

Research Paper

Optical Properties of Algae in Order to Design and Build a Device for Measuring the Amount of Chlorophyll in Water Reservoirs Using the Optical Fluorescence Emission Method¹

Ehsan Koushki*² and Eisa Kohan-Baghkheirati³

Received: 2023.05.12

Revised: 2023.07.06

Accepted: 2023.08.04

Abstract

In this article, we will first get acquainted with the absorption and emission optical properties of algae and types of chlorophylls, and then we will examine the optical setup for measuring the photoluminescence light produced by algae, which is the basis for the construction of chlorophyll concentration measuring devices. By examining algae samples in freshwater ponds in Iran and identifying the predominant type of algae in them, spectrometry and concentration measurement were carried out with the help of a hemocytometer or neobar lam method. An essential tool for measuring the concentration of algae is chlorophyll-a, which is present in all types of algae with different percentages and has the property of fluorescence. By measuring the red light resulting from photoluminescence, the amount of chlorophyll-a can be obtained. The main design of a device to measure the amount of chlorophyll-a based on the measurement of photoluminescence light is considered for this purpose, and it is used in terms of software and hardware. For this, the process and intensity of light in terms of density were done for calibration, and the disadvantages and advantages of the design were examined. Direct measurement of light, noises, high stability, and preparing a logical routine between the data can help to increase and improve the quality and this device becomes a precise tool for measuring chlorophyll and has commercialization capabilities. The stability, reproducibility, and high accuracy of the device are one of the advantages of emission (photoluminescence) test methods compared to absorbance methods.

Keywords: *Optical Properties of Algae, Chlorophyll-a, Photoluminescence, Emission Spectrum, Neobar Lam.*

¹ DOI: 10.22051/ijap.2023.43744.1324

² Assistant Professor, Department of Physics, Faculty of Science, Hakim Sabzevari University, Sabzevar, Razavi Khorasan, Iran. (Corresponding Author). Email: ehsan.koushki@hsu.ac.ir

³ Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Hakim Sabzevari University, Sabzevar, Razavi Khorasan, Iran. Email: eisa_kohan@yahoo.com



ویژگی‌های اپتیکی جلبک‌ها در جهت طراحی و ساخت دستگاه سنجش میزان کلروفیل مخازن آبی به روش نشر فلورسانس اپتیکی^۱

احسان کوشکی^{۲*} و عیسی کهن باغخیراتی^۳

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۲/۲۲

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۴/۱۵

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۵/۱۳

فصلنامه علمی فیزیک کاربردی ایران

دانشکده فیزیک، دانشگاه الزهرا

سال سیزدهم، پیاپی ۳۵، زمستان ۱۴۰۲

صص ۷۰ - ۹۲

چکیده:

در این مقاله، در ابتدا با ویژگی‌های نوری جذبی و نشری جلبک‌ها و انواع کلروفیل‌ها آشنا شده و سپس به بررسی چندمان اپتیکی اندازه‌گیری نور فوتولومینسانس بدست آمده از جلبک‌ها می‌پردازیم که پایه ساخت دستگاه‌های اندازه‌گیری غلظت کلروفیل‌ها می‌باشد. با بررسی نمونه‌های جلبکی در استخرهای آب شیرین مناطقی از ایران و تشخیص نوع غالب جلبک‌های موجود در آن، طیف‌سنجی و اندازه‌گیری غلظت به کمک روش هموستیومتر یا لام نئوبار انجام شد. مهم‌ترین ابزار برای اندازه‌گیری غلظت جلبک‌ها، کلروفیل a است که در همه انواع جلبک‌ها با درصد متفاوت وجود داشته و دارای ویژگی فلورسانس است که از راه اندازه‌گیری نور قرمز بدست آمده از فوتولومینسانس، میزان کلروفیل a را می‌توان برآورد نمود. طرح اصلی دستگاهی برای اندازه‌گیری میزان کلروفیل a بر اساس سنجش شدت نور فوتولومینسانس برای این مهم در نظر گرفته شد. سپس از دیدگاه نرم افزاری و سخت افزاری بهینه شده و مورد استفاده قرار گرفت. در این طرح، روند و توابع شدت‌های نور بر حسب غلظت، جهت کالیبراسیون دستگاه انجام شد و معایب و مزایای طرح مورد بررسی قرار گرفت. اندازه‌گیری مستقیم نور، نوفه‌های کم، پایداری بالا و تهیه روال منطقی بین داده‌ها می‌تواند به افزایش قابلیت‌ها و بهبود کیفیت کمک کند. از این رو، این دستگاه به ابزاری دقیق برای اندازه‌گیری غلظت کلروفیل تبدیل شد که قابلیت تجاری‌سازی نیز دارد. افزون بر این، پایداری، تکرارپذیری و دقت بالای دستگاه نشان از مزیت روش‌های طیف‌سنجی نشری (فوتولومینسانس) نسبت به روش‌های جذبی طیف‌سنجی است.

واژگان کلیدی: ویژگی‌های نوری جلبک، کلروفیل a ، فوتولومینسانس، طیف‌سنجی، لام نئوبار.

¹ DOI: 10.22051/ijap.2023.43744.1324

^۲ استادیار، گروه فیزیک، دانشکده علوم، دانشگاه حکیم سبزواری، سبزوار، خراسان رضوی، ایران. (نویسنده مسئول) Email: ehsan.koushki@hsu.ac.ir

^۳ استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه حکیم سبزواری، سبزوار، خراسان رضوی، ایران. Email: eisa_kohan@yahoo.com



۱. مقدمه

افزایش جمعیت ساکنان زمین و به پیروی از آن افزایش میزان تقاضا برای منابع آبی قابل استفاده، و نیز تغییرات آب و هوای جهانی، همواره آب را به عنوان یکی از مهمترین عوامل دستیابی به توسعه پایدار مطرح ساخته است. اگر معیارهای تفاوت میان کشورهای در حال توسعه و توسعه یافته را در نظر بگیریم، مدیریت بهینه منابع آبی یکی از معیارهای بسیار پررنگ و با اهمیت خواهد بود. منابع آبی تنها راه حفظ بقا و توسعه پایدار در قرن حاضر است. با توجه به گزارشات یونسکو، اگر سرانه آبی هر کشور بین ۱۰۰۰ تا ۲۰۰۰ مترمکعب باشد، آن کشور دچار کم آبی و بحران منابع آبی است. بنابراین سرانه آبی هر کشور که زیر ۱۰۰۰ مترمکعب باشد، آن کشور بحران زده بوده و نیازمند مدیریت اضطراری است. بر اساس این تعریف در حال حاضر ۲۶ کشور جهان و از جمله ۹ کشور در خاورمیانه شدیداً با کمبود آب روبرو هستند و دو میلیارد نفر در جهان محروم از آب شیرین و مناسب هستند. این در حالی است که در طی ۷۰ سال اخیر تقاضای آب در جهان سه برابر شده است [۱-۳].

ایران نیز به عنوان کشوری در حال توسعه مشمول این اصل است. کمبود بارش های سالانه در ایران، توجهی ویژه به منابع آبی را می طلبد. بیش از نود درصد از مساحت کل ایران در ناحیه های خشک و نیمه خشک قرار دارد. متوسط بارش سالانه در ایران ۲۴۰ میلیمتر است که این میزان بسیار کمتر از میانگین جهانی است. توزیع ناهمگون بارش ها در ایران به گونه ای است که در آستارا سالی ۲۰۰۰ میلی متر و در کویر لوت ۰.۵ میلی متر بارش داریم. گذشته از این، آلودگی منابع آب های سطحی و زیرزمینی، شورشیدن سفره های آب زیرزمینی در اثر نفوذ سفره های آب شور به آن، افت شدید سطح آب در اثر پمپاژ بیش از حد آن در بخش صنعت و کشاورزی، نارسایی در زمینه انتقال آب و مشکلات در زمینه لوله کشی شهری و انتقال فاضلاب، عدم تصفیه درست فاضلاب های شهری و صنعتی، و درصد بالای آلاینده ها به ویژه فلزات سنگین، بیش از پیش به مشکلات بخش آب در ایران دامن زده است.

در این میان افزون بر تلاش برای حل مشکلات بالا، حفظ و نگهداری منابع آبی موجود و نیز دستیابی به منابع جدید آبی از اهمیت بسزایی برخوردار است. با این وجود، بررسی کیفیت مطلوب منابع و مخازن آبی می تواند گاهی پرهزینه و دشوار باشد. یکی از شاخص های سلامت و کیفیت آب، جلبک ها و فیتوپلانکتون های موجود در آب است که شامل کلروفیل و به صورت ویژه کلروفیل نوع a (کلروفیل-a) هستند که البته از مهم ترین پارامترهای کیفیت آب به شمار می آید [۴ و ۱].

برای نخستین بار، لینه گیاه‌شناس در سال ۱۷۵۴، جلبک‌ها را با نام علمی آُلجی^۱ بررسی و معرفی کرد. در بیشتر جلبک‌ها هر سلول دارای ۱ تا ۲ عدد کلروپلاست (سبزینه) و به ندرت دارای کروماتوفور هستند. جلبک‌ها در اولین گروه‌بندی بر اساس رنگشان در شاخه‌های مختلفی چون جلبک‌های سبز، قهوه‌ای، قرمز و ریز جلبک‌ها (جلبک‌های سبز-آبی) تقسیم‌بندی می‌شوند. همان‌طور که از نامگذاری این شاخه‌ها مشخص است، رنگ جلبک‌ها معیاری از رنگیزه‌های کلروفیلی و غیر کلروفیلی موجود در آن‌ها است که می‌تواند برای سنجش غلظت انواع جلبک‌ها به کار رود. درصد انواع کلروفیل و رنگیزه‌های غیر کلروفیلی در رنگ جلبک‌ها مهم است. هر سلول جلبک دارای چند عدد کلروپلاست و هر کلروپلاست شامل صدها مولکول کلروفیل (سبزینه) از انواع مختلف است. شمار کلروپلاست‌ها در هر سلول به صورت ژنتیکی مشخص می‌شود. کلروپلاست‌ها به امواج مختلف طیف مرئی حساس بوده و با استفاده از کلروفیل خود انرژی فوتون‌ها را صرف تشکیل پیوندهای شیمیایی می‌کنند.

