



专题: 地球生物学前沿

论文

海南尖峰岭不同海拔土壤中微生物 脂肪酸和脂肪醇分布特征及对古海拔、 古温度重建的启示



杨欢, 丁伟华, 谢树成*

中国地质大学生物地质与环境地质国家重点实验室, 武汉 430074

* 联系人, E-mail: xiecug@163.com

收稿日期: 2013-05-10; 接受日期: 2013-09-05; 网络版发表日期: 2014-05-09

国家重点基础研究发展计划项目(编号: 2011CB808800)、国家自然科学基金项目(批准号: 41130207)和高等学校学科创新引智计划(编号: B08030)资助

摘要 海南尖峰岭不同海拔造成的年平均温度差异为检验和建立基于微生物类脂物的环境替代指标提供了良好条件. 尖峰岭土壤中含有种类丰富的微生物脂肪酸和脂肪醇化合物, 包括异构/反异构脂肪酸($ilaC_{12:0} \sim ilaC_{19:0}$), 10-甲基十六酸、异构和反异构脂肪醇($ilaC_{13} \sim iC_{26}$)、10-甲基十六醇和不饱和脂肪醇, 指示了尖峰岭土壤中强烈的微生物活动. 土壤中异构和反异构脂肪醇, 不饱和脂肪醇主要以结合态, 即蜡脂形式存在, 只有经过皂化才能释放出支链脂肪醇. 反异构十五酸/异构十五酸与海拔成正相关关系, 表明温度降低能够引起反异构十五酸相对比例的增加. 与脂肪酸不同的是, 反异构十五醇/异构十五醇, 反异构十五醇/正构十五醇随海拔升高却逐渐降低, 表现出随温度降低减小的趋势. 同样, 单不饱和十八醇/十八醇比值随海拔升高而逐渐减小, 与微生物脂肪酸不饱和度随温度降低而增加的规律相反. 此外, 植物叶蜡长链正构脂肪醇($C_{22} \sim C_{30}$)的平均碳链长度 ACL, 正构脂肪醇($C_{14} \sim C_{31}$)的碳优势指数 CPI 与海拔(或年平均温度)呈显著相关关系, 证明了其应用于古气候重建的潜力. 因此, 微生物脂肪酸和脂肪醇、高等植物叶蜡都能够灵敏的响应环境温度的变化, 可以为重建古温度和古海拔提供新的途径.

关键词

反异构脂肪醇
微生物
蜡脂
古温度
古海拔

古温度重建是当今全球变化研究中的热点之一. 古温度的重建有助于了解地质历史时期气候变化规律, 为评估自然背景和人类活动对当今全球变暖的相对贡献提供地质参考, 并为古气候模拟提供边界条件(Tierney 等, 2010). 微生物作为地球生态系统的重要组成部分, 已经广泛应用于古温度的重建中. 一

些生物类脂物分子对温度较为敏感, 其结构和组成的变化能够记录一定的生物学信息和环境温度信息. 例如, 表示颗石藻长链烯酮不饱和度的指标 UK-37'(Müller 等, 1998)、代表海洋浮游型奇古菌细胞膜脂甘油二烷基甘油四醚化合物(GDGTs)五元环相对数量的四醚指数 TEX₈₆(Schouten 等, 2002; Kim 等,

中文引用格式: 杨欢, 丁伟华, 谢树成. 2014. 海南尖峰岭不同海拔土壤中微生物脂肪酸和脂肪醇分布特征及对古海拔、古温度重建的启示. 中国科学: 地球科学, 44: 1229–1243

英文引用格式: Yang H, Ding W H, Xie S C. 2014. Distribution of microbial fatty acids and fatty alcohols in soils from an altitude transect of Mt. Jianfengling in Hainan, China: Implication for paleoaltimetry and paleotemperature reconstruction. Science China: Earth Sciences, 57: 999–1012, doi: 10.1007/s11430-013-4729-8

2008)、藻类长链二醇链长指标 LDI(Rampen 等, 2012)都能够很好的响应海水温度的变化, 并已经成为海洋古温度重建的重要手段(Liu 等, 2009; Li 等, 2013; Pearson 和 Ingalls, 2013). 在陆地湖泊环境中, 长链烯酮和古菌 GDGTs 受到盐度、水深和生物源等多种因素的影响(孙青等, 2010; 谢树成等, 2013), 其应用被限制在少数湖泊中. 与古菌 GDGTs 结构类似的细菌支链 GDGTs 在土壤中广泛存在, 代表其甲基相对数量的甲基化指数(MBT)能够灵敏的响应大气温度的变化. 通过环化指数 CBT 消除土壤 pH 的影响后建立的陆地古温度计甲基化/环化指标 MBT/CBT(甲基化/环化指数)为陆地古温度重建提供了一种新方法(Weijers 等, 2007; Peterse 等, 2012), 在湖泊(熊永强等, 2009; Sun 等, 2011)、泥炭(周浩达等, 2011)和黄土(Peterse 等, 2011; Gao 等, 2012)等环境都表现出一定的应用潜力. 但是, 由于陆地环境的不均一性较大, 各指标潜在的影响因素较多, 陆地古温度重建需要多指标体系进行相互验证, 才能提高其准确性. 因此, 建立和发展新的古温度指标显得很有必要.

海拔高度的变化会引起温度、降水、植被和微生物群落等的改变, 使得利用海拔温差来检验和建立新的古温度指标成为可能. 最近发展起来的 ^{13}C - ^{18}O 聚集同位素(clumped isotope)古温度计可以用来估算海拔隆升不同阶段的土壤温度, 进而恢复不同时期海拔高度的变化(Ghosh 等, 2006). 在陆地环境中, 尽管贡献 GDGTs 的奇古菌类群与海洋环境存在差异, 但在湿润区和干旱区不同海拔表层土壤中, TEX_{86} 都能够响应不同海拔温度的变化(Yang 等, 2010; Liu 等, 2013). 陆地古温度计甲基化/环化指标 MBT/CBT 在中国尖峰岭(Yang 等, 2010)、贡嘎山(Peterse 等, 2009)、橡皮山(Liu 等, 2013)和非洲乞力马扎罗山(Sinninghe Damsté 等, 2008)都表现出对不同海拔温度明显的响应. 目前, MBT/CBT 指标已经被成功应用于内华达山脉早始新世古海拔重建(Hren 等, 2010). 可见, 通过对古温度进行恢复, 可以间接重建出不同时期的古海拔高度.

土壤中微生物类脂物丰富, 且容易采集, 不同海拔分布的表层土壤是研究微生物类脂物对不同海拔温度响应的理想材料. 本文选取中国海南尖峰岭不同海拔表层土壤为材料, 检测来自于微生物的脂肪酸和脂肪醇化合物, 查明脂肪酸和脂肪醇的分布特征, 并利用不同海拔带来的温差效应, 建立新的基于

微生物类脂物的古温度和古海拔重建指标.

1 材料与方法

1.1 土壤样品采集

尖峰岭位于热带北缘、中国海南岛西南部的乐东县境内, 为热带雨林自然保护区(图 1). 尖峰岭主峰海拔 1405 m, 山体主要由长英质花岗岩构成, 风化后形成砖红壤和砖黄壤. 尖峰岭地区以热带岛屿季风气候为主, 夏季降雨量非常丰富, 而冬季相对较为干旱, 干湿两季差异显著. 尖峰岭天池气象站(海拔 820 m)所在地多年平均温度 19.8℃, 年平均降雨量 2449 mm(周璋等, 2009).

土壤样品采集于 2008 年 4 月, 正值海南旱季土壤样品含水量非常少. 由于尖峰岭为热带雨林山地, 植被茂盛, 土壤样品都采自于林下, 没有受到阳光直射. 从峰顶开始, 海拔每降低约 100 m 随机采集 1~2 个表层土壤样品, 土壤采集深度 0~10 cm. 将土壤样品用锡箔纸包裹, 装入牛皮信封中保存, 并迅速运回实验室. 样品从顶峰至山麓依次编号为 JFL-1~JFL-14, 所采集土壤类型主要为砖黄壤和砖红壤. 采样时, 避免采集植物根系旁边土壤和人类活动影响土壤. 样品采集的同时利用电子温度计(精度 0.1℃)测量每个采样点测定 1~2 个实时大气温度和土壤温度, 共分别测得 22 个大气温度和土壤温度. 采样点坐标方位和高程利用手持式 GPS 获得(表 1). 样品采集完运回实验室放在干燥阴凉处风干后, 用陶瓷研钵将土壤样品研成粉末, 并用 20 目筛将植物根、矿物颗粒等去除, 过筛后的样品充分混合均匀.

1.2 类脂物提取与分离

称取 15 g 左右土壤样品放入鸡心瓶中, 用不同体积比的二氯甲烷(DCM)与甲醇(MeOH)混合溶液提取类脂物, 溶剂体积比依次为 DCM:MeOH(3:1, v/v), DCM:MeOH(1:1, v/v), DCM:MeOH(1:3, v/v), 每种试剂萃取 1 遍. 用涡旋振荡器(Vortex Genuie)将土壤样品与溶剂混合均匀, 对样品进行超声抽提 15 min. 每次萃取完成后, 上清液通过滤纸过滤去除土壤悬浮颗粒物, 最后将有机提取物合并. 部分含腐殖质较多的土壤, 如 JFL-3 在提取时, 过滤完成后用大量溶剂 DCM(20 mL)冲洗滤纸防止有机质吸附和残存. 总提取物用旋转蒸发仪在 42℃ 的温度下缓慢浓缩至

