza a 2,1 m de la base, con presencia de *Tagelus plebeius* (Lightfoot) en posición de vida. Está compuesta principalmente por limos arenosos con intercalaciones de arcilla y ocasionalmente conchillas de *Littoridina australis* (d'Orbigny). Hacia el techo de la secuencia se observan marcas de raíces y signos de bioturbación (Martínez, 2002).

Fig. 4.1.4.1. Descripción del perfil C3B (en base Martínez, 2002).

Perfil Canal Tres Brazas





4.1.5 Muestras Superficiales

En agosto de 2008 fueron extraídas muestras superficiales para el estudio de foraminíferos en las zonas denominadas Villa del Mar (V) (38°52'S-62°06'O), Almirante Brown (B) (38°45'S-62°18'O) y Canal Maldonado (M) (38°44'S-62°19'O) (Fig. 4.1.1) (Fig. 4.1.5.1.). En cada una de las zonas se establecieron estaciones de muestreo, cubriendo la zona intermareal desde el nivel de bajamar hasta la parte superior de las marismas teniendo en cuenta cambios en la topografía y transiciones entre tipos de vegetación.

Se seleccionaron tres áreas de muestreo que abarcan una interesante variabilidad de condiciones ambientales, tanto en función de sus características hidrológicas y sedimentarias como del ambiente biológico, caracterizado por el tipo de vegetación dominante. El balneario Villa del Mar (V) (Fig. 4.1.5.1a) se encuentra en el sector externo del Canal Principal, en la transición entre los ambientes dominados por sedimentos finos y las costas arenosas. El patrón de zonación de la vegetación típico de esta zona del estuario incluye marismas de *Spartina alterniflora* Brongn (Espartillo), marismas de *Sarcocornia perennis* y marismas mixtas de *S. perennis* (Mill.) A. J. Scott (Jume) y *Spartina densiflora* Loisel (Parodi, 2007). En el sector interno del Canal Principal se trabajó en la zona denominada Club Almirante Brown (B) (Fig. 4.1.5.1b), que presenta el patrón de zonación típico de la cabecera del estuario, con ausencia de vegetación en la zona intermareal y marismas de *S. perennis* colonizando elevaciones por encima del nivel de las mareas ordinarias. Finalmente, se recolectaron muestras en la zona de la boca del Canal Maldonado (M) (Fig. 4.1.5.1c), que presenta la interesante particularidad de que allí crece la única marisma de *S. alterniflora* de la zona interna del estuario (Calvo Marcilese y Pratalongo, 2009).

Fig. 4.1.5.1. Descripción de las transectas recientes analizadas.

