

T.C.
RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PİGMENT ANALİZİNDE KROMATOĞRAFİK AYIRMA
PARAMETRELERİ

OSMAN AKYÜZ

TEZ DANIŞMANI
DOÇ. DR. ERTUĞRUL AĞIRBAŞ
TEZ JÜRİLERİ
PROF. DR. ALİ MUZAFFER FEYZİOĞLU
DOÇ. DR. RAHŞAN EVREN MAZLUM

YÜKSEK LİSANS TEZİ
SU ÜRÜNLERİ ANABİLİM DALI

RİZE-2019

Her Hakkı Saklıdır

T.C.
RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PİGMENT ANALİZİNDE KROMATOĞRAFİK AYIRMA PARAMETRELERİ

Doç. Dr. Ertuğrul AĞIRBAŞ danışmanlığında Osman AKYÜZ tarafından hazırlanan bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulu kararıyla oluşturulan jüri tarafından 06/08/2019 tarihinde Su Ürünleri Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS** tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Unvanı Adı Soyadı

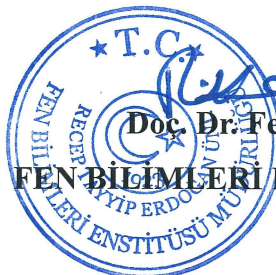
İmzası

Başkan : Prof. Dr. Ali Muzaffer FEYZİOĞLU

Üye : Doç. Dr. Ertuğrul AĞIRBAŞ

Üye : Doç. Dr. Rahşan Evren MAZLUM

(Handwritten signatures of the jury members)



(Handwritten signature of Ferhat Kalaycı)
Doç. Dr. Ferhat KALAYCI
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

ÖNSÖZ

“Pigment Analizinde Kromatografik Ayırma Parametreleri” isimli bu çalışma, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Su Ürünleri Anabilim Dalı’nda “Yüksek Lisans Tezi” olarak hazırlanmıştır. Bu tezin yürütülmesindeki desteğinden dolayı Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu’na (TÜBİTAK) teşekkürü bir borç bilirim.

Bu çalışmayı yapma olanağı sağlayan, yüksek lisans öğrenimim boyunca, tez aşamasının her anında önerileri ve paylaşımlarıyla yardımını ve desteğini esirgemeyen çok değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Ertuğrul AĞIRBAŞ’a teşekkürlerimi borç bilirim. Sonuçların yorumlanması aşamasında yardımlarını esirgemeyen Emine Akyüz Turumtay’a teşekkür ederim. Projenin başarıyla yürütülmesi için kurumsal desteğini esirgemeyen Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi ve Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Su Ürünleri Merkez Araştırma Enstitüsü yönetimlerine teşekkür ederim. Deniz çalışmaları esnasında yardımlarından dolayı “R/V SÜRAT ARAŞTIRMA I” ve “R/V KARADENİZ ARAŞTIRMA” gemilerinin kaptan ve gemi adamlarına teşekkür ederim.

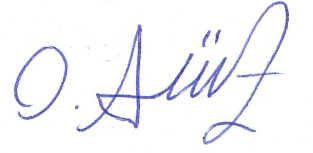
Hayatımın her aşamasında, eğitimim sırasında ne zaman ihtiyaç duysam yanımda olan, maddi ve manevi desteklerinin esirgemeyen canım ailem; eşim Pınar AKYÜZ, çocuklarım Ömer Mert ve Ali Efe’ye ve annem Fatma AKYÜZ, tüm kalbimle teşekkür ederim.

Hazırlanan bu Yüksek lisans tezi TÜBİTAK tarafından 113Y189 nolu proje ile desteklenmiştir.

Osman AKYÜZ

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Tarafımdan hazırlanan “Pigment Analizinde Kromatografik Ayırma Parametreleri” başlıklı bu tezin, Yükseköğretim Kurulu Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesindeki hususlara uygun olarak hazırladığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal işlemi kabul ettiğimi beyan ederim. 06/08/2019



Osman AKYÜZ

Uyarı: Bu tezde kullanılan özgün ve/veya başka kaynaklardan sunulan içeriğin kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

PİGMENT ANALİZİNDE KROMATOĞRAFİK AYIRMA PARAMETRELERİ

Osman AKYÜZ

**Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Su Ürünleri Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi
Danışmanı: Doç. Dr. Ertuğrul AĞIRBAŞ**

Güney Doğu Karadeniz (Artvin-Giresun) kıyıları boyunca Kasım 2014-Ağustos 2015 tarihleri arasında mevsimsel olarak yürütülen bu çalışmada pigment analizinde kullanılan ayırma parametreleri ve pigmente dayalı fitoplankton boy gruplarının zamansal ve alansal değişimleri araştırılmıştır. Çalışma kapsamında 12 farklı istasyonda yüzeyden mevsimsel örneklemeler gerçekleştirilmiştir. HPLC-DAD koşullarına bağlı olarak gerçekleştirilen analizler sonucunda 16 standart bileşiğin 38 dakika içerisinde uygun ayırımı elde edilmiştir. Ayırma parametreleri ve çözünürlük değerleri piklerin ayırımının %100'e yakın olduğunu göstermiştir. Kullanılan yöntemin pigment analizi için geçerli olduğu görülmüştür. Pigmente dayalı olarak hesaplanan fitoplankton boy gruplarının toplam fitoplanktona yaptığı katkı pikofitoplankton, nanofitoplankton ve mikrofıtoplankton için sırasıyla %3-60; %1-60 ve %8-88 arasında önemli değişim göstermiştir. Yüzey suyu ortalama klorofil-a konsantrasyonları 2, 8 ve 15 ml için sırasıyla 0,37-2,67 µg/L, 0,16-2,02 µg/L ve 0,17-1,79 µg/L arasında değişim gösterirken önce çıkan marker pigmentler peridinin, 19-heksanoloksifukoksantin, fukoksantin, zeaksantin, klorofil-b ve alloksantin pigmentleri olmuştur.

2019, 53 sayfa

Anahtar Kelimeler: Fitoplankton, HPLC-DAD, Pigment, Güney Doğu Karadeniz.

ABSTRACT

CHROMATOGRAPHIC SEPARATION PARAMETERS IN PIGMENT ANALYSIS

Osman AKYÜZ

**Recep Tayyip Erdogan University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Fisheries
Master Thesis
Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Ertuğrul AĞIRBAŞ**

In the present study, chromatographic separation parameters used in pigment analysis phytoplankton size classes depending on pigments from December 2014 to August 2015 were seasonally investigated along the south-eastern coasts (Giresun-Artvin) of the Black Sea. Along the 12 stations, seasonal samplings were collected from surface waters. Based on the HPLC-DAD conditions, an appropriate separation of 16 pigment standard was achieved within 38 minutes. The separation parameters and the resolution values showed that the peaks were close to 100%. The used method was validated for pigment analysis. Contribution of phytoplankton size classes derived from pigments to total phytoplankton in the study area revealed significant changes and ranged from 3 to 60%; 1 to 60%; 8 and 88% for picophytoplankton, nanophytoplankton and microphytoplankton, respectively. Surface mean chlorophyll-a concentrations ranged from 0.37-2.67 µg/L, 0.16-2.02 µg/L and 0.17-1.79 µg/L for 2, 8 and 15 miles, respectively. Besides chlorophyll-a, peridinin, 19-hexanoloxyfucoxanthine, fucoxanthine, zeaxanthin, chlorophyll-b and alloxanthine were the most outstanding marker pigments.

2019, 53 pages

Keywords: Phytoplankton, HPLC-DAD, Pigment, South-Eastern Black Sea

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	I
TEZ ETİK BEYANNAMESİ.....	II
ÖZET.....	III
ABSTRACT.....	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VII
TABLolar DİZİNİ	VIII
SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ	IX
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş	1
1.2. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)	2
1.2.1. Pompa	6
1.2.2. Enjektör	7
1.2.3. Kolon	9
1.2.4. Dedektör	10
1.2.5. Ultraviyole-Görünür Bölge (UV-VİS) Dedektör.....	11
1.2.6. Floresans Dedektörü.....	13
1.2.7. Kütle Spektrometrik Dedektör.....	14
1.3. Gaz kromatografisi.....	15
1.4. Süper Kritik Akışkan Kromatografisi	17
1.5. Kromatografide Ayırma Parametreleri.....	18
1.6. Fitoplankton.....	20
1.7. Fitoplankton Pigmentleri	21
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	23
2.1. Materyal ve Yöntem.....	23
2.1.1. Çalışma Sahası	23
2.1.2. Deniz Çalışmaları.....	24
2.2. Pigmentlerin HPLC-DAD Analizleri	25
2.2.1. Örneklerden Pigmentlerin Ekstraksiyonu.....	25
2.2.2. HPLC-DAD Koşulları.....	27
2.2.3. Standartlar, Validasyon ve Kalibrasyon	29
2.3. Pigmentlerin HPLC-DAD ile Ayırma Ölçütlerinin Hesaplanması.....	29

2.4. Fitoplankton Boy Grupları (FBG) ve Pigment İndeksleri.....	29
2.5. Verilerin Değerlendirilmesi	30
3. BULGULAR.....	31
3.1. Pigmentlerin HPLC-DAD ile Ayırma Ölçütleri	31
3.2. Pigment Kompozisyonu	35
3.3. Fitoplankton Boy Grupları.....	38
4. TARTIŞMA ve SONUÇLAR.....	41
4.1. Pigment Dinamiği	41
4.2. Fitoplankton Boy Grupları.....	44
5. ÖNERİLER.....	47
KAYNAKLAR	48
ÖZGEÇMİŞ	53

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Sıvı kromatografisinde molekül ağırlığı ve polariteye göre gruplar.	3
Şekil 2. Sıvı kromatografide kullanılan durgun faz çeşitleri.	4
Şekil 3. HPLC sisteminin diyagramı.....	5
Şekil 4. Gradient akış şemasını içeren bir kromatogram.....	6
Şekil 5. Pistonlu pompaların (resiprokal pompa) çalışma prensibi	7
Şekil 6. HPLC sistemlerinde kullanılan Rheodyne 7125 tipi enjeksiyon vanası.....	8
Şekil 7. Kolon dolgu materyal tipleri	10
Şekil 8. Değişken Dalga boylu UV-vis Dedektör.....	12
Şekil 9. Diyot-Serili UV dedektör.....	13
Şekil 10. HPLC-MS enstrümanının şematik gösterimi.	14
Şekil 11. Genel bir gaz kromatografi sistemi.	15
Şekil 12. Süperkritik akışkan kromatografi sistemi.	17
Şekil 13. Örneklem istasyonları.	23
Şekil 14. SBE 25 CTD prob ve SBE 32 Carousel 12 şişeli örneklem cihazı.	25
Şekil 15. Pigment analizi için deniz suyu örneklerinin GF/F filtrelerden süzülmesi.	26
Şekil 16. GF/F filtrelerin sıvı azot içerisinde muhafazası.	26
Şekil 17. Analiz öncesi ekstraksiyon (a) ve örneklerin santrifüj edilmesi (b).....	27
Şekil 18. Örneklerin HPLC-DAD ile analiz aşaması.....	28
Şekil 19. Pigment standartlarına ait karışımın HPLC-DAD kromatogramı.....	31
Şekil 20. Örneklem istasyonlarına ait yüzey in-situ klorofil-a konsantrasyonları.	37
Şekil 21. Örneklem istasyonlarına ait yüzey pikoplankton katkı (%) oranları.	38
Şekil 22. Örneklem istasyonlarına ait yüzey nanoplankton katkı (%) oranları.	39
Şekil 23. Örneklem istasyonlarına ait yüzey mikrop plankton katkı (%) oranları.....	40

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1.	Örnekleme istasyonlarına ait derinlik ve koordinatlar.....	24
Tablo 2.	Fitoplankton standartlarının kromatografik ayırma parametreleri.....	32
Tablo 3.	Kasım-14 Yüzey suyu fitoplankton için ayırma parametreleri.	33
Tablo 4.	Mayıs 2015 Yüzey suyu fitoplankton için ayırma parametreleri	34
Tablo 5.	Ağustos 2015 Yüzey suyu fitoplankton için ayırma parametreleri	34
Tablo 6.	Kasım 2014 dönemine ait HPLC pigment konsantrasyonları.	35
Tablo 7.	Şubat 2015 dönemine ait HPLC pigment konsantrasyonları.	36
Tablo 8.	Mayıs 2015 dönemine ait HPLC pigment konsantrasyonları.....	36
Tablo 9.	Ağustos 2015 dönemine ait HPLC pigment konsantrasyonları.....	37
Tablo 10.	Karadeniz’de yürütülen klorofil-a çalışmaları.....	42
Tablo 11.	Karadeniz’de pigment üzerine yürütülen çalışmalar	44
Tablo 12.	Pigmente dayalı fitoplankton boy gruplarının belirlendiği çalışmalar	46

SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ

%	Yüzde
µg	Mikrogram
µm	Mikrometre
Allo	Alloksantin
AP	Aksesuar Pigmentler
B	Tampon Seyreltme Faktörü
But	19-Butanoloksifukoksantin
CO ₂	Karbondioksit
CTD	İletkenlik, Tuzluluk, Derinlik
DP	Diyagnostik Pigmentler
SDP	Diyagnostik Pigmentler Toplamı
DAD	Diode Array Dedektör
DMS	Dimetil Sülfid
FBG	Fitoplankton Boy Grupları
f _{micro}	Mikroplanktonik Fraksiyon
f _{nano}	Nanoplanktonik Fraksiyon
f _{pico}	Pikoplanktonik Fraksiyon
Fuc	Fukoksantin
Hex	19 Heksanoloksifukoksantin
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
L	Litre
PAR	Fotosentetik Aktif Radyasyon
Per	Peridinin
PSC	Fotosentetik Karotenoidler
PPC	Fotoprotektan Karotenoidler
Chl <i>b</i>	Klorofil <i>b</i>
TC	Toplam Karotenoidler
TP	Toplam Pigmentler
Zea	Zeaksantin
Cp (µg L ⁻¹)	Pigment Konsantrasyonu

Ap (mAU*s)	Pik Alanı
Rf (ngmAU ⁻¹)	Kalibrasyon Eğrisinin Eğimi (ng kolon ⁻¹)
Vfilt (L)	Süzülen Su Hacmi
Vext (mL)	Ekstraksiyon İçin Kullanılan Çözücü Hacmi
Vinj (µL)	Kromatografi Sistemine Enjekte Edilen Örnek Hacmi



1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Kromatografi karışımların bileşenlerine ayrılması için kullanılan bir tekniktir ve genellikle daha basit yöntemler tarafından ayrılmaları mümkün olmayan karmaşık ya da, kimyasal ve fiziksel özellikleri birbirine çok yakın bileşenlerin ayrılmalarına izin veren bir yöntemdir. Bu yöntem ilk kez yirminci yüzyılın başında (1903) Rus botanikçi Mikhail Tswett tarafından geliştirilmiş ve isimlendirilmiştir. Mikhail Tswett bu yöntemi çok ince öğütülmüş toz haldeki kalsiyum karbonat ile doldurulmuş bir cam kolondan klorofil ve ksantofil gibi bitki pigmentlerini ayırmakta kullanmıştır. Kullandığı kolonda renkli bantlar gözlemlemesi bu yöntemi renk ve yazı anlamına gelen kelimelerin birleşimi olan kromatografi olarak adlandırmasına neden olmuştur (Skoog vd., 2000).

Kromatografinin esası, karışımlardaki bileşenlerin iki faz sistemi arasında dağılmasıdır. Çözücü ve ayırt edici ortam olarak kullanılan bu fazlar, hareketli faz ve sabit faz olarak adlandırılır. Kromatografik ayırımlar, karışımdaki bileşenlerin hareketli bir faz yardımıyla, sabit bir fazda değişik hızlarda hareket etmeleri esasına dayanır. Tüm kromatografik ayırmalarda numune bir gaz, sıvı ya da süperkritik akışkan olabilen hareketli bir fazda çözülür. Daha sonra bu hareketli faz uygun bir sabit faz boyunca geçirilir. Sabit faz tarafından güçlü bir şekilde tutulan bileşikler hareketli fazın akışıyla sadece yavaş bir şekilde hareket eder. Öte yandan sabit faz tarafından zayıf bir şekilde tutulan bileşikler hızlıca hareket ederler. Hareketlilikteki bu farklılıkların bir sonucu olarak numunenin bileşenleri kalitatif ve/veya kantitatif olarak analiz edilebilen ayrı bantlar içinde ayrılırlar. Bir kantitatif analiz tekniği olan kromatografide amaç, anlamlı bir süre içinde iyi bir ayırma yapmaktır. Ayırmayı etkileyen parametreler, kolon ile ilgili olanlar; kolonun türü, kolonun boyutudur. Hareketli faz ile ilgili olanlar; türü, bileşimi, akış hızıdır. Ölçüm ile ilgili olanlar; dedektör türü, dalga boyu vb.'dir. Kromatografik yöntemlerin ayırma mekanizmasına göre sınıflandırıldığında dört başlık halinde bulunurlar;

- Adsorpsiyon kromatografisi
- Dağılma (paylaşım) kromatografisi

- İyon-değişim kromatografisi
- Boyut eleme kromatografisi

Kromatografinin daha temel bir sınıflandırması, kullanılan sabit ve hareketli fazların tipleri ve fazlar arasında madde aktarımını sağlayan dengelerin cinslerine göre yapılır. Bunlar;

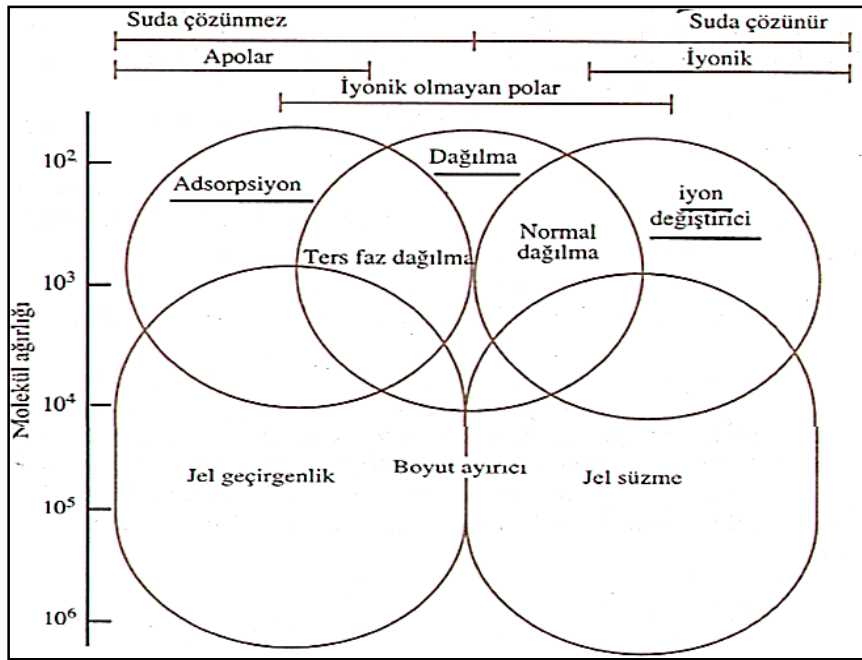
- Sıvı kromatografisi
- Gaz kromatografisi
- Süper kritik akışkan kromatografisi

Bu isimlerde de geçtiği gibi, bu üç teknikte hareketli faz sırası ile sıvı, gaz ve süperkritik akışkandır. Sadece sıvı kromatografisi hem kolonlarla hem de düz yüzeyler üzerinde gerçekleştirilebilir. Gaz kromatografisi ve süperkritik sıvı kromatografisi yalnızca kolonlarda gerçekleştirilir (Skoog vd., 2000).

1.2. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Sıvı kromatografi özellikle ısıl kararsız ve uçucu olmayan örnekler için uygulanır. Bir sıvıda çözülmüş ayrılacak bileşenler, bir kolon içerisinde bulunan genellikle katı bir destek üzerindeki sabit faz ile sıvı hareketli faz arasında dağılım davranışları arasındaki farklılıklardan dolayı kolon boyunca farklı hızlarda göçerler. Kolonu değişik zamanlarda terkederler ve böylece birbirlerinden ayrılırlar. Sıvı kromatografisi; büyük moleküllerin boyutlarına göre ayrıldıkları boyut eleme kromatografisi ve küçük moleküllerin polaritelerine göre ayrıldıkları adsorbsiyon, dağılma ve iyon değiştirme kromatografisi olarak gruplandırılabilir (Şekil 1).