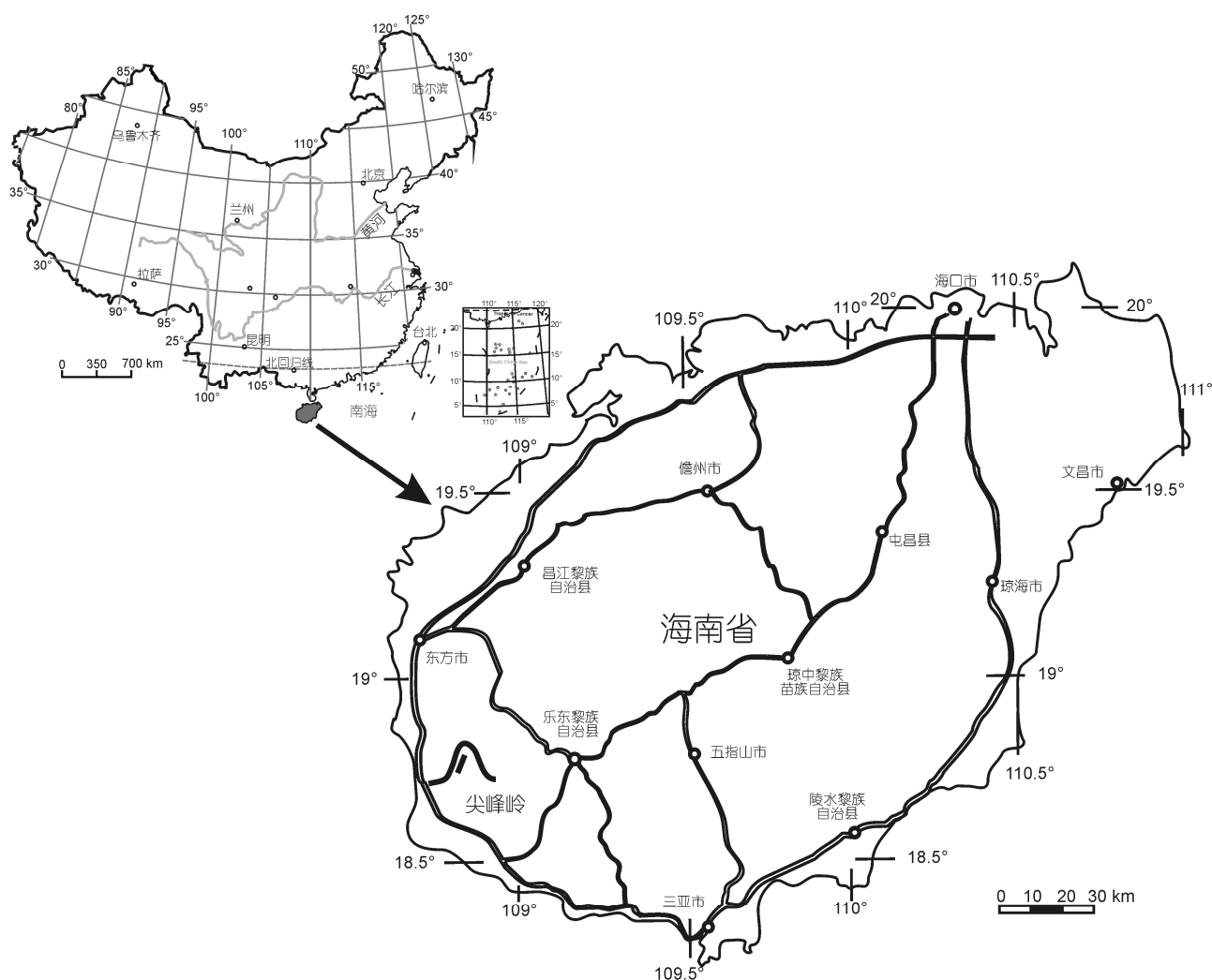


图 1 采样地尖峰岭地理位置图

中国地图中阴影部位为海南岛

3 mL 左右, 转移至细胞瓶内, 之后在低温水浴锅上蒸干。

将活化好的硅胶(150℃, 5 h)填入层析柱内并压实。溶解后的样品分别用 DCM(5 mL)与 MeOH(5 mL)淋洗分离得到非极性组分和极性组分。非极性组分中主要包括烷烃和芳烃, 而极性组分中包括游离态的脂肪酸、脂肪醇和酯等。用氮气吹干极性组分后, 加入 2 mL 0.6M KOH 的甲醇溶液(1% H₂O)进行皂化, 样品放在 30℃烘箱中恒温 15 min。冷却后加入 1 mL 超纯水和 2 mL 正己烷, 在碱性条件下对皂化产物进行萃取(5 次), 所得到的组分为中性组分, 主要包含醇和酮等。之后用盐酸(DCM 萃取去除有机质)将萃

取后的碱性溶液调成强酸性, 再重复上述萃取过程, 此组分为酸性组分, 主要包含脂肪酸等。中性组分和酸性组分均用氮气吹干后备用。

中性组分中大部分类脂物含有羟基(-OH), 而不含羧基(-COOH), 因此只需要硅烷化。在每个样品中加入 30 μL 硅烷化试剂 BSTFA(Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide 双(三甲基硅烷基)三氟乙酰胺), 在 70℃恒温箱中加热 1.5 h, 取出后冷却。然后用氮气吹干后准备上机测试。对酸性组分进行甲酯化。在酸性组分中加入 14%的 BF₃/MeOH 溶液后, 置于 70℃的恒温箱中加热 1.5 h。取出冷却后加 1 mL 超纯水, 用正己烷萃取甲酯化溶液, 共萃取 3 次, 将

表1 土壤样品信息表

土壤样品	GPS 位置	海拔 (m)	实测大气温度(°C)	实测土壤温度(°C)	土壤类型	pH	估算的年均温(°C)	估算的太阳辐射量 (10 ⁴ W m ⁻²)
JFL-1	18°43.0'N; 108°52.2'E	1405	21.5	20.7	花岗岩半风化砖黄壤, 有长石颗粒	4.69	16.6	3.73
JFL-2	18°43.0'N; 108°52.5'E	1296	22.8	20.1	花岗岩半风化或风化砖黄壤	4.40	17.2	3.83
JFL-3	18°43.0'N; 108°52.5'E	1262	22.8	19.5	腐殖质较多, 砖黄壤	4.46	17.4	3.83
JFL-4	18°42.8'N; 108°52.5'E	1137	23.2	21.1	砖黄壤	4.49	18.2	3.94
JFL-5	18°42.7'N; 108°52.6'E	1002	25.5	23.7	砖黄壤	4.18	19.0	4.05
JFL-6	18°42.3'N; 108°52.3'E	899	26.6	23	砖黄壤	4.40	19.6	4.12
JFL-7	18°42.2'N; 108°52.1'E	790	25.5	24.5	砖黄壤	4.24	20.3	4.19
JFL-8	18°41.8'N; 108°51.3'E	701	27.2	24.5	砖黄壤	4.35	20.8	4.26
JFL-9	18°42.0'N; 108°51.1'E	597	27.8	27.3	砖黄壤	4.24	21.4	4.37
JFL-10	18°42.0'N; 108°50.5'E	497	28.1	25.7	砖黄壤	4.03	22.0	4.44
JFL-11	18°42.1'N; 108°50.2'E	402	28.8	29.3	砖黄壤	4.81	22.6	4.51
JFL-12	18°41.9'N; 108°49.9'E	290	30.6	27.3	砖黄壤	4.38	23.3	4.59
JFL-13	18°42.1'N; 108°49.8'E	199	30	28	砖黄壤	5.89	23.8	4.66
JFL-14	18°42.2'N; 108°47.4'E	86	29.1	28	砖黄壤	6.20	24.5	4.73

萃取液转移至细胞瓶. 氮气吹干后用硅烷化试剂 BSTFA 进行硅烷化, 之后用氮气吹干准备上机测试. 为检验脂肪醇(尤其是支链脂肪醇)在土壤中最主要的赋存状态, 将样品 JFL-3 过柱分离所得的极性组分不经过皂化, 直接进行甲酯化, 然后再进行硅烷化, 用氮气吹干后在 GC-MS 上进行测试. 类脂物提取试验中为减少污染, 所有玻璃器皿都是先经过洗涤后再用马弗炉 500℃灼烧 5 h. 滤纸和棉花等都经过索氏抽提器抽提 72 h.

1.3 GC-MS 测试

衍生化后的脂肪酸和脂肪醇的测试使用气相色谱-质谱联用仪(GC-MS). GC-MS 型号为 HP 5890 型气相色谱仪与 HP 5973 质谱仪. 色谱条件: DB-5MS, 石英毛细管柱(60 m×0.25 mm×0.25 μm), 升温条件为始温 70℃, 升温速率 3℃/min, 终温 300℃, 在终温时恒温 20 min; 进样口温度 300℃, 进样量 1 μL, He 为载气. 质谱条件: EI 源, 电离能 70 eV, GC 与 MS 接口温度为 280℃. 在测定微生物脂肪醇和未皂化的极性组分(JFL-3)时, 升温程序与前面所述类似, 仅对升温速率有较小改动. 各组分鉴定依靠化合物质谱图、出峰顺序和文献资料, 并与 NIST 02 质谱图库进行比对. 所鉴定检测的正构脂肪酸(或醇)、异构脂肪酸(或醇)和反异构脂肪酸(或醇)均以其衍生化前的碳数表示,

分别为 $nC_{x,y}$, $iC_{x,y}$ 和 $aC_{x,y}$, 其中 x 为脂肪酸(或醇)衍生化前碳原子总数, y 为化合物双键个数. 正构脂肪醇碳优势指数 CPI 和平均碳链长度 ACL 计算公式如下:

$$CPI_{22-31} = 1/2 \times [(C_{22} + C_{24} + C_{26} + C_{28} + C_{30}) / (C_{23} + C_{25} + C_{27} + C_{29} + C_{31}) + (C_{22} + C_{24} + C_{26} + C_{28} + C_{30}) / (C_{21} + C_{23} + C_{25} + C_{27} + C_{29})],$$
$$ACL_{22-30} = (22 \times C_{22} + 24 \times C_{24} + 26 \times C_{26} + 28 \times C_{28} + 30 \times C_{30}) / (C_{22} + C_{24} + C_{26} + C_{28} + C_{30}),$$

其中 C_n 代表链长为 n 的正构脂肪醇的色谱峰面积.

1.4 土壤 pH 测试

尖峰岭表层土壤 pH 采用水浸法测定. 将研磨过筛后的土壤粉末按 1:2.5(g:mL)浸泡于超纯水溶液中, 玻璃棒搅拌均匀后, 静置 30 min, 待上层溶液澄清, 用 pH 计(IQ Scientific Instruments, USA, 精度为 0.01)测定上层溶液 pH, 总共测定 3 次, 结果取其平均值.

2 讨论与结果

2.1 土壤 pH 和采样点温度特征

尖峰岭实测的大气温度($R^2=0.90$, $P<0.001$, $n=22$)和表层土壤温度($R^2=0.88$, $P<0.001$, $n=22$)均与海拔有很好的负相关关系, 计算所得采样时大气温度垂直

梯度为 $0.60^{\circ}\text{C}/100\text{ m}$, 表明所采集样品具有较为理想的海拔温度梯度. 由于采样时间为春季, 春季实测的海拔温度梯度可能与年平均海拔温度梯度存在差异. 曾庆波等(1985)通过尖峰岭 7 个海拔高度常年监测的年平均温度与海拔建立了不同海拔与年均温的转换函数. $T=25.0-0.006\times H$ (T 为年平均温度($^{\circ}\text{C}$), H 为海拔高度(m)). 基于此, 可以估算出样品采集位置年平均温度范围值约为 $16.6\sim 24.5^{\circ}\text{C}$ (表 1). 此外, 通过曾庆波等(1985)得出的年辐射总量随高度上升线性递减的规律, 也可以估算出不同海拔的年辐射总量, 范围为 $(3.73\sim 4.73)\times 10^4\text{ W m}^{-2}$.

