



ugr

Universidad
de Granada

Departamento de Estratigrafía y Paleontología
Facultad de Ciencias
UNIVERSIDAD DE GRANADA

**Caracterización Microestructural y Cristalográfica
de la Concha Prismatofoliada de Pectinoidea,
Anomioidea y Ostreoidea (Pteriomorpha:
Bivalvia). Implicaciones Evolutivas**

Francisco José Esteban Delgado

Tesis Doctoral

Granada, 2006

Francisco José Esteban Delgado

Departamento de Estratigrafía y Paleontología

Facultad de Ciencias

Avda. Fuentenueva s/n, 18071-Granada (España)

fjeste@ugr.es



ugr

Universidad
de Granada

Departamento de Estratigrafía y Paleontología
Facultad de Ciencias
UNIVERSIDAD DE GRANADA

**Caracterización Microestructural y Cristalográfica de la Concha
Prismatofoliada de Pectinoidea, Anomioidea y Ostreoidea
(Pteriomorphia: Bivalvia). Implicaciones Evolutivas**

Memoria presentada por el Licenciado en Ciencias Biológicas D. Francisco José Esteban Delgado para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Granada.

Esta Tesis Doctoral ha sido dirigida por el Dr. Antonio Checa González, catedrático del Departamento de Estratigrafía y Paleontología de la Universidad de Granada, y por el Dr. Alejandro Rodríguez Navarro, profesor del Departamento de Cristalografía y Mineralogía de la Universidad de Granada.

En Granada, a octubre de 2006

Vº.Bº. del Director

Vº.Bº. del Director

El Doctorando

Fdo. Antonio Checa González

Fdo. Alejandro Rodríguez Navarro

Fdo. Fco. José Esteban Delgado

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Francisco J. Esteban Delgado
D.L.: Gr. 2661 - 2006
ISBN: 84-338-4200-5

Contenidos

RESUMEN/ABSTRACT	7/11
INTRODUCCIÓN GENERAL	15
BIOMINERALIZACIÓN	15
Definición y tipos.....	15
La materia orgánica en el proceso de biomineralización	18
Biominerales más frecuentes	19
Evolución de la biomineralización	23
BIOMINERALIZACIÓN EN BIVALVOS	26
La concha de bivalvos	26
Mineralogía de la concha de bivalvos	26
Significado de la producción de calcita	28
Tipos de microestructuras	30
Distribución microestructural en bivalvos	34
JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	41
MATERIAL Y MÉTODOS	47
MATERIAL	47
METODOLOGÍA EMPLEADA	48
Preparación del material	48
Microscopía electrónica de barrido (SEM)	51
Difracción de Rayos X	54
Difracción de electrones retrodispersados (EBSD)	64
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	69
Formación de la capa prismática calcítica de Pteriomorpha	69
Estructura interna de los prismas calcíticos de Pteriomorpha	70
Origen de la microestructura foliada	71
Cristalografía de la microestructura foliada	72
Mecanismo de ordenación de los prismas foliados	73
Caracterización cristalográfica de las microestructuras calcíticas	
fibrosas de Pteriomorpha	75
Microcrestas en la zona dorsal de la concha de pectínidos	76
CONCLUSIONES/CONCLUSIONS	79/81
LITERATURA CITADA	83
LISTA DE LOS MANUSCRITOS	89

Resumen

Los bivalvos construyen sus conchas con cristales de carbonato cálcico englobados en una matriz de materia orgánica. Estos cristales son de aragonito o de calcita, y se organizan en una serie limitada de ordenaciones tridimensionales denominadas microestructuras. El aragonito es el polimorfo ortorrómbico del carbonato cálcico y está presente en todos los bivalvos, ya sea como constituyente mayoritario o relegado a ciertas estructuras invariablemente aragoníticas (p. ej. concha larvaria, mineralizaciones del ligamento y del periostraco e inserciones musculares). Sin embargo, la calcita, o polimorfo trigonal, sólo aparece en determinados clados. Una característica común a todos los grupos productores de calcita es que tienen hábito de vida epibentónico, mientras que aquellos con hábito de vida endobentónico tienen generalmente conchas completamente aragoníticas. Pteriomorphia, un grupo eminentemente epibentónico, es el taxón con el mayor desarrollo en la producción de calcita ya que todos sus órdenes, con la única excepción del mayoritariamente endobentónico Arcoida, producen capas calcíticas en mayor o menor medida. Las capas calcíticas presentes en Pteriomorphia están constituidas por tres tipos de microestructuras: prismática, prismática fibrosa y foliada. Esta tesis está centrada en el estudio de estas microestructuras, marcándose como objetivo fundamental su caracterización estructural y cristalográfica.

La microestructura prismática está constituida por prismas de calcita delimitados por envueltas orgánicas. Según hemos podido constatar, la formación de las envueltas orgánicas antecede a la formación de los prismas. El desarrollo de los patrones celulares típicos de la microestructura prismática se inicia en las envueltas orgánicas mediante un proceso regido por fuerzas de tensión superficial semejante al que da lugar a la formación de burbujas. La capa prismática se inicia como una emulsión formada por el fluido precursor de las membranas orgánicas y el fluido extrapaleal. En esta emulsión se generan las vacuolas que darán lugar a las cavidades orgánicas. Por lo tanto, las envueltas orgánicas son el principal agente modelador de la microestructura prismática. La mineralización de los prismas se produce inmediatamente después en las cavidades definidas por las envueltas.

La estructura interna de los prismas difiere notablemente entre grupos. En Pinnidae, Pteriidae e Isognomonidae (orden Pterioida), los prismas están constituidos por cristales de calcita de tamaño nanométrico. Estos cristalitos tienen hábito romboédrico y presentan la misma orientación tridimensional en cada prisma, lo que explica que los prismas se comporten cristalográficamente como monocristales. En cambio, en Pectinidae, Propeamussiidae, Anomiidae (orden Pectinoida), y Ostreidae (orden Ostreoida), los

prismas tienen una estructura interna construida a base de hojas de calcita de tamaño micrométrico. Estas hojas tienen una morfología idéntica a las hojas que constituyen la microestructura foliada. Además, en la mayoría de los casos, existe continuidad estructural desde los prismas hasta la microestructura foliada subyacente. Todo ello indica que los prismas están constituidos por microestructura foliada. Estas observaciones están apoyadas por análisis de difracción de rayos X y electrones que indican que la textura u ordenación tridimensional de los cristales en ambos materiales es idéntica. Este descubrimiento refuerza la hipótesis de Waller (1976) que afirma que la microestructura foliada derivó de los prismas calcíticos. Este hecho es de suma importancia en la evolución microestructural y mineralógica de Pteriomorphia, ya que permitió el desarrollo de bordes rígidos calcíticos gracias a la sustitución de la microestructura prismática externa por microestructura foliada y la expansión de las capas calcíticas a las capas media e interna de la concha de muchos grupos.

Los prismas nuclean en las cavidades orgánicas con el eje cristalográfico c paralelo a su mayor dimensión (normal a la superficie de la concha), y los ejes a_1 , a_2 y a_3 rotados de forma aleatoria en cada prisma. Esta disposición de los prismas se traduce en una textura fibrosa en la superficie externa de la capa prismática, con el eje c como eje de fibra. En el caso de Pteriidae, Malleidae y Pinnidae, tanto la superficie externa (zona de nucleación de los prismas) como la interna (zona de crecimiento de los prismas) tienen textura fibrosa. Esto indica que la ordenación cristalográfica de estos prismas no cambia sustancialmente durante su crecimiento. Los prismas foliados, por ejemplo los de Ostreidae, nuclean con la misma ordenación cristalográfica que los de Pteriidae o Pinnidae, es decir, la superficie externa de la capa prismática presenta textura fibrosa. Sin embargo, la superficie interna puede llegar a desarrollar una textura laminar propia de un monocristal o un material policristalino con todos sus cristales alineados. El agrupamiento de los ejes a_1 , a_2 y a_3 se produce debido al giro de las hojas de calcita foliada de los prismas hasta hacerse paralelas a la dirección de crecimiento de la capa prismática, ya que las hojas tienen un crecimiento óptimo en esta dirección. Este proceso es progresivo lo que implica que el desarrollo de la textura laminar en la capa prismática es gradual y dependiente de la longitud de los prismas. A mayor espesor de la capa prismática mayor giro de las hojas y mayor desarrollo de la textura laminar. Así en ciertos propeamúsidos, donde los prismas apenas alcanzan 100 micras de longitud, la cara interna de la capa prismática mantiene la textura fibrosa, mientras que ciertos ostreidos, con espesores de la capa prismática cercanos a 400 micras, desarrollan textura laminar semejante a la de la microestructura foliada.

La microestructura foliada está constituida por cristales laminares de calcita (hojas) caracterizados por presentar una morfología típica con el extremo distal terminado en punta. Las hojas tienen una anchura de varias micras, un espesor que ronda los 200-250 nm y una longitud variable que puede alcanzar varios centenares de micras. Los trabajos previos sobre la cristalografía de la microestructura foliada han obtenido resultados dispares, con diferentes ordenaciones cristalográficas entre grupos e incluso dentro de una misma especie. Los resultados presentados en esta tesis indican que la microestructura foliada es un material altamente ordenado, con orientaciones coherentes de sus elementos constituyentes (hojas y *folia*). La estructura cristalográfica de la microestructura foliada es idéntica en todos los grupos estudiados. El eje c se dispone inclinado unos 26° con respecto a la normal de las hojas y en sentido contrario a la dirección de crecimiento de éstas. Una de las caras $\{10-14\}$ está orientada en la dirección de crecimiento de las hojas, aunque estas caras sólo se expresan en el extremo terminal de las hojas (borde apuntado o borde de crecimiento) mientras que la superficie principal de las hojas coincide con caras de romboedro $\{10-18\}$.

La microestructura calcítica prismática fibrosa engloba a toda una serie de organizaciones microestructurales caracterizadas por la presencia de haces paralelos de fibras de calcita. La denominación de microestructura prismática fibrosa no responde a la verdadera estructura de sus elementos constituyentes y por tanto podría simplificarse en microestructura fibrosa. Esta microestructura constituye la capa calcítica externa presente en muchos mitílidos y las costillas internas de propeamúsidos, aunque también aparece localmente en la capa calcítica externa de muchos grupos en relación con los prismas y la microestructura foliada. Las fibras de mitílidos están alargadas según una dirección cristalográfica paralela al eje c . En cambio, las fibras de las costillas internas de propeamúsidos están alargadas según una dirección oblicua al eje c y equidistante unos 30° de los ejes a . Esta organización cristalográfica es notoriamente diferente a la de las fibras de mitílidos y muy parecida a la de la microestructura foliada. Estas evidencias indican que es necesario diferenciar entre microestructura fibrosa *sensu stricto*, que correspondería a las fibras de mitílidos, y microestructura fibrosa de las costillas internas de propeamúsidos y probablemente al resto de microestructuras de tipo fibroso presentes junto a la microestructura foliada.

En la zona dorsal del interior de la concha de Pectinidae, Propeamussiidae y Spondylidae aparece una serie de pequeñas estrías con disposición dorsoventral. Dado que no hemos hallado ninguna referencia bibliográfica sobre estas estructuras las hemos

denominado microcrestas. Las microcrestas se disponen a ambos lados del resilium bajo el ligamento lateral. En Pectinidae las microcrestas están constituidas por elevaciones y depresiones mutuamente paralelas de unas 15-30 μm de anchura, aunque es frecuente que se fusionen y diverjan dando lugar a patrones dendríticos. Desde el punto de vista microstructural las microcrestas son crecimientos esferulíticos de calcita desarrollados sobre la capa foliada. Las microcrestas crecen en longitud pero no en anchura por lo que durante el crecimiento de la concha aparecen nuevas microcrestas en los extremos anterior y posterior. Las microcrestas de una valva encajan perfectamente en las depresiones de la valva opuesta y viceversa de forma similar a como lo hacen los dientes de la charnela. Esto sugiere que las microcrestas pueden servir de refuerzo de la charnela en estos grupos.

Abstract

Bivalves build their shells with calcium carbonate crystals embedded in an organic matrix. These crystals are either aragonitic or calcitic and are organized in a limited set of three-dimensional arrangements called microstructures. Aragonite is the orthorhombic polymorph of calcium carbonate and is present in all bivalves either as the main constituent or limited to some structures which are invariably aragonitic (i.e. larval shell, ligament and periostracum mineralization and muscle attachments). However, the calcite, or the trigonal polymorph, only appears in specific clades. A common feature to all calcite secreting groups is that all of them have an epibenthic life habit, whereas those with infaunal life habit have wholly aragonitic shells. Pteriomorpha, an eminently epibenthic group, is the taxon with the highest production of calcite since all its orders, with the only exception of the partly endobenthic Arcoida, produce calcitic layers to some degree. Calcitic layers of Pteriomorpha are built with three kinds of microstructures: prismatic, fibrous prismatic and foliated. This thesis is devoted to the study of these microstructures with the main objective of characterizing their structural and crystallographic arrangement.

The prismatic microstructure is built with calcitic prisms surrounded by organic envelopes. According to our observations, the formation of the organic envelopes precedes the formation of the prisms. The development of the cellular pattern typical of the prismatic microstructure is first generated in the organic envelopes in a process governed by interfacial tension similar to that involved in the formation of foams. The prismatic layer initiates as an emulsion formed by the fluid precursor of organic membranes and the extrapallial fluid. Within this emulsion vacuoles are generated which turn into empty organic cavities. So the organic envelopes are the main shaping agent of the prismatic microstructure. The mineralization of the prisms takes place soon after in the organic cavities defined by the organic envelopes.

The internal structure of the prisms is noticeably different between groups. In Pinnidae, Pteriidae and Isognomonidae (order Pterioidea), the prisms are built with calcite crystals of nanometric size. The crystallites have rhombohedral habit and have the same three-dimensional orientation in each prism, which explains the monocrystalline behaviour of such prisms. However, in Pectinidae, Propeamussiidae, Anomiidae (Order Pectinoidea), and Ostreidae (Order Ostreoida), the prisms have an internal structure constituted with calcitic laths with micrometric size. Such laths are identical in morphology to those of the foliated microstructure. Moreover, in most cases, there is structural continuity from the prisms to the underlying foliated microstructure. These observations are supported by X-ray and electron diffraction analyses which indicate that the texture (three-dimensional

arrangement of the crystals) is identical in both materials. This finding strengthens the hypothesis of Waller (1976) which affirms that the foliated microstructure derived from calcitic prisms. This fact was of great importance in the microstructural and mineralogical evolution of Pteriomorphia since it allowed the development of rigid calcitic shell margins thanks to the replacement of the prismatic microstructure by the foliated one, and the expansion of the calcitic layers to the middle and inner shell layers of many groups.

The prisms nucleate within the organic cavities with the crystallographic c axis parallel to their highest dimension (normal to the shell surface), and the a_1 , a_2 and a_3 axes randomly oriented. This disposition of the prisms is defined as fibre texture with the c -axis as fibre axis. In the case of Pteriidae, Malleidae and Pinnidae, both the external surface (where prisms nucleate) and the internal one have a fibre texture. This indicates that the crystallographic arrangement of the prisms does not substantially change during its growth. Foliated prisms, for example those of Ostreidae, nucleate with the same crystallographic arrangement as those of Pteriidae or Pinnidae, that is, with a fibre texture. However, measurements taken at the internal surface reveal a sheet texture characteristic of a monocrystal or of a polycrystalline material with all its crystals evenly aligned. The grouping of the a_1 , a_2 and a_3 axes is produced due to rotation of the calcitic laths of the prisms until becoming parallel to the direction of growth of the prismatic layer, since the laths have their optimum orientation in this direction. This is a progressive process which implies that the development of the sheet texture in the prismatic layer is gradual and depends on the length of the prisms in the sense that increasing thickness of the prismatic layer allows a greater degree of rotation of the laths and a better development of the sheet texture. So, in certain propeamussids, where the prisms hardly reach 100 μm in length, the internal layer of the prismatic lamella maintains the fibre texture, whereas certain ostreids, with prismatic layer thicknesses near to 400 μm , develop a sheet texture similar to that of the foliated microstructure.

The foliated microstructure is built with calcitic laminar crystals (laths) characterized by having typical arrow ends. The laths are several μm wide, 200-250 nm thick and their length is greatly variable, reaching several hundreds of μm in some instances. Previous works on the crystallography of the foliated microstructure have reported rather different results, with different crystallographic arrangements among groups and even within the same species. The results presented in this thesis indicate that the foliated microstructure is a highly ordered material which has coherent orientations of its constituent elements (laths and *folia*). The crystallographic arrangement of the foliated

microstructure is identical in all the studied groups. The c -axis lays tilted about 26° with respect to the lath surface and opposite to the growth direction of the laths. One {10-14} face is oriented in the direction of growth of the laths although these faces are only expressed in the terminal end of the laths (pointed end or growth end) while the main surface of the laths coincides with rhombohedral {10-18} faces.

The calcitic fibrous prismatic microstructure includes a set of microstructural arrangements characterized by the presence of parallel bundles of calcite fibres. The term fibrous prismatic microstructure does not fit in with the actual structure of its constituent elements and thence it could be simplified to calcitic fibrous microstructure. This microstructure constitutes the external calcitic layer present in many mytilids and the internal ribs of propeamussiids, although it is also present in the shell of many groups in relation to the prisms and to the foliated microstructure. The fibres of mytilids are elongated parallel to the c -axis. On the other hand, the fibres of the internal ribs of propeamussiids are elongated in a direction oblique to the c axis. This crystallographic arrangement is notoriously different from that of the fibrous prisms of mytilids and very similar to that of the foliated microstructure. This is not surprising since this microstructure is invariably found associated to foliated layers. Evidence indicates that it is necessary to differentiate between the fibrous microstructure *sensu stricto*, which corresponds to the fibres of mytilids, and the fibres of the internal ribs of propeamussiids, and probably all the fibres which appear together with the foliated microstructure, which are merely a fibrous variety of the foliated microstructure.

In the dorsal inner shell of Pectinidae, Propeamussiidae and Spondylidae there appears a set of tiny ridges dorsoventrally disposed. Given that we have not found any bibliographic reference to these structures we have called them microridges. Microridges are disposed in both sides of the resilium below the lateral ligament. In Pectinidae the microridges are constituted by mutually parallel elevations and depressions 15-30 μm width, although they frequently fuse and diverge forming dendritic patterns. From the structural point of view the microridges are spherulitic overgrowths developed onto the normal foliated layer. The microridges only grow in length, but not in width. Therefore, during the shell growth, their number increases by addition at the left and right ends. The microridges on one valve tightly interpenetrate the inter-ridge depressions of the opposing valve and vice versa, in a hinge-like fashion. In fact, they constitute a secondary microhinge and, possibly, they can be attributed a similar function. Therefore, their model of formation

can provide a genetic model for similar hinge types, such as the taxodont hinge. Future effort will be invested to ascertain this possibility.

Biom mineralización

Definición y tipos

Biom mineralización es el proceso mediante el cual los organismos forman minerales (Weiner y Dove 2003). Tras esta simple definición se esconde un fenómeno que ha modificado los ciclos biogeoquímicos de la Tierra, ha permitido registrar la historia de la vida y ha sido una revolución evolutiva en sí misma. Esta capacidad ha sido desarrollada por un grandísimo número de organismos repartidos en más de cincuenta *phyla* pertenecientes a todos los reinos, desde bacterias hasta organismos superiores. Los minerales producidos son igualmente diversos. Se han reconocido más de sesenta variedades minerales (Knoll 2003), tanto cristalinas (75%) como amorfas (25%), aunque la mayor parte de la producción mineral biológica se concentra en diferentes fases minerales de carbonato cálcico, fosfato cálcico, sílice y varios óxidos de hierro (Lowenstam y Weiner 1989).

El origen de la biom mineralización pudo ser el almacenamiento de elementos esenciales para el metabolismo o la eliminación de elementos en exceso, pero una vez que se consiguió una regulación de este proceso la evolución dio valores funcionales adicionales a los depósitos inorgánicos. El más extendido es probablemente el de proporcionar soporte estructural y/o protección a los organismos (huesos, conchas...), aunque también es frecuente la aparición de estructuras mineralizadas en sensores que permiten a los organismos orientarse en el espacio (estatolitos, otolitos) y con respecto al campo magnético terrestre (magnetosomas). Una característica de los minerales formados por los organismos es que tienen siempre una cierta cantidad de materia orgánica. Esta cantidad es enormemente variable, y puede oscilar entre menos del 1% en la concha de ciertos moluscos hasta más del 50% en los huesos. En muchas ocasiones la materia orgánica y la materia mineral están tan íntimamente entremezcladas que los minerales formados biológicamente son verdaderos materiales compuestos. Según la terminología utilizada en la ciencia de materiales a estos materiales se les denomina *composites* o en el caso de materiales formados biológicamente *biocomposites*. Precisamente, la íntima asociación entre fase mineral y fase orgánica es la que proporciona las excepcionales cualidades mecánicas a los biomateriales. En base a estas propiedades y a otras muchas se desarrolla actualmente toda una disciplina científica (biomimética) que trata de comprender e imitar la estructura de los biomateriales para el desarrollo de nuevos materiales bioinspirados con esas mismas o parecidas propiedades.

Para que en el seno de una disolución se produzca la precipitación y cristalización de un sólido determinado es necesario que se cumplan tres condiciones: *a)* que la disolución esté sobresaturada, *b)* que se formen gérmenes o núcleos del sólido y *c)* que los cristales crezcan (Vallet *et al.* 2003). La primera condición es un requisito termodinámico imprescindible. De lo contrario no se producirá la precipitación o se disolverá el precipitado existente. La concentración de saturación se alcanza cuando el producto iónico de los iones en disolución es igual al producto de solubilidad para una composición y temperatura determinadas. Si el producto iónico es mayor al producto de solubilidad se dice que la solución está sobresaturada y es posible la precipitación. Si por el contrario es menor no será posible la precipitación y habrá disolución del precipitado.

En cuanto a la segunda condición, en muchas ocasiones no es suficiente que una solución esté saturada para que se produzca la precipitación; es necesario que se venza la resistencia cinética a la nucleación o energía de activación de la nucleación (ΔG_N). Esta energía viene determinada por la diferencia entre la energía libre superficial de un agregado o semilla (ΔG_I), que es función del área, y la energía libre de los enlaces formados dentro de esta semilla (ΔG_B), que es función del volumen.

$$\Delta G_{\text{Total}} = -\Delta G_B + \Delta G_I$$

Como (ΔG_B) aumenta más rápidamente que (ΔG_I) con el crecimiento de la semilla, hay un tamaño crítico (r_c) a partir del cual (ΔG_B) > (ΔG_I) y la semilla puede crecer, ya que la energía libre del sistema se hace cada vez más negativa (Mann 2001).

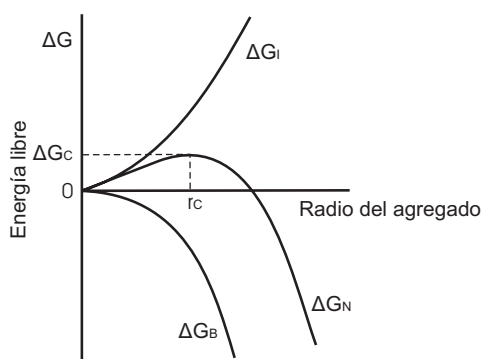


Figura 1. Energía libre de nucleación (ΔG_N) en función del tamaño de las semillas o agregados.

ΔG_C (energía libre de nucleación de las semillas) depende en gran medida de la temperatura. Una disminución de ésta supone una energía de activación menor y un tamaño crítico menor, lo que da lugar a núcleos cristalinos pequeños. A altas temperaturas la energía de activación es mayor y en consecuencia los núcleos han de alcanzar tamaños mayores para ser estables.

La nucleación comienza con la formación de un pequeño agregado de iones y/o moléculas en la disolución que crece hasta que se forma el núcleo cristalino como una fase sólida diferenciada. La formación de estos núcleos depende en gran medida de factores intrínsecos relativos a la propia naturaleza del sólido en formación, pero en líneas generales puede afirmarse que a mayor concentración de la disolución y mayor temperatura más favorecida estará la formación de núcleos.

El crecimiento de los cristales depende por tanto de la sobresaturación de la disolución y de la cantidad de núcleos que se hayan formado. A sobresaturaciones relativas muy grandes la velocidad de nucleación es mayor que la velocidad de crecimiento, por lo que se forman muchos núcleos pero crecen poco. Por el contrario cuando la sobresaturación no es demasiado alta la velocidad de crecimiento es mayor a la de nucleación, formándose en este caso menos núcleos pero cada uno de ellos dará lugar a cristales mayores que en la situación anterior. Por otra parte, las condiciones de sobresaturación determinan la fase mineral estable que va a precipitar en función de los componentes presentes en la solución.

La biomineralización no es más que la precipitación de determinados minerales en un ambiente biológico. Por ello está sometida a los mismos condicionantes quimicofísicos que rigen la precipitación inorgánica. No obstante, los seres vivos son capaces de regular el proceso de mineralización (sobresaturación, nucleación, fase mineral y crecimiento cristalino) dentro de unos determinados límites. Precisamente en función de la capacidad de regulación de este proceso se distinguen dos tipos de biomineralización: *a)* mineralización inducida biológicamente (Lowenstam 1981), y *b)* mineralización controlada biológicamente (Mann 1983). Mineralización inducida biológicamente es aquella que se produce sin ninguna maquinaria celular o macromolecular específica para tal fin, por lo que la capacidad para regular el proceso es limitado. Este sería el caso de la liberación al medio de productos de desecho por parte de ciertos microorganismos. Estos productos de desecho pueden precipitar en el medio, ya sea porque su concentración supera el límite de solubilidad, o porque se ven involucrados en reacciones químicas que originan productos poco solubles. Por ejemplo las bacterias reductoras de sulfato liberan al medio Fe^{2+} como subproducto metabólico. El Fe^{2+} reacciona en el medio con óxido férrico hidratado y da lugar a magnetita (Fe_2O_3) que precipita. Este tipo de mineralización ocurre en el medio externo y el mineral formado depende en gran medida de las condiciones fisicoquímicas de este medio (Frankel y Bazylinski 2003). En general se generan partículas minerales de muy

diferente tamaño y morfología. Es frecuente en bacterias, hongos y protistas, aunque también se da en animales superiores.

En la mineralización controlada biológicamente existe una maquinaria específica que controla todo o parte del proceso. Es la biomineralización más extendida y da lugar a cristales con una morfología, tamaño y organización definida en cada especie (Weiner y Dove 2003). El lugar donde ocurre la mineralización está aislado del medio externo por una barrera que evita la libre difusión de los iones. Esta barrera es usualmente una membrana lipídica (membrana celular o membrana de algún orgánulo) y/o una película constituida por macromoléculas (proteínas y/o polisacáridos) polimerizadas, como el periostraco de moluscos (Lowenstam y Weiner 1989, Simkiss y Wilbur 1989). Para que en ese espacio cerrado precipite el mineral es necesario que la solución esté saturada. El mecanismo general para alcanzar la saturación consiste en el bombeo de iones a través de las membranas mediante bombas iónicas. McConnaughey (1989) describe los mecanismos de transporte iónico asociados a la precipitación biológica de varios minerales.

La materia orgánica en el proceso de biomineralización

La diferencia entre las reacciones de precipitación puramente inorgánica y la precipitación controlada biológicamente es la presencia de determinadas macromoléculas orgánicas en la disolución. Estas macromoléculas además de integrarse en la estructura del biomineral e influir en sus propiedades mecánicas juegan un papel fundamental en el control de la biomineralización. El componente orgánico que más influye en la formación de los biominerales se supone que es un grupo de macromoléculas entre las que destacan ciertas proteínas, polisacáridos y lípidos. Éstas se clasifican en dos grandes grupos en función de su solubilidad en agua: *a)* macromoléculas estructurales, insolubles en agua y *b)* macromoléculas ácidas, solubles en agua. Las macromoléculas estructurales son los componentes mayoritarios y constituyen la matriz sobre la que se deposita la fase mineral a modo de soporte. Se trata de polímeros de estructura fibrosa ensamblados de diferentes formas. Hay tanto proteínas, como el colágeno de los huesos y la conquiolina de las conchas de los moluscos, como polisacáridos, como la quitina de los caparazones de los artrópodos. Las macromoléculas ácidas son un grupo heterogéneo de proteínas, fosfoproteínas y glucoproteínas globulares. Se caracterizan por presentar en su estructura una gran cantidad de aminoácidos con grupos carboxílicos (de carácter ácido), el más abundante es el aspartato (hasta el 45% del total). También son frecuentes grupos serina fosforilados (fosfoproteínas) y polisacáridos unidos a grandes cantidades de grupos

carboxilato y sulfato (glucoproteínas) (Veis y Perry 1967, Weiner 1979, Weiner, Talmon *et al.* 1983, Weiner y Traub 1984).

Las macromoléculas ácidas son un componente minoritario de la fracción orgánica del biomineral (menos del 1%), pero aparecen en todos los biominerales y son muy similares en todos los organismos. Se piensa que son las macromoléculas que más influyen en el proceso de mineralización. Tienen una gran afinidad por el calcio y cuando se unen a él adoptan una conformación en capa β con los puntos de unión situados en la periferia (Worms y Weiner 1986). Se cree que esta especial disposición de los grupos aniónicos influye en la nucleación, en la fase mineral que se forma y en su orientación cristalográfica (teoría heteroepitaxial).

Biominales más frecuentes

Aunque actualmente se conocen unos sesenta biominerales (Knoll 2003), la mayor parte de la producción mineral biológica se da en unas pocas especies: carbonatos, fosfatos, oxalatos y sulfatos de calcio o magnesio y óxidos o sulfuros de hierro. Estas sales son en general bastante insolubles. Por ejemplo, el producto de solubilidad de las sales de calcio más frecuentes (carbonatos, fosfatos y oxalatos) es tal que para pHs cercanos a 7 la precipitación se produce a concentraciones de calcio de 5×10^{-3} M y concentraciones de los diversos aniones en el rango de $1-10 \times 10^{-3}$ M. Esto da idea del riguroso control que debe existir sobre la concentración. De hecho, el control es tal que el balance en la concentración se mantiene de forma que se sobrepasa sólo ligeramente el producto de solubilidad (sobresaturación muy ligera) (Fraústo da Silva y Williams 2001). Así se evita la formación de depósitos indeseados.

A continuación se exponen alguno de los biominerales y biomineralizadores más importantes, haciendo más hincapié en la biomineralización de carbonatos, componente principal de los materiales estudiados en esta tesis.

a) Biomineralización de óxidos de hierro

Existen varios óxidos de hierro producidos biológicamente, entre ellos el más común es la ferrihidrita (óxido de hierro (III) hidratado ($5\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$)), mineral que se encuentra en el núcleo de la ferritina, proteína de almacenamiento de hierro de los mamíferos. Además existen oxihidróxidos u óxidos hidratados de hierro de formulación general $\text{FeO}(\text{OH})$ como la goetita y lepidocrocita. Otro mineral de hierro también muy abundante es la magnetita, primer biomineral de hierro descrito (Lowenstam 1962). La magnetita es un

óxido mixto de hierro (II) y hierro (III) (Fe_3O_4) en el que los iones Fe^{2+} ocupan los huecos octaédricos y los iones Fe^{3+} se sitúan la mitad en los huecos octaédricos y la otra mitad en los huecos tetraédricos en una estructura tipo espinela. La magnetita es un mineral ferromagnético natural. Esta característica es utilizada por diversos organismos para orientarse o navegar con el campo magnético terrestre. Entre los organismos que utilizan esta capacidad se encuentran las bacterias magnetotácticas (Blakemore 1975), que tienen un rosario de pequeños cristales de magnetita en su interior envueltos por una membrana (magnetosomas). También aparecen pequeños cristales de magnetita en el cerebro de insectos (Gould *et al.* 1978), peces (Walker *et al.* 1984) y aves (Walcott *et al.* 1979), presencia que está relacionada con la navegación. El cerebro humano contiene multitud de pequeños cristallitos de magnetita (Kirschvink *et al.* 1992), aunque su función no está clara.

Un caso muy especial de biomineralización de óxidos de hierro se da en la rádula de los quitones (Lowenstam 1962). Los quitones utilizan la rádula para raspar las algas de las rocas de las que se alimentan. Es una estructura que está sometida a continuo desgaste y los dientes que la componen son reemplazados como si de una cinta transportadora se tratase. Este especial desarrollo de los dientes permite estudiar el proceso de biomineralización en sus diferentes etapas. Comienza con la formación de un primordio orgánico constituido por quitina y proteína. En un primer momento se deposita ferrihidrita poco cristalina que se transforma en goetita, lepidocrocita y finalmente magnetita, que es el componente mayoritario en el diente maduro.

b) Biomineralización de sílice amorfa

El silicio es el segundo elemento en abundancia en la corteza terrestre (después del oxígeno) con un 27.7% del total. A pesar de su enorme abundancia en el suelo y en los minerales su presencia en los sistemas biológicos es bastante discreta, encontrándose sólo en pequeñas cantidades en la mayoría de los organismos. La excepción la constituyen las plantas, sobre todo gramíneas y equisetos, los radiolarios y las diatomeas donde el silicio puede llegar a ser el segundo elemento en cantidad después del carbono.

El porqué estos organismos utilizan sílice amorfa en lugar de cualquiera de las sales cristalinas (carbonatos, fosfatos...) como material estructural es desconocido. Una posibilidad es que con el uso de un material amorfo se elimine el peligro de fracturas a lo largo de determinados planos cristalinos por lo que el material puede modelarse sin pérdida de resistencia en una gran variedad de complejas arquitecturas (Mann, 2001). De hecho los

esqueletos de diatomeas y radiolarios tienen una gran complejidad arquitectónica, superior a la mayoría de estructuras cristalinas biológicas.

La sílice amorfa hidratada u ópalo es un oxihidróxido de silicio resultado de la condensación de los grupos Si-OH del ácido silícico $\text{Si}(\text{OH})_4$. A concentraciones de ácido silícico superiores a 1 mM los grupos Si-OH se condensan espontáneamente para producir polímeros con enlaces Si-O-Si, aunque también se mantienen algunos grupos Si-OH terminales, lo que da lugar a un complejo material hidratado con una composición general $[\text{SiO}_{n/2}(\text{OH})_{4-n}]_m$ (Mann *et al.* 1983), donde n oscila entre 1 y 4, y m es un número alto. La gran estabilidad de los enlaces Si-O-Si en el agua así como la variabilidad de ángulos de enlace permitida es responsable de la precipitación de la fase amorfa en vez de la cristalina en condiciones normales.

c) Biomineralización de fosfato de calcio

El fosfato de calcio $[\text{Ca}_3(\text{PO})_4]$ es uno de los biominerales más importantes. Constituye la base química de la mayoría de las estructuras mineralizadas de los cordados. Sin embargo no se presenta de forma pura sino en estado hidratado o hidroxiapatito $[\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})]$. El hidroxiapatito presenta la estructura típica de los minerales del grupo del apatito, de la que la forma más común es el fluoroapatito $[\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}]$. En el hidroxiapatito todos los aniones fluoruro del fluoroapatito están sustituidos isomórficamente por iones hidróxido. El hidroxiapatito presente en los vertebrados tiene una cierta cantidad de iones fosfato sustituidos por carbonato, de ahí que la denominación más correcta del mineral sea hidroxiapatito carbonatado.

d) Biomineralización de carbonato cálcico

La precipitación biológica de carbonato cálcico (CaCO_3) se da mayoritariamente en forma de calcita y aragonito, aunque otras formas minoritarias como vaterita, monohydrocalcita, dolomita y carbonato cálcico amorfo aparecen principalmente en procesos de reparación o como estados transitorios de las fases más estables (Beniash *et al.* 1997, Weiss *et al.* 2002). Calcita y aragonito son fases polimórficas del carbonato cálcico. Esto quiere decir que son minerales con una misma composición pero tienen estructuras cristalinas distintas. Desde el punto de vista cristalográfico, tanto aragonito como calcita están formados por capas alternantes de grupos carbonato y de cationes de calcio. La estructura cristalina de la calcita guarda relación con la estructura cúbica de la halita (NaCl). De hecho si observamos la estructura de la halita desde cualquiera de los ejes ternarios [111], la disposición de los

aniones y cationes es muy similar a la de la calcita observada desde el eje c . Debido a que la molécula de carbonato (CO_3^{2-}) es un triángulo equilátero plano y no una esfera, la celdilla unidad de la calcita está deformada, por lo que pierde la simetría cúbica y adquiere simetría romboédrica, que no es más que una cúbica que se hubiese achatado a lo largo de una diagonal que une dos vértices opuestos (uno de los ejes ternarios del cubo). En el caso de la calcita el achatamiento es del 76.66%. El romboedro resultante conserva el eje ternario, que es el elemento de simetría característico del sistema trigonal. Este eje ternario coincide con el eje cristalográfico c , mientras que el resto de ejes a_1 , a_2 y a_3 están contenidos en un plano perpendicular a c y forman 120° entre sí. Las capas de grupos carbonato y calcio se disponen perpendiculares al eje c . Dentro de cada capa los grupos carbonato apuntan todos en la misma dirección, mientras que en capas alternantes apuntan en direcciones opuestas (los grupos carbonato de capas alternantes están girados 60° unos con respecto a otros).

En la calcita los grupos carbonato están dispuestos según un empaquetamiento cúbico compacto, mientras que los cationes calcio se distribuyen en los huecos octaédricos que quedan entre dos capas sucesivas de grupos carbonato. Esta disposición es idéntica a la de los iones cloruro y sodio en la halita. La similitud entre ambas estructuras es tal que incluso la perfecta fractura cúbica de la halita por las caras $\{1000\}$ tiene su análogo en la fractura romboédrica de las caras $\{10-14\}$ en la calcita.

En el aragonito los grupos carbonato no se disponen en un único plano sino que se da un desdoblamiento de estas capas en las que los grupos carbonato no apuntan todos en el mismo sentido sino que están girados 60° (apuntan en sentidos opuestos) en la misma capa. A consecuencia de esto, en el aragonito se pierde la simetría trigonal de los grupos carbonato y se adquiere simetría ortorrómbica. El giro de los grupos carbonato deja huecos mayores donde pueden incorporarse cationes de mayor radio iónico que en el caso de la calcita. Los cationes de calcio se disponen con un empaquetamiento hexagonal compacto, lo que hace que el aragonito tienda a aparecer con hábito pseudo hexagonal. En el aragonito cada átomo de oxígeno está unido a tres átomos de calcio mientras que en la calcita sólo a dos. Por tanto, el empaquetamiento de los átomos es mayor en los cristales de aragonito. De ahí que el aragonito tenga mayor densidad que la calcita (2.94 g/cm^3 frente a 2.71 g/cm^3). Este empaquetamiento hace que los elementos alcalinotérreos con un diámetro iónico mayor a 1 \AA cristalicen con una estructura del aragonito, mientras que los de radio iónico inferior a 1 \AA cristalicen con la estructura de la calcita. El calcio, con un radio iónico de 0.99 \AA , es el único elemento del grupo que puede formar los dos tipos de estructuras a temperaturas y presiones normales. No obstante, a alta temperatura y baja presión la calcita

es estable, mientras que el aragonito lo es a baja temperatura y alta presión. Los elementos alcalinotérreos con radio iónico mayor a 1 Å tienen gran facilidad para incorporarse a la red cristalina del aragonito mientras que los de radio menor a 1 Å se integran más fácilmente en la calcita. Por ello es frecuente que elementos como el estroncio, con un radio iónico de 1.13 Å, estén presentes en la red del aragonito, mientras que el magnesio, de radio iónico menor (0.65 Å), se integra con más facilidad en la red de la calcita. Es interesante recordar que aunque el magnesio pueda integrarse en la red de la calcita (capas alternativas calcio-carbonato-magnesio-carbonato) y dar lugar a dolomita, la presencia de altas concentraciones de magnesio inhibe la formación de calcita y en su lugar precipita aragonito. Esto es especialmente importante en las aguas marinas donde el magnesio es muy abundante.

La calcita cristaliza en el sistema trigonal y forma cristales con la simetría propia de este sistema. El hábito cristalino más frecuente en la calcita es el romboédrico, en el que predominan las formas romboédricas del tipo {10-1}, cuya forma más común en la naturaleza es el romboedro {10-14} (romboedro típico de exfoliación). Otras formas frecuentes son las escalenoédricas del tipo {21-3}, y las prismáticas en las que se desarrollan las caras paralelas al eje *c* {10-10} o {11-20}, cerradas por el pinacoide básico {000} o por romboedros. También son frecuentes combinaciones de varias de las formas anteriores, como las típicas formaciones en “dientes de perro”, resultado de la combinación de prisma y escalenoedro o “cabeza de clavo” formado por un prisma y un romboedro negativo. El aragonito cristaliza en el sistema ortorrómbico y forma cristales con hábito generalmente acicular, tabular o prismático. También son frecuentes las maclas con hábito pseudo-hexagonal.

Evolución de la biomineralización

Un hito importante en la historia de la vida ocurrió hace unos 570 millones de años (m.a.) cuando de forma casi simultánea muchos grupos de organismos desarrollaron la capacidad de producir tejidos duros (mineralizados) y por tanto susceptibles de fosilizar. Los paleontólogos han denominado al periodo de tiempo que va desde ese momento hasta la actualidad como Fanerozoico, que significa “animal visible”, en contraposición al periodo anterior (Precámbrico) en el que la presencia de fósiles es muy escasa. No obstante, la historia de la biomineralización se extiende mucho más atrás de este momento. Los fósiles más antiguos que se conocen son los estromatolitos, con una edad de 3500 m.a. (sólo 300 m.a. más modernos que las rocas más antiguas que se conocen). Los estromatolitos son

estructuras laminares de acreción formados por la actividad fotosintética de cianobacterias y otros microorganismos. El consumo de dióxido de carbono en la fotosíntesis produce la precipitación del carbonato cálcico que queda englobado junto a partículas de sedimento y el mucílago de las colonias de bacterias. Otros depósitos minerales también asociados a la actividad fotosintética de los microorganismos son las formaciones de hierro bandeado, resultado de la oxidación del hierro presente en los océanos (3800-1800 m.a.). También existen depósitos minerales de azufre y manganeso con más de 2500 m.a. producidos por la actividad biológica de bacterias reductoras. Estas mineralizaciones son inducidas biológicamente, que, como ya hemos comentado con anterioridad, son consecuencia indirecta de un proceso metabólico que tiene como resultado la eliminación o liberación de determinados compuestos inorgánicos al medio.

El paso hacia un mayor control en el proceso de biomineralización se dio también en bacterias algunos millones de años después. En 1975 Richard P. Blakemore descubrió que ciertas bacterias se desplazan hacia el polo norte magnético gracias a la presencia de cadenas de cristales de magnetita intracelulares (magnetosomas) que funcionan como una brújula en su movimiento. Se conoce la existencia de esos cristales de magnetita en sedimentos con edades de 600-700 millones de años (Chang *et al.* 1987), aunque se han encontrado cristales de magnetita muy similares en rocas con dos mil millones de años (Chang 1988). Es por tanto muy posible que las bacterias hayan sido capaces de controlar la mineralización desde las épocas iniciales de la historia de la vida sobre la Tierra.

Hace aproximadamente 600 m.a. aparecieron los metazoos. Las evidencias fósiles más antiguas de esta aparición se dan en forma de rastros, huellas o perforaciones en los sedimentos. En la fauna de Ediacara (Proterozoico Superior) se reconocen una serie de organismos, en algunos casos de gran tamaño, pero en los que no se aprecian estructuras mineralizadas. Tuvieron que pasar aún algunos millones de años para que se diera la gran revolución biológica que marca el inicio del Fanerozoico (límite entre el Precámbrico y el Cámbrico, hace unos 570 m.a.): la llamada “Explosión del Cámbrico”. En este momento se produce uno de los hitos más importantes en la evolución de la biomineralización: la formación de esqueletos mineralizados. En un periodo relativamente corto desde el punto de vista geológico (unos 30 m.a.) aparecieron prácticamente todos los linajes que viven o han vivido, entre ellos los grupos que forman esqueletos mineralizados: poríferos, braquiópodos, moluscos, artrópodos, equinodermos, vertebrados... Después de este momento en pocos grupos ha surgido nuevamente la capacidad de controlar la mineralización. Llama poderosamente la atención que desde ese momento los organismos

utilizan los mismos minerales que posteriormente constituyen la mayor parte de las estructuras esqueléticas, de hecho gran parte de estas estructuras mineralizadas fabricadas por los organismos están constituidas por uno o dos tipos de un total de cinco compuestos inorgánicos (calcita, calcita con magnesio, aragonito, apatito y sílice). Del mismo modo, los tipos estructurales en que los minerales anteriores aparecen con más frecuencia en los organismos (apatito fibroso, aragonito esferulítico, aragonito lamelar cruzado, nácar, calcita foliada...) aparecieron también en ese momento (Runnegar 1989).

Los motivos que provocaron esta explosión de vida con la aparición de un gran número de *phyla* en el límite Precámbrico-Cámbrico no están claros. Las causas propuestas para explicar este evento pueden agruparse en extrínsecas e intrínsecas. Las causas extrínsecas hacen generalmente referencia a cambios ambientales globales como las variaciones de nutrientes en los océanos, fin de las glaciaciones, aumento en los niveles de oxígeno en la atmósfera y en los océanos, fragmentación de los continentes con formación de plataformas y mares someros (Mackenzie y Agegian 1989). Entre las intrínsecas se han propuesto causas genéticas, como el desarrollo de los genes *box*, que determinan el desarrollo embrionario y cuyas mutaciones podrían haber dado lugar a la gran variedad de formas o “*Bauplan*” que se desarrollaron en este momento. También se ha aludido a cuestiones ecológicas como la ocupación de nichos que estaban vacíos en esa época o la aparición de la depredación. Este último punto ha sido propuesto como factor decisivo en el desarrollo de las estructuras mineralizadas. Aunque ciertos autores sugieren que más que la depredación en sí, el causante principal fue el desarrollo de la visión (Parker 2003). Otros, en cambio, afirman simplemente que no hay ningún motivo especial para la súbita aparición de tantos grupos, sino que es consecuencia natural de la radiación explosiva de los organismos pluricelulares que había comenzado unos cuantos millones de años antes (Sepkoski 1978). Otro argumento es que la diversidad de metazoos ya existía en el Precámbrico pero sólo se hizo patente en registro fósil en el momento en el que los organismos adquirieron tamaño y estructuras mineralizadas (Rhoads y Morse 1971, Lowenstam y Margulis 1980).

Biomineralización en bivalvos

La concha de los bivalvos

La concha de los bivalvos (Bivalvia: Mollusca) está constituida por dos valvas calcificadas unidas dorsalmente por una zona flexible denominada ligamento. Aunque existe una gran diversidad morfológica entre las valvas de los distintos grupos, e incluso entre valvas de un mismo individuo, cada una de las valvas crece según una espiral logarítmica (Raup y Michelson 1965). Las valvas presentan una fina cubierta externa de naturaleza orgánica denominada periostraco. El periostraco puede ser extremadamente fino, como en el caso de ostreidos y pectínidos, donde apenas alcanza una micra de espesor mientras que en mitílidos puede llegar a tener más de 400 μm (Harper 1997). La porción calcificada (ostraco), que constituye la mayor parte de la concha, está constituida por cristales de carbonato cálcico inmersos en una matriz de materia orgánica. El carbonato cálcico aparece casi exclusivamente en forma de calcita y aragonito, aunque otras variedades minerales aparecen en contadas ocasiones. Los cristales de carbonato cálcico están organizados en una serie limitada de estructuras, denominadas microestructuras, que aparecen de forma recurrente en bivalvos, y en el resto de moluscos. En la concha normalmente hay dos o tres capas diferenciadas compuestas cada una de ellas de sólo una de esas microestructuras. Se denominan capa externa, media e interna. Entre las capas media e interna aparece, en determinadas zonas, una capa adicional que corresponde a la zona de inserción del músculo aductor. Esta capa se denomina miostraco y está constituida por prismas de naturaleza aragonítica (Fig. 2). La formación de la concha comienza con la segregación de una fina película de periostraco entre los pliegues medio y externo del borde del manto (surco periostracal). El periostraco se une a la concha preexistente y sella la unión entre la concha y el borde del manto. De esta forma se crea un reducido espacio cerrado entre la concha y el manto denominado espacio extrapaleal. En esa cavidad es donde las células epiteliales del manto segregan los constituyentes de la concha (materia orgánica, CO_3H^- y Ca^{2+}), que se incorporan a la concha preexistente (Figura 2).

Mineralogía de la concha de los bivalvos

Aragonito y calcita son los polimorfos de carbonato cálcico más frecuentes en la concha de bivalvos. Se ha descrito la presencia de otras variedades minerales, como dallita (apatito carbonatado) en la prodisoconcha de *Pinctada martensii* (Watabe 1956) o en el periostraco

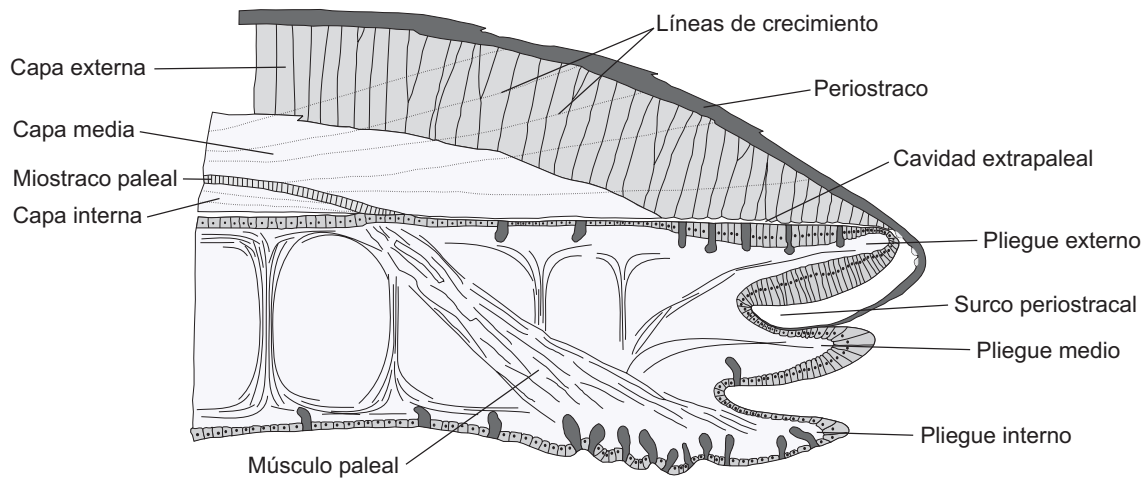


Figura 2. Esquemmatización del borde de la concha de un bivalvo con su manto asociado. Dibujado a partir de Kennedy *et al.* (1969).

de *Lithophaga nigra* (Waller 1983), aunque son casos muy minoritarios. Hay ciertas estructuras de la concha de bivalvos que siempre están constituidas de aragonito independientemente del mineral del que esté compuesto el resto. Estas estructuras son las porciones calcificadas de los ligamentos, las capas de miostraco, las calcificaciones en el periostraco y las conchas larvárias (Taylor *et al.* 1969). Originariamente la concha de bivalvos fue completamente aragonítica. Los primeros bivalvos habrían heredado la composición mineralógica de los monoplacóforos, cuya concha está constituida por una capa externa prismática y otra interna nacarada, ambas de aragonito (Taylor 1973). A este tipo de concha se la ha denominado concha prismatonacarada aragonítica y es típica de algunos grupos con registro fósil muy antiguo como nucúlidos, trigóniidos y uniónidos. En la mayoría de bivalvos se mantiene la composición aragonítica primitiva de la concha, por ejemplo todos los Paleotaxodonta, Anomalodesmata y la mayoría de Heteroconcha tienen conchas completamente aragoníticas. Sin embargo en algunos grupos de bivalvos se ha producido una evolución mineralógica consistente en la adquisición de capas calcíticas (Carter 1980). El grupo en el que más se han desarrollado las capas calcíticas es Pteriomorphia (Carter 1980). En Pteriomorphia hay representantes actuales con conchas compuestas casi exclusivamente de calcita, como pectínidos y ostreidos aunque los datos mineralógicos disponibles indican que este grupo proviene de ancestros con conchas enteramente aragoníticas (Kennedy y Taylor 1968), (Carter y Tevesz 1978). La práctica totalidad de órdenes de esta subclase, a excepción de Arcoida, presentan capas calcíticas en mayor o menor medida.

Un aspecto destacable de la distribución mineralógica en Bivalvia es que el mayor desarrollo de las capas calcíticas se da en aquellos grupos mayoritariamente epibentónicos, mientras que en los grupos endobentónicos en los que se ha desarrollado esta capacidad, siempre está muy limitada. El mejor ejemplo de esto es la misma subclase Pteriomorpha, un grupo eminentemente epibentónico con gran desarrollo de las capas calcíticas. Por el contrario en la subclase Heteroconchia, eminentemente endobentónica, la presencia de calcita está restringida a casos muy particulares, generalmente formas que han pasado a tener un hábito de vida epibentónico. Por ejemplo, algunas especies del género *Chama* (superfamilia Chamoidea) tienen una capa calcítica externa (Harper 1998), mientras que ciertos lucínidos y venéridos poseen parches calcíticos diseminados por la concha (Carter, 1980). Los rudistas son un grupo de bivalvos epibentónicos que habitaron los océanos someros templados de bajas latitudes desde el Jurásico Superior hasta el Cretácico y se extinguieron en el límite Cretácico/Terciario. Los rudistas desarrollaron capas calcíticas externas fibrosas mientras que las capas internas fueron mayoritariamente aragoníticas.

Significado de la producción de calcita

En los últimos años ha habido mucho debate sobre las posibles razones que han motivado la evolución de las capas calcíticas en moluscos, y particularmente en bivalvos. Una suposición muy extendida, basada en que las capas calcíticas aparecen siempre en primer lugar en la superficie externa de la concha, tanto en bivalvos como en gasterópodos, es que las capas calcíticas actúan como una barrera protectora contra la disolución ya que son menos solubles que las capas aragoníticas en el agua marina (p. ej. Taylor y Reid 1990, Harper *et al.* 1997).

En bivalvos la aparición de las capas calcíticas se ha dado sólo en grupos epibentónicos mientras que los endobentónicos son mayoritariamente aragoníticos. La explicación comúnmente aceptada sobre esta tendencia es que los bivalvos epibentónicos están expuestos al agua “normal” mientras que los endobentónicos están inmersos en el agua intersticial, donde las condiciones fisicoquímicas son diferentes.

La química de los océanos ha cambiado desde épocas en las que los depósitos carbonatados predominantes han sido aragoníticos, denominadas “de mares aragoníticos”, y épocas en las que los depósitos han sido mayoritariamente calcíticos, denominadas “de mares calcíticos”. Tales cambios han sido atribuidos a variaciones de la pCO_2 atmosférica o de la relación Mg^{2+}/Ca^{2+} en los océanos (Sandberg 1975, 1983, 1985). Se ha sugerido que la mineralogía de la concha de muchos organismos ha seguido tal tendencia (Stanley *et al.*

2002, Stanley 2006). De hecho el momento en el que los tres mayores clados de bivalvos productores de calcita (Pteriomorpha, Mytiloidea e Hippuritoida) comenzaron a producir calcita coincide con épocas de mares calcíticos (Harper *et al.* 1997). En los mares calcíticos los bivalvos aragoníticos estuvieron supuestamente sometidos a una desventaja selectiva en comparación con aquellos que han desarrollado capas calcíticas, debido principalmente al mayor riesgo de disolución del aragonito (Harper *et al.* 1997). Sin embargo, Harper (2000) demostró experimentalmente que las microestructuras calcíticas no son más efectivas contra la disolución que las aragoníticas, y que en todos los casos la cantidad de concha disuelta es muy pequeña. Esto contradice la suposición que las capas calcíticas han evolucionado debido a su menor solubilidad, a pesar de que siempre ocupan en primer lugar la parte externa de la concha, a modo de capa protectora.

