

古菌细胞膜脂在生物地质学中的应用

刘梅^{1,2} 帅燕华^{2*} 梁汉东¹ 徐晨光³ 宋娜娜²

(1. 中国矿业大学煤炭资源与安全开采国家重点实验室 北京 100083)

(2. 中国石油勘探开发研究院石油地质实验研究中心 北京 100083)

(3. 华北水利水电学院资源与环境学院 河南 郑州 450011)

摘要: 古菌是区别于真核生物和原核生物的第 3 种生命形式, 对于揭示全球元素循环、指示地质环境等意义重大, 是目前生物地球化学研究的热点之一, 本文综述了近几十年来, 古菌细胞膜脂应用于生物地质学等方面的研究进展, 并对古菌该研究领域尚待加强的方面进行了评述和展望。

关键词: 古菌, 磷脂脂肪酸(PLFA), 丙三醇二烷基甘油酯四醚(GDGTs), 地质环境

Application of Archaea Membrane Lipids in Biological Geology

LIU Mei^{1,2} SHUAI Yan-Hua^{2*} LIANG Han-Dong¹ XU Chen-Guang³ SONG Na-Na²

(1. State Key Laboratory of Coal Resources and Safe Mining, China University of Mining and Technology, Beijing 100083, China)

(2. Petroleum Geology Research and Laboratory Center of Research Institute of Petroleum Exploration and Development, Beijing 100083, China)

(3. North China University of Water Resources and Electric Power, Zhengzhou, Henan 450011, China)

Abstract: Archaea, as the third life form distinguished from eukaryotes and prokaryotes, plays an important role in indicating geological environment and revealing the global elements cycle. It has become one of the most important topics in the field of biogeochemical presently. The paper reviewed the application of the archaea membrane in geological research, including the deficiency and prospect of the so far studies in the area.

Keywords: Archaea, Phospholipid fatty acid (PLFA), Glycerol dialkyl glycerol tetraethers (GDGTs), Geological environment

自 1977 年 Carl Woese 等通过 16S rRNA 发现并提出古细菌概念以来^[1], 短短几十年间, 古菌领域的相关研究得到了迅猛发展, 取得了丰硕成果。古菌是一种特殊的生命形式, 与真核生物、细菌并称为第 3 种自然界生物种类^[2]。古菌与真核生物、细菌有着本质区别, 在细胞大小、形状、结构及基因

组结构方面与细菌相似, 但在 DNA 复制、转录、翻译等方面, 却具有真核生物特征^[3]。近几十年来, 关于生命的起源一直交织着 3 种观点: 细菌^[4]、真菌^[5]和古菌, 其中来源于古菌的观点为人类广泛接受。地球早期环境缺氧、含有大量氨气和甲烷, 原始海洋也可能非常热, 这些条件与古菌生存环境非常类

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 40603015, 40873031); 中国石油项目(No. 2008A-0608, 07-01-C-01-07);
国家科技重大专项项目(No. 2008ZX05)

* 通讯作者: ✉ yhshuai@petrochina.com.cn

收稿日期: 2009-10-08; 接受日期: 2009-12-30

似;另外,同一有机体同种异形基因的变异分析表明,古菌为进化极其缓慢的物种,接近于进化树根部,因此生命很可能起源于古菌域,特别是泉古菌门和广古菌门^[6],或者是纳古菌门^[7]。

古菌在生物圈层中占据着很高的比例。据 Karner 等测定和估算,仅全球大洋中古菌细胞数达 1.3×10^{28} ^[8], 占总生物量的 26.4%–37.7%。古菌分布极为广泛,除了存在于高压热溢口、热泉、盐碱湖等高温、极酸、高盐的极端环境,在湖泊、大洋、土壤等普通环境中也发现有大量古菌的存在。

