



HPLC Pigment Analizinde Kullanılan Kromatografik Ayırma Parametreleri ve Güneydoğu Karadeniz Pigment Dinamiği^[*]

Osman AKYÜZ Ertuğrul AĞIRBAŞ*

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi, 53100, Rize, Türkiye

Geliş/Received: 24.08.2020

Kabul/Accepted: 12.10.2020

Atf yapmak için: Akyüz, O. & Ağırbaş, E. (2020). HPLC Pigment Analizinde Kullanılan Kromatografik Ayırma Parametreleri ve Güneydoğu Karadeniz Pigment Dinamiği. *Anadolu Çev. ve Hay. Dergisi*, 5(4), 570-580.

How to cite: Akyüz, O. & Ağırbaş, E. (2020). Chromatographic Separation Parameters Used in HPLC Pigment Analysis and Pigment Dynamics in the South-Eastern Black Sea. *J. Anatolian Env. and Anim. Sciences*, 5(4), 570-580.

*ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7987-9668>
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4069-5113>

***Sorumlu yazarın:**

Ertuğrul AĞIRBAŞ

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi, 53100, Rize, Türkiye.

✉: ertugrul.agirbas@erdogan.edu.tr

Cep telefonu : +90 (553) 477 91 43

Telefon : +90 (464) 223 33 85 (1423)

Faks : +90 (464) 223 41 18

Öz: Güney Doğu Karadeniz (Artvin-Giresun) kıyıları boyunca Kasım 2014-Ağustos 2015 tarihleri arasında mevsimsel olarak yürütülen bu çalışmada fitoplankton pigment analizinde kullanılan kromatografik ayırma parametreleri ve pigmentlere dayalı fitoplankton boy gruplarının zamansal ve alansal değişimleri araştırılmıştır. Çalışma kapsamında 12 farklı istasyonda yüzeysel 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. Çalışma bölgesinde yüzeysel 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 değişim gösterirken önce çıkan belirteç pigmentler peridinin, 19-heksanoloksifukoksantin, fukoksantin, zeaksantin, klorofil-b ve alloxantin pigmentleri olmuştur.

Anahtar kelimeler: Fitoplankton, güney doğu karadeniz, HPLC-DAD, pigment.

Chromatographic Separation Parameters Used in HPLC Pigment Analysis and Pigment Dynamics in the South-Eastern Black Sea

Abstract: In the present study, chromatographic separation parameters used in phytoplankton pigment analysis and phytoplankton size classes depending on pigments from November 2014 to August 2015 were seasonally investigated along the south-eastern coasts (Giresun-Artvin) of the Black Sea. Along the 12 stations, samples were collected seasonally from surface waters. Based on the HPLC-DAD conditions, an appropriate separation of 16 pigment standard was achieved within 38 minutes. Separation parameters and the resolution values showed that separation of the peaks was close to 100%. The used method was validated for pigment analysis. In the study area, 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-hexanoloxycanthin, fucoxanthin, zeaxanthin, chlorophyll-b and alloxanthin were the most outstanding marker pigments.

Keywords: HPLC-DAD, phytoplankton, pigment, south-eastern black sea.

***Corresponding author's:**

Ertuğrul AĞIRBAŞ

Recep Tayyip Erdoğan University Faculty of Fisheries, 53100, Rize, Turkey.

✉: ertugrul.agirbas@erdogan.edu.tr

Mobile telephone : +90 (553) 477 91 43

Telephone : +90 (464) 223 33 85 (1423)

Fax : +90 (464) 223 41 18

[*] Bu çalışma, yüksek lisans tezinden üretilmiştir.

This study was produced from the master thesis.

GİRİŞ

Kromatografi, karışımların bileşenlerine ayrılması için kullanılan bir teknik olup genellikle basit yöntemlerle

ayrılmaları mümkün olmayan karmaşık ya da kimyasal ve fiziksel özellikleri birbirine çok yakın bileşenlerin

ayrılmalarında kullanılan 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 (Skoog vd., 2000).

Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) analitik ayırma teknikleri arasında en yaygın kullanılanıdır. Yöntemin en önemli avantajları; duyarlılığı, tekrarlanabilirliği, 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, pestisitler ve pigmentler verilebilir.

Kromatografide Ayırma Parametreleri:

Kromatografik ayrımlar bileşenlerin sabit bir durgun faz ile hareketli faz arasında farklı oranda dağılımları sayesinde gerçekleşir.

