فصلنامه علوم محیطی، دوره نوزدهم، شماره ۳، پائیز ۱۴۰۰

۴۱-۵۲

مقایسه میزان بازداری فیلترهای مختلف جهت تعیین کلروفیل - آ در آب‌های ساحلی

احمد منبوهی*، سارا غلامی‌پور و غلامرضا محمدپور

گروه علوم زیستی دریا، پژوهشکده علوم دریایی، پژوهشگاه ملی اقیانوس شناسی و علوم جوی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۹/۰۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۲/۰۳

منبوهی، ا.، س. غلامی‌پور و ، غ.ر. محمدپور. ۱۴۰۰. مقایسه میزان بازداری فیلترهای مختلف جهت تعیین کلروفیل - آ در آب‌های ساحلی). فصلنامه علوم محیطی. ۱۹(۳): ۴۱-۵۲.

سابقه و هدف: فیلتراسیون یکی از مهمترین مرحله‌ها در مطالعات فیتوپلانکتونی است. انتخاب یک فیلتر به عامل‌های مختلفی از جمله قطر چشمه و قیمت آن بستگی دارد. در پژوهش اخیر، پاسخ‌های به‌دست آمده به کمک سه فیلتر با قطر چشمه در حدود یکسان Whatman، CHM و BOECO جهت یافتن فیلتر بهتر به‌منظور استفاده در پژوهش‌های دریایی مقایسه شدند.

مواد و روش‌ها: نمونه‌برداری در ۶ نقطه از آب‌های ساحلی بندر بوشهر در فصل زمستان (۱۳۹۶) انجام گرفت. نمونه‌ها سپس با فیلترهای مورد نظر فیلتر شده و پس از اندازه‌گیری کلروفیل - آ، نتایج با هم مقایسه شدند. از آزمون کالموگروف - اسمیرنوف برای تعیین توزیع داده‌ها استفاده گردید. جهت ارزیابی معنی‌دار بودن اختلاف‌ها از معیار اندازه احتمال با سطح آزمون P<۰/۰۵ استفاده شد.

نتایج و بحث: در بیشتر ایستگاه‌ها کمترین میزان کلروفیل - آ مربوط به فیلتر CHM بود. پاسخ‌های فیلتر BOECO در همبستگی مناسبی با فیلتر Whatman بودند. در بیشتر ایستگاه‌ها، میزان بازداری کلروفیل - آ با استفاده از فیلتر BOECO نسبت به فیلترهای دیگر بیشتر بوده اما نتایج به‌دست آمده با استفاده از فیلترهای BOECO و Whatman دارای اختلاف معنی‌داری نبودند (P>0.05). بنابراین این فیلتر (برخلاف فیلتر CHM) می‌تواند جایگزین مناسبی برای فیلتر گران قیمت Whatman باشد. همچنین، برای اندازه‌گیری غلظت ذرات معلق آب می‌توان از هر سه فیلتر استفاده کرد.

نتیجه گیری: نظر به اینکه میزان بازداری کلروفیل - آ توسط سه فیلتر متفاوت بوده، بنابراین در مقایسه نتایج باید به این مورد دقت شود. همچنین پیشنهاد می‌شود که در مطالعات زیستی که به سوزاندن کربن و نیتروژن روی فیلتر نیاز است، از فیلتر Whatman استفاده شود.

واژه‌های کلیدی: کلروفیل - آ، ذرات معلق آب، مقایسه فیلترها، فیلتراسیون، آب‌های ساحلی

مقدمه

کلروفیل - آ رنگدانه موجود در همه گونه‌های فیتوپلانکتونی، شامل یوکاریوت و پروکاریوت (سیانو باکتری) می‌باشد. از این رو کلروفیل - آ به‌عنوان نماینده‌ای معتبر برای زیست توده فیتوپلانکتونی شناخته می‌شود (Gregor and

* Corresponding Author: *Email Address.* Manbohi@inio.ac.ir
http://dx.doi.org/10.52547/envs.2021.34305

Maršálek, 2004). در پژوهش‌های دریایی و اقیانوسی و بویژه در شیمی دریا و زیست دریا جهت اندازه‌گیری فیتوپلانکتون‌ها از فیلترهای با قطر چشمه[1] مختلف استفاده می‌شود (Saldanha-Corrêa *et al.*, 2004). فیلتراسیون در خلاء به‌عنوان یک روش استخراج در بسیاری از مطالعات فیتوپلانکتونی به‌کار برده می‌شود و روی نتیجه مورد بررسی تأثیر بسزایی دارد. اگرچه محققان از سال ۱۹۷۲، مطالعاتی در زمینه تأثیر نوع فیلتر روی نتایج سنجش فیتوپلانکتونی انجام داده‌اند، ولی به‌طور کلی تحقیقات در این زمینه بسیار اندک است (Sheldon *et al.*, 1972).

فیلتر گلاس فایبر به‌طور قراردادی برای استخراج سلول‌های فیتوپلانکتونی جهت اندازه‌گیری اسپکتروسکوپی رنگدانه‌ها استفاده می‌شود. با این حال پس از شناسایی فتواتوتروف‌های کوچکتر از یک میکرومتر، مانند سیانوباکترها (Waterbury *et al.*, 1979) و پیکو یوکاریوت‌ها (Johnson and Sieburth, 1982) ، فیلترهای غشایی با ترکیب‌های مختلف و قطر چشمه کوچکتر به‌منظور حفظ این موجودات روی فیلتر پیشنهاد گردیدند (Platt *et al.*, 1983).

