

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Ústav pro životní prostředí

Studijní program: Ekologie a ochrana životního prostředí

Obor: Ochrana životního prostředí



BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Biomarkery n-alkany a GDGTs v jezerních sedimentech jako nástroj pro kvantitativní rekonstrukci klimatu

n-Alkanes and GDGTs biomarkers in lake sediments as a tool for quantitative paleoclimate reconstruction

Tereza Machová

Vedoucí: RNDr. Jolana Tátošová, Ph.D.

2022

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, dne 29. 7. 2022

.....

Tereza Machová

Poděkování

Touto cestou bych ráda poděkovala své školitelce RNDr. Jolaně Tátosové, Ph.D. za velkou pomoc a trpělivost při vedení mé bakalářské práce a za veškerý čas s tím spojený. Velké díky také patří mé rodině za dlouholetou podporu během studia.

Abstrakt

Rešerše je rozdělena do dvou velkých podcelků, přičemž první se věnuje sedimentárním n-alkanům a druhý GDGTs. U n-alkanů je důležitá především délka uhlíkového řetězce a převažující sudost nebo lichost, podle které je možné rozpoznat zdrojový organismus. Problematická je ale vysoká druhová i mezidruhová variabilita délky řetězce spojená s environmentálními podmínkami prostředí nebo rozdílné množství produkce n-alkyl lipidů. Jelikož se n-alkany skládají z uhlíků a vodíků, lze je zkoumat i z na základě jejich izotopového složení. Rostliny při tvorbě organických molekul diskriminují těžší stabilní izotopy uhlíku a vodíku, což ve výsledku vede k produkci ochuzenějších sloučenin. Pomocí $\delta^{13}\text{C}$, lze například zjistit jaká byla dostupnost vody nebo jestli se jedná o C_3 nebo C_4 rostlinu, aplikovatelnost omezuje zeměpisná šířka lokality nebo bakteriální produkce n-alkenů. Analýza $\delta^2\text{H}$ C_{17} alkanů může odhalit evapotranspiraci jezera anebo hodnoty $\delta^2\text{H}$ jezerní vody, ale pro určení nutné znát zdroj vodíku jezerní vody a musíme mít dostatečné koncentrace daného n-alkanu.

GDGTs analyzujeme především na základě jejich struktury, která se může měnit se změnou okolní teploty, což se jeví jako poměrně schopný klima-proxy. Pomocí různých výpočtů lze relativně přesně rekonstruovat povrchovou teplotu jezera, průměrnou roční teplotu vzduchu nebo odhalit alochtonní vstupy organického materiálu. I zde je několik omezení, které znemožňují provedení analýzy nebo výrazně zkreslují výsledky, např. sezonalita při produkci konkrétní sloučeniny nebo nadměrný přísun organické hmoty z povodí.

Abstract

The review is divided into two major sub-sections, the first focusing on n-alkanes and the second on GDGTs. Considering n-alkanes, the carbon chain length and the predominant evenness or oddness are of particular importance to identify the source organism. However, the high species and interspecies variability in chain length associated with environmental conditions or the differences in the amount of n-alkyl lipid production are problematic. Since n-alkanes are composed of carbons and hydrogens, they can also be studied based on their isotopic composition. Plants discriminate against heavier isotopes of carbon and hydrogen during the formation of organic molecules, resulting in the production of more depleted compounds. Using $\delta^{13}\text{C}$, we can determine the water availability over time or the exchange between C_3 or C_4 vegetation; applicability is limited by the latitude of the site or bacterial production of n-alkenes. $\delta^2\text{H}$ of C_{17} alkane can reveal the evapotranspiration of a lake and/or the $\delta^2\text{H}$ values of lake water, nevertheless, we need sufficient concentrations of the n-alkane in question, and be sure the source of the hydrogen in the lake water hasn't been affected in the past.

GDGTs use to be analyzed primarily by their structure, which may change with changes in ambient temperature, i.e. GDGTs have the potential to be a capable climate-proxy. Using various calculations, we can reconstruct relatively accurately the mean surface temperature of a lake, the mean annual air temperature, or reveal allochthonous inputs of organic material. Again, a possible bias has to be considered,

e.g. seasonality in the production of a particular compound or excessive organic matter input from the catchment.

Obsah

1. Úvod.....	8
2. Lipidy jako biomarkery	10
3. n-Alkyl lipidy	12
3.1. Indexy založené na délkách n-alkanových řetězců.....	13
3.2. Izotopové složení n-alkanů.....	16
3.2.1. Diskriminace izotopů uhlíku a vodíku při biosyntéze n-alkanů.....	17
3.3. Interpretace sedimentárních n-alkanů pomocí $\delta^{13}\text{C}$ a δD	20
4. Glycerol dialkyl glycerol tetraethery (GDGTs) lipidy	23
4.1. isoGDGTs.....	25
4.2. brGDGTs.....	27
4.3. GDGTs proxy využívané pro paleorekonstrukce	29
4.3.1. Rekonstrukce povrchové teploty vody – TEX_{86}	29
4.3.2. Původ GDGTs – BIT index.....	32
4.3.3. Rekonstrukce teploty vzduchu MBT'/CBT.....	33
5. Závěr.....	37
6. Seznam literatury.....	39

1. Úvod

Klimatická změna je v dnešní době čím dál aktuálnějším tématem. Pro pochopení současného klimatu a predikci jeho vývoje do budoucnosti je klíčové zjistit, jak se přirozeně vyvíjelo a měnilo klima v minulosti. Bohužel nelze historické klimatické parametry, jako je teplota, nebo množství srážek, změřit přímo, ale pouze nepřímo pomocí zástupných ukazatelů (proxy), které s klimatickou změnou souvisí. Relativně přímé ukazatele jsou uchovány v ledovcích v polárních oblastech, jelikož je v nich zachycena voda z doby, kdy daná vrstva ledovce vznikala. Izotopové analýza ^{18}O a ^2H těchto vrstev přímo odráží změny teploty vzduchu, což umožňuje rekonstrukci klimatu (Gkinis *et al.*, 2021), ale nic nám neřekne o tom, jak na změny klimatu reagovaly ekosystémy. Pro tyto informace musíme najít jiný typ archivu, než jsou ledovcové vrty, např. mořské a jezerní sedimenty, ve kterých se uchovává celá řada biologických zbytků organismů, žijících přímo ve vodních ekosystémech nebo v přilehlém povodí. Může se jednat například o pylová zrna, pomocí kterých lze rekonstruovat lokální až regionální změny terestrické vegetace, rostlinné makrozbytky, které přinášejí informace o vodní vegetaci, tělesné schránky rozsivek, které uchovávají informace o trofii jezera (Smol *et al.*, 2001a), chitinové zbytky perlooček, které vykazují variabilitu s pH a kolísáním hladiny nebo hlavové kapsule pakomárů, které dokážou interpretovat průměrnou červencovou teplotu vzduchu (Smol *et al.*, 2001b).

Výjimečnost biochemických proxy, jako jsou biomarkery, spočívá ve schopnosti rekonstruovat jak klima, tak odezvu ekosystému. Molekuly biologických markerů (biomarkerů) jsou organické sloučeniny, které mají svůj charakteristický biologický zdroj, a které si zachovávají svou identitu i poté, co se stanou součástí sedimentů, a to i v případě, že dojde k částečné degradaci. Většina biomarkerů jsou lipidy, a vzhledem k jejich nízké náchylnosti k mikrobiální degradaci, ve srovnání s jinými typy organických látek, mohou zaznamenávat historii ukládání různých zdrojů organické hmoty v jezerních sedimentech. Prvním hlavním zdrojem lipidových biomarkerů v jezerních sedimentech jsou řasy, které žijí v jezerech a rostliny, které žijí v jeho okolí. Produkují odlišné struktury n-alkan lipidů a jejich charakteristické molekuly tak mohou sloužit jako ukazatele změn, které nastaly uvnitř jezera samotného ale také v povodí (Meyer & Teranes, 2001). Autotrofní organismy používají jako zdroj vodíku srážkovou vodu, a izotopové složení $\delta^2\text{H}$ jejich n-alkanů tak odráží $\delta^2\text{H}$ srážkové vody, která je přímo řízená teplotu vzduchu. n-Alkyl biomarkery tedy mohou sloužit i jako klima-proxy. Druhým významným zdrojem lipidů jsou domény Archea a Bacteria, které tvoří cytoplazmatickou membránu z molekul fosfolipidů se specifickou jádrovou strukturou, tzv. GDGTs (glycerol dialkyl glycerol tetraethery). Specifikem cytoplazmatické membrány archeí a bakterií je, že jsou při změně okolního prostředí (pH, teplota) schopni přizpůsobit vnitřní struktury těchto molekul, a tak GDGTs uchované v sedimentech mohou sloužit jako ukazatel změn těchto parametrů (Bush & McInerney, 2013, Schouten *et al.*, 2013a). I přes to, že zástupné ukazatele mají velký potenciál pro rekonstrukce klimatu, je nutné brát na zřetel, že se jedná o nepřímé indikátory, a tedy počítat s výsledky, které jsou zatížené jistou chybou a nejistotou při jejich interpretaci.

Literární rešerše si klade dva cíle:

1. Naučit se rozpoznat zdrojové organismy vyprodukovaných n-alkanů v jezerních sedimentech a pochopit mechanismus biosyntézy a diskriminace těžkých stabilních izotopů uhlíku a vodíku. Na základě získaných poznatků odpovědět na následující otázky:

Jsou jednotlivé indexy založené na délce uhlíkového řetězce n-alkanu spolehlivými nástroji pro paleorekonstrukce?

Jaké parametry prostředí lze odvodit pomocí $\delta^{13}\text{C}$ a $\delta^2\text{H}$ izotopové analýzy a čím může být izotopový signál zkreslený?

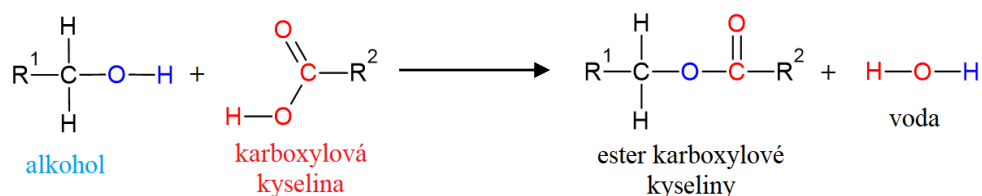
2. Porozumět původu a struktuře molekul GDGTs. Zde si budu pokládat otázky:

Jaké parametry prostředí lze rekonstruovat pomocí proxy založených na GDGTs?

Jak jsou spolehlivé tyto rekonstrukce jsou a jakým způsobem se vyhnout chybné interpretaci?

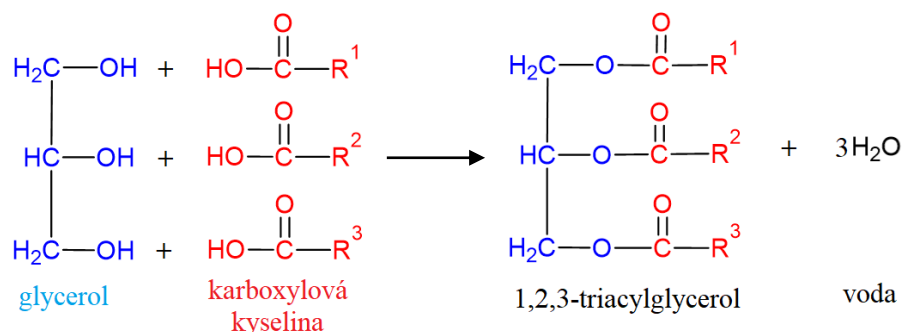
2. Lipidy jako biomarkery

Lipidy jsou heterogenní skupina organických molekul, které vznikají esterifikací vyšších mastných kyselin a alkoholů, a jejichž společnou vlastností je hydrofobní charakter. Ten je dán přítomností delšího nepolárního uhlovodíkového řetězce mastných kyselin. Esterifikace je chemická reakce, při které je OH skupina karboxylové kyseliny nahrazena organickým zbytkem vzniklým z alkoholu po odštěpení vodíku z OH skupiny (Obr. 1). Chemicky jsou přírodní lipidy nejčastěji deriváty (estery) mastných kyselin a jednosytného nebo trojsytného alkoholu.



Obrázek č. 1: Schéma esterifikace mastné kyseliny a alkoholu. Převzato z McMurry, 2015.

Lipidy se obecně dělí podle složení do tří skupin: jednoduché, složené a odvozené. Jednoduché lipidy jsou estery mastných kyselin a alkoholů a jsou tvořené jen hydrofobní částí. Podle alkoholové složky rozlišujeme acylglyceroly (glyceridy), což jsou estery vyšších alifatických monokarboxylových kyselin a trojsytného alkoholu glycerolu (Obr. 2), a vosky, což jsou estery vyšších mastných kyselin a vyšších jednosytných alkoholů (alifatické alkoholy s 16 a více uhlíkovými atomy v molekule) (Obr. 3).



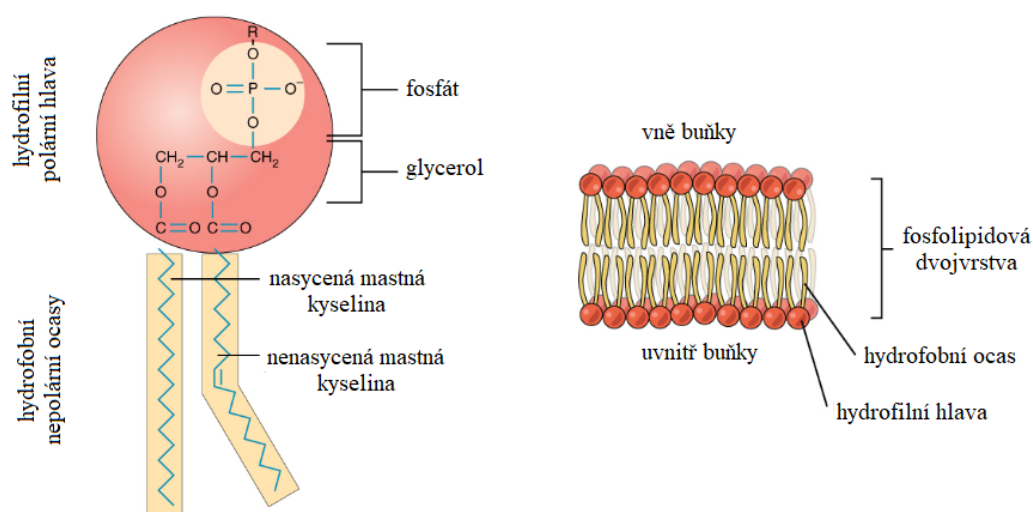
Obrázek č. 2: Reakce glycerolu s mastnými kyselinami za vzniku triacylglycerolu. Převzato z McMurry, 2015.



Obrázek č. 3: Reakce vyššího jednosytného alkoholu a jednosytné nasycené mastné kyseliny za vzniku vosku. Převzato z McMurry, 2015.

Složené lipidy jsou kromě alkoholů a karboxylových kyselin tvořeny i dalšími složkami, a proto obsahují kromě hydrofobní části i složky hydrofilní. Řadíme mezi ně fosfolipidy, glykolipidy a lipoproteiny. Glycerolfosfolipidy tvoří glycerol esterifikovaný dvěma molekulami mastných kyselin a jednou molekulou H₃PO₄ (vzniká kyselina fosfatidová). Molekula tak má na jednom konci fosfátovou

polární hydrofilní hlavu a dva dlouhé nepolární hydrofobní ocasy mastných kyselin (Obr. 4). Jako důsledek přítomnosti polární a nepolární části mají glycerolfosfolipidy tendenci se ve vodném prostředí samovolně organizovat do tvaru tzv. lipidové dvojvrstvy, kdy polární hlavy lipidů se orientují směrem k polárnímu vodnému prostředí, zatímco hydrofobní ocasy se snaží minimalizovat svůj kontakt s vodou se shlukují k sobě. Lipidová dvojvrstva je hlavní složkou buněčných membrán, a to jak cytoplazmatické membrány, tak i membrán vnitřních organel. Glykolipidy jsou podobné fosfolipidům, jen místo kyseliny fosforečné je na glycerol navázán oligo- nebo monosacharid, který tak tvoří polární konec molekuly. Nachází se pouze na vnější straně lipidové dvojvrstvy. Lipoproteiny jsou tvořeny kombinací lipidů a proteinů, kde lipid tvoří shluky a proteiny se nacházejí na jeho povrchu. Oba jsou rovněž součástí buněčných membrán (McMurry, 2015).



Obrázek č. 4: Struktura fosfolipidu a lipidová dvojvrstva (převzato z Betts et al., 2013, upraveno).

Aby molekula lipidu mohla být považována za biomarker musí kromě výše uvedených vlastností splňovat další kritérium, a tím je dostatečná odolnost vůči chemické a biologické degradaci, která umožňuje jejich zachování v jezerních či mořských sedimentech. V jezerních sedimentech se zachovávají vstupy jak ze suchozemských, tak i z vnitrojezerních zdrojů, proto v nich můžeme nalézt stopy vyšších terestrických rostlin, mikroorganismů žijící v okolních půdách i vlastních jezerních sedimentech a různých druhů řas a mikroorganismů obývajících vodní sloupec. Biomarkery tedy mohou pocházet ze všech tří domén života (bakterie, archea, eukaryota), a představují nespočet různých chemických struktur. Příkladem může být C29 n-alkan a kyselina vanilová (biomarkery pro vyšší suchozemské rostliny), methylalkenon C37:2 (biomarker pro haptofytové bičíkaté řasy), crenarchaeol (biomarker pro Thaumarchaeota), loliolid (produkt anoxické degradace pigmentu fukoxanthinu přítomného v rozsivkách) nebo rozvětvený GDGT IIb (předpokládaný produkt anaerobních půdních bakterií) (Castañeda & Schouten, 2011). Biomarkery se proto staly jedním z nejnovějších proxy používají pro paleolimnologické rekonstrukce a jejich odolnost a schopnost zachovat se v geologických materiálech nám umožňuje získávat informace o podmínkách prostředí i několik tisíc let nazpátek. Ve své práci se

zaměřuji na **n-alkyl lipidy**, pocházející z terestrických rostlin, které jsou součástí ochranné voskové vrstvy pokrývající listy a na glycerol dialkyl glycerol tetraethery (**GDGTs**) lipidy produkované bakteriemi a archei.

n-Alkyl lipidy (epikutikulární vosky rostlin) a GDGTs (membránové lipidy archeí a bakterií) se liší svou strukturou. Epikutikulární vosky najdeme na vnější straně listů terestrických rostlin, kde společně s dalšími látkami vytváří tenkou vrstvu. U některých zástupců mohou ochranné vosky pokrývat i květy, plody a semena. Chrání rostliny před nadměrným odpařováním vody a zároveň zabraňují smáčení povrchu. Dále mohou odrážet ultrafialové záření nebo zabraňovat průniku škůdců a patogenů (Koch & Ensikat, 2008). Tyto rostlinné vosky jsou tvořeny dlouhým alifatickým (necyklickým) uhlovodíkovým řetězcem s 20 až 37 atomy uhlíků, jedná se tedy o n-alkyl lipidy. Důležitou roli hraje především délka řetězce, neboť ta se liší nejen u rostlin s různým typem fotosyntézy, ale rozdíly nalezneme také mezi čeleděmi (např. Bush & McInerney, 2013; Diefendorf & Freimuth, 2017). Membránové lipidy archeí a bakterií tvoří buď dva C₄₀ izoprenové uhlíkové řetězce, které mohou obsahovat různý počet cyklopentanových kruhů nebo i jeden kruh cyklohexanu, na obou koncích připojených na C-2 a C-3 uhlíky molekul glycerolu (isoGDGTs), nebo dva řetězce 13,16-dimethyloktakosanu napojených na C-1 a C-2 atomy glycerolů (brGDGTs) (Pearson & Ingalls, 2013).