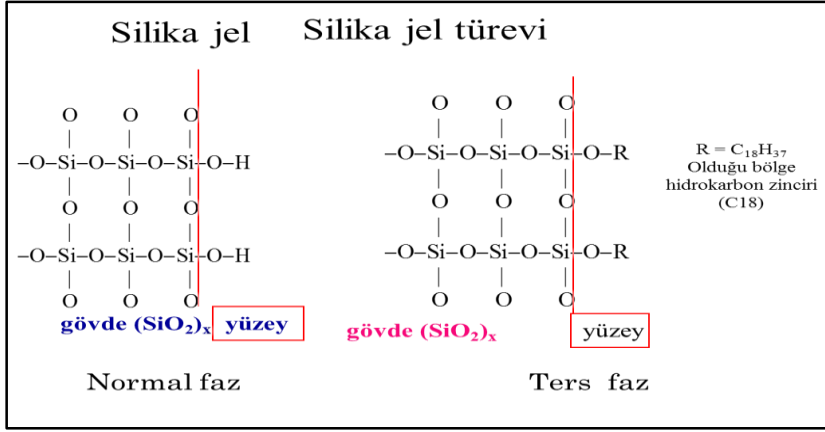
Daha çok apolar ve orta derecede polar bileşenlerin ayırımında adsorbsiyon kromatografisi kullanılmaktadır (Şekil 1).



Şekil 1. Sıvı kromatografisinde molekül ağırlığı ve polariteye göre gruplar.

Sıvı kromatografisinde bir sıvıda çözülmüş ayrılacak bileşenler, bir kolon içerisinde bulunan genellikle katı bir destek üzerindeki sabit bir faz ile farklı etkileşmelere girerek, kolon içinde değişik hızlarda ilerler. Kolonu farklı zamanlarda terk ederler ve böylece birbirinden ayrılırlar. Sıvı kromatografisi; Normal faz ve ters faz olarak başlıca iki grupta incelenebilir. Normal faz (NP) durumunda, sabit faz hareketli fazdan daha polardır ve en az polar analitler ilk elue edilirler (Şekil 2). Analit tutunması hareketli fazın polaritesi arttıkça azalır (Skoog vd., 2000).

Ters faz kromatografide (RP), sabit faz hareketli fazdan daha az polardır (Şekil 2). En polar analitler ilk elue edilirler ve analitin tutunması hareketli fazın hidrofobikliği arttıkça azalır. Ters faz kromatografide analitler durgun faz ve hareketli faz arasında dağılma gösterdiği için ayrıca bir dağılma kromatografi tipindedir (Skoog vd., 2000).

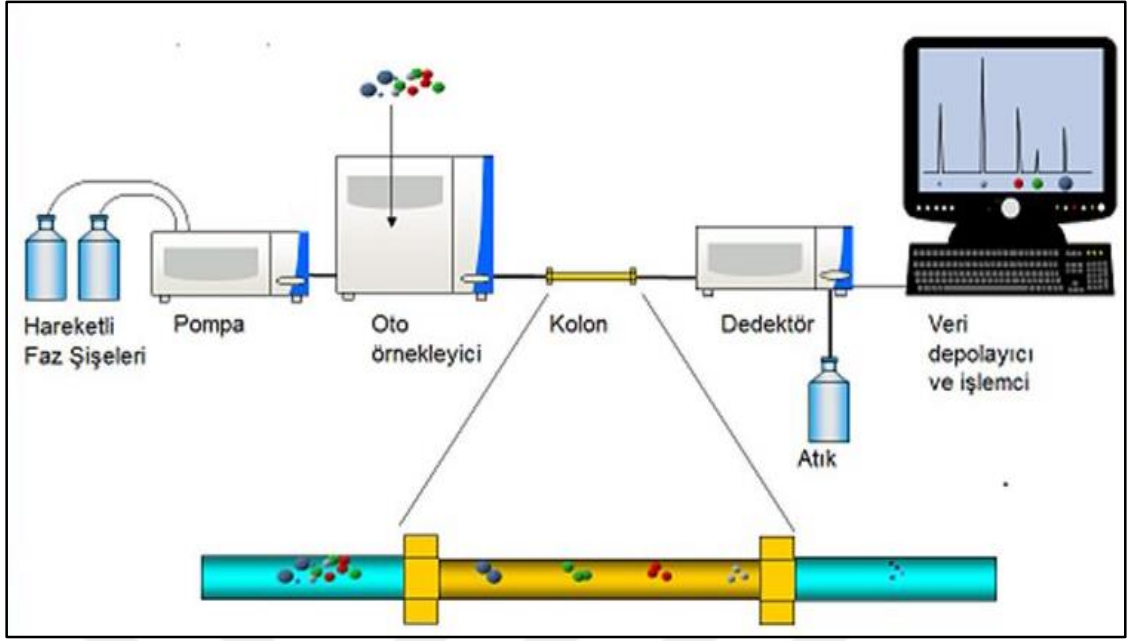


Şekil 2. Sıvı kromatografide kullanılan durgun faz çeşitleri.

Sıvı kromatografisi yönteminin özel bir uygulaması olan yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yönteminde sabit faz olarak kullanılan dolgu maddelerinin tanecik boyutunun küçültülmesi sonucu hareketli faz ile etkileşen sabit faz yüzey alanı büyür ve bu sayede kolonun etkinliği arttırılmış olur (Skoog vd., 2000).

Kısaca HPLC olarak adlandırılan yüksek performanslı sıvı kromatografisi analitik ayırma teknikleri arasında en yaygın kullanılanıdır. Yaygın kullanılma sebepleri duyarlılığı, kantitatif tayinlere kolaylıkla uyarlanabilir olması, uçucu olmayan veya sıcaklıkla kolayca bozunabilen bileşiklerin ayrılmasına uygunluğudur. En önemlisi ise sanayinin birçok bilim dalının ve toplumun birinci derecede ilgilendiği maddelere geniş bir şekilde uygulanabilirliğidir. Bu tip bileşiklere örnek olarak amino asitler, proteinler, nükleik asitler, karbohidratlar, ilaçlar ve pestisitler verilebilir.

HPLC ünitesi, Şekil 3’de gösterildiği gibi hareketli faz, pompa, örnekleyici (enjektör), kolon (ve kolon fırını) dedektör ve data işleyici kısımlarından oluşmaktadır (URL-1, 2019). Burada taşıyıcı faz olan sıvı, pompalarla kolona basıldığından yüksek akış hızındadır. Bu nedenle ayırma daha kısa sürede ve tam olarak gerçekleşmektedir. Ayrılan bileşik, kolon çıkışına bağlanan uygun bir dedektörle tespit edilip miktarıyla orantılı olarak kaydedilir. Yüksek hızda gerçekleştirilen ayırmaların yapıldığı sıvı kromatografi sistemlerine yüksek basınçlı sıvı kromatografi denir (HPLC).



Şekil 3. HPLC sisteminin diyagramı

Sıvı kromatografisinde ayırmaya etki eden değişkenlerden bir tanesi hareketli fazdır.

İyi bir hareketli faz:

- ✓ Sabit fazın özelliklerini değiştirmemelidir.
- ✓ Örnekteki bileşenlerin hepsini çözmelidir.
- ✓ Düşük viskozitede olmalıdır.
- ✓ Ayrılan bileşenlerden kolayca ayrılabilmesi (kolayca buharlaşabilmesi).
- ✓ Kullanılan dedektöre uygun olmalı.
- ✓ Ekonomik olmalı ve istenen saflıkta kolayca bulunabilir olmalıdır (URL-2, 2019).

Pompaya giden hareketli fazın kirlilik, partikül ve gaz kabarcıkları içermemesi gerekir. Hareketli faz kullanılmadan önce filtre edilmeli ve çözeltide çözünmüş gazlarından kurtarılmalıdır.

HPLC' de hareketli faz kompozisyonu analiz boyunca sabit ise buna isokratik akış, öte yandan hareketli faz kompozisyonu analiz boyunca zamana göre değişim gösteren akışlar gradient akış olarak adlandırılır. Gradient akış, analit, durgun faz ve hareketli faz etkileşimlerinde aynı sistem için analiz boyunca değişkenlik oluşturarak ayırımın daha

fazın partikül boyutu, akış hızı ve hareketli faz kompozisyonu gibi bir dizi faktöre bağlı olarak, 42000 kPa'ya (yaklaşık 6000 psi) kadar çalışma basıncı üretilebilir.

Sıvılar çok fazla sıkıştırılmadığından dolayı HPLC pompaları tarafından üretilen basıncın bir patlama tehlikesi oluşturmadığına da dikkat edilmelidir. Böylece sistemin parçalarından herhangi birisinde meydana gelebilecek bir çatlak, sadece çözücünün dışarı sızması ile sonuçlanacaktır. Tabi ki bu gibi kaçaklar bir yangın tehlikesi oluşturabilir.

Yüksek basınçta yapılan kromatografide, sisteme verilmeden önce hareketli fazın içerisindeki çözünmüş gazlar uzaklaştırılmalıdır, aksi halde sistemin düşük basınçlı kısmı olan dedektörde, çözünmüş gazlar (özellikle hava) kabarcık oluşturur. Bu durum, dedektörden çok hatalı değerler alınmasına neden olur.

Her birinin kendine göre üstünlük ve sakıncaları bulunan üç tip pompa vardır. Bunlar; pistonlu pompalar (resiprokal pompa), şırınga veya sürgülü pompalar ve pnömatik veya sabit basınç pompalarıdır (Skoog vd., 2000).



Şekil 5. Pistonlu pompaların (resiprokal pompa) çalışma prensibi

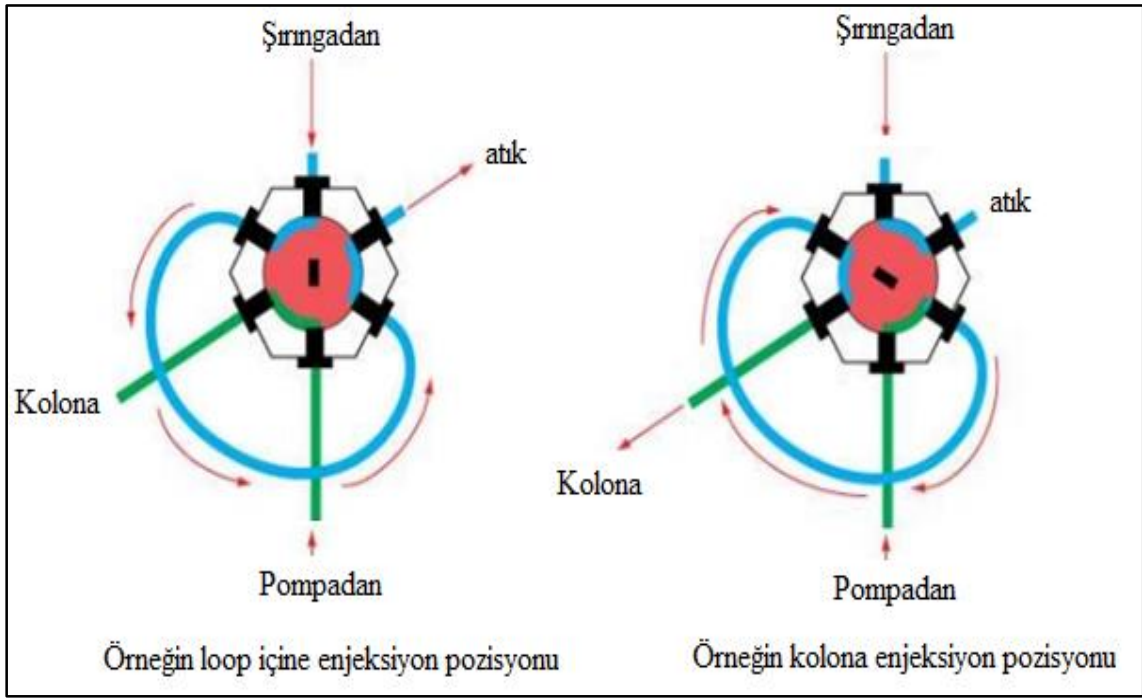
Şırınga tipi sınırlı çözücü kapasitesi ve gradient çalışmalara uygun değildir. Resiprokal pompa, mevcut cihazlarda en yaygın kullanılan pompa tipidir. Resiprokal pompalar, pistonun ileri sürüşünde kolona hareketli fazı gönderir, pistonun geri sürüşünde ise hareketli fazı iç hacmine alır (Şekil 5).

1.2.2. Enjektör

Sıvı kromatografi kolonlarına örnek verme işlemi genel olarak iki şekilde gerçekleştirilebilir;

1. Kesintisiz enjeksiyon (yüksek basınç altında)
2. Kesintili enjeksiyon (normal basınç altında)

İlk kullanılan yüksek basınç kromatografi sistemlerinde örnek, önceleri gaz kromatografide olduğu gibi, bir enjektör yardımıyla yüksek basınç altındaki kolona doğrudan verilir. Ancak basınç sınırlaması, kaçakların önlenememesi, kolon dolgusunun enjeksiyon sırasında etkilenmesi gibi nedenler bu tür enjeksiyon yöntemlerinden vazgeçilmesini gerektirmiştir. Bugün “vane” sistemleri kullanılmaktadır. Vane, merkezde dönen bir disk, örnek tüpü (loop), birkaç giriş ve çıkıştan oluşmaktadır (Şekil 6). Örnek tüpü (loop) 10, 20, 50 μL hacimlerde olabilir. Örnek, bir enjektör kullanılarak tüp hacminden fazla miktarda enjekte edilir. Örneğin fazlası tüpten taşıp bir toplama kabında birikir. Böylece tekrarlanabilir miktarda örneğin sisteme verilmesi sağlanır.



Şekil 6. HPLC sistemlerinde kullanılan Rheodyne 7125 tipi enjeksiyon vanası

Örnek tüpüne (loop) sıvı verilmesi işlemine yükleme (load) adı verilir. Bu işlem yapılırken hareketli faz vananın bir başka kısmından geçip analitik kolona ulaşmaktadır. Yükleme işleminden sonra vananın merkezi diski döndürülür ve vane enjeksiyon konumuna getirilir. Bu durumda hareketli faz örnek tüpünden geçmeye başlar ve sıvı analitik kolona sürüklenir. İki tip vananın da (valco, rheodyn) çalışma sistemleri hemen hemen aynıdır. Vane iç kısmında kılcal yollar olması nedeniyle örneğin ve hareketli fazın mutlak surette partiküllerden arındırılması gerekir.

1.2.3. Kolon

HPLC de kullanılan kolonlar, yüksek basıncı korumak için paslanmaz çelikten yapılmışlardır. Kolonlar baştan sona düzgün bir iç çapa sahiptirler ve ticari amaçlı olarak da değişik büyüklükleri mevcuttur. Bir kromatografik sistemin performansı, kolonun dolgu maddesinin seçilmesi ve kullanılmasıyla tayin edilir.

İyi bir kolon:

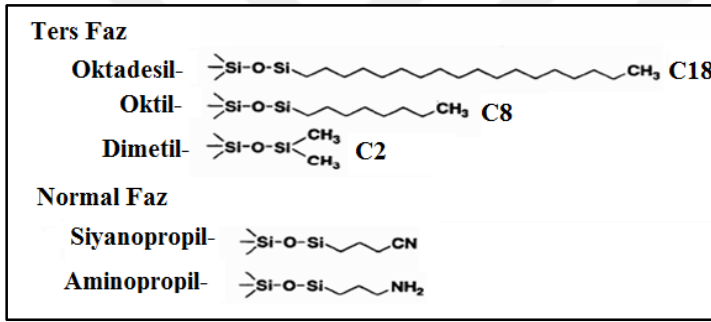
- ✓ Dolgu maddesi kararlı olmalıdır.
- ✓ Hem hareketli faz çözücülerine hemde çözeltilere karşı inert olmalıdır.
- ✓ Geniş yüzey alanına sahip, düzgün olarak dağılmış ve hareketli faza kolay erişebilir açık yapısal yüzeye sahip olmalıdır.
- ✓ Yüksek basınç ve yüksek akış hızlarından etkilenmemelidir (URL-3, 2019).

Genellikle HPLC’de ayırmalar dağılma tipinde çalışır. Dağılma kromatografisi hareketli ve sabit fazlarının bağıl polarlığına bağlı olarak iki temel forma ayrılabilir. Normal faz (NP) durumunda, sabit faz hareketli fazdan daha polardır. Benzer özelliklere sahip maddelerin birbiri içinde dağılma özelliği yüksek olduğu için en az polar analitler hareketli fazda çok iyi çözündüklerinden ilk elue edilirler. Analit tutunması hareketli fazın polaritesi arttıkça azalır. Normal faz kromatografide, sabit faz silikajel-polimer ve üzerine bağlanmış –CN, -NO₂ veya NH₂ gruplarından dolayı polar özellik gösterirken mobil faz polar olmayan ya da düşük polariteye sahip etileter, kloroform, hekzan vb. çözücüler ve karışımlarından oluşur.

Ters faz kromatografide (RP), sabit faz hareketli fazdan daha az polardır. En polar analitler ilk elue edilirler ve analitin tutunması hareketli fazın hidrofobikliği arttıkça azalır. Ters faz kromatografide, sabit faz silikajel-polimer ve üzerine bağlanmış C18 (oktadesil), oktil, fenil, metil veya etil gruplarından dolayı apolar özellik gösterirken hareketli faz polar metanol, asetonitril gibi güçlü organik çözücülerin sulu veya tamponlanmış karışımlarıdır (Skoog vd., 2004). Benzer özelliklere sahip maddelerin birbiri içinde dağılma özelliği olduğu için yüksek polariteye sahip analit hareketli fazda çok iyi çözünür ve sabit fazla az etkileştiğinden dolayı kolondan ilk önce çıkar. Alıkonma zamanını kısaltmak için mobil fazın polaritesi azaltılır.

Ters faz kolonlar silikondan modifiye edilirler. Silika jelde modifiye olan Oktil (C8) ve oktadesil (C18) en yaygın kullanılan fazlardır. HPLC kolonlar (genelde 3-5 µm) dar bir boyut dağılımına sahip küçük partiküllerden oluşur ki bunlar apolar fonksiyonel grupların kullanımıyla modifiye edilirler. Mikro partiküllü materyaller yüksek basınçta kolon boyunca pompalanan hareketli fazı gerekli kılarlar (Skoog vd., 2000).

HPLC çalışmalarında sabit faz olarak genellikle silikajel kullanılır. İçerdiği SiOH grupları nedeniyle zayıf asidik özellik gösteren silikajel, bazik özellik gösteren bileşikler bazlık kuvvetlerine göre tutar. Yani kuvvetli bazlar silikajel kolonlarda zayıf bazlara oranla daha kuvvetli tutunurlar. Silikajel doğrudan dolgu maddesi olarak kullanıldığı gibi bir katı yüzeyine film halindede kaplanabilir (Skoog vd., 2000).



Şekil 7. Kolon dolgu materyal tipleri

Kolonun verimi, kolon dolgu maddesi, ortalama parçacık çapı, kolonu doldurmak için kullanılan teknikler, kolonun iç çapı ve kolonun iç yüzeyinin geometrisi gibi pek çok faktör tarafından tayin edilir (URL-2, 2019).

Sıvı kromatografi türleri kullanılan kolona göre aşağıdaki gibi sınıflandırılır.

1. Adsorpsiyon (Sıvı-Katı) Kromatografi.
2. Dağılma (Sıvı-Sıvı) Kromatografi.
3. İyon Değişimi Kromatografi.
4. Moleküler Eleme (Jel) Kromatografisidir.

1.2.4. Dedektör

HPLC’ de dedektör, cihazın en önemli kısımlarından birini oluşturur. Kolondan çıkan madde, kolon çıkışına yerleştirilen uygun bir dedektör ile ölçülür. Dedektör,

hareketli fazda meydana gelen fiziksel ve kimyasal değişiklikleri izleyerek kalitatif ve kantitatif analiz yapılmasına izin veren elektronik araçlara denir.

Dedektör seçimi doğru ve hassas bir analiz yapabilmek için çok önemlidir. Dedektörlerin bazıları numunedeki tüm bileşenlere karşı duyarlıyken, bazı dedektörler ise bileşenlerden sadece belli özelliktekilere karşı duyarlıdır. Bir dedektörde bulunması gereken önemli karakteristikler:

- ✓ Duyarlılık,
- ✓ Doğrusallık,
- ✓ Üniversal ve seçici cevap,
- ✓ Koşulların değişiminden ekilenmeme,
- ✓ Numuneyi tahrip etmeme,
- ✓ Ucuzluk ve kolay kullanım'dır.