در یک پژوهش، Moran *et al.* (1999) فیلترهای GF/C (با قطر چشمه ۱/۲ میکرومتر)، GF/F (با قطر چشمه ۰/۷ میکرومتر)، پلی‌کربناتی (با قطر چشمه ۰/۲ میکرومتر) و استرهای سلولزی (با قطر چشمه ۰/۲۲ میکرومتر) را مقایسه کرده و مشاهده کردند که اختلاف معنی‌داری بین فیلترها در نگهداری کلروفیل - آ وجود ندارد، در حالیکه آنالیز فلوسیتومتری جریان نشان داد که بیشتر سلول‌ها بزرگتر از ۱ میکرون بودند. با این حال آن‌ها اقرار کرده‌اند که اگر مقدار بیشتری پیکوپلانکتون در نمونه‌ها موجود باشد، در آن صورت نتایج متفاوتی حاصل خواهد شد (Morán *et al.*, 1999). همچنین Ashimoto (2000) Hiomoto and اختلاف معنی‌داری بین غلظت کلروفیل - آ به‌دست آمده از GF/F و Nucleopore (با قطر چشمه ۰/۲۲ میکرون) در نمونه‌های نیمه قطبی اقیانوس آرام مشاهده نکردند. Ghavez *et al.* (1995)، میزان کلروفیل - آ اندازه‌گیری شده با فیلترهای GF/F و Nucleopore یا Poretics (با قطر چشمه ۰/۲۲ میکرون)، را مقایسه کردند و دریافتند که GF/F می‌تواند برای اندازه‌گیری‌های دقیق کلروفیل - آ حتی در آب‌های الیگوتروف مورد استفاده قرار گیرد. بنابراین در اقیانوس‌شناسی زیستی، فیلترهای GF/F به‌عنوان یک استاندارد برای تعیین کلروفیل - آ پذیرفته شده‌اند (Chavez *et al.*, 1995).

ذرات معلق آب می‌توانند نقش مهمی در ویژگی‌های نوری آب دریاها و محتویات آن‌ها ایفاء نمایند. در واقع، این ذرات به‌دلیل ویژگی‌های هندسی (اندازه و شکل) و طبیعی (ضریب شکست و جنس) قابلیت جذب و پراکنش نور در راستاها و به شدت‌های مختلف را دارا هستند، تا جایی‌که این جذب و پراکنش انتخابی طول موج‌های مختلف نور را نمی‌توان نادیده گرفت (Babin and Stramski, 2004; Stramski *et al.*, 2004). ذرات معلق آب نیز می‌توانند بر تعیین غلظت کلروفیل تأثیرگذار باشند. پژوهش‌های پیشین نشان می‌دهند که توزیع اندازه ذرات معلق و نیز ضریب شکست آن‌ها می‌تواند بر تخمین اندازه‌گیری غلظت آن‌ها توسط دستگاه‌های لیزر تأثیرگذار باشد، به گونه‌ای که غلظت کلروفیل را ۵۰٪ تا ۲۰۰۰٪ بیشتر از مقدار واقعی برآورد کند (Wozniak and Stramski, 2004).

در پژوهش حاضر عملکرد سه فیلتر غشایی شیشه‌ای در جمع‌آوری سلول‌های کوچک برای تعیین غلظت کلروفیل - آ با هم مقایسه شده‌اند. باوجود اینکه فیلترهای Whatman برای آنالیز کلروفیل - آ مناسب هستند، اما یکی از گرانترین برندهای فیلتر بوده و در نتیجه در بعضی مطالعات به‌منظور حفظ سقف هزینه‌های پروژه باید از تعداد نمونه‌ها کم شود. بنابراین در این پژوهش، با استفاده از فیلترهای مشابه (CHM و BOECO) ولی ارزانتر، امکان سنجی انتخاب جایگزین مطمئن برای جمع‌آوری سلول‌های فیتوپلانکتونی

جهت تعیین کلروفیل - آ بررسی شد. در صورتی‌که نتایج حاصله از فیلترهای مورد مطالعه یکسان باشند، با بکارگیری انواع ارزانتر هزینه‌های این آنالیز کاهش یافته و این امر امکان اجرای برنامه‌های پژوهشی وسیع‌تر یا پروژه‌های با تعداد نمونه‌ی بیشتر را بوجود می‌آورد. همچنین برای اندازه‌گیری غلظت و رسوب‌گذاری ذرات معلق آب، فیلترهای CHM و Whatman با یکدیگر مقایسه شدند.

