

学校编码: 10384

密级\_\_\_\_\_

学号: 22420070153570

廈門大學

博 士 学 位 论 文

海水酸化对几种桡足类生理生化影响及其  
机制研究

**Physio-biochemical effects and mechanisms of acidified  
seawater on several copepods**

张达娟

指导教师姓名: 李少菁 教授

专业名称: 海洋生物学

论文提交日期: 2011年6月

论文答辩时间: 2011年6月

2011年 月

## 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为( )课题(组)的研究成果,获得( )课题(组)经费或实验室的资助,在( )实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

## 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，  
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

## 目录

缩写词列表.....	I
摘    要.....	1
Abstract.....	4
第一章 绪论.....	7
1.1 酸化对海洋生态系统中非生物因素的影响.....	10
1.1.1 酸化对海水碳酸盐系统的影响.....	10
1.1.2 酸化对海水碳酸盐饱和度的影响.....	10
1.2 酸化对海洋动物的影响.....	12
1.2.1 酸化对海洋动物存活、生长、繁殖和群落结构的影响.....	12
1.2.2 海水酸化对海洋动物生理、生化过程的影响.....	19
1.2.3 海水酸化对生物影响的分子机制.....	24
1.3 本研究的目的意义、内容及技术路线.....	28
第二章 海水酸化对几种桡足类的急性毒性研究.....	30
2.1 材料和方法.....	30
2.1.1 样品采集.....	30
2.1.2 酸化海水的制备.....	31
2.1.3 实验设计.....	31
2.1.4 统计分析.....	32
2.2 结果.....	32
2.2.1 不同酸化条件下桡足类 24h 和 48hLC <sub>50</sub> pH.....	32
2.2.2 不同桡足类在酸化条件下 24h 和 48h 死亡率.....	35
2.3 讨论.....	36
2.4 小结.....	39
第三章 海水酸化对几种桡足类存活率和生殖力的影响.....	40
3.1 材料和方法.....	40
3.1.1 样品采集.....	40

3.1.2 酸化海水制备.....	41
3.1.3 实验设计.....	41
3.1.4 数据整理及分析.....	42
<b>3.2 结果.....</b>	<b>42</b>
3.2.1 酸化处理及培养时间对桡足类存活率的影响.....	42
3.2.2 酸化处理及培养时间对桡足类产卵率的影响.....	45
3.2.3 酸化处理和培养时间对刺尾纺锤水蚤和瘦尾胸刺水蚤卵孵化率的影响.....	48
<b>3.3 讨论.....</b>	<b>51</b>
3.3.1 酸化对桡足类存活率的影响.....	51
3.3.2 酸化对桡足类产卵率的影响.....	55
3.3.3 不同酸化水平对桡足类卵孵化率的影响.....	57
<b>3.4 小结.....</b>	<b>58</b>
<b>第四章 中华哲水蚤和瘦尾胸刺水蚤对海水酸化的生理生化响应....</b>	<b>60</b>
<b>4.1 材料和方法.....</b>	<b>60</b>
4.1.1 样品采集.....	60
4.1.2 酸化海水制备.....	60
4.1.3 实验设计.....	61
4.1.4 酸化暴露下中华哲水蚤和瘦尾胸刺水蚤各生化指标的测定方法..	61
4.1.5 数据整理和分析.....	64
<b>4.2 结果.....</b>	<b>64</b>
4.2.1 酸化对中华哲水蚤体内各生化指标的影响.....	64
4.2.2 酸化对瘦尾胸刺水蚤体内各生化指标的影响.....	72
<b>4.3 讨论.....</b>	<b>78</b>
4.3.1 桡足类体内 AchE 活性对海水酸化的响应.....	78
4.3.2 桡足类体内 ATPase 活性对海水酸化的响应.....	80
4.3.3 桡足类体内抗氧化酶系对海水酸化的响应.....	81
4.3.4 培养时间对桡足类生理生化指标的影响.....	85
4.3.5 桡足类体内各生化指标与 $p\text{CO}_2$ 的回归分析.....	85