Transectas Recientes

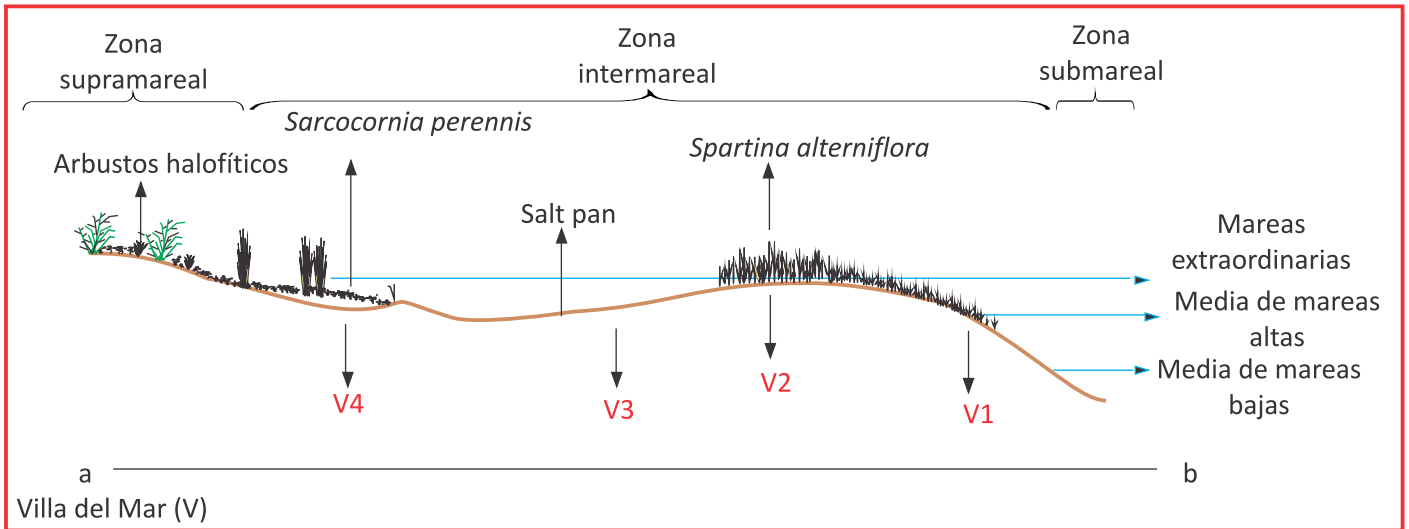


Fig.4.1.5.1.a

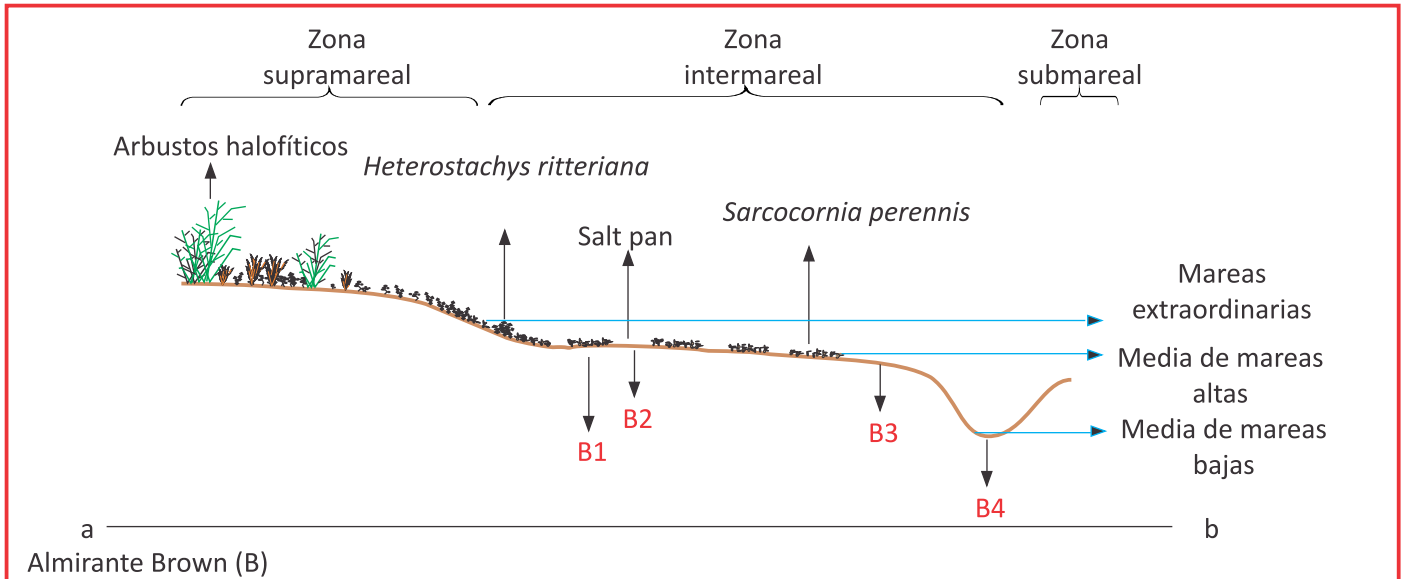


Fig.4.1.5.1.b

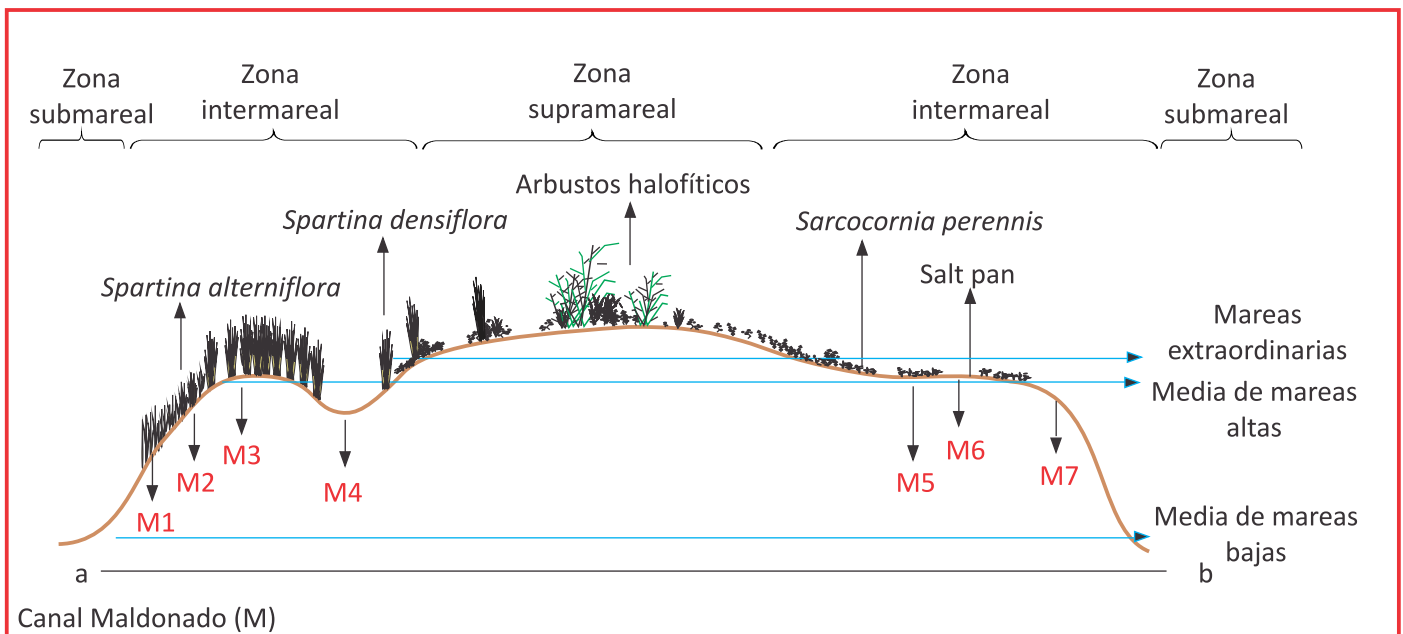


Fig.4.1.5.1.c



4.2 Muestreos y procesamiento del material

4.2.1 Material fósil

En las secciones holocenas las muestras fueron obtenidas a intervalos variables de entre 5 y 15 cm. El sedimento seco fue procesado y desagregado utilizando agua corriente. Las muestras fueron lavadas a través de un tamiz de 63 μm de abertura de malla y se dejaron secar a temperatura ambiente. Del residuo se extrajo 1 g de material que fue estudiado bajo lupa binocular. Todos los foraminíferos presentes fueron separados mediante la técnica de picking y ordenados en portamicrofósiles (Boltovskoy, 1965). Debido al reducido número de foraminíferos presentes en algunas muestras, y con el fin de lograr que éstas sean estadísticamente significativas, la cantidad de ejemplares recuperada fue ponderada en 5 g de sedimento.

Las especies fueron fotografiadas utilizando el microscopio del Centro Atómico Bariloche (Philips SEM 515) y el del Instituto Steinmann –Universidad de Bonn (Tescan; Digital Microscopy Imaging; Vega-Column Type Ts 53201 No. Vg0190171b). Luego fueron depositadas en el repositorio del Laboratorio de Micropaleontología del Museo de La Plata y en el del Centro Regional Universitario Bariloche (Uncoma), bajo las siglas MLP-Mi y UNC-PMIC respectivamente.

4.2.2 Material vivo

Luego de la selección de las áreas a muestrear, tratando de que quedaran representadas las diferentes zonaciones dentro de las planicies y marismas, se tomó un gradiente de elevación y se seleccionaron zonas vegetadas y no vegetadas representativas de variedad de factores ambientales. Posteriormente y luego de consultar las tablas de marea para la región, se acordó con el personal del Instituto Argentino de Oceanografía (IADO) visitar los sitios de muestreo en momentos en que se producía la bajamar a fin de poder observar una mayor proporción de áreas expuestas.



Para alcanzar una mayor precisión en la determinación de la elevación se utilizó un GPS Sokkia Radian IS, en modo diferencial con post-procesamiento. A su vez, el área de estudio cuenta con un mareógrafo que registra las alturas de marea, éstas se llevaron al mismo nivel de referencia (metros sobre el Datum WGS84) para estimar la frecuencia de inundación de los sitios muestreados.