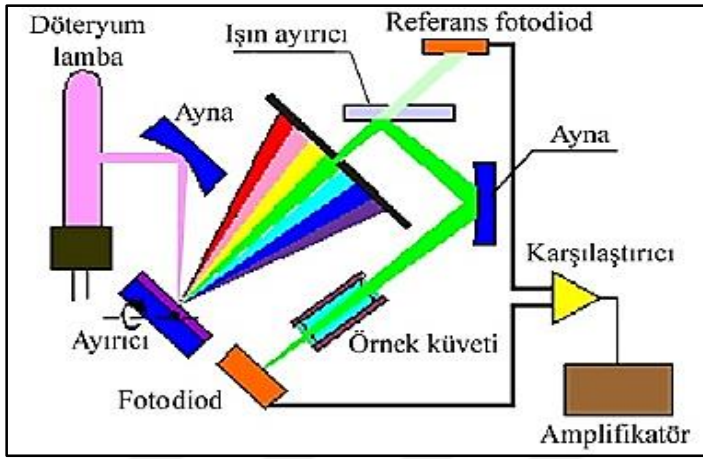
Örnek bileşenleri kromofor gruplar yani UV veya görünür alandaki ışığı absorplayan fonksiyonel gruplar içeriyorsa ilk tercih doğal olarak UV-VIS dedektör olacaktır. Bununla birlikte bir veya daha fazla bileşen UV-VIS ışığı absorblamıyorsa alternatif dedektörler de düşünölmelidir. Örneğin kimyasal yapısına ve metodun gereksinimlerine göre UV-VIS, kırılma indisi (RI), floresans (FLD), elektrokimyasal dedektörler (EC) ve kütle dedektör (MS) kullanılabilir (Sandra, 2004).

1.2.5. Ultraviyole-Görünür Bölge (UV-VIS) Dedektör

Pek çok organik molekül ve fonksiyonel grup 190 nm'den 800 nm'ye kadar olan ultraviyole (UV) ve/veya görünür (Vis) alanda elektromagnetik enerji absorplar. Tüm olefinler, aromatikler, CO, CS, -N=O ve -N $\equiv$ N- grupları içeren moleküller gibi pek çok bileşik UV bölgede (200-350 A) absorbsiyon yapar; tek veya çift bağları (π elektronlar) vardır ve bağlanmamış elektronları bulunur. UV-Vis, elektronik spektrum 100-800 nm aralığını kapsar; 100-200 nm aralığı Vakum UV, 200-400 nm aralığı UV (veya yakın UV) ve 400-800 nm aralığı görünür (Vis) bölgedir. Bir enerji absorpsiyonunun sonucu olarak atomlar ve moleküller düşük enerjili seviyeden (başlangıç ya da temel hal) daha yüksek

bir seviyeye (uyarılmış hal) geçer. Absorbe edilen elektromagnetik enerji uyarılmış ve temel haller arasındaki enerji farkına eşittir (Jaffé ve Orchin, 1964).

Dört tip UV dedektör vardır; sabit dalga boylu, değişken (veya çoklu) dalga boylu, değişken (veya çoklu) dalga boylu dispersif, diyot dizili (diode array). İstenilen dalga boyuna ayarlanarak, bileşiklerin belirlenmesine izin veren dedektörler değişken dalga boylu dedektörler olarak adlandırılır (Şekil 8).

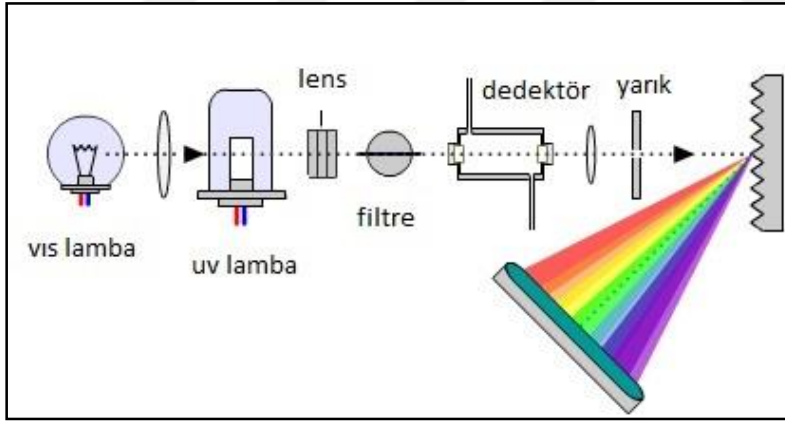


Şekil 8. Değişken Dalga boylu UV-vis Dedektör.

Tipik UV-VIS dedektör, bir ışık kaynağı, bir monokromator, bir dedeksiyon hücresi ve bir dedektör içerir. Işık kaynağı genellikle spektrumun UV bölgesinde elektromagnetik enerjiyi yayan bir döteryum lambasıdır. İkinci bir ışık kaynağı olan tungsten lamba ise spektrumun VIS bölgesindeki dalga boyları için kullanılır. Işık kaynağından gelen ışın demetini dalga boylarına göre ayıran cihazlara monokromatör denir. Monokromatörlerdeki slit aralıklarının bir sistemi numune hücresinde istenen dalga boylarına odaklanır (Şekil 8). Numune hücresinden geçen ışın, onun bolluğunu (şiddetini) kaydeden dedektöre ulaşır. Modern enstrümanlarda fotodiyodlar kullanılmasına rağmen dedektör genellikle bir fotoçoğaltıcı tüptür. UV-Vis dedektörlerde enstrüman dizaynı tek bir dalga boyunda ölçüm için uygundur. Ancak, komple bir spektrum istenirse bu tip enstrümanların bazı eksiklikleri vardır. Bir mekanik sistem monokromatörün dönmesini ve istenen tüm dalga boylarında tarama yapmasını gerektirir. Bu tip sistem yavaş çalışır ve bundan dolayı bir spektrumun kaydı için oldukça büyük zaman gereklidir (Jaffé ve Orchin, 1964).

Diyot dizili Dedektörde; geniş aralıklı bir kaynaktan (döteryum lamba gibi) gelen ışık bir akromatik mercek sistemiyle paralelleştirilir ve böylece ışığın tamamı, holografik bir ızgara üzerinde bulunan dedektör hücresinden geçer (Şekil 9). Böyle bir düzenlemeyle kaynaktan çıkan tüm dalga boylarındaki ışık örnekten geçmiş olur. Izzaradan çıkan dağıtılmış ışık bir diyot seri üzerine düşer. Diyot serileri, bir silikon kristal üzerine köşeden köşeye yerleştirilen bir seri fotodiyot dedektörleri içerir. Her bir diyot spektrumun dar bir bandını kaydetmek için tasarlanmıştır. Diyotlar tüm spektrumun bir defada kaydedilmesi için uygun şekilde bağlanmıştır. Bu tip dedektörler hareketli parçalara sahip değildir ve çok çabuk bir şekilde spektrumu kaydedebilirler.

İşlem sonunda her bir diyoda karşılık gelen UV dalga boyundaki kromatogram çizilir. Enstrümanların çoğu, ayırma işlemini takiben en az bir diyodu izleyebilecek şekilde dizayn edilmiştir. Böylece ayırma gerçekleşirken kromatogram da çizilebilmektedir. Bu tür sistemler örnekteki bileşenlerin doğrudan spektrumlarını verdiğinden ideal sistemlerdir.



Şekil 9. Diyot-Serili UV dedektör.

1.2.6. Floresans Dedektörü

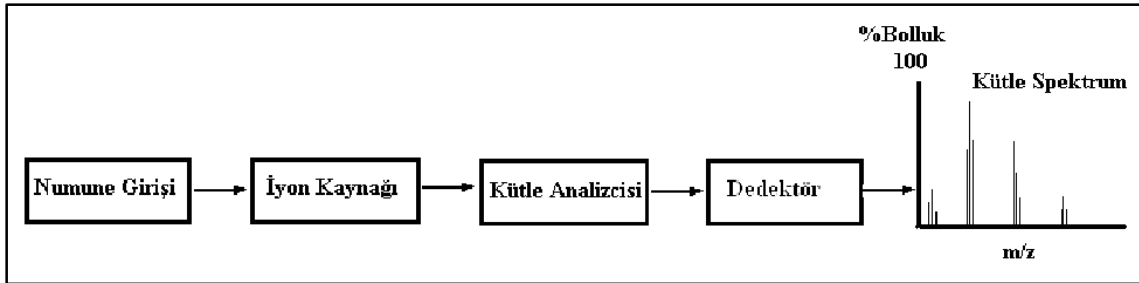
Daha kısa dalga boyundaki enerji ile uyarılmış olan, fakat daha yüksek dalga boyunda radyasyon yayan fonksiyonel gruplara sahip bileşikler, floresant bileşikler olarak adlandırılırlar. Organik maddelerin yaklaşık %15'i floresans oluşturma yeteneğine sahiptir. Kullanılan ışık kaynağı ksenon lamba olup, duyarlılığı UV/VIS

dedektöre göre yaklaşık 103 kat fazladır. Bu nedenle eser miktarlardaki maddelerin analizlerinde kullanılır.

1.2.7. Kütle Spektrometrik Dedektör

HPLC de analitlerin belirlenmesinde geline en büyük gelişme, HPLC ile MS tekniklerinin birleştirilmiş olmasıdır. Böylece, en duyarlı, en seçici ve aynı zaman da en genel dedektör olarak MS, kromatografik sistemlerde kullanılmaya başlanmıştır. Pek çok bileşiğin tam olarak tanınması gibi detaylı yapısal bilgi verebilir.

HPLC-MS'in GC-MS' e nispeten başlıca avantajı çok daha geniş bir yelpazede bileşiklerin analizini gerçekleştirebilme kapasitesine sahip olmasıdır. Yüksek polarite gösteren veya yüksek molekül ağırlıklı termal olarak kararsız bileşikler hatta proteinler bile rutin şekilde HPLC-MS kullanılarak tamamen analiz edilebilirler. Temel enstrüman örnek girişi (bir sıvı kromatografisi), iyonlaşma bölümü, kütle analizci ve dedektör ihtiva eder (Şekil 10).



Şekil 10. HPLC-MS enstrümanının şematik gösterimi.

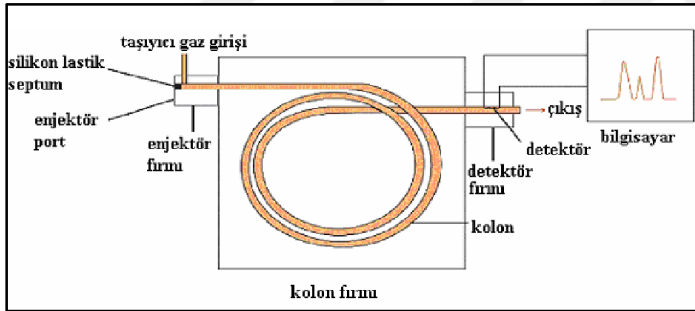
HPLC kolonunda ayrılan moleküller, bir iyonlaştırıcı aracılığıyla iyonize edilerek kütle spektrometreye gönderilir. HPLC-MS için kullanılan en yaygın iki iyonlaştırıcı elektrosprey iyonlaştırma (ESI) ve atmosferik basınç kimyasal iyonlaştırma (APCI)'dır. ESI ve APCI'nin her ikisi de iyonlaşmanın atmosferik basınçta gerçekleştiği yumuşak iyon kaynaklarıdır. İyonlaşma sonrasında moleküldeki zayıf bağlar kırılır ve bir seri iyonize olmuş fragman oluşur. Bu fragmanlar kütle spektrometresi tarafından spektrum üretmek üzere ayrılır. İyonlar dört yol boyunca hızlandırılır ve yollara hem ters hem de doğru akım uygulanır. Uygulanan gerilimler fragmanların yönünü değiştirir. Bu yollar bir kütle

filtresi gibi hareket eder. Devamında ölçülen her bir kütlenin yoğunluğundan kütle spektrumu çizilir.

Kütle spektrumu fragmentasyon teknikleri kullanılmadığı sürece esas olarak molekül ağırlığı bilgisini sağlar. Mümkün olan fragmentasyon teknikleri iyonlaşma kaynağında çarpışmadan kaynaklanan ayrışma (CID), bir ardışık tipli enstrümanın çarpışma hücreinde CID veya iyon yakalama bölümündeki fragmentasyondur.

1.3. Gaz kromatografisi

Gaz kromatografisi ısıya karşı kararlı ve yeterince uçucu bileşiklerin analizlerinde kullanılır. Tipik bir modern gaz kromatografi sistemi bir gaz hareketli faz kaynağı, bir enjeksiyon portu, sabit faz içeren bir ayırma kolonu, bir dedektör ve bir veri kayıt sisteminden oluşmaktadır (Şekil 10).



Şekil 11. Genel bir gaz kromatografi sistemi.

Kolon boyunca numuneyi ilerletmek için hareketli faz olarak genellikle hidrojen, helyum ya da azot gibi kimyaca inert gazlar taşıyıcı gaz olarak kullanılır. Gaz akış hızını sabit tutmak için akış metreler ve basınçölçerler kullanılır. Kapiler gaz kromatografisi (CGC), günümüzde uygulanan en yaygın gaz kromatografisi (GC) formudur. CGC’de küçük iç çaplı (milimetrenin onda birkaçı) kapiler sabit faz ile kaplıdır. Çoğu kapiler kolonlar dışı poliimidle kaplı eritilmiş silikadan yapılmıştır. Bu kolonlar esnektirler ve bu sayede çok uzun bir kolon küçük bir bobin halinde sarılabilir (Skoog vd. 2000). Organik bileşikler kolonda hareketli faz ve sabit faz arasında farklı dağılıma davranışlarından dolayı ayrılırlar. GC kolonlarında en yaygın sabit fazlar polisiloksanlardır ki onlara fazın polaritesini değiştirmek için çeşitli substituent gruplar eklenir. En apolar sabit faz

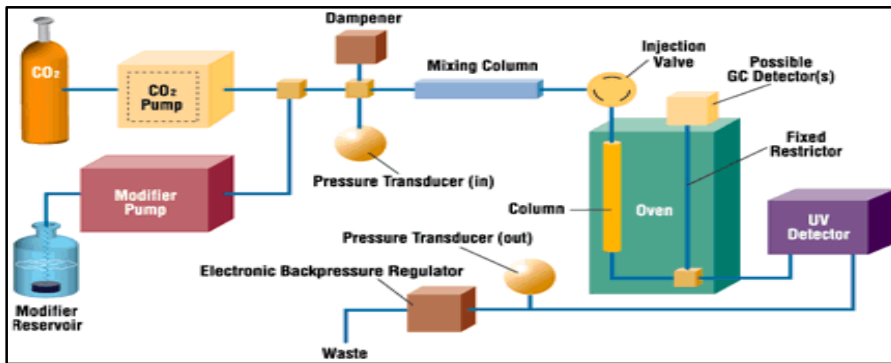
polidimetilsiloksandır ki fenil ve/veya siyanopropil grupları polimerin üzerine eklenerek daha polar yapılabilir. Çok polar analitler için polietilen glikol (örneğin Carbowax 20M) yaygın bir şekilde sabit faz olarak kullanılır. Kolon sıcaklığı hızlı bir şekilde artıp azalabilen bir fırının içinde tutulur. Sıcaklık arttıkça kaynama noktası düşük olan bileşikler yüksek olanlardan daha erken kolondan ayrılırlar. Bundan dolayı sıcaklık ve önce de ifade edilmiş olan sabit faz etkileşimleri gerçekte iki ayrı ayırma kuvvetleridir. Enjeksiyon sistemi için iki önemli gereksinim vardır. Enjeksiyon kromatografik bant genişlemesine neden olmamalı ve analiz edilecek numune kolonun içine kalitatif ve kantitatif değişime uğramadan taşınmalıdır (Sandra, 2004). GC vasıtasıyla geniş çeşitlilikte bileşikler ve numuneler analiz edilebildiği için çeşitli enjektörler geliştirilmiştir. Enjektörler evrensel ve seçici olmak üzere ikiye bölünebilir. Evrensel enjektörler; a) direkt, b) split- splitless, c) kolonda soğuk ve e) sıcaklık programlı buharlaşma (PTV) enjektörleridir (Sandra, 2004). En yaygın enjeksiyon sistemi split-splitless enjeksiyondur ve mevcut çalışmada da bu enjeksiyon kullanıldığı için yalnızca bu enjeksiyon metoduna özetle değinilecektir. Kapiler gaz kromatografisinde kapiler kolonun düşük numune hacminden dolayı ve bant genişlemesinden kaçınmak için split enjeksiyon yaygın şekilde kullanılır. İki enjeksiyon valfi sayesinde buharlaşma bölümünde hem taşıyıcı gaz hem de taşıyıcı gaz ile numune buharlarını içeren gaz karışımının akışı düzenlenir. Buharlaşma bölümü 250–300 °C'e kadar ısıtılan bir cam veya kuartz tüp (6–12 cm uzunluğunda, 3–4 mm i.d.)'den oluşmaktadır. Split enjeksiyonun en önemli dezavantajı numunenin çoğu ayrılma ve kaydetmeden önce sistemden çıktığı için duyarlılığının sınırlı olmasıdır. Bu yüzden gerektiğinde duyarlılığı yüksek olan splitless enjeksiyon kullanılır. Bu durumda split valfi enjeksiyon esnasında kapatılır ve buharlaşma bölümünden kolona gönderilir (Sandra, 2004). Dedektörün amacı kolonda ayrılmalarından sonra hareketli fazdaki analitlerin varlığını kaydetmektir. Dedektör bir bileşiğin varlığı tespit edildiğinde elektrik sinyali oluşturma kapasitesine sahiptir. Sinyal var olan analitin miktarıyla doğru orantılıdır. Dedektörün en önemli özellikleri duyarlılık, dinamik aralık ve seçiciliktir. Kromatografide koşturma esnasında bilgisayar dedektör sinyalinden bir grafik üretir. Bu grafiğe kromatogram denir. Bir bileşik GC kolonundan dedektöre elue edildiğinde kromatogramda oluşan pik, üretilen sinyali temsil eder. Kromatogramda x-ekseni alıkonma zamanını, y-ekseni sinyalin şiddetini (bolluk) gösterir. GC'de kullanılan pek çok dedektör tipleri içinde en önemlileri alev iyonlaşma dedektörü (FID), elektron yakalama detektörüdür.

1.4. Süper Kritik Akışkan Kromatografisi

Gaz ve sıvı kromatografinin en iyi özelliklerini taşıyan mobil fazı süper kritik akışkan olan bir kromatografi tekniğidir. Süperkritik, bir maddenin kritik sıcaklığının üzerinde ısıtıldığı zaman elde edilen fiziksel halidir. Kritik sıcaklık ise o sıcaklığın üstünde maddenin sıvı halde bulunamayacağı bir sıcaklıktır. Süperkritik akışkanların en önemli özelliği yüksek yoğunluğa sahip olmaları ($0,2-0,5 \text{ g/cm}^3$) nedeniyle uçucu olmayan büyük moleküllü iyonları kolay bir şekilde çözmesidir.

Süperkritik akışkan kromatografinin diğer iki kromatografiye göre üstünlükleri; gaz kromatografi ile analiz edilebilecek kadar uçucu olmayan, termal olarak kararsız olan, kromofor grup bulundurmadığı için fotometrik dedektörlerin kullanılmadığı bileşiklerin analizlerine olanak sağlamasıdır. Ayrıca bu bileşiklerin teşhisi de duyarlılığı yüksek olan FID ile kolayca yapılabilir. Süperkritik kolonların, sıvı kromatografi kolonlarından daha kolay kütle spektroskopisine bağlanması ve sıvı kromatografiye göre oldukça kısa analiz zamanı da önemli avantajları arasındadır.

Süperkritik akışkan kromatografi cihazları, yüksek basınçlı sıvı kromatografi cihazlarına benzemekle beraber tek farkı kolon basıncının ölçülmesi ve kontrolü için önlem alınmasıdır.



Şekil 12. Süperkritik akışkan kromatografi sistemi.

1.5. Kromatografide Ayırma Parametreleri

Kromatografik ayırımlar bileşenlerin sabit bir durgun faz ile hareketli faz arasında farklı oranda dağılmaları sayesinde gerçekleşir.

