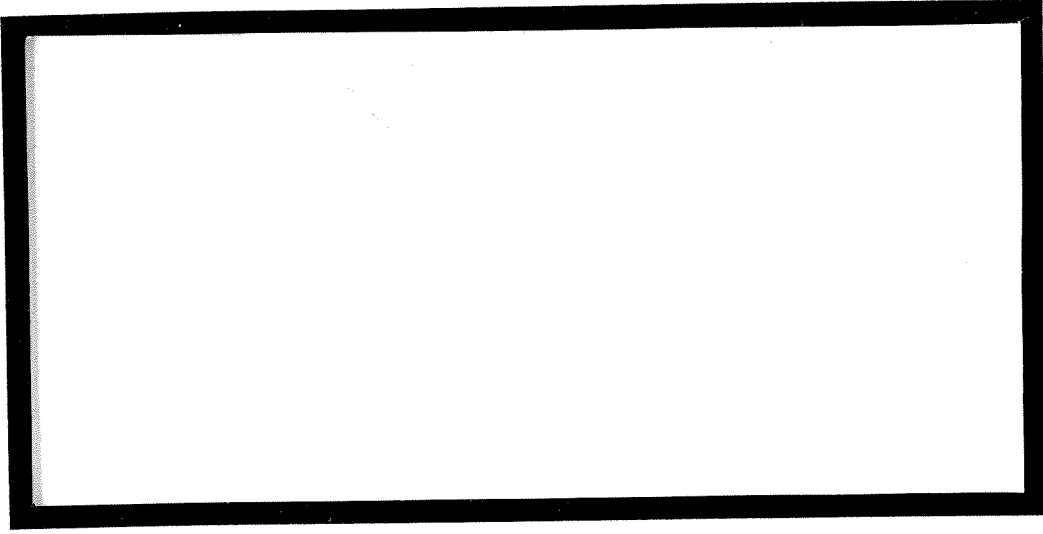


Darf  
1999-170



TÜRKİYE BİLİMSEL VE  
TEKNİK ARAŞTIRMA KURUMU

THE SCIENTIFIC AND TECHNICAL  
RESEARCH COUNCIL OF TURKEY



Yer Deniz Atmosfer Bilimleri ve  
Çevre Araştırma Grubu

Earth Marine Atmospheric Sciences and  
Environmental Researches Grant Group

FİTOPLANKTON ÖLÇMEK İÇİN  
LAZER GERİ SAÇINIM  
SPEKTROFLOROMETRESİ  
GELİŞTİRİLMESİ

PROJE NO: DEBAG-61

Prof.Dr. Ali Gökmen

Temmuz 1996  
Ankara

## I. Giriş

Dünya yüzeyinin dörtte üçünü kapsayan denizler yaklaşık temel besin üretiminin üçte birini karşılamaktadır.<sup>1</sup> Denizlerdeki temel besin üretiminin klorofil a derişimi ile yakından ilgili olduğu ilk Sorenzen tarafından ileri sürülmüştür.<sup>2</sup> Bu buluşun önemi klorofilin fotosentez için gerekli bir madde olmasının yanı sıra ölçülebilir floresans ışığı yayması ve bununda fitoplankton çokluğu ile doğrudan ilişkili olmasındandır.<sup>3</sup> Denizlerde klorofil floresansının ölçülmesi ile bu ortamdaki temel üretim miktarı doğrudan belirlenebilmektedir.

Son yirmi yıldır denizlerdeki temel üretimin geniş alanlardaki durumunun kısa süre içinde saptanmasını kolaylaştıracak klorofil floresansını uzaktan algılayacak yeni yöntemler geliştirilmektedir.<sup>4</sup> Ancak fitoplanktonların derişimlerinin uzaktan algılanması klorofil floresansının deniz içinde doğrudan (in vivo) ölçülmesini gerektirmektedir.<sup>5</sup> Klorofilin lazer ışık kaynakları ile uzaktan algılanmasına yönelik ilk çalışmalar 1970'li yıllarda başlamıştır.<sup>6,7</sup>

Fotosentezde rol oynayan boyar maddelerden carotenoidler mavi, phycoerythrin yeşil, phycocyanin turuncu ve klorofil a ve b mavi ve kırmızı ışığı soğurmakta ve diğer temel maddelerin (su, karbondioksit, vb) katkısı ile bunlar bitki tarafından organik maddeye çevrilmektedir.<sup>8</sup>

Yüksek güçlü ve pulslu Nd-YAG lazerinin ikinci harmoniği 532 nm kullanılarak Amerika'da Chesapeake Bay'de yapılan ölçümlerde phycoerythrinin 580 ve klorofilin 685 nm deki floresansı kullanılarak fitoplankton derişimleri sudaki konumlarına göre bulunmuştur.<sup>9</sup> Pulslu lazer kaynakları ile uyarılan moleküllerden çıkan fotonların ölçüm sistemine geliş zamanları ölçülerek fitoplanktonların konumları miktarları ile birlikte belirlenebilmektedir.

Lazer ile yapılan uzaktan algılama sistemlerinde denizin lazer ışığını geçirgenliğinin bilinmesi gerekmektedir. Bunun için suyun Raman geri saçınımından yararlanılmaktadır.<sup>10,11</sup> Lazer ışığının enerjisinin bir kısmı suyun O-H titreşimi nedeni ile soğurulmakta ve geri saçılan fotonlardan bir kısmının enerjisi bu etkileşim sonucu  $3350 \text{ cm}^{-1}$  kadar daha düşük enerjiye kaymaktadır.<sup>12</sup>

Klorofil floresansının lazer/fiber-optik sistem ile gemiden in situ ölçümüne yönelik bir sistem geliştirilerek test edilmiştir.<sup>13</sup> Gemi üzerine kurulan bir laboratuvardaki argon lazeri ile 488 nm de elde edilen lazer ışığı 20 m uzunluğunda 200  $\mu\text{m}$  çapındaki fiber-optik kabloya odaklanarak deniz içine taşınmaktadır. Kablonun ucundan çıkan ışıkla uyarılan klorofilden geri saçılan ışık yine aynı kablo ile geri taşınmakta ve gemide analiz edilmektedir. Bu sisteme eklenen Dik Kesit Hızlı Örnekleme sistemi (Rapid Sampling Vertical Profiler, RSVP) ile sıcaklık, iletkenlik ve basınç gibi parametrelerde floresans ile birlikte ölçülmektedir.

Dünyanın etrafında dönmekte olan NIMBUS-7 uydusu ile deniz fitoplanktonlarının dağılımı sürekli olarak pasif çok kanallı tarayıcı (Coastal Zone Color Scanner, CZCS) ile taranmaktadır. Uzaktan algılamada varılan en son aşama ise MIR uzay istasyonundan klorofil a derişiminin ölçülmesidir.<sup>14</sup>

