

**משרד החקלאות - דו"ח לתוכניות מחקר
לקרן המדען הראשי**

קוד זיהוי	א. נושא המחקר (בעברית)
780 - 0013 - 16	מערכת התראה לגילוי זיהוי חומרים מסוכנים בבדיקות דגים מבוססת שיטות ספקטרליות מתקדמות בזמן אמתי

ג. כללי	
מוסד מחקר של החוקר הראשי	
אוניברסיטת אריאל	
סוג הדו"ח	תאריכים
מסכם	תקופת המחקר
	עבודה מוגש הדו"ח
	התחלה
סיום	שנה חודש
שנה חודש	שנה חודש
01 / 2014	12 / 2016
שנה חודש	שנה חודש
/	/

ב. צוות החוקרים		
שם פרטי	שם משפחה	חוקר ראשי
אמיר	אברמוביץ	
חוקרים משניים		
1	הרפז	
2	גולדשלגר	
3		
4		
5		
6		
7		

ד. מקורות מימון עבורם מיועד הדו"ח		
שם מקור המימון	קוד מקור מימון	סכום שאושר למחקר בשנת תיקצוב הדו"ח בשקלים
משרד החקלאות		420,000

ה. תקציר שים לב - על התקציר להיכתב בעברית לפי סעיף ה' שבהנחיות לכתיבת דיווחים

שמירה על בריאות הדגים בבדיקה מחייבת בדיקה של רמות החומרים המסוכנים אשר עלולים להימצא בבדיקה. חומרים כגון אמוניה ניטריטים וניטריטים הינם מסוכנים ועלולים לפגוע בבריאותו של הדג. במהלך המחקר נבחנו שיטות מדידה ספקטרליות המתבססות על שיטת האידוי. לכל החומרים בטבע יש חתימה ספקטרלית ולכן בשנת המחקר הראשונה חקרנו את הוותמת הספקטרלית של אמוניה ניטריטים וניטריטים. תוצאות המחקר הצביעו על כך כי לאמוניה יש פס בליעה אופייני בתחום האינפרא אדום בינוני MIR אשר יכול לתת אינדיקציה על הימצאות של אמוניה וריכחה במים. התוצאות המצורפות מוכיחות כי ניתן לזהות אמוניה ניטריטים וניטריטים. כן מוצגת קונפיגורציה ראשונית של מערך מדידה בזמן אמת לניטור חנקות בריכות דגים. תוצאות המחקר מראות כי שיטת האידוי שפותחה במהלך המחקר, מאפשרת זיהוי חומרים מסוכנים כגון אמוניה בבדיקת הדגים ומאפשרת בניית מערכת אשר תאפשר ניטור בזמן אמתי של רמות החומרים הנ"ל ותתריע בכל עת שהריכוז מסכן את הדגים בבדיקה..

1. אישורים

הנני מאשר שקראתי את ההנחיות להגשת דיווחים לקרן המדען הראשי והדו"ח המצ"ב מוגש לפיהן

18/9/17 תאריך (שנה) (חודש) (יום)

חוקר ראשי מנהל המחלקה מנהל המכון (פקולטה) אמרכלות (רשות המחקר) רשות המחקר

אוניברסיטת אריאל בשומרון
ע.ר. 580367290

דו"ח מסכם לתכנית מחקר מספר 16-0013-780

מערכת התראה לגילוי זיהוי חומרים מסוכנים בבריכות דגים מבוססת שיטות ספקטרליות מתקדמות בזמן אמת

Monitoring of Ammonia concentration in fish ponds using evaporation and advanced spectroscopic methods

שנת המחקר: אחרונה מתוך 3 שנים

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות ע"י

אמיר אברמוביץ המחלקה להנדסת חשמל ואלקטרוניקה, אוניברסיטת אריאל

שנאן הרפז המחלקה למדגה מינהל המחקר החקלאי, מכון וולקני

נפתלי גולדשלגר תחנה לחקר הסחף, משרד החקלאות ואוניברסיטת אריאל

Amir Abramovich – Ariel University Department of Electrical and Electronic Engineering. E-mail: amir007@ariel.ac.il Tel: 972-3-9066389

Sheenan Harpaz – Agricultural Research Organization the Volcani center, Department of poultry and aquaculture. harpaz@agri.gov.il

Naftaly Goldshlegar - Soil Eosion Reasarch sataion and Ariel University

תקציר

שמירה על בריאות הדגים בבריכה מחייבת בדיקה של רמות החומרים המסוכנים אשר עלולים להימצא בבריכה. חומרים כגון אמוניה ניטריטים וניטריטים הינם מסוכנים ועלולים לפגוע בבריאותו של הדג. במהלך המחקר נבחנו שיטות מדידה ספקטרליות המתבססות על שיטת האידיוי. לכל החומרים בטבע יש חתימה ספקטרלית ולכן בשנת המחקר הראשונה חקרנו את החותמת הספקטרלית של אמוניה ניטריטים וניטריטים. תוצאות המחקר הצביעו על כך כי לאמוניה יש פס בליעה אופייני בתחום האינפרא אדום בינוני MIR אשר יכול לתת אינדיקציה על הימצאות של אמוניה וריכוזה במים. התוצאות המצורפות מוכיחות כי ניתן לזהות אמוניה ניטריטים וניטריטים. כן מוצגת קונפיגורציה ראשונית של מערך מדידה בזמן אמת לניטור חנקות בריכות דגים. תוצאות המחקר מראות כי שיטת האידיוי שפותחה במהלך המחקר, מאפשרת זיהוי חומרים מסוכנים כגון אמוניה בבריכות הדגים ומאפשרת בניית מערכת אשר תאפשר ניטור בזמן אמת של רמות החומרים הנ"ל ניתן לחברה למערכת אשר תתריע בכל עת שהריכוז מסכן את הדגים בבריכה.

.....

הצהרת החוקר הראשי:

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים.

הניסויים מהווים המלצות לחקלאים: כן/לא (מחק את המיותר)

***במידה וכן, על החוקר להמציא פרטים על הגוף שבאמצעותו מופץ הידע (כמו: שה"ם)**

חתימת החוקר _____ תאריך: 18/9/17

רשימת פרסומים שנבעו מהמחקר:

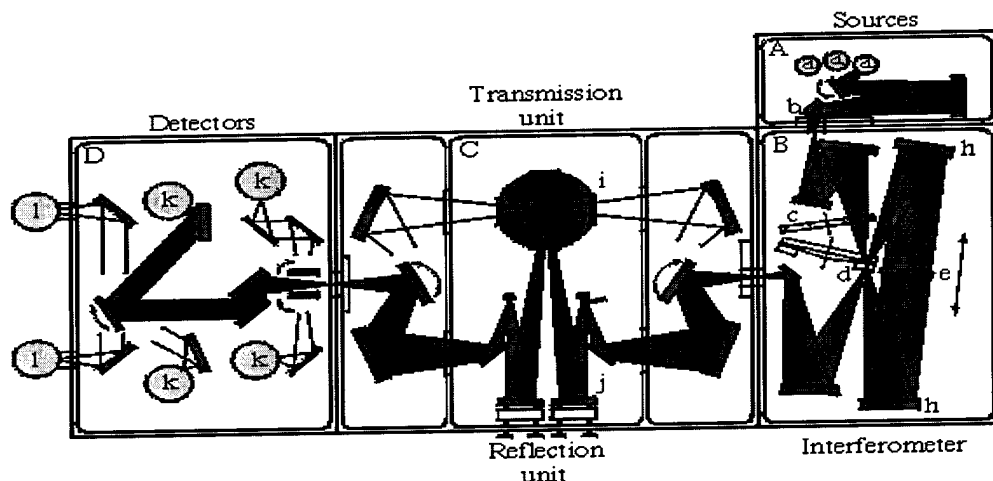
1. הנושא נמצא בשלבי רישום פטנט ולכן לא ניתן לפרסם כעת, בהמשך בהחלט נפרסם
2. עבודת מוסמך של התלמיד אהרון גרינברג שהוגשה בסוף שנת 2016 והתקבלה בציון - הצטיינות יתרה.

הדו"ח המסכם של מחקר "מערכת התראה לגילוי וזיהוי חומרים מסוכנים בבריכות דגים מבוססת שיטות ספקטרליות מתקדמות בזמן אמת" מתאר את העבודה המחקרית שנעשתה לאורך כל אחת משנות מחקר ומסכם את כלל תוצאות המחקר.

במהלך שנת המחקר הראשונה הצטרף אלינו סטודנט מחקר, אהרון גרינברג, אשר במסגרת עבודת התיזה שלו (ראה ביבליוגרפיה) ערך את סקר הספרות וחקר את פסי הבליעה של החומרים המסוכנים אמוניה ניטריט וניטרט בבריכת הדגים. במסגרת המחקר, הוקם בנק חתימות הכולל את הפירוט של פסי הבליעה האופייניים של החומרים המסוכנים השונים. מפאת קוצר מקום לא פורטו כלל הניסויים שבוצעו במהלך המחקר. פרוט מדוקדק של כלל העבודה המחקרית נמצא בעבודת המוסמך של הסטודנט אהרון גרינברג ומסכם בדו"ח שנה א'. מערך המדידה של המדידות הספקטרליות כלל את ה- FTIR ומערכת ה-ATR של חברת Harick

מערכת FTIR [1]

מערכות FTIR מתקדמות מאפשרות למדוד את התכונות האופטיות של חומרים נבדקים בתחומי תדר רחבים ביותר. במעבדה לגלים מילימטרים קיימת מערכת FTIR מסוג ISF 113v של חברת BRUKER. מערכת זו מתבססת על אינטרפרומטר מיכלסון, מראה מתכווננת, מפצל קרן, מקורות קרינה רחבי פס וגלאים מתאימים אשר מאפשרים את קבלת החותמת הספקטראלית של החומר הנבדק לאחר ביצוע התמרת פורייה מתאימה [1] (ראה איור מס' 1). המערכת שברשותנו שודרגה באופן שתוכל למדוד את התכונות האופטיות של החומר הנבדק גם בתחומי ה- FIR וה- MMW. באיור מס' 1 ניתן לראות סכמה עקרונית של מערכת ה- FTIR.



