

TECNICAS DE PREPARACION Y RECUESTO*

El estudio realizado ha consistido en el análisis cuantitativo del nanoplancton calcáreo de 350 muestras pertenecientes a seis secciones estratigráficas. Las muestras han sido personalmente recogidas en buena parte, a excepción de las 24 pertenecientes a la sección de Shakespeare Cliff. El intervalo de muestreo se ha elegido en función de los objetivos del estudio, oscilando entre varios metros y unos pocos centímetros. El muestreo ha sido especialmente detallado en las proximidades del límite Cretácico/Terciario (K/T) debido a los bruscos e importantes cambios que se registran en la asociación.

Antes de detallar la técnica utilizada en la preparación de los frotis, cabe señalar el especial cuidado que debe tenerse durante todo el proceso de manipulación de las muestras para evitar la contaminación de las mismas. El tamaño reducido (2-30 mm) de los fósiles estudiados incrementa considerablemente el riesgo de contaminación de las muestras, razón por la cual deben mantenerse presentes durante todo el proceso una serie de precauciones. En el campo, se deberá limpiar el martillo después de cada extracción de muestra. En el laboratorio, antes y después de su utilización en cada muestra, todos los utensilios manipulados deben ser lavados con agua, sometidos a una disolución diluida de Acido Clorhídrico y aclarados con agua posteriormente .

I- Preparación de frotis para el estudio con el microscopio petrográfico.-

Dado que, como se indicaba al principio de este capítulo, se pretende realizar un estudio cuantitativo del nanoplancton calcáreo, en orden a minimizar los errores cometidos, se ha elegido para la preparación de las muestras el método utilizado por FLORES (1985). Este método consiste en la preparación en "bruto" de la muestra, es decir, se prescinde de métodos que parten de un fraccionamiento de la misma, como la decantación (GARTNER, 1968), el filtrado (PIENAAR, 1966) y la centrifugación (EDWARDS, 1963), ya que introducen un sesgo importante en la información, para analizar la muestra en conjunto.

Además, con objeto de obtener datos comparables entre sí, todas las muestras han sido sometidas a la misma técnica manteniendo constante siempre una serie de magnitudes, de tal

manera que no sólo las condiciones sean las mismas, sino que además el método sea reproducible.

La técnica seguida en la preparación de las muestras consiste en una primera fase, en la que para evitar la contaminación, rasparemos la superficie externa del fragmento de muestra hasta conseguir una superficie fresca. Limpiadas las manos y la cuchilla, rasparemos de nuevo la superficie fresca de la cual tomaremos 0,02 g de polvo que introduciremos en un frasco pequeño, al que añadiremos 10 ml de agua destilada. Para conseguir una disgregación perfecta de la muestra, tras agitar enérgicamente el frasco lo dejaremos reposar durante unas 24 horas. Transcurrido el periodo de tiempo indicado, agitaremos de nuevo el frasco y con una pipeta extraeremos 0,2 ml que extenderemos sobre un portaobjetos de tal forma que cubra una superficie de 6,94 cm². Se deja secar sobre una placa eléctrica a una temperatura inferior a 65 °C; cuando la muestra está seca, se cubre la misma con un cubreobjetos utilizando bálsamo de Canadá para sellarla.

II- Estudio con el microscopio petrográfico.-

El estudio de las muestras se ha realizado con un microscopio de la marca Nikon, modelo Labophot-Pol. Para la determinación de los especímenes se ha utilizado tanto la luz normal, la luz polarizada e incluso ocasionalmente el contraste de fase. Además, la lente compensatoria 1/4 ha suministrado importante información en la identificación de algunos taxones. Respecto a los aumentos manejados, han sido 10 en los oculares, para algunos detalles se han utilizado X15, y X100 en el objetivo, que es de inmersión.

El estudio cuantitativo realizado ha consistido en dos fases, una primera en la que elegidos al azar 30 campos visuales (C.V.) repartidos por la superficie de la muestra se hace una estimación de la abundancia total en nanofósiles. Dicha estimación se ha realizado siguiendo el método introducido por HAY (1970). Este método expresa la abundancia según las potencias de 10 diferenciando cuatro grados:

Abundancia	Logaritmo	Designación	Abreviatura
10-100 espec./C.V.	+1	Abundante	A
1- 10 espec../C.V.	0	Común	C
1espec./1-10 C.V.	-1	Escaso	E
1espec./10-100C.V.	-2	Raro	R

Igualmente, esta primera fase permite obtener una primera impresión sobre el estado de conservación de la asociación.

En una segunda fase se ha procedido al estudio de la asociación realizando para ello el recuento de unos 500 nanofósiles por muestra observados en campos visuales repartidos al azar y que, de acuerdo con DENNISON y HAY (1967), permite tener la seguridad tomando un nivel de confianza del 99% ($P < 0,01$) de que se registran todos aquellos taxones cuya frecuencia relativa en las muestras sea igual o superior al 1%.