### **Projenin Amacı:**

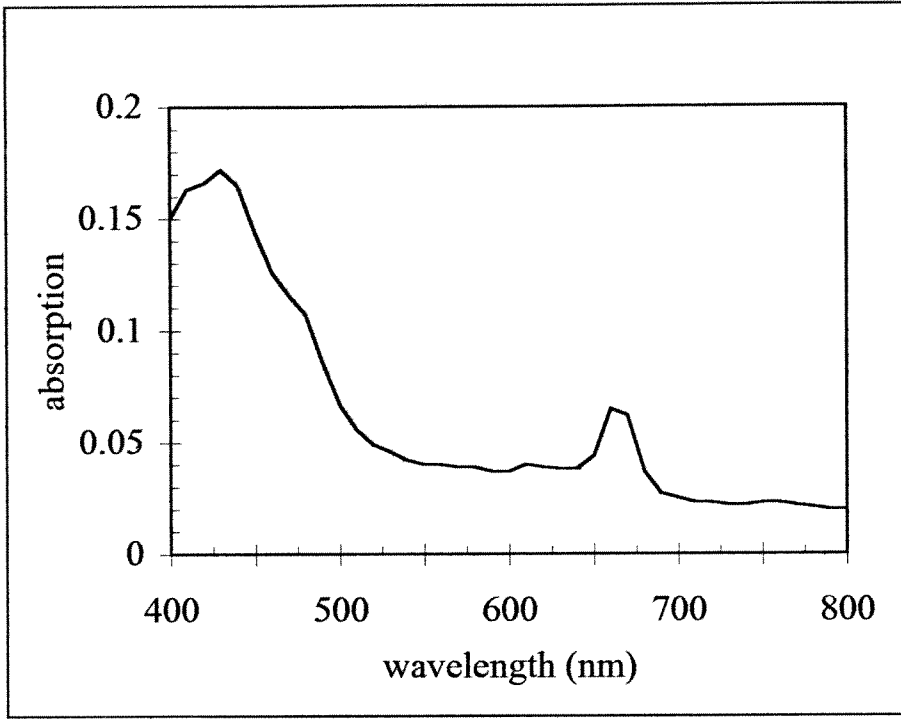
Bu projede kırmızı bölgede ışıma yapan lazer diyot ve HeNe ışık kaynakları ve fiber optik kablo kullanarak deniz ve göllerde fitoplankton aktivetelerini uzaktan algılayabilecek bir cihazın geliştirilmesi amaçlanmaktadır. Işık kaynağı olarak 632 nm de ışıma yapan HeNe lazeri ile 655 nm de ışıma yapan lazer diyot kullanılmıştır. Lazer diyot için pille çalışan bir güç kaynağı geliştirilmiştir. Lazer ışığı ile uyarılan klorofilden geri saçınan floresans fotonlarını sayabilecek bir elektronik düzenek kurulmuş ve 685 nm de ölçülmüştür. Deneylerde ODTÜ kampusundaki havuzlardan alınan su örnekleri kullanılmıştır. Floresans verimi ile fitoplankton derişimi arasındaki ilişki saptanmıştır. HeNe lazeri ile fiber optik kablo kullanmadan yapılan floresans geri saçılma deneylerinde havuz suyundaki klorofil a derişimi 20 µg/L düzeyinde bulunmuş ve sistemin ölçme limiti 160 ng/L olarak tesbit edilmiştir.

## **II. Gelişme**

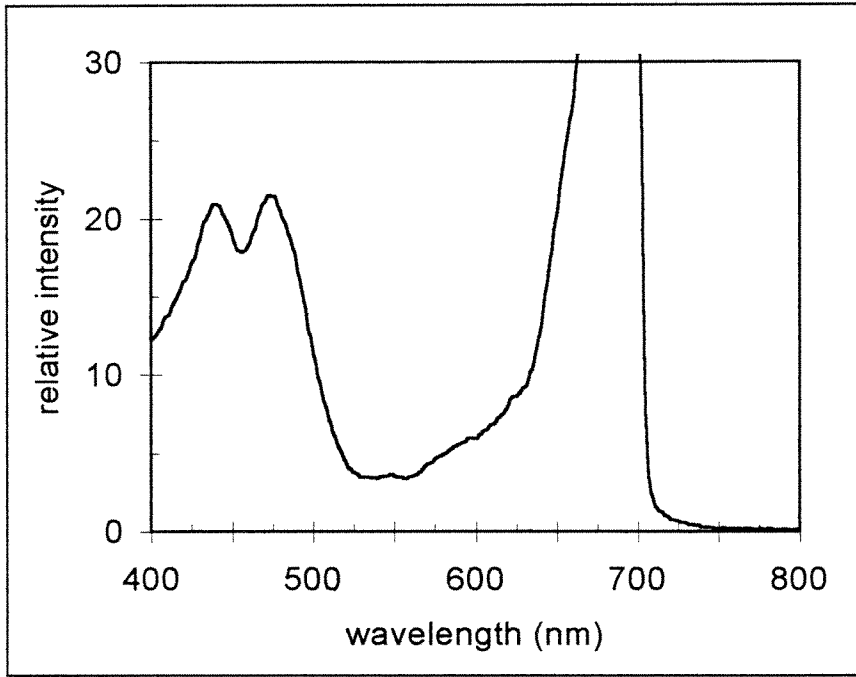
### **II. 1. Klorofil a Soğurma ve Floresans Spektrumları**

Klorofil a molekülünün elektromanyetik spektrumun iki bölgesinde soğurma bandı vardır. İlk band mavi ışık bölgesinde olup 441 ve 475 nm de iki tepe yapmakta diğeri ise 660 nm de kırmızı ışık bölgesinde tepe yapmaktadır. Klorofil molekülü bu mavi ve kırmızı ışık bölgelerinden uyarıldığı zaman 685 nm'de floresans yapmaktadır.

Ispanak bitkisinin yaprağından elde edilen sulu çözeltideki klorofil a'nın soğurma spektrumu Shimadzu UV-VIS 160 Spektrofotometresi ile ölçülmüş ve Şekil 1'de gösterilmiştir. Bu çözeltide klorofil a dışında diğeri maddeler de soğurma spektrumuna katkıda bulunmaktadır. Şekil 2'de ise aynı çözeltinin Perkin Elmer 50B Spektrofluorometresi ile alınan uyarılma spektrumu gösterilmektedir. Spektrofluorometre ile ölçülen uyarılma spektrumu UV-VIS spektrofotometresi ile ölçülenden daha seçicidir. Burada spektrofluorometre 685 nm deki floresans maksimumuna kilitlemiş ve uyarılma spektrumu 400-800 nm arasında taranarak elde edilmiştir. Şekil 2'deki spektrum sadece klorofil a molekülünün yaptığı soğurmaya karşılık gelmektedir. Ancak buradaki ölçüm birimi rastgele bir birim olup UV-VIS spektrometresinin ölçtüğü absorbans değerinden farklıdır. Şekil 2'de 440 ve 475 nm de görülen uyarılma tepelikleri UV-VIS spektrumunda ölçülenden daha belirgindir. 660 nm'deki tepelik 685 nm'deki floresans tepesi ile çakıştığından ayırt edilememektedir.



Şekil 1. Ispanak yaprağının sulu çözeltisinin UV-VIS spektrofotometre ile ölçülen soğurma spektrumu



Şekil 2. Ispanak yaprağının sulu çözeltisinin spektrofotometre ile ölçülen uyarılma spektrumu

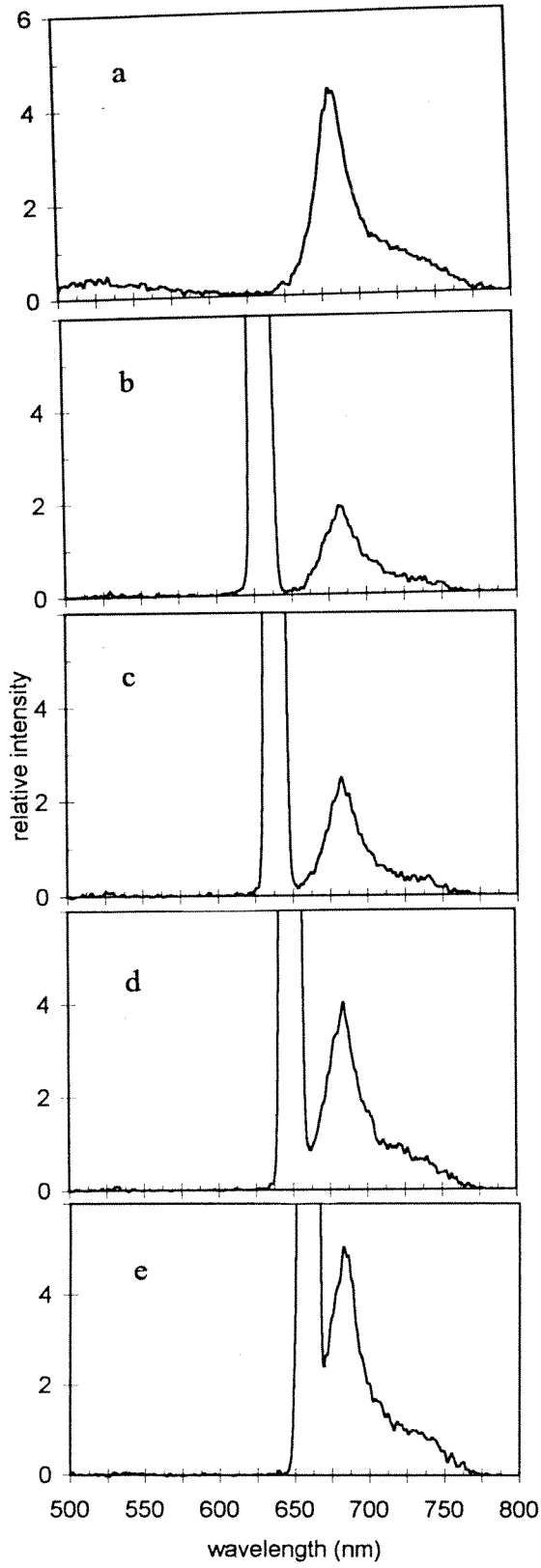
İspanak yaprağı çözeltilisinde bulunan klorofil a molekülü 441, 632, 640, 650 ve 660 nm den uyarılarak elde edilen floresans spektrumları Şekil 3’de gösterilmiştir. Bu ölçümlerde Perkin Elmer 50B spektrofluorometresinin uyarılma dalga boyu yukarıda belirtilen dalgaboyunda sabit tutularak floresans dalgaboyu 500-800 nm arasında taranmıştır.