4.3.6 桡足类各生理生化指标主成分以及相关分析.....	86
<b>4.4 小结.....</b>	<b>86</b>
<b>第五章 酸化条件下中华哲水蚤蛋白质组学的研究.....</b>	<b>88</b>
<b>5.1 材料与方法.....</b>	<b>89</b>
5.1.1 样品采集.....	89
5.1.2 酸化海水制备.....	89
5.1.3 实验设计.....	89
5.1.4 中华哲水蚤细胞总蛋白的提取.....	89
5.1.5 总蛋白的定量.....	90
5.1.6 蛋白双向电泳(2-DE)条件.....	91
5.1.7 蛋白银染.....	92
5.1.8 图像扫描与分析.....	92
5.1.9 酶解.....	92
5.1.10 蛋白点的分析与鉴定.....	93
<b>5.2 结果.....</b>	<b>95</b>
5.2.1 不同酸化条件下中华哲水蚤蛋白的差异表达.....	95
5.2.2 差异蛋白的鉴定与功能分析.....	96
<b>5.3 讨论.....</b>	<b>96</b>
<b>5.4 小结.....</b>	<b>101</b>
<b>第六章 海水酸化对中华哲水蚤和刺尾纺锤水蚤肌肉和卵母细胞超微结构的影响.....</b>	<b>105</b>
<b>6.1 材料与方法.....</b>	<b>105</b>
6.1.1 样品采集.....	105
6.1.2 酸化海水制备.....	105
6.1.3 实验设计.....	106
6.1.4 超微结构切片的制作与观察.....	106
<b>6.2 结果.....</b>	<b>107</b>
6.2.1 酸化对中华哲水蚤和刺尾纺锤水蚤肌肉超微结构的影响.....	107

6.2.2 酸化对中华哲水蚤和刺尾纺锤水蚤卵母细胞超微结构的影响.....	109
<b>6.3 讨论.....</b>	<b>111</b>
6.3.1 酸化条件下桡足类肌肉组织超微结构的变化.....	111
6.3.2 酸化条件下桡足类卵母细胞超微结构的变化.....	112
<b>6.4 小结.....</b>	<b>113</b>
<b>第七章 论文主要结论和创新点.....</b>	<b>114</b>
7.1 论文的主要结论.....	114
7.2 创新点.....	115
7.3 展望.....	115
<b>参考文献.....</b>	<b>117</b>
<b>博士在学期间文章及参加会议情况.....</b>	<b>147</b>
<b>致    谢.....</b>	<b>148</b>

## Content

<b>Table of abbreviations.....</b>	<b>I</b>
<b>Abstract in Chinese.....</b>	<b>1</b>
<b>Abstract in English.....</b>	<b>4</b>
<b>Chapter 1 Introduction.....</b>	<b>7</b>
<b>1.1 Impacts of ocean acidification on the abiotic factors of marine ecosystem</b> .....	<b>10</b>
1.1.1 Impacts of ocean acidification on the carbonate system.....	10
1.1.2 Impacts of ocean acidification on the saturation state of calcium carbonate.....	10
<b>1.2 Impacts of ocean acidification on marine animals.....</b>	<b>12</b>
1.2.1 Impacts of ocean acidification on the survival, growth, reproduction and community structure of marine animals.....	12
1.2.2 Impacts of ocean acidification on the physiological and biochemical processes of marine animals.....	19
1.2.3 Impacts of ocean acidification on the molecular mechanisms of marine organisms.....	24
<b>1.3 Objectives, contents and approaches of this study.....</b>	<b>28</b>
<b>Chapter 2 Study of acute toxicology of ocean acidification on several marine copepods.....</b>	<b>30</b>
<b>2.1 Materials and methods.....</b>	<b>30</b>
2.1.1 Sample collection.....	30
2.1.2 Preparing the acidified seawater.....	31
2.1.3 Experimental design.....	31
2.1.4 Statistical analysis.....	32
<b>2.2 Results.....</b>	<b>32</b>
2.2.1 The 24 h and 48 h LC <sub>50</sub> pH of copepods.....	32



