

响应曲面法研究菹齿眼子菜克藻效应的环境因子

张楠^{1*}, 孙长虹¹, 季民² (1.北京市环境保护科学研究院, 北京 100037; 2.天津大学环境科学与工程学院, 天津 300072)

摘要: 利用响应曲面法, 评价了影响沉水植物菹齿眼子菜对蛋白核小球藻产生克藻效应的 3 个环境因子(温度、光照强度、全盐量)的交互作用。结果表明, 菹齿眼子菜对蛋白核小球藻的藻细胞个数相对抑制率在温度为 42℃、光照强度为 2683lx、全盐量为 3706mg/L 时, 达到最佳状态。方差分析显示, 其显著性小于 0.0001, 相关系数为 0.9800, 模型拟合度较好。

关键词: 响应曲面法; 环境因子; 菹齿眼子菜; 蛋白核小球藻

中图分类号: X703.5 文献标识码: A 文章编号: 1000-6923(2010)04-0483-04

Environmental factors of allelopathic effects against algae by response surface methodology. ZHANG Nan^{1*}, SUN Chang-hong¹, JI Min² (1.Beijing Institute of Environmental Protection, Beijing 100037, China; 2.School of Environmental Science and Engineering, Tianjin University, Tianjin 300072, China). *China Environmental Science*, 2010, 30(4): 483~486

Abstract: Response surface methodology (RSM) was used to optimize three environmental factors (temperature, light intensity and total dissolved solids) of allelopathic effects of submerged macrophytes against *Chlorella vulgaris*. By analyzing the response surface plots, the optimum ranges of the relatively inhibitory rate of algal cell number lied in 42℃, 2683lx and total salt content of 3706mg/L. The significance level of the RSM model was less than 0.0001 and the correlation coefficient was 0.9800, which indicating the model was satisfactory and accurate.

Key words: response surface methodology; environmental factors; *Potamogeton pectinatus*; *Chlorella pyrenoidosa*

据报道^[1-3]部分水生植物具有克藻效应, 能抑制导致水体富营养化的单细胞藻类过度繁殖。但是水生植物克藻效应受到多种环境因子影响, 如温度、光照、pH 值、氮磷营养元素水平等^[4]。关于沉水植物对高盐度再生水体富营养化藻类的克藻效应受到何种环境因子影响的研究还鲜见报道。另外, 关于克藻效应环境因子的研究多为单因素研究, 没有考虑各因子之间交互作用, 与实际情况有一定差距。

响应曲面法(RSM)实验设计是一种优化生物过程的综合性实验技术, 它将统计学与系数学相结合, 不仅建立连续变量的曲面模型, 而且对多个影响因子及其交互作用进行评价, 与传统的均匀设计、正交设计实验相比, 该实验方法偏差较小, 可信度较高^[5]。目前, 响应曲面法多用于食品、化工、制药、建筑等行业的实验优化设计, 应用于环境保护领域, 特别是用于沉水植物克藻效应

研究的尚少见报道。

本研究针对天津某再生水景观河道水质和植物生长的实际情况, 根据响应曲面法中的 Box-Behnken 实验设计原理, 对影响该河道中的沉水植物——菹齿眼子菜对蛋白核小球藻克藻效应的 3 个环境因子及其交互作用进行同步实验, 为研究沉水植物在再生水体中的克藻效应机理提供理论和实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

菹齿眼子菜(*Potamogeton pectinatus*)采自天津开发区再生水景观河道。采回后迅速移栽到温度(25±2)℃, 光照强度(4000±100)lx 的培养箱

收稿日期: 2009-09-07

基金项目: 国家“863”项目(2003AA601030)

* 责任作者, 助理研究员, tjunan@126.com

中,驯化培养 5~7d.实验前取适量生长良好的菹齿眼子菜,用蒸馏水反复冲洗后吸干其表面的水分,称重.

再生水取自天津开发区某再生水厂出水口.藻种为蛋白核小球藻(*Chlorella pyrenoidosa*),购自中科院水生所藻种库,于温度(25±2)℃、光照强度(4000±100)lx、光暗比 12h:12h 的控温光照培养箱培养,藻种经过 3 代稳定转接后用于实验.采用藻细胞个数作为藻类生长指标,血球计数板计数.数据采用统计软件进行分析.藻细胞个数相对抑制率的计算公式为:

$$RI\% = (N_0 - N_t) / N_0 \times 100\%$$
 (1)

式中:RI%为藻细胞个数相对抑制率,%; N_0 为对照组的藻细胞个数; N_t 为处理组的藻细胞个数.