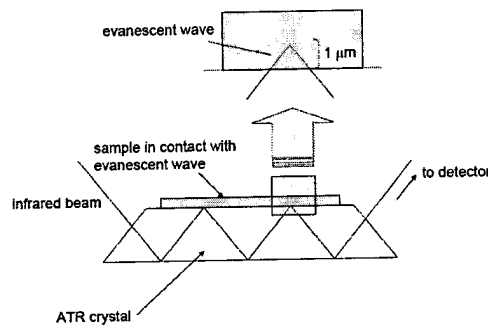
איור מס' 1 : תיאור סכמתי של מערכת FTIR מדגם ISF 113v . בתא A נמצאים מקורות רחבי פס הכוללים מנורת כספית לתחום FIR ומנורת GLOWBAR לתחום MIR. בתא B ניתן לראות את האינטרפרומטר המורכב משתי מראות קבועות (מסומנות ב- h) וממראה נעה (מסומנת ב- e). מפצל הקרן של האינטרפרומטר מסומן באות d. תא C של המערכת משמש כתא המדידה בו ניתן למדוד גם העברה וגם החזרה בהתאם לסידור המראות. בתא D ממוקמים הגלאים של המערכת.

מערכת ה- FTIR מאפשרת לבצע אנליזה כימית כגון התאמת ספקטרום לבנק נתונים, זיהוי חומרים לא ידועים ובדיקות תוך כדי התרחשות של תגובות כימיות. המערכת מאפשרת לזהות קבוצות והרכבים כימיים בתערובת נבדקת לא ידועה. בנוסף לכל אילו ניתן גם לקבל מידע אלקטרוני אודות מוליכות החומר הנבדק ומקדמי

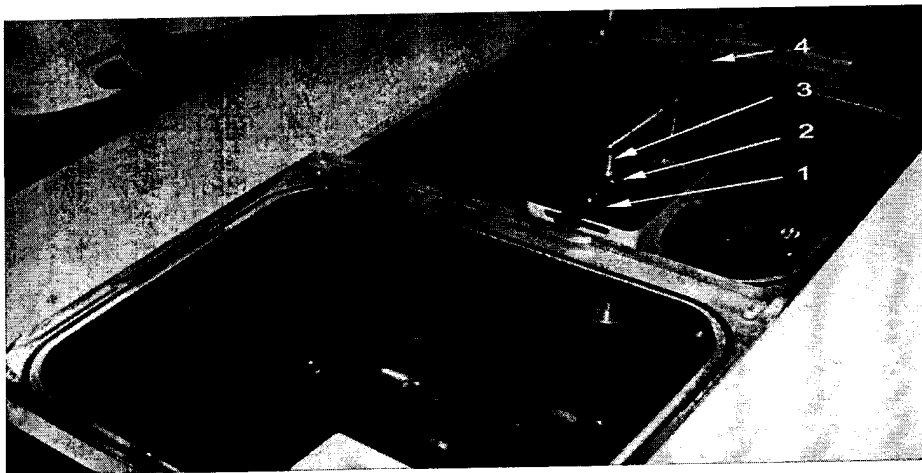
השבירה הקומפלקסים [1]. מערכת ה-FTIR שברשותנו מאפשר רזולוציות מדידה מהגבוהות ביותר (0.03cm^{-1}) שזה כ-0.9 GHz) ביחס למערכות FTIR של יצרנים אחרים.

מערכת ATR-FTIR [1,2]

מדידת ATR מתבססת על מדידת ה- Evanescent wave החודר לתוך חומר נבדק במצב בו יש החזרה מוחלטת מהמשק בין החומר הנבדק לגביש של מערכת המדידה כפי שמודגם באיור מס' 2. ה- Evanescent wave מהווים פתרון למשוואות מקסוול במצב בו מתקיימת החזרה מלאה בממשק בין שני חומרים בעלי מקדם שבירה שונה. מידת החדירה של ה- Evanescent wave נקבעת בהתאם לחומר המונח על הגביש של המערכת ולפיכך אנו מקבלים חתימה ספקטראלית בהתאם לפסי בליעה או העברה של החומר הנבדק. שיטה זו הוכחה במשך השנים כשיטה יעילה ביותר המאפשרת אפיון ספקטראלי מהיר ואמין של דוגמא ללא צורך בהכנות מיוחדות. בשיטה זו ניתן לבדוק שכבות דקות, מוצקים, אבקות ונוזלים. כל אילו מוצמדים לפני הגביש ומאפשרים למדוד את ה- Evanescent wave החודר לתוך הדוגמא בתחומי תדר נרחבים של מערכת FTIR. למעשה מדידה זו מצריכה אביזר הכולל את הגביש בדרך כלל בעל מקדם שבירה גבוה וכן את התקנתו בתוך תא המדידה של ה- FTIR. המעבדה לגלים מילימטריים ותת מילימטריים מצוידת במערכת ATR מדגם MVP Pro Star המותקנת בתוך תא המדידה של ה- FTIR כפי שניתן לראות באיור מס' 3.



איור מס' 2: תיאור ה- Evanescent wave החודרים לתוך הדוגמא במצב של החזרה מלאה.



איור מס' 3: מערכת MVP Pro Star מותקנת בתא המדידה של ה- FTIR.

1-sampling plate, 2 - diamond crystal, 3 - pressure head, 4 - pressure applicator knob

[3] OPUS Spectroscopy Software

התוצאות הספקטרליות שנמדדו באמצעות ה- FTIR מעובדות באמצעות תוכנת OPUS [3]. תוכנת OPUS מאפשרת את העיבודים המתקדמים הבאים: חיפוש זיהוי של חומרים על פי פסי בליעה מתוך מאגר נתונים מסחרי ו/או מאגר נתונים שהוקם ע"י החוקרים. התוכנה כוללת עיבוד נתונים הכולל חישובים ספקטראליים, החסרת ספקטרומים, פיצוי השפעות אטמוספירה ותחום נרחב של פונקציות מתמטיות כגון נירמול, נגזרות, סטטיסטיקה נרחבת, התמרות פורייה והתמרות קרמס-סקרונינג ועוד מניפולציות על הספקטרומים הנמדדים [3]. כל חישובים הקשורים במדידות הספקטרום נעשו באמצעות תוכנת OPUS כוללת התאמות פסי בליעה וחישובים סטטיסטיים.

במהלך שנה א למחקר בוצעו ודווחו המשימות הבאות:

1. סקר ספרות: רעלים וחומרים ביולוגיים המאמרים שנסקרו מופיעים ברשימת הביבליוגרפיה
2. הקמת בנק חותמות בתחומי ה MIR הרעלים והחומרים הנ"ל
3. חקירת הקשר הכימי ואופני הבליעה של החומרים הנ"ל בתחום ה MIR
4. ביצוע מדידות ראשוניות במים והשוואה לבנק הנתונים
5. *הרחבת המדידות לתחום ה FIR וה- MMW

לגבי משימה מס' 5 אנו מבקשים להדגיש כי נעשו מדידות בתחומי ה- FIR אולם לא נמצאו פסי בליעה אופייניים של החומרים המסוכנים בתחום זה. יתירה מכך מצאנו כי בליעת המים ורעשי הרקע בתחום זה גבוהים. בנוסף מצאנו כי גביש היהלום המשמש אותנו במדידות ה- ATR בולע חלק מקרינה בתחומי ה- FIR, דבר הגורם להקטנה משמעותית של היחס אות לרעש (SNR) של המערכת ומקשה על ההבחנה בפסי בליעה אם קיימים. כתוצאה מכך החלטנו להתמקד בפסי בליעה ברורים וחזקים שנמצאו במהלך מחקר שנה א ובשלב הקמת בנק הנתונים שנבנה על סמך המדידות הספקטרליות ונמצאים בהתאמה לספרות המקצועית ולמבנה המולקולרי של החומרים כפי שהובא בדוח מסכם שנה א'.