Bileşenlerin fazlar arası dağılıma eşitliği aşağıdaki gibi gösterilir:

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

Ayrılacak olan bileşenlerin farklı formlarında bulunma durumları gözardı edilerek her bir bileşenin toplam miktarına göre hareketli ve durgun fazlar arasındaki derişimlerinin oranına “*dağılıma katsayısı*” denir (Skoog vd., 2000). Dağılıma katsayısı “K” ile gösterilir ve aşağıdaki gibi hesaplanır;

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

Eşitlik-2’ de verilen C_d , bileşenin durgun fazdaki derişimi, C_m ise hareketli fazdaki derişimidir.

Numune enjeksiyonu ile analit pikinin dedektöre ulaşması arasında geçen süreye “*alınma zamanı*” denir. Alınma zamanı “ t_r ” ile gösterilir. Kolon boyunca geçen mobil faz için alınma zamanı “*ölü zaman*” (t_0) olarak ifade edilir ki bu zaman kolonda hiç tutunmayan bileşenlerin alınma zamanıdır. Alınma faktörü olarak adlandırılan k' terimi kolonda analitlerin geç etme oranı olarak kullanılır. Bu faktör “*kapasite faktörü*” olarak da kullanılmaktadır (Skoog vd., 2000).

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

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

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

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;

$$R = (t_{r2} - t_{r1}) / 0,5 \cdot (W_{b1} + W_{b2}) \quad (8)$$

Yaklaşık olarak $W_{b1} = W_{b2}$ kabul edilir ve bu durumda formül

$$R = (t_{r2} - t_{r1}) / W_{b2} \text{ olarak kullanılır.} \quad (9)$$

Çözünürlük değerinin 1 olması %95,4 oranında ayırımı tamamladığını gösterir. En az $R=1,5$ olmalıdır ki bu noktada ayırımı %99,73 dür (Skoog vd., 2000). Çözünürlük kolon etkinliği, alınma faktörü ve seçicilik faktörüne bağlı olarak değişmektedir ve bu üç parametre kullanılarak da hesaplanabilir. Bu şekilde hesaplanan çözünürlüğü R_s sembolü ile ifade edilir.

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

Eşitlik-10’ da N_2 olarak belirtilen sembol ayırımı incelenen iki pikten daha geç elde edilen pikin kolon etkinliğidir. Aynı şekilde k_2 ’ de ikinci pike ait alınma faktörüdür.

Fitoplankton: Birincil üreticiler olan fitoplanktonik gruplar besin zinciri yolu ile zooplanktondan, balıklara, kuşlara ve memeli hayvanlara kadar enerjinin aktarılmasında kilit rol oynayanlar (Tait ve Dipper, 2001). Sahip oldukları yüksek fotosentetik kapasiteleri sayesinde yeryüzündeki birincil üretimin yarısını oluştururken

(Falkowski ve Raven, 2007, Boyce vd., 2010), denizel ortamdaki organik üretimin neredeyse tamamından sorumludurlar (Mackas, 2011). Aynı zamanda, ortamdaki karbondioksit konsantrasyonunu etkileyerek pH dengesini sağlarken, antropojenik kaynaklı CO₂ salınımını büyük oranda (1/3) düşürerek sera gazı etkisini azaltmaya yardımcı olurlar (Takahashi vd., 2002).

Fitoplankton çalışmaları geleneksel olarak mikroskop kullanılarak yürütülmektedir. Bu teknik klasik bir yöntem olup, türlerin taksonomik özelliklerinin kullanılarak teşhisi, hücre bolluğunun ve biyokütlelerinin belirlenmesini sağlamaktadır (Utermohl, 1958; Booth, 1993; Eker-Develi vd., 2008). Ancak, ön işlemleri zaman alan ve uzun yıllar süren deneyim gerektiren bir teknik olmasından dolayı mikroskopik hücre tanımlama ve sayım tekniği kısa zamanda fazla sayıda örnek çalışılmasına imkân vermemektedir. Ayrıca taksonomik olarak dış yapısal özellikleri bulunmayan küçük fitoplanktonik grupların (pikoplankton) teşhisinde de sıkıntılar yaşanmaktadır (Mackey vd., 1996).