此外,大多数已培养的古菌具有嗜极端环境的特性,这为我们研究地外生命提供了崭新的视角和可能的手段。既然地球上的生命禁区(缺氧、贫营养等特征)可以存在种类繁多的古菌生命,则地外星球也有生命存在的可能。已有报道称在陵兰岛地下冰芯中发现了产甲烷菌^[9],预示了与该环境相似的火星上,可能也存在产甲烷菌等生物。同时古菌如产甲烷菌等为解决当前日益恶化的环境、能源问题提供了可能的解决办法。

古菌作为特定的地质微生物标志物,对于指示深部生物圈的地球化学变化和地质环境变迁具有重要意义,古菌特征标志物在某一地质体内的出现和分布往往跟某一类菌有关,这意味着古菌特征标志物在某种环境下具有专属性和特征性。根据古菌特征标志物可以确定环境中古菌存在与否、类型及群落组成^[10]。本文总结了近年来古菌膜脂指示地质环境方面研究取得的新成果和新进展,指出该研究领域存在的一些不足,并进行了展望。

1 古菌细胞膜膜脂

单层结构的古菌细胞膜是定性或定量研究古菌的重要依据。作为细胞膜骨架的脂类分子,是支持细胞膜隔离保护功能的主要构造。它是由一条长的碳链分子组成,侧链多不含活性官能团,以醚键与甘油酸分子相连,具有十分坚固的稳定结构,不易降解,可以抵抗非常恶劣的外界环境。

1.1 特定生物标志物

对古菌膜脂的研究,主要是对其特定生物标志物的分析。区别于真核生物和原核生物的特定生物标志物[类固醇(Steroid)和藿烷类化合物(Hopanoid)]^[11],古菌的特定生物标志物是含有异戊

二烯侧链的醚脂^[12](如Phytanyl I 和Biphytanyl II)以及PME (2,6,10,15,19-Pentamethylcosenes III)^[10]等。其最具有代表性的生物化学标志物是其所具有的核心膜脂、甘油二醚、甘油四醚类物质IV(图1)^[13]。

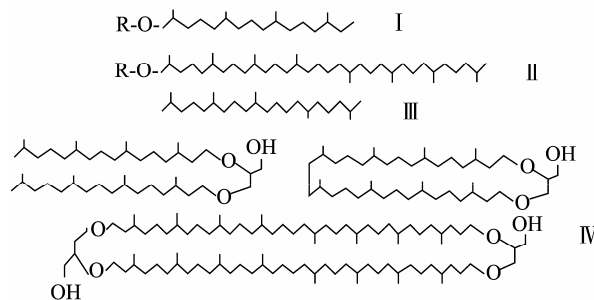


图1 古菌特征生物化学标志物结构

Fig. 1 Structure of typical biochemical marker of archaea

1.2 分析方法

古菌膜脂的分析步骤如下:使用振荡^[14]、超声^[15]、索式抽提^[16]、快速溶剂萃取^[17]等前处理方法。用 P-buffer:氯仿:甲醇=0.8:1:2(V/V/V)提取,提取后,静置分层,取下层氯仿层用氮气吹干。重新溶解后过硅胶柱,分别用氯仿、丙酮、甲醇洗脱出中性组分、糖脂组分和磷脂组分。分别用氮气吹干保存。将中性脂部分用 5%的未活化硅胶进一步分离得到醇组分。醇组分可用 N,O-双三甲基硅基三氟乙酰吡啶(Bistrimethyl silyl trifluoroacetamide-pyridine, BSTFA-pyridine)衍生化,取提取液 0.1 mL 于衍生化试管中,氮气吹干溶剂后加入 BSTFA 和二甲基甲酰胺(DMF)的混合溶液(1:1,V/V) 0.1 mL,在 75°C 水浴加热 30 min,再加入 0.5 mL 丙酮;极性磷脂部分用 0.5 mol/L 的 KOH 甲醇溶液皂化,其脂肪酸组分可用正己烷在 pH < 2 的条件下萃取出来,酸组分用三氟化硼甲醇(BF₃-methanol)甲酯化。中性组分和极性组分所得产物,均用气相色谱(GC)、气相色谱-质谱联用仪(GC-MS)和同位素质谱仪(Irm GC-MS)分析。

