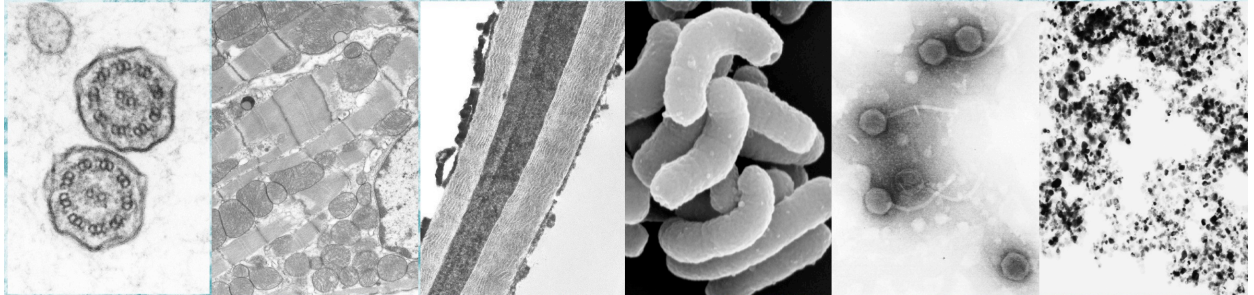


Egas Moniz Symposium on Electron Microscopy

An Overview of Scientific Applications

May 12, 2014



<http://emem2014.egasmoniz.info>

Main Auditorium

Egas Moniz Cooperativa de Ensino Superior CRL

Campus Universitário, Quinta da Granja , Monte de Caparica, 2829-511 Caparica, Portugal

Electron microscopy is the most important and widely used method that provides a reliable way of imaging small details in specimens down to the molecular and even atomic levels. For more than 75 years this unique capability has proved essential to the understanding of the organization of biological and non-biological materials, and fostered a conceptual revolution in these disciplines following the development of suitable sample preparation methods.

This Symposium will present an overview of applications from groups that are using electron microscopy in their research activities and provide good examples of what can be achieved now and in the future with the methodology over a wide range of scientific issues.

We extend an invitation to all colleagues from research, analytical and industrial fields to attend this symposium that will have the participation of experienced and internationally well-known invited guests from Portugal, the USA and Brazil, and will address the possibilities offered by the enchanted world of electron microscopy.



EMmem2014.egasmoniz.info

The importance of electron microscopy in Micropaleontology

Paulo Legoinha

CICEGe, Departamento de Ciências da Terra, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, 2829-516 Caparica, Portugal. pal@fct.unl.pt

Microfossils are fossilized remains of microscopic organisms, whose study requires the use of the binocular stereo microscope, optical microscope or scanning electron microscope. Their carapaces — mineralized skeletons or resistant organic coatings — are preserved. The branch of Paleontology that deals with the study of microfossils is **Micropaleontology**. The main groups studied are ostracods, foraminifera, radiolarians, diatoms, calcareous nannoplankton and palynomorphs (spores, pollen, dinoflagellates, chitinozoa and acritarchs). The palynomorphs, studied in Palynology, all have an organic coating very resistant to attack by acids. Remains of macroorganisms (ossicles and teeth of vertebrates, skeletal parts of invertebrates, seeds, etc) are also considered and studied as microfossils. Microscopic organisms are abundant, having broad geographic distribution, sometimes with rapid evolution through geological time. They inhabit marine, lake and fluvial environments. Consequently, microfossils allow **aging and correlation of sedimentary rocks** and give information about **environmental and climate evolution**. Some species accurately indicate the depth, salinity, temperature and energy of the medium, type of substrate and oxygen levels. The study of microfossils was strongly driven by the oil industry. Microfossils have become fundamental in the interpretation of drill cores because of the small size, abundance, and the fact that they are not destroyed by the drilling process.

In the seventeenth century, and while observing beach sand, Robert Hook, inventor of the microscope, noticed for the first time a shell of foraminifera and realized that it was a remnant of an organism. He named it "tiny snail water". Hook published his book "Micrographia" with several drawings of the biological world that still attest to his artistic talent. **Scientific illustration** is an inseparable visual component of science communication, as well as of science dissemination (Legoinha & Correia, 2010). However, it requires a skill for drawing that only few scientists have. The photographs of microfossils obtained by **electron microscopy** help to ease this difficulty.

The development and commercialization of the **scanning electron microscope (SEM)** in the 1960s, allowed major advances in Micropaleontology (Hay & Sandberg, 1967). This equipment was readily considered indispensable for the study of microfossils and, despite its high cost, was soon acquired by many university and industrial micropaleontological laboratories (Bignot, 1985). The **advantages** of the scanning electron microscope in the **study of microfossils** are:

- very wide range of useful magnification
- very small limit of resolution: 250-100 Å
- large depth of field allowing good stereoscopic vision
- easy preparation and no destruction of the material under study
- possibility of varying the angle of observation

Below are some of the **main contributions** of electron microscopy to Micropaleontology:

- the study of **skeletal elements of echinoderms**, highly porous and difficult to observe under an optical microscope
- the analysis of the **wall structure of planktonic foraminifera shells**, including surface ornamentation and piercing, with phylogenetic importance
- the **microtopography of conodonts**, providing clues about the mode of secretion and biological affinities (strains)
- the study and illustration of **bryozoans skeletal elements**, with considerable relief and morphological details
- the ontogenetic and phylogenetic analysis of the structures of the **hinge** and **muscular impressions** in the **valves of ostracods**, as well as pores and channels, which were previously unknown
- obtaining planar and lateral views of the same **coccolith** in the skeletal parts of **calcareous nannoplankton**

- the research and study of **plant structures**, including pollens, spores, very small floral structures, leaf cuticles (epidermal cells and stomata) and trunk fragments. Some of these structures are recognizable only through images taken by the SEM. In addition to the 3D vision, some are so small that optical instruments are not able to resolve anatomic or ornamental details. Currently it is possible to obtain images of the interior of these structures through high resolution X-ray tomography that allows, for example, detection of eggs within the ovaries of **flowers** of 130 Ma **primitive angiosperms**.
- the study of **dinoflagellates**, namely the organization and opening of the plates, which can only be observed in detail with the SEM

Acknowledgment

I would like to thank Prof. João Pais (UNL) for some suggestions and figures.