Şekil 3’de gösterilen, değişik dalgaboylarında uyarılmış klorofil a molekülü 685 ve 715 nm de iki floresans tepesi oluşturmaktadır. Bunlardan 685 nm’deki esas floresans tepesi olup klorofil ölçümleri için yaygın olarak kullanılmaktadır. Tablo 1’de klorofil a’nın 440, 475, 632, 640, 650 ve 660 nm dalgaboylarında uyarılması ile oluşan 685 nm’deki floresans tepesinin göreceli yükseklikleri karşılaştırılmıştır.

Tablo 1. Klorofil a’nın değişik uyarılma dalgaboylarındaki göreceli floresans verimleri

Uyarılma dalgaboyu (nm)	Göreceli floresans verimi
440	4.37
475	4.47
632	1.86
640	2.46
650	4.02
660	4.96

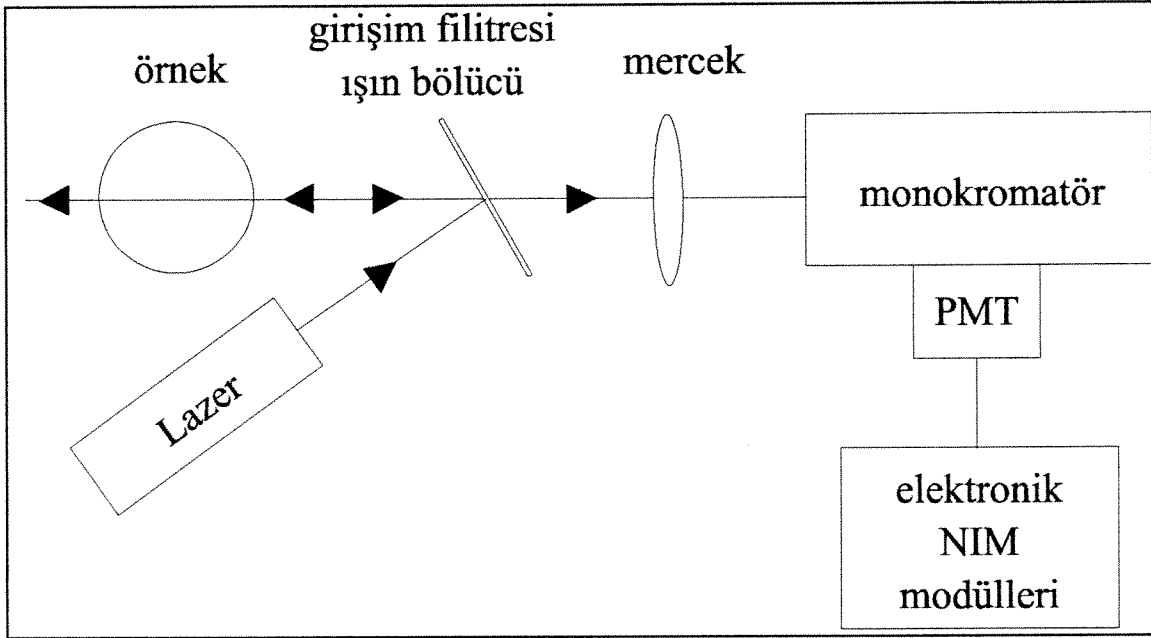
Klorofil a’nın 440 ve 475 deki floresans verimleri 4.5 civarında olup bunlar Şekil 1’de gösterilen klorofil soğurma tepelerine karşılık gelmektedir. Klorofilin 632-660 nm arasındaki uyarılması ile oluşan floresans verimleri klorofilin 660 nm’deki soğurulma bandının yan tarafından uyarılması ile oluşmaktadır. Bu durumda floresans verimleri 660 nm’ye yaklaştıkça artmakta ve 440 ve 475 nm’deki değeri ulaşıp geçmektedir. Ancak uyarılma dalgaboyunun 685 nm’deki floresans bandına yaklaşması ile iki tepe birbirlerini örtmektedir. Spektrofluorometre ile yapılan bu ölçümlerde kullanılacak lazer ışık kaynaklarının dalgaboyları gözetilmiştir. 632 nm de HeNe lazeri, 640, 650 ve 655 nm dalgaboylarında lazer diyot ışık kaynakları bulunmaktadır.



Şekil 3. Klorofil a'nın a)441, b)632, c)640, d)650 ve e)660 nm'de uyarılmış floresans spektrumları

## II.2 Lazer ile Uyarılmış Geri Saçınım Floresans Ölçme Sistemi

Lazer ile uyarılmış geri saçınım floresans ölçme sistemi bir lazer ışık kaynağı, monokromatör, mercekler, girişim filtresi, ve nükleer elektronik modüllerden oluşmaktadır. Şekil 4'de bu projede geliştirilen deneysel düzenek gösterilmektedir. Burada lazer ışık kaynağından çıkan ışık bir girişim filtresinin üzerinden yansıtılarak örnek üzerine düşürülmekte ve örnekten geri saçılan floresans ışığı aynı yol üzerindeki girişim filtresinden geçip monokromatöre girmekte ve dalgaboyu ayırımından sonra elektronik olarak ölçülmektedir. Girişim filtresinin optik yol üzerindeki açısı lazerin ışığını yansıtacak ve geri saçılan floresans ışığını soğurmadan geçirecek şekilde ayarlanmıştır. Bundan sonraki kısımda girişim filtresinin konumunun belirlenmesine yönelik özellikler açıklanacaktır. Girişim filtresinden geçen ışık odak uzaklığı 25.4 mm olan NewPort KPX 076 merceği ile monokromatörün giriş yarığına odaklanmaktadır. Monokromatör floresans ışımınının maximum değeri olan 685 nm'ye ayarlanmıştır.