مواد و روش ها

در زمستان ۱۳۹۶ نمونه‌برداری از آب سطحی در منطقه ساحلی بندر بوشهر جهت سنجش کلروفیل - آ در ۶ ایستگاه و با سه تکرار صورت گرفت. هیدرودینامیک آب‌های ساحلی بندر بوشهر به‌طور عمده به‌وسیله جریان جذر و مدی کنترل می‌شود. نمونه‌برداری در زمان مد آب انجام شد. نمونه‌ها با استفاده از بطری نیسکین جمع‌آوری گردیدند و به بطری‌های یک لیتری پلی‌اتیلنی انتقال یافتند و در اسرع وقت با فیلترهای مورد نظر در فشار پایین (به کمک پمپ خلاء و ست فیلتراسیون) فیلتر شدند. ویژگی فیلترها، اندازه و قطر چشمه آن‌ها در جدول ۱ آورده شده است. برای برداشت ذرات معلق آب، نمونه‌ها با فیلتر ۰/۷ میکرون گلاس فایبر و پمپ خلأ با فشار ثابت به روش گرانشی انجام شد (Mueller *et al.*, 2004). برای اندازه‌گیری کلروفیل - آ نیز فیلترها در فویل آلومینیومی (دور از نور) تا زمان آنالیز در فریزر ۵۰- نگهداری گردیدند. عملیات استخراج کلروفیل - آ پس از انحلال صافی در ۳ میلی‌لیتر استون ۹۰ درصد و همگن‌کردن در تاریکی به مدت ۱۰ دقیقه آغاز و با انجام سانتریفیوژ عملیات تکمیل شد (ROPME, 2010). جهت انجام سانتریفیوژ از دستگاه ROTOFIX 32A (شرکت Hettich) استفاده شد. اندازه‌گیری غلظت کلروفیل - آ با روش اسپکتروفوتومتری و با استفاده از دستگاه طیف‌سنج دو پرتویی Specord 210 (شرکت Analytik-jena) در طول موج‌های ۶۳۰، ۶۴۵، ۶۶۳ و ۷۵۰ نانومتر و به کمک معادله SCOR/UNESCO انجام شد (UNESCO, 1966). این داده‌ها برای مطالعه بازده نسبی سه نوع کاغذ صافی شیشه‌ای بیان شده مورد ارزیابی قرار گرفتند. pH آب به صورت در- محل و به کمک دستگاهWTW 330i اندازه‌گیری شد. دمای سطحی آب و میزان اکسیژن محلول به صورت در-محل و به کمک مولتی‌متر HACH (HQ40d) اندازه‌گیری شدند. شوری و هدایت الکتریکی نیز به کمک دستگاه WTW 3210 در محل تعیین شدند. عمق نقاط نمونه‌برداری شده به کمک دستگاه Ecotech (ژاپن) تعیین شد. مقادیر و تغییرات فراسنج‌های فیزیکوشیمیایی آب‌های سطحی منطقه‌های نمونه‌برداری شده در جدول ۲ آورده شده‌اند.

آنالیزهای آماری توسط نرم افزار SPSS، نسخه ۲۲ اجراء گردید. آزمون کالموگروف - اسمیرنوف جهت تعیین توزیع داده‌ها استفاده شد که نشان داد بیشتر داده‌ها از حالت نرمال تبعیت نمی‌کنند. باوجود بکارگیری دو روش لگاریتم و ریشه دوم به‌منظور نرمال‌کردن داده‌ها، توزیع نرمال حاصل نشد. بنابراین از آزمون غیرپارامتریک من - ویتنی یو[۲] برای مقایسه‌ها استفاده گردید. جهت ارزیابی یکسان بودن یا معنی‌دار بودن اختلاف‌ها از معیار اندازه احتمال با سطح آزمون $P<0/05$ استفاده گردید. همچنین از آزمون اسپیرمن برای به‌دست آوردن همبستگی بین داده‌ها استفاده شد.

جدول ۱- ویژگی‌های سه فیلتر استفاده شده در این پژوهش
Table 1. Specifications of the three filters used in this study

نوع فیلتر Filter type	قطر حدودی چشمه Pore size(µm)	قطر فیلتر Filter diameter (mm)	حجم فیلترشده Filtered volume (L)
(GF5) CHM	0.7	47	1
(GF/F) Whatman	0.7	47	1
(GF 6) BOECO	0.7	50	1

جدول ۲- مختصات جغرافیایی، عمق و ویژگی‌های فیزیکی - شیمیایی ایستگاه‌های نمونه‌برداری شده
Table 2. Geographical coordinates, depth, and physico-chemical properties of the sampling stations

نام ایستگاه Station	عمق Depth (m)	عرض جغرافیایی Latitude	طول جغرافیایی Longitude	دمای آب Water temperature (°C)	اکسیژن محلول DO (mg/l)	هدایت الکتریکی Electrical conductivity (ms/cm)	شوری Salinity psu)(	pH
C1	2.9	50.82708	28.99034	21.7	9.34	59.2	39.4	8.11
C2	0.6	50.80489	28.99034	22.0	9.12	58.5	38.8	8.17
C3	1.2	50.83496	28.88152	21.7	9.10	58.4	38.7	8.12
S1	3.6	50.81848	28.99646	20.9	9.11	59.0	39.1	8.01
S2	6.9	50.79706	28.93845	21.8	11.06	58.7	39.0	8.32
S3	6.6	50.82556	28.87772	21.6	11.62	58.4	38.8	8.29

