

# FUNDAMENTAL



Una historia de muerte,  
melanina y azufre

English  
version included

# **UNA HISTORIA DE MUERTE, MELANINA Y AZUFRE**

---

**MARIA McNAMARA, BART VAN DONGEN, NICK LOCKYER,  
IAN BULL Y PATRICK ORR**

**McNamara, M., Van Dongen, B., Lockyer, N., Bull, I. y Orr, P. (2018).**

Una historia de muerte, melanina y azufre. *¡Fundamental!* 31, 1–58.

Este número se ha editado en el marco del 15º Premio Internacional de Investigación en Paleontología **paleonturología 17**, convocado por la Fundación Conjunto Paleontológico de Teruel–Dinópolis.

Esta publicación forma parte de los proyectos de investigación en Paleontología subvencionados por: Departamento de Educación, Cultura y Deporte del Gobierno de Aragón; Departamento de Innovación, Investigación y Universidad (Grupo de Investigación de Referencia FOCONTUR E04–17R) del Gobierno de Aragón y Fondo Social Europeo; Instituto Aragonés de Fomento; Dinópolis y Caja Rural de Teruel.

**EDICIÓN:** © Fundación Conjunto Paleontológico de Teruel – Dinópolis.

**AUTORES:** Maria McNamara, Bart Van Dongen, Nick Lockyer, Ian Bull y Patrick Orr.

Todas las imágenes son de Maria McNamara, excepto la de la página 11 que es de Uta Kiel (Forschungsinstitut Senckenberg).

**COORDINACIÓN:** Luis Alcalá.

**DISEÑO Y MAQUETA:** © JoaquínJPG.

**FOTOGRAFÍA PORTADA:** Un ejemplar excepcionalmente conservado de *Pelophylax pueyoi* de Libros (ejemplar 26217, Museu de Geologia del Seminari, Barcelona). Los tejidos blandos muestran múltiples modos de conservación; en particular, el contorno del cuerpo está definido por melanosomas que se conservan mediante sulfuración.

**DEPÓSITO LEGAL:** TE–179–2018

**ISBN–13:** 978-84-944167-4-3

*Queda rigurosamente prohibida, sin la autorización escrita de los autores y del editor, bajo las sanciones establecidas en la ley, la reproducción total o parcial de esta obra por cualquier medio o procedimiento, comprendidos la reprografía y el tratamiento informático. Todos los derechos reservados.*

# 15° PREMIO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN EN PALEONTOLOGÍA paLeonturoLogía 17



En la ciudad de Teruel, a las 21:00 horas del día 14 de diciembre de 2017, se reúnen en calidad de miembros del jurado los doctores **Ángela D. Buscalioni** (Profesora de la Universidad Autónoma de Madrid y miembro del equipo ganador del premio Paleonturología 16), **Francis Duranthon** (Director del Museo de Historia Natural de Toulouse y miembro del equipo Human Origins en Namibia) y **Luis Moliner** (paleontólogo distinguido con la Medalla de la Universidad de Granada en 2010) y, en calidad de secretario, el doctor Luis Alcalá (Director Gerente de la Fundación Conjunto Paleontológico de Teruel-Dinópolis).

Después de examinar los 18 artículos científicos participantes en la fase final del Decimoquinto Premio Internacional de Investigación en Paleontología **paLeonturoLogía 17** (convocado por la Fundación Conjunto Paleontológico de Teruel-Dinópolis, la Caja Rural de Teruel y la Sociedad Gestora del Conjunto Paleontológico de Teruel) y tras las oportunas deliberaciones

acuerdan conceder el Premio **paLeonturoLogía 17**, dotado con 4.500 euros y una edición divulgativa del trabajo premiado, al artículo:

## Fossilization of melanosomes via sulfurization

cuyos autores son

**Maria E. McNamara, Bart E. Van Dongen, Nick P. Lockyer,  
Ian D. Bull & Patrick J. Orr**

University College Cork (Ireland), University of Manchester (UK),  
University of Bristol (UK) & University College Dublin (Ireland)

publicado en ***Palaeontology*, 59 (3): 337–350, 2016.**

El trabajo premiado identifica gránulos de melanina fósil (llamados melanosomas) que forman parte del tejido blando de los organismos y que, sin embargo, se han conservado excepcionalmente en algunas ocasiones, como en los fósiles de ranas de Libros (Teruel, España). Estos melanosomas constituyen un recurso importante para inferir el color y su función en los animales.

El estudio señala que los compuestos de sulfuros orgánicos y/o concentraciones elevadas de sulfuros se han identificado en melanosomas conservados en varios fósiles de invertebrados y de vertebrados de diferentes ambientes sedimentarios, lo que sugiere que la conservación a través de la sulfuración pudo haber sido muy común.

El jurado ha valorado la innovación del trabajo en un área emergente de la paleontología, como es la tafonomía molecular, que se apoya en diferentes técnicas (microscopía electrónica, cromatografía de gases y análisis geoquímicos) para caracterizar no solo los procesos de fosilización de tejidos blandos sino también para reinterpretar unas estructuras microscópicas de las ranas que ahora se determinan como elementos de la propia piel del animal. Además, valora la circunstancia de que nuevas técnicas permitan el progreso en el conocimiento científico, enmendando interpretaciones anteriores, así como el comportamiento ético de los autores al revisar sus conclusiones previas.

De todo lo cual doy constancia a las 11:16 horas del día 15 de diciembre de 2017.

El Secretario  
Luis Alcalá

# Autores

## Dra. Maria McNamara



Soy una paleobióloga que trabaja en la preservación de tejidos blandos en animales extintos. Gran parte de mi investigación actual se centra en la conservación del color en fósiles de insectos y vertebrados. También estoy interesada en la conservación de los fósiles de manera más amplia, incluida la tafonomía de esqueletos fosilizados, y en los controles ambientales y biológicos de la preservación. Los aspectos más destacados de mi investigación incluyen el descubrimiento de piel fosilizada de dinosaurios con plumas y aves primitivas (McNamara *et al.*, 2018a, *Nature Communications*), el reconocimiento de que los melanosomas pueden derivar en muchos fósiles de órganos internos y no de la piel (McNamara *et al.*, 2018b, *Nature Communications*) y la reconstrucción de la coloración de una serpiente a partir de su fósil (McNamara *et al.*, 2016, *Current Biology*).

maria.mcnamara@ucc.ie ■ <http://mariamcnamara.ucc.ie>

## Dr. Bart Van Dongen



Soy un geoquímico orgánico y gran parte de mi investigación se centra en la aplicación de técnicas geoquímicas orgánicas al estudio de procesos biogeoquímicos, incluida la preservación de tejidos blandos en el registro fósil. Investigaciones anteriores destacables incluyen el descubrimiento de que la conservación mediante sulfuración es un mecanismo más importante de lo que se pensaba en la preservación del carbono orgánico en el registro fósil, y el desarrollo de nuevas técnicas no destructivas para mapear compuestos orgánicos de modo que puedan utilizarse para revelar la química de estructuras biológicas conservadas en reptiles, plumas y plantas de hasta 50 millones de años de antigüedad, al menos.

## Dr. Nicholas Lockyer



Me doctoré en 1996 en la UMIST (Universidad de Manchester) con un trabajo sobre espectrometría de masas de biomoléculas por ionización con láser. Después de un período de trabajo posdoctoral y de una beca de investigación Leverhulme desarrollando la instrumentación de imagen de espectrometría de masas de iones secundarios en tiempo de vuelo (ToF-SIMS), fui nombrado profesor en el Departamento de Química de la UMIST en 2002. Mi ocupación actual es de profesor en la Facultad de Química de la Universidad de Manchester. Mis intereses de investigación incluyen el desarrollo de instrumentación de imágenes y aplicaciones de espectrometría de masas, sobre lo que he publicado más de 100 artículos.

## Dr. Ian Bull



Soy un químico analítico interesado en la caracterización, principalmente a través de la aplicación de espectrometría de masas, de compuestos orgánicos presentes en materiales naturales (como fósiles, suelos y sedimentos) para proporcionar información sobre el origen de la materia orgánica, los procesos que la alteran y su preservación a largo plazo. Algunos ejemplos de cómo se puede utilizar este conocimiento incluyen: obtener información biológica sobre los organismos responsables de la formación de fósiles, investigar la actividad funcional de las comunidades microbianas y, más ampliamente, obtener una mejor comprensión de los ciclos de los elementos en el medio ambiente.

## Dr. Patrick Orr



El Dr. Patrick Orr está interesado en la investigación en el extenso campo de la paleobiología. Sus estudios incluyen la tafonomía de biotas excepcionales y el uso de huellas fósiles e icnofábricas para documentar la evolución de las primeras comunidades de animales marinos. Su investigación actual incluye también la paleobiología de la conservación, un campo que se está desarrollando rápidamente, utilizando asociaciones recientes de fósiles de origen antropogénico y natural como referencia para contrastar la respuesta de las comunidades actuales frente al cambio ambiental.



# Una historia de muerte, melanina y azufre

*Maria McNamara, Bart Van Dongen,  
Nick Lockyer, Ian Bull y Patrick Orr*



## PREÁMBULO


Me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento al jurado del Premio Paleontología por haber seleccionado mi publicación de 2016, "Fosilización de melanosomas a través de sulfuración" (publicada en la revista *Paleontology*), como ganadora del Premio 2017. También me gustaría agradecer las contribuciones respectivas de cada uno de mis coautores en el trabajo: Bart Van Dongen e Ian Bull, que realizaron los análisis GC-MS, Nick Lockyer, que realizó los análisis ToF-SIMS, y Patrick ('Paddy') Orr, que realizó aportaciones útiles en todas las etapas de la investigación. El artículo fue el resultado de una verdadera colaboración y no se podría haber publicado sin las aportaciones y experiencia de cada uno de los coautores.

En segundo lugar, deseo agradecer las contribuciones de todos los coautores que han trabajado conmigo en varios aspectos de los fósiles de Libros: Luis Alcalá, Pere Anadón, Enrique ("Quique") Peñalver,

Stuart Kearns, Jo Kaye y Valentina Rossi. Un agradecimiento muy especial es para Patrick Orr, quien ha colaborado conmigo en todas mis investigaciones relacionadas con Libros y que, como supervisor de mi doctorado, me puso en el camino para descifrar el registro fósil. Un agradecimiento especial también debe ir a mi esposo Seán, no solo por su ayuda como asistente de campo durante mi trabajo de doctorado en Libros, sino por haberme apoyado durante todas las alegrías y obstáculos de una carrera de investigación y haciendo juegos malabares con una familia joven.

También quiero agradecer a todos mis colegas, estudiantes y contratados posdoctorales, por haberme brindado estimulantes y emocionantes discusiones sobre los fósiles de Libros y sobre la tafonomía en general durante los últimos 15 años. Y finalmente, gracias a Naomi O'Reilly, que me ayudó con el formato del texto.

*Maria McNamara*



Trabajo de campo en Libros. La Dra. Maria McNamara (segunda desde la derecha) consulta un mapa geológico con -de izquierda a derecha-, el Dr. Luis Alcalá, el Dr. Pere Anadón, el Dr. Patrick Orr y el Sr. Seán Burke.

## 1 INTRODUCCIÓN

Esta publicación trata sobre fósiles, esos restos enigmáticos de la vida antigua. En particular, este libro se centra en las ranas fósiles excepcionalmente conservadas de la biota de Libros en Teruel, NE de España (Figura 1). Estos fósiles son mundialmente famosos debido a la calidad de la conservación de sus tejidos blandos, que normalmente no perduran en el registro fósil. Los tejidos blandos de los fósiles de Libros conservan detalles de tejidos que solo tienen micrómetros o nanómetros de tamaño; sin embargo, nos hablan de la ecología y del comportamiento de animales remotos, así como de su proceso de fosilización. Los fósiles se han estudiado intensamente por un equipo internacional de paleontólogos durante los últimos 15 años, y aunque hemos aprendido mucho, todavía tenemos muchas preguntas sin respuesta. Debido a esto, los fósiles de Libros todavía se están investigando por estudiantes y paleontólogos expertos de todo el mundo, trabajando juntos para desentrañar misterios relacionados con la delicada anatomía y composición química de los tejidos blandos fosilizados.

El propósito de esta publicación es presentar estos notables fósiles, animar a aprender más acerca de otras maravillas naturales y, sobre todo, plantear preguntas sobre el mundo que nos rodea.

En el texto se han destacado algunas palabras en **negrita**; se trata de términos importantes cuyo significado se explica en el glosario situado en las páginas 35 y 36.



Figura 1. Ejemplar MNCN 63663 de Libros, compuesto por el esqueleto articulado casi completo y los tejidos blandos de los ojos, del tronco, de las patas y el contenido estomacal (en blanco, en el centro del abdomen).

## 2 CONSERVACIÓN DE FÓSILES

Los fósiles constituyen extraordinarias evidencias de la historia de la vida en la Tierra a través del tiempo. Proporcionan respuestas directas a algunas de las preguntas esenciales sobre la evolución de la vida: ¿qué formas de vida han existido? ¿Dónde vivían? ¿Qué comían? ¿Cómo se desplazaron, se comunicaron, se reprodujeron? ¿Cuándo surgieron y cuándo desaparecieron? Estas preguntas, aunque relativamente fáciles de responder cuando

se estudian organismos actuales, son mucho más difíciles en el caso de nuestros más antiguos ancestros porque el registro fósil no contiene todas las formas de vida del pasado. En cambio, el registro fósil es selectivo y conserva solamente algunas piezas del rompecabezas de la vida primitiva (Figura 2).

Hay varias razones por las cuales el registro fósil no es "perfecto". A veces las rocas sedimentarias que contienen fósiles se destruyen durante el ciclo de las rocas, pues se pueden fundir en las zonas de subducción de los límites de las placas tectónicas. Incluso



Figura 2. Ejemplar MCS 604b de Libros. A diferencia de muchas otras ranas de Libros, este ejemplar no conserva los tejidos blandos y los huesos están desarticulados. Esta conservación es típica en gran parte del registro fósil.

## KONSERVAT-LAGERSTÄTTEN

Es un término alemán (que significa "mina de conservación") utilizado para describir yacimientos de fósiles que se consideran excepcionales por la calidad de la conservación de los fósiles. Normalmente, la mayoría de los fósiles consisten en fragmentos rotos de huesos o conchas. En los *Konservat-Lagerstätten*, sin embargo, los fósiles se conservan como esqueletos articulados y pueden preservar tejidos blandos no mineralizados. Ejemplos famosos de *Konservat-Lagerstätten* incluyen el yacimiento de Burgess Shale en Canadá, de unos 520 millones de años de antigüedad, y el yacimiento de Messel en Alemania, de unos 50 millones de años de antigüedad.



Un escarabajo fósil de 47 millones de años de antigüedad del yacimiento de Messel, en Alemania, que aún conserva los colores estructurales. El yacimiento es un famoso *Konservat-Lagerstätte*.

si escapan a un final tan extremo, cualquier fósil contenido en una roca puede ser dañado o destruido por las altas temperaturas y presiones padecidas durante su enterramiento o por la acción de fluidos que se filtran a través de sus poros (que incluso pueden llegar a disolver huesos y caparazones).

Finalmente, no todos los organismos tienen las mismas probabilidades de fosilizar. Claramente, un animal con un robusto esqueleto **biomineralizado** (por ejemplo, con un caparazón o con huesos) tiene más posibilidades de ser fosilizado que un ejemplar compuesto completamente por **tejidos blandos**, como un gusano o una flor, dado que los tejidos más duros son más resistentes a la descomposición después de la muerte. Las estructuras vivas muy pequeñas, como las larvas de los animales, los huevos microscópicos y las células bacterianas tienen incluso menores posibilidades de fosilización (¡y además son más difíciles de encontrar!). Otros factores que afectan al potencial de fosilización incluyen el hábitat: los organismos que viven en el agua o cerca de ella tienen más posibilidades de formar parte del registro fósil que los animales que viven en regiones montañosas. Esto se debe a que la mayoría de

los entornos terrestres se caracterizan por la erosión, mientras que muchos entornos acuáticos son zonas de transporte y deposición de sedimentos. Por lo tanto, los organismos de entornos acuáticos tienen una mayor probabilidad de quedar cubiertos por sedimentos que los protegerán de carroñeros y de llegar, por tanto, a convertirse en fósiles.

Por estas razones, la mayor parte del registro fósil se compone de las partes duras biomineralizadas de animales relativamente grandes que vivían en el agua o cerca de ella. Sin embargo, en circunstancias excepcionales, las partes blandas de los animales no se descomponen por completo y pueden conservarse en los fósiles. Estos tejidos blandos fosilizados elevan la clasificación del yacimiento a lo que se denomina una "biota excepcional" o ***Konservat-Lagerstätte***. Estos depósitos con fósiles pueden darnos una imagen mucho más clara de la vida antigua que el registro fósil convencional por cuatro razones:

1. Conservan las únicas evidencias de seres vivos que carecen de un esqueleto biomineralizado (por ejemplo, gusanos, medusas, todas las plantas e insectos).

2. Conservan las únicas evidencias de partes blandas de los animales con esqueletos biomineralizados (por ejemplo, músculos, piel, órganos internos, plumas, pelo).
3. Nos proporcionan una representación más precisa de la diversidad de los ecosistemas antiguos (al conservar animales de cuerpo blando que normalmente no se encuentran en el registro fósil).
4. Contribuyen a entender el proceso de fosilización, ayudándonos a reconocer cuándo han desaparecido algunas piezas del rompecabezas.

Famosos ejemplos de fósiles excepcionalmente conservados incluyen caballos primitivos, (algunos incluso con fetos en su interior) en el yacimiento de Messel en Alemania, de 47 millones de años de antigüedad, dinosaurios emplumados de la biota de Jehol en China, de 125 millones de años, increíbles artrópodos conservados tridimensionalmente de Herefordshire en el Reino Unido, y delicados ejemplares de insectos, flores y telarañas del ámbar birmano (ver **KONSERVAT-LAGERSTÄTTEN**, Figura 3).

Sin embargo, debemos ser cuidadosos y no esperar demasiado de tales fósiles **conservados excepcionalmente**. Incluso cuando un fósil conserva los tejidos blandos, no todos los tejidos y órganos originales pueden haberse conservado. Esto se debe a que los diferentes tejidos blandos varían incluso en su resistencia a la descomposición y en su potencial para ser fosilizados. La piel, el pelo y las plumas son relativamente resistentes a la descomposición, pero el tejido nervioso y las vísceras lo hacen rápidamente. Los tejidos resistentes se suelen conservar como restos orgánicos, es decir, como compuestos orgánicos. Los tejidos propensos a la descomposición raramente fosilizan como restos orgánicos, ya que este proceso necesita un tiempo: ¡de unas semanas a cientos o miles de años! Sin embargo, los tejidos propensos a la descomposición pueden fosilizar si en el cadáver putrefacto, o alrededor del mismo, están presentes los tipos apropiados de iones minerales, ya que esto puede conllevar que la estructura del tejido se replique en



Figura 3. Ejemplar MCS 607b de Libros. Aunque el yacimiento de Libros es un *Konservat-Lagerstätte* (yacimiento de conservación excepcional) no todos los fósiles de ranas presentan muchos tejidos blandos (ver también la Figura 2). En este ejemplar casi no se conservan tejidos blandos, a pesar de que los huesos están casi perfectamente articulados.

minerales que pueden sobrevivir durante millones de años; este proceso se denomina **mineralización autigénica**. Podemos descifrar los procesos responsables de la conservación de los tejidos blandos de dos maneras: estudiando los fósiles y simulando en el laboratorio diversos aspectos del proceso de fosilización (ver **TAFONOMÍA EXPERIMENTAL**). Esta área de investigación se llama **tafonomía** y actualmente constituye un importante foco de investigación de la paleobiología.

Los fósiles de Libros conservan los tejidos blandos de las dos maneras descritas, es decir, como restos orgánicos y también como minerales autigénicos, tal y como se explicará en los apartados 4 y 5 de esta publicación.

## TAFONOMÍA EXPERIMENTAL

No todos los organismos tienen las mismas posibilidades de fosilizar e, incluso, no todos los tejidos de un mismo organismo tienen las mismas posibilidades de fosilizar. Para entender por qué esto es así, muchos paleontólogos realizan experimentos para estudiar el proceso de fosilización en el laboratorio. La mayoría de los experimentos tafonómicos investigan procesos importantes, como el transporte (que produce la rotura de partes del cuerpo), la descomposición (que conduce a la pérdida de tejidos blandos), la mineralización (que puede conservar tejidos blandos) y la maduración (que también puede conservar tejidos blandos).



Envoltorios de oro y de aluminio para muestras de tejidos actuales a punto de ser calentadas a altas temperaturas y de comprimirse a altas presiones, experimentos que simulan el proceso de fosilización.