Şekil 4. Geri saçınım lazer ışık kaynaklı floresans ölçüm sistemi

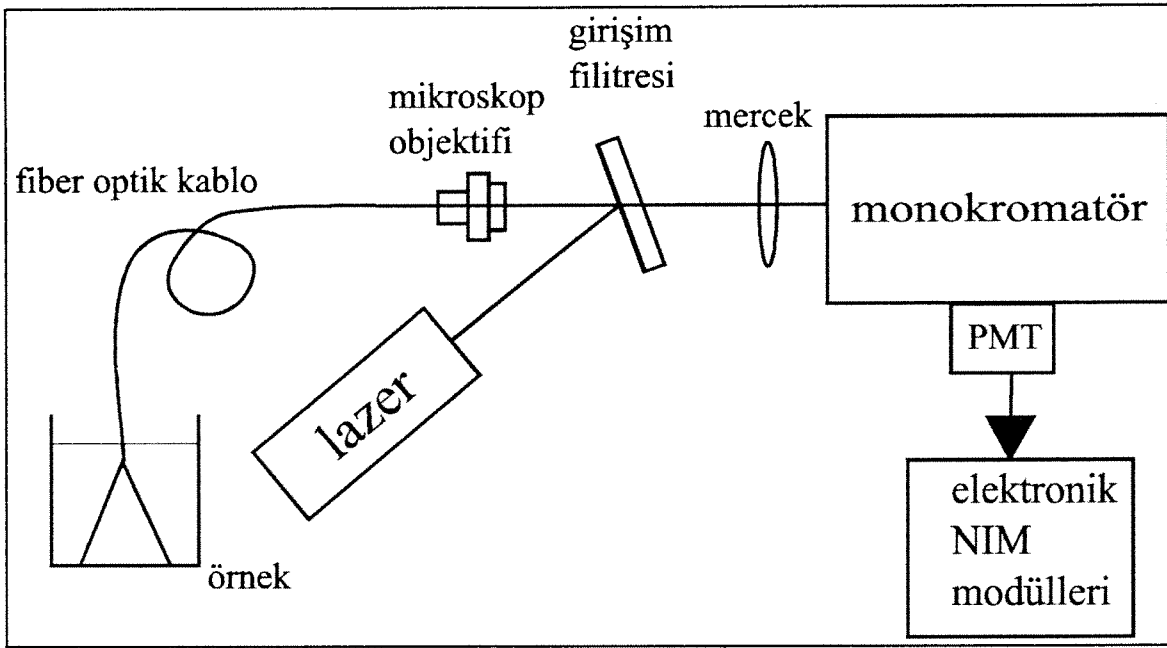
Bu çalışmada Czerny-Turner tipi 240 mm odak uzaklığı olan Digikrom 240 monokromatörü kullanılmıştır. Bu monokromatörün doğrusal ters saçılması (reciprocal linear dispersion,  $d\lambda/dy=3.2$  nm/mm) olup, 20  $\mu$ m slit açıklığında spektral pencere 0.06 nm olarak belirlenmektedir. 220 nm dalgaboyunda cihazın ışık sızdırması (stray light) % 0.02'den daha azdır. Digikrom 240 monokromatörünün dalgaboyu taraması adımli bir motor tarafından kontrol edilmekte ve her adımda 44  $\mu$ radyan taranmakta bu da 0.07 nm dalgaboyu genişliğine karşılık gelmektedir. Monokromatör çıkış yarığında floresans ölçümünün yapıldığı kırmızı ışığa duyarlı Hamamatsu R928 foton çoğaltıcı tüp (photo multiplier tube, PMT) kullanılmıştır.



PMT çıkışı foton pulslarını ölçmeye yönelik nükleer elektronik, (NIM) modüllerinde şekillendirilerek sayılmaktadır. Elektronik sinyal şekillendirilmesi Bölüm II.5’de anlatılmıştır.

### II.3. Lazer-Fiber Optik Uzaktan Algılama Floresans Spektroflorometresi

Şekil 4’de gösterilen düzeneğe yapılan ilavelerle Şekil 5’de gösterilen lazer/fiber optik uzaktan algılama spektroflorometresi düzenlenmiş ve test çalışmaları yapılmıştır.



Şekil 5. Lazer/fiber optik uzaktan algılama klorofil a spektroflorometresi

Klorofil a moleküllerini uyarmada kullanılan lazer ışığı girişim filtresinden yansıtıldıktan sonra NewPort firmasının M-MH-2PM mikroskop objektifi kullanılarak ışık, iç çapı 1000  $\mu\text{m}$  olan fiber optik bir kabloya odaklanmıştır. Fiber optik kablonun ucundan çıkan ışık konik bir dağılım göstererek yayılmakta ve bu hacimde bulunan klorofil a moleküllerini uyarmaktadır. Geri saçınan floresans ışığı ise yine aynı fiber optik kablo ile taşınarak girişim filtresinden geçmekte ve odak uzaklığı 25.40 mm olan NewPort KPX 076 merceği ile monokromatör giriş yarığına odaklanmaktadır. 685 nm’ye ayarlanmış Digikrom 240 monokromatörünün çıkışındaki elektronik düzenek ile foton pulsları sayılmaktadır.

Lazer diyot için şarj edilebilen bir 12 V batari ile çalışan bir güç kaynağı geliştirilmiştir. Bu güç kaynağı sabit akım kaynağı olup 0 ile 100 mA arasında ayarlanabilmektedir. Lazer diyot içinde bulunan monitor diyot lazer ışık şiddeti ile orantılı bir akım üretmekte ve bu ışık şiddetinin değişimi ile orantılı olarak değişmektedir. Güç kaynağında sabit akım üretmek için monitor diyot çıkışı geri besleme sinyali olarak kullanılmaktadır.

#### II.4. Girişim Filitresi

Şekil 6'da gösterilen girişim filitresi üzerine düşen ışığı dalga boyuna göre ya geçirmekte veya yansıtmaktadır. Girişim filitresi çok katlı dielektrik katmanlardan ve bunların aynalı yüzeylerinden oluşmaktadır. Aynalı yüzeyler arasındaki dielektrik bölgenin kalınlığı,  $t_{op}$  filitrenin geçireceği dalga boyuna uygun olarak imal edilmektedir. Işığın filitrenin normali (N) ile yaptığı açının ( $\theta$ ) değişmesi ile filitre içinde aldığı yolun uzunluğu değişmekte ve filitre değişik dalgaboyundaki ışığı geçirmektedir. Girişim filitresinden geçen ışığın dalgaboyu  $\theta$  açısına göre şu şekilde gösterilmektedir:

$$2 t_{op} \cos\theta = m\lambda \quad (1)$$

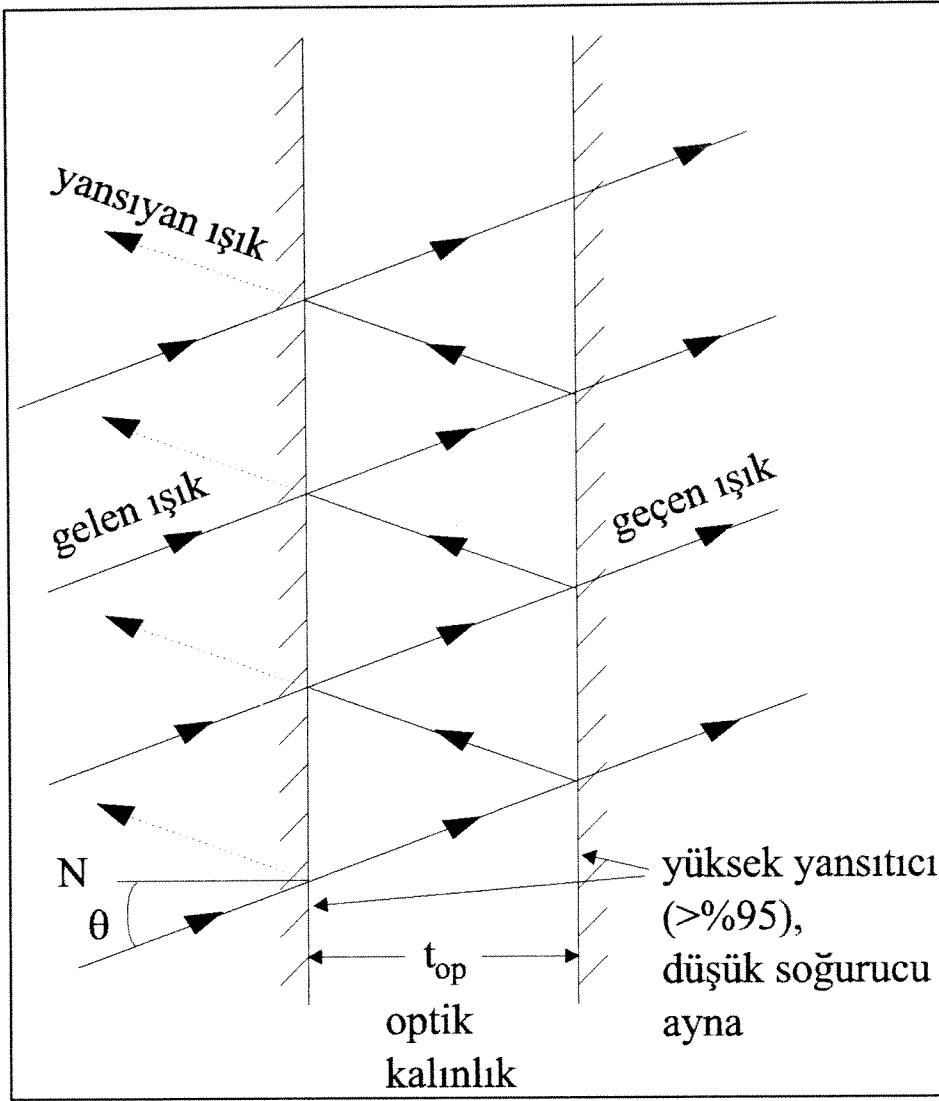
Burada,  $\lambda$  ışığın dalga boyunu, m ise girişimin derecesini (=1, 2, 3,..) göstermektedir. Girişim filitresinin yansıtma maksimumu ise  $\theta$  açısı ile şöyle değişmektedir:

$$2 t_{op} \cos\theta = (m+1/2)\lambda \quad (2)$$

Işığın küçük geliş açılarını için girişim filitresinin geçirgenliği aşağıdaki bağıntı ile gösterilmektedir:

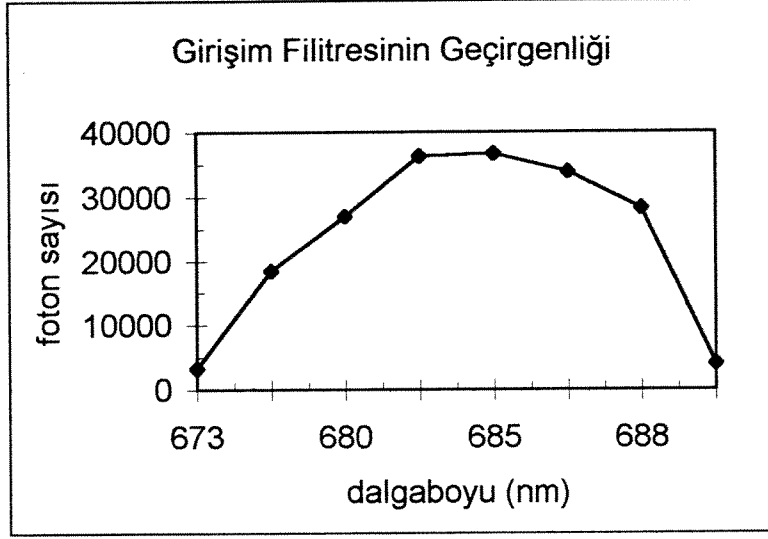
$$\lambda = \lambda_{\max} \sqrt{1 - \left(\frac{n_0}{n_e}\right)^2 \sin^2 \theta} \quad (3)$$

Burada,  $n_0$  havanın kırılma sabiti (=1),  $n_e$  de girişim filitresinin ortalama kırılma sabitidir.  $\lambda_{\max}$  ise girişim filitresinin ışığın yüzeyine dik geldiğinde maksimum geçirdiği dalgaboyudur.



Şekil 6. Girişim filtresinin gelen ışığı geçirmesi ve yansıtması

Bu çalışmada çapı 1 inç merkezi dalgaboyu,  $\lambda_0=700$  nm, olan bir girişim filtresi kullanılmıştır. Girişim filtresinin gelen ışıkla yaptığı  $\theta$  açısı Bağıntı 3 kullanılarak bulunmuş ve bu deneysel olarak test edilmiştir. Girişim filtresinin geçirdiği ışığın dalgaboyu beyaz ışık kaynağı halojen lamba kullanılarak ölçülmüş ve  $\theta=15$  derecede 685 nm'yi maksimum geçirdiği saptanmıştır. Girişim filtresinin bu açıda dalgaboyuna göre geçirgenliği Şekil 7'de gösterilmiştir. Filtrenin yarı geçirgenliği (maksimum geçirgenliğinin yarıya düştüğü dalgaboyu genişliği) 10 nm olarak bulunmuştur. 670 nm den daha kısa ve 690 nm den daha uzun dalgaboyu olan ışık bu filtreden geçememekte yansıtılmaktadır.



Şekil 7. Girişim filtresinin 15 derecede dalgaboyuna göre ışık geçirgenliği

## II.5. Elektronik devre

Şekil 4’de gösterilen monokromatörün çıkış yarığı önüne yerleştirilen yakın infrared ışığa hassas olan R928 foton çoğaltıcı tüp floresans fotonlarını elektrik pulslarına dönüştürmektedir. Şekil 8’de optik devre sol tarafta, sinyalin elektronik devre tarafından işlenişi ve elektronik sinyallerin şekilleri de sağ tarafta gösterilmektedir. Bu çalışmada ODTÜ Kimya Bölümü Nükleer Laboratuvarında bulunan modüler nükleer elektronik birimler kullanılmıştır.

PMT’nin katodu ORTEC Model No. 459 yüksek gerilim güç kaynağı ile beslenmektedir. PMT foton pulslarını yükseltmeye 500 V üzerindeki gerilimlerle ulaşılmaktadır. Çalışma gerilimi 800 V olarak belirlenmiştir. PMT’nin anodundan alınan sinyal ORTEC 109A model ön güçlendiriciye (preamplifier) bağlanmıştır. Ön güçlendiricinin çıkışındaki çarpım faktörü 10 da tutulmuştur. ORTEC 109A’nın çıkışındaki foton pulslarının osiloskop taraması Şekil 8’in sağ tarafında canlandırılmıştır. Bu sinyallerin yükselme zamanları çok hızlı olup (<10 ns), sıfıra inme süreleri ise çok uzundur (40  $\mu$ s). Sinyal genlikleri ise 0 ile 20 mV arasında değişmektedir. Elektromanyetik spektrumun görünür ve daha düşük enerjili foton pulslarının oluşturduğu elektronik sinyal genlikleri rastgele olmaktadır. Yani aynı enerjili fotonlar yüksek genlikte bir elektronik puls oluşturabildiği gibi bu çok düşük değerli de olabilmektedir.

Önyükselticiden alınan sinyaller elektronik olarak şekillendirilmek üzere Canberra 2030 zaman filitreli güçlendiriciye (Timing Filter Amplifier, TFA) girilmektedir. Burada integral ve türev alıcı devreler yardımı ile şekillendirilen sinyalin toplam süresi 400 ns ve tepe noktası maksimum 3 V olacak biçimde ayarlanmaktadır. TFA'nın çıkışındaki sinyaller Şekil 8'de gösterilmiştir. Ölçümlerde kullanılan TFA parametreleri şöyledir:

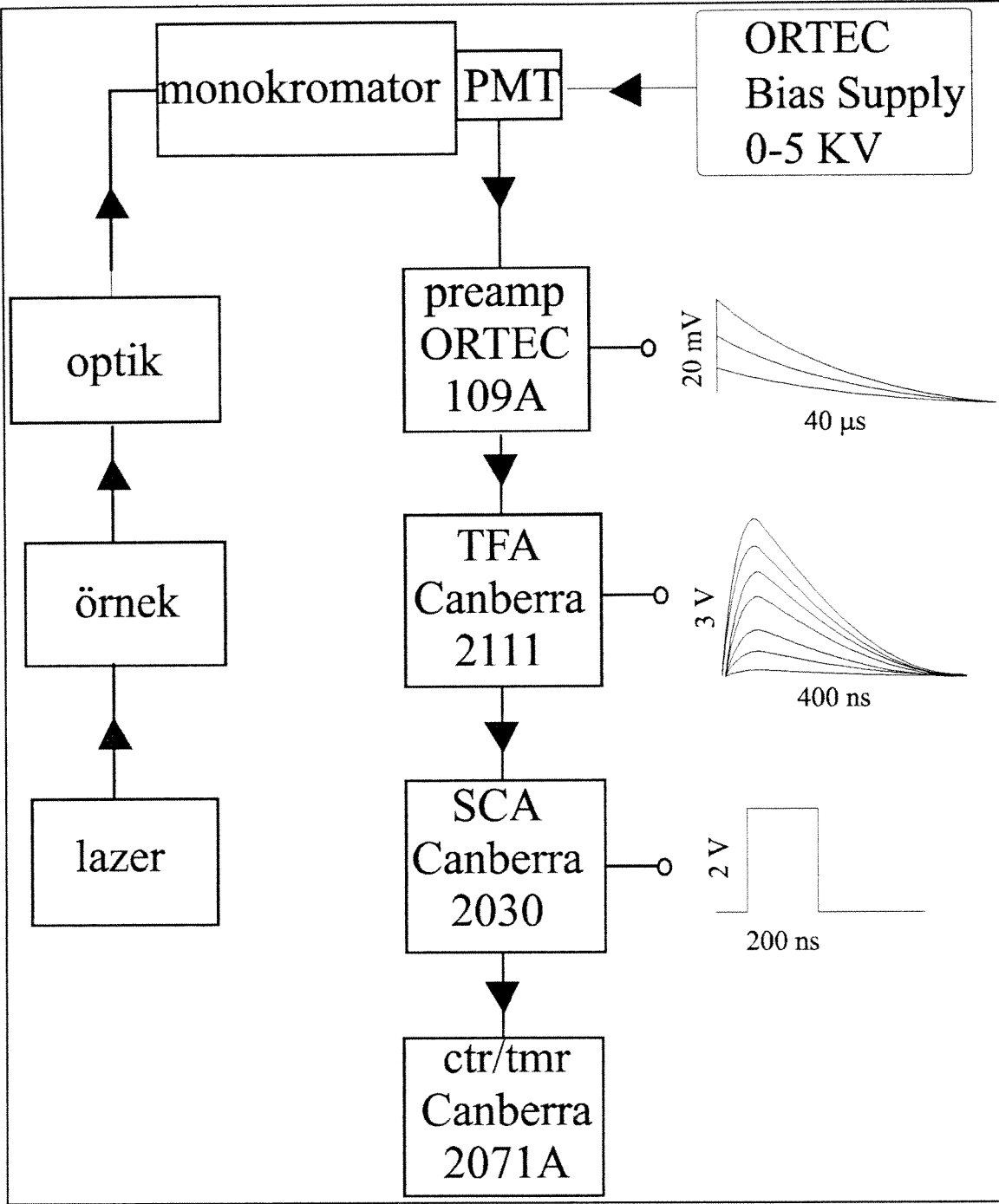
Tablo 2. TFA ayarları

Parametre	Değeri
Coarse gain	100
Fine gain	0.5-0.6
Differential	100
Integral	10
Non-inverting	Seçilmiş

TFA'dan elde edilen sinyaller enerjilerine göre ayrılmak üzere Şekil 8'de gösterilen Canberra 2030 tek kanallı analizöre (Single Channel Analyzer, SCA) bağlanmaktadır. Burada amaç düşük seviyeli elektronik gürültüyü gerçek foton pulslarından ayırmaktır. SCA'nın iki kontrol düğmesi bulunmaktadır, E ve  $\Delta E$ . Bu düğmelerle elektronik bir pencere oluşturulmakta, eğer SCA'nın girişindeki sinyal pencere limitleri içine düşerse sinyalin genliğine eşit dikdörtgen biçiminde bir sinyal üretilmektedir. Sinyal genliği 0-3 V arasındaki değişen ve 200 ns uzunluğundaki SCA sinyalleri Şekil 8'de gösterilmiştir. Ölçümlerde  $E=60$ ,  $\Delta E=244$  ve gerilim maksimumu 10 V olarak belirlenmiştir.

Elektronik devre elemanlarının sonucusu ise Canberra 2071A model sayıcıdır (Dual Counter/Timer, DCT). Bu birim girişindeki SCA sinyallerini önceden belirlenen bir süre kadar saymakta ve sonucunu 10 saniye süreyle göstermektedir. Bu ölçümlerde DCT, 100 saniye süre sayım yapacak şekilde programlanmıştır.

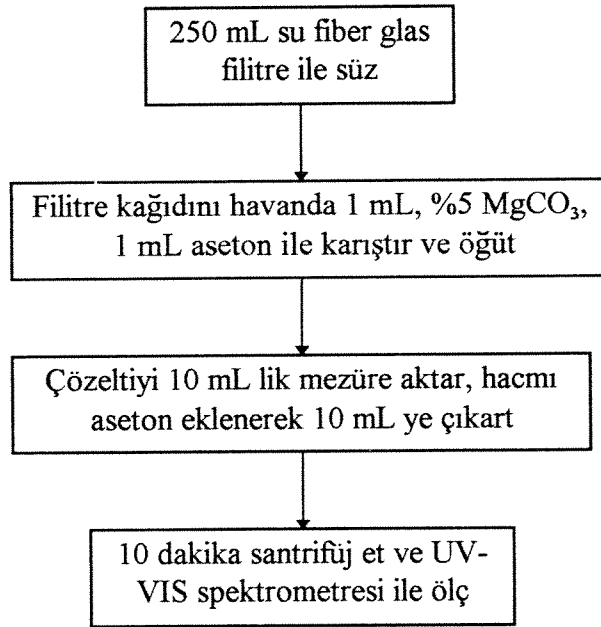
Bu proje çerçevesinde geliştirilen foton sayma tekniği ile floresans ölçümü en hassas teknik olup<sup>15</sup> tek bir klorofil molekülünden çıkan floresans fotonunu görmek mümkündür.



Şekil 8. Elektronik devre ve sinyaller

## II.6. Fitoplankton miktarının Klorofil a Kullanılarak Ölçülmesi

Göl ve deniz suyundaki biyo kütlenin yaklaşık % 1.5'u klorofil a dır. Toplanan örneklerdeki fitoplankton miktarının floresans ölçümleri ile bulunabilmesi için klorofil a derişimi ile floresans verimi arasında doğrusal bir ilişkinin kurulması gerekmektedir. Bu amaçla doğal ortamlardan toplanan örneklerdeki klorofil a, laboratuvarında diğer maddelerden arındırılarak ölçülebilecek hale getirilmiştir. Klorofil a'nın değişik dalgaboylarında bilinen molar soğurma katsayıları kullanılarak deniz ve göl içindeki gerçek derişimleri saptanabilmektedir. Klorofil a diğer maddelerden arındırıldıktan sonra belirli dalgaboylarındaki soğurması UV-VIS spektrometresi ile ölçülerek derişimleri bulunmuştur. Şekil 9'da klorofil a'nın arındırılmasına yönelik yapılan işlemler aşağıda şematik olarak anlatılmıştır.<sup>16</sup>



Şekil 9. Klorofil a'nın arındırılması

Klorofil a derişimini, C, hesaplamak için aşağıda gösterilen bağıntı kullanılmıştır:

$$C = \frac{11.0 A_{663} V_{\text{aseton}}}{V_{\text{örnek}} d} \quad (4)$$

Burada  $A_{663}$  klorofilin 663 nm deki soğurması,  $V_{\text{aseton}}$  arındırmada kullanılan asetonun hacmi (mL),  $V_{\text{örnek}}$  süzelen su örneğinin hacmi (L) ve d ise spektrometre hücresinin genişliği (cm) olarak verilmektedir. Yukarıdaki bağıntıda 11.0 sayısı klorofilin 663 nm deki molar soğurma katsayısı ve diğer sabitleri içermektedir. Klorofilin 663 nm'deki soğurması bulunurken bu dalgaboyundaki soğurmadan 640 nm deki geniş bantlı diğer soğurmaların katkısı çıkarılır. Ayrıca koloidal parçacıkların neden olduğu saçılmaları

düzeltilmek için de 750 nm deki soğurma, yukarıda elde edilen düzeltilmiş değerden çıkarılır.

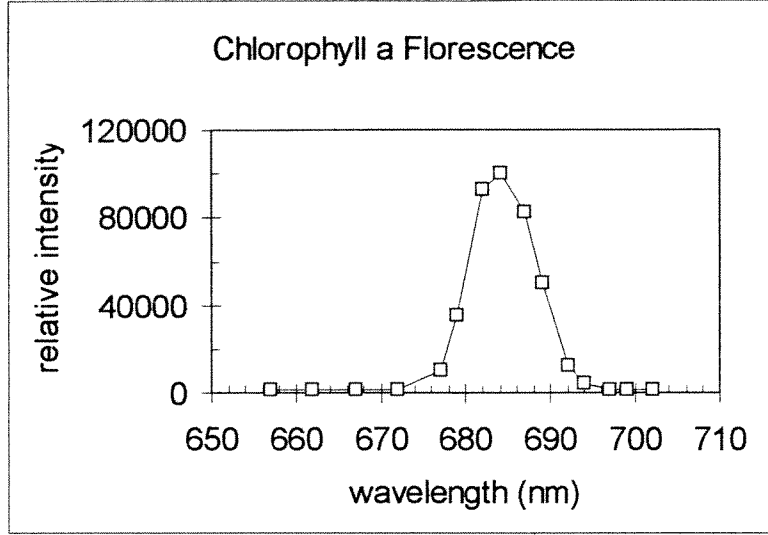
### III. Sonuçlar

Deniz ve göllerdeki fitoplankton yoğunluğunu klorofil a floresansını ölçerek belirlemek için geliştirdiğimiz lazer ışık kaynaklı spektrometre havuzlardan alınan örneklerle denenmiş ve sonuçlar bu kısımda sunulmuştur. Floresans ölçümleri Şekiller 4 ve 8'de gösterilen deney düzeneği kullanılarak yapılmış, fiber optik kablo kullanılarak uzaktan algılamaya yönelik yapılan denemeler Bölüm II.3'de anlatılmıştır.