References

- Antunes, M.T., Legoinha, P., Nascimento, A. & Pais, J. (1996) – The evolution of the Lower Tagus Basin (Lisbon and Setúbal Peninsula, Portugal) from Lower to early Middle Miocene. *Géologie de la France*, Orléans, 6: 59-77.
- Bignot, G. (1985) - Elements of micropaleontology. London: Graham & Trotman Ltd., 217 p.
- Correia, F. & Legoinha, P. (2010) – Ilustração científica de microfósseis de Portugal. VIII Congresso Nacional de Geologia. Braga. *e-Terra*, vol. 17, n. 2: 4p.
- Fonseca, B. (1977) - Notes sur la géologie et la paléontologie du Miocène de Lisbonne - XVIII - Coupe de Palença, rive gauche du Tage: stratigraphie et micropaleontologie (Coccolithophorides). *Ciências da Terra (UNL)*, Lisboa, 3: 61-99.
- Friis, E.M., Pedersen, K.R., von Balthazar, M., Grimm, G.W. & Crane, P.R. (2009) - *Monetianthus mirus* gen. et sp. nov., a Nymphaealean flower from the Early Cretaceous of Portugal. *Int. J. Plant Sci.*, 170 (8): 1086-1101.
- Hay, W. & Sandberg, P. (1967) - The scanning electron microscope, a major break-through for micropaleontology. *Micropaleontology*, 13 (4): 407-418.
- Legoinha, P. (2001) - Biostratigrafia de Foraminíferos do Miocénico de Portugal (Baixo Tejo e Algarve). *Dissertação de Doutoramento*, Universidade Nova de Lisboa, 241 p., 24 est.
- Legoinha, P. (2003) - Upper Miocene planktonic foraminifera from Algarve (Portugal) – chronostratigraphical implications. *Ciências da Terra (UNL)*, Lisboa, 15: 199-208.
- Mendes, M. M., Friis, E. M. & Pais, J. (2008) - *Erdtmanispermum juncalense* sp. nov., a new species of the extinct Erdtmanithecales from the Early Cretaceous of Portugal. *Rev. Palaeob. Palynology*, 149: 50-56.
- Mendes, M., Pais, J. & Friis, E. M. (2008) - *Raunsgaardispermum lusitanicum* gen. et sp. nov., a new seed with in situ pollen from the Early Cretaceous (probably Berriasian) of Portugal: further support for the Bennettitales-Erdtmanithecales-Gnetales link. *Grana*, 47: 211-219.
- Mendes, M., Friis, E., Pedersen, R. & Pais, J. (2010) - *Erdtmanitheca portucalensis*, a new pollen organ from the Early Cretaceous (Aptian-Albian) of Portugal with *Eucommiidites*-type pollen. *Grana*, 49: 26-36.
- Mendes, M. M., Dinis, J., Pais, J. & Friis, E. M. (2011) - Early Cretaceous flora from Vale Painho (Lusitanian Basin, western Portugal): An integrated palynological and mesofossil study. *Review of Palaeobotany and Palynology*, 166: 152-162.
- Vieira M., Poças E., Pais J. & Pereira D. 2011 - Pliocene flora from S. Pedro da Torre deposits (Minho, NW Portugal). *Geodiversitas*, 33 (1): 71-85.

 Legoinha, P. (2014) – The importance of electron microscopy in Micropaleontology. Abstracts of *Egas Moniz Symposium on Electron Microscopy - An Overview of Scientific Applications*. Egas Moniz Cooperativa de Ensino Superior CRL, Monte de Caparica, Portugal. <http://microventures.co/SymposiumEgas2014>

FIGURE 1

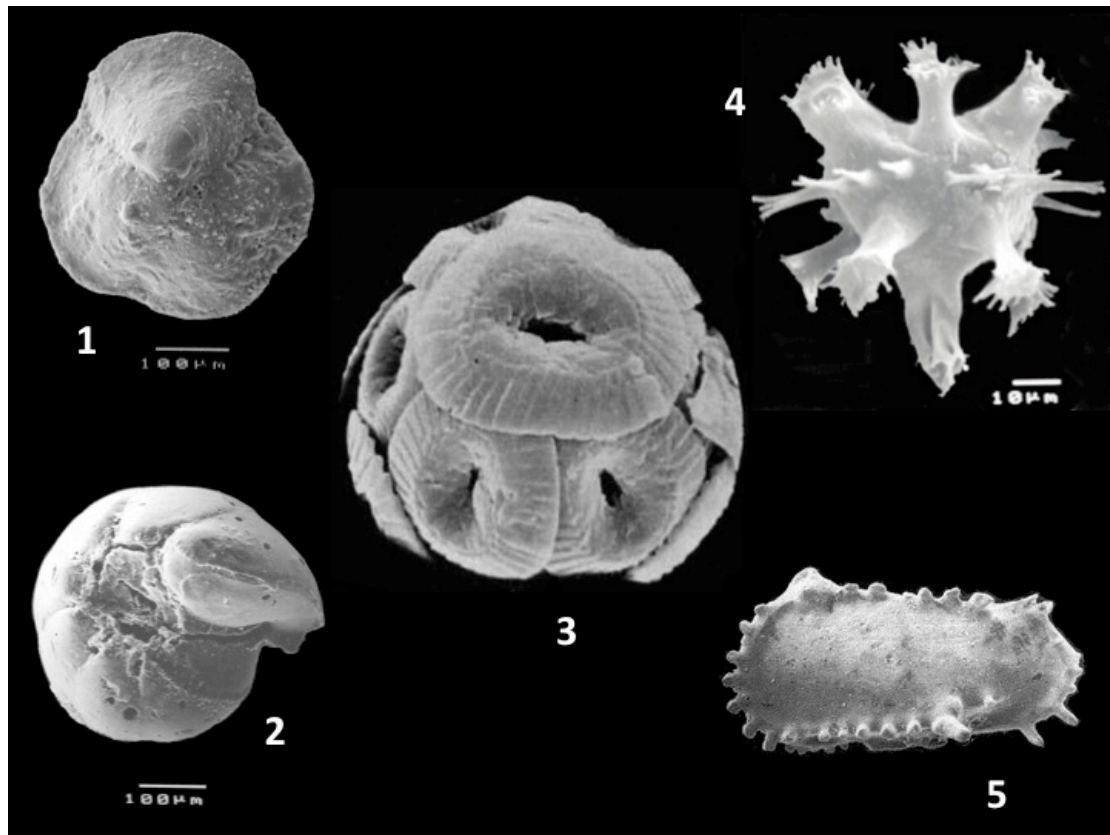


Figure 1 – Photographs of microfossils obtained with the SEM. (1) *Globorotalia conomiozea*; planktonic foraminifera from Quelfes (Algarve), ~7 Ma (Messinian). (2) *Gyroidina soldani*; benthic foraminifera from Penedo norte (Setúbal Península), ~14.6 Ma (early Tortonian). (3) *Coccolithus pelagicus*, x 6500; coccosphere, calcareous nannofossil from Palença (Setúbal Península), ~18 Ma (Burdigalian). (4) *Hystrichokolpoma rigaudiae*; dinoflagellate, from Miocene (Setúbal Península). (5) *Pterygocytheris (P.) siveteri*, x 80; ostracod from Almada - Cristo Rei (Setúbal Península), ~15.5 Ma (Langhian).