Bileşenlerin fazlar arası dağılma eşitliği aşağıdaki gibi gösterilir:

$$A_{\text{mobil}} \rightleftharpoons A_{\text{durgun}} \quad (1)$$

Ayrılacak olan bileşenlerin farklı formlarında bulunma durumları gözardı edilerek herbir bileşenin toplam miktarına göre hareketli ve durgun fazlar arasındaki derişimlerinin oranına dağılma katsayısı denir (Skoog vd. 2000). Dağılma katsayısı K ile gösterilir ve Eşitlik-2' deki gibi hesaplanır:

$$K = \frac{C_d}{C_m} \quad (2)$$

Eşitlik-2' de geçen C_d , bileşenin durgun fazdaki derişimi, C_m ise hareketli fazdaki derişimidir.

Numune enjeksiyonu ile analit pikinin dedektöre ulaşması arasında geçen süreye alıkonma zamanı denir. Alıkonma zamanı t_r ile gösterilir. Kolon boyunca geçen mobil faz için alıkonma zamanı ölü zaman (t_0) olarak ifade edilir ki bu zaman kolonda hiç tutunmayan bileşenlerin alıkonma zamanıdır. Alıkonma faktörü olarak adlandırılan k' terimi kolonda analitlerin göç etme oranı olarak kullanılır. Bu faktör kapasite faktörü olarak da kullanılmaktadır (Skoog vd. 2000). Örneğin bir A analiti için kapasite faktörünün nasıl hesaplanacağı Eşitlik-3' de verildi:

$$k'_A = (t_{rA} - t_0) / t_0 \quad (3)$$

Bir analit için alıkonma faktörü $k' < 1$ olduğu durumda elüsyon çok hızlıdır ve bu durumda analitik alıkonma zamanını doğru belirlemek çok zordur. Alıkonma faktörünün çok büyük olduğu örneğin $k' > 20$ durumunda ise elüsyonun çok uzun zamanda

gerçekleştirdiği sonucunu çıkarırız. Bir analit için ideal alıkonma faktörü 1 ile 5 arasında olmalıdır. Ancak ayırımı yapılan örneğin içeriğine göre daha karmaşık karışımlarda en uygun kapasite faktörü 2 ile 10 değişebilir.

Seçicilik faktörü “ α ” ise iki türün (A ve B) kolondan ayrılmasını tanımlar;

$$\alpha = k'_B / k'_A \quad (4)$$

Eşitlik-4’ de alıkonma faktörü verilen A türü kolondan B türünden daha hızlı ayrılır ve böylece seçicilik faktörü daima 1’den büyüktür.

Optimum bir ayırma için, keskin ve simetrik pikler elde edilmelidir. Bunun için bant genişliği olarak adlandırılan piklerin taban genişlikleri (W_b) mümkün olduğunca küçük olmalıdır. Bant genişliği aynı zamanda kolon etkinliğinin bir faktörüdür. Kolon etkinliği (N), kolonun teorik tabaka sayısı olarak ifade edilen bir terimdir ve basitçe kolon uzunluğunun teorik tabaka yüksekliğine oranı olarak tanımlanabilir (Eşitlik-5);

$$N = L/H \quad (5)$$

Tabaka sayısı, kolonun çok sayıda ayrı tabakalardan oluşmuş olduğu varsayımından yola çıkılarak belirlenen teorik bir terimdir. Gerçekte kolon içinde bu şekilde ayrılmış tabakalar yoktur.

Kolon etkinliği N, aynı zamanda bir kromatogramdan rahatlıkla hesaplanabilir;

$$N = 16 \cdot (t_r / W_b)^2 = 5,54 \cdot (t_r / W_{1/2})^2 \quad (6)$$

$$W_{1/2} = \text{pikin yarı yüksekliğindeki genişliği} \quad (7)$$

Teorik tabaka sayısı ya da diğer adıyla kolon etkinliği ne kadar büyükse kolonda analitin ayırımı o kadar iyidir.

Tüm bu parametreleri içeren ve iki pikin çözünürlüğünü ifade eden birim çözünürlük R ile ifade edilir ve şu şekilde hesaplanır:

$$R = (tr_2 - tr_1) / 0,5 \cdot (W_{b1} + W_{b2}) \quad (8)$$

Yaklaşık olarak $W_{b1} = W_{b2}$ kabul edilir, öyleyse formül

$$R = (tr_2 - tr_1) / W_{b2} \text{ olarak kullanılır.} \quad (9)$$

Çözünürlük değerinin 1 olması %95,4 oranında ayırımın tamamlandığını gösterir. En az $R=1,5$ olmalıdır ki bu noktada ayırım %99,73 dür (Skoog vd. 2000). Çözünürlük kolon etkinliği, alıkonma faktörü ve seçicilik faktörüne bağlı olarak değişmektedir ve bu üç parametre kullanılarak da hesaplanabilir. Bu şekilde hesaplana çözünürlüğü R_s sembolü ile belirtirsek:

$$R_s = \frac{\sqrt{N_2}}{4} \cdot \left[\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right] \cdot \left[\frac{k_2}{k_2 + 1} \right] \quad (10)$$

Eşitlik-9' da N_2 olarak belirtilen sembol ayırımları incelenen iki pikten daha geç elue edilen pikin kolon etkinliğidir. Aynı şekilde k_2 ' de ikinci pike ait alıkonma faktörüdür.

1.6. Fitoplankton

Fitoplankton besin zinciri yolu ile zooplanktondan, balıklara, kuşlara ve memeli hayvanlara kadar enerjinin aktarılmasında önemli rol oynarlar (Tait ve Dipper, 2001). Sahip oldukları yüksek fotosentetik kapasiteleri sayesinde yeryüzündeki birincil üretimin yarısını oluştururken (Falkowski vd., 2007, Boyce vd., 2010) denizel ortamdaki organik üretimin neredeyse tamamından sorumludurlar (Mackas, 2011). Aynı zamanda, ortamdaki karbondioksit konsantrasyonunu etkileyerek pH dengesini sağlarken, antropojenik kaynaklı CO_2 salınımını büyük oranda (1/3) düşürerek sera gazı etkisini azaltmaya yardımcı olurlar (Takahashi vd., 2002).

Fitoplanktonik alışmalar geleneksel olarak mikroskop kullanılarak yürütülmektedir. Bu teknik klasik bir yöntem olup, türlerin taksonomik özelliklerinin kullanılarak teşhisi, hücre sayılarının sayılması ve biyomaslarının belirlenmesini kapsamaktadır (Utermohl, 1958; Booth, 1993; Eker-Develi vd., 2008). Ancak, zaman alan (rnek hazırlanması, çöktürülmesi vb.) ve ciddi manada uzmanlık gerektiren bir teknik olmasından dolayı mikroskopik hücre sayımı kısa zamanda fazla sayıda örnek çalışılmasına imkn vermemektedir. Ayrıca taksonomik olarak dış yapısal özellikleri bulunmayan küçük fitoplanktonik grupların (pikoplankton) teşhisinde de sıkıntılar yaşanmaktadır (Mackey vd., 1996).

1.7. Fitoplankton Pigmentleri

Klorofil-*a* fitoplankton biyomasının belirlenmesinde uzun zamandan beri kullanılan temel fotosentetik bir pigmenttir (Boyce vd., 2010). Klorofil-*a* pigmentinin yanı sıra fitoplanktonik gruplara özgü olan marker pigmentler kullanılarak da fitoplankton biyoması ve fitoplanktonik grupların katkısı ortaya konulabilmektedir (Uitz vd., 2006). Örneğın Bacillariophyta (diatom) (Stauber ve Jeffrey, 1988), Cyanophyta (mavi-yeşil algler) (Guillard vd., 1985; Millie vd., 1993) ve Chlorophyta (yeşil algler) (Jeffrey ve Vesk, 1997) için sırasıyla fukoksantin, zeaksantin ve klorofil-*b* marker pigment olarak kullanılmaktadır. Son yıllarda, proklorofitler spesifik marker pigment olan divinil klorofil *a* ve *b*'nin (dvCHLa ve b) kullanımı oligotrofik okyanus bölgelerinde pikofitoplankton yapısının daha iyi bir şekilde anlaşılmasına olanak tanımıştır (Gibb vd., 2001). Ayrıca marker pigmentlerin klorofil-*a*'ya oranları sayesinde fitoplankton boy gruplarının (pikofitoplankton, nanofitoplankton ve mikrofıtoplankton) oransal dağılımı da belirlenebilmektedir (Gieskes ve Kraay, 1983; Wright ve Jeffrey, 1987; Wright vd., 1996; Obayashi vd., 2001, Ediger vd., 2006).

Klorofil-*a* diğer pigmentlere göre daha çabuk sentezlenip parçalanabilen bir pigment olduğu için dış çevrede meydana gelen değişimlere çok hızlı tepki verebilmekte ve bundan dolayı temel pigment olarak değerlendirilmektedir. Diğer taraftan aksesuar pigmentler alg gruplarının fizyolojik durumu ve taksonomik kompozisyonu hakkında bilgi verebilmektedir. Pigmentlerin bu özelliklerinden yola çıkılarak fitoplanktonik grupları taksonomik olarak tanımlamada çeşitli “pigment indeksleri” kullanılmaktadır.

Bu amaçla yaygın olarak ve fitoplanktonik grupları temsilen yedi ana pigment (fukoksantin, peridinin, 19'-Heksanoloksifukoksantin, 19'-Butanoloksifukoksantin, Alloksantin, Klorofil-*b* ve Zeaksantin) kullanılmaktadır. Bütün bunların toplamı “diyagnostik pigment” (DP) olarak tanımlanır ve bu oranlar aşağıdaki formüllerle ifade edilmektedir (Uitz vd., 2006);

$$DP = (Fuc) + (Per) + (Hex) + (But) + (Allo) + (Chl\ b) + (Zea) \quad (11)$$

Bu formülde DP tüm “diyagnostik pigmentlerin” konsantrasyonları toplamını temsil eder. Fitoplankton boy gruplarını (pikofitoplankton, nanofitoplankton ve mikrofitoroplankton) tanımlamak için aşağıdaki eşitlikler kullanılır;

$$Pikofitoplankton = (Chl\ b) + (Zea) / DP \quad (12)$$

$$Nanofitoplankton = (Hex) + (But) + (Allo) / DP \quad (13)$$

$$Mikrofitoroplankton = (Fuc) + (Per) / DP \quad (14)$$

Farklı fitoplanktonik gruplar bulundukları ortamın trofik seviyesi hakkında bilgi verirken (Barlow vd., 2004), aynı zamanda gruplara özgü olan marker pigment oranları ve indeksleri kullanılarak farklı biyo-coğrafik geçiş bölgelerinin ve su kütlelerinin yapısı belirlenebilmektedir (Gibb vd., 2000). Son 15 yılda, pigmente dayalı fitoplankton kemotaksonomisi fitoplankton popülasyonlarının dağılımının ve kompozisyonunun anlaşılmasında önemli katkılar yapmıştır. (Gibb vd. 2001).

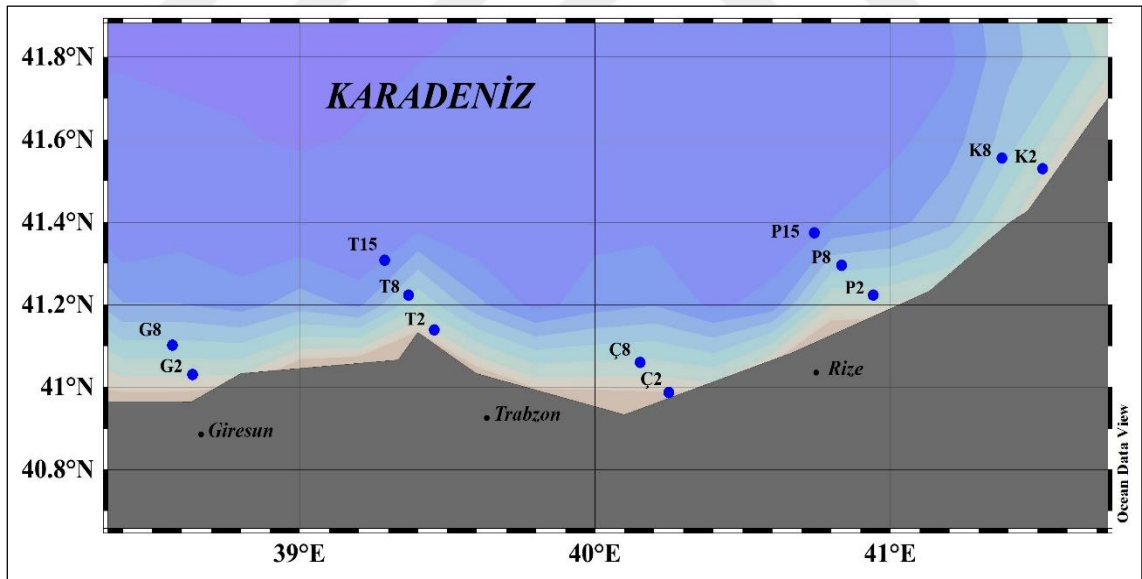
Dinamik bir yapıya sahip olan Karadeniz’de fitoplankton yapısı önemli oranda değişirken, grupların bloom zamanlarında önemli fenolojik değişimler kaydedilmiştir. Küçük boy grubundaki fitoplanktonik grupların dönemsel baskınlıkları birçok araştırmacı tarafından rapor edilmiştir. Bu çalışma ile Güney Doğu Karadeniz kıyılarında (Artvin-Giresun) yüzey suyundan (<5 m) alınan deniz suyu örneklerinde yapılan pigment analizlerinde kromatografik ayırma paramterlerinin test edilmesi amaçlanmıştır. Ayrıca, ayırma paramterlerine göre pigmente dayalı fitoplankton boy gruplarının zamansal ve alansal olarak değişiminin belirlenip belirlenemeyeceği de araştırılmıştır.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Materyal ve Yöntem

2.1.1. Çalışma Sahası

Bu çalışma, Güney Doğu Karadeniz (Artvin-Giresun) kıyıları boyunca belirlenen farklı karakterdeki 12 adet istasyonda (2, 8 ve 15 deniz mili) yılın dört mevsimini kapsayacak şekilde yürütüldü. Bunun için Kasım 2014, Şubat 2015, Mayıs 2015 ve Ağustos 2015 tarihlerinde, Giresun kıyısından 2 ve 8 deniz mili mesafesinde (G2 ve G8), Trabzon kıyısından 2, 8 ve 15 deniz mili mesafesinde (T2; T8 ve T15), Çamburnu kıyısında 2 ve 8 deniz mili mesafesinde (Ç2 ve Ç8), Pazar kıyısından 2, 8 ve 15 deniz mili mesafesinde (P2, P8 ve P15) ve Kemalpaşa kıyısından ise 2 ve 8 deniz mili mesafesinde yüzey suyu örnekleri alındı (Şekil 13). Örnekleme istasyonlarına ait koordinat bilgileri Tablo 1’de sunuldu.



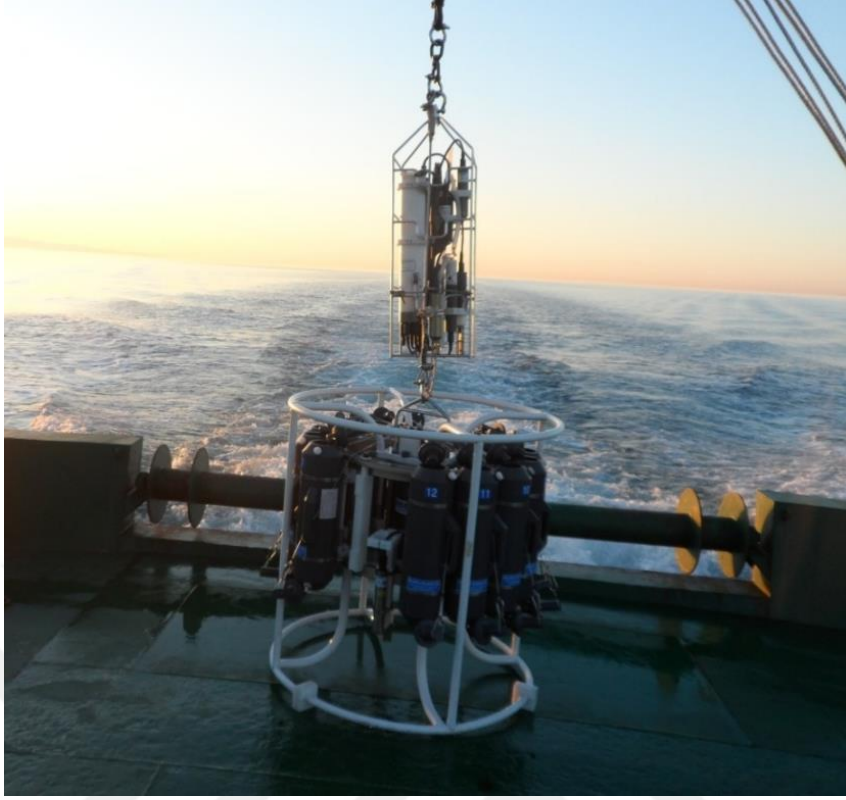
Şekil 13. Örnekleme istasyonları.

Tablo 1. Örnekleme istasyonlarına ait derinlik ve koordinatlar.

İstasyon Adı	Derinlik (m)	Enlem	Boylam
G2	650	41°01'51''K	41°01'51''D
G8	1300	41°06'07''K	38°34'39''D
T2	400	41°10'24''K	39°25'23''D
T8	500	41°15'37''K	39°21'07''D
T15	1500	41°21'04''K	39°15'27''D
Ç2	400	40°59'44''K	40°14'27''D
Ç8	750	41°04'02''K	40°07'46''D
P2	450	41°14'27''K	40°54'32''D
P8	1500	41°19'28''K	40°49'09''D
P15	1700	41°24'33''K	40°42'52''D
K2	120	41°31'48''K	41°30'29''D
K8	350	41°35'11''K	40°23'42''D

2.1.2. Deniz Çalışmaları

Deniz çalışmalarında Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Trabzon Su Ürünleri Merkez Araştırma Enstitüsü bünyesinde bulunan “R/V SÜRAT ARAŞTIRMA I” ve Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi’ne ait “R/V KARADENİZ ARAŞTIRMA” araştırma gemileri kullanılmıştır. Deniz suyu örnekleri yüzeyden SBE 32 Carousel 12 şişeli su örnekleme cihazı ile alınmıştır (Şekil 14).



Şekil 14. SBE 25 CTD prob ve SBE 32 Carousel 12 şişeli örnekleme cihazı.

2.2. Pigmentlerin HPLC-DAD Analizleri

2.2.1. Örneklerden Pigmentlerin Ekstraksiyonu

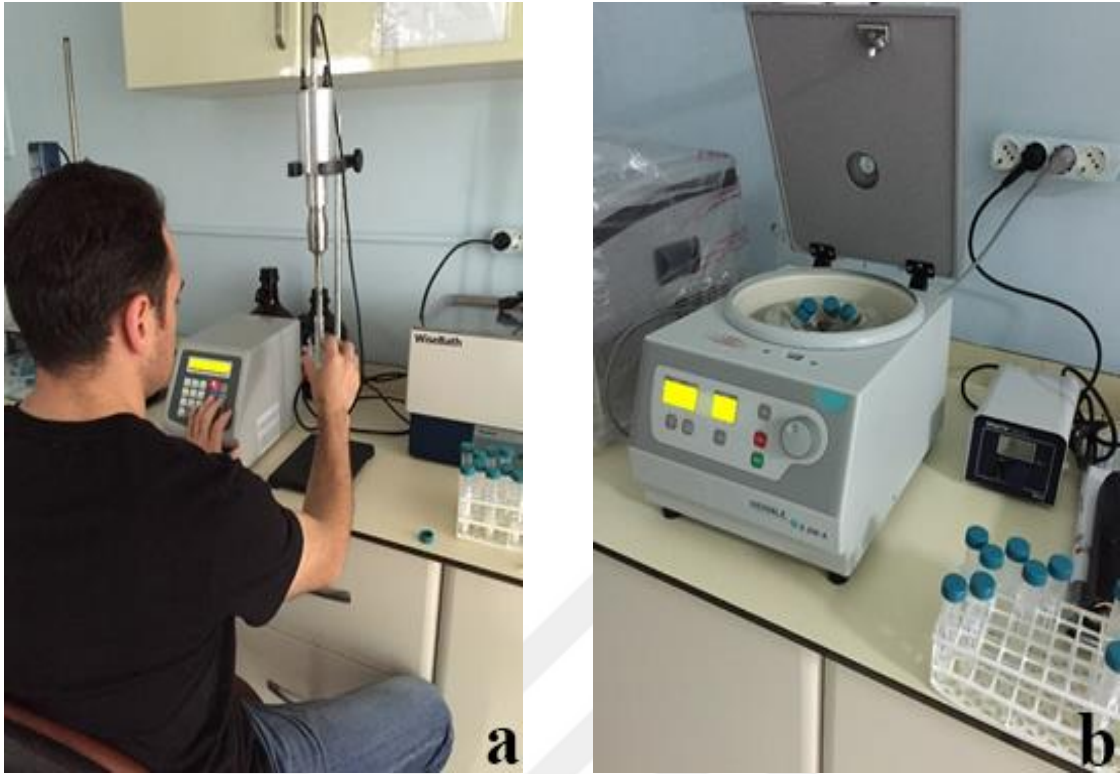
HPLC ile pigment analizleri Mantoura ve Llewelyn (1983)'ün önerdiği yöntemle göre yapılmıştır. İstenilen derinlikten alınan deniz suyu örnekleri (1 L) koyu renkli polietilen şişelere alındıktan sonra düşük vakum altında (0,5 atm den daha az) 47 mm çaplı GF/F filtrelerden süzölmüştür (Şekil 15). Daha sonra filtreler analiz aşamasına kadar sıvı azot içerisinde (-196°C) muhafaza edilmiştir (Şekil 16). Analiz öncesi GF/F filtreler % 90'lık 5 ml “HPLC saflığında” aseton içerisine konularak ekstraksiyon işlemi yapılmıştır. Hücrelerin parçalanması ultrasonikatör (1 dakika için 60 Hz) yardımı ile sağlanarak ekstraksiyon hızlandırılmıştır (Şekil 17a). Ekstraksiyon sonrası örnekler bir gece karanlık ortamda buzdolabında (+4°C) muhafaza edilerek ekstraksiyonun daha iyi olması sağlanmıştır. Daha sonra örnekler analiz öncesinde 3500 rpm devirde 10 dakika süreyle santrifüj edilerek hücresel parçaların ortadan kalkması sağlanmıştır (Şekil 17b).