3. n-Alkyl lipidy

Chemická struktura rostlinných kutikulárních vosků byla podrobně zkoumána až s rozvojem plynové chromatografie a hmotnostní spektrometrie v 60. letech minulého století a výsledky ukázaly, že složení vosků je mnohem komplexnější, než se původně myslelo (Eglinton *et al.*, 1962). Hlavní složkou všech rostlinných vosků jsou dlouhé alifatické nasycené řetězce uhlovodíků s 20 až 37 atomy uhlíků, z nichž převažují ty s lichým počtem atomů, zejména C₂₉ a C₃₁. Alkany se sudým počtem atomů uhlíku se ve voscích vyskytují také běžně, nicméně jsou zastoupeny mnohem menším množstvím než liché řetězce, a rozvětvené řetězce alkanů se ve voscích vyskytují jen velmi málo. Kromě alkanů se na tvorbě rostlinných vosků podílí také alkoholy (ve formě esterů), nejvíce jsou zastoupeny primární sudé alkoholy (C₂₂ – C₃₂) a sekundární liché (C₂₁ – C₃₃). Běžně se ve voscích vyskytují také estery alifatických kyselin, zejména pak s lichým řetězcem (C₁₄-C₃₄) (Eglinton & Hamilton, 1963). V sedimentech se dochovávají všechny zmíněné složky, hlavní pozornost však byla věnována n-alkanům, zejména proto, že jsou nejvíce rezistentní vůči degradaci (Cranwell, 1981).

n-Alkyl lipidy extrahovatelné ze sedimentů tedy představují lipidy s navázaným jednovazebným radikálem (zbytkem) nasyceného alifatického uhlovodíku, jehož atomy uhlíku a vodíku jsou uspořádány v lineárním řetězci (může být nerozvětvený i rozvětvený). Do této skupiny proto řadíme **n-alkany**, **n-alkanoly** a **n-alkanové kyseliny**. n-Alkany se vyznačují tím, že ve své struktuře kromě uhlíku obsahují pouze atomy vodíku, a v důsledku absence funkčních skupin jsou velice stabilní, a proto i schopny přežít v životním prostředí i několik tisíc let. n-Alkanoly a n-alkanové kyseliny patří mezi kyslíkaté deriváty uhlovodíků, tzn., že mají ve svém řetězci zabudované kromě vodíku a uhlíku i atomy kyslíku. U n-alkanolů

je kyslík přítomen ve formě hydroxylové skupiny (-OH), zatímco u n-alkanových kyselin ve formě karboxylové skupiny (-COOH). n-Alkany jsou v živých rostlinách i sedimentárních archivech nejhojněji zastoupeny a, jak již bylo zmíněno nejméně podléhají degradaci, proto byla výzkumná pozornost zaměřena zejména na ně. I v této práci se nadále bude hovořit jen o n-alkanech.

Kromě chemického vzorce nás zajímá i počet uhlíků v řetězci, celkový počet uhlíků v molekule, větvení skeletu, struktura a izotopové složení. Všechny tyto parametry jsou totiž závislé na tom, který organismus danou molekulu syntetizoval a odvíjí se od nich fyzikální vlastnosti molekuly (Vinter, 2009; Cao, 2016). Dlouhé řetězce n-alkanů s převažujícím lichým počtem uhlíků ($C_{27} - C_{35}$) jsou hlavní součástí epikutikulárních vosků **terestrických** cévnatých rostlin. Středně dlouhé řetězce n-alkanů ($C_{23} - C_{25}$) jsou dominantní složkou u **submergentních a plovoucích** vodních makrofyt (emergentní vodní rostliny mají složení n-alkanů podobné terestrickým rostlinám) (Ficken *et al.*, 2000) a kratší řetězce n-alkanů ($C_{17} - C_{21}$) jsou produkovány především **řasami a sinicemi** (Cao, 2016). Dosud není zcela objasněno, jak velkou roli v obsahu a složení n-alkylů v sedimentech hrají heterotrofní organismy. Většinu mikroorganismů nacházejících se v přírodním prostředí nelze laboratorně kultivovat, a nelze proto ani zjistit jaký typ alkanů produkují. Li *et al.* (2018) se o to pokusili izotopicky značeným pokusem: inkubovali rašelinou půdu bez přístupu světla (inhibice fotosyntézy, tak aby bylo nezpochybnitelné, že vyprodukované alkaný pocházejí pouze z mikrobiální činnosti), kterou zavlažovali vodou obohacenou o deuterium. Inkubace probíhala paralelně za aerobních a anaerobních podmínek po dobu 1 a půl roku. Za aerobních podmínek byly nejvíce nabožaceny o deuterium alkaný s krátkým řetězcem ($C_{18}-C_{21}$), následovaly dlouhé řetězce ($C_{27}-C_{31}$) jinak typické pro terestrické cévnaté rostliny, a středně dlouhé řetězce ($C_{22}-C_{25}$) byly nabožaceny minimálně nebo vůbec. Naproti tomu za anaerobních podmínek došlo k nabožacení pouze krátkých alkanů (C_{18} a C_{19}). Míra izotopového nabožacení jednotlivých alkenů jim tak umožnila kvantifikovat příspěvek mikroorganismů k tvorbě n-alkanů: mikrobiální podíl n-alkanů s dlouhým řetězcem může v aerobních podmínkách dosáhnout až 0,1 % ročně. U n-alkanů s krátkým řetězcem mohou mikroorganismy v aerobních a anaerobních podmínkách přispívat až 2,5 % ročně.

3.1. Indexy založené na délkách n-alkanových řetězců

Jednotlivé indexy a poměry založené na délkách n-alkanových řetězců se zavádí ve snaze rekonstruovat historické podmínky a dlouhodobý vývoj ekosystémů. Poměry dlouhých řetězců C_{29} a C_{31} ku C_{17} se využívají jednak jako proxy pro rozlišení relativního vstupu suchozemské organické hmoty tvořené převážně vyššími rostlinami od autochtonní organické hmoty tvořené převážně fytoplanktonem, zároveň nám dokážou odhalit i konkrétní skupinu cévnatých rostlin. Cranwell (1973 v Meyers, 2003) například zjistil, že řetězce se 31 atomy uhlíku reprezentují vstupy trav, kdežto C_{27} a C_{29} představují vstupy ze stromů a keřů. Střední délky řetězců (převážně C_{23}) odpovídají rašeliníku *Sphagnum* a vodním rostlinám (Nott *et al.*, 2000). Na základě těchto poznatků dokážeme odhadnout převažující vegetaci v daném období a s tím související klimatické změny nebo změny využívání půdy v povodí jezera. Informace získané

z jednotlivých poměrů délek n-alkanových řetězců lze často korelovat s dalšími paleoproxy jako jsou například pylové záznamy nebo rostlinné makrozbytky (Bush & McInerney, 2013).

Nejčastěji používaným indexem je průměrná délka řetězce (ACL – average chain length) rostlinných epikutikulárních listových vosků (Poynter *et al.*, 1989 v Meyers, 2003). Jedná se o metodu popisující vážený průměr různých délek uhlíkových řetězců, s následující rovnicí:

$$ACL = \frac{\sum(C_n * n)}{\sum(C_n)}$$

kde C_n odpovídá koncentraci každého n-alkanu s n atomy uhlíku. Hlavní vliv na délku řetězce má typ vegetace, který danou sloučeninu vyprodukoval. Vyšší ACL n-alkanů izolovaných ze sedimentů může například indikovat změnu vegetace směrem k travním porostům (Jeng, 2006). Nižší hodnoty ACL pak mohou indikovat přítomnost vodní makrovegetace nebo převahu fytoplanktonního zdroje n-alkanů v sedimentech jezera.

Dalším parametrem je index uhlíkové preference (CPI – carbon preference index), který určuje míru převahy lichých uhlíkových řetězců nad sudými a počítá se jako podíl součtu lichých uhlovodíků k součtu sudých (Marzi *et al.*, 1993) Současná podoba rovnice indexu dle Bush & McInerney (2013) je:

$$CPI = \frac{(C_{21} + C_{23} + C_{25} \dots C_{33})(C_{23} + C_{25} + C_{27} \dots C_{35})}{2(C_{24} + C_{26} + C_{28} \dots C_{34})}$$

Za pomoci tohoto parametru můžeme odlišovat původ n-alkanů. Hodnoty větší než jedna znamenají převahu lichých délek řetězců nad sudými a indikují biologický původ, neboť alkany mohou pocházet i nebiologických zdrojů, např. ropy a termálně nestabilního podloží. Hodnota CPI těchto nebiologických zdrojů je nízká, většinou 1 a méně (Bush & McInerney, 2013). CPI blízké jedné signalizují bakteriální vstup. Naopak suchozemské rostliny mají tak vysokou převahu lichých uhlíkových řetězců nad sudými, že se jejich hodnoty CPI pohybují kolem 5 až 10 (Jeng, 2006).

P_{aq} index byl navržen tak, aby dokázal rozlišit vstupy n-alkanů z vodních makrofyt od terestrických a emergentních rostlin (Ficken *et al.*, 2000). Vyjadřuje relativní podíl středních délek řetězců (C_{23} , C_{25}) a dlouhých (C_{29} , C_{31}) alkanových řetězců.

$$P_{aq} = \frac{(C_{23} + C_{25})(C_{23} + C_{25} + C_{29} + C_{31})}{(C_{23} + C_{25} + C_{29} + C_{31})}$$

Suchozemské a emergentní rostliny mají podobnou distribuci n-alkanů, s maximální délkou řetězce C_{29} nebo C_{31} . Naproti tomu ponořené vodní rostliny tvoří řetězce o maximální délce C_{23} nebo C_{25} . Ze studie Ficken *et al.* (2000) vychází, že pokud je P_{aq} menší než 0,1, potom se jedná o n-alkany ze suchozemských rostlin. Hodnoty P_{aq} mezi 0,1 a 0,4 odpovídají zdroji z emergentních rostlin a 0,4 až 1 z ponořených vodních makrofyt. Tento index ve výsledku můžeme využívat k interpretaci změny výšky hladiny jezera, kdy vyšší hodnoty P_{aq} znamenají vyšší příspěvek vodních rostlin, což naznačuje větší expanzi litorálů jezera za humidnějších podmínek. Naopak nižší hodnoty naznačují větší příspěvky terestrických rostlin, což můžeme vykládat jako sušší klima a nižší hladinu jezera (Ling *et al.*, 2021).

Přestože se výše zmíněné indexy a poměry délek jeví jako potenciálně schopné proxy pro určování vývoje vegetace a klimatu, není tomu doposud tak. Je zde několik překážek, které jejich využití komplikuje. Pro správnou interpretaci n-alkan lipidů v sedimentech je nutné znát jejich distribuci v živých zástupcích, a to v co největším možném druhovém spektru (Bush & McInerney, 2013). Četnost n-alkanů s dlouhým řetězcem (C_{25} a výše) bývá typicky vyšší u krytosemenných stromů a keřů nežli u mnoha nahosemenných rostlin (jehličnanů) (Diefendorf & Freimuth, 2017). Problém ale je, že krytosemenné rostliny v průměru produkují mnohem větší množství n-alkanů na jednotku hmoty listu než opadavé a stálezelené nahosemenné rostliny. Z toho vyplývá, že i kdyby v ekosystému byly krytosemenné rostliny zastoupeny minoritně, ve výsledku by ze sedimentárního záznamu vyšly jako dominantní. Ani rozdíl v délce řetězců u trav a stromů nemusí vždy platit. Velká studie n-alkanů kutikulárních vosků živých rostlin napříč taxonomickým spektrem tento fakt nepotvrdila, naopak autoři zjistili, že mnoho druhů produkuje v různých podmínkách svého výskytu různě dlouhé řetězce (Bush & McInerney, 2013). Z tohoto důvodu se není možné spoléhat na ACL index jako na parametr, který s jistotou určí, o jakou skupinu rostlin se jedná, výjimkou je pouze poměr kratších n-alkanů C_{23} ku C_{27-31} , který by měl poměrně spolehlivě oddělovat mechy od ostatních terestrických rostlin (Bush & McInerney, 2013). Otázkou také zůstává, zdali jistou roli nehraje i poloha listů v koruně, tedy jestli se jedná o stinné nebo osluněné listy nebo vegetační období (Lockheart *et al.*, 1997). Bush & McInerney, (2013), kteří nasbírali mnoho vzorků napříč rostlinnými druhy, však zjistili, že poloha listů v koruně stromu (osluněnost) má jen minimální vliv na prostorovou variabilitu celkové produkce n-alkanů a ani plně vyvinuté listy a listy těsně před opadem (vegetační období) nevykazovaly žádný významný rozdíl v relativní distribuci n-alkanů. Musíme však brát v potaz, že studie byla vypracována pouze pro mírné zeměpisné šířky, a to na vybraných rostlinách, které jsou ovlivněné člověkem (nasbírány v tropických sklenících a přilehlých botanických zahradách). Listové vosky jsou první bariérou, které rostlinu chrání před vnějším okolím, proto lze logicky předpokládat, že v rámci adaptace na okolní prostředí bude rovněž docházet ke změně v jejich složení. Hodnoty ACL listových vosků suchozemských rostlin mohou tedy záviset také na environmentálních faktorech. Tipple & Pagani (2013) například zjistili, že délka řetězce u téhož druhu stromu se liší v závislosti na průměrné roční teplotě vzduchu a to tak, že s rostoucí teplotou roste i ACL. Bush & McInerney (2013) však možnost využití ACL jako klimatického proxy zpochybnili, neboť tvrdí, že v paleozáznamech nelze odlišit, zda je změna distribuce n-alkanů způsobena přímým vlivem změny klimatu nebo jde o nepřímý vliv klimaticky řízené změny druhového složení vegetace. ACL by v paleoanalýzách mělo být doplněno o další paleoproxy jako je například pylová analýza (Meyers, 2003). Také CPI hodnoty vykazují velkou variabilitu, u některých rostlinných skupin menší u jiných velmi vysokou, nicméně dobře lze odlišit nahosemenné (průměrné hodnoty CPI 5,20, $n = 296$) a krytosemenné rostliny (11,76, $n = 1380$) (Bush & McInerney, 2013). Ani CPI tedy není bezchybný nástroj pro interpretaci konkrétních funkčních skupin rostlin, spolehlivě však může být využit pro určování terestrického vstupu jako celku. V případě indexu Paq je pravděpodobně jediným úskalím ovlivnění množství krátkých řetězců (indikují jako hlavní zdroj fytoplankton) přítomností anerobních heterotrofních organismů, neboť ty také produkují krátké řetězce n-alkanů a mohou tak tvořit až 2,5 % jejich celkového množství (Li *et al.*, 2018).

3.2. Izotopové složení n-alkanů

Izotopy obecně označují prvky, které mají stejné protonové číslo, ale liší se číslem nukleonovým. To znamená, že počet protonů v jádře atomu je vždy stejný a mění se jen počet neutronů. V případě uhlíku máme tři izotopy: dva stabilní – ^{12}C , ^{13}C a jeden radioaktivní - ^{14}C . Dominujícím izotopem je izotop ^{12}C , jehož procentuální zastoupení v atmosféře činí 98,89 %. Izotopu ^{13}C už je podstatně méně a jeho koncentrace v atmosféře odpovídá 1,11 %. Nejméně je radioaktivního izotopu ^{14}C , u kterého je jeho procentuální zastoupení zanedbatelné. Vodík má stejně jako uhlík tři izotopy – ^1H , ^2H (deuterium) a ^3H (tritium). Stabilní jsou první dva z nich. ^1H neboli protium je nejvíce zastoupeným izotopem, v atmosféře je ho více než 99,98%. ^2H , jehož triviální název je deuterium a označuje se proto také jako ^2D , je v atmosféře minoritním izotopem (2,6 až 18,4 tisícina procenta) a díky omezenějšímu odpařování bývá jeho relativní koncentrace o něco málo větší v oceánech než v atmosféře. ^3H se značí také jako ^3T (tritium) a jedná se o radioaktivní izotop, jehož množství v atmosféře je zanedbatelné (Šantrůček *et al.*, 2014)