Lowenstam (1954) y Lowenstam y Weiner (1989) plantearon que la producción de calcita no tiene valor adaptativo ya que es una mera necesidad fisiológica a bajas temperaturas. En base a esta idea Carter *et al.* (1998) propusieron que las bajas temperaturas favorecieron el desarrollo de las capas calcíticas a través de la facilitación cinética de los, en un principio, débiles controles sobre la producción de calcita, efecto denominado potenciación térmica. Este efecto expuso las bases genéticas de la producción de calcita a la selección natural por lo que pudieron refinarse y en último término permitió la competición entre aragonito y calcita por ocupar las capas de la concha. Estos autores sugieren que una vez que las capas calcíticas fueron expuestas a la selección éstas evolucionaron en las conchas de bivalvos debido a una serie de ventajas selectivas tales como resistencia a la disolución, resistencia a la perforación química por algas y gasterópodos, reducción en la densidad de la concha en especies nadadoras y habitantes de fondos fangosos, alta flexibilidad en capas prismáticas y localización de fracturas y economía de producción en la microestructura foliada. Carter *et al.* (1998) afirman que la mayoría de casos en los que se ha dado un incremento de la producción de calcita han ocurrido durante el Pérmico y Triásico, momento en el que las bajas temperaturas globales marinas podrían haber desencadenado la potenciación térmica de la calcita. Sin embargo, Hautmann (2001, 2006) sugiere que las nuevas estimaciones de temperatura marina global no apoyan la hipótesis de Carter *et al.* (1998) y que la expansión de las capas calcíticas ocurrió más tarde, tras el límite Triásico/Jurásico. Hautmann propone que la disminución de la relación Mg^{2+}/Ca^{2+} en combinación con un incremento de la pCO_2 acaecido en ese periodo dio lugar a un mar calcítico en el que la producción de calcita tiene un menor coste metabólico. Debido a esto muchas familias epibentónicas sustituyeron el aragonito por calcita en sus conchas a partir

del Jurásico, entre ellos Pectinidae, Gryphaeidae, Pectinidae, Plicatulidae y Buchiidae. Hautmann también afirma que los grupos con conchas engrosadas sufrieron un grave declive en diversidad hasta que adaptaron su mineralogía a las nuevas condiciones del agua marina.

Tipos de microestructuras

Las microestructuras de Bivalvia aparecen ampliamente descritas en varias publicaciones entre las que hay que destacar Bøggild (1930), Taylor, Kennedy, *et al.* (1969), Kennedy *et al.* (1969), Carter (1980; 1990). En general se reconocen unas siete u ocho microestructuras principales según autores. La clasificación adoptada en esta tesis se hace en base al mineral del que están constituidas (aragoníticas o calcíticas) y por motivos de simplicidad se obvia hacer referencia a la multitud de variantes descritas.

Microestructuras aragoníticas

a) Prismática aragonítica

La microestructura prismática (tanto aragonítica como calcítica) aparece mayoritariamente en la superficie externa de la concha. Está constituida por unidades cristalinas alargadas en forma de prisma rodeadas por envueltas orgánicas. Los prismas suelen tener sección poligonal y se disponen con el eje mayor perpendicular a la superficie de la concha. Es frecuente que ocurran fenómenos de competición por el espacio entre prismas que conlleva la desaparición o disminución del tamaño de algunos prismas, mientras que otros incrementan su tamaño a costa de los anteriores (Ubukata 1994, Checa & Rodríguez-Navarro 2001). Por ello el número de prismas que aparecen en la superficie interna de la capa prismática suele ser menor que en la externa, aunque de mayor diámetro. Los prismas aragoníticos son agregados policristalinos de fibras de aragonito que crecen esferulíticamente desde la superficie externa de la capa prismática. La microestructura prismática aragonítica aparece en Solemyoidea, Unionoidea, Trigonoidea Pholadomyoidea, Pandoroidea, Poromyoidea y Verticordioidea.

b) Nacarada

La microestructura nacarada está formada por “tabletas” cristalinas de forma poligonal (hexagonal o pseudo-hexagonal) u ovalada, dispuestas en capas horizontales. Cada capa cristalina está separada de la siguiente por una membrana orgánica de proteína-polisacárido

denominada matriz orgánica interlamelar. Se da una alternancia de capas cristalinas y capas orgánicas a lo largo de todo el espesor lo que resulta en una apariencia típica en muro de ladrillo o “*brick wall*”. Cada tableta de nácar está rodeada por una envuelta de materia orgánica denominada matriz orgánica intercristalina. Las tabletas de nácar tienen el eje cristalográfico c perpendicular a la superficie de de las tabletas, que coincide con las caras cristalinas $\{001\}$, mientras que los ejes a y b son paralelos a dicha superficie. La microestructura nacarada es común en Bivalvia, Gastropoda y Cephalopoda. Es junto con la prismática una de la microestructuras más primitivas. En bivalvos los frentes de crecimiento de las lamelas de nácar tienen una disposición en terrazas, mientras que en gasterópodos los cristallitos de las sucesivas capas en crecimiento se apilan en torres. La microestructura nacarada aparece actualmente en Bivalvia en Nuculoidea, Mytiloidea, Pterioidea, Pinnoidea Unionoidea, Trigonoidea, Pandoroidea y Pholadomyoidea (Taylor *et al.*, 1969).

c) Lamelar Cruzada y Lamelar Cruzada Compleja

La microestructura lamelar cruzada (en adelante LC) es probablemente la microestructura más común en los moluscos. Aparece en todas las clases, con la única excepción de Cephalopoda (Bogild, 1930). En la clase Bivalvia es característica del Orden Arcoidea (Pteriomorphia) y de la Subclase Heteroconchia, el grupo más diverso, donde constituye junto con la microestructura lamelar cruzada compleja (en adelante LCC), la concha de muchas de sus especies. Esta microestructura sólo falta en las subclases Protobranchia y Paleoheterodonta (Carter, 1990).

La microestructura LC es una de las microestructuras más organizadas internamente. Consiste en bandas alargadas, denominadas lamelas de primer orden, que se disponen de forma conmarginal en la concha (bivalvos). En algunos casos estas bandas son muy regulares mientras que en otros casos tienen morfología irregular y aparecen ramificadas y entrelazadas. Las lamelas de primer orden están formadas por unidades menores denominadas lamelas de segundo orden. Éstas son generalmente alargadas y están inclinadas con respecto a la superficie de deposición. Las lamelas de segundo orden pertenecientes a lamelas de primer orden adyacentes se inclinan en direcciones opuestas. El ángulo entre ellas suele ser de 90-130°. Las lamelas de segundo orden están a su vez constituidas por otras laminillas o fibras de menor entidad denominadas lamelas de tercer orden.

La microestructura lamelar cruzada compleja (LCC) es similar a la LC, pero con un grado de ordenación menor. Al igual que en la LC, en la microestructura LCC las lamelas de tercer orden están agrupadas y forman lamelas de segundo orden, pero los bloques de lamelas de segundo orden no llegan a organizarse en lamelas de primer orden como en la LC

d) Homogénea

La microestructura homogénea fue definida por (Boggild, 1930) para designar aquellos casos en los que no era posible observar ninguna microestructura con la microscopía óptica de la época. Este término ha seguido utilizándose posteriormente en publicaciones más recientes (Taylor et al., 1969), incluso después de la utilización extensiva del microscopio electrónico de barrido (Carter, 1990).

Entre nícoles cruzados, esta microestructura muestra extinción paralela en amplias zonas, frecuentemente con el eje c perpendicular a la superficie (Boggild, 1930), (Taylor et al., 1969). Cuando se observa con el microscopio electrónico de barrido esta microestructura aparece constituida por cristalitos de morfología redondeada o irregular, pero aproximadamente equidimensionales. Taylor *et al.* (1969) reconocen la presencia de microestructura homogénea en Nuculanoidea, Arcticoidea y Glossoidea, aunque Uozumi y Suzuki (1981) amplían esta lista hasta 13 superfamilias.

Microestructuras Calcíticas

a) Prismática

Esta microestructura está constituida por prismas de calcita rodeados por envueltas orgánicas. Tradicionalmente se ha considerado a los prismas calcíticos como monocristalinos o prismas simples (Boggild, 1930), aunque actualmente se conocen casos de prismas constituidos por varias subunidades cristalinas (Dauphin, 2003). Los prismas se disponen con su eje mayor perpendicular a la superficie de la concha y el eje cristalográfico c de la calcita paralelo a esta dirección. La microestructura prismática calcítica constituye la capa externa ancestral de Pterioidea, Pectinoidea y Ostreoida, aunque en los dos últimos grupos se ha reducido, o desaparecido en muchas familias.

La microestructura foliada está constituida por finas hojas ligeramente inclinadas respecto a la superficie de la concha. La morfología de las hojas es variable aunque suelen tener el extremo distal terminado en punta de flecha, a veces truncada. Las hojas están dispuestas unas junto a otras con la misma orientación sobre áreas extensas (anómidos), o tener orientaciones muy variables (pectínidos). La microestructura foliada es exclusivamente calcítica. Aparece únicamente en Ostreoida, Pectinoida y Limoida (Taylor et al., 1969).

c) Prismática fibrosa

Esta denominación se reserva para aquellos casos en los que los prismas tienen una gran relación longitud/anchura, de manera que los prismas tienen morfologías fibrosas. No hay que confundir esta denominación con la estructura interna de los prismas aragoníticos. Esta microestructura es mucho menos frecuente que la prismática calcítica y aparece casi exclusivamente en la capa externa de algunos representantes del orden Mytiloida y en los radios fibrosos internos de la familia Propeamussiidae. También se ha descrito la presencia de prismas fibrosos en la superficie externa de la concha de pectínidos, spondílicos y límidos.

d) Otras microestructuras calcíticas

En este apartado describo brevemente algunas microestructuras calcíticas que aparecen exclusivamente en el orden Ostreoida. Se trata de microestructuras porosas poco densas que aparecen generalmente en forma de masas lenticulares en la concha. La microestructura *chalk*, que puede traducirse por cretácea o yesosa, está constituida por agregaciones irregulares de hojas de calcita dispuestas casi perpendicularmente a la superficie de la concha. Es frecuente que se produzca una transición progresiva desde la microestructura foliada hasta la *chalk* que consiste en un paulatino aumento del ángulo de inclinación de las hojas de calcita.

La microestructura vacuolar (también denominada vesicular) está constituida por vacuolas o vesículas vacías con paredes de calcita de aspecto espumoso o esponjoso. Las vesículas están generalmente alargadas en perpendicular a la superficie interna de la concha y presentan secciones poligonales irregulares. Este tipo microestructural es exclusivo de la familia Gryphaeidae.

Las microestructuras prismática calcítica, foliada y fibrosa son objetivo básico de esta Tesis y serán tratadas en profundidad más adelante.

Distribución microestructural en Bivalvia

En este apartado se expone de manera resumida la composición microestructural de los principales grupos de bivalvos. En aras de una mayor simplicidad, esta información está recogida en dos tablas (Tablas 1 y 2). La Tabla 1 representa las microestructuras mayoritarias de las subclases de bivalvos por superfamilias, a excepción de Pteriomorphia. La Tabla 2 representa de forma detallada las microestructuras de Pteriomorphia por familias. Dado que muchas de estas familias han sufrido notables cambios microestructurales a lo largo de su historia evolutiva, con expresión de distintas combinaciones de microestructuras, a continuación se hace una pequeña descripción de la evolución microestructural de las superfamilias estudiadas en esta tesis (Anomioidea, Pectinoidea y Ostreoidea). La información para la elaboración de las tablas procede de Bøggild (1930), Taylor *et al.* (1969; 1973), Kennedy *et al.* (1969), Uozumi y Suzuki (1981) y Carter (1990).

Superfamilia Anomioidea

En esta superfamilia la composición microestructural ancestral es una capa prismática externa y microestructura lamelar cruzada en las capas media e interna.

En la familia Anomiidae (Jurásico – Actualidad) Carter (1990) ha establecido tres grupos en base a la microestructura de la valva derecha. El grupo con la microestructura más primitiva es el de *Anomia simplex* que se caracteriza por presentar la composición microestructural ancestral. El grupo de *Anomia ephippium* presenta una delgada capa prismática externa, una capa foliada media y una capa lamelar cruzada interna. El grupo con la composición microestructural más evolucionada de la familia es el de *Enigmonia*. En este grupo, la valva derecha es completamente foliada, con la posible existencia de trazas de capas aragoníticas en la hendidura bisal.

En la familia Placunidae (Eoceno-Actualidad) la composición microestructural ancestral (*Placunanomia*) es semejante a la del grupo de *Anomia ephippium*. *Placuna* representa un grado avanzado ya que ha reemplazado totalmente las capas lamelares cruzadas por capa foliada. La capa prismática está restringida a la valva juvenil derecha.

			Externa	Media	Interna	
Profobranch.	Nuculoidea	Nuculoidea				
		Nuculanoidea				
	Solemyoidea	Solemyoidea				
P.heter.	Unionoidea	Unionoidea				
	Trigonoidea	Trigonoidea				
Heterodonta	Veneroidea	Lucinoidea				
		Chamoidea				
		Leptonoidea				
		Chlamydoconch.				
		Cyamyoidea				
		Carditoidea				
		Crassatelloidea				
		Cardioidea				
		Tridacnoidea				
		Mactroidea				
		Solenoidea				
		Tellinoidea				
		Dreissenoidea				
		Gaimardioidea				
		Articoidea				
		Glossoidea				
		Corbiculoidea				
		Veneroidea				
		Myoidea	Myoidea			
			Gastrochenoidea			
			Hiatelloidea			
			Pholadoidea			
		Anomalodesmata	Pholadomyoidea	Pholadomyoidea		
Pandoroidea						
Poromyoidea						
Verticordioidea						
Thracioidea						
Cuspidaroidea						

Prismas aragoníticos
 Nácar
 Lamelar cruzada
 Lamelar cruzada compleja
 Homogénea
 Aragonítica sin especificar
 Prismas calcíticos
 Foliada
 Fibrosa

Tabla 1. Composición microestructural en las capas externa, media e interna de la concha de las superfamilias de bivalvos (arriba). En azul las microestructuras aragoníticas y en amarillo las calcíticas.

			Externa	Media	Interna	Ord	Sil	Dev	Car	Per	Tri	Jur	Cre	Pal	Neo
Arcoidea	Praecardioidea	Praecardiidae													
	Cyrtodontoidea	Cyrtodontidae													
	Arcoidea	Arcidae													
		Parallelodontidae													
		Noetiidae													
		Cucullaeidae													
		Glycymerididae													
	Limopsoidea	Limopsidae													
		Philobryidae													
	Pichlerioidea	Pichleriidae													
Pterioidea	Ambonychioidea	Ambonychiidae													
		Inoceramidae													
		Alatoconchidae		?	?										
		Myalinidae													
		Eurydesmidae													
		Pergamidiidae													
	Pterioidea	Pterineidae													
		Pteriidae													
		Bakevelliidae													
		Lithiotidae													
Limoida	Pterioidea	Cassianellidae													
		Isognomonidae													
		Pulvinitidae													
		Malleidae													
Pinnoidea	Pinnidae														
Limoida	Limidae														
Ostreoida	Plicatuloidea	Plicatulidae													
	Dimyoidea	Dimyidae		?	?										
	Ostreoida	Ostreidae													
	Gryphaeoida	Gryphacidae													
Pectinoidea	Aviculopectinoidea	?													
		Saharopteriidae													
		Pterinopectinidae													
	Pectinoidea	Aviculopectinidae													
		Deltopectinidae													
		Pseudomonotidae													
		Oxytomidae													
		Monotidae													
		Asoellidae													
		Anomioidea	Anomiidae												
Mytiloidea	Pectinoidea	Placunidae													
		Propeamussiidae													
		Entoliidae													
		Pernopectinidae													
		Streblochondriidae													
		Spondylidae													
Mytiloidea	Mytilidae														

Tabla 2. Composición microestructural de una selección de familias de Pteriomorpha junto a su distribución estratigráfica (a la derecha). En esta tabla se representan las microestructuras más características pero téngase en cuenta que en algunas familias existe más de una microestructura en una determinada capa o una asimetría entre valvas. Del mismo modo algunas familias han sufrido notables cambios microestructurales a lo largo de su historia evolutiva.

Superfamilia Pectinoidea

En la superfamilia Pectinoidea aparecen las mismas tendencias evolutivas que en el resto de grupos. En primer lugar, en la capa externa se produce una reducción de la capa calcítica prismática ancestral. Ésta queda reducida a escasos milímetros de la valva post-juvenil de la mayoría de los representantes. En las capas media e interna se da una sustitución de la microestructura lamelar cruzada aragonítica por microestructura foliada calcítica. La expansión de la concha foliada se da primero desde el borde de la concha hacia la línea paleal, y posteriormente desde el umbo hacia la línea paleal.

Carter (1990) establece unas categorías que representan distintos grados en la evolución microestructural de la superfamilia. Estos grados son los siguientes:

Grado 1. Es el más primitivo dentro del grupo. Se mantiene una capa prismática calcítica en la superficie externa de ambas valvas en estado adulto. Las capas media e interna son lamelares cruzadas. Esta combinación de microestructuras sólo aparece actualmente en algunos propeamússiidos como *Bathypecten vulcani*. Constituye un avance microestructural en relación a la completa sustitución del nácar por las capas lamelares cruzadas.

Grado 2. La capa prismática calcítica se mantiene en la valva derecha en estado adulto, mientras que en la valva izquierda es reemplazada por microestructura foliada o prismática fibrosa. La capa lamelar cruzada se deposita en las proximidades del borde de la concha, así como dentro de la línea paleal. Este grado es característico de muchos propeamússiidos, pernopectínidos y el pectínido actual *Lissochlamis exotica*.

Grado 3. La capa prismática calcítica está restringida a la valva derecha juvenil o no se presenta. En su lugar aparece microestructura prismática fibrosa y/o foliada. Las capas media e interna son lamelares cruzadas. Este grado es característico de Entoliidae, Spondylidae y de algunos pectínidos triásicos y cretácicos.

Grado 4. La capa externa es igual que en el grado 3, pero la microestructura foliada ha reemplazado completamente a la lamelar cruzada fuera de la línea paleal. Dentro de la línea paleal se sustituye progresivamente la microestructura lamelar cruzada por foliada.

La familia Propeamussiidae (Carbonífero Inferior – Actualidad) presenta una combinación microestructural de caracteres primitivos y derivados. Por un lado mantiene la

capa prismática en la valva derecha en estado adulto, y por otro ha reemplazado completamente la capa nacarada por capas lamelares cruzadas medias e internas. Los prismas de la capa prismática externa de la valva derecha pueden transformarse en prismas fibrosos o microestructura foliada. Los propeamúsidos tienen costillas internas de microestructura fibrosa englobadas dentro de la microestructura lamelar cruzada. *Bathypecten vulcani* es el único representante actual con microestructura de Grado 1. El resto de propeamúsidos actuales pertenecientes a los géneros *Bathypecten*, *Propeamussium*, *Catillopecten*, *Cyclopecten* y *Similipecten*, suelen tener microestructuras del grado 2.

La familia Spondylidae (Jurásico - Actualidad) ha perdido totalmente la capa prismática externa, que ha sido reemplazada por capa foliada. En las capas media e interna hay capas lamelares cruzadas y lamelares cruzadas complejas.

En la familia Pectinidae (Triásico - Actualidad) la capa prismática externa está restringida a la valva juvenil derecha o no aparece. La capa lamelar cruzada aragonítica está presente únicamente dentro de la línea paleal o ausente. Los pectínidos modernos están caracterizados por presentar microestructuras de Grado 4, aunque algunas especies presentan Grados 3 e incluso 2.

Las modificaciones microestructurales presentes en la familia Pectinidae reflejan tres tendencias evolutivas consecutivas:

1. Restricción temprana de la capa prismática ancestral a la valva derecha juvenil.
2. Sustitución de la capa lamelar cruzada media por capa foliada, que se expande desde el borde ventral de la concha hacia la línea paleal.
3. Sustitución de la capa lamelar cruzada interna de la concha por microestructura foliada debido a la expansión del área de secreción de ésta desde la cavidad del umbo hacia la línea paleal.

Estos cambios se dan de una forma más rápida en la valva izquierda que en la derecha lo que ha dado lugar a una notable asimetría microestructural entre valvas. La asimetría se ha dado también en otras familias de Pectinoidea como Propeamussiidae, Entoliidae, Pterinopectinidae, Aviculopectinidae, Euchondriidae, Oxytomidae y Anomiidae, aunque no en todas estas familias se dan las tres tendencias que han ocurrido en Pectinidae, que puede considerarse como la más evolucionada desde el punto de vista microestructural.

Superfamilia Ostreoidea

La familia Ostreidae (Triásico Superior - Actualidad) presenta una capa prismática externa bien desarrollada, al menos en la valva derecha. Las capas internas eran ancestralmente aragoníticas con presencia de nácar, pero desde muy temprano en la historia evolutiva del grupo pasaron a estar constituidas por microestructura foliada. Es también frecuente la presencia de capas de microestructura “*chalk*” así como de láminas de conquiolina. La familia Ostreidae presenta una composición microestructural evolucionada desde su aparición, esto es, sustitución temprana de la capas aragoníticas por calcíticas.

Justificación y Objetivos

La microestructura prismática calcítica constituye la capa externa ancestral de la disoconcha de los pteriormorfos incluidos por Boss (1982) en Eupteriomorphia, es decir, Pterioida, Pectinoida, Ostreoida y Limoida. Sin embargo esta microestructura sólo aparece actualmente de forma regular en una o ambas valvas en la mayoría de Pterioida, Anomiidae, Propeamussiidae, Gryphaeidae y Ostreidae (Taylor *et al.* 1969, Carter 1990).

La formación de la capa prismática de Pterioida y Ostreoida ha sido extensamente tratada en diversas publicaciones (Taylor *et al.* 1969, Watabe & Wada 1956, Tsuji, Sharp, *et al.* 1958, Carriker *et al.* 1980, Nakahara y Bevelander 1971). Según el modelo general propuesto por estos autores, la formación de la capa prismática comienza con la secreción del periostraco en el surco periostracal situado entre los lóbulos externo y medio del borde del manto. El periostraco constituye la capa más externa de la concha, sobre el que se produce la nucleación de los prismas. El crecimiento de los prismas hace que sus bordes contacten por lo que se desarrollan las típicas formas poligonales. Una vez que toda la superficie del periostraco está cubierta, los prismas sólo pueden crecer hacia el interior de la concha. La microestructura prismática ha sido comparada con agregados cristalinos inorgánicos. Por ejemplo, la competición y selección geométrica de cristales, típica de del crecimientos cristalino inorgánico (p. ej. geodas de cuarzo), ha sido reconocida como uno de los principales agentes modeladores de la microestructura prismática, tanto calcítica como aragonítica (Grigor'ev 1965, Taylor *et al.* 1969, Ubukata 1994, Checa y Rodríguez-Navarro 2001). En consecuencia, la mayor parte de los estudios se ha centrado en la fase mineral, mientras que se ha obviado completamente la formación de las envueltas orgánicas de los prismas y su papel en la configuración de la capa prismática. La única hipótesis propuesta sobre la formación de las envueltas orgánicas se debe a Tsuji *et al.* (1958) y a Carriker *et al.* (1980), quienes propusieron que las envueltas orgánicas se forman debido al empuje de los prismas sobre la materia orgánica durante su crecimiento. Sin embargo, esta no es una explicación válida, ya que una vez que los prismas hubieran alcanzado su máxima anchura deberían expulsar a la materia orgánica hacia el interior de la concha. Además, la distribución, espesor y continuidad de las envueltas orgánicas no se pueden explicar de este modo. Es por ello que esta tesis tiene como uno de sus objetivos (**Objetivo 1**) el desarrollar un modelo de formación de la microestructura prismática que combine las propiedades de la fase orgánica y de la fase mineral.

La microestructura foliada constituye la mayor parte de los depósitos calcíticos producidos por los bivalvos. Mientras que la microestructura prismática se encuentra exclusivamente en la superficie externa de la concha, la microestructura foliada puede

aparecer en cualquier capa y es la responsable de la formación de conchas ampliamente calcíticas. A pesar de la gran importancia que la aparición de la microestructura foliada ha tenido en la evolución mineralógica y microestructural de los bivalvos, en particular de *Pteriomorpha*, no se ha investigado mucho sobre el origen de esta microestructura. De hecho, sólo se han propuesto dos hipótesis sobre el origen de la microestructura foliada. La primera es de Taylor (1973) y sugiere que esta microestructura es una derivación de la microestructura nacarada mediante la transformación directa de aragonito por calcita. Sin embargo, el mayor conocimiento que se tiene hoy en día de la estructura íntima de las microestructuras, sobre todo del nácar, hace bastante improbable esta hipótesis, ya que aparte de la disposición laminar de ambos materiales, nácar y microestructura foliada no tienen ninguna otra similitud mineralógica, estructural o cristalográfica. La segunda hipótesis sobre el origen de la microestructura foliada es la de Waller (1976). Su hipótesis implica que dicha microestructura deriva de la capa prismática calcítica. Waller basa su hipótesis en el hecho que ambas capas comparten la misma mineralogía y en que la capa foliada siempre se desarrolla debajo de los prismas. Existe una tercera posibilidad con respecto al origen de la microestructura foliada y es que sea una microestructura de neoformación sin ninguna relación con otra microestructura preexistente. El objetivo que nos hemos marcado con respecto a este asunto es el de examinar la relación entre las dos principales microestructuras calcíticas (prismática y foliada) en base a su estructura interna (**Objetivo 2**).

La microestructura foliada está compuesta por cristales laminares alargados con el extremo distal terminado en punta. Estos cristales se disponen paralelos unos a otros y forman láminas denominadas *folia*. Las *folia* se extienden sobre áreas más o menos extensas con una misma orientación de sus hojas, lo que hace de la microestructura foliada un material bastante bien ordenado. Para una descripción más detallada de la morfología y modo de crecimiento de las hojas puede consultarse a Taylor *et al.* (1969) y a Carter (1980).

La microestructura foliada es frecuente en bivalvos, donde forma extensas capas en varios grupos epibentónicos (Limoida, Pectinoida y Ostreoida) (Carter, 1990), aunque también aparece en algunas lapas (Taylor y Hall 1990) y en briozoos (Taylor y Weedon, 2000).

La microestructura foliada ha sido poco estudiada y sólo unos pocos autores han aportado datos sobre su orientación cristalográfica como Tsujii *et al.* (1958), Watabe *et al.* (1958), Taylor *et al.* (1969), Runnegar (1984) y Sikes *et al.* (2000). Sin embargo, las orientaciones descritas por estos autores son claramente diferentes y entran en conflicto

unas con otras. Por ejemplo Runnegar (1984) propone para bivalvos tres orientaciones cristalográficas posibles con la particularidad de que algunas familias, por ejemplo Ostreidae y Pectinidae, e incluso algunas especies presentan más de un tipo de microestructura foliada. Esta disparidad de resultados puede deberse bien a una variabilidad real de la organización cristalográfica de dicha microestructura, o a una inadecuada determinación de las orientaciones cristalográficas debido a las limitaciones de las técnicas empleadas. La primera posibilidad, aunque no es descartable en absoluto, parece poco probable ya que es bien conocido que los bivalvos son capaces de ejercer un alto control sobre la biomineralización y generar estructuras altamente reproducibles dentro de un mismo grupo (Addadi y Weiner, 1992). En lo referente a las técnicas usadas previamente por los diferentes autores hay que comentar que la orientación cristalográfica no se puede determinar sólo en base a la morfología o hábito de los cristales. Por ello los resultados obtenidos sólo en base a microscopía óptica u otros tipos de microscopía (SEM, TEM o AFM) pueden estar sujetos a error. Para determinar inequívocamente las orientaciones cristalográficas hay que complementar las observaciones anteriores (morfología, ángulos interfaciales) con datos relativos a la estructura interna de los cristales obtenidos a partir de análisis de difracción, ya sea de Rayos X o de electrones. En este sentido, los barridos convencionales θ - 2θ (ver sección sobre difracción de Rayos X en Metodología) determinados por difracción de Rayos X dan sólo una información limitada sobre la orientación preferencial de los cristales (Runnegar 1984, Rodríguez-Navarro *et al.* 2002). Para determinar la orientación cristalográfica tridimensional de los cristales es necesario el uso de otras técnicas que proporcionen una información mucho más detallada y precisa de la distribución de las direcciones cristalográficas necesarias para definir la orientación de los cristales. Estas técnicas son (1) el análisis de texturas por difracción de Rayos X, y (2) el EBSD (difracción de electrones retrodispersados). Estas técnicas son complementarias y dan una información de alta resolución sobre la organización de los cristales a diferentes escalas, desde milímetros (1), hasta micras (2).

Debido a la enorme importancia que tiene el conocimiento de la microestructura foliada en futuros estudios sobre morfogénesis o a sus implicaciones evolutivas-sistemáticas o biomiméticas, nos planteamos como unos de los objetivos principales de estas tesis determinar sus principales direcciones axiales así como establecer si la microestructura foliada corresponde a una o varias ordenaciones cristalográficas (**Objetivo 3**).

Unos de los hallazgos más importantes de esta tesis es que los prismas de determinados grupos de bivalvos, particularmente los pertenecientes a las superfamilias Ostreoidea, Anomioidea y Pectinoidea (Pteriomorphia), están constituidos por microestructura foliada. Esto además de tener implicaciones de gran trascendencia en lo relativo al origen de la microestructura foliada (ver apartado de resultados y discusión) ha supuesto un motivo adicional de estudio ya que la capas prismáticas constituidas por estos prismas tienen un comportamiento cristalográfico netamente distinto al resto de capas prismáticas.

Los prismas calcíticos de Pteriomorphia han sido considerados tradicionalmente como monocristalinos (Bøggild 1930, Taylor et al. 1969, Cuif et al. 1983), aunque recientemente se ha documentado que en cierta especie son policristalinos (Dauphin et al. 2003, Dauphin 2003). Es bien conocido que una característica común a todas las capas prismáticas calcíticas es que el eje cristalográfico c de los prismas se dispone paralelo a su dirección de elongación, y por tanto perpendicular a la superficie de la concha (Bøggild 1930). Cada prisma nuclea con los ejes a_1 , a_2 y a_3 rotados de forma aleatoria sobre el eje c . Esta disposición de los prismas hace que la capa prismática tenga una textura fibrosa en la que el eje c es el eje de fibra y los ejes a_1 , a_2 y a_3 se encuentran completamente rotados aleatoriamente alrededor del eje c . En los prismas calcíticos de Pterioidea, por ejemplo en Pinnidae, Pteriidae o Malleidae, la textura fibrosa se encuentra tanto en la superficie externa de la capa como en la interna. Esto indica que la organización cristalográfica de la capa no cambia sustancialmente durante el crecimiento de los prismas, cosa que por otro lado es esperable ya que los prismas son monocristales. En cambio, las capas prismáticas formadas por prismas foliados tienen, en algunos casos, textura laminar en la superficie interna (superficie de crecimiento), lo que indica que ha habido una reordenación de los ejes cristalográficos a_1 , a_2 y a_3 que se han alineado progresivamente durante el crecimiento de los prismas. Esta es la primera vez que se describe en la microestructura prismática calcítica un proceso de ordenación de los ejes cristalográficos en el plano definido por los ejes a_1 , a_2 y a_3 . No obstante, aún queda por establecer un modelo de crecimiento de la capa prismática que integre la ultraestructura de los prismas con las observaciones relativas a su organización cristalográfica (**Objetivo 4**).

Bajo la denominación de prismas fibrosos se engloba una serie heterogénea de microestructuras caracterizadas por la presencia de haces paralelos de fibras de calcita. Esta microestructura aparece en la superficie externa de la concha de algunos mitílidos, donde puede llegar a formar extensas capas. También aparece en la capa calcítica externa de

límidos, plicatúlidos y pectínidos en conjunción con la microestructura foliada y en las costillas internas de propeamúsidos.

No se conoce mucho sobre la estructura cristalográfica de esta microestructura, y los escasos y contradictorios datos que se tienen provienen siempre de la microestructura fibrosa presente en mitílidos. Según Feng *et al.* (2000) las fibras de calcita están alargadas en paralelo a la dirección del eje *c*-. Además, grupos de unas cinco unidades de estas fibras tienen idéntica orientación cristalográfica mientras que grupos circundantes presentan ligeras desviaciones. Las fibras se disponen inclinadas unos 45° de manera que un juego de caras {104} es paralela a la superficie de la concha. Chateigner *et al.* (2002) coinciden con los anteriores autores en que los prismas fibrosos de mitílidos tienen orientaciones cristalográficas coherentes pero afirman que las fibras están alargadas según una dirección que no corresponde a ninguno de los ejes *a* ni a *c*.

En vista de la ausencia de consenso entre los autores que previamente han estudiado esta microestructura nos planteamos abordar su estudio para determinar su estructura cristalográfica. Esto es con especial referencia a los prismas fibrosos del resto de grupos de los que no se tiene ninguna información (**Objetivo 5**)

Otro interesante hallazgo ocurrido durante la realización de esta tesis doctoral es el descubrimiento de una serie de estrías con disposición dorsoventral en la zona dorsal del interior de la concha de ciertos pectínidos, entre otros *Pecten maximus* y *Mimachlamys varia*. Sorprendentemente estas estructuras han pasado inadvertidas hasta la fecha para autores previos por lo que las hemos denominado microcrestas. Dado que no se tiene ninguna información sobre estas estructuras el objetivo que nos hemos planteado es hacer un estudio completo sobre la morfología, distribución y estructura interna de las microcrestas así como de la porción del manto implicada en su secreción para obtener conclusiones desde el punto de vista morfogénico (**Objetivo 6**).

Material y Métodos

Material

Las especies examinadas durante la realización de esta tesis aparecen enumeradas en la Tabla 3.

Taxón	Localidad
ORDEN PTERIOIDA	
Superfamilia Pterioidea, Familia Pteriidae	
<i>Pinctada margaritifera</i> (Linnaeus, 1758)	Isla Margarita, Venezuela
<i>Pinctada martensii</i> (Dunker, 1872)	Uwajima city, Ehime prefecture (Japan)
<i>Pteria hirundo</i> (Linnaeus, 1758)	Fuengirola (Málaga)
<i>Pteria avicula</i> (Holten, 1802)	Isla Calitoban, Filipinas
Superfamilia Pterioidea, Familia Malleidae	
<i>Malleus malleus</i> (Linnaeus, 1758)	Localidad desconocida
<i>Malleus albus</i> (Lamarck, 1819)	Filipinas, localidad desconocida
<i>Malleus regulus</i> (Forskål, 1775)	Turquía, localidad desconocida
Superfamilia Pterioidea, Familia Isognomonidae	
<i>Isognomon legumen</i> (Gmelin, 1791)	Hong-Kong
Superfamilia Pinnoidea, Familia Pinnidae	
<i>Pinna nobilis</i> (Linnaeus, 1758)	Agua Amarga (Almería)
<i>Pinna rudis</i> (Linnaeus, 1758)	Costa de Granada
<i>Atrina pectinata</i> (Linnaeus, 1758)	Fuengirola (Málaga)
<i>Atrina serrata</i> (Sowerby, 1825)	Sarasota, Florida
ORDEN OSTREOIDA	
Superfamilia Ostreoidea, Familia Ostreidae	
<i>Ostrea edulis</i> Linnaeus, 1758	Fuengirola (Málaga)
<i>Crassostrea gigas</i> (Thunberg, 1793)	Lochgilphead, E Scotland
<i>Ostrea pulchana</i> D'Orbigny, 1841	Atlántico Sur, localidad desconocida
<i>Saccostrea echinata</i> (Quoy and Gaymard, 1834)	Uwajima, Japón
Superfamilia Pectinoidea, Familia Pectinidae	
<i>Pecten maximus</i> (Linnaeus, 1758)	Fuengirola (Málaga)
<i>Chlamys varia</i> (Linnaeus, 1758)	Fuengirola (Málaga)
<i>Flexopecten flexuosa</i> (Poli, 1795)	Fuengirola (Málaga)
<i>Aequipecten opercularis</i> (Linnaeus, 1758)	Fuengirola (Málaga)
<i>Adamussium colbecki</i> (Smith, 1902)	Isla Signy, Península Antártica
Superfamilia Pectinoidea, Familia Propeamussiidae	
<i>Propeamussium dalli</i> (Smith, 1886)	Islas Maldivas
<i>Propeamussium jeffreysii</i> (Smith, 1886)	Banco Josephine, Atlántico Noreste
<i>Propeamussium sibogai</i> (Dautzenberg & Bavay, 1904)	Filipinas, localidad desconocida
Superfamilia Anomioidea, Familia Anomiidae	
<i>Anomia ephippium</i> (Linnaeus, 1758)	Fuengirola (Málaga)
<i>Anomia chinensis</i> Philippi, 1849	Cape d'Aguilar, Hong Kong
Superfamilia Anomioidea, Familia Placunidae	
<i>Placuna placenta</i> (Linnaeus, 1758)	Mai Po, Hong-Kong (New Territories)

Tabla 3. Listado de los taxones estudiados en esta Tesis.

Metodología empleada

Preparación del material

a) Selección y tratamientos preliminares de las muestras

Para el tipo de estudios realizados en esta tesis es conveniente utilizar siempre material “fresco” que no haya sufrido abrasión ni disolución. Esto es especialmente crítico en el caso de tratarse de muestras destinadas a la observación de microestructuras, sobre todo si se tiene la intención de utilizar microscopía electrónica de alta resolución. La microestructura foliada, sobre todo en pectínidos y ostreidos, es especialmente sensible a esta degradación y hay que ser muy cuidadoso con este aspecto. El proceso de selección de muestras comienza siempre con una inspección bajo la lupa binocular. Se seleccionan las zonas de interés en función de los objetivos previamente definidos. Un criterio general para elegir una determinada área de la concha es evitar aquellas zonas que manifiesten un aspecto deteriorado, con roturas, arañazos o incrustaciones. Por el contrario, un aspecto iridiscente suele ser indicio de una buena conservación. Hay que evitar el uso de ejemplares mantenidos en acuarios ya que suelen sufrir ligeras disoluciones de la concha. Una vez que se ha identificado una zona de interés hay que proceder a cortarla. Como norma general hemos utilizado una herramienta multifunción rotatoria DREMEL® Multi™ dotada de discos de corte de 32 y 24 mm de diámetro. El corte es el procedimiento adecuado cuando se pretende observar la superficie de la concha. La preparación de muestras en fractura se puede hacer directamente a mano, o en el caso de especímenes que se exfolian con facilidad, como la capa foliada, es conveniente hacer primero un corte somero y luego fracturar. Cuando se trata de muestras para SEM el tamaño máximo es de 1 cm², mientras que para otros fines (difracción de rayos X, EBSD...) el tamaño suele ser menor. En todos los casos es imprescindible lavar cada muestra con agua corriente primero y someterla luego a un lavado en ultrasonidos con agua destilada durante al menos dos minutos.

b) Tratamientos específicos

El material objeto de estudio en esta tesis es un “*biocomposite*”, constituido por una parte mineral y una orgánica. En función de los objetivos que nos hayamos marcado con cada muestra es necesario eliminar o realzar alguno de los constituyentes. Para ello se somete a las muestras a unos tratamientos específicos que actúan selectivamente sobre el mineral o sobre la matriz orgánica.

Tratamientos sobre la matriz orgánica

La matriz orgánica engloba a los cristales de carbonato cálcico y puede dificultar su observación o la realización de análisis de distinto tipo. Para evitar esta inferencia normalmente se procede a su eliminación. Por ejemplo para realizar un análisis de texturas por difracción de rayos X conviene eliminar la mayor cantidad de materia orgánica ya que ésta generalmente dificulta la realización del análisis. En la realización de esta tesis se han empleado tres métodos: proteinasa K *buffer* (PKb 1 mg/ml), lejía de uso doméstico (NaClO 5%) y sosa cáustica (NaOH 5%).

a) Protocolo proteinasa K *buffer* (PKb)

La metodología empleada es la descrita por Shiao *et al.* (1999) para aumentar el contraste de las líneas de crecimiento en otolitos de peces. La proteinasa K es una proteinasa poco específica por lo que es muy útil para degradar proteínas cuando no se conoce o no se está especialmente interesado en la secuencia y estructura de éstas. Debido a que un alto porcentaje de la composición de la matriz orgánica es proteínico, una forma de eliminarla es atacar a las proteínas. El protocolo para la preparación del PKb es el siguiente (Tabla 4).

	[] de la solución fuente	Cantidad usada	[] final
Proteinasa K		10 mg	1 mg/ml
Tri-HCl	1 M	0.1 ml	0.01 M
SDS	20%	0.5 ml	1%
NaCl	5 M	0.02 ml	0.01 M

Tabla 4. Protocolo de preparación del PK b. Volumen final de la disolución 10 ml.

Los trozos de concha se colocan en un vaso de precipitados con la superficie de interés hacia abajo. Se añade PKb y se mantiene a 40° C durante un tiempo que puede oscilar entre uno y treinta minutos. El tiempo necesario depende en gran medida del tipo de microestructura y contenido en materia orgánica por lo que debe ser establecido de forma experimental. Es aconsejable agitar el vaso de precipitados frecuentemente para asegurar un ataque homogéneo por toda la superficie. Tras el tratamiento es necesario lavar la muestra con etanol al 75% para disolver los cristales de dodecil sulfato de sodio (SDS).

b) Lejía de uso doméstico (NaClO 5%)

La lejía de uso doméstico se ha revelado como el método más eficaz para eliminar la materia orgánica de las muestras. Además de la simplicidad de la preparación (se puede usar directamente sin diluir) es sumamente selectiva en su acción. El tiempo de tratamiento utilizado en la preparación de las muestras ha oscilado entre uno y treinta minutos.

c) Hidróxido sódico (NaOH 5%)

El hidróxido sódico es también un método eficaz para eliminar la materia orgánica. Sus resultados son comparables a los de la proteinasa K. El tiempo de actuación suele estar entre uno y diez minutos.

Tratamientos sobre la materia mineral

Estos tratamientos se hacen con el objeto de poner de manifiesto los planos cristalográficos, líneas de crecimiento y fracturas de la fase mineral de las muestras. En general tienden a ser tratamientos suaves y/o rápidos ya que de lo contrario se pierde todo indicio de la microestructura. Los reactivos utilizados han sido: EDTA (ácido etilen diamino tetraacético) y HCl (ácido clorhídrico).

a) EDTA (ácido etilen diamino tetraacético)

El EDTA es un ácido débil que forma quelatos con los cationes de calcio. A las concentraciones usadas (1-2%) produce una disolución lenta del carbonato muy apropiada en la preparación de las muestras. Los tiempos de tratamiento oscilan entre un par de minutos y varias horas.

b) HCl

El ácido clorhídrico es un ácido fuerte por lo que se usa diluido al 0.1-1%. El tiempo de reacción suele ser muy breve, sólo unos segundos.

Tratamiento final

El paso final en el proceso de preparación de cualquier muestra es el lavado. Se puede hacer con agua corriente pero es recomendable utilizar agua destilada. El lavado ha de ser meticuloso e inmediatamente después de finalizar el tratamiento para que no actúe más tiempo del deseado. Para terminar hay que someter a cada muestra a un baño de ultrasonidos en agua destilada durante al menos dos minutos. Con esto se asegura que la

muestra esté libre de sales cristalizadas, partículas de polvo, suciedad, así como de pequeños fragmentos desprendidos de la propia muestra.

Técnicas utilizadas

a) Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Introducción

El microscopio electrónico de barrido, SEM, (*Scanning Electron Microscope*) es un instrumento que barre o escanea la superficie de objetos con un fino haz de electrones y reconstruye una imagen de esa superficie muy ampliada a partir de los electrones secundarios emitidos por la superficie del objeto. Las muestras se introducen en la cámara del microscopio donde se someten a un alto vacío para que las moléculas del aire no interfieran con el haz de electrones. Para asegurar la conductividad de las muestras éstas se cubren con una fina capa conductora que generalmente es de oro o carbono. El rango de aumentos que proporciona un SEM convencional suele estar entre 100000 y 300000 aumentos, aunque existen microscopios con una arquitectura especial que pueden llegar casi a doblarlos.

Anatomía del SEM

a) Cañón electrónico:

Está situado en el extremo superior de la columna y se encarga de producir un haz de electrones de un diámetro entre 20 y 50 μm . Normalmente está constituido por un filamento metálico, normalmente de tungsteno, en forma de V, un cilindro metálico (cilindro de Wehnelt), donde está encerrado el filamento y que tiene un diafragma situado inmediatamente por debajo de él (ambos forman el cátodo), y una placa circular con un orificio central (ánodo). El filamento sometido a una corriente eléctrica emite una nube de electrones que tiende a estar más concentrada en el vértice (efecto termoiónico). La misión del cilindro de Wehnelt es la de concentrar la nube de electrones en el orificio de su diafragma por lo que actúa a modo de lente.

El cátodo está conectado al polo negativo de una fuente de alto voltaje mientras que el ánodo lo está al polo positivo. De esta manera se crea un potencial eléctrico entre ambos. Este potencial se denomina voltaje de aceleración y gracias a él los electrones

generados en el filamento, que están cargados negativamente, son acelerados hacia el orificio central del ánodo y recorren la columna hasta chocar con la muestra.

b) Lentes magnéticas y diafragmas

Puesto que los electrones son partículas cargadas eléctricamente su trayectoria puede modificarse por un campo magnético. Las lentes magnéticas están diseñadas para este propósito y consisten básicamente en un hilo metálico enrollado alrededor de una pieza de hierro fundido.

Un SEM tiene al menos dos lentes magnéticas dispuestas en serie. La más próxima al cañón se denomina lente condensadora (frecuentemente doble), la más alejada lente objetivo. Las lentes magnéticas son bastante imperfectas desde el punto de vista óptico. Hay tres tipos fundamentales de aberraciones (esférica, cromática y astigmatismo) que reducen su capacidad de formar un haz explorador con un pequeño diámetro y de intensidad uniforme. En el trayecto del haz electrónico hay interpuestos al menos dos diafragmas metálicos, uno por debajo de la lente condensadora (diafragma condensador) y otro por debajo de la lente objetivo (diafragma final) (Figura 3). Los diafragmas sólo permiten el paso de los electrones por su orificio central, disminuyendo el tamaño del haz y haciéndolo más homogéneo ya que eliminan los electrones dispersados, reduciendo además las aberraciones.

El conjunto de lentes y diafragmas reducen el diámetro del haz entre 20 y 100 veces consiguiéndose de esta forma un fino haz con el que explorar la muestra. El tamaño de este haz (*spot size*) es el que determina la resolución de las imágenes. La lente objetivo además enfoca el haz sobre la muestra.

c) Sistema generador del barrido

Con el fin de que el haz realice un barrido sistemático de la superficie de la muestra hay dos pares de espirales electromagnéticas (bobinas deflectoras o *scan coils*) situadas entre las lentes o dentro de la lente objetivo (Figura 3). Cada par produce el movimiento del haz en una determinada dirección del eje de coordenadas, barriendo sistemáticamente la superficie de la muestra siguiendo un patrón en parrilla. El movimiento del haz de electrones está sincronizado con la pantalla por lo que hay una correspondencia punto a punto entre la posición del haz sobre la muestra y el píxel sobre la pantalla, de manera que se genera una imagen de la muestra en la pantalla.

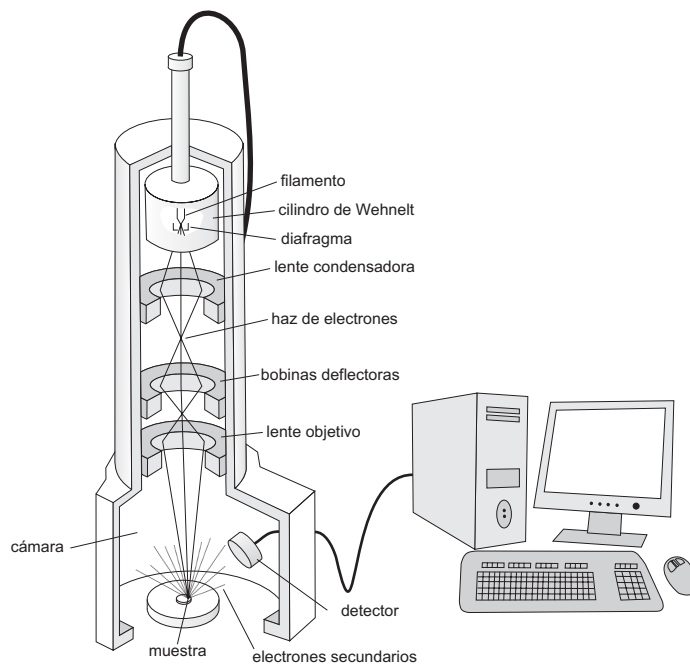


Figura 3. Anatomía básica del microscopio electrónico de barrido.

Preparación de las muestras para el SEM

Las muestras se montan sobre portamuestras de aluminio de 12.5 mm de diámetro. Para ello se utiliza carbono coloidal o pegamento de plata. Es importante asegurar la conductividad de las muestras mediante puentes de carbono o plata en aquellas zonas en las que no exista contacto con el portamuestras. Para la metalización con oro se utiliza un metalizador Polaron E 5000 y para la metalización con carbono, un evaporador Hitachi UHS, ambos ubicados en el centro de Instrumentación Científica (CIC) de la Universidad de Granada.

Equipos utilizados

Se han utilizado varios microscopios electrónicos de barrido con características diferentes en función del tipo e interés de la muestra. El trabajo rutinario se ha realizado en microscopios convencionales: Zeiss DSM 950, Jeol JSM-820 y LEO 1430-VP. Este último es un microscopio de “presión variable”, aunque se ha utilizado normalmente en el modo alto vacío, que es similar a trabajar con un microscopio convencional. Las muestras que han requerido un mayor poder de resolución han sido observadas con microscopios más potentes: FESEM (*Field Emission SEM*) LEO GEMINI-1530 y UHRSEM (*Ultra High resolution SEM*) Hitachi S5200. Para observar muestras sin metalizar o en estado húmedo se ha utilizado un ESEM (*Environmental SEM*) FEI Quanta 400. Las características técnicas y la ubicación de los microscopios utilizados se muestran en la Tabla 5.

	<i>Ubicación</i>	<i>Tensión de aceleración</i>	<i>Rango de aumentos</i>	<i>Resolución</i>
<i>DSM 950</i>	CIC-UGR	30 kv	15-100000 x	5 nm
<i>FEI Q-400</i>	CEAMA	30 kv	40-300000x	4nm
<i>JSM-820</i>	ES-CU	39 kv	20-300000 x	4.5 nm
<i>VPSEM</i>	CIC-UGR	0.2-30 kv	15-300000 x	3.5 nm
<i>UHRSEM</i>	CITIUS	0.1-30 KV	15-350000 x	5 Å
<i>FESEM</i>	CIC-UGR	0.1-30 kv	20-500000 x	1 nm

Tabla 5. Microscopios electrónicos de barrido utilizados. CIC-UGR: Centro de instrumentación Científica, Universidad de Granada. CEAMA: Centro Andaluz de Medio Ambiente. ES-CU: Departamento de Ciencias de la Tierra, Universidad de Cambridge (UK). CITIUS: Centro de Investigación, Tecnología e Innovación de la Universidad de Sevilla.

b) Difracción de rayos X

Introducción histórica

Los rayos X fueron descubiertos por Wilhelm Conrad Röntgen en 1895. Su descubrimiento y las posteriores aplicaciones en medicina le sirvieron para ser galardonado con el Premio Nobel de Física en 1901. Desde su descubrimiento la aplicación de esta radiación ha tenido dos vertientes principales. Por un lado han sido ampliamente usados en medicina en el diagnóstico de patologías gracias al poder de penetración a través de materiales blandos (radiografías). Por otro lado, el hecho de que esta radiación sea difractada por los átomos o moléculas de materiales cristalinos ha permitido el desarrollo de la cristalografía moderna. Centrándonos en este último punto, la historia de la difracción de rayos X ha tenido dos hitos remarcables. El primero ocurrió en 1912 cuando Max von Laue descubrió la difracción de los rayos X por la materia cristalina. Este hecho puso de manifiesto simultáneamente la naturaleza ondulatoria de los rayos X (radiación electromagnética), y el carácter ordenado de la materia cristalina. Gracias a este descubrimiento Laue recibió el Premio Nobel de Física en 1914. El segundo hito en la historia de la difracción de rayos X ocurrió en 1913 cuando el equipo formado por William Henry Bragg y su hijo William Lawrence Bragg explicaron de una forma sencilla la relación existente entre los patrones de difracción y la estructura del material que los produce. La formulación de la ley que lleva su nombre (ley de Bragg) les hizo merecedores del Premio Nobel de Física en 1915. Actualmente la difracción de rayos X (XRD según sus siglas en inglés), es una técnica usada de forma rutinaria para la caracterización de materiales cristalinos tanto inorgánicos como orgánicos y para la determinación de su estructura atómica o molecular.

Fundamento de la técnica. Ley de Bragg.

Cuando un haz monocromático (λ fija) de rayos X incide sobre una muestra, además de absorción y otros fenómenos, se produce una dispersión de rayos X que mantienen la misma longitud de onda que el haz incidente. Esa dispersión se conoce como dispersión de rayos X coherente y no está distribuida uniformemente en el espacio sino que es una función de la distribución electrónica de la muestra. Si esa muestra tiene sus átomos y moléculas ordenados periódicamente la intensidad y la distribución espacial de los rayos X dispersados forma un patrón de difracción específico y que está relacionado con la estructura interna del material.

La ley de Bragg nos explica de una forma sencilla la relación existente entre el patrón de difracción y la estructura del material. Cuando un haz de rayos X incide sobre un plano cristalográfico a un ángulo θ específico se produce un haz reflejado con el mismo ángulo θ simétrico al haz incidente (Figura 4). La difracción se produce para ángulos θ que cumplen la condición de Bragg:

$$\lambda = 2d \sin \theta$$

donde λ es la longitud de onda del haz de rayos X incidente, d es el espaciado de los planos cristalográficos y θ es el ángulo de Bragg al que se produce la difracción.

Además se ha de cumplir otra condición relacionada con la posición relativa de los planos cristalográficos y los haces incidentes y reflejados: la normal a los planos (hkl) ha de ser paralela a la bisectriz entre el haz incidente y reflejado.

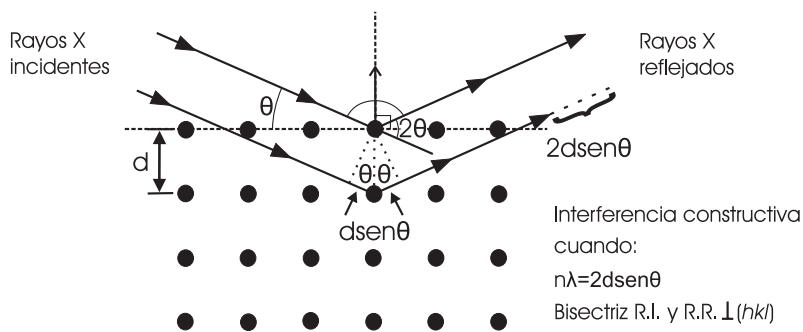


Figura 4. Ley de Bragg. Representación de la condición necesaria para la difracción.

En muestras monocristalinas cada juego de planos cristalográficos produce haces difractados que apuntan en direcciones discretas. En muestras policristalinas los haces difractados forman una serie de conos ya que muchos cristales orientados aleatoriamente son irradiados por el haz incidente simultáneamente y difunden los rayos X según conos de

apertura igual a 4θ . Cada cono corresponde a la difracción de una familia de planos con espaciado d_{hkl} diferente de los cristales que cumplen la condición de Bragg (Figura 5).

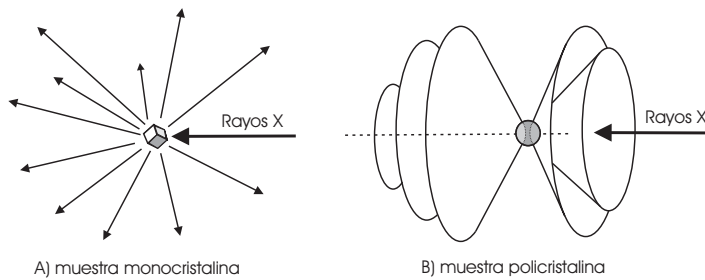


Figura 5. Difracción en materiales monocristalinos y policristalinos

Metodología experimental en difracción de rayos X

En los casi cien años de historia de la difracción de rayos X las técnicas instrumentales para medir los ángulos e intensidades de los haces difractados han evolucionado considerablemente. Hasta los años setenta del siglo pasado los métodos fotográficos eran los más extendidos. Entre ellos los métodos de Laue, Weissenberg, precesión y oscilación. A finales de la década de los setenta el desarrollo de los computadores permitió el diseño de los difractómetros automáticos de cuatro círculos. En éstos existe una mecánica goniométrica muy precisa que mediante tres giros permite colocar la muestra en cualquier posición en el espacio, dándose así las condiciones necesarias para que se produzca la difracción. Sobre el cuarto círculo gira el detector para registrar los haces difractados. En los difractómetros de cuatro círculos existen dos geometrías goniométricas básicas. La euleriana, en la que la muestra se orienta mediante los tres ángulos de Euler (φ , χ y ω). φ corresponde a la rotación en la cabeza goniométrica, χ corresponde a la inclinación con respecto al anillo vertical y ω a la rotación completa del goniómetro. El movimiento del detector está regido por el ángulo 2θ (Figura 6). En la geometría *Kappa* no existe el anillo cerrado χ pero su función es sustituida por los ejes K y ω_k . Los movimientos según los ejes φ y 2θ son idénticos a los de la geometría euleriana (Figura 6).