Şekil 15. Pigment analizi için deniz suyu örneklerinin GF/F filtrelerden süzülmesi.



Şekil 16. GF/F filtrelerin sıvı azot içerisinde muhafazası.



Şekil 17. Analiz öncesi ekstraksiyon (a) ve örneklerin santrifüj edilmesi (b).

2.2.2. HPLC-DAD Koşulları

HPLC analizleri C8 kolon (Thermo Hypersil MOS-2 C8; 150 x 4,6 mm; 3 μ m particle size; 120Å pore size ve %6,5 carbon loading) ve DAD (Diode Array Dedektör) dedektör kullanılarak RTEÜ Su Ürünleri Fakültesi'nde bulunan SHIMADZU marka HPLC cihazı ile gerçekleştirilmiştir (Şekil 18). Analiz için, ekstrakt içerisinde 500 μ l örnek alınarak 0,2 μ m lik millipore filtrelerden süzülüp ve 500 μ l 1M Amonyum Asetat iyon çözeltisiyle karıştırılmıştır. Otomatik örnekleyici yardımıyla alınan 100 μ l tamponlu ekstrakt HPLC sistemine enjekte edilerek analiz başlatılmıştır. Pigmentlerin lineer eğimli çift mobil faz sistem kullanılarak ayrılması sağlanmıştır. Mobil fazlar metanol ve 1 M amonyum asetattan (80:30 v/v) oluşan mobil faz A ve % 100 metanol'den oluşan mobil faz B'den oluşmaktadır. Pigmentlerin pik alanları 1 ml/dk'lık düşük akım altında lineer eğimle belirlenmiştir (dakika, % mobil faz A, % B mobil faz): (0; 75; 25), (1; 50; 50), (20; 30; 70), (25; 0; 100), 32; 0; 100). Analiz sonrası verilerin değerlendirilmesi LC solution yazılımı ile yapılmıştır.

Pigment konsantrasyonları aşağıdaki denkleme göre hesaplanmıştır;

$$C_p = \frac{A_p \times V_{ext} \times 10}{B \times V_{flt} \times V_{inj} \times 1000 \times R_f} \quad (15)$$

C_p (μgL^{-1}) = Pigment konsantrasyonu,

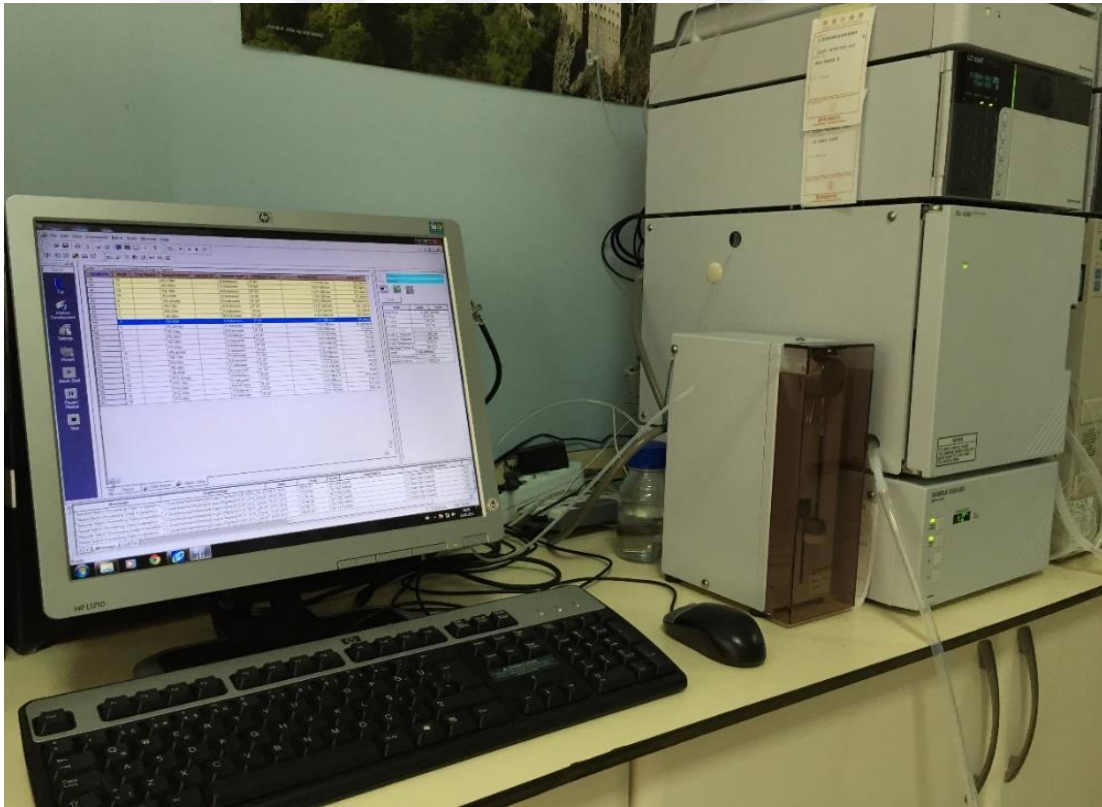
A_p (mAU*s) = Pik alanı,

R_f (ngmAU $^{-1}$) = Kalibrasyon eğrisinin eğimi (ng kolon $^{-1}$),

V_{flt} (l) = Süzülen su hacmi,

V_{ext} (ml) = Ekstraksiyon için kullanılan çözücü hacmi,

V_{inj} (μl) = Kromatografi sistemine enjekte edilen örnek hacmi, B= Tampon seyreltme faktörü.



Şekil 18. Örneklerin HPLC-DAD ile analiz aşaması.

2.2.3. Standartlar, Validasyon ve Kalibrasyon

HPLC-DAD sistemi her pigment için ticari standartlar (klorofil *a*, *b*: Sigma Kolonu; klorofil *c*2, klorofil *c*3, perid, 19-but, fuco, 19 hex, diadinoxanthin, allo, lutein, zeaxanthin, divinil klorofil-*a* ve β karoten: VKI, Danimarka) kullanılarak kalibre edilmiştir. Klorofil-*a* ve marker pigmentler için belirleme sınırı 0,005-0,007 $\mu\text{g/l}$ dir.

2.3. Pigmentlerin HPLC-DAD ile Ayırma Ölçütlerinin Hesaplanması

Ayırma ölçütleri peridinin, 19-butanoloksifukoksantin, fukoksantin, 19-heksanoiloksifukoksantin, alloksantin, zeaxantin, klorofil-*a* ve klorofil-*b* standart bileşiklerinin karışımlarının HPLC-DAD ile analizi sonucunda için elde edilen kromatogramdan hesaplanmıştır. Herbir standardın kromatogramda belirlenen piklerine ait alıkonma zamanı ve pik taban genişlikleri kullanılarak çözünürlükleri hem basitçe yalnız alıkonma zamanı ve pik genişliğinden (R) hem de kolon etkinliği, seçicilik ve alıkonma faktörü kullanılarak (R_s) belirlenmiştir.

2.4. Fitoplankton Boy Grupları (FBG) ve Pigment İndeksleri

HPLC analizleri sonucu elde edilen diyagnostik pigment konsantrasyonları kullanılarak fitoplankton boy gruplarının toplam fitoplanktona yaptığı katkı (%) aşağıdaki eşitlikler yardımıyla hesaplanmıştır (Uitz vd., 2006);

$$\Sigma DP_w = 1.41 \cdot [\text{Fuc}] + 1.41 \cdot [\text{Per}] + 1.27 \cdot [\text{Hex-fuc}] + 0.35 \cdot [\text{But-fuc}] + 0.60 \cdot [\text{Allo}] + 1.01 \cdot [\text{TChlb}] + 0.86 \cdot [\text{Zea}] \quad (16)$$

$$f_{\text{piko}} = (1.01 \cdot [\text{TChlb}] + 0.86 \cdot [\text{Zea}]) / \Sigma DP_w \quad (17)$$

$$f_{\text{nano}} = (1.27 \cdot [\text{Hex-fuco}] + 0.35 \cdot [\text{But-fuco}] + 0.60 \cdot [\text{Allo}]) / \Sigma DP_w \quad (18)$$

$$f_{\text{micro}} = (1.41 \cdot [\text{Fuco}] + 1.41 \cdot [\text{Perid}]) / \Sigma DP_w \quad (19)$$

ΣDP : Diyagnostik pigmentler toplamı

f_{piko} : Pikofitoplankton fraksiyonu ($\leq 0.2-2 \mu m$)

f_{nano} : Nanofitoplankton fraksiyonu ($2-20 \mu m$)

f_{mikro} : Mikrofitoplankton fraksiyonu ($\geq 20 \mu m$)

Yukarıdaki formüller ile hesaplanan boy gruplarının % katkı oranları aşağıdaki formüller yardımıyla belirlenmiştir.

$$\% \text{ Pikofitoplankton} = 100 * f_{piko} \quad (20)$$

$$\% \text{ Nanofitoplankton} = 100 * f_{nano} \quad (21)$$

$$\% \text{ Mikrofitoplankton} = 100 * f_{mikro} \quad (22)$$

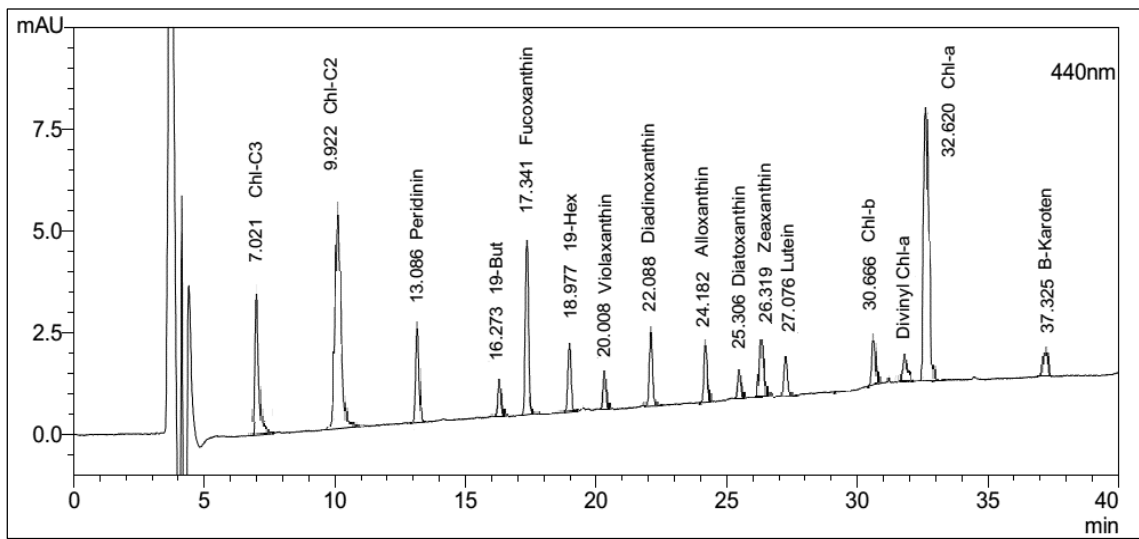
2.5. Verilerin Değerlendirilmesi

Çalışma süresince elde edilen veriler arasında istatistiksel olarak önemli farklılıkları saptamak amacıyla “One Way ANOVA” ve “Tukey” testleri uygulanmıştır. Analiz sonrasında normal dağılım göstermediği tespit edilen gruplar için “Kruskal Wallis” testi uygulanmıştır. (Sokal ve Rohlf, 1969). Parametreler arasındaki ilişkiler “Lineer Regresyon” analizleri ile açıklanmaya çalışılmıştır. İstatistiksel analizler ve grafikler SigmaPlot 11.0 ve ODV 4 paket programlarıyla yapılmıştır.

3. BULGULAR

3.1. Pigmentlerin HPLC-DAD ile Ayırma Ölçütleri

HPLC-DAD kullanılarak onaltı adet pigment için piklerin alıkonma zamanı ve taban genişlikleri kullanılarak ayırma ölçütleri hesaplanmıştır. Pigmentlere ait kromatogram Şekil 19’da verilmiştir. Bu kromatogramda $t_0=3,75$ idi. Tablo 2’de bu fitoplankton standartları için hesaplanan ayırma parametreleri verildi.



Şekil 19. Pigment standartlarına ait karışımın HPLC-DAD kromatogramı

HPLC-DAD koşullarına bağlı olarak gerçekleştirilen analizler sonucunda fitoplankton pigmentlerinden oluşan 16 standart bileşiğin 38 dakika içerisinde uygun ayırımı elde edilmiştir. Ayırımın ölçütleri olan teorik tabaka sayısı ve çözünürlükleri hesaplanarak tablo 2’de verilmiştir. Piklerde taban genişliği ayırımı olumsuz etkileyen önemli bir faktördür. Taban genişliği yüksek olan piklerin hem teorik tabaka sayısı hem de çözünürlüğü düşüktür. Lutein bileşiğine ait pik 458193.61 olarak hesaplanan en yüksek teorik tabaka sayısına sahip piktir ki bu da taban genişliğinin çok küçük olmasına dayanır. En düşük tabaka sayısı olarak klorofil-c3 piki ile hesaplanan 1083.98 tane bulunmuştur. Klorofil-c3 yapısında bulundurduğu 3 kalboksil grubu sayesinde diğer bileşiklere göre en polar yapıda bileşik olduğu için kromatogramda en erken gelen pik olmuştur. Bu da teorik tabaka sayısının düşük çıkmasının bir sebebidir. Ortalama teorik tabaka sayısı 86523.63 tane olup bu değer HPLC ayırmaları için yeterli bir değerdir.

Çözünürlük değerleri incelendiğinde tüm bileşiklere ait piklerin çözünürlüklerinin 1,59'un üzerinde olduğu görülmektedir. Çözünürlük değerinin 1,5'den büyük olması komşu piklerin ayırımının %100'e yakın olduğunu göstermektedir. Bu durumda tüm piklerin %100 ayırımının gerçekleştiği tablo 2'deki verilerden anlaşılmaktadır.

Tablo 2. Fitoplankton standartlarının kromatografik ayırma parametreleri.

Standartlar	t ₀	t _R	W _b	Pik Alanı	N	k	α	R	R _s
Chl-c3	3,75	7,02	0,85	6581	1083,98	0,87			
Chl-c2	3,75	9,92	1,17	15181	1142,83	1,65	1,89	2,86	2,47
Peridinin	3,75	13,09	0,50	3634	10915,87	2,49	1,51	3,78	6,32
19-But	3,75	16,27	0,29	534	51082,28	3,34	1,34	8,08	11,07
Fukoksantin	3,75	17,34	0,46	9130	22837,20	3,63	1,09	2,86	2,33
19-Hex	3,75	18,98	0,48	3296	25008,79	4,06	1,12	3,48	3,41
Violaksantin	3,75	20,01	0,31	504	66650,58	4,34	1,07	2,61	3,33
Diadionoksantin	3,75	22,09	0,63	3928	19730,20	4,89	1,13	4,43	3,31
Alloksantin	3,75	24,18	0,39	3048	60271,50	5,45	1,11	4,09	5,31
Diatoksantin	3,75	25,31	0,27	460	143729,02	5,75	1,06	3,40	4,21
Zeaksantin	3,75	26,32	0,40	1107	67569,19	6,02	1,05	3,01	2,50
Lutein	3,75	27,08	0,16	234	458193,61	6,22	1,03	2,68	4,73
Chl-b	3,75	30,67	0,31	2280	157585,87	7,18	1,15	15,31	11,62
diviniyl Chl-a	3,75	31,86	0,34	640	139652,35	7,50	1,04	3,67	3,50
Klorofil-a	3,75	32,62	0,48	22614	73893,36	7,70	1,03	1,86	1,59
β -Karoten	3,75	37,33	0,51	2262	85031,47	8,96	1,16	9,49	9,19

HPLC yöntemiyle pigmentlerin ayırma parametrelerinin deniz suyu örneklerindeki değerlerinin değişkenliğini incelemek için Kasım 2014, Mayıs 2015 ve Ağustos 2015 dönemlerinin yüzey sularının HPLC-DAD kromatogramlarından yararlanıldı. Kromatogramda ilgili pikin taban genişliği ve alıkonma zamanı kullanılarak ayırma parametreleri hesaplandı. Piklerin taban genişliklerinin büyük olması kolon etkinliği ve dolayısıyla çözünürlüğün düşük olduğunun göstergesidir. Taban genişliği elüsyon çözeltilerinin içeriği, hareketli fazın akış hızı, kolon materyali ve kolon sıcaklığı gibi parametrelerin iyi seçimi ile iyileştirilebilir. Bu tez çalışmasında standart pigmentlerin uygun ayırımı elde edildiği için taban genişliklerinin daha fazla daraltılmasına ihtiyaç duyulmadı. Ayrıca deniz suyu örneklerinin HPLC analizlerinin ayırma parametrelerinin, standart pigmentlerle elde edilen değerlerle yakın olup olmadığının araştırılması için 3 temsili örnek seçilerek kromatogramları incelendi. Elde edilen değerler tablo 3-5 da verildi.

Ayırma parametrelerinden teorik tabaka sayısı (N) yani kolon etkinliği değeri pikin alıkonma zamanı ve taban genişliğine bağlıdır. Öte yandan seçicilik faktörü (α) ise komşu piklerin alıkonma faktörlerine (k) bağlıdır. Çözünürlük değeri de bu üç değer in toplam etkilerini içermektedir. Yani çözünürlük komşu piklerden ne derece ayrılmanın olduğunun yansıttığı için komşu piki bulunmayan pikler için hesaplanamaz. Seçilen 3 aya ait tablolar incelendiğinde, örnekte tespit edilmeyen piklerin ayırma parametreleri hesaplanamazken bu piklere komşu olan piklerin de seçicilik faktörü ve çözünürlüğünün hesaplanamadığı görülmektedir (Tablo 3-5). Lutein bileşiğinin standardına ait pik 458193,61 olarak hesaplanan en yüksek teorik tabaka sayısına sahip iken Mayıs 2015 yüzey suyu örneğinde 167394,38 ve Ağustos 2015 yüzey suyu örneğinde ise 114785,44 olarak kolon etkinliğinde %50 den fazla düşüş gözlemlendi. Pik alanlarının yani konsantrasyonun artışı ile pik taban genişliklerinde artış beklenen bir durumdur ve bu da teorik taban sayısı ve dolayısıyla çözünürlüğü düşürmektedir.

Tablo 3. Kasım-14 Yüzey suyu fitoplankton için ayırma parametreleri.