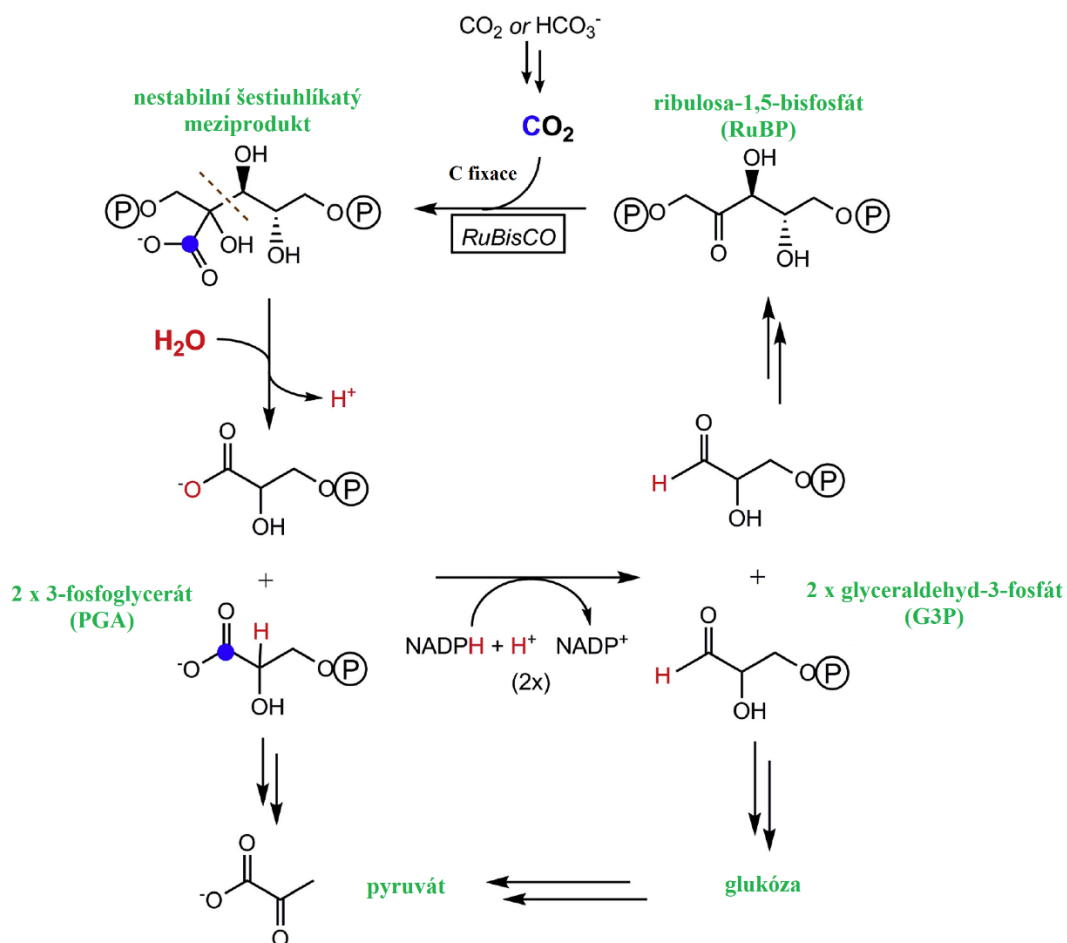
Ke změně izotopového složení dochází obecně nejčastěji během biosyntézy nebo změně skupenství, kdy výsledné produkty bývají ochuzené o těžké izotopy vodíku i uhlíku. Každý **autotrofní** organismus si sahá pro tyto prvky do specifických „zásobníků“, v nichž jsou těžší stabilní izotopy (^{13}C , ^2H) přítomny v určitém specifickém poměru. Uhlík čerpají z atmosféry v podobě CO_2 , jeho izotopový poměr je dlouhodobě stabilní, ale výrazně se měnil v průběhu cyklů glaciál – interglaciál v závislosti na teplotě a rychlosti vypařování (např. Hayes *et al.*, 1999). Zdrojem vodíku je pak meteorická (srážková) voda, jejíž izotopový poměr je určován zejména klimatickými podmínkami, tj. teplotou a vlhkostí, kdy v polárních oblastech jsou průměrné roční srážky ochuzeny o ^2H nejvíce (δD až -390 ‰) a na rovníku je ochuzení nejmenší (až 40 ‰) (Bowen & Revenaugh, 2003). Po přijetí substrátu (C, H) organismem dochází pomocí enzymů k jeho zabudování do organických molekul. Enzymatická aktivita diskriminuje těžší izotopy, což vede k rozdílnému relativnímu zastoupení lehkých a těžkých izotopu (tj. k izotopovému frakcionačnímu faktoru ϵ) ve vytvořené organické molekule. **Heterotrofní** organismy konzumací (metabolickým zpracováním) biomasy určitého izotopového složení opět do určité míry zvýší frakcionační faktor, a tím vznikne tělesná tkáň, která bude ještě více ochuzená o těžké izotopy (Holtvoeth *et al.*, 2019). Jak tyto prvky procházejí biochemickými cykly, jejich izotopové složení v konkrétních molekulách nese informaci o tom odkud tyto prvky pocházejí a jak se do molekul dostaly. Izotopová analýza specifických látek (CSIA ~ compound-specific isotope analysis) umožnila přiblížit procesy přeměny organické hmoty v mnohem menším měřítku a studovat koloběh prvků v jednotlivých ekosystémech od primárního producenta až po konečného mikrobiálního dekompozitora a mineralizaci. Pokud tedy víme, jak určité změny v ekosystému dokážou pozměnit izotopový otisk v organických molekulách uložených v sedimentárních archivech, můžeme pomocí proxy založených na CSIA zdokumentovat, jak se tyto ekosystémy adaptovaly na změny způsobené různými klíčovými parametry prostředí, jako je teplota nebo množství srážek. Některé CSI proxy reagují na změny těchto parametrů přímo – například izotopové složení vodíku a kyslíku v meteorické vodě se přímo odrazí v izotopovém složení biomarkerů syntetizovaných prostřednictvím příjmu vody (Holtvoeth *et al.*, 2019). Stanovení poměrů stabilních izotopů

v organických molekulách uložených v sedimentárních archivech má proto velký potenciál jako nástroj pro rekonstrukci klimatu, vývoje vegetace nebo původu organické hmoty (Meyers, 2003; Diefendorf *et al.*, 2011; Andrae *et al.*, 2020).

3.2.1. Diskriminace izotopů uhlíku a vodíku při biosyntéze n-alkanů

Prekurzorem pro biosyntézu rostlinných vosků je acetyl-koenzym A, který vzniká z produktů fotosyntézy. Celý proces tedy začíná absorbováním CO₂ a vody fotosyntetizujícím organismem (Obr 5). U C₃ rostlin molekuly následně putují skrz vodné prostředí buňky až do chloroplastů, kde enzym RuBisCo (ribulosa-1,5-bisfosfát karboxyláza/oxygenáza) zprostředkuje navázání (karboxylaci) oxidu uhličitého na pětiuhlíkatou molekulu ribulosou-1,5-bisfosfátu (RuBP). Právě během karboxylace dochází k nejvýznamnější izotopové diskriminaci ¹³C. Znamená to tedy, že původně rozpuštěný CO₂ v buňce nebyl výrazně ochuzený o těžší izotop uhlíku, ale až výsledné produkty karboxylace vykazují značné ochuzení o ¹³C. Karboxylací vzniká šestiuhlíkový produkt, který je nestabilní a rychle se rozpadá na dva 3-fosfoglyceráty (PGA), obsahující tři atomy uhlíku. Po dodání energie v podobě ATP si PGA převezme vodík z NADPH komplexu a přemění se na glyceraldehyd-3-fosfát (G3P). Ze tří původních molekul RuBP tak vzniká 6 molekul G3P, 5 je použito na obnovení RuBP a jen jedna na tvorbu glukózy. Pro vytvoření jedné molekuly jednoduchého šesti uhlíkatého cukru (glukózy) se proto proces vzniku G3P musí opakovat šestkrát. Následnými metabolickými ději dochází k rozkladu jednoduchého cukru na pyruvát, což je prekurzor pro vznik acetyl koenzymu-A (acetyl CoA) (Holtvoeth *et al.*, 2019).

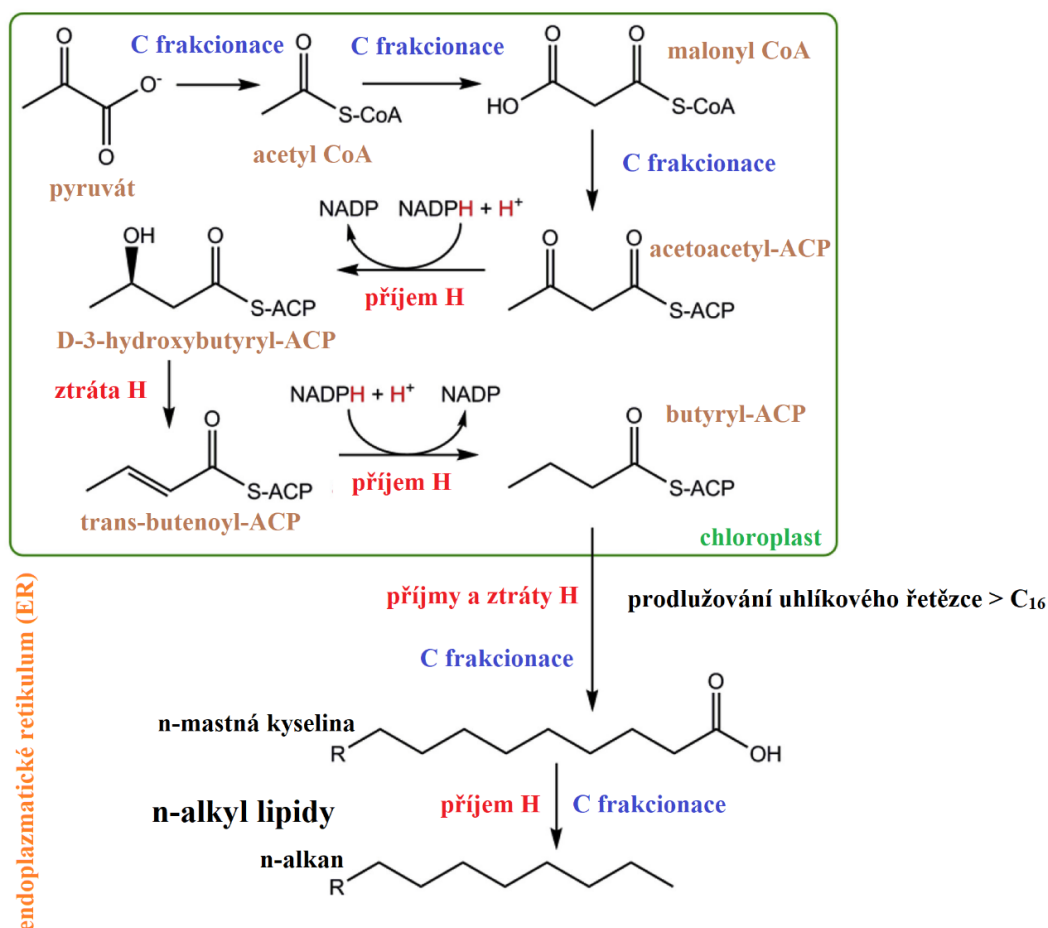
U C₄ rostlin je výchozí izotopové složení prekurzoru acetyl CoA jiné, protože fixace uhlíku neprobíhá v Calvinově nýbrž v Hatchově–Slackově cyklu, který je adaptací na suché a horké podmínky. Díky této evoluční výhodě mohou C₄ rostliny fixovat uhlík i během noci, kdy je chladněji. Po fixaci atmosférického CO₂ dochází u těchto rostlin k rozpuštění na HCO₃⁻. Tento proces vede k nabožení o ¹³C o 6,8 až 9,2 ‰, v závislosti na teplotě. Následně se rozpuštěný iont v mezofilních buňkách za pomoci PEP-karboxylázy mění na čtyř uhlíkatou sloučeninu – oxalacetát. Sloučenina je z mezofylu přesouvána do buněk svazkových pochev, kde dojde k dekarboxylaci kyseliny a uvolnění CO₂, jenž se dále předává k RuBisCo v Calvinova cyklu. Díky vyžití naboženého HCO₃⁻ je výsledná diskriminace ¹³C biomasy C₄ rostlin menší než u C₃ rostlin. Objemové hodnoty δ¹³C C₃ rostlin jsou v průměru -27‰ (pohybují se v rozmezí -22 až -37‰), zatímco u C₃ rostlin byly změřeny hodnoty od -9 až po -15‰ (průměrně -12‰) (Diefendorf & Freimuth, 2017). Izotopové postavení vodních makrofyt je někde mezi C₃ a C₄ rostlinami, ačkoli se jedná typem fotosyntézy o C₃ rostliny. Vyvinula se u nich totiž schopnost asimilovat uhlík i z rozpuštěného hydrogenuhlíčanového iontu, který má v důsledku hydratace CO₂ vyšší δ¹³C než rozpuštěný CO₂ (Lánová, 2022).



Obrázek č. 5: Biosyntéza pyruvátu v Calvinově cyklu fotosyntézy. Rozpadem nestabilního šestiuhlíkatého meziproduktu vznikají dvě molekuly PGA, ale jen jedna z nich nese uhlík z CO_2 . Pyruvát může vznikat přímo z PGA (není zobrazeno, přeměna probíhá v 10 krocích) nebo přes biosyntézu jednoduchých cukrů (glukózy), kdy je PGA přeměno na G3P. Pět ze šesti molekul G3P je použito na obnovu RuBP a jen jedna na tvorbu glukózy, tzn. ● - přidaný uhlík z CO_2 ; H - přidaný atom vodíku v molekuly vody). Převzato z Holtvoeth et al., 2019, upraveno.

n-Alkyl lipidy fotosyntetizujících organismů vznikají biosyntézou nových mastných kyselin. Mastné kyseliny s dlouhými uhlíkovými řetězci jsou biosyntetizovány acetogenní cestou z pyruvátu, z něhož v prvním kroku vzniká acetyl navázaný na koenzym – acetyl CoA (Diefendorf *et al.*, 2011). Část molekul acetyl CoA reaguje pomocí ATP s CO_2 za vzniku malonyl-CoA. V následujícím kroku reaguje další molekula acetyl CoA s malonylem CoA (kondenzace) za vzniku čtyř-uhlíkového komplexu acetoacetyl-ACP, kde ACP označuje acetyl přenašečový protein (acetyl carrier protein). V acetoacetyl-ACP dojde k redukci dvojné vazby s atomem kyslíku jeho nahrazením za vodík, který do reakce přináší NADPH (redukce keto-skupiny). Preferenčně je předáván lehký izotopu vodíku. Vzniká hydroxyacyl-ACP (D-3-hydroxybutyryl-ACP), který po odštěpení dvou atomů H a jednoho atomu O (dehydratace) vytvoří mezi dvěma atomu uhlíku dvojnou vazbu, vzniká trans-2-enyl-ACP (trans-buteonyl-ACP). Redukcí pomocí NADPH dojde k předání vodíku a zrušení dvojné vazby a vzniká acyl-ACP (butyryl-ACP). Elongace řetězce probíhá navázáním (kondenzací) dalšího malonyl-CoA na butyryl-ACP, opět proběhne redukce keto-skupiny, dehydratace a redukce vodíkovým iontem, a vzniká C_6 acyl-ACP. Touto reakcí se prodlouží řetězec vždy o 2 atomy uhlíku. Celý proces syntézy končí

vytvořením mastných kyselin s 16 nebo 18 uhlíkovými atomy, známých také jako kyselina palmitová (C₁₆) a stearová (C₁₈). Pro vytvoření n-alkyl lipidů se výsledné produkty přesouvají do endoplazmatického retikula (ER), kde se přidáváním dalších dvouuhlíkatých jednotek můžou řetězce dále prodlužovat (Obr. 6). n-Alkany vznikají následnou redukcí a dekarboxylací n-mastné kyseliny, kdy dojde k odstranění aldehydové skupiny (-CHO). Odstraněním jednoho atomu uhlíku z řetězce dojde k typické převaze lichých uhlíkových řetězců nad sudými (Holtvoeth *et al.*, 2019).



Obrázek č. 6: n-Alkany jsou biosyntetizovány acetogenní cestou z pyruvátu, který vzniká z jednoduchých cukrů produkovaných během fotosyntézy. Příjmy a ztráty C nebo H během reakcí spolu s reakcemi mezi molekulami samotnými vedou k tomu, že jsou výsledné molekuly n-alkan lipidů o oba izotopy ochuzeny. ACP = proteinový nosič acetylu (acetyl carrier protein), CoA = ko-enzym A, NADPH = nikotinamid adenin dinukleotid fosfát. Převzato z Holtvoeth *et al.*, 2019, upraveno.

Delší uhlíkové řetězce n-alkanů, které prošly enzymatickým prodlužováním, jsou ochuzenější o těžší izotopy nežli kratší uhlíkové sloučeniny. Biochemické zpracování organických molekul rozlišuje těžké izotopy, a tedy během fotosyntézy způsobuje proměnlivé izotopové složení. Výsledné organické molekuly obsahující uhlík a vodík jsou zpravidla izotopově lehčí (ochuzené o ²H a ¹³C). Pro rostliny je frakcionační faktor (ε) vzniklých n-alkylových sloučenin oproti substrátu obvykle u uhlíku rovný -10 až -30 % a v případě vodíku se hodnoty pohybují v rozmezí -100 až -170 % (Holtvoeth *et al.*, 2019).

Experimenty prováděné na C₃ a C₄ travách ukázaly, že se jejich n-alkany liší nejen v izotopovém složení uhlíku, ale také vodíku. C₃ rostliny byly ochuzeny o ²H až o 40 ‰ více než C₄ (Gamarra & Kahmen, 2016). Při biosyntéze n-alkanů je výsledná hodnota δ²H určena hodnotou δ²H prekurzoru acetyl-CoA, přídavky ²H z různých zdrojů NADPH a přenosem ²H z okolní vody během biochemických reakcí (voda v listech, v xylému, nebo vnitrobuněčná voda u řas). Prekurzor je u obou typů rostlin stejný, neliší se v izotopovém složení vodíku. Přenos vodíku z okolní vody přispívá do biosyntézy lipidu pouze z 25 %, zatímco NADPH 50 % (zbývajících 25 % pochází z biochemického prekurzoru). Lze tedy předpokládat, že rozdíl v δ²H mezi C₃ a C₄ rostlinami dán různými zdroji NADPH. NADPH může mít dva různé zdroje vodíku. Může pocházet buď přímo ze světelné reakce fotosyntézy, nebo z pentosofosfátové dráhy, kde se oxidují uložené sacharidy. NADPH ze světelné reakce fotosyntézy je více ochuzen o ²H ve srovnání s NADPH z pentosofosfátového cyklu (Gamarra & Kahmen, 2015). Proto lze předpokládat, že NADPH produkovaný v buňkách svazkových pochev C₄ rostlin je o ²H více obohacen než NADPH produkovaný ve světelné fázi fotosyntézy C₃ rostlinami (Gamarra & Kahmen, 2016).

3.3. Interpretace sedimentárních n-alkanů pomocí δ¹³C a δD

V nižších zeměpisných šířkách můžeme využívat δ¹³C hodnoty n-alkanů pro určování vegetace na základě jejich metabolické dráhy. Rozdílná diskriminace ¹³C mezi C₃ a C₄ rostlinami se projevuje i listových voscích. Hodnoty δ¹³C n-alkylových lipidů s dlouhým řetězcem (C₂₉ a C₃₁) v C₃ rostlinách se pohybují kolem -35 ‰, zatímco pro C₄ rostliny je to kolem -20 ‰. Díky tomu jsme schopni rekonstruovat časoprostorové změny v C₃ a C₄ vegetaci, zejména relativní hojnost vegetace s převahou stromů a keřů v porovnání s pastvinami. Možnost využití δ¹³C, jak už jsem avizovala výše, je možná pouze pro nižší zeměpisné šířky, protože relativní zastoupení C₄ rostlin ve středních a vyšších zeměpisných šířkách je zanedbatelná (Holtvoeth *et al.*, 2019).