#### III.1. Lazer Geri Saçınım Floresans Spektrometresi

Floresans verimini ölçmek için kullandığımız Şekil 4'deki düzenekte 632.8 nm de ışına yapan Spektra Physics firmasının 0.8 mW gücündeki HeNe lazeri kullanılmıştır. HeNe lazerinin ışığı girişim filtresinin normaline 15 derecelik bir açı ile gönderilmektedir. Girişim filtresinden yansıyan lazer ışığı test tüp içindeki örneği uyarmakta ve klorofil a moleküllerinden geri saçılan floresans ışığı girişim filtresinden geçerek bir mercekle yardımcı ile monokromatör giriş yarığına odaklanmakta ve elektronik düzenek tarafından ölçülmektedir. Ispanak yaprağından çıkarılan ekstre ile elde edilen klorofil a'nın sulu çözeltisinin floresans spektrumu Şekil 10'da gösterilmiştir. Ölçümlerde monokromatörün giriş ve çıkış yarıklarının açıklığı 1000 µm olarak ayarlanmış elektronik sistemin parametreleri Tablo 1'de verilen değerlere ayarlanmıştır. Monokromatör 657 ile 702 nm arasında taranmıştır. Şekil 10'da gösterilen noktalar 100 saniye süre ile ölçülen foton sayılarını göstermektedir. Lazer spektrofluorometresi ile elde edilen klorofil a'nın floresans spektrumu Şekil 3'de Perkin Elmer 50B spektrofluorometresi ile 632 nm de uyarılarak ölçülen floresans spektrumuna benzemektedir. 685 nm'de gözlenen floresans tepesi simetrik bir yapı göstermektedir. Oysa Perkin Elmer 50B spektrofluorometresi ile ölçülen floresans spektrumlarında 715 nm'de ikinci bir tepe gözlenmekte idi. Bu ikinci tepe lazer spektrometresinde kullanılan girişim filtresi tarafından kesilmektedir. Bu çalışmada geliştirilen lazer ışık kaynaklı spektrofluorometre ile ölçülen spektrum beyaz ışık kaynağı Xe kullanılan ticari spektrofluorometreden çok daha hassastır. Şekil 10'da gösterilen foton sayısı 685 nm deki floresans tepesinde 100,000'e ulaşırken Şekil 3'de bu sayı 4 civarındadır.





Şekil 10. Klorofil a'nın lazer ışık kaynaklı geri saçınım floresans spektrumu

Bu çalışmada geliştirilen spektrofotometrenin gerçek örneklerle değerlendirmesi için ODTÜ Mimarlık Fakültesi önündeki havuzdan örnekler alınmış ve bunun içindeki biyokütle Bölüm II.6 daki yöntemle ayrılıp klorofil a derişimi bulunmuştur. 250 ve 125 mL lik iki havuz suyu örneğindeki biyokütle filitre ile süzöldükten sonra aseton ile çözülmüş ve Shimadzu UV-VIS spektrometresi ile 664, 637 ve 715 nm'deki soğurmaları ölçölmüştür. Bu değerler Tablo 3'de gösterilmiştir.

Tablo 3. Havuz suyundaki biyokütlenin klorofil a soğurma değerleri

Dalgaboyu (nm)	Soğurma (250 mL)	Soğurma (125 mL)
664	0.070	0.030
637	0.036	0.007
750	0.023	0.004

İki paralel örnek kullanarak hazırlanan havuz örneklerinin soğurma değerleri Bölüm II.6'da verilen Eşitlik 5 kullanılarak havuz suyundaki klorofil a derişimi hesaplanmıştır. Burada, 664 nm deki klorofil a'nın soğurma maksimumundan 637 nm'deki diğer maddelerden gelen soğurma değeri çıkarılarak sadece klorofil a'nın soğurması bulunmuştur. Ayrıca örneğin içindeki kolloidal parçacıklardan gelen saçınım, yukarıda hesaplanan değerden 750 nm deki soğurma değeri çıkarılarak elde edilmiştir. 250 mL havuz suyunda klorofil a derişimi 20 µg/L, 125 mL örnekte ise 17 µg/L olarak bulunmuştur.

Hazırlanan bu örnekler daha sonra lazer spektrofotometresi ile floresansları 10'ar kez ölçölmüş ve ortalama floresans değerleri 250 mL havuz suyu kullanılarak hazırlanan

çözeltide 100 saniyede 667,000, 125 mL havuz suyu çözeltisinde ise 333,000 olarak bulunmuştur. 250 mL havuz suyu kullanılarak hazırlanan örnekteki klorofil a miktarı 125 mL havuz suyundakine göre iki misli fazladır. Floresans ölçümlerinde elde edilen foton sayılarının 250 mL/125 mL oranı 2 olup, bu şekilde madde miktarı ile floresans verimlerinin doğrusal ilişkisi kanıtlanmaktadır.

### III.2. Klorofil a Kalibrasyon Eğrisi ve Ölçüm Limitleri

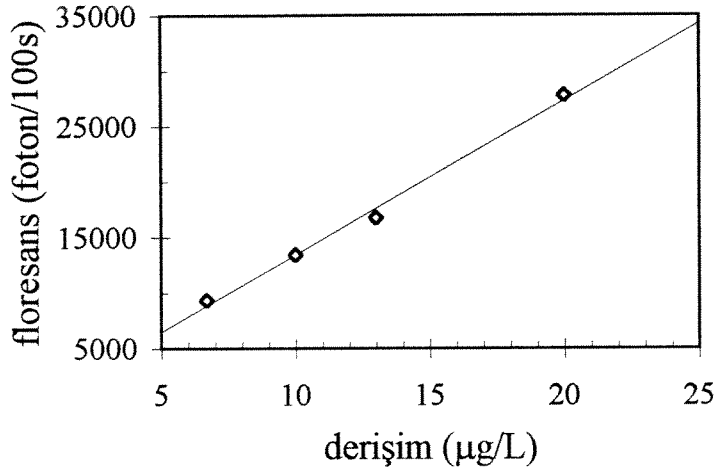
Lazer geri saçınım floresans spektrometresinin klorofil a ölçümlerindeki kalibrasyon eğrisi ile ölçülebilir en düşük derişimler bu kısımda incelenmiştir. Bir önceki kısımda yapılan çalışmada kullanılan ODTÜ Mimarlık Fakültesindeki havuzdan alınan örnek hiç bir ayırım yapılmadan doğrudan lazer spektrofluorometresi ile ölçülmüştür. 10 mL havuz suyu çapı 1 cm olan deney tüpüne koyularak floresans fotonları 100 saniye süre ile sayılmıştır. Daha sonra buna üç kez 5'er mL saf su ilave edilerek klorofil a derişimi seyreltilmiş ve sonuçlar Tablo 4'de gösterilmiştir.

Tablo 4. Klorofil a floresansının derişim ile değışimi

10 mL havuz suyuna ilave edilen saf su (mL)	Klorofil a derişimi ( $\mu\text{g/L}$ )	Floresans verimi (foton sayısı/100s)
0	20	27762
5	13	16745
10	10	13421
15	6.7	9364

Tablo 4'deki değerler kullanılarak klorofil a'nın kalibrasyon eğrisi çizilmiş ve Şekil 11'de gösterilmiştir. Şekildeki noktalar tablodaki deneysel değerleri, doğru ise bu noktalardan geçen en iyi doğruyu göstermektedir. Kalibrasyon eğrisinin korelasyon katsayısı 0.997 olarak bulunmuştur.