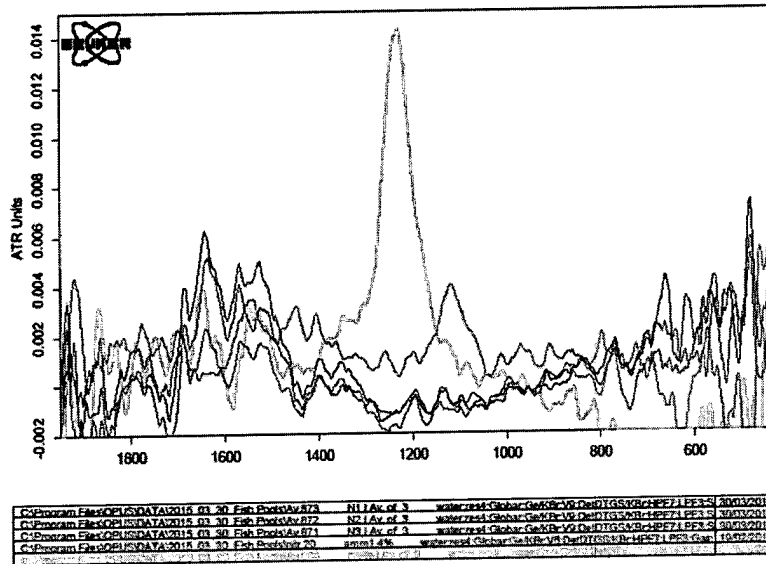
בשנת המחקר השנייה התמקדנו במדידת אמוניה וניטריט ממי אקווריומים בהם הוחזקו דגים ומתוך מי בריכות דגים. במהלך שנה זו במחקר נערכו מדידות ספקטרליות עבור דגימות של מי בריכות דגים ממקומות שונים בהם גדלו דגים בתנאי הזנה שונים. מי הבריכות נבדקו על ידי ערכות מדידה סטנדרטיות בהתאם לטבלה מס' 1 המצורפת:

טבלה מס' 1: דוגמה לאחת המדידות שנערכו ע"י ערכה של Merck. כל הערכים מבוטאים ביחידות של

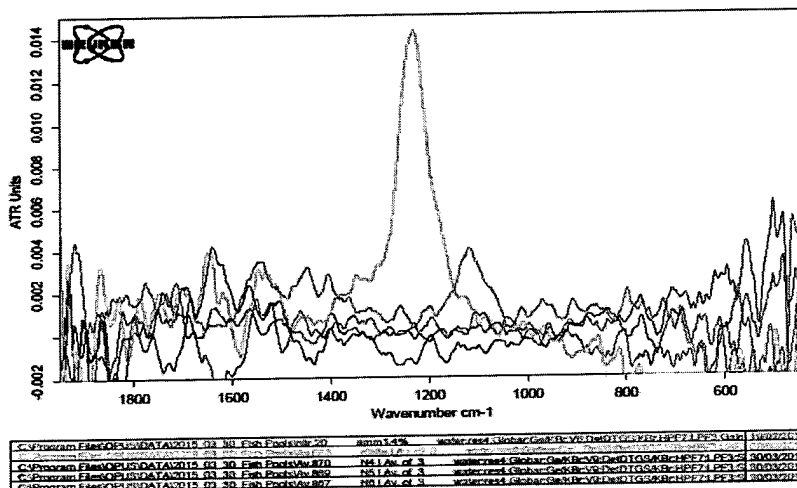
ppm.

nitrite	NH3	Ammonia total	דגימות
0.3	0.4	0.5	1+2
0.2	2.3	3	3+4
0	3.9	5	5+6

. בדוח מסכם שנה ב' ניתן לראות את תוצאות אחת המדידות הספקטרליות (איור מס' 3 בדוח שנה ב') אשר נעשו עבור דגימות 1, 2, ו-3 (מסומן בגרף N1,N2, N3). מדידות אילו מובאות באיור מס' 4. תוצאות מדידת מי הבריכות הושוו למדידות ופסי הבליעה של החומרים המסוכנים בבנק הנתונים שהוכן בשנה א'. נמצא מתאם גבוה בין התוצאות שהתקבלו בשימוש בערכה ותוצאות הבדיקה הספקטרלית.



איור מס' 4: תוצאות ספקטרליות אופייניות של מערכת FTIR-ATR עבור דוגמאות 1,2,3 בהשוואה לפסי בליעה של אמוניה (וורוד) וניטריט (תכלת) מבנק הנתונים.
 באיור מס' 5 ניתן לראות את המדידות הספקטרליות עבור הדוגמאות 4,5,6 (מסומנות כ- N4,N5, N6 בגרף).



איור מס' 5: תוצאות ספקטרליות אופייניות של מערכת FTIR-ATR עבור דוגמאות 4,5,6 בהשוואה לפסי בליעה של אמוניה (וורוד) וניטריט (תכלת) מבנק הנתונים.

התוצאות של דוגמאות 4,5,6 המובאות באיור מס' 5 דומות מאוד לאילו המופיעות באיור 4 ובדוח מסכם שנה ב' מבחינת פסי הבליעה של אמוניה וניטריט מבנק הנתונים. והתאמה טובה עם תוצאות המדידה הכימית המובאות בטבלה 1.

ניתוח התוצאות מופיע בדוח שנה ב' וכן התוכניות לשנה ג' למחקר. התוצאות שנתקבלו ממי בריכות הדגים בשיטת ה-ATR לא היו מספקות שכן לא ניתן היה למדוד בהצלחה ריכוזים הנמוכים מ 1ppm ולכן היה נדרש שיכלול ושדרוג בשיטת המדידה כפי שמובא בדוח מסכם של שנה ב'. אנו מבקשים להדגיש כי עיבוד הנתונים שנעשה במהלך שנת המחקר השנייה וגם במהלך השנה השלישית נעשו בעזרת תוכנת עיבוד ספקטרלית OPUS אשר מבצעת חישובים והערכות סטטיסטיות לגבי מיקום של פסי בליעה ולגבי השוואה של פסי בליעה בין מספר דוגמאות שונות וחישובים סטטיסטיים לגבי התאמה ספקטרלית בפסי הבליעה כפי שמופיע במשימה 10 להלן.

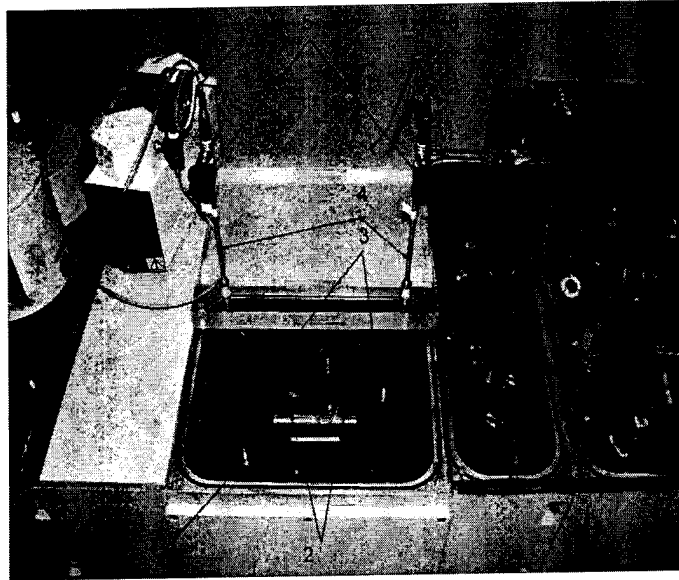
במהלך שנה ב' בוצעו המשימות הבאות:

6.	* מדידות ספקטרליות במים בתחום ה FIR לזיהוי רעלים וחומרים ביולוגיים באקווריום עם דגים
7.	** תכנון מערכת למדידות ספקטרליות בתחום ה MMW
8.	* ביצוע מדידות מסכמות באקווריומים עם דגים ומי בריכות דגים והערכת יעילות השיטה בתחום ה MMW
9.	תכנון מערכת מבוססת דיודת לייזר מתכווננת לגילוי וזיהוי פסי הבליעה האופייניים על סמך בנקי הנתונים שהוקמו במהלך המחקר הנוכחי
10.	הערכת ריכוזי המזהמים במים תוך שימוש בשיטות סטטיסטיות מתקדמות, בנק החותמות הנ"ל ומדידת פסי הבליעה של המזהמים במים

* המדידות הספקטרליות כללו את החומרים: אמוניה וניטריט בהתאם לפסי הבליעה אשר נמדדו בשנה א' למחקר. מי בריכות הדגים הובאו למעבדה והמדידות בוצעו עוד באותו יום.

** בשלב זה של המחקר ולאור התוצאות שנתקבלו במחקר שנה א' לא נמצאו פסי בליעה בתחום ה- MMW בשל SNR נמוך שהוזכר קודם ומגבלת הממדים של גביש ה-ATR שברשותנו.

על רקע התוצאות המובאות באיורים 4 ו-5 ולאור הצורך להגיע ליכולת זיהוי ריכוזים נמוכים במיוחד של אמוניה בסדר גודל של 1 PPM ופחות, פיתחנו שיטה ייחודית לזיהוי אמוניה מבוססת ספקטרוסקופיה של מכשיר ה-FTIR תוך ניצול התכונות הכימיות ופסי בליעה ייחודיים של אמוניה (כפי שמופיע בדוח שנה א'). לצורך המדידה התקנו בתוך תא המדידה של ה-FTIR תא גז מסוג TGS-3-BR2 כפי שניתן לראות באיור מס' 6 (מסומן בספרה 1). לתא יש שני חלונות (מס' 2 באיור מספר 6), שמהם יוצאים צינוריות פלסטיק גמישות (3) אל צינוריות אל-חלד (4) המצוידות בשסתומי ברז (5). היציאה בצינוריות מוליכה מצד אחד (8) אל בקבוק הניסוי. והיציאה השנייה (6) מוליכה אל משאבת ואקום (7). השיטה הייחודית מבוססת על אידי האמוניה מהמים כגז, ע"י יצירת ואקום. משאבת האקום יוצרת ואקום בתא הגז, בזמן שהברזים פתוחים, ובקבוק הניסוי סגור, לאחר שנוצר הלחץ הרצוי בתא הגז, סוגרים את הברז המוליך אל המשאבה ופותחים את הברז שמגיע מהבקבוק. בצורה זו אמוניה, שמשקלה המולקולרי נמוך מאויר נשאבת בואקום הנוצר מהר יותר בצינורית, וריכוזה בדגימה עולה. בצורה זו יש סבירות רבה לקבלת תוצאות כמותיות של ריכוזים נמוכים במיוחד.