FIGURE 2

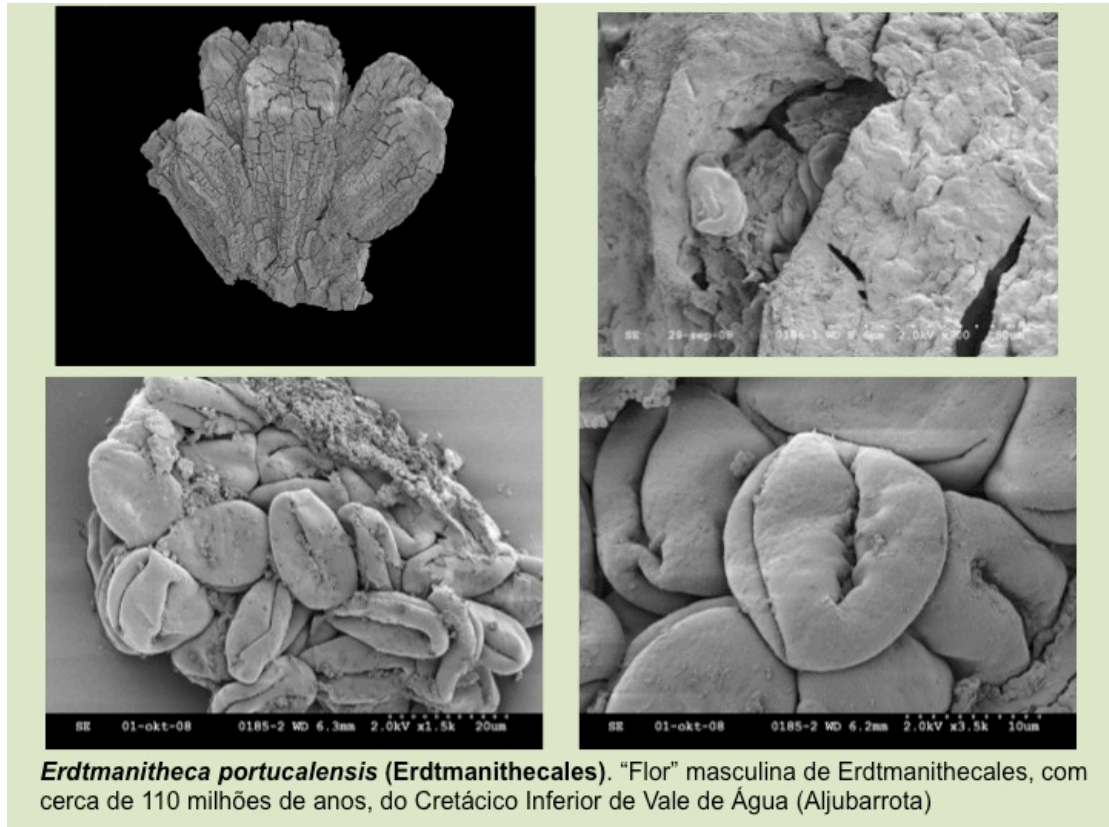


Figure 2 - *Erdtmanitheca portucalensis* (Erdtmanithecales). Male flower of Erdtmanithecales, with about 110 million years, from the Early Cretaceous of Vale de Água (Aljubarrota) and preserved trisulcate pollen on the stigma.

Mendes, M., Friis, E., Pedersen, R. & Pais, J. (2010) - *Erdtmanitheca portucalensis*, a new pollen organ from the Early Cretaceous (Aptian-Albian) of Portugal with *Eucommiidites*-type pollen. *Grana*, 49: 26-36.