کلروفیل‌ها رنگیزه عمده‌ی فتوسنتزی در عالم گیاهان می‌باشند. مولکول کلروفیل شامل سر پورفیرینی (چهار حلقه‌ی پیرول محتوی عامل نیتروژن که به یک یون منیزیم در مرکز متصل هستند) و یک دنباله‌ی هیدروکربنی (فیتول) هست. کلروفیل‌ها با دنباله‌ی هیدروکربنی محلول در چربی در همه جلبک‌ها، گیاهان عالی و سیانوباکتری‌ها یافت می‌شوند و عمل فتوسنتز را انجام می‌دهند [۵]. چهارنوع کلروفیل در جلبک‌ها شناسایی شده است: کلروفیل a در همه گروه‌های جلبکی و سیانوباکتری‌ها موجود می‌باشد. کلروفیل b در جلبک‌های سبز، کلروفیل c در دیاتومه‌ها، دینوفلاژلات‌ها و جلبک‌های قهوه‌ای، کلروفیل d تنها در جلبک‌های قرمز [۶] و کلروفیل f در برخی از سیانوباکتری‌ها یافت می‌شود [۷]. کلروفیل a فراوان‌ترین شکل کلروفیل در موجودات فتوسنتز کننده است و سبب رنگ سبز در گیاهان و جلبک‌ها می‌شود [۸] و افزون بر این به عنوان یک شاخص معتبر برای توده زیستی فیتوپلانکتون (جلبک‌ها) و کیفیت آب محسوب می‌شود [۹]. سایر کلروفیل‌ها به عنوان رنگدانه‌های کمکی و مولکول‌های رابط عمل کرده و به کلروفیل a در فتوسنتز کمک می‌کنند. ساختار مولکولی این کلروفیل‌ها در شکل ۱ نمایش داده شده است.

طول موج‌های جذبی انواع مختلف کلروفیل متفاوت است به صورتی که کلروفیل a نور بنفش و نارنجی را به صورت عمده جذب می‌کند. کلروفیل b اغلب نور آبی و زرد را جذب می‌کند. هر دو نوع کلروفیل a و b، به میزان کمتر جذب کننده‌ی دیگر طول موج‌های نوری نیز هستند. به صورت

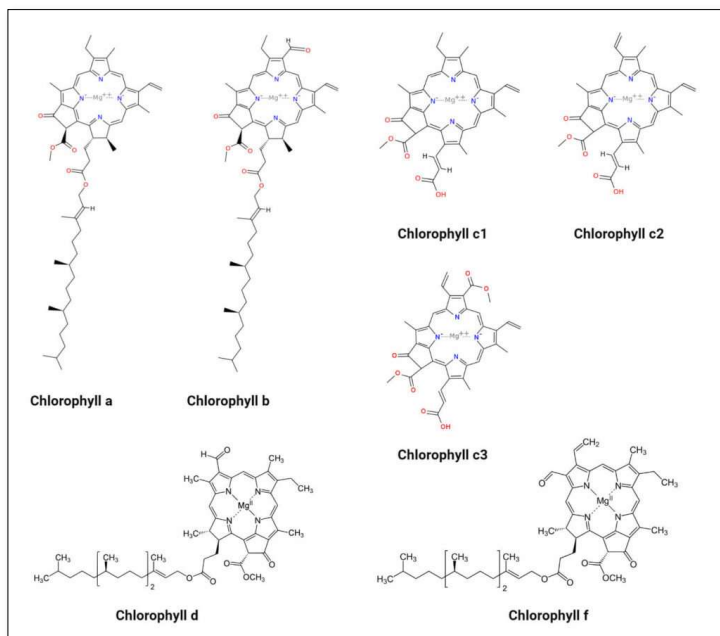
^۱ Algae



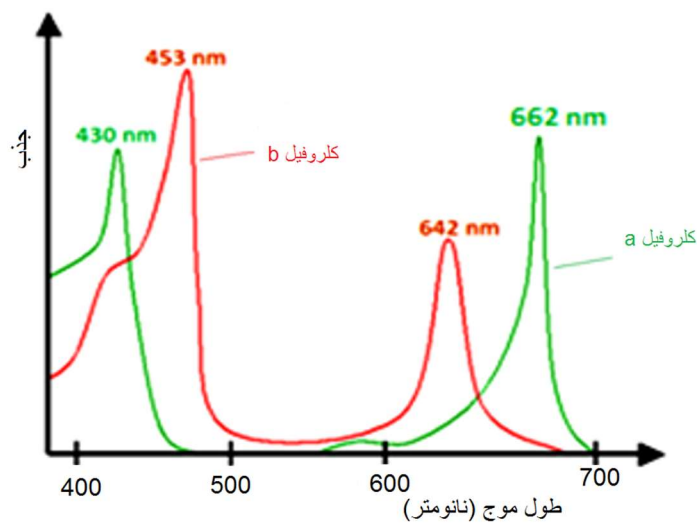
کلی می‌توان گفت که همه انواع کلروفیل، نورهای بنفش-آبی را جذب می‌کنند، اما برخی چون کلروفیل c جذب بالایی را در نورهای زرد و نارنجی نیز نشان می‌دهند و یا برخی دیگر چون کلروفیل a و b در نور قرمز نیز جذب بالایی دارند [۱۰]. به بیان دقیق‌تر مقادیر جذب کلروفیل a- دارای قله‌های جذبی در ۴۳۰ و ۶۶۲ نانومتر و در کلروفیل b- دارای قله جذب تقریبی در ۴۵۳ و ۶۴۲ نانومتر هستند (شکل ۲) [۱۱ و ۱۲]. طیف‌های بدست آمده در آزمایش‌های مختلف ممکن است دارای قله‌های کوچک‌تر اضافی و غیرمنتظره (یک تا سه قله اضافی) نیز باشند که می‌توان آن را به وجود مقادیر اندکی از جاذب‌های غیر کلروفیلی (که به دلیل تصفیه ناقص کلروفیل‌ها وجود دارند) نسبت داد. افزون بر این، حلال مورد استفاده در تعیین محل قله‌ها بسیار مهم است. استفاده از حلال‌های شفاف با درصد‌های مختلفی از آب، اتانول، استون، دی‌اتیل‌اتر، و متانول می‌تواند قله جذب‌های اصلی را به سمت طول موج‌های بلندتر (جابجایی سرخ) و یا طول موج‌های کوتاه‌تر (جابجایی آبی) سوق دهد. دلیل این امر قطبش‌های الکتریکی متفاوت مولکول‌های حلال است که کلروفیل‌ها (با هر ذره دیگر کلئیدی چون نانوذرات که داخل این محلول‌ها پراکنده شده) را احاطه نموده و سبب تغییر پذیرفتاری الکتریکی و ویژگی‌های نوری کلروفیل‌ها می‌شوند [۱۲ و ۱۳]. آزمایش‌ها نشان می‌دهند که حلال‌های ترکیبی بیان شده می‌توانند در کلروفیل a- قله بلند اصلی را در بازه ۶۶۰ تا ۶۶۵.۲ نانومتر تغییر دهند. همچنین، در مورد کلروفیل b- این بازه از ۶۴۱.۸ تا ۶۵۲.۴ نانومتر متغیر است [۱۲]. از این رو، لازم است نتیجه‌گیری کنیم جابجایی‌هایی بین ۵ تا ۱۰ نانومتر در قله‌های اصلی طیف‌ها مربوط به قطبیت و ضریب شکست نوری حلال‌ها است و البته pH حلال نیز می‌تواند در این راستا نقش داشته باشد. با توجه به جدایی طیفی کافی قله‌های کلروفیل‌های a و b، این میزان کم جابجایی نمی‌تواند مانعی برای تشخیص قله اصلی ایجاد کند و با این وجود تشخیص کلروفیل‌های a و b از یکدیگر باز هم ممکن، آسان و بدیعی خواهد بود.

با توجه به ویژگی‌های نوری کلروفیل‌های مختلف، می‌توان از روش‌های اپتیکی چون طیف‌سنجی برای تشخیص و اندازه‌گیری میزان و نوع کلروفیل‌های موجود در آن استفاده نمود. روش‌های نوری بر پایه طیف‌سنجی و به‌ویژه طیف جذبی مرئی-فرابنفش و طیف فوتولومینسانس از روش‌های مرسوم در اندازه‌گیری غلظت کلروفیل‌ها است [۱۱]. کلروفیل a- متداول‌ترین نوع کلروفیل است که در همه موجودات فتوسنتزی تولیدکننده اکسیژن چون گیاهان آوندی، جلبک‌های قرمز و سبز و غیره وجود دارد و کلروفیلی است که بیش از سایرین ویژگی فوتولومینسانس از خود نشان می‌دهد

و با تابش نور بنفش یا آبی، نور قرمز از خود متصاعد می‌کند [۱۲ و ۱۳]. جدول ۱ اطلاعات کامل تری درباره طیف جذبی انواع کلروفیل ارائه می‌دهد.