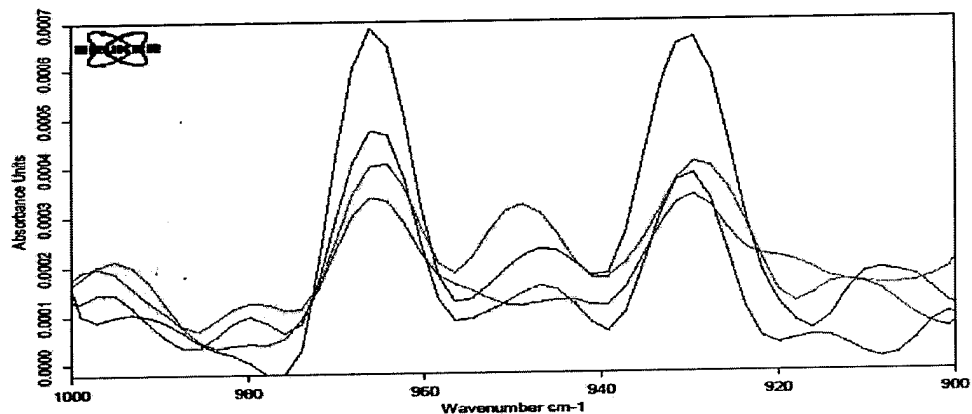


איור מס' 6: תיאור סכמתי של מערכת FTIR מדגם ISF 113v הכוללת תא גז.

לבדיקת המערכת השתמשנו בריכוזי אמוניה גבוהים ובמי בריכות דגים המכילים אמוניה. נבדקו ריכוזים של 2ppm, 5ppm, 10ppm, על פי בדיקה עם ערכת זיהוי אמוניה מבוססת צבע של חברת Merck. המטרה הייתה לזהות אמוניה בקווי הבליעה המוכרים בספרות ולשלול הפרעות שונות של גורמים נוספים במים, כמו כן לבדוק האם הריכוז של האמוניה בדגימה מושפע מהשיטה שפיתחנו. הבדיקה נעשתה בספקטרום MIR, במספרי גל 400-4000cm⁻¹.

תוצאות

באיור מס' 7 ניתן לראות את התוצאות שנתקבלו בשני פסי בליעה שונים של האמוניה במספרי גל 966cm⁻¹,¹ בהתאמה מלאה לספרות. עוד ניתן לראות באיור מס' 7, כי ישנה התאמה מסוימת בין רמת הספיגה לבין הריכוז הנמדד. ערכי האמוניה שנבדקו כאן גבוהים ביותר אך בבדיקת מי בריכות הדגים ניתן לזהות בבירור את האמוניה בריכוזים נמוכים, הקריאה הטובה ביותר שמראה פוטנציאל זיהוי מרבי היא הקריאה במספר גל 966cm⁻¹.



איור 7: בדיקת אמוניה בתחום מספרי גל 900-1000: שחור- אמוניה בריכוז של 128ppm, כחול- 10ppm, ורוד- 5ppm, אדום- 2.5ppm.

דיון ומסקנות

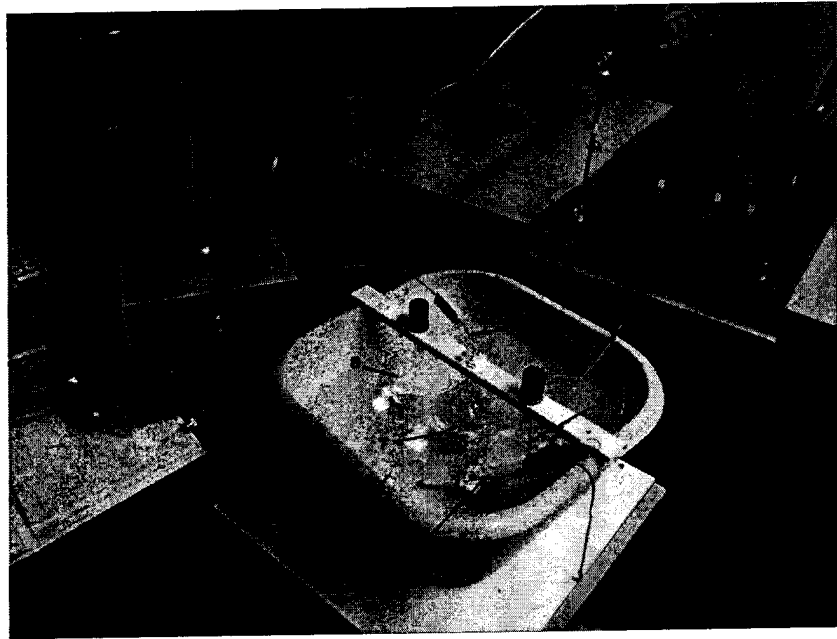
המטרה שהוגדרה לניסוי הייתה לבדוק האם השיטה שפותחה על ידינו, אכן מסוגלת לזהות אמוניה בריכוזים נמוכים יותר שכן האמוניה רעילה לדגים בריכוזים נמוכים. בתוצאות שהתקבלו ניתן לראות בבירור כי רעשי הרקע הסביבתי פחתו בצורה משמעותית. השיאים בגרף, על אף שהם מפוזרים יותר, כצפוי, בולטים בצורה כזו שמאפשרת זיהוי בטוח יותר של אמוניה. בניסוי זה ניתן כבר לזהות די בקלות ריכוזים נמוכים מאוד של אמוניה, והיות ולא נבדק סף זיהוי תחתון, קיימת בניסוי זה הבטחה ברורה לכך שהשיטה המוצעת על ידינו יכולה לזהות אמוניה ברמות הנמוכות יותר מאלה הממיתות דגים. הזיהוי הטוב ביותר, בניגוד לשיטה הקודמת, נצפה באזור 966cm^{-1} , וגם תופעה זו הגיונית, היות ולא נעשה שימוש בשבירת האור ע"י יהלום, ניתן לראות כי גם הקריאה במספר גל 931cm^{-1} , היא טובה, אך הניתוח הסטטיסטי של תוכנת OPUS המשמשת כמערכת ההפעלה של ה-FTIR, מראה כי סף הזיהוי נמוך יותר.

ניסוי השיטה עם שינויי טמפרטורה

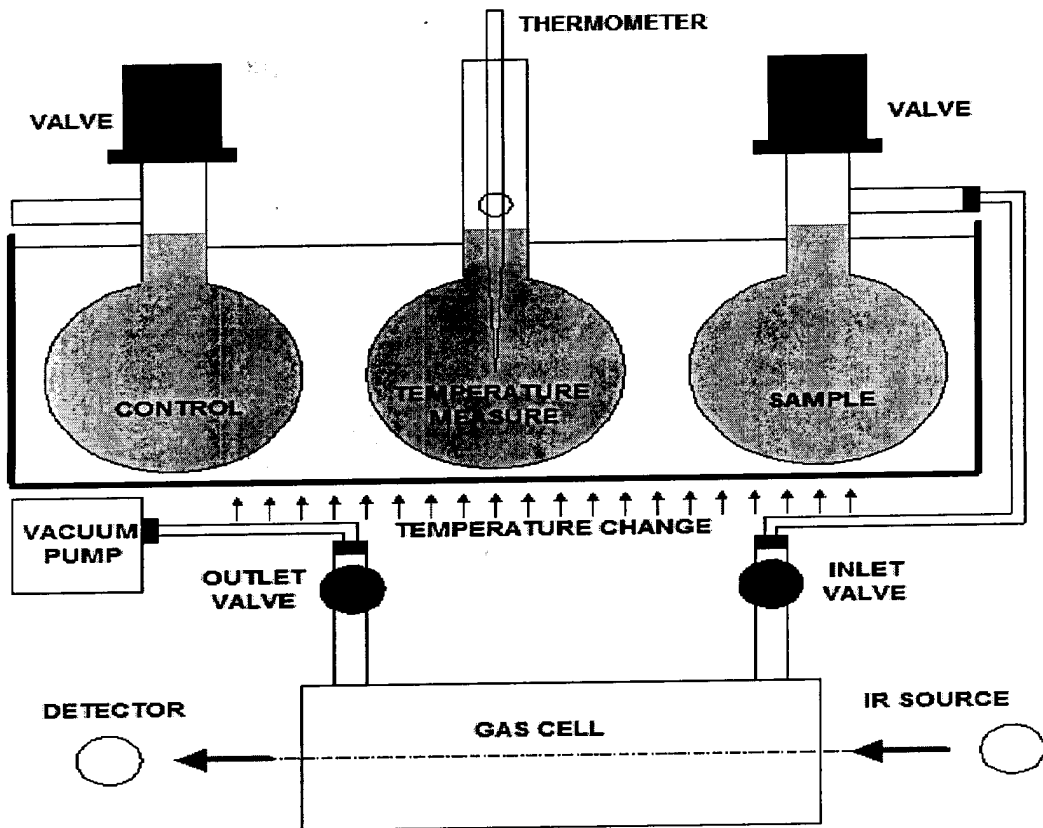
טמפרטורת המים בבריכות הדגים משתנה בהתאם לעונות השנה ועל כן חשוב היה לבדוק את יכולת הזיהוי של האמוניה כתלות בטמפרטורה.