土壤 pH 测定数据显示, 尖峰岭不同海拔土壤都呈较强的酸性, 其 pH 变化范围为 $4.03\sim 6.20$. 这一方面与其风化的母岩为花岗岩有关, 同时也与尖峰岭热带雨林区较强的淋滤作用和高有机质输入有关. 不同海拔表层土壤 pH 没有出现较大波动, 只是在海拔较低处: 199 和 86 m 处, pH 呈现出了增加的趋势. pH 是控制土壤微生物生长非常重要的影响因素 (Fierer 和 Jackson, 2006; Lauber 等, 2009). 因此, 在研究微生物类脂物对不同海拔温度的响应时, 要将土壤 pH 作为类脂物分布的一个影响因子.

2.2 土壤脂肪酸分布特征及来源

尖峰岭土壤中包含着丰富的脂肪酸化合物, 其

碳数范围为 $\text{C}_{14}\sim\text{C}_{31}$, 主峰碳为 C_{16} , 表现出强烈的偶奇优势(图 2). 一般认为, 碳链长度大于 20 的高碳数一元正构脂肪酸($\text{C}_{21}\sim\text{C}_{32}$)主要来自于植物叶蜡、角质和软木脂等成分 (Eglinton 和 Hamilton, 1967), 而支链脂肪酸, 包括异构(*iso*)、反异构(*anteiso*)和甲基支链脂肪酸主要是由土壤中微生物贡献 (Kaneda, 1991). 显然, 尖峰岭土壤脂肪酸有大量叶蜡成分输入, 主要贡献了长碳链($>\text{C}_{20}$)的脂肪酸组分. 由于对样品进行了皂化处理, 植物角质和软木脂中结合态的长链脂肪酸也会释放出来, 因而它们也贡献了部分长碳链脂肪酸. 尖峰岭土壤中能够检测到来自于微生物支链脂肪酸包括 *ilaC* $_{12:0}\sim\text{ilaC}$ $_{19:0}$ 和 10-甲基十六酸 ($10\text{-Me-C}_{16:0}$), 其中以 *ilaC* $_{15:0}$ 含量最为丰富, 表明热带雨林生态系统中强烈的微生物活动. 一般同碳数异构、反异构和正构脂肪酸相对丰度为正构脂肪酸>异构脂肪酸>反异构脂肪酸. 土壤中大量出现的含甲基支链的十七酸, 其相对丰度明显高于 $\text{C}_{17:1}$ (图 2). 前人统计结果表明, 革兰氏阳性菌合成的脂类主要为 *iC* $_{15:0}$, *aC* $_{15:0}$, *iC* $_{16:0}$, *iC* $_{17:0}$ 和 *aC* $_{17:0}$; 革兰氏阴性菌会合成大量不饱和脂肪酸, 如 $16:1\omega 7\text{c}$ 和 $18:1\omega 7\text{c}$ (Frostegård 和 Bååth, 1996). 真菌标志物为 $18:2\omega 6, 9\text{c}$ (Frostegård 和 Bååth, 1996), 而 10-甲基- $\text{C}_{16:0}$ 则被认为是放线菌的标志物 (Zelles, 1999). 因而, 尖峰岭土壤中细菌群落可能以革兰氏阳性菌为主, 此外还包含

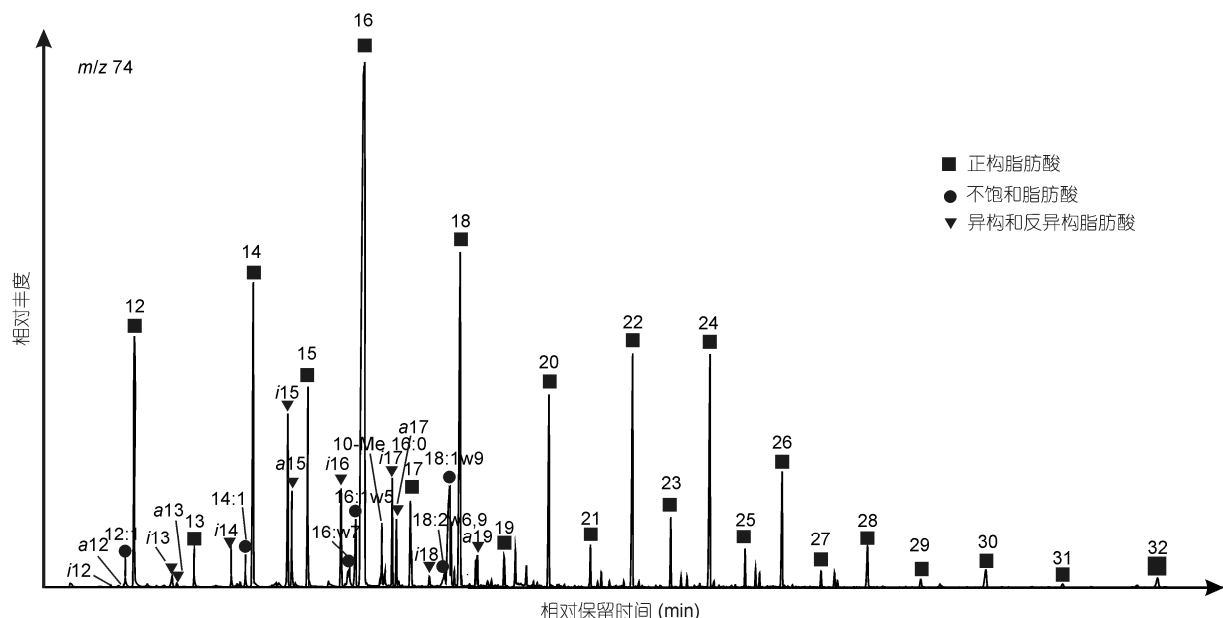


图 2 尖峰岭土壤(JFL-1)中脂肪酸质量色谱图(m/z 74)

一些革兰氏阴性菌和放线菌。

2.3 土壤脂肪醇分布特征及来源

尖峰岭不同海拔表层土壤中的脂肪醇分布模式类似,都是以 C_{22} 或 C_{24} 为主峰,碳数分布范围为 $C_7 \sim C_{32}$,偶碳数优势较为明显(图3)。长碳链($>C_{21}$)脂肪醇丰度明显高于短碳链脂肪醇($<C_{21}$),代表较强的植物蜡脂的输入,与脂肪酸所反映结果一致。脂肪醇组分中含有大量异构、反异构的支链脂肪醇,碳数范围为 $C_{13} \sim C_{26}$ 。由于正构脂肪醇与对应的异构/反异构和含甲基支链的同分异构体质谱图相同,各脂肪醇异构体之间主要通过相对保留时间进行鉴定。例如,异构和反异构脂肪醇($iC_{15:0}$ 和 $aC_{15:0}$)与正构十五醇质谱图结构基本相同(图4),各同分异构体沸点大小为 $iC_{15:0} < aC_{15:0} < nC_{15:0}$,在色谱上出峰的顺序则依次为 $iC_{15:0}$, $aC_{15:0}$ 和 $nC_{15:0}$,其他脂肪醇同分异构体出峰顺序与之相同。值得注意的是,尖峰岭大部分土壤样品,例如 JFL-8 和 JFL-10 中十七醇一般有 3~5 种含甲基支链的异构体,主要为 10-甲基- $C_{16:0}$ (图3中 10-Me- C_{16})、 $iC_{17:0}$ 、 $aC_{17:0}$ 和其他两种甲基位置不确定的异构体(brC_{17} 表示含甲基支链但甲基位置不确定),部

分样品(如 JFL-12)中异构体甚至多达 7 种。正构十九醇也拥有 4 种含有甲基支链的异构体。此外,还检测到 $nC_{16:1}$, $nC_{17:1}$, $nC_{18:1}$, $nC_{19:1}$, $nC_{20:1}$, $nC_{22:1}$, $nC_{23:1}$, $nC_{24:1}$, $nC_{25:1}$, $nC_{26:1}$ 和 $nC_{28:1}$ 11 种单不饱和脂肪醇,不饱和醇 $nC_{18:1}$ 由于双键位置的差异存在 2~3 个异构体,在 JFL-10~14 中甚至出现多不饱和脂肪醇 $nC_{18:2}$ 。 $ilaC_{15:0}$ 和 $ilaC_{17:0}$ 脂肪醇在海洋沉积物曾有发现(Treignier 等, 2006),而包括 $ilaC_{14} \sim iC_{26}$ 在内的多种支链型脂肪醇在以往土壤类脂物研究中几乎都没有报道。在尖峰岭绝大多数土壤样品中十七醇至少有 3 种甲基支链型异构体,与十七酸也至少有 3 种异构体相对应,所有样品中几乎都同时含有 10-甲基- $C_{16:0}$ 对应的酸和醇。同时, C_{14} , C_{15} , C_{16} 和 C_{18} 异构脂肪醇均有相同碳数的异构脂肪酸与其相对应并且分布形式相同。例如,异构十五醇比反异构十五醇含量高,而其相同样品中对应的异构十五酸也比反异构十五酸含量丰富。低碳数($C_{14} \sim C_{18}$)异构(反异构)脂肪酸和异构(反异构)脂肪醇的高度对应性,说明这些异构脂肪酸和异构脂肪醇可能具有相同的生物源。