نتایج و بحث

پژوهش حاضر در آب‌های ساحلی شهر بوشهر در فاصله یک کیلومتری از ساحل، که به‌دلیل ورودی‌های فاضلاب، روان‌آب‌های سطحی و زباله‌های بشرزاد ساحلی به‌عنوان منطقه یوتروف (پرغذا) در نظر گرفته می‌شود، صورت گرفت. در منطقه‌های ساحلی ارتباط نزدیکی بین بالا بودن مواد مغذی ناشی از ورود پساب‌ها و فاضلاب‌های شهری و خانگی به آب‌های ساحلی و پدیده تغذیه‌گرایی (یوتریفیکاسیون) وجود دارد. با توجه به اینکه پیکوپلانکتون‌ها (یا ذرات با قطر کمتر از ۲ میکرومتر) توزیع بیشتری در بیومس و تولید اولیه در آب‌های الیگوتروف نسبت به سیستم‌های یوتروفیک دارند (Lee and Nalewajko, 1978)، در مطالعه حاضر این ذرات تأثیر کمتری در نتایج حاصله دارند.

در مطالعات مرتبط با فیتوپلانکتون‌ها بیشتر نمونه‌های آب، به‌منظور نگهداشتن ارگانیسم‌ها جهت استخراج، فیلتر می‌شوند. از این فیلترها می‌توان در روش‌های جداسازی (به‌طور نمونه HPLC) یا میکروسکوپی استفاده کرد در صورتی که می‌توان از نمونه آب فیلتر شده جهت تعیین میزان مواد مغذی بهره برد (Mantoura *et al.*, 1997). در نتیجه فیلتراسیون یکی از اصلی‌ترین و مهمترین مرحله‌های در تعیین میزان کلروفیل - آ و ذرات معلق و نیز میزان مواد مغذی است. انتخاب یک فیلتر به عامل-های مختلفی از جمله قطر چشمه، قیمت و سازگاری شیمیایی آن (بویژه برای HPLC) بستگی دارد.

فیلترهای مورد استفاده جهت استخراج کلروفیل - آ از مواد آلی و معدنی مختلفی تشکیل شده‌اند. با این حال بیشتر از فیلترهای گلاس فایبر، پلی‌کربنات و مخلوط استرهای سلولزی استفاده می‌شود (Morán *et al.*, 1999). به‌طوریکه در حدود ۹۰ درصد موارد از فیلترهای گلاس فایبر استفاده شده است (Saldanha-Corrêa *et al.*, 2004). در این پژوهش فیلترهای مورد استفاده از جنس گلاس فایبر بوده و دارای اندازه حفره‌های مشابهی بودند. جستجو در منابع علمی معتبر نشان داد که تاکنون این سه فیلتر جهت استخراج کلروفیل - آ مقایسه نشده‌اند. از طرفی در ایران بتازگی به جای فیلترهای Whatman از فیلترهای ارزان‌تر CHM جهت استخراج کلروفیل - آ بیشتر استفاده می‌شود.

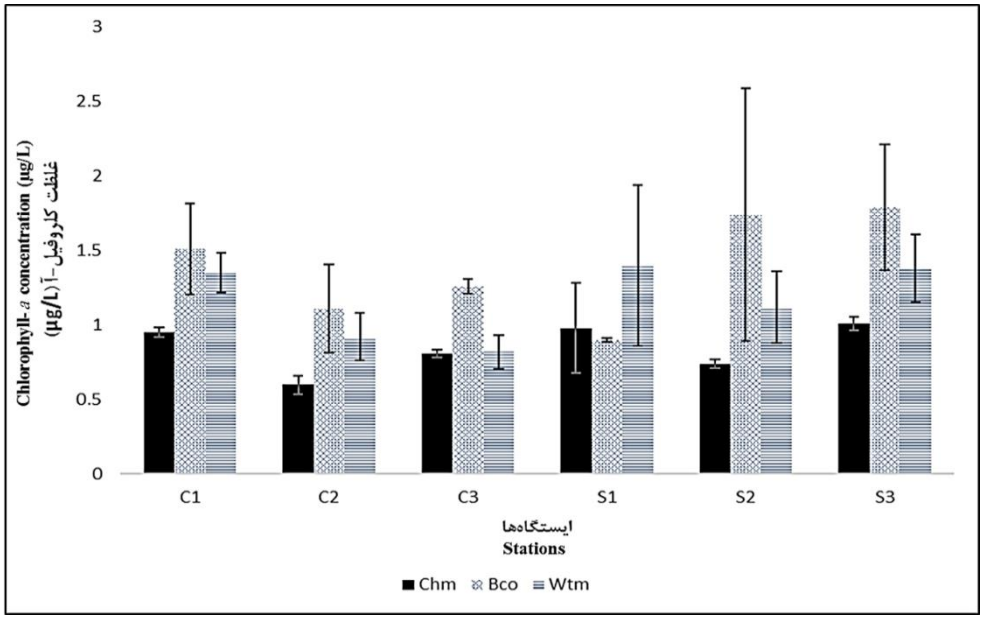
Mantoura *et al.* (1997) اختلاف قابل توجهی بین پاسخ‌های به‌دست آمده به کمک فیلترهای گلاس فایبر (GF/F, GF/C) و غشایی (پلی‌کربنات ۰/۲ میکرومتر و سلولز استرهای مخلوط شده ۰/۲۲ میکرومتر) مشاهده نکردند. با این حال آن‌ها جهت نگهداشتن ۱۰۰ درصدی رنگدانه‌ها[۳] از فیلتر GF/F استفاده کردند Hiomoto and Ashimoto (2000). مشاهده کردند که تفاوت مهمی بین غلظت کلروفیل - آ به‌دست آمده از فیلترهای GF/F و Nuclepore (۰/۲۲ میکرومتر) وجود نداشت. همچنین Chavez *et al.* (1995) مقادیر به‌دست آمده برای کلروفیل - آ به هنگام استفاده از فیلترهای GF/F، Poretics و Nuclepore (۰/۲۲ میکرومتر) را