## 3 COLOR DE LOS FÓSILES

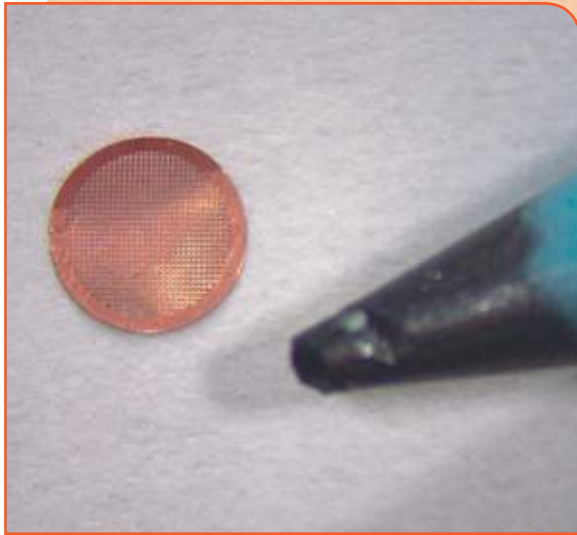
En los animales modernos, el **integumento** (por ejemplo, piel, plumas, pelo o la cutícula de los insectos) suele ser de color, a veces con tonos monótonos y sutiles de color marrón, pero en otros casos con patrones llamativos y colores fuertes como rojos, amarillos, verdes e, incluso, **iridiscencia**. Estos colores pueden producirse mediante **pigmentos**, que son sustancias químicas que absorben la luz, mediante **estructuras biofotónicas**, que son distintivos microscópicos de los tejidos que dispersan la luz (generando **colores estructurales**) o, a veces, mediante una combinación de pigmentos y de estructuras biofotónicas. Muchas estructuras productoras de color se estudian utilizando potentes microscopios electrónicos (ver **MEB Y MET**, Figura 4).

El color juega papeles biológicos importantes en los animales, incluida la protección frente a la radiación ultravioleta, la regulación de la temperatura corporal y la retención de metales, pero sobre todo en la comunicación visual. Las funciones comunes de señalización visual incluyen camuflaje, mimetismo, advertencia a depredadores y exhibición para el apareamiento. En muchos casos, la historia evolutiva y los orígenes de los diferentes mecanismos de coloración son poco conocidos. Los fósiles pueden proporcionar información sobre la historia evolutiva de las características de los animales actuales pero, hasta hace poco, no se creía posible reconstruir los colores de los animales extintos. Esto se debe a que el color se considera demasiado propenso a la descomposición como para sobrevivir a la fosilización.

En los últimos 10 años, sin embargo, una serie de notables descubrimientos han revertido esta idea mediante el análisis de pequeñas muestras de tejidos blandos fósiles utilizando microscopios electrónicos (ver **MUESTREO DE FÓSILES**, Figuras 5 y 6). Se ha detectado que la piel y muchas plumas fósiles conservan **melanosomas**, orgánulos celulares de tamaño micrométrico que en los animales modernos contienen el pigmento **melanina**. Se han encontrado rastros de melanina y de iones metálicos

## MEB Y MET

La microscopía electrónica de barrido y la de transmisión (MEB y MET) son técnicas comunes que se utilizan para examinar la morfología detallada de estructuras en diversas ciencias, como la biología, la geología y la ingeniería. Los tejidos fósiles a menudo se examinan mediante MEB, que generalmente implica simplemente pegar un pequeño fragmento del fósil (menor de 4-5 mm) en un alfiler y luego insertar el alfiler en la máquina. La MET es menos común en paleontología, en gran parte porque es difícil preparar muestras, pues deben tener un tamaño inferior a 1 mm, incrustarse en resina, cortarse con un diamante en secciones de solo unos 90 nanómetros de espesor (es decir, el grosor de la membrana de una célula humana) y... ¡manipularse con una pestaña!



Junto a un lápiz, una rejilla de cobre contiene tres secciones ultrafinas de tejido fosilizado para su análisis con MET, pero son tan pequeñas que no se aprecian a simple vista.

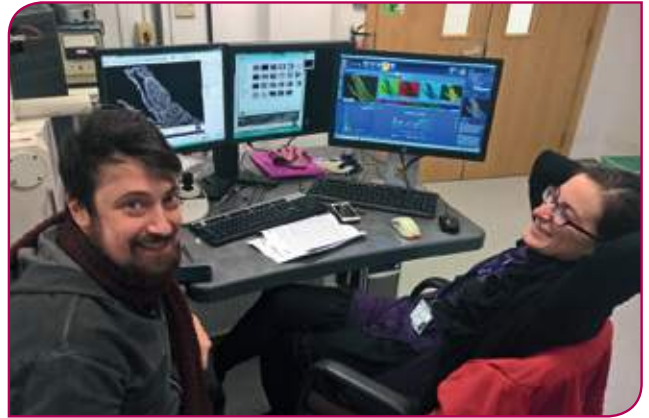


Figura 4. María McNamara y su doctorado, el Dr. Tim Astrop, durante la realización de análisis de MEB en algunos fósiles (ver **MEB Y MET**).

asociados en melanosomas de diversos fósiles (Clements *et al.*, 2016; Colleary *et al.*, 2015; Lindgren *et al.*, 2012, 2014; Wogelius *et al.*, 2011). Los melanosomas fósiles (Figura 7) pueden tener diversas formas, como sus homólogos modernos, que incluyen esferas, ovoides y formas similares a salchichas de diferentes longitudes (Figuras 8 a 10). En las aves actuales, la forma de los melanosomas está relacionada con el color de las plumas: los eumelanosomas con forma de salchicha producen los colores negro y marrón oscuro, mientras que los feomelanosomas con aspecto de balón de fútbol producen colores entre marrón rojizo y anaranjado. Las formas de salchicha muy alargadas pueden incluso producir iridiscencia cuando los melanosomas están bien empaquetados. Estas observaciones se han aplicado a los fósiles para establecer espectaculares reconstrucciones de los colores originales de los dinosaurios con plumas, como *Anchiornis* (Li *et al.*, 2010), *Sinosauropteryx* (Zhang *et al.*, 2010) y *Microraptor* (Li *et al.*, 2012), así como de aves primitivas, como *Incayaku* (Clarke *et al.*, 2010) y *Caihong* (Hu *et al.*, 2018). El diseño llamativo o los colores iridiscentes de algunos de estos animales servirían, casi con certeza, para los rituales de apareamiento, si bien en algunos casos, como *Sinosauropteryx*, también tendrían funciones de camuflaje (Smithwick *et al.*, 2017).

## MUESTREO DE FÓSILES

Muchos análisis de la anatomía microscópica y de la química de los tejidos blandos fósiles requieren muestras pequeñas, es decir, hay que cortar con bisturíes y herramientas afiladas pequeños fragmentos de los fósiles (usualmente a un tamaño menor de 1 mm). No siempre es fácil obtener permiso para cortar una parte de un fósil, especialmente si el fósil es pequeño, como el caso de un insecto, pero si hay una buena razón científica muchos conservadores de fósiles permitirán algún muestreo. Sin embargo, obtener el permiso es solo ganar la mitad de la batalla, ya que el siguiente paso es realmente angustiante: atacar al fósil con un cuchillo. ¡Este trabajo requiere una mano muy firme, paciencia y coraje!



Tomar muestras de fósiles requiere un cuchillo afilado, un buen microscopio y una mano firme.



Figura 5. Toma de muestras de tejidos blandos con un bisturí (ver **MUESTREO DE FÓSILES**).

Los melanosomas de la piel, sin embargo, no tienen esa misma asociación entre forma y color (Li *et al.*, 2014) pero aun así la abundancia relativa de melanosomas conservados en la piel fosilizada de diferentes zonas del cuerpo puede proporcionar información útil sobre patrones de color. La aplicación de esta característica a los fósiles de varios grupos de animales extintos ha permitido a los investigadores realizar reconstrucciones del color de la piel de dinosaurios (Brown *et al.*, 2017), reptiles marinos (Lindgren *et al.*, 2014) y vertebrados acuáticos primitivos (Gabbott *et al.*, 2016).

Todos estos estudios se enfrentan, sin embargo, a algunas limitaciones. El tamaño y la forma de los melanosomas pueden no conservarse intactos durante el proceso de fosilización y los experimentos tafonómicos han demostrado que los melanosomas se reducen cuando se someten a calor y presión (McNamara *et al.*, 2013). Como resultado, no se puede inferir el color de las plumas fósiles usando melanosomas si se



demuestra que la contracción de estos pudo haber cambiado el color original.

En segundo lugar, los melanosomas de animales actuales son solo uno de los componentes del color, ya que la tonalidad visible depende a menudo de varios factores adicionales, como la presencia de otros pigmentos, nanoestructuras biofotónicas, y otras características del tejido que pueden modificar el color producido por los melanosomas. Por ejemplo, las plumas de aves de colores rojo, amarillo, verde e incluso azul pueden contener melanosomas (McNamara *et al.*, 2013) pero, dado que las estructuras y los pigmentos que no son de melanina no sobreviven generalmente al deterioro, el color de algunos fósiles puede malinterpretarse como marrón o negro.

Un reciente descubrimiento, realizado en el fósil de una serpiente excepcionalmente conservada de la biota de Libros,

demuestra que las evidencias de estructuras y pigmentos no melanínicos pueden conservarse (McNamara *et al.*, 2016a). La piel de la serpiente fósil presenta detalles anatómicos espectaculares, incluso se han conservado las fibras dérmicas de colágeno (que tienen una anchura de solo 1-2 **micras**, es decir, ¡0,001 milímetros!), y lo más importante, también lo han hecho las células pigmentarias que producen el color (Figura 11). Los reptiles actuales (y los anfibios y los peces) tienen tres tipos de células pigmentarias en su piel:

- **melanóforos** que contienen melanosomas y producen colores oscuros,
- **xantóforos** que contienen carotenoides y producen colores de amarillo a rojo, e
- **iridóforos** que contienen cristales de guanina que dispersan la luz.

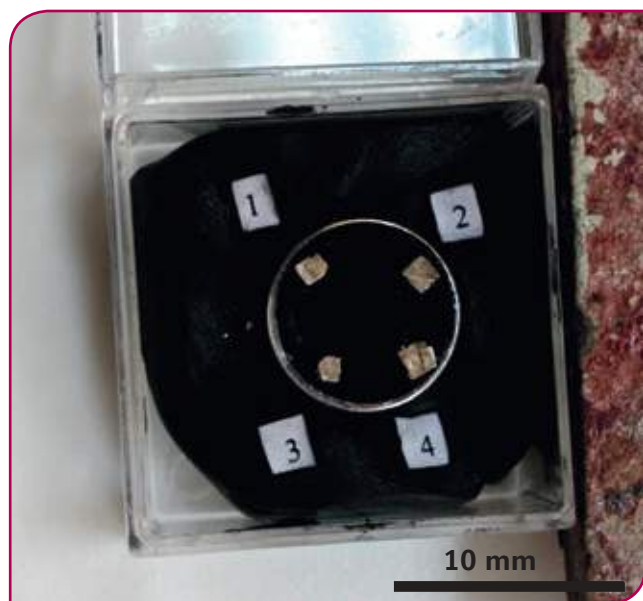


Figura 6. Muestras de tejidos blandos fijadas en cinta adhesiva de fibra de carbono y listas para su análisis MEB (ver **EL ALQUIMISTA DE LIBROS**).

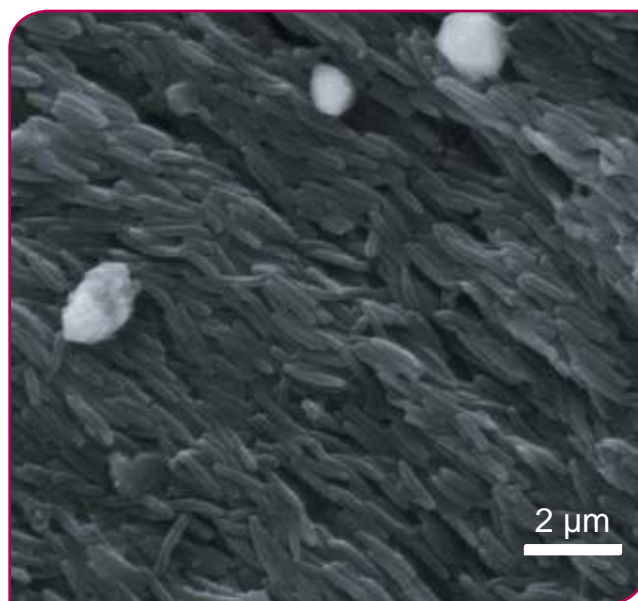


Figura 7. Imagen de MEB de melanosomas conservados en una pluma fósil de 47 millones de años de antigüedad procedente de Messel, Alemania.

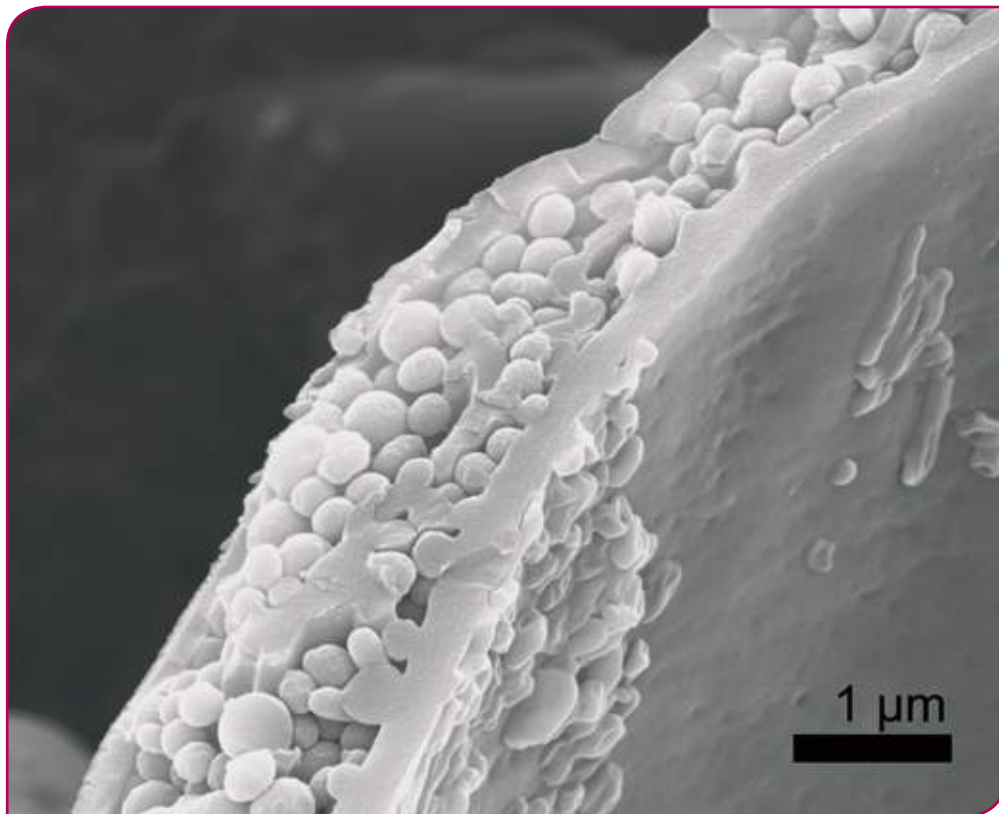


Figura 8. Imagen de MEB de melanosomas en una pluma de paloma actual (*Columba livia*).

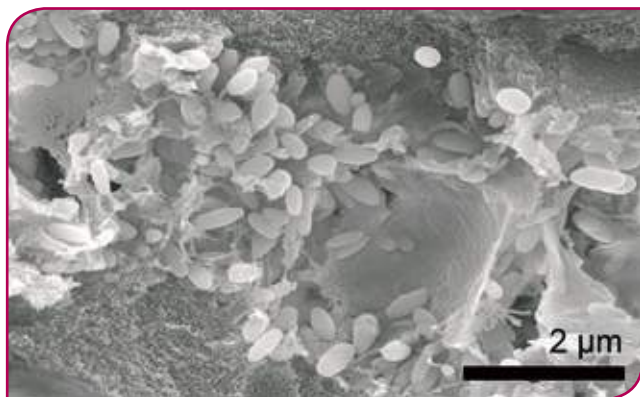


Figura 9. Imagen de MEB de melanosomas en una pluma de guacamayo azul y amarillo actual (*Ara ararauna*).

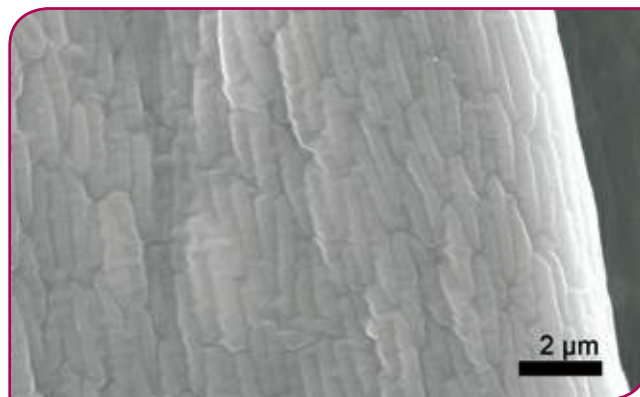


Figura 10. Imagen de MEB de melanosomas en una pluma de pergolero satinado (*Ptilonorhynchus violaceus*).

Sorprendentemente, los tres tipos de células pigmentarias se conservan en la piel de la serpiente fósil. Las variaciones en la abundancia relativa de las células pigmentarias en todo el cuerpo permitieron la reconstrucción de los colores de la serpiente, que sería predominantemente verde con un vientre pálido y manchas oscuras en su parte dorsal y en las zonas laterales. Es probable que estos colores funcionasen principalmente para favorecer el camuflaje: el color verde y el patrón irregular se confundirían con la vegetación, al igual que el **contrasombreado** del cuerpo.

Los pigmentos, sin embargo, son solo una parte de la historia del color del fósil. Muchos insectos fósiles conservan colores metálicos brillantes que se asemejan a los colores estructurales de los insectos actuales (Figura 12). Estudios recientes han demostrado que estos colores metálicos están producidos por estructuras biofótónicas (McNamara *et al.*, 2011, 2012a, 2012b), en particular por capas ultradelgadas de **cutícula** apiladas que se denominan **reflectores multicapa** (Figura 13). Estas diminutas capas dispersan la luz, y el color de la luz producida

depende del grosor de las capas y de su composición: las capas más gruesas producen colores rojizos mientras que las capas más delgadas producen verdes y azules. El estudio detallado de la estructura de los reflectores multicapa de los fósiles y los modelos de ordenador que interpretan cómo dispersan la luz muestran que los colores que presentan actualmente los fósiles no eran los mismos que tenían los organismos cuando estaban vivos: los colores se alteran durante el proceso de fosilización hacia colores de longitud de onda más corta. Los experimentos tafonómicos han explicado por qué esto es así: la presión y la temperatura hacen que las capas se vuelvan más delgadas y cambien su composición química, generando la dispersión de longitudes de onda de la luz diferentes a las del animal cuando estaba vivo.

Al igual que con los melanosomas fósiles, estos colores estructurales de los fósiles también pueden informarnos sobre el comportamiento de los seres vivos. Los colores metálicos brillantes de los escarabajos fósiles se habrían utilizado, casi con certeza, como

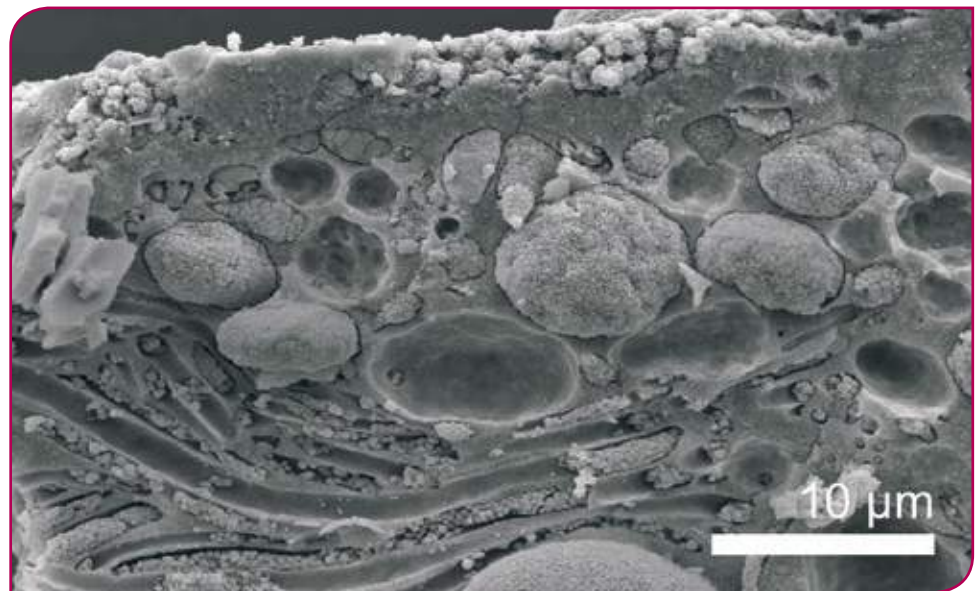


Figura 11. Imagen de MEB de células pigmentarias conservadas en una serpiente fósil de Libros.



Figura 12. Colores metálicos conservados en el ejemplar de escarabajo Mel 12223 de 47 millones de años de antigüedad procedente de Messel, Alemania.