FIGURE 3

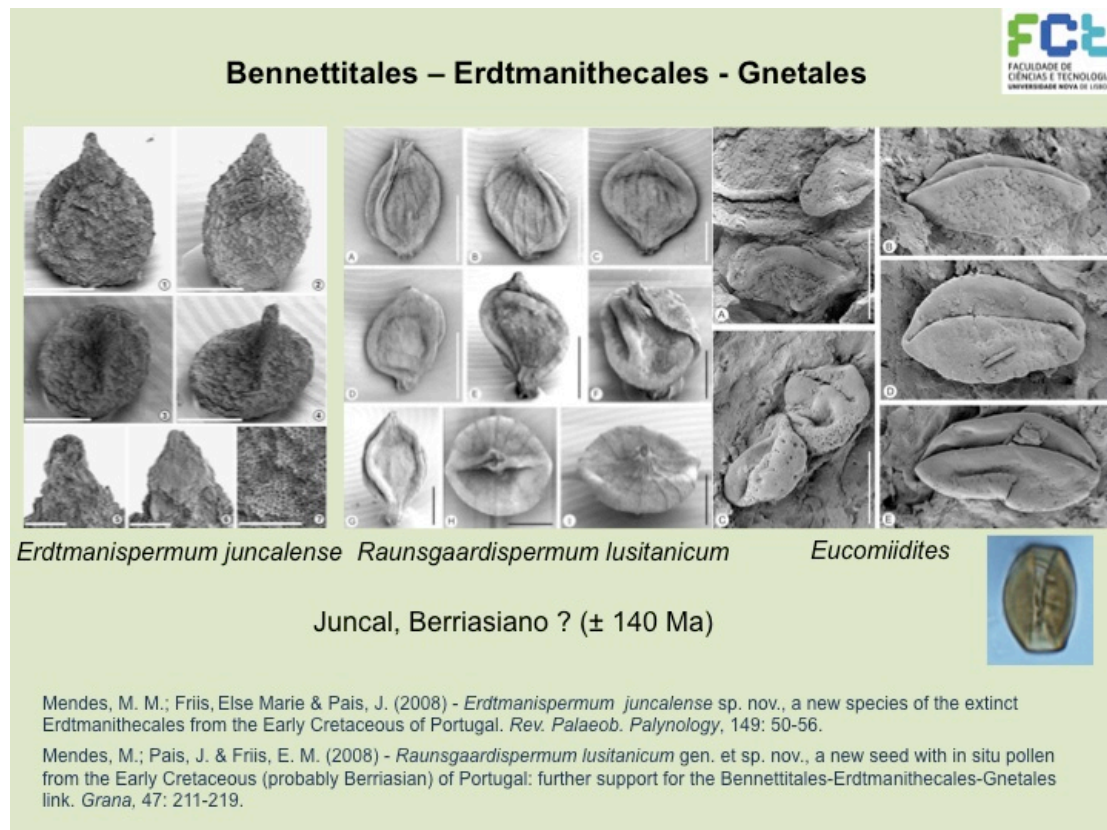


Figure 3 – Seeds of *Erdtmanispermum juncalense* (*Erdtmanithecales*) and *Raunsgaardispermum lusitanicum* (clade BEG – Bennettitales, Erdtmanithecales, Gnetales) and pollens type *Eucomiidites* found in the micropyle of these seeds in SEM and optical microscopy

Mendes, M. M., Friis, E. M. & Pais, J. (2008) - *Erdtmanispermum juncalense* sp. nov., a new species of the extinct Erdtmanithecales from the Early Cretaceous of Portugal. *Rev. Palaeob. Palynology*, 149: 50-56.

Mendes, M., Pais, J. & Friis, E. M. (2008) - *Raunsgaardispermum lusitanicum* gen. et sp. nov., a new seed with in situ pollen from the Early Cretaceous (probably Berriasian) of Portugal: further support for the Bennettitales-Erdtmanithecales-Gnetales link. *Grana*, 47: 211-219.

FIGURES 4 and 5

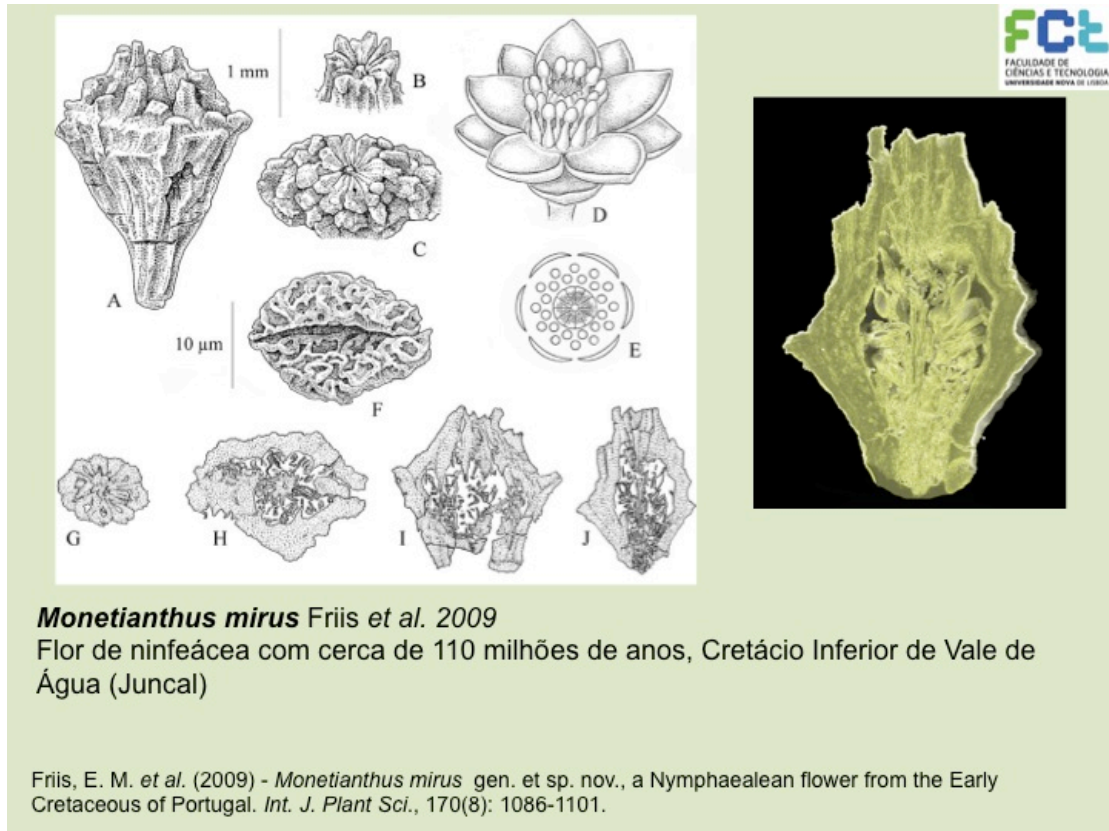


Figure 4 – X-ray tomography of flower of Nymphaeaceae (*Monetianthus mirus* Friis et al. 2009) with about 110 million years from the Lower Cretaceous of Vale de Água (Juncal) with flower drawing and reconstitution.

Friis, E. M. et al. (2009) - *Monetianthus mirus* gen. et sp. nov., a Nymphaealean flower from the Early Cretaceous of Portugal. *Int. J. Plant Sci.*, 170 (8): 1086-1101.

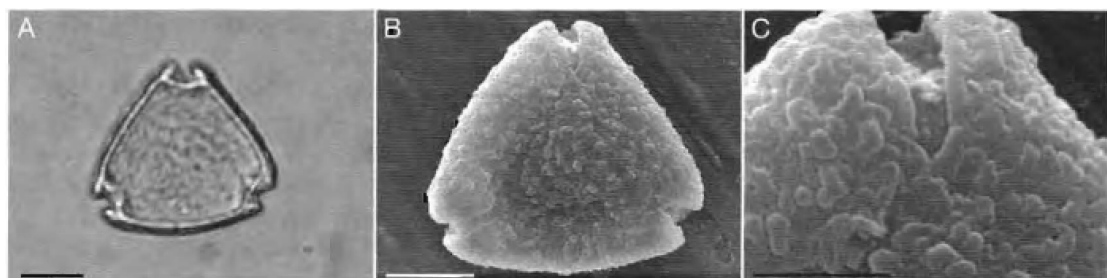


Figure 5 – *Symplacos* sp. pollen: A, LM equatorial view; B, SEM equatorial view; C, detail of the exine surface. Scale bars: A, B, 10 µm ; C, 1 µm.