1.2 响应曲面实验

采用 Box-Behnken3 因素 3 水平试验设计,自变量分别定义为温度(A)、光照(B)、全盐量(C),每个自变量的 3 个水平值编码分别为-1、0、1,自变量各编码水平取值见表 1.温度和光照强度通过调节光照控温培养箱达到编码水平,全盐量通过精确称取 NaCl 加入营养液达到编码水平.换算公式为 $A=(\text{培养温度}-25)/5$; $B=(\text{培养光照强度}-3000)/1000$; $C=(\text{培养全盐量}-4000)/1000$.

表 1 实验自变量编码值及其实际值

Table 1 The coded and actual levels of variables chosen for the experiments

自变量	编码	编码水平		
		-1	0	1
温度(℃)	A	20	25	30
光照强度(lx)	B	2000	3000	4000
全盐量(mg/L)	C	3000	4000	5000

响应曲面实验采用菹齿眼子菜与小球藻共培养的方式.于 250mL 锥形瓶中装入 100mL 灭菌营养液,无菌条件下接种藻液,使初始藻细胞个数约为 3×10^5 个/mL,加入菹齿眼子菜,生物量约为 (10.0±0.1)g/L.没有加入菹齿眼子菜的组设为对照(CK),处理组与对照组均做 3 个平行样,每组实验进行 7d.根据 Box-Behnken 响应曲面设计要求共进行 17 组实验,以藻细胞个数的相对抑制率作为

响应值 $Y_{RI\%}$,模型和最小二乘法拟合.实验数据采用 Design Expert 软件进行多元回归拟合、方差分析,采用 Matlab 软件进行模型的分析 and 运算.

2 结果与讨论

2.1 实验结果

环境因子对菹齿眼子菜克藻效应影响的响应曲面实验结果,通过回归拟合得到响应值与自变量(3 个环境因子)的二次多项回归方程为:

$$Y_{RI\%} = 67.34 + 13.34A - 10.51B + 2.57C + 12.02AB - 13.55AC + 3.80BC + 1.19A^2 + 4.89B^2 - 12.63C^2$$
 (2)

对模型进行方差分析,该模型的显著性高 ($P<0.0001$),模型决定系数为 0.9543,这说明仅有 5%的响应值总变异不能由此模型解释,其相关系数 $R=0.9800$.线性影响中仅有全盐量不显著,其余 2 项均显著;交互作用中,光照强度和全盐量的交互作用不显著,其他两两交互作用显著.从交互作用项系数的符号看, AB、BC 之间有协同作用, AC 之间有拮抗作用.

利用 Design Expert 软件做出模型的三维响应曲面图和等高线图(图 1~图 6).等高线图不仅说明单个因子的影响,而且能反映出交互作用强弱,曲线越陡,说明该因子影响效应越大;图形中曲面颜色越深的区域,说明结果越显著^[6-7].

由图 1 和图 2 可见,温度(A)和光照强度(B)交互作用显著,曲面呈双曲面形;在等高线图的右下方区域,即温度≥30℃、光照强度≤3000lx 时,图形颜色最深,说明抑制率较高.从图 3 和图 4 可见,等高线图右侧图形颜色最深,藻细胞抑制率高;即温度大于 30℃、全盐量 3000~4000mg/L 时,克藻效果好.光照强度、全盐量 2 个因子在光照较低、盐度为 4000mg/L 左右时克藻效果较好,图形中沿横轴曲线变化较陡,说明光照强度的影响显著,这与模型方差分析的结果吻合.

2.2 模型分析

模型建立后作进一步的模型分析,将二次多项式改写成矩阵形式,用 Matlab2006b 软件求解模型的二次项系数矩阵的特征值为 $\lambda_{RI\%} = -32.4247、0.0099、19.3148$.特征值符号相异,说明模型的最佳点是鞍点^[8-9].