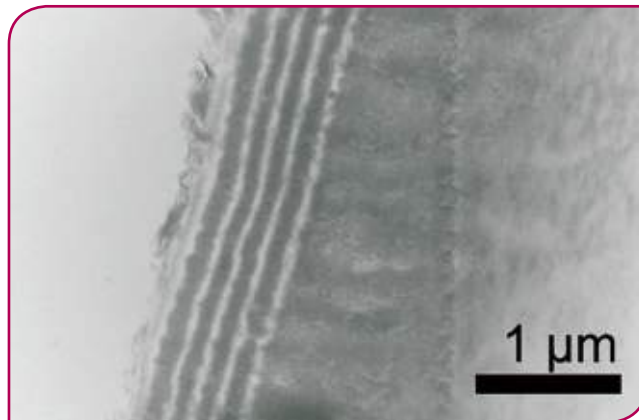


Figura 13. Imagen de MET de un reflector multicapa conservado en un escarabajo fósil.

exhibición durante el apareamiento, ya que producirían brillantes destellos de color -un reflejo especular- bajo la luz solar directa. Otro ejemplo excelente se encuentra en el caso de polillas doradas del yacimiento de Messel en Alemania (Figura 14, McNamara *et al.*, 2011). Al igual que con los escarabajos fósiles, los colores de estas polillas son producidos por reflectores multicapa, pero en las polillas los reflectores multicapa están curvados en las escamas de las alas de la mariposa (Figura 15). Esta curvatura provoca la generación de más colores mate, que son menos llamativos, menos visibles en un rango amplio de ángulos y menos iridiscentes (es decir, son verdes en todas las direcciones) que los de los escarabajos metálicos. Al igual que en los escarabajos, los colores de las polillas han cambiado durante la fosilización, por lo que las polillas originalmente habrían tenido colores verdosos. Los colores probablemente funcionaron bien para el camuflaje cuando las polillas descansaban en la vegetación, pero pueden haber funcionado también durante los apareamientos cuando se alimentaban en las flores.

Finalmente, el registro fósil puede conservar incluso la evidencia de la evolución de algunas de las estructuras de tejidos más complejas conocidas en animales, los cristales fotónicos tridimensionales. Estas increíbles estructuras microscópicas están



Figura 14. Colores metálicos conservados en el ejemplar de polilla fósil Mel 14269 de 47 millones de años de antigüedad procedente de Messel, Alemania.

compuestas por tejidos entrelazados y doblados que dan lugar a complejas formas cristalinas tridimensionales visibles solo con potentes microscopios electrónicos. Producen los colores más brillantes y puros de la naturaleza y generalmente intervienen en

## 4 LOS FÓSILES DE LIBROS

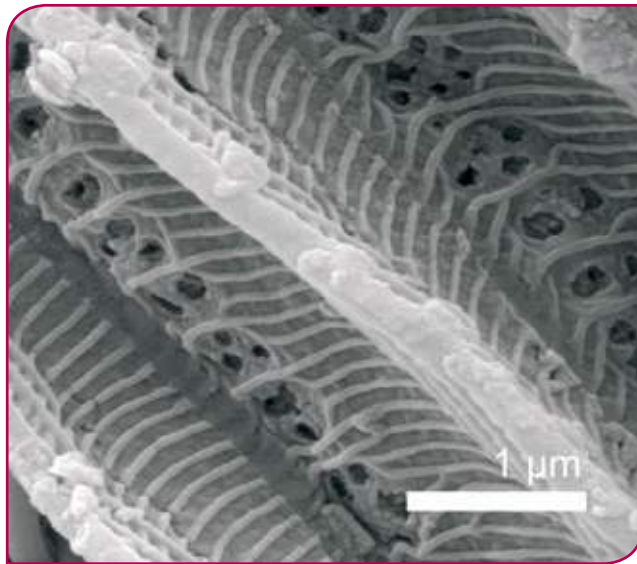


Figura 15. Imagen de MEB de crestas, costillas transversales y perforaciones en las escamas del ejemplar de polilla fósil Mel 11808 procedente de Messel, Alemania.

la comunicación entre animales, pero no se descubrieron en los animales actuales hasta la década de 1990. Increíblemente, estas nanoestructuras pueden conservarse en los fósiles pero hasta la fecha solo se han documentado en un escarabajo fósil (bastante reciente) de América del Norte (Figura 16, McNamara *et al.*, 2014). Al analizar las estructuras fósiles con rayos X de alta potencia a partir de un haz de luz de sincrotrón, quedó claro que los fósiles conservan cristales fotónicos tridimensionales con una estructura de diamante, como en muchos escarabajos actuales. Curiosamente, el color del escarabajo fósil es bastante apagado, un marrón mate, que contrasta con los colores brillantes de los insectos actuales con estas estructuras. Esto se debe a que los cristales individuales en los fósiles son extremadamente pequeños, y aunque cada cristal produce un color muy puro (rojo, verde o amarillo), los colores se mezclan con la distancia, como los píxeles en una pantalla de televisión. Este color marrón mate coincide con el color de la grava en la que se encontraron los fósiles, lo que sugiere que el pequeño tamaño de los cristales es una adaptación para el camuflaje.

Los fósiles de Libros provienen de una localidad, el Barrio de las Minas, situada unos 10 km al sureste de la población de Libros, en el sur de Teruel (Figura 17). Los afloramientos rocosos están expuestos a lo largo de una pista sin asfaltar que serpentea por una colina y también en pequeñas excavaciones diseminadas en la base de la colina (Figura 18). El área es muy rural y tranquila, con la excepción de algún visitante raro e inusual (ver **EL ALQUIMISTA DE LIBROS**).

Las rocas se originaron en las orillas y en el interior de un lago relativamente grande y profundo, de unos 30 km<sup>2</sup> de superficie (Anadón *et al.*, 1992) y hasta 100 m de profundidad (Ortí *et al.*, 2003). Cerca de las orillas del **paleolago** se depositaron potentes capas de **calizas** fosilíferas, ricas en conchas y plantas, mientras que en las partes más profundas

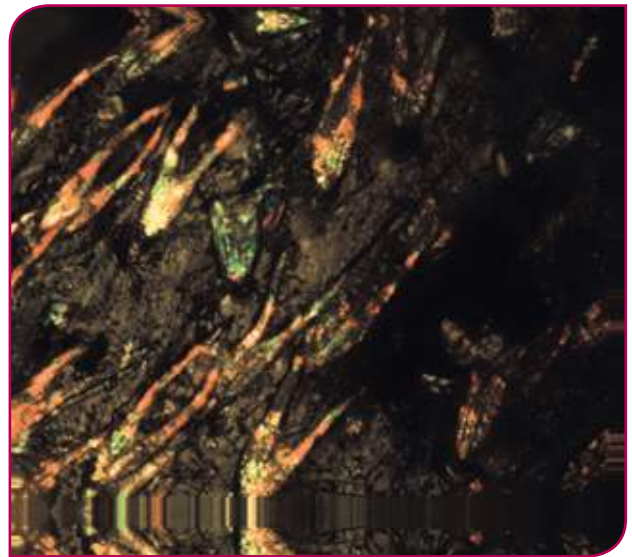


Figura 16. Colores iridiscentes conservados en escamas bifurcadas en un gorgojo de 725.000 años de antigüedad procedente de Gold Run, Canadá.



Figura 17. Barrio de las Minas.



Figura 18. Un afloramiento típico en el Barrio de las Minas.

del lago se depositaron **lutitas** finamente **laminadas** (Figura 19). Los estudios químicos de las rocas de Libros muestran que el lago era rico en azufre (Figura 20) y que se **estratificó**: la masa de agua se separó en una parte superior **alcalina** rica en nutrientes y oxígeno, y una parte inferior carente de oxígeno y rica en **sulfuro** tóxico y en iones minerales (De las Heras et al., 2003; Del Río et al., 2004). Sabemos esto por la presencia en las rocas de ciertas moléculas orgánicas ricas en azufre (**compuestos organosulfurados**). Trabajar con estas rocas presenta algunos riesgos (Figura 21, ver **LOS PELIGROS DEL TRABAJO DE CAMPO**).

Las rocas también nos indican que hace 10 millones de años el clima en esta parte de España era bastante variable. Intervalos de color blanco a gris claro de lutitas laminadas ricas en **micrita** se depositaron en condiciones cálidas y áridas con estaciones poco definidas. Los intervalos de color gris y gris oscuro de láminas ricas en materia orgánica y **aleuritas** de episodios de inundación se depositaron en condiciones más frías, más húmedas y más estacionales (Figura 19).

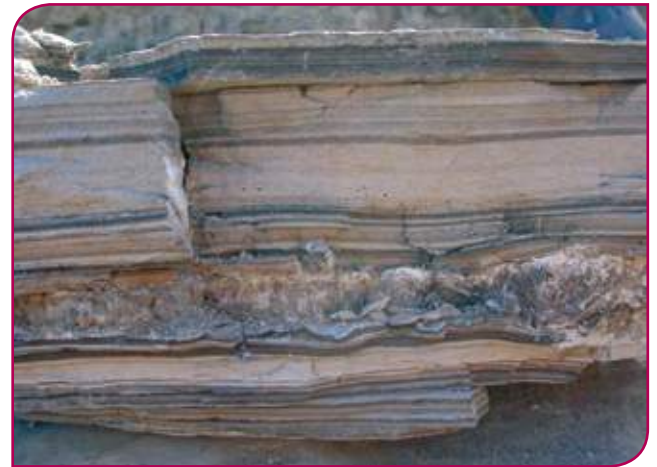


Figura 19. Sedimentos laminados.

## EL ALQUIMISTA DE LIBROS

Un día estaba trabajando en un afloramiento de Libros mientras mi asistente de campo iba hacia el automóvil para buscar nuestro almuerzo. Cuando ya se había ido, observé que un automóvil desconocido se aproximaba por la larga y serpenteante carretera que subía hacia la colina en la que estaba trabajando. Para mi sorpresa, el coche se detuvo justo a mi lado y el conductor bajó del mismo. Me dijo que era un alquimista en busca de azufre porque necesitaba “extraer de él la fuerza vital”. A pesar de mi sorpresa (¡seguramente los últimos alquimistas vivieron hace cientos de años!), señalé la pared rocosa, donde había nódulos del tamaño de un puño de azufre amarillo. Entonces el “alquimista” comenzó a golpear la roca con un pico, recogiendo los nódulos de azufre. Protesté, diciéndole que estaba trabajando justamente en esas rocas pero ¡ya era demasiado tarde! Recogió el azufre, entró en su coche rápidamente y desapareció. Todavía me gustaría saber qué reacciones químicas planeaba hacer...



Nódulo de azufre del afloramiento de Libros que fue visitado por el alquimista.



Figura 20. Afloramiento de yeso estratificado-laminado de Libros con nódulos amarillos de azufre.

Los fósiles excepcionalmente conservados de Libros incluyen ranas adultas y renacuajos, salamandras, serpientes, pájaros, insectos y hojas, todos ellos procedentes de las lutitas laminadas de las aguas profundas. Todos los ejemplares fósiles conocidos se recuperaron a principios del siglo XX en las minas de azufre de la zona. Desafortunadamente, se desconocen los niveles concretos que contienen los fósiles, ya que se encuentran en las profundidades de las minas, que ya no son accesibles. Afortunadamente, sin embargo, muchos museos locales, nacionales e internacionales custodian fósiles de Libros en sus colecciones, y son precisamente estos especímenes de los museos los que han proporcionado muchos descubrimientos notables.

La mayoría de los fósiles están muy bien conservados, con esqueletos casi completos y, a menudo, con extensos tejidos blandos que incluso pueden definir el contorno original del cuerpo (Figura 22).

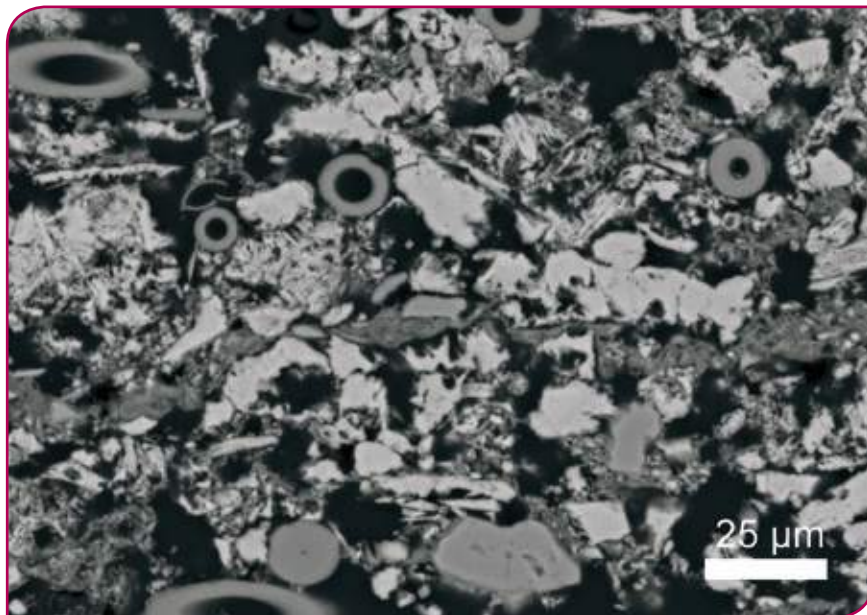


Figura 21. Imagen de electrones retrodispersados de una sección pulida de las lutitas laminadas de Libros que contiene abundantes espículas huecas de esponjas (ver **LOS PELIGROS DEL TRABAJO DE CAMPO**).

## LOS PELIGROS DEL TRABAJO DE CAMPO

El trabajo de campo tiene muchos riesgos: caídas de rocas, rocas resbaladizas junto a orillas, mareas que ascienden, acantilados y laderas escarpadas, quemaduras de sol e incluso picaduras de insectos. Un peligro que no anticipamos cuando hicimos el trabajo de campo en Libros fue microscópico. Al final del primer día en el campo, que pasamos excavando y manipulando las rocas todo el día, notamos que nuestra piel estaba muy sensible. ¡Sentarse en el coche en el camino de regreso fue extremadamente doloroso! El motivo fueron las agujas microscópicas (espículas) de las esponjas fósiles, que son muy comunes en las rocas laminadas (lutitas) de Libros. Cuando estábamos excavando las rocas, el polvo se estaba depositando en nuestra piel y, literalmente, miles de agujas microscópicas se incrustaban en nuestra piel. ¡No hace falta decir que usamos camisas de manga larga y pantalones largos durante el resto de la campaña a pesar del calor del verano!



Uno de los peligros del trabajo de campo: ¡vacas con cuernos afilados!





Figura 22. Ejemplar MSB 20789 de Libro con extensos tejidos blandos y el esqueleto casi completo.

Los estudios sobre los renacuajos fósiles (Figura 23) y una de las serpientes de Libros han revelado que los renacuajos se alimentaban de algas que crecían en plantas sumergidas en el lago y que estaban adaptados para la vida en aguas tranquilas, mientras que la serpiente (que era acuática) muestra patrones de color verdoso utilizados para el camuflaje entre la vegetación (ver el apartado 3).

Buena parte de la investigación científica hasta el momento, sin embargo, se ha llevado a cabo en las ranas fósiles, que contienen una variedad inusual de tejidos blandos conservados de diferentes maneras, es decir, con diferentes **modos de conservación**

(McNamara *et al.*, 2009). Por ejemplo, la médula ósea de las ranas se conserva como restos orgánicos y retiene los detalles celulares (Figuras 24 y 25, McNamara *et al.*, 2006). Esto resulta extremadamente inesperado porque la médula ósea suele ser uno de los primeros tejidos en descomponerse. Su conservación se puede explicar por un proceso llamado **sulfuración**, mediante el que los sulfuros de las aguas del lago reaccionaron con el tejido de la médula ósea durante la descomposición. Los sulfuros habrían unido moléculas orgánicas en el tejido con "puentes" de sulfuro, haciéndolas más resistentes a la descomposición. Hoy en día, este es el mejor ejemplo en todo el registro fósil de un tejido propenso a la descomposición que se ha conservado orgánicamente.

Otra característica sorprendente de estas ranas es que contienen piel fosilizada (Figura 26, McNamara *et al.*, 2009). En este caso, el tejido no se ha conservado orgánicamente sino que se ha replicado en fosfato de calcio. Solo se ha mantenido una parte de la piel: la **capa E-K** de la dermis media. La calidad de



Figura 23. Ejemplar MNCN 63786 de renacuajo de Libros que muestra la conservación del ojo, del cuerpo, de parte de las extremidades, de la cola y del cordón nervioso (línea blanca en la cola), así como un halo de descomposición formado por una fuga de fluidos corporales del cadáver durante la descomposición.



Figura 24. Corte transversal a través de una porción de médula ósea de una rana Libros fósil, que muestra médula amarilla grasa (centro) y médula roja productora de células sanguíneas.

la preservación es tan alta que incluso se aprecian bellas fibrillas serpenteantes de colágeno, de tan solo unas pocas micras de diámetro (Figura 27). Esta calidad de conservación es bastante típica del fosfato de calcio, ya que los cristales pueden ser extremadamente pequeños, de tan solo 25 **nanómetros** y, por lo tanto, pueden mostrar finos detalles anatómicos. En las ranas actuales, la capa E-K está presente solo en especies que viven la mayor parte de sus vidas en tierra, volviendo al agua solo para reproducirse. Debido a esto, es probable que la mayoría de las ranas de Libros murieran poco después del apareamiento (McNamara *et al.*, 2012).

Otros detalles que permanecen en las ranas incluyen los estómagos y el contenido estomacal (Figura 28, McNamara *et al.*, 2009). En muchos ejemplares, el estómago se conserva como un material granular de color rosa pálido formado por concentraciones irregulares de fosfato de calcio. Aquí no se conserva ninguna estructura del tejido, ya que el fosfato de calcio parece ser un

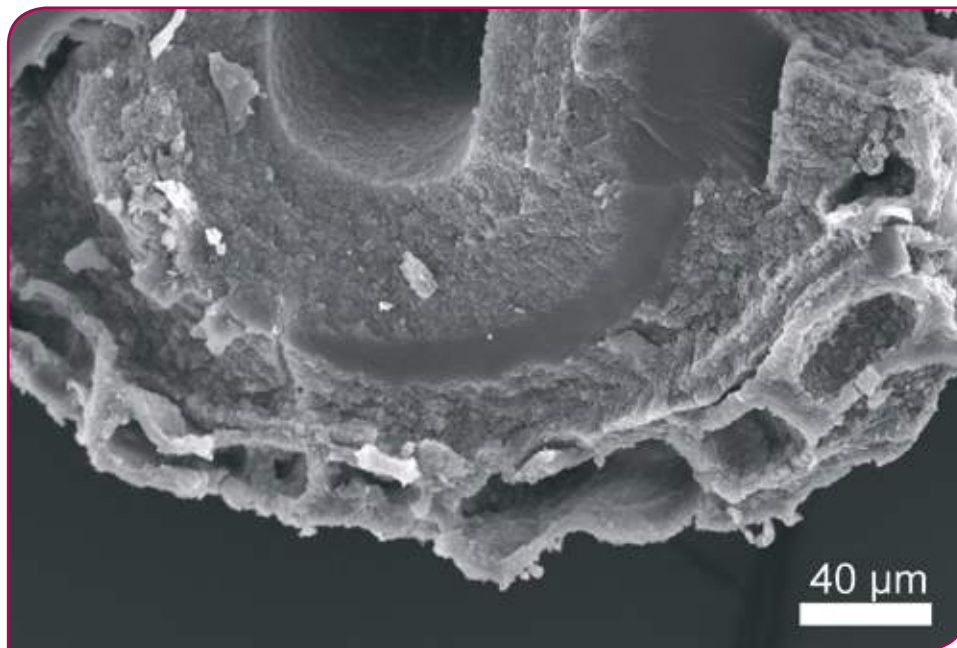


Figura 25. Imagen de MEB de la médula ósea fósil que muestra grandes osteoclastos formadores de hueso alrededor del borde de la médula.

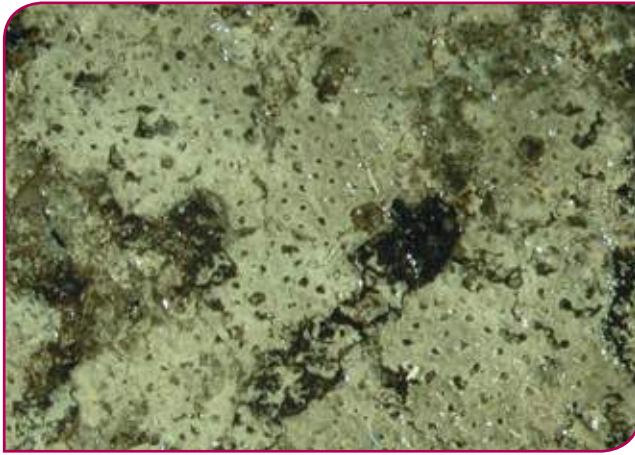


Figura 26. Imagen de microscopio óptico de piel fosilizada de una rana de Libros. Fibras microscópicas podrían haber penetrado en la capa E-K a través de los pequeños agujeros.

precipitado que rellena el espacio interno vacío del estómago. Esto puede parecer extraño pero el fosfato de calcio se asocia comúnmente con los estómagos y los intestinos de los fósiles porque el mineral requiere un pH bajo para formarse ( $\text{pH} < 6,38$ ) y los estómagos suelen tener un pH bajo debido a la presencia de ácidos estomacales. En algunas muestras de ranas fósiles el estómago también contiene restos de la última comida del animal. Estos contenidos estomacales incluyen gasterópodos y conchas de bivalvos, fragmentos de cutículas de insectos ¡e incluso renacuajos!

