DOI: 10.22034/JAR.2024.8392.1966 مقاله پژوهشی، صفحات ۱۸۲-۱۶۸

مروری بر روش‌های مطالعه نانوپلانکتون‌های آهکی و ارائه روشی نوین جهت آماده‌سازی هم‌زمان برای میکروسکوپ نوری و الکترونی روبشی

فریبا فروغی* و نسیم لواسانی

ایران، تهران، دانشگاه تهران، دانشکدگان علوم، دانشکده زمین شناسی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۲/۰۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۳/۲۰

چکیده

نانوپلانکتون‌های آهکی یکی از گروه‌های موجودات دریایی عهد حاضر هستند که تولید آهک‌های زیستی (Chalky Limestone) می‌کنند. آن‌ها توسط جلبک‌های میکروسکوپی هاپتوفیت (Haptophytes)، در آب دریا و در رسوبات عهد حاضر و یا از طریق موجودات منقرض شده در رسوبات اقیانوس‌های دیرینه یافت می‌شوند. یکی از مهم‌ترین قدم‌ها برای مطالعه نانوپلانکتون‌ها انتخاب روش صحیح آماده‌سازی نمونه‌ها است. در این پژوهش بر اساس نوع و سن رسوبات، انواع روش‌های استاندارد آماده‌سازی رسوبات برای مشاهده با میکروسکوپ نوری(LM) شامل روش‌های آغشته کردن (smear slide)، استفاده از پیپت (pippet strew slide)، ته‌نشست ثقلی (gravity settling)، سانتریفیوژ (centrifuging)، به علاوه روش آماده‌سازی مربوط به نمونه‌های عهد حاضر که در آب شور دریا حضور دارند، ارائه شده و به تفصیل مورد بحث قرار گرفته‌اند. همچنین روشی برای آماده‌سازی نمونه‌ها جهت مطالعه با میکروسکوپ الکترونی روبشی برای تعیین نانوفاسیس‌ها هم ارائه گردیده است. علاوه بر این، روشی جدید برای آماده‌سازی نمونه‌ها جهت مطالعه هم‌زمان میکروسکوپ نوری(LM) و میکروسکوپ الکترونی روبشی(SEM) نیز معرفی شده است. ضمناً روش‌های تعیین فراوانی مطلق گونه‌ها، تنوع گونه‌ای، میزان حداکثر فراوانی گونه‌ای، میزان یکنواختی، شاخص تغذیه‌ای و میزان حفظ‌شدگی گونه‌ها که در تحلیل‌های بوم‌شناسی استفاده می‌شود، مورد بحث قرار گرفته است. لذا این پژوهش می‌تواند به عنوان راهنمایی جهت آماده‌سازی و مطالعه استاندارد نانوپلانکتون‌های آهکی برای مطالعات زیست‌شناسی، زیست‌چینه‌نگاری و دیرینه‌بوم‌شناسی نیز مورد استفاده قرار گیرد.

واژه های کلیدی: دیرینه بوم‌شناسی، میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)، میکروسکوپ نوری (LM)، نانو پلانکتون‌های آهکی

* نویسنده مسئول، پست الکترونیکی: f.foroughi@ut.ac.ir

مقدمه

نانوپلانکتون‌های آهکی گروهی از موجودات دریایی هستند که ابعادی کوچکتر از ۶۳ میکرون داشته (۶) و برای اولین بار توسط لوهمن (۱۶) معرفی شدند. این گروه از جانوران دریایی جزو جلبک‌های هاپتوفیت دسته بندی می‌شوند. آن‌ها بواسطه دیواره آهکی از جنس آراگونیت یا کربنات کلسیم که توسط موجود زنده تولید می‌شوند، می‌توانند در چرخه ژئوشیمیایی آب دریاهای عهد حاضر و اقیانوس‌های دیرینه شرکت نمایند. نانوپلانکتون‌ها در زمان حیات خود سپرهایی به نام کوکولیت (Coccolithus) را تولید کرده که امروزه جهت شناسایی و تعیین سن نسبی گونه‌ها از آن‌ها استفاده می‌شود. کوکولیتوفورها، صفحات آهکی را در درون سلول ساخته و به سطح سلول حرکت می‌دهند تا همانند پوششی محافظ، در اطراف سلول مستقر و پس از مرگ سلول از هم گسیخته می‌شوند (۳۴). بسیاری از دانشمندان معتقدند که عمل کوکولیت‌ها علاوه بر حفاظت از سلول به عنوان تأمین نور جهت فتوسنتز برای کوکولیتوفرها بکار می‌رود (۹). از

DOI: 10.22034/JAR.2024.8392.1966 مقاله پژوهشی، صفحات ۱۸۲-۱۶۸

آنجائیکه نحوه آماده‌سازی نمونه‌ها در آزمایشگاه و روش مورد استفاده در کیفیت و نتیجه نهایی مطالعات تاثیر بسزائی دارد، لذا مروری بر روش‌های استاندارد و ارائه متمرکز روش‌هایی که تاکنون ارائه شده‌اند، می‌تواند به پژوهشگران در زمینه مطالعات مربوط به نانوپلانکتون‌های آهکی کمک نماید. برای مطالعه نانوپلانکتون‌های آهکی، غالبا از سه نوع میکروسکوپ نوری (Light Microscope) به اختصار(LM) و میکروسکوپ الکترونی روبشی (Scanning Electron Microscope) به اختصار (SEM) و میکروسکوپ الکترونی عبوری (Transmission Electron Microscope) به اختصار (TEM) استفاده می‌شود. روش‌های آماده‌سازی نمونه‌های فسیلی موجود در سنگ‌های رسوبی با نمونه‌های عهد حاضر موجود در آب دریا، روش آماده‌سازی برای مطالعه با میکروسکوپ نوری و میکروسکوپ الکترونی روبشی کاملا متفاوت است. در این نوشتار به بررسی همه روش‌های معمول، قدیمی و جدید پرداخته شده، همچنین روشی برای آماده‌سازی نمونه‌ها برای مطالعه همزمان در میکروسکوپ نوری و الکترونی روبشی نیز ارائه شده است. در ادامه روش‌های مطالعه نمونه‌های آماده‌سازی شده برای انجام مطالعات زیست شناسی، زیست‌چینه‌نگاری، دیرینه‌بوم‌شناسی که در اقیانوس‌شناسی و تعیین سن لایه‌های رسوبی برای مطالعات رسوبات سطح‌الارضی و تحت‌الارضی (چاه‌ها) کاربرد دارد، پرداخته شده است.

مواد و روشها

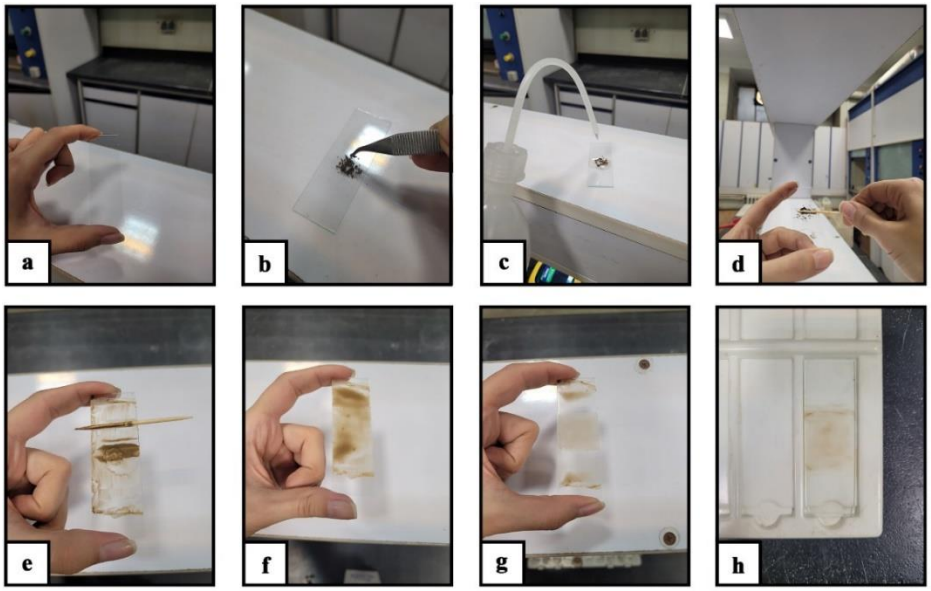
آماده‌سازی نمونه‌ها جهت مطالعه گونه‌های نانوپلانکتونی موجود در سنگ‌های رسوبی شیل و مارنی یا آهک‌های آرژیلیتی تشکیل شده در آب‌های اقیانوس‌های دیرینه و نمونه‌های مربوط به آب‌های دریایی عهد حاضر صورت می‌گیرد. نمونه‌برداری از نهشته‌های اقیانوسی به طور کلی به دو روش انجام می‌شود؛ نمونه‌برداری سیستماتیک (Systematic) و نمونه‌برداری نقطه‌ای (Spot-sample). برای جلوگیری از برداشت نمونه از بخش هوازده، با رعایت اصول عدم آغشتگی از عمق ۵۰ تا ۷۰ سانتی‌متری نمونه‌برداری انجام می‌شود. همچنین برای پیشگیری از آلودگی نمونه‌ها باید برای برداشت هر نمونه از دستکش یک‌بار مصرف استفاده کرد و پس از برداشت هر نمونه چکش را شستشو داد. همچنین جهت نمونه‌برداری از آب اقیانوس‌های عهد حاضر، با توجه به هدف مطالعه از آب‌های سطحی و یا از اعماق مختلف نمونه‌برداری انجام می‌شود (۴).