糖脂部分的残留物用体积比为 99:1 的正己烷丙酮溶液在超声 10 min 条件下溶解。将所得的混悬液离心,转速为 2500 r/min,上清液用 4 mm 直径 0.45 μm 的 Teflon 微孔滤头过滤后装瓶用高效液相色谱-质谱联用仪(HPLC-MS)方法分析。

同时,将适量的糖脂部分溶液用 57% (重量浓度)的 HI 水溶液回流 4 h 来清除脂键。所生成的烷基碘化物用 LiAlH₄ 在四氢呋喃溶液中还原为烃类化合

物。将产物用 GC、GC-MS 和 IrmGC-MS 分析^[18]。

1.3 对地质环境的指示

糖脂组分含有古菌的核心膜脂, 如甘油二醚、甘油四醚类物质, 是其生存于各种极端环境的本质生理特征, 利用该组分可以获得古菌数量^[19]、群落结构^[20]等信息。目前, 人类对四醚类物质中的 GDGTs (Glycerol dialkyl glycerol tetraethers, 图2) 研究较多, 最近几年被用于古气候研究中, 荷兰科学家 Schouten 等建立了海洋中古菌膜脂的组成与表面温度的关系, 提出了 TEX₈₆ (The tetraether index of tetraether consisting of 86 carbon atoms) 温度计(公式 1)^[21]。这个模型提出后, 后人进行了大量相关性验证^[22]。Courtney Turich 指出, TEX₈₆ 脂类不仅反映温度的变化, 同样指示古菌生态环境、营养物浓度等海洋环境变化情况^[23]。大量培养实验^[24]也证实, 温度是影响 GDGTs 的成分的主导因素, 而盐度、营养物浓度对其影响不大。另外, 这 pH 值也有较强作用效果, 但海洋中 pH 值变化较小, 影响不大^[25]。目前 TEX₈₆ 温标主要应用于白垩纪海洋缺氧事件^[26]、古新世-始新世热事件^[27]以及末次冰期研究^[28]。随着该温度计在古海洋温度研究中的应用, 近年来, 人们对其在湖泊中应用的可行性进行了分析^[29]。Powers 等分析了 9 个湖的 TEX₈₆ 指数, 发现其与湖泊的历年平均表面温度线性相关; 但是最近通过对欧洲 50 个湖泊的研究发现该模型在湖泊中的应用并没有以前想象的这么简单, 所测得高含量的古菌 GDGTs 可能来自于岸上的土壤^[30], TEX₈₆ 仅适用于成熟度较低的沉积物^[31], 不适用于较冷水体, 且其与水体深度及季节变化之间的关系还不甚明了。这些都需要进一步的深入研究。

$$T(^{\circ}\text{C}) = \frac{\text{TEX}_{86} - 0.028}{0.015} (R^2 = 0.92)$$

$$\text{TEX}_{86} = \frac{\textcircled{3} + \textcircled{4} + \textcircled{6}}{\textcircled{2} + \textcircled{3} + \textcircled{4} + \textcircled{6}} \quad (1)$$

式中序号与图2中的各物质相对应^[21], TEX₈₆ 表征沉积物中不同种类的二醚 GDGTs 的相对丰度。

对糖脂组分醚类的分析还可以区分活的和死的古菌, 在古菌活体内, 绝大多数醚脂含有极性头组, 如磷酸盐、糖基或者两者都有并且被称为完整的极性脂类 (IPLs)^[32]。通过与细菌的酰基醚脂类比, 细菌的极性酰基醚脂在细胞死后会通过酶的水解作用失

掉极性头组^[33], 极性醚脂的存在可以表明活体古菌的存在而不是化石古菌^[34-35]。另一方面, 作为完整极性醚脂水解产物的中性醚脂, 则被认为是死的古菌的生物标志物。不过, 人们至今还没有将完整的极性醚脂和中性醚脂清楚分开。