מטרת הניסוי הייתה על כן: לבחון את יכולת זיהוי האמוניה הבלתי מיוננת ע"י הספקטרומטר, בתנאים של טמפרטורה משתנה, היות ובריכות הדגים חשופות לסביבה ומושפעות ממנה, ומכאן כי טמפרטורת המים נעה בין 7-10 מעלות צלזיוס בחורף עד כדי 30-33 מעלות צלזיוס בקיץ. ההנחה העומדת בבסיס ניסוי זה היא כי יקשה עלינו לזהות אמוניה בלתי מיוננת בטמפרטורה נמוכה יותר, כיוון שהאידיוי שלה יהיה נמוך יותר. ע"פ המשוואה $PV=nRT$, (P =לחץ, V =נפח, n =מספר מולקולות, R =קבוע הגז, T =טמפרטורה), ניתן להבין כי כאשר n, R, V , קבועים, ירידה בטמפרטורה תגרום לירידה בלחץ, ופחות אמוניה בלתי מיוננת תשתחרר מהמים אל מערכת הניסוי. כדי לבחון נושא זה הרכבנו מערכת ניסוי סגורה, כפי שניתן לראות באיור מספר 8 ואיור מס' 9. בניסוי נעשה שימוש בבקבוקים מסוג SYN-490250 של סיגמה-אולדריץ', העמידים לעבודות בווקום, ומכילים פתח מילוי בעל אטם, וברז שחרור עם וסת ברז.

כדי למנוע תנודתיות של גורמים ביוטיים ברמות האמוניה הבלתי מיוננת במים במהלך הניסוי, הכנו תמיסה של מים מזוקקים (DiH_2O) עם 5ppm אמוניה (TAN). התמיסה הוכנה במקום הניסוי והוכנסה מיד לתוך שני בקבוקים שנאטמו מיד לאחר המילוי. בקבוק נוסף מולא לצרכי מעקב אחר טמפרטורה. אחד הבקבוקים עם תמיסת האמוניה חובר למערכת ה-FTIR ע"י צינור פלסטיק ואילו השני נשאר אטום עד לסוף הניסוי, ושימש ביקורת לכך שאין איבוד של אמוניה לסביבה בזמן הניסוי. הבקבוקים הוכנסו לתוך אמבט מים שקוררו באמצעות קרח ל- 4°C . מדידות בוצעו לבדיקת המכשיר בטמפרטורה זו, לפני פתיחת הברז. במהלך הניסוי נבדקה התמיסה כל 5°C בטווח שבין $5-35^\circ\text{C}$, כאשר חימום המים נעשה ע"י הוספה הדרגתית של מים חמים לתוך. לכל בדיקה נערכו 7 חזרות. בתום הניסוי נבדקה התמיסה שבבקבוק הביקורת, ונבדקו pH ואמוניה בעזרת ערכה מבוססת צבע של חברת Merck. התוצאות נותחו למספר גל 966cm^{-1} בעזרת תוכנת OPUS שמותאמת לספקטרומטר של Bruker.



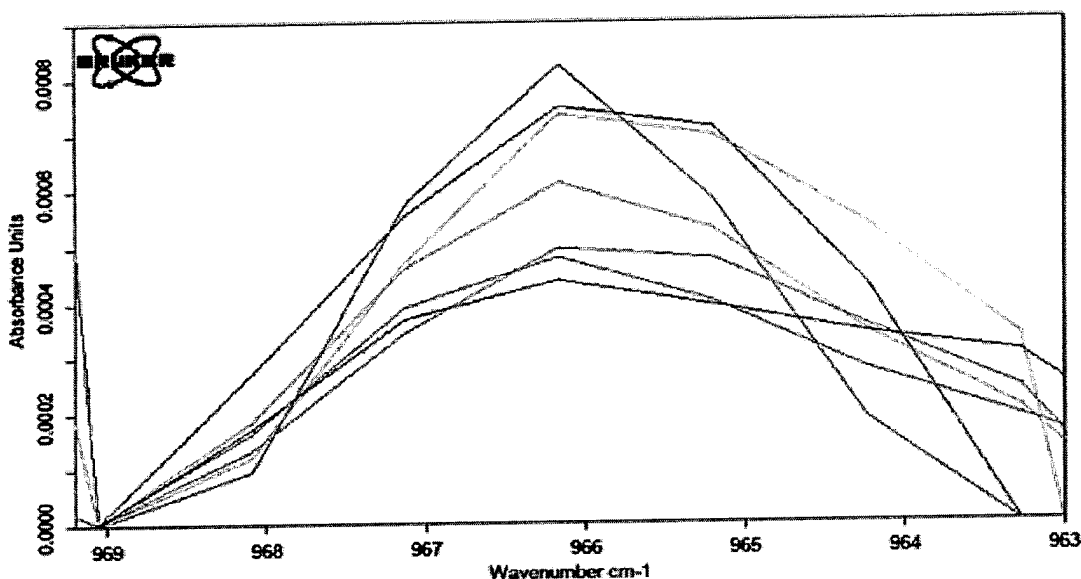
איור 8: מערכת הניסוי לבדיקת השפעות טמפרטורה. 1- בקבוק הניסוי. 2- צינורית הפלסטיק המוליכה אל תא הגז. 3- תא הגז. 4- ספקטרומטר FTIR. 5- מד טמפרטורה. 6 מדיד הטמפרטורה בתוך בקבוק המעקב. 7 בקבוק המעקב לבדיקת הטמפרטורה בתוך הבקבוקים. 8- בקבוק הביקורת. 9- אמבט. 10- המים בתוך של הבקבוקים. 11- מד טמפרטורה למעקב אחרי טמפרטורת התווך.



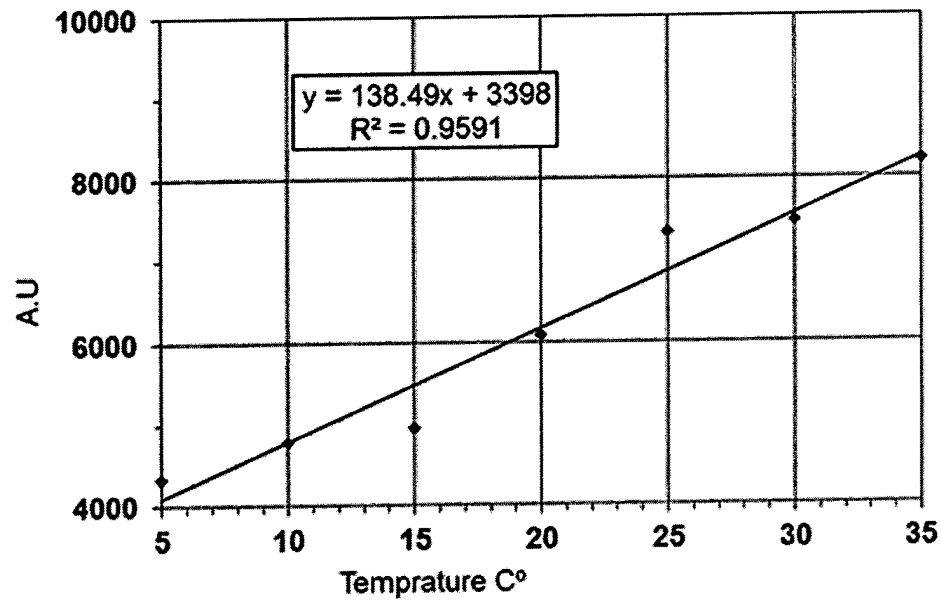
איור 9: סכמת הניסוי לבדיקת השפעת טמפרטורה על תוצאות הבליעה.

תוצאות

ערך ה-pH שנמדד בסוף הניסוי היה 9.8, מכאן כי כמחצית מהאמוניה צפויה להיות בלתי מיוננת. בבחינת תוצאות הניסוי ניתן לראות כי ישנו שיא באזור מס' 966cm^{-1} כמצופה. ככל שהטמפרטורה גבוהה יותר כך גם יחידות הספיגה (AU) ברורות יותר. ההסבר לכך הוא שכלל שהטמפרטורה גבוהה יותר, כמות גדולה יותר של אמוניה בלתי מיוננת משתחררת מהמים, כיוון שיכולת הרוויה של אמוניה יורדת עם העלייה בטמפרטורה. התוצאות מראות כי גם בטמפרטורה נמוכה עדיין ניתן לזהות ריכוזים נמוכים של אמוניה. התוצאות גם מראות כי קיים קשר קווי ישיר בין יחידות הספיגה לבין הטמפרטורה שבה נבדקה התמיסה (איור מס' 10), מכאן כי ניתן לחזות את כמות האמוניה הבלתי מיוננת המשוחררת מהתמיסה אל תא הגז, בקורלציה לטמפרטורה הנבדקת. תוצאה זו מאששת את ההנחה הבסיסית של הניסוי כי שינויי טמפרטורה אינם אמורים להשפיע על זיהוי האמוניה הבלתי מיוננת במים, ועל יכולת הכימות שלה. בניגוד לערכות הצבע שתלויות בטמפרטורה ליצירת התגובה הנדרשת לזיהוי, הספקטרום אמנם מזהה בקלות רבה יותר, כמעט פי 2 יחידות ספיגה, בטמפרטורות גבוהות יותר, אך יכול גם לזהות אמוניה בלתי מיוננת בטמפרטורות נמוכות. תוצאות אלו מתאימות לכך שבטמפרטורה גבוהה יש כמעט פי 2 יותר אמוניה בלתי מיוננת כחלק יחסי מהאמוניה מאשר בטמפרטורה נמוכה. קירוב לינארי של התוצאות הנ"ל כתלות בטמפרטורה ניתן לראות באיור מס' 11.



איור 10 : תוצאות ניסוי השפעות טמפרטורה. כחול- 5°C . אדום- 10°C . סגול- 15°C . ירוק- 20°C . תכלת- 25°C .
חום- 30°C . ירוק כהה- 35°C .