Vieira M., Poças E., Pais J. & Pereira D. 2011. - Pliocene flora from S. Pedro da Torre deposits (Minho, NW Portugal). *Geodiversitas*, 33 (1): 71-85.

A importância da microscopia electrónica em Micropaleontologia

Paulo Legoinha

CICEGe, Departamento de Ciências da Terra, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, 2829-516 Caparica, Portugal. *pal@fct.unl.pt*

Os **microfósseis** são restos fossilizados de organismos microscópicos. O seu estudo tem de ser efectuado à lupa binocular, microscópio óptico ou microscópio electrónico de varrimento. O que se preserva destes organismos são as suas carapaças — esqueletos constituídos por matérias minerais, ou revestimentos orgânicos. O ramo da Paleontologia que se ocupa do estudo dos microfósseis é a **Micropaleontologia**. Os grupos mais estudados são os ostracodos, foraminíferos, radiolários, diatomáceas, nanofósseis calcários e palinomorfos (esporos, polénes, dinoflagelados, quitinozoários e acritarcas). Os palinomorfos são estudados na Palinologia e têm como característica comum um revestimento orgânico muito resistente ao ataque por ácidos. Restos de macro-organismos (dentes e ossículos de vertebrados, peças esqueléticas de invertebrados, sementes, etc) são também considerados microfósseis e estudados na Micropaleontologia. Os organismos microscópicos são abundantes e têm larga distribuição geográfica, apresentando às vezes rápida evolução através do tempo geológico. Habitam ambientes marinhos, lacustres e fluviais. Consequentemente os microfósseis permitem **datar e correlacionar rochas sedimentares**, bem como reconstituir a **evolução de ambientes e do clima**. Algumas espécies indicam com rigor a profundidade, salinidade, temperatura e energia do meio, tipo de substrato e níveis de oxigénio. O estudo dos microfósseis foi fortemente impulsionado pela indústria petrolífera. Em virtude do pequeno tamanho, abundância e não destruição pelo processo de sondagem, os microfósseis tornaram-se fundamentais na interpretação dos testemunhos de sondagem.

No século XVII, Robert Hook, inventor do microscópio, ao observar areia de praia reparou pela primeira vez numa concha de foraminífero e apercebeu-se que se tratava de um resto de organismo, designando-o de “minúsculo caracol de água”. Hook publicou o livro “Micrographia” com diversos desenhos do mundo biológico que atestam ainda o seu talento artístico. A **ilustração científica** é uma componente visual indissociável da comunicação científica, bem como da divulgação da ciência (Correia & Legoinha, 2010). No entanto, requer uma habilidade para desenho que poucos cientistas têm. As fotografias de microfósseis obtidas por **microscopia electrónica** ajudam a resolver esta dificuldade.

O surgimento e comercialização do **microscópio electrónico de varrimento (MEV)**, na década de 60, possibilitou grandes avanços da Micropaleontologia (Hay & Sandberg, 1967). Este equipamento foi logo considerado indispensável para o estudo dos microfósseis e, apesar do seu elevado custo, adquirido por muitos laboratórios de micropaleontologia, universitários e industriais (Bignot, 1985). As **vantagens** do microscópio electrónico de varrimento no **estudo de microfósseis** são:

- intervalo muito amplo de ampliação útil
- limite de resolução muito pequeno: 250 a 100 Å
- grande profundidade de campo permitindo boa visão estereoscópica
- fácil preparação e não destruição do material em estudo
- possibilidade de variação do ângulo de observação

Entre os **principais contributos** da microscopia electrónica para a Micropaleontologia, destacam-se:

- o estudo de **elementos esqueléticos de equinodermes**, altamente porosos e difíceis de observar com o microscópio óptico
- a análise da estrutura da **parede das conchas de foraminíferos planctónicos**, nomeadamente a ornamentação da superfície e as perfurações, com importância filogenética
- a **microtopografia de conodontes** fornecendo pistas sobre o modo de secreção e afinidades biológicas (linhagens)
- o estudo e ilustração de **peças esqueléticas de briozoários**, apresentando considerável relevo e detalhes morfológicos
- a análise ontogenética e filogenética das **estruturas da charneira** e das **impressões musculares nas valvas de ostracodos**, bem como de poros e canais, anteriormente desconhecidos
- em **peças esqueléticas de nanoplâncton calcário**, a obtenção de imagens em vista de plano e lateral do mesmo cocólito

- a pesquisa e estudo de **estruturas vegetais**, incluindo pólenes, esporos, estruturas florais muito pequenas, cutículas de folhas (células epidérmicas e estomas) e fragmentos de troncos. Algumas destas estruturas só são reconhecíveis através de imagens obtidas em MEV. Para além da visão tridimensional, algumas são tão pequenas que os instrumentos ópticos não são capazes de resolver os pormenores anatómicos ou ornamentais. Actualmente já é possível obter imagens do interior dessas estruturas através de tomografias de raios X de elevada resolução que permitem, por exemplo, observar os óvulos no interior de ovários de **flores de angiospérmicas primitivas**, com cerca de 130 milhões de anos
- o estudo de **dinoflagelados**, nomeadamente a organização das placas e a abertura, que só podem ser observados em pormenor recorrendo ao MEV

Agradecimento

Agradeço ao Prof. João Pais (UNL) algumas sugestões e figuras.