Pigment	t_R	W_b	Pik alanı	N	k	α	R	R_s
Chl-c3	7,09	0,37	476	5746,78	0,89			
Chl-c2	9,99	0,42	2237	9223,39	1,66	1,87	7,34	6,97
Peridinin	13,18	0,39	2331	17896,19	2,51	1,51	7,87	8,09
19-But	—	—	—	—	—	—	—	—
Fukoksantin	17,44	0,41	3393	29672,40	3,65	ND	ND	ND
19-Hex	19,07	0,38	1983	39443,62	4,09	1,12	4,12	4,23
Violaksantin	—	—	—	—	—	—	—	—
Diadionoksantin	22,16	0,33	2000	72162,24	4,91	—	—	—
Alloksantin	24,25	0,31	1175	97900,35	5,47	1,11	6,52	6,73
Diatoksantin	25,36	0,25	280	171402,76	5,76	1,05	4,00	4,53
Zeaksantin	26,36	0,28	553	144938,26	6,03	1,05	3,85	3,63
Lutein	—	—	—	—	—	—	—	—
Chl-b	30,67	0,24	273	272599,52	7,18	—	—	—
diviniyl Chl-a	—	—	—	—	—	—	—	—
Klorofil-a	32,60	0,41	7555	103145,39	7,70	—	—	—
β -Karoten	37,25	0,42	622	128308,62	8,94	1,16	11,33	11,19

Luteinin Ağustos 2015 örneğinin miktarı pik alanından da anlaşılacağı gibi standarda göre 3,16 kat daha yüksektir. Pik alanındaki bu artışın kolon etkinliğinin de 3,99 kat düşüşüne neden olduğu görülmektedir. Öte yandan Mayıs 2015 örneğindeki luteinin pik alanının, standart luteinin pik alanına çok yakın değer de olmasına rağmen kolon etkinliğinin 2,73 kat düşük olmasının örnekteki safsızlıklardan ileri gelebileceği düşünülmektedir. Klorofil a için elde edilen teorik tabaka sayılarına bakıldığında,

standardın konsantrasyonunun örneklerden daha yüksek olmasından dolayı örneklerdeki pikler ile hesaplanan kolon etkinliğinin standarda göre çok daha yüksek olması beklenen bir durumdur. Diadinoksantin tablo değerleri incelendiğinde de Ağustos 2015’ de en düşük pik alanı (262) ve en yüksek kolon etkinliğine (170097,33) sahip olduğu görülmektedir.

Tablo 4. Mayıs 2015 Yüzey suyu fitoplankton için ayırma parametreleri

Pigment	t _R	W _b	Pik alanı	N	k	α	R	R _s
Chl-c3	—	—	—	—	—	—	—	—
Chl-c2	—	—	—	—	—	—	—	—
Peridinin	—	—	—	—	—	—	—	—
19-But	—	—	—	—	—	—	—	—
Fukoksantin	—	—	—	—	—	—	—	—
19-Hex	18,44	0,35	359	43885,49	3,92	—	—	—
Violaksantin	20,03	0,37	1109	46133,97	4,34	1,11	4,40	4,27
Diadionoksantin	23,33	0,34	1266	74905,75	5,22	1,20	9,25	9,69
Alloksantin	—	—	—	—	—	—	—	—
Diatoksantin	—	—	—	—	—	—	—	—
Zeaksantin	26,44	0,25	262	186299,70	6,05	—	—	—
Lutein	27,31	0,27	287	167394,38	6,28	1,04	3,41	3,27
Chl-b	—	—	—	—	—	—	—	—
diviniyl Chl-a	—	—	—	—	—	—	—	—
Klorofil-a	33,39	0,29	1086	215064,06	7,91	—	—	—
β -Karoten	—	—	—	—	—	—	—	—

Tablo 5. Ağustos 2015 Yüzey suyu fitoplankton için ayırma parametreleri

Pigment	t _R	W _b	Pik alanı	N	k	α	R	R _s
Chl-c3	—	—	—	—	—	—	—	—
Chl-c2	—	—	—	—	—	—	—	—
Peridinin	—	—	—	—	—	—	—	—
19-But	—	—	—	—	—	—	—	—
Fukoksantin	18,21	0,44	809	27785,91	3,86	—	—	—
19-Hex	—	—	—	—	—	—	—	—
Violaksantin	—	—	—	—	—	—	—	—
Diadionoksantin	23,10	0,22	262	170097,33	5,16	—	—	—
Alloksantin	—	—	—	—	—	—	—	—
Diatoksantin	—	—	—	—	—	—	—	—
Zeaksantin	—	—	—	—	—	—	—	—
Lutein	27,10	0,32	741	114785,44	6,23	—	—	—
Chl-b	—	—	—	—	—	—	—	—
diviniyl Chl-a	—	—	—	—	—	—	—	—
Klorofil-a	33,13	0,36	923	133235,06	7,84	—	—	—
β -Karoten	38,13	0,24	148	421228,62	9,17	1,17	16,74	21,30

3.2. Pigment Kompozisyonu

Çalışma dönemi içerisinde pigment kompozisyonu ve konsantrasyonu önemli değişimler göstermiştir (ANOVA, $p < 0.05$). Öne çıkan pigmentler başta klorofil-a olmak üzere genellikle diyagnostik ve fotosentetik karakterdeki pigmentler olurken fotoprotektan karakterdeki pigmentlerin çok düşük konsantrasyonlarda hatta belirleme limitinin altında olduğu dikkat çekmektedir. Bundan dolayı fitoplankton boy gruplarının karakterizasyonunda kullanılan pigmentler ve klorofil-a pigmentine ait HPLC ölçümleri Tespit limiti $< 0,005 \mu\text{g/L}$ olarak sunulmuştur (Tablo 6-9).

Tablo 6. Kasım 2014 dönemine ait HPLC pigment konsantrasyonları.

İstasyon	Mesafe (nm)	Perid	19-But	Fuco	19-Hex	Allo	Zea	Chl-b	Chl-a
Kemalpaşa	2	2,49	<0,005	0,64	0,51	0,53	0,13	0,11	3,23
Pazar	2	2,62	<0,005	0,82	0,49	0,21	0,16	0,20	3,77
Çamburnu	2	2,62	<0,005	0,98	0,72	0,22	0,16	0,46	3,58
Trabzon	2	1,85	0,048	1,00	0,64	0,25	0,13	0,47	2,74
Giresun	2	1,10	<0,005	1,22	0,99	0,11	0,16	0,53	3,73
Kemalpaşa	8	0,60	<0,005	0,39	0,48	0,05	0,12	0,13	2,40
Pazar	8	2,40	<0,005	1,17	0,26	0,21	0,12	0,28	3,12
Çamburnu	8	1,56	<0,005	0,68	0,63	0,18	0,13	0,31	3,47
Trabzon	8	1,31	<0,005	0,71	0,40	0,22	0,08	0,36	3,04
Giresun	8	0,99	<0,005	0,44	0,50	0,07	0,15	0,18	2,49
Pazar	15	1,75	0,081	0,58	0,46	0,15	0,21	0,22	3,20
Trabzon	15	2,47	<0,005	0,17	0,30	0,37	<0,005	0,80	2,14

Fitoplankton biyomasının bir göstergesi olan ve temel fotosentetik pigment olarak değerlendirilen klorofil-a kıyı sularda genellikle yüksek konsantrasyonlarda olup açığa doğru gidildikçe düşüş göstermiştir. İstasyonlardaki konsantrasyonu genel olarak 0,18-3,81 $\mu\text{g/L}$ arasında değişim göstermiştir. Klorofil-a pigmentinin yanı sıra öne çıkan diğer marker pigmentler sırasıyla; peridinin (0,15-2,62 $\mu\text{g/L}$), 19-heksanoloksifukoksantin (0,04-1,54 $\mu\text{g/L}$), fukoksantin (0,03-1,28 $\mu\text{g/L}$), zeaksantin (0,06-0,81 $\mu\text{g/L}$), klorofil-b (0,11-0,80 $\mu\text{g/L}$) ve alloksantin (0,01-0,53 $\mu\text{g/L}$) pigmentleri olmuştur. Diğer marker pigmentler ise daha düşük konsantrasyonlarda tespit edilmiş ve hatta bazı mevsimlerde ise hiç tespit edilememiştir.

Örnekleme dönemleri açısından bir değerlendirme yapıldığında Kasım 2014 (sonbahar) ve Şubat 2015 (kış) dönemlerinin pigment kompozisyonu açısından daha zengin olduğu dikkat çekerken bu dönemleri Mayıs 2015 (ilkbahar) ve Ağustos 2015 (yaz) dönemleri takip etmiştir.

Tablo 7. Şubat 2015 dönemine ait HPLC pigment konsantrasyonları.

İstasyon	Mesafe (nm)	Perid	19-But	Fuco	19-Hex	Allo	Zea	Chl-b	Chl-a
Kemalpaşa	2	0,64	<0,005	<0,005	1,54	0,43	0,26	0,58	3,32
Pazar	2	0,35	<0,005	0,09	0,22	0,36	0,09	0,52	1,93
Çamburnu	2	1,28	<0,005	0,79	0,07	0,45	<0,005	0,16	3,11
Trabzon	2	0,46	<0,005	0,83	0,10	0,25	<0,005	0,25	2,60
Giresun	2	0,39	<0,005	0,51	0,08	0,31	<0,005	0,34	2,38
Kemalpaşa	8	0,53	<0,005	<0,005	1,52	0,41	0,2	0,51	3,26
Pazar	8	1,35	<0,005	<0,005	0,46	0,21	0,2	0,40	2,23
Çamburnu	8	0,28	<0,005	0,51	0,12	0,34	0,1	0,18	3,14
Trabzon	8	0,69	<0,005	0,63	0,07	0,37	<0,005	0,30	2,41
Giresun	8	0,72	<0,005	1,28	0,32	<0,005	0,15	0,66	3,81
Pazar	15	0,71	<0,005	<0,005	0,29	0,15	0,10	0,29	1,94
Trabzon	15	<0,005	<0,005	0,65	<0,005	0,28	<0,005	0,14	2,71

Bölgesel olarak bir değerlendirme yapıldığında ise 2 deniz mili mesafesinde yer alan istasyonlar genel anlamda yüksek pigment konsantrasyonu ile karakterize olurken dönemsel olarak 8 deniz mili mesafesinde yer alan istasyonlar öne çıkmıştır. 15 deniz mili mesafesinde yer alan istasyonlar ise daha düşük konsantrasyonlarla temsil edilmiştir.

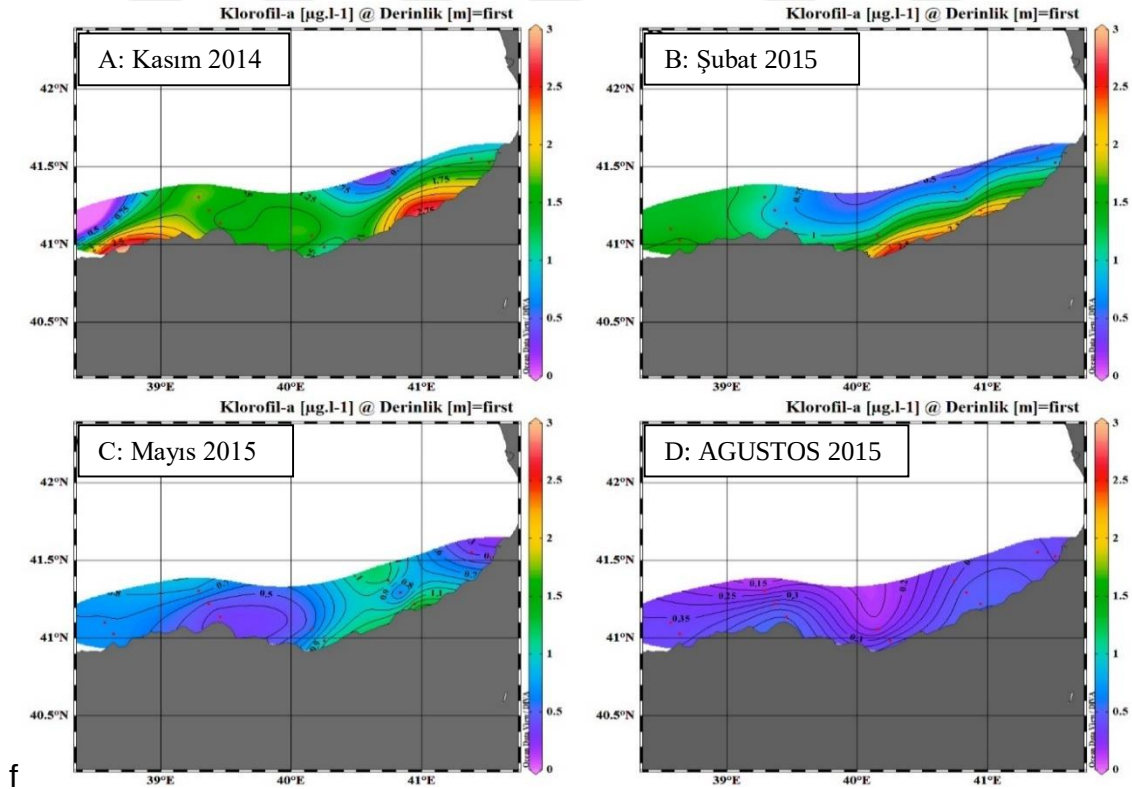
Tablo 8. Mayıs 2015 dönemine ait HPLC pigment konsantrasyonları.

İstasyon	Mesafe (nm)	Perid	19-But	Fuco	19-Hex	Allo	Zea	Chl-b	Chl-a
Kemalpaşa	2	0,15	0,101	0,16	0,37	0,06	0,24	0,13	1,21
Pazar	2	0,39	<0,005	0,30	0,09	<0,005	0,08	0,12	0,69
Çamburnu	2	<0,005	<0,005	0,33	0,30	0,097	<0,005	0,48	1,53
Trabzon	2	0,37	<0,005	0,16	0,45	0,14	0,15	0,15	1,83
Giresun	2	0,47	<0,005	0,11	0,11	0,16	<0,005	0,22	1,09
Kemalpaşa	8	0,62	<0,005	0,09	0,05	<0,005	0,18	<0,005	0,90
Pazar	8	<0,005	<0,005	0,03	0,10	0,04	0,29	0,11	3,10
Çamburnu	8	0,92	<0,005	<0,005	0,29	<0,005	0,12	0,26	1,70
Trabzon	8	0,27	<0,005	<0,005	0,10	0,28	0,12	0,16	1,50
Giresun	8	<0,005	<0,005	0,52	0,12	0,23	0,06	0,17	0,16
Pazar	15	0,39	0,036	0,70	0,56	<0,005	0,24	0,15	2,60
Trabzon	15	0,34	<0,005	<0,005	0,08	<0,005	0,07	<0,005	0,92

Tablo 9. Ağustos 2015 dönemine ait HPLC pigment konsantrasyonları.

İstasyon	Mesafe (nm)	Perid	19-But	Fuco	19-Hex	Allo	Zea	Chl-b	Chl-a
Kemalpaşa	2	0,191	<0,005	0,42	0,12	0,09	0,81	<0,005	2,42
Pazar	2	0,200	<0,005	0,20	<0,005	<0,005	0,22	<0,005	0,58
Çamburnu	2	<0,000	<0,005	0,50	0,07	<0,005	0,74	<0,005	1,91
Trabzon	2	<0,005	<0,005	0,13	0,04	<0,005	0,16	<0,005	0,18
Giresun	2	<0,005	<0,005	0,16	<0,005	0,01	0,35	<0,005	0,47
Kemalpaşa	8	<0,005	<0,005	0,69	0,06	<0,005	0,08	<0,005	2,26
Pazar	8	<0,005	<0,005	0,22	0,07	<0,005	0,19	<0,005	0,77
Çamburnu	8	<0,005	<0,005	0,33	0,08	<0,005	0,55	<0,005	1,06
Trabzon	8	<0,005	<0,005	0,11	<0,005	0,01	0,48	<0,005	0,46
Giresun	8	1,60	<0,005	0,35	0,14	<0,005	0,50	<0,005	1,30
Pazar	15	0,36	<0,005	0,19	0,04	0,04	0,25	<0,005	0,86
Trabzon	15	0,17	<0,005	0,20	0,18	<0,005	0,47	<0,005	1,09

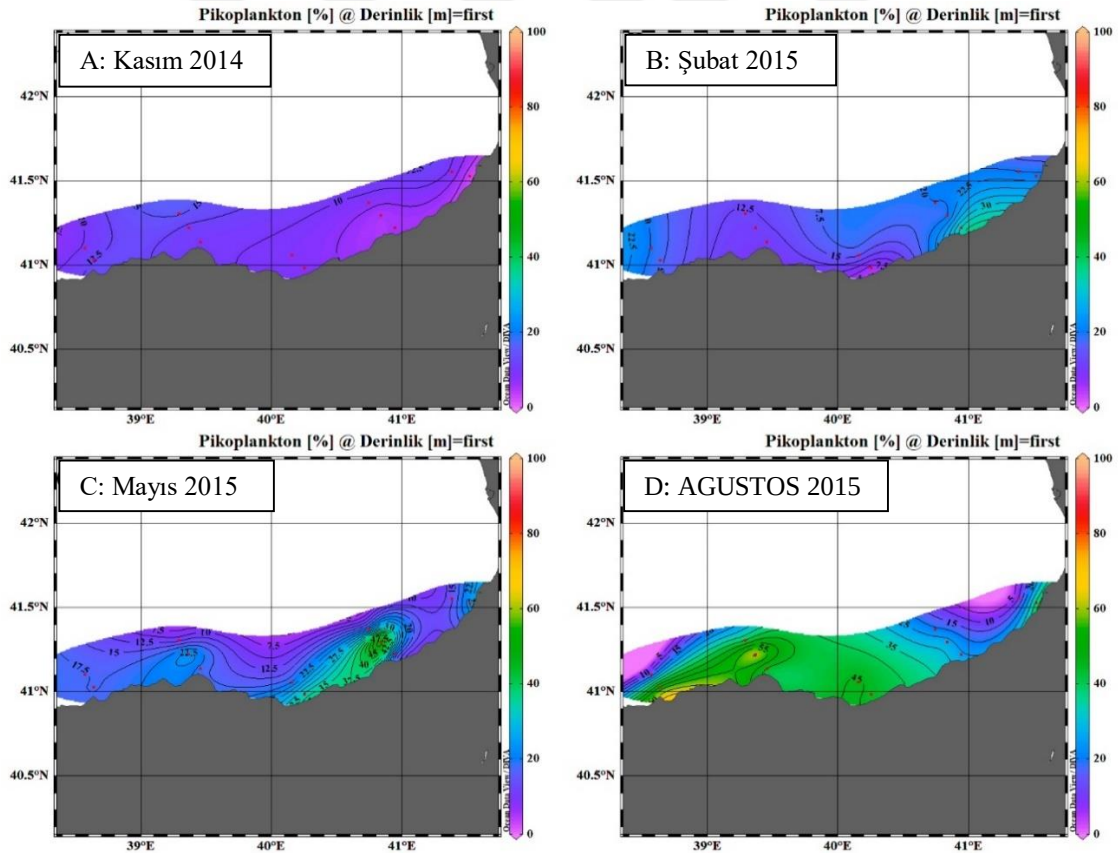
In-situ klorofil-a profilleri değerlendirildiğinde Kasım 2014, Şubat 2015, Mayıs 2015 ve Ağustos 2015 örnekleme dönemlerinde konsantrasyonları sırasıyla 0,52-2,66 $\mu\text{g/L}$; 0,66-2,49 $\mu\text{g/L}$; 0,37-1,32 $\mu\text{g/L}$ ve 0,16-0,51 $\mu\text{g/L}$ arasında değiştiği görülmektedir (Şekil 20).

**Şekil 20.** Örnekleme istasyonlarına ait yüzey in-situ klorofil-a konsantrasyonları.

Grafiklerden de anlaşılacağı üzere Kasım 2014 ve Şubat 2015 dönemleri bariz bir şekilde yüksek klorofil-a konsantrasyonu ile karakterize olmuştur. Klorofil-a haritasına bakıldığında kıyusal bölgelerin daha üretken olduğu ve istasyonlar açısından ise sonbahar mevsiminde Pazar ve Giresun istasyonları, kış döneminde ise Pazar ve Çamburnu istasyonları yüksek klorofil-a ile karakterize olduğu görülmüştür. Alansal bir değerlendirme yapıldığında ise kıyusal bölgelerin (2 mil) klorofil-a açısından daha zengin olduğu ve yüzey suyu ortalama klorofil-a konsantayonlarının 2, 8 ve 15 mil için sırasıyla 0,37-2,67 $\mu\text{g/L}$, 0,16-2,02 $\mu\text{g/L}$ ve 0,17-1,79 $\mu\text{g/L}$ arasında değiştiği tespti edilmiştir.