مقایسه کرده و نتیجه‌گیری کردند که فیلتر GF/F نتایج دقیق‌تری بویژه در منطقه‌های الیگوتروف ارائه می‌دهد. بنابراین در اقیانوس‌شناسی و بویژه اقیانوس‌شناسی زیستی و شیمیایی فیلتر GF/F به‌عنوان فیلتر استانداردی (قابل قبول) در تعیین کلروفیل - آ محسوب می‌شود (Morán *et al.*, 1999). باوجود اینکه این فیلتر در تعیین میزان کلروفیل - آ مناسب بوده با این حال یکی از گرانترین فیلترها است. در نتیجه به‌دلیل این هزینه بالای فیلتر GF/F، گاهی تعداد نمونه‌های آب کاهش داده می‌شود. بنابراین فیلترهای دیگری جهت کاهش هزینه و افزایش تعداد نمونه‌های آب برداشت شده پیشنهاد و مقایسه شده‌اند.

با توجه به جدول ۳ و شکل ۱، با استفاده از فیلتر CHM، کمترین میزان کلروفیل - آ (۰/۶۰ µg/l) به‌دست آمد. در کل با اینکه قطر چشمه سه فیلتر مورد بررسی یکسان بوده، در بیشتر ایستگاه‌های بررسی شده کمترین میزان کلروفیل - آ مربوط به فیلتر CHM و کمترین میزان انحراف استاندارد مربوط به فیلتر BOECO (۰/۰۱۴ µg/l) بود. پاسخ‌های فیلتر BOECO در همبستگی مناسبی با پاسخ‌های فیلتر Whatman قرار داشتند. نتایج به‌دست‌آمده در این پژوهش نشان داد که در کل در بیشتر ایستگاه‌ها، استفاده از فیلتر BOECO بالاترین پاسخ را تولید می‌کند و بنابراین می‌تواند جایگزین مناسبی برای فیلتر گران قیمت Whatman جهت پژوهش در زمینه فیتوپلانکتون‌ها باشد. مطالعه آماری نشان داد میانگین غلظت کلروفیل - آ محاسبه شده با فیلتر Whatman و BOECO اختلاف معنی‌داری، در سطح اطمینان P<۰/۰۵، نداشتند، در حالیکه میزان کلروفیل - آ به‌دست آمده با استفاده از فیلتر CHM به‌طور معنی‌داری با هر دو فیلتر دیگر متفاوت بود؛ به‌طوریکه میزان بازداری کلروفیل - آ به کمک فیلتر CHM نسبت به دو نوع فیلتر دیگر کمتر بود (جدول ۲). نتایج به‌دست آمده به کمک فیلترهای Whatman و BOECO قابل مقایسه بود. بهرحال با در نظر گرفتن قیمت به‌نسبت بالای فیلتر Whatman، می‌توان جهت استخراج کلروفیل - آ از فیلتر ارزان‌تر BOECO استفاده کرد. در این پژوهش نشان داده شد که حتی با یکسان‌بودن قطر چشمه و جنس فیلترها (گلاس فایبر)، پاسخ‌های به‌دست آمده می‌توانند متفاوت باشند. از دلیل‌های متفاوت بودن میزان بازداری این فیلترها می‌توان به نوع مواد بکار رفته و کیفیت فیلترها اشاره کرد.

جدول ۳- میانگین، انحراف استاندارد و CV (%) غلظت کلروفیل - آ سه فیلتر در ایستگاه‌های نمونه‌برداری شده
Table 3. The average, standard deviation, and CV (%) of chlorophyll-*a* of the three filters in the sampling stations

نام ایستگاه Station	فیلتر Filter	کلروفیل-آ (µg/l) Chlorophyll-*a*		
		میانگین غلظت Average	انحراف استاندارد Standard deviation	CV (%)
C1	CHM	0.95	0.034	3.590
	BOECO	1.51	0.307	20.30
	Whatman	1.35	0.135	10.05
C2	CHM	0.60	0.062	10.39
	BOECO	1.11	0.298	26.73
	Whatman	0.92	0.159	17.35
C3	CHM	0.81	0.025	3.060
	BOECO	1.26	0.051	4.050
	Whatman	0.82	0.114	13.97
S1	CHM	0.98	0.304	30.85
	BOECO	0.90	0.014	1.550
	Whatman	1.40	0.538	38.27
S2	CHM	0.74	0.032	4.370
	BOECO	1.74	0.850	48.78
	Whatman	1.12	0.240	21.52
S3	CHM	1.01	0.047	4.660
	BOECO	1.79	0.424	23.71
	Whatman	1.38	0.230	21.75