Na velikost celkové frakcionace fotosyntézy C₃ rostlin, a tudíž i jejich n-alkanů, má vliv dostupnost vody. Voda totiž ve svěracích buňkách listových průduchů kontroluje míru jejich otevřenosti, což ovlivňuje rychlost difúze atmosférického CO₂. Nedostatek vody, resp. uzavřené průduchy, tak mohou u C₃ rostlin vést k vytvoření o ¹³C méně ochuzených cukrů (Farquhar *et al.*, 1982). Za předpokladu, že nedocházelo v povodí jezera k velkým změnám v druhovém zastoupení vegetace (pylová analýza) a není ani zjevný důvod si myslet, že se měnilo izotopové složení atmosférického CO₂, mohou změny δ¹³C rostlinných n-alkylů uložených v sedimentárním profilu reprezentovat **změny humidity**, resp. dostupnost vody.

Hlavním diskriminačním procesem izotopů vodíků je změna skupenství. Těžký izotop vodíku se vypařuje hůře nežli lehčí, což způsobuje ochuzení vodní páry o ²H. Jak se vodní pára pohybuje od zdroje, dochází k její kondenzaci, přičemž snadněji kondenzují těžší izotopy. Znamená to tedy, že čím dále od výparného místa se voda nachází, tím ochuzenější o těžší izotopy vodíku bude. Děje se to proto, že kondenzace souvisí s teplotou – čím je vzduch na cestě mezi výparným místem a místem srážky chladnější, je schopen udržet méně a méně páry a zbavuje se jí kondenzací čili srážkami. Proto ochlazení

vzduchu vede k častějším srážkám zanechávajíc ve vzduchu vodní páru výrazně ochuzenou o ^2H . Z ní pak vyprší srážky lehčí, než měla srážka předchozí. Pokud tento jev aplikujeme na vývoj historického klimatu, pak chladnější období bude provázeno srážkami, které budou více ochuzené o ^2H než srážky v období teplém (pára se déle udržela ve vzduchu a méně ztrácela ^2H). Rostliny tedy přijímají srážkovou vodu s určitým izotopovým složením, ale respirací (evaporací) znovu mění její izotopové složení ještě před tím, než je využita biosyntetickými reakcemi. Při silné evaporaci se budou snadněji vypařovat lehké izotopy vodíku a v rostlinách bude zůstat voda nabohacená o ^2H a to až o 20 až 80 ‰ (Sachse *et al.*, 2004). Hodnoty $\delta^2\text{H}$ odvozené z lipidů suchozemských rostlin proto odrážejí kombinovaný signál jednak ze srážek, tak i z evapotranspirace. Tím se ovšem komplikuje jejich interpretace $\delta^2\text{H}$ jako proxy, které je schopné **rekonstruovat $\delta^2\text{H}$ srážkové vody, tj. i klimatu** (Holtvoeth *et al.*, 2019).

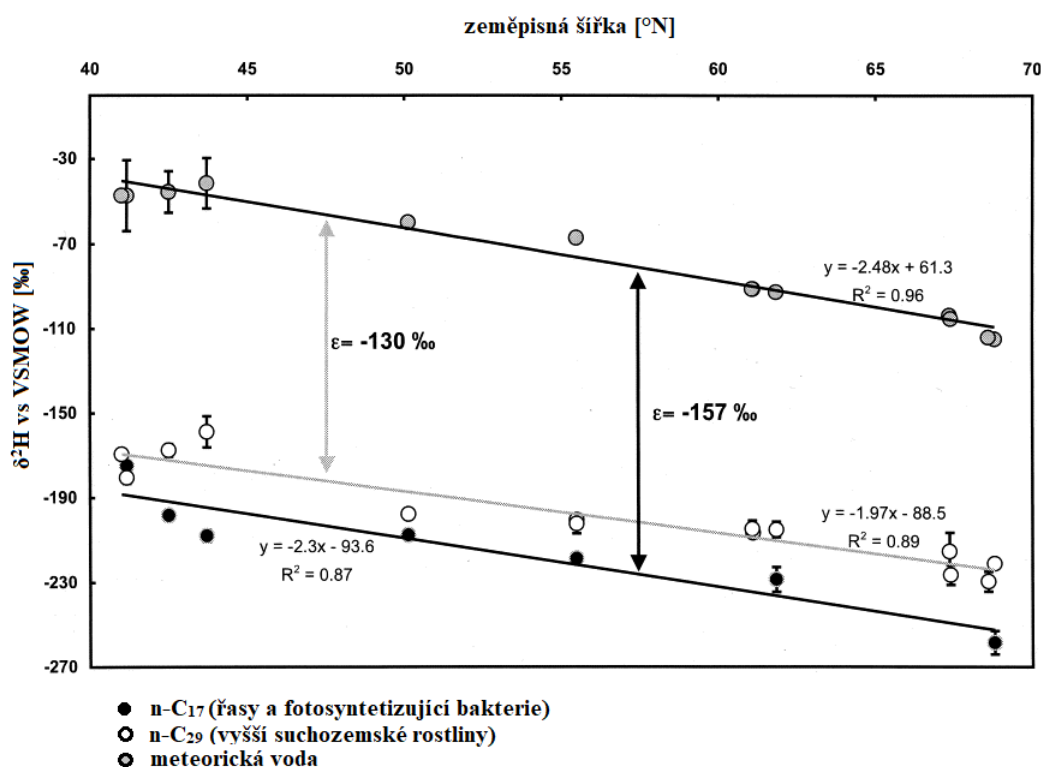
Zdrojem vodíku pro ponořené vodní makrofyty a řasy je voda z vodního sloupce. Pro jezera bez výrazného fluvialního přítoku vody ze vzdálených oblastí (s jiným klimatem) tak budou hodnoty $\delta^2\text{H}$ lipidů ponořených vodních makrofyt a řas odrážet především průměrnou hodnotu **$\delta^2\text{H}$ místních srážek řízenou klimatem** (Holtvoeth *et al.*, 2019). To potvrdili i Sachse *et al.* (2004) když zjistili, že $\delta^2\text{H}$ C_{17} n-alkanů z evropských jezerních sedimentů silně korelovaly s hodnotami $\delta^2\text{H}$ vody v jezeře a s $\delta^2\text{H}$ meteorické vody, což značí, že meteorická voda je hlavním zdrojem vodíku pro tvorbu C_{17} n-alkanů. Tento poznatek dokazuje, že frakcionace během tvorby organické hmoty je závislá pouze na použité biochemické dráze. Zjistili také, $\delta^2\text{H}$ C_{17} n-alkanů vykazují jasnou negativní korelaci se zeměpisnou šířkou a pozitivní korelaci s průměrnou roční teplotou vzduchu. Ve výsledku to znamená, že n-alkan C_{17} je schopným nástrojem pro zaznamenávání a rekonstrukci $\delta^2\text{H}$ hodnotu jezerní vody, a tudíž i teploty.

Zdá se tedy, že n-alkany různých délek uchované v sedimentech evropských jezer nevykazují stejný izotopový signál, a podle jejich $\delta^2\text{H}$ hodnot je můžeme rozdělit do čtyř hlavních skupin (Sachse *et al.*, 2004):

- (i) Krátké sudé řetězce (C_{12} , C_{14} , C_{16} , C_{18} , C_{20}) a C_{13} a C_{15} jsou připisovány bakteriím. Nízká koncentrace těchto látek v prostředí však často zabraňuje stanovit jejich $\delta^2\text{H}$ hodnoty. Hodnoty $\delta^2\text{H}$ z C_{16} a C_{18} pozitivně korelovaly se zeměpisnou šířkou ($\epsilon_{\text{látka/voda}}$ se u těchto sloučenin zvyšovala od severu k jihu) a negativně s průměrnou roční teplotou, hodnotami $\delta^2\text{H}$ meteorické vody a $\delta^2\text{H}$ hodnotami jezerní vody. Nižší frakcionační faktor C_{16} a C_{18} n-alkanů na severu by mohl být způsobený metanoxidujícími bakteriemi, což je ale v chladných a oligotrofních jezerech nepravděpodobné. Pro upřesnění hypotézy je nutný další výzkum, který by dokázal objasnit původ vodíku v alkanech s krátkým sudým řetězcem a zdali dochází k odlišné frakcionaci izotopů vodíku u heterotrofů ve srovnání s autotrofními organismy.
- (ii) Liché n-alkany se středně dlouhým uhlíkovým řetězcem (C_{17} , C_{19} , C_{21} , C_{23}) jsou pro využitím v paleolimnologii nejvhodnější, obzvláště pak C_{17} , jejichž hodnoty $\delta^2\text{H}$ vykazovaly jasnou negativní korelaci se zeměpisnou šířkou a pozitivní korelaci s roční průměrnou teplotou. Hodnoty $\delta^2\text{H}$ n-alkanu C_{17} také silně korelovaly s hodnotami $\delta^2\text{H}$ jezerní vody a meteorické vody. To dokazuje, že meteorická voda je hlavním zdrojem vodíku pro C_{17} n-alkany.

Rozsah frakcionace $\epsilon_{C17/W}$ byl konstantní podél celého severojižního transektu, který pokrývá různá podnebí a jezera s různou trofií, což podporuje domněnku, že frakcionace vodíku při vzniku organických molekul je určována pouze biochemickou syntézou n-alkanu a není ovlivněn jinak.

- (iii) Sudé n-alkany se středně dlouhým až dlouhým řetězcem (C_{22} , C_{24} , C_{26} , C_{28} , C_{30}) se v přírodě nachází ve velmi malých koncentracích a jejich využití je výrazně omezeno.
- (iv) Liché n-alkany s dlouhým řetězcem (C_{25} až C_{31}) jsou běžně považovány za vstup vyšších suchozemských rostlin. $\epsilon_{C29/W}$ vycházela o 30 ‰ těžší, než byl průměr u C_{17} n-alkanů. Listová voda v rostlinách může být obohacena o 2H o 20 až 80 ‰ ve srovnání s půdní vodou, což nastává v důsledku evapotranspiračních procesů v listech. Pokud budeme předpokládat, že terestrické a vodní rostliny sdílejí stejný zdroj vodíku (meteorickou vodu), mohl by rozdíl mezi hodnotami δ^2H terestrických a vodních n-alkyl lipidů sloužit jako **proxy pro evapotranspiraci jezerního systému** (Sachse *et al.*, 2004).



Obrázek č. 7: Korelace mezi zeměpisnou šířkou (evropská jezera na transektu SZ-JV) a hodnotami δ^2H meteorické vody, C_{17} n-alkanů C_{17} a C_{29} n-alkanů v jezerních sedimentech. Korelace zeměpisné šířky a δ^2H jezerní vody potvrzuje vliv teploty na δ^2H meteorické vody (zdroj vody v jezerech), a jak C_{17} tak C_{29} alkanly tyto změny odrážejí také. Ve vyšších zeměpisných šířkách C_{29} alkanly vykazují menší diskriminaci proti 2H než meteorická voda (směrnice křivky je mírnější), naproti tomu hodnoty δ^2H C_{17} alkanů zcela kopírují směrnici hodnot meteorické vody a ukazuje se tak, že alkanly C_{17} jsou spolehlivým proxy pro rekonstrukci 2H meteorické vody, tj. i klimatu. VSMOW - Vienna Standard Mean Ocean Water – izotopový standard pro stanovení δ^2H a $\delta^{18}O$ (upraveno podle Sachse *et al.*, 2004).

4. Glycerol dialkyl glycerol tetraethery (GDGTs) lipidy

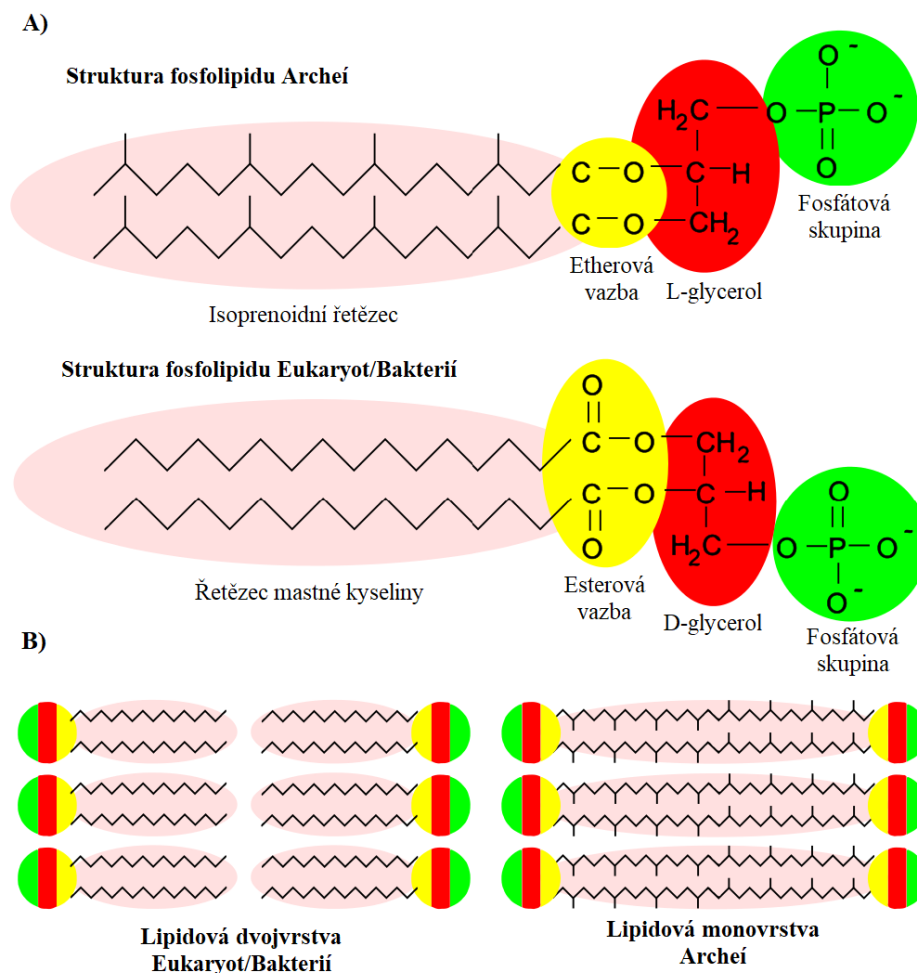
GDGTs jsou specifické organické molekuly tvořící cytoplazmatickou membránu Archeí. Dříve se mělo a to, že Archea osidlují pouze extrémní habitáty (vysoká salinita, vysoká teplota, nízké pH, anoxie) a specifické membránové lipidy - GDGTs – tvoří pouze tyto extremofilní Archea (Schouten *et al.*, 2013a). DeLong (1992) však zjistil, že se tyto organické molekuly běžně vyskytují i v prokysličených povrchových vrstvách oceánů, současně byly zjištěny také v oxických i anoxických mořských sedimentech (Hoefs *et al.*, 1997) což vedlo k přesvědčení, že výskyt Archeí je mnohem běžnější. Další výzkumy pak prokázaly přítomnost mezofilních Archeí v jezerních sedimentech i půdách, a doložili tak, že mezofilní Archea jsou ubikvisté vyskytující se jak ve vodním, tak i terestrickém prostředí (Hershberger *et al.*, 1996). Zajímavé zjištění také bylo, že se Archea v mořské vodě a sedimentech vyskytují ve vysokých abundancích, mohou zde tvořit 30 %, resp. 50 % mikrobiálního společenstva (Schouten *et al.*, 2013a). Archea, jako skupina známá hlavně z moří a oceánů, byla původně rozdělena na skupinu hypertermofilních archeí **Crenarchaeota** a skupinu metanogenních archeí **Euryarchaeota**. Objevení archeí žijících mimo extrémní podmínky vedlo k domněnce, že tato skupina mezofilních archeí je sesterskou skupinou Crenarchaeota a byla nazvána jako mezofilní Crenarchaeota. Jak však později ukázaly fylogenetické analýzy, tvoří tato skupina samostatný archeální kmen, který obsahuje amoniak oxidující archea – **Thaumarchaeota** (Pester *et al.*, 2011). Zatímco Crenarchaeota žijí jen v mořích a případně extrémních sladkovodních habitatech, Euryarchaeota a Thaumarchaeota jsou běžná i ve vnitrozemských vodách a jejich sedimentech (Schouten *et al.*, 2013a).

Archea je rozsáhlá starobylá skupina (doména) prokaryotických organismů a společně s bakteriemi a eukaryoty tvoří 3 základní domény života. V průběhu evolučního vývoje došlo u archeí k celé řadě adaptací, které je významně odlišují od zbylých domén. Jedním z nejdůležitějších rozpoznávacích znaků, který odlišuje archea od bakterií a eukaryot je složení jejich membránových lipidů (Obr. 8). Ty jsou tvořeny převážně dvěma typy isoprenoidních etherových lipidů, a to dialkyl glycerol diethery (DGDs – například archeol) složené ze 43 uhlíků a 86 uhlíkové glycerol dialkyl glycerol tetraethery (GDGTs). Podíl zastoupení GDGTs a DGDs v buněčných membránách je u jednotlivých skupin Archeí hodně individuální. Některé skupiny mohou produkovat pouze archeol a jiné mohou syntetizovat pouze GDGTs (Turich *et al.*, 2007). Archeol vytváří dvojvrstvou membránu, která je na první pohled podobná klasické fosfolipidové dvojvrstvě. Naopak GDGTs jsou odlišné hned několika způsoby (Zeng *et al.*, 2022):

- (i) nahrazení esterových vazeb, které spojují vícesytný alkohol (glycerol) a alifatický řetězec mastné kyseliny v klasické cytoplazmatické membráně, za etherové vazby (Jain *et al.*, 2014). Etherové vazby nejsou výsadou pouze Archeí. Vyskytují se plošně i u některých zástupců bakterií a eukaryot (Jain *et al.*, 2014). Například u některých (hyper)termofilních bakterií byly nalezeny struktury, které velmi připomínají GDGTs (Schouten *et al.*, 2013a). Nicméně oproti archeálním GDGTs nejsou distribuovány ubikvistně a nebývají majoritní složkou buněčných membrán (Jain *et al.*, 2014).