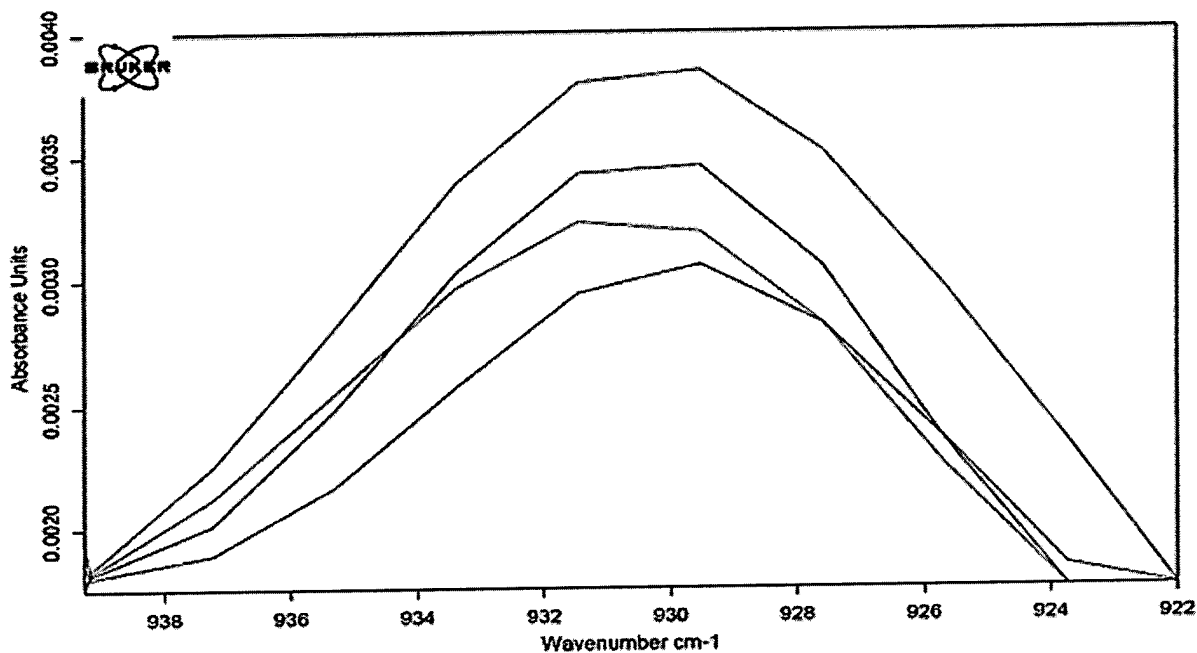


איור 11: קירוב לינארי של השתנות ריכוז האמוניה כתלות בטמפרטורת המים כולל הקירוב הלינארי.

דיון ומסקנות

במערכת הניסויים בחנו את השפעות הטמפרטורה על שיטת מיצוי האמוניה ע"י ואקום, מן המים. ההנחה שלנו הייתה כי ככל שהטמפרטורה גבוהה יותר, כך יורדת המסיסות של האמוניה במים, ויעלה ריכוזה בגז הנשאב אל הספקטרומטר. המטרה שלנו הייתה לבחון את קצב השחרור בהנחה שניתן לתאר את קצב השחרור בעקומה לינארית שתאפשר, בהתבסס על שינוי הטמפרטורה קבלת נתוני הריכוז המשתנים במים. המסקנה מן הניסוי היא כי אכן קיים קשר לינארי מובהק בין הטמפרטורה ליחידות הקליטה של האמוניה בספקטרומטר, כפי שבא לידי ביטוי באיור מס' 11. חשוב לציין כי הניסוי בחן את טווח הטמפרטורה הרלוונטי לבריכות הדגים, ייתכן כי בטמפרטורות נמוכות יותר התוצאות יהיו שונות כיוון שמתחת ל-0°C, המים יקפאו והאמוניה תישאר במצב גזי. על פי תוצאות ניסוי זה אין ספק כי הקריאה של אמוניה בטמפרטורות גבוהות קלה יותר (כמעט פי 2 יחידות קליטה), מאשר בטמפרטורות נמוכות, אך עדיין ניתן לזהות אמוניה בטמפרטורות נמוכות (ראה איור מספר 11).

לאחרונה שיפרנו עוד את מערך המדידה תוך שימוש בתא גז בעל דרך אופטית ארוכה יותר. התוצאות במערך המשופר מופיעות באיור מספר 12.



C:\Program Files\OPUS\DATA\17_05_10 Ammonia\0.5ppm\0	0.5ppm Av. of 3	vac rest 4 Globar GeKBr V3 DTGS KBr HPF7 L PF3 Ga	10/05/2017
C:\Program Files\OPUS\DATA\17_05_10 Ammonia\1ppm\0	1ppm Av. of 3	vac rest 4 Globar GeKBr V3 DTGS KBr HPF7 L PF3 Ga	10/05/2017
C:\Program Files\OPUS\DATA\17_05_10 Ammonia\2ppm\0	2ppm Av. of 3	vac rest 4 Globar GeKBr V3 DTGS KBr HPF7 L PF3 Ga	10/05/2017
C:\Program Files\OPUS\DATA\17_05_10 Ammonia\3ppm\0	3ppm Av. of 3	vac rest 4 Globar GeKBr V3 DTGS KBr HPF7 L PF3 Ga	10/05/2017

איור 12. 931cm^{-1} around ammonia spectra: Blue line - 0.5ppm, red - 1ppm, brown - 2ppm, green - 3ppm

התוצאות שבאיור מס' 12 מדברות בעד עצמן ומוכיחות את יעילות ואמינות השיטה. ניתן לראות כי באזור פס הבליעה מתקבל אות נקי מרעשי רקע אשר היו חלק בלתי נפרד מתוצאות מדידות הספקטרום במהלך שנת המחקר השנייה. בנוסף נדגיש כי נמדדו רמות ריכוז אמוניה הנמוכות מ- 1PPM.

לשיטה אשר פותחה במהלך המחקר ושופרה בשנת המחקר השלישית ישנם היתרונות הבאים:

- 1) מדידה ישירה של אמוניה על פי פס בליעה ייחודי של אמוניה שאיננו מופרע ע"י הבליעות רבות של מים ומרכיבים אחרים בתוכם אשר קיימות בכל ספקטרום המדידה. לפיכך יכולנו למדוד נוכחות אמוניה במי בריכות דגים ללא צורך בסינון המים. בכל ניסוי נבדקה קודם כמות האמוניה באמצעות ערכות המקובלות כיום על מנת לבחון התאמה בין השיטות ונמצאה התאמה טובה.
- 2) מאחר ומוודים ישירות את האמוניה (NH_3) שהינה רעילה ביותר לדגים, ומדידה זו של האמוניה איננה תלויה ב pH ועל כן אין כל צורך לבצע חישובים ותיקונים לערך המתקבל כפי שנעשה כיום בערכות מדידה אחרות. באם עושים שימוש בערכות בהן משתמשים כיום ואשר מבוססות על מדידת יון האמון NH_4^+ הנמצא בשיווי משקל עם האמוניה חשוב לבדוק את ערכי ה pH שכן בתנאי pH בסיסיים שיווי המשקל נוטה לכיוון האמוניה הרעילה ומסוכנת יותר לדגים.
- 3) נבדקה גם השפעת הטמפרטורה של המים בעת הבדיקה שכן הטמפרטורה יכולה להשפיע על קצב המעבר של האמוניה מן המים לתא המדידה ואכן נמצא שהטמפרטורה משפיעה על כמות האמוניה המגיע לתא המדידה וההשפעה הינה ביחס ישר כך שניתן לבצע תיקון אוטומטי לקריאה.
- 4) המדידה יכולה להתבצע בעומקים שונים ובזמן אמיתי

5) המדידה איננה דורשת מעורבות של חומרים כימיים ואיננה דורשת מעבדה (ראה נספח א').

6) ניתן בעזרתה למדוד גם ריכוזים נמוכים של 0.1 ppm אמוניה ובכך יעילה למדידה בברכות הדגים שכן האמוניה רעילה ביותר לדגים גם בריכוזים נמוכים אלה.

7) המכשיר הסופי יכול להיות קומפקטי, נייד וזול יחסית (ראה נספח א').

מפאת קוצר מקום לא פורטו כל הניסויים שבוצעו במהלך המחקר. פרוט מדוקדק של כלל העבודה המחקרית נמצא בעבודת המוסמך של הסטודנט אהרון גרינברג אשר היה שותף לביצוע חלק לא מבוטל מהעבודה הניסויית.

במהלך שנת המחקר השלישית נעשתה הערכה לגבי תכנון ובניה של מכשיר נייד וקומפקטי אשר יוכל לשמש לניטור אמוניה רציף במי בריכות הדגים. המכשיר שפותח מתבסס על רכיבים אשר ניתנים להשגה באופן מסחרי כולל עלויות. יצירת הוואקום יכולה להיעשות באמצעות משאבה פשוטה המצויה במכשיר ביתי למדידת לחץ דם שעלותה נמוכה מאוד. משאבה כזו הודגמה בהצלחה רבה במעבדת המחקר. יצור באופן המוני של מכשיר המדידה שפותח יוזיל את מחירו באופן שיהיה תחרותי לערכות הקיימות. חשוב להדגיש שלאחר העלות הראשונית של רכישת המכשיר אין צורך ברכישת חומרים נוספים לתפעולו. זאת בניגוד לערכות הקיימות הדורשות רכישה חוזרת של חומרים כימיים לצורך המדידות. בנוסף המכשירים הקיימים דורשים תחזוקה שוטפת בעוד שהמכשיר המוצע איננו נדרש לכך. קיימת התעניינות רבה במכשיר ויש סיכוי טוב שניתן יהיה לעשות בו שימוש בשטחי הבריכות לטובת ענף גידול הדגים על פי הכוונה המקורית של מחקר זה.