Esta segunda fase proporciona el número de especies identificadas por muestra, así como los porcentajes en que se registra cada una de ellas. En el presente estudio la abundancia de las especies ha sido descrita en términos de cuatro categorías:

- Abundante....>25 % de la asociación
- Común.....>5-25 % de la asociación
- Escasa.....1-5 % de la asociación
- Rara.....<1 % de la asociación

Si bien todos los datos numéricos proporcionados en este estudio responden al recuento de 500 individuos, en algunos casos se ha estimado conveniente analizar un número más elevado de nanofósiles, reflejando por tanto los datos vertidos en los cuadros de distribución de las especies en las diferentes secciones toda la información recogida.

III.- Preparación de las muestras para su estudio con el microscopio electrónico de barrido.-

Como quiera que la observación con el microscopio electrónico de barrido, MEB, de las muestras preparadas siguiendo la técnica utilizada para el microscopio petrográfico, no proporcionó resultados satisfactorios debido a la gran cantidad de partículas de arcilla adheridas a los nanofósiles, se optó por utilizar una técnica diferente sometiendo las muestras a ultrasonidos y centrifugación. Dado que los objetivos del estudio con el MEB son únicamente de reconocimiento e ilustración de las especies, el uso de este tipo de técnicas no introduce sesgos en la información, sino más bien ha servido para ratificar la idea que nos llevó a prescindir de este tipo de técnicas por considerarlas no idóneas para la realización de un estudio cuantitativo de los nanofósiles, ya que por una parte, se han reconocido especies *Goniolithus fluckigeri* y *Microrhabdulus belgicus*, que no habían sido identificadas con el microscopio petrográfico; por otra, muchas de las especies identificadas en este último no han sido reconocidas con el MEB. Sirva este ejemplo para comprender las transformaciones que en la composición de la asociación introducen las mencionadas técnicas.

La técnica utilizada tiene una fase inicial idéntica a la descrita para el microscopio petrográfico, pero es más laboriosa y complicada. Después de pulverizar la muestra y añadirle agua destilada, la someteremos por espacio de 4-5 minutos a ultrasonidos. El efecto de este aparato es doble, por una parte introduce un dispersante que penetra entre la pared del microfósil y las partículas de arcilla neutralizando las cargas eléctricas, por otra el efecto de cavitación desaloja las partículas de arcilla tanto de la superficie de los nanofósiles como de sus perforaciones (CLARK, 1973). Precisar que si se prolonga excesivamente este tratamiento se llega a la destrucción de los nanofósiles, por lo que deben realizarse varias pruebas hasta detectar el tiempo necesario para obtener los resultados idóneos.

Posteriormente, las muestras serán centrifugadas; en nuestro caso se ha utilizado una centrifuga manual, para la cual había sido previamente calculado el número de revoluciones (30). El centrifugado de la muestra tiene por objeto facilitar y acelerar el posterior estudio de la muestra con el MEB, ya que concentra las partículas de un determinado tamaño. Sometida la muestra a las revoluciones indicadas se vierte el líquido sobrenadante y se le añade agua destilada agitando enérgicamente. Se somete de nuevo la muestra a centrifugado y se repite el proceso las veces que sea necesario (entre 3 y 7 dependiendo del tipo de muestra) hasta conseguir que el sobrenadante aparezca completamente transparente. Tras verter el último líquido sobrenadante, se le añade agua destilada y se agita. Sobre una placa eléctrica a 60° C

colocaremos un soporte sobre el que depositaremos una gota de agua destilada y sobre ésta otra de suspensión. Cuando la muestra esté seca, la someteremos a un proceso de metalizado que dejará la muestra preparada para su estudio con el MEB.

El estudio con el microscopio electrónico se llevó a cabo en el Geologische Bundesanstalt de Viena, siendo el aparato utilizado un modelo Cambridge SEM 150. La mayor parte de las fotografías presentadas corresponden a muestras de la sección de Bidart, la única que presenta un grado de conservación suficientemente bueno para permitir la identificación específica en el MEB.

* El contenido corresponde al capítulo del mismo título de la memoria de tesis doctoral de Amalia Gorostidi. 1993.

Lo esencial del mismo está referenciado, entre otras, en:

- M. A. Lamolda, A. Gorostidi & C.R.C. Paul. 1994. Quantitative estimates of calcareous nannofossil changes across the Plenus Marls (latest Cenomanian), Dover, England: implications for the generation of the Cenomanian-Turonian Boundary Event. *Cretaceous Research*, **14**,143-164.
- A. Gorostidi y M. A. Lamolda. 1995. La nanoflora calcárea y el tránsito KT de la sección de Bidart (SW de Francia). *Revista española de Paleontología*, nº Homenaje al Dr. Guillermo Colom (M.A. Lamolda, Ed.), 153-168.