2.2.2 The 24 h and 48 h death rate of copepods.....	35
<b>2.3 Discussion.....</b>	<b>36</b>
<b>2.4 Summary.....</b>	<b>39</b>
<b>Chapter 3 Impacts of ocean acidification on the survival and reproduction of     several copepods.....</b>	<b>40</b>
<b>3.1 Materials and methods.....</b>	<b>40</b>
3.1.1 Sample collection.....	40
3.1.2 Preparing of acidified seawater.....	41
3.1.3 Experimental design.....	41
3.1.4 Statistical analysis.....	42
<b>3.2 Results.....</b>	<b>42</b>
3.2.1 Impacts of acidified seawater and exposure time on the survival rate of copepods.....	42
3.2.2 Impacts of acidified seawater and exposure time on the egg reproduction rate of copepods.....	45
3.2.3 Impacts of acidified seawater and exposure time on the egg hatching rate of <i>A. spinicauda</i> and <i>C. tenuiremis</i> .....	48
<b>3.3 Discussion.....</b>	<b>51</b>
3.3.1 Impacts of ocean acidification on the survival rate of copepods.....	51
3.3.2 Impacts of ocean acidification on the egg production rate of copepods .....	55
3.3.3 Impacts of ocean acidification on the egg hatching rate of copepods...57	
<b>3.4 Summary.....</b>	<b>58</b>
<b>Chapter 4 Physio-Biochemical response of <i>C. sinicus</i> and <i>C. tenuiremis</i> to the     ocean acidification.....</b>	<b>60</b>
<b>4.1 Materials and methods.....</b>	<b>60</b>
4.1.1 Sample collection.....	60
4.1.2 Preparing the acidified seawater.....	60
4.1.3 Experimental design.....	61

4.1.4 Measurements of the biochemical parameters of <i>C. sinicus</i> and <i>C. tenuiremis</i> .....	61
4.1.5 Statistical analysis.....	64
<b>4.2 Results.....</b>	<b>64</b>
4.2.1 Impacts of acidified seawater on the biochemical parameters of <i>C. sinicus</i> .....	64
4.2.2 Impacts of acidified seawater on the biochemical parameters of <i>C. tenuiremis</i> .....	72
<b>4.3 Discussion.....</b>	<b>78</b>
4.3.1 Response of AchE of copepods to acidified seawater.....	78
4.3.2 Response of ATPase of copepods to acidified seawater.....	80
4.3.3 Response of antioxidant system of copepods to acidified seawater....	81
4.3.4 Impacts of exposure time on the biochemical parameters.....	85
4.3.5 Regression analysis of different biochemical parameters of copepods to $p_{CO_2}$ .....	85
4.3.6 PCA and relaticity analysis of different biochemical parameters.....	86
<b>4.4 Summary.....</b>	<b>86</b>
<b>Chapter 5 Proteomics of <i>C. sinicus</i> with different <math>p_{CO_2}</math> levels.....</b>	<b>88</b>
<b>5.1 Materials and methods.....</b>	<b>89</b>
5.1.1 Sample collection.....	89
5.1.2 Preparing the acidified seawater.....	89
5.1.3 Experimental design.....	89
5.1.4 Protein extration of <i>C. sinicus</i> .....	89
5.1.5 Quantified of the protein content.....	90
5.1.6 2-DE analysis.....	91
5.1.7 Silver staining.....	92
5.1.8 Image capture and analysis.....	92
5.1.9 Enzymatic hydrolysis.....	92
5.1.10 Mass spectrometirc analysis.....	93

<b>5.2 Results</b> .....	<b>95</b>
5.2.1 Protein profile in <i>C. sinicus</i> exposed to acidified seawater.....	95
5.2.2 Identify and functional analysis of different proteins.....	96
<b>5.3 Discussion</b> .....	<b>96</b>
<b>5.4 Summary</b> .....	<b>101</b>
<b>Chapter 6 Impacts of ocean acidification on muscle and oocyte ultrastructure of</b> <b><i>C. sinicus</i> and <i>A. spinicauda</i></b> .....	<b>105</b>
<b>6.1 Materials and methods</b> .....	<b>105</b>
6.1.1 Sample collection.....	105
6.1.2 Preparing acidified seawater.....	105
6.1.3 Experimental design.....	106
6.1.4 Excution and observation of the ultrastructural slice.....	106
<b>6.2 Results</b> .....	<b>107</b>
6.2.1 Impacts of acidified seawater on the muscle ultrastructure in <i>C. sinicus</i> and <i>A. spinicauda</i> .....	107
6.2.2 Impacts of acidified seawater on the oocytes ultrastructure in <i>C. sinicus</i> and <i>A. spinicauda</i> .....	109
<b>6.3 Discussion</b> .....	<b>111</b>
6.3.1 Impacts of acidified seawater on the muscle ultrastructure in copepods .....	111
6.3.2 Impacts of acidified seawater on the oocytes ultrastructure in copepods .....	112
<b>6.4 Summary</b> .....	<b>113</b>
<b>Chapter 7 Conclusions</b> .....	<b>114</b>
<b>7.1 Summary</b> .....	<b>114</b>
<b>7.2 Remarkable results and characteristic</b> .....	<b>115</b>
<b>7.3 Perspective</b> .....	<b>115</b>
<b>References</b> .....	<b>117</b>