生物合成的脂肪醇一般以直链偶碳数脂肪醇为主,具有明显的偶奇优势。例如,海洋浮游藻类以

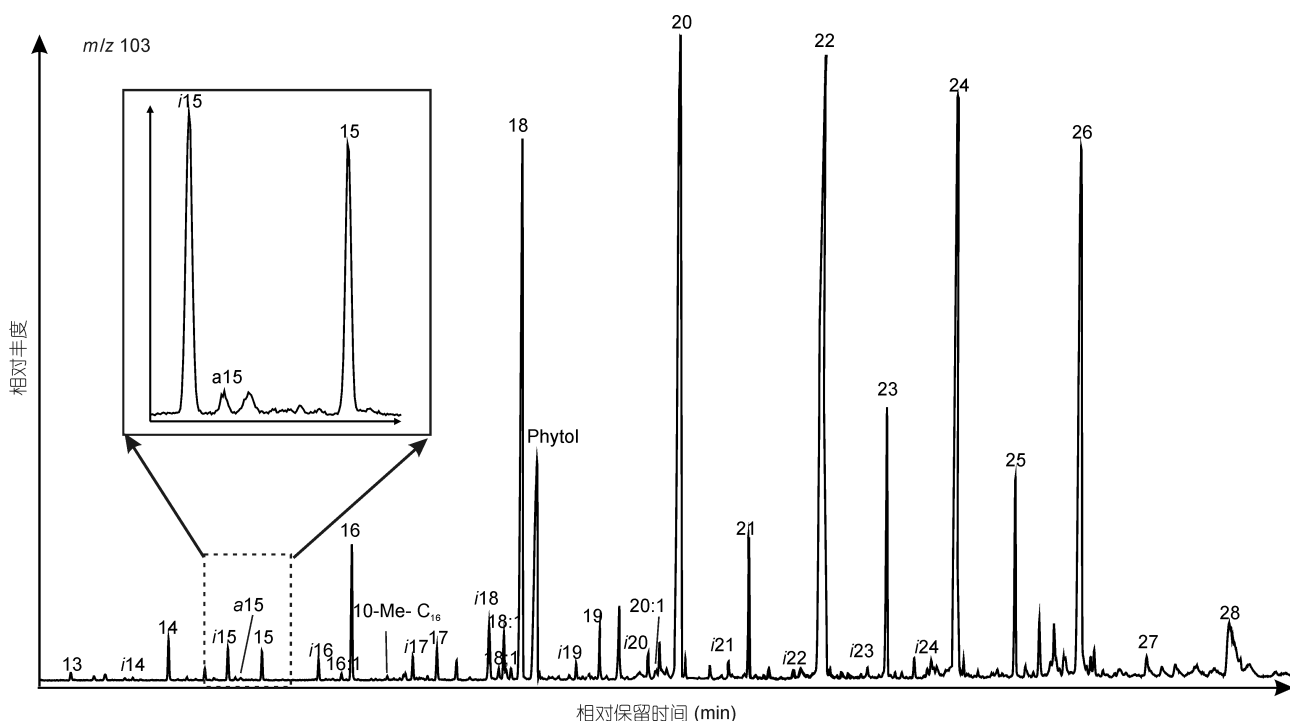


图3 尖峰岭土壤样品(JFL-3)脂肪醇质量色谱图(m/z 103)

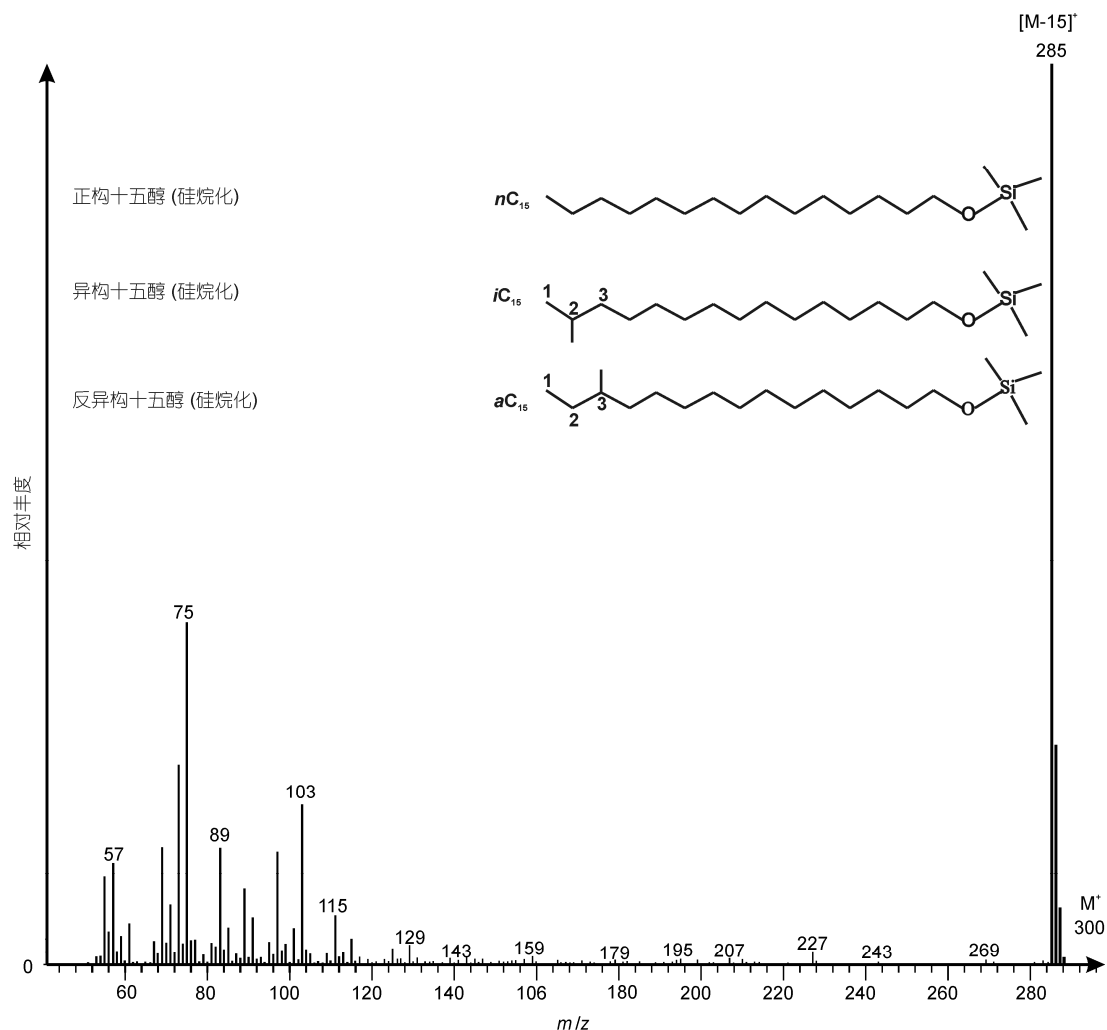


图 4 十五醇(硅烷化)三种异构体结构和相同的质谱图

nC_{22} 脂肪醇为主(Volkman 等, 1999), 水生植物脂肪醇碳数范围为 $C_{20}\sim C_{32}$, 主峰碳以 C_{28} 和 C_{30} 为主(Ficken 等, 2000), 高等植物中脂肪醇一般 C_{24} , C_{26} 和 C_{28} 占主导地位, 碳数分布范围为 $C_{22}\sim C_{32}$ (Eglinton 和 Hamilton, 1967; Zhang 等, 2006). 而异构(*iso*)和反异构(*anteiso*)脂肪醇被认为来源于细菌(Mudge 和 Norris, 1997; Mudge 等, 2008). 支链脂肪醇 $ilaC_{15:0}$ 和 $ilaC_{17:0}$ 在尖峰岭和神农架土壤(Huang 等, 2013)、大九湖泥炭(Huang 等, 2013)和海洋沉积物(Treignier 等, 2006)都被发现, 表明这类之前未被重视的微生物脂类在地质环境体中有着较为广泛的分布. 土壤中支链脂肪醇与海洋甲烷渗漏地区沉积物存在差异(Thiel 等, 1999). 尖峰岭土壤中脂肪醇 $iC_{15:0}$ 的含量明显高于 $aC_{15:0}$, 而甲烷渗漏口中脂肪醇 $aC_{15:0}$ 含量要高于

$iC_{15:0}$, 并且碳同位素极为负偏, 被认为可能来自于参与甲烷代谢的硫酸盐还原菌(Thiel 等, 1999; De Boever 等, 2009). 此外, 在深海冷泉口分离出的嗜盐细菌能够合成大量的不饱和脂肪醇 $C_{16:1}\omega 7c$ (Hua 等, 2007), 也证明不饱和脂肪醇同样可能来自于微生物. 细菌能够产生异构与反异构脂肪醇可以从微生物纯培养实验得到最为直接的证据. 我们通过对土壤中细菌进行琼脂平板划线分离培养, 然后用 LB 培养基获得大量细菌细胞体(蛋白胨 19 g L^{-1} , 酵母提取物 5 g L^{-1} , NaCl 10 g L^{-1} , pH 7). 得到的 9 株细菌中发现 1 株革兰氏阳性菌(细菌编号为 4-1-2)的中性脂皂化后的产物中含有少量的异构脂肪醇, 包括 $iC_{16:0}$, $iC_{17:0}$, $iC_{19:0}$, $iC_{20:0}$, $iC_{21:0}$, $iC_{22:0}$ 和不饱和脂肪醇 $nC_{18:1}$. 可见, 并非所有细菌均能够产生异构脂肪醇. 对中国南海

好氧不产氧光合细菌(革兰氏阴性)*Erythrobacter* sp. (Yang 等, 2009)的脂肪醇组分分析表明, 异构、反异构脂肪醇和不饱和脂肪醇的合成不仅仅局限在革兰氏阳性细菌中, 革兰氏阴性细菌也能够合成丰度并不低于革兰氏阳性细菌的支链和不饱和脂肪醇化合物, 但其含量相对脂肪酸来说仍然很低. 好氧不产氧光合细菌的异构脂肪醇包括 $iC_{15:0}$, $iC_{16:0}$, $iC_{17:0}$, $iC_{18:0}$, $iC_{19:0}$, $iC_{21:0}$, $iC_{22:0}$, $iC_{23:0}$ 和 $iC_{24:0}$ (图 5). 除 $iC_{13:0}$ 和 $iC_{14:0}$ 含量太低处于检测限以下外, 基本涵盖了尖峰岭土壤中异构脂肪醇的碳数范围, 即 $C_{13}\sim C_{26}$. 此外, *Erythrobacter* sp. 单不饱和脂肪醇包括 $nC_{17:1}$, $nC_{18:1}$ 与 $nC_{20:1}$, 这些不饱和脂肪醇在尖峰岭土壤中都广泛存在.