Referências

- Antunes, M.T., Legoinha, P., Nascimento, A. & Pais, J. (1996) – The evolution of the Lower Tagus Basin (Lisbon and Setúbal Peninsula, Portugal) from Lower to early Middle Miocene. *Géologie de la France*, Orléans, 6: 59-77.
- Bignot, G. (1985) - Elements of micropaleontology. London: Graham & Trotman Ltd., 217 p.
- Correia, F. & Legoinha, P. (2010) – Ilustração científica de microfósseis de Portugal. VIII Congresso Nacional de Geologia. Braga. *e-Terra*, vol. 17, n. 2: 4p.
- Fonseca, B. (1977) - Notes sur la géologie et la paléontologie du Miocène de Lisbonne - XVIII - Coupe de Palença, rive gauche du Tage: stratigraphie et micropaleontologie (Coccolithophorides). *Ciências da Terra (UNL)*, Lisboa, 3: 61-99.
- Friis, E.M., Pedersen, K.R., von Balthazar, M., Grimm, G.W. & Crane, P.R. (2009) - *Monetianthus mirus* gen. et sp. nov., a Nymphaealean flower from the Early Cretaceous of Portugal. *Int. J. Plant Sci.*, 170 (8): 1086-1101.
- Hay, W. & Sandberg, P. (1967) - The scanning electron microscope, a major break-through for micropaleontology. *Micropaleontology*, 13 (4): 407-418.
- Legoinha, P. (2001) - Biostratigrafia de Foraminíferos do Miocénico de Portugal (Baixo Tejo e Algarve). *Dissertação de Doutoramento*, Universidade Nova de Lisboa, 241 p., 24 est.
- Legoinha, P. (2003) - Upper Miocene planktonic foraminifera from Algarve (Portugal) — chronostratigraphical implications. *Ciências da Terra (UNL)*, Lisboa, 15: 199-208.
- Mendes, M. M., Friis, E. M. & Pais, J. (2008) - *Erdtmanispermum juncalense* sp. nov., a new species of the extinct Erdtmanithecales from the Early Cretaceous of Portugal. *Rev. Palaeob. Palynology*, 149: 50-56.
- Mendes, M., Pais, J. & Friis, E. M. (2008) - *Raunsgaardispermum lusitanicum* gen. et sp. nov., a new seed with in situ pollen from the Early Cretaceous (probably Berriasian) of Portugal: further support for the Bennettitales-Erdtmanithecales-Gnetales link. *Grana*, 47: 211-219.
- Mendes, M., Friis, E., Pedersen, R. & Pais, J. (2010) - *Erdtmanitheca portucalensis*, a new pollen organ from the Early Cretaceous (Aptian-Albian) of Portugal with *Eucommiidites*-type pollen. *Grana*, 49: 26-36.
- Mendes, M. M., Dinis, J., Pais, J. & Friis, E. M. (2011) - Early Cretaceous flora from Vale Painho (Lusitanian Basin, western Portugal): An integrated palynological and mesofossil study. *Review of Palaeobotany and Palynology*, 166: 152-162.
- Vieira M., Poças E., Pais J. & Pereira D. 2011 - Pliocene flora from S. Pedro da Torre deposits (Minho, NW Portugal). *Geodiversitas*, 33 (1): 71-85.

 Legoinha, P. (2014) – The importance of electron microscopy in Micropaleontology. Abstracts of *Egas Moniz Symposium on Electron Microscopy - An Overview of Scientific Applications*. Egas Moniz Cooperativa de Ensino Superior CRL, Monte de Caparica, Portugal. <http://microventures.co/SymposiumEgas2014>

FIGURA 1

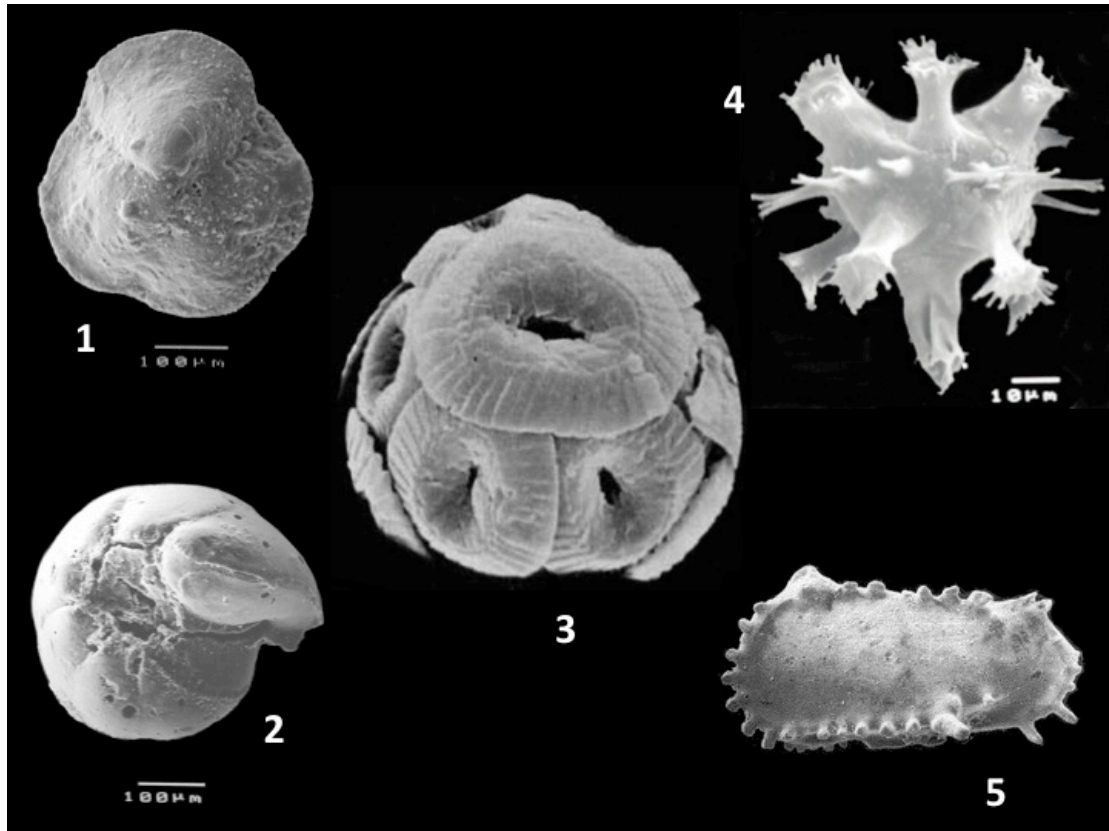


Figura 1 – Fotografias de microfósseis obtidas com o MEV (1) *Globorotalia conomiozea*, foraminífero planctónico de Quelfes (Algarve), ~7 Ma (Messiniano). (2) *Gyroidina soldani*, foraminífero bentónico de Penedo norte (Península de Setúbal), ~14,6 Ma (Tortoniano inferior). (3) *Coccolithus pelagicus*, x 6.500; cocosfera, nanofóssil calcário de Palença (Península de Setúbal), ~18 Ma (Burdigaliano). (4) *Hystriocholpoma rigaudiae*, dinoflagelado, Miocénico (Península de Setúbal). (5) *Pterygocytheris (P.) siveteri*, x 80; ostracodo de Cristo Rei (Almada), ~15,5 Ma (Langhiano).