En los difractómetros utilizados en los laboratorios de cristalografía el haz de rayos X se produce en un tubo de rayos X. Éste consta básicamente de un ánodo de metal puro, usualmente cobre, y un filamento incandescente de tungsteno entre los que se establece una diferencia de potencial. Desde el filamento cargado negativamente saltan electrones hacia el ánodo (cargado positivamente) lo que da lugar a una corriente que suele estar en torno a 30 miliamperios (mA). El bombardeo de electrones acelerados por la diferencia de potencial en el ánodo provoca una reorganización en los niveles de energía de los electrones de sus átomos que conlleva la emisión de rayos X. La radiación utilizada en cristalografía de rayos

X es la radiación característica K_α que en función del metal usado como ánodo tiene diferente longitud de onda. En la Tabla 5 se muestra la longitud de onda de las K_α de varios metales usados como ánodo. El uso de un metal u otro dependerá del tipo de material a estudiar y del experimento.

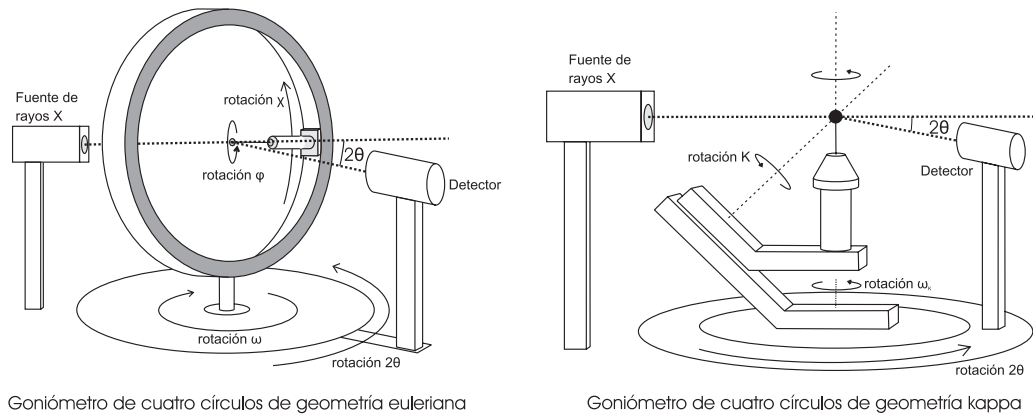


Figura 6. Esquema de la arquitectura básica de los goniómetros de cuatro círculos

Ánodo	K_α longitud de onda (Å)
Plata	0.560869
Molibdeno	0.710730
Cobre	1.541838
Cobalto	1.790260
Hierro	1.937355
Cromo	2.29100

Tabla 5. Metales usados como ánodo junto a la longitud de onda de su radiación característica K_α .

Recolección de reflexiones

Tanto en la geometría euleriana como en la kappa, el sistema de detección más utilizado es el denominado puntual. Con este tipo de detector cada reflexión se mide de forma individual, de manera que para recoger todas las reflexiones es necesario variar de forma ordenada los cuatro ángulos (φ , χ , ω y 2θ) del goniómetro. En la Figura 7 se muestra el procedimiento de recogida de reflexiones en un difractómetro con detector puntual para una muestra monocristalina. El detector describe un giro circular a lo largo de 2θ para cada (φ , χ , ω). Esto conlleva tiempos de recolección muy largos: horas e incluso días.

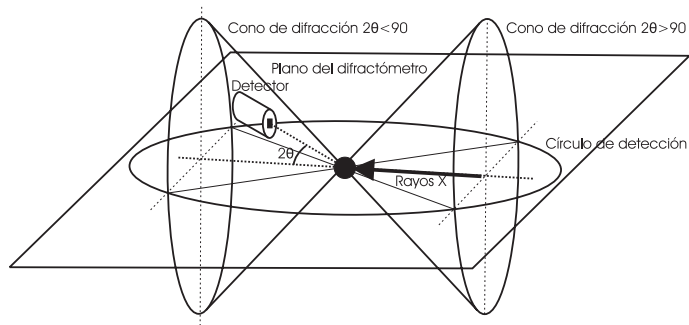


Figura 7. Esquema del movimiento de un detector puntual a lo largo del círculo de detección. El detector sólo puede capturar una reflexión en cada posición.

Como alternativa a los detectores puntuales se han desarrollado detectores bidimensionales o de área. Estos detectores se montan normalmente sobre goniómetros de tipo *Kappa*, ya que en esta arquitectura la muestra es más accesible. Los detectores de área tienen la ventaja de recoger simultáneamente varias reflexiones, reduciéndose enormemente el tiempo del análisis (Figura 8).

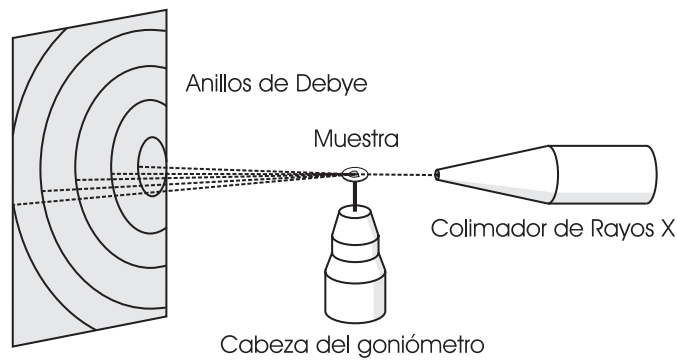


Figura 8. Esquema de un detector bidimensional o de área. El detector capta varias reflexiones simultáneamente.

El patrón de difracción refleja la simetría interna de los cristales que son iluminados. La Figura 9a muestra las reflexiones 006 y 104 de una muestra de la capa prismática de *Ostrea edulis*. Ambas reflexiones se encuentran aproximadamente a 45° , que es el ángulo existente entre los planos (001) y (104). En la Figura 9b se relaciona la posición de los planos (001) y (104) con sus reflexiones.

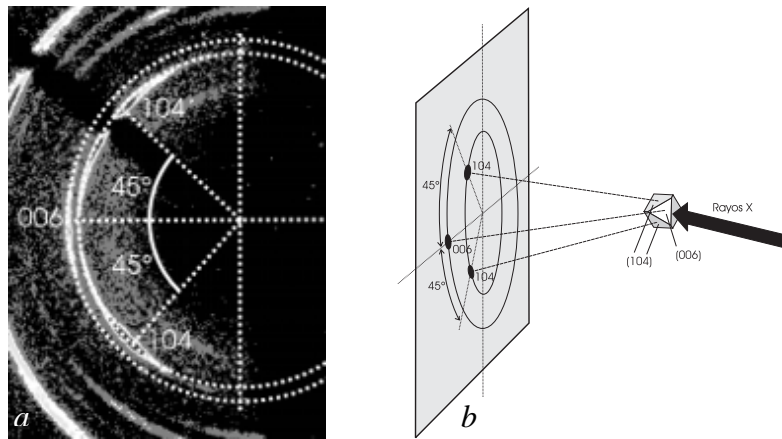


Figura 9. a) Situación de las reflexiones 006 y 104 de la capa prismática de *Ostrea edulis* recogidos por un detector de área. b) Relación entre la posición de las anteriores reflexiones y los planos cristalográficos (006) y (104)

Otros factores tales como el diámetro del haz, el tamaño de los cristales o el grado de texturización del material se ven también reflejados en los patrones de difracción. El diámetro del haz de rayos X, fijado por el diámetro del colimador, determina el área de la muestra iluminada. Hay que tener cuidado con la relación existente entre el diámetro del haz y el tamaño de los cristales, ya que si el diámetro del haz es similar al tamaño de los cristales, pocos cristales contribuirán al patrón de difracción y no darán suficiente información estadística. Por otro lado el tamaño de los cristales está directamente relacionado con la intensidad del haz difractado. A menor tamaño del cristal aparecen más reflexiones pero de menor intensidad en el patrón de difracción. Esto se traduce en patrones formados por anillos continuos tal como se muestra en la Figura 10A. Por el contrario, cuando los cristales tienen un tamaño de la misma magnitud que el diámetro del haz los patrones están formados por anillos con máximos discretos de gran intensidad (Figura 10B). La existencia de textura en el material queda reflejada en el agrupamiento de las reflexiones en sectores a lo largo de los anillos (Figura 10).

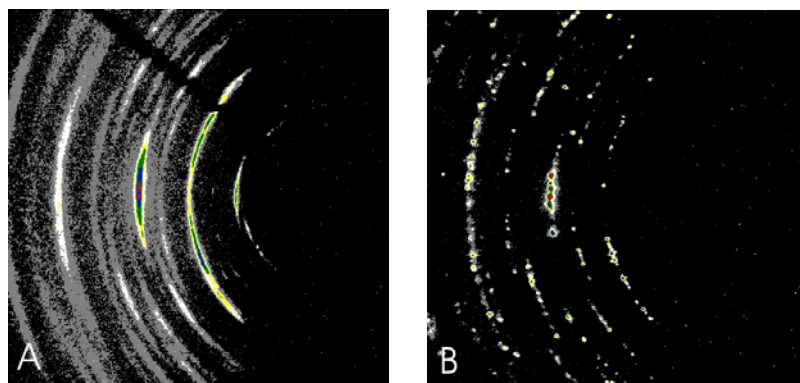


Figura 10. Patrones de difracción de la capa prismática de *Pteria birundo* (A) borde ventral de la concha donde los prismas calcíticos son pequeños, y (B) cerca del contacto con la capa nacarada donde los prismas tienen mayor tamaño. En A contribuyen a la difracción un gran número de cristales por lo que los anillos son continuos. En B, sólo unos pocos cristales contribuyen por lo que los anillos están formados por reflexiones discretas. A y B proceden del mismo individuo.

Diseño experimental. I. Análisis de texturas por difracción de rayos X en difractómetro con detector puntual.

Una pequeña parte de los análisis de texturas por difracción de rayos X se hizo con esta técnica. Los análisis se llevaron a cabo en la Universidad Rovira i Virgili (Tarragona). Se utilizó un difractómetro de cuatro círculos con cuna euleriana (anillo χ incompleto) Siemens D5000 con radiación Cu K_{α} . Los resultados obtenidos con esta técnica fueron similares a los obtenidos con las otras técnicas. Debido al alto coste y a la lentitud de los análisis pronto decidimos que las otras técnicas analíticas (DRX con detector de área y EBSD) eran más apropiadas.

Diseño experimental. II. Análisis de texturas por difracción de rayos X en difractómetro con detector de área.

El equipo utilizado durante la realización de esta tesis es un difractómetro *Bruker Smart Apex* con detector de área de tipo CCD (*Charge Couple Device*) ubicado en el Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada. Se trata de un difractómetro con goniómetro de cuatro círculos de geometría *Kappa* con ángulo K fijo (54.74°). En la tabla 6 se resume las condiciones experimentales de trabajo.

Radiación	Mo K_{α}
Voltaje de aceleración	50 KV
Corriente del filamento	30 mA
Diámetro del colimador	0.5 mm
Tiempo de exposición	20 s
Resolución del detector	512x512 píxeles
Distancia al detector	60 mm
ω_K	$5^{\circ}, 10^{\circ}$
2θ	$10^{\circ}, 20^{\circ}$
K	54.74°
Tamaño de las muestras	~ 4 mm \varnothing

Tabla 6. Condiciones experimentales de trabajo con el difractómetro *Bruker Smart Apex*.

Las muestras se colocaron sobre círculos de vidrio de 1 cm de diámetro adosados al portamuestras con la superficie a analizar perpendicular al eje de giro φ . Éstas fueron orientadas de forma que la dirección de crecimiento coincidiera con $\varphi = 0$. Todo el proceso de recolección se automatizó mediante una serie de comandos que indica al goniómetro la posición de los cuatro ángulos en cada momento. Los ángulos ω_K , 2θ y K permanecen

constantes mientras que φ avanza desde $\varphi = 0^\circ$ hasta $\varphi = 180^\circ$ en pasos de 1, 2 ó 3° . El resultado es una colección ordenada de patrones de difracción (*frames*), uno para cada valor de φ considerado, que usualmente contiene las posiciones de las reflexiones más intensas de la calcita (104, 006, 110, 113, 202 y 108). Una vez que tenemos los patrones de difracción éstos son procesados por un programa informático diseñado a tal efecto por A. Rodríguez-Navarro. El primer paso para procesar los datos consiste en localizar el centro y la posición de los anillos de Debye-Scherrer en los patrones de difracción mediante una aplicación informática denominada XRD2DScan (disponible en <http://www.ugr.es/~anava/index.htm>). Una vez definido el centro que mejor se adapta a los anillos de difracción el programa genera un difractograma similar a otro realizado con el método de polvo, integrando la intensidad de los píxeles equidistantes del centro y representándola frente al ángulo 2θ (calculado a partir de la distancia del anillo al centro). En la Figura 11 se muestra un ejemplo correspondiente al patrón de difracción de la capa foliada de *Placuna placenta* para $\varphi = 150^\circ$. La estrella indica el centro que el programa ha utilizado para integrar la intensidad de las reflexiones. El anillo punteado está situado sobre las reflexiones 104, anillo que está localizado aproximadamente a un valor de $2\theta = 13^\circ$. El programa también calcula la distribución de intensidades en función del ángulo γ a lo largo de cada anillo de Debye seleccionado. La gráfica inferior de la Figura 11 muestra la distribución de intensidades a lo largo del anillo 104 donde se aprecia la existencia de dos picos.

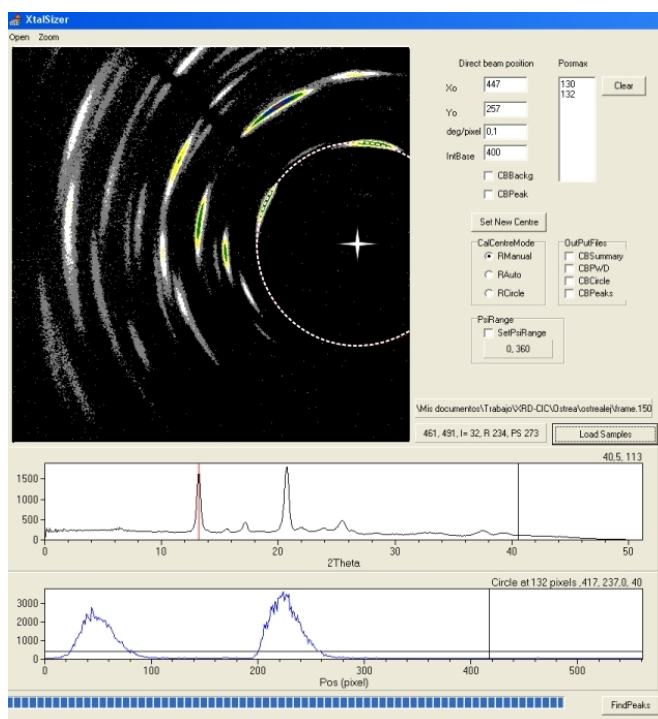


Figura 11. Interfaz del programa XtalSizer que muestra el patrón de difracción de la capa foliada de *Placuna placenta* tomado a $\varphi = 150^\circ$. La estrella marca el punto definido como centro y el anillo discontinuo señala la posición de las reflexiones 104. El gráfico central representa la distribución de intensidades reflejadas integrada a partir de anillos concéntricos desde el centro frente al radio del anillo, previa conversión en valores 2θ . El gráfico inferior representa la distribución de intensidades reflejadas a lo largo del anillo de Debye 104.

Cada anillo hkl de un $frame_{\varphi}$ contiene información de la orientación de los polos hkl (direcciones normales a los planos cristalográficos (hkl)) contenidos en un plano perpendicular a la superficie de la muestra y que está girado un ángulo φ del origen. Para abarcar la totalidad de la semiesfera de proyección es necesario integrar la información de $frames$ con ángulo φ 0° hasta 180° (ver Figura 12). Este proceso lo realiza otra aplicación informática denominada Pframe3. Una vez definido el centro y el radio de cada anillo (o ángulo 2θ) el programa “lee” los anillos a lo largo de γ en todos los $frames$ y genera un archivo de extensión *.pol que contiene la información relativa a la variación de la intensidad de una reflexión hkl para diferentes orientaciones de la muestra. Esta información es visualizada en forma de figuras de polos mediante el programa Xtexture. Xtexture permite cargar hasta seis archivos *.pol simultáneamente que pueden corresponder, por ejemplo, a seis anillos de Debye registrados a seis valores 2θ diferentes (Figura 13). Xtexture representa la distribución de reflexiones hkl de dos maneras distintas. En la fila superior (gráficos rectangulares) de la Figura 13 aparecen los seis archivos cargados (103.pol, 131.pol,... 206.pol) que corresponden a los valores 2θ 10.3° , 13.1° ,... 20.6° . Aquí se representa en ejes cartesianos φ frente a γ (ver detalle explicado en figura 14). La otra manera es mediante una proyección estereográfica (gráfico circular) (Figura 15). Para cualquier punto que seleccionemos en los gráficos rectangulares Xtexture muestra el valor de ψ y de φ así como la intensidad de las reflexiones. Además representa en corte la distribución de las intensidades en x (ψ constante [azul]) y en y (φ constante [rojo]) (Figura 13, recuadro en la esquina inferior izquierda).

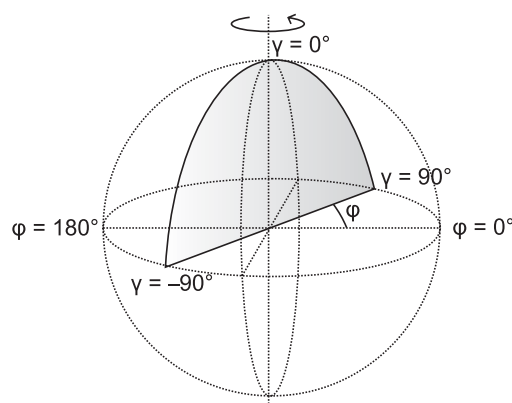


Figura 12. Construcción de la semiesfera de proyección a partir de los anillos de Debye del patrón de difracción. Cada anillo de Debye de un $frame_{\varphi}$ aporta información sobre la distribución de reflexiones en un sector de la semiesfera situado a φ grados del origen desde $\gamma = 90^{\circ}$ hasta $\gamma = -90^{\circ}$. Para cubrir la totalidad de la semiesfera hay que “barrer” desde $\varphi = 0^{\circ}$ hasta $\varphi = 180^{\circ}$.

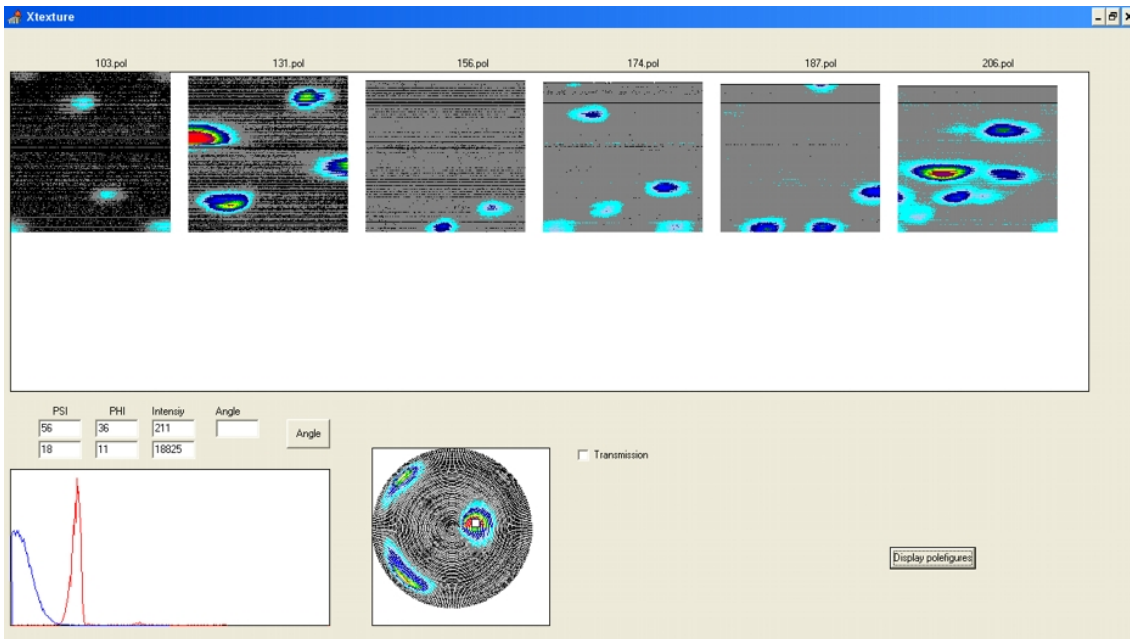


Figura 13. Interfaz de Xtexture con seis archivos *.pol cargados (101.pol,...206.pol). Se ha seleccionado el archivo 131.pol correspondiente a las reflexiones 104 que aparecen representadas en un diagrama de polos según proyección estereográfica (gráfico inferior central). El programa ofrece los valores ψ , ϕ e intensidad de cualquier punto seleccionado en el gráfico, en este caso el centro del máximo 104 más intenso (marcado con un recuadro blanco): $\psi = 18^\circ$, $\phi = 11^\circ$ e intensidad 18825. En el recuadro inferior izquierdo se representa la distribución de intensidades a lo largo de ψ (curva roja) y ϕ (curva azul) para los valores de ψ y ϕ determinados por el punto seleccionado.

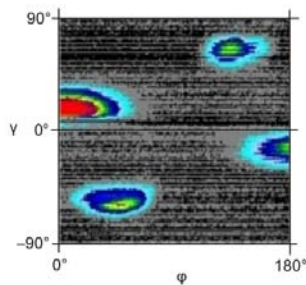


Figura 14. Distribución de las reflexiones 104 de la capa foliada de *Placuna placenta* representadas ψ frente a ϕ .

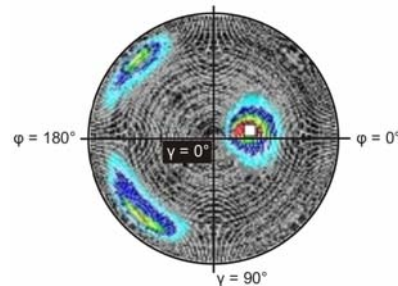


Figura 15. Proyección estereográfica de las reflexiones 104.

c) Difracción de electrones retrodispersados (EBSD)

Introducción

La difracción de electrones retrodispersados, EBSD (*Electron Back-Scattered Diffraction*), también conocida como difracción retrodispersada de Kikuchi (*Backscattered Kikuchi Diffraction, BKD*) es una técnica relativamente reciente. Comenzó a desarrollarse en 1954 por Alam, Blackman y colaboradores quienes describieron una serie de patrones de

difracción que fueron denominados “*wide-angle back-scatter Kikuchi patterns*” en relación a los fenómenos de difracción descubiertos por Kikuchi a finales de los años 20. No fue hasta los años 70 cuando Venables & Harland (1973) aplicaron el EBSD a la cristalografía metalúrgica, lo que abrió la técnica al resto de disciplinas científicas. Hasta comienzos de los años 90 esta técnica no comenzó a generalizarse, dándose un incremento exponencial en su utilización hasta la actualidad. Esto se refleja en el número de publicaciones científicas aparecidas desde entonces que han utilizado la técnica, según una búsqueda en Science Citation Index (SCI) (Figura 16).

La técnica se basa en la formación de líneas de Kikuchi, recogida, y posterior análisis de las líneas. De dicho análisis se extrae información relativa a la naturaleza del cristal (identificación de fase y orientación tridimensional de dicho cristal). Los detectores EBSD suelen montarse sobre un microscopio electrónico de barrido (SEM) que proporciona el haz de electrones necesario para el funcionamiento del sistema. Esto permite el que se pueda combinar el EBSD con imágenes de electrones secundarios (SE), imágenes de retro-dispersados (BS) o microanálisis EDS o WDS.

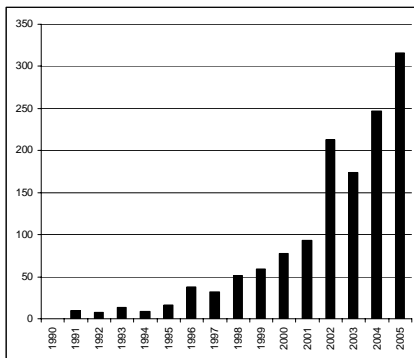


Fig. 16. Evolución del número de publicaciones con palabras clave EBSD o EBSP según búsqueda en SCI.

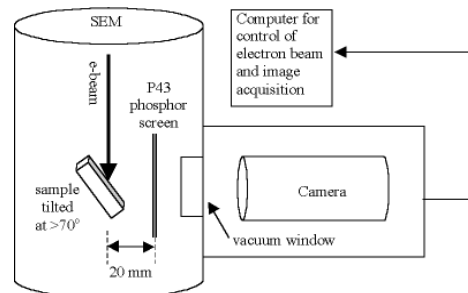


Fig. 17. Arquitectura del EBSD.

Fundamento de la técnica

La muestra a analizar se monta en la cámara del SEM con una inclinación de unos 70° con respecto al haz incidente, y orientada hacia el detector EBSD (Figura 17). Así se facilita la producción de electrones retrodispersados, que irradian desde la superficie de la muestra y son interceptados por la pantalla del detector. Es conveniente que la muestra esté pulida, ya que así se evitan los efectos topográficos que pueden dificultar la obtención de los patrones. En muestras no conductoras es posible que aparezcan problemas de carga, pero pueden corregirse, en parte, sometiéndolas a un leve metalizado, disminuyendo el tamaño o creando puentes conductores de carbono sobre la superficie.

Los electrones retrodispersados se producen al chocar los electrones del haz incidente con los núcleos o los electrones de los átomos de la muestra. Estos pierden energía y difunden inelásticamente en un rango amplio de ángulos. Los electrones retrodispersados siguen trayectorias rectilíneas pero tienen distintas energías, y en consecuencia distintas longitudes de onda. En su trayecto a través de la muestra pueden interactuar con sus átomos y difractar. Como la longitud de onda de los electrones no es fija sino continua se producen dos conos de difracción de mayor intensidad electrónica en vez de máximos discretos para cada familia de planos. Estos son visualizados al interceptar una pantalla de fósforo (el fenómeno de la difracción será tratado en detalle en el apartado rayos X). Los conos tienen una pequeña apertura angular ($2-4^\circ$) e interceptan la pantalla dando lugar a dos finos segmentos hiperbólicos casi rectos denominados líneas de Kikuchi (ver Figura 16). La distancia que separa los pares de líneas vale $r\lambda/d_{hkl}$, donde r es la distancia entre la muestra y la pantalla, λ es la longitud de onda de los electrones, y d_{hkl} la distancia entre los planos atómicos. De ahí que cuanto menor sea el espaciado d_{hkl} mayor separación habrá entre líneas. Cada una de las familias de planos de la red del cristal produce pares de conos de mayor intensidad de electrones (conos de difracción), transmitidos cuando $2\theta > 90^\circ$, y reflejados cuando $2\theta \leq 90^\circ$. Por ello el resultado es un conjunto de líneas de Kikuchi conocido como EBSP (*Electron Back-Scattered Pattern*), patrón de electrones retrodispersados, que aporta información de la simetría de la estructura cristalina, de la orientación tridimensional que presenta dicha estructura cristalina y de la deformación del cristal (Figura 18).

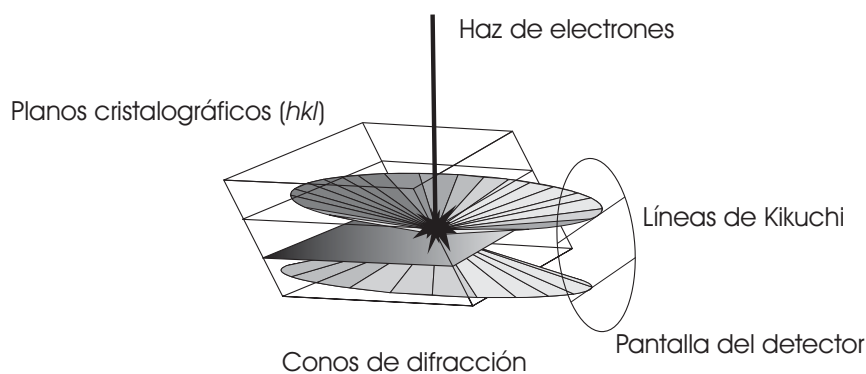


Figura 18. Generación de las líneas de Kikuchi.

La imagen proyectada en la pantalla de fósforo es recogida por una cámara digital para su indexación automática por el software del sistema o manual por el operador. Una vez que las líneas de Kikuchi están identificadas el sistema calcula su posición mediante la

transformada de Hough, que transforma las líneas en puntos de dicho espacio y los compara con patrones teóricos que el sistema contiene en una base de datos (Figura 19).

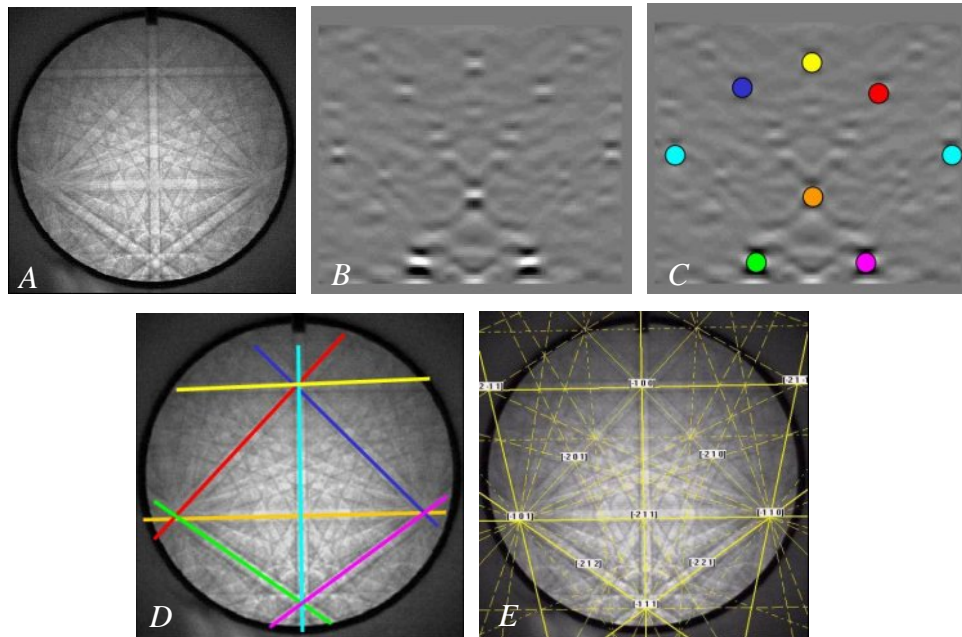


Figura 19. A) EBSP de una muestra de germanio (voltaje de aceleración 20 kV). B) Transformada de Hough correspondiente al EBSP anterior. C) Picos en la transformada de Hough identificados y coloreados. D) Líneas de Kikuchi en el EBSP original correspondientes a los picos identificados en la transformada de Hough. E) Patrón de difracción indexado. Imágenes procedentes de 15H www.ebsd.com (Oxford Instruments).

Normalmente se tiene una idea de las posibles fases que nos podemos encontrar, y por ello la búsqueda es más limitada. Para aquellos casos en los que se desconocen los posibles minerales de la muestra, se puede realizar un análisis EDS para determinar la composición. Si se conoce el sistema cristalino, el sistema es capaz de determinar la orientación tridimensional de cada grano de mineral. Cada medida que el sistema realiza va acompañada de un índice de confianza (CI) que nos indica la fiabilidad de la medida. Como norma general, aquellas medidas que vayan acompañadas de un CI mayor de 0.1 puede darse como válidas.

Mapas de distribución de orientación en EBSD

En muchas ocasiones la información que nos interesa no es sólo la aportada por un punto, sino la referente a una superficie de la muestra más o menos extensa. En estos casos el software del sistema nos permite seleccionar un área determinada y especificar el número de análisis que queremos hacer en dicha área. El haz de electrones del SEM va recorriendo

el área y en cada uno de los puntos seleccionados realiza un análisis. Se recogen los siguientes datos:

1. Localización en coordenadas (x,y) del punto analizado.
2. Fase presente en dicho punto.
3. Orientación tridimensional del material
4. Índice de confianza de la orientación calculada (CI).
5. Calidad de la imagen.

Toda esta información se puede procesar para crear un mapa de distribución de orientación, que permite una representación visual de la orientación cristalográfica (textura). En su forma más básica, a cada punto se le asigna un valor de una escala de grises. A aquellos que presenten una orientación próxima a una orientación determinada se les asigna un gris claro que pasa a ser gris oscuro a medida que se aleja de dicha orientación. De igual modo, se puede aplicar una escala de colores para advertir de forma más clara las diferencias de orientación. En una figura de polos inversa los colores representan la orientación (Figura 20). En el ejemplo, los puntos coloreados de azul son aquellos que presentan el eje [111] normal a la superficie, de rojo los que presentan el eje [001] y de verde los que presentan el eje [101].



Figura 20. Figura de polo inversa. El color en cada punto de la imagen representa la orientación de los ejes cristalográficos

Un mapa de bordes de grano (Figura 21) se genera al comparar la orientación de pares de puntos vecinos. Un cambio abrupto en la orientación es indicativo de un borde de grano. Así, cada vez que dicha diferencia supere un valor establecido se dibuja una línea que separa dichos puntos. Se pueden establecer varios umbrales de forma que podamos visualizar la diferencia de orientación entre los distintos granos de acuerdo con una escala de colores. De esta forma se puede distinguir bordes de grano, bordes de macla, etc.



Figura 21. Mapa de bordes de grano. El color de la línea indica el ángulo que forman dos puntos contiguos.

El software asociado al EBSD también permite un tratamiento estadístico de la información obtenida. Las figuras de polos son una proyección estereográfica de la distribución tridimensional de las normales a los planos cristalográficos (hkl) o polos. En el plano ecuatorial se representan las proyecciones de los polos $[hkl]$ de un cristal que estuviese situado en el centro de una esfera. Si se repite este mismo proceso para muchos puntos analizados, se obtiene una nube de proyecciones que representan las orientaciones de los planos (hkl) en todos esos puntos. Al agrupar los sectores de la proyección que tienen la misma densidad de puntos y aplicar una escala de grises o de color se obtiene un diagrama de polos como el que se muestra en la figura 22. Este tipo de representación es el que hemos utilizado en las publicaciones emanadas de esta tesis.

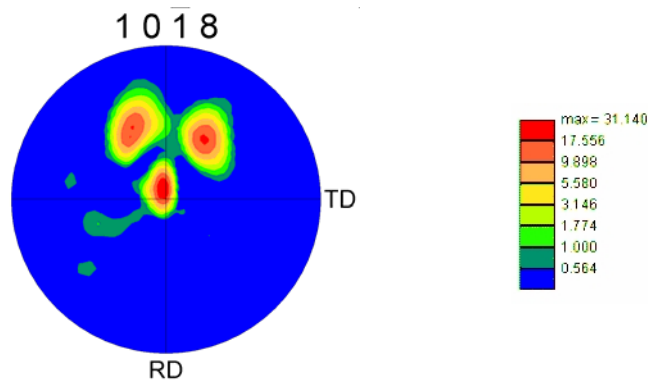


Figura 22. Diagrama de la densidad de polos 10-18 o figura de polos 10-18 asociada a los planos (10-18) de la capa foliada de *Placuna placenta*. A la derecha se muestra la escala que indica la densidad de puntos expresado en unidades arbitrarias.

Resultados y Discusión

Formación de la capa prismática calcítica de *Pteriomorpha* (Manuscrito I)

El resultado más significativo de este apartado es que las envueltas orgánicas de los prismas pueden originarse en ausencia de relleno mineral. Esto ha quedado patente en procesos de regeneración de la capa prismática y en individuos cultivados con una alta relación Mg/Ca, donde hemos observado la presencia de envueltas vacías así como de entramados compuestos exclusivamente por fibras orgánicas. Cuif *et al.* (1983a, b) documentaron cómo las envueltas orgánicas preceden a la mineralización de los prismas en *Pinna nobilis*. A partir de sus imágenes hemos concluido que la porción desmineralizada en esta especie se extiende unos 100 μm desde el margen y que las cavidades tienen unos 5 μm de profundidad cuando comienza la mineralización de los prismas. Suponemos que esta es la forma normal de iniciación de la capa prismática lo que implica que la materia orgánica tiene un papel fundamental en la conformación de la morfología de los prismas.

En las conchas los contactos entre prismas son rectos o ligeramente curvados. Muy diferentes por tanto de los bordes irregulares típicos de los prismas crecidos en agregados cristalinos inorgánicos. Los bordes entre prismas de las conchas son comparables a los de burbujas poliédricas formadas en un medio espumoso, en el que la tensión superficial es la principal fuerza modeladora. La espuma es una dispersión de un gas en un líquido en la que el líquido ocupa menos de un 10% del volumen total y en la que el gas está encerrado en celdas separadas por láminas de líquido. Estas láminas son películas de líquido con caras aproximadamente paralelas que se curvan cuando dos o tres de estas láminas se juntan, lo que genera superficies cóncavas hacia el gas denominadas bordes de Plateau. La existencia de estas concavidades hace que la presión del líquido en el vértice entre las celdas sea menor que la del líquido entre capas paralelas, lo que produce el flujo de líquido hacia esas zonas por succión capilar, denominado escurrimiento, que genera un engrosamiento de los vértices (Rodríguez 2005). El engrosamiento depende de la viscosidad y de la proporción relativa del líquido con respecto al aire. En las membranas interprismáticas el engrosamiento de los vértices es bastante leve, lo que indica que el fluido precursor de las membranas es muy viscoso. Sólo en el pseudoligamento de *Pinna nobilis*, donde la proporción de materia orgánica es la mayor registrada, el engrosamiento es más notorio.

La analogía con las espumas puede incluso explicar ciertos patrones poco usuales que aparecen en la capa prismática de Ostreidae. En estos bivalvos aparecen células con paredes curvadas con la convexidad dirigida hacia el borde de crecimiento. La presencia de paredes curvadas puede asimilarse a burbujas con un extremo libre. Esto ocurre cuando las burbujas incipientes se sitúan por un intervalo de tiempo al borde de la concha y, por tanto,

tienen el extremo distal libre que se expande debido a la presión existente en el interior de la burbuja. Esto implica que las células con paredes curvadas (por ejemplo en ostras) se forman secuencialmente mientras que aquellas con paredes rectas (ptéridos y pinnidos) han de formarse simultáneamente. Es importante tener en cuenta que en la formación de la capa prismática no se forma una espuma, sino una emulsión (dispersión de un líquido en otro líquido), aunque las propiedades de las emulsiones son similares a las de las espumas y por tanto también aplicables a formación de las envueltas orgánicas.

El precursor de las envueltas orgánicas se segrega en un estado viscoelástico que desarrolla el típico patrón celular antes de adquirir su consistencia definitiva por polimerización. Las cavidades orgánicas permanecen sin mineralizar por un corto periodo de tiempo aunque contienen un fluido de baja viscosidad (fluido extrapaleal) que junto con las envueltas orgánicas forma una emulsión líquido-líquido de propiedades similares a las de las espumas. Una vez que comienza la mineralización en las cavidades la superficie de las envueltas y la superficie de los prismas se nivela y a partir de aquí la secreción de ambas fases ocurre simultáneamente.

Estructura interna de los prismas calcíticos de *Pteriomorphia* (Manuscrito II)

Las observaciones realizadas sobre los prismas calcíticos de varias familias de *Pteriomorphia* indican que existen notables diferencias en cuanto a la estructura interna de éstos. Así en las familias Pinnidae, Pteriidae e Isognomonidae (Pterioida), los prismas están constituidos por cristales de tamaño nanométrico con hábito romboédrico. Los cristalitos se disponen mutuamente alineados y conforman agregados paralelos, lo que hace que los prismas se comporten cristalográficamente como monocristales. Esto concuerda con la idea tradicional sobre la conformación de los prismas y el concepto de prisma simple (Bøggild 1930, Taylor et al. 1969, Cuif et al. 1983, Dauphin et al. 2003, Dauphin 2003), aunque también se conocen casos de prismas constituidos por varias subunidades cristalinas con diferente orientación (Dauphin 2003).

Por el contrario, los prismas de Pectinidae, Propeamussiidae, Anomiidae (Pectinoida) y Ostreidae (Ostreoida) tienen una estructura interna formada a base de hojas de calcita. Esta estructura se hace patente en forma de una notable foliación observable en vista sagital que se dispone, según los grupos, perpendicular u oblicua al eje mayor del prisma. En la superficie de crecimiento de los prismas se observa el extremo de las hojas que tiene una morfología terminada en punta idéntica a la de las hojas de la microestructura foliada. De hecho los prismas están formados por microestructura foliada depositada en el

interior de las cavidades definidas por las envueltas orgánicas. La similitud estructural entre estos prismas y la microestructura foliada se pone especialmente de manifiesto en la transición entre estas dos microestructuras. La transición ocurre debido al cese en la producción de las envueltas orgánicas de los prismas, mientras que existe continuidad estructural en la fase mineral de una capa a otra.

Origen de la microestructura foliada (Manuscrito II)

Waller (1976) y posteriormente Carter (1990) propusieron que la microestructura foliada habría surgido a partir de los prismas calcíticos. Estos autores basaron su hipótesis en la coincidencia mineralógica de ambas microestructuras y en que la microestructura foliada siempre aparece en primer lugar debajo de la capa prismática, pero no realizaron observaciones sobre la estructura interna de los prismas. El hecho que los prismas de aquellos grupos que han desarrollado capa foliada tengan una estructura interna también constituida por microestructura foliada refuerza el que esta microestructura haya derivado de los prismas. Sin embargo, los prismas de los grupos sin capa foliada tienen una estructura interna diferente, lo que indica que posiblemente no desarrollaron microestructura foliada ya que carecían del biomaterial necesario.

El proceso por el que se originó la microestructura foliada es relativamente simple y ocurrió casi con toda seguridad de la misma forma en que se produce la transición entre capas. La transición entre la microestructura prismática y la microestructura foliada ocurre debido al cese en la producción de las envueltas orgánicas. Una vez que éstas dejan de producirse las hojas de calcita crecen libremente, recubren las envueltas orgánicas y forman una capa foliada continua debajo de los prismas. La capa foliada incipiente tiene una estructura cristalográfica semejante a la de la capa prismática antes de la transición, como ha quedado de manifiesto en los análisis de textura realizados en ambas capas. Esto demuestra que existe una continuidad estructural entre capas y que las hojas que previamente formaban los prismas constituyen luego la microestructura foliada.

La microestructura foliada apareció internamente a los prismas, pero en muchos casos pasó a constituir la capa externa de la concha cuando la capa prismática desapareció o quedó relegada a estadios juveniles de la concha. Este hecho tuvo una gran importancia en la configuración de las conchas ya que los márgenes prismáticos flexibles primitivos fueron reemplazados por márgenes rígidos foliados. Aquellos clados en los que se produjo este cambio también sufrieron otras modificaciones morfológicas. Por ejemplo, los márgenes flexibles son incompatibles con el desarrollo de conchas voluminosas ya que éstos han de

ser necesariamente planos y casi paralelos. Así aquellos grupos que han reemplazado la capa prismática por foliada han desarrollado conchas voluminosas con mayor espacio para las partes blandas. Del mismo modo, los márgenes flexibles son también inapropiados para el desarrollo de costillas radiales y otra ornamentación como espinas o tubérculos que tienden a dar rigidez al margen (Waller 1972. ver también discusión en Carter 1990 p 234). En algunos grupos la sustitución se dio sólo en la valva izquierda mientras que la derecha mantuvo una capa prismática funcional, como en propeamúsidos, anómidos y ostreidos. En estos grupos con “márgenes rígido-flexibles” aún se obtiene un cierre estanco de la concha, como en las ostras donde la valva derecha flexible cierra sobre la valva izquierda rígida.

El desarrollo de márgenes rígidos abrió nuevas vías para la evolución de la morfología de la concha y, en particular, diferentes estrategias para evitar los daños en la concha. Sin embargo, aquellos que mantienen la capa prismática en ambas valvas (por ejemplo pínidos y ptéridos) aunque son familias con un registro fósil muy extenso tienen pocos géneros y en general una distribución mayoritariamente tropical/subtropical. Por el contrario, los clados con bordes rígidos foliados (por ejemplo pectínidos u ostreidos) tienen distribuciones amplias y una alta diversidad genérica. En el mismo sentido, el porcentaje de familias con capa prismática en ambas valvas ha descendido desde el Paleozoico mientras que las que han sustituido la capa prismática en al menos una valva ha aumentado.

Las relaciones filogenéticas dentro de Pteriomorpha se han sometido a debate desde la aparición de la hipótesis de relación de Steiner y Hammer (2000) basados en estudios moleculares. Esta hipótesis ha sido posteriormente apoyada por Giribet y Wheeler (2002) y Giribet y Distel (2003) y agrupa a las superfamilias productoras de microestructura foliada en un mismo clado (Plicatuloidea+Anomioidea+Limoidea+Pectinoidea) con la excepción de Ostreoidea, que es situada más próxima a Pinnoidea y Pterioidea. Según esto, la microestructura foliada ha aparecido al menos dos veces en Eupteriomorpha, lo que no está en absoluto en contraposición con nuestra idea ya que la característica común a todos los eupteriomorphos es la presencia de una capa prismática calcítica primitiva (Waller, 1978), de la que podría surgir fácilmente la microestructura foliada.

Cristalografía de la microestructura foliada de bivalvos (Manuscrito III)

Los análisis de difracción, tanto de Rayos X como de electrones, indican que esta microestructura es un material altamente ordenado constituido por cristales con sus principales direcciones cristalográficas comúnmente alineadas. Las hojas de calcita se

disponen con el eje c inclinado 21-30° con respecto a la normal a la superficie de la concha en sentido opuesto a la dirección de crecimiento. Uno de los máximos {10-14} está siempre dirigido en la dirección de avance de las hojas mientras que los otros dos máximos relacionados por el eje ternario de simetría están dirigidos hacia atrás. Esta orientación se ha encontrado en todas las especies analizadas indistintamente de la técnica utilizada y ha sido confirmada por observaciones sobre ejemplares que han sufrido una corrosión natural de las hojas en las que se han puesto de manifiesto pequeños romboedros {10-14}, resultado de la disolución de la calcita. En ciertos casos ha sido posible identificar directamente sobre las hojas las caras cristalinas del extremo apuntado que se corresponden inequívocamente con las caras de romboedro {10-14}.

Una vez que tenemos localizadas las principales direcciones cristalográficas de las hojas de calcita es relativamente fácil determinar qué plano cristalino coincide con la superficie principal de las hojas. La disposición de tales planos debe ser subparalela (aproximadamente a 2-3°) a la superficie de la concha. La normal (o polo) asociada a dicho plano debe situarse aproximadamente en el centro de la figura de polos correspondiente. De la disposición de los planos {10-14} y {0001} se deduce que el plano que más se acerca a dicha posición es el {10-18} que dista 26.3° de las caras {0001}. De hecho, al construir la figura de polos correspondiente a los planos {10-18} se comprueba que uno de los máximos queda muy cercano al centro, con una pequeña desviación de unos 5° que es achacable a la ligera inclinación de las hojas de calcita sobre la superficie de la concha.

La identificación de la superficie de las hojas como planos {10-18} ha sido previamente llevada a cabo por otros autores. Por ejemplo Taylor *et al.* (1969) llegaron a esta conclusión, aunque no determinaron la orientación de los ejes cristalográficos. Runnegar (1984) también identificó a los planos {10-18} como la superficie de las hojas pero orientó el eje c en la dirección de crecimiento de las hojas y concluyó que existen hasta tres ordenaciones cristalográficas diferentes en la microestructura foliada de bivalvos. Nuestros resultados, en cambio, indican que al menos en las especies analizadas sólo hay una ordenación cristalográfica posible de los cristales constituyentes de la microestructura foliada.

La expresión de las caras {10-18} no se da en cristales inorgánicos de calcita lo que nos lleva a pensar que en la microestructura foliada dichas caras están estabilizadas gracias a la adsorción de moléculas orgánicas específicas que tienen afinidad por esos planos cristalográficos.

Mecanismo de ordenación de los ejes cristalográficos en los prismas foliados (Manuscrito IV)

El desarrollo de la textura laminar u ordenación de los ejes cristalográficos en el plano de los ejes a_1 , a_2 y a_3 ocurre de forma progresiva y depende del espesor de la capa prismática. En ostreidos la capa prismática está constituida por sucesivas lamelas prismáticas superpuestas. Cada laminilla forma una cuña en la que el espesor de los prismas disminuye progresivamente hacia el exterior. Al analizar la textura de una de estas laminillas prismáticas a diferentes espesores se observa claramente cómo a medida que los prismas tienen mayor longitud, la textura laminar es cada vez más patente. Así, en el borde distal de la lamela prismática, donde el espesor es mínimo, la superficie interna tiene textura fibrosa, igual que la superficie externa. Por el contrario justo antes del inicio de la capa foliada, donde los prismas alcanzan su mayor espesor, la superficie interna de la capa prismática tiende a presentar textura laminar. Esto mismo se ha encontrado al analizar la capa prismática de varios propeamúsidos. En estas especies la capa prismática tiene el mismo espesor en toda su extensión, por lo que la comparación se ha hecho entre distintas especies con diferentes espesores. Los resultados han sido muy similares, ya que aquellas especies con mayor espesor de la capa prismática desarrollan en mayor grado una textura laminar.

El desarrollo de la textura laminar en la superficie interna de la capa prismática implica un alineamiento progresivo de los ejes cristalográficos a_1 , a_2 y a_3 de los prismas. Este proceso puede estar propiciado por dos mecanismos que pueden actuar independientemente o de forma simultánea en función de la naturaleza de los prismas. Si los prismas son monocristalinos la única posibilidad para que disminuya la dispersión los ejes a_1 , a_2 y a_3 en la superficie interna de la capa prismática es que compitan durante el crecimiento, lo que originaría la supervivencia selectiva de aquellos prismas que tienen sus ejes cristalográficos orientados en una determinada dirección.

La otra posibilidad es que los prismas no se comporten como monocristales y que se de una rotación de los ejes cristalográficos de éstos en un plano perpendicular al eje c durante su crecimiento. Este proceso no se ha descrito nunca, pero pensamos que sería posible en biocristales gracias a su estructura interna a base de hojas de calcita, similar a la microestructura foliada, separada por membranas orgánicas nanométricas. Estas hojas tendrían una cierta libertad para orientarse y por tanto podrían dar lugar a cambios en la orientación de los ejes cristalográficos de los prismas. Esto podría deberse a que se favoreciese el crecimiento de las hojas con una determinada orientación favorable.

La primera posibilidad se puede desestimar ya que en *Ostrea puelchana* no se observa competencia de prismas, y sin embargo, se desarrolla una clara textura laminar. Por lo tanto, parece evidente que la única forma en la que se puede adquirir la textura laminar en la cara interna de la capa prismática es a través de la rotación de las hojas de calcita dentro de los prismas.

Caracterización cristalográfica de la microestructura prismática fibrosa calcítica (Manuscrito V)

La denominación de microestructura prismática fibrosa podría simplificarse en microestructura fibrosa, ya que no existe ninguna similitud estructural ni cristalográfica con la microestructura prismática que justifique esta denominación. La microestructura fibrosa está constituida por fibras muy diferentes a los prismas típicos cuya disposición es también distinta. Además presentan estructuras cristalográficas distintas, ya que la microestructura fibrosa está mucho más ordenada que la prismática.

Hemos encontrado dos estructuras cristalográficas netamente diferentes en los prismas fibrosos estudiados. Por un lado están los prismas fibrosos de mitílidos, que constituyen amplias capas calcíticas en la concha externa de muchas de sus especies. Su estructura cristalográfica corresponde a la descrita previamente por otros autores, por ejemplo Feng *et al.* (2000) o Chateigner *et al.* (2000). Las fibras se disponen paralelas e inclinadas unos 45° con respecto a la superficie de la concha. Están alargadas según el eje c y existe una notable alineación de los ejes a_1 , a_2 y a_3 de las distintas fibras, por lo que se trata de un material altamente ordenado. La otra estructura cristalográfica corresponde a los prismas fibrosos que constituyen las costillas internas de los propeamúsidos. Estos prismas no están alargados según el eje c sino en una dirección aproximadamente perpendicular a ésta. El frente de avance de las fibras está constituido por dos caras {10-14} mientras que el resto de la superficie tiene un aspecto irregular no delimitado por caras cristalinas. Las fibras tienen sus ejes cristalográficos alineados, por lo que al igual que en el caso anterior forman un material altamente ordenado.

De acuerdo con nuestros resultados creemos que es necesario distinguir entre microestructura fibrosa *sensu stricto*, presente en mitílidos, que sería aquella cuyas fibras están alargadas en paralelo al eje c , y la microestructura fibrosa que aparece en relación con la microestructura foliada y que constituye las costillas internas de propemúsidos, que es una variación de la microestructura foliada ya que, en esencia, estas fibras tienen la misma estructura cristalográfica que las hojas de la microestructura foliada. No obstante, aparte de

mencionar que existen diferencias morfológicas entre hojas y fibras, hay que comentar que en el caso de las hojas la superficie principal está delimitada por caras {10-18} mientras que en las fibras en muchos casos no llegan a desarrollarse estas caras.

Microcrestas en la concha de pectínidos (Manuscrito VI)

En esta familia, las microcrestas tienen unas 15-30 μm y alternan con depresiones del mismo tamaño. Están alargadas dorsoventralmente y son mutuamente paralelas, aunque con cierta frecuencia se ramifican, fusionan e intercalan lo que da lugar a un patrón dendrítico. Las microcrestas se extienden desde ambos lados del resílder hasta cerca del borde de ambas aurículas. Desde el punto de vista microestructural las microcrestas son esferulitos de calcita desarrollados sobre la superficie foliada del interior de la concha. Las microcrestas sólo crecen en longitud (en dirección ventral), pero no en anchura. Por ello, durante el crecimiento de la concha se incrementa el número de microcrestas por adición de éstas en el extremo anterior y posterior. Las microcrestas de una valva encajan perfectamente en las depresiones de la valva opuesta y viceversa, de modo similar a como lo hacen los dientes de la charnela. En *Pecten maximus* el epitelio del manto se adapta a la forma de las microcrestas, aunque sólo se adhiere a las elevaciones mientras que en las depresiones está libre. La epidermis está formada por células cuboidales con microvilli y células glandulares situadas en la lámina basal. En las convexidades que recubren las depresiones hay células epiteliales altas y con cierta frecuencia glándulas mucosas. En las concavidades del manto que recubren las microcrestas las células epiteliales son más bajas y contienen muchas mitocondrias y un retículo endoplasmático y aparato de Golgi bien desarrollados. Estas características son propias de una alta actividad metabólica, probablemente relacionada con el proceso de calcificación.

Desde el punto de vista morfogenético las microcrestas se inician por un plegamiento localizado del borde del manto. En esa zona se forma un micro-anticlinal con eje dorsoventral bajo el cual comienza el depósito esferulítico. Cuando el depósito adquiere una cierta elevación el manto pierde el contacto con la concha en la zona más hundida (sinclinal).

Aunque la posible función que desempeñen las microcrestas es meramente especulativa, parecen actuar del mismo modo que los dientes de la charnela. Esto es, un elemento de engranaje entre ambas valvas. El estudio de las microcrestas puede aportar pistas para entender el desarrollo de la charnela taxodonta.

Conclusiones

1. La formación de las envueltas orgánicas de los prismas precede a la producción mineral. Su morfología sugiere que están determinadas por tensión interfacial, lo que implica que son producidas en un estado viscoelástico que posteriormente adquiere su estado definitivo elástico por polimerización. Este modelo enfatiza el papel de la fase orgánica como el principal agente modelador de la capa prismática.
2. La estructura interna de los prismas es diferente en los grupos estudiados. En Pteriidae, Pinnidae e Isognomonidae los prismas están constituidos por cristales nanométricos de calcita mientras que en Pectinidae, Propeamussiidae, Anomiidae y Ostreidae los prismas están constituidos por microestructura foliada.
3. La microestructura foliada de bivalvos ha derivado de los prismas calcíticos con estructura interna foliada. Esta aparición permitió la sustitución de la capa prismática flexible por márgenes foliados rígidos y, en determinados grupos, la producción de conchas completamente calcíticas por invasión de las capas primitivamente aragoníticas media e interna.
4. La microestructura foliada es un material altamente ordenado. En las especies estudiadas existe una única estructura cristalográfica caracterizada por la coincidencia de la superficie principal de las hojas con las caras de romboedro {10-18} mientras que el borde de crecimiento está definido por caras de romboedro {10-14}.
5. Los prismas foliados sufren una reordenación de los ejes cristalográficos a_1 , a_2 y a_3 debido al giro de las hojas para alinearse con la dirección de crecimiento de la capa. Esta reordenación es progresiva y está directamente relacionada con la longitud alcanzada por los prismas.
6. Existen dos tipos de microestructuras calcíticas fibrosas. En mitílidos las fibras están alargadas según el eje c mientras que en propeamúsidos y pectínidos las fibras tienen una estructura cristalográfica idéntica a la de las hojas de la microestructura foliada. Las diferencias cristalográficas entre ambos tipos de fibras hace necesario distinguir entre microestructura fibrosa *sensu stricto*, para referirse al primer tipo de fibras, y microestructura foliada fibrosa para referirse al segundo tipo.
7. Las microcrestas son formaciones esferulíticas de calcita dispuestas dorsoventralmente en la zona dorsal del interior de la concha de pectínidos, propeamúsidos y spondylidos. Las microcrestas de una valva son complementarias a las de la valva opuesta y encajan como los dientes de la charnela. Estas estructuras

se forman debido a plegamientos localizados del manto en esa zona bajo los que se produce el depósito de calcita. Las microcrestas probablemente sirven de refuerzo a la charnela y su estudio puede aportar indicios para entender el desarrollo de la charnela taxodonta.