نتایج

روش‌های آماده‌سازی نمونه‌های نانوپلانکتون‌ها در سنگ‌های رسوبی و آب دریا به چند روش استاندارد قابل اجرا می‌باشد که در زیر به آن اشاره شده است:

۱- روش آغشته کردن (Smear Slide): این روش توسط بون (۶) و پرچ نیلسن (۲۱) توضیح داده شده است. ابتدا سطح کمی از نمونه سنگی با استفاده از تیغ یا چاقو تراش داده می‌شود تا بخش هوازده کنار زده شده و نمونه مورد استفاده از سطح تازه و بدون آلودگی برداشت شود. سپس مقدار بسیار کمی از نمونه بر روی لام قرار داده می‌شود و با یک الی دو قطره آب مقطر آغشته می‌گردد. پس از آن با استفاده از خلال دندان یا میله نازک پلاستیکی، نمونه‌ها بر روی سطح لام پخش و صاف می‌شوند. در این مرحله در صورت غلیظ بودن می‌توان آب مقطر اضافه نمود تا نمونه کاملا حل شود و یک سطح صاف و نازکی از نمونه بر روی لام باقی بماند. در این مرحله با استفاده از صفحه داغ (hot-plate) یا لامپ UV روند خشک شدن نمونه تسریع می‌شود. پس از خشک شدن سطح لام، با ریختن چسب (مثل چسب انتلان) بر روی لامل و چسباندن آن به لام، اسلاید آماده می‌گردد (شکل ۱). از این روش برای آماده‌سازی همه انواع نمونه‌ها استفاده می‌شود. از این روش برای انجام مطالعات زیست‌چینه‌نگاری و اطمینان از غنای نانوپلانکتون‌ها در نمونه‌های برداشته شده از شیل و مارن‌ها و برای تعیین فراوانی نسبی استفاده می‌شود.

مقاله پژوهشی، صفحات ۱۸۲-۱۶۸ DOI: 10.22034/JAR.2024.8392.1966



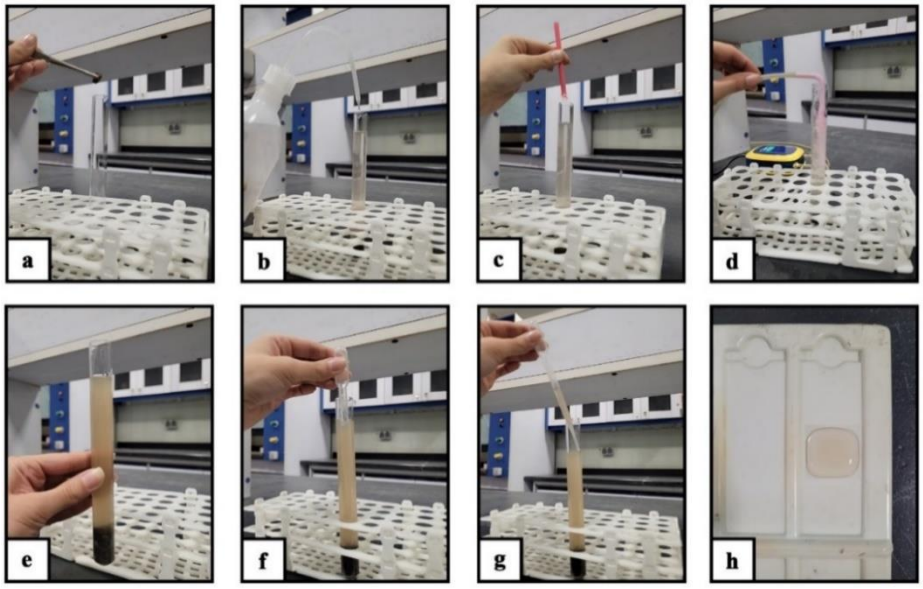
شکل ۱- مراحل آماده‌سازی نمونه‌ها به روش آغشته کردن. پس از برداشتن یک لام (a)، مقداری از رسوب خرد شده بر روی سطح لام قرار داده می‌شود (b)، سپس مقداری آب مقطر اضافه شده (c) و با حرکت دادن خلال دندان بر روی سطح لام (d) نمونه حل می‌شود. در صورت غلیظ بودن نمونه (e) مقداری آب مقطر اضافه می‌شود (f) تا در نهایت سطح صاف و نازکی از نمونه بر روی اسلاید باقی بماند (g). سپس برای خشک شدن اسلاید، روی یک صفحه داغ (hot plate) یا در زیر لامپ UV قرار داده می‌شود (h).

۲- استفاده از روش پیپت (Pipette Strew Slide): این روش با دستورالعمل‌های متفاوتی توسط نویسندگان مختلف ارائه شده است. بون (۶) معتقد است پس از تراش دادن سطح نمونه با چاقو جهت حذف بخش هوازده، کمی از نمونه درون هاون خرد شده و سپس با مقداری آب مقطر مخلوط می‌گردد. پس از آن مقداری Calgon که همان هگزامتافسفات سدیم است، به ترکیب فوق اضافه شده و مخلوط می‌شود. برای مدتی به ترکیب حاصله استراحت داده می‌شود تا ذرات درشت ته‌نشین شده و نانوپلانکتون‌های آهکی در بخش بالایی قرار گیرند. سپس مقداری از بخش بالایی مخلوط درون ظرف دیگری ریخته شده و سپس با اضافه کردن کمی آب مقطر رقیق می‌شود. در آخر مقداری از محلول بدست آمده با پیپت روی لامل ریخته می‌شود تا خشک شده و به لام چسبانده می‌شود. تیبولت و گاردین (۳۰) معتقدند که در این روش پس از خرد کردن نمونه در هاون، مقدار ۵۰ میلی‌گرم از نمونه با ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر ترکیب شده و به مدت ۱۵ ثانیه درون دستگاه اولتراسونیک قرار داده می‌شود. سپس ماده بر روی لامل ریخته می‌شود و پس از آن به لام چسبانده می‌شود. در روشی دیگر ۵۰ میلی‌گرم از نمونه به همراه ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر همراه با آمونیاک مخلوط شده و پس از قرارگیری در دستگاه اولتراسونیک به مدت ۵ تا ۸ ثانیه و تکان دادن محلول، نمونه ۲ دقیقه در مرحله سکون قرار می‌گیرد. استفاده از دستگاه اولتراسونیک جهت جلوگیری از لخته شدن نانوپلانکتون‌ها و از بین بردن حالت امولسیونی رس‌های موجود در نمونه است. پس از آن نمونه برای ریخته شدن بر روی لامل و چسباندن به لام آماده می‌شود. پس از چسباندن لامل به لام، می‌توان آن را در زیر نور فرابنفش (UV) قرار داد تا روند خشک شدن چسب را تسریع نمود.

طبق تجربیات حاصله، این روش به شرح زیر بسط داده شد: پس از قرار دادن بخش غیرهوازده نمونه درون لوله آزمایش و اضافه کردن آب مقطر و مقدار کمی هگزامتافسفات سدیم، جهت جلوگیری از لخته شدن (aggregate) نانوپلاکتون‌ها و جدایش کوکولیت‌ها از کوکوسفر (Coccosphere) و

مقاله پژوهشی، صفحات ۱۸۲-۱۶۸ DOI: 10.22034/JAR.2024.8392.1966

همچنین برای از بین بردن حالت امولسیونی رس‌ها به جای دستگاه اولتراسونیک از پمپ آکواریوم به مدت ۱۵ دقیقه استفاده می‌شود. پس از آن ۲ دقیقه به ترکیب حاصله استراحت داده شده و پیپت تا ۲ سانتی‌متری پائینی لوله آزمایش فرو برده شده و بعد از برداشت نمونه، بر روی لامل انتقال داده می‌شود. در نهایت با چسباندن لامل بر روی لام اسلاید تهیه می‌گردد (شکل ۲). شایان ذکر است که از این روش که به روش ۵۰-۵۰ مشهور است، برای انجام همه مطالعات خصوصاً دیرینه‌بوم‌شناسی و تعیین فراوانی نسبی نانوپلانکتون‌ها استفاده می‌شود.