FIGURA 2

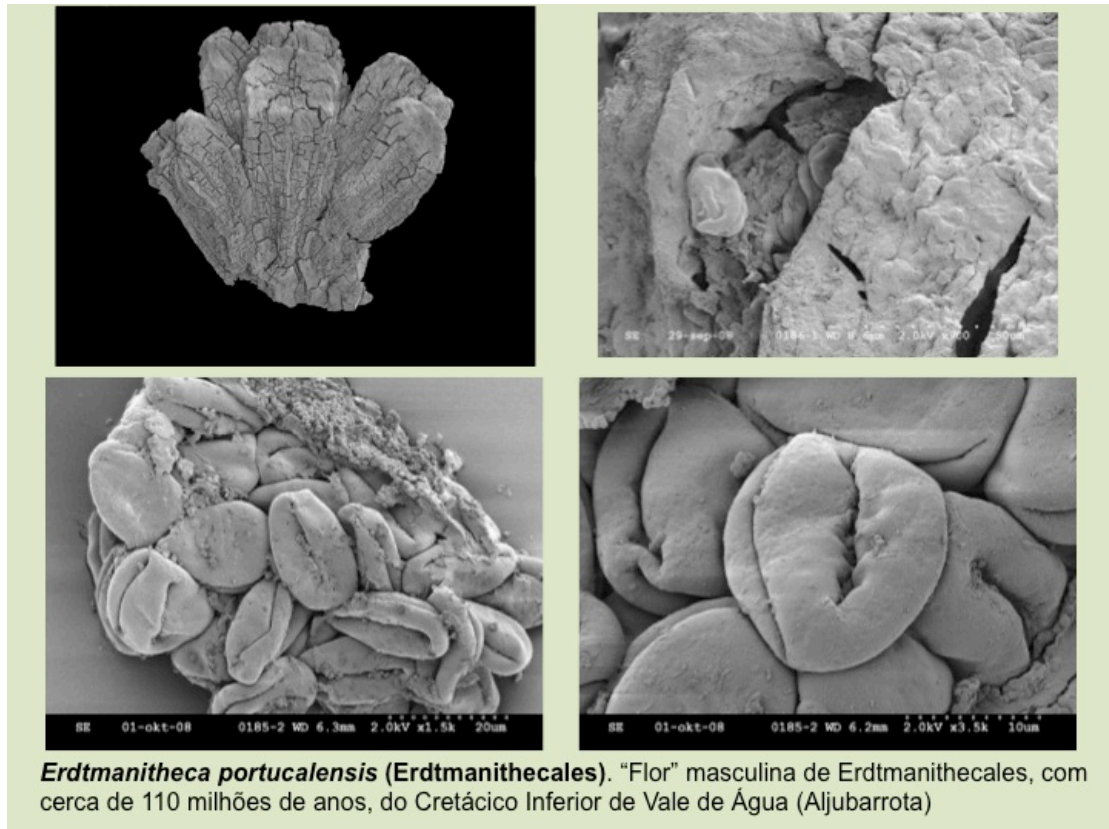


Figura 2 - *Erdtmanitheca portucalensis* (Erdtmanithecales). “Flor” masculina de Erdtmanithecales, com cerca de 110 milhões de anos, do Cretácico Inferior de Vale de Água (Aljubarrota) e pólenes trisulcados preservados no estigma.

Mendes, M., Friis, E., Pedersen, R. & Pais, J. (2010) - *Erdtmanitheca portucalensis*, a new pollen organ from the Early Cretaceous (Aptian-Albian) of Portugal with *Eucommiidites*-type pollen. *Grana*, 49: 26-36.

FIGURA 3

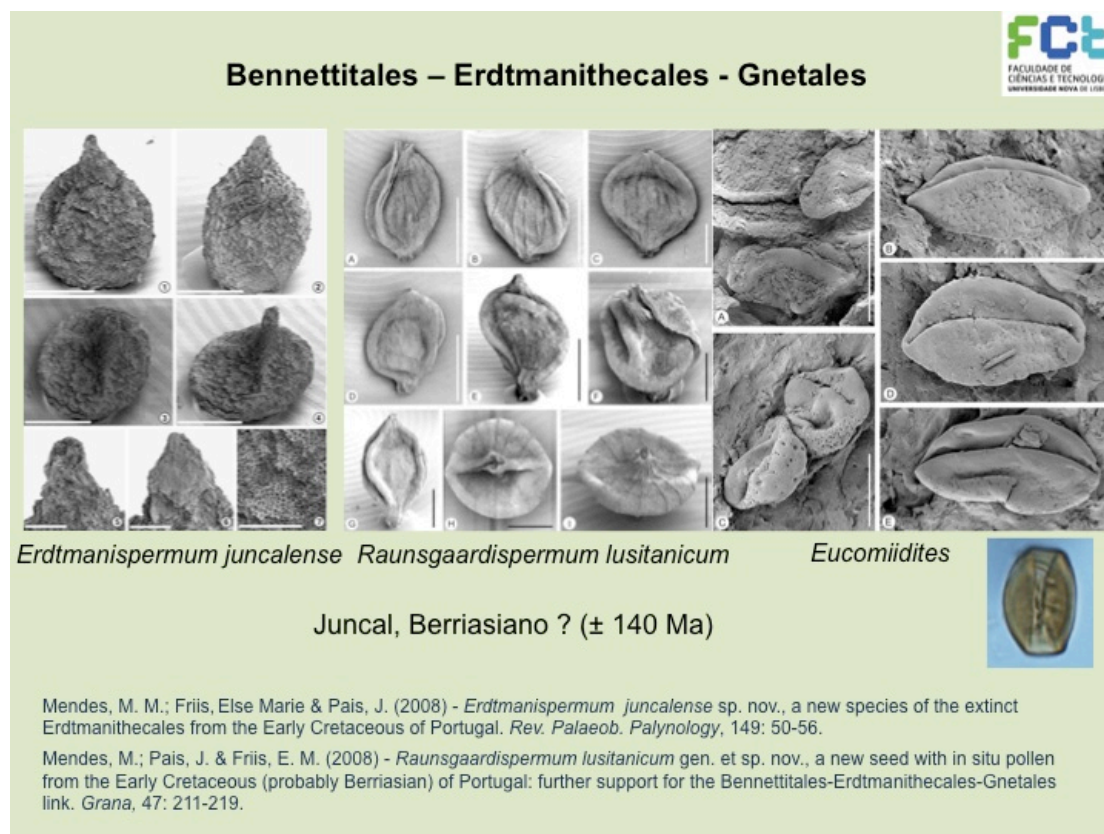


Figura 3 – Sementes de *Erdtmanispermum juncalense* (Erdtmanithecales) and *Raunsgaardispermum lusitanicum* (clado BEG – Bennettitales, Erdtmanithecales, Gnetales) e pólenes tipo *Eucomiidites* em MEV e em microscopia óptica encontrados no micrópilo destas sementes