8. La combinación de técnicas de microscopía electrónica y de difracción de rayos X y de electrones proporciona una información complementaria indispensable para el estudio de la organización tridimensional de la fase cristalina de los biocomposites.

Conclusions

1. The formation of the organic envelopes of the prisms precedes the mineral production. Its morphology suggests that they are shaped by interfacial tension, which implies that they are secreted in a viscous or viscoelastic state and later attain their definitive state by polymerization. This model places the emphasis on the organic phase as the main patterning agent of the prismatic layer.
2. The internal structure of the prisms is different in the studied groups. In Pteriidae, Pinnidae and Isognomonidae the prisms are constituted by rhombohedral micro- to nanometric crystals whereas in Pectinidae, Propeamussiidae, Anomiidae and Ostreidae the prisms are constituted with foliated microstructure.
3. The foliated microstructure of bivalves is derived from calcitic prisms with internal foliated structure. Its development allowed the replacement of the flexible prismatic layer by foliated rigid margins and, in some groups, also allowed the production of wholly calcitic shells by the invasion of the formerly aragonitic middle and inner shell layers.
4. The foliated microstructure is a highly ordered material. There is a unique crystallographic structure in the studied species belonging to Ostreidae, Pectinidae, Propeamussiidae, Anomiidae and Placunidae, which is characterized by coincidence of the main surface of the laths with the {10-18} rhombohedral faces while the growing front is defined by {10-14} rhombohedral faces.
5. Foliated prisms undergo a reorientation of the crystallographic a_1 , a_2 and a_3 axes, which is obtained by slow and progressive rotation of their constituent laths to become aligned in the direction of growth of the prismatic lamella. This reorganization increases with the length attained by the prisms.
6. There are two kinds of calcitic fibrous microstructures. In mytilids the fibres are elongated along the c axis whereas in propeamussids and pectinids they have a crystallographic structure identical to that of the laths of the foliated microstructure. The crystallographic differences between both types of fibres makes it necessary to distinguish between fibrous microstructure *sensu stricto*, to refer to the former kind of fibres, and the second type of fibres which are mere variations of the foliated microstructure.
7. Microridges are spherulitic formations of calcite disposed dorsoventrally in the dorsum of the valve interiors in Pectinidae, Propeamussiidae and Spondylidae.

Microridges from one valve are complementary to those of the opposite valve and interpenetrate in a hinge-like fashion. These structures are formed due to local folding of the mantle in that region, below which calcitic deposits are secreted. Microridges probably develop a micro-hinge function and their study may provide clues to understand the development of the taxodont hinge.

8. The combination of electron microscopy and X-ray and electron diffraction techniques provide complementary information essential for the study of the three-dimensional organization of the crystalline phase of the biocomposites.

Agradecimientos

Quiero expresar mi más sincera gratitud a todas aquellas personas que de un modo u otro han contribuido a que este proyecto de Tesis Doctoral haya llegado a buen término.

En primer lugar tengo que hacer un merecido reconocimiento al trabajo de mis directores: Antonio y Alejandro, sin cuyo esfuerzo y dedicación no habría sido posible la realización de esta Tesis. Antonio, muchas gracias por confiar en mí. Me siento muy orgulloso de haber compartido estos años de trabajo. Eres un ejemplo a seguir en todos los aspectos, tanto en lo profesional, donde demuestras una profesionalidad que va mucho más allá de lo exigible, como en lo personal, donde demuestras una humanidad difícilmente igualable. Alejandro, te agradezco enormemente la paciencia y dedicación que has demostrado en la realización de esta Tesis. Muchas gracias por priorizar este proyecto, aún cuando no podías.

A todos los compañeros del Departamento de Estratigrafía y Paleontología de la Universidad de Granada les agradezco su cálida acogida y su amabilidad, especialmente a Pascual Rivas y a Pepe Martín, directores del Departamento durante los años de realización de esta Tesis. A Soco, infinitas gracias por hacerlo todo más fácil. A Antonio Jiménez, muchas gracias por tu interés en mi trabajo y por tu disposición para prestarme muestras (que no siempre han sido devueltas).

Qué decir de mis compañeros becarios del Departamento. Muchas gracias por regalarme vuestra amistad. Raef, eres una de las personas con mayor humanidad y sentido común que he conocido. Nono, de ti he aprendido mucho, sobre todo cómo hacer fácil lo difícil. Ali, muchas gracias por contagiarnos a todos con tu dulzura. Me siento muy enriquecido como persona después de haberos conocido. Muchísimas gracias a todos. Por supuesto no me puedo olvidar del esto de amigos que he hecho durante estos años: Ana, Anita, Francis, Miguel... Gracias a todos.

José María, compañero, muchas gracias por hacer agradables las muchas horas de trabajo compartidas en los 9 m² de nuestro despacho.

Liz, te estaré siempre agradecido por la ayuda prestada durante mis visitas a Cambridge. Tus comentarios y sugerencias han mejorado notablemente esta memoria. Mucho de lo que aparece en esta Tesis se debe a tu intuición y a tu perspicacia.

Mi agradecimiento al personal del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada, especialmente a Isabel y a Alicia por vuestro saber hacer con el microscopio electrónico de barrido. A Juan de Dios y a Conchi por vuestra pericia y

diligencia en la preparación de muestras, y a Pepe Romero, por la ayuda prestada en los análisis de texturas.

Isabel Sánchez, muchas gracias por el interés mostrado en la observación de mis muestras.

A Joaquín Ramírez, gracias por tu tenacidad en los análisis de texturas por EBSD.

A John Taylor, gracias por proporcionarme valiosísimas muestras y por permitirme el acceso a las colecciones del museo.

David y Gema, gracias por vuestra amistad. Vuestra compañía siempre ha sido una de mis más preciadas posesiones.

Silvia, cómo agradecerte todo lo que has hecho por mí. Sin tu apoyo y cariño nada de esto habría sido posible.

Y a mis padres, suegros y cuñados, muchas gracias por estar siempre ahí.

Uno de los hallazgos más relevantes de esta tesis es que los prismas calcíticos de determinados grupos de bivalvos están constituidos por microestructura calcítica. Según hemos visto, estos prismas aparecen en dos clados de acuerdo con los modernos análisis cladísticos basados en análisis moleculares. Sin embargo, no conocemos cual es la condición primitiva de los prismas calcíticos de Pteriomorpha (foliados o no). En este sentido, sería de gran interés seguir hacia atrás en el registro fósil la estructura interna de los prismas de los principales grupos para comprobar si la presencia de la microestructura foliada en el interior de los prismas es una condición primitiva o derivada.

Según he expuesto en esta tesis, la microestructura foliada es un material altamente ordenado con una gran capacidad de autoorganización por parte de sus elementos constituyentes (hojas). No obstante, siempre existe un cierto grado de desorganización tanto localmente como entre áreas más distantes. Esto quiere decir que las hojas introducen un ligero desorden dentro de la microestructura. Según hemos podido observar, las hojas pueden curvarse cuando se encuentran con grandes irregularidades en la superficie. Sin embargo, este hecho parece más ser el resultado de una mineralización deficiente que de un fenómeno común dentro de esta microestructura. Lo usual en este material es que las hojas crezcan de forma lineal, por lo que parece más probable que las ligeras desviaciones de las hojas se produzcan durante el proceso de nucleación. Este modelo nos ha servido para explicar la reordenación de los ejes cristalográficos en la capa prismática de ostras y pectinoideos aunque en realidad sabemos muy poco de cómo ocurre realmente. Un futuro estudio podría examinar el papel de las membranas orgánicas que recubren las hojas en el proceso de nucleación de éstas. Sería ciertamente relevante averiguar de qué forma las nuevas hojas adquieren su orientación, por ejemplo a través de un contacto directo con la superficie de la hoja sobre la que crece, a través de la nucleación sobre las membranas orgánicas o por un proceso de selección geométrica de las hojas.

Otro aspecto sobre el que se podría profundizar es en la caracterización cristalográfica de las fibras de calcita, por ejemplo en límidos y plicatúlidos. Los resultados obtenidos hasta el momento indican que las microestructuras fibrosas de aquellos grupos que presentan microestructura foliada tiene una estructura cristalográfica prácticamente idéntica a esta última y por tanto son una variación. Si esto se demostrase para el resto de grupos podríamos hablar de un origen común para los dos tipos principales de microestructuras calcíticas (foliada y fibrosa) a partir de los prismas calcíticos.

Con el objeto de completar el estudio de las microestructuras calcíticas de bivalvos se podría abordar el estudio de la microestructura fibrosa de rudistas, un grupo que abundó en los mares someros Mesozoicos y que desarrolló ampliamente las capas calcíticas. Otro material de interés es la microestructura *chalk* presente en ostreidos. Este material es sumamente interesante ya que se produce en directa relación con la microestructura foliada y en muchos casos se da una transición directa de un material a otro, con un acusado aumento en la inclinación de las hojas hacia la microestructura *chalk*.

Literatura citada

- Addadi, L. & Weiner, S. (1992).** Control and design principles in biological mineralization. *Angewandte Chemie-International Edition in English*, 31, 153-169.
- Alam, M. N., Blackman, M. & Pashley, D. W. (1954).** High-angle Kikuchi patterns. *Proceedings of the Royal Society of London series A. Mathematical and Physical Sciences*, 221, 224-&.
- Beniash, E., Aizenberg, J., Addadi, L. & Weiner, S. (1997).** Amorphous calcium carbonate transforms into calcite during sea-urchin larval spicule growth. *Proceedings of the Royal Society of London series B-Biological Sciences*, 264, 461-465.
- Blakemore, R. P. (1975).** Magnetotactic bacteria. *Science*, 190, 377-379.
- Bøggild, O. B. (1930).** The shell structure of the molluscs. *Det Kongelige Danske Videnskabernes Selskrabs Skrifter, Naturvidenskabelig og Matematisk Afdeling*, 2, 231-236.
- Boss, K. J. (1982).** Mollusca. In Parker, S. P. (ed) *Synopsis and classification of living organisms*. McGraw-Hill, New York, pp 945-1166.
- Carriker, M. R., Palmer, R. E. & Prezant, R. S. (1980).** Functional ultramorphology of the dissoconch valves of the oyster *Crassostrea virginica*. *Proceedings of the National Shellfisheries Association*, 70, 139-183.
- Carter, J. G. (1980).** Environmental and biological controls of bivalve shell mineralogy and microstructure. In Rhoads, D. C. & Lutz, R. A. (eds), *Skeletal Growth of Aquatic Organisms*. Plenum Press, New York, London, pp. 69-113.
- Carter, J. G. (1990).** Evolutionary significance of shell microstructure in the Palaeotaxodonta, Pteriomorpha and Isofilibranchia (Bivalvia: Mollusca). In Carter, J. G. (ed), *Skeletal Biomineralization: Patterns, Processes and Evolutionary Trends*. Van Nostrand & Reinhold, New York, pp. 135-411.
- Carter, J. G., Barrera, E. & Tevesz, M. J. S. (1998).** Thermal potentiation and mineralogical evolution in the Bivalvia (Mollusca). *Journal of Paleontology*, 72, 991-1010.
- Carter, J. G. & Hall, R. M. (1990)** Polyplacophora, Scaphopoda, Archaeogastropoda and Paragastropoda (Mollusca). Plates 122-134. In Carter, J. G. (ed). *Skeletal Biomineralization: Patterns, Processes and Evolutionary Trends*. Van Nostrand & Reinhold, New York, pp 122-134.
- Carter, J. G. & Tevesz, M. J. S. (1978).** The shell structure of *Ptychodesma* (Crytodontidae; Bivalvia) and its bearing on the evolution of Pteriomorpha. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, 284, 367-374.
- Chang, S. B., Kirschvink, J. L. & Stolz, J. F. (1987).** Biogenic magnetite as a primary remanence carrier in limestone deposits. *Physics of the Earth and Planetary Interiors*, 46, 289-303.
- Chang, S. B., Stolz, J. F., Kirschvink, J. L. & Awramik, S. M. (1989).** Biogenic magnetite in stromatolites. II. Occurrence in ancient sedimentary environments. *Precambrian Research*, 43, 305-315.
- Chateigner, D., Hedeagaard, C. & Wenk, H. R. (2000).** Mollusc shell microstructures and crystallographic textures. *Journal of Structural Geology*, 22, 1723-1735.

- Chateigner, D., Morales, M. & Harper, E. M. (2002).** QTA of prismatic calcite layers of some bivalves, a link to *Trichite* ancestrals. *Materials Science Forum*, 408-412, 1687-1692.
- Checa, A. & Rodríguez-Navarro, A. (2001).** Geometrical and crystallographic constraints determine the self-organization of shell microstructures in Unionidae (Bivalvia: Mollusca). *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, 268, 771-778.
- Cuif, J. P., Dauphin, Y., Denis, A., Gaspard, D. & Keller, J. P. (1983).** Étude des caractéristiques de la phase minérale dans les structures prismatiques du test de quelques Mollusques. *Bulletin du Muséum National d'Histoire Naturelle*, Paris ser. 4, v. 5, section A, no. 3, p. 679-717.
- Cuif, J. P., Denis, A. & Raguideau, A. (1983).** Observations sur les modalités de mise en place de la couche prismatique du test de *Pinna nobilis* L. par l'étude des caractéristiques de la phase minérale. *Haliotis*, 13, 131-141.
- Dauphin, Y. (2003).** Soluble organic matrices of the calcitic prismatic shell layers of two pteriomorphid bivalves - *Pinna nobilis* and *Pinctada margaritifera*. *The Journal of Biological Chemistry*, 278, 15168-15177.
- Dauphin, Y., Cuif, J. P., Doucet, J., Salomé, M., Susini, J. & Williams, C. T. (2003).** In situ chemical speciation of sulfur in calcitic biominerals and the simple prism concept. *Journal of Structural Biology*, 142, 272-280.
- Feng, Q. L., Li, H. B., Pu, G., Zhang, D. M., Cui, F. Z. & Li, H. D. (2000).** Crystallographic alignment of calcite prisms in the oblique prismatic layer of *Mytilus edulis* shell. *Journal of Materials Science*, 35, 3337-3340.
- Frankel, R. B. & Bazylinski, D. A. (2003).** Biologically induced mineralization by bacteria. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, 54, 95-114.
- Fraústo da Silva, J. J. R. & Williams, R. J. P. (2001).** The biological chemistry of the elements: the inorganic chemistry of life. Oxford University Press, New York.
- Giribet, G. & Distel, D. L. (2003).** Bivalve phylogeny and molecular data. In Lydeard, C. L. & Lindberg, D. R. (eds), *Molecular, Systematics and Phylogeography of Mollusks*. Smithsonian Books, Washington and London, pp. 45-90.
- Giribet, G. & Wheeler, W. (2002).** On bivalve phylogeny: a high-level analysis of the Bivalvia (Mollusca) based on combined morphology and DNA sequence data. *Invertebrate Biology*, 12, 271-324.
- Gould, J. L., Kirschvink, J. L. & Deffeyes, K. S. (1978).** Bees have magnetic remanence. *Science*, 201, 1026-1028.
- Grigor'ev, D. P. (1965) *Ontogeny of minerals*. Jerusalem.
- Harper, E. M. (1997).** The molluscan periostracum: an important constraint in bivalve evolution. *Palaeontology*, 40, 71-97.
- Harper, E. M. (1998).** Calcite in chomid bivalves. *Journal of Molluscan Studies*, 64, 391-399.

- Harper, E. M. (2000).** Are calcitic layers an effective adaptation against shell dissolution in the Bivalvia? *J Zool Lond*, 251, 179-186.
- Harper, E. M., Palmer, T. J. & Alphey, J. R. (1997).** Evolutionary response by bivalves to changing Phanerozoic sea-water chemistry. *Geological Magazine*, 134, 403-407.
- Hautmann, M. (2004).** Effect of end-Triassic CO₂ maximum on carbonate sedimentation and marine mass extinction. *Facies*, 50, 257-261.
- Hautmann, M. (2006).** Shell mineralogical trends in epifaunal Mesozoic bivalves and their relationship to seawater chemistry and atmospheric carbon dioxide concentration. *Facies*, 52, 417-433.
- Kennedy, W. J. & Taylor, J. D. (1968).** Aragonite in Rudist. *Proceedings of the Geological Society of London*, 1645, 325-331.
- Kennedy, W. J., Taylor, J. D., Hall, A. (1969).** Environmental and biological controls on bivalve shell mineralogy. *Cambridge Philosophical Society Biological Reviews*, 44, 499-530.
- Kirschvink, J. L., Kobayashi-Kirschvink, A. & Woodford, B. J. (1992).** Magnetite biomineralization in the human brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89, 7683-7687.
- Knoll, A. H. (2003).** Biomineralization and evolutionary history. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, 54, 329-356.
- Lowenstam, H. A. (1954).** Factors affecting the aragonite:calcite ratios in carbonate-secreting marine organism. *Journal of Geology*, 62, 284-322.
- Lowenstam, H. A. (1962).** Magnetite in denticle capping in recent chitons (Polyplacophora). *Bulletin of the Geological Society of America*, 73, 435-438.
- Lowenstam, H. A. (1981).** Minerals formed by organisms. *Science*, 211, 1126-1131.
- Lowenstam, H. A. & Margulis, L. (1980).** Evolutionary prerequisites for early Phanerozoic calcareous skeletons. *Biosystems*, 12, 27-41.
- Lowenstam, H. A. & Weiner, S. (1989).** On Biomineralization. Oxford University Press, New York.
- Mackenzie, F. T. & Agegian, C. R. (1989).** Biomineralization and tentative links to plate tectonics. In Crick, R. E. (ed), *Origin, evolution, and modern aspects of biomineralization in plants and animals*. Plenum Press, New York, pp. 11-27.
- Mann, S. (1983).** Mineralization in biological systems. *Structure and Bonding*, 54, 125-174.
- Mann, S. (2001).** Biomineralization: principles and concepts in bioinorganic materials chemistry. Oxford University Press, New York.
- Mann, S., Perry, C. C., Williams, R. J. P., Fyfe, C. A., Gobbi, G. C. & Kennedy, G. J. (1983).** The characterization of the nature of silica in biological system. *Journal of the Chemical Society-Chemical Communications*, 4, 168-170.

- McConnaughey, T. A. (1989).** Biomineralization mechanisms. In Crick, R.E. (ed), *Origin, evolution, and modern aspects of biomineralization in plants and animals*. Plenum Press, New York, pp. 57-73.
- Nakahara, H. & Bevelander, G. (1971).** Formation and growth of the prismatic layer of *Pinctada radiata*. *Calcified Tissue Research*, 7, 31-45.
- Parker, A. (2003).** In the blink of an eye; how vision sparked the big bang of evolution Perseus Publishing.
- Raup, D. M. & Michelson, A. (1965).** Theoretical morphology of coiled shell. *Science*, 147, 1294-&.
- Rhoads, D. C. & Morse, J. W. (1971).** Evolutionary and ecological significance of oxygen-deficient marine basins. *Letbaia*, 4, 413-428.
- Rodríguez, L. J. (2005).** Sistemas coloidales en farmacia. http://www3.usal.es/~licesio/Sistemas_Coloidales.htm.
- Rodríguez-Navarro, A. B., Gaines, K. F., Romanek, C. S., Masson, G. R. (2002).** Mineralization of clapper rail eggshell from a contaminated salt marsh system. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 43, 449-460.
- Runnegar, B. (1984).** Crystallography of the foliated calcite shell layers of bivalve molluscs. *Alcheringa*, 8, 273-290.
- Runnegar, B. (1989).** The evolution of mineral skeletons. In Crick, R.E. (ed), *Origin, evolution, and modern aspects of biomineralization in plants and animals*. Plenum Press, New York, pp. 75-94.
- Sandberg, P. A. (1975).** New interpretations of great salt lake ooids and of ancient non-skeletal carbonate mineralogy. *Sedimentology*, 22, 497-537.
- Sandberg, P. A. (1983).** An oscillating trend in Phanerozoic non-skeletal carbonate mineralogy. *Nature*, 305, 19-22.
- Sandberg, P. A. (1985).** Nonskeletal aragonite and $p\text{CO}_2$ in the Phanerozoic and Proterozoic. *American Geophysical Union Monograph*, 32, 585-594.
- Sepkoski, Jr. J. J. (1978).** A kinetic model of Phanerozoic taxonomic diversity I. Analysis of marine orders. *Paleobiology*, 4, 223-251.
- Shiao, J. C., Tzeng, C. S., Leu, C. L. & Chen, F. C. (1999).** Enhancing the contrast and visibility of daily growth increments in fish otolith etched by proteinase K buffer. *Journal of Fish Biology*, 54, 302-309.
- Sikes, C. S., Wheeler, A. P., Wierzwicki, A., Mount, A. S. & Dillaman, R. N. (2000).** Nucleation and growth of calcite on native versus pyrolyzed oyster shell folia. *Biological Bulletin*, 198, 50-66.
- Simkiss, K. & Wilbur, K. M. (1989).** Biomineralization. Cell Biology and Mineral Deposition. Academic Press, Inc., San Diego.

- Stanley, S. M., Ries, J. B., Hardie, L. A. (2002).** Low-magnesium calcite produced by coralline algae in seawater of Late Cretaceous composition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 15323-15326.
- Stanley, S. M. (2006).** Influence of seawater chemistry on biomineralization throughout Phanerozoic time: Paleontological and experimental evidence. *Palaeogeography Palaeoclimatology Palaeoecology*, 232, 214-236.
- Steiner, G. & Hammer, S. (2000).** Bivalvia inferred from 18S rDNA sequences with particular reference to the Pteriomorphia. In Harper, E. M., Taylor, J. D. & Crame, J. A. (eds), *The Evolutionary Biology of the Bivalvia*. Geological Society, London, Special Publications, 177, pp. 11-29.
- Taylor, J. D. (1973).** The structural evolution of the bivalve shell. *Palaeontology*, 16, 519-534.
- Taylor, J. D., Kennedy, W. J. & Hall, A. (1969).** The shell structure and mineralogy of the Bivalvia. Introduction, Nuculacea-Trigonaea. *Bulletin of the British Museum (Natural History), Zoology Series, Supplement 3*, 1-125.
- Taylor, J. D., Kennedy, W. J. & Hall, A. (1973).** The shell structure and mineralogy of the Bivalvia. II. Lucinacea-Clavagellacea. Conclusions. *Bulletin of the British Museum (Natural History), Zoology, Supplement*, no. 3, p. 1-125.
- Taylor, J. D. & Reid, D. G. (1990).** Shell microstructure and mineralogy of the Littorinidae; ecological and evolutionary significance. *Hydrobiologia*, 193, 199-215.
- Taylor, P. D. & Weedon, M. J. (2000).** Skeletal ultrastructure and phylogeny of cyclostome bryozoans. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 128: 337-399.
- Tsujii, T., Sharp, D. G. & Wilbur, K. M. (1958).** Studies on shell formation VII. The submicroscopic structure of the shell of the oyster *Crassostrea virginica*. *The Journal of Biochemical Cytology*, 4, 275-287.
- Ubukata, T. (1994).** Architectural constraints on the morphogenesis of the prismatic structure in the Bivalvia. *Palaeontology*, 37, 241-261.
- Uozumi, S. & Suzuki, S. (1981).** The evolution and shell structure in the Bivalvia. In Habe, T. & Omori, M. (eds), *Study of Molluscan Paleobiology*. Committee Prof. M. Omori memorial volume, Niigata, Japan, pp. 63-78.
- Vallet, M., Faus, J., García-España, E. & Moratal, J. (2003).** Biomineralización. Introducción a la química bioinorgánica. Editorial Síntesis, Madrid, pp. 423-550.
- Veis, A. & Perry, C. C. (1967).** The phosphoprotein of the dentin matrix. *Biochemistry*, 6, 2409-2416.
- Venables, J. A. & Harland, C. J. (1973).** Electron backscattering patterns -new technique for obtaining information in scanning electron-microscope. *Philosophical Magazine*, 27, 1193-1200.
- Walcott, C., Gould, J. L. & Kirschvink, J. L. (1979).** Pigeons have magnets. *Science*, 205, 1027-1029.

- Walker, M. M., Kirschvink, J. L., Chang, S. B. R. & Dizon, A. E. (1984).** A candidate magnetic sense organ in the yellowfin tuna *Thunnus albacares*. *Science*, 224, 751-753.
- Waller, T. R. (1972).** The functional significance of some shell microstructures in the Pectinacea (Mollusca: Bivalvia). *Proceedings of the International Geological Congress, 24th Session, Montreal, Canada, Section 7, Paleontology*, 48-56.
- Waller, T. R. (1976).** The origin of foliated-calcite shell microstructure in the subclass Pteriomorpha (Mollusca: Bivalvia). *Bulletin of the American Malacological Union, Inc., for 1975*, 57-58.
- Waller, T. R. (1978).** Morphology, morphoclines and a new classification of the Pteriomorpha (Mollusca: Bivalvia). *Philosophical Transaction of the Royal Society of London, Series B*, 284: 345-365.
- Waller, T. R. (1983).** Dahllite in the periostracum of *Lithophaga nigra* (Mollusca: Bivalvia) and its taxonomic and functional implications. *American Malacological Bulletin*, 1, 101.
- Watabe, N. (1956).** Dahllite identified as a constituent of prodissoconch of *Pinctada martensii* (Dunker). *Science*, 124, 630.
- Watabe, N., Sharp, D. G. & Wilbur, K. M. (1958).** Studies on shell formation VIII. Electron microscopy of crystal growth of the nacreous layer of the oyster *Crassostrea virginica*. *The Journal of Biochemical Cytology*, 4, 281-295.
- Watabe, N. & Wada, K. (1956).** On the shell structure of Japanese pearl oyster, *Pinctada martensii* (Dunker). I. Prismatic layer. *Report of the Faculty of Fisheries, Prefectural University of Mie*, 2, 227-232.
- Weiner, S. (1979).** Aspartic acid-rich proteins: mayor components of the soluble organic matrix of mollusk shells. *Calcified Tissue Research*, 29, 163-167.
- Weiner, S. & Dove, P. M. (2003).** An overview of biomineralization processes and the problem of vital effect. In Dove, P. M., De Yoreo, J. J. & Weiner, S. (eds), *Biomineralization*. The Mineralogical Society of America, Washington, pp. 1-29.
- Weiner, S., Talmon, Y. & Traub, W. (1983).** Electron diffraction of molusc shell organic matrices and their relationship to the mineral phase. *International Journal of Biological Macromolecules*, 5, 325-328.
- Weiner, S. & Traub, W. (1984).** Macromolecules in mollusc shells and their functions in biomineralization. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London series B-Biological Sciences*, 304, 425-434.
- Weiss, I. M., Tuross, N., Addadi, L. & Weiner, S. (2002).** Mollusk larval shell formation: Amorphous calcium carbonate is a precursor phase for aragonite. *Journal of Experimental Zoology*, 293, 478-491.
- Worms, D. & Weiner, S. (1986).** Mollusc shell organic matrix: Fourier transform infrared study of the acidic macromolecules. *Journal of Experimental Zoology*, 237, 11-20.

Lista de los Manuscritos

I. The nature and formation of calcitic columnar prismatic shell layers in pteriomorphian bivalves Pág.93

Antonio G. Checa, Alejandro B. Rodríguez-Navarro, Francisco J. Esteban-Delgado

Biomaterials 26 (2005) 6404-6414

II. Origin and expansion of the foliated calcitic layers in pteriomorph bivalves Pág.105

Francisco J. Esteban Delgado, Antonio G. Checa, Elizabeth Harper, Alejandro B. Rodríguez-Navarro

Submitted to the Zoological Journal of the Linnean Society

III. Crystallographic structure of the foliated calcite of bivalves Pág.133

Antonio G. Checa, Francisco J. Esteban-Delgado, Alejandro B. Rodríguez-Navarro

Journal of Structural Biology (doi:10.1016/j.jsb.2006.09.005). *Published online*

IV. Re-orientation of the crystallographic axes of the prisms in the prismatic layer of oyster and scallops shells Pág.145

Francisco J. Esteban-Delgado, Antonio G. Checa, Alejandro B. Rodríguez-Navarro

Manuscript.

V. Crystallographic characterization of the calcitic fibrous prismatic microstructures of Pteriomorphia Pág.157

Francisco J. Esteban-Delgado, Antonio G. Checa, Alejandro B. Rodríguez-Navarro

Manuscript.

VI. Microridges in the inner dorsal shell of pectinids Pág.171

Antonio G. Checa, Francisco J. Esteban-Delgado, Carmen Salas-Casanova

Manuscript.

**The nature and formation of calcitic columnar
prismatic shell layers in pteriomorphian
bivalves**



The nature and formation of calcitic columnar prismatic shell layers in pteriomorphian bivalves

Antonio Gerardo Checa^{a,*}, Alejandro B. Rodríguez-Navarro^b,
Francisco J. Esteban-Delgado^a

^a*Departamento de Estratigrafía y Paleontología, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, Avenida Fuentenueva s/n, 18071 Granada, Spain*

^b*Departamento de Mineralogía y Petrología, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, Avenida Fuentenueva s/n, 18071 Granada, Spain*

Received 18 January 2005; accepted 7 April 2005
Available online 23 May 2005

Abstract

The calcitic columnar prismatic (CCP) microstructure constitutes the external shell layer of pteroid and ostreoid bivalves. It consists of calcite monocrystals, which extend perpendicular to the growth surface and are surrounded by thick interprismatic membranes (<1–8 μm). The exceptional biomechanical properties of CCP layers make them interesting for biomechanical–biomimetic studies. Their potential as biomedical implants still requires further testing. Previous studies attributed the mineral phase a crucial role in the organization of the microstructure. Conversely, our observations on the morphology of prisms and abnormally calcified shells reveal that the organic web may form in the absence of the mineral infilling and that the boundaries between prismatic units are shaped by interfacial tension. Accordingly, we consider interprismatic organic membranes as the main shaping agent. We propose that the prismatic layer initiates as an emulsion formed by the fluid precursor of organic membranes and the extrapallial fluid, which causes formation of empty organic cavities. Prismatic crystals began to form within the organic cavities a little later, but their secretion surface soon levelled that of organic membranes.

© 2005 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Biomineralisation; Microstructure; Shell; Calcite; Prismatic layer; Bivalves

1. Introduction

Bivalve shells are composite bioceramics made of CaCO₃ crystals in the form of calcite and/or aragonite, embedded within an organic framework. Crystals in different shell layers may adopt different morphologies and organise themselves in different spatial configurations, or microstructures. Microstructures characterise big groups of bivalves and are useful in systematic and evolutionary studies.

One of the most common microstructures is composed of columnar elements of either calcite or aragonite encased in rather thick organic sheaths (Fig. 1A). Calcitic prismatic layers were first observed by Bower-

bank [1] and Bøggild [2]. The latter author and several others [3–7] described calcite prisms as single crystals. However, several exceptions have been reported [4,7–11], in which each prism is composed of a few subunits. Aragonitic prisms, on the contrary, are composed of very small, needle-like subunits radiating from a common central axis [12]. Both calcitic and aragonitic prismatic microstructures were collectively named simple prismatic by Carter [13,14], which does not conform to the internal structure of aragonitic prisms. We prefer the term ‘columnar prismatic’ from Ubukata [15] because it emphasizes the external aspect of microstructures and will formally refer to calcitic (CCP) and aragonitic columnar prismatic (ACP) layers. Individual units in this CCP microstructure are separated by thick organic envelopes (organic interprismatic membranes) (Fig. 1A). Intraprismatic or intracrystalline

*Corresponding author. Tel.: +34 958 243201; fax: +34 958 248528.
E-mail address: acheca@ugr.es (A.G. Checa).

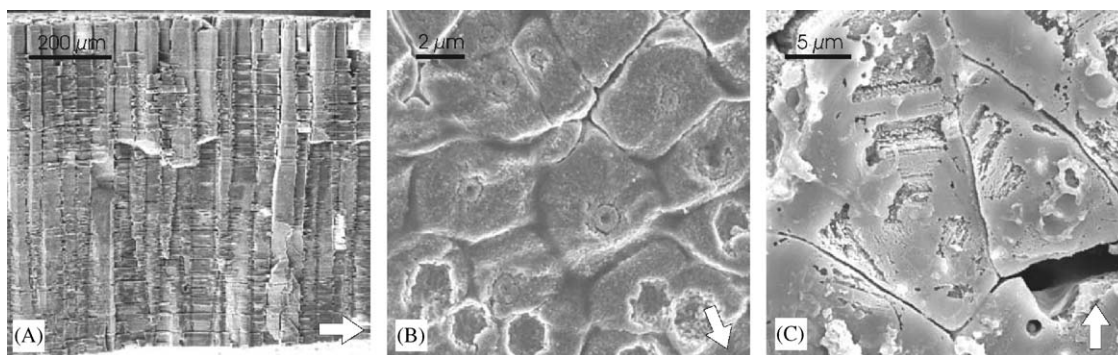


Fig. 1. (A) Fracture through the CCP layer of *P. nobilis*. Untreated specimen. External surface to the top. Note remains of interprismatic membranes. (B) External surface of the CCP layer of *O. edulis* (treated with proteinase K for 10 min). Some prisms display an initial hexagonal spherulith. (C) External surface of the CCP layer of *A. colbecki* (treated with 5% NaOH for 5 min) showing concentric growth lines of prisms. Arrows indicate direction of shell growth.

membranes may be longitudinal, separating prismatic monocrystalline subunits [4,7], transversal, delineating the different growth increments [5,6,16] and others of uncertain arrangement [17].

Typical occurrences of CCP microstructures are the external shell layer of the dissoconch of one or both valves of most Pinnoidae, Pterioidea, Ostreoidae, some Propeamussiidae (Pectinoidea), Anomiidae and Placunidae (Anomioidea) [3,18]. Despite the apparent structural simplicity of this microstructure, there are differences between groups as to the aspect of prisms, as well as to their content of organic matter.

Some works have treated extensively on the formation of prismatic shells of Ostreoidae [3,19–22] and Pterioidea [3,8,23]. Current models imply that secretion initiates at the mantle edge (that is, the epithelium lining the internal shell surface and responsible for shell secretion) with the formation of the periostracum (an organic pellicle which constitutes the outermost cover of the shell). The periostracal layer curves back and seeds of calcite crystals begin to grow below it [15,20,21,23]. With growth, crystals impinge on each other and attain typical polygonal shapes. Later they grow towards the shell interior. The CCP microstructure has been compared to inorganic crystal aggregates. For instance, crystal competition, which is a process typical of inorganic crystal growth (e.g., in quartz geodes), has been recognized to affect the organization of both CCP and ACP shell layers [3,12,15]. Accordingly, most studies on the CCP microstructure have focused essentially on the mineral phase and completely overlooked the formation of organic interprismatic membranes and their role in the configuration of the pattern. The only hypothesis as to the genesis of interprismatic membranes is due to Tsuji et al. [19] and Carriker et al. [21], who implied that formation was due to squeezing of organic matter during prism growth. This is not a valid explanation as once prisms have attained their full width, they should push the organic matter towards the shell interior during growth. Nevertheless, the distribution, thickness and

continuity of the organic framework cannot be explained in this way.

We have mainly focused on the morphology and distribution of the interprismatic membranes and their relationships to the crystal units. The ultimate goal is to arrive to a genetic model combining the properties of both the organic and crystal phases. The CCP microstructure of bivalves is a widely distributed biomaterial whose origin is poorly understood. This unknown must therefore be the subject of basic research aiming to understand the genesis of biomaterials. Additionally, this material has interesting biomechanical properties. The thick organic interprismatic membranes provide the CCP layers of pteriomorphian bivalves with the highest content of organic matter recorded in molluscs. This feature confers this material, in its natural hydrated state, exceptional bending capacities (pers. obs. 2004), surpassing those of any other mineral-organic biocomposite secreted by molluscs and, to our knowledge, invertebrates. Hence, it is important for biomechanical-biomimetic studies. Nacre is the only mollusc microstructure tested to date for clinical-medical applications [24,25]. The potential biomedical interest of similar biomaterials with different mechanical properties and, probably, longer durability in body fluids (due to its high organic content) is evident.

2. Material and methods

2.1. Material

The species of Pterioidea and Ostreoidae (Pteriomorpha) examined are listed in Table 1. In all cases, the CCP layer is the most external shell layer. In Pterioidea, it overlies an internal nacreous layer. In all four species of Ostreoidae examined, the CCP layers are only found in the right (uppermost) valve. The rest of the shell is composed of foliated calcite. The CCP layers of *Propeamussium* and *Adamussium* (Pectinoidea) are

Table 1
List of taxa used in this study

Taxon	Locality
Order Pterioidea	
Superfamily Pterioidea, Family Pteriidae	
<i>Pinctada margaritifera</i> (Linnaeus, 1758)	Margarita Island, Venezuela
<i>Pteria hirundo</i> (Linnaeus, 1758)	Off the coasts of Granada and Málaga (SE Spain)
<i>Pteria avicula</i> (Holten, 1802)	Calitoban Island, Philippines
Superfamily Pterioidea, Family Malleidae	
<i>Malleus albus</i> (Lamarck, 1819)	Philippines, locality unknown
Superfamily Pterioidea, Family Isognomonidae	
<i>Isognomon legumen</i> (Gmelin, 1970)	Hong-Kong
Superfamily Pinnoidea, Family Pinnidae	
<i>Pinna nobilis</i> (Linnaeus, 1758)	Agua Amarga (Almería) and Málaga, SE Spain
<i>Pinna rudis</i> (Linnaeus, 1758)	Off the coast of Granada, SE Spain
<i>Atrina pectinata</i> (Linnaeus, 1758)	Fuengirola (Málaga), SE Spain
<i>Atrina serrata</i> (Sowerby, 1825)	Sarasota, Florida
Order Ostreoida	
Superfamily Ostreoida, Family Ostreidae	
<i>Ostrea edulis</i> Linnaeus, 1758	Mariculture Center PEMARES, Huelva, SE Spain
<i>Ostrea puelchana</i> D'Orbigny, 1841	Southern Atlantic, locality unknown
<i>Crassostrea gigas</i> (Thunberg, 1793)	El Rompido, Huelva, SE Spain
<i>Saccostrea echinata</i> (Quoy and Gaymard, 1834)	Uwajima City, Ehime Prefecture, Japan
Superfamily Pectinoidea, Family Propeamussiidae	
<i>Propeamussium jefreysii</i> (Smith, 1885)	Josephine Bank, NE Atlantic
<i>Propeamussium dalli</i> (Smith, 1886)	Maldwe Islands
<i>Adamussium colbecki</i> (Smith, 1902)	Signy Island, Antarctica
Superfamily Anomioidea, Family Anomiidae	
<i>Anomia ephippium</i> Linnaeus, 1758	Millport, Scotland

restricted to the right valve and are superimposed onto a calcitic foliated middle and an aragonitic crossed lamellar internal layer. In *Anomia ephippium* (Anomioidea), the CCP microstructure only develops in the right valve, superimposed onto an aragonitic crossed lamellar layer behind the pallial line.

2.2. Optical and electron microscopy

The prismatic shell was observed by optical and scanning electron microscopy (SEM), although this last technique provided better results. For polarized-light microscopy, samples were embedded in epoxy resin, thin-sectioned at 30–40 μm (with a Buehler Petro-Thin) and polished (Struers Planopol-V). SEM observation was carried out both in fractured specimens and in the shells' surfaces. Some samples were observed intact, although we usually removed either the organic [with 5% NaOH or proteinase K (1 mg ml⁻¹)] or mineral matter (2–4% EDTA). Samples were coated with either gold (Polaron E5000 sputtering) for SEM observation (Zeiss DSM950), or carbon (Hitachi UHS evaporator) for field emission SEM (FESEM) observation (Leo Gemini 1530).

2.3. X-ray texture analysis and EBSD

The three-dimensional orientation of the shell crystals was determined by registering pole densities for 006, 104

and 110 reflections of calcite, using an X-ray texture diffractometer (Siemens D5000, Cu K α). The corresponding pole figures showed the three-dimensional distribution of the poles of (*hkl*) crystallographic planes associated to each *hkl* reflection analysed. The stereographic projection of the pole figures was displayed as counter plots.

Similar, though much more detailed information is obtained by using an electron back-scattering diffraction detector (TSL OIM 3.5), coupled with an SEM (Philips XL30 LaB₆). This so-called SEM-EBSD technique provides a pattern of back-scattered electrons (Kikuchi pattern), which is characteristic of the mineral phase (symmetry system) and orientation of crystals at a μm scale. We recorded the same reflections and used the same system of representation as above.

2.4. Thermogravimetry

The organic mater content of shells was determined using a thermogravimetric analyzer (SHIMADZU TGA-50H) for a temperature range from 25 to 950 °C. In all samples, two weight loss events were detected in the temperature ranges 200–400 °C and 400–600 °C. Both were assigned to organic mater combustion. Subsequent weight loss (>600 °C) was attributed to CO₂ emission from shell CaCO₃ decomposition into CaO.

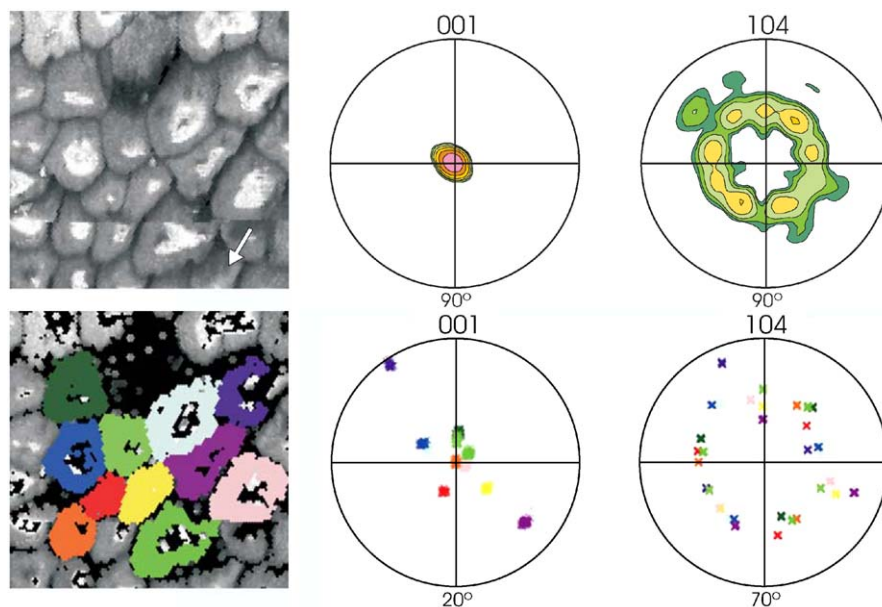


Fig. 2. EBSD pole figures for 001 and 104 reflections of a $100 \times 100 \mu\text{m}$ area of the external surface of a CCP lamella of *O. edulis* (upper left; arrow indicates direction of shell growth). Measurements were taken at $1 \mu\text{m}$ step and only those with a confidence index >0.1 were considered. The upper row shows composite pole figures for the whole area. The 001 pole figure indicates that *c*-axes of prismatic units are preferentially perpendicular to the external surface, whereas the turbostratic distribution of 104 poles (rhombohedron faces) indicates that *a*- and *b*-axes are disoriented. The lower row shows 001 and 104 pole figures for individual prisms. Each prism and its corresponding measurements (also at $1 \mu\text{m}$ step) are indicated by the same color. In both pole figures measurements made on a single prism are fully coincident (mean spread angle = 0.9° , below instrumental resolution = 1°), which implies that prisms are monocrystals.

2.5. Culture specimens

Fully grown specimens of *Ostrea edulis* (10–12 cm in diameter) were induced to regenerate their shell layers by sectioning the upper valve straight at a distance of about 1 cm from the ventral edge. Specimens were later kept in an aquarium. A thin regenerated prismatic lamella was secreted in a matter of hours and recovered after 4–6 days.

We also studied some specimens of *Ostrea edulis* bred in artificial seawater with high magnesium content (Mg/Ca mole ratio 8.3–9.2) for a different research project aiming to reveal the influence of water chemistry in CaCO_3 polymorph secretion. Specimens were maintained in an aquarium between 48 and 56 days and then observed under SEM. Some specimens of *O. edulis* showed abnormalities in calcification, which are also relevant for the present study.

3. Results

3.1. Mineral units

The initiation of prismatic crystals may or may not be subcentral to the organic cells. It is marked by an initial spherulith with an oval to hexagonal outline (Fig. 1B), which is revealed by differential dissolution. Concentric

growth increments reflecting lateral growth of crystals were observed in *Pinna nobilis*, *O. edulis*, *Crassostrea gigas*, *Propeamussium jeffreysii*, *Adamussium colbecki* (Fig. 1C) and *A. ephippium*. SEM-EBSD and XRD texture analyses clearly indicate that the crystallographic *c*-axes of prismatic crystals are preferentially oriented perpendicular to the external shell surface and that their spread is very small (Fig. 2, top center). Disorientation of *a*- and *b*-axes shown in the corresponding pole figures (Fig. 2, top right) indicates that crystals have a turbostratic disposition. SEM-EBSD analyses in different positions on a single prism reveal that there is no change in crystallographic orientation, indicating that each prism is essentially a single crystal (Fig. 2, bottom).

3.2. Thickness of organic interprismatic membranes

Dissolution of calcium carbonate reveals that the interprismatic organic envelopes begin immediately below and in contact with the periostracum (Fig. 3A). Their thicknesses vary among groups. Typical values in oysters are between 2 and $3 \mu\text{m}$ (Fig. 3A), with a maximum of $5 \mu\text{m}$ in *O. edulis*. On the contrary, in Pectinoidea and Anomioidea, thicknesses are always $<1 \mu\text{m}$, usually $0.4\text{--}0.5 \mu\text{m}$. The rest of the groups studied show intermediate values, with the exception of the pseudoligamentary shell area of *P. nobilis* (Fig. 3B), in which we recorded the maximum thickness ($8 \mu\text{m}$). In

Pinctada margaritifera and *Pteria hirundo* thicknesses decrease drastically at a certain level (40–100 µm) below the external surface (from 1.8 to 0.8 µm in *P. margaritifera* and from 0.8 to 0.1 µm in *Pt. hirundo*).

Undoubtedly, interprismatic organic membranes contribute essentially to the bulk organic matter content. In the CCP layer of *O. edulis*, the average value is 4.6% of the total shell weight, while it is of only 1.5% in the underlying foliated layer (in which interprismatic membranes are absent). Values for CCP layers of Pterioidea are similar to those of Ostreoida [*Atrina pectinata*: 2.7%; *Pinctada martensii*: 5.2%; *P. nobilis* (normal CCP layer): 4.3%; *P. nobilis* (pseudoligamentary CCP layer): 6.1%]. Our data coincide with those previously reported [26].

3.3. Cross sectional shape of columnar prismatic units

Neighbouring prismatic units may commonly vary in size and it is frequent to find areas with very different size distributions (Fig. 3C, D, E and F). The number of sides of the polygonal cells is also very variable, from three to eight (Fig. 3D and G). Cell walls are usually straight, but rare curved walls can also be found (Figs. 3C, F and H). A rare instance is the CCP layer forming the pseudoligament of *P. nobilis*, in which calcite crystals display rounded corners, the extra space being filled with organic matter (Fig. 3B). In many instances of *O. edulis*, the adoral (i.e. looking forward) side of the cells is convex in the direction of growth of the shell margin (Fig. 3C, E, F and H). Prisms of Ostreidae sometimes lengthen in the direction of shell growth, both on the external (Fig. 3I) and internal surfaces (Fig. 3E and G).

Frequently, organic lamellae partially intrude the prismatic cell, thus forming an incomplete septum. This has been observed in representatives of all families, except Malleidae. Incomplete membranes found in oyster prisms, which elongate in the direction of shell growth (see above), usually initiate at the rear of

the prism and extend parallel to the elongation axis (Fig. 3G). Drastic irregularities have been recorded locally in *Ostrea puelchana* (Fig. 3I) and in regenerated lamellae of *O. edulis* (Fig. 3K), where organic envelopes lose their typical polygonal shape and transform into interconnected and longitudinally arranged open cells. Some isolated membranes may appear in the center of cells. In this way, the pattern acquires a pseudo-labyrinthine aspect.

3.4. Empty organic cavities

An interesting feature is observed in specimens of *O. edulis* obliged to regenerate the prismatic shell layer as well as in those bred in seawater with a high Mg/Ca ratio. In the first instance, there are either scattered or lumped fully formed cavities in which there is no mineral matter or the calcitic infilling is well below the normal level (Fig. 3H). High Mg/Ca ratios sometimes lead to absence of calcification and the only remains of the CCP layer consist of an empty mesh-like organic fabric (Fig. 3L).

3.5. Columnar prismatic units in longitudinal view

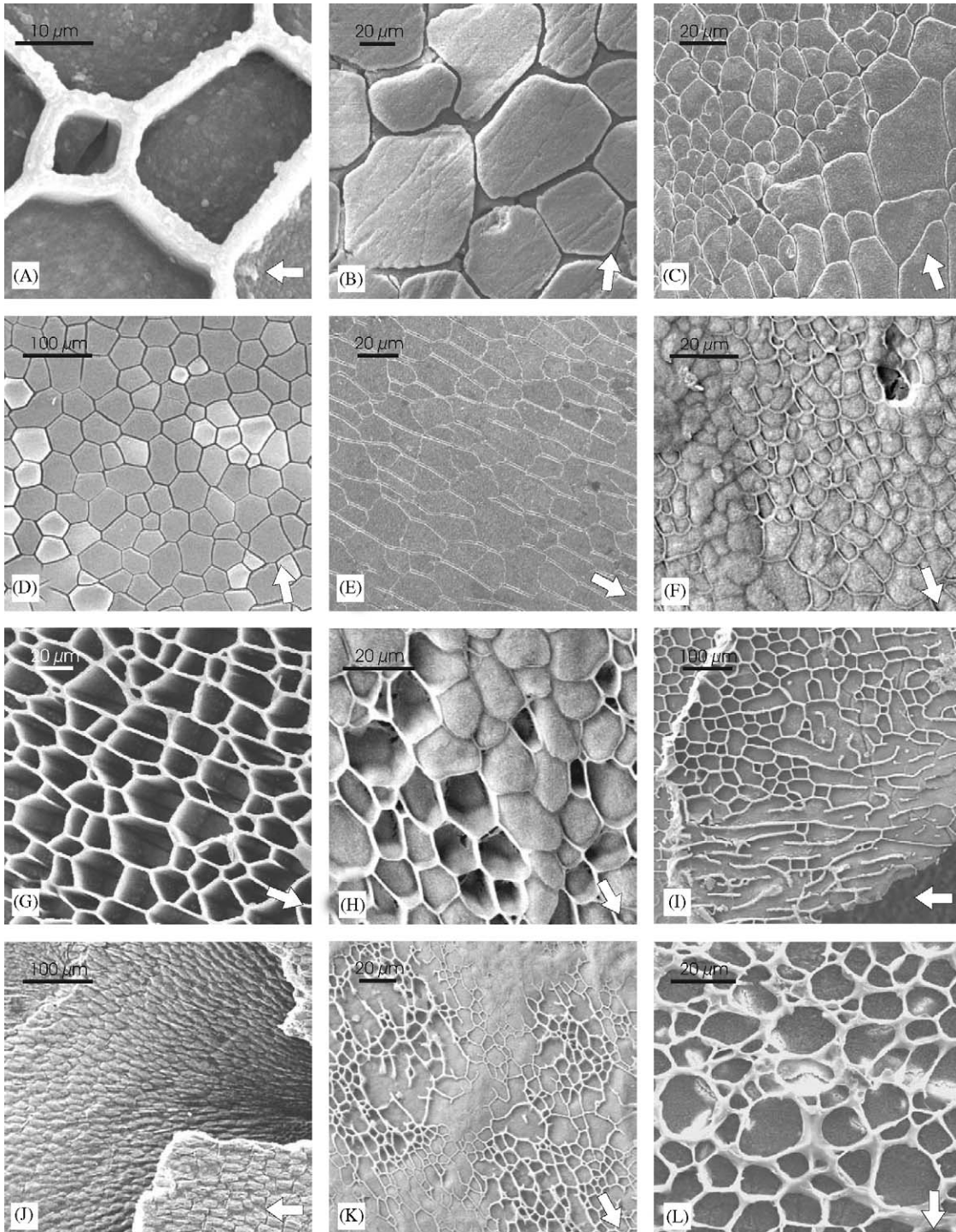
Columnar prisms are straight and perpendicular to the growth surface (Fig. 1A). The only exceptions are some Ostreidae (*O. edulis*, *Crassostrea gigas*, *Saccostrea echinata*) in which it is frequent that the upper part of the columnar units composing the proximal end of the lamellae becomes curved (convex adoralwards or, more rarely, sigmoidal; Fig. 4). The curvature diminishes progressively towards the shell interior and prisms finally become somewhat inclined or perpendicular to the growth surface. There is a zonation of features along each single lamella as the proximal zone is composed of prisms according to the above description, whereas towards the distal areas, only inclined or perpendicular straight prisms are found (Fig. 4). The lamella's more external growth lines wedge out

Fig. 3. (A) External surface of the CCP layer of *O. puelchana* (decalcified with 2% EDTA for 25 min) showing thick organic membranes. (B) Internal view of the CCP layer of the pseudoligament of *P. nobilis*. Treated with 4% EDTA for 10 min. (C) Internal surface of a CCP lamella (proximal area) of *O. edulis* (treated with proteinase K for 1 min). The adoral side of prisms is convex. (D) Internal surface of the CCP layer (ventral shell area) of *P. nobilis* (treated with 4% EDTA for 10 min). (E) Internal surface of a CCP lamella of *O. edulis*, close to the contact with the foliated layer. Treated with proteinase K for 3 min. Prisms elongate in the direction of shell growth and have rounded adoral edges. (F) Internal surface of a regenerated CCP lamella of *O. edulis* showing adoral curvature of organic membranes. Slightly decalcified with 2% EDTA for 10 min. (G) Internal surface of a CCP lamella of *O. edulis* (completely decalcified with 2% EDTA for two days). Organic cells elongate in the direction of growth and there are frequent incomplete membranes intruding the cells from the rear. (H) Internal surface of a regenerated CCP lamella of *O. edulis*. Slightly decalcified with 2% EDTA for 10 min. Organic cavities display varied degrees of infilling with calcite, from empty to completely filled. Adoral edges of organic membranes curve in the direction of growth. (I) Irregular distribution of organic membranes on the external surface of a CCP lamella of *O. puelchana* (etched with 2% EDTA for 25 min). The irregular arrangement of membranes is parallel to the direction of growth. (J) External surface of two consecutive CCP lamellae of *O. edulis* (untreated). The view shows the proximal area of the shell, in which prisms usually elongate in the direction of growth. (K) Internal surface of a regenerated CCP lamella of *O. edulis* showing irregular arrangement of organic membranes. Slightly decalcified with 2% EDTA for 10 min. (L) Internal surface of an anomalously unmineralized CCP lamella (untreated) of a specimen of *O. edulis* maintained in aquarium for 48 days in sea water with an Mg/Ca molar ratio of about 8.4. The lamella is reduced to a thin layer composed of interconnected organic threads. Arrows indicate direction of shell growth.

progressively in the distal direction, indicating that distal prisms correspond to the more internal stages of proximal prisms.

Another peculiarity is that many small units are present near the external surface. The aggregate evolves inward in such a way that some units wedge out until complete disappearance while others coarsen at the expense of the disappearing units (Figs. 1A and 5A).

This is the so-called competitive growth. Nonetheless, we have recorded cases of Ostreidae (Fig. 5B) and Pinnidae in which prisms are fully columnar. In *P. margaritifera* and *P. hirundo* (Fig. 5C) the aspect of prismatic units is tubular up to a certain thickness, in which competitive growth initiates. This boundary coincides with a drastic reduction in the thickness of interprismatic membranes (see Section 3.2).