شکل ۱ ساختار مولکولی کلروفیل‌ها.



شکل ۲ طیف جذبی کلروفیل‌های a و b [۱۲ و ۱۴].



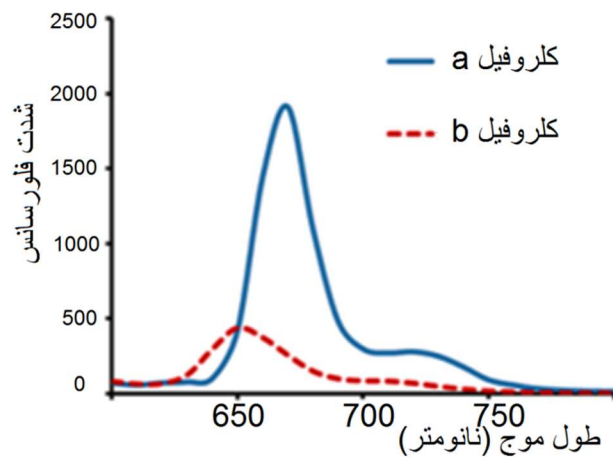
جدول ۱ رنگیزه‌های اصلی فتوسنتزی در جلبک‌ها و ویژگی‌های آن‌ها [۱۰].

Major Chlorophylls in Algae	Algal groups	Solubility	Molecular formula	Absorbance	Function
Chlorophyll a	All photosynthetic algae	Organic solvents- alcohol, diethyl ether, benzene, acetone except petroleum ether	$C_{55}H_{72}O_6N_4Mg$	Red light absorption band-663 nm Other- 430 nm	Light receptor in photosystem I of the light reaction
Chlorophyll b	Chlorophyta Euglenophyta Charophyta	Maximum in acetone and Methanol	$C_{55}H_{70}O_6N_4Mg$	645 nm and 435 nm	Light harvesting pigment transferring absorbed light energy to chlorophyll a
Chlorophyll c ₁	Heterokontophyta	Ether, acetone, methanol, ethyl acetate	$C_{53}H_{70}O_6N_4Mg$	634 nm, 583 nm and 440 nm	Accessory pigment to photosystem II
Chlorophyll c ₂	Dinophyta Cryptophyta Phaeophyta Heterokontophyta	Ether, acetone, methanol, ethyl acetate	$C_{53}H_{70}O_6N_4Mg$	635 nm, 586 nm and 452 nm	Accessory pigment to photosystem II
Chlorophyll d	Cyanobacteria Rhodophyta	Diethyl ether, benzene, acetone, Methanol	$C_{54}H_{70}O_6N_4Mg$	696 nm, 456 nm and 400 nm and 710 nm (Infrared light)	Energy capturing from sunlight
Chlorophyll f	Cyanobacteria Xanthophyta	Diethyl ether, benzene, acetone, Methanol	$C_{55}H_{70}O_6N_4Mg$	>700 nm (Infrared light)	Energy transfer and charge separation

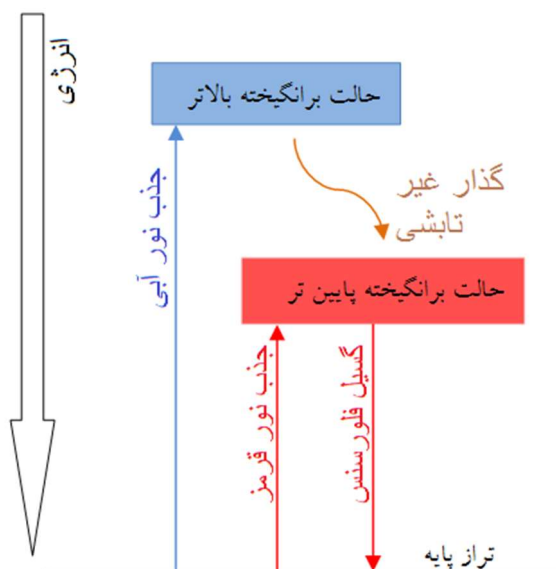
مرور منابع علمی نشان می‌دهد که طیف فوتولومینسانس (فلورسنس) کلروفیل‌های a و b نیز مورد مطالعه پژوهشگران بوده است [۱۱، ۱۲ و ۱۴]. در مقاله‌ای که توسط آیودها و همکاران در سال ۲۰۱۵ منتشر شد، این دو نوع کلروفیل را از گیاه سرخس استخراج و تحت تابش نورهای آبی رنگ طیف‌های فلورسنس آن‌ها را بررسی کردند. آن‌ها دریافتند که شدت نور تغییر یافته خروجی تابعی از طول موج نور ورودی و تهییج کننده است. به عبارتی دیگر، شدت نور قرمز خروجی به طول موج نور تابیده آبی به کلروفیل بستگی دارد [۱۵]. در مطالعه‌ای که توسط لمب و همکارانش در سال ۲۰۱۸ منتشر شد، کلروفیل‌های جلبک کروی کلرلا استخراج شد و مطالعات فلورسنس روی آن‌ها نشان داد که افزون بر طول موج ورودی، دما نیز بر این فرایند مؤثر بوده و افزایش دما می‌تواند شدت نور قرمز خروجی را کاهش دهد [۱۶]. در تمام بررسی‌های انجام شده طول موج نور فلورسنس ساطع شده بین ۶۴۰ تا ۷۰۰ نانومتر (قرمز و فرسرخ نزدیک) بوده است. همچنین بهترین طول موج-های تهییج کننده برای فلورسانس کلروفیل در محدوده ۳۸۰ تا ۴۵۰ یعنی نور بنفش مرئی و آبی بوده است (شکل ۳).

طیف جذبی کلروفیل‌ها بیشتر بر پایه گذارهای از نوع π به π^* است که در راستای قطری مولکول‌های کلروفیل (شکل ۱) و در امتداد اتم‌های نیتروژن قطری آن روی می‌دهد. این گذارها در همه انواع کلروفیل‌ها سبب دو قله جذبی در ناحیه‌های آبی و قرمز می‌شوند که البته طول موج

قله‌ها در انواع مختلف کلروفیل کمی با هم متفاوت است [۱۷]. در مورد کلروفیل a، این دو قله در نواحی آبی (۴۴۰ نانومتر) و قرمز (۶۶۲ نانومتر) رخ می‌دهد و به همین دلیل این کلروفیل سبز رنگ است و نور سبز را جذب نکرده، عبور می‌دهد. در شکل ۴، نمودار انرژی ترازهای جذبی و فلورسانس کلروفیل a مشاهده می‌شود.



شکل ۳ طیف فلورسانس کلروفیل‌های a و b با نور ورودی آبی ۴۴۰ نانومتر [۱۵].



شکل ۴ نمودار انرژی و ترازهای برانگیخته کلروفیل a که منجر به گذارهای جذبی و فوتولومینسانس می‌شود [۱۷].



تعیین عوامل موثر بر رشد جلبک‌ها در آب‌های سطحی از اهمیت زیادی برخوردار است. بررسی پراکنش جمعیت جلبکی (فیتوپلانکتون‌ها) و آگاهی از روابط بین عوامل محیطی و جامعه فیتوپلانکتونی می‌تواند در بهبود کیفیت آب و تصمیم‌گیری‌های مدیریتی تاثیر بگذارد. بررسی فلور جلبکی ۱۹ مخزن آبی در ایران [۱۸]، شامل سدهای امیرکبیر، ارس، چغاخور، گلستان، گلستان مشهد، گلپایگان، حسنلو، جیرفت، کارون، کرخه، مهاباد، میناب، ۱۵ خرداد، قشلاق، سفیدرود، شهناز، طوق، وشمگیر و زاینده رود، نشان دهنده تنوع جلبکی بالایی است به صورتی که ۱۱۲۹ نمونه جلبک از ۹ شاخه جلبکی شناسایی شده است. تنوع این جلبک‌ها شامل سیانوپروکاریوتا با ۱۷۲ گونه، اوگنوفایتا با ۵۳ گونه، کریزوفایتا با ۳۹ گونه، گراتوفایتا با ۳۹ گونه، باسیلاریوفایتا با ۵۳۱ گونه، دینوفایتا با ۲۵ گونه، کریپتوفایتا با ۷ گونه، کلروفایتا با ۱۷۲ گونه و استرپتوفایتا با ۱۷۲ گونه می‌باشند. در این بین بیشترین فراوانی مربوط به شاخه باسیلاریوفایتا با ۵۳۱ گونه بوده است. تنوع گونه‌ای هر یک از این سدها با منطقه جغرافیایی سد و کیفیت آب آن ارتباط مستقیم دارد به صورتی که جلبک‌های آب شور و آب شیرین با تفاوت معنی داری پراکنش وابسته به میزان شوری آب نشان می‌دهند. در این راستا ساخت دستگاهی که بتواند در محل میزان کلروفیل را اندازه بگیرد اجتناب‌ناپذیر است.

در این پژوهش بر پایه بررسی چیدمان اپتیکی سنجش ویژگی‌های فوتولومینسانس جلبک‌ها، به بررسی دستگاه‌های نوری که برای سنجش کلروفیل استفاده می‌شوند پرداخته و دستگاهی که بر اساس فوتولومینسانس کلروفیل a ساخته شده و در اختیار منابع آب ایران قرار گرفته است، بررسی شده است. تولید این دستگاه می‌تواند گامی در جهت خودکفایی در صنایع اپتیکی بوده و جلوه‌ای دیگر از کاربرد فیزیک در دیگر زمینه‌ها و صنایع را نشان دهد.