Para la extracción de las muestras recientes se utilizó un aro metálico de 10 cm de diámetro por 2 cm de alto, y se recogieron los 2 cm superficiales, luego el material fue vertido en un recipiente con etanol al 70%. Este procedimiento fue repetido en 3 ocasiones a fin de evitar la distribución en parches característica de los foraminíferos (Fig.4.2.2.1). El material recogido, fue lavado con un *set* de tamices de 500 y 63 micrómetros de luz de malla con el fin de eliminar la fracción gruesa y la fina (Boltovskoy, 1965). Una vez limpio, el residuo fue volcado en un vaso al que se le adicionó una solución de agua destilada con el colorante Rosa de Bengala (1g/l). Al día siguiente las muestras fueron lavadas a fin de eliminar el exceso de colorante, y se dejaron secar a temperatura ambiente. Del residuo se extrajo 1 g de material que fue estudiado bajo lupa binocular. Los ejemplares con protoplasma, presuntamente vivos al momento del muestreo, adquirieron una coloración rosa muy marcada. Todos los foraminíferos presentes fueron separados mediante la técnica de picking, y ordenados en portamicrofósiles.

La utilización de colorantes como el Rosa de Bengala, técnica introducida por Walton (1952), tiene como finalidad determinar cuáles ejemplares se encontraban vivos al momento del muestreo, produciéndose la coloración de los microorganismos por absorción del colorante a través del protoplasma. El uso del Rosa de Bengala es una técnica ampliamente utilizada y aceptada, si bien se conocen algunos casos en los que material indudablemente muerto resultó coloreado (Boltovskoy, 1965), son más las ventajas que desventajas en la utilización de este método ya que no se requieren equipamientos especiales (Murray, 2006).



A nivel local, Boltovskoy en múltiples oportunidades (Boltovskoy, 1963a; Boltovskoy y Boltovskoy, 1968; Boltovskoy y Theyer, 1970; Boltovskoy y Totah, 1985) ha utilizado estas técnicas de coloración para el estudio de foraminíferos actuales, pero desde sus últimos estudios sólo unos pocos trabajos han sido publicados en Argentina, utilizando métodos de tinción para análisis de material reciente (Scott *et al.*, 1990; Martínez, 2005; Cusminsky *et al.*, 2006; Calvo Marcilese y Pratolongo, 2009 y Laprida *et al.*, 2011). De esta manera los resultados sobre fauna actual presentados en esta Tesis, hacen hincapié y retoman el estudio de material vivo como importante herramienta para análisis ambientales del presente y del pasado.

En forma paralela a la extracción de muestras para el recuento de foraminíferos, se obtuvieron muestras similares de sedimento sobre las que se determinó la densidad aparente, el contenido de materia orgánica (Loss on Ignition %), la granulometría (Analizador láser Malvern Mastersizer), la salinidad y el pH (solución 1:2 de suelo seco en agua destilada) (Calvo Marcilese y Pratolongo, 2009).



Draga para recolección de muestras submareales



Recolección de muestras en marismas y planicies de marea

Fig.4.2.2.1. Recolección de material reciente- Estuario de Bahía Blanca



4.3 Edad de las secciones

Las dataciones radimétricas referidas en esta sección se han realizado tanto en el Laboratorio de Análisis de Tritio y Radicarbono (LATYR) de la Facultad de Ciencias Naturales y Museo de la Universidad Nacional de La Plata, como en Beta Analytic (Miami, EEUU) (Ver Tabla 4.3.1). En el caso del LATYR se utilizó la datación sobre conchillas de moluscos, a través de la técnica de Espectrometría de Centelleo Líquido (LSC), mientras que en laboratorios como BETA Analytic se realizaron dataciones sobre materia orgánica utilizando la técnica de Espectrometría de Masas con Acelerador (AMS). Ambas metodologías de medición lo hacen con la misma exactitud y precisión, con la diferencia que para poder datar material utilizando la técnica LSC se necesita un mínimo de 4 g de carbono, mientras que para AMS con unos mg de carbono es suficiente. Esto es importante ya que los pretratamientos a realizar involucran pérdida de material original, a veces hasta en un 80% según el estado y preservación de la muestra, por lo tanto la cantidad inicial de material debe ser mayor (Figini, 2005).