<b>Publications during the author's PhD study.....</b>	<b>147</b>
<b>Acknowledgements.....</b>	<b>148</b>

厦门大学博硕士学位论文摘要库

## 缩写词列表

2-DE: Two-dimensional electrophoresis, 双向电泳

AchE: Acetylcholine esterase, 乙酰胆碱酯酶

ACN: Acetonitrile, 乙腈

APS: Ammonium persulfate, 过硫酸铵

ATP: Adenosine triphosphate, 三磷酸腺苷

ATPase: Adenosine triphosphatase, 三磷酸腺苷酶

BSA: Bovine serum albumins, 牛血清蛋白

CHAPS: 3-[(3-Cholamidopropyl) dimethylammonio] propanesulfonic acid, 3-[(胆酰胺丙基)二甲氨基]丙磺酸内盐

CO<sub>2</sub>: Carbon dioxide, 二氧化碳

DTT: Dithiothreitol, 二硫苏糖醇

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid, 乙二胺四乙酸

GPx Glutathione peroxidase, 谷胱甘肽过氧化物酶

GSH: Reduced glutathione, 还原型谷胱甘肽

GSSG: Oxidized glutathione, 氧化型谷胱甘肽

GST: Glutathione S-transferase, 谷胱甘肽硫转移酶

IPCC: Intergovernmental Panel on Climate Change, 政府间气候变化专门委员会

mRNA: Messenger Ribonucleic acid, 信使 RNA

$p_{CO_2}$ : partial pressure of carbon dioxide, 二氧化碳分压

POC: Particulate organic carbon, 颗粒有机碳

ROS: Reactive oxygen species, 活性氧

SDS: Sodiun decdecyl sulfate, 十二烷基磺酸钠

SOD: Superoxide dismutase, 超氧化物歧化酶

TCA: Trichloroacetic acid, 三氯乙酸

TEMED: N,N,N',N',-Tetramethylethylenediamine, N,N,N',N',-四甲基乙二胺

TGS: Tris-glydine-SOS, Tris-甘氨酸-SOS

Tris: Hydroxymethyl aninomethane, 三羟甲基氨基甲烷

$\Omega$ : Saturation state, 饱和度

厦门大学博硕士学位论文摘要库

## 摘 要

由于海水对 CO<sub>2</sub> 的吸收以及海洋封存 CO<sub>2</sub> 导致的海水酸化已经成为全球性的环境问题，其不仅引起海水化学性质的改变，而且对海洋生物的生存、生长和繁殖产生影响。浮游动物在海洋物质循环和能量流动中占有重要地位，研究浮游动物对海水酸化的响应将有助于我们更好的理解海水酸化对生物产生的影响。本研究选取中华哲水蚤、太平洋纺锤水蚤、刺尾纺锤水蚤、瘦尾胸刺水蚤等几种桡足类作为研究对象，比较 CO<sub>2</sub> 酸化和 HCl 酸化对桡足类的 24 h 和 48 h 的急性毒性 (LC<sub>50</sub>pH)，并分析二者之间的差异；采用实验生态学的方法，研究了为期 8 d 不同酸化水平 ( $p_{\text{CO}_2}$  800、2000、5000 和 10000 ppm) 对桡足类存活率、产卵率以及卵孵化率的影响 (第 2、4、6 和 8 d)，以了解海水酸化对桡足类繁殖生物学的影响及其应对策略；采用生化测定方法，研究不同酸化条件和不同暴露时间对中华哲水蚤和瘦尾胸刺水蚤体内抗氧化系统 (SOD、GPx、GST、GSH 和 GSH/GSSG)、AChE 和 ATPase 活性的影响，以探讨酸化对桡足类的毒害效应及其应激机制；引入蛋白质组学分析方法作为辅助手段，分别了解在正常海水和酸化海水中培养的中华哲水蚤体内蛋白的表达情况，寻找差异蛋白并探讨海水酸化对桡足类影响的分子作用机制；最后，选择暴露在酸化条件下 8 d 的中华哲水蚤和刺尾纺锤水蚤作为研究对象，研究不同酸化水平对两种桡足类肌肉组织和卵母细胞超微结构的影响，以探讨海水酸化对桡足类的毒性效应。主要研究结果如下：