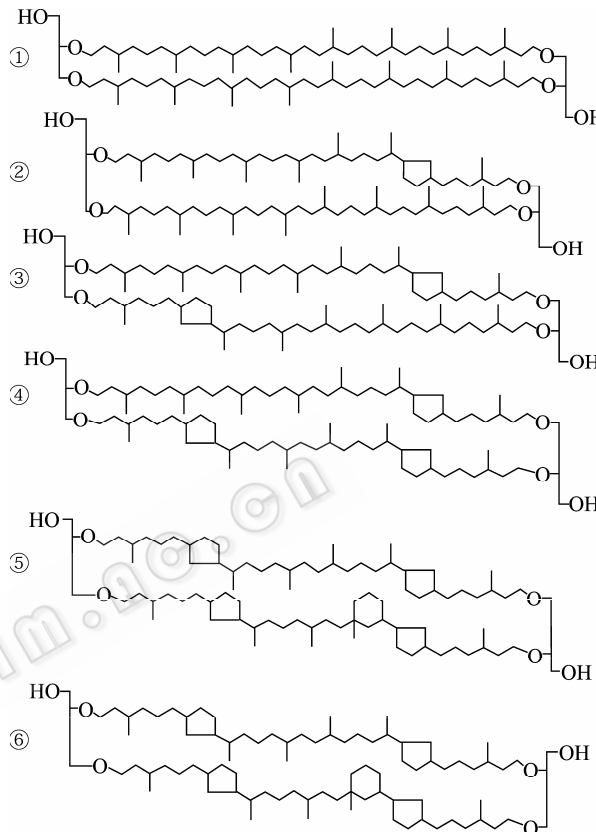


图2 GDGTs 结构式
Fig. 2 The structures of the GDGTs

极性组分中的磷脂作为生物膜的重要组成部分, 为研究深部生物圈微生物的种类组成提供了一种新奇而有用的工具。磷脂只存在于所有活体细胞膜中, 其含量在一定程度上反映细胞功能及生存环境信息。对总磷脂脂肪酸的分析可以反映微生物的生理特性随营养状况改变而发生的变化, 从而获取控制古菌分布的各影响因子, 以及脂类结构与地质环境特点的关系。饱和脂肪酸和不饱和脂肪酸的比值, 可以反映环境的变化, 干燥的环境可以使饱和脂肪酸和不饱和脂肪酸的比例增加。带有脂肪酰基侧链的磷脂, 可以随着压力、温度和营养状况不同而改变^[36-37]。在极端高压环境中, 磷脂的侧链中含有较高比例的不饱和脂肪酸甚至会出现多聚不饱和脂肪酸 (PUFAs)。例如, 在一些嗜压古菌的 C_{20:5} 和 C_{22:6}^[38-39]。另外, 这种适应过程通常与磷脂酰甘油

(PG)头基相关^[36-40]。这些结构的变化被证实可以在高压环境中保持胞膜流动性^[41-42]。

无论是磷脂还是糖脂组分的分析, C₂₀以上长链无环类异戊二烯系列化合物, 一般认为来源于古菌^[43]。某些种类的古菌, 其中包括嗜盐菌、嗜热嗜酸菌和产甲烷菌, 都含有饱和的和不饱和的无环类异戊二烯烃类, 其链长范围从C₁₄至C₃₀^[44-45]。C₂₅无环类异戊二烯烷烃, 及与其同时存在的C₃₀无环类异戊二烯烷烃, 已被用作海相沉积中甲烷古菌的特征标志化合物^[46]。Noble等对印度尼西亚生物气源岩的研究中, 曾利用C₂₅和C₃₀无环类异戊二烯烷烃在气源岩中的绝对含量, 判断甲烷菌的活动强度及相应的生物气生成强度^[47], 头-头连接的不规则类异戊二烯烃类是沉积物中古菌输入的特殊标志化合物^[48]; Petrov等在原油中发现了C₂₁至C₃₉的头-头连接的不规则类异戊二烯烃类, 认为来源于古菌细胞壁的一类脂类^[49]; Stefanova等在煤岩中发现了C₃₈-C₄₀的长链头-头连接的不规则类异戊二烯类, 认为是甲烷菌的标志化合物^[50]。