3.3. Fitoplankton Boy Grupları

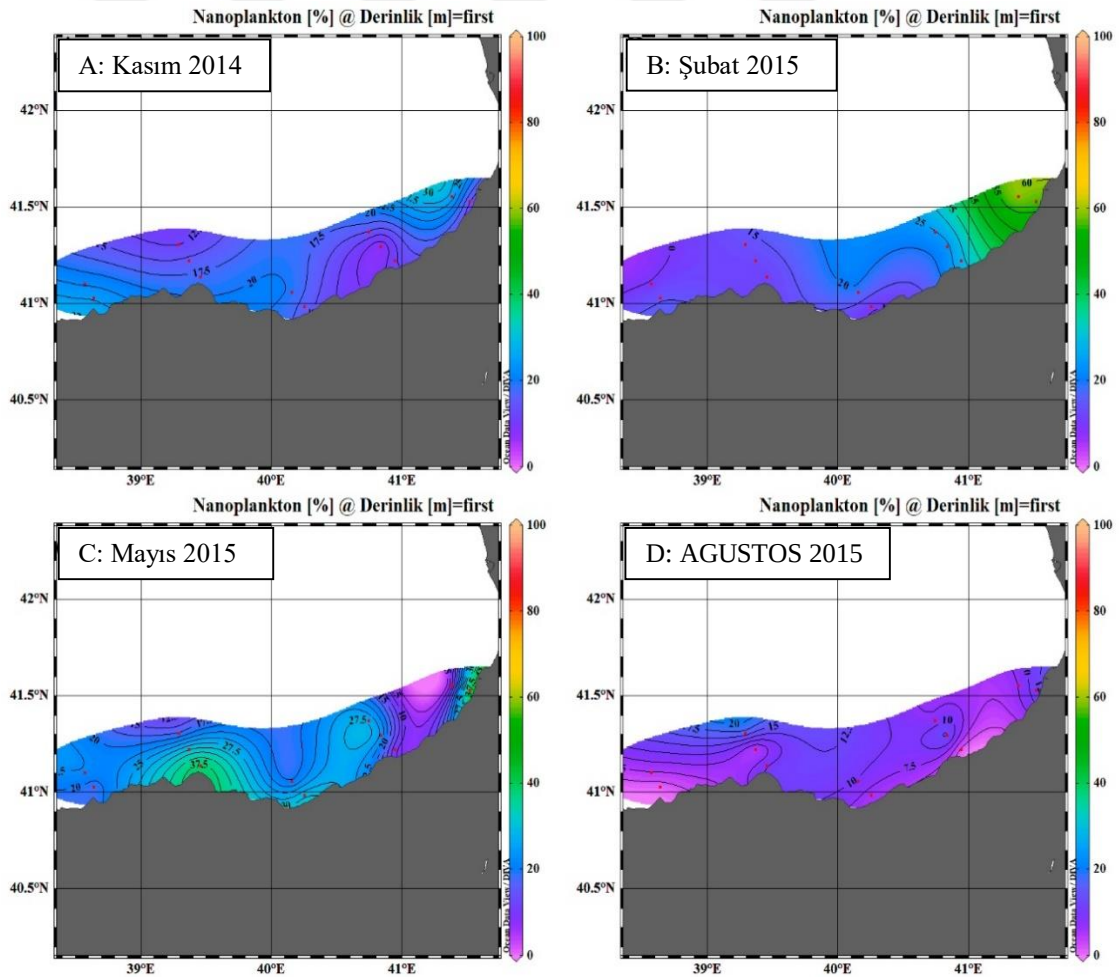
Diagnostik pigmentler kullanılarak hesaplanan fitoplankton boy gruplarının (piko-, nano- ve mikrofitoroplankton) toplam fitoplanktona yaptıkları katkının (%) mevsime bağlı değişimi şekil 21-23'te sunulmuştur.



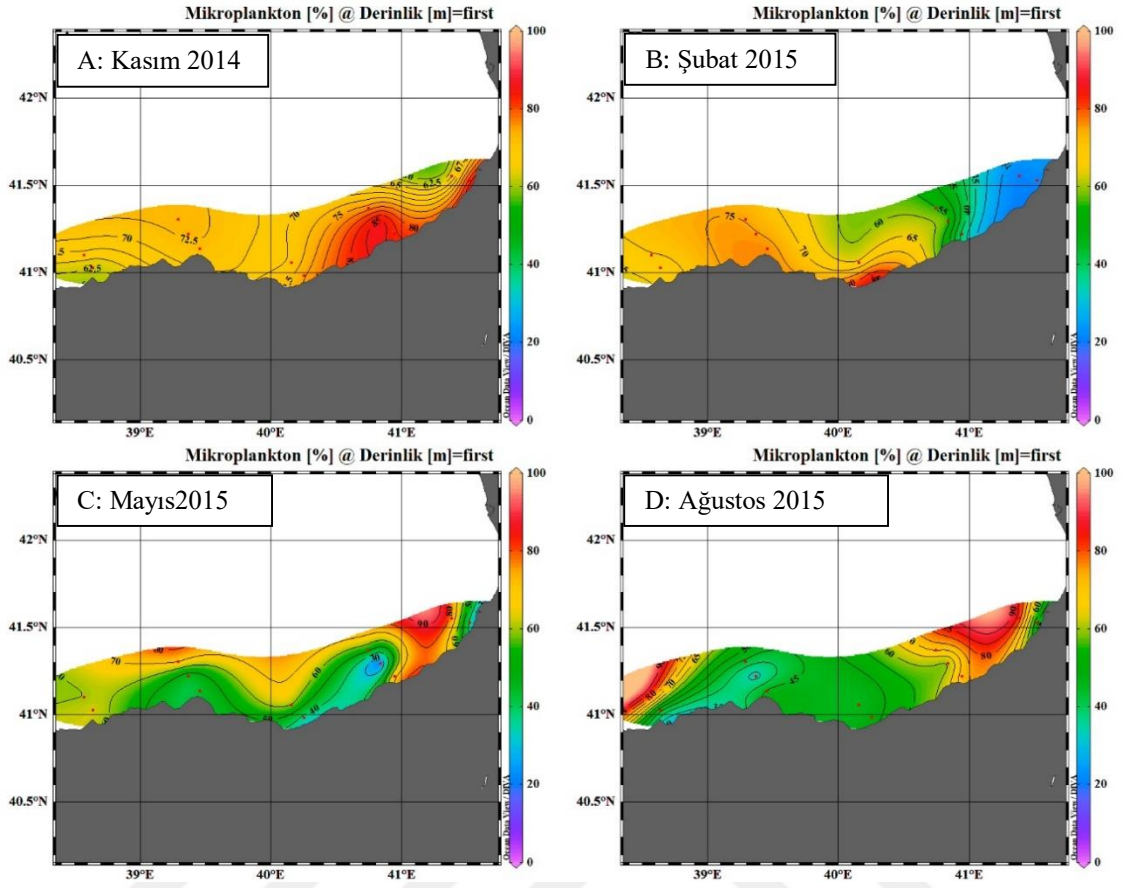
Şekil 21. Örnekleme istasyonlarına ait yüzey pikoplankton katkı (%) oranları.

Grafikler değerlendirilğinde toplam fitoplanktona katkısı en fazla olan grup mikrofitoplankton (%8-88) olmuştur. Nanofitoplankton (%1-60) en fazla katkı yapan ikinci grup olurken, pikofitoplankton (%3-60) en az katkı yapan grup olmuştur.

Mevsimsel bir değerlendirme yapıldığında, pikofitoplanktonun katkısı sonbahar ve kış döneminde %35'in altında kalmıştır. İlkbahar mevsiminde artmaya başlayan pikofitoplankton katkısı yaz mevsiminde en yüksek seviyesine ulaşmıştır (Şekil 21). Orta derecede katkısı olan nanofitoplanktonik gruplar, en fazla katkıyı kış (%60) ve ilkbahar (%41) mevsimlerinde yapmıştır (Şekil 22). Bölgede en fazla oranda temsil edilen mikrofitoplankton katkısı mevsimsel benzerlikler gösterirken bazı mevsimlerde bölgesel düşüşler seriglemiştir (Şekil 23).



Şekil 22. Örnekleme istasyonlarına ait yüzey nanoplankton katkı (%) oranları.



Şekil 23. Örnekleme istasyonlarına ait yüzey mikroplankton katkı (%) oranları.

4. TARTIŞMA ve SONUÇLAR

Güneydoğu Karadeniz’de pigment analizinde kullanılan kromatografik ayırma parametreleri ve buna bağlı olarak hesaplanan fitoplankton boy grupları ve pigment kompozisyonunun belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen bu çalışma Kasım 2014 ve Ağustos 2015 tarihleri arasında mevsimsel olarak yürütülmüştür.

4.1. Pigment Dinamiği

Fitoplankton biyomasının bir göstergesi olan klorofil-*a*’nın Karadeniz’deki dağılımı Tablo 10’da sunulmuştur. Karadeniz geneli için 1964-1986 yılları arasında ortalama klorofil-*a* konsantrasyonu $0,15 \pm 0,04$ µg/L olarak rapor edilmiştir (Yunev vd., 2002). Başka bir çalışmada ise Karadeniz’in geneli için ortalama klorofil-*a* değerlerinin $0,59-0,69$ µg/L arasında değiştiği bildirilmiştir (Kopelevcih vd., 2004). Yılmaz vd. (1998) Karadeniz’in Anadolu sahilleri için klorofil-*a* konsantrasyonunun 1995-1996 yılları için $0,1-1,5$ µg/L arasında değiştiğini bildirmişlerdir. Başka bir çalışmada ise Türkiye kıyıları için 1996-1998 döneminde yüzey suyu klorofil-*a* değerlerinin $0,34-0,42$ µg/L arasında değiştiği bildirilmiştir (Eker-Develi vd., 2003). Ediger vd. (2006) Güneybatı Karadeniz için ortalama klorofil-*a* konsantrasyonun $0,15-1,23$ µg/L arasında olduğunu rapor etmiştir. Ağırbaş (2010) tarafından Güneydoğu Karadeniz’de yürütülen çalışmada ise yüzey suyu klorofil-*a* konsantrasyonu kıyı (2 mil) ve açık (8 mil) istasyonlar için sırasıyla $1,97$ µg/L ve $1,84$ µg/L olarak rapor edilmiştir. Güney Doğu Karadeniz Rize sahillerinde yürütülen başka bir çalışmada ise klorofil-*a* konsantrasyonunu $0,34-2,71$ µg/L arasında değiştiği tespit edilmiştir (Koca, 2014). Türkmen (2016) tarafından Güneydoğu Karadeniz ekosisteminde mevsimsel ölçekte yürütülen çalışmada ise Kasım 2014-Ağustos 2015 dönemi için yüzey suyu ortalama klorofil-*a* konsantrasyonlarının 2, 8 ve 15 mil için sırasıyla $0,37-2,68$ µg/L, $0,16-2,04$ µg/L ve $0,32-1,79$ µg/L arasında değiştiği rapor edilmiştir. Aylık peryotlar halinde yürütülen başka çalışmada ise yüzey suyu klorofil-*a* konsantrasyonları nehir ağzı, kıyı ve açık istasyonlar için sırasıyla $0,51-3,97$ µg/L; $0,16-2,47$ µg/L ve $0,18-3,04$ µg/L arasında değiştiği tespit edilmiştir (Genç, 2018). Karadeniz (2019) tarafından aynı bölgede ancak farklı dönemlerde yürütülen başka bir çalışmada ise yüzey suyu ortalama klorofil-*a* değerleri 2, 8 ve 15 mil için sırasıyla $2,61$ µg/L, $2,56$ µg/L ve $2,23$ µg/L olarak tespit

edilmiştir. Mevcut çalışmada ise yüzey suyu ortalama klorofil-a konsantrasyonları 2, 8 ve 15 mil için sırasıyla 0,37-2,67 µg/L, 0,16-2,02 µg/L ve 0,17-1,79 µg/L arasında değişmiştir.

Tablo 10. Karadeniz’de yürütülen klorofil-a çalışmaları

Bölge	Dönem	Klorofil-a (µg/L)	Referans
Tüm Havza	1964-1986	0,15	Yunev vd., 2002
	1992	0,99	
	1993	0,26	
Tüm Havza	1998-2001	0,59-0,69	Kopelevcih vd., 2004
Ukrayna	1991	0,2-0,6	Krupatkina ve Berseneva, 1995
Güney Kar.	1995-1996	0,1-1,5	Yılmaz vd., 1998
Güney Kar.	Temmuz 1997 ve Eylül 1998	<0,5-1,5	Yayla vd., 2001
Anadolu sahilleri	Haziran-Temmuz 1996	0,34	Eker-Develi vd., 2003
	Mart-Nisan 1998	0,42	
	Eylül 1998	0,40	
Kuzeybatı Kar.	Mayıs-Haziran 2001	0,03-1,92	Yılmaz vd., 2006
Güneybatı Kar.	Mayıs 2001	0,15-1,23	Ediger vd., 2006
Güneydoğu Kar.	Şubat-Aralık 2009		
Güneydoğu Kar.	Kıyı (2 mil), aylık	1,97	Ağırbaş, 2010
Güneydoğu Kar.	Açık (8 mil), aylık	1,84	Ağırbaş, 2010
Güneydoğu Kar.	Kıyı (2 mil), aylık	0,6	Kopuz, 2012
Güneydoğu Kar.	Kıyı (1 mil), aylık	0,34-2,71	Koca, 2014
Güneydoğu Kar.	Kıyı (2 mil), mevsimsel	1,22	Türkmen, 2016
Güneydoğu Kar.	Kıyı (8 mil), mevsimsel	0,81	Türkmen, 2016
Güneydoğu Kar.	Kıyı (15 mil), mevsimsel	0,76	Türkmen, 2016
Güneydoğu Kar.	Nehir Ağzı (0,5 mil), aylık	0,79-3,11	Genç, 2018
Güneydoğu Kar.	Kıyı (5 mil), aylık	0,73-2,78	Genç, 2018
Güneydoğu Kar.	Kıyı (20 mil), aylık	0,67-2,29	Genç, 2018
Güneydoğu Kar.	Kıyı (2 mil), mevsimsel	2,61	Karadeniz, 2019
Güneydoğu Kar.	Kıyı (8 mil), mevsimsel	2,56	Karadeniz, 2019
Güneydoğu Kar.	Kıyı (15 mil), mevsimsel	2,23	Karadeniz, 2019
Güneydoğu Kar.	Kıyı (2 mil), mevsimsel	0,37-2,67	Bu çalışma
Güneydoğu Kar.	Kıyı (8 mil), mevsimsel	0,16-2,02	Bu çalışma
Güneydoğu Kar.	Kıyı (15 mil), mevsimsel	0,17-1,79	Bu çalışma

Bu çalışmadan elde edilen bulgular literatür verileriyle kıyaslandığında özellikle bölgede daha önce yürütülen çalışmalarla uyumluluk gösterdiği ancak Karadeniz'in diğer bölgelerinde yürütülen çalışmalara göre değerlerin yüksek olduğu dikkat daançekmektedir. Tespit edilen bu farklılıklar temelde yöntem farklılıklarından (spektrofotometre, florometre, floresan ölçümleri, HPLC ve uydu oşinografisi vb.) kaynaklanabilceğı gibi bölgesel farklılıklar, örnekleme dönemi farklılığı, örnekleme sıklığı, örnekleme derinliği ve ekosistem koşullar altında değışen fitoplankton kommunité yapısı gibi faktörler de etkili olabilmektedir.

Marker pigmentleri belirlemeye yönelik yürütülen çalışmalar her geçen gün giderek artmaktadır (Tablo 11). Güneybatı Karadeniz'de tek dönemde yürütülen bir çalışmada marker pigmentlerden peridinin (0,03-0,33 µg/L), fukoksantin (0,02-0,18 µg/L) ve 19'-Heksanoloksifukoksantin (0,04-0,19 µg/L) HPLC yöntemi ile belirlenmiş ve fitoplankton hücre bolluğı ile arasındaki korelasyon ortaya konulmuştur (Ediger vd., 2006). Ağırbaş (2010) tarafından Güneydoğı Karadeniz kıyılarında aylık dönemler halinde yürütülen başka bir çalışmada ise peridinin, fukoksantin ve 19'-Heksanoloksifukoksantin konsantrasyonlarının sırasıyla 0,04-0,45 µg/L; 0,06-1,45 µg/L ve 0,04-0,43 µg/L arasında değışim gösterdiği rapor edilmiştir. Koca (2014) tarafından Güneydoğı Karadeniz Rize sahillerinde yüzey suyunda yürütülen başka bir çalışmada ise fotosentetik pigmentlerden diadinoksantin, zeaksantin, klorofil-*b* ve β-Karoten'nin aylık değışimleri ortaya konulmuştur. Artvin-Giresun arasında mevsimsel olarak yürütülen başka bir çalışmada ise pigment kompozisyonu ve pigmente dayalı ftoplankton boy gruplarının katkısı ortaya konulmuştur (Türkmen, 2016). Türkmen (2016) çalışmasında peridinin, fukoksantin, 19-Heksanoloksifukoksantin, zeaksantin ve klorofil-*b* pigment konsantrasyonlarını sırasıyla 0,14-3,48 µg/L; 0,02-2,52 µg/L; 0,02-2,56 µg/L; 0,03-0,09 µg/L ve 0,01-1,67 µg/L arasında değıştiğini rapor etmiştir. Genç (2018) tarafından Güney Doğı Karadeniz'de aylık olarak yürütülen çalışmada fukoksantin, peridinin ve 19-heksanoloksifukoksantin bölgede öne çıkan pigmentler olduğı ve konsantrasyonlarının sırasıyla 0,03-2,94 µg/L, 0,11-2,29 µg/L ve 0,03-1,76 µg/L arasında değıştiğı rapor edilmiştir. Karadeniz (2019) tarafından Güneydoğı Karadeniz'de yürütülen güncel bir çalışmada ise fukoksantin (0,05-2,55 µg/L), peridinin (0,06-2,45 µg/L), 19-heksanoloksifukoksantin (0,02-2,10 µg/L), klorofil-*b* (0,02-1,62 µg/L), 19-butanoloksifukoksantin (0,05-1,40 µg/L),

zeaksantin (0,01-1,16 µg/L), alloksantin (0,01-0,94 µg/L) ve klorofil-c₂ (0,001-0,75 µg/L) öne çıkan pigmentler olmuştur.

Bölgede daha önce yürütülen çalışmalar ile mevcut çalışmadan elde edilen bulgular kıyaslandığında benzerlikler (Genç, 2018; Karadeniz, 2019) olduğu gibi bazı çalışmalardan (Ediger vd., 2006; Ağırbaş, 2010) ise yüksek olduğu tespit edilmiştir. Benzerliklerin görüldüğü çalışmalar genelde aynı bölgede ve aynı örnekleme rejimine sahip çalışmalar olurken, bölgesel olarak farklı karakterde olan su kütlelerinde yürütülen çalışmalarda ise daha düşük değerler elde edilmiştir. İstasyon farklılıklarının yanısıra örnekleme rejimi, örnekleme derinliği, örnekleme dönemi ve ekolojik koşullarda farklı sonuçlar elde edilmesinde etken faktörler arasında değerlendirilmektedir (Ediger vd., 2006).