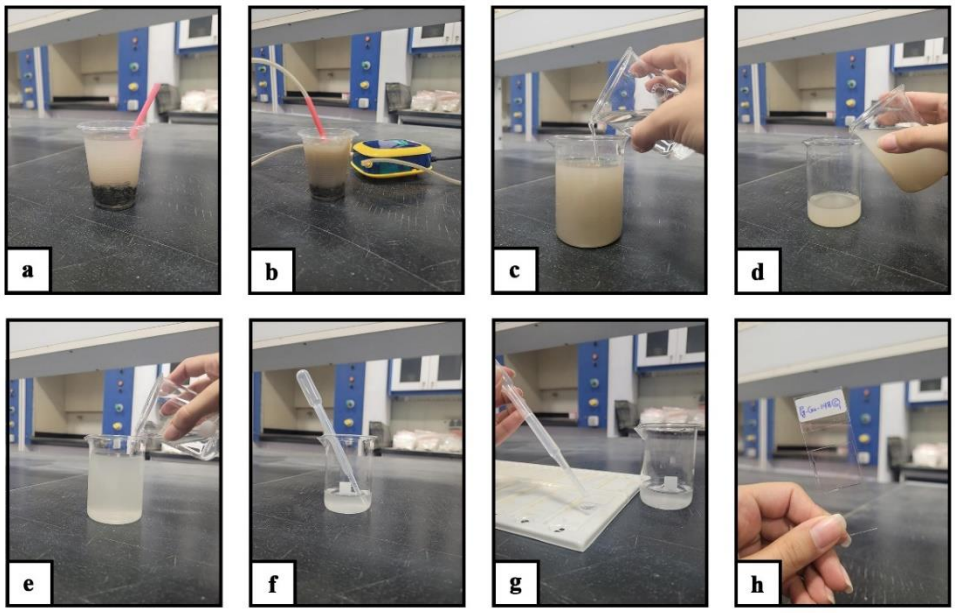
شکل ۲- مراحل آماده‌سازی نمونه‌ها به روش فروبردن پیپت، مقداری از رسوب درون لوله آزمایش ریخته می‌شود (a)، سپس نمونه با اضافه کردن آب مقطر به حجم می‌رسد (b)، پس از آن مقدار بسیار کمی از پودر هگزامتافسفات کلسیم اضافه شده (c) و برای پمپ کردن نمونه، لوله پمپ آکواریوم به داخل لوله آزمایش فرو برده می‌شود (d)، پس از گذشت ۲ دقیقه در حالت سکون قرار داده می‌شود (e) و پس از آن پیپت تا ۲ سانتی‌متر انتهایی لوله آزمایش فرو برده شده (f) و نمونه برداشت می‌گردد (g)، در آخر قطره‌ای بر روی لامل ریخته می‌شود و اسلاید تهیه می‌گردد (h).

۳- روش ته‌نشست ثقلی (Gravity Settling): این روش در سال ۱۹۷۶ توسط مشکویتز و ارلیچ (۱۹) و در سال ۱۹۷۷ توسط هی (۱۲) ارائه شده است. در این روش که بر مبنای قانون استوک است، مقدار بیش‌تری از نمونه (حدوداً cm33) در مقایسه با سایر روش‌ها استفاده می‌شود. بر اساس توصیف این روش توسط بون (۶)، پس از برداشتن بخش غیرهوازده نمونه، خرد کردن آن در هاون و اضافه کردن آب مقطر و هم زدن آن، ترکیب حاصله به مقدار ۱ تا ۲ دقیقه در حالت سکون قرار داده می‌شود. سپس در ظرف دیگری ریخته شده و ۱۰ تا ۱۵ دقیقه در حالت سکون قرار داده می‌شود. این بار بخش بالایی مخلوط دور ریخته شده و از باقی‌مانده آن اسلاید تهیه می‌گردد.

طبق تجربیات حاصله، این روش به شرح زیر بسط داده شد: ابتدا نمونه داخل یک بشر ۲۵۰ میلی‌لیتری ریخته شده و با استفاده از آب مقطر به حجم رسانده می‌شود. مقدار بسیار کمی هگزامتافسفات سدیم در همین مرحله به بشر اضافه می‌شود تا از بهم‌چسبیدگی رسوبات و ایجاد لخته جلوگیری نماید. پس از گذشت ۲۴ ساعت از خیساندن نمونه در آب مقطر، به مدت ۱۵ دقیقه با استفاده از پمپ آکواریوم پمپ زده می‌شود تا رسوبات از حالت سخت خارج شده و هم نانوپلانکتون‌ها از رسوبات و هم کوکولیت‌ها از کوکوسفر جدا شوند. پس از آن با توجه به نوع و سن رسوبات، بین ۸ تا ۱۰ دقیقه به ترکیب حاصله استراحت داده می‌شود. سپس ۲ سانتی‌متر از بالای ترکیب به آرامی به یک بشر ۸۰

مقاله پژوهشی، صفحات ۱۸۲-۱۶۸ DOI: 10.22034/JAR.2024.8392.1966

میلی‌لیتری دیگر انتقال داده شده و با آب مقطر مجدداً به حجم رسانیده می‌شود. در این مرحله ترکیب مذکور ۱ دقیقه در حالت سکون قرار داده شده و پس از آن مجدداً ۲ سانت بالایی آن درون یک بشر ۸۰ میلی‌لیتری دیگر ریخته می‌شود. با تکرار مجدد این مرحله، این بار ۲ سانتی‌متر انتهایی ترکیب درون بشر نگه داشته شده و باقی‌مانده دور ریخته می‌شود. از این ۲ سانت انتهایی مربوط به بشر سوم، با استفاده از پیپت نمونه برداشت شده و روی لامل ریخته می‌شود. پس از خشک شدن لامل، روی لام که به چسب آغشته شده به آرامی روی آن قرار داده می‌شود (شکل ۳). از این روش جهت تهیه همه انواع نمونه‌های سنگی و برای مطالعات زیست‌چینه‌نگاری استفاده می‌شود. تهیه اسلاید با این روش نسبت به سایر روش‌های آماده‌سازی، زمان بیش‌تری نیاز دارد ولی مزیت آن بر دیگر روش ها این است که رسوبات و اجزای غیر فسیلی کاهش می‌یابند و نمونه ها تمیزتر هستند. علاوه بر آن در این روش، چون حجم بیشتری از رسوب مورد بررسی قرار می‌گیرد قاعدتاً تعداد گونه‌های بیش‌تری نیز مورد ارزیابی قرار می‌گیرند. لذا این روش برای رسوباتی که حجم نانوپلانکتون‌ها در آن‌ها کم است (مثل رسوبات تریاس یا ژوراسیک و اوایل کرتاسه پایینی)، ابعاد نمونه‌ها کوچک بوده و میزان فراوانی و تنوع گونه‌ها کم است، این روش بسیار مفید به نظر می‌رسد.



شکل ۳- مراحل آماده‌سازی نمونه‌ها به روش ته‌نشست ثقلی. پس از ریختن نمونه درون بشر و ترکیب آن با آب مقطر و مقدار کمی هگزامتافسفات سدیم، نمونه برای ۲۴ ساعت خیسانده می‌شود (a)، سپس به مدت ۱۵ دقیقه با پمپ آکواریوم پمپ زده شده (b) پس از ۱ دقیقه استراحت ، مقدار ۲ سانت بالایی در بشر دوم ریخته شده و با آب مقطر به حجم رسانده می‌شود (c)، در این مرحله پس از هم زدن و ۱ دقیقه استراحت، ۲ سانتی‌متر بالایی آن درون بشر سوم ریخته شده (d) و مجددا با آب مقطر مخلوط می‌شود (e). بعد از هم زدن و ۱ دقیقه استراحت، محتوای بالایی بشر دور ریخته شده و ۲ سانت پایینی بشر برای تهیه اسلاید نگاه داشته می‌شود (f). با استفاده از پیپت مقداری از نمونه بر روی لامل ریخته شده (g) و پس از خشک شدن روی لام چسبانده می‌شود (h).

۴- روش سانتریفیوژ (Centrifuging): شرح این روش توسط پژوهشگران زیادی مورد بحث قرار گرفته است (۶؛ ۷؛ ۱۴؛ ۲۳؛ ۲۸). بر اساس جدیدترین منبع موجود (۶) ابتدا بخشی از نمونه غیرهوازده درون لوله آزمایش مخصوص دستگاه سانتریفیوژ (test-tube) ریخته و با آب مقطر مخلوط می‌شود. سپس لوله درون دستگاه سانتریفیوژ قرار گرفته و

مقاله پژوهشی، صفحات ۱۸۲-۱۶۸ DOI: 10.22034/JAR.2024.8392.1966

برای ۱۵ ثانیه روی r.p.m. 350 تنظیم می‌شود. پس از این مرحله، محتوای بالایی لوله به لوله دوم منتقل شده و در این صورت ذرات رسوب که ابعادی بیش از ۳۰ میکرون دارند حذف می‌شوند. این بار دستگاه برای ۳۰ ثانیه روی r.p.m. 1000 تنظیم شده و پس از آن محتوای بالایی لوله دور ریخته می‌شود (این کار باعث می‌شود ذرات رسوب با ابعاد کم‌تر از ۲ میکرون حذف شوند). سپس به محتوای انتهایی ظرف آب مقطر اضافه می‌شود تا کاملا رقیق شود. پس از آن مجدداً دستگاه برای ۳۰ ثانیه روی r.p.m. 1000 تنظیم شده و محتوای بالایی نمونه دور ریخته می‌شود. در آخر از محتوای باقی‌مانده در انتهای لوله برای تهیه اسلاید استفاده می‌شود. مدت زمان آماده‌سازی نمونه با استفاده از این روش به نوع دستگاه سانتریفیوژ، نوع و سن رسوبات بستگی دارد. این روش برای آماده‌سازی نمونه جهت مطالعه در میکروسکوپ الکترونی روبشی بسیار مناسب بوده و چون نانوپلانکتون‌های بزرگ‌تر در انتهای ظرف باقی می‌مانند و ذرات کوچک حذف می‌شوند، نمونه‌ای تمیز برای مطالعه در دسترس خواهد بود.