在古菌的同位素分析方面, (1) 古菌脂类的稳定同位素研究碳、氢的来源及流向, 揭示古菌在全球元素循环中的作用; (2) 可以预测古菌的活动, 获取古菌生物量的数量、空间分布、主要种类及新陈代谢类型等特征^[51-53]。如, 利用脂类中 $\delta^{13}\text{C}$ 值来判断产甲烷菌的存在^[54-55]。对古菌膜脂中较低 $\delta^{13}\text{C}$ 值可以指示甲烷的富存及甲烷厌氧氧化作用的存在^[56-57]; 通过分析古菌的碳同位素, 来判断古菌对于大气环境中CO₂含量的影响^[58]。(3) 应用¹⁴C等放射性同位素研究来判断脂膜降解的速率。如Gesine Mollenhauer等根据细胞膜脂中放射性同位素, 对比得出在运输等有氧存在的情况下GDGTs比膜结构中的不饱和烃更容易降解^[59]。古菌的同位素分析所获得的信息, 同样是揭示地质环境的宝贵信息。

2 问题和展望

通过近几十年的发展, 古菌对地质指示意义的研究取得了令人瞩目的成就, 研究方法和研究成果不断涌现, 奠定了古菌膜脂应用于指示地质环境的研究基础, 在特定生物标志物方面指导了古菌膜脂全新的研究方向。综合上述研究进展可以得知, 古菌膜脂的研究尚存有一些问题:

(1) 最近的研究表明, 细菌也可具有醚键的结构^[60]。虽然醚键作为一种常规手段一直在被用于判断古菌是否存在的依据, 但很显然这并不是绝对的准则, 需要人们进行深入的研究。这有待于分子生物技术的进步和DNA序列数据库的完善, 从而便于更好地对各种微生物进行区分。

(2) 对古菌膜脂的研究较多, 研究方法也发展了很多种类, 对样品的处理程序也各不相同, 如何对已有的方法进行优化分析, 对比总结出最优分析方法, 并制定相关标准, 将使膜脂在指示地质环境方面的应用更有意义。为相关研究成果提供一个可以量化比较的平台, 从而促进本研究方向更快更好的发展。

参考文献

- [1] Woese CR, Fox GE. Phylogenetic Structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Science USA*, 1977(74): 5088-5090.
- [2] Olsen GJ, Woese CR, Overbeek R. The winds of (evolutionary) change: breathing new life into microbiology. *Journal of Bacteriology*, 1994, **176**(1): 1-6.
- [3] Hu Kai, Wu Qingshu. The basic outline of the evolution of single cell life-form. *Hereditas*, 2002, **24**(1): 104-110.
- [4] Cavalier-Smith T. The neomuran origin of archaeobacteria, the negibacterial root of the universal tree and bacterial mega-classification. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2002(52): 7-76.
- [5] Glansdorff N. About the last common ancestor, the universal life-tree and lateral gene transfer: a reappraisal. *Mol Microbiol*, 2000, **38**(2): 177-185.
- [6] Hong Xue, KaLok Tong, Christian Marck, et al. Transfer RNA paralogs: evidence for genetic code-amino acid biosynthesis coevolution and an archaeal root of life. *Gene*, 2003, **310**(22): 59-66.
- [7] Massimo Di Giulio. The tree of life might be rooted in the branch leading to Nanoarchaeota. *Gene*, 2007(401): 108-113.
- [8] Markus B Karner, Edward F DeLong, David M Karl. Archaeal dominance in the mesopelagic zone of the Pacific Ocean. *Nature*, 2001(409): 507-510.
- [9] Tung HC, Bramall NE, Price PB. Microbial origin of excess methane in glacial ice and implications for life on Mars. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005(102): 18292-18296.
- [10] Wakehama SG, Hopmans EC, Schoutenb S, et al. Archaeal lipids and anaerobic oxidation of methane in euxinic water columns: a comparative study of the Black Sea and Cariaco Basin. *Chemical Geology*, 2004(205):