- (ii) alifatická část je v případě Archeí tvořena isoprenoidním řetězcem, který se často ještě dále větví nebo utváří cyklopropanové nebo cyklohexanové cykly, kdežto u eukaryot a bakterií jsou přítomny zbytky mastných kyselin (Damsté *et al.*, 2002);
- (iii) eukaryota a bakterie mají řetězce mastných kyselin navázány na sn-glycerol-3-fosfát, zatímco Archea své isoprenoidní řetězce vážou sn-glycerol-1-fosfát, což znamená, že jejich postavení je zrcadlové a utváří tak enantiomery (Koga *et al.*, 2007).
- (iv) v neposlední řadě někteří zástupci archea syntetizují spíše fosfolipidovou monovrstvu než dvojvrstvu. Monovrstvu si můžeme představit jako kovalentně vázanou dvojvrstvu. Tedy dva konce isoprenoidního řetězce dvou fosfolipidů se spojí kovalentní vazbou a vznikne tak mnohem stabilnější struktura (Schouten *et al.*, 2013a).

Všechny výše zmíněné adaptace vedou k větší stabilitě buněčné membrány a umožňují tak organismu přežít v extrémních podmínkách (Zeng *et al.*, 2022).



Obrázek č. 8: Rozdíl ve struktuře cytoplazmatické membrány Archeí a Eukaryot/Bakterií. A - fosfolipidy Archeí jsou tvořeny isoprenoidními řetězci navázanými na glycerol-1-fosfát etherovou vazbou, zatímco fosfolipidy Eukaryot/Bakterií jsou tvořeny lineárními řetězci mastných kyselin návaznými na glycerol-3-fosfát esterovými vazbami. B – cytoplazmatická membrána Archeí je tvořena lipidovou monovrstvou, v níž jsou isoprenoidní řetězce dvou fosfolipidů spojeny kovalentní vazbou (převzato z Rey *et al.* 2016, upraveno).

Archea a bakterie po sobě zanechávají fosilní tělesnou schránku jen velmi výjimečně. Proto pro jejich určování bylo potřeba vymyslet metodu, která by jejich přítomnost dokázala odhalit. A právě k tomu se využívají membránové lipidy (Baumann *et al.*, 2018). V životním prostředí je můžeme najít ve dvou formách. Buď jako neporušené polární lipidy (intact polar lipids ~ IPLs) nebo jako jádrové lipidy (core lipids ~ CLs) (Pitcher *et al.*, 2011). Jako jádrové lipidy označujeme hydrofobní část membránových lipidů, tedy tu část, která je „schovaná“ uprostřed dvojvrstvy a skládá se z uhlovodíkových konců navázaných na glycerol. Neporušené polární lipidy je obecné pojmenování pro jádrové lipidy společně s hydrofilními polárními hlavami, které se uskupují na vnější straně membrány směrem k vodnému prostředí a skládají se hlavně s fosfátových skupin a cukrů (Schouten *et al.*, 2010; Baumann *et al.*, 2018). Polární hlavová část sice poskytuje dodatečné taxonomické informace, ale chemicky je nestabilní a po zániku buňky dochází k rychlé degradaci (Baumann *et al.*, 2018). Využívají se tak většinou k identifikaci a posuzování dynamiky žijících mikrobiálních populací v různých prostředích (Schouten *et al.*, 2010). Naopak jádrové lipidy jsou stabilnější a vydrží v prostředí velmi dlouhou dobu (Baumann *et al.*, 2018), proto je lze využít ke studium archeálních aktivit v minulosti, a to až do miliónů let (Becker *et al.*, 2013). Považujeme je proto za fosilní biomarkery (Li *et al.*, 2022). Jádrové lipidy navíc nesou řadu informací o různých environmentálních parametrech, z jejich struktury můžeme například určit původ organické hmoty v sedimentech (Hopmans *et al.*, 2004), pH půdy nebo také průměrnou roční teplotu vzduchu (MAAT) (Weijers *et al.*, 2007). Proto se proxy, založené na analýze GDGTs, v současné době hojně využívají v paleolimnologii a paleoklimatologii pro paleorekonstrukce různých environmentálních proměnných.

4.1. isoGDGTs

GDGTs se primárně dělí do dvou skupin podle struktury uhlíkového skeletu, a to na isoprenoidní (isoGDGTs) a na rozvětvené (brGDGTs). Řetězce isoGDGTs se skládají ze série isoprenových jednotek a mohou obsahovat cyklopentanové kruhy, běžně v počtu 0 až 3 kruhy (Sun *et al.*, 2022), ale byly nalezeny lipidy, které obsahují až 8 cyklopentanových skupin (Schouten *et al.*, 2013a). Názvosloví se odvíjí od počtu cyklopentanových kruhů: podle množství kruhů přidáváme za GDGT odpovídající arabskou číslici (GDGT-0, GDGT-1, GDGT-2...) (Sun *et al.*, 2022) (Obr. 9). **GDGT-0**, nazývaný také **caldarchaeol**, je považován za nejčastější archeální membránový lipid a najdeme ho ve všech archeálních kmenech (Turich *et al.*, 2007), nicméně jeho největší zastoupení se nachází u metanogenních a metanotrofních archeí – Euryarchaeota, u kterých mnohdy tvoří jedinou formu GDGT (Schouten *et al.*, 2013a) (Tabulka č.1).

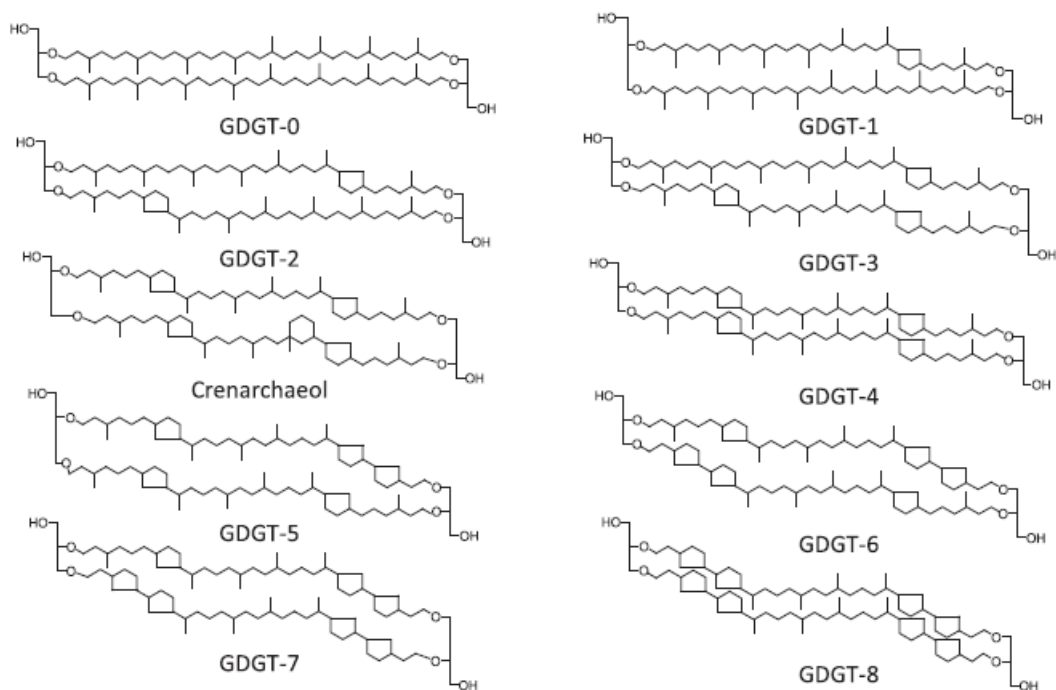
Tabulka č. 1: Skupiny Archea a jejich nejčastěji syntetizované formy isoGDGTs. cren – crenarchaeol. Data převzata z Schouten *et al.*, 2013a.

Archea skupina	Výskyt	typ isoGDGTs
extremofilní Crenarchaeota	moře, extrémní sladkovodní habitaty	0-8
metanogenní Euryarchaeota	moře a běžné sladkovodní habitaty	0 dominují, 1-4 minoritní
Thaumarchaeota	moře a běžné sladkovodní habitaty	cren a 0; 1-4 nejméně

Cyklizací uhlíkového řetězce dochází k zahuštění molekuly, a tak vzniká ještě teplotně stabilnější buněčná membrána. Jak bylo zjištěno u některých termofilních zástupců archeí ze skupiny Crenarchaeota, teplota okolního prostředí pozitivně koreluje s počtem cyklopentanových kruhů v isoprenoidních řetězcích jejich fosfolipidů. Mohlo by se tedy zdát, že cyklopentanové skupiny v buněčných membránách jsou speciální adaptací termofilních mikroorganismů. Později však byli objeveni mezofilní zástupci, kteří také syntetizují tento typ membránových fosfolipidů (DeLong *et al.*, 1998; Damsté *et al.*, 2002), a které dnes řadíme do kmene Thaumarchaeota. Přítomnost **GDGTs 1–4** tak byla prokázána v kulturách jak Crenarchaeota, Thaumarchaeota tak i některých Euryarchaeota (Tabulka č. 1). Thaumarchaeota, skupina archeí dominující ve vodním sloupci, jak moří, tak sladkovodních ekosystémů, často bývá hlavním zdrojem těchto GDGT. A to odpovídá i tomu, že GDGT 1-4 byly ve značném množství přítomny v místech, kde probíhá anaerobní oxidace metanu. GDGTs s vyšším počtem cyklopentanových kruhů (GDGTs 5-8) se vyskytují převážně v kulturách hypertermofilních Crenarchaeota a jejich výskyt nebyl nikdy prokázán v mezofilním prostředí (Schouten *et al.*, 2013a).

Crenarchaeol (cren, izomer je uváděn jako cren') je speciální membránový lipid, který kromě čtyř cyklopentanových jednotek obsahuje také jednu hexacyklovou (Sun *et al.*, 2022). Původně se předpokládalo, že crenarchaeol je biomarker pro mezofilní Archea, která se evolučně oddělila od termofilních archeí a že cyklohexan v molekule tvoří jakousi vypouklinu, která brání optimálnímu uspořádání buněčné membrány, čímž se normálně tuhá lipidová vrstva GDGT stává tekutější, a to umožňuje adaptaci na chladnější prostředí. Poté se však ukázalo, že crenarchaeol produkují i termofilní Thaumarchaeota a dnes je spojován hlavně s amoniak oxidujícími archei – Thaumarchaeota (Schouten *et al.*, 2013a) (Tabulka č. 1). Jedná se proto o ekologicky významnou molekulu, kterou můžeme používat jako biologický biomarker (Pitcher *et al.*, 2010).

Euryarchaeota neprodukují crenarchaeol, proto lze pomocí poměru relativního množství GDGT-0 ku crenarchaeolu v sedimentu identifikovat relativní zastoupení metanogenních archeí (Blaga *et al.*, 2009). Relativní množství GDGTs 1–4 v membránách Thaumarchaeota je mnohem nižší než relativní množství crenarchaeolu nebo GDGT-0, proto v prostředí (např. sedimentech), kde koncentrace GDGT 1-4 převažuje nad koncentrací crenarchaeolu, mohou být hlavním zdrojem GDGT 1-4 naopak metanogenní Euryarchaeota (Schouten *et al.*, 2013a).



Obrázek č. 9: Strukturální vzorce isoprenoidních GDGTs (isoGDGTs). Převzato z Schouten *et al.*, 2013a.

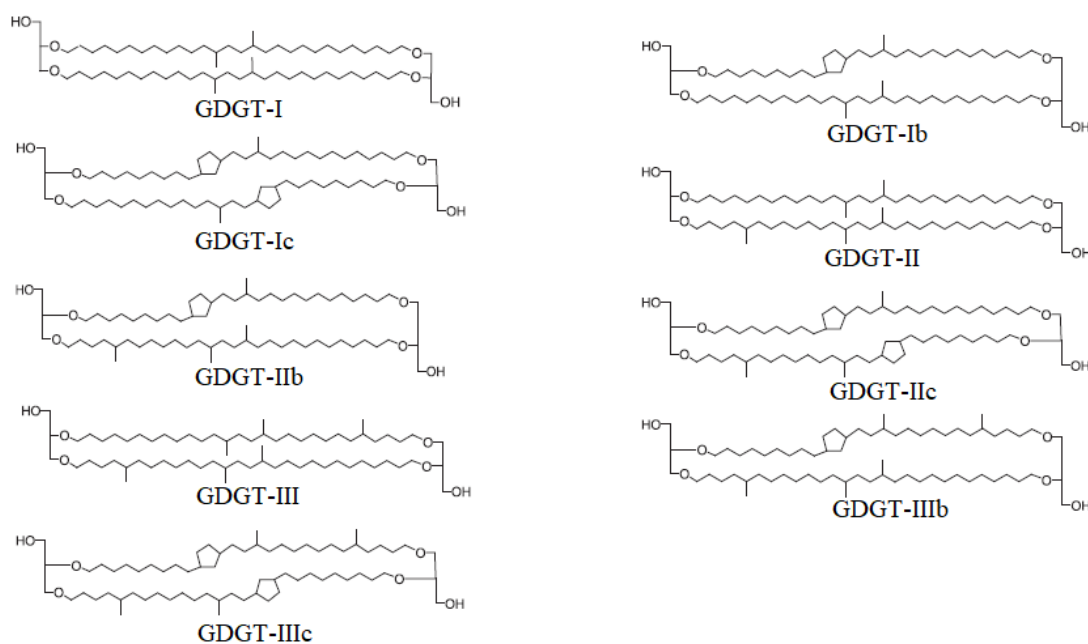
4.2. brGDGTs

Rozvětvené lipidy mají nahrazeny esterové vazby za etherové a často v těchto molekulách můžeme najít cyklopentanové skupiny, což by teoreticky mělo naznačovat jejich archeální původ. Klíčovým odlišujícím prvkem rozvětvených a isoprenoidních GDGTs je jejich stereochemie, resp. napojení alkylových řetězců na glycerolové jednotky. Zatímco u isoGDGTs se uhlovodíkové řetězce napojují na glycerol na uhlíky C-2 a C-3, u brGDGTs na C-1 a C-2 (Bechtel *et al.*, 2010), a to by mohlo ukazovat na jejich bakteriální původ (Weijers *et al.*, 2006). Další důkaz, který to naznačuje, je struktura alkylového řetězce, který se u brGDGT nachází ve formě 13,16-dimethyloktakosan (oktakosan patří mezi alkany a obsahuje 28 uhlíků), a ten je typický pro bakterie, zatímco všechna doposud známá archeální GDGTs mají isoprenoidní alkylový řetězec (Schouten *et al.*, 2013a). Přesný původ rozvětvených lipidů bohužel dodnes není zcela objasněn (Bechtel *et al.*, 2010; Martínez-Sosa & Tierney, 2019), a ačkoliv stereochemie a struktura alkanového řetězce brGDGTs ukazuje na bakteriální původ, doposud se dané lipidy nepovedlo úplně identifikovat ani kultivovat. Pouze jeden z patnácti v prostředí běžně nacházených brGDGTs se povedlo prokázat u dvou kultur kmenů Acidobakterií (Raberg *et al.*, 2022). Nepřekvapí proto, že největší koncentrace těchto lipidů byla zjištěna v rašelině, kde panuje trvale nasycené a anoxické prostředí s nízkým pH. Podle charakteru prostředí se proto odhadovalo, že tyto lipidy vytvářejí především heterotrofní (Zell *et al.*, 2014) anaerobní acidofilní bakterie (Naafs *et al.*, 2017) patřící do kmene Acidobacteria (Schouten *et al.*, 2013a).

Dlouhou dobu se proto předpokládalo, že brGDGTs vznikají výhradně v půdách a jejich původ v sedimentech vodních ekosystémů je pouze alochtonní. Tato teorie už je překonaná, neboť produkce

brGDGT byla dokázána in situ ve vodním sloupci jezer a moří (Loomis *et al.*, 2014; Rattray *et al.*, 2020). Vzhledem k tomu, že rozvětvené lipidy byly objeveny ve všech prostředích (půdy, rašelina, mořské a sladkovodní sedimenty...), můžeme tak tvrdit, že jsou téměř všudypřítomné (Loomis *et al.*, 2011).

Alkylové řetězce nejčastějších brGDGTs obsahují 4 až 6 methylových skupin (Sun *et al.*, 2022) a až 2 cyklopentanové skupiny, které vznikají vnitřní cyklizací uhlíkového řetězce. Pokud by lipid obsahoval všech 6 methylových skupin, potom platí, že 4 z nich se navážou uprostřed 28 uhlíkových alkylových řetězců a zbylé dva se pak vážou na pátý uhlík (C-5 a C-5'). Od množství methylových a cyklopentanových skupin se odvozuje označení jednotlivých lipidů. Pro označení brGDGTs používáme římské číslice, a to od I po III, které popisují, kolik modifikací konkrétní lipid má (Obr. 10). Čtyři modifikace jsou označeny číslicí I, pěti modifikacím přiřazujeme II a šest modifikací má číslici III. Doplňující informace o množství cyklopentanových jednotek poskytují malá písmena za římskou číslicí (b nebo c). Pokud je součástí uhlíkového řetězce jeden cyklopentanový kruh, potom přiřazujeme písmeno -b. Pokud jsou v řetězci dvě cyklopentanové skupiny, potom molekula dostává označení -c (Weijers *et al.*, 2007). Jako příklad lze uvést lipid GDGT-IIIb: molekula obsahuje šest modifikací – jeden cyklopentanový kruh a pět methylových skupin.



Obrázek č. 10: Strukturální vzorce rozvětvených GDGTs (brGDGTs). Převzato Weijers *et al.*, 2007.

De Jonge *et al.* (2013) se podařilo zdokonalit chromatografickou separaci brGDGTs a identifikovali tak novou skupinu pentametylovaných brGDGTs (II), která se liší polohou okrajových metylových skupin, místo na pátý uhlík se vážou na C-6 a C-6'. Tyto izomery se označují brGDGT II'. Později byly zjištěny také u hexametylovaných brGDGTs (III) a také u všech forem cyklických brGDGT II i III. Dnes je tedy možné identifikovat brGDGT II a II', IIb a IIb', IIc and IIc' a brGDGT III a III', IIIb a IIIb', IIIc a IIIc'. Nedávno byl objeven hexametylovaný brGDGT s navázanou jednou methylovou skupinou v pozici C-5 a druhou v poloze C-6' (Weber *et al.*, 2015). Tato forma byla zjištěna pouze

v jezerech, nevyskytovala se v okolních půdách, což dokazuje produkci přímo v jezerech a také to, že bakterie mohou v různých podmínkách produkovat různé formy brGDGTs (Russell *et al.*, 2018).