۵- روش آماده‌سازی نمونه‌های نانوپلانکتون‌های آهکی برای مطالعه در میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM): مطالعه نانوپلانکتون‌های آهکی در میکروسکوپ الکترونی روبشی روش متفاوتی نیاز دارد چرا که قبل از شروع آماده‌سازی باید ابتدا نمونه‌ها را به یکی از روش‌های فوق‌الذکر آماده‌سازی نمود تا در زیر میکروسکوپ نوری میزان حفظ‌شدگی نمونه‌ها مورد بررسی قرار گیرد و نمونه‌هایی که دارای حفظ‌شدگی خوبی هستند در این مرحله برای آماده‌سازی جهت مطالعه با میکروسکوپ الکترونی روبشی آماده شوند. لازم به ذکر است گاهی در ظاهر، حفظ‌شدگی نانوپلانکتون‌ها در زیر میکروسکوپ نوری خوب به نظر می‌رسد ولی در زیر میکروسکوپ الکترونی روبشی حفظ‌شدگی مطلوبی را نشان نمی‌دهند. برای تشخیص نانوپلانکتون‌های آهکی، میکروسکوپ نوری کفایت می‌کند، ولی گاهی از طریق میکروسکوپ نوری نمی‌توان به شناسایی دقیق نانوپلانکتون‌های آهکی دست یافت، لذا میکروسکوپ الکترونی روبشی جهت ارزیابی غنای نانوپلانکتون‌ها، تشخیص نانوفاسیس‌ها و شناسایی دقیق بعضی از گونه‌ها استفاده می‌شود. برای ارزیابی غنای نانوفاسیس‌های نمونه سنگ، مقدار بسیار کوچکی از نمونه که سطح آن صیقل داده شده (Polish)، با جهت خاصی بر روی پایه‌های مخصوص (Stub) چسبانده می‌شود (۱). سپس در دستگاه قرار گرفته و پس از ۶ دقیقه خلاء، عکسبرداری صورت می‌گیرد و به این ترتیب می‌توان نانوفاسیس سنگ را تشخیص داد (۲). امروزه از این روش می‌توان برای تعیین نانوفاسیس سنگ‌هایی که امکان تهیه مقاطع نازک میکروسکوپی از آن‌ها به روش‌های معمول و استاندارد وجود ندارد و مطالعه بر روی سنگ‌هایی که احتمال حضور نانوپلانکتون‌ها در آن‌ها کم می‌باشد (نظیر رسوبات انتهای تریاس و ژوراسیک) استفاده کرد "گفتگوی شفاهی، Gardin, 2011". شایان ذکر است که نانوفاسیس مارن‌ها نیز با این روش مورد مطالعه قرار می‌گیرد. استفاده یا عدم استفاده از پوشش (Coating) نمونه توسط عناصری نظیر طلا، کربن، پلاتین و غیره به نوع میکروسکوپ الکترونی روبشی و نمونه هدف بستگی دارد. در بعضی از دستگاه‌ها، برای نمونه‌های عهد حاضر و نمونه‌های زنده موجودات از جمله گیاهان و جانوران نیازی به استفاده از پوشش نمی‌باشد.

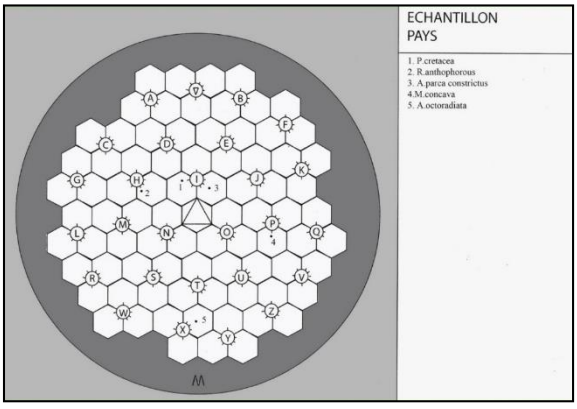
۶- روش آماده‌سازی نمونه‌های نانوپلانکتون‌های آهکی برای مطالعه هم‌زمان در میکروسکوپ نوری و الکترونی روبشی (LM/SEM): با میکروسکوپ الکترونی روبشی فقط ریخت‌شناسی سطحی نمونه مورد بررسی قرار گرفته و در میکروسکوپ نوری خصوصیات کریستالوگرافی المان‌های سازنده نانوپلانکتون‌ها قابل بررسی است (۲۹). این دو ویژگی تنها در یک نوع میکروسکوپ قابل مشاهده بوده در حالیکه در نوع دیگر قابل رویت نمی‌باشد. بنابراین برای رسیدن به یک تشخیص دقیق، نیاز است نمونه به

مقاله پژوهشی، صفحات ۱۸۲-۱۶۸ DOI: 10.22034/JAR.2024.8392.1966

گونه‌ای آماده‌سازی شود که هم‌زمان با هر دو نوع میکروسکوپ قابل مطالعه باشد، چرا که قطع به یقین مطالعه با هر دو نوع میکروسکوپ تکمیل‌کننده اطلاعات خواهد بود (۸).

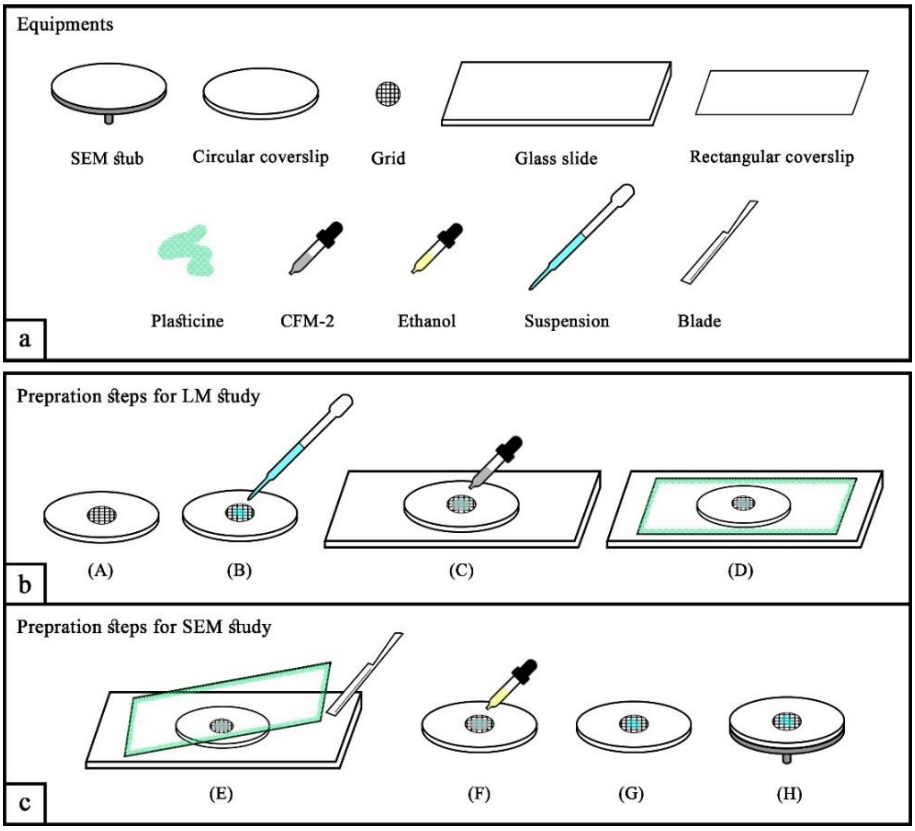
تاکنون روش‌های زیادی توسط نویسندگان مختلف درباره روش‌های آماده‌سازی نمونه‌ها جهت مطالعه هم‌زمان یک نوع گونه خاص در انواع میکروسکوپ‌ها ارائه شده است. از این میان پرچ نیلسن (۲۲) روشی برای آماده‌سازی نمونه جهت مطالعه هم‌زمان در میکروسکوپ نوری و میکروسکوپ الکترونی روبشی عبوری ارائه کرده، پس از آن تیرستین و همکاران (۲۹) روشی جهت آماده‌سازی نمونه ابتدا برای مطالعه در میکروسکوپ نوری و سپس مطالعه همان گونه در میکروسکوپ الکترونی روبشی معرفی کرده‌اند. با گذشت زمان روشی جهت مطالعه اولیه در میکروسکوپ نوری سپس مطالعه همان گونه در میکروسکوپ الکترونی روبشی توسط مشکویتز (۱۸) و (۱۹) و گریگ (۱۱) معرفی گردید. در همان سال روشی دیگر برای آماده‌سازی نمونه‌ها جهت مطالعه هم‌زمان یک گونه خاص در زیر میکروسکوپ نوری، الکترونی روبشی و الکترونی عبوری توسط مای (۱۷) ارائه شد. گالاگر (۸) روشی برای این منظور ارائه کرده است که در آن آماده‌سازی برای مطالعه اولیه در میکروسکوپ نوری و پس از آن در میکروسکوپ الکترونی روبشی انجام می‌گیرد. پس از آن، رادریزانی و همکاران (۲۴) روشی برای مطالعه ابتدایی در میکروسکوپ الکترونی روبشی و سپس در میکروسکوپ نوری معرفی کردند و بر این باورند که در روش ارائه شده به دلیل استفاده از گرید مسی، سرعت آماده‌سازی نسبت به روشی که تیرستین (۲۹) ارائه کرده، بیش‌تر می‌باشد.