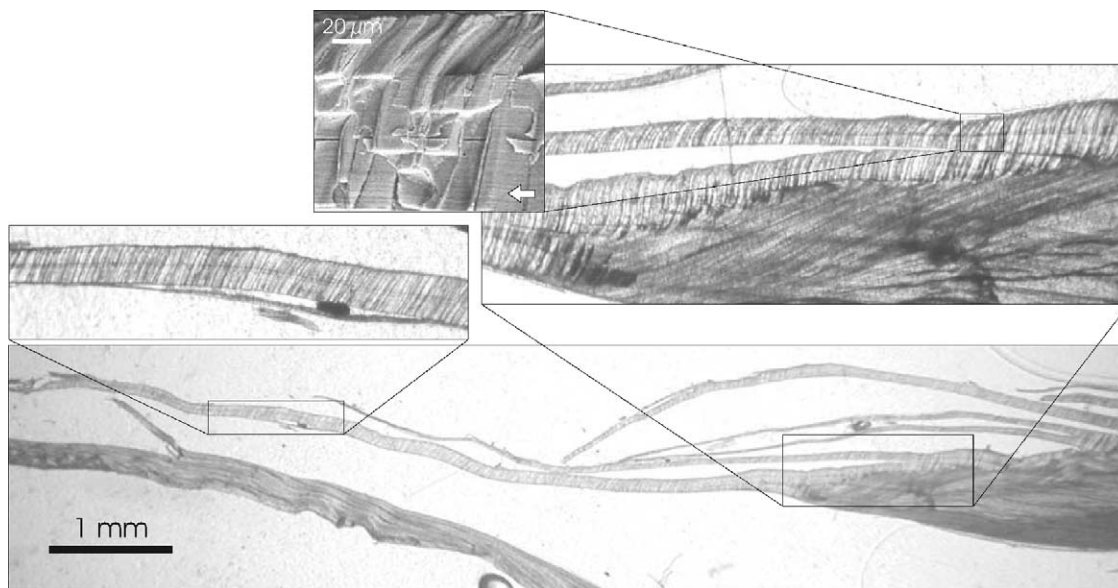


Fig. 4. Sagittal thin section through the edge of a shell of *O. edulis* (right valve to the top). Right inset, detail of the proximal area of two CCP lamellae and their contact with the underlying foliated layer. Lamellae thin in the distal direction and are composed of curved prismatic units. The central inset is a SEM micrograph of a broken CCP lamella of *O. edulis* (treated with proteinase K for 20 min) (arrow indicates direction of shell growth). Left inset, distal part of a lamella; prisms are inclined and straight.

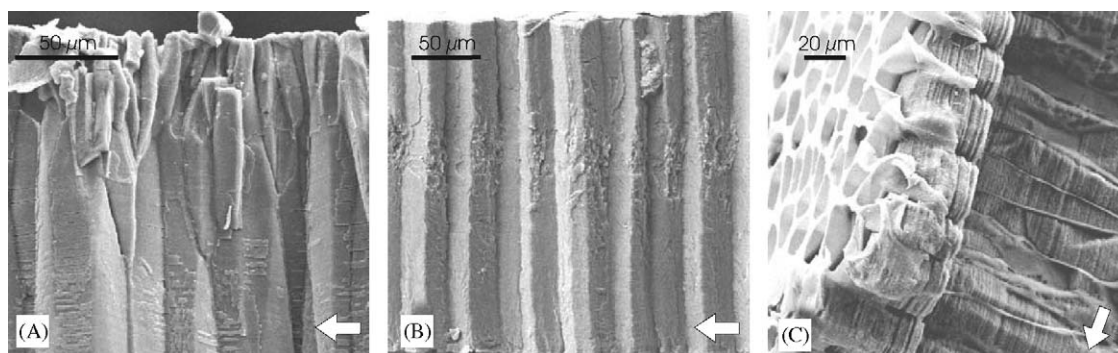


Fig. 5. (A) Transversely broken CCP shell of *P. nobilis* (untreated), Competition for space leads to disappearance of many prismatic units towards the shell interior (bottom). (B) Fractured CCP lamella of *O. puelchana* (treated with proteinase K for 20 min), showing lack of competition. External surface to the top. (C) Fracture through the CCP layer of *P. hirundo* (decalcified with 2% EDTA for 25 min). Prisms are strictly columnar in the external part of the lamella (left) whereas some units wedge out in the lower part, coinciding with a drastic reduction in thickness of the organic membranes. Arrows indicate direction of shell growth.

4. Discussion

4.1. Structure of columnar prismatic crystals

SEM-EBSD data clearly indicate that the calcite crystals inside the prisms are monocrystalline. This is in agreement with the reports of other authors [2–7], based on techniques different from ours. The crystallographic *c*-axes of the individual crystals are aligned perpendicular to the secretion surface. Crystals are rotated around the direction of *c*-axis alignment displaying a (001) fiber texture or turbostratic disposition (Fig. 2). This is not surprising as the calcite *c*-axis is the fastest

direction of growth ($a/c = 1/3.419$) and crystals which are favourably oriented tend to grow faster in the direction in which the mantle episodically leaves free space, i.e., towards the internal or growth surface [12].

4.2. Tempos in the secretion of prismatic crystals and organic interprismatic membranes

One of the most significant results is that organic membranes can originate in the absence of the mineral infilling, as deduced from the existence of empty cavities (Fig. 3H) and complete frameworks solely composed of organic membranes (Fig. 3L). Cuif et al. [5,6] reported

and illustrated how incipient interprismatic membranes antedate mineralization in the forming shell of *P. nobilis*, this stage consisting of very shallow empty organic cavities. From their illustrations, we may deduce that this unmineralized stage extends for at least some 100 μm backwards from the margin and that empty organic cells may attain some 5 μm in height at the onset of mineralization. In our opinion, this may be the normal initiation of the CCP layer in bivalves and implies that the pattern is highly, if not totally, determined by the organic phase.

4.3. Assimilation of the organic framework to a pattern dominated by interfacial tension

Boundaries between prisms in inorganic crystalline aggregates are characteristically irregular and broken (Fig. 6A). They are quite different from the straight or gently curved edges found in shells (Fig. 3). At first sight, the organic membranes have a great influence in modifying what would otherwise be a purely crystallographic pattern.

The contacts between prismatic units observed in actual shells are comparable to polyhedral bubbles formed in foams (Fig. 6B), in which surface tension is the dominant force shaping the pattern. Foam is a gas-in-liquid dispersion in which the liquid occupies less than about 10% of the volume. In ideal foams, bubbles are separated by thin liquid films which join at angles of about 120° to form triple junctions (referred to as Plateau borders). Four edges can only join at a vertex. Foams can be ordered or disordered, depending on whether or not cells have an even size and distribution (Figs. 7A and B). The similarity of bubbles to columnar prisms in cross-section is so evident (compare Figs. 3A, B, D, F–6B) that it is tempting to compare both from the genetic viewpoint as well.

The flat surfaces of the films in foams curve where they join together to form a Plateau border (e.g. [27]). Curvature causes a reduction in pressure on the Plateau border compared to the flat portions of the film. Films

are therefore drained into the Plateau borders by capillary suction, which gives the border a coarsened aspect. Coarsening increases with the mobility of the liquid and the proportion of liquid to air. Interprismatic membranes in CCP layers are only very slightly coarsened (Fig. 3A), which speaks in favour of the high viscosity of the material originally forming them. The only exception is the pseudoligament of *P. nobilis* (Fig. 3B), in which the proportion of organic matter is the highest recorded.

The analogy between CCP patterns and foams can be taken further. We have reported cells in Ostreidae having convex edges in the direction of growth (Fig. 3C, F and H), which can be assimilated to bubbles having a free boundary. This could happen if incipient organic ‘bubbles’ are located for some time at the very edge of the shell. The adoral edge of the cells is then free to bulge outward due to surface tension. The ‘foam’ model implies that cells having rounded edges formed in sequence, contrary to those with straight edges, which have to form simultaneously. In fact, oyster cells with convex edges are observed in the proximal areas of the prismatic lamellae, where the wedge-like pattern of growth lines and the lamellar surface (Fig. 4) implies progressive extrusion of the mantle in the initial stages of secretion of each lamella (Fig. 8A). In this situation, the

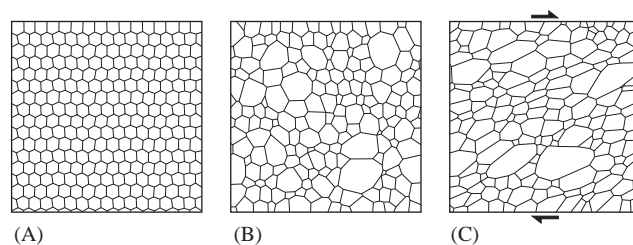


Fig. 7. (A) Structure of an ordered foam. Courtesy of Yi Jiang (Los Alamos National Lab, New Mexico), redrawn from his web page (<http://math.lanl.gov/~yi/foam.html>). (B) Disordered foam. (C) Disordered foam under bulk shear stress. (B and C) are reprinted figures with permission from Jiang Y, Swart PJ, Saxena A, Asipauskas M, Glazier JA. *Physical Review E*, 59, Fig. 7a (left and center), p. 5827 (Copyright 1999 by the American Physical Society).

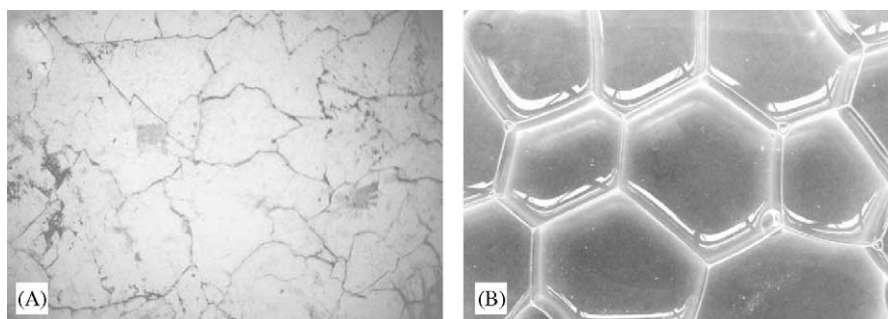


Fig. 6. (A) Thin section of a speleothem cut perpendicular to the calcite prisms (field width is about 5 mm). Contacts between crystals are broken and highly irregular. (B) Aspect of foam developed in soapy water (field width is 5 cm). Walls between bubbles are straight or gently curved and meet at about 120° .

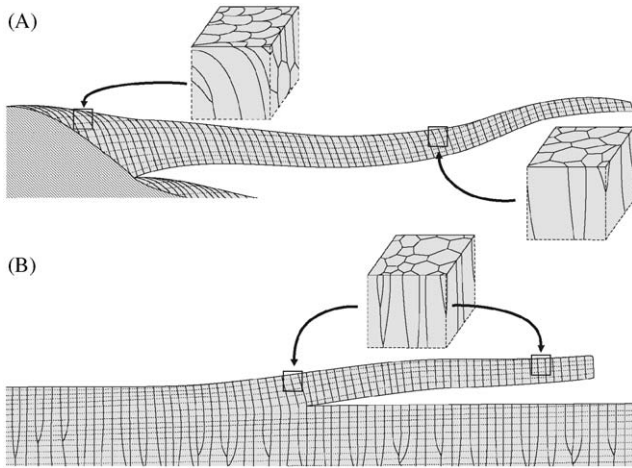


Fig. 8. (A) Mode of formation of CCP lamellae and shell in ostreoids. In the proximal part of the lamella, growth lines form a high angle with the shell surface, which implies progressive extrusion from the shell. Organic cells acquire a rounded (free) adoral edge due to temporal exposure at the margin. Mantle dragging causes curvature of columnar prisms and their elongation in cross-section. In distal parts of the lamella the angle between the mantle and the shell surface is close to zero. Prismatic units produced at this stage have polygonal outlines and are straight. (B) Mode of formation of CCP lamellae and shell in pterioideans. The mantle is extruded “instantaneously” and secretion of the lamella initiates at once. Cells develop polygonal cross-sections and prismatic units are perpendicular to the growth surface. External and internal surfaces of lamellae are indicated by solid lines in block diagrams, while broken lines indicate surfaces cut out from the shell.

forming organic cells have to be placed at the margin for some time, thus having a free-to-bulge adoral margin. In distal areas of the lamella the angle between growth lines and surface of the lamella becomes drastically reduced, such that the delay in formation between successive organic cells is almost negligible. Prismatic units have purely polygonal boundaries here (Fig. 8A). The relationship between growth lines and shell surface in pterioideans implies rapid extrusion of the mantle during formation of the lamella, resulting in the formation of flat edges on the prismatic cells (Fig. 8B).

In the proximal areas of the lamellae of *Ostrea* and *Crassostrea* prisms are frequently curved in the direction of growth when seen from a lateral view (Fig. 4). This could reflect the dragging of the organic cells by the progressively extruding mantle (Fig. 8A).

Evidence that prismatic cells are formed of a deformable material is provided by the frequent observation of areas in Ostreidae in which the cross sections of prisms elongate adorally (Fig. 3E, G and J). This reflects radial tensions exerted by the mantle on the forming organic cells during the process of extrusion from the shell. The viscoelastic behaviour of bubbles leads to the same effect in foams subjected to stresses (Fig. 7C). Longitudinally stretched cells sometimes display incomplete membranes (Fig. 3G) at their rear sides. Since they connect at angles

close to 120° with adjacent walls, they may represent an incomplete stage of either division of a cell or, more likely, breakage of the wall between two cells, probably caused by mantle dragging.

Irregular patterns found in *O. puelchana* (Fig. 3I) and *O. edulis* (Fig. 3K) also show radial arrangements, which indicate influence by mantle extension. They might correspond to areas of abnormally low secretion of organic matter, causing the cells to become incomplete.

4.4. Mode of secretion of interprismatic membranes

Morphological resemblance is not enough to attribute organic cells of CCP layers an origin similar to bubbles. They should also be comparable from the biophysical viewpoint. We argue that, before hardening by polymerization to acquire their present elastic behaviour, recently formed membranes are primarily viscoelastic, in agreement with their origin from mucous secretions of the mantle margin epithelium. Evidence that they are originally deformable is provided for at least Ostreidae (see Section 4.3).

Previous data imply that recently formed, bubble-like organic cells remain empty of calcareous secretions for a short period (see Section 4.2), although they are filled with a low viscosity fluid, the extrapallial fluid (i.e. that between the mantle and the shell) (Fig. 9A). This is an example of two immiscible liquids in which there is a continuous (the fluid precursor of the organic web) and a discontinuous phase (the extrapallial fluid). Such a system is called a liquid–liquid emulsion and the pattern is shaped by interfacial tension. Although we previously compared the pattern formed by organic membranes with foams rather than emulsions, both colloidal systems have similar properties. Therefore, the above discussion on foams still applies. It is important to stress that in the emulsion leading to CCP patterns, the difference in viscosity between the precursor fluid of organic membranes and the extrapallial fluid is comparable to that between liquid and air in foams.

Once mineralization begins within the organic cavities, the growing surfaces of organic membranes and calcite crystals should soon level and, from here on, secretion of both phases proceeds at the same pace (Fig. 9B and C).

Interprismatic membranes may form in two ways: (a) the whole surface of the external mantle epithelium secretes an organic fluid covering its whole surface, which later self-organizes into polygonal cavities by processes of interfacial tension; (b) particular epithelial cells (or portions of them) of the external mantle secrete the walls of interprismatic membranes. Continuation of organic walls between secretion episodes might be achieved by contact recognition. Mechanism (a) is likely to occur in the initial stage of organization of interprismatic walls (Fig. 9A), before the onset of mineralization.

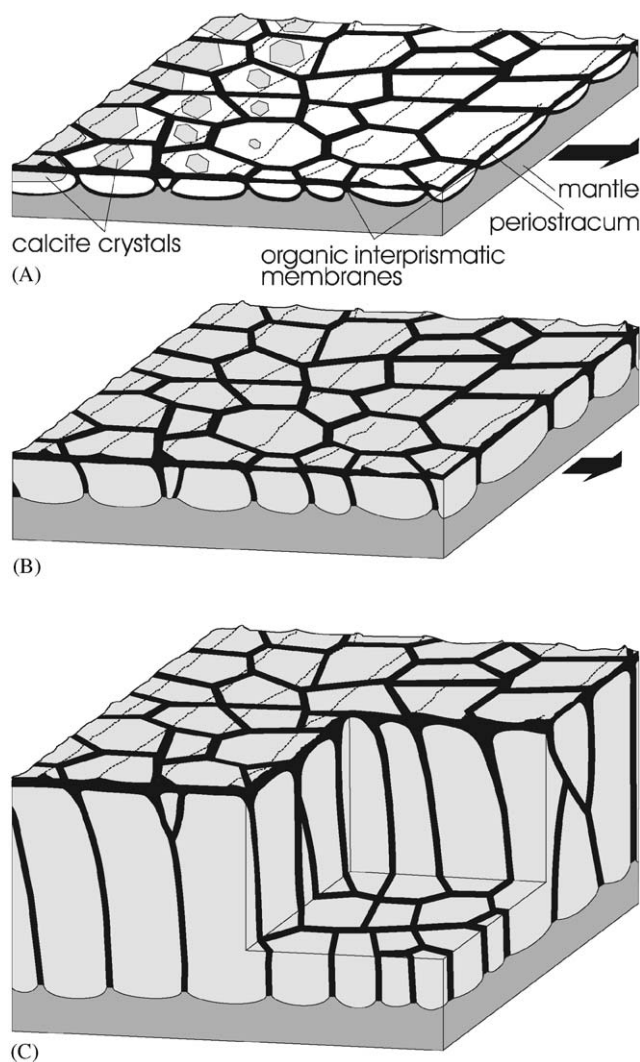


Fig. 9. Proposed mode of formation of CCP layers. (A) The mantle extrudes from the shell and secretes both a viscous organic and an extrapallial fluid below the periostracum. The viscous fluid is organized into polygonal cells by interfacial tension. Mineralization within organic cells is delayed. (B) Growth of the organic and mineral phases level in the initial stages of secretion of the lamella. (C) Once the movement of mantle extrusion ceases, growth of the lamella is essentially in thickness. The diagram is inspired in the case of oysters (see Fig. 8).

Incipient organic interprismatic membranes illustrated by Nakahara and Bevelander [23] in the pteriod *Pinctada radiata* clearly display meniscus-like contacts with the periostracum, thus implying a mechanism as in (a) above. Later, when calcite crystals are already growing, mechanism (b) remains as the only possibility (Figs. 9B and C).

4.5. Competitive growth

Geometrical selection of crystal units due to competitive growth is common in CCP layers (Figs. 1A and 5A) and favours the growth of those crystal units which grow

with their fastest growth direction (the crystallographic *c*-axis) perpendicular to the secretion (mantle) surface. Crystals so oriented intercept and prevent growth of others not so favourably oriented. Finally, only a few homogeneously oriented crystals survive and contribute to the growth surface [12,15].

Competitive growth is seemingly absent in the cases of *O. puelchana* (Fig. 5B) and *Pinna rudis*, both with membrane thicknesses of several μm . Interestingly, competitive growth in *P. margaritifera* and *P. hirundo* (Fig. 5C) initiates after the thickness of organic lamellae has drastically decreased. This suggests that organic membranes may inhibit competitive growth when their thickness increases above a certain value.

5. Conclusions

Although the calcitic columnar prismatic (CCP) microstructure is probably the one seemingly closest to inorganic crystal aggregates, their origins are very different. The observation of both incipient and fully formed organic cavities devoid of mineral infilling implies that organic cavities slightly antedate the formation of mineral infilling and that they are thus the main shaping element. Their morphological pattern is also suggestive of being shaped by interfacial tension. We propose that the CCP layer initiates as a liquid–liquid emulsion formed by an organic viscous or viscoelastic fluid (the continuous phase), deriving from mucous secretions of the mantle margin epithelium, and the extrapallial fluid (the discontinuous phase). Interfacial tension then causes the continuous phase to acquire its typical cavernous pattern. Organic membranes most likely harden by polymerization immediately after their secretion, to acquire their primarily elastic behaviour. Slightly after the formation of incipient organic cavities, growth of calcite monocrystals begins within them, which soon level the secretion surface of organic membranes. From here on, the CCP pattern exhibits competitive growth (sometimes inhibited by particularly thick organic membranes), which is a typical crystalline feature. Note that, contrary to former ideas, our model places the emphasis on the organic phase as the main patterning agent of the CCP microstructure.

Acknowledgements

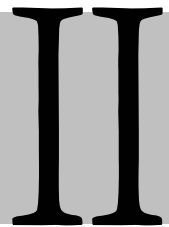
We thank Juana Cano (Centro Oceanográfico de Fuengirola, Málaga) for providing specimens. Encarnación Jurado (Departamento de Ingeniería Química, Univ. Granada) and Alfonso Ontiveros (Departamento de Física, Univ. Jaén) advised on colloidal systems. Comments by three anonymous reviewers and the editor

helped to significantly improve the manuscript. This study was supported by Research Projects BOS2001-3220 and CGL2004-00802/BTE (DGI, MCyT) and by the Research Group RNM190 (CICE, JA).

References

- [1] Bowerbank JS. On the structure of the shells of molluscos and conchiferous animals. *Trans Microsc Soc London* 1844;1:123–52.
- [2] Bøggild OB. The shell structure of mollusks. *Kgl Danske Vidensk Selsk Skrifter, Naturvidensk Math* 9 1930;2:231–326.
- [3] Taylor JD, Kennedy WJ, Hall A. The shell structure and mineralogy of the Bivalvia. Introduction, Nuculacea-Trigonacea. *Bull British Mus (Nat Hist) Zool Ser* 1969;Suppl. 3:S1–S124.
- [4] Dauphin Y, Cuif JP, Doucet J, Salomé M, Susini J, Williams CT. In situ chemical speciation of sulfur in calcite biominerals and the simple prism concept. *J Struct Biol* 2003;142:272–80.
- [5] Cuif JP, Denis A, Raguideau A. Observations sur les modalités de mise en place de la couche prismatique du test de *Pinna nobilis* L. par l'étude des caractéristiques de la phase minérale. *Haliotis* 1983;13:131–41.
- [6] Cuif JP, Dauphin Y, Denis A, Gaspard A, Keller JP. Étude des caractéristiques de la phase minérale dans les structures prismatiques du test de quelques mollusques. *Bull Mus Natl Hist Nat Paris 4^e sér* 1983;5:679–717.
- [7] Dauphin Y. Soluble organic matrices of the calcitic prismatic shell layers of two pteriomorphid bivalves, *Pinna nobilis* and *Pinctada margaritifera*. *J Biol Chem* 2003;278:15168–77.
- [8] Watabe N, Wada K. On the shell structure of Japanese pearl oyster, *Pinctada martensii* (Dunker). I. Prismatic layer. *Report Fac Fish Prefect Univ Mie* 1956;2:227–32.
- [9] Wada K. Electron-microscopic observations on the shell structure of the pearl oyster (*Pinctada martensii*). I. Observations on the calcite crystals in prismatic layers. *Bull Natl Pearl Res Lab* 1956;1:1–16.
- [10] Wada K. Crystal growth of molluscan shells. *Bull Natl Pearl Res Lab* 1961;7:703–828.
- [11] Dauphin Y. Comparison of the soluble matrices of the calcitic prismatic layer of *Pinna nobilis* (Mollusca, Bivalvia, Pteriomorpha). *Comp Biochem Physiol A* 2002;132:577–90.
- [12] Checa AG, Rodríguez-Navarro A. Geometrical and crystallographic constraints determine the self-organization of shell microstructures in Unionidae (Bivalvia: Mollusca). *Proc R Soc London B* 2001;268:771–8.
- [13] Carter JG. Environmental and biological control on bivalve shell mineralogy and microstructure. In: Rhoads DC, Lutz RA, editors. *Skeletal growth of aquatic organisms*. New York: Plenum; 1980. p. 69–113.
- [14] Carter JG. Guide to bivalve shell microstructures. In: Rhoads DC, Lutz RA, editors. *Skeletal growth of aquatic organisms*. New York: Plenum; 1980. p. 645–73.
- [15] Ubukata T. Architectural constraints on the morphogenesis of prismatic structure in Bivalvia. *Palaeontology* 1994;37:241–61.
- [16] Cuif JP, Raguideau A. Observations sur l'origine de l'individualité cristallographique des prismes de *Pinna nobilis*. *C R Acad Sci Paris* 1982;295:415–8.
- [17] Travis DF, Gonsalves M. Comparative ultrastructure and organization of the prismatic region of two bivalves and its possible relation to the chemical mechanism of boring. *Amer Zool* 1969;9:635–61.
- [18] Carter JG. Shell microstructural data for the Bivalvia. In: Carter JG, editor. *Skeletal biomineralization: patterns, processes and evolutionary trends*, vol. I. New York: Van Nostrand Reinhold; 1990. p. 297–411.
- [19] Tsuji T, Sharp DG, Wilbur KM. Studies on shell formation. VII. The submicroscopic structure of the shell of the oyster *Crassostrea virginica*. *J Biophys Biochem Cytol* 1958;4:275–9.
- [20] Galtsoff PS. The American oyster *Crassostrea virginica* Gmelin. *Fish Bull Fish Wildlife Serv* 1964;64:1–151.
- [21] Carriker MB, Palmer RE, Prezant RS. Functional ultramorphology of the dissoconch valves of the oyster *Crassostrea virginica*. *Proc Natl Shellfish Assoc* 1980;70:139–83.
- [22] Carriker MB. The shell and ligament. In: Kennedy VS, Newell RIE, Eble AF, editors. *The Eastern oyster Crassostrea virginica*. Maryland: Maryland Sea Grant College; 1996. p. 75–168.
- [23] Nakahara H, Bevelander G. The formation and growth of the prismatic layer of *Pinctada maxima*. *Calif Tissue Res* 1971;7: 31–45.
- [24] Camprase S, Camprase G, Pouzol M, Lopez E. Artificial dental root made of natural calcium carbonate (Bioracine). *Clin Mater* 1990;5:235–50.
- [25] Atlan G, Balmain N, Berland S, Vidal B, Lopez E. Reconstruction of human maxillary defects with nacre powder: histological evidence for bone regeneration. *CR Acad Sci Paris, Life Sci* 1997; 320:253–8.
- [26] Taylor JD, Layman M. The mechanical properties of bivalve (Mollusca) shell structures. *Palaeontology* 1972;15:73–87.
- [27] Ball P. *The self-made tapestry. Pattern formation in nature*. Oxford: Oxford University Press; 1999.

Origin and expansion of the foliated calcitic layers in pteriomorph bivalves



Origin and expansion of the foliated microstructure in pteriomorph bivalves

Francisco J. Esteban-Delgado⁽¹⁾, Elizabeth M. Harper⁽²⁾, Antonio G. Checa⁽¹⁾, Alejandro B. Rodríguez-Navarro⁽³⁾

⁽¹⁾ Departamento de Estratigrafía y Paleontología, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, Avenida Fuentenueva s/n, 18071 Granada, Spain; fjeste@ugr.es; achecca@ugr.es

⁽²⁾ Department of Earth Sciences, Downing Street, Cambridge, CB2 3EQ, United Kingdom; emh21@cus.cam.ac.uk

⁽³⁾ Departamento de Mineralogía y Petrología, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, Avenida Fuentenueva s/n, 18071 Granada, Spain; anava@ugr.es

Abstract

The ultrastructure of the calcitic prisms of the prismatic shell layers of pteriomorph bivalves was examined by SEM and diffracting techniques. Results indicate that the internal structure of the prisms is noticeably different in between taxa. In species belonging to Pinnidae, Pteriidae and Isognomonidae (Pterioida) prisms are built up with nanometric calcite crystals. On the other hand, pectinids, propeamussids, anomids (order Pectinoida) and ostreids (Ostreoida) have prisms constituted by calcitic laths with micrometric size. These laths are indistinguishable from those constituting the foliated microstructure. Additionally, in almost all cases, there is mineral continuity from the prisms to the underlying foliated layer, this being confirmed by X-ray texture analyses. These findings confirm the previous assumption that the foliated microstructure derived from calcitic prisms, particularly from those with internal foliated structure. The appearance of the foliated microstructure facilitated drastic mineralogical and microstructural changes in pteriomorph shells such as the development of rigid shell margins and the production of largely calcitic shells. Such changes have, no doubt, contributed to the evolutionary success of the groups, with a pronounced diversification over time.

Keywords.- Biomineralisation, Calcitic layers, Evolution, Prismatic microstructure, Foliated microstructure, Shell, X-Ray diffraction.

Resumen

La ultraestructura de los prismas de las capas prismáticas de los bivalvos pteriormorfos fue examinada por medio del SEM y de técnicas de difracción. Los resultados indican que la estructura interna de los prismas es notablemente diferente entre los taxa. En especies pertenecientes a Pinnidae, Pteriidae e Isognomonidae (Pterioida) los prismas están constituidos por cristales nanométricos de calcita. Por el contrario, pectínidos, propeamússiidos, anómidos (orden Pectinoida) y ostreidos (orden Ostreoida) tienen prismas constituidos por hojas de calcita de tamaño micrométrico. Esas hojas son indistinguibles de las hojas que constituyen la microestructura foliada. Además, en casi todos los casos existe continuidad estructural desde los prismas hasta la capa foliada subyacente, como lo demuestran los análisis de textura por difracción de rayos X. Estos hallazgos confirman la asunción previa que la microestructura foliada derivó de los prismas calcíticos, particularmente de aquellos con estructura interna foliada. La aparición de la microestructura foliada facilitó drásticos cambios mineralógicos y microestructurales en las conchas de pteriormorfos como el desarrollo de márgenes rígidos y la producción de conchas ampliamente calcíticas. Tales cambios sin duda han contribuido al éxito evolutivo de los grupos, con una pronunciada diversificación a lo largo del tiempo.

Palabras clave.- *Biom mineralización, Capas calcíticas, Evolución, Microestructura prismática, Microestructura foliada, Concha, Difracción de rayos X.*

Manuscript

Introduction

Early bivalves built wholly aragonitic shells consisting of an external prismatic layer and a middle and an inner nacreous layers (Taylor, 1973). This primitive prismato-nacreous shell is retained by some extant groups, such as nuculoideans, trigonioids, unionoids and most anomalodesmatan families (Taylor, 1973; Carter, 1990; Cope, 1997) whose origins extend far back into the Paleozoic. However, the majority of bivalves have developed new ways to organize their shells. In many bivalves new aragonitic microstructures (crossed lamellar, complex crossed lamellar and homogeneous) evolved and in a smaller number of taxa the ability to secrete calcite in their shells, namely prismatic and foliated microstructures has been acquired (Bøggild, 1930; Taylor, Kennedy & Hall, 1969, 1972; Kennedy, Taylor & Hall, 1969; Carter, 1980; Carter, 1990). The distribution of calcitic shell layers within the Bivalvia is interesting. Calcitic microstructures have only formed continuous layers in epifaunal taxa (Carter, 1980) and within these in only four higher taxa, namely the Eupteriomorphs (*sensu* Waller, 1998), the Hippuritoidea (the extinct rudists) and some mytiloid and chamoids (Carter, 1980; Harper, 1998). Within infaunal taxa, calcite is restricted to patches within otherwise aragonitic shells (Carter, 1980; Carter, Barrera & Tevesz, 1998).

The only extant taxon with representatives possessing major calcitic layers is the Pteriomorphia. Within this subclass, although the Arcoida are known to be wholly aragonitic, calcitic shell structures have been developed sporadically within the Mytiloidea, where it occurs as fibrous prisms in the outer shell layer, and universally within the Eupteriomorpha (*sensu* Waller, 1998), where it occurs as prisms and, or foliae. Other calcitic microstructures, such as chalk and vacuolar microstructures in ostreoids or fibrous prisms in pectinoids and limoids have been reported but none makes continuous shell layers.

We consider that there have been two key events in the evolution of calcitic layers within the Eupteriomorpha: (1), the development of an external layer of prismatic calcite, and (2), the development and extension of foliated layers.

The most primitive eupteriomorph calcite microstructure is prismatic, first appearing in the Middle Ordovician in the Ambonychiidae and Pterineidae (Carter, 1990; Cope, 1996). These prismatic layers are always found on the external surface of the shell with individual prisms arranged nearly perpendicular to the shell surface and surrounded by organic envelopes (also called organic walls). These organic envelopes give the prismatic

layers a relatively high organic content. Indeed, values reported by Taylor & Layman (1972) and Checa, Rodríguez-Navarro & Esteban-Delgado (2005) are higher (4-6%) than for other molluscan shell microstructures, providing a high degree of flexibility to prismatic parts of the shell, in particular the ventral margin.

The foliated microstructure comprises parallel and overlapping calcitic flat laths with typical arrow-pointed endings which are inclined at a small angle (2° - 3°) to the shell surface. The arrangement of the laths can be very variable and there have been described several sub-types of foliated microstructure on the basis of the disposition of the laths (see Taylor *et al.*, 1969; Kennedy *et al.*, 1969 and Carter, 1980 for morphological descriptions and Checa, Esteban-Delgado & Rodríguez-Navarro, in press for crystallographic structure of foliated microstructure). By contrast to prismatic calcite, foliated microstructure contains very little organic matrix, with measured values ranging from 0.4% to 1.5% of the weight (Taylor & Layman, 1972; Checa *et al.* 2005). Foliated layers have been shown to be low density and weak in most mechanical tests, compared to other molluscan microstructures (Taylor & Layman, 1972). The earliest eupteriomorph reported to possess foliated layers is the Upper Devonian pectinoid *Sabaropteia pareyni* (Sharopteriidae) which had a largely calcitic foliated shell (Pareyn, Termier & Termier, 1971). From this time on, foliated layers became more widely distributed, appearing in all ostreoids, pectinoids and limoids (Carter, 1990) and, in some instances, making up an increasing proportion of the shell.

Despite the obvious interest of the evolution and expansion of foliated shell layers to the debate on the development of calcitic shells, there has been little research. As far as we are aware there have been just two hypotheses to explain the appearance of foliated calcite. The first one, attributable to Taylor (1973: 526), suggests that foliated layers are the result of a direct mineralogical transformation from nacre. However, although both structures have a laminar disposition of crystallites, there are no mineralogical, structural or crystallographic features in common. On this basis this hypothesis seems unlikely to be correct. The second hypothesis is that of Waller (1976) and implies that the foliated microstructure is derived from the calcitic prismatic layer. He based his hypothesis in the facts that (1) both layers share the same mineralogy, and that (2) the foliated layer is always developed below a prismatic layer (although in many groups the primitive prismatic layer has been secondarily lost). Later Carter (1990) followed the hypothesis of Waller (1976) about the origin of the foliated microstructure but pointed out that it could have developed either directly or indirectly through intermediate fibrous prismatic, spherulitic prismatic or homogeneous grades depending on the groups (Carter 1990: 256). There is obviously a

third possibility, that the foliated layer is just a new microstructure unrelated to any other pre-existent shell layer.

Our study specifically examines the relationship between the two main calcitic microstructures of eupteriomorph bivalves (prismatic and foliated) on the basis of their ultrastructural arrangement. To do this we have undertaken the study of the ultrastructure of prisms with special emphasis on the transition between layers in representative groups of pteriomorph bivalves by SEM and diffracting techniques.

Material and methods

Shell fragments of about 1 cm² from the ventral area of the shell of a variety of eupteriomorph species (listed in Table 1) were prepared for SEM. Fragments were mounted on 12.5 mm aluminium stubs oriented so to allow either the study of the inner most surface of the shells, or the fractured edge. Samples were bleached with NaClO (3.5 % for 1-10 min) or treated with proteinase K buffer according to the protocol described by Shiao *et al.*(1999) (1 mg/ml, 5-30 min) to remove the organic matter, namely the organic walls of the prisms. In some instances samples were slightly etching with HCl (0.5-1% for 5 s-1min). Samples were either sputtered with carbon on a Hitachi UHS evaporator for FESEM (LEO GEMINI-1530) observation, or covered with gold on a Polaron E 5000 for conventional SEM (LEO GEMINI 1430VP and FEI Quanta 400) observations.

The three-dimensional orientation of the crystallites (texture) of the prismatic lamella and the underlain layers, either foliated or nacreous was measured near the transition with a Bruker Smart Apex X-ray diffractometer with area detector working in reflection mode with the following parameters: 50 kV, 30 mA, $2\theta=20^\circ$, $\omega=10^\circ$, Mo-K_α radiation. Samples were oriented with the growth direction in $\varphi = 0^\circ$ and rotated 180° around φ in 3° steps. The resulting collection of frames is a record of the positions of the main reflections of the calcite (Debye rings) for any of the φ -angles considered. The frames were analysed with specially designed software (XRD2DScan) in order to determine the position of the main reflections of calcite and aragonite and to represent them as counter plots. Analyses were made on both sides of the prismatic lamella immediately before the transition and in the underlying layer, either nacreous or foliated, 1 mm after the transition. Texture analyses are represented as 006 and 104 pole figures for calcite reflections in prismatic and foliated layers, and as 002 and 112 pole figures for aragonite in nacre. Since samples were all set with the surface normal to the φ axis of the diffractometer, the centre of the pole figures coincides with the normal to the sample surface.

<i>Taxon</i>	<i>Locality</i>
Superfamily Pterioidea	
Family Pteriidae	
<i>Pteria hirundo</i> (Linnaeus, 1758)	Fuengirola (Málaga), SE Spain
<i>Pinctada martensii</i> (Dunker, 1872)	Uwajima city, Ehime prefecture (Japan)
Family Malleidae	
<i>Malleus Malleus</i>	locality unknown
<i>Malleus regulus</i>	Turkey, locality unknown
Family Isognomonidae	
<i>Isognomon legumen</i> (Gmelin, 1791)	Cape d'Aguilar, Hong Kong
Superfamily Pinnoidea	
Family Pinnidae	
<i>Pinna nobilis</i> (Linnaeus, 1758)	Agua Amarga (Almería), SE Spain
<i>Atrina pectinata</i> (Linnaeus, 1758)	Fuengirola (Málaga), SE Spain
<i>Atrina serrata</i> (Sowerby, 1825)	Sarasota, Florida
Superfamily Ostreoidea	
Family Ostreidae	
<i>Ostrea edulis</i> Linnaeus, 1758	Mariculture Center PEMARES (Huelva), SE Spain
<i>Ostrea puelchana</i> d'Orbigny, 1842	Southern Atlantic, locality unknown
<i>Crassostrea gigas</i> (Thunberg, 1793)	Lochgilphead, E Scotland
Superfamily Pectinoidea	
Family Pectinidae	
<i>Adamussium colbecki</i> (Smith, 1902)	Signy Island, Antarctic Peninsula
Family Propeamussiidae	
<i>Propeamussium dalli</i> (Smith, 1885)	Maldives Islands
<i>Propeamussium jeffreysii</i> (Smith, 1885)	Josephine Bank, NE Atlantic
<i>Propeamussium sibogai</i> (Dautzenberg & Bavay, 1904)	Philippines, locality unknown
Superfamily Anomioidea	
Family Anomiidae	
<i>Anomia ephippium</i> Linnaeus, 1758	Fuengirola (Málaga), SE Spain
<i>Anomia chinensis</i> Philippi, 1849	Cape d'Aguilar, Hong Kong

Table 1. List of species studied in this work.

Results

a) Prisms ultrastructure

We have found that, although constant within families, the observed ultrastructure of prisms varied between the higher taxa investigated.

In pinnoids and most of the pterioids (those belonging to the Pteriidae) the observations of either intact or treated prisms have not revealed any internal organization or structure (Figs. 1A, B). In such prisms we have only found growth lines and, in some cases, zigzag traces produced by microboring organisms, whereas the growing surface of the prisms is smooth (Figs. 1C, D). In slightly acid etched prisms of *Isognomon legmen* (Isognomonidae) there were narrow fissures forming a reticule engraved over the growing surface of the prisms (Fig. 1E). High magnifications revealed that the growing surface of the prisms is composed of small crystalline units with nanometric size (Figs. 1F, G). Such nanocrystals have rhombohedral habit and are disposed with their crystallographic axes and faces commonly oriented forming a parallel aggregate (Fig. 1G).

By contrast in most representative species of the orders Pectinoida and Ostreoida (families Propeamussiidae, Pectinidae, Anomiidae and Ostreidae) observation of fractured prisms showed a clear internal structure consisting of a remarkable foliation (Figs. 2A-E). This foliation is nearly perpendicular to the main axis of the prisms in *P. dalli*, *P. jeffreysii* (Fig. 2D), *P. sibogai* and *A. colbecki* (Fig. 2C), while in *O. edulis* (Fig. 2A), *C. gigas* (Fig. 2B) and *A. ephippium* (Fig. 2E) the foliation is oblique (30°, 30° and 45° respectively). The growing surface of the prisms reveals a substructure formed by small leaves or laths covering their entire surface (Figs. 2F-L). The laths are chevron shaped or squared (less frequently), with straight and well defined outlines (Fig. 2L), although in some cases they appeared to be worn. Laths are usually juxtaposed side by side forming *folia* which extend laterally all over the prism surface. Laths are all evenly aligned within each prism, although this direction is not coincident between prisms.

The prisms of the two representatives of the pterioid family Malleidae (both of the genus *Mallens*) showed a foliation similar to that of ostreoids and pectinoids. Foliation was visible in both intact or in treated samples and is disposed transversal to the prism, i.e., subparallel to the growing surface (Fig. 1H). The inner surface of the prisms had lathy crystals with micrometric size (Fig. 1I).

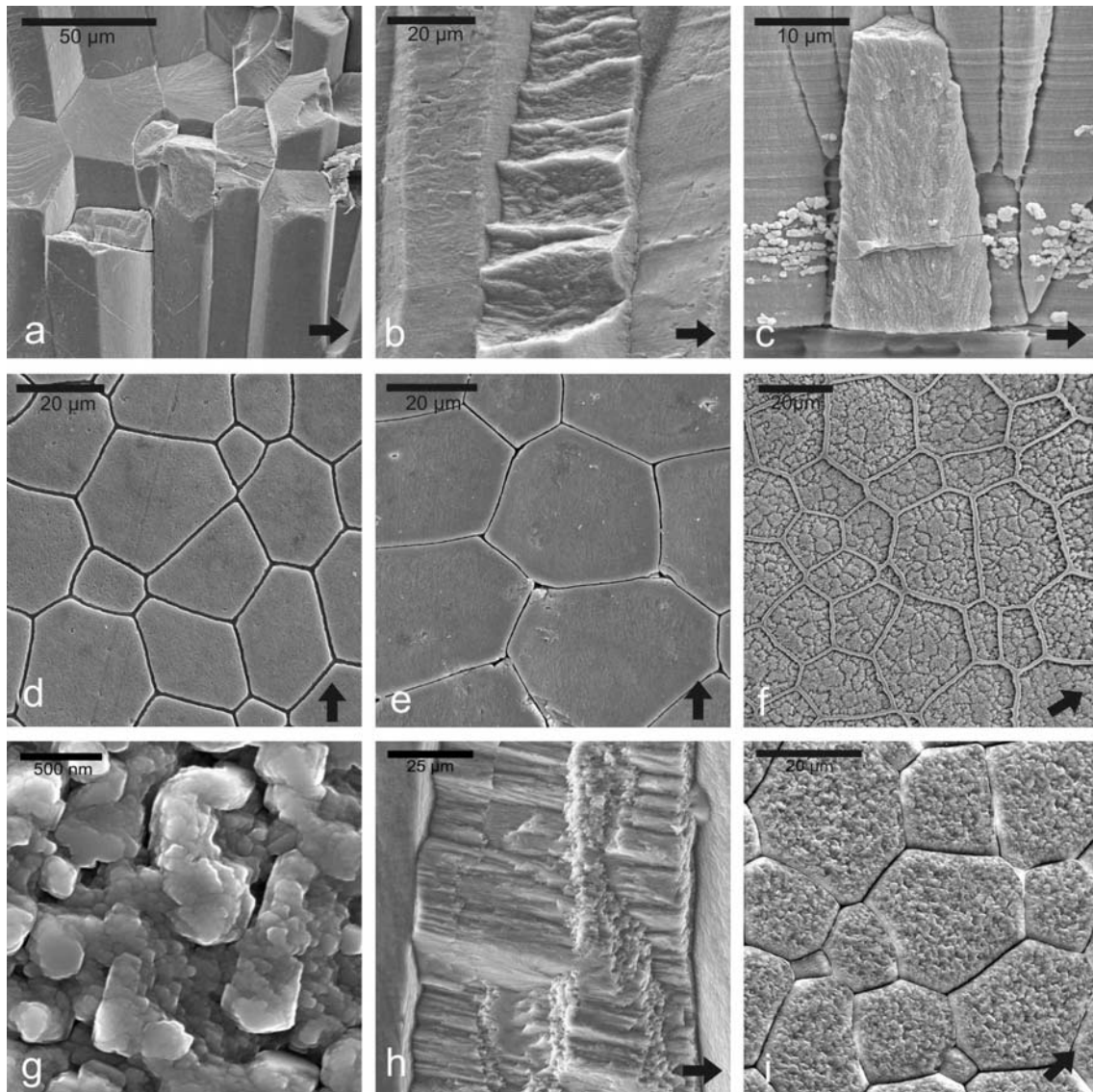


Figure 1. (A) Fractured prisms of *Atrina serrata* showing the absence of appreciable internal ultrastructure. (B) Detail of a fractured prism of *Pteria hirundo*. Horizontal bands in neighbouring prisms are growth lines. Organic envelopes removed with proteinase K. (C) Fractured prism of *Isognomon legumen*. The prism does not show any particular internal structure. (D) Internal surface of the prismatic layer of *Isognomon legumen* displaying regular surface in the growth front of the prisms. (E) Inner view of the prismatic layer of *Atrina serrata*. (F) Internal view of slightly etched prismatic layer of *Isognomon legumen*. Etching reveals narrow fissures which form a reticulate engraved over the growing surface. Sample treated with HCl (0.1%) for 1 min. (G) High resolution image of the inner surface of a prism of *Pinctada martensii*. The prism is built with nanometric crystals with rhombohedric habit. All crystals have their faces and crystallographic axes commonly oriented forming a parallel aggregate. (H) Fractured prism of *Malleus malleus* showing a

b) Transition between prismatic and underlying layers

The transition between the prisms and the underlying nacre of pteriids and pinnids starts with the production of an organic pellicle which lines the prism surface (Fig. 3A). This pellicle first appears over the interprismatic walls and then extends towards the prism centre, until it covers the entire surface (Fig. 3A). Nacre crystals nucleate in the depressed

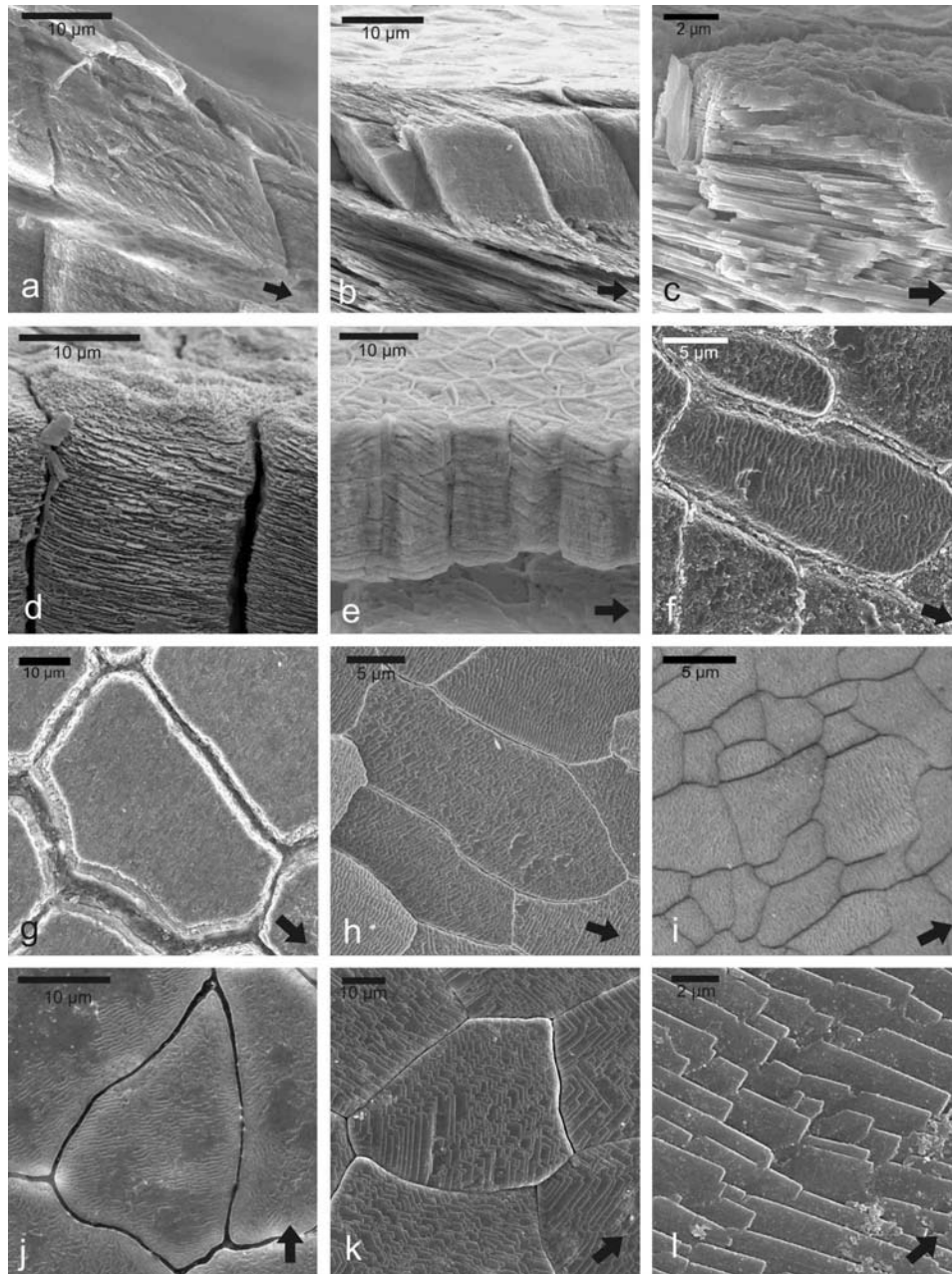


Figure 2. (A) Cross sectioned prism of *Ostrea edulis* showing the internal foliation oblique to growth lines. Sample slightly etched with HCl (1%, 5 s). (B) Fractured prisms of young *Crassostrea gigas*. The uppermost part of the prisms is foliated and the foliated layer can be seen below. (C) High magnification of a prism of *Adamussium colbecki*. The internal foliation present in the prism is similar to the foliation of the underlying foliated layer. (D) Detail of a prism of *Propeamussium jeffreysii* which shows a delicate foliation nearly parallel to the prism surface. The organic envelopes have been removed. Prisms are slightly etched with HCl 0.5% for 2 min. (E) Fractured prismatic layer of *Anomia ehippium* with a marked foliation oblique to the surface of the prisms. External surface at the top. Organic envelopes removed with NaClO for 4 min and slightly etched with HCl 1% for 5 s. (F) Internal surface of the prisms of *Ostrea edulis* showing the folia emerging in parallel to the cross-sectional elongation of the prism. Organic matter partially removed with proteinase K for 10 min. (G) Inner surface of the prismatic layer of *Ostrea puelchana*. Folia are present in the surface of the prisms although they are hardly visible due to the natural corrosion. Untreated sample. (H) Internal view of the prisms of *Crassostrea gigas* with foliated laths lining the surface. Organic matter was removed by bleaching the sample for 30 min. (I) View of the inner surface of the prismatic layer of *Anomia ehippium*. The folia have different orientation in each prism. (J) Internal view of the prisms of *Propeamussium sibogai* showing the foliation over their surface. (K) Internal surface of the prisms of *Propeamussium dalli* with foliated laths all over the surface. (L) Detail of the foliated laths in the prisms of *Propeamussium dalli*. Laths have identical morphology to those of the foliated layer.

interprismatic walls over the organic pellicles, from where they first invade the prisms edges and finally the central area of the prisms until creating a continuous layer (Fig. 3A). In *Malleus regulus* the contact between the nacreous and the prismatic layer is sharp but there is no intermediate organic pellicle as in pteriids and pinnids. The organic walls of the prisms are usually lost prior to the production of the nacreous layer, thus forming a rather continuous calcitic mass (Fig. 3B). In the pectinoids and ostreids the transition between the prismatic layers and the underlying layers of foliae is defined by the interruption of the organic envelopes at the end of the prisms (Figs. 2C, 3C, D, E), whereas the mineral matter is continuous from one layer to another. The laths in the foliated layer inherit the orientation of the laths inside the prisms. When the folia inside the different prisms have the same orientation there is a gentle changeover of layers with the foliated being perfectly right from the beginning (Fig. 3C and D). However, when different prisms have their folia differently oriented the underlying foliated layer displays disoriented bundles of folia making a rather uneven transition (Fig. 3E).

Views of the internal surface of the shell reveal that the transition between layers happens due to a progressive covering of the organic envelopes of the prisms by the foliae (Figs. 3F and G). The organic envelopes are not homogeneously covered and there appear organic remnants embedded in the incipient foliated layer (Fig. 3F small arrow) as well as semi-covered cells (Fig. 3G and H).

In *P. dalli* and *P. jeffreysii* (Fig. 3I) there is an intermediate organic sheet separating both layers, so there is not mineral continuity between layers.

c) XRD texture analyses

In *P. nobilis*, *P. hirundo*, *M. malleus* and *M. regulus* both sides of the prismatic lamella have fibre texture with the *c*-axis (006 poles) as fibre axis disposed normally to the lamella surface. 104 poles have a turbostratic distribution indicating that the *a*- and *b*-axes of different prisms are freely rotated around the *c*-axis (Fig. 4A).

In *P. sibogai* and *O. puelchana* the external side of the prismatic lamella also has a fibre texture. However, in the internal side of both species, close to the transition to the foliated layer, the 104 poles are grouped in three discrete maxima (displaying a sheet texture) which implies that prisms in that area have their crystallographic axes commonly oriented. In *P. sibogai* the three 104 pole maxima are relatively wide suggesting that the *a*- and *b*-axes are scattered to a certain degree.

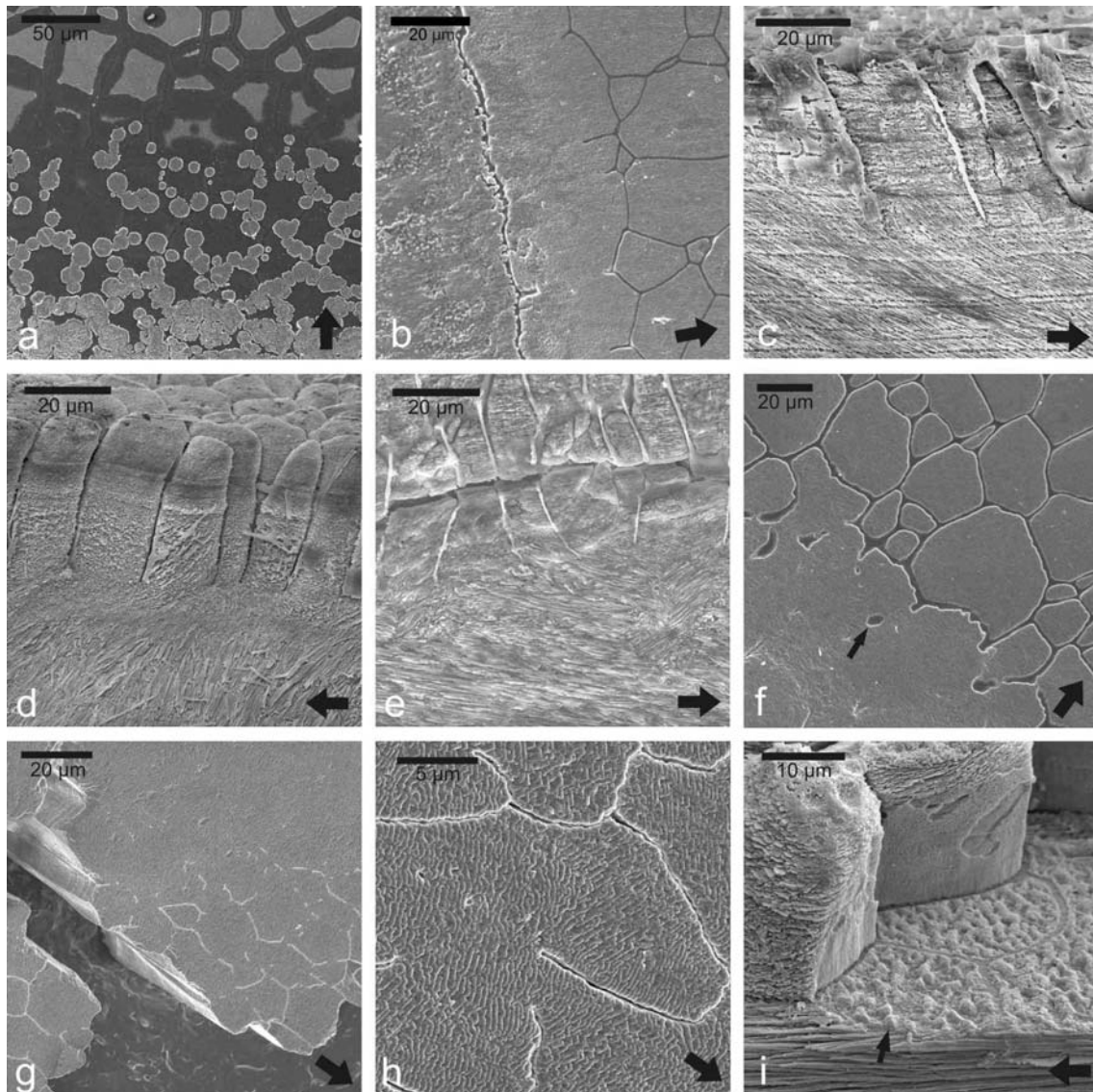


Figure 3. (A) Transition from the prismatic (top) to the nacreous layer (bottom) in *Pinctada martensii*. The transition starts with the production of an organic sheet (in black) which first extends over the prisms organic walls and thence over the entire surface of the prisms. After that nacre crystals nucleate over the organic sheet and coalesce until making a continuous front. (B) Zone of contact of the prismatic layer (right) and the nacreous layer (left) in the left valve of *Malleus regulus*. Organic envelopes disappear about 20 μm before the nacre creating a band of continuous calcite. (C) Polished fracture through the transition from the prismatic to the foliated layer in *Ostrea edulis*. There is mineral continuity throughout with the folia of the prisms identically oriented that those of the underlying foliated layer. Sample slightly etched with HCL 1% for 5 s. (D) Fractured prismatic layer of *Crassostrea gigas* showing the continuity between layers. Organic envelopes completely removed with NaClO for 3 min and later slightly etched with HCL 1% for 5 s. (E) View of the transition area of *Ostrea edulis*. The foliated layer progressively covers the prismatic layer. Small arrow shows an uncovered fragment of the organic walls. Untreated specimen. (G) Internal surface of the right valve of *Crassostrea gigas* at the transition area showing the progressive blurring of the organic envelopes. Sample bleached for 30 min. (H) Close up of (G). The organic envelopes (completely removed by the treatment) are partially covered by the

Texture analyses of the underlain layers are shown in Fig. 4B. Results from the nacreous layer are similar in all species and hence we only show pole figures of *M. regulus*. Disposition of the 002 poles indicates that nacreous tablets have the *c*-axis laying normal to the surface. 112 poles are grouped in four incipient maxima which indicates that the *a*- and *b*-axes of aragonite crystals are well aligned, with the *b*-axis oriented in the local direction of growth of the shell margin. The texture of the incipient foliated layer was analysed in *P. sibogai* and *O. puelchana*. This was found to be typical of this material with three well individualized 104 pole maxima (sheet texture), one of them facing the direction of growth, and the 006 poles reclined about 30° opposite to this direction. In the two species analyzed the texture of the foliated layer is therefore very similar to that of the prismatic layer previous to the transition, the only difference being the shifting of the 006 and 104 pole maxima of the foliated layer opposite to the growth direction (Fig. 4).