בנספח א' ניתן למצוא את הדוח בעניין פרוט מרכיבי המכשיר לניטור אמוניה בבריכות דגים ועלויות רכישת המרכיבים.

ביבליוגרפיה

גרינברג, א. (2016) פיתוח ובדיקת היתכנות של שימוש בשיטות ספקטרוטריות לזיהוי וניטור בזמן אמת של אמוניה בלתי מיוננת במערכות לגידול דגים. עבודת תואר מוסמך (M.Sc.) בפקולטה למדעי החיים של אוניברסיטת בר-אילן, רמת גן.

1. Griffiths P. R., De Haseth J. A., (2007). Fourier transform infrared spectrometry. John Wiley & Sons. 171:1-18.
2. Li-Chan E., Chalmers J., Griffiths P., (2011). Applications of vibrational spectroscopy in Food Science. John Wiley & Sons.
3. OPUS http://shaker.umh.es/investigacion/OPUS_script/OPUS_5_BasePackage.pdf

מקורות נוספים עליהם התבססנו במהלך המחקר

4. Avnimelech Y., Diab S., Kochva M., Mokady S., (1992). Control and utilization of inorganic nitrogen in intensive fish culture ponds. Aquaculture and fisheries management. 23: 421-430.
5. Bernath P.F., (2005). Spectra of atoms and molecules. Second edition. Oxford university. 116-307.

6. Beveridge M.C.M., Little D.C., (2002). The history of aquaculture in traditional societies. Ecological aquaculture. Edited by Costa-Pierce B.A. Blackwell, Oxford. 3-27.
7. Bhatnagar A., Devi P., (2013). Water quality guidelines for management of pond fish culture. International journal of environmental science. 3:1980-2009.
8. Bower C.A., Bidwell J.P., (1978). Ionization of Ammonia in Seawater: Effects of Temperature, pH, and Salinity. Journal of fisheries research board of Canada. 35: 1012-1016.
9. Briand D., Manzardo O., de Rooij N.F., Hildenbrand J., Wollenstein, J. (2007). Gas detection using a micromachined FTIR spectrometer. Sensors, IEEE, 1364-1367.
10. Caglan A., Benli K., Koksak G., Ozkul A., (2008). Sub lethal ammonia exposure of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) effect on gill, liver and kidney histology. Chemosphere.72: 1355-1358.
11. Dufour E., (2009). Principles of infrared spectroscopy. Infrared spectroscopy for food quality analysis and control. Edited by Da-Wen S. 1-27.
12. Durborow R.M., Crosby D.M., Brunson M.W., (1997). Ammonia in fishponds. Southern regional aquaculture center. Publication # 463.
13. El Shebly A.A., God H.A.M., (2011). Effect of chronic ammonia exposure on growth performance, serum growth hormone (GH) levels and gills histology of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Journal of microbiology and biotechnology research. 4: 183-197.
14. Emerson K., Russo R. C., Lund R. E., Thurston R. V., (1975). Aqueous ammonia equilibrium calculations: effect of pH and temperature. Journal of the Fisheries Board of Canada. 32: 2379-2383.
15. Hanssen L.M., Zhu C., (2002). Wavenumber Standards for Mid-infrared Spectrometry. Handbook of Vibrational Spectroscopy. Wiley Online Library.
16. Hargreaves J.A., Tucker C.S., (2004). Managing ammonia in fishponds. Southern regional aquaculture center. Publication # 4603.
17. Harris D.B., Shores R.C., Jones L.G., (2001). Ammonia emissions factors from swine finishing operations. 10th Annual international emission inventory conference.
18. Iqbal F., Qureshi I.Z., Ali M., (2005). Histopathological Changes in the Liver of a Farmed Cyprinid Fish, *Cyprinus carpio*, Following Exposure to Nitrate. Pakistan Journal of zoology. 37: 297-300.
19. Lewis Jr. W.M., Morris D.P., (1986). Toxicity of Nitrite to fish: a review. American fisheries society. 115: 183-195.
20. Marley L., Signolle J.P., Amiel C., Travert J., (2001). Discrimination, classification, identification of microorganisms using FTIR spectroscopy and chemometrics. Vibrational spectroscopy. 26(2): 151-159.
21. Merino G., Barange M., Blanchard J.L., Harle J., Holmes R., Allen I., Jennings S., (2012). Can marine fisheries and aquaculture meet fish demand from a growing human population in a changing climate?. Global Environmental Change. 22(4): 795-806.

22. Ni J.Q., Heber A.J., (2001). Sampling and Measurement of Ammonia Concentration at Animal Facilities – A Review. ASAE Annual International Meeting.
- 23.
24. Ottinger M., Clauss K., Kueznar C., (2016). Aquaculture: Relevance, distribution, impacts and spatial assessments- A review. *Ocean and Coastal Management*. 119: 244-266.
25. Palmer C.A., Loewen E.G., (2005). *Diffraction grating handbook*. Springfield, Ohio, USA: Newport Corporation. 14-17.
26. Rotshild D., Azoulay Y., Ochana M., Shulzinger A., Abramovich A., (2015). Real time detection and recognition of micro-poisons in aqueous solutions and atmosphere using perfect absorber metamaterial in millimeter wavelength regime. In *Microwaves. COMCAS, 2015 IEEE International Conference*. 1-4.
27. Rotshild D., (2016). Real time detection and recognition of micro-poisons in aqueous solutions using advanced spectral methods. M.Sc. thesis in Engineering, Ariel University.
28. Schmitt J., Flemming H.C., (1998). FTIR- spectroscopy in microbial and material analysis. *International biodeterioration & biodegradation*. 41: 1-11.
29. Shulzinger A., Abramovich A., Farber E., (2009). Attenuated Total Reflectance (ATR)-FTIR spectral measurements in MIR and FIR (THz) range. *Comcas 2009 conference*. 1-3.
30. Socrates G., (2004). *Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies: Tables and Charts*. third edition. Wiley-Blackwell.
31. Timmer B., Olthuis W., Van Den Berg A., (2005). Ammonia sensors and their applications—a review. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 107: 666-677.
32. Zhou L., Boyd C.E., (2016). Comparison of Nessler, phenate, salicylate and ion selective electrode procedures for determination of total ammonia nitrogen in aquaculture. *Aquaculture*. 450: 187-193.

נספח א'

Preliminary design of prototype for real time monitoring of Ammonia and Oxygen levels in fishponds and its cost evaluation

1. Prototype description

In our recent research, we have developed a new method for real-time monitoring of ammonia (NH_3) levels in fishponds. The new method is based on evaporation of the pond's water and measuring the IR spectral signature of the evaporation in a sealed cell. Ammonia has a well-known absorption line at 966 cm^{-1} and we were able to measure Ammonia levels in the order of 1PPM and below as can be seen in Fig. 1.

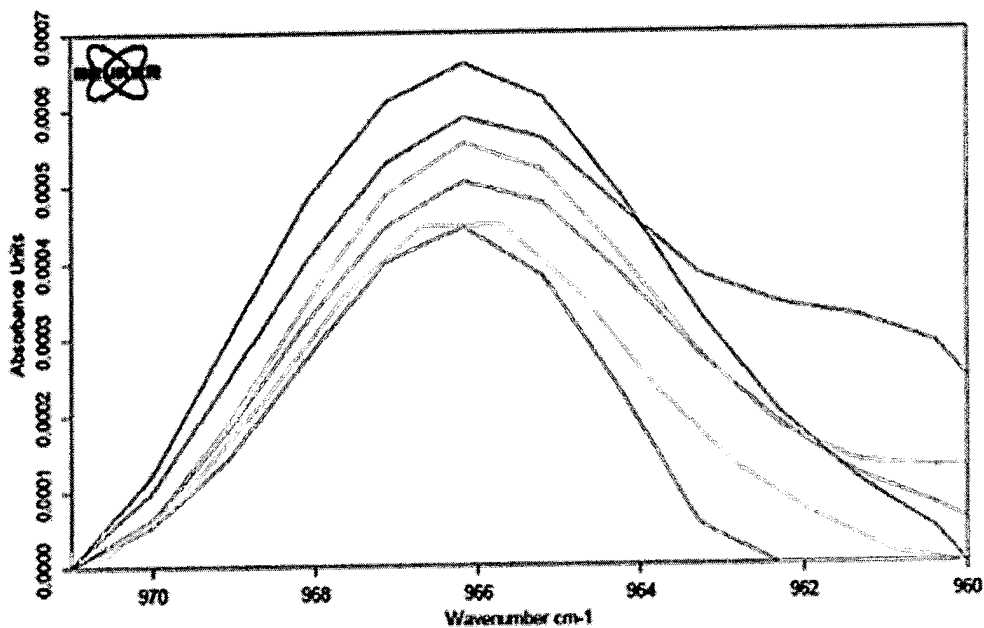


Figure 4: Spectra at the 966 cm^{-1} : light blue line - 0ppm of NH_3 ; blue - 0.2ppm; red - 0.4ppm; pink - 0.8ppm; light green - 1.6ppm; black - 4ppm (note that $966 \text{ cm}^{-1} = 10.352 \mu\text{m}$).

In order to realize compact mobile and inexpensive instrument we propose the following block diagram given in Fig. 2.