در تبیین این روش، برای شروع، نمونه‌ها به روش ته‌نشست ثقلی که قبلا ذکر شد، آماده‌سازی می‌شوند. پس از آن، جهت مطالعه در میکروسکوپ نوری، ابتدا یک صفحه مشبک به نام گرید (Grid) که در شکل ۴ نمایش داده شده است، بر روی یک لامل گرد شیشه‌ای قرار می‌گیرد و یک قطره از محلول حاوی نانوپلاکتون‌ها روی گرید چکانده می‌شود. با این کار، نانوپلانکتون‌ها در بین بخش‌های شماره‌گذاری شده گرید قرار می‌گیرند. در این مرحله یک قطره از مایع CFM-2 (Carbon Fiber Material type 2) بر روی گرید ریخته می‌شود. سپس لامل گردی که گرید روی آن قرار دارد، روی یک لام ثابت شده و با استفاده از خمیر پلاستیسین (Placticine) با یک لامل مستطیلی پوشانده می‌شود. نمونه در این مرحله آماده مطالعه با میکروسکوپ نوری است. در حین مشاهده در میکروسکوپ نوری، گونه مورد نظر انتخاب شده و شماره سلولی که در گرید قرار دارد، یادداشت شده و عکسبرداری می‌شود. پس از آن با استفاده از یک پنس، لامل مستطیلی از روی لام برداشته شده و لامل گرد حاوی گرید، بر روی پایه مخصوص میکروسکوپ الکترونی روبشی (Stub) ثابت می‌شود. برای از بین بردن اثر CFM-2 از اتانول استفاده می‌شود و پس از تبخیر اتانول، گرید مسی درون میکروسکوپ الکترونی روبشی گذاشته شده و آماده عکسبرداری می‌گردد (شکل ۵).



شکل ۴- برگه ثبت نانوپلانکتون‌ها در گریدها با میکروسکوپ نوری و مکان‌یابی برای مشاهده در میکروسکوپ الکترونی روبشی (۴).

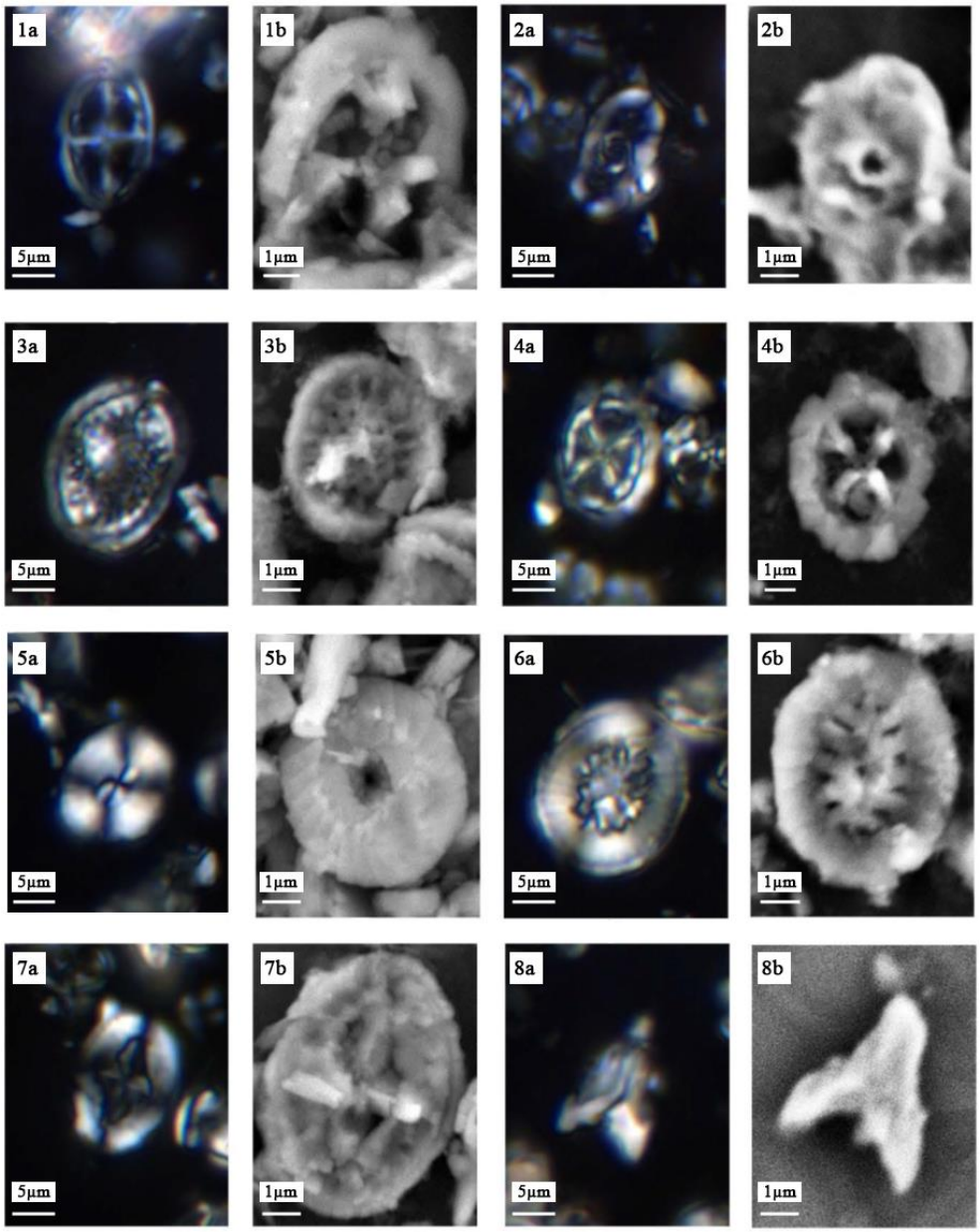
مقاله پژوهشی، صفحات ۱۸۲-۱۶۸ DOI: 10.22034/JAR.2024.8392.1966



شکل ۵- مراحل آماده‌سازی نمونه جهت مطالعه هم‌زمان در میکروسکوپ نوری و میکروسکوپ الکترونی روبشی. (a تجهیزات مورد نیاز از چپ به راست؛ پایه مخصوص، لامل گرد، صفحه مشبک، لام، لامل مستطیلی، خمیر پلاستیسین، ماده کربن فایبر نوع ۲، اتانول، ترکیب حاوی نانوپلانکتون‌های آهکی و آب مقطر که از روش‌های آماده‌سازی استاندارد بدست آمده، تیغ، (b مراحل انجام آماده‌سازی نمونه جهت مطالعه در میکروسکوپ نوری؛ ابتدا صفحه مشبک بر روی لامل گرد چسبانده شده (A) مقداری از محلول حاوی نانوپلاکتون‌ها به آن اضافه می‌گردد (B) سپس لامل گرد بر روی لام قرار داده می‌شود و یک قطره CFM-2 به آن اضافه می‌گردد (C) سپس با استفاده از خمیر پلاستیسین با یک لامل مستطیلی پوشانده می‌شود ((D، c) مراحل انجام آماده‌سازی نمونه جهت مطالعه در میکروسکوپ الکترونی روبشی؛ ابتدا لامل مستطیلی با استفاده از تیغ از روی لام جدا شده (E)، سپس برای از بین بردن CFM-2 از چند قطره اتانول استفاده می‌شود (F)، پس از آن باید مقدار زمانی بگذرد تا CFM-2 از بین رفته و اتانول نیز تبخیر شود (G)، در آخر لامل گرد بر روی پایه مخصوص میکروسکوپ الکترونی روبشی قرار می‌گیرد (H).

شایان ذکر است برای اینکه مقدار بیش‌تری از نمونه مورد بررسی قرار گیرد می‌توان به صورت هم‌زمان از دو یا سه گرید بر روی یک لام استفاده کرد. همچنین امکان از بین رفتن گریدها در هنگام انتقال آن به پایه مخصوص میکروسکوپ الکترونی روبشی زیاد است و اضافه کردن اتانول برای از بین بردن CFM-2 گاهی موجب حذف نانوپلانکتون‌ها می‌شود. با اینکه این روش بسیار سخت و زمان‌بر است، امکان مشاهده یک گونه در میکروسکوپ نوری و سپس مطالعه همان گونه در میکروسکوپ الکترونی روبشی را فراهم می‌کند که این امر بسیار حائز اهمیت می‌باشد. بنابراین این روش عکسبرداری برای گونه‌های خاص، تعیین مرزهای زمان زمین‌شناسی و GSSPها (Global Boundary Stratotype Sections and Points) که نیاز به تحقیقات دقیق‌تری دارند، به کار می‌رود. در شکل ۶ نمونه‌هایی از عکسبرداری هم‌زمان در میکروسکوپ نوری و الکترونی روبشی (SEM/LM) از رسوبات حوضه کپه‌داغ نمایش داده شده است.