Además, incluso se preservan los tejidos nerviosos de las ranas: el cerebro y la columna vertebral están definidos por cristales **euhedrales** perfectos de carbonato de calcio (McNamara *et al.*, 2009). Estos no conservan la estructura de ningún tejido, pero parecen estar relleno del espacio donde habrían estado el cerebro y la médula espinal.

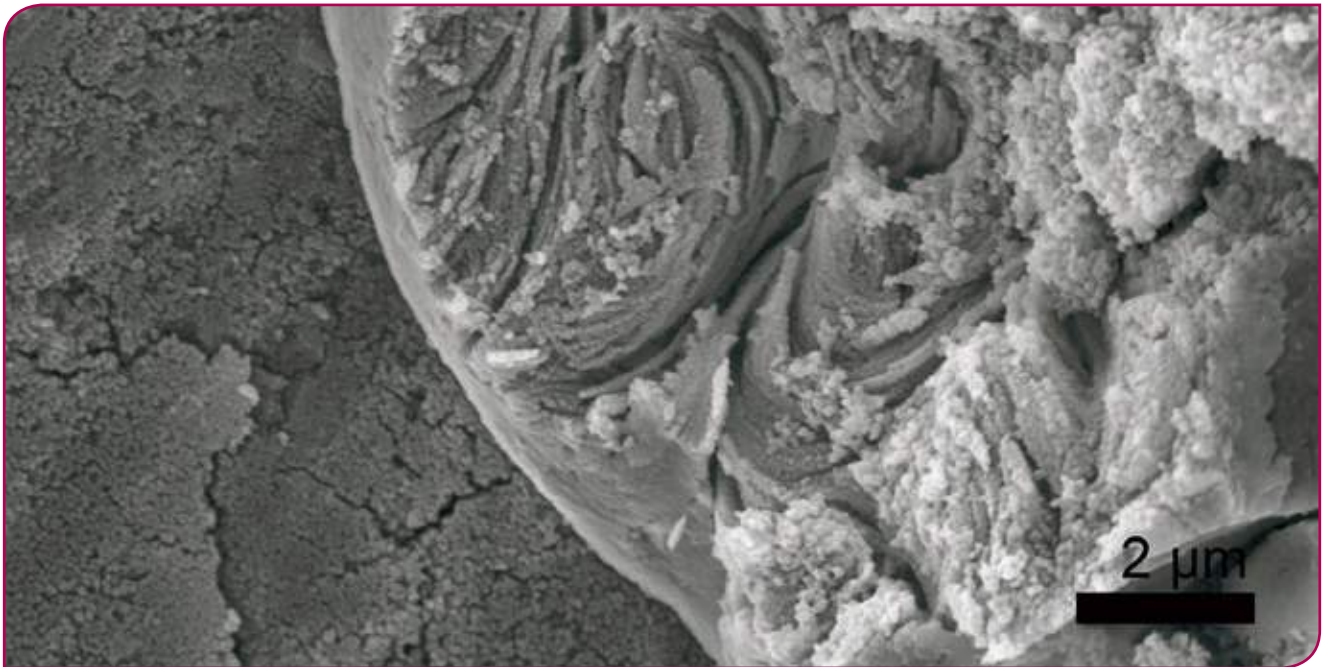


Figura 27. Imagen de MEB de fibras de colágeno sinuosas, conservadas en fosfato de calcio, en la piel fosilizada de una rana de Libros.

## 5 SULFURACIÓN DE MELANOSOMAS

Por último, pero no menos importante, tal vez una de las características más llamativas de las ranas de Libros es la definición del contorno del cuerpo mediante una capa de color marrón oscuro de composición orgánica (imagen de portada). Esta capa es la protagonista del apartado 5.

La presencia de estos tipos variados de tejidos blandos en las ranas, y sus diversos modos de preservación, son el reflejo de factores y procesos biológicos. La cantidad limitada de tejido blando fosfatado (restringido a la dermis media) indica que los iones de fosfato deben provenir de los propios tejidos. Si el fosfato fuera abundante en los sedimentos o en las aguas del lago, esperaríamos encontrar una fosfatación más extensa de los tejidos blandos. En cambio, la única fuente concentrada de iones fosfato en las ranas era la capa dérmica media, que en las ranas actuales es rica en gránulos de fosfato de calcio. El fosfato en el estómago no define ninguna estructura tisular, sino que simplemente es un relleno. En este caso, los iones fosfato probablemente provenían de material alimenticio en descomposición en el propio estómago y se precipitaron en la cavidad estomacal antes de que el órgano se descompusiera y colapsase. El carbonato de calcio en el tejido nervioso probablemente provenía de ese tejido, que en los vertebrados vivos necesita mucho calcio para la transmisión de los impulsos nerviosos. La falta de cualquier estructura tisular se debe a que el tejido nervioso suele licuarse muy rápidamente, en cuestión de días, después de la muerte.

La calidad de conservación de las ranas varía de un ejemplar a otro pero los análisis estadísticos demuestran que esta variación no está relacionada con los cambios en la composición de los sedimentos (que indican cambios en el paleoambiente). En cambio, la conservación parece estar controlada por factores biológicos: por ejemplo, los especímenes en los que la piel no se pudrió completamente tienen esqueletos más completos porque la piel habría mantenido a los huesos juntos mientras el cadáver reposaba en el fondo del lago antes de ser enterrado por sedimentos (McNamara *et al.*, 2012b).

Este apartado reúne las dos líneas de nuestro relato: la de los melanosomas y el color de los fósiles, y la de las ranas de Libros. Nuestro estudio de 2016 (McNamara *et al.*, 2016b) respondió a dos preguntas principales:

1. ¿Las ranas de Libros conservan melanosomas fósiles?
2. ¿Cómo se conservan los melanosomas en los fósiles?

### ¿Bacterias fósiles o melanosomas?

Los primeros estudios de los tejidos blandos de las ranas de Libros revelaron que los tejidos blandos del contorno del cuerpo generalmente se conservan como una mezcla de un material marrón y un material blanco. Una investigación más detallada con microscopios electrónicos reveló que el material blanco es piel fosfatada (ver el apartado 4) y que el material marrón es carbonáceo y consiste en pequeñas esferas y ovoides de solo 0,5–1  $\mu\text{m}$  de longitud (Figuras 29 y 30). Estas esferas y ovoides se interpretaron inicialmente como bacterias fósiles (McNamara *et al.*, 2006) por varias razones:

- muchas bacterias tienen un tamaño y forma idénticos,
- se sabe que las bacterias descomponen los tejidos blandos,
- algunas microestructuras parecen estar unidas, de modo similar a una división celular,
- las estructuras fósiles se encontraron solo en los tejidos blandos y no en otras partes del sedimento,
- estructuras similares se conservan en fósiles de otras localidades y se habían interpretado como bacterias de descomposición fosilizadas (Wuttke, 1983; Toporski *et al.*, 2002).

En los años posteriores a los trabajos iniciales sobre los fósiles de Libros, surgieron nuevas evidencias relativas a la conservación de melanosomas en tejidos de vertebrados fósiles, al principio en plumas (Li *et al.*, 2010, 2012; Vinther *et al.*, 2008, 2010; Zhang *et al.* 2010) pero luego también en ocelos (Lindgren *et al.*, 2012), piel (Lindgren *et al.*, 2014) y pelo (Li *et al.*, 2014). Concretamente, algunos de estos estudios analizaron la composición química de los “melanosomas” fósiles y encontraron indicios del pigmento melanina (Lindgren *et al.*, 2012, 2014). Esto nos llevó a cuestionar si nuestras interpretaciones iniciales de las estructuras en los fósiles de Libros eran correctas. Sin embargo, había dos problemas:

- algunos investigadores todavía afirmaban que los melanosomas fósiles eran, de hecho, bacterias de la descomposición fosilizadas (ver **GC-MS, ToF-SIMS y FTIR**; Moyer *et al.*, 2014), y
- no estaba claro por qué los melanosomas fósiles deberían conservarse.

### ¿Cómo se conserva la melanina?

Los descubrimientos de melanosomas en fósiles se han aplicado principalmente a estudios de coloración original (ver sección 3). Sorprendentemente, a pesar de tan intensivos estudios, tenemos una comprensión incompleta acerca de cómo se conservan los melanosomas.

La melanina en sí es una molécula muy resistente a la descomposición que no se disuelve fácilmente en ácidos, bases u oxidantes. Como resultado, algunos investigadores sugirieron que la melanina se fosiliza debido a estas mismas propiedades. Estudios previos, sin embargo, demostraron que la forma y composición de los melanosomas cambian durante la fosilización. Los experimentos mostraron que los melanosomas se contraen cuando se calientan (McNamara *et al.*, 2013). Otros estudios concluyeron que la melanina se conserva mejor en los melanosomas fósiles que los **lípidos** y las **proteínas** y que, durante la fosilización, las moléculas de melanina se entrecruzan.



Figura 28. Ejemplar MNCN 63800 que muestra abundantes fragmentos de conchas en el estómago.

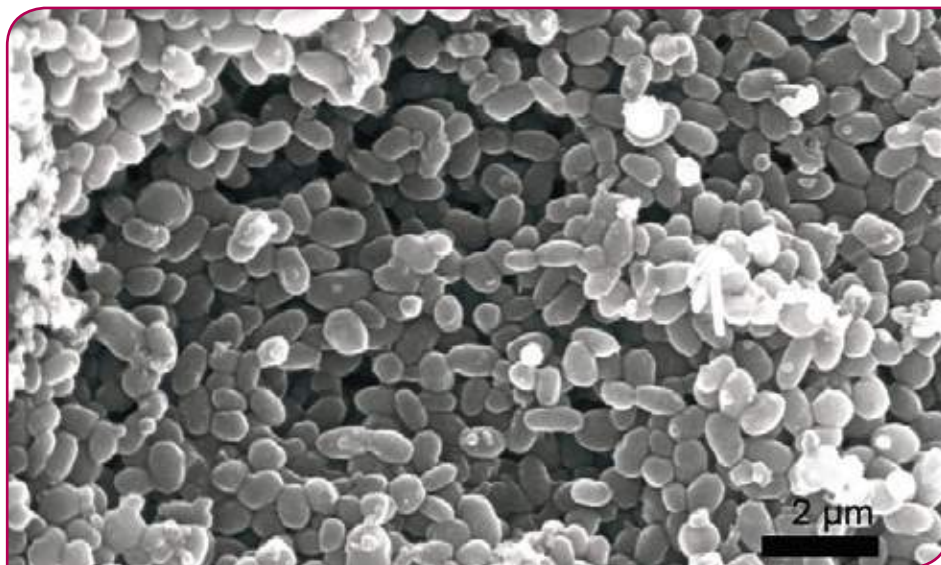


Figura 29. Imagen de MEB de melanosomas fosilizados en los tejidos blandos de una rana de Libros.

Todavía no había un modelo para explicar cómo se conservan los melanosomas en los fósiles...

Había, sin embargo, algunas pistas para explicar el por qué. Muchos fósiles, especialmente **artrópodos**, plantas y **graptolitos**, se conservan mediante un proceso llamado polimerización *in situ*, mediante el cual las moléculas originales se reticular para formar grandes moléculas **alifáticas** construidas en torno a largas cadenas de átomos de carbono. Estas grandes moléculas son resistentes a la degradación y con frecuencia sobreviven en los fósiles, incluidos los melanosomas (Barden *et al.*, 2011, 2014; Glass *et al.*, 2013).

### El papel del azufre

Una variación de este proceso de polimerización se denomina sulfuración, por medio del cual las moléculas orgánicas incorporan azufre durante la descomposición o la diagénesis (Kok *et al.*, 2000; Sinninghe Damsté *et al.*, 1998a, 1998b, 2007; Werne *et al.*, 2000; Van Dongen *et al.*, 2003a, 2003b). De hecho, el azufre y los compuestos organosulfurados se han documentado incluso

en melanosomas fósiles (Barden *et al.*, 2011, 2014; Glass *et al.*, 2012; Lindgren *et al.*, 2014; Pinheiro *et al.*, 2012).

El problema con el azufre es que puede provenir de diferentes fuentes. Aunque el azufre de los melanosomas fósiles puede originarse durante la diagénesis, también es posible que sea original: los feomelanosomas (pero no los eumelanosomas) son ricos en azufre. Por lo tanto, es posible que el azufre de los melanosomas fósiles refleje la presencia de la feomelanina original y no la sulfuración durante el proceso de fosilización. La única manera de saberlo con certeza es mediante el análisis de los compuestos que contienen azufre en los fósiles y en el sedimento circundante: si están presentes tanto en los fósiles como en los sedimentos, es un buen síntoma de sulfuración. También sugiere que la presencia de azufre en los melanosomas fósiles no necesariamente implica que la feomelanina esté presente, lo que podría afectar a las reconstrucciones del color original.

En nuestro artículo de 2016 comprobamos esto mediante el análisis del material marrón de los tejidos blandos de las ranas de Libros y del sedimento circundante.

## GC-MS, ToF-SIMS Y FTIR

Estas son tres técnicas usadas para analizar la composición química de un material. GC-MS (cromatografía de gases-espectrometría de masas) divide las moléculas grandes en fragmentos más pequeños y los separa según su masa, aportando una lectura (o espectro) donde se detectan primero las moléculas pequeñas y luego las moléculas más grandes. Esta técnica es muy útil para muestras geológicas, porque durante la fosilización las moléculas orgánicas a menudo se unen o se polimerizan para formar macromoléculas muy grandes que no son fáciles de analizar con otras técnicas. El inconveniente de la técnica GC-MS es que destruye la muestra durante el análisis (se quema). ToF-SIMS y FTIR, por otro lado, son técnicas no destructivas (la muestra no se daña). ToF-SIMS analiza los compuestos químicos presentes en los 50 nanómetros superiores de una muestra (grosor que es aproximadamente la mitad del de una membrana celular), por lo que es muy importante que las muestras estén limpias y libres de contaminación (como huellas dactilares en la superficie). La mejor manera de preparar las muestras es romperlas y analizar inmediatamente la superficie fresca utilizando la máquina. Proporciona información detallada sobre los fragmentos moleculares presentes. FTIR es una técnica "rápida y sucia" que no requiere preparación de las muestras pero proporciona información menos específica acerca de los enlaces químicos presentes. Es menos preciso que los otros métodos pero puede ser útil para determinar si ciertos compuestos están presentes en la muestra, como agua, carbono orgánico, compuestos organosulfurados y amidas.

El ToF-SIMS es un instrumento muy impresionante.



## Estudios morfológicos de las microestructuras de Libros

La microscopía electrónica de barrido y de transmisión revelan importantes características morfológicas que son consistentes con los melanosomas pero no con las bacterias:

1. Las microestructuras se encuentran tanto en las caras superiores como en las inferiores de los fósiles. Esto no debería suceder si se tratase de un crecimiento externo de microbios sobre las carcasas en descomposición.
2. No hay evidencias de que haya tapetes microbianos gruesos creciendo sobre la superficie del sedimento. Esto podría esperarse si las estructuras fueran bacterias.
3. Las microestructuras son uniformemente oscuras en las imágenes teñidas tomadas con MET, como los melanosomas (Figura 31). Las bacterias deberían tener un color claro con una pared celular oscura.
4. Los pequeños glóbulos internos de las microestructuras se asemejan a las **vacuolas** internas de los melanosomas (Figura 32).
5. La superficie irregular de las microestructuras se asemeja a la de los melanosomas (Figura 30).

## Estudios químicos de los microcuerpos de Libros

Utilizamos tres técnicas químicas (ver **CONSERVACIÓN DE BACTERIAS**) para evaluar la presencia de melanina y de compuestos bacterianos en las estructuras de Libros. Nuestros resultados de GC-MS muestran que las microestructuras de Libros son ricas en compuestos organosulfurados pero no contienen ningún compuesto diagnóstico de bacterias. Los sedimentos también son ricos en compuestos organosulfurados y asimismo contienen compuestos llamados hopanoides, que provienen de bacterias.

En segundo lugar, nuestros resultados de FTIR muestran que la composición orgánica de las microestructuras de Libros es muy similar a la de la melanina pura. Al igual que con los resultados de GC-MS, los espectros FTIR para las microestructuras fósiles muestran evidencias de compuestos organosulfurados.

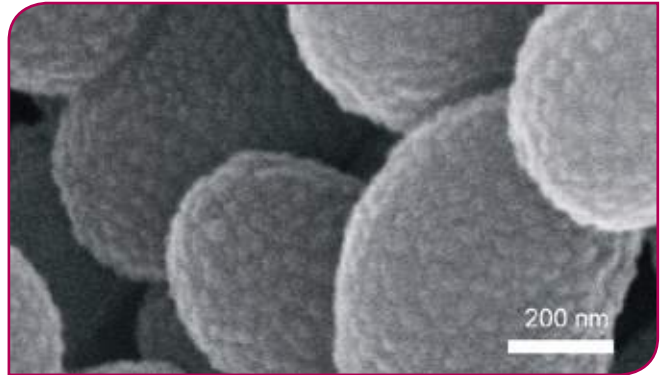


Figura 30. Imagen de MEB a gran aumento de melanosomas fosilizados de una rana de Libros que muestra una superficie grumosa.

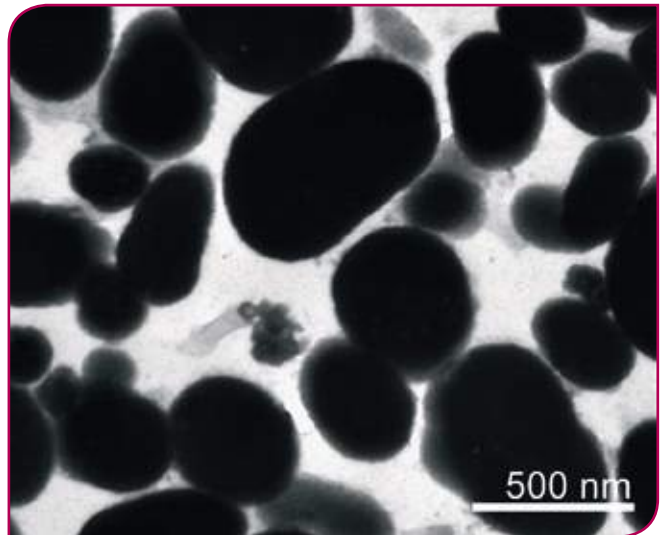


Figura 31. Imagen de MET de melanosomas de Libros que muestran una coloración negra uniforme como en los melanosomas actuales.



En tercer lugar, nuestros resultados de ToF-SIMS muestran que las microestructuras fósiles son químicamente muy similares a las de la melanina pura pero, de nuevo, con evidencias de compuestos organosulfurados. Por el contrario, el sedimento no muestra ninguna evidencia de melanina, pero contiene abundantes compuestos organosulfurados (Figura 33).

### Melanosomas de Libros

En base a estos resultados, las microestructuras de Libros se pueden interpretar con seguridad como melanosomas fósiles. No hay evidencias químicas de compuestos bacterianos en las microestructuras. No obstante, los compuestos bacterianos se conservan en el sedimento, por lo que su ausencia en los fósiles no es un artefacto de la fosilización. Sin embargo, las microestructuras contienen evidencias químicas de melanina (o de sus productos

de degradación). Como no hay evidencias de melanina en el sedimento, la melanina proviene claramente de los fósiles y no del sedimento.

### Conservación de melanosomas por sulfuración

Nuestros resultados químicos muestran que los melanosomas fósiles de Libros contienen abundantes compuestos organosulfurados. Estos compuestos no se parecen a la feomelanina, ya que los **biomarcadores** para la feomelanina (por ejemplo, benzotiazina y benzotiazol) no están presentes. En cambio, muchos de los compuestos organosulfurados de los melanosomas de Libros también están presentes en el sedimento. Esto significa que los melanosomas de Libros se conservan por sulfuración, lo que resulta consistente con nuestro conocimiento del lago de Libros: era anóxico, rico en sulfuro y pobre en hierro (que puede impedir el proceso de sulfuración).