- 427–442.
- [11] Markus BK, Edward FD, David MK. Archaeal dominance in the mesopelagic zone of the Pacific Ocean. *Nature*, 2001(409): 507–510.
- [12] Tung HC, Bramall NE, Price PB. Microbial origin of excess methane in glacial ice and implications for life on Mars. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005(102): 18292–18296.
- [13] Brassell SC, Wardroper AMK, Thomson ID, *et al.* Specific acyclic isoprenoids as biological markers of methanogenic bacteria in marine sediments. *Nature*, 1981(290): 693–696.
- [14] Kohnen MEL, Schouten S, Sinninghe Damste JS, *et al.* Recognition of palaeobiochemicals by a combined molecular sulfur and isotope geochemical approach. *Science*, 1992(256): 358–362.
- [15] Stefan S, Marc JEC, Van DM. 2,6,10,15,19-Pentamethylcosenes in *Methanobolus bombayensis*, a marine methanogenic archaeon, and in *Methanosarcina mazei*. *Organic Geochemistry*, 1997(26): 409–414.
- [16] Tadashi Eguchi, Yuji Nishimura, Katsumi Kakinuma. Importance of the isopropylidene terminal of geranyl group for the formation of tetraether lipid in methanogenic archaea. *Tetrahedron Letters*, 2003(44): 3275–3279.
- [17] Joshua Schimel, Teri C balser, Matthew Wallenstein. Microbial stress-response physiology and ITS implication for ecosystem function. *Ecology*, 2007, **88**(6): 1386–1394.
- [18] Findlay RH, Dobbs FC. Quantitative description of microbial communities using lipid analysis//Kemp PF, Sherr BF, Sherr EB, *et al.* Current Methods in Aquatic Microbial Ecology. Boca Raton: Lewis Publishers, 1993: 271–284.
- [19] 帅燕华, 张水昌, 赵文智. 古菌细胞膜类脂化合物分析与初步应用. *地质学报*, 2007, **81**(1): 16–22.
- [20] Thea van der Merwe, Karl-Heinz Riedel, Francois Wolfaardt. Analysis of the structural diversity of the microbial community in a paper-mill water system. *Water SA*, 2002, **28**(4): 407–412.
- [21] Schouten S, Hopmans E, Schefuss E, *et al.* Distributional variations in marine crenarchaeotal membrane lipids: a new tool for reconstructing ancient sea water temperatures? *Earth Planet Sci Letts*, 2002(204): 265–274.
- [22] Kim JH, Schouten S, Hopmans EC, *et al.* Global sediment core-top calibration of the TEX₈₆ paleothermometer in the ocean. *Geochim Cosmochim Acta*, 2008(72): 1154–1173.
- [23] Courtney Turich, Katherine H Freeman, Mary Ann Bruns, *et al.* Lipids of marine archaea: patterns and provenance in the water-column and sediments. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 2007(71): 3272–3291.
- [24] Cornelia Wuchter, Stefan Schouten, Stuart G Wakeham. Temporal and spatial variation in tetraether membrane lipids of marine Crenarchaeota in particulate organic matter: Implications for TEX₈₆. *Paleothermometry Paleoceanography*, 2005(20): 3013.