4.3. GDGTs proxy využívané pro paleorekonstrukce

Schopnost archeí upravovat strukturu lipidů v membránách na základě okolní teploty nebo pH, vysoká rezistence lipidů vůči degradaci a fakt, že jsou všudypřítomné, jsou klíčovými prvky, které z GDGTs dělají velmi spolehlivý nástroj pro paleorekonstrukce. Pro lepší schopnost predikovat vývoj klimatu v budoucnosti je důležité vědět, jak se klima měnilo v historii, a právě GDGTs lipidy mohou být velmi užitečným nástrojem pro interpretaci paleoklimatických záznamů uložených v jezerních a mořských sedimentech. Na základě struktury skeletu bylo odvozeno několik indexů, které dokážou rekonstruovat historickou teplotu vody nebo vzduchu.

4.3.1. Rekonstrukce povrchové teploty vody – TEX₈₆

TEX₈₆ neboli TetraEther index pro tetraethery složené z 86 atomů uhlíků (Schouten *et al.*, 2002) je parametr, který se hojně využívá k rekonstrukci povrchové teploty moře (Sea Surface Temperature ~ SST) (Becker *et al.*, 2013). Před publikováním TEX₈₆ se pro rekonstrukci teploty moří využíval jiný paleo-teplotní proxy, hlavně U^k₃₇ index, založený na počtu dvojných vazeb v C₃₇ řetězcích nenasycených ketonů (alkenolů) produkovaných bičikatými haptofytními fotosyntetizujícími mořskými bičíkovci (Powers *et al.*, 2004). Aplikace GDGT lipidů má však hned několik výhod: (i) membránové lipidy (GDGTs) jsou všudypřítomné, což umožňuje určovat teploty celosvětově, (ii) GDGTs jsou odolné vůči diagenězi, což umožňuje rekonstrukce až miliony let nazpět, (iii) a v neposlední řadě dokáže TEX₈₆ odhalit mnohem vyšší růstové teploty, než je to u U^k₃₇, který lze používat pouze do 28,5 °C. Schopnost určit i vysoké teploty je významná pro hodnocení extrémně teplého oceánu během Druhohor a Kenozoika (Zhang *et al.*, 2016). TEX₈₆ byl navržen v roce 2002 (Schouten *et al.*, 2002) a vycházel z lineární korelace mezi průměrnou roční povrchovou teplotou moře a abundancí cyklických isoGDGT ve 41 vzorcích povrchových mořských sedimentů z 15 globálně rozmístěných lokalit. Index je tedy závislý na počtu cyklopentanových skupin v uhlíkovém řetězci jádrových isoGDGTs a základním předpokladem je přibývání cyklopentanových jednotek s narůstající teplotou. Kromě kultivačních experimentů, které dokázaly, že relativní distribuce cyklopentanových skupin je silně závislá na teplotě, můžeme toto tvrzení pozorovat i v přírodě. Chladnější oblasti obsahují téměř výhradě GDGT-0 a crenarchaeol, zatímco v teplejších oblastech dominuje crenarchaeol (cren) a je doplněn o jeho regioizomer (cren') a isoGDGTs s jedním až třemi cyklopentanovými cykly. Ve výsledku to tedy znamená, že rozložení GDGTs se mění s teplotou mořské vody (Schouten *et al.*, 2002). Přesto však doposud nebyl zjištěn žádný přímý důkaz, který by s jistotou tvrdil, že teplota je jediným rozhodujícím faktorem, který určuje počet cyklických jednotek v uhlovodíkovém řetězci (Qin *et al.*, 2015). Dalšími faktorem by mohla být například salinita, která také pozitivně koreluje s teplotou vody, avšak zkoumané halofytní Archea ve vysokých koncentracích soli obsahovaly spíše dialkyl glycerol diethery nežli GDGTs. Množství živiny pravděpodobně ovlivňuje absolutní množství produkovaného GDGTs, nikoliv však relativní distribuci

jednotlivých frakcí. Zdá se tedy, že teplota je opravdu nejpravděpodobnějším faktorem řídícím produkci cyklických jednotek v GDGTs (Schouten *et al.*, 2002).

Samotná rovnice tetraetherového indexu je založena na relativním množství minoritních isoGDGTs, tedy GDGT-1, 2, 3 a cren' (pokud bychom k minoritním složkám přičetli crenarchaeol a GDGT-0, dostali bychom 100 %) (Schouten *et al.*, 2002):

$$\text{TEX}_{86} = \frac{[\text{GDGT-2}] + [\text{GDGT-3}] + [\text{cren}']}{[\text{GDGT-1}] + [\text{GDGT-2}] + [\text{GDGT-3}] + [\text{cren}']}$$

ve které sloučeniny v závorkách představují procentuální zastoupení dané látky. Vztah ročního průměru SST a TEX_{86} je dán lineární rovnicí:

$$\text{SST } (^\circ\text{C}) = \frac{\text{TEX}_{86} - 0,28}{0,015}, r^2 = 0,92.$$

GDGT-0 v rovnici zahrnut není, neboť kromě pelagických mezofilních Thaumarchaeota jej v mořích hojně produkují metanogenní Euryarchaeota. Jelikož Euryarchaeota neprodukují žádné nebo jen minoritní množství cyklických isoGDGTs, by byl relativní poměr jednodolých GDGTs v rovnici narušen a neodrážel by pouze vliv teploty. Navíc může GDGT-0 pocházet z archeí žijících přímo v anaerobním sedimentu nebo se do něj může dostat po odumření zooplanktonu, v jejichž střevech tyto anaerobní archea také žijí. Naproti tomu crenarchaeol a jeho izomer cren' produkují pouze Thaumarchaeota, nicméně crenarchaeol je produkován v o řád vyšších koncentracích, a proto byl z rovnice také vyjmut, aby neředil vliv minoritních GDGTs, a index počítá jen s jeho izomerem (cren').

Tato rovnice však nebyla úplně ideálním nástrojem pro rekonstrukci SST v chladnějších oblastech, protože v takovém prostředí je relativní abundance GDGT s cyklopentanovými skupinami mnohem menší (Schouten *et al.*, 2002). Proto byly zavedeny rovnice dvě, $\text{TEX}_{86}^{\text{H}}$ pro teplé tropické oblasti, a $\text{TEX}_{86}^{\text{L}}$ pro studené polární oblasti (Schouten *et al.*, 2013b):

$$\text{TEX}_{86}^{\text{H}} = \log \left[\frac{[\text{GDGT-2}] + [\text{GDGT-3}] + [\text{Cren}']}{[\text{GDGT-1}] + [\text{GDGT-2}] + [\text{GDGT-3}] + [\text{Cren}']} \right]$$

$$\text{TEX}_{86}^{\text{L}} = \log \left[\frac{[\text{GDGT-2}]}{[\text{GDGT-1}] + [\text{GDGT-2}] + [\text{GDGT-3}]} \right]$$

Bohužel ani tento index není dokonalým nástrojem pro určování SST zejména v pobřežních oblastech, neboť v jejich sedimentech může být vysoký podíl terestrického organického materiálu, který do sedimentů přináší další isoGDGTs a hodnoty indexu by mohly být výrazně zkresleny (Schouten *et al.*, 2013b).

Pro pochopení dynamiky **kontinentálního** klimatu nám rekonstrukce teploty moří příliš nepomůže, proto se další pozornost zaměřila na možnost rekonstrukce povrchové teploty vnitrozemských jezer. Powers *et al.* (2004) analyzovali isoGDGTs v povrchových sedimentech 4 velkých jezer z různých částí světa vybraných tak, aby pokryli široký rozsah klimatických podmínek, a rozhodli se poprvé aplikovat TEX_{86} pro rekonstrukci průměrné roční povrchové teploty jezer (mean Annual Lake Surface Temperature ~ ALST). Lineární vztah mezi ALST a TEX_{86} byl téměř identický jako původní vztah se SSL.

Dokládat aplikovatelnost indexu vnitrozemské vodní ekosystémy na příkladu 4 jezer však bylo nedostatečné, a tak Powers *et al.* (2010) provedli analýzu svrchních sedimentů 46 globálně rozmístěných jezer různých velikostí. Zjistili, že v mnoha malých jezerech nebyl detekován crenarchaeol, tudíž ani jeho izomer, což znamená, že buď se v těchto jezerech mezofilní archa nevyskytovala, nebo byla přítomnost lipidů z těchto archeí přehlušena lipidy alochtonního původu. K výpočtu vztahu tak mohlo být použito pouze 20 jezer, kde byly změřeny všechny frakce isoGDGT:

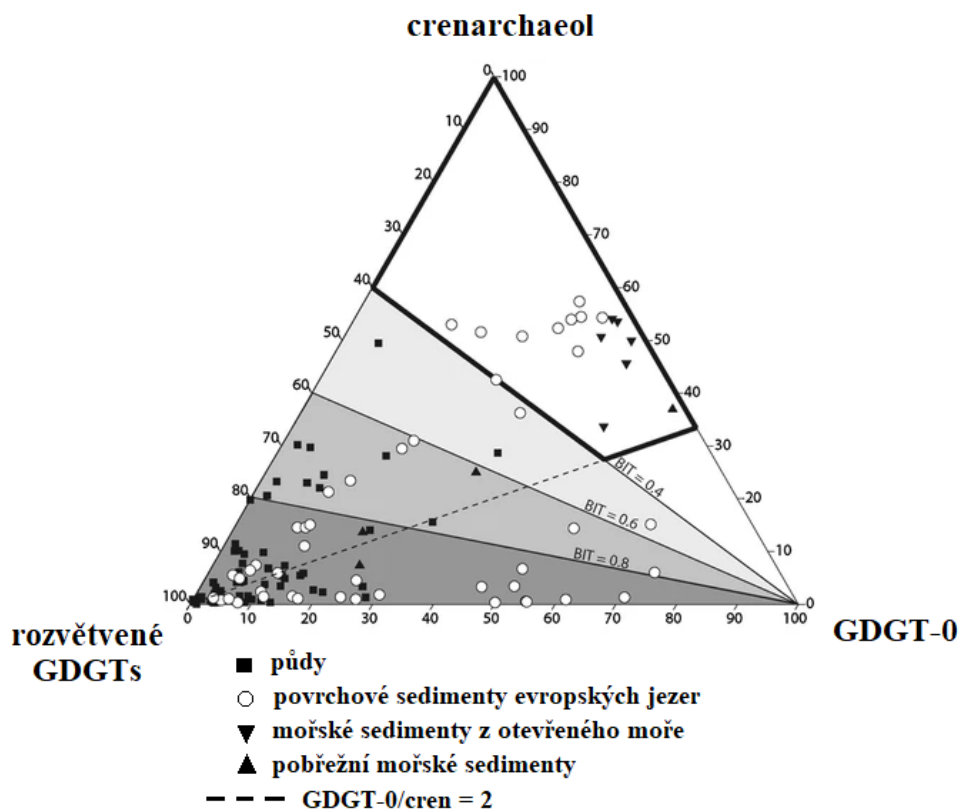
$$\text{ALST } (^{\circ}\text{C}) = -10,4 + 50,8 * \text{TEX}_{86}, r^2 = 0,68.$$

Předchozí studie však upozornily na skutečnost, že zejména u malých jezer může výsledek zkreslit velká míra alochtonního přísunu lipidů pocházejících z půdy, což ovlivní distribuci isoGDGTs (Weijers *et al.*, 2006; Blaga *et al.*, 2009). Autoři proto pro všech 20 jezer vypočítali BIT index (kapitola 4.3.2.), a jezera s vysokým podílem alochtonních zdrojů ze souboru vyloučili. Lineární vztah ALST zbylých 12 jezer a TEX_{86} byl mnohem těsnější:

$$\text{ALST } (^{\circ}\text{C}) = -14,0 + 55,2 * \text{TEX}_{86}, r^2 = 0,86.$$

Využívání TEX_{86} u jezer má tedy také jistá omezení. Index velmi dobře funguje u velkých jezer, avšak u menších jezer je potřeba brát na zřetel následující faktory (Obr. 11):

- (i) v jezerním prostředí můžou dominovat i další archea, které pozmění relativní zastoupení lipidů a pozmění tak odezvu indexu, např. významný příspěvek isoGDGT-1 až 4 methanogenními bakteriemi, pokud je jejich biomasa velká (viz. kapitola 4.1.). Vyvarování se nesprávných výsledků a odhalení významného vlivu methanogenních archeí můžeme pomocí aplikace poměru mezi GDGT-0 a crenarchaeolem (cren). Thaumarchaeota syntetizují současně cren i GDGT-0, zatímco methanogenní archea produkují pouze GDGT-0. Poměr **GDGT-0/cren** > 2 naznačuje, že zdrojem GDGT-0 v sedimentech byla jiná archa nežli Thaumarchaeota, a sedimentární profil, nebo jeho část takto ovlivněna, nemůže být pro TEX_{87} použita.
- (ii) velká míra alochtonního přísunu lipidů pocházejících z půdy výrazně ovlivňuje distribuci jednotlivých frakcí GDGT. V tomto případě je nutné vypočítat BIT index, který podíl alochtonních lipidů odhalí. Pokud budou hodnoty **BIT indexu** > 0,4, pak distribuce GDGTs byla silně ovlivněna přísunem lipidů z půdy, a na analyzovaný sediment, nebo jeho část, nemůže být aplikován TEX_{86} jako objektivní nástroj pro paleorekonstrukce (Blaga *et al.*, 2009)



Obrázek č. 11: Ternární diagram složení hlavních GDGTs v povrchových sedimentech 47 evropských jezer nacházejících se na celém severojižním transektu. Pro srovnání s hodnotami nalezenými v jezerech byly zobrazeny také hodnoty nalezené v půdách (data byla převzata z Weijers et al. 2006) a mořských sedimentech (u pobřeží i v otevřeném moři, data byla převzata z (Schouten et al., 2000)). Postupně se ztmavující šedá plocha představuje rostoucí BIT index a ukazuje, že jezerní sediment s vysokým BIT indexem má podobné složení GDGTs jako půdy (převažují brGDGTs). Přerušovaná čára reprezentuje poměr GDGT-0/cren = 2, a indikuje, že v jezerech, kde je poměr vyšší než 2 jsou zdrojem GDGT-0 jiná archea než *Thamarchaeota*, nejčastěji metanogenní *Euryarchaeota*. Ohraničení tlustou čarou tak vymezuje jezera s BIT < 0.4 and GDGT-0/crenarchaeol < 2, jejichž sedimenty mají potenciál pro úspěšnou aplikaci TEX₈₇. Převzato z Blaga et al., 2009, upraveno.

4.3.2. Původ GDGTs – BIT index

Jak už bylo zmíněno v půdách a v rašelinách jsou dominujícím lipidem brGDGTs, naopak ve vodách to bývají isoGDGTs, je tedy zřejmé, že crenarchaeol v sedimentech pochází převážně z vodního (autochtonního) vstupu. Hopmans *et al.* (2004) proto navrhli index založený na relativní četnosti těchto dvou typů GDGTs, který je schopen vysledovat relativní množství terestrického organického uhlíku v mořských i jezerních sedimentech. Index rozvětvených a isoprenoidních tetraetherů (Branched and Isoprenoid Tetraether index ~ BIT) se zakládá na relativní četnosti rozvětvených GDGT, které představují suchozemskou (alochtonní) organickou hmotu, a crenarchaeolu, který představuje vodní (autochtonní) organickou hmotu, a je definován takto:

$$\text{BIT} = \frac{[\text{GDGT-I}] + [\text{GDGT-II}] + [\text{GDGT-III}]}{[\text{cren}] + [\text{GDGT-I}] + [\text{GDGT-II}] + [\text{GDGT-III}]}$$

BIT index se tak v půdě a rašelině může blížit hodnotě 1, ve volném oceánu se hodnota BIT indexu bude blížit 0 (Li *et al.*, 2022), nicméně hodnoty v mořských a jezerních sedimentech se mohou pohybovat na celé škále od 0 d 1 (Xu *et al.*, 2020). U jezer je vliv vstupů z povodí závislý na velikosti jezera, resp.

na poměru plochy jezera ku ploše povodí, kdy malá jezera jsou vstupem z povodí ovlivněna výrazně více, zatímco velká jezera mnohem méně.

Úskalím použití BIT indexu je skutečnost, že i v půdách se mohou vyskytovat Archea produkující isoGDGTs, a výsledné hodnoty BIT tak mohou být zkresleny. Záleží také na množství isoGDGTs produkovaného přímo ve vodách a míře degradačních procesů (Zell *et al.*, 2014). Negativní ovlivnění výsledků BIT indexu může nastat v období, kdy Thaumarchaeota z nějakého důvodu neprodukuje cren, tzn. jeho koncentrace ve vodách budou nízké. Pokud v jezeře a v povrchové vrstvě panují oxické podmínky, cren podléhá selektivní degradaci, a to až 2x rychleji než brGDGTs. Naopak brGDGTs lipidy jsou vystaveny zvýšené degradaci během transportu z povodí, což je způsobené mikrobiální degradací a také fyzickým (hydrodynamickým) oddělením a zachycováním v půdách (Wu *et al.*, 2013). Pro spolehlivé uplatnění BIT indexu je tak ještě potřeba další zkoumání (Zell *et al.*, 2014). Kromě sledování transportu organické hmoty lze tento index využívat při rozhodování, zdali je možné použít další paleoklimatické proxy, MBT'/CBT.

4.3.3. Rekonstrukce teploty vzduchu MBT'/CBT

BrGDGTs lipidy produkované pravděpodobně bakteriemi, jsou tvořeny uhlovodíkovým řetězcem se 4 až 6 metylovými skupinami a 1 nebo 2 cyklopentanovými kruhy, které vznikají vnitřní cyklizací metylové skupiny. Předpokládá se, že změnou složení lipidů v membráně bakterie přizpůsobují tekutost membrány v reakci změny okolního prostředí, a částečně tak činí právě stupněm metylace a cyklizace produkovaných brGDGTs (Schouten *et al.*, 2013a). Jelikož se předpokládalo, že brGDGTs jsou produkovány výhradně v rašelinách a půdách, zaměřil se celosvětový výzkum na půdy. Ten ukázal, že stupeň metylace a cyklizace půdních brGDGTs koreluje s průměrnou roční teplotou vzduchu (Mean Annual Air Temperature ~ MAAT) a půdním pH (Weijers *et al.*, 2007). Autoři proto navrhli dva indikátory, methylační index rozvětvených tetraetherů (MBT) a cyklizační index rozvětvených tetraetherů (CBT). MTB představuje stupeň metylace (množství metylových skupin) v poloze C-5 a C-5':

$$MBT = \frac{[I + Ib + Ic]}{[I + Ib + Ic] + [II + IIb + IIc] + [III + IIIb + IIIc]}$$

$$MTB = -0,28 + 0,025 * MAAT, r^2 = 0,62.$$

Vysoká hodnota MBT poměru značí nízký stupeň metylace a koreluje s vyššími teplotami, a naopak nízká hodnota MBT poměru indikuje vysoký stupeň metylace a koreluje s nižšími teplotami. Analýza však také ukázala na vztah mezi MBT a půdním pH – vysoká hodnota MTB (nižší metylace) za nízkého pH a naopak. Negativní lineární korelace těchto dvou proměnných však byla slabá ($r^2 = 0,37$), když ale byly MAAT a pH půdy společně vyneseny proti MBT, byla závislost mnohem silnější:

$$MTB = 0,867 - 0,096 * pH + 0,021 * MAAT, r^2 = 0,82$$

Přidání metylové větve funguje pravděpodobně stejným způsobem jako tvorba cyklopentanových kruhů – zvyšuje fluiditu membrány.