Tablo 11. Karadeniz’de pigment üzerine yürütülen çalışmalar

Bölge	Per	Fuk	Hex	Diad	Zea	Chl-b	B-Kar	Referans
Güneybatı Karadeniz.	0,03-0,33	0,02-0,18	0,04-0,19	-	-	-	-	Ediger vd., 2006
Güneydoğu Karadeniz	0,04-0,45	0,06-1,45	0,04-0,43	0,01-1,00	0,01-0,77	0,01-0,77	0,01-0,25	Ağırbaş, 2010
Güneydoğu Karadeniz	0,04-0,78	0,07-0,90	0,03-0,57	0,01-0,61	0,02-0,47	0,02-0,47	0,01-0,21	Koca, 2014
Güneydoğu Karadeniz	0,14-3,48	0,02-2,52	0,02-2,56	-	0,03-0,09	0,03-0,09	-	Türkmen, 2016
Güneydoğu Karadeniz	0,11-2,29	0,03-2,94	0,03-1,76	-	0,01-1,21	0,01-2,13	-	Genç, 2018
Güneydoğu Karadeniz	0,06-2,45	0,05-2,55	0,02-2,10	0,01-0,16	0,01-1,16	0,01-1,16	0,01-0,19	Karadeniz, 2019
Güneydoğu Karadeniz	0,15-2,62	0,03-1,28	0,04-1,54	-	0,06-0,81	0,11-0,80	-	Bu çalışma

4.2. Fitoplankton Boy Grupları

Çalışmanın yürütüldüğü dönem içerisinde pigmente dayalı olarak belirlenen fitoplankton boy grupları (FBG)’nın katkı alansal ve zamansal olarak önemli değişimler göstermiştir. Bölgede mikrofıtoplankton (%8-88) öne çıkarken bunu pikofıtoplankton (%3-60) ve nanofıtoplankton (%1-60) takip etmiştir. Dünya’nın farklı bölgelerinde ve Karadeniz’de yürütülen çalışmalar incelendiğinde sonuçların farklılık gösterdiği görülmektedir (Tablo 12). Ocak-Şubat 2005 döneminde Hint Okyanusunda yürütülen bir

çalışmada mikrofitoplankton (%50-90) öne çıkan temel grup olurken bunu nanofitoplankton (%10-50) takip etmiştir (Uitz vd., 2009). Diğer taraftan Atlantik'te yürütülen uzun dönemli başka bir çalışmada ise mikrofitoplanktondan (%50-70) sonra pikofitoplankton (%7-70) katı yapan ikinci grup olmuştur (Brewin vd., 2010).

Karadeniz'de yapılan çalışmalar incelendiğinde; Türkmen (2016) tarafından Kasım 2014-Ağustos 2015 dönemleri arasında Güneydoğu Karadeniz'de yürütülen çalışmada su kolonu içerisinde (fotik bölge) en fazla katkı mikrofitoplankton (%8-93) yaparken nano- ve pikofitoplankton katkısı sırasıyla; %1-92 ve %1-71 arasında değiştiği tespit edilmiştir. Türkmen (2016) bölgede kış ve ilkbahar döneminde mikrofitoplanktonun baskın olduğunu ve yaz mevsiminde yerini pikofitoplanktona bıraktığını tespit etmiştir. Benzer şekilde Güneydoğu Karadeniz'de ancak farklı karakterdeki istasyonlarda FBG belirlemeye yönelik yürütülen bir başka çalışmada bölgede mikrofitoplanktonun (%8-91) baskın grup olurken nano- ve pikofitoplanktonun ise hemen hemen eşit oranlarda katkı yapmıştır (Genç, 2018). Araştırmacı mikrofitoplanktonun nehir ağzına yakın istasyonların tamamında ve açıkta yer alan istasyonlarında ise yüzey sularında baskın olduğunu, nanofitoplanktonun kıyı ve açık suların yüzey tabakalarında ve kısmen fotik bölgenin alt sınırlarında daha fazla katkı yaptığını ve pikofitoplanktonun ise açık istasyonlarda ve yüzey altı derinliklerde daha yüksek oranlarda temsil edildiğini gözlemlemiştir. Karadeniz (2019) tarafından aynı istasyonlarda ancak farklı dönemlerde yürütülen çalışmada ise mikrofitoplankton baskın grup olurken bunu sırasıyla nano-ve pikofitoplankton takip etmiştir. Mevsimsel olarak bölgede mikrofitoplankton sonbahar ve kış döneminde öne çıkarken nanofitoplankton ilkbahar döneminde ve pikofitoplankton yaz döneminde öne çıkmıştır.

Mevcut çalışmadan elde edilen bulgular literatür bulgularıyla kıyaslandığında bölgede daha önce yürütülen çalışmalara ile benzerlik gösterdiği anlaşılmaktadır. Ancak diğer denizlerde yürütülen çalışmalara göre (Brewin vd., 2010; Uitz vd., 2009) farklılıklar bulunmaktadır. Tespit edilen bazı farklılıkların bölgesel (kıyı, açık deniz, okyanus) dönemsel farklılıklar, örnekleme derinliği, örnekleme periyodu ve çalışma bölgesinin trofik durumu (oligotrofik, mesotrofik ve ötrofik) gibi farklılıklardan kaynaklanabileceği değerlendirilmektedir.

Tablo 12. Pigmente dayalı fitoplankton boy gruplarının belirlendiği çalışmalar

Bölge	Dönem	Piko (%)	Nano (%)	Mikro (%)	Referans
Hint Okyanusu	Ocak-Şubat 2005	2-20	10-50	50-90	Uitz vd., 2009
Atlantik	1997-2004	7-70	20-60	50-70	Brewin vd., 2010
Güneydoğu Karadeniz	Kasım 2014-Ağustos 2015	1-71	1-92	8-93	Türkmen, 2016
Güneydoğu Karadeniz	Mayıs 2015-Nisan 2016	2-70	1-70	8-91	Genç, 2018
Güneydoğu Karadeniz	Kasım 2015-Ağustos 2016	2-60	3-77	5-90	Karadeniz, 2019
Güneydoğu Karadeniz	Kasım 2014-Ağustos 2015	3-60	1-60	8-87	Bu çalışma

Saha çalışmaları oligotrofik bölgelerde fitoplankton komünite yapısının pikofitoplankton tarafından domine edildiği ve klorofil maksimuma doğru inildikçe nanofitoplanktonun katkısının arttığını göstermiştir (Gibb vd., 2000; Zubkov vd., 1998; Barlow vd., 2002). Kopuz vd. (2012) Güneydoğu Karadeniz kıyıları için *Synechococcus* spp.'nin en yüksek bolluk ve biyokütlesinin yaz döneminde (Haziran 2010) ve %1'lik ışık derinliğinde olduğunu rapor etmişlerdir. Diğer taraftan düşük verimlikle karakterize olan Batum antisiklonunun yüzey sularında ve öfotik bölge içerisinde *Synechococcus* spp.'nin baskın grup olduğu rapor edilmiştir (Uysal, 2001). Aynı araştırmacı başka bir çalışmada ise *Synechococcus* spp. bolluğunun nano- ve mikrofıtoplanktonun ilkbahar patlamasından sonra arttığını tespit etmiştir (Uysal, 2006). Gerek literatür bulgular ve gerekse mevcut çalışmanın sonuçları değerlendirildiğinde Güney Doğu Karadeniz'de fitoplankton boy gruplarının önemli mevsimsel salınımlar gösterdiği ve son yıllarda alışılagelmiş olan fitoplankton yapısının değiştiğini göstermiştir.

5. ÖNERİLER

Yarıkapalı ve dünyanın en büyük anoksik havzalarından biri olan Karadeniz antropojenik ve iklimsel değişimlere karşı oldukça hassastır. Yapısında meydana gelen ekolojik değişimler fitoplanktonik yapının da önemli oranda değişmesine yol açabilmektedir. Buna bağlı olarak fitoplankton grup oranlarında meydana gelen değişimler besin zinciri yoluyla pelajik ekosistemin verimliliğini ve dinamiklerini etkilediğinden sistemin sürekli olarak izlenmesi gerekmektedir. Bu değişim Karadeniz gibi verimliliği büyük ölçüde pelajik sisteme bağlı olan denizlerde son derece önemli sonuçlara sebep olabilmektedir. Ekosistemde meydana gelen değişmelerin etkilerini anlayabilmek için bu organizma gruplarının hızlı ve kısa zamanda tespit edilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu çalışma ile hızlı ve tekrarlanabilir yöntem olan HPLC-DAD tekniği ile kromatografik ayırma parametreleri de kullanılarak pigmente dayalı fitoplankton boy gruplarının zamansal ve alansal dağılımı belirlenmiştir.

Ayırma parametreleri fitoplankton boy gruplarının belirlenmesinde pigmente dayalı hesaplamaların kullanılabileceğini bir kez daha ortaya koymuştur. İlerleyen dönemlerde yapılacak olan çalışmalarda bu göstergelerin de değerlendirilmesi bölgeyi karakterize etmek için büyük önem taşımaktadır. Ancak bölgeyi karakterize etmek için salt pigment verisinin yeterli olmadığı sistemi tüm yönleriyle değerlendirebilecek şekilde veri setlerine (mikroskopik hücre sayımı, nütrient dinamiği, fiziko-kimyasal parametreler, uydu verisi vb) ve sürekli izleme programlarına ihtiyaç duyulmaktadır.

KAYNAKLAR

- Ağırbaş, E., 2010.** Güneydoğu Karadeniz’de Pigment Konsantrasyonu ve Birincil Üretimin Çevre Koşulları İle Etkileşimi, Doktora Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Trabzon, Türkiye, 199 s.
- Barlow, R.G., Aiken, J., Holligan, P.M., Cummings, D.G., Maritorena, S. and Hooker, S., 2002.** Phytoplankton pigment and absorption characteristics along meridional transects in the Atlantic Ocean. Deep-Sea Research Part I-Oceanographic Research Papers, 49 (4), 637-660.
- Barlow, R.G., Aiken, J., Moore, G.F., Holligan, P.M. and Lavender, S., 2004.** Pigment adaptations in surface phytoplankton along the eastern boundary of the Atlantic Ocean. Marine Ecology Progress Series, 281, 13-26.
- Brewin, R.J.W., Sathyendranath, S., Hirata, T., Lavender, S.J., Barciela, R.M. and Hardman-Mountford N.J., 2010.** A three-component model of phytoplankton size class for the Atlantic Ocean. Ecological Modelling, 221 (11), 1472-1483.
- Booth, B.C., 1993.** Estimating cell concentration and biomass of autotrophic plankton using microscopy. In: Kemp P.F., Sherr B.F., Cole J.J. (Eds.), Handbook of methods in aquatic microbial ecology. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, pp. 199-205.
- Boyce, D.G., Lewis, M.R. and Worm, B., 2010.** Global phytoplankton decline over the past century. Nature, 466 (7306), 591-596.
- Ediger, D., Soydemir, N. and Kideys, A.E., 2006.** Estimation of phytoplankton biomass using HPLC pigment analysis in the Southwestern Black Sea. Deep-Sea Research Part II-Topical Studies in Oceanography, 53, 1911-1922.
- Eker-Develi, E. and Kideys, A.E., 2003.** Distribution of phytoplankton in the southern Black Sea in summer 1996, spring and autumn 1998. Journal of Marine Systems, 39, 203-211.
- Eker-Develi, E., Berthon, J.F. and Linde, D., 2008.** Phytoplankton class determination by microscopic and HPLC-CHEMTAX analyses in the southern Baltic Sea. Marine Ecology Progress Series, 359, 69-87.
- Falkowski, P.G. and Raven, J.A., 2007.** Aquatic photosynthesis, Princeton University Press, Second edition, 484 s.
- Genç N., 2018.** Güneydogu Karadeniz'de pigmente dayalı fitoplankton boy gruplarının fotik bölge dinamiği, (Yüksek Lisans Tezi) Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü-, Rize, Türkiye, 48 s.
- Gibb, S.W., Barlow, R.G., Cummings, D.G., Rees, N.W., Trees, C.C., Holligan, P. and Suggett, D., 2000.** Surface phytoplankton pigment distributions in the Atlantic

- Ocean: an assessment of basin scale variability between 50°N and 50°S. Progress in Oceanography, 45, 339-368.
- Gibb, S.W., Cummings, D.G., Irigoien, X., Barlow, R.G., Fauzi, R. and Mantoura C., 2001.** Phytoplankton pigment chemotaxonomy of the northeastern Atlantic. Deep Sea Research II, 48, 795-823.
- Gieskes, W.W.C. and Kraay, G.W., 1983.** Dominance of Cryptophyceae during the Phytoplankton Spring Bloom in the Central North Sea Detected by HPLC Analysis of pigments. Marine Biology, 75, 179-185.
- Guillard, R.R.L., Murphy, L.S., Foss, P. and Liaaen-Jensen, S., 1985.** Synechococcus spp. as likely Zeaxanthin-dominant Ultraphytoplankton in the North Atlantic. Limnology and Oceanography, 30, 412-414.
- Jaffe H. H. Ve Orchin M., 1964.** Theory and Application of Ultraviolet Spektroskopy, John Wiley and Sons, New York.
- Jeffrey, S.W. and Vesk, M., 1997.** Introduction to marine phytoplankton and their pigment signatures. In: Jeffrey SW, Mantoura RFC, Wright SW (Eds.), Phytoplankton Pigments in Oceanography: Guidelines to Modern Methods. UNESCO, Paris, pp. 19-36.
- Karadeniz, M.N., 2010.** Güneydoğu Karadeniz Fitoplankton Pigment Profili Ve Fitoplankton Boy Grupları, Yüksek Lisans Tezi, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 70 s.
- Koca, L., 2014.** Güney Doğu Karadeniz Kıyıları (Rize) Diatom/Dinoflagellat Oranları Ve Pigment Kompozisyonun Zamansal Değişimi, Yüksek Lisans Tezi, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 73 s.
- Kopelevceh, O.V., Burenkov, V.I., Ershova, S.V., Sheberstov, S.V. ve Evdoshenko, M.A., 2004.** Application of SeaWiFS data for Studying Variability of Bio-Optical Characteristics in the Barents, Black and Caspian Seas. Deep Sea Research II, 51, 1063-1091.
- Kopuz, U., Feyzioglu, A.M., Agirbas, E., 2012.** Picoplankton Dynamics during Late Spring 2010 in the South-Eastern Black Sea. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 12, 397-405.
- Krupatkina, D.K. and Berseneva, G.P., 1995.** Primary production and Chlorophyll -a in the Black Sea in Winter and Autumn Seasons. Oceanology, 34, 6, 775-779.
- Mackas, D.L., 2011.** Does blending of chlorophyll data bias temporal trend? Nature, 472 (7342), E4-E5.
- Mackey, M.D., Mackey, D.J., Higgins, H.W. and Wright, S.W. 1996.** CHEMTAX-a program for estimating class abundances from chemical markers: application to

HPLC measurements of phytoplankton. Marine Ecology Progress Series, 144, 265-283.

Mantoura, R.F.C. and Llewellyn C.A., 1983. The rapid determination of algal Chlorophyll-a and Carotenoid Pigments and Their Breakdown Products in Natural Waters by Reverse-Phase High Performance Liquid Chromatography. Analytica Chimica Acta, 151, 297-314.

Millie, D.F., Paerl, H.W., Hurley, J.P. and Kirkpatrick, G.J. 1993. Algal pigment determinations in aquatic ecosystems: Analytical Evaluations, applications and recommendations. Current Topics Botinical Research, 1, 1-13. Oceanography UNESCO, Paris, 327-341.

Obayashi, Y., Tanoue, E., Suzuki, K., Handa, N., Nojiri, Y. and Wong, C.S., 2001. Spatial and Temporal Variabilities of Phytoplankton Community Structure in the Northern North Pacific as Determined by Phytoplankton Pigments. Deep-Sea, Research I, 48, 439-469.

Sandra, P. 2004. Course on Advanced Separation Science, Ghent University, Belgium.

Skoog, D.A., Holler, F.J. Nieman, T.A., 2000. Enstrümental Analiz İlkeleri, Birinci Baskı, Saunders Golden Sunburst Publishing, USA, Kılıç E., Köseoğlu F., Yılmaz H., Bilim Yayıncılık, Ankara.

Skoog, D.A., West D., M., Holler J.F., Crouch S.R., 2004. Analitik Kimya Temel İlkeler, Sekizinci Baskı, 2. Cilt. Thomson Brooks/Cole Publishing, USA, Kılıç E. ve Yılmaz H., Bilim Yayıncılık, Ankara.

Sokal and Rohlf, 1969. Biometry W. A. Freeman and Company. San Francisco, 340 pp.

Stauber, J.L. and Jeffrey, S.W., 1988. Photosynthetic Pigments in fifty-one Species of Marine Diatoms. Journal of Phycology, 24, 158-172.

Tait, R. V. ve Dipper, F. A., 2001. Elements of Marine Ecology, Butterworth-Heinemann Pub., forth edition, Gread Britaiin, 462 s.

Takahashi, T., Sutherland, S.C., Sweeney, C., Poisson, A., Metzl, N., Tilbrook, B., Bates, N., Wanninkhof, R., Feely, R.A., Sabine, C., Olafsson, J. and Nojiri, Y., 2002. Global sea-air CO₂ flux based on climatological surface ocean pCO₂, and seasonal biological and temperature effects. Deep-Sea Research Part II-Topical Studies in Oceanography, 49 (9-10), 1601-1622.

Türkmen, P., 2016. Güneydoğu Karadeniz Kıyıları (Artvin-Giresun) Pigment Kompozisyonunun Mevsimsel Değişimi, (Yüksek Lisans Tezi) Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Rize, Türkiye, 61 s.

- Uitz, J., Claustre, H., Morel, A. and Hooker, S.B., 2006.** Vertical distribution of phytoplankton communities in open ocean: An assessment based on surface chlorophyll. *Journal of Geophysical Research-Oceans*, 111, 1-23.
- Uitz, J., Claustre, H., Brian Griffiths, F., Ras, J., Garcia, N., and Sandroni, V., 2009.** A phytoplankton class-specific primary production model applied to the Kerguelen Islands region (Southern Ocean). *Deep-Sea Research I*, 56, 541–560.
- URL-1.** <http://okanongan.blogspot.com/2019/01/>
- URL-2.** <https://www.foodelphi.com/hplc-yukse-performansli-sivi-kromatografisi-ars-gor-nahit-gencer/2019/02/>
- URL-3.** <http://www.chromatographyonline.com/things-you-should-know-about-your-hplc-column/2019/02>
- Utermohl, H., 1958.** Zur Vervollkommnung der quantitativen phytoplankton: Methodik Mitteilung Internationale Vereinigung Theoretische und Angewandte Limnologie 9, 1-38.
- Uysal, Z. 2001.** Chroococcoid cyanobacteria *Synechococcus* spp. in the Black Sea: pigments, size, distribution, growth and diurnal variability. *Journal of Plankton Research*, 23 (2), 175-189.
- Uysal, Z. 2006.** Vertical distribution of marine cyanobacteria *Synechococcus* spp. in the Black, Marmara, Aegean and eastern Mediterranean Seas. *Deep-Sea Research II*, 53, 1976- 1987.
- Wright, S.W. and Jeffrey, S.W., 1987.** Fucoxanthin pigment markers of marine phytoplankton analysed by HPLC and HPTLC. *Marine Ecology Progress Series* 38, 259-266.
- Wright, S.W. and Thomas, D.P., Marchant, H.J., Higgins, H.W., Mackey, M.D. and Mackey, D.J., 1996.** Analysis of Phytoplankton of the Australian Sector of the Southern Ocean: Composition of Microscopy and Size Frequency Data with Interpretations of Pigment HPLC Data Using the CHEMTAX Matrix Factorization Program. *Marine Ecology Progress Series*, 144, 285-298.
- Yayla, M., Yılmaz, A. and Morkoç, E., 2001.** The Dynamics of Nutrient Enrichment and Primary Production Related to Recent Changes in the Ecosystem of the Black Sea, *Aquatic Ecosystem Health and Management*, 4, 33-49.
- Yılmaz, A., Tugrul, S., Polat, C., Ediger, D., Çoban, Y. and Morkoc, E., 1998.** On the Production, Elemental Composition (C, N, P) and Distribution of Photosynthetic Organic Matter in the Southern Black Sea, *Hydrobiologia*, 363,141-156.
- Yılmaz, A., Çoban-Yıldız, Y., Karakoç, F.T. and Bologa, A., 2006.** Surface and mid-water sources of organic carbon by photoautotrophic and chemoautotrophic production in the Black Sea, *Deep-Sea Research II*, 53, 1988-2004.

Yunev, O., Vladimir, A., Baştürk, Ö., Yılmaz, A., Kideys, A.E., Moncheva, S. and Konovalov, S.K., 2002. Long-term Variation of Surface Chlorophyll-a and Primary Production in the open Black Sea, Marine Ecology Progress Series, 230, 11-28.

Zubkov, M.V., Sleigh, M.A., Tarran, G.A., Burkill, P.H. and Leakey, R.J.G., 1998. Picoplanktonic community structure on an Atlantic transect from 50 N to 50 S. Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers 45 (8), 1339-1355.



ÖZGEÇMİŞ

Osman AKYÜZ 1973 yılında Rize’ de doğdu. Öğrenimine 50. Yıl İlköğretim Okulu’nda başladı ve Rize lisesinde lise öğrenimini tamamladı. 1994 yılında kazandığı Dicle Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünden 1999 yılında mezun oldu. 2014 yılında Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Su Ürünleri Anabilim Dalı’ nda yüksek lisans öğrenimine başladı ve halen aynı bölümde yüksek lisansa devam etmektedir. Evli ve iki çocuk sahibidir. İngilizcesi orta derecededir.