脂肪酸是大多数细菌细胞膜脂主要组成成分之一, 并且脂肪酸一般在细胞膜中与甘油基团结合形成甘油酯. 脂肪醇化合物作为细菌细胞膜脂的可能性较低, 因为以甘油为骨架的磷脂或糖脂很难有脂肪醇结合的位点(即脂肪醇羟基与甘油羟基很难结合). 生物体脂肪醇化合物一般与脂肪酸结合在一起,

以蜡脂(wax ester)形式存在. 植物蜡脂主要用于防止叶表皮水分蒸发、紫外线照射和病虫害侵袭, 同时也是典型的储能物质(Eglinton 和 Hamilton, 1967; 李婧婧等, 2011); 而微生物蜡脂也主要起储存能量作用以保护微生物渡过不利环境, 但其含量相对植物较低(Ishige 等, 2003; Waltermann 等, 2005). 地质环境中的脂肪醇可能存在游离态和结合态. 游离态脂肪醇被抽提出来后经硅烷化可以直接用 GC-MS 检测到, 而结合态脂肪醇一般以蜡脂形式存在. 由于土壤中蜡脂含量较低, 不能通过直接的方式检测土壤中支链脂肪醇是否以蜡脂的形式存在. 皂化前后对比可以验证土壤中支链和不饱和脂肪醇的赋存形式. 我们选取 JFL-3 直接抽提游离态类脂物, 不对极性组分进行皂化, 所得脂肪醇分布如图 6. 很明显, 未皂化样品中长碳链脂肪醇($>C_{22}$)占脂肪醇组分的大部分, 主峰为 nC_{22} 脂肪醇, 而短碳链($<C_{22}$)脂肪醇只出现了 $C_{14}\sim C_{21}$, 并没有出现支链脂肪醇和不饱和脂肪醇. 因此, 大部分微生物来源的短碳链脂肪醇、不饱和脂肪醇和全部支链脂肪醇均是以结合态的蜡脂形式存

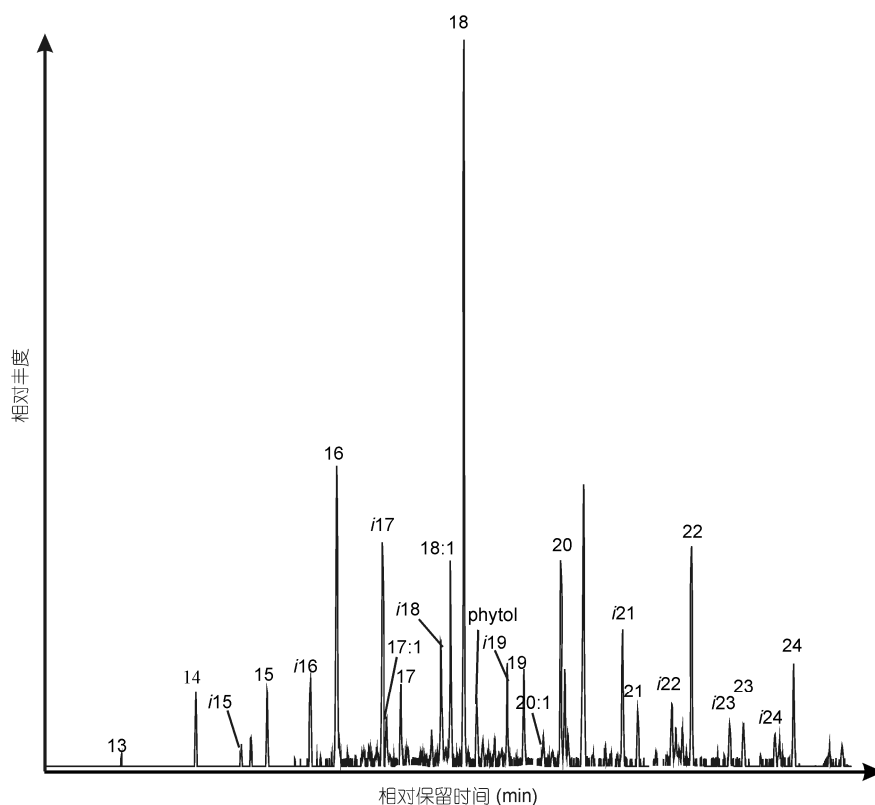


图 5 中国南海好氧不产氧光合细菌脂肪醇(硅烷化)质量色谱图(m/z 103)

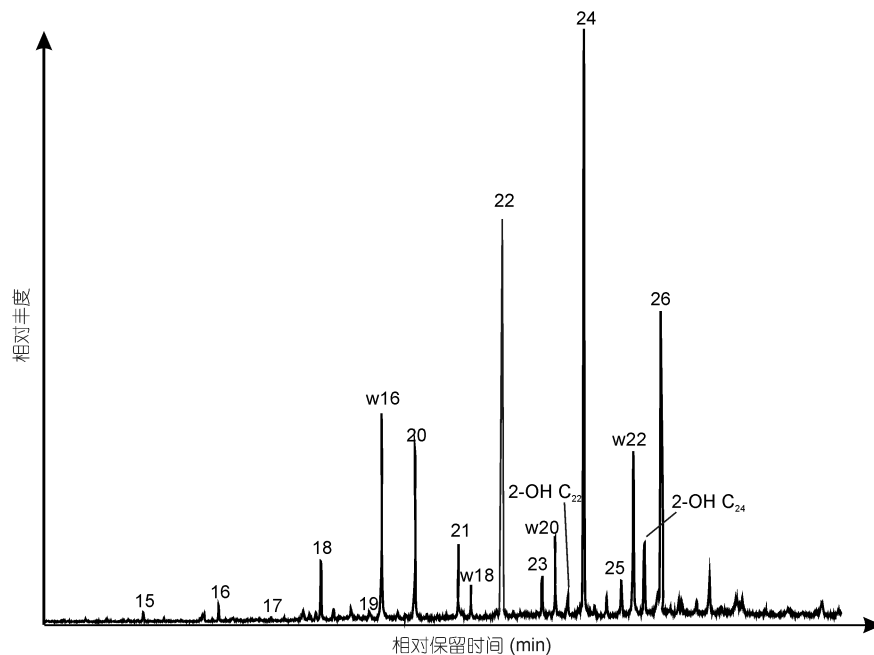


图 6 尖峰岭土壤 JFL-3 中游离态脂肪醇质量色谱图(m/z 103)

ω 16 表示羟基在 ω 位的十六酸, 2-OH C_{22} 等表示碳数为 22, 羟基在 α 位的羟基酸

在于土壤中. 一些低等原生动物和细菌, 如绿眼虫 (Dasgupta 等, 2012) 和绿非硫细菌 (Schouten 等, 2009; van der Meer 等, 2010) 能够合成一系列蜡脂, 组成这些蜡脂的脂肪醇含有 C_{15} ~ C_{17} 多种异构、反异构脂肪醇. 绿非硫细菌绿弯菌门 (Chloroflexi) 是土壤中细菌类群的重要组成部分 (Costello 和 Schmidt, 2006; Janssen, 2006). 因而, 土壤中绿弯菌门可能是贡献土壤中微生物蜡脂和支链脂肪醇的一个重要生物源.

2.4 微生物类脂物对不同海拔温度的响应

2.4.1 脂肪酸对不同海拔温度的响应

土壤中脂肪酸和脂肪醇含量丰富且复杂, 本文主要选取来源于微生物的脂类, 包括短碳链和支链脂肪酸/醇, 通过构建指标建立与不同海拔温度之间的关系. 反异构十五酸、异构十五酸及反异构十五醇、异构十五醇在环境中较其他微生物脂类含量丰富, 且在土壤、湖泊和泥炭等陆地环境中广泛存在, 因而被选定为主要研究对象. 由于采样点海拔高度对应的年平均温度只能通过海拔进行换算, 并没有实测的温度, 我们直接采用海拔作为自变量来评估年平均温度与微生物脂类的关系. 随着海拔增高, 年平均温度逐渐降低, 反异构十五酸/异构十五酸 (aC_{15}/iC_{15})

表现为增加的趋势, 此比值与海拔之间存在显著正相关关系 ($R^2=0.52$, $P<0.01$) (图 7(a)). 这说明土壤中细菌能够改变其细胞膜脂的结构以适应环境温度的变化. 事实上, 微生物的培养实验也证实, 微生物反异构十五酸 (aC_{15}) 与异构十五酸 (iC_{15}) 之间的比值随培养温度的增加而降低, 即在低温下反异构十五酸被合成的更多 (Annous 等, 1997; Zhu 等, 2005). 反异构十五酸在低温下的增加是因为反异构十五酸独特的物理化学性质造成的, 它能够在低温下维持微生物细胞膜的液晶状态, 使其保持较好的流动性. 反异构十五酸具有相对较低的熔点 (25.8°C), 其卵磷脂固液相转变温度 (-13.9°C) 比含异构十五酸 (-7.0°C) 的卵磷脂要低得多 (Suutari 和 Laakso, 1994), 这表明微生物细胞膜脂中反异构脂肪酸在低温下增加能够更好的维持细胞膜液晶状态, 保持其流动性 (Edgcomb 等, 2000). 此外, 反异构脂肪酸拥有比正构脂肪酸和异构脂肪酸更大横截面, 能够分散紧密排列的脂肪酰基链增强细胞膜的流动性 (Willecke 和 Pardee, 1971).