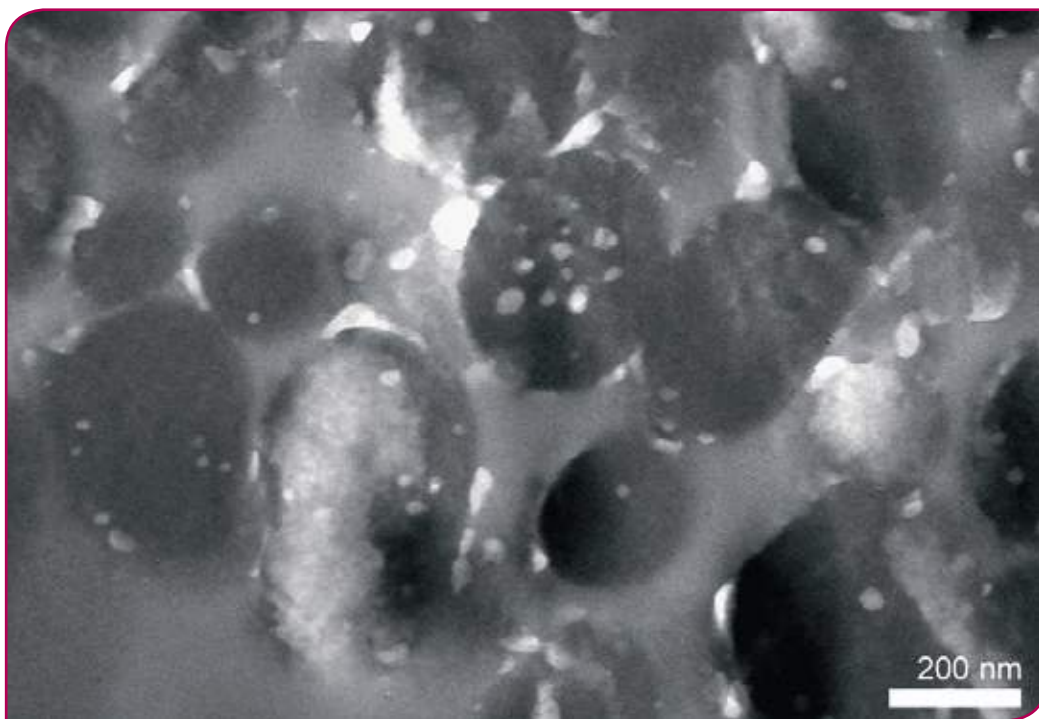


Figura 32. Imagen de MET de melanosomas no coloreados de Libros que muestran vacuolas internas como en los melanosomas actuales.

El proceso de sulfuración puede ocurrir en un momento extremadamente temprano de la descomposición, incluso cuando la materia orgánica se está depositando a través de la columna de agua, y otros estudios han demostrado que la sulfuración aumenta la resistencia de las moléculas orgánicas a la descomposición. Dado que los melanosomas conservados en otras localidades

fósiles son ricos en azufre y/o en compuestos organosulfurados, el proceso de sulfuración es probablemente muy común y relevante en la historia de la fosilización de melanosomas antiguos.

Es probable que la sulfuración sea un factor principal de la conservación de melanosomas en el registro fósil.

## CONSERVACIÓN DE BACTERIAS

Las bacterias fósiles son muy raras, por varias razones: (1) las bacterias son pequeñas y difíciles de ver; (2) no tienen partes duras y son difíciles de fosilizar; (3) por lo general no producen grandes masas apreciables a simple vista. Hay muy pocos ejemplos de bacterias fósiles asociadas con fósiles de animales grandes. Un buen ejemplo es un cangrejo herradura de hace unos 155 millones de años del Jurásico de Nusplingen, en Alemania, en el que las bacterias espirales fosilizaron en fosfato de calcio durante la descomposición de los tejidos del animal. Otro ejemplo es el yacimiento de Rhynie Chert en Escocia, de hace unos 410 millones de años, en el que muchos pequeños y delicados organismos fosilizaron al quedar englobados en la sílice que se formó en el entorno de un cálido estanque hidrotermal de un área volcánicamente activa. Los fósiles de Rhynie incluyen bacterias, pero también hongos, otros pequeños parásitos y restos de las primeras plantas y animales terrestres. Yendo más atrás en el tiempo, los fósiles más antiguos de la Tierra son bacterias de hace 4200 millones de años, pero muchos de estos fósiles tan antiguos son controvertidos porque las bacterias tienen formas tan simples como las de algunas estructuras minerales inorgánicas. Las evidencias de bacterias fósiles también pueden provenir de estudios químicos de las rocas en sí, ya

que las bacterias pueden proporcionar sustancias químicas de sus paredes celulares que perduren durante miles de millones de años. Las bacterias también pueden cambiar la proporción de algunos elementos químicos en las rocas, que a menudo se utilizan como señales de un metabolismo bacteriano.

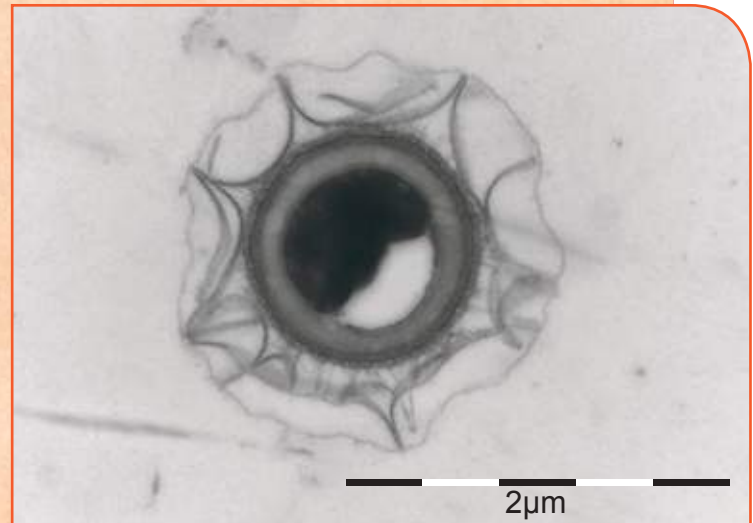


Imagen de MET de una célula bacteriana actual. La célula es pequeña (con un diámetro menor de 1  $\mu\text{m}$ ) y muestra una llamativa pared celular con espinas externas. Esto es una señal de que la bacteria está enquistada y ello le permite sobrevivir a condiciones inhóspitas. Desafortunadamente, las bacterias son difíciles de conservar como fósiles.

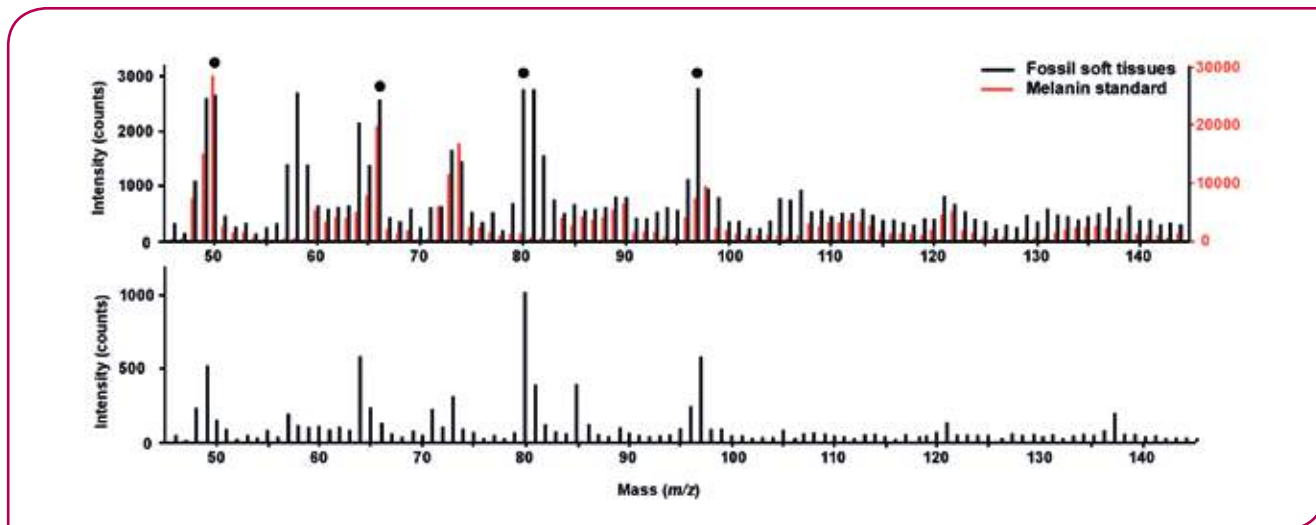


Figura 33. Espectros ToF-SIMS de los melanosomas de Libros con un estándar de melanina pura (arriba) y el sedimento de Libros (abajo). El espectro de los melanosomas es muy similar al de la melanina. Los melanosomas de Libros contienen picos adicionales que no están presentes en la melanina pura; estos picos representan compuestos organosulfurados, que son evidencias clave del proceso de sulfuración.

## 6 INVESTIGACIONES FUTURAS

La investigación de los melanosomas fósiles de Libros continúa. Nuestro estudio más reciente utiliza las ranas de Libros para demostrar que no todos los melanosomas conservados en el contorno del cuerpo de los fósiles provienen de la piel (McNamara *et al.*, 2018). De hecho, la mayoría de los melanosomas de las ranas de Libros se conserva en una capa más interna que la piel, es decir, provienen de órganos internos. Este espectacular descubrimiento sugiere que los paleontólogos deben ser extremadamente cuidadosos cuando empleen melanosomas fósiles para reconstruir los colores originales. ¡Claramente, los melanosomas de los órganos internos no revelarán nada útil sobre el color de la piel!

Al estudiar los melanosomas en las ranas actuales, descubrimos que es fácil diferenciar entre los melanosomas cutáneos y los

melanosomas internos al observar su forma y tamaño. Los melanosomas cutáneos siempre tienen una forma diferente a la de los órganos internos. En los fósiles, los tejidos blandos colapsan durante la descomposición y las partes del tejido propensas a la descomposición se pudren, quedando solo los melanosomas. En las ranas de Libros vemos capas de melanosomas de diferentes tamaños, procedentes de diferentes órganos. En particular, los melanosomas internos son de un tamaño diferente a los de la piel. Los paleontólogos, por lo tanto, deben estudiar cuidadosamente el tamaño y la forma de los melanosomas fósiles para determinar cuáles provienen de la piel.

La investigación futura de las ranas de Libros se centra en la médula ósea conservada. Con suerte, pronto tendremos algunos descubrimientos fascinantes.

# GLOSARIO

**Alcalino:** pH>7

**Aleurita:** partículas sedimentarias entre 0,002 y 0,063 mm de tamaño.

**Alifática:** molécula orgánica compuesta por cadenas de átomos de carbono unidas por enlaces C-C individuales.

**Artrópodos:** animales con extremidades articuladas, como los cangrejos o los insectos.

**Biomarcador:** sustancia química que se encuentra en las rocas y que sirve como indicador de otro compuesto, muy similar, que se encuentra en los organismos vivos. Las sustancias bioquímicas se transforman a menudo en otras sustancias químicas con una estructura similar que son más estables a lo largo del tiempo geológico.

**Biomineralizado:** tejido compuesto por biominerales como el carbonato de calcio (presente en las conchas de caracol) o el fosfato de calcio (en huesos y dientes humanos).

**Caliza:** roca compuesta predominantemente por carbonato de calcio.

**Capa E-K:** la capa de Eberth-Katschenko es la capa media de la dermis en las ranas terrestres actuales y protege contra la desecación.

**Colores estructurales:** colores producidos por nanoestructuras biofotónicas.

**Compuestos organosulfurados:** compuestos a base de carbono ricos en azufre, generalmente en forma de puentes de sulfuro que unen cadenas de carbono alifáticas adyacentes.

**Conservación excepcional:** la conservación de los tejidos blandos.

**Contrasombreado:** tipo común de coloración según el cual los animales tienen superficies superiores oscuras y superficies inferiores pálidas para favorecer su camuflaje.

**Cutícula:** el "casarón" externo de los insectos, compuesto por quitina, un polisacárido (azúcar).

**Estratificado:** un lago donde el cuerpo de agua se divide en dos o más capas que no se mezclan. Las capas se pueden distinguir por sus diferentes densidades (causadas, por ejemplo, por diferencias en la composición) y/o diferentes temperaturas.

**Estructuras biofotónicas:** estructuras de tejido a escala nanométrica que dispersan la luz de modo uniforme, causando que ciertas longitudes de onda se dispersen con preferencia.

**Euhedral:** grano mineral que presenta caras cristalinas perfectas.

**Graptolitos:** animales marinos extintos que vivían en colonias unidas por un esqueleto común similar al colágeno y conectadas por tejido nervioso común.

**Integumento:** partes externas del cuerpo de un animal: piel, pelo, plumas, garras y cuernos.

**Iridiscencia:** cambio de color al cambiar el ángulo de visión.

**Iridóforo:** célula pigmentaria que contiene láminas microscópicas de cristal que se apilan unas encima de las otras y reflejan la luz.

**Konservat-Lagerstätte:** yacimiento caracterizado por la excepcional conservación de los fósiles, por ejemplo, de esqueletos articulados casi completos y, a veces, de tejidos blandos.

**Laminado:** con capas finas.

**Lípidos:** grasas y ceras.

**Lutita:** roca compuesta por partículas de grano muy fino, menores de 0,002 mm. Las partículas pueden ser predominantemente de carbonato (micrita) o de arcilla.

**Melanina:** pigmento formado a partir del aminoácido tirosina que está altamente entrecruzado y es muy resistente a la degradación o disolución química.

**Melanóforo:** célula rica en melanosomas que produce los colores marrón claro y negro de la piel.

**Melanosomas:** orgánulos celulares, de un tamaño de micras, ricos en el pigmento melanina.

**Micra:** micrómetro. 1 micra = 0,001 mm

**Micrita:** roca sedimentaria de grano fino compuesta por carbonato de calcio.

**Mineralización autigénica:** replicación de los tejidos por minerales como resultado de cambios químicos pronunciados durante la descomposición, generalmente causada por degradación bacteriana.

**Modo de conservación:** la forma en la que un tejido blando se conserva en un fósil. Se refiere a la química de los tejidos blandos conservados (por ejemplo, replicado en fosfato de calcio o conservado orgánicamente).

**Nanómetro:** 1 nanómetro = 0,001 micras.

**Paleolago:** lago antiguo (fossilizado).

**Pigmentos:** productos químicos que absorben selectivamente la luz de solo algunas longitudes de onda, dejando que se reflejen otras longitudes de onda (causando color visible).

**Proteínas:** moléculas orgánicas que contienen nitrógeno y algo de azufre.

**Reflector multicapa:** estructura biofotónica compuesta por muchas capas de cutículas que actúan como espejos, dispersando la luz visible.

**Sulfuración:** el proceso por el cual el azufre (en forma de sulfuro o iones de polisulfuro) reacciona con moléculas orgánicas, uniéndolas a través de puentes de azufre.

**Sulfuro:** azufre reducido (por ejemplo  $H_2S$ , "olor a huevos podridos").

**Tafonomía:** el estudio de todos los procesos que ocurren desde el momento de la muerte (incluido el mecanismo de muerte) hasta el momento en que se descubre un fósil.

**Tejidos blandos/partes blandas:** las partes de un animal (o planta) que no están biomineralizadas, como piel, músculo y órganos internos.

**Vacuolas:** espacios internos huecos o vacíos.

**Xantóforo:** una célula pigmentaria que contiene pigmentos carotenoides (que producen colores amarillo, naranja y rojo).

# REFERENCIAS

## Información general

---

- Benton, M., Harper, D.A.T., 2009. *Introduction to Paleobiology and the Fossil Record*. Wiley-Blackwell.
- Fraser, N., Sues H.-D., 2017. *Terrestrial Conservation Lagerstätten: Windows into the Evolution of Life on Land*. Dunedin Academic Press.
- Selden, P.A., Nudds, J.R., 2012. *Evolution of Fossil Ecosystems*. Academic Press.
- Wyse Jackson, P., 2010. *Introducing Palaeontology: A Guide to Ancient Life*. Dunedin Academic Press.

## Referencias científicas

---

- Anadón, P., Rosell, L., Talbot, M.R., 1992. Carbonate replacement of lacustrine gypsum deposits in two Neogene continental basins. *Sedimentary Geology*, 78, 201–216.
- Barden, H.E., Wogelius, R.A., Li, D., Manning, P.L., Edwards, N.P., Van Dongen, B.E., 2011. Morphological and geochemical evidence of eumelanin preservation in the feathers of the Early Cretaceous bird, *Gansus yumenensis*. *PLoS One*, 6, e25494.
- Barden, H.E., Bergmann, U., Edwards, N.P., Egerton, V.M., Manning, P.L., Perry, S., Van Veelen, A., Wogelius, R., Van Dongen, B.E., 2014. Bacteria or melanosomes? A geochemical analysis of microbodies on a tadpole from the Oligocene Enspel Formation of Germany. *Paleodiversity & Paleoenvironments*, 95, 33–45.
- Brown, C.M., Henderson, D.M., Vinther, J., Fletcher, I., Sistiaga, A., Herrera, J., Summons, R.E., 2017. An exceptionally preserved three-dimensional armored dinosaur reveals insights into coloration and Cretaceous predator-prey dynamics. *Current Biology*, 27, 2514–2521.
- Clarke, J.A., Ksepka, D.T., Salas-Gismondi, R., Altamirano, A.J., Shawkey, M.D., D’Alba, L., Vinther, J., Devries, T.J., Baby, P., 2010. Fossil evidence for evolution of the shape and color of penguin feathers. *Science*, 330, 954–957.
- Clements, T., Dolocan, A., Martin, P., Purnell, M.A., Vinther, J., Gabbott, S.E., 2016. The eyes of *Tullimonstrum* reveal a vertebrate affinity. *Nature*, 532, 500–503.

- Colleary, C., Dolocan, A., Gardner, J., Singh, S., Wuttke, M., Rabenstein, R., Habersetzer, J., Schaal, S., Feseha, M., Clemens, M., Jacobs, B.F., Currano, E.D., Jacobs, L.L., Sylvestersen, R.L., Gabbott, S.E., Vinther, J.V., 2015. Chemical, experimental, and morphological evidence for diagenetically altered melanin in exceptionally preserved fossils. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112, 12592–12597.
- De las Heras, F.X.C., Anadón, P., Cabrera, L., 2003. Biomarker record variations in lacustrine coals and oil shales: contribution from Tertiary basins in NE Spain. In: *Valero Garcés, B.L. (ed.): Limnogeology in Spain: A Tribute to Kerry Kelts*, 187–228. Spanish Research Council (Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Madrid.
- Del Río, J.C., Olivella, M.A., Knicker, H., De las Heras, F.X.C., 2004. Preservation of peptide moieties in three Spanish sulfur-rich Tertiary kerogens. *Organic Geochemistry*, 35, 993–999.
- Gabbott, S.E., Donoghue, P.C.J., Sansom, R.S., Vinther, J., Dolocan, A., Purnell, M.A., 2016. Pigmented anatomy in Carboniferous cyclostomes and the evolution of the vertebrate eye. *Proceedings of The Royal Society B*, 283, 20161151.
- Glass, K., Ito, S., Wilby, P.R., Sotad, T., Nakamurad, A., Bowers, C.R., Vinther, J., Dutta, S., Summons, R., Briggs, D.E.G., Wakamatsu, K., Simon, J.D., 2012. Direct chemical evidence for eumelanin pigment from the Jurassic period. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109, 10218–10223.
- Hu, D., Clarke, J.A., Eliason, C.M., Qiu, R., Li, Q., Shawkey, M.D., Zhao, C., D'Alba, L., Jiang J., Xu, X., 2018. A bony-crested Jurassic dinosaur with evidence of iridescent plumage highlights complexity in early paravian evolution. *Nature Communications*, 9, 217.
- Kok, M.D., Rijpstra, W.I.C., Robertson, L., Volkman, J.K., Sinninghe Damsté, J.S., 2000. Early steroid sulfurization in surface sediments of a permanently stratified lake (Ace Lake, Antarctica). *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 64, 1425–1436.
- Li, Q., Gao, K.-Q., Vinther, J., Shawkey, M.D., Clarke, J.A., D'Alba, L., Meng, Q., Briggs, D.E.G., Prum, R.O., 2010. Plumage color patterns of an extinct dinosaur. *Science*, 327, 1369–1372.
- Li, Q., Gao, K.-Q., Meng, Q., Clarke, J.A., Shawkey, M.D., D'Alba, L., Pei, R., Ellison, M., Norell, M.A., Vinther, J., 2012. Reconstruction of *Microraptor* and the evolution of iridescent plumage. *Science*, 335, 1215–1219.
- Li, Q., Clarke, J.A., Gao, K.-Q., Zhou, C.-F., Meng, Q., Li, D., D'Alba L., Shawkey, M.D., 2014. Melanosome evolution indicates a key physiological shift within feathered dinosaurs. *Nature*, 507, 350–353.
- Lindgren, J., Uvdal, P., Sjövall, P., Nilsson, D.E., Engdahl, A., Schultz, B.P., Thiel, V., 2012. Molecular preservation of the pigment melanin in fossil melanosomes. *Nature Communications*, 3, 824–831.
- Lindgren, J., Sjövall, P., Carney, R.M., Uvdal, P., Gren, J., Dyke, G., Schultz, B.P., Shawkey, M.D., Barnes, K.R., Polcyn, M.J., 2014. Skin pigmentation provides evidence of convergent melanism in extinct marine reptiles. *Nature*, 506, 7489, 484.
- McNamara, M.E., Orr, P.J., Kearns, S., Alcalá, L., Anadón, P., Peñalver, E., 2006. High-fidelity preservation of bone marrow in ca. 10 Ma amphibians. *Geology*, 34, 641–644.