Mikroorganismy jsou schopny přizpůsobit své složení cytoplazmatické buněčné membrány podle měnících se růstových teplot. Pro optimální fungování buňky je nezbytné udržovat jistý stupeň tekutosti membrány i při měnících se teplotách okolí, což zajistí právě změnou složení membránových lipidů. Tato vlastnost se nazývá homeoviskózní adaptace. Archea jsou schopna regulovat tekutost pomocí cyklopentanových skupin ve svých uhlíkových řetězcích, zatímco bakterie optimální stupeň fluidity zajišťují změnou délky řetězce, stupněm nasycení nebo stupněm větvení alkylových řetězců mastných kyselin. Například při poklesu růstové teploty z 65 na 45 °C produkovala termofilní bakterie *Bacillus* sp 8násobně víc mastných kyselin s rozvětveným řetězcem než nasycených mastných kyselin s lineárním řetězcem. Bakterie produkující brGDGTs, v reakci na měnící se teplotu, přizpůsobují své lipidové složení v membránách podobným způsobem, a to změnou množství methylových skupin navázaných na uhlíkové řetězce. Biosyntéza membránových lipidů se zvýšeným počtem methylových skupin pravděpodobně povede k volnějšímu zabalení, což umožní membráně zůstat v kapalném krystalickém stavu při nižších teplotách. Z energetického hlediska se tento proces zdá být výhodnějším, nežli syntéza delšího alkanového řetězce nebo tvorba dvojných vazeb (Weijers *et al.*, 2007).

CBT naopak udává relativní množství cyklopentanových skupin v uhlíkovém řetězci daného lipidu. Původně jednoduchý poměr navržený Weijesem *et al.* (2007):

$$CBT = \frac{[Ib] + [IIIb]}{[I] + [II]}$$

Ostatní rozvětvené lipidy byly z poměru vyloučeny, protože GDGT Ic, IIc, III, IIIb, a IIIc se v prostředí tak často nevyskytují a jejich nízké koncentrace by mohla zabránit správné kvantifikaci indexu. Vyšší hodnoty CBT indexu představují relativně vysoké abundance brGDGTs s cyklopentanovou skupinou. Jak již bylo zmíněno, v isoprenoidních GDGT membránových lipidech je počet cyklopentylových částí silně závislý na okolní teplotě, avšak vztah mezi poměrem cyklizace rozvětvených GDGT a roční MAAT nebyl nalezen vztah žádný ($r^2 = 0,03$). Zato byl zjištěn silný pozitivní exponenciální vztah CBT a pH (Weijers *et al.*, 2007).

$$CTB = 0,002 e^{0,65pH}, r^2 = 0,62.$$

Důležitou funkcí buněčné membrány je protonová permeabilita, která za pomoci pH gradientu umožňuje zásobování buňky energií (přísun H^+ pro tvorbu ATP). Přenos protonu s největší pravděpodobností zajišťují molekuly vody zachycené v lipidovém jádru membrán. Klíčovým faktorem pro přenos protonů se zdá být míra sbalení membrány, protože méně sbalená membrána (tj. s více cyklopentanovými nebo methylovými skupinami) dokáže pojmout více molekul vody a tím zvýšit protonovou permeabilitu (Weijers *et al.*, 2007).

Nelineární vztah CBT a pH se autoři rozhodli vyřešit logaritmickou úpravou CBT a získali tak lineární korelaci:

$$CBT = -\log\left(\frac{[Ib] + [IIIb]}{[I] + [II]}\right) \text{ a } CTB = 3,33 - 0,38 * pH, r^2 = 0,70.$$

To jim umožnilo ve vztahu MTB a pH vs. MAAT nahradit pH za CBT a vznikl tak MTB/CBT proxy pro rekonstrukci teploty vzduchu:

$$MTB = 0,122 + 0,187*CBT + 0,02*MAAT, r^2 = 0,77$$

Peterse *et al.* (2012) rozšířili dataset analyzovaných půd o dalších 126, společně s publikovanými daty získali soubor o velikosti 278 vzorků půd napříč všemi kontinenty. Jelikož se GDGT IIIb a IIIc často vyskytovaly v množství pod limitem detekce, byly z MBT vyloučeny a byly spočteny nové korelace:

$$MBT' = \frac{[I]+[Ib]+[Ic]}{[I] + [Ib]+[Ic]+[II]+[IIb]+[IIc]+[III]}$$

$$MAAT (^{\circ}C) = -0,64 + 22,9*MTB, r^2 = 0,47$$

$$pH = 7,90 - 1,97*CBT, r^2 = 0,70$$

$$MAAT (^{\circ}C) = -23,20 + 2,86*pH + 33,71*MTB', r^2 = 0,62$$

$$MAAT (^{\circ}C) = 0,81 - 5,67*CBT + 31,0*MTB', r^2 = 0,59$$

S možností separovat a kvantifikovat 5- a 6-methyl izomery hexametylovaných brGDGTs vyvstala otázka, jaké parametry prostředí ovlivňují produkované množství 6-methyl izomer (De Jonge *et al.*, 2014). Ukázalo se, že různé frakce brGDGT mají různý vztah k pH: 5-methyl brGDGT obsahující jeden cyklopentan (Ib, IIb, IIIb) s pH pozitivně korelovaly ($0,41 < r^2 < 0,55$), zatímco ty, obsahující dva cyklopentany (Ic, IIc, IIIc) měly korelaci s pH slabou ($0,02 < r^2 < 0,22$). BrGDGT-0 (bez cyklických jednotek) vykazovaly silnou negativní korelaci s pH ($r^2 = 0,72$), brGDGT-II slabou negativní korelaci ($r^2 = 0,34$) a brGDGT-III žádnou ($r^2 = 0,05$). Velmi zajímavé však bylo zjištění, že všechny 6-methyl brGDGTs (II', IIb', IIc', III', IIIb', IIIc') vykazovaly silnou pozitivní korelaci s pH ($0,41 < r^2 < 0,79$), a tím se potvrdil rozdílný vztah 5- a 6-methyl izomerů k pH. Vzhledem k relativně vysokému zastoupení izomerů 6-methyl brGDGT (průměrně tvořili 24 % všech brGDGTs v půdách) a jejich silné korelaci s pH se De Jonge *et al.* (2014) rozhodli přehodnotit MBT'/CBT a to tak, že vliv 6-methyl izomerů by měl být vyhodnocen vypočtením CBT_{5ME} and MBT'_{5ME} , které jsou založeny na abundanci pouze 5-methyl brGDGTs. Co se týče korelace pH a CBT_{5ME} , vyloučení 6-methyl brGDGT zpřesnilo kalibraci jen málo, neboť vztah je založen na cyklizaci ne na methylových skupinách. Zato vztah MBT'_{5ME} a pH, tak jak ho popsal Weijers *et al.* (2007) se zcela rozpadl ($r^2 = 0,05$) právě proto, že byly odstraněny na pH závislé 6-methyl formy brGDGTs. „Dvojrole“ MBT (vztah k MAAT a současně vztah k CBT) už nemusela být ve vztahu MBT a MAAT zohledněna, a lineární regrese mezi MBT'_{5ME} a MAAT byla upravena (De Jonge *et al.*, 2014):

$$MAAT = -8,57 + 31,45*MBT'_{5ME}, r^2 = 0,66.$$

Russell *et al.* (2018) chtěli zjistit, zda se dá půdní vztah MAAT a MTB' aplikovat také na **jezerní sedimenty**. Bohužel tato kalibrace výrazně podhodnocovala rekonstruovanou teplotu vzduchu, neboť se ukázalo, že v jezerech je distribuce nejen 5-methyl ale i některých 6-methyl izomerů brGDGTs řízena teplotou místo pH. Také se oproti původnímu předpokladu ukázalo, že brGDGTs mohou být produkovány nejen v půdách ale také přímo v jezerním prostředí, a že se liší od těch produkováných v půdách, což je

další skutečnost, která znemožňuje použití kalibrací založených na půdních vzorcích na jezerní sedimenty (review v Russel *et al.*, 2018 nebo Martínez-Sosa *et al.*, 2021). Martínez-Sosa *et al.* (2021) se proto pokusili o podobnou globální kalibraci MTB jakou provedl Weijers *et al.* (2007) pro půdy, a to na základě analýzy vzorků ze 272 vrchních vrstev sedimentů jezer rozprostřených na co nejširší škále MAAT a pH. Distribuci brGDGTs v sedimentech porovnávali s publikovanými daty o jejich distribuci v půdách a rašelinách a zjistili, že v půdách/rašelinách jsou rozvětvené lipidy GDGTs značně obohaceny o 6' izomer a převažuje v nich GDGT-I, zatímco v jezerním prostředí dominují 5' izomery a je zde vyšší množství lipidu GDGT-III. Navíc brGDGTs v jezerních sedimentech mají významně menší rozptyl v množství jednotlivých frakcí než ty v půdách a rašelinách. Všechny výše zmíněné poznatky podporují hypotézu, že i na globálním měřítku je to produkce in situ, kdo řídí distribuci brGDGTs v jezerních sedimentech. Pokud by totiž v sedimentech jezer obecně převažoval alochtonní vstup, projevovalo by se ekvivalentním množstvím 5' i 6' izotopů a vyšším rozptylem hodnot jednotlivých frakcí brGDGTs. Nicméně ani tak není možné úplně vyloučit vliv půdních vstupů, protože pro některá jezera může být stále velmi signifikantní. Když autoři zjistili, že v sedimentech dominují 5-methyl izomery a jezera tudíž nejsou obecně ovlivněna vstupem z půd, rozhodli se prozkoumat vztah MBT'_{5ME} k MAF (průměrná teplota měsíců nad bodem mrazu) a k MAAT. Zjistili že MBT'_{5ME} má silnější korelaci s MAF ($r^2 = 0.84$) nežli s MAAT ($r^2 = 0.77$). MAF totiž lépe zohledňuje sezónní šum v odezvě v brGDGTs na teplotu, který lze pozorovat v sezónně zamrzajících jezerech středních až vysokých zeměpisných šířek. Zdá se, že producenti brGDGTs jsou opravdu omezeni na sezónní období růstu, tzn. že nejsou aktivní v zimě, kdy jezera zamrzají. Tím, že neprodukují lipidy, které by odrážely aktuální teplotu, nepřináší do sedimentu informaci o teplotě z tohoto zimního období, a nadhodnocují tak rekonstrukci průměrné roční teploty vzduchu. Anebo to může také ukazovat, že brGDGTs nejsou schopny zaznamenat teploty vzduchu pod bodem mrazu kvůli ledové pokrývce, která vzduch a vodu, kde organismy žijí, odděluje. Proto brGDGTs mnohem lépe ukazují na průměrnou teplotu měsíců nad bodem mrazu. Vztah mezi MBT'_{5ME} a MAF popisuje regresní rovnice:

$$MBT'_{5ME} = 0,030(\pm 0,001)MAF + 0,075(\pm 0,012), r^2 = 0,82$$

Omezení ve využití rovnice by mohlo nastat, pokud by jezero mělo extrémní chemismus (kombinace vysoké alkality a vysokého výskytu specifických iontů) nebo pokud by šlo o příliš mělké jezero ve středních zeměpisných šířkách. V takovém případě by docházelo k předpovídání vyšších teplot, protože takováto mělká jezera nemají dostatečný objem, který by sezónní i denní výkyvy dokázal tlumit (Martínez-Sosa *et al.*, 2021).

5. Závěr

Rekonstrukce klimatu, vegetace nebo vývoj jezera je možný pouze pomocí zástupných ukazatelů (proxy) zachovaných v sedimentárních archívech. Problém těchto zástupných ukazatelů je jejich nepřímé spojení s rekonstruovanými parametry, a tak je nutné počítat s jistou chybou při výpočtu a nejistotě při interpretaci výsledků. Obecně to znamená, že je nutná vysoká míra opatrnosti při jejich využívání. V tabulce č. 2 jsou uvedeny hlavní proxy založené na dvou biomarkerech (n-alkany a GDGTs) využívané pro paleolimnologické rekonstrukce a jejich nedostatky, které je potřeba brát v potaz. Zároveň je zde uveden návrh, jak se omezením vyhnou, případně jaké doprovodné sedimentární ukazatele je vhodné použít pro ověření výsledků.

Tabulka č.2: Souhrnný přehled n-alkan a GDGTs paleoproxy, jejich využití, problémy nutné zohlednit při aplikaci nebo interpretaci a návrh doprovodných sedimentárních ukazatelů.

Proxy	Využití	Úskalí	Možné řešení
ACL	rekonstrukce vegetace;	vysoká druhová i mezidruhová variabilita délky řetězce spojena s enviromentálními podmínkami prostředí, rozdílné množství produkce n-alkyl lipidů	doplnění dalším paleoproxy (např. pylová analýza)
	průměrné roční teploty vzduchu	možný příspěvek středně dlouhých řetězců anaerobními bakteriemi přímý vliv změny klimatu na ACL vs nepřímý vliv klimaticky řízené změny druhového složení vegetace	bulk $\delta^{13}\text{C}$ (organická hmota pocházející z metanotrofních bakterií je více diskriminována o ^{13}C nežli OM pocházející z rostlin a fytoplanktonu) pylová analýza
CPI	rekonstrukce vegetace	vysoká variabilita hodnot	pylová analýza, rostlinné makrozbytky
	krytosemenné vs nahosemenné	nejsou	
	celkový terestrický vstup	nejsou	
P_{aq}	terestrický vs vodní zdroj => rekonstrukce výšky hladiny jezera	přítomnost krátkých řetězců produkovaných anaerobními heterotrofními organismy	bulk $\delta^{13}\text{C}$, subfossilní perloočky, rostlinné makrozbytky
n-alkyl $\delta^{13}\text{C}$	C_{29} a C_{31} : C_3 vs C_4	aplikace pouze pro nižší zeměpisné šířky příspěvek dlouhých alkanů aerobními bakteriemi	pylová analýza, rostlinné makrozbytky nelze odlišit
	C_{29} a C_{31} : klima (dostupnost vody)	změny v druhovém zastoupení vegetace v povodí	pylová analýza

		změny v izotopovém složení atmosférického CO ₂	izotopové složení ledovců (publikovaná data)
n-alkyl δ²H	C ₁₇ : rekonstrukce δ ² H hodnot jezerní vody	nízké koncentrace C ₁₇ n-alkanu v prostředí	nelze ničím nahradit
	C _{29 a 31} vs C ₁₇ : míra evaporace jezera	rozdílný zdroj vodíku u vodních a terestrických rostlin	nelze zjistit
TEX₈₆	rekonstrukce povrchové teploty jezera	přísun GDGTs z povodí (malá jezera)	BIT (musí být < 0.4)
		lipidy metanogenních archeí	poměr GDGT-0/cren (musí být < 2)
BIT	cren vs brGDGT => původ organického materiálu a zdali je vhodné použít TEX ₈₆ a MBT'/CBT indexu	produkce isoGDGTs i v půdě	nelze zjistit
		sezonalita v jezerní produkci cren	nelze zjistit
CBT/MBT'	rekonstrukce průměrné roční teploty vzduchu (MAAT)	vztah MTB'k pH	MBT' _{ME5}
		sezonalita v jezerní produkci brGDGTs	nutná kalibrace pro jednotlivé typy vzorků a lokality
	rekonstrukce průměrné teplota měsíců nad bodem mrazu (MFA)	více méně bez komplikací	

6. Seznam literatury

* jsou označeny sekundární citace

Andrae, J. W., McInerney, F. A. & Sniderman, J. M. K. (2020): Carbon isotope systematics of leaf wax n-alkanes in a temperate lacustrine depositional environment. *Organic Geochemistry*, 150, 104121.

Baumann, L. M. F., Taubner, R.-S., Bauersachs, T., Steiner, M., Schleper, C., Peckmann, J., Rittmann, S. K.-M. R., Birgel, D. (2018): Intact polar lipid and core lipid inventory of the hydrothermal vent methanogens *Methanocaldococcus villosus* and *Methanothermococcus okinawensis*. *Organic Geochemistry*, 126: 33–42.

Becker, K. W., Lipp, J. S., Zhu, C., Liu, X.-L., Hinrichs, K.-U. (2013): An improved method for the analysis of archaeal and bacterial ether core lipids. *Organic Geochemistry*, 61: 34–44.

Bechtel, A., Smittenberg, R. H., Bernasconi, S. M., Schubert, C. J. (2010): Distribution of branched and isoprenoid tetraether lipids in an oligotrophic and a eutrophic Swiss lake: Insights into sources and GDGT-based proxies. *Organic Geochemistry*, 41: 822–832.

Betts, J.G., Young, K.A., Wise, J.A., Johnson, E., Poe, B., Kruse, D.H., Korol, O., Johnson, J. E., Womble, M., DeSaix, P. (2022). Anatomy and Physiology 2e [online]. OpenStax, Houston, Texas [cit. 2022-06-28]. Dostupné z: <https://openstax.org/books/anatomy-and-physiology/pages/3-1-the-cell-membrane>

Blaž, C. I., Reichert, G.-J., Heiri, O., Damste, J. S. S. (2009): 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*, 41: 523–540.

Bowen, G. J. & Revenaugh, J. (2003): Interpolating the isotopic composition of modern meteoric precipitation. *Water Resources Research*, 39, 1299.

Bush, R. T. & McInerney, F. A. (2013): Leaf wax n-alkane distributions in and across modern plants: Implications for paleoecology and chemotaxonomy. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 117: 161–179

CAO, Min (2016). Biomarker proxies as quantitative indicators of climate variability in the Montcortés lake. PhD Thesis, Universitat Autònoma de Barcelona, Institut de Ciència i Tecnologia Ambientals. Barcelona.

Castañeda, I. S. & Schouten, S. (2011): A review of molecular organic proxies for examining modern and ancient lacustrine environments. *Quaternary Science Reviews*. 30: 2851–2891.

*Cranwell, P. A. (1973): Chain-length distribution of n-alkanes from lake sediments in relation to post-glacial environmental change. *Freshwater Biology*. 3: 259–265.

Cranwell, P. A. (1981). Diagenesis of free and bound lipids in terrestrial detritus deposited in a lacustrine sediment. *Organic Geochemistry*, 3: 79-89.