2.4.2 脂肪醇对不同海拔温度的响应

脂肪醇化合物用于古环境重建多使用来自于植物的长碳链正构脂肪醇. 来自植物蜡脂中的长碳链脂肪醇能够记录植被变迁, 其平均碳链长度 ACL 和

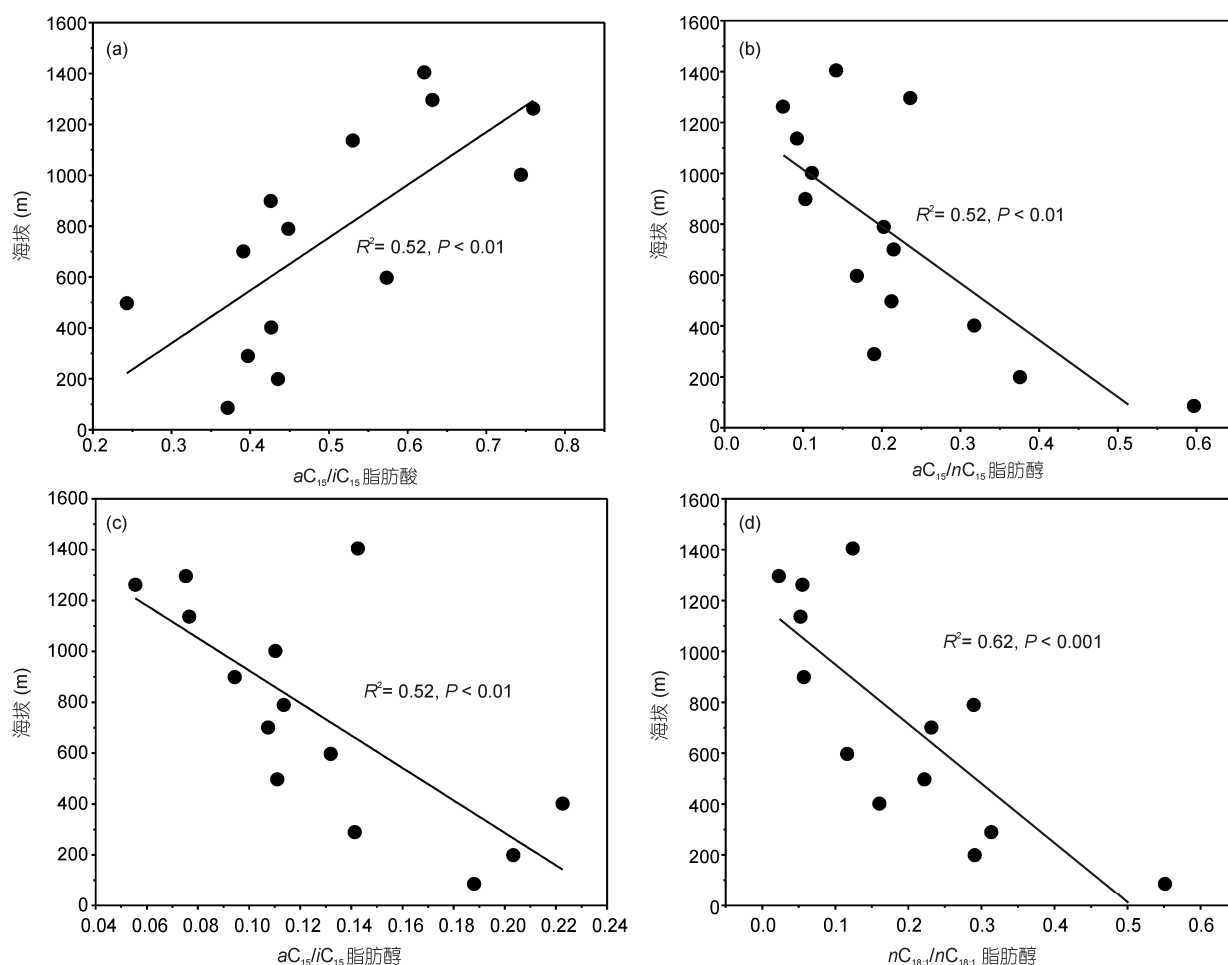


图 7 海拔与 aC_{15}/iC_{15} 脂肪酸(a)、 aC_{15}/nC_{15} 脂肪醇(b)、 aC_{15}/iC_{15} 脂肪醇(c)和 $nC_{18:1}/nC_{18}$ 脂肪醇(d)之间的相关关系
 $P < 0.05$ 表示相关关系显著

碳优势指数 CPI 的变化可以用来指示气候所引起的植物群落变化和微生物降解强弱(Ficken 等, 2000). 短碳链脂肪醇与长碳链脂肪醇之间的比值则可以反映沉积物中有机质降解状况或微生物(或海洋生物)与高等植物相对输入量, 进而恢复相应的气候变化(Xie 等, 2003; Treignier 等, 2006). 尖峰岭长碳链正构脂肪醇($C_{21} \sim C_{31}$)的 $CPI_{21 \sim 31}$ 值范围为 8.6~15.7(表 2), 与海拔(或年平均温度)基本不存在相关关系($R^2=0.02$). 若计算短碳链脂肪醇($C_{14} \sim C_{20}$)和长碳链脂肪醇总体, 即 $C_{14} \sim C_{31}$ 的 $CPI_{14 \sim 31}$ 值, 发现 $CPI_{14 \sim 31}$ 与海拔之间具有显著的正相关关系($R^2=0.68$, $P < 0.001$, 图 8(a)), 即温度越高, $CPI_{14 \sim 31}$ 值越小, 这表明正构脂肪醇整体比长链脂肪醇对环境的敏感性更强. 事实上, 温度的升高能够促进微生物活动, 对脂类进行改造和降解, 使

得土壤中植物叶蜡正构脂肪醇的 CPI 值降低(谢树成等, 2013). 长碳链脂肪醇($C_{22} \sim C_{30}$)的 ACL 值范围为 23.1~25.2(表 2), 表现为与海拔高度显著的负相关关系($R^2=0.65$, $P < 0.001$, 图 8(b)), 即年均温度越高植物倾向于合成链长更长的正构脂肪醇. 尖峰岭植被的垂直分带性被人类砍伐破坏, 后期形成的次生林并没有明显的分带性. 这表明, 尖峰岭植物长链正构脂肪醇 ACL 的变化可能不是记录植被类型的改变, 而主要是对不同海拔造成的温度差异的响应, 这与现代植物叶蜡正构烷烃链长在高温下趋于更长的现象一致, 链长的增加有利于减少植物叶片在高温下水分的蒸发(Dodd 和 Poveda, 2003).

尖峰岭土壤中短碳链脂肪醇种类和含量丰富. 在大量来源于微生物的异构/反异构脂肪醇中, 我们

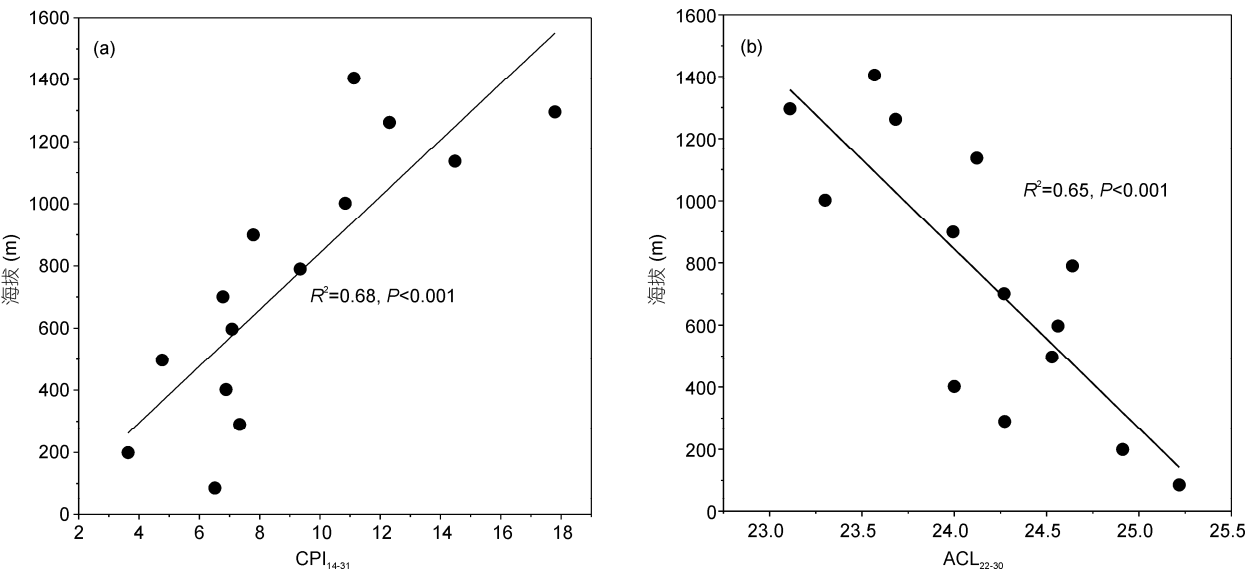


图 8 海拔与正构脂肪醇(C₁₄~C₃₁)碳优势指数 CPI(a)和长链正构脂肪醇(C₂₂~C₃₀)平均碳链长度 ACL(b)之间的相关关系
P<0.05 表示相关关系显著

表 2 尖峰岭不同海拔土壤脂肪酸和脂肪醇各指标^{a)}

样品名	海拔(m)	估算的年均温(°C)	CPI ₁₄₋₃₁ (醇)	ACL ₂₂₋₃₀ (醇)	<i>a</i> C ₁₅ / <i>n</i> C ₁₅ (醇)	<i>a</i> C ₁₅ / <i>i</i> C ₁₅ (醇)	C _{18:1} / <i>n</i> C _{18:0} (醇)	<i>a</i> C ₁₅ / <i>i</i> C ₁₅ (酸)
JFL-1	1405.0	16.6	11.1	23.6	0.14	0.14	0.12	0.62
JFL-2	1296.0	17.2	17.8	23.1	0.24	0.08	0.02	0.63
JFL-3	1262.0	17.4	12.3	23.7	0.07	0.06	0.06	0.76
JFL-4	1137.0	18.2	14.5	24.1	0.09	0.08	0.05	0.53
JFL-5	1002.0	19.0	10.8	23.3	0.11	0.11	—	0.74
JFL-6	899.0	19.6	7.8	24.0	0.10	0.09	0.06	0.43
JFL-7	790.0	20.3	9.3	24.6	0.20	0.11	0.29	0.45
JFL-8	701.0	20.8	6.8	24.3	0.21	0.11	0.23	0.39
JFL-9	597.0	21.4	7.1	24.6	0.17	0.13	0.12	0.57
JFL-10	497.0	22.0	4.8	24.5	0.21	0.11	0.22	0.24
JFL-11	402.0	22.6	6.9	24.0	0.32	0.22	0.16	0.43
JFL-12	290.0	23.3	7.3	24.3	0.19	0.14	0.31	0.40
JFL-13	199.0	23.8	3.6	24.9	0.38	0.20	0.29	0.44
JFL-14	86.0	24.5	6.5	25.2	0.60	0.19	0.55	0.37

a) –为数据不可得

首先验证已经提出的 BNA₁₅ 指标, 即(*a*C₁₅+*i*C₁₅)/*n*C₁₅ 脂肪醇(Huang 等, 2013), 发现这个指标在尖峰岭基本上与海拔或年平均温度不存在相关关系(*R*²=0.00). 这可能是尖峰岭(16.6~24.5℃)与神农架(0.9~12.1℃)不同的温度区间或微生物群落有关. 我们然后选取了在沉积物中分布较为广泛的反异构十五醇(*a*C₁₅), 发现它与正构十五醇(*n*C₁₅)之间的比值*a*C₁₅/*n*C₁₅与海拔(或年平均温度)之间具有较好的负(正)相关关系