Arroyo Napostá (N1)

En el caso de las muestras correspondientes al Arroyo Napostá, las dataciones fueron realizadas por el Dr. Eduardo Gómez (IADO-CONICET) en BETA Analytic. En esta tesis sólo se han mencionado las edades convencionales (mediciones de la actividad ^{14}C residual en muestras naturales, utilizando el set de parámetros delineados por Stuiver y Polach, 1977) debido a algunas inconsistencias en la edad asignada para la base y su comparación con dataciones posteriores. La edad de la secuencia obtenida por datación radimétrica abarcaría desde los 8200 ± 50 años AP (edad sujeta a revisión) en la base (180 cm) hasta los 4090 ± 40 años AP en la sección superior (70 cm) (Calvo Marcilese *et al.*, 2007) (Tabla 4.3.1).



Testigo PS2B2

Las edades convencionales asignadas para el Testigo PS2B2 se obtuvieron luego de datar materia orgánica a través de la técnica AMS (BETA Analytic), posteriormente fueron calibradas a fin de obtener valores en años calendarios (se obtienen luego de transformar por calibración la edad ^{14}C de la muestra).

Las edades obtenidas para el testigo PS2B2 a través de dataciones radiocarbónicas (AMS) fijan la edad de la secuencia en 6350 ± 40 años AP para la sección inferior (280 cm) y 2460 ± 50 años AP para la sección media (160 cm). La calibración de éstas edades convencionales (1σ) produjo una serie de 7300-7250 años cal. AP para el nivel de 280 cm y 2720-2365 cal. AP años para el nivel de 160 cm (Gómez *et al.*, 2005) (Tabla 4.3.1).

Canal del Medio (CDM)

Materia orgánica proveniente de dos niveles del perfil Canal del Medio fue enviada a datar por el Dr. Eduardo Gómez (BETA Analytic), las edades convencionales y sus calibraciones fueron publicadas en Borel y Gómez, 2006. En esta contribución se han modificado los valores obtenidos para las edades calibradas (Tabla 4.3.1). Las edades radiocarbónicas convencionales obtenidas para la sección CDM fueron de 3500 ± 40 ^{14}C años AP para la base (178-180 cm) y de 3470 ± 80 años AP para la sección superior (38-40 cm) (Borel y Gómez, 2006) (Tabla 4.3.1).

Canal Tres Brazas (C3B)

Restos de conchillas de moluscos fueron extraídos del perfil Canal Tres Brazas, el material de la sección superior fue datado por la Dra. Dina E. Martínez (UNS) y publicado en Martínez, 2002; el material de la base fue enviado a datar por el Dr. Salvador Aliotta (IADO-CONICET) (Aliotta *et al.*, 2004). Las edades medidas brindadas por el LATYR fueron corregidas por fraccionamiento isotópico



(corrección de la actividad ^{14}C medida en función de un valor determinado de $\delta^{13}\text{C}$, Figini, 2005) para poder realizar su posterior calibración, los resultados han sido publicados en Calvo Marcilese *et al.*, 2011 (Tabla 4.3.1).

Número de muestra	Laboratorio	Edad ^{14}C Años	Edad Calibrada Años AP	Material datado
N1 70 cm	BETA	4090±40	----	Materia orgánica
N1 180 cm	BETA	8200±50	----	Materia orgánica
PS2B2 160 cm	BETA	2460±50	2720-2365	Materia orgánica
PS2B2 280 cm	BETA	6350±40	7300-7250	Materia orgánica
CDM 38-40 cm	BETA	3470±40	*3718-3610	Materia orgánica
CDM 178-180 cm	BETA	3500±80	*3831-3617	Materia orgánica
C3B 150 cm	LATYR	1430±30	*1051-909	Conchillas de moluscos
C3B 350 cm	LATYR	1933±40	*1589-1371	Conchillas de moluscos

Tabla 4.3.1. Dataciones radiocarbónicas de las secciones bajo estudio.

* Datos obtenidos como resultado de este estudio.



4.4 Determinación taxonómica y análisis cuantitativos

4.4.1 Determinación taxonómica

Para el estudio sistemático se utilizó principalmente la lupa binocular estereoscópica, mientras que para análisis detallados y obtención de fotografías de alta definición se recurrió al microscopio electrónico de barrido del Centro Atómico Bariloche y del Instituto Steinmann de la Universidad de Bonn.