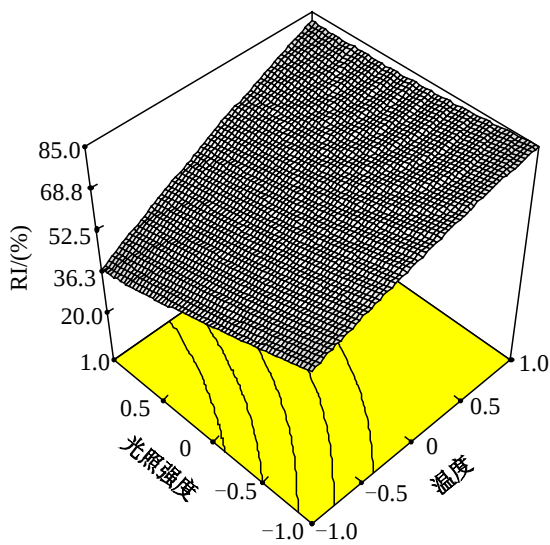


图 1 RI%响应曲面图(AB)
Fig.1 AB Response surface of RI%

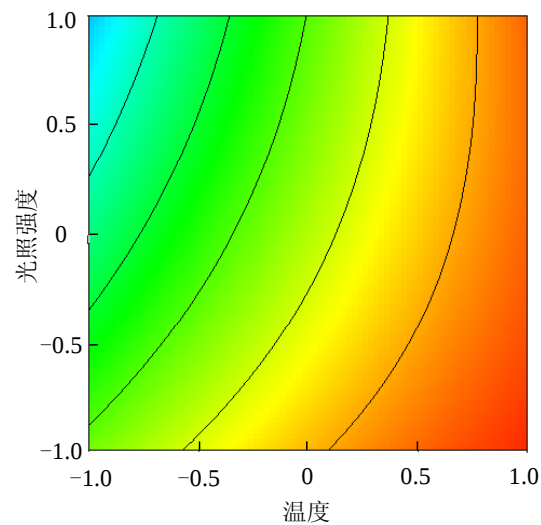


图 2 RI%等高线图(AB)
Fig.2 AB contour lines of RI%

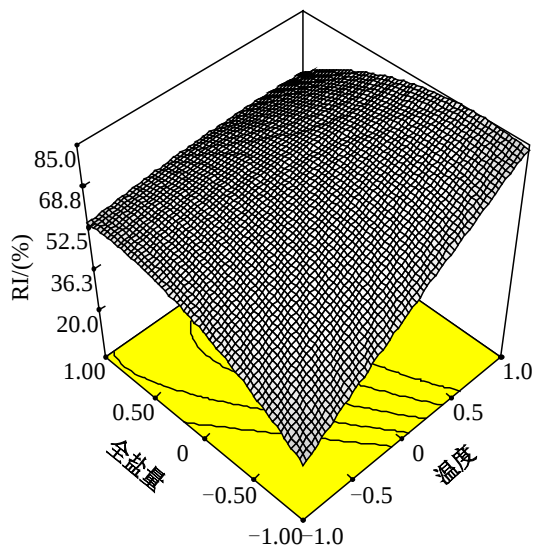


图 3 RI%响应曲面图(AC)
Fig.3 AC Response surface of RI%

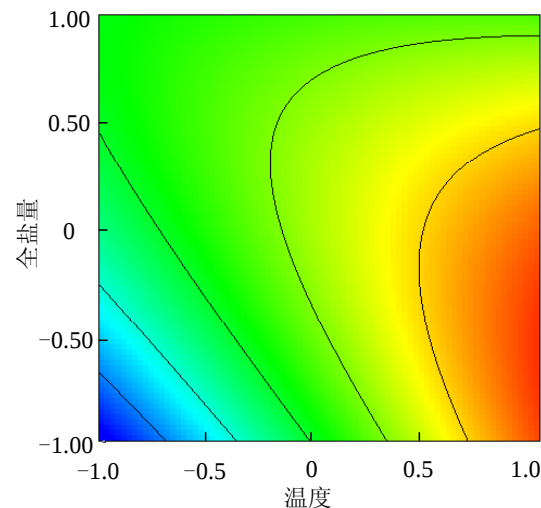


图 4 RI%等高线图(AC)
Fig.4 AC contour lines of RI%

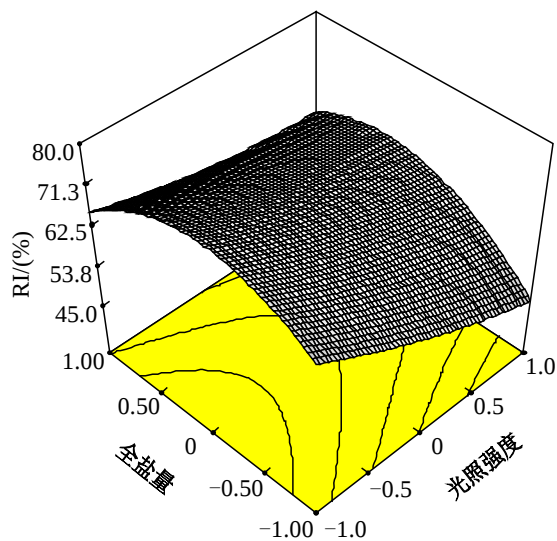


图 5 RI%响应曲面图(BC)
Fig.5 BC Response surface of RI%

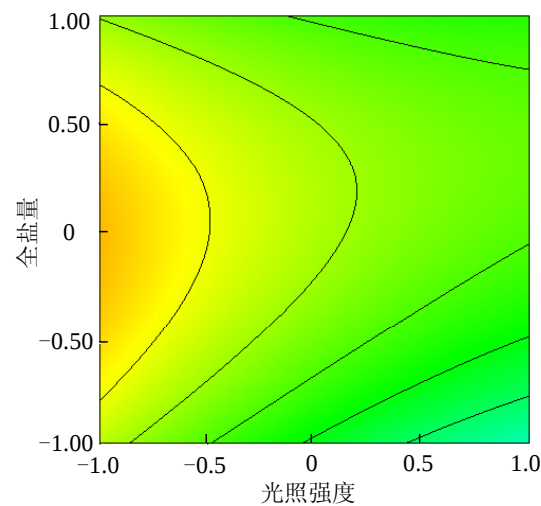


图 6 RI%等高线图(BC)
Fig.6 BC contour lines of RI%

对回归模型取一阶偏导数为零,整理得到藻细胞个数抑制率的最佳点方程组如下:

$$\begin{cases} 13.34 + 12.02B - 13.55C + 2.38A = 0 \\ -10.51 + 12.02A + 3.8C + 9.78B = 0 \\ 2.57 - 13.55A + 3.8B - 25.26C = 0 \end{cases} \quad (3)$$

求解方程组(3)得出最佳点的编码值,代入方程(2)反求自变量值,最后求得藻细胞个数相对抑制率在温度、光照强度、全盐量位于 (42℃、2683lx、3706mg/L)时达到最佳点.将上述结果代入模型中,得到的理论相对最大抑制率 $Y_{RI\%}$ 为 89.0%.

通过上述分析可知,在再生水处理的实际操作中可以根据实验结论适当调整再生水处理工艺,如调节反渗透处理水量使再生水全盐量尽量达到克藻效应的最佳条件,避免富营养化大面积爆发.根据实地观察,该景观河道在春末再生水全盐量较低时富营养化情况严重,与实验结果比较吻合.

为了验证模型的准确性,在 3 个自变量的实验水平范围内选择进行 5 组不同组合的验证实验,结果实测值与预测值的相对误差 $\leq 5\%$,说明模型具有一定的实用性.

3 结论

3.1 通过响应曲面法 Box-Behnken 中心组合实验,得出菹齿眼子菜对蛋白核小球藻克藻效应的 3 个环境因子的二次多项式模型.模型显著性高 ($P < 0.0001$),相关系数为 0.9800.

3.2 响应曲面为双曲面,最佳点是鞍点,在温度 42℃、光照强度 2683lx、全盐量 3706mg/L 时,菹齿眼子菜的克藻效应达到最佳.

参考文献:

- [1] Rice E L. Allelopathy [M]. Orlando:Academic Press, 1984.
- [2] Nilsen E T. Bioassays and field studies for allelopathy in terrestrial plants: progress and problems [J]. Critical Reviews in Plant Sciences, 2003,22(2):221-238.