Fitoplankton hücre tanımlamalarında mikroskop kullanılmasının yanısıra fitoplankton pigmentleri de alg gruplarının tanımlanmasında kullanılmaktadır. Klorofil-*a* fitoplankton biyokütlesinin belirlenmesinde uzun zamandan beri kullanılan temel fotosentetik bir pigmenttir (Boyce vd., 2010). Klorofil-*a* pigmentinin yanı sıra fitoplanktonik gruplara özgü olan belirteç pigmentler kullanılarak da fitoplankton biyokütlesi ve fitoplanktonik grupların katkısı belirlenebilmektedir (Uitz vd., 2006). Örneğin 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* belirteç pigment olarak kullanılmaktadır (Gibb vd., 2001). Ayrıca belirteç pigmentlerin klorofil-*a*'ya olan oranları sayesinde fitoplankton boy gruplarının (pikofitoplankton, nanofitoplankton ve mikrofotoplankton) oransal dağılımı da hesaplanabilmektedir (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,

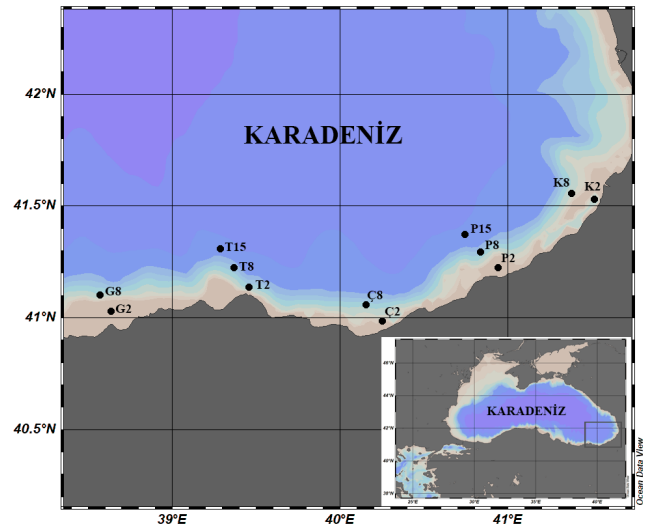
Alloksantin, Klorofil-*b* ve Zeaksantin) kullanılmaktadır (Uitz vd., 2006).

Fitoplanktonik gruplar buldukları ortamın trofik seviyesi hakkında bilgi verirken (Barlow vd., 2004), aynı zamanda gruplara özgü olan belirteç 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 (Ediger vd., 2006; Eker-Develi vd., 2012; Koca, 2014; Türkmen, 2016;). Diğer taraftan sistemde küçük boy grubundaki fitoplanktonik grupların dönemsel baskınlıkları birçok araştırmacı tarafından rapor edilmiştir (Kopuz vd., 2012; Ağırbaş vd., 2017). Bu çalışma ile Güney Doğu Karadeniz kıyılarında (Artvin-Giresun) yüzey suyundan (<5 m) alınan deniz suyu örneklerinde yapılan pigment analizlerinde kromatografik ayırma parametrelerinin test edilmesi ve pigment konsantrasyonunun alansal ve zamansal değişiminin belirlenmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL VE METOT

Bu çalışma, Güney Doğu Karadeniz (Artvin-Giresun) kıyıları boyunca belirlenen farklı karakterdeki 12 istasyonda (2, 8 ve 15 deniz mili) Kasım 2014-Ağustos 2015 tarihleri arasında mevsimsel olarak yürütülmüştür (Şekil 1).



Şekil 1. Örnekleme istasyonları.

Figure 1. Sampling stations.

(G2: Giresun 2 deniz mili; G8: Giresun 8 deniz mili; T2: Trabzon 2 deniz mili; T8: Trabzon 8 deniz mili; T15: Trabzon 15 deniz mili; C2: Çamburnu 2 deniz mili; C8: Çamburnu 8 deniz mili; P2: Pazar 2 deniz mili; P8: Pazar 8 deniz mili; P15: Pazar 15 deniz mili; K2: Kemalpaşa 2 deniz mili; K8: Kemalpaşa 8 deniz mili).

Saha çalışmalarında Tarım ve Orman 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" gemileri kullanılmıştır. Deniz suyu örnekleri yüzeyden SBE 32 Carousel 12 şişeli su örnekleme cihazı ile alınmıştır.