مقاله پژوهشی، صفحات ۱۸۲-۱۶۸ DOI: 10.22034/JAR.2024.8392.1966



شکل ۶- نمونه‌هایی از مطالعه هم‌زمان یک گونه در میکروسکوپ نوری و میکروسکوپ الکترونی روبشی از اقیانوس دیرینه Tethys، حوضه کپه‌داغ در شمال شرق ایران.

(1a-1b). *Staurolithites imbricatus*, a: XPL, b: SEM; (2a-2b). *Rhagodiscus splendens*, a: 30º rotated, XPL, b: SEM; (3a-3b). *Cribrosphaerella ehrenbergii*, a: 30º rotated, XPL, b: SEM; (4a-4b): *Prediscosphaera cretacea*, a: 5º rotated, XPL, b: SEM; (5a-5b). *Watznaueria barnesiae*, a: 30º rotated, XPL, b: SEM; (6a-6b). *Retecapsa crenulata*, a: 30º rotated, XPL, b: SEM; (7a-7b). *Broinsonia parca* subsp. *Constricta*, a: 30º rotated, XPL, b: SEM; (8a-8b). *Ceratolithoides aculeus*, a: 30º rotated, XPL, b: SEM.

این عکس‌ها با میکروسکوپ نوری Axioplan Imaging II Zeiss و با بزرگنمایی ۱۵۷۰ برابر و میکروسکوپ الکترونی روبشی که نیاز به Coting ندارد در دانشگاه پیر و ماری کوری (پاریس ۶) فرانسه تهیه شده‌اند.

۷- روش آماده‌سازی نانوپلانکتون‌های عهد حاضر در آب دریا: برای مطالعه و عکسبرداری از نمونه‌های عهدحاضر که در آب شور دریا حضور دارند یک مشکل اساسی وجود دارد و آن وجود بلورهای نمک است. خشک شدن آب دریا

مقاله پژوهشی، صفحات ۱۸۲-۱۶۸ DOI: 10.22034/JAR.2024.8392.1966

بر روی لامل و یا پایه مخصوص (stub) میکروسکوپ الکترونی روبشی غالباً موجب تشکیل بلورهای نمک می شود. بنابراین باید قبل از شروع فرآیند آماده‌سازی جهت مطالعه، نمک موجود در آب دریا زدوده شود یا رقیق گردد. برای این کار سه روش ممبرین (Membrane)، فلوتاسیون (Flotation) و اضافه کردن آب مقطر جهت رقیق کردن آب دریا می‌تواند مفید باشد. باید به این نکته توجه داشت که اضافه کردن هر نوع ماده شیمیایی و یا وارد نمودن هر نوع فشار فیزیکی به واسطه تاثیری که بر روی ریخت‌شناسی گونه‌ها می‌گذارد، موجب ایجاد خطا در تشخیص و نتایج نهایی مطالعات می‌گردد. بنابراین سه روش ارائه شده تاکنون بهترین روش‌های موجود جهت از بین بردن NaCl موجود در آب دریا می‌باشند. پس از آن یک یا دو قطره از آبی که نمک آن زدوده و یا رقیق شده را می‌توان بر روی لام جهت مطالعه زیر میکروسکوپ نوری و یا بر روی پایه مخصوص (stub) جهت مطالعه زیر میکروسکوپ الکترونی روبشی ریخت (۳).

پس از انجام فرآیند آماده‌سازی نمونه‌ها در آزمایشگاه، باید مطالعات زیست‌چینه‌نگاری و دیرینه‌بوم‌شناسی انجام شوند که در ادامه به شرح آن‌ها پرداخته شده است.

مطالعات زیست‌چینه‌نگاری (Biostratigraphy): پس از آماده‌سازی نمونه‌ها در آزمایشگاه، در قدم اول باید به شناسایی گونه‌های نانوپلانکتون‌ها پرداخت. مبنای مطالعات زیست‌چینه‌نگاری در نظر گرفتن اولین حضور (FO: First Occurrence) و آخرین حضور (LO: Last Occurrence) گونه‌های شاخص (Index Fossils) می‌باشد. لذا پس از شناسایی دقیق تمامی گونه‌های شاخص و مشخص کردن زون‌های زیستی استاندارد مربوط به رسوبات مورد مطالعه در اقیانوس آن زمان، می‌توان جدول زیست‌چینه‌نگاری را ترسیم نمود و در نهایت سن نسبی بدست آمده را اعلام نمود.

مطالعات دیرینه‌بوم‌شناسی (Paleoecology): یکی از مهم‌ترین کاربردهای مطالعه نانوپلانکتون‌های آهکی پس از تعیین سن، تعیین شرایط دیرینه اقیانوس می‌باشد. برای انجام مطالعات دیرینه‌بوم‌شناسی به طور کلی دو روش استاندارد بصورت مطالعات کمی و مطالعات نیمه‌کمی وجود دارد.

مطالعات کمی (Quantitative analysis): برای انجام مطالعات کمی پس از تعیین بیوزون‌های مربوطه، تعدادی از نمونه‌ها انتخاب می‌شوند تا برای مطالعات دیرینه‌بوم‌شناسی و مطالعات کمی بررسی گردند. این انتخاب باید بر پایه سنجش و ارزیابی سنی بیوزون‌ها، میزان ضخامت برش مورد مطالعه و با انتخاب فواصل یکسان صورت گیرد. برای مطالعات کمی، تعداد ۳۰۰ عدد گونه نانوپلانکتون از هر نمونه شمارش می‌شود. این شمارش بدون در نظر گرفتن میدان دید (Field of View: FOV) و یا انتخاب گونه‌ای خاص می‌باشد. سپس با درصدگیری از هر گونه، درصد فراوانی هر یک از نانوپلانکتون‌های موجود در هر نمونه، ارزیابی و منحنی‌های مربوطه کشیده می‌شود و برای مطالعات دیرینه‌بوم‌شناسی، آب و هوای دیرینه (Paleoclimatology)، شرایط دریا و اقیانوس دیرینه (Paleoceanography) و غیره مورد استفاده قرار می‌گیرد. در این راستا برای تعیین فراوانی مطلق (Absolute Abundance) تعداد نانوپلانکتون‌های آهکی موجود در ۱ گرم از نمونه در مساحت میدان‌های دید (برای ۳۰۰ گونه) در هر اسلاید از فرمول ۱ استفاده می‌شود (۵) ؛ (۶).

$$X = (N^* SL) / (A^*F^*m) \quad (۱)$$

در فرمول فوق، X: تعداد گونه‌های موجود در هر گرم از نمونه، N: تعداد گونه‌های شمارش شده، SL: مساحت هر اسلاید، A: مساحت هر میدان دید با توجه به بزرگنمایی، F: تعداد میدان‌های دید در هر اسلاید، m: مقدار g 001/0 را نشان می‌دهند.

DOI: 10.22034/JAR.2024.8392.1966 مقاله پژوهشی، صفحات ۱۸۲-۱۶۸

روشی دیگر نیز برای محاسبه فراوانی مطلق برای تعداد گونه‌های موجود در هر گرم وجود دارد که در فرمول ۲ به آن اشاره شده است (۳۱).

$$X = (N*V) / (m*F*A*H) \quad (۲)$$

در این فرمول، X: تعداد گونه‌های موجود در هر گرم از نمونه، N: تعداد گونه‌های شمارش شده، V: مقدار 1000 ml، m: مقدار 0/001 g، F: تعداد میدان‌های دید در هر اسلاید، A: مساحت هر میدان دید با توجه به بزرگنمایی، H: مقدار ۲ سانتی‌متر را نشان می‌دهند.

شاخص شنون (Shannon Index) میزان تنوع گونه‌ای را مشخص می‌نماید و عبارت است از نسبت فراوانی گونه‌ها به ماتریکس. این شاخص توسط شنون و ویور (۲۷) ارائه شده و از فرمول ۳ محاسبه می‌شود.

$$\text{Shannon Index} = 0 - S \log 2 S \quad (۳)$$

در این فرمول، S: نشان‌دهنده تعداد کل گونه‌ها است.

اگر شاخص شنون زیاد شود یعنی غنای نانوپلانکتونی زیاد شده و شرایط پایدار محیطی افزایش یافته است. این مسأله نشانگر این مطلب است که منابع غذایی به صورت یکسان توزیع شده‌اند. اگر این شاخص کم شود، نشانگر این است که میزان کمی از گونه‌ها در محیط حضور داشته که حجم زیادی از منابع را استفاده می‌کردند.

حداکثر فراوانی گونه‌ای (Species Richness) کمیتی دیگر است که با استفاده از آن می‌توان غلبه نسبی گونه در جامعه فسیلی را بدست آورد. این کمیت نیز تحت تأثیر شرایط پایدار محیطی است.

میزان یکنواختی (Evenness) گونه‌ها نیز باید تعیین شود. شایان ذکر است که شاخص شنون شامل هر دو پارامتر حداکثر فراوانی گونه‌ای و تنوع گونه‌ای می‌شود (۳۲).