۲. روش‌های تجربی اندازه‌گیری غلظت کلروفیل‌ها

مواد آلی را می‌توان از دیدگاه نوری در دسته‌بندی‌های متفاوتی قرار داد. با توجه به چپش مولکول‌ها و تعداد الکترون‌های π غیرجایگزیده و شکل و تعداد حلقه‌های کربنی، اندازه و چیدمان‌های مونومری و پلیمری، ویژگی‌های نوری متفاوتی از آن‌ها دیده می‌شود. در این راستا، جلبک‌ها بعنوان سلول‌های زنده گیاهی دارای ویژگی‌های خاص خود هستند. اندازه نسبتاً بزرگ ساختار جمعیتی آن‌ها سبب پراکندگی قابل توجه نور می‌شود که بیشتر در جذب خالص نوری آن‌ها تداخل ایجاد کرده و طیف‌سنجی از این نمونه‌ها را با مشکل مواجه می‌کند. به عبارت دیگر، در جذب نوری که

از هیبریدهای جلبکی (چون مخلوط در آب) دیده می‌شود، اثرات پراش سبب ایجاد سهم در جذب نوری شده و داده‌های جذب نور عبوری، دیگر به صورت خالص تنها مربوط به جذب طیفی نخواهند بود بلکه پراش نوری هم در آن وارد خواهد شد. بر اساس نظریه کلاسیکی پراکندگی مای^۱، چون اندازه سلول‌های جلبک در مقیاس میکرون و از محدوده طول موج نور مرئی است، انتظار پراکندگی نوری بسیار است. این امر را می‌توان با عبور یک پرتو لیزر پایدار از درون محلول جلبکی به روشنی دید. اگر از یک توان سنج برای اندازه‌گیری توان نور عبوری استفاده کنیم، توان سنج یک عدد ثابت را نشان نخواهد داد. چرا که با کوچک‌ترین حرکت براونی ذرات از مقابل پرتو و پراکنده‌سازی دینامیک نور، عدد متفاوتی خواهیم دید. در این شرایط بهتر است افزون بر استفاده از جذب نوری، جهت ایجاد دقت افزوده از ویژگی نوری دیگری از جلبک‌ها نیز استفاده کرده و آن ویژگی فلورسانس (نوعی فوتولومینسانس) کلروفیل‌های موجود در جلبک‌ها است. چنانکه پیشتر بیان شد، فلورسانس نوعی ویژگی نورتابی (لومینسانس) است که در سیستم‌های شیمیایی گازی، مایع یا جامد و به ویژه در مولکول‌های آلی رخ می‌دهد و اینگونه مواد کاربردهای گوناگونی در فناوری‌های کنونی دارند. فلورسانس در اثر جذب فوتون در حالت پایه و رسیدن به حالت برانگیخته بوجود می‌آید. زمانی که مولکولی برانگیخته، به حالت پایه بازگردد، تابش فوتون‌هایی با انرژی کمتر و طول موج بلندتر را به همراه دارد. نتیجه ساده این فرآیند این است که اگر ماده را با نوری آبی یا بنفش تابانیده و برانگیخته کنیم، ماده نور را جذب نموده و در محدوده دیگری یعنی سبز، زرد یا قرمز خواهد داد. استفاده از ابزارهای دقیق اپتیکی که طیف‌های مختلف جذبی، نثری و فلورسانس را اندازه‌گیری می‌کنند در این حوزه بسیار مهم است.

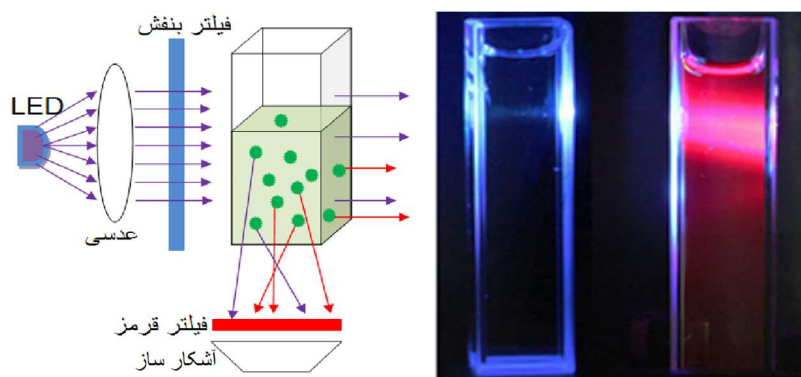
در اندازه‌گیری غلظت جلبک‌ها به روش‌های اپتیکی از دو پدیده اپتیکی استفاده می‌شود: جذب نوری بر پایه قانون بیر-لامبرت و اثر فوتولومینسانس تبدیل نور بنفش-آبی به نور قرمز (در جلبک‌های شامل کلروفیل نوع a). متداول‌ترین چیدمان اپتیکی برای اندازه‌گیری غلظت کلروفیل a در شکل ۵ ملاحظه می‌شود که برای ساخت دستگاه نیز استفاده شده است. در این چیدمان نور بنفش ساطع شده از یک چشمه LED پس از فیلتر شدن (در صورت نیاز) به سل شیشه‌ای یا پلاستیکی شامل محلول آبی جلبک تابانیده شده و نور قرمز بدست آمده از فوتولومینسانس پس از فیلتر در جهت عمود بر راستای تابش، توسط یک آشکارساز^۲ فوتوسل اندازه‌گیری می‌شود [۱۹] و [۲۰]. معمولا فوتوسل‌ها یک ولتاژ یا جریان خروجی به عنوان سیگنال تولید می‌کنند و یا چون آنچه

¹ Mie Theory

² Detector



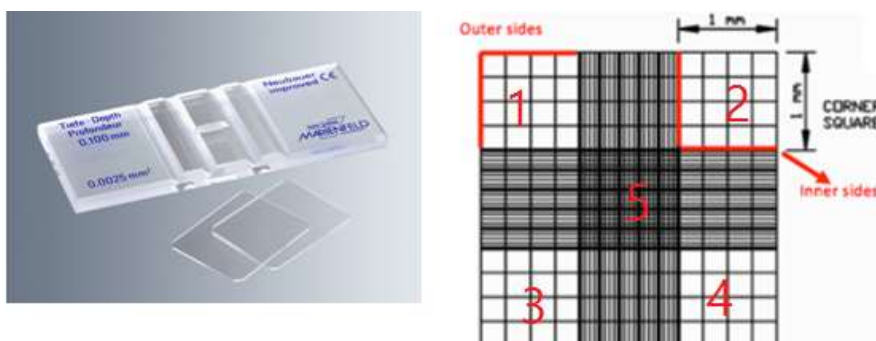
در اینجا انجام شد، تغییر در امیدانس یا مقاومت ظاهری توسط یک ریزپردازنده اندازه گیری می شود. با کالیبراسیون اعداد توسط یک محلول استاندارد که غلظت جلبک آن با روشی دیگر چون لام نئوبال (که در ادامه شرح می دهیم) اندازه گرفته شده، دستگاهی ساخته شد که غلظت جلبک را نمایش می دهد. در ادامه با جزئیات بیشتری از فرایند کالیبراسیون آشنا خواهیم شد.



شکل ۵ اندازه گیری غلظت جلبک. در سمت چپ چیدمان اپتیکی نشان داده شده است. نور آبی ابتدا توسط یک عدسی همگرا موازی سازی شده و پس از فیلتراسیون آبی (در صورت نیاز و پهن بودن طیفی چشمه نور) به سلول شامل جلبک می تابد و پس از ایجاد نور قرمز و فیلتراسیون و جداسازی از نور آبی پراکنده شده، وارد آشکار ساز قرمز می شود. در سمت راست دو نمونه حاوی نور کلروفیل-a (قرمز) و b (آبی) ملاحظه می شوند [۱۹ و ۲۰].

یکی دیگر از روش های شمارش تراکم سلولی کشت جلبکی استفاده از هموسیئومتر یا لام نئوبال است. هموسیئومترها همانطور که از نام آن پیداست، برای شمارش سلول های خونی ساخته شده اند، اگرچه می توان از آن ها برای محاسبه تراکم سلولی کشت جلبکی استفاده کرد، به شرط آنکه سلول ها کمابیش کوچک (۵۰-۵ میکرومتر) و تک سلولی یا زنجیره ای کوتاه باشند. هموسیئومتر برای تراکم سلولی بیش از ۱۰۴ سلول در میلی لیتر استفاده می شود. این لام از یک اسلاید میکروسکوپی شیشه ای ضخیم به همراه کنگره های مستطیلی شکل تشکیل شده که یک محفظه را به وجود می آورد. این محفظه با ساختار توری مانندی از خطوط عمود بر هم توسط لیزر حک شده است. طراحی این وسیله با دقت خاصی بوده و حدود خطوط و عمق دستگاه مشخص می باشد و در نتیجه شمارش تعداد سلول ها در حجم مشخصی از مایع و در نتیجه محاسبه غلظت سلول ها در حجمی از مایع امکان پذیر است. اندازه این محفظه ها می تواند بسته به شرکت سازنده آن متفاوت باشد. در کار حاضر از نام

بازرگانی نوبار^۱ استفاده کردیم که از دو اتاق تشکیل شده است، هر کدام با حجم ۰/۱ میلی-مترمکعب، شامل یک شبکه شمارش مشخص شده به مساحت ۱ میلی‌متر مربع است (شکل ۶). در نمونه جلبکی سلول‌های غیرمتحرک که نیازی به تثبیت ندارند می‌توانند به محض جمع آوری نمونه شمارش شوند. با این حال، اگر بین جمع آوری نمونه و شمارش تاخیر وجود داشته باشد، یا اگر سلول‌ها متحرک باشند، نمونه باید حفظ شود که رایج‌ترین تثبیت‌کننده مورد استفاده برای ریزجلبک‌های دریایی، محلول لوگول است.