- [25] Johannes C Scholten, David E Culley, Fred J Brockman, *et al.* Evolution of the syntrophic interaction between *Desulfovibrio vulgaris* and *Methanosarcina barkeri*: Involvement of an ancient horizontal gene transfer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2007(352): 48–54.
- [26] Hofmann P, Stüsser I, Wagner T, *et al.* Climate-ocean coupling off North-West Africa during the Lower Albian: The oceanic anoxic event 1b. *Palaeogeography Palaeoclimatology Palaeoecology*, 2008(262): 157–165.
- [27] Sluijs A, Schouten S, Pagani M, *et al.* Subtropical Arctic Ocean temperatures during the Palaeocene/Eocene thermal maximum. *Nature*, 2006(441): 610–613.
- [28] Huguet C, Kim JH, Sinninghe Damsté JS, *et al.* Reconstruction of glacial-interglacial sea surface temperature in the Arabian Sea using organic proxies. *Paleoceanography*, 2006(21): 3003.
- [29] Cornelia Iulia Blaga, Gert-Jan Reichart, Oliver Heiri, *et al.* Tetraether membrane lipid distributions in water-column particulate matter and sediments: a study of 47 European lakes along a north-south transect. *Journal of Paleolimnology*, 2009, **41**(3): 523–540.
- [30] Tom Walsh, Jon M McClellan, Shane E McCarthy. Rare structural variants disrupt multiple genes in neurodevelopmental pathways in schizophrenia. *Science*, 2008, **320**(5875): 539–543.
- [31] Schouten S, Hopmans EC, Schefu E, *et al.* Distributional variations in marine crenarchaeotal membrane lipids: a new tool for reconstructing ancient sea water temperatures. *Earth Planet Sci Lett*, 2004, **35**(5): 265–274.
- [32] Masateru Nishihara, Yosuke Koga. Extraction and composition of polar lipids from the archaeobacterium, methanobacterium thermoautotrophicum: effective extraction of tetraether lipids by an acidified solvent. *Biochem*, 1987, **101**(4): 997–1005.
- [33] White DC, Davis WM, Nickels JS. Determination of the sedimentary microbial biomass by extractable lipid phosphate. *Oecologia*, 1979, **40**(1): 51–62.
- [34] Helen F Sturt, Roger E Summons, Kristin Smith, *et al.* Intact polar membrane lipids in prokaryotes and sediments deciphered by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization multistage mass spectrometry—new biomarkers for biogeochemistry and microbial ecology. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2004(18): 617–628.
- [35] Jennifer F Biddle, Julius S Lipp, Mark A Lever, *et al.* Heterotrophic Archaea dominate sedimentary subsurface ecosystems off Peru. *PNAS*, 2006, **103**(10): 3846–3851.
- [36] Herbert HP, Fang Hong Liu. Effect of pH on hydrogen production from glucose by a mixed culture. *Bioresour Technol*, 2002, **82**(1): 87–93.
- [37] Amnon Levya, Christopher Hennessy. Why does capital structure choice vary with macroeconomic conditions?