مطالعات نیمه‌کمی (Semi-quantitative analysis): با توجه به میزان وجود نانوپلانکتون‌ها در رسوبات و روش‌های آماده‌سازی (غلظت اسلاید تهیه شده)، در حدود ۱۰۰ تا ۱۵۰ میدان دید مورد بررسی قرار می‌گیرد. مثلا در روش آغشته کردن چون تعداد نانوپلانکتون‌ها به طور کلی در اسلاید نسبتا کم است، باید ۱۰۰۰ میدان دید (FOV) مورد بررسی قرار گیرد. با پیمایش مطالعاتی ۳ تا ۷ ردیف در طول اسلاید میکروسکوپی به صورت تصادفی، میزان پراکندگی و فراوانی هر یک از فسیل‌های شاخص سنجیده می‌شود (۳۳؛ ۱۵؛ ۶). سپس بر اساس جدول ۱ میزان فراوانی نانوپلانکتون‌های شاخص تعیین می‌گردد.

جدول ۱- جدول تعیین میزان فراوانی نانوپلانکتون‌های شاخص (۶).

FOV=Field of View	Abundance	Abbreviation
10-50 sp. per FOV	بسیار فراوان	VA
1-10 sp. per FOV	فراوان	A
1 sp. per 2-10 FOVs	معمولی	C
1 sp. per 11-50 FOVs	کم	F
1 sp. per 50-100 FOVs	کمیاب	R
1 sp. per more than 100 FOVs	یک گونه	S

بررسی میزان حفظ‌شدگی (Preservation analysis): بر اساس تعیین میزان حفظ‌شدگی که توسط راث و تیریستین (۲۶) ارائه گردیده و توسط راث (۲۵) تکمیل شده است، این میزان بین خوب (Good)، متوسط (Medium) و ضعیف (Poor) متغیر می‌باشد. میزان خورده‌شدگی یا انحلال (Etching) و رشد ثانویه (Overgrowth) در میکروسکوپ نوری نیز باید در مطالعات دیرینه‌بوم‌شناسی لحاظ شود. این بررسی‌ها بر پایه مطالعات واتکینز (۳۳) همراه با تغییرات می‌باشد (جدول ۲).

مقاله پژوهشی، صفحات ۱۸۲-۱۶۸ DOI: 10.22034/JAR.2024.8392.1966

جدول ۲- جدول تعیین میزان حفظ‌شدگی نانوپلانکتون‌های آهکی (۳۳).

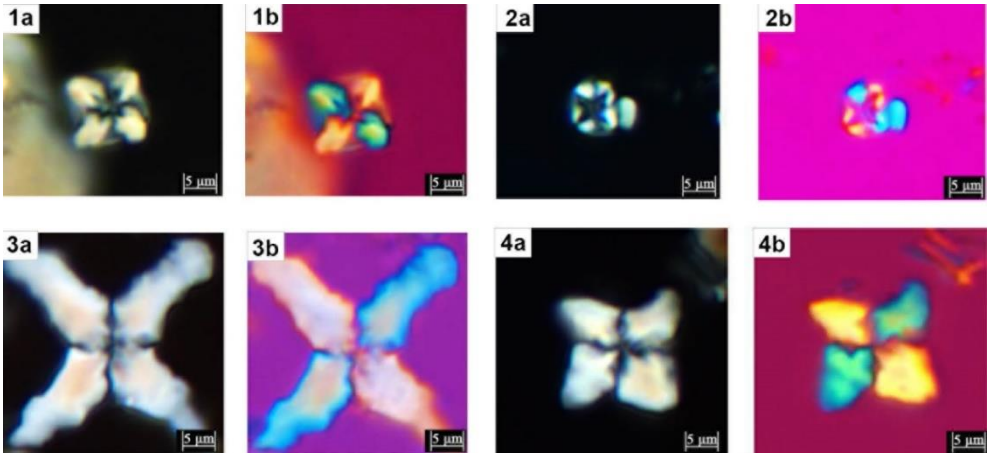
Preservation	Abbreviation	
Good	G	Little evidence of overgrowth or etching, no impairment of species identification
Moderate	M	Clear evidence of overgrowth or etching, species identification usually not impaired
Poor	P	Clear evidence of overgrowth or etching, species identification often impaired

فرمول ۴ $$NI = \frac{high\ fertility\ assemblage}{(low\ fertility\ assemblage + high\ fertility\ assemblage)} \times 100$$

شاخص تغذیه‌ای (Nutrient Index): برای ارزیابی مقدار مواد غذایی موجود در آب دریا در زمان حیات نانوپلانکتون‌ها، از فرمول ۴ استفاده می‌شود که توسط هرله (۱۳) ارائه شده است (۷).

مقدار NI زیاد نشان‌دهنده حضور مقدار زیادی مواد غذایی در آب دریا است. هرچه مقدار NI کم‌تر باشد یعنی مقدار مواد غذایی در محیط کم‌تر بوده است. چون در این فرمول به بررسی نسبت گونه‌های انتخابی پرداخته می‌شود، این روش دید بهتری نسبت به روش محاسبه فراوانی مطلق یک گونه ارائه می‌دهد.

عکسبرداری (Photography): جهت عکسبرداری از نانوپلانکتون‌های آهکی رعایت چند نکته ضروری است. عکسبرداری با استفاده از میکروسکوپ نوری باید در دو نور عادی (PPL: Plane-Polarized Light) و نور پلاریزه (XPL: Cross-Polarized Light)، در دو جهت (یکی موازی با محورهای نیکون و دیگری با توجه به نوع گونه شناسایی شده و ویژگی‌های نوری آن با زاویه نسبت به محورهای نیکون) انجام گیرد. در برخی جنس‌ها و گونه‌ها جهت تشخیص دقیق‌تر از ورقه ژیپس استفاده می‌شود که در این صورت باید در این حالت هم عکس تهیه شود، در غیر این صورت نیازی به تهیه عکس در هنگام وارد کردن ورقه ژیپس نمی‌باشد. مثلاً برای تفکیک جنس‌های *Uniplanarius* و *Micula* از ورقه ژیس استفاده می شود. رنگ ربع‌های دوم و چهارم در جنس *Micula* آبی رنگ و در ربع‌های اول و سوم زرد رنگ است و یا در جنس *Uniplanarius* در ربع‌های دوم و چهارم زرد رنگ و در ربع‌های اول و سوم آبی رنگ است. بنابراین وارد کردن ورقه ژیپس در میکروسکوپ یکی از راه‌های تشخیص این دو از یکدیگر است (شکل ۷).



شکل ۷- متفاوت بودن رنگ ربع دوم و چهارم در جنس‌های *Micula* و *Uniplanarious*.

(1a, b). *Micula staurophora*; (2a, b) *Micula cubiformis*; (3a, b). *Uniplanarius sissinghii*; (3a, b). *Uniplanarius sissinghii*; (4a, b) *Uniplanarius* cf. *U. sissinghii*.

DOI: 10.22034/JAR.2024.8392.1966 مقاله پژوهشی، صفحات ۱۸۲-۱۶۸

بحث و نتیجه گیری

روش‌های آماده‌سازی رسوبات برای مطالعه نانوپلانکتون‌های آهکی شامل روش‌های آغشته کردن، فرو بردن پیپت، ته‌نشست ثقلی و سانتریفیوژ با هدف اضافه کردن نکاتی برای انجام دقیق‌تر فرآیند آماده‌سازی، مورد بررسی قرار گرفته‌اند. انواع روش‌های مطالعات زیست‌شناسی، زیست‌چینه‌نگاری و دیرینه‌بوم‌شناسی شامل مطالعات کمی و نیمه‌کمی که در آن‌ها پارامترهای فراوانی مطلق گونه‌ها، تنوع گونه‌ای، حداکثر فراوانی گونه‌ای، میزان یکنواختی، شاخص تغذیه‌ای و میزان حفظ‌شدگی گونه‌ها مورد بررسی قرار می‌گیرند، در این پژوهش به طور متمرکز به این روش‌ها پرداخته شده است و قابل تعمیم به نمونه‌های عهد حاضر هم می‌باشند. همچنین روشی جدید برای مطالعه هم‌زمان در میکروسکوپ نوری و میکروسکوپ الکترونی روبشی نیز معرفی شده و سه روش شامل روش‌های فلوتاسیون، ممبرین و اضافه کردن آب مقطر جهت رقیق کردن آب شور دریا برای تهیه اسلاید از نمونه‌های عهد حاضر مورد بررسی قرار گرفته‌اند.

سپاسگزاری

از سرکار خانم پروفسور سیلویا گاردین در دانشگاه UPMC (Paris 6) و از دانشگاه تهران که شرایط لازم جهت عکسبرداری و انجام مطالعات را برایمان فراهم کردند، صمیمانه تشکر و قدردانی می‌نمائیم. همچنین از سردبیر محترم مجله زیست‌شناسی جانوری و داوران محترم تشکر و سپاسگزاری می‌شود.

منابع

۱- اشکبور، ع.، دوست‌شناس، ب.، نبوی، س. م.، و سخایی، ن.، ۱۳۹۵. مطالعه تنوع زیستی و شناسایی اجتماعات روزنه‌داران در شرق جزیره قشم. مجله پژوهش‌های جانوری (مجله زیست‌شناسی ایران) (علمی)، ۲۹ (۱)، ۱-۱۷.