شکل ۶ هموسیتومتر یا لام نوبار و شبکه شمارش.

۳. بررسی آزمایشگاهی نمونه‌های جلبکی

در نمونه‌هایی که از استخرها و آبگیرهای آب شیرین موجود در شهرستان سبزوار گردآوری شد، جلبک‌های سبز رنگ کلونیدی در آب مورد بررسی قرار گرفتند. در شکل av تصویر نمونه‌های بهم پیوسته و ماکروسکوپی جلبک را می‌بینیم که با چشم غیر مسلح قابل دیدن هستند. در شکل bv، تصویری میکروسکوپی از جلبک‌های زنده کلونیدی واحد مشاهده می‌شود و در شکل cv تصویر بزرگ‌نمایی شده آن دیده می‌شود. تصاویر میکروسکوپی نشان می‌دهند این تصویر متعلق به میکروجلبک سبز سندسموس^۲ است. این میکروجلبک از خانواده سندسماسی^۳ بوده و به عنوان یکی از ریزجلبک‌های مهم که متعلق به رده کلروفیل سی^۴ می‌باشد و برای اهداف آبی‌زی پروری و

¹ Neubauer

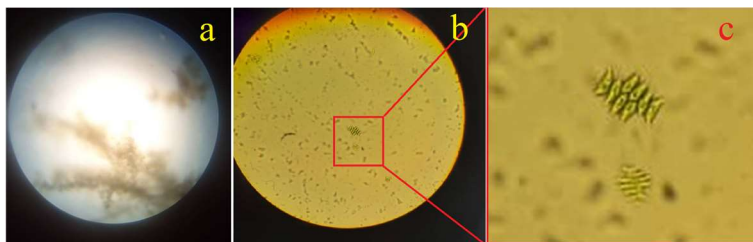
² Scenedesmus

³ Scenedesmaceae

⁴ Chlorophyceae



خوراک انسانی نام برده شده است [۲۱]. تصویری روشن از این میکروجلبک در شکل ۸ قابل مشاهده است [۲۲].



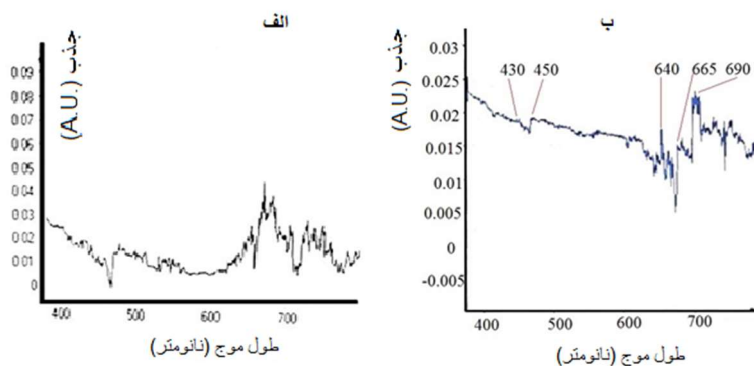
شکل ۷ (a) تصویر جلبک‌های بهم چسبیده رشته‌ای شکل، (b) تصویر میکروسکوپی جلبک‌های کلونیدی در آب، (c) تصویر بزرگنمایی از چند سلول جلبک.



شکل ۸ تصویری با وضوح بالا از جلبک سندسموس [۲۲].

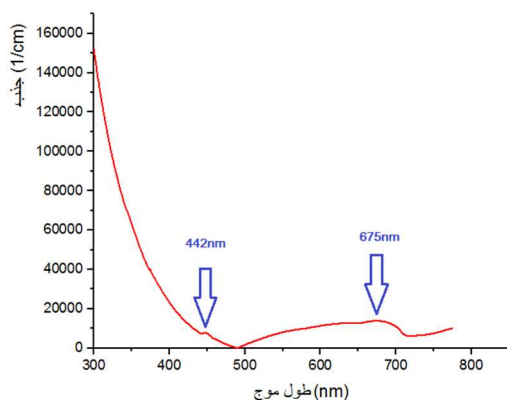
در گام بعد طیف جذبی کلونید این جلبک بررسی شد. چنانکه در شکل ۹ مشاهده می‌شود، با رسوب ذرات درشت کلونید و خوشه‌های بهم چسبیده جلبک، طیف روشن‌تری بدست آمد که بررسی قله‌های آن وجود مقادیری از کلروفیل‌های a و b را نشان می‌دهند. تصفیه به‌روش‌های رسوب‌گذاری یا سانتریفوژ در یافتن طیف‌های واضح‌تر مهم است. وجود تجمع‌هایی از سلول‌ها و مواد رنگینه غیر کرومیلی تصفیه نشده سبب می‌شود طیف جذبی بدست آمده با طیف کلروفیل‌های خالص شکل ۲ متفاوت باشد. ذرات درشت‌تر با پراکندگی نور سبب ایجاد نوفه‌های بیشتر در نمودار جذبی می‌شوند. اگرچه نوفه‌ها به مقداری نیستند که بتوانند بر قله‌های اصلی جذب، به ویژه بر محل

طول موجی آن‌ها تاثیر بگذارند و از این رو می‌توان از روی قله‌های جذب به نوع کلروفیل همچنان پی برد.



شکل ۹ طیف جذبی نمونه جلبکی مورد آزمایش. (الف) طیف نمونه پیش از رسوب، (ب) طیف نمونه پس از رسوب گذاری.

در شکل ۱۰ طیف جذبی نمونه‌ای از همان حوزچه شکل ۷ را می‌بینیم که پس از تخلیه آب و شست‌وشو، دوباره پس از سه ماه تشکیل شده ولی بسیار رقیق‌تر از پیش است. غلظت این نمونه پس از رسوب گذاری ذرات گرد و غبار و چندین بار غلیظ‌سازی با استفاده از سانتریفیوژ، 0.5 mg/mL بدست آمد. قله‌های جذبی در ۴۴۲ و ۶۷۵ نانومتر دلیل بر وجود مقادیر کمی از کروئیل a است. نوفه‌های کمتر نسبت به شکل ۹ نشان می‌دهد که نمونه از نظر ابعاد ذرات معلق یکدست‌تر بوده و دارای تجمیع‌های درشت نیست. جذب در ناحیه ۳۰۰ تا ۴۰۰ به خاطر پراکندگی مای نورهای فرابنفش است و ارتباطی با غلظت کلروفیل ندارد.



شکل ۱۰ طیف جذبی نمونه جلبکی مورد آزمایش با جلبک‌های جوان.



در نمونه‌هایی که از استخرها و آبیگرهای آب شیرین موجود در شهرستان سبزوار گردآوری شد، تمام جلبک‌های سبز رنگ کلونیدی در آب مورد بررسی قرار گرفتند. تنوع جلبکی موجود در آب مهم است و در تصاویر میکروسکوپی تهیه شده حداقل شش گونه از سه راسته متفاوت جلبکی شناسایی شدند. در شکل ۱۱ (الف)، گونه اول از جنس *Lepocinclis*^۱ از شاخه اوگنوفیتا^۲ نمایش داده شده است. اوگلناها از آغازیانی بوده که در آب‌های غنی از مواد آلی زندگی می‌کنند. از ویژگی‌های ساختاری اوگلناها وجود لکه چشمی قرمز رنگ در نزدیک تاژک بوده که در تشخیص جهت نور موثر است. این جلبک‌ها با مصرف و تجزیه مواد آلی و باقی مانده‌های سایر موجودات در آب به تصفیه آب کمک می‌کنند. با این حال برخی از گونه‌های اوگلنا در آب‌های شور یا شیرین با محتوی نیتروژن بالا رشد کرده و ضمن شکل‌گیری بوم یا شکوفایی جلبکی (افزایش جمعیت جلبک‌ها در سطح آب و ممانعت از ورود نور و اکسیژن به اعماق آب)، منجر به مرگ ماهی‌ها و آبیان می‌شوند [۲۳]. گونه دوم در این نمونه آب از جنس *Gymnodinium*^۳ از خانواده دینوفلاژله‌ها^۴ در شکل ۱۱ (ب) نمایش داده شده است. دینوفلاژله‌ها با حدود ۲۰۰۰ گونه بیش از ۷۰ درصد گونه‌های سمی آب را تشکیل می‌دهند و در آب‌های با نیتروژن بالا در شکوفایی جلبکی نیز مشارکت فعال دارند [۲۴ و ۲۵]. گونه *Gymnodinium* نیز با تولید سم ساکسیتوزین^۵ ایجاد سندرم‌های کشنده و خطرناک می‌کند که از علائم آن واکنش‌های عصبی، عدم تعادل، گیجی و تب است. گونه‌های سوم تا پنجم متعلق به جنس *Desmodesmus*^۶ از خانواده سندماسی^۷ (شکل ۱۱ ج-ه)، و گونه ششم از جنس کلرلا^۸ (شکل ۱۱ و)) که همگی متعلق به شاخه کلروفیتا^۹ می‌باشند. جلبک‌های جنس *Desmodesmus* با تنوع ۷۰ گونه‌ای در کلنی‌های ۴ تا ۸ تایی سبز قرار می‌گیرند. این جلبک‌ها منابع غنی نیتروژن و فسفات را دریافت می‌کنند و نقش ویژه‌ای در تصفیه پساب‌ها دارند.