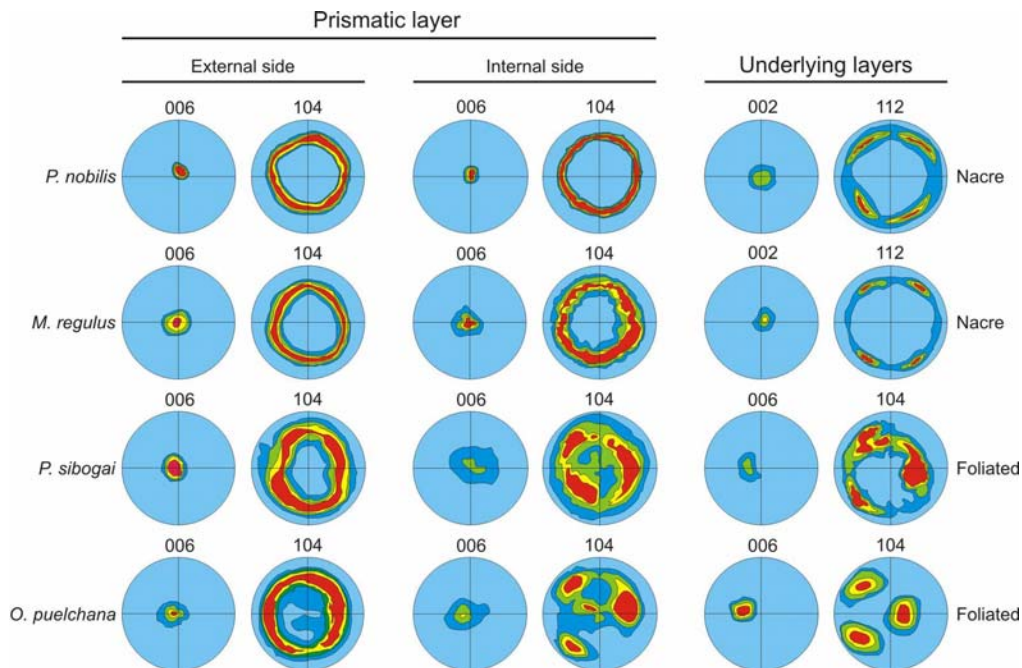


Figure 4. X-Ray diffraction texture analyses of the prismatic layer and the underlying nacreous and foliated layers of several pteriomorph species. In the prismatic layer the 006 poles indicate that the *c*-axis of the calcite lays normal to the surface of the prismatic lamella and hence *a*- and *b*-axes are disposed parallel to the surface in all species analysed. Disposition of 104 poles indicates that the external surface has always fibre texture and that the *a*- and *b*-axes are freely rotated around the *c*-axis. Texture is also fibrous in the inner surface of *Pinna nobilis* and *Malleus regulus* which indicates that crystallographic arrangement of the prismatic layer does not change substantially during layer growth. On the other hand, the inner side of *Propeamussium sibogai* and *Ostrea puelchana* has a sheet texture, as is denoted by the three discrete 104 pole maxima. This means that the crystallographic arrangement of the layer drastically changes during growth, with a realignment of the crystallographic axes in the *a*-*b* plane. In the nacreous layer of *Malleus regulus* the 112 poles are distributed in four discrete maxima which denotes that nacreous crystals have a common crystallographic orientation (sheet texture). In *P. sibogai* and *O. puelchana* the 104 poles are grouped in three

Discussion

a) Ultrastructure of prisms and foliated layer

We have showed that the prisms of the eupteriomorph families Pectinidae, Propeamussiidae, Anomiidae and Ostreidae are in fact made up of a foliated microstructure. This is evidenced by the internal foliation present in the prisms and by the morphology of the constituent laths with the characteristic arrow pointed endings in both prisms and foliated layer. These results agree well with the observations made by Travis & Gonsalves (1969) on decalcified prisms of *Crassostrea virginica*. These authors found that the intraprismatic organic matrix of *C. virginica* was composed of sheet-like compartments in which the inorganic calcite crystals are deposited (see their figures 9-11 and 17-19). Those compartments are perfectly ordered in brick-like rows with a thickness of approximately 150 nm. Such compartments are in fact the organic pellicles which surround the individual laths or *folia* within the prisms. The existence of these pellicles was described by Tsuji, Sharp & Wilbur (1958) precisely in the foliated layer of the same species.

X-ray texture analyses confirm that mature foliated prisms have the same texture, or crystallographic arrangement, as the foliated layer. Therefore, taking into account the structural and crystallographic similarities between prisms and foliated layer and the fact that the foliated microstructure is usually developed below a prismatic layer, we confirm Waller's hypothesis that foliated microstructure is derived from calcitic prisms (Waller, 1976). Recent work by Checa *et al.* (in press) stated that the crystallographic arrangement of representatives of five families of bivalves (Ostreidae, Pectinidae, Propeamussiidae, Anomiidae and Placunidae) is identical, with the main surfaces of the *folia* being coincident with the {108} rhombohedral faces and the *c*-axis reclined opposite to the growth direction. This similarity strengthens the argument for a similar origin for the foliated layer in all pteriomorph groups that bears it (Pectinoida, Ostreoida and Limoida). Based on Waller's (1976) hypothesis, Carter (1990: 256) suggested the possibility that the foliated layer could have evolved either directly from calcitic prisms or indirectly through intermediate grades of fibrous prismatic, irregular spherulitic prismatic and/or homogeneous structure. Our unpublished results indicate that the fibrous prisms of the internal ribs of propeamussids, and probably all the fibrous prisms of pectinoids and limoids, have the same crystallographical arrangement as the foliated microstructure, and are totally different to the "typical" fibrous prisms (e.g. those of the external calcitic layer of *Mytilus edulis* Linné, 1758). This implies that fibrous prisms of propeamussids are probably mere variations of the calcitic *folia*, and therefore, the occurrence of gradations

prisms-fibrous prisms-folia is perfectly reasonable. However, our observations indicate that the transition between the prisms and the foliated microstructure is direct without intermediate grades

The foliation which we observe in the prisms of ostreids or pectinoids can not be an artefact resulting from the sample preparation procedures since it is invariably present in treated and untreated samples. However, Suzuki & Uozumi (1981) found a substructure of fine sheet-like crystals in etched prisms of *Pinctada fucata martensii* at some 45° of the long axis of the prisms. That substructure is probably the result of the dissolution of the calcite along the {104} rhombohedral faces.

The reticule present in the inner surface or the prisms of *Isognomon legumen* is identical to the “organic sinuses” described by Dauphin (2003) in *Pinctada*, who identified these sinuses as intraprismatic organic sheets which delineate crystallographic domains within the prisms.

Texture analyses have shown that the crystallographic arrangement of the “non-foliated” and foliated prisms is noticeably different, with the later developing sheet texture at the growing surface of the lamella (inner side). However it is necessary to point out that the attainment of the sheet texture is progressive and depends on the thickness reached by the prismatic lamella (Esteban-Delgado FJ, Checa A & Rodríguez-Navarro A. Unpublished data). This explains the better definition of the 104 pole maxima in *O. puelchana* (prisms length 300 µm) compared to *P. sibogai* (100 µm) (see Fig. 4A), even though both species have foliated prisms.

In pteroids prisms and nacre are separated by an organic sheet and there is no continuity between layers. Initial nacre tablets grow over the organic sheet with the *a*- and *b*-axes totally disoriented. With the accumulation of successive lamellae nacre tablets become commonly oriented in a competitive process (Checa & Rodríguez-Navarro, 2005; Checa, Okamoto & Ramírez, 2006). This ordination can not be inherited from the prismatic layer since prisms were totally disoriented previous to the transition (see figure 4). In the case of prisms-folia transition of pectinoids and ostreids, the foliated layer inherits the structural arrangement attained by mature prisms. When the prismatic layer has a good alignment of the laths of the different prisms this is transferred to the foliated layer creating a gentle layer transition (see figure 3C). However, when the prismatic layer has a poor alignment of the laths inside the individual prisms, the foliated layer inherits a poorer organization. In that case, the incipient foliated layer develops a clear disorganization with bundles of *folia* radiating in different orientations from the bottom of the prisms (figure

3E). Nevertheless, the foliated layer soon after develops a good arrangement of its laths and *folia*, all commonly oriented in the direction of growth (figure 3E bottom).

b). Consequences of shell microstructure on valve margin and gross shell morphology

The morphology of the valve margins of bivalved molluscs is critically determined by the nature of the outer shell layers. Extensive and well-developed layers of calcite prisms, which extend ventrally beyond the middle and inner shell layers, have allowed pteriods to possess flexible flange-like margins. This also affects the gross morphology of the shell, tending to produce a flattened shell with low width. The malleids seem exceptional in this respect because the prismatic layer may achieve up to 1 cm in thickness and sometimes represents a much higher volume than the inner nacreous layer (Yonge, 1968). Malleid prisms have huge dimensions with diameters near 100 μm , while organic walls are quite often incomplete, forming open or labyrinthine patterns identical to those described in some oysters, such as *Ostrea puelchana* (Checa *et al.*, 2005). The creation of a flexible flange is not easy to track in the fossil record because it is often unclear how much of the shell's interior is covered by more rigid middle and inner shell layers. It is interesting to note, however, that in the pinnoids, Taylor *et al.* (1969) observed that, of the three extant genera, the surface area of the inner nacreous layer is markedly smaller in successively younger taxa. It would be interesting to test whether there is a trend within the pteriods and pinnoids towards an increase in the width of the flexible flange. The possession of flexible valve margins may confer selective advantage on the pteriods in certain conditions. It allows sealing from ambient conditions, and may have direct advantage in resistance to predators by allowing repair after unsuccessful predation damage (e.g. by crushing decapods or fish) (Vermeij, 1987; Dietl & Alexander, 2005), or by making it difficult to prise apart the valves (e.g. by extra-oral feeding asteroids) (Harper & Morton, 1994).

Those clades which were able to produce foliated microstructure also achieved rigid valve margins and this may have allowed a number of other important morphological modifications. For example, flexible margins are incompatible with the development of voluminous shells since they require almost parallel flat shell margins. By contrast those groups with foliated microstructures have been enabled to build markedly convex valves with greater space for soft parts. Flexible margins are also unsuited for the development of radial folds or ridges and other ornamental features such as spines or tubercles which tend to rigidify the margins (Waller, 1972. See also discussion in Carter, 1990: 234). In some groups replacement only took place in the left valve whereas the right one kept a functional

prismatic layer, as in propeamussids, anomiiids and ostreids. In these animals with ‘flexible-rigid margins’, effective sealing is still possible, as evidenced by oysters with just one flexible valve addressed against the opposite rigid valve.

It seems to us that the evolution of the ability to form foliated shell microstructure in some groups but not in others has opened different pathways for the evolution of shell form and, in particular, different strategies of avoiding damage. However, it is interesting to note that those groups which have retained flexible prismatic layers in both valves, e.g. the pterioids and pinnoids, although they have long evolutionary histories and persist into the Recent, they are today relatively genus-poor families and with a restricted, mostly tropical/subtropical, distribution, whereas the clades with foliated calcite are widespread and have high generic diversities. Indeed, the percentage of families with prismatic layers in both valves have decreased over time, more markedly after the Paleozoic, whereas those which replaced the prismatic layer at least in one valve have increased since then (see figure 5).

c) Evolution and phylogeny of foliated shell microstructure

We propose, on the basis of our ultrastructural analysis, that the ability to secrete foliated calcite is simply acquired by ceasing to lay down the prism organic envelopes in those taxa which possess foliated prisms. The fossil record indicates that calcite prisms first appeared in the external layers of the Middle Ordovician ambonychiids and pterineids (Pterioida) (Carter, 1990). The pteriomorphs later radiated, particularly in the post-Palaeozoic, as they abandoned epibyssate habits to attain new lifestyles such as cementation or free lying (see Skelton *et al.*, 1990). The first foliated shell structures have been recorded in the Upper Devonian Saharopteriidae (Pareyn *et al.*, 1971) some 100 million years after the first appearance of calcitic prisms in the group. Shells comprising extensive foliated layers remained uncommon during the Palaeozoic, being only present in the Saharopteriidae (Upper Devonian – Carboniferous) and Deltopectinidae (Upper Carboniferous – Lower Permian) (Carter, 1990). During the post-Palaeozoic there was a marked increase in the prevalence and importance of foliated shell microstructure, which expanded into middle and inner shell layers within several pectinoid families, the Ostreidae and the Gryphaeidae. Other pteriomorphs (namely pterioids, limoids and some pectinoideans), by contrast, have retained internal aragonitic layers (nacreous and crossed lamellar).

Although it is difficult to accurately estimate the amount of aragonite missing from shells which have been stripped by diagenesis, there is good evidence that foliated calcitic

layers have occupied the space of aragonitic layer in several taxa (e.g. Plicatulidae). There are different opinions as to when this expansion occurred. Carter *et al.* (1998) suggest that in many taxa it occurred during the latest Palaeozoic and early Triassic, but Hautmann (2006) thought that it was actually rather later, in the Late Triassic and Jurassic. The expansion of the foliated layer has also, in some clades, been accompanied by reduction or loss of the external prismatic layer in one (e.g. ostreoids) or both valves (e.g. spondylids and plicatulids), at least in the post-larval shell (see figure 5).

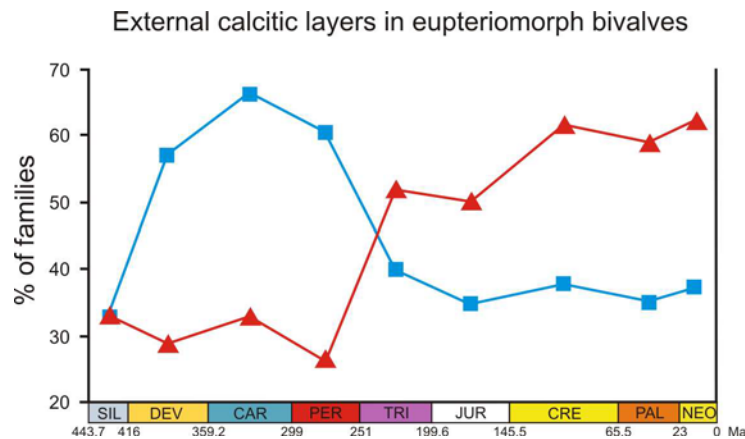


Figure 5. Percentage of eupteriomorphs families possessing external prismatic layers in both valves (squares), and percentage of families which have replaced the prismatic layer by foliated at least in one valve (triangles).

In order to investigate these microstructural changes further we have considered them in the light of recent phylogenetic analyses. The phylogenetic relationships of families within the Pteriomorphia have been subject to some debate as evidenced by the conflicting hypotheses depicted by Steiner & Hammer (2000, Figure 1). These authors used a combined analysis of near-complete 18S rRNA genes and morphological characters to propose a new hypothesis. This scheme has been supported by the combined analysis of Giribet & Wheeler (2002) and Giribet & Distel (2003) and so the following discussion is based on the proposed tree of Steiner & Hammer (2000, figure 8b). Their phylogenetic tree places the Arcoidea and Mytiloidea as basal groups within the Pteriomorphia, with the former as the sister groups to a clade that unites (Plicatuloidea+Anomioidea+Limoidea+Pectinoidea) and Mytiloidea as the sister group of (Pinnoidea + Pterioidea+Ostreoidea). These sister clades comprise the extant members of what Waller (1998) terms the 'Eupteriomorphia' but note that Carter *et al.* (2000) suggest abandonment of this term since they consider the arcoids as derived relative to the pectinoids, pterioids and ostreoids. Steiner & Hammer (2000) noted that the synapomorphy that defines this clade is the

possession of calcitic prisms in the outer shells. Plotting our findings onto this tree reveals that the possession of foliated microstructure is diphyletic (Figure 6). It is apparent that each group independently acquired the ability to secrete this material by the simple transition we propose.

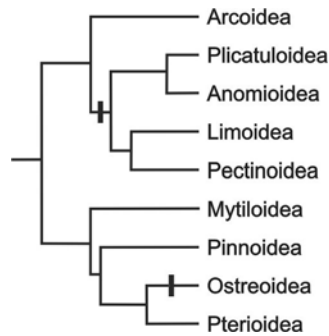


Figure 6. Possession of foliated microstructure plotting onto Steiner & Hammer (2000) phylogenetical tree. This possession seems to be diphyletic according to its presence in two separate clades.

These changes appear to have occurred in parallel trends. For example it is accepted that the most primitive internal layer in pteriomorph bivalves is nacre (Taylor, 1973; Carter, 1990, 2006). Within Pteriomorphia nacre appears in all pterioids (Carter, 1990), in some Paleozoic pectinoids (e.g. Pterinopectinidae) and in early oysters. In pectinoids nacre was replaced by crossed lamellar microstructure, being completely absent in all post-Paleozoic members of the order (Carter, 1990). The crossed lamellar layer constitutes the middle and inner shell layer of limoids, plicatulids, propeamussids and spondylids, but is absent in oysters (see below) (Carter, 1990). In some species the crossed lamellar coexists with foliated microstructure (e.g. anomiiids), but in others foliae occupy almost all middle and inner layers (e.g. pectinids) (Carter, 1990). Oysters followed a seemingly different route since they directly replaced the primitive nacreous layer by foliated microstructure without the intermediate production of crossed lamellar layer (Carter, 1990; McRoberts & Carter, 1994; Hautmann, 2001)

Only pterioids have retained the outer prismatic layer in both valves whereas the rest of the groups have replaced it by foliated layer at least in the left valve. A possible explanation to this could be that pterioids did not develop foliated prisms, and consequently never developed foliated layers. However a few pterioideid families, namely Eurydesmidae (Lower Permian) and Pergamidiidae (Upper Triassic-Lower Jurassic), developed foliated microstructure in their outer layers (Carter, 1990). The position of the

malleids is an interesting one. In their molecular analysis, Steiner & Hammer (2000) found that the two malleid species they included (unfortunately none of the genus *Malleus*) were polyphyletic, yet securely within the Pterioida. It is of note that Hertlein & Cox (1969: N326) included a number of extinct genera with extensive foliated layers (e.g. *Euphemax*, *Heligmina*, *Nayadina*, *Ostreinella*, *Chalmasia*, *Eligmus*) within the Malleidae. However these genera were subsequently excluded from Malleidae and assigned to Ostreidae by Waller (1978; 1985) on the basis of their lack of nacre and the possession of foliated layers and other characteristic features such as chomata, lack of byssal notch and pleurothetic life habit over the left valve. Although malleids have calcitic prisms with lathy structure, they never developed foliated layers.

d) Expansion of foliated microstructure into middle and inner shell layers

It is worth considering what selection pressures may have led to the parallel evolution of expanding the foliated calcite into the middle and inner shell layers. There has been much debate in recent years about the possible reasons for the evolution of calcitic shell layers in the molluscs, and in bivalves in particular. A widespread suggestion, based on the invariability of the first appearance of external calcite layers in both bivalves and gastropods, is that calcitic shell microstructures may be less soluble in seawater which has become unsaturated with respect to calcium carbonate, either because of ambient temperatures or changing sea water chemistry (e.g. Sandberg, 1975; 1983) (Taylor & Reid, 1990, Harper, Palmer & Alphey, 1997; but see Carter *et al.*, 1998; Harper 2000). It is, important however, to separate this discussion from the one which addresses the progressive increase in calcite within the shell with time. There is a significant time lag, of around 250 million years, between the widespread appearance of calcitic outer shell layers in 'eupteriomorphs' and the expansion of foliated calcite into the middle and inner shell layers.

Lowenstam (1954) and Lowenstam & Weiner (1989) argued that secretion of calcite had no adaptive value and was merely the physiological product of lower temperatures. Following this notion, Carter *et al.* (1998) proposed that cold temperatures favoured the development of calcitic layers by kinetically facilitating initial weak controls in calcite production (thermal potentiation). This exposed the genetic basis of calcite production to natural selection and hence allowed the competition calcite vs. aragonite for occupying shell layers. They suggested that once calcitic layers were exposed to selection they evolved in bivalve shells for a variety of selective advantages such as resistance to dissolution;

resistance to chemical boring by algae and gastropods; reduced shell density in swimming and soft-bottom reclining species; enhanced flexibility in prismatic layers and fracture localization and economy of secretion in foliated structures. They argued that the majority of taxa which show an increase in foliated shell layers occur during the Permian and Triassic when lower global sea water temperatures might have triggered the thermal potentiation of calcite. However, Hautmann (2001; 2006) found that the expansion of calcitic shell layers occurred somewhat later, after the Triassic/Jurassic boundary, and points out that newer estimates of global seawater temperature do not support the findings of Carter *et al* (1998). Hautmann (2006) noted that the change correlates with the proposed change between the 'aragonite' and the 'calcite facilitating' sea water conditions (Stanley, 2006). He proposed that during these conditions the manufacture of calcitic shell microstructures has a lower metabolic cost and that this, in particular, favoured their spread in thick shelled taxa. Recent experimental work has demonstrated that changes in sea water chemistry (i.e. Mg/Ca ratio) may influence the mineralogy of the shell in epibenthic bivalves (Checa *et al.* in press). It is however unclear why some families (e.g. spondylids, limids or propeamussids) retained internal aragonitic layers despite having the ability to produce foliated microstructure.

Conclusions

The study of the internal structure of the calcitic prisms of some representatives of the subclass Pteriomorpha (Bivalvia) has revealed noticeable differences between the main groups. The studied members of the order Pterioidea did not show any appreciable ultrastructure in their prisms except for small nanometric units commonly oriented. The only exception was found in Malleidae where prisms had internal lathy crystals. On the other hand, the prisms of Pectinidae, Anomiidae, Propeamussiidae and Ostreidae showed an internal structure made with calcitic laths identical to those of the foliated layer. This implies that the difference between the prismatic and the foliated microstructures in these groups is due to the presence (prismatic layer) or absence (foliated layer) of organic envelopes. The similar constitution of both layers allows us to confirm that the foliated microstructure derived from calcitic prisms, as previously assumed by Waller (1976) and Carter (1990). The foliated microstructure appeared internally to calcitic prisms. This appearance was a key event in the evolution of eupteriomorphs bivalves since it allowed the replacement of primitive flexible prismatic shell margins by rigid foliated margins and the production of largely calcitic shells. This event has no doubt contributed to the

evolutionary success of the group, since those groups which carried out this replacement have suffered a pronounced diversification over time whereas those which retained the prismatic layers in both valves are clearly less diversified.

Acknowledgements

We thank Juana Cano (Centro Oceanográfico de Fuengirola, Málaga), John Taylor (Natural History Museum, London) and Lloyd Peck (British Antarctic Survey) for providing specimens. We are grateful to Peter Skelton (Department of Earth Sciences, Open University) for useful comments on bivalve palaeobiology. José Romero, Alicia González and Isabel Guerra (Centro de Instrumentación Científica, Universidad de Granada) advised on X-Ray texture analyses and SEM procedures. This study was supported by Research Project CGL2004-00802 (DGI, MCyT) and by the Research Group RNM190 (CICE, JA).

References

- Bøggild OB. 1930.** The shell structure of the molluscs. *Det Kongelige Danske Videnskabernes Selskrabs Skrifter, Naturvidenskabelig og Matematisk Afdeling* **2**: 231-236.
- Carter JG. 1980.** Environmental and biological controls of bivalve shell mineralogy and microstructure. In: Rhoads DC, Lutz RA, eds. *Skeletal Growth of Aquatic Organisms*. Topics in Geobiology. New York, London: Plenum Press.
- Carter JG. 1990.** Evolutionary significance of shell microstructure in the Palaeotaxodonta, Pteriomorphia and Isofilibranchia (Bivalvia: Mollusca). In: Carter JG, eds. *Skeletal Biomineralization: Patterns, Processes and Evolutionary Trends, Vol. 1*. New York: Van Nostrand & Reinhold.
- Carter JG, Barrera E, Tevesz MJS. 1998.** Thermal potentiation and mineralogical evolution in the Bivalvia (Mollusca). *Journal of Paleontology* **72**: 991-1010.
- Carter JG, Campbell DC, Campbell MR. 2000.** Cladistic perspectives on early bivalve evolution. In: Harper EM, Taylor, JD, Crame JA eds. *The Evolutionary Biology of the Bivalvia*. Geological Society, London, Special Publications **177**, 47-79.
- Checa A, Esteban-Delgado FJ, Rodríguez-Navarro A. 2006.** Crystallographic structure of the foliated calcite of bivalves. *Journal of Structural Biology* in press.

Checa A, Jiménez-López C, Rodríguez-Navarro A, Machado J. 2006. Precipitation of aragonite by calcite bivalves in Mg-enriched marine waters. *Marine Biology* in press.

Checa A, Rodríguez-Navarro A. 2005. Self-organisation of nacre in the shell of Pterioida (Bivalvia: Mollusca). *Biomaterials* **26**: 1071-1079.

Checa A, Rodríguez-Navarro A, Esteban-Delgado FJ. 2005. The nature and formation of calcitic columnar prismatic shell layers in pteriomorphian bivalves. *Biomaterials* **26**: 6404-6414.

Checa A, Okamoto T, Ramírez J. 2006. Organization pattern of nacre in Pteriidae (Bivalvia : Mollusca) explained by crystal competition. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* **273**: 1329-1337.

Cope JCW. 1996. The early evolution of the Bivalvia. In: Taylor JD eds. *Origin and Evolutionary Radiation of the Mollusca*. Oxford: Oxford University Press.

Cope JCW. 1997. The early phylogeny of the class Bivalvia. *Palaeontology* **40**: 713-746.

Dauphin Y. 2003. Soluble organic matrices of the calcitic prismatic shell layers of two pteriomorphid bivalves - *Pinna nobilis* and *Pinctada margaritifera*. *The Journal of Biological Chemistry* **278**: 15168-15177.

Dietl GP, Alexander RR. 2005. High frequency and severity of breakage-induced shell repair in western Atlantic Pinnidae (Bivalvia). *Journal of Molluscan Studies* **71**: 307-311.

Giribet G, Distel DL. 2003. Bivalve phylogeny and molecular data. In: Lydeard CL, Lindberg DR, eds. *Molecular, Systematics and Phylogeography of Mollusks*. Smithsonian Series in Comparative Evolutionary Biology. Washington and London: Smithsonian Books.

Giribet G, Wheeler W. 2002. On bivalve phylogeny: a high-level analysis of the Bivalvia (Mollusca) based on combined morphology and DNA sequence data. *Invertebrate Biology* **12**: 271-324.

Harper EM. 1998. Calcite in chamid bivalves. *Journal of Molluscan Studies* **64**: 391-399.

Harper EM. 2000. Are calcitic layers an effective adaptation against shell dissolution in the Bivalvia? *Journal of Zoology* **251**: 179-186.

Harper EM, Morton B. 1994. The biology of *Isognomon legumen* (Gmelin, 1791) (Bivalvia: Pterioidea) at Cape D'Aguilar, Hong Kong, with special reference to predation by muricids. In: Morton B. *The Malacofauna of Hong Kong and Southern China III*, 405-425.

Harper EM, Palmer TJ, Alphey JR. 1997. Evolutionary response by bivalves to changing Phanerozoic sea-water chemistry. *Geological Magazine* **134**: 403-407.

Hautmann M. 2001. Taxonomy and phylogeny of cementing Triassic bivalves (families Prospondylidae, Plicatulidae, Dimyidae and Ostreidae). *Palaeontology* **44**: 339-373.

Hautmann M. 2004. Effect of end-Triassic CO₂ maximum on carbonate sedimentation and marine mass extinction. *Facies* **50**: 257-261.

Hautmann M. 2006. Shell mineralogical trends in epifaunal Mesozoic bivalves and their relationship to seawater chemistry and atmospheric carbon dioxide concentration. *Facies* **52**: 417-433.

Hertlein LG, Cox LR. 1969. Family Malleidae. In: Moore RC ed. *Treatise on Invertebrate Paleontology. Part N Mollusca 6 Bivalvia Vol. 1*. Lawrence, Kansas. The Geological Society of America and the University of Kansas Press, N326-N332.

Kennedy WJ, Taylor JD, Hall A. 1969. Environmental and biological controls on bivalve shell mineralogy. *Biological Reviews* **44**: 499-530.

Lowenstam HA. 1954. Factors affecting the aragonite:calcite ratios in carbonate-secreting marine organism. *Journal of Geology* **62**: 284-322.

Lowenstam HA, Weiner S. 1989. *On Biomineralization*. New York: Oxford University Press.

McRoberts CA, Carter JG. 1994. Nacre in an early gryphaeid bivalve (Mollusca). *Journal of Paleontology* **68**: 1405-1408.

Pareyn C, Termier G, Termier H. 1971. Les bivalves ostréiformes du Sahara. *Société Géologique du Nord, Annales* **91**: 229-238.

Sandberg PA. 1975. New interpretations of great salt lake ooids and of ancient non-skeletal carbonate mineralogy. *Sedimentology* **22**: 497-537.

Sandberg PA. 1983. An oscillating trend in Phanerozoic non-skeletal carbonate mineralogy. *Nature* **305**: 19-22.

Shiao JC, Tzeng CS, Leu CL, Chen FC. 1999. Enhancing the contrast and visibility of daily growth increments in fish otolith etched by proteinase K buffer. *Journal of Fish Biology* **54**: 302-309.

Skelton PW, Crame JA, Morris NJ, Harper EM. 1990. Adaptive divergence and taxonomic radiation in post-Palaeozoic bivalves. *Systematics Association Special Volume* **52**: 91-117.

Stanley SM. 2006. Influence of seawater chemistry on biomineralization throughout Phanerozoic time: Paleontological and experimental evidence. *Palaeogeography Palaeoclimatology Palaeoecology* **232**: 214-236.

Steiner G, Hammer S. 2000. Bivalvia inferred from 18S rDNA sequences with particular reference to the Pteriomorpha. In: Harper EM, Taylor JD, Crame JA eds. *The Evolutionary Biology of the Bivalvia*. Geological Society, London, Special Publications **177**: 11-29.

Suzuki S, Uozumi S. 1981. Organic components of prismatic layers in molluscan shells. *Journal of the Faculty of Sciences, Hokkaido University, Ser.IV* **20**: 7-20.

Taylor JD. 1973. The structural evolution of the bivalve shell. *Palaeontology* **16**: 519-534.

Taylor JD, Kennedy WJ, Hall A. 1969. The shell structure and mineralogy of the Bivalvia. Introduction, Nuculacea-Trigonacea. *Bulletin of the British Museum (Natural History), Zoology Series Supplement* **3**: 1-125.

Taylor JD, Layman MA. 1972. The mechanical properties of bivalve (Mollusca) shell structures. *Palaeontology* **15**: 73-87.

Taylor JD, Reid DG. 1990. Shell microstructure and mineralogy of the Littorinidae; ecological and evolutionary significance. *Hydrobiologia* **193**: 199-215.

Travis DF, Gonsalves M. 1969. Comparative ultrastructure and organization of the prismatic region of two bivalves and its possible relation to the chemical mechanism of boring. *American Zoologist* **9**: 635-661.

Tsuji T, Sharp DG, Wilbur KM. 1958. Studies on shell formation VII. The submicroscopic structure of the shell of the oyster *Crassostrea virginica*. *The Journal of Biochemical Cytology* **4**: 275-287.

Vermeij GJ. 1987. *Evolution and scalation: an ecological history of life*. Princeton, New Jersey: Princeton University Press.

Waller TR. 1972. The functional significance of some shell microstructures in the Pectinacea (Mollusca: Bivalvia). *Proceedings of the International Geological Congress 24th Session, Montreal, Canada, Section 7, Paleontology*, 48-56.

Waller TR. 1976. The origin of foliated-calcite shell microstructure in the subclass Pteriomorpha (Mollusca: Bivalvia). *Bulletin of the American Malacological Union, Inc., for 1975*, 57-58.

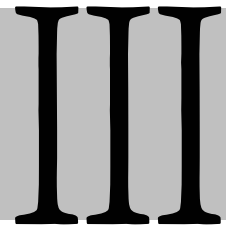
Waller TR. 1978. Morphology, morphoclines and a new classification of the Pteriomorpha (Mollusca: Bivalvia). *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **284**: 345-365.

Waller TR. 1985. Jurassic "Malleidae" and the distinction between Ostreoida and Pterioda (Mollusca: Bivalvia). *Journal of Paleontology* **59**: 768-769.

Waller TR. 1998. Origin of the molluscan class Bivalvia and a phylogeny of major groups. In: Johnston PA, Haggart JA eds. *Bivalves: An eon of Evolution - Paleobiological Studies Honoring Norman D. Newell*. Calgary: University of Calgary Press.

Yonge CM. 1968. Form and habit in species of *Malleus* (including the "hammer oysters") with comparative observations on *Isognomon isognomon*. *Biological Bulletin* **135**: 378-405.

**Crystallographic structure of the
foliated calcite of bivalves**





ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com



Journal of Structural Biology xxx (2006) xxx–xxx

**Journal of
Structural
Biology**

www.elsevier.com/locate/yjsbi

Crystallographic structure of the foliated calcite of bivalves

Antonio G. Checa^{a,*}, Francisco J. Esteban-Delgado^a, Alejandro B. Rodríguez-Navarro^b

^a Departamento de Estratigrafía y Paleontología, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, Avenida Fuentenueva s/n, 18071 Granada, Spain

^b Departamento de Mineralogía y Petrología, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, Avenida Fuentenueva s/n, 18071 Granada, Spain

Received 9 May 2006; received in revised form 22 September 2006; accepted 24 September 2006

Abstract

The foliated layer of bivalves is constituted by platy calcite crystals, or laths, surrounded by an organic layer, and which are arranged into sheets (folia). Therefore, the foliated microstructure can be considered the calcitic analogue to nacre. In this paper, the foliated microstructure has been studied in detail using electron and X-ray diffraction techniques, together with SEM observations on naturally decalcified shells, to investigate the crystallographic organization on different length scales and to resolve among previous contradictory results. This layer is highly organized and displays a coherent crystallographic orientation. The surface of the laths of the foliated layer is constituted by calcite crystals oriented with their *c*-axis tilted opposite to the growth direction of the laths and one of its {10 $\bar{1}$ 4} rhombohedral faces looking in the growth direction. These faces are only expressed as the terminal faces of the laths, whereas the main surfaces of laths coincide with {10 $\bar{1}$ 8} rhombohedral faces. This arrangement was consistently found in all specimens studied, which leads us to the provisional conclusion that, unlike previous studies, there is only one possible crystallographic arrangement for the foliated layer. Future studies on other species will help to ascertain this assertion.

© 2006 Published by Elsevier Inc.

Keywords: Biomineralisation; Microstructure; Shell; Calcite; Foliated layer; Bivalves; Oysters; Scallops; Electron back scattering diffraction; X-ray diffraction

1. Introduction

Foliated microstructure is defined as being composed of blade-like elongate parallel crystals (laths) of calcite with arrow-point endings which coalesce laterally forming laminae (folia) (Fig. 1). The folia dip uniformly over large areas and usually reach the surface of secretion of the shell at a reduced angle. Clear descriptions of the morphology and mode of growth of the foliated layer can be found in Taylor et al. (1969) and Carter (1980).

The foliated layer is particularly frequent in bivalves, where it forms the bulk of the shells of several epibenthic groups (Table 1). It is present in the Middle Cambrian bivalve *Tuarangia* (MacKinnon, 1982; Runnegar, 1985; Berg-Madsen, 1987), but it does not reappear until the

Upper Devonian (in the pectinoid genus *Saharopteria*, e.g., Carter, 1990), from whence it has been increasingly frequent in bivalves.

The typical foliated fabric is also found in some limpets (e.g., Carter and Hall, 1990). Outside the Mollusca, it has been described in cyclostome bryozoans (Taylor and Weedon, 2000) and a similar microstructure (the calcitic cross-bladed lamination; see, e.g., Williams, 1997) also occurs in some articulate brachiopods.

The foliated microstructure has been studied by many authors (see introduction in Runnegar, 1984), but only a few have described the crystallographic orientation of crystals in this microstructure. Fig. 2 summarizes the basic information regarding crystal orientation and the techniques used in previous studies. It can be observed that crystallographic orientations reported by different authors vary substantially and are clearly in conflict with each other. Among these studies, the most comprehensive is that of Runnegar (1984), which comprises several families. This

* Corresponding author. Fax: +34 958 248528.

E-mail address: acheca@ugr.es (A.G. Checa).

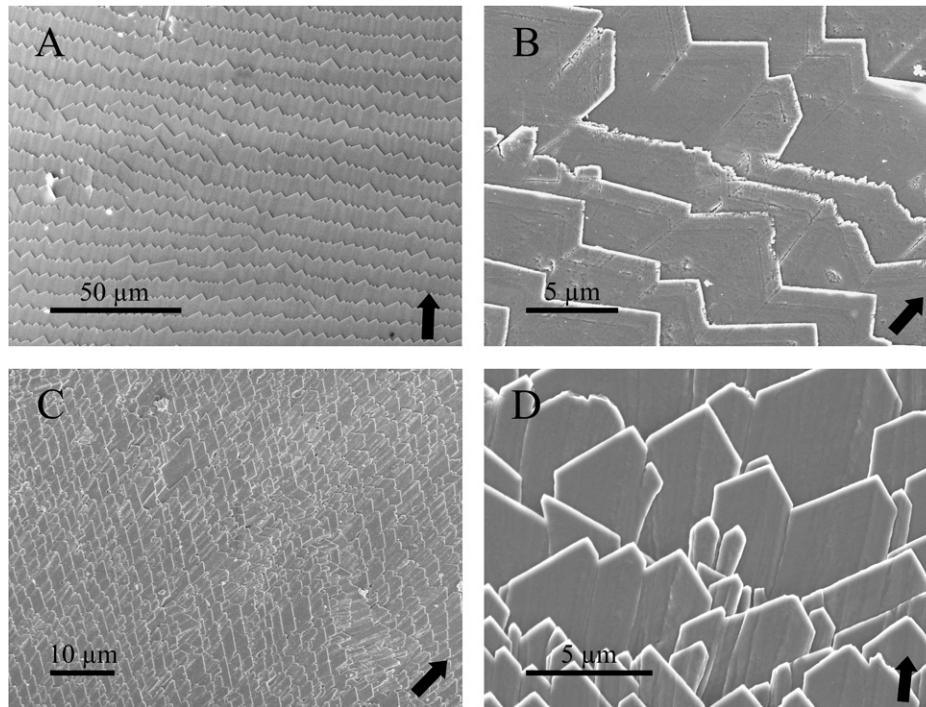


Fig. 1. Surface views of the foliated layers of *A. ephippium* (A and B) and *O. edulis* (C and D) showing the different degrees of coplanarity of laths and development of folia. Arrows indicate growth direction of the shell.

Table 1
Bivalve families with foliated layers

Order Ostreoida
Superfamily Ostreoidae: families Ostreidae*, Gryphaeidae
Superfamily Pectinoidea: families Pectinidae*, Propeamussiidae*, Spondyliidae
Superfamily Anomioidea: families Anomiidae*, Placunidae*
Order Limoida
Superfamily Limoidea: family Limidae

Asterisks indicate the groups studied.

56 author proposes more than one solution within single fam-
 57 ilies (*Ostreidae* and *Pectinidae*) and even species (*Crassos-*
 58 *trea virginica*). This uncertainty could be due either to:
 59 (1) a high variability of the crystallographic properties of
 60 such microstructures or (2) ambiguity in the determination
 61 of the crystallographic orientation resulting from the tech-
 62 niques used. The first possibility is not likely since organ-
 63 isms displaying this microstructure type (i.e., bivalves) are
 64 known to control the orientation and disposition of crys-
 65 tals. This control is exerted by different, genetically defined
 66 factors and results in highly reproducible microstructural
 67 characteristics displayed by organisms belonging to the
 68 same group (Addadi and Weiner, 1992). Regarding the sec-
 69 ond possibility, previous authors have determined crystal
 70 orientation using XRD, TEM, and other types of micros-
 71 copy (OM, AFM). Crystal orientation cannot be precisely
 72 and unambiguously determined based on morphology
 73 alone obtained by optical, scanning electron or atomic
 74 force microscopy. TEM provides much more precise infor-
 75 mation about crystal orientation of a thin sectioned sample

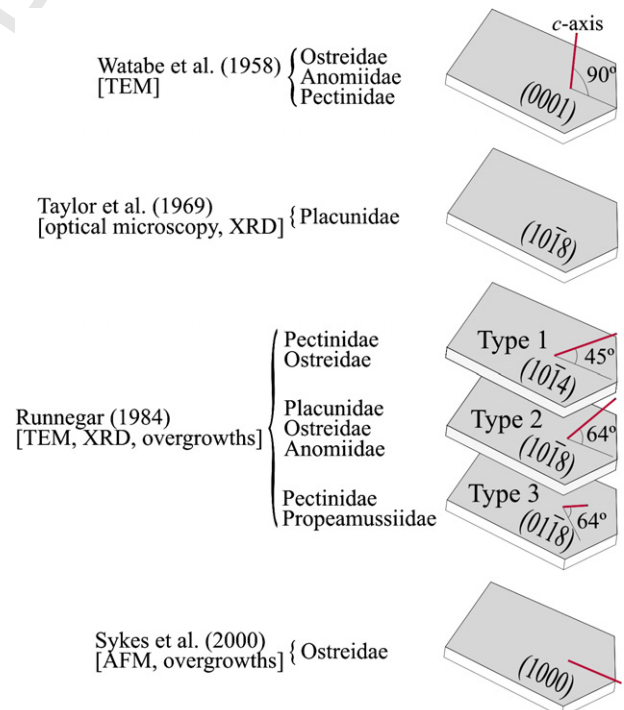


Fig. 2. Interpretations of the crystallography of the foliated layers in previous studies.

by means of selected area electron diffraction (SAED). 76
 Nevertheless, SAED patterns obtained are sections of the 77
 reciprocal space and in order to define the disposition of 78
 the main crystallographic axes, the sample needs to be 79
 cut and oriented adequately (Beeston et al., 1986). Further- 80

81 more, SAED patterns are from a very small sample area
 82 (~0.5 μm in diameter) and only provide information about
 83 the orientation of individual crystals and not about the
 84 long range order of crystals in the shell. Conventional θ –
 85 2θ scans determined by XRD give only limited information
 86 about the preferential orientation of crystals (Rodríguez-
 87 Navarro et al., 2002). To determine the three-dimensional
 88 crystallographic orientation, other techniques are avail-
 89 able, including XRD texture analysis and electron back
 90 scatter diffraction (EBSD). These techniques provide much
 91 more detailed and unambiguous information of the 3-D
 92 disposition of crystals than do the previously mentioned
 93 techniques. They provide the distribution of pole densities
 94 of crystallographic directions needed to define the orienta-
 95 tion of crystals. Additionally, these two techniques are
 96 complementary and give high resolution information about
 97 the organization of crystals on different scales from milli-
 98 meters (XRD texture analysis) to micrometers (EBSD).
 99 While the first technique gives statistical information of
 100 the disposition of crystals in the shell, the second yields
 101 detailed local information about the orientation of individ-
 102 ual crystals. XRD texture analysis has been applied to
 103 study different shell microstructure types (see Chateigner
 104 et al., 2000, and references therein) but not the foliated
 105 microstructure. Our study has been based mainly on the
 106 above mentioned two techniques.

107 The crystallographic structure is a basic ultrastructural
 108 aspect and is a prerequisite for further studies dealing with
 109 morphogenetic, evolutionary-systematic and, even, biomi-
 110 netic aspects. Our study aims to determine the main crys-
 111 tallographic directions of crystals of the foliated layer and
 112 whether there is more than one crystallographic
 113 arrangement.

114 2. Materials and methods

115 2.1. Materials

116 The following species have been investigated: the oysters
 117 *Ostrea edulis* Linnaeus, 1758, *Ostrea puelchana* D'Orbigny,
 118 1842 and *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1873) (Ostreidae),
 119 the scallops *Pecten maximus* Linnaeus, 1758, *Aequipecten*
 120 *opercularis* (Linnaeus, 1758), *Mimachlamys varia* (Linnae-
 121 us, 1758) (Pectinidae), *Adamussium colbecki* (Smith,
 122 1902), *Propeamussium jeffreysi* (Smith, 1885) and *Propea-*
 123 *amussium sibogai* (Dautzenberg and Bavay, 1904) (Propea-
 124 mussiidae), the window-pane shell *Placuna placenta*
 125 (Linnaeus, 1758) (Placunidae), and the saddle shell *Anomia*
 126 *ephippium* (Linnaeus, 1758) (Anomiidae). Except for *O.*
 127 *puelchana*, *A. colbecki*, *Pr. sibogai*, *Pr. jeffreysi*, and *P. pla-*
 128 *centa*, we always observed shells of freshly killed animals
 129 (caught in the Mediterranean coast of Andalucía, Spain).
 130 Specimens of *M. varia*, *P. maximus* and *A. ehippium* were
 131 kept alive for some two weeks in aquaria. Probably due to
 132 the shortage of food, the interior of the valves showed a
 133 delicate dissolution of the constituent crystallites and their
 134 organic envelopes, which revealed its ultrastructure.

2.2. Scanning electron microscopy

SEM observation of nacre crystals was carried out both
 in fractured specimens and in the shell interiors. Samples
 were usually observed intact, although in some we removed
 either the organic [with 5% NaOH for one to two hours or
 proteinase K (1 mg ml⁻¹) from 1 to 20 min] or mineral
 matter (2–4% EDTA) at room temperature. Samples were
 coated either with carbon (UHS evaporator, Hitachi,
 Japan) for FESEM observation (Gemini 1530, Leo, Ger-
 many) and Ultra-high resolution FESEM (S-5200, Hitachi,
 Japan).

2.3. X-ray diffraction

The three-dimensional orientation of the shell crystals
 was determined using an X-ray single diffractometer
 equipped with an area detector (D8 SMART APEX, Bru-
 ker, Germany). For diffraction experiments, the working
 conditions were: Mo K α , 50 KV and 30 mA, a pin-hole col-
 limator of 0.5 mm in diameter, and an exposure time of
 20 s per frame. Shell samples were measured by reflection
 (diffractometer ω and 2θ angles were set at 10 and 20°,
 respectively) without polishing the surface. A set of frames
 (2-D diffraction patterns) was registered while rotating the
 sample around ϕ angle (a frame every degree; a total of 180
 frames). Pole densities for the strongest calcite reflections
 (102, 104, 006, 110, 113, 202, 018, and 116) were calculated
 using XRD2DScan software (www.ugr.es/~anava/xrd2dscan.htm) and displayed in stereographic projection
 using specially designed visualization software. Each pole
 figure displays the intensity variation of a given hkl reflec-
 tion as a function of the sample orientation (Fig. 3). From
 these plots, the 3-D orientation of associated {hkl} crystal
 faces can be observed. Pole figures calculated in this way
 were compared to those measured using a conventional
 X-ray texture diffractometer (D-5000, Siemens, Germany).

Pole figures were registered for *O. edulis*, *O. puelchana*,
P. maximus, *M. varia*, *A. colbecki*, *Pr. sibogai*, *P. placenta*,
 and *A. ehippium* shells.

2.4. Electron diffraction

The electron back scatter diffraction (EBSD) technique
 analyzes the diffraction pattern produced when backscat-
 tered electrons are diffracted by a crystalline material. This
 pattern provides information about the orientation of the
 crystal lattice and the space group of the crystal structure
 (Randle, 2000). Using the scanning capabilities of a SEM
 (XL-30, Philips, The Netherlands), data from different
 positions can be either integrated into an orientation map
 or processed to obtain pole figures, pole plots or rocking
 curves resembling those obtained by X-ray diffraction.
 We have used the same system of representation (stereo-
 graphic projection) as for XRD data. This technique pro-
 vides resolution on a μm scale and is therefore a good
 complement to the broader scale, X-ray-based techniques

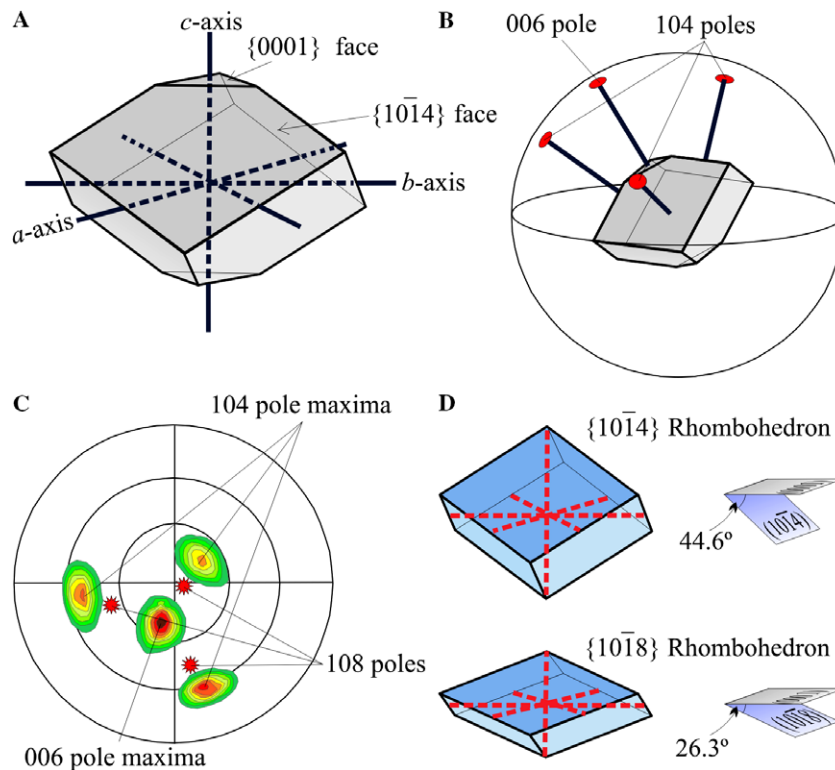


Fig. 3. (A) Schematic drawing of a calcite crystal displaying the spatial arrangement of their main crystal faces, their associated Miller–Bravais indexes and its crystallographic axes. (B) Relative orientation of 001 and 104 poles associated to a {0001} face and three {10 $\bar{1}$ 4} rhombohedral faces. The three {10 $\bar{1}$ 4} faces in the positive part of the c -axis are related by a three fold rotation axis parallel to the c -axis (or $\langle 00.1 \rangle$ pole). (C) Stereographic projection showing the usual aspect of 006 and 104 pole densities in an ordered material. The estimated position of $\langle 10^*8 \rangle$ poles is also shown. This disposition of maxima indicates that calcite crystals are biaxially aligned. (D) Interfacial angle between {0001} and both {10 $\bar{1}$ 4} and {10 $\bar{1}$ 8}.

187 also used. Details about the EBSD technique can be found
188 in, e.g., Randle and Engler (2000).

189 Measurements were made on the inner surface close to
190 the shell margin of *O. edulis*, *P. placenta*, and *A. ephippium*,
191 making sure that the foliated layer was clearly exposed.
192 Samples were analyzed unpolished and only the organic
193 matter was removed from the samples prior to analysis.
194 We measured areas of $25 \times 25 \mu\text{m}$ and a step size of
195 $0.5 \mu\text{m}$ was selected. Despite the absence of any conductive
196 coating, no excessive charging of the specimens was
197 observed and the quality of the patterns was acceptable
198 in almost all cases.

199 3. Results

200 3.1. SEM observations

201 As has been described, folia are composed by adjacent,
202 blade-like laths. The degree of coplanarity of laths and
203 hence the lateral extension of folia varies for different species
204 (Fig. 1). Laths are typically 2–5 μm wide (Fig. 1B and
205 D) and 200–250 nm thick (Fig. 4A) and have arrow point
206 endings, which are sometimes truncated (Figs. 1B and D,
207 4B–D). The surface of laths shows growth lines produced
208 by the advance of their growth fronts (Figs. 1B and 4C).
209 New laths appear either as outgrowths of pre-existing laths

(dendritic growth; Watabe and Wilbur, 1961) (Fig. 4D) or, 210
211 more rarely, by epitaxial nucleation on the surface of pre-
212 vious crystals (Fig. 4E). On the shell internal surface each
213 folium emerges from below at a low angle (usually 2–3°),
214 although there are notable exceptions. For example, in
215 the area close to the shell border of oysters, where the shell
216 thickens rapidly, folia form a wide wedge and meet the
217 secretion surface at angles of 30° or greater. Folia tend to
218 grow in the direction of shell growth, though this direction
219 may vary over specific areas of the shell (Fig. 4E).

220 Specimens of *O. edulis* frequently cease to secrete carbon-
221 ate in particular areas of the shell interior, while organ-
222 ic matter continues to be produced. These areas have a
223 greenish, slightly translucent aspect and stand out on the
224 white foliated background. The transition from the organic
225 layer to the foliated layer is progressive. Sparse, disoriented
226 grains composed of the same material as the normal foliated
227 layer first settle onto the organic layer (Fig. 5). In trans-
228 verse section, they have a spherulithic appearance. Their
229 density increases progressively until they coalesce. The
230 strictly foliated layer begins when the aggregate finally
231 achieves a common orientation (Fig. 5).