- McNamara, M.E., Orr, P.J., Kearns, S., Alcalá, L., Anadón, P., Peñalver, E., 2009. Soft tissue preservation in Miocene frogs from Libros (Spain): Insights into the genesis of decay microenvironments. *Palaios*, 24, 104–117.
- McNamara, M.E., Briggs, D.E.G., Orr, P.J., Wedmann, S., Noh, H., Cao, H., 2011. Fossilized biophotonic nanostructures reveal the original colors of 47 million-year-old moths. *PLoS Biology*, 9, e1001200.
- McNamara, M.E., Briggs, D.E.G., Orr, P.J., Noh, H., Cao, H., 2012a. The original colours of fossil beetles. *Proceedings of the Royal Society B*, 279, 1114–1121.
- McNamara, M.E., Briggs, D.E.G., Orr, P.J., 2012b. The controls on the preservation of structural color in fossil insects. *Palaios*, 27, 443–454.
- McNamara, M.E., Orr, P.J., Kearns, S., Alcalá, L., Anadón, P., Peñalver, E., 2012. What controls the taphonomy of exceptionally preserved taxa – environment or biology? A case study using exceptionally preserved frogs from the Miocene Libros Konservat–Lagerstätte, Spain. *Palaios*, 27, 63–77.
- McNamara, M.E., Briggs, D.E.G., Orr, P.J., Field, D., Wang, Z., 2013. Experimental maturation of feathers: implications for reconstructions of fossil feather colour. *Biology Letters*, 9, 20130184.
- McNamara, M.E., Saranathan, V., Locatelli, E., Noh, H., Briggs, D.E.G., Orr, P., Cao, H., 2014. Cryptic iridescence in a fossil weevil generated by single diamond photonic crystals. *Journal of the Royal Society Interface*, 11, 20140736.
- McNamara, M.E., Orr, P.J., Kearns, S.L., Alcalá, L., Anadón, P., Peñalver, E., 2016a. Reconstructing carotenoid–based and structural coloration in fossil skin. *Current Biology*, 26, 1075–1082.
- McNamara, M.E., Van Dongen, B., Bull, I., Orr, P.J., 2016b. Fossilization of melanosomes via sulfurization. *Palaeontology*, 59, 337–350.
- McNamara, M.E., Kaye, J.S., Benton, M.J., Orr, P.J., 2018. Non–integumentary melanosomes bias reconstructions of the colours of fossil vertebrate skin. *Nature Communications*, 9, 2878.
- McNamara, M.E., Zhang, F., Kearns, S.L., Orr, P.J., Toulouse, A., Foley, T., Hone, D.W.E., Rogers, C.S., Benton, M.J., Johnson, D., Xu, X., Zhou, Z., 2018. Fossilized skin reveals coevolution with feathers and metabolism in feathered dinosaurs and early birds. *Nature Communications*, 9, 2072.
- Moyer, A.E., Zheng, W., Johnson, E.A., Lamanna, M.C., Li, D.Q., Lacovara, K.J., Schweitzer, M.H., 2014. Melanosomes or microbes: testing an alternative hypothesis for the origin of microbodies in fossil feathers. *Scientific Reports*, 4, 4233.
- Ortí, F., Rosell, L., Anadón, P., 2003. Deep to shallow lacustrine evaporites in the Libros gypsum (southern Teruel Basin, Miocene, NE Spain): an occurrence of pelletal gypsum rhythmites. *Sedimentology*, 50, 361–386.
- Pinheiro, F.L., Horn, B.L.D., Schultz, C.L., De Andrade, J.A.F.G., Sucerquia, P.A., 2012. Fossilized bacteria in a Cretaceous pterosaur headcrest. *Lethaia*, 45, 495–499.
- Sinninghe Damsté, J.S., Kohnen, M.E.L., Horsfield, B., 1998a. Origin of low-molecular-weight alkylthiophenes in pyrolysates of sulphur-rich kerogens as revealed by micro-scale sealed vessel pyrolysis. *Organic Geochemistry*, 29, 1891–1998.



- Sinninghe Damsté, J.S., Kok, M.D., Köster, J., Schouten, S., 1998b. Sulfurized carbohydrates: an important sedimentary sink for organic carbon? *Earth & Planetary Science Letters*, 164, 7–13.
- Sinninghe Damsté, J.S., Rijpstra, W.I.C., Coolen, M.J.L., Schouten, S., Volkman, J.K., 2007. Rapid sulfurization of highly branched isoprenoid (HBI) alkenes in sulfidic Holocene sediments from Ellis Fjord, Antarctica. *Organic Geochemistry*, 38, 128–139.
- Smithwick, F.M., Nicholls, R., Cuthill, I.C., Vinther, J., 2017. Countershading and stripes in the theropod dinosaur *Sinosauropteryx* reveal heterogeneous habitats in the Early Cretaceous Jehol Biota. *Current Biology*, 27, 3337–3343.
- Toporski, J.K.W., Steele, A., Westall, F., Avci, R., Martill, D.M., McKay, D.S., 2002. Morphologic and spectral investigation of exceptionally well-preserved bacterial biofilms from the Oligocene Enspel formation, Germany. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 66, 1773–1791.
- Van Dongen, B.E., Schouten, S., Sinninghe Damsté, J.S., 2003a. Sulfurization of carbohydrates results in a S-rich, unresolved complex mixture in kerogen pyrolysates. *Energy & Fuels*, 17, 1109–1118.
- Van Dongen, B.E., Baas, M., Geenevasen, J.A.J., Sinninghe Damsté, J.S., 2003b. An experimental study of the low-temperature sulfurization of carbohydrates. *Organic Geochemistry*, 34, 1129–1144.
- Vinther, J., Briggs, D.E.G., Prum, R.O., Saranathan, V., 2008. The colour of fossil feathers. *Biology Letters*, 4, 522–525.
- Vinther, J., Clarke, J., Mayr, G., Prum, R.O. 2010. Structural coloration in a fossil feather. *Biology Letters*, 6, 128–131.
- Vinther, J., Nicholls, R., Lautenschlager, S., Pittman, M., Kaye, T.G., Rayfield, E., Mayr, G., Cuthill, I.C., 2016. 3D camouflage in an ornithischian dinosaur. *Current Biology*, 26, 2456–2462.
- Werne, J.P., Hollander, D.J., Behrens, A., Schaeffer, P., Albrecht, P., Sinninghe Damsté, J.S., 2000. Timing of early diagenetic sulfurization of organic matter: a precursor-product relationship in Holocene sediments of the anoxic Cariaco Basin, Venezuela. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 64, 1741–1751.
- Wogelius, R.A., Manning, P.L., Barden, H.E., Edwards, N.P., Webb, S.M., Sellers, W.I., Taylor, K.G., Larson, P.L., Dodson, P., You, H., Da-King, L., Bergman, U., 2011. Trace metals as biomarkers for eumelanin pigment in the fossil record. *Science*, 333, 1622–1626.
- Wuttke, M., 1983. 'Weichteil-Erhaltung' durch lithifizierte Mikroorganismen bei Mittel-Eozänen Vertebraten aus den Ölschiefern der 'Grube Messel' bei Darmstadt. *Senckenbergiana lethaea*, 64, 509–527.
- Zhang, F., Kearns, S.L., Orr, P.J., Benton, M.J., Zhou, Z., Johnson, D., Xu, X., Wang, X., 2010. Fossilized melanosomes and the colour of Cretaceous dinosaurs and birds. *Nature*, 463, 1075–1078.



# **A story of death, melanin and sulfur**

*Maria McNamara, Bart Van Dongen,  
Nick Lockyer, Ian Bull & Patrick Orr*

English version

# Authors



Dr Maria McNamara

I'm a palaeobiologist working on the preservation of soft tissues in fossil animals. Much of my current research focuses on the preservation of colour in fossil insects and vertebrates. I am also interested in fossil preservation more broadly, including the skeletal taphonomy of fossils and the environmental and biological controls on preservation. My research highlights include the discovery of fossil skin in feathered dinosaurs and ancient birds (McNamara et al. 2018a *Nature Communications*), the recognition that melanosomes in many fossils may derive from internal organs, not the skin (McNamara et al. 2018b *Nature Communications*), and the reconstruction of 'full' colour in a fossil snake (McNamara et al. 2016 *Current Biology*).



Dr Bart Van Dongen

I'm an organic geochemist and much of my research focuses on the application of organic geochemical techniques to the study of biogeochemical processes, including the preservation of soft tissues in the fossil record. Past research highlights include the discovery that preservation through sulfurization is a more important mechanism for the preservation of organic carbon in the fossil record than previously thought and the development of new techniques to non-destructively map organic compounds that can be used to reveal the chemistry of biological structures preserved in fossil reptiles, feathers and plants up to at least 50 Myr old.



Dr Nicholas Lockyer

I received a PhD in 1996 from UMIST on laser ionisation mass spectrometry of biomolecules. After a period of post-doctoral work and a Leverhulme Special Research Fellowship developing imaging time-of-flight secondary ion mass spectrometry (ToF-SIMS) instrumentation I was appointed Lecturer in the Department of Chemistry at UMIST in 2002. My current position is a Reader in the School of Chemistry at the University of Manchester. My research interests include the development of imaging mass spectrometry instrumentation and applications, on which I have published over 100 papers.



Dr Ian Bull

I am an analytical chemist interested in the characterisation, principally through the application of mass spectrometry, of organic compounds present in natural materials such as fossils, soils and sediments to provide information about the origin of organic matter, the processes that alter it and its long-term preservation. Examples of how this knowledge may be used include: obtaining biological information about organisms responsible for fossil formation, probing the functional activity of microbial communities and, more widely, obtaining a better understanding of the cycling of elements in the environment.



Dr Patrick Orr

Dr Patrick Orr has wide ranging research interests across the broad field of palaeobiology. These include study of the taphonomy of exceptional biotas and the use of trace fossils and ichnofabrics to document the evolution of early marine animal communities. Current research also includes the rapidly developing field of conservation paleobiology - using fossil assemblages of natural and anthropogenic origin from the recent past as a benchmark against which to test extant communities for environmental change.

## FOREWORD

I would like to express my sincere thanks to the committee of the Paleontology Award for selecting my 2016 publication, 'Fossilization of melanosomes via sulfurization' (published in the journal *Palaeontology*), for the 2017 Award. I would also like to acknowledge the respective contributions of each of my co-authors on the paper: Bart Van Dongen and Ian Bull, who performed the GC-MS analyses; Nick Lockyer, who performed the ToF-SIMS analyses; and Patrick ('Paddy') Orr, who provided useful discussion at all stages of the research. This was a truly collaborative paper and would not have been published without the input and expertise of each of the co-authors.

Secondly, I wish to acknowledge the contributions made by all of my co-authors who have worked with me on various aspects of the Libros

fossils: Luis Alcalá, Pere Anadón, Enrique ('Quique') Peñalver, Stuart Kearns, Jo Kaye and Valentina Rossi. A very special thank you goes to Patrick Orr, who has collaborated with me on all of my Libros-related research, and who as my PhD supervisor set me on the path to questioning the fossil record. A special thank you must also go to my husband Seán, not least for acting as my field assistant during my PhD fieldwork at Libros, but who has supported me through all the joys and trials of a research career and juggling this with a young family.

I also want to thank all of my colleagues, students and postdocs, plus who have provided stimulating and exciting discussion on the Libros fossils, and on taphonomy in general, over the last 15 years. And finally, thanks to Naomi O'Reilly who helped with the formatting of the text.

*Maria McNamara*

## A story of death, melanin and sulfur

## 1 INTRODUCTION

This booklet is about fossils – enigmatic remains of ancient life. In particular, this book focuses on the exceptionally preserved fossil frogs from the Libros biota in Teruel, NE Spain (Figure 1). These fossils are world-famous because of the quality of preservation of their soft tissues, which normally don't survive in the fossil record. The soft tissues of the Libros fossils preserve tissue details that are only micrometres to nanometres in size, yet they tell us about the ecology and behaviour of the ancient animals, as well as about the fossilization process itself. The fossils have been studied intensively by an international team of palaeontologists for the last 15 years, and although we have learned much, we still have lots of unanswered questions. Because of this, research on the Libros fossils is still happening, right now, where both

student and experienced palaeontologists from around the world are working together to unravel mysteries relating to the fine anatomy and chemistry of the fossil soft tissues.

 – Figure 1. Specimen MNCN 63663 from Libros, showing near-complete, articulated skeleton and soft tissues in the eyespots, torso, legs, and including stomach contents (in white, in the central abdomen).

The purpose of this booklet is to introduce you to these remarkable fossils, to inspire you to learn more about other natural wonders and, above all, to ask questions about the world around you.

In the text, you will find some words written in **bold** font and coloured. These are important terms defined in the Glossary at the back of the booklet (see page 56).

## 2 FOSSIL PRESERVATION

Fossils are remarkable evidence of the history of life on Earth through deep time. They provide direct answers to some of the most fundamental questions about the evolution of life: What life forms have existed? Where did they live? What did they eat? How did they move, communicate, reproduce? When did they appear, and when did they die out? These questions, although relatively easy to answer when studying living organisms today, are much harder to answer about our ancient ancestors because the fossil record is not perfect. Instead, the fossil record is selective, preserving only pieces of the puzzle of ancient life (Figure 2).

Page 10

Figure 2. Specimen MCS 604b from Libros. Unlike many other Libros frogs, this specimen does not preserve soft tissues and the bones are disarticulated. This preservation is typical of much of the fossil record.

There are several reasons why the fossil record is not perfect. Sometimes sedimentary rocks containing fossils get destroyed during the rock cycle – rocks can be subducted at plate boundaries and melted. Even if rocks escape such extremes, any fossils contained within can still be damaged or destroyed by high temperatures and pressures during burial, or by the action of fluids percolating through pore spaces in rocks – such fluids can even dissolve bones and shells.

Finally, not all creatures have the same chance of being fossilized. Clearly, an organism with a hard **biomineralized** skeleton, e.g. with a shell, or bones, has a better chance of being fossilized than an animal made entirely of squishy tissues or **soft parts**, e.g. a worm, or a flower, because harder tissues are more resistant to decay after death. Very small living structures, such as animal larvae, microscopic eggs and bacterial cells, have an even smaller chance of fossilization (plus they are harder to find!). Other factors which affect fossilization potential include habitat: organisms that live in or near water have a better chance of making it into the fossil record than animals that live in mountainous regions. This is because most terrestrial environments are characterised by erosion, whereas many aquatic environments are zones of sediment transport and deposition. Organisms in aquatic settings therefore have a better chance of being covered by sediment, protecting them from scavengers, and thus surviving as fossils.

For these reasons, the bulk of the fossil record is made up of the hard biomineralized parts of relatively large animals that lived in or near water. In rare circumstances, however, the soft parts of animals do not decay completely and can be preserved in fossils. These fossilized soft tissues raise the classification of the fossil deposit to what is termed an 'exceptional biota' or '**Konservat-Lagerstätte**'. These fossil deposits can give us a much clearer picture of ancient life than the normal fossil record for four reasons:

- (1) They preserve the only evidence of life that lacks a biomineralized skeleton (e.g. worms, jellyfish, all plants and insects)
- (2) They preserve the only evidence of the soft parts of animals with biomineralized skeletons (e.g. muscles, skin, internal organs, feathers, hair)
- (3) They give us a more accurate depiction of the diversity of ancient ecosystems (by preserving soft-bodied animals that are normally missing in the fossil record)
- (4) They help us understand the fossilization process, helping us recognise when pieces of the fossil puzzle are missing

### KONSERVAT-LAGERSTÄTTEN

*Konservat-Lagerstätten* – meaning 'conservation lode' in German, is a term used to describe fossil deposits which are deemed remarkable for the quality of fossil preservation. Normally, most fossils are broken fragments of bones or shells. In Konservat-Lagerstätten, however, fossils are preserved as articulated skeletons and can preserve soft, non-mineralized tissues. Famous examples of Konservat-Lagerstätten include the ca. 520 million year old Burgess Shale locality in Canada and the ca. 50 million year old Messel locality in Germany.

Page 11

A 47 million year old fossil beetle, still preserving structural colours, from the Messel locality in Germany. This locality is a famous Konservat-Lagerstätte.

## EXPERIMENTAL TAPHONOMY

Not all organisms have an equal chance of being fossilized, and even within one organism not all tissues have an equal chance of being fossilized. To understand why this is, many palaeontologists conduct experiments to study the fossilization process in the laboratory. Most taphonomic experiments investigate major processes such as transport (which leads to breakup of body parts), decay (which leads to loss of soft tissues), mineralization (which can preserve soft tissues) and maturation (which can also preserve soft tissues).

Page  
13

– Gold cells and aluminium foil wrappers for samples of modern tissues, about to be heated to high temperatures and squashed at high pressures. Such experiments simulate the fossilization process.

Famous examples of exceptionally preserved fossils include primitive horses, some pregnant (with unborn fetuses preserved) from the 48 million year old Messel locality in Germany, feathered dinosaurs from the 125 million year old Jehol biota in China, remarkable three-dimensionally preserved arthropods from Herefordshire in the UK, and delicate specimens of insects, flowers, and spiderwebs from Burmese amber (see **KONSERVAT-LAGERSTÄTTEN**; Figure 3).

Page  
12

– Figure 3. Specimen MCS 607b from Libros. Although the Libros fossil locality is a Konservat-Lagerstätte, not all of the frogs have extensive soft tissues (see also Figure 2). In this specimen, there is almost no soft tissue preserved, even though the bones are almost perfectly articulated.

We must be careful, however, and not expect too much of such **exceptionally preserved** fossils. Even where a fossil preserves soft tissues, not all of the original tissues and organs may be preserved. This is because even different soft tissues vary in their resistance to decay and

their potential to be fossilized. Skin, hair and feathers are relatively resistant to decay, but nervous tissue and guts decay quickly. Resistant tissues are most often preserved as organic remains, i.e. consisting of organic compounds. Decay-prone tissues are rarely fossilized as organic remains as this process takes time – weeks to hundreds or thousands of years! Decay-prone tissues can, however, be fossilized if the right types of mineral ions are present in and around the rotting carcass, as this can cause the tissue structure to become replicated in minerals that can survive for millions of years – this is called **authigenic mineralization**. We can understand the processes responsible for soft tissue preservation both by studying fossils and simulating aspects of the fossilization process in the laboratory (see **EXPERIMENTAL TAPHONOMY**). This area of research is called **taphonomy** and is a major focus of research in palaeobiology today.

The Libros fossils preserve soft tissues both as organic remains and in authigenic minerals, as we'll explore in Sections 5 and 6.

## SEM AND TEM

Scanning- and transmission electron microscopy (SEM and TEM) are common techniques that are used to examine the fine-scale morphology of structures across diverse sciences from biology to geology to engineering. Fossil tissues are often examined using SEM, which usually involves simply sticking a small piece of the fossil (less than 4-5 mm) to some tape on a pin and then inserting the pin in the machine. TEM is less common in palaeontology, largely because it is difficult to prepare samples – samples need to be less than 1 mm in size, embedded in resin, cut with a diamond into sections only ca. 90 nm thick (that's as thick as a human cell membrane!) and picked up using an eyelash!

Page  
14

– A copper grid beside a pencil. The grid contains three 'ultrathin' sections of fossil tissue for TEM analysis, but they are so small that they are invisible to the naked eye.

### 3 FOSSIL COLOUR

In modern animals, the **integument** (e.g. skin, feathers, hair, or the cuticle of insects) is usually coloured, sometimes with subtle monotonous shades of brown, but in other cases with striking patterning and strong colours such as reds, yellows, greens, and even **iridescence**. These colours can be produced by **pigments**, which are chemicals that absorb light, by **biophotonic structures**, which are microscopic features in tissues that scatter light (generating **structural colours**), or sometimes by a combination of pigments and biophotonic structures. Many colour-producing structures are studied using powerful electron microscopes (see **SEM AND TEM**; Figure 4).

**Page 14** – Figure 4. Maria and her postdoc Dr Tim Astrop enjoying doing SEM analyses on some fossils.

Colour plays important biological roles in animals, including UV protection, regulating body temperature and sequestering metals, but most importantly in visual communication. Common visual signalling functions include camouflage, mimicry, warning predators and producing mating displays. In many cases, the evolutionary history and origins of different coloration mechanisms are poorly understood. Fossils can provide insights into the evolutionary history of features in modern animals, but until recently, it was not thought possible to reconstruct the colours of ancient animals. This is because colour was considered to be too decay-prone to survive fossilization.

Over the last 10 years, however, a series of remarkable discoveries have turned this notion on its head, based on analyses of tiny samples (see **SAMPLING FOSSILS**; Figures 5, 6) of fossil soft tissues using electron microscopes. Many fossil feathers and skin are reported to preserve **melanosomes**, micron-sized cell organelles that in modern animals contain the pigment **melanin**. Traces of melanin pigment and associated metal ions have now been reported in melanosomes from diverse fossils (Clements et al. 2016, Colleary et al. 2015, Lindgren et al. 2012, 2014, Wogelius et al. 2011). The fossil melanosomes (Figure 7), as in their modern counterparts, can have various shapes, including spheres, ovoids, and sausage-like shapes of different lengths (Figures 8-10). In modern birds, the

### SAMPLING FOSSILS

Many analyses of the microscopic anatomy and chemistry of fossil soft tissues require small samples – in other words, cutting small pieces (usually less than 1 mm in size) from fossils using sharp scalpels and tools. It is not always easy to get permission to cut out a part of a fossil – especially if the fossil itself is small, like an insect, but if there is a good scientific reason, many fossil curators will allow some sampling. Getting permission is only half the battle, however, as the next step is truly nerve-racking – taking the knife to the fossil. This work requires a very steady hand, patience, and courage!