¹ *Lepocinclis globosa* or *Lepocinclis ovum*

² Euglenophyta

³ *Gymnodinium catenatum*

⁴ Dinophyceae

⁵ Saxitoxin

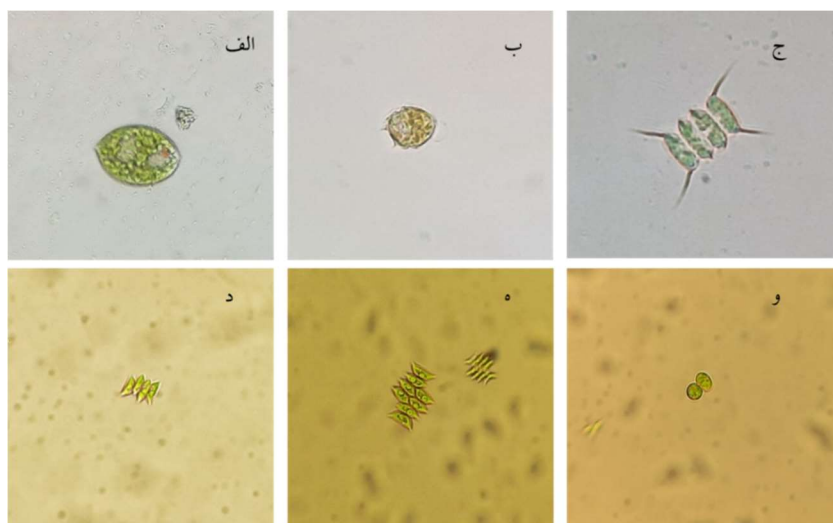
⁶ *Desmodesmus quadricauda* and *Scenedesmus acutus*

⁷ Scenedesmaceae

⁸ *Chlorella vulgaris*

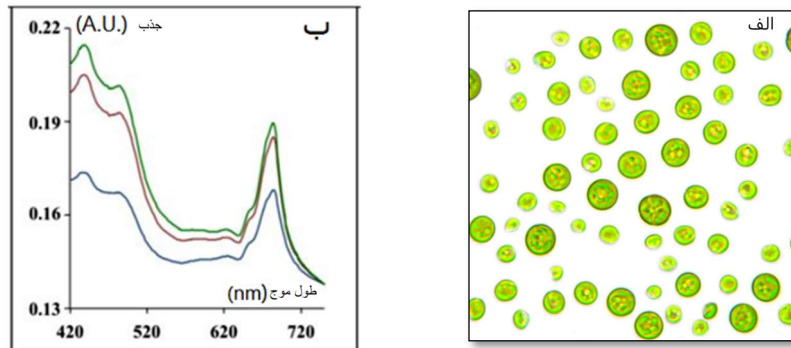
⁹ Chlorophyta





شکل ۱۱ تصویر جلبک‌های میکروسکوپی موجود در نمونه آب شیرین جمع آوری شده از استخر در سبزوار. (الف) جنس لپوسینسلیس از راسته اوگلنا، (ب) جنس جیمنودینیوم از راسته دینوفلاژله‌ها، (ج تا ه) گونه‌های متفاوت از جنس سندسموس و (و) جنس کلرلا همگی از شاخه کلروفیتا.

نمونه دیگری که از شرکت توسعه ذخایر زیستی جلبک‌های فارس خریداری شد به نام علمی کلورلا وولگاریس^۱ است. نمونه تهیه شده تقریباً خالص بوده و شکل جلبک‌ها و طیف جذبی آن در شکل ۱۲ مشاهده می‌شود.



شکل ۱۲ (الف) تصویر جلبک‌های میکروسکوپی کلورلا وولگاریس از شرکت توسعه ذخایر زیستی جلبک‌های فارس و (ب) طیف جذبی کلروفیل در غلظت‌های متفاوت [۲۶].

^۱ Chlorella vulgaris



۴. ساخت دستگاه

دستگاه بر اساس الگوی شکل ۱ ساخته شد. نشتی‌های نوری به درون دستگاه به عنوان عنصر مخرب ایجاد نوفه کاهش یافت. از یک برد آردوینو به عنوان ریزپردازنده استفاده شد. نرم افزارهای برد میکروکنترلر نوشته و بر روی برد بارگیری شد. همچنین پایداری داده‌های خروجی و در نهایت کالیبراسیون با جلبک‌های بیان شده در بالا انجام پذیرفت. طرح اصلی که دستگاه شمارنده سلول‌های جلبک رومیزی (پورتابل) است در شکل ۱۳ نشان داده شده است. طراحی اپتیکی داخلی بهینه شد و تاثیر نشتی‌های نوری خارجی مورد ملاحظه قرار گرفت. با کاهش نشتی‌ها و بهینه‌سازی در طراحی نوری، میزان نوفه حسگر نوری به شدت کاهش یافت. همچنین سیستم نمایشگر LED رنگی با سرعت بالا بر روی دستگاه نصب و راه اندازی شد که می‌تواند میزان شدت نور فوتولومینسانس و نیز غلظت جلبک‌ها را همزمان نمایش دهد. نمونه شامل درپوش جهت جلوگیری از نشتی نوری خارجی است. نگهدارنده سلول مایع که بر اساس استانداردهای طیف‌سنج‌های اپتیکی طراحی و چاپ سه بعدی شده است را در شکل ۱۳ ملاحظه می‌نمایید.



شکل ۱۳ طرح اصلی که دستگاه شمارنده سلول‌های جلبک رومیزی (پورتابل).

درون دستگاه، چشمه نوری و آشکارساز نور قرار گرفته‌اند و نور بنفش که از چند LED قوی با طول موج ۳۸۵ نانومتر ساطع شده، از کلونید شامل جلبک‌ها عبور نموده و به آشکارساز می‌رسد. نور عبوری پس از عبور از فیبر نوری گیرنده به سنسور تشخیص نور می‌رسد که شامل سه فیلتر رنگی (سبز- قرمز- آبی) است. پس از فیلتر شدن و حذف باقیمانده نورهای اضافی در هر فیلتر، شدت نورهای آبی، قرمز و سبز با استفاده از سه سنسور که زیر هر فیلتر قرار دارد، خوانده می‌شود. سنسور دیگری در جهت عمود بر نور تابشی تنها نور قرمز بدست آمده از فوتولومینسانس ساطع شده

از کلروفیل a را می‌خواند. با اندازه‌گیری نور قرمز و با کالیبراسیون آن غلظت کلروفیل-a و به پیروی از آن، غلظت سلول‌های جلبک قابل محاسبه است. برای ساخت دستگاه سنجش غلظت کلروفیل، نخست باید جمع‌آوری داده‌ها انجام شود. جمع‌آوری داده‌ها و در نهایت تجزیه و تحلیل آن‌ها برای کالیبراسیون ضروری است. روش کار و نحوه جمع‌آوری داده‌ها در این دستگاه به این صورت است که ابتدا سل دستگاه با نمونه آب شامل جلبک مورد نظر پر می‌شود. پس از آن دستگاه کار خود را آغاز کرده و در فواصل مشخص نور LED هدایت شده را از درون مایع نمونه عبور می‌دهد. سپس سنسورهای نوری اطلاعات نوری عبوری از مایع نمونه را گرفته و امپدانس‌ها به عنوان داده‌ها بر اساس شدت مولفه‌های نور ثبت و ذخیره می‌شوند. یادآوری می‌شود که فواصل آن‌ها تنظیم شده است تا بهترین بهره و حساسیت بدست آید. تمامی قطعات و ماژول‌های بیان شده به همراه کد نوشته شده، کتابخانه‌های نرم افزاری و غیره در طرح بر روی برد آردوینو مگا نصب و آپلود شده است. فایل‌هایی که توسط نرم افزار سالیید ورکر^۱ طراحی و با استفاده از پرینتر سه بعدی ساخته شده‌اند.

۵. شمارش جلبک‌ها بر اساس هموسیتمتر یا لام نئوبار

به منظور شمارش جلبک‌ها در محیط کشت مورد نظر، باید لام نئوبار یا هموسیتمتر از محلول شامل جلبک پر شود. برای پر کردن محفظه‌های هموسیتمتر، ابتدا لامل ضخیم روی هر دو شبکه قرار گرفت و به کمک سمپلر مقدار ۱۰ میکرولیتر از نمونه جلبکی (کلرلا) از محیط کشت جلبک برداشته شد. سمپلر در زاویه تقریباً ۴۵ درجه (برای کنترل سرعت جریان بیشتر یا کمتر) و نوک آن در لبه جلویی لامل قرار گرفت. با فشار بسیار ملایم، نمونه به سرعت و به صورت یکنواخت در محفظه جریان یافت و محفظه‌ها پر شدند. بعد از حدود یک دقیقه که نمونه‌های جلبکی ته‌نشین و به صورت یکنواخت پخش شدند، شمارش جلبک‌ها در زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی ۱۰ صورت گرفت (شکل ۱۴). شمارش جلبک‌ها در محیط‌هایی با رقت‌های مختلف تکرار شد و تعداد جلبک‌ها در هر محیط توسط فرمول ارائه شده در ادامه محاسبه گردید. با هر بار شمارش جلبک‌ها در محیط‌های با رقت‌های مختلف میزان فلورسنت کلروفیل نمونه‌ها به کمک دستگاه طراحی شده مورد سنجش قرار گرفت.