شکل ۱- میزان متوسط کلروفیل - آ هر سه فیلتر در ایستگاه‌های نمونه‌برداری شده (Wtm، Bco و Chm به‌ترتیب فیلترهای Whatman، BOECO و CHM است)

Fig. 1- The average amount of chlorophyll-*a* on the three filters in the sampling stations (Wtm, Bco, and Chm represent Whatman, BOECO, and CHM filters, respectively)

رسوب‌گذاری ذرات معلق آب روی فیلترها

برای تعیین اندازه‌ی درست تغییرات زیستی و عامل‌های مؤثر بر فرآیندهای زیست - زمین شیمیایی ستون آب، باید روشی به‌مراتب دقیق‌تر از روش‌های معمول بکار گرفته شود. در اندازه‌گیری فرآیندهای زیستی مانند تولید اولیه و کلروفیل - آ، به‌طور عموم از فیلتر گلاس فایبر GF/F و با قطر چشمه ۰/۷ میکرونی استفاده می‌شود. هرچند که بخش قابل توجهی از نیتروژن تثبیت شده با یاخته‌های باکتریایی به‌صورت آمونیوم و یا نیتروژن آلی محلول از چرخه‌ی تثبیت رها می‌شود (Berthelot *et al.*, 2017)، اما در اثر همین تغییرات، اندازه واقعی باکتری‌ها نیز می‌تواند تغییر کند، تا جایی که بخش بزرگی از باکتری‌ها هنگام فیلتراسیون از روزنه‌های فیلتر عبور کنند (Konno *et al.*, 2010). این فرآیند حتی می‌تواند شامل پیکوپلانکتون‌هایی که قطر آن‌ها بین ۰/۲ و ۲ میکرون هستند، باشد و سبب تخمین کمتر غلظت آن‌ها و درنتیجه، تخمین کمتر اثر نیتروژن بر فرآیندهای زیستی گردد. در اندازه‌گیری کلروفیل - آ به کمک روش فیلتراسیون نیز، از فیلتر گلاس فایبر با قطر چشمه ۰/۷ میکرون استفاده می‌شود. بررسی‌ها با میکروسکوپ الکترونی نشان می‌دهند که فیلترهای بوروسیلیکات گلاس فایبر هنگام قرارگرفتن در دمای ۴۵۰ درجه سلسیوس، فشرده‌تر شده و قطر اسمی روزنه آن کمتر می‌گردد (Nayar and Chou, 2003). از سوی دیگر، حرارت دادن فیلترهای گلاس فایبر تا دمای ۴۵۰ درجه سلسیوس سبب می‌شود که کربن و نیتروژن اضافی که می‌توانند نمونه را آلوده کنند، از روی کاغذ فیلتر حذف شوند (Bombar *et al.*, 2018). بنابراین افزون بر نیتروژن زیستی، در نمونه‌برداری‌های مربوط به تولید اولیه و باکتری‌ها، حذف کربن و نیتروژن اضافی از روی فیلتر می‌تواند از لحاظ کمی، اندازه‌ای دقیق از غلظت، نوع و پهنه بندی قطر ذرات به‌دست دهد.

همانطور که پیش از این نیز بیان گردید، در این مطالعه، از فیلترهای گلاس فایبر با قطر چشمه ۰/۷ میکرون بهره‌گیری شد. گفتنی است که پیش از استفاده، فیلترها در کوره و به مدت ۴ ساعت در دمای ۴۰۰ درجه سلسیوس حرارت دیده تا نیتروژن و کربن اضافی موجود روی آن‌ها حذف گردد. با حرارت دادن فیلترهای گلاس فایبر و حذف نمودن کربن و نیتروژن اضافه روی آن‌ها،