232 In aquarium specimens of *Chlamys varia*, *P. maximus*
233 and *A. ephippium*, naturally corroded shells show that laths
234 of the foliated layer have a continuous organic coating and
235 a substructure of tiny rhombohedra, which are evenly ori-

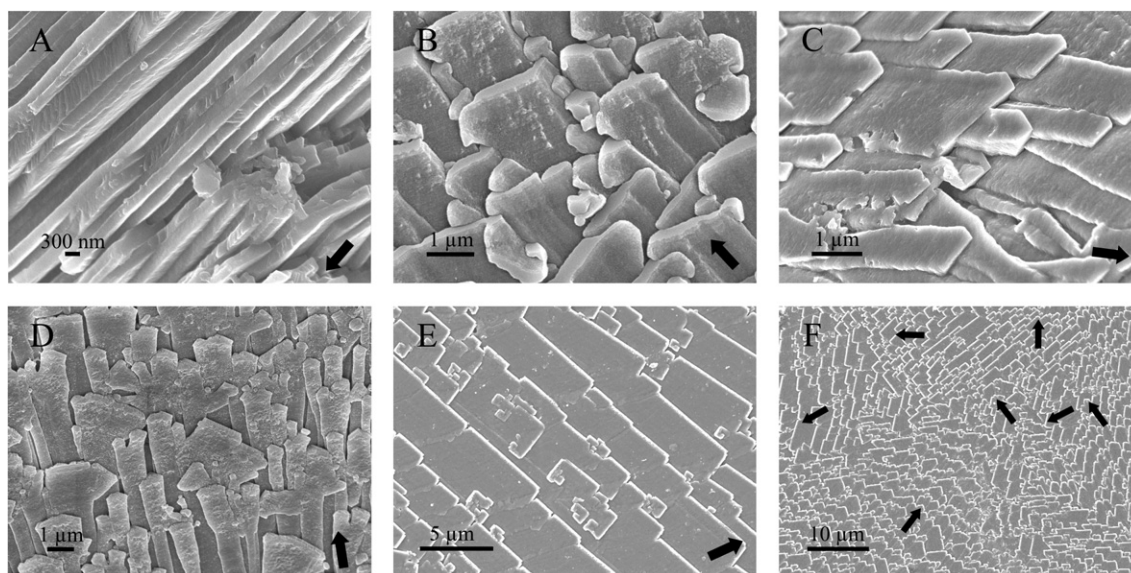


Fig. 4. (A) Cross sectional view of the foliated layer of *O. edulis*. (B) Terminal faces of laths in *C. varia*, some of which can be interpreted as $\{10\bar{1}4\}$ rhombohedral faces. (C) Terminal $\{10\bar{1}4\}$ faces in the foliated layer of *Propeamussium dalli*. (D) Dendritic growth of laths in the foliated layer of *C. varia*. (E) Epitaxial nucleation of new laths in the foliated layer of *O. edulis*. (F) Differently oriented sets of folia in *O. edulis*. Arrows indicate the growth direction of the folia.

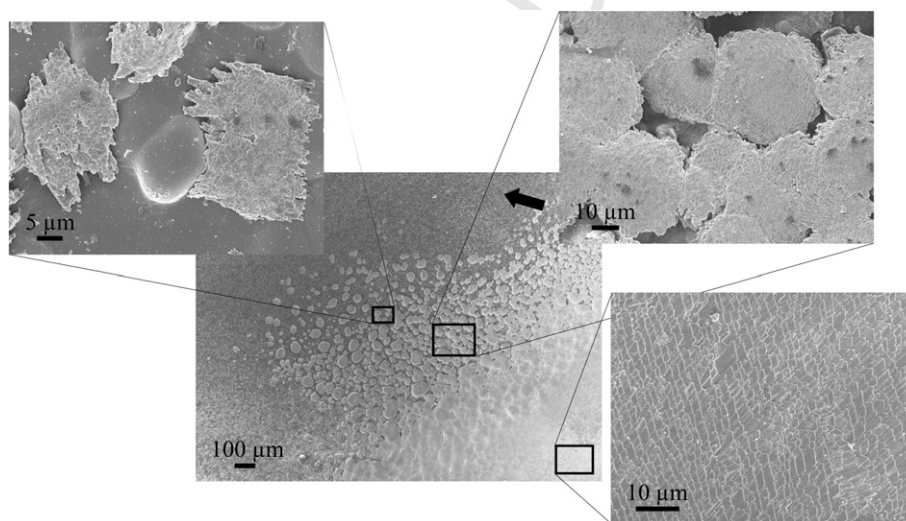


Fig. 5. Transition between an organic layer (dark area in the center micrograph) and the normal foliated layer (white area) on the internal shell surface of *O. edulis*. The process of calcification progresses towards the right bottom side. It initiates with the deposition of isolated and disoriented foliated grains (upper left micrograph); background bulges are calcite rhombohedra formed within the organic layer. When the density and size of grains increases they begin to interact with each other although the whole is highly disoriented (upper right micrograph). The material becomes highly organized shortly after carpeting of the organic surface is completed (lower right micrograph).

236 ented and also co-oriented with those of neighbouring laths
 237 and folia (Fig. 6A and B). The orientation of corrosion
 238 rhombohedra is consistent in the three species examined
 239 and there is always a rhombohedral face (the one which
 240 is the best exposed in plan view) looking in the direction
 241 of growth while the other two are looking backwards. In
 242 lateral view, the face looking forwards is less inclined with
 243 respect to the lath surface than the edge of the faces look-
 244 ing backward. Their outlines form an angle greater than
 245 90° (Fig. 6C).

3.2. X-ray and electron diffraction

Pole figures determined either by XRD or EBSD in the
 different shells analysed are always consistent, so we will
 refer to them without distinction. A selection of samples
 is shown in Figs. 7 and 8. We should stress that 006 and
 001 pole figures determined by XRD and EBSD, respec-
 tively, represent the orientation of $\{0001\}$ crystal planes
 of calcite and are equivalent. In all specimens studied, the
 006/001 pole figures display one single maxima at a vari-

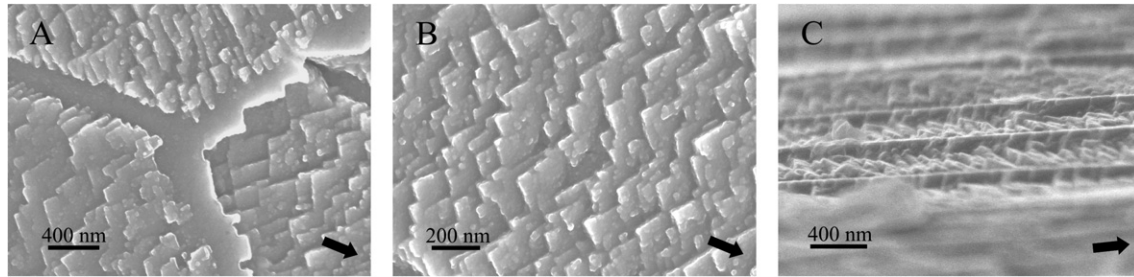


Fig. 6. (A,B) Internal surface of a naturally corroded shell of *A. ephippium*, showing the substructure consisting of aligned $\{10\bar{1}4\}$ rhombohedra. (C) Lateral view of corroded folia of *A. ephippium*.

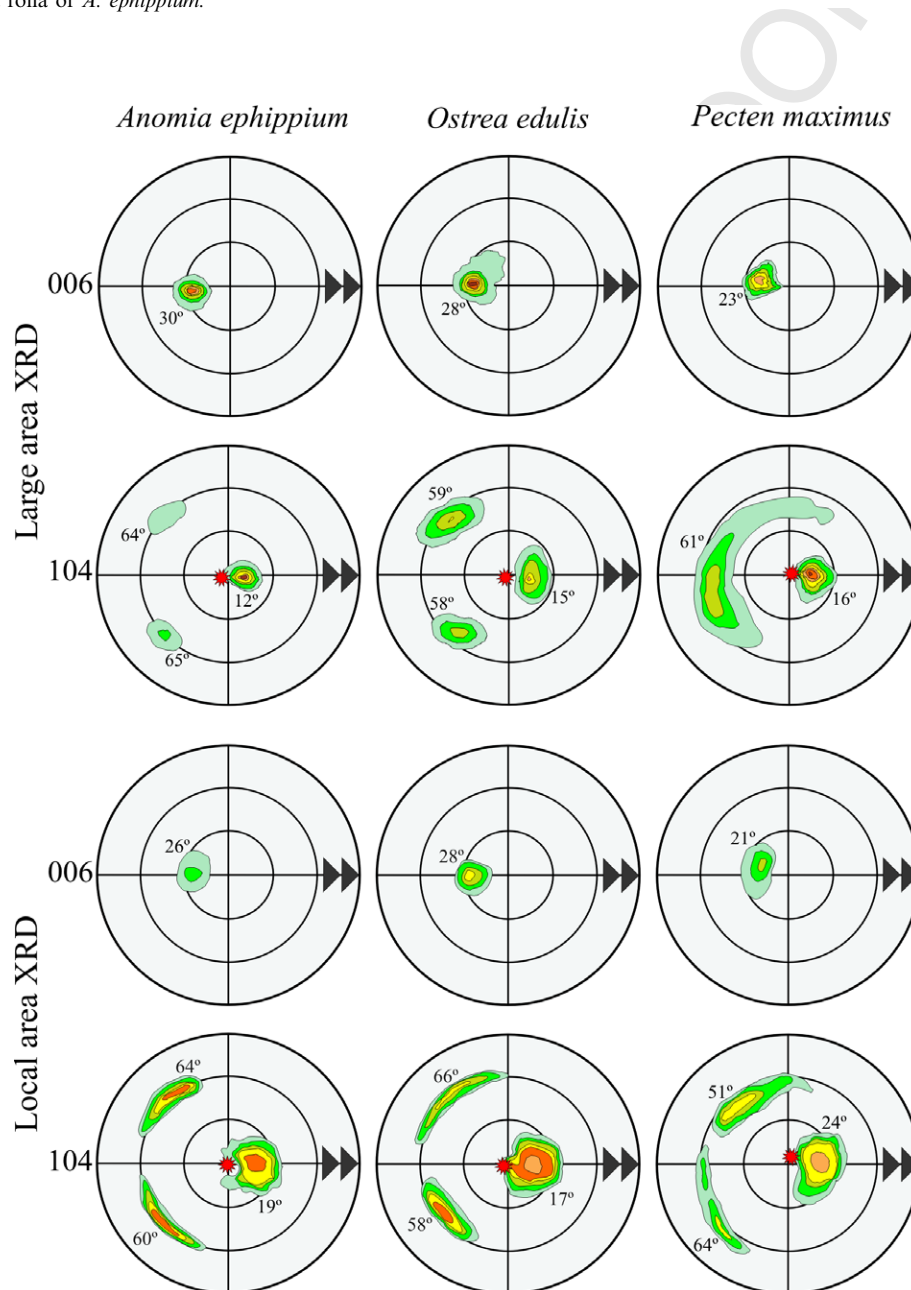


Fig. 7. Pole figures determined by standard or large area ($\sim 5 \times 5$ mm) and local area (0.5×0.5 mm) X-ray diffraction texture analysis for the calcitic foliated layer of different species. The 006 pole figures display a unique maximum placed at a slightly variable angular distance of the center (indicated in the figure) implying that crystals are oriented with their c -axis co-aligned and tilted relative to the shell normal. The 104 pole figures display three well defined maxima, which shows that crystals are biaxially oriented. The exception is the standard pole figure of *P. maximus* that has a ring-like disposition, due to an incipient turbostratic distribution of crystals. Numbers within figures refer to the angular distances from the centers of pole maxima to the center of the pole figure. The estimated positions of the $\{10.8\}$ poles (*) and the growth direction of the folia (►) are also indicated.

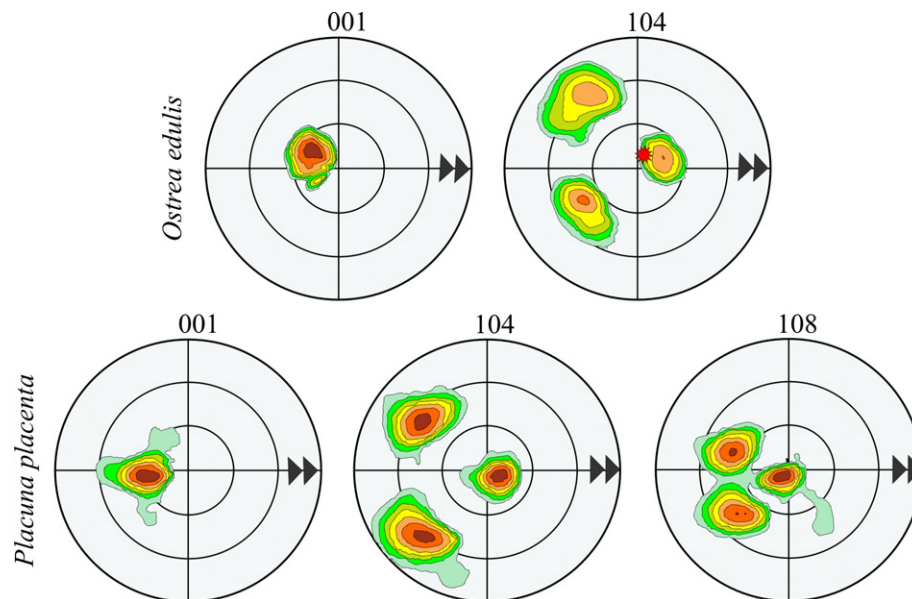


Fig. 8. Pole figures from single folia determined by EBSD for *O. edulis* and *P. placenta*, showing the orientation of crystals relative to the growth direction. Note that there is always a $\{10\bar{1}4\}$ rhombohedral face oriented in the growth direction and that the c -axis is tilted backward relative to the shell growth direction. The 108 pole figure of *P. placenta* is intended to show the almost coincidence of one 108 pole maxima with the center of the pole figure. The estimated position of the $\{10.8\}$ pole (*) and the growth direction of the folia (▶) are indicated.

255 able angular distance from the center (between 21° and 30° .
 256 On the other hand, the 104 pole figures display three well
 257 defined maxima placed at about 75° between each other
 258 and each located at an angular distance of about 44° from
 259 the position of the 006 maximum. In some specimens (e.g.,
 260 *P. maximus*, Fig. 7) some 104 pole maxima determined by
 261 conventional XRD texture analysis show an appreciably
 262 greater angular dispersion and even fuse. SEM-EBSD analyses
 263 (Fig. 8) make it possible to obtain a direct correlation
 264 between the actual crystallographic orientation determined
 265 from the Kokuchi patterns and the growth direction of
 266 crystals, determined from SEM images. It can be observed
 267 that the 001 maximum, the center of the diagram and one
 268 of the 104 maxima (the one in a more advanced position)
 269 are all aligned following the growth direction of folia.

270 4. Discussion

271 The foliated layer is the calcitic analogue of nacre in the
 272 sense that both biomaterials are composed of highly oriented
 273 platy crystals arranged in sheets. Unlike nacre, the crystallographic
 274 properties of the foliated layer are not so well understood and,
 275 as previously mentioned, in the literature we find contradictory
 276 reports about its organization. In this study we have applied
 277 different electron and X-ray diffraction techniques to study
 278 the foliated layer and determine its level of organization on
 279 different length scales.

280 The mode in which the foliated layer becomes organized
 281 can be inferred by studying this layer at different stages of
 282 development. We have observed how its secretion resumes
 283 on top of organic layers, produced after a refractory period
 284 of shell deposition. Initial deposits consist of isolated

285 aggregates with irregular to pseudo-hexagonal outlines,
 286 constituted by co-oriented calcite laths; the subsequent fact
 287 that aggregates extend laterally and that their density
 288 increase causes them to impinge on each other. These
 289 aggregates resemble the inorganic calcite aggregates precipitated
 290 in the presence of a poly-acrylamide hydrogel by
 291 Grassmann et al. (2003), although they differ in the
 292 expressed crystal faces. At a short distance (a few hundred
 293 microns), the material becomes highly organized and displays
 294 a coherent crystallographic orientation (Fig. 5).

295 X-ray and electron diffraction analyses imply that the
 296 foliated layer is a highly ordered material consisting of
 297 crystals with their three main crystallographic axes aligned
 298 (that is, it has a sheet texture). The angles between 104
 299 maxima of the pole figures (about 75°) and between those
 300 and the 001 maximum (44°) correspond to the angles
 301 between different $\{10\bar{1}4\}$ rhombohedral faces and to the
 302 angle between $\{0001\}$ and $\{10\bar{1}4\}$ faces (Fig. 3D) in a
 303 calcite crystal, respectively. The slight azimuthal disorder
 304 observed in several pole figures of *P. maximus* (Fig. 7)
 305 suggests that crystals are slightly rotated around the c -axis
 306 (turbostratic distribution). This may be attributed to the
 307 presence of co-existing sets of folia running in different
 308 directions (a fact usually observed by SEM).

309 Calcite crystals of the foliated layer are oriented with
 310 their c -axis tilted back (i.e., opposite to the growth direction)
 311 with respect to the shell surface normal (by some
 312 $21\text{--}30^\circ$). One of the $\{10\bar{1}4\}$ rhombohedral faces always
 313 looks in the direction of advance of the lath and the
 314 other two upper faces related by symmetry look back-
 315 wards. This orientation has been consistently found in
 316 all eight species (which are representative of five families;

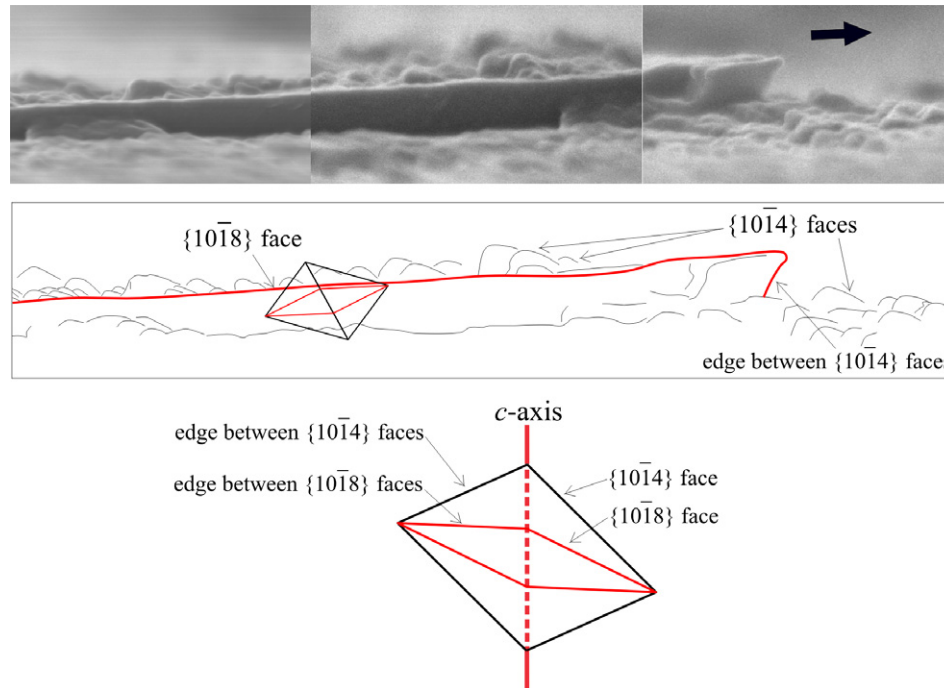


Fig. 9. Side view of a corroded lath, showing the outlines of corrosion rhombohedra. The lateral outline of the $\{10\bar{1}4\}$ calcite rhombohedron is fitted to the corrosion rhombohedra by tilting the c -axis opposite to the growth direction (arrow). Then, the outline of the $\{10\bar{1}8\}$ rhombohedron is coincident with the surface of the lath.

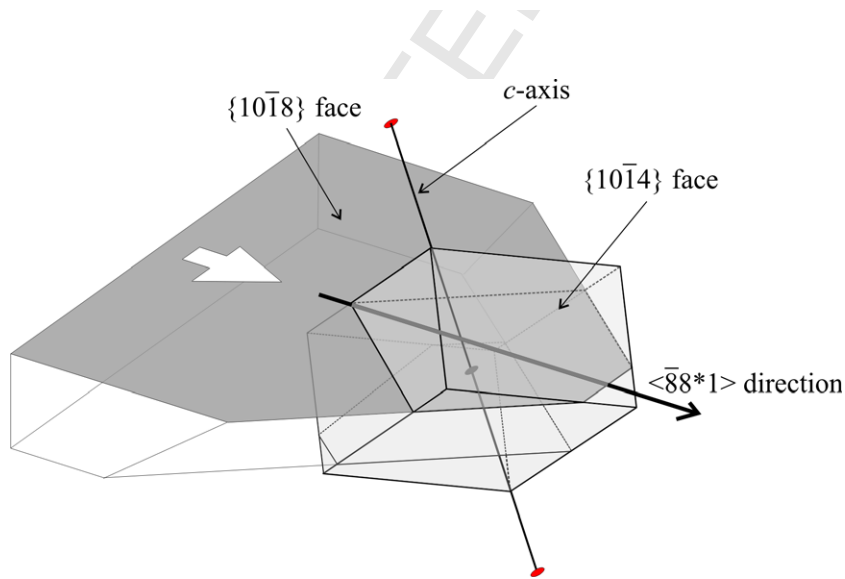


Fig. 10. Proposed model for the crystallography of the foliated layer, explained by showing the interpenetration of a lath with the $\{10\bar{1}4\}$ rhombohedron. The surface of the lath is a $\{10\bar{1}8\}$ face and contains an $\langle 88 * 1 \rangle$ direction, which is parallel to the growth direction (white arrow). There is a $\{10\bar{1}4\}$ face looking in the growth direction. Consequently, the c -axis is tilted opposite to this direction. In this example, the terminal faces of laths are $\{10\bar{1}4\}$ rhombohedral faces.

317 see Table 1) analysed either by XRD or EBSD (Figs. 7
 318 and 8) and has been confirmed by SEM observations
 319 of naturally corroded specimens (Fig. 6). In these speci-
 320 mens the corroded crystals express $\{10\bar{1}4\}$ rhombo-
 321edral faces tilted so that the c -axis is inclined opposite
 322 to the growth direction of the folia (Fig. 9). In samples
 323 of *C. varia* and *Pr. jeffreysi*, terminal faces showing very
 324 good exposition are unequivocally $\{10\bar{1}4\}$ rhombohedral
 325 faces of calcite (Fig. 4B and C).

In our analyses the planes coinciding with the surface of 326
 folia are subparallel (typically at an angle of 2–3°) to the 327
 shell surface. Therefore, the poles associated to this plane 328
 would plot at a small distance of the center of the corre- 329
 sponding pole figure. The most likely centered face is a 330
 $\{10\bar{1}8\}$ rhombohedral face, which is at 26.3° of the 331
 $\{0001\}$ face (Fig. 3C and D). In fact, when the approxi- 332
 mate positions of the 108 poles are plotted on pole figures 333
 (Figs. 7 and 8), there is always one such poles very close to 334

335 the center of the pole figure (the maximal deviation mea-
 336 sured is 5°. A 108 pole figure derived from EBSD analyses
 337 is shown in Fig. 8 and it can be appreciated how a maxi-
 338 mum is located centrally. Additionally, the inclination of
 339 $\{10\bar{1}4\}$ rhombohedral faces observed in corroded samples
 340 implies that one of the $\{10\bar{1}8\}$ faces is parallel to the lath
 341 surface (Fig. 9). The crystallographic model so far pro-
 342 posed is depicted in Fig. 10. In brief, crystals are preferen-
 343 tially oriented with a $\{10\bar{1}8\}$ crystal face parallel to the
 344 surface of the laths and a $\langle 88 * 1 \rangle$ direction aligned with
 345 the growth direction (Fig. 10).

346 We therefore agree with the conclusions of Taylor et al.
 347 (1969), and partly, with those of Runnegar (1984) that the
 348 lath surfaces are $\{10\bar{1}8\}$ rhombohedral faces (Fig. 2). Nev-
 349 ertheless, the former authors did not determine axial orien-
 350 tations, whereas, unlike us, Runnegar (1984) placed the c -
 351 axis inclined forward towards the direction of growth (his
 352 Type 2) or at 30° of it (Type 3). He came to the conclusion
 353 that the foliated microstructure of bivalves had three differ-
 354 ent crystallographic arrangements (Fig. 2) by taking the
 355 angle between the growing edges of laths as an additional
 356 distinctive criterion. In our opinion, based on the constan-
 357 cy of the distribution of pole maxima in the different
 358 groups analyzed, there is only one crystallographic orienta-
 359 tion of calcite crystals in the foliated microstructure.

360 In biogenic calcite, the expression of faces other than the
 361 basal $\{0001\}$ face or the $\{10\bar{1}4\}$ cleavage rhombohedra
 362 results from their stabilization by preferential absorption
 363 of specific organic molecules (Addadi and Weiner, 1985).
 364 For example, in sea urchin spicules normally expressed fac-
 365 es are $\{hk0\}$ prismatic faces, which are parallel to the c -
 366 axis (e.g., Berman et al., 1993). The expressed $\{10\bar{1}8\}$ faces
 367 of calcite found in the surfaces of folia have neither been
 368 described in biomineral systems nor found in inorganically
 369 precipitated calcite crystals in which the negative $\{01\bar{1}8\}$
 370 rhombohedra is expressed instead (e.g., “nail head” calcite;
 371 Kostov et al., 1999). Therefore, this type of face must be
 372 stabilized by particular molecules from the organic matrix.

373 5. Conclusions

374 The combined use of SEM, electron, and X-ray diffrac-
 375 tion techniques provides complementary and highly
 376 detailed information about the organization of shell micro-
 377 structures on different length scales.

378 The foliated layer is a highly ordered biomaterial with
 379 a very well defined crystallographic orientation which
 380 consistently displays the same characteristics in the differ-
 381 ent groups with this microstructure. Calcite crystals are
 382 oriented with their three main axes aligned. They have
 383 their c -axis tilted back relative to the shell normal (and
 384 the growth direction of folia) and have one of their
 385 $\{10\bar{1}8\}$ rhombohedral faces parallel to the lath surface.
 386 Further effort is necessary to define both the mechanisms
 387 inducing the expression of $\{10\bar{1}8\}$ crystallographic
 388 planes and that producing such a high degree of orienta-
 389 tion of calcite crystals.

6. Uncited references

Sykes et al. (2000), Watabe et al. (1958).

Acknowledgments

We thank Juan de Dios Bueno Pérez (CIC, Univ. Gra-
 nada) for sample preparation, and Joaquín Ramírez and
 Francisco Varela Feria (CITIUS, Univ. Sevilla) for EBSD,
 and SEM operation. This study was supported by Research
 Projects CGL2004-00802 and REN2003-7375 (DGI,
 MCyT), and by the Research Groups RNM190 and
 RNM179 (CICE, JA).

References

- Addadi, L., Weiner, S., 1985. Interactions between acidic proteins and
 crystals: stereochemical requirements in biomineralization. Proc. Natl.
 Acad. Sci. USA 82, 4110–4114.
- Addadi, L., Weiner, S., 1992. Control and design principles in biological
 mineralization. Angew. Chem. 31, 153–169.
- Beeston, B.E.P., Horne, R.W., Markham, R., 1986. Electron Diffraction
 and Optical Diffraction Techniques. North-Holland, Amsterdam.
- Berg-Madsen, V., 1987. *Tuarangia* from Bornholm (Denmark) and
 similarities in Baltoscandian and Australasian late Middle Cambrian
 Faunas. Alcheringa 11, 245–259.
- Berman, A., Hanson, J., Leiserowitz, L., Koetzle, T.F., Weiner, S.,
 Addadi, L., 1993. Biological control of crystal texture: a widespread
 strategy for adapting crystal properties to function. Science 259, 776–
 779.
- Carter, J.G., 1980. Guide to bivalve shell microstructures. In: Rhoads,
 D.C., Lutz, R.A. (Eds.), Skeletal Growth of Aquatic Organisms.
 Plenum Press, New York, pp. 645–673.
- Carter, J.G., 1990. Chapter 10. Evolutionary significance of shell
 microstructures in the Palaeotaxodonta, Pteriomorphia and Isofili-
 branchia (Bivalvia: Mollusca). In: Carter, J.G. (Ed.), Skeletal Biomin-
 eralization: Patterns, Processes and Evolutionary Trends, vol. 1. Van
 Nostrand Reinhold, New York, pp. 135–296.
- Carter, J.G., Hall, R.M., 1990. Polyplacophora, Scaphopoda, Archaeo-
 gastropoda and Paragastropoda (Mollusca). Plates 122–134. In:
 Carter, J.G. (Ed.), Skeletal Biomineralization: Patterns, Processes
 and Evolutionary Trends, Atlas and Index, vol. 2. Van Nostrand
 Reinhold, New York, pp. 29–51.
- Chateigner, D., Hedegaard, C., Wenk, H.-R., 2000. Mollusc shell
 microstructures and crystallographic textures. J. Struct. Geol. 22,
 1723–1735.
- Grassmann, O., Neder, R.B., Putnis, A., Löbmann, P., 2003. Biomimetic
 control of crystal assembly by growth in an organic hydrogel network.
 Am. Mineral. 88, 647–652.
- Kostov, I., Kostov, R., I., 1999. Crystal habits of minerals. Pensoft, Sofia.
- MacKinnon, D.I., 1982. *Tuarangia paparua* n. gen. and n. sp., a late
 Middle Cambrian pelecypod from New Zealand. J. Paleontol. 56, 589–
 598.
- Randle, V., 2000. Theoretical framework for electron backscattering
 diffraction. In: Schwartz, A.J., Kumar, M., Adams, B.L. (Eds.),
 Electron Backscatter Diffraction in Materials Science. Kluwer Aca-
 demic, New York, pp. 19–30.
- Randle, V., Engler, O., 2000. Introduction to Texture Analysis: Macro-
 texture, Microtexture and Orientation Mapping. Gordon and Breach
 Science, Amsterdam.
- Rodríguez-Navarro, A.B., Gaines, K.F., Romanek, C.S., Masson, G.R.,
 2002. Mineralization of clapper rail eggshell from a contaminated salt
 marsh system. Arch. Environ. Con. Tox. 43, 449–460.
- Runnegar, B., 1984. Crystallography of the foliated calcite shell layers of
 bivalve molluscs. Alcheringa 8, 273–290.

- 450 Runnegar, B., 1985. Shell microstructures of Cambrian molluscs replicat- 460
451 ed by phosphate. *Alcheringa* 9, 245–257. 461
- 452 Sykes, C.S., Wheeler, A.P., Wierzbicki, A., Mount, A.S., Dillaman, R.M., 462
453 2000. Nucleation and growth of calcite on native versus pyrolyzed 463
454 oyster shell folia. *Biol. Bull.* 198, 50–66. 464
- 455 Taylor, P.D., Weedon, M.J., 2000. Skeletal ultrastructure and phylogeny 465
456 of cyclostome bryozoans. *Zool. J. Linn. Soc-Lond.* 128, 337–399. 466
- 457 Taylor, J.D., Kennedy, W.J., Hall, A., 1969. Shell structure and 467
458 mineralogy of the Bivalvia. Introduction. *Nuculacae-Trigonacae. Bull.* 468
459 *British Mus. Nat. Hist. Zool.* 3 (Suppl.), 1–125. 469
- Watabe, N., Wilbur, K.M., 1961. Studies on shell formation. IX. An 460
electron microscope study of crystal layer formation in the oyster. *J.* 461
Biophys. Biochem. Cy. 9, 761–771. 462
- Watabe, N., Sharp, D.G., Wilbur, K.M., 1958. Studies on shell formation. 463
VIII. Electron microscopy of crystal growth of the nacreous layer of 464
the oyster *Crassostrea virginica*. *J. Biophys. Biochem. Cy.* 4, 281–286. 465
- Williams, A., 1997. Shell structure. In: Kaesler, R.L. (Ed.), *Treatise on* 466
Invertebrate Paleontology, Part H, Brachiopoda Revised. The Geo- 467
logical Society of America Inc., The University of Kansas, Boulder, 468
Colorado, and Lawrence, KS, pp. 267–320. 469
470

UNCORRECTED PROOF

**Re-orientation of the crystallographic axes of
the prisms in the prismatic layer of oyster
and scallops shells**

IV

Re-orientation of the crystallographic axes of the prisms in the prismatic shell layer of oyster and scallops

Francisco J. Esteban-Delgado⁽¹⁾, Antonio G. Checa⁽¹⁾, Alejandro B. Rodríguez-Navarro⁽²⁾

⁽¹⁾ *Departamento de Estratigrafía y Paleontología, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, Avenida Fuentenueva s/n, 18071 Granada, Spain; fjeste@ugr.es; ache@ugr.es*

⁽²⁾ *Departamento de Mineralogía y Petrología, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, Avenida Fuentenueva s/n, 18071 Granada, Spain; anava@ugr.es*

Abstract

The calcitic columnar prisms of the pteriomorphian bivalves have the crystallographic c -axis lying normally to the shell surface and the a -axes rotated without any preferential orientation. However in oysters and scallops such crystallographic arrangement only happens in the external surface of the prismatic layer whereas the inner surface has the a -axes of the different prisms evenly aligned. The fact that allows the re-orientation of the a -axes during growth of the prismatic layer is the tendency of the laths forming the prisms to become aligned to the direction of shell growth since their growth is optimum in that direction. The twist of the laths causes the progressive rotation of the a -axes of the individual prisms. The extent of such rotation is, therefore, directly related to the length attained by the prisms which causes a common disposition of the a -axes when prisms growth the necessary.

Keywords.- *Biomineralization, Microstructures, Bivalve shell, Calcite, Prismatic layer, Re-orientation, Oysters, Scallops, X-Ray diffraction.*

Resumen

Los prismas calcíticos columnares de los bivalvos pteriomorfos tienen los ejes cristalográficos c normales a la superficie de la concha y los ejes a rotados sin ninguna orientación preferencial. Sin embargo, en ostreoides y pectinoideos tal organización cristalográfica sólo se da en la superficie externa de la capa prismática mientras que la superficie interna tiene los ejes a de los diferentes prismas uniformemente alineados. El hecho que permite la reorientación de los ejes a durante el crecimiento de la capa prismática es la tendencia de las hojas que forman los prismas de alinearse con la dirección de crecimiento de la concha ya que su crecimiento es óptimo en esa dirección. El giro de las hojas causa la rotación progresiva de los ejes a en cada prisma. La magnitud de tal rotación está, por lo tanto, directamente relacionada con la longitud alcanzada por los prismas que da lugar a una disposición común de los ejes a cuando los prismas crecen lo suficiente.

Palabras clave.- *Biomineralización, Microestructuras, Concha de bivalvos, Capa prismática, Re-orientación, Ostreoides, Pectinoideos, Difracción de Rayos X.*

Manuscript

Introduction

The possession of an external calcitic columnar prismatic shell layer is a common ancestral feature to many pteriomorph bivalves such as Pterioidea, Limoida, Pectinoidea and Ostreoida (Carter 1990). However its presence in recent groups is very variable, and there are taxa bearing it in both valves (e.g. Pterioidea) and taxa in which it is completely absent (e.g. Limoida). In ostreoidans the prismatic layer only covers the external layer of the upper right valve of Ostreidae and Gryphaeidae (with some exceptions) while in pectinoideans the prismatic layer appears in Propeamussiidae, Anomiidae (only right valve) and Pectinidae (just some mm in the post-juvenile right valve).

The prismatic layer of these groups is constituted with calcitic columnar prisms (CCP) enclosed by organic envelopes, also called organic walls. The great amount of organic matter surrounding the prisms confers flexibility to the prismatic layer in its natural hydrated state. This makes the right valve to adapt its contour to the rigid left valve when both valves are shut, producing an effective sealing of the shell.

The crystallographic arrangement of the CCP is very constant among bivalves, with the c -axis parallel to the elongation direction of the prisms, which is usually is normal to the surface of the prismatic layer. This can be explained because the growth along the c -axis of the calcite is quicker than in any other direction. The crystallographic a -axes, which are perpendicular to the c -axis, have different orientations in each prism, producing a fibre texture in the prismatic layer with the c -axis as fibre axis. The CCPs have traditionally been considered as monocrystalline (referred as simple prisms), although some cases of polycrystalline prisms have been described (Wada 1956, Watabe & Wada 1956, Dauphin 2002, Dauphin 2003 and Dauphin, Cuif, *et al.* 2003). It has recently been stated that the CCPs of the pteriomorphian families (Propeamussiidae, Pectinidae, Anomiidae and Ostreidae) are built with foliated microstructure (Esteban-Delgado *et al.* unpublished data). Despite their polycrystalline constitution, these “foliated” CCPs produce monocrystalline diffraction patterns due to the common orientation of the laths inside the individual prisms. Interestingly the inner surface of the prismatic layer has a sheet texture similar to that of the foliated microstructure, which implies that the a -axes of the different prisms are mutually oriented. This is really relevant since it means that there is a reorientation of the a -axes in a plane perpendicular to the c -axis.

In this work we have undertaken the study of the crystallographic evolution of the “foliated” CCPs in some bivalves (namely oysters and propeamussiids) in order to assess the mechanisms involved in the reorientation of the crystallographic axes of the prismatic layer.

Material and methods

Material

We have studied the prismatic layer of *Ostrea edulis* Linnaeus, 1758, *Ostrea puelchana* d'Orbigny, 1842, *Crassostrea gigas* (Ostreidae: Ostreoidae); and *Propeamussium sibogai* (Propeamussiidae: Pectinoidea). We used specimens with complete and unaltered prismatic layer and, in order to facilitate the observations and analyses, the flatter surface.

Methods

a) SEM

Samples of the above mentioned species were prepared in order to observe the internal surface of the prismatic lamella. Fragments of about 1 cm² from the ventral area were treated with proteinase K (1mg ml⁻¹) for 1-30 minutes or bleached (NaClO 3.5 %) for 1-10 minutes to remove the organic matter. Samples were sputtered with carbon on a Hitachi UHS evaporator for SEM (LEO GEMINI 1430VP) and FESEM (LEO GEMINI-1530) observation. Assessment of the cross-sectional area of prisms and orientation of the folia in the internal surface of the prisms of *Ostrea edulis* was done in SEM pictures taken at three different locations in the internal surface of the lamella (distal, medium and proximal) using ImageJ (image analysis software, National Institute of Health, USA).

b) X-ray diffraction texture analyses

We determined the texture, or preferred orientation, of the crystallites of the calcitic prisms and foliated layer in the inner surface of the prismatic layer of *Ostrea edulis*, *Ostrea puelchana* and *Propeamussium sibogai* with a Bruker D8 Smart Apex diffractometer (Bruker AXS, Germany) equipped with an area detector. Samples were placed normally to the φ axis and rotated from $\varphi=0^\circ$ to $\varphi=180^\circ$ in 3° steps. We located the position of the 104 and 006 poles associated to the (104) and (006) crystallographic planes in the corresponding Debye-Scherrer rings from the two-dimension frames taken at different φ angles. The orientation of crystals is plotted as pole figures with contours indicating intensity levels as a function of the sample orientation. The experimental conditions were: $\omega=10^\circ$, $2\theta=20^\circ$, 50 KV, 30 mA, 0.5 mm collimator diameter and 20 sec time of exposition.

Results

SEM observations

a) Prisms morphology

The prismatic calcitic layer of *Ostrea edulis* attains a maximum thickness of some 300 μm immediately before being covered by the foliated layer. This thickness progressively decreases towards the ventral area of the lamella. In radially fractured shells of *Ostrea edulis* prisms show a prominent curvature at the outermost part of the lamella (Figure 1a). This area corresponds to the early growth stage of the prisms where they grow reclined about 30-45°. The angle later increases progressively until prisms grow almost perpendicular to the lamella surface. This usually happens when the thickness of the lamella is about 50 μm . From here on the prisms grow straight or slightly curved (Figure 1a). The prisms competition is stronger in the outermost part of the prismatic lamella, as denoted by the disappearance of many prisms in this area. On the other hand, competition in the vertical domain is rare and almost all prisms reach the internal surface (Figure 1a). In *Ostrea puelchana* the maximum thickness of the lamella is 400 μm (Figure 1b). As in *O. edulis* the thickness progressively decreases towards the ventral margin. The prisms are straight and their diameter almost constant throughout (columnar shape) (Figure 1b). There is no prisms selection and all the prisms reach the internal surface of the layer. The prismatic layer of *Propeamussium sibogai* has approximately the same thickness along all its extension (about 100 μm) (Figure 1c). The prisms of the different parts of the lamella are therefore equal in length. Prisms selection is very scarce and the prisms have columnar shape, although some prisms are slightly sigmoidal (Figure 1c).

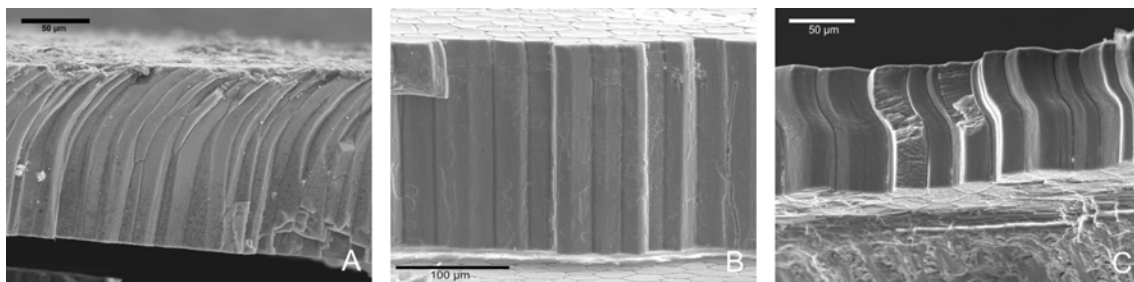


Figure 1. Radial fracture in the prismatic layer of A) *Ostrea edulis*, B) *Ostrea puelchana* and C) *Propeamussium sibogai*.

The prisms of *Ostrea edulis* have elongated cross sections, namely elliptical in shape, with the biggest dimension usually ventrally directed, that is, parallel to the lengthening direction of the lamella. In *Ostrea puelchana* the cross sections of the prisms are also elongated but not as evidently as in *O. edulis*. In the prismatic layer of *O. puelchana* there are

patches where the organic envelopes partially disappear and the typical cellular network fades away and is replaced by a labyrinthine patterns. In *Propeamussium sibogai* the cross sections of the prisms are polygonal although many prisms have gently curved edges.

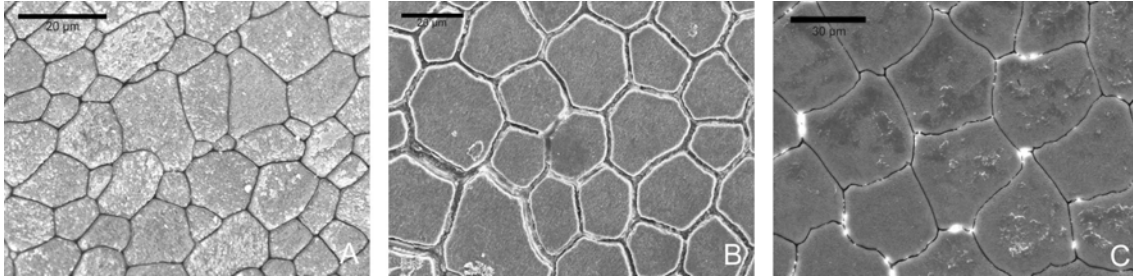


Figure 2. Internal surface of the prismatic layer of A) *Ostrea edulis*, *Ostrea puelchana* and C) *Propeamussium sibogai*.

b) Orientation of the calcitic laths in the inner surface of the prisms

The calcitic laths which build up the prisms appear in the inner or growing surface of the prisms. As the crystallographic directions of the laths is known (Checa *et al.* 2006), we can infer the crystallographic orientation of the prisms by measuring the orientation of their laths. In the oyster species observed (*Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas*) there are notable differences in the orientation of the laths of the prisms between the distal area of the lamella and the area proximal to the foliated layer. At the ventral margin the prisms are disoriented (Figure 3a) whereas near to the foliated layer all the prisms have their laths radially oriented (parallel to the growth direction of the shell) (Figure 3b). To quantify the orientation of the prisms in the inner surface of the prismatic lamella of *Ostrea edulis* both at the ventral margin and close to the foliated layer we measured the angle between the direction of elongation of the foliated laths and the direction of shell growth. The measurements are expressed in the Table 1.

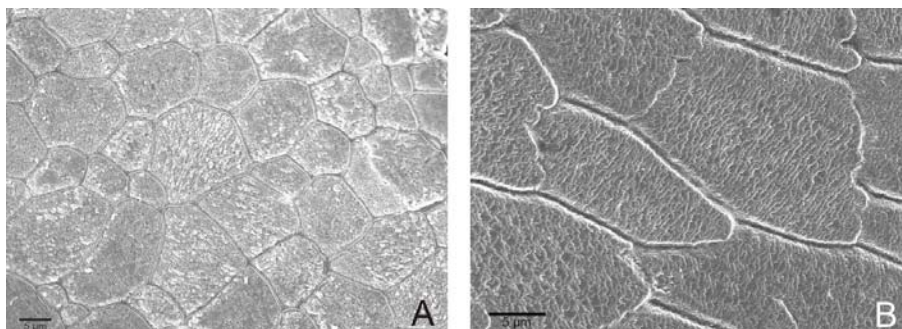


Figure 3. View of the inner surface of the prismatic layer of *Ostrea edulis* to show the disorientation of the prisms in the distal area of the lamella (A), and the common orientation of the prisms near to the foliated layer (B).

	n	v
Distal	212	368.73
Proximal	114	152.77

Table 1. Measure of the dispersion of the prisms as the angle between the direction of elongation of the fibres with respect to the direction of growth of the shell. (n) sample size, (v) variance.

X-ray texture analyses

The texture or preferential three dimensional orientations of the prisms are showed in the pole figures (Figure XX) where the distribution of the hkl poles is associated to the (hkl) crystallographic planes of the calcite. Pole figures indicate that the external surface of the prismatic layer from all species have a turbostratic disposition of the 104 poles, which indicates that the a -axes have no preferential orientation, these being rotated around the c -axis (fibre texture, with c -axis as the fibre axis). In *O. puelchana* the most distal inner surface of the prismatic layer also has a fibre texture. However, towards more proximal areas the 104 poles become progressively grouped, with three discrete maxima appearing in the proximity of the foliated layer (giving a sheet texture). This implies that the a -axes of the different prisms are commonly oriented in this area.

In *Propeamussium sibogai* the texture analyses made at different areas of the internal surface of the prismatic lamella are all very similar having three discrete 104 pole maxima. However, the 104 pole maxima of *P. sibogai* are broader than those of *O. puelchana*, pointing out that its prisms are a bit more disoriented than in *O. puelchana*.

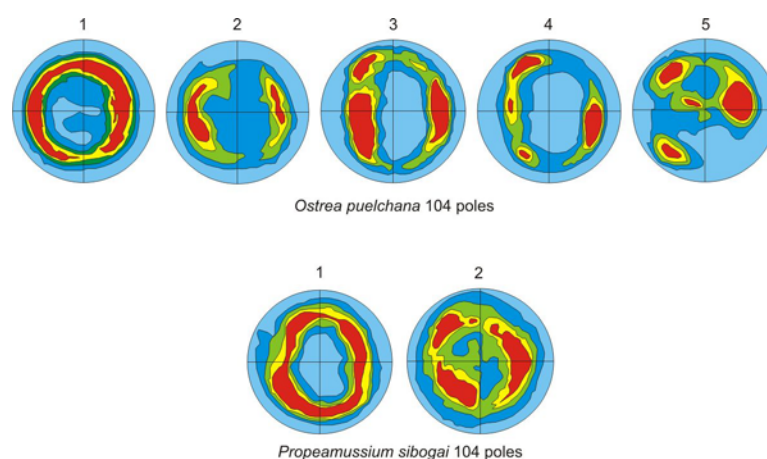


Figure 4. X-Ray texture 104 pole figures from the prismatic layer of *Ostrea puelchana* and *Propeamussium sibogai*. In *O. puelchana* the pole figure labelled 1 corresponds to the external side of the lamella and the pole figures from 2 to 5 correspond to sequential analyses made from the distal edge of the lamella (2) to near to the foliated layer (5). In *P. sibogai* the 104 pole figure labelled 1 comes from the external side and the number two from the inner side.

Discussion

Previous works about the crystallographic arrangement of the calcitic prismatic layers of bivalves have reported non-oriented distribution of the *a*-axes (referencias). The only references as to a single crystal-like distribution of the *a*-axes of the prisms comes from Chateigner *et al.* (2002) in *Amusium parpiraceum* and our unpublished results in the prismatic layer of oysters and propeamussiids. We have precisely showed in this work that the prisms of some oysters and propeamussiids nucleate with no preferential orientation of the *a*-axes and that later these crystallographic axes become oriented during the growth of the prisms. The main aim of this work is to explain the way in which the reorientation of the crystallographic axes of the prisms happens. In this sense, the competition for space has been recognized as one the main shaping factors of the prismatic layers of bivalves, this process being essentially similar to that described for inorganic systems (Ubukata 1994). Prism selection by competition is known to produce a reduction of the dispersion of the *c*-axes in the prismatic layer of bivalves by eliminating those prisms with are more disoriented (Checa & Rodríguez-Navarro 2001). Prism selection could theoretically reduce also the dispersion of the *a*-axes in the same way. However, this is clearly impossible in the case of prismatic layers without prism competition (e.g. *Ostrea puelchana* and *Propeamussium sibogai*). The only possible explanation for these cases is that the prisms rotate their crystallographic *a*-axes during their growth. We think that the rotation of the crystallographic axes is possible due to the foliated ultrastructure of the prisms. The growth of the prisms is produced thanks to the elongation of the existing laths and to the nucleation of newly formed laths which form successive sheets of laths inside the prisms. In every process of nucleation there may be introduced slight changes in the orientation of the laths due to the presence of organic membranes separating the mineral phase or to the nanostructured arrangement of the laths (pers. obs.). Those slight changes in the direction of growth may provide slight geometric advantages to the laths when such change diminishes the angle to which the laths reach the surface of the prism. As the inner surface of the prisms is slightly oblique looking to the shell margin, the laths which acquire that direction have more space to grow and prevail in the successive sheets. The effect which this has in the whole prism is that the crystallographic *a*-axes rotate following the direction of growth of the laths.

Obviously the extent of the rotation of the crystallographic axes is directly related to the length attained by the prisms. A higher length allows more time for the competition of the laths within the prisms and thence more opportunities for the reorientation of the *a*-axes. This explain why the prismatic lamella of the oysters suffers a progressive

reorientation of the *a*-axes whereas in *P. sibogai* the texture is similar in any area of the internal side of the prismatic lamella.

Conclusion

The observed reorientation of the crystallographic *a*-axes of the prisms in the prismatic layer of oysters and propeamussiids is due to the change in the direction of elongation of the calcitic laths which constitutes the prisms. The laths turn their direction of elongation to become parallel to the direction of growth of the shell since that is their optimum direction of growth. The alignment of the laths within the different prisms causes a reduction of the overall dispersion of the *a*-axes of the prismatic lamella. This reduction is directly related to the length attained by the prisms.

Acknowledgements

We thank Antonio Jiménez for providing some specimens and José Romero (CIC, Univ. Granada) for advising on two-dimensional X-Ray texture analyses. This study was supported by Research 396 Projects CGL2004-00802 and REN2003-7375 (DGI, 397 MCyT), and by the Research Groups RNM190 and 398 RNM179 (CICE, JA).

References

- Carter, J.G. (1990).** Evolutionary significance of shell microstructure in the Palaeotaxodonta, Pteriomorphia and Isofilibranchia (Bivalvia: Mollusca). In Carter, J.G. (ed), *Skeletal Biomineralization: Patterns, Processes and Evolutionary Trends*. Van Nostrand & Reinhold, New York, pp. 135-411.
- Chateigner, D., Morales, M. & Harper, E.M. (2002).** QTA of prismatic calcite layers of some bivalves, a link to Trichite ancestrals. *Materials Science Forum*, 408-412, 1687-1692.
- Checa, A. & Rodríguez-Navarro, A. (2001).** Geometrical and crystallographic constraints determine the self-organization of shell microstructures in Unionidae (Bivalvia: Mollusca). *Proceedings of the Royal Society of London series B-Biological Sciences*, 268, 771-778.
- Dauphin, Y. (2002).** Comparison of the soluble matrices of the calcitic prismatic layer of *Pinna nobilis* (Mollusca, Bivalvia, Pteriomorphia). *Comp Biochem Physiol Part A*, 132, 577-590.
- Dauphin, Y. (2003).** Soluble organic matrices of the calcitic prismatic shell layers of two pteriomorphid bivalves - *Pinna nobilis* and *Pinctada margaritifera*. *The Journal of Biological Chemistry*, 278, 15168-15177.

Dauphin, Y., Cuif, J.P., Doucet, J., Salomé, M., Susini, J. & Willams, C.T. (2003). In situ chemical speciation of sulfur in calcitic biominerals and the simple prism concept. *Journal of Structural Biology*, 142, 272-280.

Ubukata, T. (1994). Architectural constraints on the morphogenesis of the prismatic structure in the Bivalvia. *Palaeontology*, 37, 241-261.

Wada, K. (1956). Electron-microscopic observations on the shell structure of the pearl oyster (*Pinctada martensii*). I. Observations on the calcite crystals in prismatic layers. *Bull Natl Pearl Res Lab*, 1, 1-16.

Watabe, N. & Wada, K. (1956). On the shell structure of Japanese pearl oyster, *Pinctada martensii* (Dunker). I. Prismatic layer. *Report of the Faculty of Fisheries, Prefectural University of Mie*, 2, 227-232.

**Crystallographic characterization of the
calcitic fibrous prismatic microstructures
of Pteriomorpha**



Crystallographic characterization of the calcitic fibrous microstructure of Pteriomorpha

Francisco J. Esteban-Delgado⁽¹⁾, Antonio G. Checa⁽¹⁾, Alejandro B. Rodríguez-Navarro⁽²⁾

⁽¹⁾ Departamento de Estratigrafía y Paleontología, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, Avenida Fuentenueva s/n, 18071 Granada, Spain; fjsteb@ugr.es; acheca@ugr.es

⁽²⁾ Departamento de Mineralogía y Petrología, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, Avenida Fuentenueva s/n, 18071 Granada, Spain; anava@ugr.es

Abstract

The calcitic fibrous prismatic microstructure includes a set of microstructural arrangements characterized by the presence of parallel calcite fibres. This microstructure constitutes the external calcitic layer present in many mytilids and the internal ribs of propeamussiids, although it is also present in the shell of pectinids, limids and plicatulids in relation to the prisms and to the foliated microstructure. The term fibrous prismatic microstructure does not fit in with the actual structure of its constituent elements and thence it could be simplified to calcitic fibrous microstructure. The fibres of the mytilids are elongated parallel to the c -axis whereas the fibres of the pectinoideans are elongated in a direction oblique to the c -axis. This crystallographic arrangement is notoriously different from that of the fibrous prisms of mytilids and very similar to that of the foliated microstructure. Evidence indicates that it is necessary to differentiate between the fibrous microstructure *sensu stricto*, which corresponds to the fibres of mytilids, and the fibres of the pectinoideans and probably all the fibres which appear together with the foliated microstructure, which are merely a fibrous variety of the foliated microstructure.

Keywords.- *Biom mineralization, Microstructures, Shell, Calcite, Fibrous layer, Mytilids, Scallops, X-Ray diffraction.*

Resumen

La microestructura prismática fibrosa incluye una serie de organizaciones microestructurales caracterizadas por la presencia de fibras paralelas de calcita. Esta microestructura constituye la capa calcítica externa presente en muchos mitílidos y en las costillas internas de propeamussiidos, aunque también aparece en la concha de pectínidos, limídos y plicatúlidos en relación con la microestructura prismática y foliada. El término microestructura prismática fibrosa no se adecua a su verdadera estructura de sus elementos constituyentes y por lo tanto podría ser simplificado en microestructura fibrosa calcítica. Las fibras de los mitílidos están alargadas en paralelo al eje c mientras que las fibras de los pectinoideos están alargadas en una dirección oblicua a este eje. Esta estructura cristalográfica es notoriamente diferente a la de las fibras de los mitílidos y muy semejante a la de la microestructura foliada. Las evidencias indican que es necesario distinguir entre la microestructura fibrosa *sensu stricto*, que corresponde a las fibras de mitílidos, y las fibras de pectinoideos y probablemente todas las fibras que aparecen junto a la microestructura foliada que son meras variaciones de dicha microestructura.

Palabras clave.- *Biom mineralización, Microestructuras, Concha, Calcita, Capa fibrosa, Mitílidos, Pectinoideos, Difracción de Rayos X*

Manuscript

Introduction

The fibrous prismatic microstructure is typical of the external layer of many mytilids where it forms extensive calcitic layers. The mytilids have had fibrous shell layers since very the Carboniferous (Carter 1990), always covering the otherwise inner aragonitic nacreous layers. There are Recent species with this calcitic external layer and species which lack it. The production of the calcitic layers in mytilids has been related to the temperature, with an apparent inverse relationship existing between the percentage of calcite in the shell and the mean temperature on the environment inhabited by the bivalve (Lowenstam 1954a, b, see also Kennedy et al. 1969, Taylor et al. 1969 and Carter 1980). According to this, there seems to be a tendency for tropical mytilids to be wholly aragonitic, and for temperate species to contain both calcite and aragonite (Taylor et al. 1969).

Microstructure described also as fibrous prismatic are also present in the external calcitic layer of limids, plicatulids, propeamussiids and pectinids where it appears associated to the prisms and the foliated microstructure (Carter 1990). The internal ribs that occur in some members of the Propeamussiidae are also made with fibrous prismatic microstructure (Carter 1990). These ribs are bars of calcite embedded in crossed lamellar aragonite. Unlike the plicae and costae of the Pectinidae, which are formed by crenulation of the foliated calcite, the propeamussiid ribs are formed by specialized areas of cells on the mantle distributed outside the pallial line, but within the distal boundary of the crossed lamellar layer (Waller 1972).