^۱ Solid Works

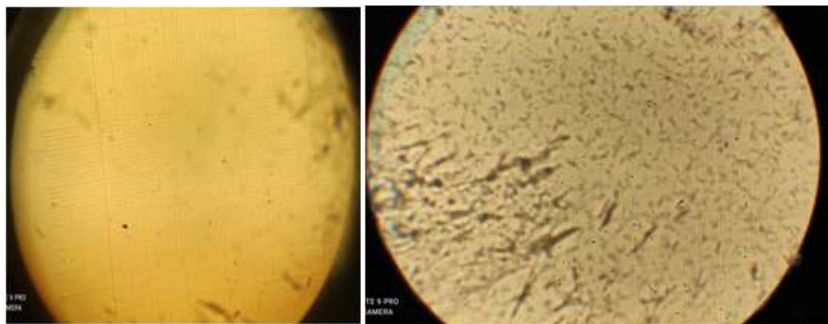


روش استاندارد برای محاسبه تراکم سلولی جلبک در استفاده از لام نئوبار وجود دارد. در ابتدا تعداد میانگین سلول‌ها در هر مربع را محاسبه می‌کنند:

$$(۱) \quad \text{تعداد میانگین سلول در هر مربع} = \frac{\text{تعداد سلول‌های شمارش شده}}{\text{تعداد مربع‌ها}}$$

و از رابطه استاندارد زیر می‌توان به غلظت سلول‌ها (تعداد در یک میلی‌لیتر) رسید:

$$(۲) \quad 10^4 \times \text{میانگین تعداد کل سلول‌ها در 25 مربع} = \text{تعداد کل سلول‌ها در 1 میلی‌لیتر}$$



شکل ۱۴ تراکم جلبکی بر روی هموسیتومتر یا لام نئوبار.

۶. تست و کالیبراسیون دستگاه و تهیه راهنما

غلظت کلروفیل-a رابطه مستقیمی با شدت نور قرمز تولید شده به روش فوتولومینسانس دارد. بخشی از نور آبی پس از عبور به رنگ قرمز تبدیل شده و در همه جهات پراکنده می‌شود. بعد از فیلتر شدن آن و حذف نور آبی، با آشکارسازی نور قرمز در جهت عمود بر تابش اولیه می‌توان به شدت نور فلورسنس رسید که معیاری برای غلظت کلروفیل-a است. از نمونه جلبکی خالص با غلظت‌های مختلف استفاده شد. دو نور سفید رنگ و آبی رنگ به صورت پیاپی و به مدت ۱ ثانیه از سلول شامل کلونید جلبکی عبور نموده و شدت نورهای عبوری ثبت شد. همانطور که در بخش پیشین مشاهده شد، شمارش نمونه‌های جلبکی انجام شده است. در ابتدا برای یک نمونه غلیظ با حجم ۳ میلی‌لیتر شمارش سلول‌های جلبک انجام شد. در گام بعد با آب مقطر حجم آن نمونه زیاد شد و دوباره خوانش شد و این فرآیند چندین بار تا رسیدن به نمونه‌ای رقیق و به ظاهر کمابیش شفاف ادامه یافت. نمودار شمارش تعداد سلول‌ها بر حسب حجم کل در شکل ۱۵ مشاهده می‌شود. از شکل پیداست که نمودار نزولی است و با حجم نسبت عکس دارد که دلیل آن کاملاً منطقی است. چنانکه می‌دانیم اگر غلظت را با n و تعداد کل سلول‌ها را با N و حجم را با V نشان دهیم، برای اولین غلظت داریم:

$$n_0 = \frac{N_0}{V_0} \quad (3)$$

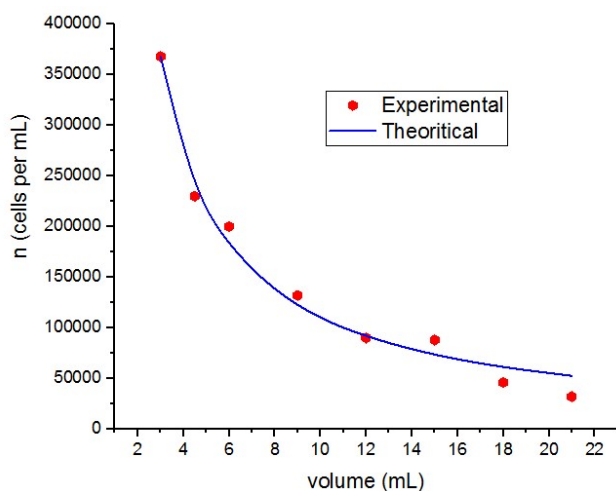
که زیرنویس‌های صفر مربوط به اولین نمونه است. در گام‌های بعد تعداد اولیه جلبک‌ها تغییر نکرده و تنها حجم زیاد و غلظت کم شده است. پس می‌توان نوشت:

$$n(V) = \frac{N_0}{V} \quad (4)$$

از رابطه (۳) می‌توان نوشت:

$$n(V) = \frac{n_0 V_0}{V} \quad (5)$$

یعنی غلظت با معکوس حجم در تناسب است که دو نمودار نیز به روشنی دیده می‌شود.



شکل ۱۵ نمودار غلظت بر حسب حجم تهیه شده.

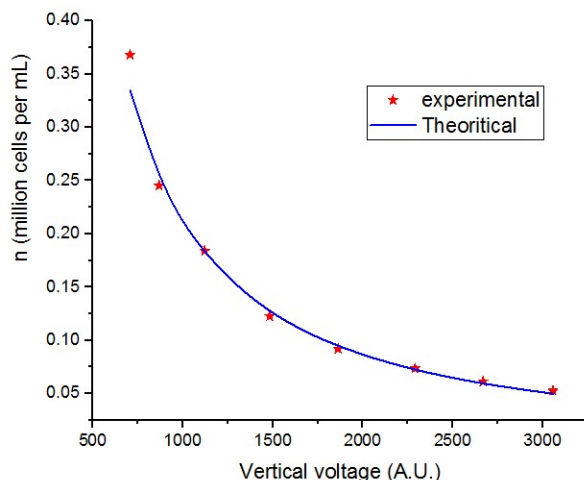
هر غلظت را درون سل دستگاه که شسته شده، ریخته شده است و اعداد سنسورها خوانش شد. مهم‌ترین عدد، عدد سنسور عمودی مربوط به تابش فوتولومینسانس است که اتفاقاً مناسب‌ترین عدد بود (سیگنال عمودی). تابع غلظت سلول‌های جلبکی شمارش شده بر حسب سیگنال عمودی در شکل ۱۶ آمده است. با برازش عددی نمودار به تابع تئوری رسیدیم که تابع کالیبراسیون است:

$$n = \frac{1694000}{(Vertical_signal)^{1.3}} \quad (6)$$



که در آن، n برحسب K_{cell}/mL (هزار سلول در میلی‌لیتر) و $Vertical_signal$ همان سیگنال عمودی است.

در نهایت از راه میان‌یابی ریاضی به این تابع ریاضی رسیدیم که با اعمال آن‌ها در کد برنامه‌نویسی، دستگاه حاضر کالیبره شد و قابل استفاده توسط سازمان منابع آب می‌باشد. پایداری، تکرارپذیری و دقت بالای دستگاه نشان از مزیت روش‌های طیف‌سنجی نشری (فوتولومینسانس) نسبت به روش‌های جذبی طیف‌سنجی است.



شکل ۱۶ نمودار غلظت بر حسب سیگنال عمودی دستگاه.

در آخرین گام ضریب کالیبراسیونی استفاده شد که یک خروجی بر حسب میکروگرم کلروفیل a بر میلی‌لیتر روی صفحه نمایش دهد. از آنجا که اندازه‌گیری جرمی کلروفیل بسیار دقیق و حساس است، از مقالات معتبر برای این امر استفاده شد تا ضریب تبدیل مناسبی برای تعداد سلول‌ها در واحد حجم یافته شود. در سال‌های کنونی، چند روش جدید برای محاسبه جرم دقیق کلروفیل a معرفی شده‌اند [۲۷ و ۲۸]. در منبع [۲۶] زیست توده‌های میکروجلبک‌ها (بیشتر از نوع نمونه‌هایی که در کار حاضر بررسی شد) در شرایط محیطی گوناگون چون تابش نورهای متفاوت و ph های متفاوت در فازهای لگاریتمی (در حال رشد) و رشد یافته بررسی شدند. افزایش زیست توده با استفاده از روش وزن‌سنجی و روش اسپکتروفتومتری بر اساس کلروفیل a موجود در سلول‌های ریزجلبک مشخص شد. تعداد سلول‌های ریزجلبک نیز با استفاده از هموسیتومتر مشخص شد. از بررسی تمام حالات بررسی شده به این نتیجه رسیدیم که به صورت متوسط به ازای هر سلول جلبک 5.5×10^{-8}

میکروگرم کلروفیل a داریم. یا به عبارتی جرم کلروفیل‌های a را $5.5 \times 10^{-8} \frac{\mu g}{cell}$ می‌توان نوشت. این ضریب تبدیل در دستگاه اعمال شده و ppm کلروفیل a را می‌دهد. دقت اندازه‌گیری این دستگاه تا ۱ ppm برآورد شده است که دقت متداول برای دستگاه‌های اندازه‌گیری غلظت کلروفیل a بوده و قابل مقایسه با نمونه‌های خارجی است [۲۹-۳۱].