داده‌های زیستی حاصل از این فیلترها (مانند کلروفیل - آ) با صحت بیشتری به‌دست خواهند آمد. پژوهش‌های پیشین نشان می‌دهند که فیلترهای Whatman، Macherey-Nagel و Millipore از لحاظ ساختاری با هم مشابه بوده و هر سه برای برداشت داده‌های کلروفیل - آ مناسب هستند (Flavia *et al.*, 2004). اما زمانی انتخاب نوع فیلتر اهمیت خود را نشان می‌دهد که هدف از نمونه‌برداری، برداشت پیکوپلانکتون و یا سیانوباکتری‌ها باشد، چرا که این ذرات از اندازه‌های مختلفی برخوردار هستند (Waterbury *et al.*, 1979). در این موارد، استفاده از فیلترهای ۰/۲۲ تا یک میکرومتر برای برداشت ذرات معلق توصیه شده است (Li *et al.*, 1983; Platt *et al.*, 1983). همچنین، پس از حرارت دادن فیلترهای CHM و Whatman در کوره، روشن شد که در رسوب‌گذاری ذرات معلق آب روی فیلترها، تفاوت قابل ملاحظه‌ای میان آن‌ها مشاهده نمی‌شود. نکته قابل توجه درباره‌ی فیلترهای گلاس فایبر CHM استفاده شده در این تحقیق این بود که اگر این فیلترها به مدت طولانی‌تر از ۶ ساعت در معرض حرارت قرارگیرند، شکننده شده و این احتمال وجود دارد هنگام فیلتراسیون، انسجام خود را از دست داده و سبب تغییر در اندازه قطر روزنه و یا پارگی شوند. همچنین، قرارگرفتن آن‌ها در معرض حرارت بیش از ۴۵۰ درجه سلسیوس، سبب ذوب شدن الیاف بوروسیلیکات گلاس فایبر شده و داده‌های به‌دست آمده از رسوب‌گذاری روی این فیلترها با خطای قابل ملاحظه مواجه خواهند شد (Morán *et al.*, 1999). در پایان، می‌توان گفت که برای اندازه‌گیری غلظت و رسوب‌گذاری ذرات معلق آب، فیلترهای CHM و Whatman تفاوت چندانی با یکدیگر نداشته و به‌دلیل مقرون به صرفه بودن، فیلتر CHM از کارآیی لازم برخوردار است. اما پیشنهاد می‌گردد که در مطالعات زیستی، که به سوزاندن کربن و نیتروژن روی فیلتر نیاز است، از فیلتر Whatman استفاده شود.

نتیجه‌گیری

در پژوهش اخیر از نمونه آب‌های ساحلی استفاده شد و پاسخ‌های به‌دست آمده به کمک سه فیلتر Whatman (GF/F)، CHM (GF5) و BOECO (GF6) جهت یافتن فیلتر بهتر به‌منظور استفاده در پژوهش‌های دریایی و اقیانوسی مقایسه شدند. اگر چه فیلتر GF/F در مطالعات فیتوپلانکتونی بر فیلترهای دیگر ترجیح داده می‌شود، اما در پژوهش اخیر به کمک آزمون‌های آماری نشان داده شد که پاسخ‌های به‌دست آمده به کمک فیلتر BOECO، که قیمت کمتری از فیلتر GF/F داشته، اختلاف معنی‌داری با پاسخ‌های به‌دست آمده به کمک فیلتر Whatman نداشته ($P > 0.05$) و می‌توان از فیلتر BOECO به‌عنوان جایگزینی برای فیلتر Whatman استفاده کرد. با این حال پاسخ‌های به‌دست آمده به کمک فیلتر CHM دارای اختلاف معنی‌داری با دو فیلتر بیان شده داشتند. با توجه به نتایج به‌دست آمده، باید در مقایسه نتایج کلروفیل - آ بویژه به‌وسیله فیلترهای Whatman و CHM احتیاط لازم را داشت. همچنین، برای اندازه‌گیری غلظت و رسوب‌گذاری ذرات معلق آب، فیلترهای CHM و Whatman تفاوت چندانی با یکدیگر نداشته و به‌دلیل مقرون به صرفه بودن، فیلتر CHM از کارآیی لازم برخوردار است. اما پیشنهاد می‌گردد که در مطالعات زیستی، که به سوزاندن کربن و نیتروژن روی فیلتر نیاز است، از فیلتر Whatman استفاده شود.

سپاسگزاری

از پژوهشگاه ملی اقیانوس‌شناسی و علوم جوی به‌دلیل حمایت‌های مادی و معنوی جهت به سرانجام رساندن این پژوهش نهایت تشکر را داریم.

پی‌نوشت‌ها

[1] Pore size
[2] Mann-Whitney U
[3] Pigments

منابع

Ashimoto, S.H. and Hiomoto, A.S., 2000. Comparison of gf/f filters and 0.2 and 0.6 μm nuclepore filters on the chlorophyll retention. Bulletin - National Research Institute of Far Seas Fisheries (Japan). 37, 45-48.

Babin, M. and Stramski, D., 2004. Variations in the mass-specific absorption coefficient of mineral particles suspended in water. Limnology and Oceanography. 49, 756–767.

Berthelot, H., Benavides, M., Moisander, P.H., Grosso, O. and Bonnet, S., 2017. High-nitrogen fixation rates in the particulate and dissolved pools in the western tropical pacific (solomon and bismarck seas). Geophysical Research Letters. 44, 8414-8423.

Bombar, D., Paerl, R.W., Anderson, R. and Riemann, L., 2018. Filtration via conventional glass fiber filters in 15n2 tracer assays fails to capture all nitrogen-fixing prokaryotes. Frontiers in Marine Science. 5, 1–11.

Chavez, F.P., Buck, K.R., Bidigare, R.R., Karl, D.M., Hebel, D., Latasa, M., Campbell, L. and Newton, J., 1995. On the chlorophyll a retention properties of glass-fiber gf/f filters. Limnology and Oceanography. 40, 428-433.

Gregor, J. and Maršálek, B., 2004. Freshwater phytoplankton quantification by chlorophyll a: A comparative study of in vitro, in vivo and in situ methods. Water Research. 38, 517-522.

Johnson, P.W. and Sieburth, J.M., 1982. In-situ morphology and occurrence of eucaryotic phototrophs of bacterial size in the picoplankton of estuarine and oceanic waters1. Journal of Phycology. 18, 318-327.