۲- فروغی، ف.، ۱۳۹۲. بیوستراتیگرافی و لیتوستراتیگرافی سازند آب‌تلخ بر اساس نانوفسیل‌های آهکی در شرق حوضه کپه‌داغ. رساله دکتری، دانشگاه شهید بهشتی، ایران، تهران.

۳- فروغی، ف. و ابراهیمی، ه.، ۱۴۰۱. معرفی تعدادی از گونه‌های نانوپلانکتون‌های آهکی عهد حاضر از خلیج فارس. پنجمین همایش ملی انجمن کواترنری ایران.

۴- پورغلام، ر.، تهامی، ف. س. و کیهان ثانی، ع.، ۱۳۹۳. بررسی تنوع فصلی فیتوپلانکتون‌ها در آب‌های حوضه جنوبی دریای خزر طی سال ۱۳۸۹. مجله پژوهش‌های جانوری (مجله زیست‌شناسی ایران) (علمی)، ۲۷(۳)، ۳۰۷-۳۱۸.

5- Beaufort, L., 1991. Adaptation of the Random settling method for quantitative studies of calcareous nannofossils. Micropaleontology, 37, 415-418. Society Publications Series. Chapman & Ltd/Kluwer Academic Press, London.

6- Bown, P.R., 1998. Calcareous Nannofossil Biostratigraphy. British Micropaleontology Society Publication Series. Chapman and Hall, London, 328pp.

7- Edwards, A.R., 1963. A preparation technique for calcareous nannoplankton. Micropaleontology, 9, 103-104.

8- Gallagher, L., 1988. A technique for viewing the same nannofossil specimen in light microscope and scanning electron microscope using standard preparation materials. Micropaleontology, 7 (1), 53-57.

9- Gartner, S., Bukry, D., 1969. Tertiary Hollococolithes. Journal of Paleontology, 43 (5), 193-142.

10- Geisen, M., Bollmann, J., Herrle, J.O., Mutterlose, J., Young, J.R., 1999. Calibration of the random settling technique for calculation of absolute abundance of calcareous nannoplankton. Micropaleontology, 45 (4), 437-442.

11- Greig, D.J., 1983. A method for the examination of the same nannofossil specimens from the light microscope to the scanning electron microscope. Tulane Studies in Geology and Paleontology, 17, 121-122.

12- Hay, W.W., 1977. Calcareous nannofossils. Oceanic Micropalaeontology 2 (ed. A.T.S. Ramsay) Academic Press, 1055-1200.

مقاله پژوهشی، صفحات ۱۸۲-۱۶۸ DOI: 10.22034/JAR.2024.8392.1966

13- Herrle, J.O., 2003. Reconstructing nutricline dynamics of mid-Cretaceous oceans: evidence from calcareous nannofossils from the Niveau Paquier black shale (SE France). Marine Micropaleontology, 47, 307-321.

14- Katz, B.J., 1978. Preparation of calcareous nannofossil assemblages for chemical examination. Journal of Paleontology, 52, 497-500.

15- Lander, B., Wise, S., 2001. Calcareous nannofossil biostratigraphy of upper Cretaceous to Paleocene sediments from Leg 173, Iberia abyssal plain, sites 1067-1069. In Beslier, M.O., Whitmarsh, R.B., Wallace, P.J., and Girardeau, J. (Eds.), Proceedings of the Ocean Drilling Program, Scientific Results, No. 173.

16- Lohmann, H., 1909. Die Gehause und Gallertblasen der Appendicularien und ihre Bedeutung fur die Erfoschung des Lebens im Meer. Verhanlungen Deutsche Zoologische Geseleschafi, 19, 200-239.

17- Mai, H., 1983. Korrelation cretazischer Coccolithen im Lichtmikroskop, Rasterelektronenmikroskop and Transmissions Electronenmicroskop. Palaeontographica, 189, 139-161.

18- Moshkovitz, S., 1974. A new method for observing the same nannofossil specimens both by light microscope and by scanning electron microscope and preservation of types. Israel Jour. Earth Sciences, 23, 145-147.

19- Moshkovitz, S., Ehrlich, A., 1976. Distribution of Middle and upper Jurassic calcareous nannofossils in the northeastern Negev, Israel and in Gebel Maghara, northern Sinai. Bulletin of the Geological Survey of Israel, 69, 1-47.

20- Moshkovitz, S., 1978. New types of cover slip and mounting slide with a graticule for examination of the same small object both by the light microscope and scanning electron microscope. Microscopica Acta, 80 (2), 161-166.

21- Perch-Nielsen, K., 1985. Mesozoic Calcareous Nannofossils; In Bolli, H.M., Saunders, J.B., and Perch-Nielsen, K. (Eds.); Plankton stratigraphy, Cambridge Earth Science Series, Cambridge University Press, 329-426.

22- Perch-Nielsen, K., 1967. Eine Preparationstechnik zur Untersuchung von Nannoplankton in Lichtmikroskop und im Elektronenmikroskop. Dansk. Geol. Foren. Meddel., 17, 129-130.

23- Pienaar, R.N., 1966. Microfossils from the Cretaceous System of Zululand studies with the aid of the electron microscope. South African Journal of Science, 62, 147-157.

24- Radrizzani, C.P., Castradori, D., Erba, E., Guasti, G., Rizzi, A., 1990. A revised method for observing the same nannofossil specimens with scanning electron microscope and light microscope. Riv. It. Paleontology Stratigraphy, 95 (4), 449-454.

25- Roth, H., 1983. Jurassic and Lower Cretaceous calcareous nannofossils in the western North Atlantic (Site 534): biostratigraphy, preservation and paleoceanography. Initial Reports DSDP, No. 76, 587-621.

26- Roth, P.H., Thierstein, H., 1972. Calcareous nannoplankton: Leg 14 of the Deep Sea Drilling Project. In: Hayes, D.E., Pimm, A.C., et al., Initial Reports DSDP, No. 14, 421-485.

27- Shannon, E., Weaver, W., 1949. The mathematical theory of communication. University Illinois Press, 125.

28- Taylor, R.J., Hamilton, G.B., 1982. Techniques, in A Stratigraphical Index of Calcareous Nannofossils. (cd. A.R. Lord), Ellis Horwood Limited, Chichester, 11-15.

29- Thierstein, H.R., Franz, H.E., Roth, P.H., 1971. Scanning electron and light microscopy of the same object. Micropalaeontology, 17, 501-502.

30- Thibault, N., Gardin, S., 2006. Maastrichtian calcareous nannofossil biostratigraphy and paleoecology in the Equatorial Atlantic (Demerara Rise, ODP Leg 207 Hole 1258A). Revue de Micropaléontologie 49, 199-214.

31- Thibault, N., 2008. Nannoplancton calcare actuet et nannofossiles calcaires du Cretace terminal. PhD. Thesis in Universite Pierre et Marie Curie (UPMC), Paris 6.

32- Watkins, D.K., 1969. In: Linnert, C., Mutterlose, J., Herrle, J.O., Late Cretaceous (Cenomanian-Maastrichtian) calcareous nannofossils from Goban Spur (DSDP Sites 549, 551): Implications for the paleoceanography of the proto North Atlantic. Paleogeography, Palaeoclimatology, Paleoecology, No. 299, pp. 507-528.

33- Watkins, D.K., 2007. Quantitative analysis of the calcareous nannofossil assemblages from CIROS-1, Victoria Land Basin, Antarctica. J. Nannoplankton Res. 29 (2), 130-137.

34- Young, J.R. (1994). Functions of Coccolithus. In Coccolithophores, Ed. A. Winter & W.G. Siesser, pp. 63±82. Cambridge: Cambridge University Press.

مقاله پژوهشی، صفحات ۱۸۲-۱۶۸ DOI: 10.22034/JAR.2024.8392.1966

Reviewing Calcareous Nannoplankton studying methods and proposing an innovative simultaneous sample preparation technique for both Light and Scanning Electron Microscope

Foroughi F.* and Lavasani N.

Dept. of Geology, Faculty of Science, University of Tehran, Tehran, I.R. of Iran

Abstract

Calcareous nannoplankton, a group of marine microorganisms, play a significant role in producing chalky limestones. They are predominantly associated with microscopic algae known as Haptophytes and can be found in seawater and present oceans, sediment, and ancient ocean sediments. Selecting the appropriate sample preparation method is crucial for nannoplankton studies. This research explores various standard methods for sediment preparation for a light microscope (LM), such as smear slide, pipette strew slide, gravity settling, and centrifuging, along with methods specific to samples retrieved from seawater. A technique for preparing samples for scanning electron microscopy (SEM) to analyze nannofacies is also discussed. Furthermore, an innovative sample preparing technique for simultaneous study in LM and SEM is proposed. In addition, methods for determining the absolute abundance, Shannon diversity index, species richness, evenness, nutrient index, and species preservation, which are used in ecological analyses, have been discussed. Consequently, this study serves as a comprehensive guide to standard preparation techniques and studying methods for calcareous nannoplankton, facilitating biological, biostratigraphical, and paleoecological studies.

Key words: Paleoecology, Scanning Electron Microscope (SEM), Light Microscope (LM), Calcareous Nannoplankton