بیان این نکته ضروری است که برازش عددی داده‌ها از روش کمینه مربعات^۱ استفاده شده که یک روش ریاضی برای یافتن منحنی مناسب برای مجموعه‌ای از نقاط است. در این روش فرض می‌شود که بهترین منحنی برازش، منحنی است که دارای کمینه مجموع انحرافات از یک مجموعه داده معین داشته باشد. به عبارت دیگر، بهترین تابع با به کمینه رساندن مجموع مجذور انحرافات نقاط از منحنی تابع بدست می‌آید [۳۲].

۷. نتیجه‌گیری

در این مطالعه، در ابتدا با بررسی نمونه‌های جلبکی در استخرهای آب شیرین و نیز نمونه خالص تهیه شده از شرکت توسعه ذخایر زیستی جلبک‌های فارس، و تشخیص نوع جلبک‌های موجود در آن، طیف‌سنجی و اندازه‌گیری غلظت انجام شد. مهم‌ترین ابزار برای اندازه‌گیری غلظت جلبک‌ها، کلروفیل-a است که در همه انواع جلبک‌ها با درصد متفاوت وجود دارد و دارای ویژگی فلوروسانس است که از راه اندازه‌گیری نور قرمز، میزان کلروفیل-a را می‌توان برآورد نمود. تهیه راهنما و توابع شدت‌های نور بر حسب غلظت، جهت کالیبراسیون دستگاه‌ها انجام شد. اندازه‌گیری مستقیم نور، نوفه‌های کم، پایداری بالا و تهیه روال منطقی بین داده‌ها می‌تواند به افزایش قابلیت‌ها و بهبود کیفیت کمک کند و این طرح به ابزاری دقیق برای اندازه‌گیری غلظت کلروفیل تبدیل شد. پایداری، تکرار پذیری و دقت بالای دستگاه نشان از مزیت روش‌های طیف‌سنجی نشری (فوتولومینسانس) نسبت به روش‌های جذبی طیف‌سنجی است.

۸. تقدیر و تشکر

این پژوهش با حمایت مالی گروه تحقیقات کاربردی شرکت مدیریت منابع آب ایران تحت قرارداد شماره ۱۵۰/۱۴۰۰۲/۰۲ مورخ ۱۴۰۰/۰۲/۰۱ به انجام رسیده است.

^۱ Least-Squares method



منابع

- [1] Kolahchi N., "Sustainable development, water resources, the limits and barriers", *National Conference on Human, Environment and Sustainable Development*, March 2010. Hamadan. Iran (in Persian).
- [2] Five-year plan for agriculture and natural resources. 1367 country program and budget organization (in Persian).
- [3] Kotsar A., "Bulletin of the Water Commission, Watershed management: Bypass towards the wisely Department of Water Resources", *Jihad Sazandegi Publications*, **10**, 8, 1373 (in Persian).
- [4] Strain H. H., "Paper chromatography of chloroplast pigments: Sorption at a liquid-liquid interface", *J. Phys. Chem.* **57** (7), 638-640, 1953. <https://doi.org/10.1021/j150508a007>.
- [5] Rasmussen, R.S. and Morrissey, M.T., "Marine biotechnology for production of food ingredients, In: Steve, L.T. (Ed.)", *Advances in Food and Nutrition Research*. **52**, 237-292, 2007. [https://doi.org/10.1016/S1043-4526\(06\)52005-4](https://doi.org/10.1016/S1043-4526(06)52005-4)
- [6] Patel, B. H. Natural dyes, In: Clark, M. (Ed.), "Handbook and Textile and Industrial Dyeing", *Woodhead Publishing, Science Direct*. 395-424, 2011.
- [7] Pareek, S., Sagar, N. A., Sharma, S., Kumar, V., Agarwal, T., Gonzalez-Aguilar, G. A. and Yahia, E. M., "Chlorophylls: Chemistry and Biological Functions, In: Yahia, E. M. (Ed.)", *Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry and Human Health*, *Weily*, 269-284, 2018.
- [8] Balali, S., Hoseini, S. A., Ghorbani, R. and Balali, S., "Correlation of Chlorophyll-A with Secchi Disk Depth and Water Turbidity in the International Alma Gol Wetland, Iran.", *World Journal of Fish and Marine Science*, **4**, 504-508, 2012. DOI: 10.5829/idosi.mejsr.2013.13.10.1124
- [9] Cevic, F. "The influence of some physico-chemical criteria on chlorophyll-a in summer season.", Ph.D. Thesis. *Cukurova University, ADANA. Graw-Hill*, 2005.
- [10] Satpati, G.G. and Pal, R., "Photosynthesis in algae, in: Arumugam", M., Kathiresan, S. and Nagaraj, S. (Eds.), *Applied Algal Biotechnology. Nova Science*, 49-68, 2020.
- [11] Pedros R., Moya I., Goulas Y. and Jacquemoud S., "Chlorophyll fluorescence emission spectrum inside a leaf, Photochem. Photobiol", *Sci.*, **7**, 498-502, 2008. <https://doi.org/10.1039/B719506K>
- [12] Lichtenthaler H. K., Buschmann C., "Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS Spectroscopy", *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, **1**, F4.3.1-F4.3.8. 2001. <https://doi.org/10.1002/0471142913.faf0403s01>
- [13] Koushki E., "Effect of conjugation with organic molecules on the surface plasmon resonance of gold nanoparticles and application in optical biosensing", *RSC Advances*. **11**, 23390-23399. 2021. <https://doi.org/10.1039/D1RA01842F>
- [14] Fernandez-Jaramillo A. A., Duarte-Galvan C., Contreras-Medina L. M. Torres-Pacheco I., Romero-Troncoso R.d. J., Guevara-Gonzalez R. G. and Millan-Almaraz J.R., "Instrumentation in Developing Chlorophyll Fluorescence Biosensing: A Review", *Sensors*, **12**, 11853-11869, 2012. <https://doi.org/10.3390/s120911853>
- [15] Na Ayudhya T. I., Posey F. T., Tyus J.a C., and Dingra N. N., "Using a Microscale Approach to Rapidly Separate and Characterize Three Photosynthetic Pigment Species from Fern", *J. Chem. Educ.* **92**, 920-923, 2015. <https://doi.org/10.1021/ed500344c>
- [16] Lamb J.J., Rokke G., and Hohamann-Marriott M.F., "Chlorophyll fluorescence emission spectroscopy of oxygenic organisms at 77 K", *PHOTOSYNTHETICA* **56** (1), 105-124. 2018. <https://doi.org/10.1007/s11099-018-0791-y>



- [17] Li Y. and Chen M., "Novel chlorophylls and new directions in photosynthesis research", *Functional Plant Biology* **42**. 493-501. 2015. <https://doi.org/10.1071/FP14350>.
- [18] Zarei Darki B., "Algal Flora of Reservoirs of Iran.", *International Journal on Algae*, **16**(2). 132-143. 2014. <https://doi.org/10.1615/InterJAlgae.v16.i2.40>
- [19] <http://www.citclops.eu/fluorescence-/measuring-water-fluorescence>.
- [20] Yadav S.P., Ibaraki Y., Dutta Gupta S., "Estimation of the chlorophyll content of micropropagated potato plants using RGB based image analysis", *Plant Cell Tiss Organ Cult.* **100**, 183-188. 2020. <https://doi.org/10.1007/s11240-009-9635-6>
- [21] Ganjian Khanari A. Ghasemnejad M., Shakouri M., Ganjian Khanari F. Chashnidel Y., Khosravi M., Rohi A., Farabi V., "Coagulation and Paste Preparation from Scenedesmus Microalgae", *Journal of Breeding and Aquaculture Sciences*, **2**, 55-66, 2014 (in Persian).
- [22] <https://en.wikipedia.org/wiki/Chloroplast>.
- [23] Rahman, M. M., Jewel M.A.S., Khan S. and Haque M.M. "Study of Euglenophytes Bloom and It's Impact on Fish Growth in Bangladesh", *Algae* **22** (3). 185-192. 2007. <https://doi.org/10.4490/algae.2007.22.3.185>
- [24] Mohsenizadeh F., "Fishing sustainability and the necessity of risk prediction of HABS", *4th National Shrimp Conference, Bushehr, Iran*, February 2019 (in Persian).
- [25] Tahami F.S. "Study on Lake water quality of Sanandaj Dam by algal biological indicators", *Ecology and Water Resource Journal*, **1**. 23-32. 2018.
- [26] Pfendler S., Alaoui-Sossé B., Alaoui-Sossé L., Aleya L., "Effects of UV-C radiation on *Chlorella vulgaris*, a biofilm-forming alga", *Journal of Applied Phycology*, **30**. 1607-1616. 2018. <https://doi.org/10.1007/s10811-017-1380-3>
- [27] Ratomski P. and Hawrot-Paw M. "Production of *Chlorella vulgaris* Biomass in Tubular Photobioreactors during Different Culture Conditions", *Appl. Sci.* **11**. 3106. 2021. <https://doi.org/10.3390/app11073106>
- [28] Rinawati M., Sari L. A. and Pursetyo K. T. "Chlorophyll and carotenoids analysis spectrophotometer using method on microalgae", *IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.* **441**. 012056. 2020.
- [29] <https://www.yisi.com/accessory/id-6025/6025-chlorophyll-sensor>.
- [30] <https://ppsystems.com/in-situ-spectrofluorometers>.
- [31] <https://www.aquams.com/parametre/55-chlorophyll-a/?lang=en>.
- [32] Koushki E., Koushki A., "Simple Method for Optical Detection and Characterization of Surface Agents on Conjugated Gold Nanoparticles", *Plasmonics*, **18**. 1151-1157. 2023. <https://doi.org/10.1007/s11468-023-01843-8>



This article is an open-access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-Noncommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).