Konno, U., Tsunogai, U., Komatsu, D.D., Daita, S., Nakagawa, F., Tsuda, A., Matsui, T., Eum, Y.J. and Suzuki, K., 2010. Determination of total n 2 fixation rates in the ocean taking into account both the particulate and filtrate fractions. Biogeosciences. 7, 2369–2377.

Lee, K. and Nalewajko, C., 1978. Photosynthesis, extracellular release and glycollic acid uptake by plankton: Fractionation studies. SIL Proceedings, 1922-2010. 20, 257-262.

Mantoura, R.F.C., Wright, S.W., Jeffrey, S.W., Barlow, R.G. and Cummings, D.E., 1997. Phytoplankton Pigments in Oceanography: Guidelines to modern methods: Filtration and Storage of Pigments from Microalgae. UNESCO, Paris, in Environmental Science.,pp. 283–305

Morán, X.A.G., Gasol, J.M., Arin, L. and Estrada., M.F., 1999. A comparison between glass fiber and membrane filters for the estimation of phytoplankton poc and doc production. Marine Ecology Progress Series. 187, 31-41.

Nayar, S. and Chou, L.M., 2003. Relative efficiencies of different filters in retaining phytoplankton for pigment and productivity studies. Estuarine, Coastal and Shelf Science. 58, 241-248.

Platt, T., Rao, D.V.S. and Irwin, B., 1983. Photosynthesis of picoplankton in the oligotrophic ocean. Nature. 301, 702-704.

MOOPAM, 2010. Manual of Oceanographic Observations and Pollutant Analyses Methods (MOOPAM). Regional Organization for the Protection of the Marine Environment, Kuwait.

Saldanha-Corrêa, F.M.P., Gianesella, S.M.F. and Barrera-Alba, J.J., 2004. A comparison of the retention capability among three different glass-fiber filters used for chlorophyll-a determinations. Brazilian Journal of Oceanography. 52, 243-247.

Sheldon, R.W., 1972. Size separation of marine seston by membrane and glass-fiber filters. Limnol. Oceanogr. 17(3), 494‑498.

Stramski D., Woz´niak S.B. and Flatau P.J., 2004. Optical properties of Asian mineral dust suspended in seawater, Limnology Oceanography. 49, 749–755.

UNESCO .1966. Determination of photosynthetic pigments in sea-water. Pp. in In Monographs on Océanographie Methodology,eds. The United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization, France.

Waterbury, J.B., Watson, S.W., Guillard, R.R.L. and Brand, L.E., 1979. Widespread occurrence of a unicellular, marine, planktonic, cyanobacterium. Nature. 277, 293-294.

Wozniak, S.B. and Stramski, D., 2004. Modeling the optical properties of mineral particles suspended in seawater and their influence on ocean reflectance and chlorophyll estimation from remote sensing algorithms. Applied Optics. 43, 3489-3503.

Environmental Sciences Vol.19 / No.3 / Autumn 2021

41-52

A comparison of retention capability of different fiberglass filters used for the determination of chlorophyll-*a* in coastal waters

Ahmad Manbohi*, Sara Gholamipour and Gholamreza Mohammadpour

Marine Chemistry and Environment division, Ocean Sciences Department, Iranian National Institute for Oceanography and Atmospheric Science, Tehran, Iran

Received: 2020.11.22 Accepted: 2021.02.21

Manbohi, A., Gholamipour, S. and Mohammadpour, Gh.R., 2021. A comparison of retention capability of different fiberglass filters used for the determination of chlorophyll-*a* in coastal waters. Environmental Sciences. 19(3): 41-52

Introduction: Filtration is one of the most important steps in phytoplankton studies. Choosing a filter for research purposes depends on its pore size and price. In the present study, the results obtained by Whatman, CHM, and BOECO filters were compared to find better filters to use in marine research.

Material and methods: The samplings were performed in 6 stations of coastal waters of Bushehr port in winter (2017). The samples were filtered with the mentioned filters. After calorimetrical measurement of chlorophyll-*a*, the obtained results were compared. The Kolmogorov-Smirnov test was used to determine data distribution. In order to evaluate whether the differences are significant, the probability size criterion was used with the $P < 0.05$ test level.

Results and discussion: In most stations, the lowest amount of chlorophyll-*a* was obtained by the CHM filter. In most stations, the retention amount of chlorophyll-*a* using the BOECO filter was higher than other filters. Despite the CHM filter, the results obtained using BOECO and Whatman filters were not significantly different ($P>0.05$). Therefore, the BOECO filter can be a good alternative to the expensive Whatman filter for research on phytoplanktons. Furthermore, for measuring suspended particulate matter, all three filters can be used.

Conclusion: Due to the fact that the retention amounts of chlorophyll-*a* using the three filters were different, caution should be exercised when comparing chlorophyll-*a* results. It is also recommended that the Whatman filter be used in biological studies that rely on burning carbon and nitrogen on the filter.

* Corresponding Author: *Email Address.* Manbohi@inio.ac.ir
http://dx.doi.org/10.52547/envs.2021.34305

Keywords: Chlorophyll-*a*, Suspended particulate matter, Filtration, Coastal waters, Phytoplankton