## Klorofil a Kalibrasyon Eğrisi



Şekil 11. Klorofil a'nın kalibrasyon eğrisi

Yukarıda özellikleri tanımlanan sistemin ölçebileceği en düşük klorofil a derişimi (detection limit) aşağıda gösterilen bağıntı kullanılarak bulunmuştur.<sup>15</sup>

$$C_L = 2\sqrt{2} \times 0.01 \times \text{RSDB} \frac{C_0}{\text{SBR}} \quad (5)$$

Burada, RSDB (relative standard deviation of background) taban sinyalinin (içinde hiç klorofil a bulunmayan örneğin floresans sinyali) standard sapmasını yüzde olarak;

$$\text{RSDB} = \sigma_B / \bar{x}_B \quad (6)$$

SBR (signal-to-background ratio) ise klorofil a sinyalinin,  $x_A$ , taban sinyaline,  $x_B$ , oranını göstermektedir:

$$\text{SBR} = x_A / x_B \quad (7)$$

İçinde klorofil a bulunmayan su örneği kullanılarak 16 ardışık ölçüm yapılmış ve bunların dağılımından standart sapma,  $\sigma_B = 78.2$ , ortalama değer,  $\bar{x}_B = 2374$  olarak bulunmuştur. Buna göre  $\text{RSDB} = 3.29\%$  olmaktadır. Tablo 4'de gösterilen 10 mL havuz suyuna 15 mL saf su ilave edilerek ( $C_0 = 6.7 \mu\text{g/L}$ ) hazırlanan örneğin floresans değeri,  $x_A = 9364$ , taban değerine (içinde klorofil a bulunmayan su örneği),  $x_B = 2374$  bölünerek,  $\text{SBR} = 3.94$  olarak bulunmuştur. Eşitlik 5 kullanılarak bu çalışmada geliştirdiğimiz lazer spektrofotometresinin ölçebilme limiti,  $C_L = 160 \text{ ng/L}$  olarak bulunmuştur.

### III.3. Lazer diyot ve fiber optik kablolu uzaktan algılama sistemi

Hitachi firmasının 655 nm'de ışımaya yapan lazer diyotu kullanılarak Bölüm II.3. de açıklanan lazer/fiber optik sisteminde kullanılmıştır. Ancak lazer diyot sistemi ile veri toplamak mümkün olmamıştır. Lazer diyotların statik elektriğe ve 220 V şehir ceryanının kesintilerinden etkilenmektedir. NATO aksesuar fonundan alınan lazer diyotlar denemeler sırasında elektrik kesintisinden zarar görerek kullanılamaz duruma gelmiş ve yerine yenisi konulamamıştır.

Lazer diyotların kaybindan sonra denemelere HeNe lazeri ile devam edilmiş ve yukarıda açıklanan sonuçlar elde edilmiştir. Bölüm II.1 de klorofil a'nın 632 ve 650 nm lerdeki floresans verimleri göreceli olarak 1.86 ve 4.0 olarak ölçülmüştü. Dalgaboyunun 632 nm den 650 ye kayması, floresans veriminin iki mislinden fazla bir iyileşme getirecektir. Ayrıca lazer diyotların 5 mW gücü, HeNe lazerin 0.8 mW gücüne göre de 6 kat bir iyileşme sağlayacaktır. Dolayısı ile HeNe sisteminden lazer diyota geçiş sistem performansını 10 kattan fazla arttıracaktır.

### **Sonuç ve Öneriler**

Bu projede lazer ile kırmızı bölgede uyarılan fitoplanktonların doğrudan floresans ölçümleri yapan foton sayma tekniği ile uzaktan algılamalı spektrofloreometre geliştirilmiştir. 632.8 nm HeNe lazeri kullanılarak havuz suyunda yapılan ölçümlerde klorofil derişimlerinin ölçülme limiti 160 ng/L olarak bulunmuştur. Bu değer daha önce geliştirilen Ar lazeri ile elde edilen 1000 ng/L değerinden 7 kez daha düşüktür. Deneyler sırasından bozulan lazer diyotlar kullanılırsa bu limitlerin en az 10 kez daha aşağı ineceği yapılan ölçümlerden anlaşılmıştır.

Lazer diyot ışık kaynaklarının çok ucuz ve hafif olması nedeni ile taşınabilir bir lazer spektrofloreometresinin imali gerçekleştirilebilir. Bateria ile çalışan bir lazer diyot güç kaynağı geliştirilmiş ve lazer diyot bununla çalıştırılmıştır. Taşınabilir bir spektrofloreometre yapmak için taşınabilir monokromatörlerden sağlanması ve bunun sisteme bağlanması gerekmektedir.

Denizlerde fitoplankton ölçümlerinin araştırma gemilerinden seyir halinde iken yapılması ve bu verilerin uydu ve uzay laboratuvarlarından yapılan klorofil ölçümleri ile ilişkilendirilmesi önem taşımaktadır. Ayrıca göllerde yapılan araştırmalarda taşınabilir bir aletle anında göl içindeki fitoplankton dağılımı ve bunun dinamiği çalışılabilecektir. Bu proje ile geliştirilen lazer/fiber optik uzaktan algılama spektrofloreometresinin tamamlanabilmesi için kırmızı bölgede 640, 655 ve 670 nm lazer diyot ve güç kaynakları ile taşınabilir bir monokromatörün sağlanarak böyle bir cihazın bilim dünyasına kazandırılması yararlı olacaktır.

## Kaynaklar

1. Strumm, W. and J. Morgan, *Aquatic Chemistry*, (Wiley, New York, 1981).
2. Sorenzen, C.J., "The Biological Significance of Surface Chlorophyll Measurements," *Limnology and Oceanography*, **15**, 479-80, (1970).
3. Yentsch, C.S. and D.W. Menzen, "A method for the Determination of Phytoplankton Chlorophyll and Phaeophytin by Fluorescence," *Deep Sea Research*, **10**, 221-31, (1963).
4. Sorenzen, C.J., "A method for the Continuous Measurement of 'In Vivo' Chlorophyll Concentration," *Deep Sea Research*, **13**, 223-7, (1966).
5. Kim, H.H., "New Algae Mapping Technique by the Use of Airborne Laser Fluorescensor," *Applied Optics*, **12**, 1454-9, (1973).
6. Mumola, P.B. and H.H. Kim, "Remote Sensing of Marine Plankton by dye Laser Induced Fluorescence," *Proc. Of Conference, Engineering in the Ocean Environment. IEEE*, **3**, 204-7, (1972).
7. Govindjee, R., "The Absorption of Light in Photosynthesis," *Scientific American*, **231(6)**, 68-82, (1974).
8. Campbell, J.W. and J.P. Thomas, eds. 1981, *The Chesapeake Bay Plume Study, Superflux 1980*. Proceedings of Conference held in Williamsburg VA, January 21-23, 1981, NASA Conference Proceedings Document CP-2188).
9. Bristow, M.D., D. Nielsen, D. Bundy and F. Furtek, "Use of Water Raman Emission to Correct Airborne Laser Fluoresensor Data for Effects of Water Optical Attenuator," *Applied Optics*, **20**, 2889-906, (1981).
10. Hoge, F.F., R.N. Savift, "Airborne Simultaneous Spectroscopic Detection of Laser Induced Water Raman Backscatter and Fluorescence from Chlorophyll-a and other Naturally Occuring Pigments," *Applied Optics*, **20**, 3197-205, (1981).
11. Poole, L.R. and W.E. Esaias, "Water Raman Normalization of Airborne Laser Fluorescence Measurements: A computer Study," *Applied Optics*, **21**, 3756-61, (1982).
12. Cowles, T.J., J.N. Moum, R.A. Desiderio and S.M. Angel, "In Situ Monitoring of Ocean Chlorophyll via Laser-Induced Fluorescence Backscattering through an Optical Fiber," *Applied Optics*, **28(3)**, 595-600, (1989).
13. Badaev, V.V., L.N. Vasilev, V.N. Pelevin, V.L. Solomakha and G. Zimmerman, "Determination of the Concentration of Phytoplankton Chlorophyll in the Ocean from Measurements from the Mir Space Station as Part of the Karibe 88 Experiment," *Soviet Journal of Remote Sensing*, **9**, 805-18, (1992).
14. Boumans, P.W.J.M., "Atomic Emission Detection Limits: More than Incidental Analytical Figures of Merit!- A Tutorial Discussion of the Differences and Links Between Two Complementary Approaches," *Spectrochimica Acta* **46B**, 917-39, (1991).
15. Talling, J.F. and D. Driver, "Some Problems in the Estimation of Chlorophyll a in Phytoplankton," *Proceedings of Conference Primary Production Measurement in Marine and Freshwater*, (Ed. M.S. Doty) University of Hawaii, U.S. Atomic Energy Commission Publications, TID 7633, (1961).