Grégoire (1961) described the prisms of *Mytilus edulis* as thin, elongated needles with a sheath of organic matrix which are polygonal in cross section and have blunt, pyramidal terminations. The term fibrous prismatic microstructure was introduced by Kobayashi (1969) to differentiate the prismatic structure of *Mytilus* from that of other calcitic prismatic layers. Carter (1980) defined the fibrous prismatic microstructure as that whose prisms have a large length/width ratio. According to Suzuki & Uozumi (1981) the fibrous prisms of the outer layer of mytiloids are thin needles (0.5-5 μm diameter) inclined toward the shell margin and each prism consisting of a single crystal regardless of its ultrastructure. Travis & Gonsalves (1969) studied in some detail the fibrous prisms of *Mytilus edulis* and concluded that the prisms are closely packed and are delineated from one another by 300 Å wide non mineralized electron lucent regions (organic sheets). However, they erroneously attributed an anvil shape to the prisms and gave a lesser length (6 μm) probably due to inadequate longitudinal sections. Travis & Gonsalves (1969) also reported brief crystallographic information of the prismatic layer of *Mytilus* obtained by selected area

electron diffraction (SAED) TEM. These authors found that the prisms have the same three-dimensional orientation, the prismatic layer of *Mytilus* thus being a highly ordered material. Feng et al. (2000) also analyzed the crystallographic arrangement of the fibrous prisms of *Mytilus edulis* by XRD and SAED-TEM and arrived to the conclusions that the long axis of the prisms is the crystallographic *c*-axis of calcite and that the prisms grow with their (104) faces parallel to the shell surface. They also found that the adjacent prisms have the same three-dimensional orientation which makes of this material a highly ordered one. Chateigner *et al.* (2002) analyzed the crystallographic texture of the fibrous prisms of *Mytilus edulis* and *Bathymodiolus thermophilus* and found a single-crystal-like distribution of the *a*-axes in both species. However, they did not identify the direction of elongation of the prisms.

In view of the uncertainty about the crystallographic arrangement of this microstructure we have undertaken its study putting a special emphasis in the fibrous microstructure of the non-mytilid groups from which there is not any structural or crystallographic information.

Material and methods

The fibrous prismatic microstructure was studied in two mytilid species (*Mytilus edulis* and *Bathymodiolus thermophilus*), where it comprises the wide external calcitic layer, in three propeamussiids (*Propeamussium sibogai*, *Propeamussium jeffreysii* and *Propeamussium dalli*), where it forms the internal ribs, and in the pectinid *Mimachlamys varia* where the fibrous prismatic microstructure appears together with the foliated microstructure.

Samples of the above species were observed by SEM. To do so we cut fragments of some 1 cm² from the ventral margin. The organic matter of the samples was removed by bleaching (NaClO 5% for 1-5 min). Samples were coated with carbon in a Hitachi UHS evaporator for SEM observations (FESEM Leo Gemini 1530).

We determined the texture or preferred three-dimensional orientation of the fibrous prisms of the cited species with a Bruker D8 Smart Apex diffractometer (Bruker AXS, Germany) equipped with an area detector. In the case of mytilids a small bar of about 0.5x0.5x4 mm was cut radially to the shell at the ventral margin. In propeamussiids an internal rib of some 3 mm length and 0.5 mm diameter was mechanically extracted. Special care was devoted to eliminate the aragonitic crossed lamellar microstructure. In *Mymachlamys varia* pieces of about 2x2 mm were cut from the inner ventral area of the shell. The mytilid and propeamussiid rod-like samples were placed with the inner surface both perpendicular and parallel (horizontal and vertical respectively) to the φ -axis of the

diffractometer (φ -axis coincides with the centre of the pole figures) whereas pectinid samples were placed only horizontal. Samples were rotated from $\varphi=0^\circ$ to $\varphi=180^\circ$ in 3° steps. We located the position of the $10\bar{1}4$ and 0006 poles associated to the $(10\bar{1}4)$ and (0006) crystallographic planes in the corresponding Debye-Scherrer rings from the two-dimensional frames taken at different φ angles. The orientation of crystals is plotted as pole figures with contours indicating intensity levels as a function of the sample orientation. The experimental conditions were: $\omega=10^\circ$, $2\theta=20^\circ$, 50 KV, 30 mA, 0.5 mm collimator diameter and 20 sec time of exposition.

Results

a) SEM observations

In the mytilids *Mytilus edulis* and *Bathymodiolus azoricus* the fibrous prisms are elongated rods of about $1\ \mu\text{m}$ diameter and tens or hundreds of μm in length (Figure 1A). The fibres are closely packed and inclined towards the shell interior 45° . The distal ends of the fibres are rhombohedral shaped with one face looking towards the shell interior (Figures 1B and C).

The fibrous prisms of the internal rib of the propeamussiids *P. dalli*, *P. sibogai* and *P. jeffreysii* are also elongated rods of some $1\ \mu\text{m}$ diameter and tens of μm in length. These fibres are not so closely packed as those of mytilids, with some empty space in between them (Figure 2A). The fibres are disposed nearly parallel to the length of the ribs with a small angle of some 5° inclined towards the shell interior. The distal ends of the fibres are bifaceted with the two faces inclined backwards (Figures 2B and C).

In *Mimachlamys varia* the size of the fibres is similar to those of the previous species, although the width is more variable ranging from 0.5 to $3\ \mu\text{m}$. This makes the morphology of the fibres to vary from lath-like to rod-like (Figure 3A). The fibres are elongated in the direction of the acute edge of the rhombohedron and arranged into bundles disposed on the shell with different orientations. The distal ends of the fibres may be either arrow pointed or truncated (Figures 3B and C respectively).

The direction of elongation of the prisms (triangle) as well as the normal to the faces of the distal ends (circles) is plotted in a pole figure-like diagram (Figure 4 left column).

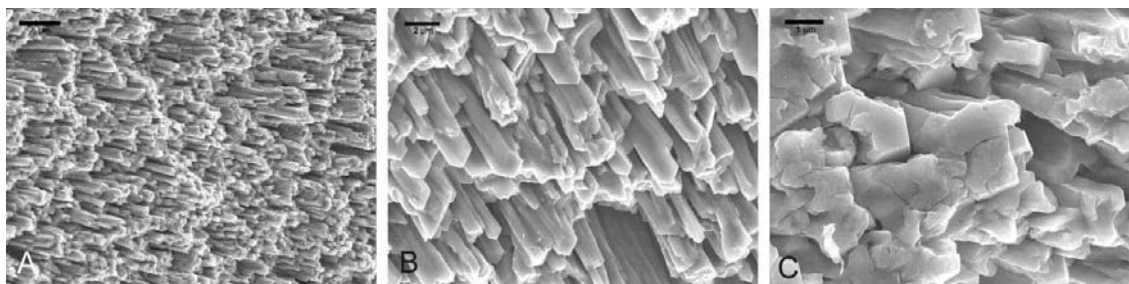


Figure 1. Calcitic fibrous microstructure of *Bathimodiolus azorensis*. A) General view of the closely packed disposition of the fibres. B) Detail of the pointed ends of the fibres with a smooth face disposed parallel to the shell surface. C) Slightly oblique view of the fibres which show rhombohedron shaped ends.

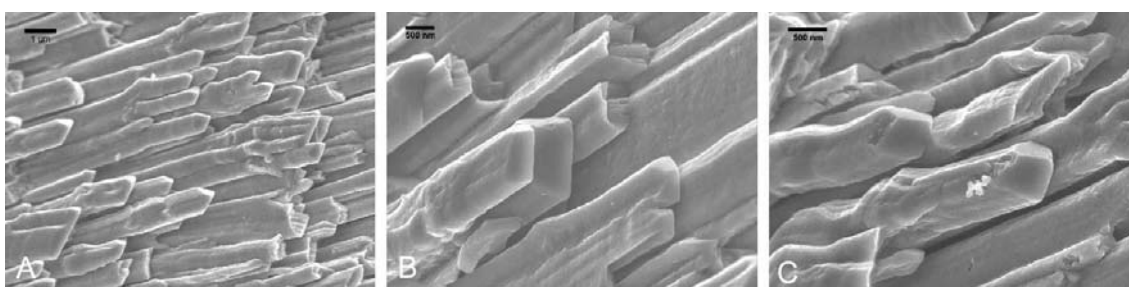


Figure 2. Calcitic fibres of the internal ribs of *Propeamussium dalli*. A) General view showing the packing and the great alignment of the fibres. B) and C) Detail of the distal ends of the fibres. There are two smooth faces looking forward and upwards which joint at a sharp edge inclined backwards.

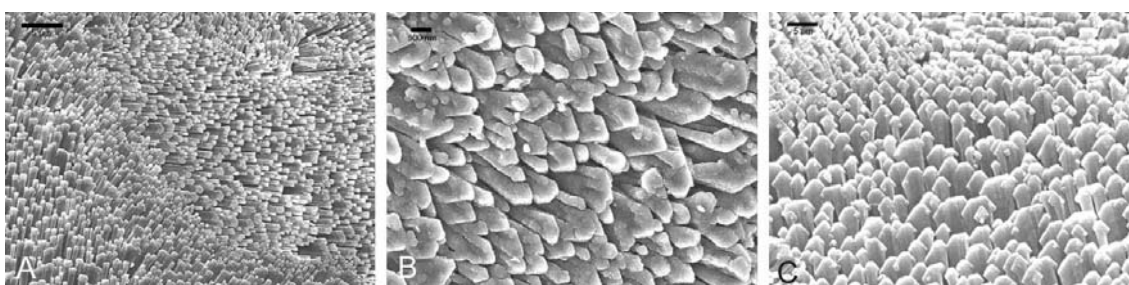


Figure 3. Calcitic fibres of the internal shell surface of *Mimachlamys varia*. A) General appearance of the fibres. B) Detail of the acute ends of the fibres showing the lateral faces and the sometimes truncated ends. C) Main surface of the fibres with rhombohedric overgrowths.

b) XRD texture analyses

The texture analyses made in the fibrous prismatic microstructure of *Mytilus* indicate that this material is highly ordered with a great alignment of the crystallographic axes of the constituent fibres. In the samples laying horizontally the 0006 pole maximum (= position of the c -axis) is inclined some 45° from the centre of the pole figure in the direction of growth of the fibres. One $10\bar{1}4$ pole maximum is near the centre of the pole figure indicating that the fibres have one $(10\bar{1}4)$ face laying in parallel to the shell surface. In the *Mytilus* samples disposed vertically the c -axis also lays at 45° from the centre of the pole

figure but there are two $10\bar{1}4$ pole maxima pointing upwards at both sides of the centre whereas the third $10\bar{1}4$ pole is inclined in the direction of growth of the fibres (Figure 4).

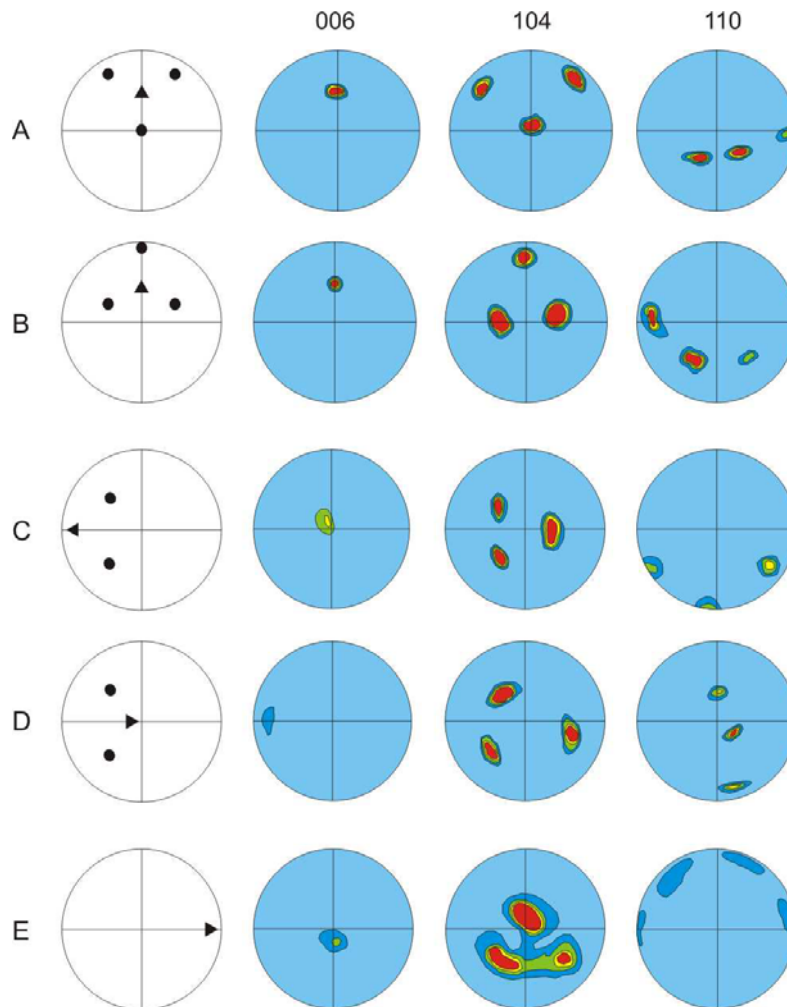


Figure 4. The left column shows the observed direction of growth of the fibres (triangles) and the approximated positions of the faces which constitute the distal ends of the fibres (circles). The columns entitled 006, 104 and 110 are the corresponding 006, 104 and 110 pole figures. A) Inner surface of the fibrous layer of *Bathymodiolus azoricus* arranged horizontally. B) Fibrous layer of *Bathymodiolus azoricus* settled vertically with inner surface looking to the top of the pole figure. C) Internal rib of *Propeamussium sibogai* resting horizontally. D) Internal rib of *Propeamussium sibogai* placed vertically. E) Fibrous layer of *Mimachlamys varia* set horizontally.

The internal ribs of propeamussiids are also an ordered material with a high alignment of the constituent fibres. In the samples disposed horizontally, the 0006 pole maximum is inclined some $25\text{-}30^\circ$ in the direction of growth of the fibres whereas the $10\bar{1}4$ pole maximum are disposed around with two maxima looking forwards and the third one looking backwards. The $11\bar{2}0$ pole maxima are located near to 90° opposite to the 0006 pole maximum. In the vertically disposed samples the 0006 pole maximum is located 70°

inclined whereas the $10\bar{1}4$ pole maxima are distributed around, two of them looking to the interior of the shell and the other one looking to the exterior. The $11\bar{2}0$ maxima are disposed close to the central meridian of the pole figure (Figure 4).

In *Mimachlamys varia* the texture analyses indicate that the fibres are also ordered although to a lesser extent than in the previous microstructures. The c -axis is reclined some 25° and there is one $10\bar{1}4$ maximum inclined 18° in the direction of growth and the other two maxima are inclined backwards. The $11\bar{2}0$ maxima are disposed at about 70° from the centre of the pole figure.

Discussion

The term fibrous “prismatic” microstructure was introduced by Kobayashi (1969) to name the external calcitic layers of mytilids. However the “fibrous prisms” of the mytilids have nothing to do with the typical columnar prisms of the prismatic layer of pteriods or ostreoids. That is the reason why here we propose that the term “prismatic” should be eliminated from the denomination of this microstructure and simplified to calcitic fibrous microstructure. Accordingly, the constituent elements of this microstructure should be named just fibres or calcitic fibres.

The fibres of the studied species are different in morphology, especially in their cross sections, but the most distinctive feature is the different arrangement of the growth fronts (distal ends). In mytilids and propeamussiids the growth fronts are defined by smooth, well developed crystalline faces whereas in the pectinid the growing surfaces are rather rugose. The interfacial relation of the faces of the growth front of the fibres seems to be the same that for the $\{10\bar{1}4\}$ calcite rhombohedron. This is not unlikely since it is well known that the most stable faces of calcite are the $\{10\bar{1}4\}$ rhombohedral faces (referencia aqu). However, the arrangement of such faces is different in the fibres of the studied species and therefore there seems to be some differences in their crystallographic arrangement.

The X-ray texture analyses used in combination with the SEM observations has allowed us to unravel the crystallographic arrangement of the fibres. In the mytilids the crystallographic c -axis coincides with the main axis of the prisms, as is demonstrated by the superposition of the 0006 pole maximum and the observed direction of elongation of the fibres. The faces coincide with the position of the 104 poles, which confirms our assumption that these faces are $\{10\bar{1}4\}$ calcite planes. One of the $10\bar{1}4$ pole maxima lies at

the centre of the pole figure, which is in agreement with the result of Feng *et al.* (2000) that the fibres grow with a $(10\bar{1}4)$ face parallel to the shell surface. The interpretation of the crystallographic arrangement of the mytilids fibres is represented in Figure 5A.

In the fibres of the internal ribs of the propeamussiids the distal ends are also the $\{10\bar{1}4\}$ planes as is evidenced by their coincidence with the position of the 104 pole maxima. However, the crystallographic arrangement of the fibres is completely different to that of the mytilids since their direction of elongation does not coincide with the c -axis but with a direction located approximately at 65° from it, that is, parallel to the $(10\bar{1}8)$ calcite planes (see our interpretation in Figure 5B). This finding is very interesting since it has been stated that the main surface of the laths of the foliated layer are delimited by $(10\bar{1}8)$ rhombohedron faces (Checa *et al.* 2006). In fact if we observe in some detail the crystallographic arrangement of the fibres and the laths we can see that the fibres of the internal ribs are identical to the laths of the foliated layer but rotated 180° along the main axis of the fibres (upside down) (Figure 5B). Notice that both fibres and laths have two $(10\bar{1}4)$ faces in the growth front although inclined in opposite directions. The same happens for the c -axis.

In the fibres of the pectinid *Mimachlamys varia* the crystallographic faces are not as clearly recognizable as in the previous species. However, in those fibres which develop acute ends at the extreme of the fibres it is possible to identify their main crystallographic directions. Such acute ends of some 75° correspond to the smaller interfacial angle of the $\{10\bar{1}4\}$ rhombohedron. Therefore according to the observed disposition of the $\{10\bar{1}4\}$ faces, the fibres are elongated in a direction parallel to the a -axis, and consequently, the truncation frequently developed at the extreme of the fibres is the expression of the $\{11\bar{2}0\}$ prismatic faces (see Figure 5C). In many cases the ends of the fibres are truncated with a small expression or without the expression of the $\{10\bar{1}4\}$ faces (Figure 3A and B). However the crystallographic arrangement of the fibres is exactly the same. This proposed arrangement fits perfectly to the position of the 0006, 104 and 110 pole maxima obtained by XRD texture analyses made in this material. From these pole figures we can also infer that the upper surface of the fibres lies between the $(10\bar{1}4)$ and the (0006), being nearly parallel to the $(10\bar{1}8)$ face. The expressed surface of the fibres is therefore as the same that of the laths of the foliated microstructure ($(10\bar{1}8)$ faces). However the direction of elongation of the fibres is rotated 90° with respect to the foliated laths since the laths grow

along the wide angle of the rhombohedron, and the fibres do it along the acute angle (see Figure 5C for a more detailed explanation).

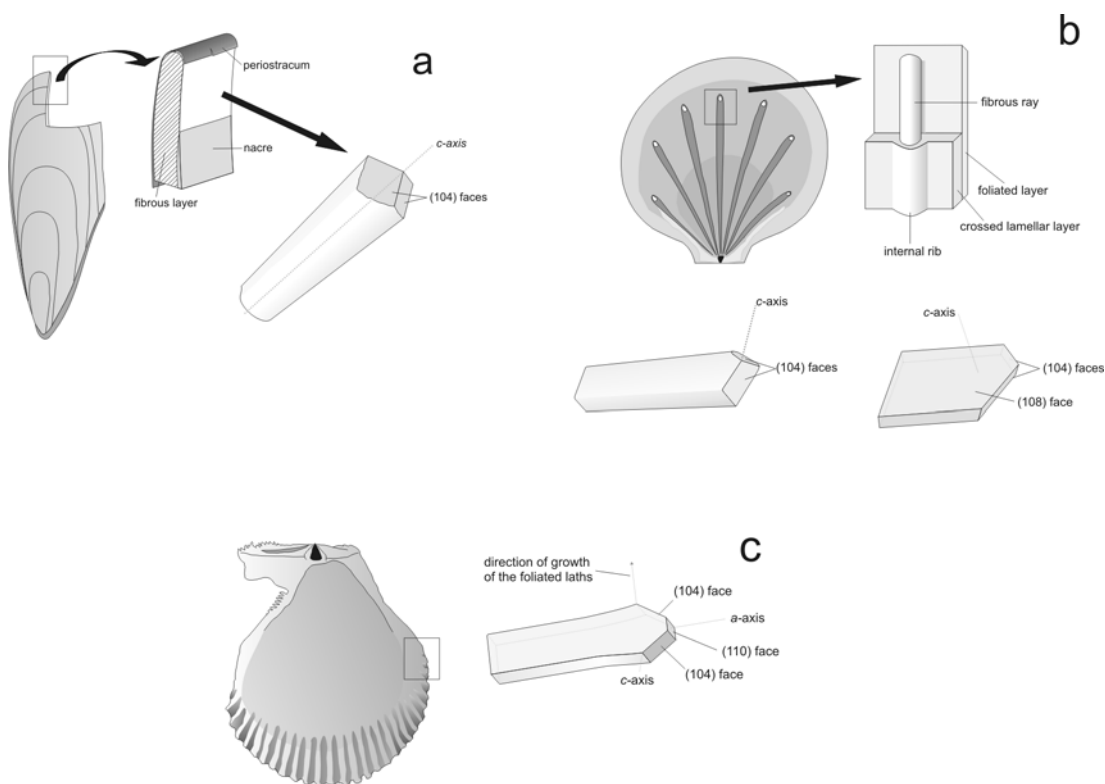


Figure 5. Interpretation of the crystallographic arrangement of the studied fibres. A) Mytilids fibres. B) Fibres of the internal ribs of propeamussiids, and C) fibres of the pectinid *Mimachlamys varia*.

From the above discussion we can infer that there are two well differentiated basic structural arrangements in the fibres of the studied species. One corresponds to the fibres of the mytilids, which are parallel to the c -axis, and the other is that of the fibres of the pectinoids, which are parallel to the $\{10\bar{1}8\}$ faces. The second type of fibres has the same essential architecture that the laths of the foliated microstructure, from which we think they are mere variations. Therefore, according to their ultrastructural arrangement we can make the distinction between the fibres of mytilids, which could be re-named as fibrous microstructure *sensu stricto*, and the fibres of pectinoideans which are fibrous varieties of the foliated microstructure.

Our study is not exhaustive since fibrous microstructures of other bivalves have not been studied, e.g. plicatulids or limids. However, we have settled with this work the basis for future investigations which should cope with the great variability of arrangements of the calcitic fibres of bivalves.

Conclusion

The calcitic fibrous microstructures of the pteriomorph bivalves are ordered materials which have a coherent arrangement of their constituent fibres. Their structure and crystallographic arrangement is noticeably different from that of the calcitic columnar prisms which constitute the prismatic layers of eupteriomorphs bivalves and therefore the term “prismatic” should be avoided to establish a clear distinction between microstructures. There is a clear crystallographic distinction between the fibres of the mytilids, which are elongated in parallel to the c -axis, and the fibres of the pectinoids which are built with the same architectural base as the foliated microstructure. According to these differences we propose to retain the term “fibrous microstructure” for the outer calcitic layer of mytilids and consider the fibrous prisms of the pectinoids variations of the foliated microstructure.

Acknowledgements

We thank José Romero (CIC, Univ. Granada) for advising on two-dimensional X-Ray texture analyses. This study was supported by Research 396 Projects CGL2004-00802 and REN2003-7375 (DGI, 397 MCyT), and by the Research Groups RNM190 and 398 RNM179 (CICE, JA).

References

- Carter JG (1980).** Environmental and biological controls of bivalve shell mineralogy and microstructure. In: *Skeletal Growth of Aquatic Organisms* (Rhoads DC, Lutz RA, eds), pp 69-113. New York, London: Plenum Press.
- Carter JG (1990).** Evolutionary significance of shell microstructure in the Palaeotaxodonta, Pteriomorphia and Isofilibranchia (Bivalvia: Mollusca). In: *Skeletal Biomineralization: Patterns, Processes and Evolutionary Trends* (Carter JG, ed), pp 135-411. New York: Van Nostrand & Reinhold.
- Chateigner D, Morales M, Harper EM (2002).** QTA of prismatic calcite layers of some bivalves, a link to Trichite ancestrals. *Materials Science Forum* 408-412: 1687-1692.
- Checa A, Esteban-Delgado FJ, Rodríguez-Navarro A (2006).** Crystallographic structure of the foliated calcite of bivalves. *Journal of Structural Biology* in press.
- Feng QL, Li HB, Pu G, Zhang DM, Cui FZ, Li HD (2000).** Crystallographic alignment of calcite prisms in the oblique prismatic layer of *Mytilus edulis* shell. *Journal of Materials Science* 35: 3337-3340.

Kennedy WJ, Taylor JD, Hall A (1969). Environmental and biological controls on bivalve shell mineralogy. *Cambridge Philosophical Society Biological Reviews* 44: 499-530.

Kobayashi I (1969). Internal microstructure of the shell of bivalve molluscc. *American Zoologist* 9: 663-672.

Lowenstam HA (1954a). Environmental relations of modification compositions of certain carbonate-secreting marine invertebrates. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 40: 39-48.

Lowenstam HA (1954b). Factors affecting the aragonite:calcite ratios in carbonate-secreting marine organism. *Journal of Geology* 62: 284-322.

Suzuki S, Uozumi S (1981). Organic components of prismatic layers in molluscan shells. *Journal of the Faculty of Sciences, Hokkaido University, Ser IV* 20: 7-20.

Taylor JD, Kennedy WJ, Hall A (1969). The shell structure and mineralogy of the Bivalvia. Introduction, Nuculacea-Trigonacea. *Bulletin of the British Museum (Natural History), Zoology Series Supplement* 3: 1-125.

Travis DF, Gonsalves M (1969). Comparative ultrastructure and organization of the prismatic region of two bivalves and its possible relation to the chemical mechanism of boring. *American Zoologist* 9: 635-661.

Waller TR (1972). The functional significance of some shell microstructures in the Pectinacea (Mollusca: Bivalvia). *Proceedings of the International Geological Congress 24th Session, Montreal, Canada, Section 7, Paleontology*: 48-56.

**Microridges in the inner dorsal shell of
pectinids**

VI

Microridges in the inner dorsal shell of pectinids

Antonio G. Checa⁽¹⁾, Francisco J. Esteban-Delgado⁽¹⁾, Carmen Salas-Casanova⁽²⁾

⁽¹⁾Departamento de Estratigrafía y Paleontología, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, Avenida Fuentenueva s/n, 18071 Granada, Spain; acheca@ugr.es; fjeste@ugr.es

⁽²⁾Departamento de Biología Animal, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, Campus de Teatinos s/n, 29071 Málaga, Spain. casanova@uma.es

Abstract

Microridges are tiny ridges which appear in the dorsum of the valve interiors in Pectinidae, Propeamussiidae and Spondylidae. Given that these structures have not seemingly been described earlier we have undertaken a SEM and TEM-based study of the morphology, distribution and microstructure of the microridges present in the family Pectinidae and of their associated mantle in order to obtain morphogenetic conclusions. In this family microridges have widths between 15-30 μm and alternate with similarly sized depressions. They elongate dorsoventrally and are mutually parallel, although they frequently diverge, fuse and intercalate, thus forming a certain dendritic pattern. They extend from both sides of the resilifer to close to the ends of both valve wings. Microstructurally they are calcitic spherulitic outgrowths developed onto the normal foliated layer. The microridges only grow in length, but not in width. Therefore, during the shell growth, their number increases by addition at the left and right ends. The microridges on one valve tightly interpenetrate the inter-ridge depressions of the opposing valve and vice versa, in a hinge-like fashion. In *Pecten maximus* the dorsal mantle epithelium adapts to the shape of the microridges, although it only adheres at the elevations but not at the depressions. The epidermis consists of cuboidal cells, with microvillar borders and some gland cells. At the convexities facing the depressions between ridges, there are tall epithelial cells with frequent mucous glands. At the concavities facing the ridges the epithelial cells are shorter, and have many mitochondria and well developed endoplasmic reticuli and Golgi apparatuses. These traits are indicative of metabolic activity, probably related to the calcification process. From the morphogenetic viewpoint, the microridges initiate by local folding of the mantle margin. A microanticline with dorsoventral axis thus forms, which initiates an underlying spherulitic deposit. Although their function is speculative, microridges seemingly act in a hinge-like fashion. Their study may provide clues to understand the development of the taxodont hinge.

Keywords.- *Biom mineralization, Microstructures, Shell, Calcite, Microridges, Pectinidae, Constructional morphology*

Resumen

Las microcrestas son pequeñas estrías que aparecen del interior de las valvas de Pectinidae, Propeamussiidae y Spondylidae. Dado que estas estructuras no han sido aparentemente descritas previamente hemos llevado a cabo un estudio de la morfología, distribución y microestructura basado en observaciones de SEM y TEM de las microcrestas presentes en la familia Pectinidae y de su manto asociado con el objeto de obtener conclusiones desde el punto de vista morfogénético. En esta familia, las microcrestas tienen una anchura entre 15-30 μm y alternan con depresiones del mismo tamaño. Ambas estructuras están alargadas dorsoventralmente y son mutuamente paralelas, aunque frecuentemente divergen, se fusionan e intercalan en un patrón dendrítico. Se extienden desde ambos del resilifer hasta cerca del margen de las aurículas. Desde el punto de vista microestructural son crecimientos esferulíticos de calcita desarrollados sobre la capa foliada. Las microcrestas sólo crecen en longitud, pero no en anchura. Por lo tanto, durante el crecimiento de la concha su número aumenta por adición en los extremos. Las microcrestas de una valva interpenetran estrechamente en las depresiones de la valva opuesta y viceversa, de un modo similar a los dientes de la charnela. En *Pecten maximus* el epitelio dorsal del manto se adapta a las microcrestas, aunque sólo se adhiere a las elevaciones y no a las depresiones. La epidermis consiste en células cuboidales con microvilli y algunas células glandulares. En las convexidades que recubren las crestas las células epiteliales son más bajas, y tienen muchas mitocondrias y retículo endoplasmático y aparato de Golgi bien desarrollados. Estos rasgos son indicativos de actividad metabólica, probablemente relacionada con el proceso de calcificación. Desde el punto de vista morfogénético las microcrestas se inician por plegamientos locales del borde del manto. Se forma por lo tanto un microanticlinal de eje dorsoventral debajo del cual se produce el depósito esferulítico. Aunque su función es especulativa, las microcrestas parecen

actuar del mismo modo que la charnela. Su estudio puede aportar indicios para comprender el desarrollo de la charnela taxodonta.

Palabras clave.- *Biomineralización, Microestructuras, Concha, Calcita, Microcrestas, Pectinidae, Morfología constructiva*

Manuscript

Introduction

We call microridges a set of crests and troughs with a general dorso-ventral arrangement which have been appreciated in the dorsalmost area of the shell of most pectinoideans examined. They are bounded dorsally by the hinge line and fade out in the ventral direction within the hinge plate. Although crests elongate dorsoventrally, there are in detail many cases of division, joining, cessation and origination, such that the general pattern is slightly dendritic (Fig. 1). This is not the case with Spondylidae in which the final arrangement on the hinge area is strictly parallel since ridges here are in fact the tracks left by very short crests in the inner dorsal plate.

Our efforts to find previous descriptions of structures similar to microridges in pectinoideans or in other bivalve groups have been completely unsuccessful and we hardly believe that microridges are undescribed structures. The present study aims at describing such structures in detail and to propose a model for their origin. Additionally, we will try to relate them to the associated hinge system.

Material and methods

We have examined a total of 79 species belonging to all families and subfamilies of Pectinoidea. A list of the number of species examined per genus is provided in Table 1. Microridges have been noticed in 66 among such species (i.e., 84%). The dorsal area of the remaining species is smooth, except for the existence of hinge teeth. A peculiar case is that of the species of *Hinnites*, in which microridges are present only in juvenile shells. Microridges are also absent in other sedentary forms, such as *Pedum*. Nevertheless, there is no clear relationship with the mode of life, since the absence of microridges has also been detected in active forms (e.g., *Adamussium*).

The shells of *Aequipecten opercularis* and *Pecten maximus* have been examined with FESEM (LEO GEMINI-1530, covered with carbon on a Hitachi UHS evaporator), both in surface and in fracture. Cross-sections of the microridge systems of the opposing valves along the left-right axis have also been examined with transmitted light microscopy (OLYMPUS BX51).

The mantle associated to the microridges of *Pecten maximus* has been examined both with light microscopy and TEM (OLYMPUS BX51 and ZEIS EM 902 respectively).

Family	Genus	+	-	Total
Propeamussiidae	<i>Adamussium</i>	0	1	1
	<i>Amussium</i>	3	0	3
Pectinidae	<i>Aequipecten</i>	1	0	1
	<i>Argopecten</i>	2	0	2
	<i>Chlamys</i>	16	5	21
	<i>Patinopecten</i>	1	2	3
	<i>Anguipecten</i>	1	0	1
	<i>Annachlamys</i>	1	0	1
	<i>Crassadoma</i>	0	1	1
	<i>Delectopecten</i>	2	0	2
	<i>Decatopecten</i>	2	0	2
	<i>Gloripallium</i>	1	0	1
	<i>Hemipecten</i>	1	0	1
	<i>Hinnites</i>	4*	1	5
	<i>Leptopecten</i>	1	0	1
	<i>Lyropecten</i>	2	0	2
	<i>Mirapecten</i>	1	0	1
	<i>Palliolium</i>	1	0	1
	<i>Pecten</i>	21	2	23
<i>Pedum</i>	0	1	1	
<i>Pseudamussium</i>	2	0	1	
<i>Semipallium</i>	3	0	3	
Spondylidae	<i>Spondylus</i>	3	0	3
Total		66(84%)	13(16%)	79(100%)

Table 1. List of the number of species examined per genus. The column (+) indicates the number of species with microridges and the column (-) the number of species without microridges per genus.

Results

The following results are based on the shell and mantle of *Aequipecten opercularis* and *Pecten maximus*. The general characteristics provided in both cases agree to those of the rest of Pectinoidea, with the exception of those forms in which there is a ligamentary area (such as *Spondylus*).

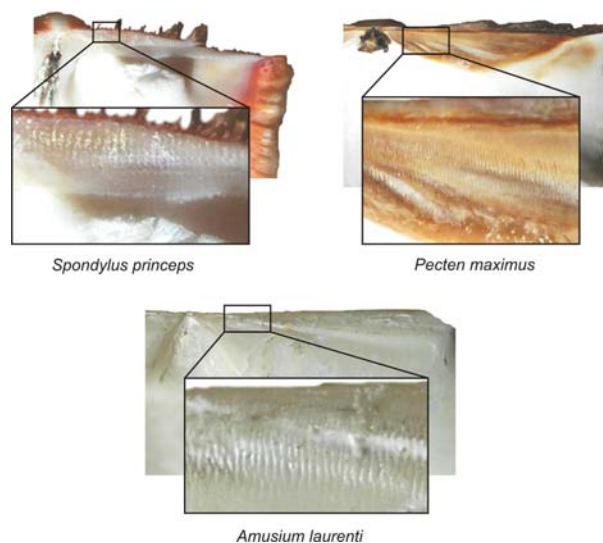


Figure 1. Microridges in dorsum of some bivalves.

A) Shell

In SEM view the microridges of both valves agree to the general description provided above. Microridges extend from the dorsal line to half the extension of the dorsal hinge pate. They can be described as having a dorsoventral labyrinthine pattern (Fig. 2). Both towards the right and left sides of the shell, microridges fade out and their outlines become increasingly dendritic (Fig. 2).

The shell forming the micridge area is similar to the foliated layer forming the rest of the shell interior outside the pallial line. The aspect of the shell surface varies depending on whether we consider ridges or troughs (Fig. 3). In the heights the shell is smooth and the endings of the calcitic laths forming the shell are levelled. On the contrary, the crystals found at the bottoms of troughs have arrow-point endings and form a rough, druse-like surface.

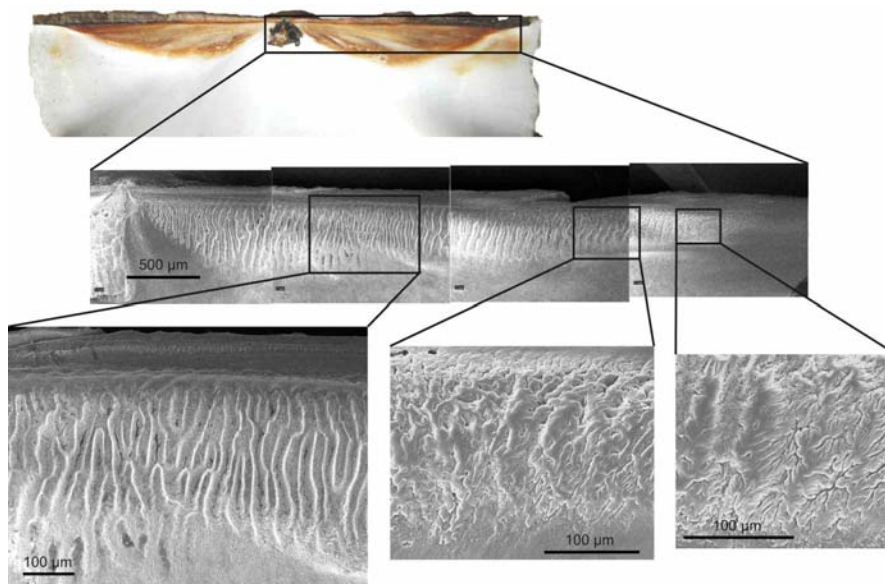


Figure 2. Microridges in *Pecten maximus*

In fracture view, it can be appreciated how every ridge corresponds to a spherulith, whereas the troughs are the boundaries between spheruliths (Fig. 4). Void spaces can sometimes be appreciated at these contacts.

A simple bivariate plot demonstrates that the number of microridges increases linearly with the size of the scallop (expressed as the length of the hinge line) (Fig. 5).

When the two opposing valves are juxtaposed and sectioned together along the dorsal line in a left-right direction (i.e., perpendicular to the main elongation of the crests) it can be appreciated how there is an exact correspondence between the crests on one valve and the troughs on the opposite valve, and vice versa (Fig. 6, left). The degree of

interpenetration is not complete since the flat-topped ridges do not reach the bottoms of the gorge-like troughs, thus leaving void spaces in between.

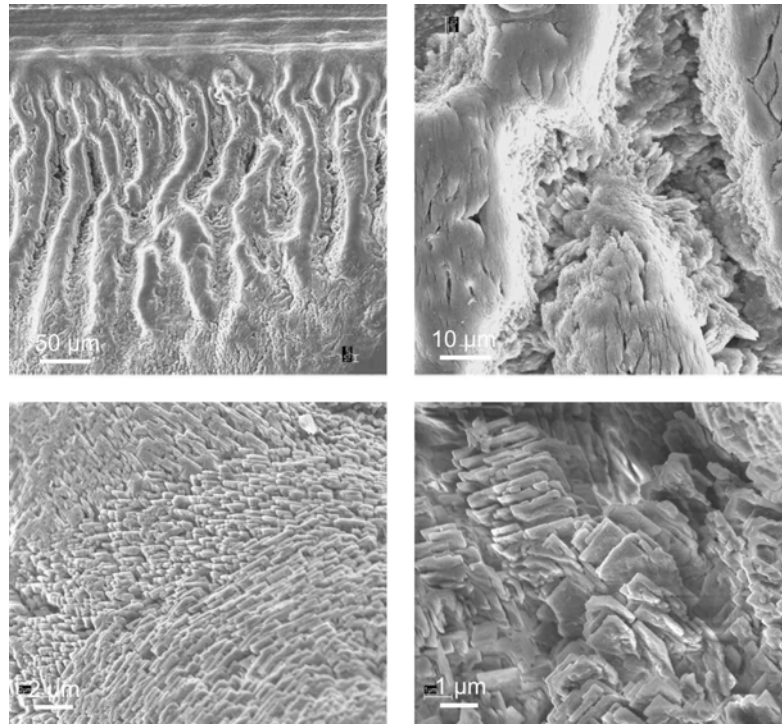


Figure 3. The upper row shows the smooth surface of the crystallites at the heights and the inferior row shows the arrow-pointed crystallites forming a rough, druse-like surface.

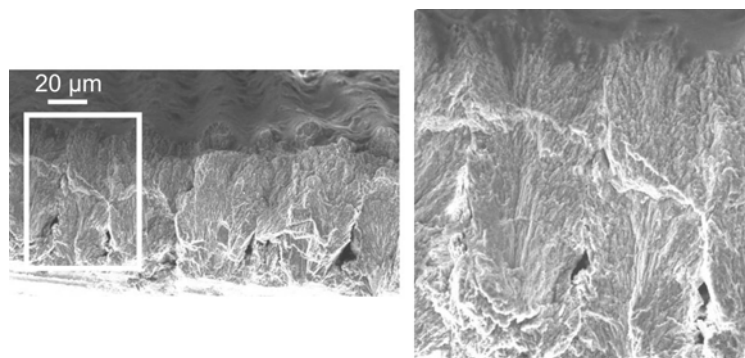


Figure 4. Fracture of the microridges showing their spherulitic structure

When the superficial distribution of microridges of the two valves is compared in detail it can be seen how there is a one-to-one correspondence in number and shape of the crests of one valve with those of the troughs of the opposing valve (Fig. 6, right).

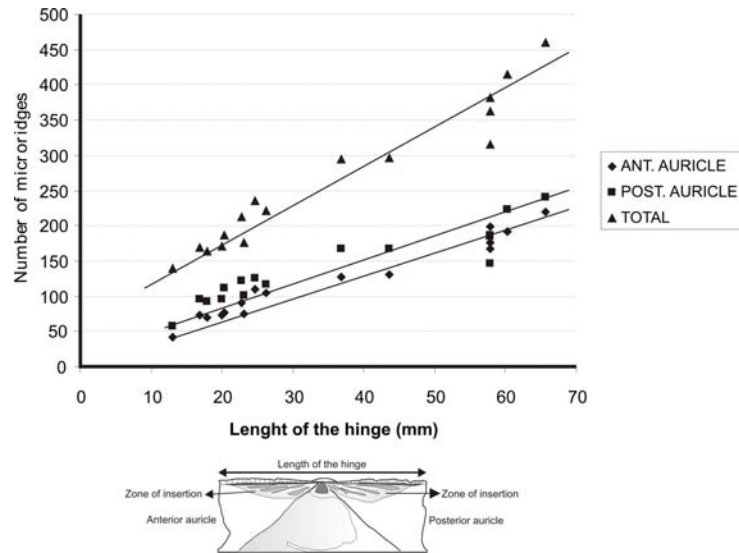


Figure 5. Plotting of the number of microridges as a function of the length of the hinge. There is a lineal relation between the size of the shell (measured as the length of the hinge) and the number of microridges.

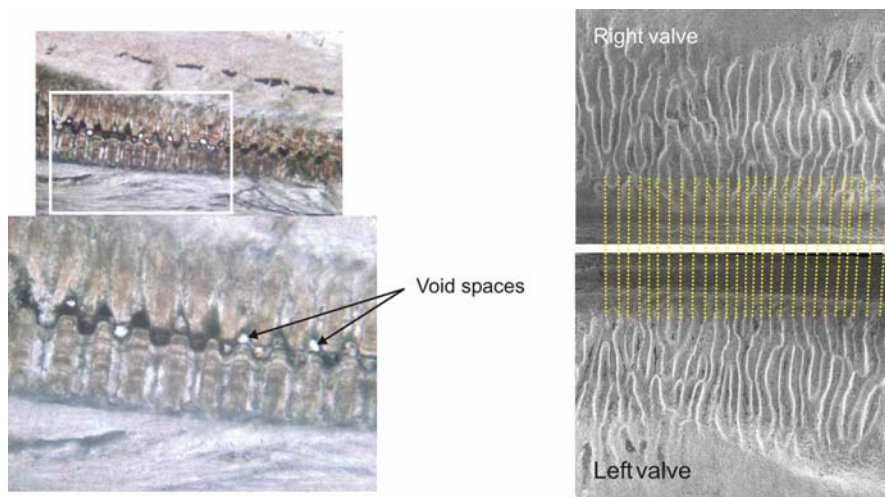


Figure 6. Left. Thin section of the microridges of *Pecten maximus*. There is a perfect interpenetration of the microridges in between valves. Right. SEM montage to show the correspondence of the patterns displayed by the microridges in both valves.

B) Mantle

The observation of the critically point dried mantle clearly shows that the system of microridges is impressed in the mantle surface (Fig. 7). They differ from the equivalent features in the shell in that both the concavities and convexities are smooth and there is not so much difference in height between the swells and troughs. The ridges on one mantle side clearly correspond to the troughs of the valve to which it adheres and, as expected, to the ridges of the opposite valve (Fig. 7).

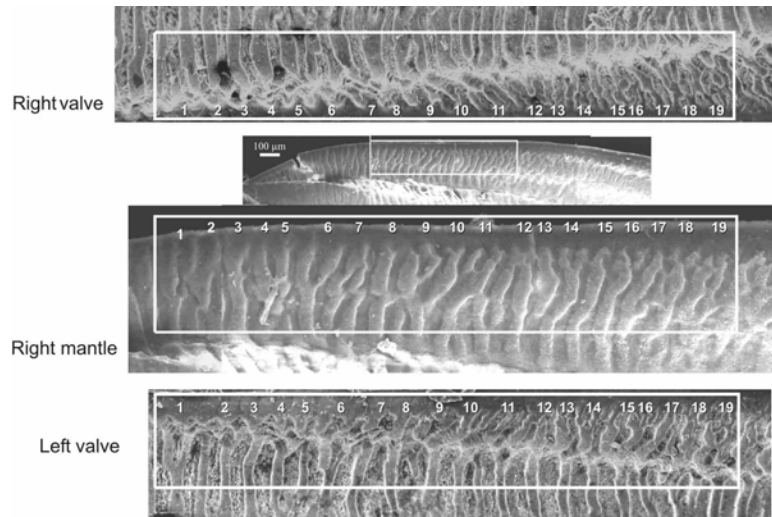


Figure 7. Correspondence in the microridges of the valves and the impressions in the corresponding mantle surface.

Antero-posterior thin sections of the mantle secreting the microridges shows the even succession of anticlines and synclines commented on above (Fig. 8). At this level of observation there are obvious differences in the thickness of the mantle, which is relatively coarsened at the elevations.

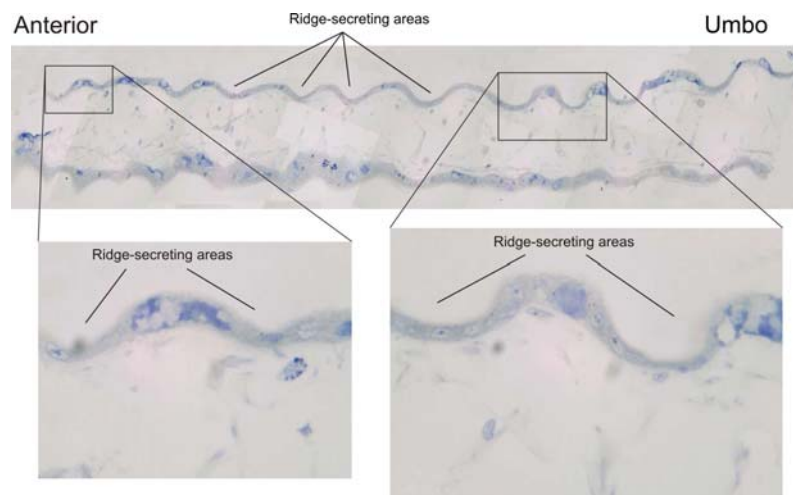


Figure 8. Thin section of the mantle which lines the microridges. There is a succession of anticlines and sinclines which corresponds to the elevated and depressed areas of the microridges. The epithelium is relatively coarsened at the elevations.

TEM observations reveal that the fine structure is different at the elevations and at the depressions (Fig. 9). Elevations are rich in mucopolysaccharide and lipoprotein rich bodies, whereas the cells at the depressions (i.e., those areas secreting the shell ridges) are

rich in mitochondria, Golgi apparatus vesicles, granular endoplasmatic reticuli and lysosomes.

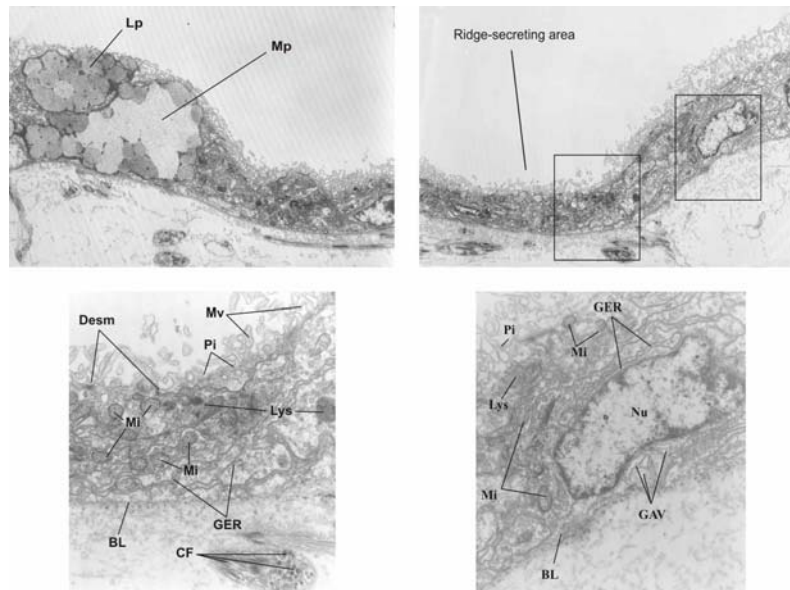


Figure 9. TEM observations of the mantle lining the microridges. There is a clear differentiation in the organules in each area. Lp: lipoprotein bodies, Mp: mucopolysaccharide bodies, Mi: mitochondria, GAV: Golgi apparatus vesicles, GER: granular endoplasmatic reticuli, Lys: lysosomes, Nu: nucleus, Mv: microvilli.

Discussion

A) Relationship between mantle and shell in the microridges

The different superficial aspect of crystal aggregates at the ridges and troughs (Fig. 3) are strongly indicative that the mantle is in direct contact with the shell at the shell crests, but not at the troughs. This is also supported by the smoother shapes of folds formed in the mantle, compared to those of the shell (Fig. 7). This explains why when opposing valves are fitted together, ridges do not reach the bottoms of troughs.

Histological differences found in the microridge secreting mantle (Fig. 8) can also be explained within this context. The crest secreting mantle cells are far richer than those facing the troughs in mitochondria, granular endoplasmatic reticuli and other structures which are indicative of a high secretory activity.

The main conclusion is that the mantle only adheres at the heights, which correspond to the tops of spheruliths, in which there is active mantle secretion. Crystals in the interspherulith areas grow passively by precipitation within the extrapallial fluid.

B) Microridge growth

Given that every microridge is a spherulithic outgrowth of the shell which is bounded by other spheruliths, their size cannot increase during growth. They can only extend in length dorsoventrally. This is demonstrated by the linear relationship found between the number of microridges and the size of the bivalve (Fig. 5). The areas in which new ridges insert during growth are the right and left ends of the microridge system.

In these areas, the relief of microridges is attenuated and their outlines are complex dendritic (Fig. 2). This dendritic pattern is produced because, immediately following the initiation of mantle folds initiate in this area, there is a process of detachment of the mantle folds at the inter-ridge areas. This may cause formation of the so-called viscous fingers. These form when two fluids are into contact and the less viscous fluid pushes against the more viscous one. The interface between both fluids then becomes unstable (Saffman-Taylor instability) and breaks forming a dendritic pattern. The differences in pressure can be obtained either by increasing the pressure in the less viscous fluid or by creating a low pressure in the more viscous fluid. This last effect is obtained, e.g., when a wet soap tablet is suddenly detached from the washbasin surface and air is allowed to intrude the soapy water film. The same physical situation can be produced when the mantle progressively detaches from the shell at the inter-ridge areas. A certain vacuum is then produced in the detaching mantle area. The extrapallial liquid then intrudes the mantle itself or the mucus film by which this adheres to the shell (Fig. 10). A Saffman-Taylor instability is unavoidably produced which corresponds to the dendritic outline of forming microridges. When growth of the underlying spherulith causes complete detachment of the mantle, the pressure across the interface between the mantle and the extrapallial fluid becomes equilibrated and the interfacial shape reverts to flat or gently curved, which is the normal shape in mature microridges.

C) Model of formation of microridges

The general linear pseudodendritic aspect of microridges is consistent with a folding pattern of the dorsal mantle. Microridges are fully comparable to skin folds developed, e.g., in sphinx cats (Fig. 10). In the case of microridges, folds are not compression folds, but they are produced by positive allometric growth (extraordinary cellular proliferation) of the mantle in a left-right direction only within the dorsalmost band. The excess length then accommodates by wrinkling (Fig. 10). Given the complementarity of both the right and left

mantle epithelia, these, together with the intervening connective tissue, fold as a single lamina with a constant wavelength

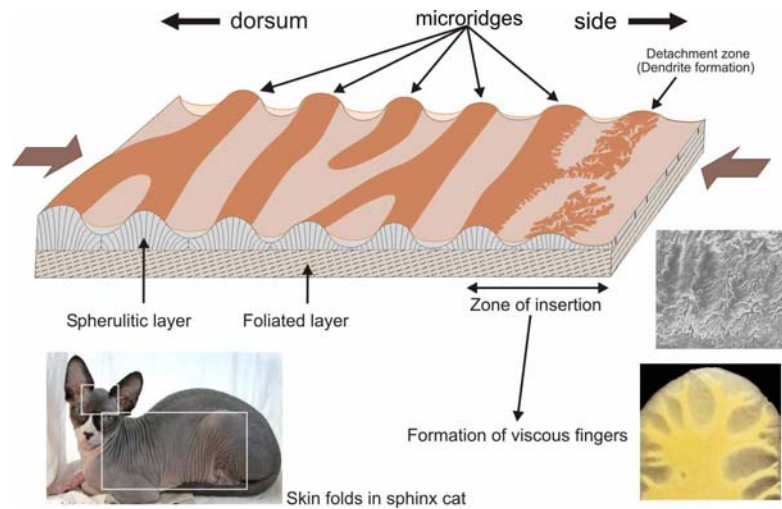


Figure 10. Mode of formation of the microridges in the shell of pectinids.

Microcrests initiate at the anterior and posterior ends as a very shallow fold in which the anticline and syncline still remain in contact with the shell surface. A spherulithic outgrowth is then induced to form below the anticline. With subsequent growth, the spherulith pushes the mantle on top of it until the mantle syncline begins to lose contact with the inter-ridge area below it. This causes the formation of an immature microridge with dendritic outline in the way explained above (Fig. 10). With time, when detachment is complete at the inter-ridge areas, the outline of the microridges becomes smooth undulating. Since there is active secretion only at the mantle areas in contact with the microridges a contact histological differentiation should also occur, with actively secreting mantle cells being characterized by a more complex arrangement of secretion-related organelles.

Conclusions

The microridge system of the dorsal shell of pectinids is described for the first time and a model for its formation is provided. In brief, microridges are formed by mantle folds, which initiate spherulithic outgrowths of the foliated shell layer. The mantle later remains in contact with the shell only at the ridges and not at the troughs.

Microridges of opposing valves are complementary and interpenetrate in a hinge-like fashion. In fact, they constitute a secondary microhinge and, possibly, they can be attributed a similar function. Therefore, their model of formation can provide a genetic

model for similar hinge types, such as the taxodont hinge. Future effort will be invested to ascertain this possibility.

Acknowledgements

We would like to thank Juan de Dios Bueno Pérez (CIC, UGR) for the mantle preparations. Antonio P. Jiménez Jiménez (Depto. Estratigrafía y Paleontología, UGR) made the photographs of the pectinids hinge. Juana Cano López (Centro Oceanográfico de Fuengirola, MCyT) provided fresh specimens for the histological preparations. We would also like to thank to John Taylor (NHM London) who kindly allowed the supervision of the pectinid collection of the museum, and to Liz Harper (Dept. Earth Sciences, Univ. Cambridge) who also provided some specimens. Nikolaus Malchus (Unitat Paleontología, UAB) contributed with interesting comments on hinge development. This study was supported by Research Project CGL2004-00802 (MEC) and Research Group RNM 190 (JA).

References

- Le Pennec, M. (1974).** Morphogenèse de la coquille de *Pecten maximus* (L.) élevé au laboratoire. *Cab Bio Mar* 15: 475-482.
- Marsh, M. E., Sass, R. L. (1981).** Matrix-mineral relationships in the scallop hinge ligament. *Journal of Ultrastructure Research* 76: 57-70.
- Waller, T.R. (1986).** A new genus and species of scallop (Bivalvia: Pectinidae) from off Somalia, and the definition of a new tribe Decatopectinini. *The Nautilus* 100: 39-46.