**Page 15** – Taking samples from fossils requires a sharp knife, a good microscope, and a steady hand!

shape of the melanosomes is linked to the colour of the feathers: sausage-like eumelanosomes produce black and dark brown colours, whereas football-like phaeomelanosomes produce reddish-brown to orange colours. Very long sausage shapes can even produce iridescence where the melanosomes are tightly packed. These observations have been applied to fossils to produce dramatic reconstructions of the original colours of feathered dinosaurs such as *Anchiornis* (Li et al. 2010), *Sinosauropteryx* (Zhang et al. 2010) and *Microraptor* (Li et al. 2012), as well as ancient birds such as *Incayaku* (Clarke et al. 2010) and *Caihong* (Hu et al. 2018). The striking patterning or iridescent colours of some of these beasts almost certainly functioned in mating displays, but some, e.g. *Sinosauropteryx*, also show evidence for colours with a dual function in camouflage (Smithwick et al., 2017).

**Page 15** – Figure 5. Taking samples of soft tissues with a scalpel. (Sampling fossils)

**Page 16** – Figure 6. Samples of soft tissues secured on black carbon tape, ready for SEM analysis. (**THE LIBROS ALCHEMIST**)

Melanosomes in skin, however, don't have the same association between shape and colour (Li et al. 2014), but even so, the relative abundance of preserved melanosomes in fossil skin in different body regions can still yield useful information on colour patterning in the skin. Applying this to fossils of various ancient animal groups has allowed researchers to produce colour reconstructions of the skin of dinosaurs (Brown et al. 2017), marine reptiles (Lindgren et al. 2014) and primitive fish-like vertebrates (Gabbott et al., 2016).

 Page 16 – Figure 7. SEM image of preserved melanosomes in a 48 million year old fossil feather from Messel, Germany.

 Page 17 – Figure 8. SEM image of melanosomes in a modern pigeon (*Columba livia*) feather.

 Page 17 – Figure 9. SEM image of melanosomes in a modern blue-and-yellow macaw (*Araararauna*) feather.

 Page 17 – Figure 10. SEM image of melanosomes in a modern satin bowerbird (*Ptilonorhynchus violaceus*) feather.

All of these studies face, however, some common limitations. The size and shape of melanosomes may not survive the fossilization process intact – taphonomic experiments have shown that as melanosomes are subjected to heat and pressure, they shrink (McNamara et al. 2013). As a result, studies can only infer the colour of fossil feathers using melanosomes if they test whether melanosome shrinkage would change the preserved colour.

Secondly, melanosomes in modern animals are just one component of colour, as the visible hue often depends on a range of additional factors, such as the presence of other pigments, biophotonic nanostructures, and other tissue features that can modify the colour produced by melanosomes. For example, bird feathers with red, yellow, green and even blue colours can all contain melanosomes (McNamara et al. 2013) – but since the non-melanin pigments and structures usually don't survive decay, the colour could be misinterpreted as brown to black in fossils.

A recent fossil discovery, based on an exceptionally preserved snake from the Libros biota, shows that evidence of non-melanin pigments and structures can be preserved (McNamara et al. 2016a). The skin of the fossil snake is preserved with spectacular anatomical details – even the dermal collagen fibres (which are only about 1–2 **microns** (µm) wide – that's 0.001 millimetres!) are preserved and, most importantly, so are the pigment cells that produce colour (Figure 11). Modern reptiles (and amphibians and fish) have three types of pigment cell in their skin: **melanophores** that contain melanosomes and produce dark colours, **xanthophores** that contain **carotenoids** and produce yellow to red colours, and **iridophores** that contain crystals of the chemical guanine, which scatters light. Remarkably, all three types of pigment cell are preserved in the fossil snake skin. Variations in the relative abundance of the pigment cells across the body allowed reconstruction the colours of the snake as predominantly green with a pale belly and dark patches on its back and sides. These colours probably functioned primarily in camouflage: the green colour and irregular patterning would blend in with vegetation, as would the **countershading** of the body.

 Page 18 – Figure 11. SEM image of pigment cells preserved in a fossil snake from Libros.

Pigments, however, are just one part of the story of fossil colour. Many fossil insects preserve bright metallic colours that resemble structural colours in modern insects (Figure 12). Recent studies have shown that these metallic colours are indeed produced by biophotonic structures (McNamara et al. 2011, 2012a, 2012b) – in particular, by ultrathin layers of **cuticle** arranged into stacks called **multilayer reflectors** (Figure 13). These tiny layers scatter light, and the colour of the light produced depends on the thickness of the layers and their composition; thicker layers produce reddish colours, whereas thinner layers produce greens and blues. Detailed study of the structure of the fossil multilayer reflectors and computer models of how they scatter light shows that the colours of the fossils today were not the colours which they had during life – the colours are altered by the fossilization process towards shorter wavelength colours. Taphonomic experiments have explained why this is – pressure and temperature cause the layers to get thinner and change their chemistry, causing scattering of different wavelengths of light than when the animal was alive.



– Figure 12. Metallic colours preserved in the 47 million year old fossil beetle specimen Mel 12223 from Messel, Germany.

– Figure 13. TEM image of a preserved multilayer reflector in a fossil beetle.

As with the fossil melanosomes, these fossil structural colours can also tell us about fossil behaviour. The bright metallic colours of the fossil beetles would almost certainly have been used for mating displays as they would produce brilliant flashes of colour – a specular reflection – in direct sunlight. Another excellent example is found in the case of golden-coloured moths from the Messel fossil locality in Germany (Figure 14; McNamara et al. 2011). As with the fossil beetles, the colours of these moths are produced by multilayer reflectors, but in the moths, the multilayer reflectors are curved in between the ridges on the butterfly wing scales (Figure 15). This curvature causes the generation of more matte colours that are less ‘flashy’ or specular (i.e. visible over a broader range of angles) and less iridescent (i.e. green from all directions) than those of the metallic beetles. Like the beetles, the colours of the moths have changed during fossilization, so the moths would originally have had greenish colours. The colours most likely functioned in camouflage when the moths were resting in vegetation, but may have functioned in mating displays when feeding on flowers.

– Figure 14. Metallic colours preserved in the 48 million year old fossil moth specimen Mel 14269 from Messel, Germany.

– Figure 15. SEM image of ridges, crossribs, and perforations in the scales of fossil moth specimen Mel 11808 from Messel, Germany.

Finally, the fossil record can even preserve evidence of the evolution of some of the most complex tissue structures known in animals – 3D photonic crystals. These amazing structures are microscopic, made from weaving and bending animal tissues into complex 3D crystalline shapes visible only with powerful electron microscopes. They produce the brightest and purest colours in nature and usually function in animals in communication, but they were only discovered in modern animals in the 1990s. Incredibly, these nanostructures can survive in fossils – but to date

have been reported in only one (rather young) fossil beetle from North America (Figure 16; McNamara et al. 2014). By analyzing the fossil structures with high-powered X-rays from a beam of synchrotron light, it was clear that the fossils preserve 3D photonic crystals with a single diamond structure, as in many modern beetles. Strangely, the colour of the fossil beetle is rather muted – a dull brown, in contrast to the bright colours of modern insects with these structures. This is because the individual crystals in the fossils are extremely small, and although each crystal produces a very pure colour (red, green, or yellow), at a distance the colours mix, like the pixels on a TV screen. This matt brown colour closely matches the colour of the gravel the fossils were found in, suggesting that the small crystal size is an adaptation for camouflage.

– Figure 16. Iridescent colours preserved in forked scales in the 725,000 year old fossil weevil from Gold Run, Canada.

## 4 THE LIBROS FOSSILS

The Libros fossils come from a locality, ‘Barrio de las Minas’, approximately 10 km southeast of Libros village in southern Teruel (Figure 17). Rocky outcrops are exposed along the side of a dirt track that meanders up a low hill and also in small excavations dotted around the base of the hill (Figure 18). The area is very rural and quiet, except for rare unusual visitors (see **THE LIBROS ALCHEMIST**).

– Figure 17. Barrio de las Minas.

– Figure 18. A typical outcrop in the Barrio de las Minas.

The rocks were laid down in and around the shores of a relatively large, deep lake up to ca. 30 km<sup>2</sup> in area (Anadon et al. 1992) and up to 100 m deep (Orti et al. 2003). Thick beds of fossiliferous **limestones** rich in shells and plants were laid down near the shorelines of the **palaeolake**, whereas finely **laminated mudstones** (Figure 19) were laid down in the deeper parts of the lake. Chemical studies of the Libros rocks shows

that the lake was rich in sulfur (Figure 20) and was **stratified**: the water body was separated into an **alkaline** upper part rich in nutrients and oxygen, and a lower part lacking oxygen and rich in toxic **sulfide** and mineral ions (de las Heras et al. 2003; del Rio et al. 2004). We know this from the presence of certain sulfur-rich organic molecules (**organosulfur compounds**) in the rocks. Working with these rocks comes with some hazards (Figure 21; see **THE HAZARDS OF FIELDWORK**).

Page 21 – Figure 19. Laminated Sediments.

Page 22 – Figure 20. Outcrop of bedded to laminated gypsum at Libros, showing yellow nodules of sulfur.

## THE LIBROS ALCHEMIST

One day whilst in the field at Libros I was working on an outcrop while my field assistant was gone back to the car to fetch our lunch. While he was gone, I noticed an unfamiliar car approach along the long winding road up the hill to where I was working. To my surprise, the car stopped right beside me and the driver jumped out. He told me that he was an alchemist looking for sulfur because he needed to 'extract the life force from it'. Despite my surprise (surely the last alchemists lived hundreds of years ago?), I pointed to the rock face, where there were fist-sized nodules of yellow sulfur. The 'alchemist' then began hammering the rock face with a pickaxe, collecting the sulfur nodules. I protested, saying that I was working on those very rocks, but it was too late! He took the sulfur, jumped back in his car, and was gone. I still would love to find out what chemical reactions he was planning to do...

Page 22 – A sulfur nodule from the rock outcrop at the Libros locality which was visited by the alchemist.

## THE HAZARDS OF FIELDWORK

Fieldwork comes with lots of dangers – falling rocks, slippery rocks by the shore, incoming tides, navigating cliffs and steep slopes, sunburn, even biting insects. One danger which we didn't anticipate when we did fieldwork at Libros was microscopic. At the end of the first day in the field – spent digging and handling the rocks all day – we noticed that our skin was very tender. Sitting in the car on the way back to base was extremely painful! The reason for this was microscopic needles (spicules) from fossil sponges, which are very common in the Libros laminated mudstones. When we were digging the rocks, the dust was settling on our skin – and literally thousands of microscopic needles were embedded in our skin. Needless to say we wore long-sleeved tops and long pants for the rest of the fieldwork despite the summer heat!

Page 23 – One of the hazards of fieldwork – cows with sharp horns!


Page 23 – Figure 21. Backscattered electron image of a polished section through the Libros laminated mudstones, showing abundant hollow sponge spicules. (**THE HAZARDS OF FIELDWORK**)


The rocks also tell us that 10 million years ago, the climate in this part of Spain was quite variable. White to light grey intervals of mudstone laminae rich in **micrite** were laid down in warm, arid conditions with poorly defined seasons. Medium to dark grey intervals of laminae rich in organic matter and **silt** from flood events were laid down in cooler, wetter and more seasonal conditions (Figure 19).

The exceptionally preserved Libros fossils include adult frogs and tadpoles, salamanders, snakes, birds, insects and leaves, all of which are from the deep-water laminated mudstones. All known


fossil specimens were recovered in the early 20<sup>th</sup> century from the sulfur mines in the area. Unfortunately the levels that contain the fossils are unknown as they are located deep inside the mines, which are no longer accessible. Luckily, however, many local, national and international museums hold specimens of the Libros fossils in their collections, and it is these museum specimens which have yielded many remarkable discoveries.

Most of the fossil specimens are very well preserved, with near-complete skeletons and often extensive soft tissues that can even define the original outline of the body (Figure 22). Studies on the fossil tadpoles (Figure 23) and one of the Libros snakes has revealed that the tadpoles fed on algae growing on submerged plant material in the lake and were adapted for life in slow-moving or still waters, whereas the snake (a water snake) displayed greenish colour patterning used for camouflage in foliage (see Section 3).

 Page 24 – Figure 22. Specimen MSB 20789 from Libros, showing extensive soft tissues and near-complete skeleton.

 Page 24 – Figure 23. Tadpole specimen MNCN 63786 from Libros, showing preservation of the eyespot, body, part of the limbs, tail, and nerve cord (white line in tail), as well as a decay halo formed by leakage of body fluids out of the carcass during decay.


The vast majority of scientific research to date, however, has been carried out on the fossil frogs, which preserve an unusual array of soft tissues preserved in different ways – different **modes of preservation** (McNamara et al. 2009). For instance, the bone marrow of the frogs is preserved as organic remains and retains cellular details (Figures 24, 25; McNamara et al. 2006). This is extremely unexpected because bone marrow is usually one of the first tissues to decay. Its preservation can be explained by a process called **sulfurization**, where sulfides from the lake waters reacted with the bone marrow tissue during decay. The sulfides would have linked up organic molecules in the tissue with sulfide ‘bridges’, making them more decay-resistant. Today, this is the best example in the entire fossil record of a decay-prone tissue preserved organically.

 Page 25 – Figure 24. Cross-section through a piece of fossil bone marrow from a Libros frog, showing cream-coloured fatty marrow (centre) and red-coloured blood cell-producing marrow.

 Page 25 – Figure 25. SEM image of the fossil bone marrow, showing large bone-forming osteoclast cells around the edge of the marrow.

Another striking feature of the fossil frogs is that they preserve fossilized skin (Figure 26; McNamara et al. 2009). In this case, the tissue isn’t preserved organically but has been replicated in the mineral calcium phosphate. Only one part of the skin has been preserved – the mid-dermal **E-K layer**. The quality of preservation is so high that even beautiful meandering collagen fibrils, only a few microns across, are preserved (Figure 27). This quality of preservation is quite typical of calcium phosphate, because the crystals can be extremely small – as little as 25 **nanometres** – and therefore can preserve fine anatomical details. In modern frogs, the E-K layer is present only in species that live most of their lives on land, returning to the water only to breed. Because of this, it is likely that most of the Libros frogs died shortly after mating (McNamara et al. 2012).

 Page 26 – Figure 26. Light microscope image of fossilized skin from a Libros frog. The tiny holes are where microscopic fibres would have penetrated the E-K layer.

 Page 26 – Figure 27. SEM image of sinuous collagen fibres, preserved in calcium phosphate, in the fossilized skin of a Libros frog.

Other details preserved in the frogs include the stomachs and stomach contents (Figure 28; McNamara et al. 2009). In many specimens, the stomach is preserved as a pale pink granular material made up of irregular clusters of calcium phosphate. Here, no tissue structure is preserved, as the calcium phosphate seems to be a void-fill precipitate – filling the internal space of the stomach. This sounds strange but calcium phosphate is commonly associated with fossil stomachs and guts because the mineral requires low pH (< pH 6.38) in order to form, and stomachs typically have low pH due to the presence of stomach acids. In some fossil frog specimens, the stomach also contains traces of the animal’s last meal. These stomach contents include gastropod and bivalve shells, pieces of insect cuticle, and even tadpoles!

Figure 28. Specimen MNCN 63800 showing abundant shell fragments in the stomach.

What's more, even the nervous tissues of the frogs are preserved – the brain and vertebral column are defined by perfect **euhedral** crystals of calcium carbonate (McNamara et al. 2009). These are not preserving any tissue structure but seem to be infilling the space where the brain and spinal cord would have been.

Last, but not least, perhaps one of the most striking features of the Libros frogs is the definition of the outline of the body in a dark brown layer that is organic in composition (cover image). This layer is the focus of Section 5.

The presence of these varied types of soft tissue in the frogs, and their various modes of preservation, reflect biological factors and processes. The limited amount of phosphatized soft tissue (restricted to the mid-dermis) indicates that phosphate ions must have come from the tissues themselves. If phosphate was abundant in the lake floor sediments or lake waters, we would expect to see more extensive phosphatization of soft tissue. Instead, the only concentrated source of phosphate ions in the frogs was the mid-dermal layer, with in modern frogs is rich in granules of calcium phosphate. The phosphate in the stomach is not defining any tissue structure, but is simply a void-fill. In this example, the phosphate ions were probably sourced from decaying food material in the stomach itself and precipitated in the stomach cavity before the organ decayed and collapsed. The calcium carbonate in the nervous tissue was most likely sourced from that tissue, which in living vertebrates requires lots of calcium for transmission of nerve impulses. The lack of any tissue structure is because nervous tissue usually liquefies very rapidly – within days – after death.

The quality of preservation of the frogs varies from specimen to specimen, but statistical analyses show that this variation is not connected to changes in the composition of the sediments (which indicates changes in the palaeoenvironment). Instead, preservation seems to be controlled by biological factors: for instance, specimens where the skin did not decay fully have more complete skeletons, because the skin would have held the bones together while the carcass was resting on the lake floor prior to being buried by sediment (McNamara et al. 2012b).

This section brings together the two strands of our tale: that of melanosomes and fossil colour, and the Libros frogs. Our 2016 study (McNamara et al. 2016b) answered two main questions: (1) Do the Libros frogs preserve fossil melanosomes? (2) How are melanosomes preserved in fossils?

### Fossil bacteria – or melanosomes?

Early studies of the soft tissues of the Libros frogs revealed that the soft tissues of the body outline are usually preserved as a mixture of a brown material and a white material. More detailed investigation with electron microscopes revealed that the white material is phosphatized skin (see Section 4), and that the brown material is carbonaceous and consists of tiny spheres and ovoids only 0.5 – 1  $\mu\text{m}$  long (Figures 29, 30). These spheres and ovoids were initially interpreted as fossil bacteria (McNamara et al. 2006) for a number of reasons:

1. many bacteria have an identical size and shape
2. bacteria are known to decay soft tissues
3. some microstructures appear to be joined, similar to cell division
4. the fossil structures were found only in the soft tissues and not elsewhere in the sediment
5. similar structures are preserved in fossils from other localities and had been interpreted as fossilized decay bacteria (Wuttke 1983, Toporski et al. 2002).

Figure 29. SEM image of fossilized melanosomes from the soft tissues of a Libros frog.

In the years following the initial reports on the Libros fossils, mounting evidence emerged for the preservation of melanosomes in fossil vertebrate tissues – initially in feathers (Li et al. 2010, 2012; Vinther et al., 2008, 2010; Zhang et al. 2010), but then also in eyespots (Lindgren et al. 2012), skin (Lindgren et al. 2014) and hair (Li et al. 2014). In particular, some of these studies tested the chemistry of the fossil ‘melanosomes’ and found evidence for the pigment melanin (Lindgren et al. 2012, 2014). This caused us to question whether our initial interpretations of the structures in the Libros fossils were correct. There were two problems, however: some researchers still claimed that the fossil melanosomes were in fact fossilized decay bacteria (see **GC-MS, ToF-SIMS AND FTIR**; Moyer et al. 2014), and it wasn’t clear why fossil melanosomes should preserve.

### How is melanin preserved?

Discoveries of melanosomes in fossils have been applied primarily to studies of original coloration (see section 4). Surprisingly, despite this intensive study, we have an incomplete understanding of how melanosomes are preserved.

Melanin itself is a very decay-resistant molecule that does not dissolve easily in acids, bases, or oxidants. As a result, some researchers had suggested that melanin is fossilized because of these very properties. Previous studies, however, showed that the shape and composition of melanosomes changes during fossilization. Experiments showed that melanosomes shrink when heated (McNamara et al. 2013). Other studies showed that the melanin in fossil melanosomes preserves better than the **lipids** and **proteins**, and that during fossilization the melanin molecules become cross-linked. There was yet no model to explain how melanosomes are preserved in fossils.

There were, however, hints to explain why. Many fossils, especially **arthropods**, plants, and **graptolites**, are preserved by a process called in situ polymerization, whereby original molecules become cross-linked to form large **aliphatic** molecules built around long chains of carbon atoms. These large molecules resist degradation and frequently survive in fossils, including melanosomes (Barden et al. 2011, 2014; Glass et al. 2013).

## GC-MS, ToF-SIMS AND FTIR

These are three techniques used to analyze the chemistry of a material. GC-MS splits big molecules into smaller fragments and separates them according to their mass, giving a readout (or spectrum) where the small molecules come out first and the larger molecules, later. This technique is very useful for geological samples, because during fossilization organic molecules often link up or polymerize to form very large macromolecules that are not easy to analyze using other techniques. The disadvantage of GC-MS is that it destroys the sample during analysis (it is burnt up). ToF-SIMS and FTIR, on the other hand, are non-destructive techniques (the sample does not get damaged). ToF-SIMS analyses the chemical compounds present in the uppermost 50 nanometres of a sample (that’s about half the thickness of a cell membrane), so it’s really important that samples are clean and free from contamination such as fingerprints on the surface. The best way to prepare samples is to break them and immediately analyse the freshly broken surface using the machine. It gives detailed information on molecular fragments present. FTIR is a ‘quick and dirty’ technique – it requires no sample preparation at all, but gives less specific information – on what chemical bonds are present. It is less precise than the other methods, but can be still useful at determining whether certain compounds are present in the sample, such as water, organic carbon, organosulfur compounds, and amides.