(*R*²=0.52, *P*<0.01), 随着海拔增加, *a*C₁₅相对于*n*C₁₅的含量逐渐降低(图 7(b)). JFL-1 和 JFL-2 两个样品由于花岗岩基岩风化不完全, 土壤成分与其他样品存在差异, 这可能造成样品中微生物群落发生改变, 使*a*C₁₅/*n*C₁₅ 比值偏离拟合曲线. 尖峰岭不同海拔降雨量都非常充沛(年均降雨量>2000 mm), 因而降雨可能不是限制微生物生长和改变其细胞膜脂成分的关键要素. 事实上, 目前已知的能控制微生物类脂物组

成和结构发生改变的主要环境因素是温度和土壤 pH(Schouten 等, 2002; Yang 等, 2010). 微生物生存在土壤溶液中, 降雨量大小很难作为一个环境因子影响微生物类脂物组成. 因此, aC_{15}/nC_{15} 脂肪醇比值随海拔的变化可能主要是不同海拔温度差异所造成的. 尖峰岭土壤 pH 在整个海拔断面上有较小的变化. 若将土壤 pH 变化的因素考虑进来, aC_{15}/nC_{15} 比值与海拔、土壤 pH 三者可呈现出很显著的线性关系, 其相关系数 R^2 可达 0.81($P<0.001$)(图 9), 校正公式为 $aC_{15}/nC_{15}=0.137\times pH-0.000127\times H-0.322$ (H 为海拔). 土壤 pH 的引入明显提高了线性相关系数. 某些微生物类脂物结构和组分变化已经证明能够响应土壤 pH 变化. 例如, 表征细菌支链 GDGTs 五元环相对数量的环化指数(CBT)与 pH 有较强的负相关关系(Yang 等, 2010). 与之类似, 尖峰岭土壤中微生物脂肪醇对土壤 pH 的响应可能是通过改变异构脂肪醇的相对量来实现的. 利用 pH, aC_{15}/nC_{15} 比值和海拔(或年平均温度)之间的线性关系, 可以为重建古海拔提供一种新的方法, 同时可能可以作为一种全新的陆地古温度指示计, 运用到第四纪沉积剖面的古温度重建中去. 反异构十五醇和正构十五醇普遍存在于各种地质环境中, 如泥炭(Huang 等, 2013)和土壤等, 这为这种新的古温度计广泛应用提供了良好的前提. 需要指出的是, 由于尖峰岭处于热带地区, 其年平均温度值(16.6~24.5℃)相对较高. 因而, aC_{15}/nC_{15} 比值应用于其他年平均温较低的地区可能需要区域的校正. 此外, aC_{15}/nC_{15} 受温度控制的同时可能会受 pH 的影响, 这可能会将 aC_{15}/nC_{15} 应用限制在 pH 变动较小的环境中, 如泥炭沉积柱等. 事实上, 在土壤和泥炭等沉积环境中, pH 的变动可以通过细菌支链 GDGTs 的环化指数 CBT 进行评估.

反异构脂肪醇响应不同海拔(或年平均温度)变化的方式恰好与反异构脂肪酸相反. 随着年平均温度降低, 反异构十五醇的相对含量降低, 而反异构十五酸的相对含量则不断增加. 在低温环境中, 细菌能够合成更多反异构十五酸等以维持细胞膜的流动性. 显然, 微生物脂肪醇响应不同海拔温度变化的机制不能得到相同的解释. 不仅反异构脂肪醇表现出与反异构脂肪酸相反的特性, 单不饱和十八醇($nC_{18:1}$ 的几种异构体)也表现出明显不同于脂肪酸的特征: 尖峰岭土壤中单不饱和十八醇与饱和十八醇 $nC_{18:1}/nC_{18:0}$ 的比值随海拔增加(年平均温度降低)而逐渐减

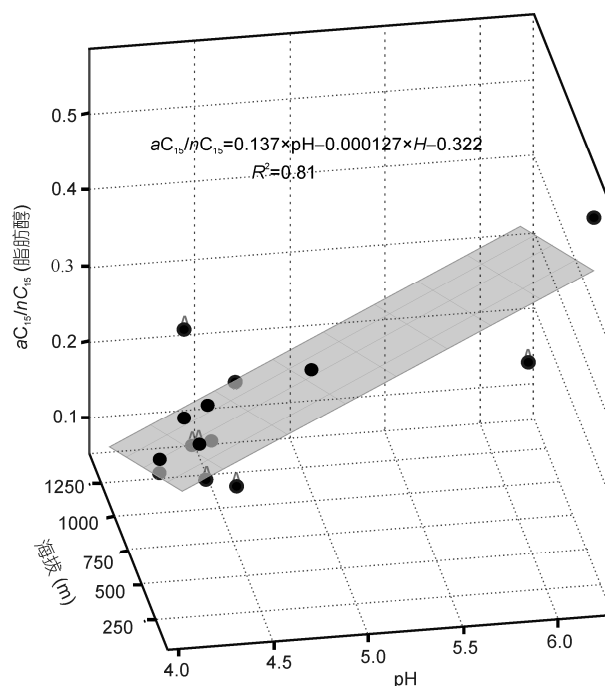


图 9 aC_{15}/nC_{15} (脂肪醇)比值与土壤 pH、海拔之间的线性关系

其中 H 为海拔高度

小(图 7(d)). 一般微生物脂肪酸的不饱和度会随温度降低而逐渐增大(Wada 等, 1987; Suutari 和 Laakso, 1992), 不饱和脂肪酸相对饱和脂肪酸其“折叠”式分子结构减少了分子与分子间的作用力, 因而熔点较低. 不饱和度的增加会降低膜脂的熔点, 使其在较低温度下仍能够保存较好的流动性, 以维持微生物的正常生理代谢. 例如, *Haptophyta* 合成的长链烯酮不饱和度增加也是颗石藻适应环境温度降低的结果(Prahl 和 Wakeham, 1987). 如前所述, 反异构和不饱和脂肪醇只能通过皂化释放出来, 被认为主要来自于微生物, 而正构十五醇和正构十八醇主要来自于游离脂中的植物叶蜡. 海拔引起的温度降低可能直接引起了产异构脂肪醇和不饱和脂肪醇的微生物活动减弱和生物量减少, 表现为含量相对于十五醇和十八醇逐渐降低的趋势. 因此, $nC_{18:1}/nC_{18:0}$ 脂肪醇比值同样为重建古海拔和古温度的变化提供了一个新的指标.

光照量导致的紫外线强弱变化可能会影响植物蜡脂组成(李婧婧等, 2011). 然而, 异构和反异构脂肪醇主要来自于微生物, 微生物生活在土壤中, 而且

所采集的土壤基本被热带雨林茂密的植物所遮盖, 很难受到阳光照射. 所以, 尽管尖峰岭不同海拔光照量呈现一定梯度的变化(表 1), 但可能较难影响到土壤中微生物的生理生态.

3 结论

尖峰岭不同海拔表层土壤中含有丰富的微生物脂肪酸和脂肪醇化合物, 包括异构/反异构脂肪酸、10-甲基-十六酸、异构/反异构脂肪醇、10-甲基-十六醇和单不饱和脂肪醇等. 这些脂肪醇主要是以结合态的形式, 即蜡脂存在于土壤中, 通过皂化才能将它们释放出来. 土壤中低碳数($<C_{22}$)甲基支链型脂肪酸

与甲基支链型支链脂肪醇一一对应, 表明这些支链型脂肪酸和其对应的脂肪醇可能具有共同的微生物来源. 支链脂肪酸和支链脂肪醇都表现出对不同海拔温度明显的响应. 反异构十五酸/异构十五酸(aC_{15}/iC_{15})比值随海拔增加逐渐增大, 即年平均温度的降低使得反异构十五酸比例增加. 与之相反, 反异构十五醇/异构十五醇(aC_{15}/iC_{15})比值和反异构十五醇/正构十五醇(aC_{15}/nC_{15})比值随海拔增加逐渐减小. 此外, 单不饱和十八醇与饱和十八醇 $nC_{18:1}/nC_{18:0}$ 的比值随海拔增加(年平均温度降低)也逐渐减小, 与微生物脂肪酸不饱和度随温度降低而增加的认识相反. 这些微生物脂肪酸和脂肪醇与海拔之间的相关关系, 可能可以为古海拔和泥炭、黄土中古温度重建提供新的思路.

致谢 秦养民在采样中的帮助和陈林对 GC-MS 仪器的维护以及审稿人认真细致的审阅, 在此一并致谢.

参考文献

- 李婧婧, 黄俊华, 谢树成. 2011. 植物蜡质及其与环境的关系. 生态学报, 31: 565–574
- 孙青, 储国强, 刘国祥, 等. 2010. 湖泊体系中长链烯酮研究进展. 地球学报, 31: 485–494
- 谢树成, 黄咸雨, 杨欢, 等. 2013. 示踪全球环境变化的微生物代用指标. 第四纪研究, 33: 1–18
- 熊永强, 吴丰昌, 王铜山, 等. 2009. 滇池湖泊沉积物中甘油二烷基甘油四醚脂的组成特征. 沉积学报, 27: 1191–1198
- 曾庆波, 丁美华. 1985. 海南岛尖峰岭热带植被类型垂直分布与水热状况. 植物生态学与地植物学丛刊, 9: 297–305
- 周浩达, 胡建芳, 明荔莉, 等. 2011. 150 年来若尔盖泥炭沉积支链四醚膜类脂及古环境重建. 科学通报, 56: 1741–1748
- 周璋, 李意德, 林明献, 等. 2009. 海南岛尖峰岭热带山地雨林区 26 年的热量因子变化特征. 生态学杂志, 28: 1006–1012
- Anous B A, Becker L A, Bayles D O, et al. 1997. Critical role of *anteiso*- $C_{15:0}$ fatty acid in the growth of *Listeria monocytogenes* at low temperatures. Appl Environ Microbiol, 63: 3887–3894
- Costello E K, Schmidt S K. 2006. Microbial diversity in alpine tundra wet meadow soil: Novel Chloroflexi from a cold, water-saturated environment. Environ Microbiol, 8: 1471–1486
- Dasgupta S, Fang J, Brake S S, et al. 2012. Biosynthesis of sterols and wax esters by *Euglena* of acid mine drainage biofilms: Implications for eukaryotic evolution and the early Earth. Chem Geol, 306–307: 139–145
- De Boever E, Birgel D, Thiel V, et al. 2009. The formation of giant tubular concretions triggered by anaerobic oxidation of methane as revealed by archaeal molecular fossils(Lower Eocene, Varna, Bulgaria). Paleogeogr Paleoclimatol Paleoecon, 280: 23–36
- Dodd R S, Poveda M M. 2003. Environmental gradients and population divergence contribute to variation in cuticular wax composition in *Juniperus communis*. Biochem Syst Ecol, 31: 1257–1270
- Edgcomb M R, Sirimanne S, Wilkinson B J, et al. 2000. Electron paramagnetic resonance studies of the membrane fluidity of the foodborne pathogenic psychrotroph *Listeria monocytogenes*. BBA-Biomembranes, 1463: 31–42
- Eglinton G, Hamilton R J. 1967. Leaf epicuticular waxes. Science, 156: 1322–1335
- Ficken K J, Li B, Swain D L, et al. 2000. An *n*-alkane proxy for the sedimentary input of submerged/floating freshwater aquatic macrophytes. Org Geochem, 31: 745–749
- Fierer N, Jackson R B. 2006. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. Proc Natl Acad Sci USA, 103: 626–631
- Frostegård A, Bååth E. 1996. The use of phospholipid fatty acid analysis to estimate bacterial and fungal biomass in soil. Biol Fert Soils, 22: 59–65
- Gao L, Nie J, Clemens S, et al. 2012. The importance of solar insolation on the temperature variations for the past 110 kyr on the Chinese Loess Plateau. Paleogeogr Paleoclimatol Paleoecon, 317–318: 128–133
- Ghosh P, Garzione C N, Eiler J M. 2006. Rapid uplift of the Altiplano revealed through ^{13}C - ^{18}O bonds in paleosol carbonates. Science, 311: 511–515