Mendes, M. M., Friis, E. M. & Pais, J. (2008) - *Erdtmanispermum juncalense* sp. nov., a new species of the extinct Erdtmanithecales from the Early Cretaceous of Portugal. *Rev. Palaeob. Palynology*, 149: 50-56.

Mendes, M., Pais, J. & Friis, E. M. (2008) - *Raunsgaardispermum lusitanicum* gen. et sp. nov., a new seed with in situ pollen from the Early Cretaceous (probably Berriasian) of Portugal: further support for the Bennettitales-Erdtmanithecales-Gnetales link. *Grana*, 47: 211-219.

FIGURAS 4 e 5

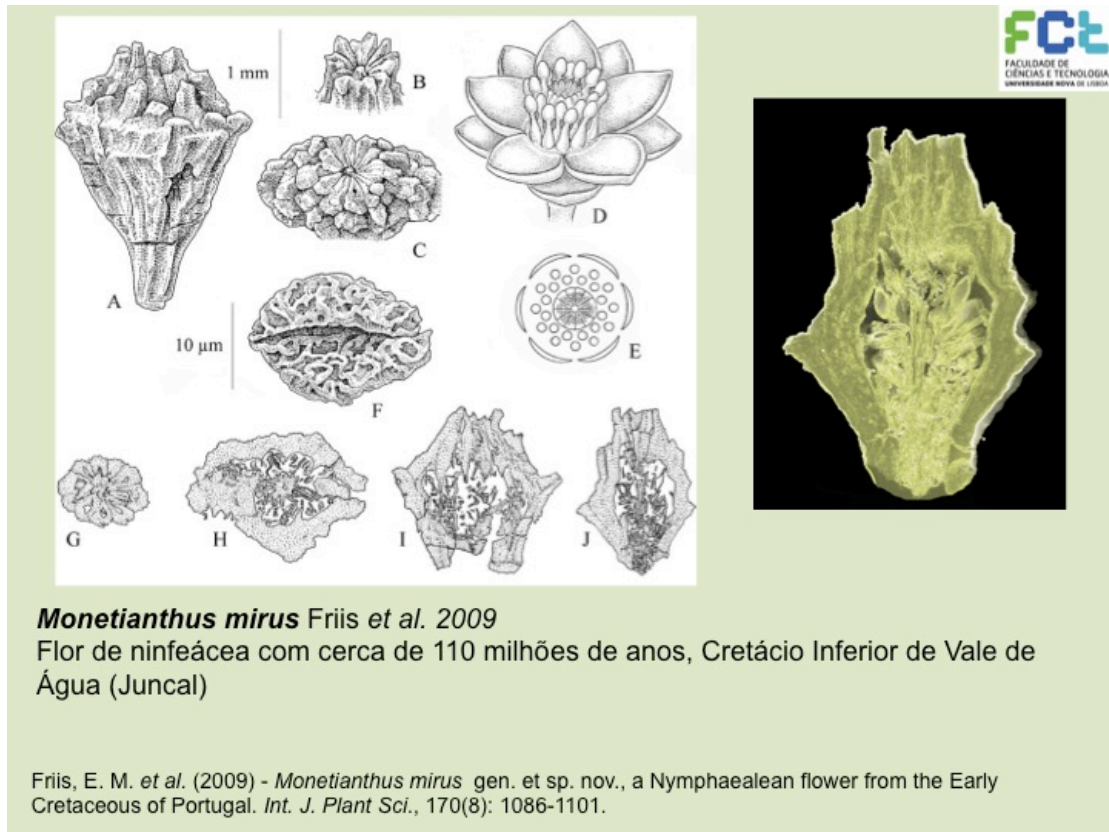


Figura 4 – Tomografia de raios X de flor de Flor de Nynpheaceae (*Monetianthus mirus* Friis et al. 2009) com cerca de 110 milhões de anos, Cretácio Inferior de Vale de Água (Juncal) com desenho da flor e sua reconstituição

Friis, E. M. et al. (2009) - *Monetianthus mirus* gen. et sp. nov., a Nymphaealean flower from the Early Cretaceous of Portugal. *Int. J. Plant Sci.*, 170 (8): 1086-1101.

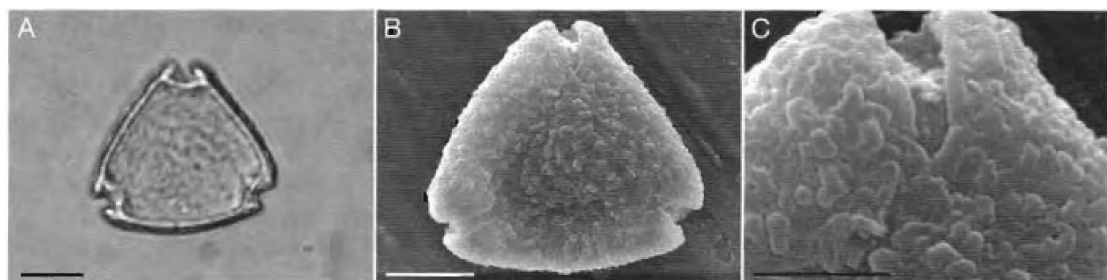


Figura 5 – Pólen *Symplocos* sp.: A, MO vista equatorial; B, MEV vista equatorial; C, detalhe da superfície da exina. Barra de escala: A, B, 10 µm ; C, 1 µm.

Vieira M., Poças E., Pais J. & Pereira D. 2011. - Pliocene flora from S. Pedro da Torre deposits (Minho, NW Portugal). *Geodiversitas*, 33 (1): 71-85.