Page  
30

– A TEM image of a modern bacterial cell. The cell is tiny – less than 1 µm across – and shows a fabulous outer cell wall with spines. This is a sign that the bacterium has encysted; this allows it to survive inhospitable conditions. Unfortunately bacteria are notoriously difficult to preserve as fossils.

## The role of sulfur

A variation on this polymerization process is called sulfurization, whereby organic molecules incorporate sulfur during decay or diagenesis (Kok et al., 2000; Sinninghe Damsté et al. 1998a, b, 2007; Werne et al. 2000; Van Dongen et al. 2003a, b). In fact, sulfur and organosulfur compounds have even reported from fossil melanosomes (Barden et al. 2011, 2014; Glass et al. 2012; Lindgren et al. 2014; Pinheiro et al. 2012).

The problem with sulfur is that it may come from different sources. Although the sulfur in fossil melanosomes may come from diagenesis, it is also possible that the sulfur is original: phaeomelanosomes (but not eumelanosomes) are rich in sulfur. Therefore it is possible that the sulfur in the fossil melanosomes reflects the presence of original phaeomelanin and not sulfurization during the fossilization process. The only way to know for sure is by analyzing the fossils and the surrounding sediment for sulfur-bearing compounds. If these are present in both fossils and sediment, this is a good signal for sulfurization. It also suggests that the presence of sulfur in fossil melanosomes does not automatically mean that phaeomelanin is present, which could impact on reconstructions of original colour.

In our 2016 paper, we tested this by analyzing the brown material from the soft tissues of the Libros frogs, and the surrounding sediment.

## Morphological studies of the Libros microstructures


Scanning- and transmission electron microscopy reveal important morphological features that are consistent with melanosomes but not bacteria:

1. The microstructures occur on both upper and lower sides of the fossils. This would not be expected if they were an external growth of microbes on the decaying carcasses.
2. There is no evidence for thick mats of microbes growing on the sediment surface. This would be expected if the structures were bacteria.

3. The microstructures are uniformly dark in stained TEM images, like melanosomes (Figure 31). Bacteria should appear light with a dark cell wall.
4. The small internal globules of the microstructures resemble the internal **vacuoles** of melanosomes (Figure 32).
5. The bumpy surface of the microstructures resembles that of melanosomes (Figure 30).

 Page 31 – Figure 30. High-magnification SEM image of fossilized melanosomes from a Libros frog, showing bumpy surface.

 Page 31 – Figure 31. TEM image of melanosomes from Libros, showing uniform black staining as in modern melanosomes.

 Page 32 – Figure 32. TEM image of unstained melanosomes from Libros, showing internal vacuoles, as in modern melanosomes.

## Chemical studies of the Libros microbodies

We used three chemical techniques (see **BACTERIAL PRESERVATION**) to test for the presence of melanin, and bacterial compounds, in the Libros structures. Our GC-MS results show that the Libros microstructures are rich in organosulfur compounds but do not contain any compounds diagnostic of bacteria. The sediments are also rich in organosulfur compounds, but also contain compounds called hopanoids, which come from bacteria.

Secondly, our FTIR results show that the organic composition of the Libros microstructures is very similar to that of pure melanin. As with the GC-MS results, the FTIR spectra for the fossil microstructures show evidence for organosulfur compounds.

Thirdly, our ToF-SIMS results show that the fossil microstructures are chemically very similar to that of pure melanin, but again, with evidence of organosulfur compounds. In contrast, the sediment does not show any evidence for melanin, but contains abundant organosulfur compounds (Figure 33).

Figure 33. ToF-SIMS spectra of the Libros melanosomes and a pure melanin standard (top), plus the Libros sediment (bottom). The spectrum of the melanosomes is very similar to that of melanin. The Libros melanosomes contain additional peaks that are not present in pure melanin; these peaks represent organosulfur compounds, key evidence for the sulfurization process.

## BACTERIAL PRESERVATION

Fossil bacteria are very rare. There are several reasons for this: (1) bacteria are tiny and difficult to see; (2) they don't have hard parts and are difficult to fossilize; (3) they usually don't occur in large masses that are visible with the naked eye. There are very few examples of fossil bacteria associated with fossils of large animals. One good example is a specimen of a ca. 155 million year old horseshoe crab from the Jurassic of Nusplingen in Germany, where spiral bacteria have become fossilized in the mineral calcium phosphate during decay of the animal's tissues. Another example is the ca. 410 million year old Rhynie Chert from Scotland, where lots of small, delicate creatures are fossilized by becoming encased in silica that formed close to a warm hydrothermal pond in a volcanically active area. The Rhynie fossils include bacteria, but also fungi, other tiny parasites, and some of the earliest plants and animals on land. Going further back in time, the oldest fossils on Earth are 4.2 billion year old bacteria, but many of these very old fossils are controversial because bacteria have simple shapes that could be formed by inorganic mineral structures. Evidence of fossil bacteria can also come from chemical studies of the rocks themselves, as bacteria can leave behind chemicals from their cell walls that can survive for billions of years. Bacteria can also change the ratio of some chemical elements in rocks, which is often used as a signal for bacterial metabolism.

The ToF-SIMS is a very impressive instrument!

## Libros melanosomes

Based on these results, the Libros microstructures can be interpreted with confidence as fossil melanosomes. There is no chemical evidence for bacterial compounds in the microstructures. Bacterial compounds are, however, preserved in the host sediment, so their absence in the fossils is not an artefact of fossilization. The microstructures do, however, contain chemical evidence for melanin (or its breakdown products). There is no evidence for melanin in the sediment, so clearly the melanin is coming from the fossils and not from the sediment.

## Melanosome preservation by sulfurization

Our chemical results show that the fossil melanosomes from Libros contain abundant organosulfur compounds. These compounds do not resemble phaeomelanin as **biomarkers** for phaeomelanin (e.g. benzothiazine and benzothiazole) are not present. Instead, many of the organosulfur compounds in the Libros melanosomes are also present in the host sediment. This means that the Libros melanosomes are preserved by sulfurization. This is consistent with our knowledge of the Libros lake: it was anoxic and rich in sulfide, with low amounts of iron (which can impede the sulfurization process).

The sulfurization process can occur extremely early during decay, even while organic matter is settling through the water column, and other studies have shown that sulfurization increases the resistance of organic molecules to decay. Given that preserved melanosomes from other fossil localities are rich in sulfur and/or organosulfur compounds, the sulfurization process is likely very common and important in the fossilization history of ancient melanosomes.

Sulfurization is likely to be a major factor in preserving melanosomes in the fossil record.

## 6 FUTURE WORK

Research is continuing on the fossil melanosomes from Libros. Our most recent study uses the Libros frogs to show that not all melanosomes preserved in the body outline of fossils come from the skin (McNamara et al. 2018). In fact, most of the melanosomes in the Libros frogs are preserved in a layer that is internal to the skin – i.e. they come from internal organs. This dramatic discovery suggests that palaeontologists must be extremely careful when using fossil melanosomes to reconstruct original colours – clearly melanosomes from internal organs will not tell anything useful about skin colour!

By studying melanosomes in modern frogs, we found that it is easy to tell the difference between skin melanosomes and internal melanosomes

by looking at their shape and size. Skin melanosomes are always a different shape to those from the internal organs. In fossils, the soft tissues collapse during decay, and decay-prone tissue parts rot away, leaving just the melanosomes. In the Libros frogs, we see layers of melanosomes of different sizes, coming from different organs. In particular, the internal melanosomes are a different size to those from the skin. Palaeontologists therefore need to carefully study the size and shape of fossil melanosomes in order to determine which come from the skin.

Future research on the Libros frogs is focussing on the preserved bone marrow. Hopefully we will have some exciting discoveries on the way soon.



- Aliphatic:** an organic molecule composed of chains of carbon atoms linked by single C-C bonds
- Alkaline:** pH > 7
- Arthropods:** animals with jointed limbs, e.g. crabs, insects
- Authigenic mineralization:** the replication of tissues by minerals as a result of steep chemical changes during decay, usually caused by bacterial degradation
- Biomarker:** a chemical found in rocks that is a signal for another, very similar compound, found in living organisms. Biochemicals are often transformed into other chemicals with a similar structure that are more stable over geological timescales
- Biomaterialized:** a tissue made of biominerals such as calcium carbonate (like in snail shells) or calcium phosphate (like human bones and teeth)
- Biophotonic structures:** Nanometre-scale tissue structures that scatter light in a regular fashion, causing certain wavelengths to be preferentially scattered
- Countershading:** the common phenomenon whereby animals have dark upper surfaces and pale lower surfaces for camouflage
- Cuticle:** the outer 'shell' of insects, made of the polysaccharide (sugar) chitin
- E-K layer:** the Eberth-Katschenko layer, the middle layer of the dermis in modern terrestrial frogs. It protects against desiccation
- Euhedral:** a mineral grain with perfect crystal faces
- Exceptional preservation:** the preservation of soft tissues
- Graptolites:** extinct marine animals that lived in colonies joined together by a common collagen-like skeleton and linked by common nervous tissue
- Integument:** the outer parts of an animal's body, including the skin, hair, feathers, claws, and horns
- Iridescence:** colour change with changes in viewing angle
- Iridophore:** a pigment cell that contains microscopic crystal plates that stack on top of each other and reflect light
- Konservat-Lagerstätte:** a fossil deposit remarkable for the high quality of preservation – i.e. articulated, near-complete skeletons, sometimes with soft tissue preservation
- Laminated:** thinly layered
- Limestone:** a rock made predominantly of calcium carbonate
- Lipids:** fats and waxes
- Melanin:** a pigment formed from the amino acid tyrosine that is highly cross-linked and is very resistant to degradation or chemical dissolution
- Melanophore:** a pigment cell rich in melanosomes that produces dark brown to black colours in skin
- Melanosomes:** micron-sized cell organelles rich in the pigment melanin
- Micrite:** mud rich in lime (calcium carbonate)
- Micron:** micrometre. 1 micron = 0.001 mm
- Mode of preservation:** the way in which a soft tissue is preserved in a fossil. Refers to the chemistry of the preserved soft tissues (e.g. replicated in calcium phosphate, or organically preserved)
- Mudstone:** a rock made of very fine-grained particles less than 0.002 mm in size. Particles can be predominately of carbonate (producing a micrite) or of clay (producing a claystone)
- Multilayer reflector:** a biophotonic structure composed of many layers of cuticle that act like mirrors, scattering visible light
- Nanometre:** 1 nanometre = 0.001 microns
- Organosulfur compounds (OSCs):** carbon-based compounds rich in sulfur, usually in the form of sulfide bridges that link up adjacent aliphatic carbon chains
- Palaeolake:** an ancient (fossil) lake
- Pigments:** chemicals that selectively absorb light of only some wavelengths, leaving other wavelengths to be reflected (causing visible colour)
- Proteins:** organic molecules containing nitrogen and some sulfur
- Silt:** sedimentary particles between 0.002 and 0.063 mm in size
- Soft parts / soft tissues:** the parts of an animal (or plant) that are not biomineralized, e.g. skin, muscle, and internal organs
- Stratified:** a lake where the water body is divided into two or more layers that do not mix. The layers can be distinguished by having different densities (caused e.g. by differences in composition) and/or different temperatures
- Structural colours:** colours produced by biophotonic nanostructures
- Sulfide:** reduced sulfur, e.g. H<sub>2</sub>S ('rotten egg smell')
- Sulfurization:** the process by which sulfur (in the form of sulfide or polysulfide ions) reacts with organic molecules, linking them up via sulfur bridges
- Taphonomy:** the study of all processes that occur from the moment of death (including the killing mechanism) to the moment a fossil is discovered
- Vacuoles:** internal voids or empty spaces
- Xanthophore:** a pigment cell that contains carotenoid pigments (that produce yellow, orange and red colours)

# Contents

- |  |                |
|--|----------------|
| <b>1. INTRODUCTION</b>                 | Page <b>43</b> |
| <b>2. FOSSIL PRESERVATION</b>          | Page <b>44</b> |
| <b>3. FOSSIL COLOUR</b>                | Page <b>46</b> |
| <b>4. THE LIBROS FOSSILS</b>           | Page <b>48</b> |
| <b>5. SULFURIZATION OF MELANOSOMES</b> | Page <b>51</b> |
| <b>6. FUTURE WORK</b>                  | Page <b>55</b> |
| <b>7. GLOSSARY</b>                     | Page <b>56</b> |

# Índice

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	Página <b>9</b>
<b>2. CONSERVACIÓN DE FÓSILES</b>	Página <b>10</b>
<b>3. COLOR DE LOS FÓSILES</b>	Página <b>13</b>
<b>4. LOS FÓSILES DE LIBROS</b>	Página <b>20</b>
<b>5. SULFURACIÓN DE MELANOSOMAS</b>	Página <b>27</b>
<b>6. INVESTIGACIONES FUTURAS</b>	Página <b>34</b>
<b>7. GLOSARIO</b>	Página <b>35</b>
<b>8. REFERENCIAS</b>	Página <b>37</b>
<b>ENGLISH VERSION</b>	Página <b>41</b>

Snake colour reconstruction by Jim Robbins



2ª EDICIÓN



El primer número, *El apasionante mundo de la Paleontología*, se editó en el marco del proyecto *La paleontología al alcance de todos*, desarrollado por la Fundación y financiado por el Ministerio de Ciencia y Tecnología (DIF2003–10062–E).



El segundo número, *Dinosaurios de Teruel*, ha sido editado en el marco del III Seminario sobre Paleontología y Desarrollo de la Universidad de Verano de Teruel (Universidad de Zaragoza) y con la colaboración de ésta.



El tercer número, *Evolución humana en el valle del río Omo (Etiopía)*, se edita como consecuencia de la adjudicación del Primer Premio Internacional de Investigación en Paleontología **Paleonturología 03**.



*El Gigante Europeo: excavando un dinosaurio*. Documental y juego interactivo de la excavación del gran dinosaurio de Riodeva (Teruel), *Turiasaurus riodevensis*. Programa Nacional de Fomento de la Cultura Científica y Tecnológica del Ministerio de Educación y Ciencia (492839C1).



–3.200.000 + 2005 *Tejidos (óseos, arquitectónicos, pictóricos)* es el catálogo de la exposición artística presentada en el Museo de Teruel desde el 4 de noviembre al 11 de diciembre de 2005.



El noveno número, *Los huesos gastrales de los terópodos: insuflando vida a los dinosaurios*, se edita como consecuencia de la adjudicación del Tercer Premio Internacional de Investigación en Paleontología **Paleonturología 05**.



*Teruel: territorio paleontológico* (Seminario sobre Paleontología y Desarrollo de la Universidad de Verano de Teruel), ha sido editado en el marco del Año de la Ciencia 2007 con ayuda de la FECYT y del Ministerio de Educación y Ciencia (proyecto *Paleontología en Teruel: dos libros mejor que uno* CCT005–07–00629).



*Los ojos de los trilobites: el sistema visual más antiguo conservado* se edita como consecuencia de la adjudicación del Quinto Premio de Investigación en Paleontología **Paleonturología 07**.

AGOTADO

13



## ¡FUNDAMENTAL!

**¡Fundamental!** es una serie de publicaciones de difusión paleontológica de la Fundación Conjunto Paleontológico de Teruel–Dinópolis que consta de subseries temáticas para cuentos (*Fundacuentos paleontológicos*) o para versiones divulgativas de artículos científicos (*Paleonturología*). Dirigido a públicos de diferentes niveles en función de la complejidad.

Dirección de la serie: Luis Alcalá.



*Teoría del Homosaurus (Paleontología imaginaria de Dino y Saura)* es un cuento del que es autor Elifio Feliz de Vargas (Teruel, 1964), veterinario. En 1990 obtuvo la “Ayuda a la Creación Literaria” concedida por el Instituto de Estudios Turoleses y en 1991 el Premio “Teruel” de relatos.



*XVI Reunión Bienal de la Real Sociedad Española de Historia Natural* contiene los trabajos de investigación presentados en dicha reunión, celebrada en Teruel (septiembre-octubre de 2005).



El octavo número, *Modalidades de ornamentación en bivalvos*, se edita como consecuencia de la adjudicación del Segundo Premio Internacional de Investigación en Paleontología **Paleonturología 04**.



*Laboratorios de Paleontología* (IV Seminario sobre Paleontología y Desarrollo de la Universidad de Verano de Teruel), ha sido editado en el marco del Año de la Ciencia 2007 con una ayuda de la FECYT y del Ministerio de Educación y Ciencia (proyecto *Paleontología en Teruel: dos libros mejor que uno* CCT005–07–00629).




*Aligerando a los gigantes: los huesos neumáticos de los dinosaurios saurópodos y sus implicaciones para la estimación de la masa corporal* se edita durante el Año de la Ciencia 2007 como consecuencia de la adjudicación del Cuarto Premio de Investigación en Paleontología **Paleonturología 06**.




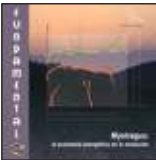
*Mesozoic Terrestrial Ecosystems in Eastern Spain* es una síntesis en inglés de ecosistemas mesozoicos continentales –Pirineos orientales y centrales, Teruel y Cuenca– preparada con motivo de su visita durante el 10<sup>th</sup> MTE Symposium, celebrado en Teruel (septiembre de 2009).


AGOTADO

14


- 15  *El dinosaurio que excavó su madriguera* se edita como consecuencia de la adjudicación del Sexto Premio de Investigación en Paleontología **Paleonturología 08**.


- 17  *En la Tierra como en el Cielo: Río Tinto como análogo terrestre de Marte* se edita como consecuencia de la adjudicación del Séptimo Premio de Investigación en Paleontología **Paleonturología 09**.

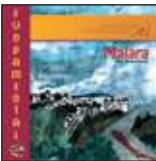
- 19  *Myotragus: la economía energética en la evolución* se edita como consecuencia de la adjudicación del Octavo Premio de Investigación en Paleontología **Paleonturología 10**.


- 21  *El Plateosaurus virtual* se edita como consecuencia de la adjudicación del Noveno Premio de Investigación en Paleontología **Paleonturología 11**.

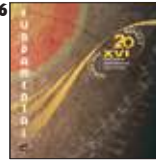
AGOTADO


- 23  *Opiliones fósiles. Los arácnidos actuales de origen más remoto* se edita como consecuencia de la adjudicación del Décimo Premio de Investigación en Paleontología **Paleonturología 12**.


- 25  *El ancestro bilateral de los equinodermos pentarradiados* se edita como consecuencia de la adjudicación del Undécimo Premio de Investigación en Paleontología **Paleonturología 13**.


- 27  *Malara* es un relato de ficción, ambientado en geoparques y escrito por José Manuel Quero, que fue galardonado con el premio de novela científica de la Comisión de Jóvenes Geólogos del Ilustre Colegio Oficial de Geólogos (2014).


- 29  *El enigmático lobopodio Hallucigenia y el origen de los gusanos aterciopelados* se edita como consecuencia de la adjudicación del Decimotercer Premio de Investigación en Paleontología **Paleonturología 15**.


- 16  *XVI Simposio sobre Enseñanza de la Geología* incluye las 34 comunicaciones presentadas en la reunión conmemorativa del vigésimo aniversario de la Asociación Española para la Enseñanza de las Ciencias de la Tierra (Teruel, julio de 2010).


- 18  *Dinojuegos* (serie *Fundajuegos paleontológicos*, de nivel infantil) se ha realizado en colaboración con el Museo Nacional de Ciencias Naturales (CSIC) y en el marco del proyecto **e-dino 10**, financiado por la Fundación Española para la Ciencia y la Tecnología – Ministerio de Ciencia e Innovación (FCT-10-980). Incluye un DVD.


- 20  *10th Annual Meeting of the European Association of Vertebrate Palaeontologists* incluye las comunicaciones presentadas en la reunión anual de la EAVP celebrada en Teruel (junio de 2012).

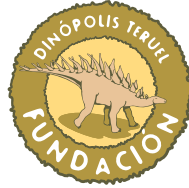
- 22  *Escuela Taller de Restauración Paleontológica IV* describe trabajos de laboratorio y de campo promovidos para la recuperación de patrimonio y para la formación profesional.

- 24  *XXX Jornadas de Paleontología* incluye las ponencias y comunicaciones presentadas en la reunión anual de la Sociedad Española de Paleontología celebrada en Teruel (octubre de 2014).

- 26  *Wonders of ancient life. Fossils from European Geoparks* es el resultado de un proyecto del Grupo de Trabajo Temático sobre Fósiles de la *European Geoparks Network*.

- 28  *Reconstruyendo el esqueleto de un coral tabulado del Carbonífero* se edita como consecuencia de la adjudicación del Duodécimo Premio de Investigación en Paleontología **Paleonturología 14**.

- 30  *Spinolestes, un mamífero primitivo excepcional del yacimiento de Las Hoyas* se edita como consecuencia de la adjudicación del Decimocuarto Premio de Investigación en Paleontología **Paleonturología 16**.



INFANTIL

GENERAL

AVANZADO