- [3] Mallik A U. Challenges and opportunities in allelopathy research: a brief overview [J].Journal of Chemical Ecology, 2000, 26(9):2007-2009.
- [4] Charpentier A, Grillas P, Lescuyer F, et al. Spatio-temporal dynamics of a *Zostera noltii* dominated community over a period

of fluctuating salinity in a shallow lagoon, Southern France [J]. Estuarine, Coastal and Shelf Science, 2005,64(3):307-315.

- [5] Wasser S P. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides[J].Applied Microbiology Biotechnology, 2002,60(2):258-274.
- [6] Muralidhar R V, Chirumamila R, Marchant R.Response surface approach for the comparison of lipase production by *Candida cylindracea* using two different carbon sources [J]. Biochemistry Engineering Journal, 2001,9(1):17-23.
- [7] Liu C, Liu Y, Liao W, et al. Application of statistically based experimental designs for the optimization of nisin production from whey [J]. Biotechnology Letters, 2003,25(8):877-882.
- [8] Vohra A, Satyanarayana T. Phytases: microbial sources, production, purification and potential biotechnological applications [J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2003,23(1):29-60.
- [9] Abdel-Fattah Y R, Saeed M H, Gohar Y M, et al. Improved production of *Beudomonas aeruginosa* uricase by optimization of process parameters through statistical experimental designs [J]. Process Biochemistry, 2005,40(11):1707-1714.

致谢: 现场植物采集由王卫红博士协助完成,在此表示感谢.

作者简介: 张楠(1977-),女,天津人,助理研究员,博士,主要从事水污染控制方面研究.发表论文 10 余篇.