- Hren M T, Pagani M, Erwin D M, et al. 2010. Biomarker reconstruction of the early Eocene paleotopography and paleoclimate of the northern Sierra Nevada. *Geology*, 38: 7–10
- Hua N P, Kanekiyo A, Fujikura K, et al. 2007. *Halobacillus profundus* sp. nov. and *Halobacillus kuroshimensis* sp. nov., moderately halophilic bacteria isolated from a deep-sea methane cold seep. *Int J Syst Evol Micr*, 7: 1243–1249
- Huang X, Meyers P A, Jia C, et al. 2013. Paleotemperature variability in central China during the last 13 ka recorded by a novel microbial lipid proxy in the Dajiuhu peat deposit. *Holocene*, 23: 1123–1129
- Ishige T, Tani A, Sakai Y, et al. 2003. Wax ester production by bacteria. *Curr Opin Microbiol*, 6: 244–250
- Janssen P H. 2006. Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. *App Environ Microbiol*, 72: 1719–1728
- Kaneda T. 1991. Iso- and anteiso-fatty acids in bacteria: Biosynthesis, function, and taxonomic significance. *Microbiol Rev*, 55: 288–302
- Kim J H, Schouten S, Hopmans E C, et al. 2008. Global sediment core-top calibration of the TEX₈₆ paleothermometer in the ocean. *Geochim Cosmochim Acta*, 72: 1154–1173
- Laubert C L, Hamady M, Knight R, et al. 2009. Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale. *Appl Environ Microbiol*, 75: 5111–5120
- Li D, Zhao M, Tian J, et al. 2013. Comparison and implication of TEX₈₆ and UK-37' temperature records over the last 356 kyr of ODP Site 1147 from the northern South China Sea. *Paleogeogr Paleoclimatol Paleoecol*, 376: 213–223
- Liu W, Wang H, Zhang C L, et al. Distribution of glycerol dialkyl glycerol tetraether lipids along an altitudinal transect on Mt. Xiangpi, NE Qinghai-Tibetan Plateau, China. *Org Geochem*, 2013, 57: 76–83
- Liu Z H, Pagani M, Zinniker D, et al. 2009. Global cooling during the Eocene-Oligocene climate transition. *Science*, 323: 1187–1190
- Mudge S M, Norris C E. 1997. Lipid biomarkers in the Conwy Estuary (North Wales, U.K.): A comparison between fatty alcohols and sterols. *Mar Chem*, 57: 61–84
- Mudge S M, Belanger S E, Nielsen A M. 2008. Fatty alcohols: Anthropogenic and natural occurrence in the environment. Cambridge: UK Royal Soc Chem
- Müller P J, Kirst G, Ruhland G, et al. 1998. Calibration of the alkenone paleotemperature index UK-37' based on core-tops from the eastern South Atlantic and the global ocean (60°N–60°S). *Geochim Cosmochim Acta*, 62: 1757–1772
- Pearson A, Ingalls A E. 2013. Assessing the use of archaeal lipids as marine environmental proxies. *Annu Rev Earth Planet Sci*, 41: 359–384
- Peterse F, van der Meer M T J, Schouten S, et al. 2009. Assessment of soil *n*-alkane δD and branched tetraether membrane lipid distributions as tools for paleoelevation reconstruction. *Biogeosciences*, 6: 2799–2807
- Peterse F, Prins M A, Beets C J, et al. 2011. Decoupled warming and monsoon precipitation in East Asia over the last deglaciation. *Earth Planet Sci Lett*, 301: 256–264
- Peterse F, van der Meer J, Schouten S, et al. 2012. Revised calibration of the MBT–CBT paleotemperature proxy based on branched tetraether membrane lipids in surface soils. *Geochim Cosmochim Acta*, 96: 215–229
- Prahl F G, Wakeham S G. 1987. Calibration of unsaturation patterns in long-chain ketone compositions for paleotemperature assessment. *Nature*, 330: 367–369
- Rampen S W, Willmott V, Kim J H, et al. 2012. Long chain 1, 13- and 1, 15-diols as a potential proxy for palaeotemperature reconstruction. *Geochim Cosmochim Acta*, 84: 204–216
- Schouten S, Hopmans E C, Schefuss E, et al. 2002. Distributional variations in marine crenarchaeotal membrane lipids: A new tool for reconstructing ancient sea water temperatures? *Earth Planet Sci Lett*, 204: 265–274
- Schouten S, Klimiuk A M, van der Meer M T J, et al. 2009. Occurrence and carbon metabolism of green non sulfur-like bacteria in Californian and Nevada Hot Spring microbial mats as revealed by wax ester lipid analysis. *Geomicrobiol J*, 26: 179–188
- Sinninghe Damsté J S, Ossebaer J, Schouten S, et al. 2008. Altitudinal shifts in the branched tetraether lipid distribution in soil from Mt. Kilimanjaro (Tanzania): Implications for the MBT/CBT continental palaeothermometer. *Org Geochem*, 39: 1072–1076
- Sun Q, Chu G, Liu M, et al. 2011. Distributions and temperature dependence of branched glycerol dialkyl glycerol tetraethers in recent lacustrine sediments from China and Nepal. *J Geophys Res*, 116: G01008, doi: 10.1029/2010JG001365
- Suutari M, Laakso S. 1992. Unsaturated and branched-chain fatty-acids in temperature adaptation of *Bacillus subtilis* and *Bacillus megaterium*. *BBA-Lipids Lipid Metab*, 1126: 119–124
- Suutari M, Laakso S. 1994. Microbial fatty acids and thermal adaptation. *Crit Rev Microbiol*, 20: 285–328
- Thiel V, Peckmann J, Seifert R, et al. 1999. Highly isotopically depleted isoprenoids: Molecular markers for ancient methane venting. *Geochim Cosmochim Acta*, 63: 3959–3966

- Tierney J E, Russell J M, Eggermont H, et al. 2010. Environmental controls on branched tetraether lipid distributions in tropical East African lake sediments. *Geochim Cosmochim Acta*, 74: 4902–4918
- Treignier C, Derenne S, Saliot A. 2006. Terrestrial and marine *n*-alcohol inputs and degradation processes relating to a sudden turbidity current in the Zaire canyon. *Org Geochem*, 37: 1170–1184
- van der Meer M T J, Klatt C G, Wood J, et al. 2010. Cultivation and genomic, nutritional and lipid biomarker characterization of *Roseiflexus* strains closely related to predominant *in situ* populations inhabiting Yellowstone hot spring microbial mats. *J Bacteriol*, 192: 3033–3042
- Volkman J K, Barrett S M, Blackburn S I. 1999. Eustigmatophyte microalgae are potential sources of C₂₉ sterols, C₂₂–C₂₈ *n*-alcohols and C₂₈–C₃₂ *n*-alkyl diols in freshwater environments. *Org Geochem*, 30: 307–318
- Wada M, Fukunaga N, Sasaki S. 1987. Effect of growth temperature on phospholipid and fatty-acid compositions in a psychrotrophic bacterium, *Pseudomonas* sp. Strain E-3. *Plant Cell Physiol*, 28: 1209–1217
- Waltermann M, Hinz A, Robenek H, et al. 2005. Mechanism of lipid-body formation in prokaryotes: How bacteria fatten up. *Mol Microbiol*, 55: 750–763
- Willecke K, Pardee A B. 1971. Fatty acid-requiring mutant of *Bacillus subtilis* defective in branched chain α -keto acid dehydrogenase. *J Biol Chem*, 246: 5264–5272
- Weijers J W H, Schouten S, van den Donker J C, et al. 2007. Environmental controls on bacterial tetraether membrane lipid distribution in soils. *Geochim Cosmochim Acta*, 71: 703–713
- Xie S C, Chen F H, Wang Z Y, et al. 2003. Lipid distributions in loess-paleosol sequences from northwest China. *Org Geochem*, 34: 1071–1079
- Yang H, Ma X, Li Q, et al. 2009. Distributions of phospholipid and glycolipid fatty acids in two strains of different functional *Erythrobacter* sp. isolated from South China Sea. *Front Earth Sci*, 3: 91–99
- Yang H, Ding W, He G, et al. 2010. Archaeal and bacterial tetraether membrane lipids in soils of varied altitudes in Mt. Jianfengling in South China. *J Earth Sci*, 21: 277–280
- Zelles L. 1999. Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterisation of microbial communities in soil: A review. *Biol Fert Soils*, 29: 111–129
- Zhang Z, Zhao M, Eglinton G, et al. 2006. Leaf wax lipids as paleovegetational and paleoenvironmental proxies for the Chinese Loess Plateau over the last 170 kyr. *Quaternary Sci Rev*, 25: 575–594
- Zhu K, Bayles D O, Xiong A M, et al. 2005. Precursor and temperature modulation of fatty acid composition and growth of *Listeria monocytogenes* cold-sensitive mutants with transposon-interrupted branched-chain α -keto acid dehydrogenase. *Microbiology-SGM*, 151: 615–623