A fin de determinar la fauna de foraminíferos se realizó un reconocimiento de la bibliografía disponible para el área de estudio y áreas adyacentes. Se utilizó la clasificación supragenérica de Loeblich y Tappan (1987, 1992) y el Catálogo de Foraminíferos publicado por el Museo de Ciencias Naturales de Nueva York, Ellis y Messina (1940 y subsiguientes), donde se detallan todas las descripciones de las nuevas especies y géneros establecidos, acompañados de ilustraciones originales. También se ha considerado como material de referencia el “Atlas of benthic shelf foraminifera to the southwest Atlantic” de Boltovskoy *et al.* (1980), Boltovskoy (1954a, 1954b, 1957) y la tesis doctoral de Ferrero (2006). Para el caso de los ejemplares pertenecientes al género *Ammonia* Brünnich, se siguieron los criterios propuestos por Buzas-Stephens *et al.* (2002). Para la designación de especies con nomenclatura abierta se utilizó el trabajo de Matthews (1973).

Para la caracterización de la abundancia, se utilizaran los siguientes rangos en función de la cantidad de ejemplares recuperados:

Dominantes > 100

Abundantes 50-100

Frecuentes 21-50

Escasos 6-20

Raros 3-5

Muy raros 1-2



4.4.2 Análisis cuantitativos

Para el tratamiento de las muestras fósiles se separaron bajo lupa binocular los individuos presentes en 1g de sedimento lavado, estos valores se han ponderado en 5 g. Las muestras recientes se han estudiado en un volumen estandarizado de 50 cm³ de material.

Se establecieron las abundancias absolutas y relativas, donde la **Abundancia Absoluta** refiere a la cantidad de individuos contabilizados por muestra o volumen de sedimento, y la **Abundancia Relativa** a la proporción de especies presentes por nivel (Murray, 1991).

A fin de realizar el análisis de la diversidad se han considerado la **Riqueza específica (S)** o número de especies presentes por muestra, y el **índice de Shannon-Wiener (H)**, el cual es considerado un índice de heterogeneidad que incluye tanto el número de especies como la distribución de individuos entre especies. Este valor se obtiene al aplicar la función de información H incluida en la siguiente ecuación:

$$H'(S) = - \sum_{i=1}^s p_i \cdot \ln \cdot p_i$$

Donde **S** corresponde al número de especies, y **p_i** a la proporción de la especie **i** (p= porcentaje dividido 100).

Según Buzas y Gibson (1969), valores de H mayores a 3, indicarían condiciones marino-normales. Por su parte Murray (1973, 1991) sugiere que valores de H menores a 0,6 corresponderían a lagunas hiposalinas, y valores mayores a 2,1 indicarían ambientes marino-normales.

Otro índice considerado en este estudio para el análisis de la diversidad fue el **α (alpha) de Fisher**, descrito por Fisher *et al.* (1943) y utilizado con mucha



frecuencia por Murray (1991, 2007). Su obtención surge de la aplicación de la siguiente ecuación:

$$\alpha = \frac{n^1}{X}$$

Donde **X** es una constante cuyo valor es <1 y n^1 se calcula a partir $N(1-X)$ siendo **N** el número de individuos por muestra.

Este índice varía según el tamaño de la muestra y se utiliza cuando el número de individuos es superior a 100. Asume que el número de individuos por especie sigue una serie logarítmica e incluye a las especies menos frecuentes. Se obtiene de plotear en un diagrama el número de especies versus el número de individuos por muestra (Fig.4.4.2.1) (Murray, 1991).

Con el fin de determinar diferentes ambientes en función del α de Fisher, se estima que valores de α mayores a 7 indicarían el desarrollo de un ambiente marino normal de plataforma a batial o plataforma hipersalina. Valores iguales a 5 indicarían el límite de un ambiente marino normal, mientras que inferiores a 5 sugerirían ambientes hiposalinos, o marino marginales hipersalinos (Murray, 1973).