Damsté, J. S. S., Schouten, S., Hopmans, E. C. van Duin, A. C. T., Geenevasen, J. A. J. (2002): Crenarchaeol: The characteristic core glycerol dibiphytanyl glycerol tetraether membrane lipid of cosmopolitan pelagic crenarchaeota. *Journal of Lipid Research*, 43: 1641–1651.

De Jonge, C., Hopmans, E. C., Stadnitskaia, A., Rijpstra, W. I. C., Hofland, R., Tegelaar, E., Damste, J. S. S. (2013): Identification of novel penta- and hexamethylated branched glycerol dialkyl glycerol tetraethers in peat using HPLC-MS2, GC-MS and GC-SMB-MS. *Organic Geochemistry*, 54: 78–82.

De Jonge, C., Hopmans, E. C., Zell, C. I., Kim, J.-H., Schouten, S., Damste, J. S. S. (2014): Occurrence and abundance of 6-methyl branched glycerol dialkyl glycerol tetraethers in soils: Implications for palaeoclimate reconstruction. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 141: 97–112.

Delong, E. F. (1992): Archaea in coastal marine environments. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, 89: 5685-5689.

- DeLong, E. F., King, L. L., Massana, R., Cittone, H., Murray, A., Schleper, C., Wakeham, S. G. (1998): Dibiphytanyl ether lipids in nonthermophilic crenarchaeotes. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 1133–1138.
- Diefendorf, A. F. & Freimuth, E. J. (2017): Extracting the most from terrestrial plant-derived n-alkyl lipids and their carbon isotopes from the sedimentary record: A review. *Organic Geochemistry*, 103: 1-21.
- wangendorf, A. F., Freeman, K. H., Wing, S. L., Graham, H. V. (2011): Production of n-alkyl lipids in living plants and implications for the geologic past. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 75: 7472–7485.
- Eglinton G. & Hamilton, R. J. (1963). The distribution of alkanes. In: Swain, T. (ed.) *Chemical Plant Taxonomy*, Academic Press Inc, New York: 187-218.
- Eglinton, G., Gonzalez, A. G., Hamilton, R. J., Raphael, R. A. (1962): Hydrocarbon constituents of the wax coatings of plant leaves – a taxonomic survey. *Phytochemistry*, 1: 89–102.
- Farquhar, G. D., O’Leary, M. H., Berry, J. A. (1982): On the relationship between carbon isotope discrimination and the intercellular carbon dioxide concentration in leaves. *Australian Journal of Plant Physiology*, 9: 121–137.
- Ficken, K. J., Li, B., Swain, D. L., Eglinton, G. (2000): An n-alkane proxy for the sedimentary input of submerged/ floating freshwater aquatic macrophytes. *Organic Geochemistry*, 31: 745–749.
- Gamarra, B. & Kahmen, A. (2015): Concentrations and delta H-2 values of cuticular n-alkanes vary significantly among plant organs, species and habitats in grasses from an alpine and a temperate European grassland. *Oecologia*, 178: 981-998.
- Gamarra, B., Sachse, D., Kahmen, A. (2016): Effects of leaf water evaporative H-2-enrichment and biosynthetic fractionation on leaf wax n-alkane H-2 values in C3 and C4 grasses. *Plant, Cell & Environment*, 39: 2390-2403.
- Gkinis, V., Vinther, B. M., Popp, T. J., Quistgaard, T., Faber, A.-K., Holme, C. T. *et al.* (2021): A 120,000-year long climate record from a NW-Greenland deep ice core at ultra-high resolution. *Scientific data*, 8, 141.
- Hayes, J. M., Strauss, H. and Kaufman, A. J. (1999): The abundance of ¹³C in marine organic matter and isotopic fractionation in the global biogeochemical cycle of carbon during the past 800 Ma. *Chemical Geology*, 161: 103–125.
- Hershberger, K. L., Barns, S. M., Reysenbach, A. L., Dawson, S. C., Pace, N. R. (1996): Wide diversity of *renarchaeota*. *Nature*, 384: 420–420.
- Hoefs, M. J. L., Schouten, S., De Leeuw, J. W., King, L. L., Wakeham, S. G., Damsté J. S. S. (1997): Ether Lipids of Planktonic Archaea in the Marine Water Column †, *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 3090–3095.
- Holtvoeth, J., Whiteside, J. H., Engels, S., Freitas, F. S., Grice, K., Greenwood, P., Johnson, S., Kendall, I., Lengger, S. K., Luecke, A., Mayr, C., Naafs, B. D. A., Rohrsen, M., Sepulveda, J. (2019): The paleolimnologist’s guide to compound-specific stable isotope analysis – An introduction to principles and applications of CSIA for Quaternary lake sediments. *Quaternary Science Reviews*, 207: 101–133.
- Hopmans, E. C. Weijers, J. W. H., Schefuss, E., Herfort, L., Damste, J. S. S., Schouten, S. (2004): A novel proxy for terrestrial organic matter in sediments based on branched and isoprenoid tetraether lipids. *Earth and Planetary Science Letters*, 224: 107–116.
- Jain, S., Caforio, A., Driessen, A. J. M. (2014): Biosynthesis of archaeal membrane ether lipids. *Frontiers in Microbiology*, 5, 641.
- Jeng, W.L. (2006): Higher plant n-alkane average chain length as an indicator of petrogenic hydrocarbon contamination in marine sediments. *Marine Chemistry*, 102: 242–251.
- Koga, Y. & Morii, H. (2007): Biosynthesis of Ether-Type Polar Lipids in Archaea and Evolutionary Considerations. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71: 97–120.

- Koch, K. & Ensikat, H. J. (2008): The hydrophobic coatings of plant surfaces: Epicuticular wax crystals and their morphologies, crystallinity and molecular self-assembly. *Micron*, 39: 759–772.
- LÁNOVÁ, Zuzana (2022). Interpretace stabilních izotopů uhlíku v archivech jezerních sedimentů. Bakalářská práce, Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta. Praha.
- Li, G., Li, L., Tarozo, R., Longo, W. M., Wang, K. J., Dong, H., Huang, Y. (2018): Microbial production of long-chain n-alkanes: Implication for interpreting sedimentary leaf wax signals. *Organic Geochemistry*, 115: 24–31.
- Li, Y., Su, X., Jiao, L., Chen, F., Cheng, S. (2022): Intact Polar and Core Tetraether Lipids in Sediments from the Haiyang 4 Cold-seep of the Northern South China Sea and their Implications. *Acta Geologica Sinica*, 96: 691–700.
- Ling, Y., Zheng, M., Wang, S., Sun, Q., Xie, B., Zhang, C. (2021): The Impact of Climatic and Environmental Factors on n-Alkanes Indices in Southwestern Tibetan Plateau. *Acta Geologica Sinica*, 95: 648–658.
- Lockheart, M. J., VanBergen, P. F., Evershed, R. P. (1997): Variations in the stable carbon isotope compositions of individual lipids from the leaves of modern angiosperms: implications for the study of higher land plant-derived sedimentary organic matter. *Organic Geochemistry*, 26: 137–153.
- Loomis, S. E., Russell, J. M., Damste, J. S. S. (2011): Distributions of branched GDGTs in soils and lake sediments from western Uganda: Implications for a lacustrine paleothermometer. *Organic Geochemistry*, 42: 739–751.
- Loomis, S. E., Russell, J. M., Heurreux, A. M., D'Andrea, W. J., Damste, J. S. S. (2014): Seasonal variability of branched glycerol dialkyl glycerol tetraethers (brGDGTs) in a temperate lake system. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 144: 173–187.
- Martínez-Sosa, P. & Tierney, J. E. (2019): Lacustrine brGDGT response to microcosm and mesocosm incubations. *Organic Geochemistry*, 127: 12–22.
- Martínez-Sosa, P., Tierney, J. E., Stefanescu, I. C., Crampton-Flood, E. D., Shuman, B. N., Routson, C. (2021): A global Bayesian temperature calibration for lacustrine brGDGTs. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 305: 87–105.
- Marzi, R., Torkelson, B. E., Olson, R. K. (1993): A revised carbon preference index. *Organic Geochemistry* 20: 1303–1306.
- MCMURRY, John (2015). *Organická chemie*. 1. vydání Vysoké učení technické v Brně, nakladatelství VUTIUM ; Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 1178 s. ISBN 978-80-214-4769-1
- Meyers P. A. (2003): Application of organic geochemistry to paleolimnological reconstruction a summary of examples from the Laurentian Great Lakes. *Organic Geochemistry*, 34: 261–289.
- Meyers, P. A. & Teranes J. L. (2001). Sediment Organic Matter. In: Last W. M. & Smol, J.P. (eds.) Tracking Environmental Change Using Lake Sediments. Volume 2: Physical and Geochemical Methods. 1st edition. Dordrecht: Springer Dordrecht: 239-269 p.
- Naafs, B. D. A., Inglis, G. N., Zheng, Y., Amesbury, M. J., Biester, H., Bindler, R., Blewett, J., Burrows, M. A., del Castillo Torres, D., Chambers, F. M. (2017): Introducing global peat-specific temperature and pH calibrations based on brGDGT bacterial lipids. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 208: 285–301.
- Nott, C. J., Xie, S. C., Avsejs, L. A., Maddy, D., Chambers, F. M., Evershed, R. P. (2000): n-Alkane distributions in ombrotrophic mires as indicators of vegetation change related to climatic variation. *Organic Geochemistry*, 31: 231–235.
- Pearson, A. & Ingalls, A. E. (2013): Assessing the use of archaeal lipids as marine environmental proxies. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*, 41: 359–384.
- Pester, M., Schleper, C., Wagner, M. (2011): The *Thaumarchaeota*: An emerging view of their phylogeny and ecophysiology. *Current Opinion in Microbiology*, 14: 300–306.

- Peterse, F., van der Meer, J., Schouten, S., Weijers, J. W. H., Fierer, N., Jackson, R. B., Kim, J.-H., Damsté J. S. S. (2012): Revised calibration of the MBT–CBT paleotemperature proxy based on branched tetraether membrane lipids in surface soils. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 96: 215–229.
- Pitcher, A., Rychlik, N., Hopmans, E. C., Spieck, E., Rijpstra, W. I. C., Ossebaar, J., Schouten, S., Wagner, M., Damste, J. S. S. (2010): Crenarchaeol dominates the membrane lipids of *Candidatus Nitrososphaera gargensis*, a thermophilic Group I.1b Archaeon. *ISME Journal*, 4: 542–552.
- Pitcher, A., Wuchter, C., Siedenberg, K., Schouten, S., Damste, J. S. S. (2011): Crenarchaeol tracks winter blooms of ammonia-oxidizing *Thaumarchaeota* in the coastal North Sea. *Limnology and Oceanography*, 56: 2308–2318.
- Power, L., Werne, J. P., Vanderwoude, A. J., Damsté, J. S. S., Hopmans, E. C., Schouten, S. (2010): Applicability and calibration of the TEX86 paleothermometer in lakes. *Organic Geochemistry*, 41: 404–413.
- Powers, L. A., Werne, J. P., Johnson, T. C., Hopmans, E. C., Damste, J. S. S., Schouten, S. (2004): Crenarchaeotal membrane lipids in lake sediments: A new paleotemperature proxy continental paleoclimate reconstruction? *Geology*, 32: 613–616.
- *Poynter J. G., Farnimond, P., Robinson, N., Eglinton, E. (1989). Aeolian-derived higher plant lipids in the marine sedimentary record: links with palaeoclimate. In: Leinen, M., Sarnthein, M. (Eds.), *Paleoclimatology and Paleometeorology: Modern and Past Patterns of Global Atmospheric Transport*, Kluwer, 1st edition Dordrecht, 435–462 p.
- Qin, W., Carlson, L. T., Armbrust, E. V., Devol, A. H., Moffett, J. W., Stahl, D. A., Ingalls, A. E. (2015): Confounding effects of oxygen and temperature on the TEX86 signature of marine *Thaumarchaeota*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112: 10979–10984.
- Raberg, J. H., Miller, G. H., Geirsdottir, A., Sepulveda, J. (2022): Near-universal trends in brGDGT lipid distributions in nature. *Science advances*, 8, 7625.
- Rattray, J. E. & Smittenberg, R. H. (2020): Separation of Branched and Isoprenoid Glycerol Dialkyl Glycerol Tetraether (GDGT) Isomers in Peat Soils and Marine Sediments Using Reverse Phase Chromatography. *Frontiers in Marine Science*, 7, 539601.
- Russell, J. M., Hopmans, E. C., Loomis, S. E., Liang, J., Damste, J. S. S. (2018): Distributions of 5- and 6-methyl branched glycerol dialkyl glycerol tetraethers (brGDGTs) in East African lake sediment: Effects of temperature, pH, and new lacustrine paleotemperature calibrations. *Organic Geochemistry*, 117: 56–69.
- Rye, C., Wise, R., Jurukovski, V., DeSaix, J., Choi, J. & Avissar, Y. (2016). Biology [online]. OpenStax, Houston, Texas [cit. 2022-06-xx dopln]. Dostupné z: <https://openstax.org/books/biology/pages/22-2-structure-of-prokaryotes>
- Sachse, D., Radke, J., Gleixner, G. (2004): Hydrogen isotope ratios of recent lacustrine sedimentary n-alkanes record modern climate variability. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 68: 4877–4889.
- Sessions, A. L., Burgoyne, T. W., Schimmelmann, A., Hayes, J. M. (1999) Fractionation of hydrogen isotopes in lipid biosynthesis. *Organic Geochemistry*, 30: 1193–1200.
- Schouten, S., Hopmans, E. C. and Damsté, J. S. S. (2013a): The organic geochemistry of glycerol dialkyl glycerol tetraether lipids: A review. *Organic Geochemistry*, 54: 19–61.
- Schouten, S., Hopmans, E. C., ancost, R. D., Damste, J. S. S. (2000): Widespread occurrence of structurally diverse tetraether membrane lipids: Evidence for the ubiquitous presence of low-temperature relatives of hyperthermophiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97: 14421–14426.
- Schouten, S., Hopmans, E. C., Rosell-Mele, A., Pearson, A., Adam, P., Bauersachs, T., Bard, E., Bernasconi, S. M., Bianchi, T. S., Brocks, J. J. *et al.* (2013b): An interlaboratory study of TEX86

- and BIT analysis of sediments, extracts, and standard mixtures. *Geochemistry, Geophysics, Geosystems*, 14: 5263–5285.
- Schouten, S., Hopmans, E. C., Schefuss, E., Damste, J. S. S (2002): Distributional variations in marine crenarchaeotal membrane lipids: a new tool for reconstructing ancient sea water temperatures? *Earth and Planetary Science Letters*, 204: 265–274.
- Schouten, S., Middelburg, J. J., Hopmans, E. C., Damste, J. S. S. (2010): Fossilization and degradation of intact polar lipids in deep subsurface sediments: A theoretical approach. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 74: 3806–3814.
- Smol, J. P., Birks, H. J. B, Last, V. M., Bradley, R. S., Alverson, K. (2001a). Tracking Environmental Change Using Lake Sediments. Volume 3: Terrestrial, Algal, and Siliceous Indicators. 1st edition. Dordrecht: Springer Dordrecht, 371 p.
- Smol, J.P., Birks, H.J.B, Last, V.M., (2001b). Tracking Environmental Change Using Lake Sediments. Volume 4: Zoological Indicators. 1st edition. Dordrecht: Springer Dordrecht, 218 p.
- Sun, C., Li, H., Li, W., Li, X., Lue, X. (2022): Characteristics of isoprenoid and branched tetraether lipids in the deep ocean: implications from surface sediments in the seamount area of the Western Pacific Ocean. *Marine Chemistry*, 240, 104086.
- ŠANTŮČEK, J., ŠANTŮČKOVÁ a kolektiv (2014). Stabilní izotopy a jejich použití v biologii a ekologii. 1. vydání. České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, 111 s. ISBN: 978-80-7394-481-0
- Tipple, B. J. & Pagani, M. (2013): Environmental control on eastern broadleaf forest species' leaf wax distributions and D/H ratios. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 111: 64–77
- Turich, C., Freeman, K. H., Bruns, M. A., Conte, M., Jones, A. D., Wakeham, S. G. (2007): Lipids of marine Archaea: Patterns and provenance in the water-column and sediments. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 71: 3272–3291.
- VINTER, Štěpán (2009). Stanovení n-alkanů v prostředí. Bakalářská práce. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta. Brno.
- Weber, Y., De Jonge, C., Rijpstra, W. I. C., Hopmans, E. C., Stadnitskaia, A., Schubert, C. J., Lehmann, M. F., Damste, J. S. S., Niemann, H. (2015): Identification and carbon isotope composition of a novel branched GDGT isomer in lake sediments: Evidence for lacustrine branched GDGT production. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 154: 118–129
- Weijers, J. W. H., Schouten, S., Spaargaren O. C., Damsté J. S. S. (2006): Occurrence and distribution of tetraether membrane lipids in soils: Implications for the use of the TEX86 proxy and the BIT index. *Organic Geochemistry*, 37: 1680–1693.
- Weijers, J. W. H., Schouten, S., van den Donker, J. C., Hopmans, E. C., Damste, J. S. S. (2007): Environmental controls on bacterial tetraether membrane lipid distribution in soils. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 71: 703–713.
- Wu, W., Zhao, L., Pei, Y., Ding, W., Yang, H., Xu, Y. (2013): Variability of tetraether lipids in Yellow River-dominated continental margin during the past eight decades: Implications for organic matter sources and river channel shifts. *Organic Geochemistry*, 60: 33–39.
- Xu, S., Zhang, Z., Jia, G., Yu, K., Lei, F., Zhu, X. (2020): Controlling factors and environmental significance of BIT and $\delta^{13}\text{C}$ of sedimentary GDGTs from the Pearl River Estuary, China over recent decades. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 233, 106534.
- Zell, C., Kim, J. H., Balsinha, M., Dorhout, D., Fernandes, C., Baas, M., Damste, J. S. S. (2014): Transport of branched tetraether lipids from the Tagus River basin to the coastal ocean of the Portuguese margin: Consequences for the interpretation of the MBT'/CBT paleothermometer. *Biogeosciences*, 11: 5637–5655.

Zeng, Z., Chen, H., Yang, H., Chen, Y., Yang, W., Feng, X., Pei, H., Welander, P. V. (2022): Identification of a protein responsible for the synthesis of archaeal membrane-spanning GDGT lipids. *Nature Communications*, 13, 1545.

Zhang, Y. G., Pagani, M., Wang, Z. (2016): Ring Index: A new strategy to evaluate the integrity of TEX86 paleothermometry. *Paleoceanography*, 31: 220–232.