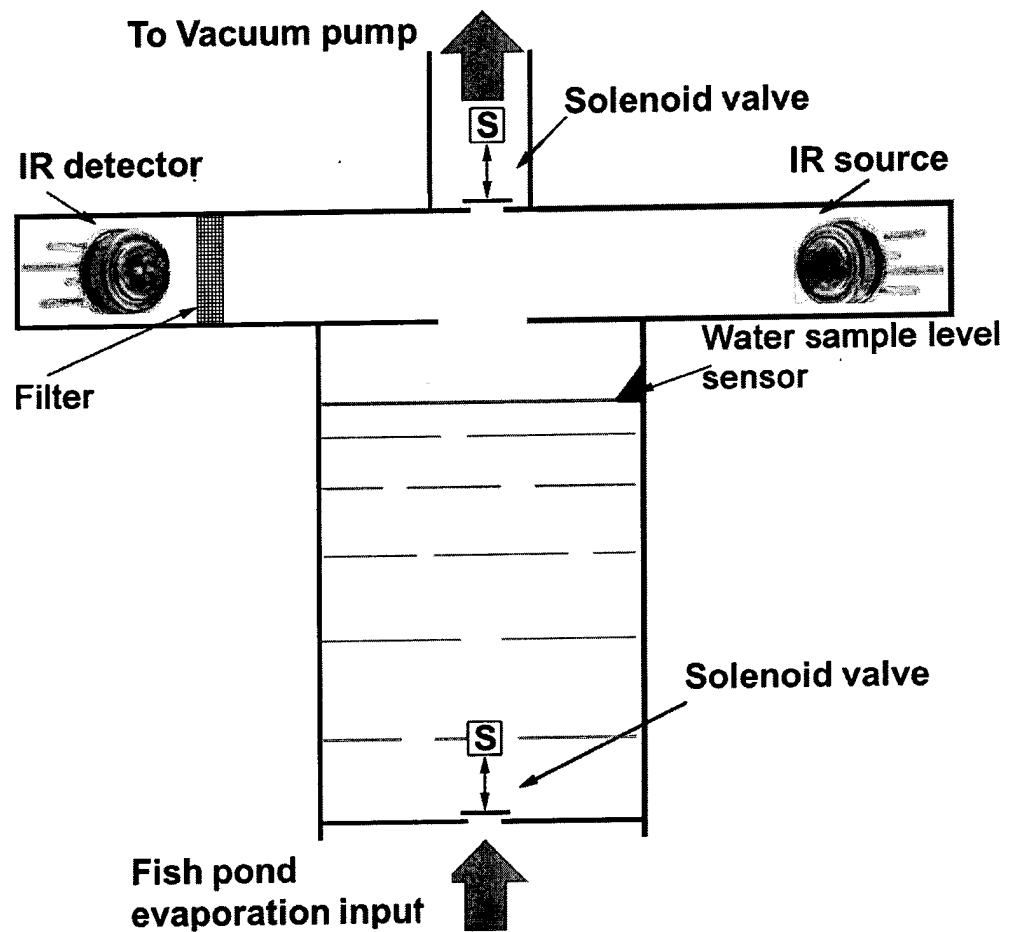


Figure 2: Block diagram of the real time Ammonia level monitoring in fish ponds

The prototype is composed of the following components IR source, 10 μ m filter and IR detector. The components are installed inside a sealed measurement cell which connects to a vacuum pump and to fish pond water evaporation input. The operation of the prototype is controlled by computer software. The measurement cycle of the prototype starts with sealing the vacuum measurement cell (Fish pond evaporation is closed), when vacuum is sufficient, a reference measurement of the IR radiation intensity is carried out by the IR detector. At this point the vacuum valve is closed and the fish pond evaporation valve is opened and IR signal measurement of the evaporation is carried out and compared to the reference signal yielding the Ammonia level in the evaporation. By using calibration tables of the IR detector, the Ammonia level in fish pond water can be determined accurately.

2. Prototype components

In order to carry out the spectral measurements around 966 cm^{-1} ($10.352\mu\text{m}$) as was indicated in our research (see Fig. 1), an IR source such as IRE-12 or Lamp Bulb, QTH, 50W of sciencetech® company can be used. An IR detector (of Melexis® Company) is required to measure the IR radiation intensity inside the sealed measurements cell. IR filters are required as well to filter out unnecessary wavelengths.

IR source (two options)

1. (IRE-12) Coiled Filament Infrared Emitter (1 μm - 30 μm), 8W IR

Source (cost \$260)

The IRE-12 is a coil filament based IR source with emissivity of approximately 0.8 (see Fig. 3). It emits in the IR spectral region of $1\mu\text{m}$ to approximately $30\mu\text{m}$. The model IRE-12 operates at 800°C @ 8 watts. However the emitter can be over powered to a higher temperature with a decrease in service life. It is appropriate for use in lab or field instrumentation due to its long life and stable properties. Please note this is only an IR emitter component and does not include a reflector or housing enclosure.

The radiating element is a coil of resistance wire which has a high emissivity in the infrared spectral region. The coil is supported on a grooved cylindrical substrate of alumina, resulting in the windings being electrically insulated from each other. This contributes to a more uniform radiating source. Two reflectors are available. One is a parabolic reflector and the other is an elliptical reflector. We can provide collimating optics using an AR coated ZnSe lens, a sapphire lens or an aluminum parabolic reflector. The IR emitter is not packaged in a housing with the reflector. It only comes in component form and the user needs to package it into a housing and provide electrical connection to the power supply. Should the constant voltage power supply or battery power supply be purchased, the socket harness for the IR emitter as well as corresponding cables are included. Nominal operating voltage: 6V at 1.8 amps.

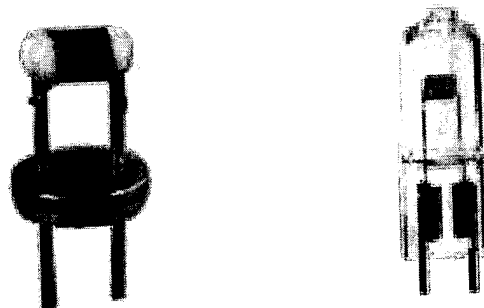


Figure 3: IRE-12 is a coil filament based IR source (right) and Lamp Bulb, QTH, 50W (left)

2. A 50W Quartz, Tungsten, Halogen bulb for Sciencetech's QTH housings (cost \$40)

A 50W Quartz, Tungsten, Halogen bulb for Sciencetech's QTH housings (See Fig. 3). Using this kind of lamp requires additional IR filter to cut out the Visual light in the case of our system.

IR detector

- **Infrared Thermometer - MLX90614 (cost \$20)**

Melexis'® MLX90614ESF-BAA is an infrared thermometer designed for non-contact temperature sensing. An internal 17-bit ADC and a powerful DSP contribute to the MLX90614's high accuracy and resolution. It has a huge number of applications including body temperature measurement and movement detection. The MLX90614 provides two methods of output: PWM and SMBus (i.e. TWI, I2C). The 10-bit PWM output provides a resolution of 0.14°C, while the TWI interface has a resolution of 0.02°C. The MLX90614 is factory calibrated in wide temperature ranges: -40 to 85°C for the ambient temperature and -70 to 382.2°C for the object temperature. The measured value is the average temperature of all objects in the Field Of View of the sensor. The MLX90614 offers a standard accuracy of 0.5°C around room temperatures. This device comes in an industry standard TO-39 package. Fig. 4 shows the IR detector.



Figure 4: Infrared Thermometer - MLX90614

IR Filter

- **THz Bandpass Filters: 10 μm - 590 μm Center Wavelength (\$700)**

Thorlabs'® Far-Infrared and Terahertz Bandpass Filters provide high-spectral-resolution filtering with center wavelengths (CWLs) from 10 to 590 μm (30.0 THz to 510 GHz). With more than 70% transmission at the CWL, these filters are fabricated from gold-mesh frequency-selective surfaces designed to reject out-of-band radiation primarily by reflection and destructive interference. Fig. 5 shows this filter and its transmission function.

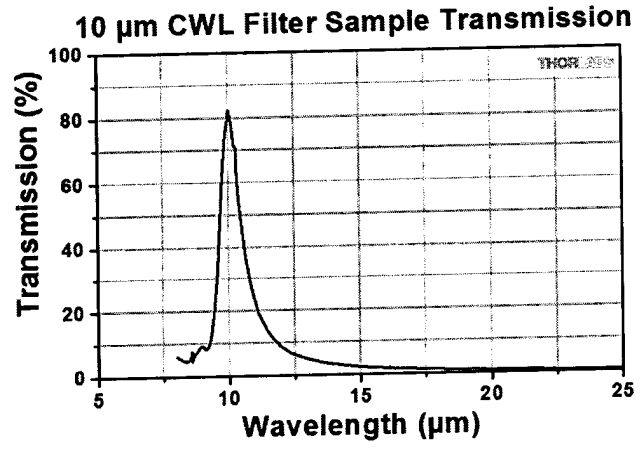
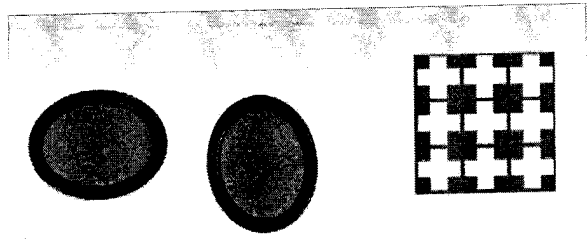


Figure 5: FB19M10 10 μm (30.0 THz) BPF photo (top) and transmission function (bottom)