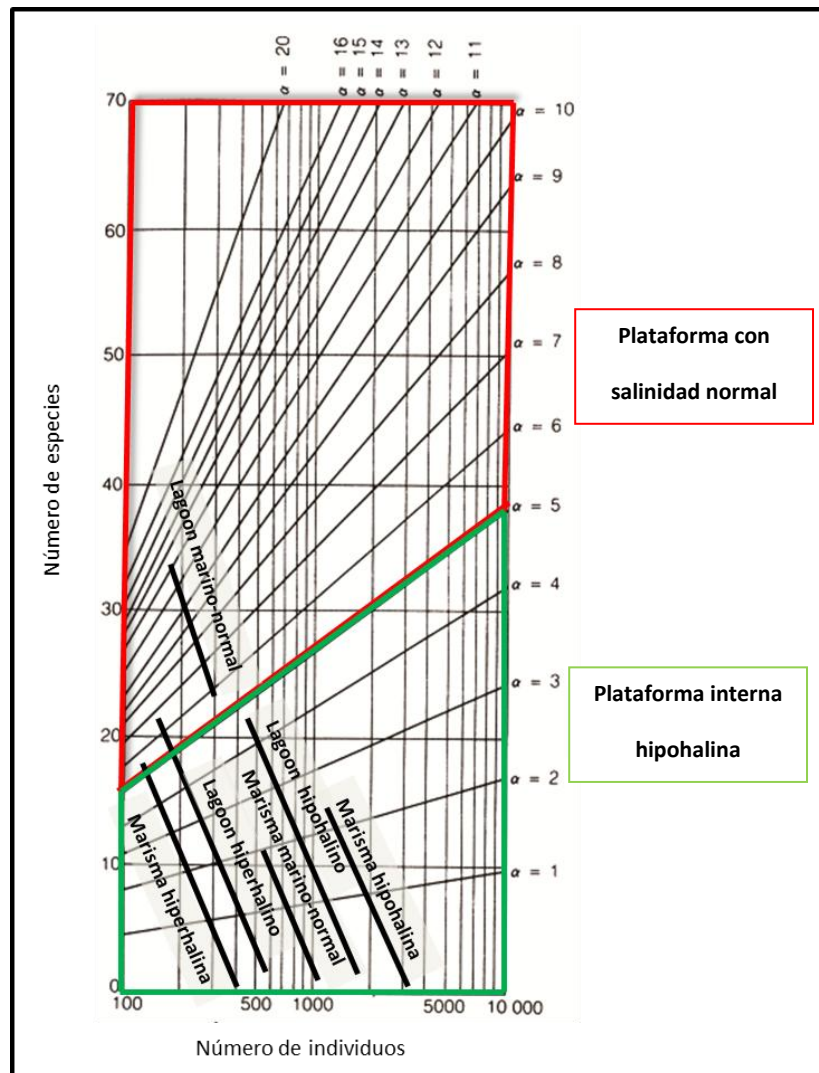


Fig. 4.4.2.1. Gráfico que relaciona número de especies, de individuos y líneas con igual valor de α (Modificado de Murray, 1973).

4.4.3 Análisis estadísticos

A fin de establecer zonaciones en las secuencias estudiadas, se realizaron análisis de agrupamiento y diagramas de frecuencia. Se utilizaron los programas Tilia 2.0 (Grimm, 1991) y TG View (Grimm, 2001), considerando sólo las especies cuya abundancia relativa es igual o superior al 2% en al menos 2 muestras (Gómez *et al.*, 2005; Bernasconi, 2006). Los grupos se formaron según el método de agrupamiento jerárquico de la suma de los cuadrados del error. El análisis de



agrupamiento se efectuó respetando el orden estratigráfico (*stratigraphical unconstrained analysis*), y empleando la transformación de datos por estandarización a media 0 y desviación típica 1. Como coeficiente de distancia se utilizó la distancia euclidiana estandarizada (Grimm, 1991).

En el caso de las muestras recientes, el análisis de agrupamiento (*Cluster*) se realizó a partir de los conteos de individuos vivos de 13 muestras (las muestras M5 y M6 fueron excluidas del análisis por contener únicamente ejemplares sin colorear). Con los valores estandarizados según el número total de individuos coloreados en cada muestra se construyó la matriz de distancia (distancia euclídea) y las asociaciones de muestras se definieron según el algoritmo de ligamiento simple, a través de la utilización del paquete estadístico R. Para el análisis cuantitativo y para la caracterización de cada nivel se tuvo en cuenta el número y las frecuencias relativas de las especies halladas.