- 1、由 CO<sub>2</sub> 导致的海水酸化对桡足类 24 h 和 48 h 半致死 pH 均高于 HCl 酸化的结果，即 CO<sub>2</sub> 酸化对桡足类产生的毒性高于盐酸酸化的毒性。在 CO<sub>2</sub> 酸化组中，日本虎斑猛水蚤的耐受性高于其它浮游性种类的耐受性，在营浮游生活的种类中，植食性种类 (中华哲水蚤) 对酸化的耐受性明显高于其它杂食性或肉食性种类；在盐酸酸化组中，中华哲水蚤表现出最高的耐受性，其次是日本虎斑猛水蚤，在其它营浮游生活的种类中，肉食性种类 (精致真刺水蚤) 对酸化的耐受性最低。CO<sub>2</sub> 酸化对桡足类的毒性具有一定的种类特异性。

- 2、在 CO<sub>2</sub> 酸化条件下培养 8 d 后，中华哲水蚤、太平洋纺锤水蚤、刺尾纺

锤水蚤和瘦尾胸刺水蚤的存活率均随酸化水平的加剧而下降,但酸化仅对刺尾纺锤水蚤和瘦尾胸刺水蚤的存活率产生显著的抑制作用;除太平洋纺锤水蚤外,其余3种桡足类的产卵率均受到海水酸化的显著抑制作用,并随酸化水平的加剧而下降,在暴露的第8d刺尾纺锤水蚤和瘦尾胸刺水蚤停止产卵,此外,暴露时间的长短也起着重要的作用,所有酸化处理组中桡足类的产卵率均随着暴露时间的延长而降低;刺尾纺锤水蚤和瘦尾胸刺水蚤卵的孵化率随酸化水平的加剧及雌体在酸化条件下暴露时间的延长而下降,即酸化对雌体的累积毒性可能会影响卵的孵化。

3、不同水平的CO<sub>2</sub>酸化均会引起中华哲水蚤和瘦尾胸刺水蚤体内各种生化指标(SOD、GPx、GST、GSH、GSH/GSSG、AChE和ATPase)的显著变化,这些指标的变化与桡足类所遭受的酸化水平以及暴露时间有一定的相关性。特别是GPx,在整个暴露过程中,一直保持着较高水平,受到海水酸化的显著刺激作用,该指标有望成为桡足类体内指示酸化的良好标志物;酸化对两种桡足类体内AChE的活性有不同程度的影响,CO<sub>2</sub>对桡足类可能具有神经毒性;酸化条件下,桡足类体内的ATPase活性有不同程度的升高,这可能是生物体用来度过短期不良环境的重要途径。主成分分析的结果表明,在桡足类应对海水酸化时,体内的解毒过程占据重要地位。

4、在酸化条件下暴露4d后,中华哲水蚤体内蛋白的表达有所改变,在对照组中,一些与桡足类蛋白合成过程有关的蛋白(翻译延长因子2和羧基末端蛋白酶)的表达量明显下降;海水酸化可以通过抑制机体内与三羧酸循环、糖酵解和脂类合成有关蛋白的表达量来对其新陈代谢过程产生影响;酸化会导致与桡足类解毒过程、细胞修复以及运动有关蛋白的表达量下降。

5、在酸化条件下暴露8d以后,中华哲水蚤和刺尾纺锤水蚤的肌肉组织和卵母细胞的超微结构均受到影响,肌丝排列的有序性随酸化水平的加剧而下降。在较高pCO<sub>2</sub>处理组中,甚至出现肌丝断裂现象,海水酸化会对桡足类造成一定程度的氧化损伤;两种桡足类的卵母细胞内的线粒体出现内脊断裂现象,球形颗



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士学位论文摘要库