- Journal of Monetary Economics*, 2007, **54**(6): 1545–1564.
- [38] Edward F, DeLong A, Aristides Yayanos, *et al.* Biochemical function and ecological significance of novel bacterial lipids in deep-sea prokaryotes. *Appl Environ Microbiol*, 1986, **51**(4): 730–737.
- [39] Nogi Y, Chiaki Kato. Taxonomic studies of extremely barophilic bacteria isolated from the Mariana Trench and description of *Moritella yayanosii* sp. nov., a new barophilic bacterial isolate. *Extremophiles*, 1999, **3**(1): 71–77.
- [40] Shigetoshi Yano, Hiroshi Tokumitsu, Thomas R Soderling. Calcium promotes cell survival through Ca M-K kinase activation of the protein-kinase-B pathway. *Nature*, 1998(396): 584–587.
- [41] Bartletta DH, Katob C, Horikoshib K. High pressure influences on gene and protein expression influence des hautes pressions sur expression des gènes et des protéines. *Research in Microbiology*, 1995, **146**(8): 697–706.
- [42] DeLong, Yayanos. Adaptation of the membrane lipids of a deep-sea bacterium to changes in hydrostatic pressure. *Science*, 1985, **228**(4703): 1101–1103.
- [43] Thompson K FM, Kennicut HM C. Correlations of Gulf Coast petroleum on the basis of branched acyclic alkanes. *Organic Geochemistry*, 1992, **18**(1): 103–119.
- [44] Tornabene TG, Langworthy TA, Holzer G, *et al.* Squalenes, phytanes and other isoprenoids as major neutral lipids of methanogenic and thermoacidophilic “archaeobacteria”. *Journal of Molecular Evolution*, 1979(13): 73–83.
- [45] Rowland SJ, Lamb NA, Wilkinson CF, *et al.* Confirmation of 2,6,10,15,19-pentamethylheicosane in methanogenic bacteria and sediments. *Tetrahedron Letters*, 1982(23): 101–104.
- [46] Schouten S, vander Maarel MJEC, Huber R, *et al.* 2,6,10,15,19-Pentamethylheicosanes in *Methanobrevibacterium* *bombayensis*, a marine methanogenic archaeon, and in *Methanosarcina mazei*. *Organic Geochemistry*, 1997(26): 409–414.
- [47] Noble RA, Henk JrFH. Hydrocarbon charge of a bacterial gas field by prolonged methanogenesis: an example from the East Java Sea, Indonesia. *Organic Geochemistry*, 1998(29): 301–314.
- [48] Volkman JK, Maxwell JR. Acyclic isoprenoids as biological marker//Johns RB. *Biological Markers in the Sedimentary Record*. New York: Elsevier, 1986: 1–42.
- [49] Petrov A, Vorobyova NS, Zemskova ZK. Isoprenoid alkanes with irregular “head to head” linkages. *Organic Geochemistry*, 1990(16): 1001–1005.
- [50] Nadia Stefanova, Lars Klimaschewski, Werner Poewe. Glial cell death induced by overexpression of α -synuclein. *Journal of Neuroscience Research*, 2001, **65**(5): 432–438.
- [51] Elvert M, Hopmans EC, Treude T. Spatial variations of methanotrophic consortia at cold methane seeps: implications from a high-resolution molecular and isotopic. *Approach Geobiology*, 2005(3): 195–209.
- [52] Martin Blumenberg, Richard Seifert, Joachim Reitner. Membrane lipid patterns typify distinct anaerobic methanotrophic consortia. *PNAS*, 2004, **101**(30) : 11111–11116.
- [53] Beth Orcutt, Antje Boetius, Marcus Elvert. Molecular biogeochemistry of sulfate reduction, methanogenesis and the anaerobic oxidation of methane at Gulf of Mexico cold seeps. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 2005, **69**(17): 4267–4281.
- [54] Masahiro Oba, Susumu Sakata, Urumu Tsunogai. Polar and neutral isoprenyl glycerol ether lipids as biomarkers of archaea in near-surface sediments from the Nankai Trough. *Organic Geochemistry*, 2006, **37**(12): 1643–1654.
- [55] Urumu Tsunogai, Naohiro Yoshida, Junichiro Ishibashi. Carbon isotopic distribution of methane in deep-sea hydrothermal plume, Myojin Knoll Caldera, Izu-Bonin arc: implications for microbial methane oxidation in the oceans and applications to heat flux estimation. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 2000, **64**(14): 2439–2452.
- [56] Suess E, Whiticar MJ. Methane-derived CO₂ in pore fluids expelled from the Oregon subduction zone. *Palaeogeogr Palaeoclimatol Palaeoecol*, 1989(71): 119–136.
- [57] Whiticar MJ. Carbon and hydrogen isotope systematics of bacterial formation and oxidation of methane. *Chem Geol*, 1999(161): 291–314.
- [58] Jaap S, Sinninghe Damsté, Marcel MM Kuypers, *et al.* The carbon isotopic response of algae, (cyano) bacteria, archaea and higher plants to the late Cenomanian perturbation of the global carbon cycle: Insights from biomarkers in black shales from the Cape Verde Basin (DSDP Site 367). *Organic Geochemistry*, 2008(39): 1703–1718.
- [59] Gesine Mollenhauer, Timothy I Eglinton, Ellen C Hopmans. A radiocarbon-based assessment of the preservation characteristics of crenarchaeol and alkenones from continental margin sediments. *Organic Geochemistry*, 2008(39): 1039–1045.
- [60] Johan WH, Weijersa, Stefan Schoutena, *et al.* Occurrence and distribution of tetraether membrane lipids in soils: Implications for the use of the TEX₈₆ proxy and the BIT index. *Organic Geochemistry*, 2006, **37**(12): 1680–1693.