Örneklerden Pigmentlerin Ekstraksiyonu ve HPLC Analizi: HPLC ile pigment analizleri Mantoura ve Llewelyn (1983)'in önerdiği yönteme 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 süzümüştür. Daha sonra filtreler analiz aşamasına kadar sıvı azot içerisinde (-196°C) muhafaza edilmiştir. Analiz öncesi GF/F filtreler % 90'luk 5 ml "HPLC saflığında" aseton içerisine konularak ekstraksiyon işlemi yapılmıştır. Ultrasonikatör (1 dakika için 60 Hz) yardımıyla hücrelerin parçalanıp ekstraksiyonun hızlandırılması sağlanmıştır. Ekstraksiyon işleminin tamamlanması için örnekler bir gece buzdolabında (+4°C) muhafaza edilmiştir. Daha sonra örnekler analiz öncesinde 3500 rpm devirde 10 dakika süreyle santrifüj edilerek hücresel parçaların çöktürülmesi sağlanmıştır.

HPLC analizleri C8 kolon (Thermo Hypersil MOS-2 C8; 150 x 4,6 mm; 3 µm 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. Analiz için, ekstrakt içerisinden 500 µl örnek alınarak 0,2 µm lik millipore filtrelerden süzülüp ve 500 µL 1M Amonyum Asetat iyon çözeltisiyle karıştırılmıştır. Otomatik örnekleyici yardımıyla alınan 100 µL 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 asetat (80:30 v/v) oluşan mobil faz A ve % 100 metanol'den oluşan mobil faz B'den oluşmaktadır. Pigmentlerin pik alanları 1 mL/dk'luk 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;

$$C_p = \frac{A_p \times V_{ext} \times 10}{B \times V_{filt} \times V_{inj} \times 1000 \times R_f} \quad (11)$$

C_p (µg/L) = Pigment konsantrasyonu,

A_p (mAU*s) = Pik alanı,

R_f (ngmAU⁻¹) = Kalibrasyon eğrisinin eğimi (ng kolon⁻¹),

V_{filt} (L) = Süzülen su hacmi,

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

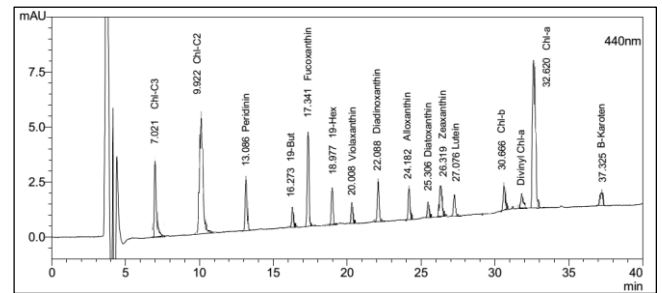
V_{inj} (µL) = Kromatografi sistemine enjekte edilen örnek hacmi, B = Tampon seyreltme faktörü.

HPLC-DAD sistemi her pigment için ticari standartlar (klorofil a, b: Sigma Kolonu; klorofil c2, klorofil c3, perid, 19-but, fuco, 19 hex, diadinoxanthin, allo, lutein, zea, divinil klorofil-a ve β karoten: VKI, Danimarka) kullanılarak kalibre edilmiştir. Klorofil-a ve belirteç pigmentler için belirleme sınırı 0,005-0,007 µg/L dir.

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

BULGULAR

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 2'de verilmiştir. Bu kromatogramda $t_0=3,75$ olup Tablo 1'de bu fitoplankton standartları için hesaplanan ayırma parametreleri verilmiştir.



Şekil 2. Pigment standartlarına ait HPLC-DAD kromatogramı
Figure 2. HPLC-DAD chromatogram for pigment standards.

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 1'de verilmiştir. Piklerde taban genişliği, pik 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 karboksil grubu sayesinde diğer bileşiklere göre en polar yapıda bileşik olduğu için kromatogramda en erken gelen pik olmuştur. Bu da teorik tabaka sayısının düşük çıkmasının diğer 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 1'deki verilerden anlaşılmaktadır.

Tablo 1. Fitoplankton pigment standartlarına ait kromatografik ayırma parametreleri.

Table 1. Chromatographic separation parameters for phytoplankton pigment standards.

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

(t₀: ölü zaman, t_R: pigmentin alıkonma zamanı, W_b: taban genişliği; N: teorik tabaka sayısı; k: piklerin alıkonma faktörü, α: seçicilik faktörü, R: çözünürlük değeri; R_s: çözünürlük).
(t₀: dead time, t_R: retention time of pigment, W_b: base width; N: theoretical layer number; k: retention factor of peaks, α: selectivity factor, R: solubility value; R_s: resolution).

Tablo 2. Kasım 2014 dönemine ait yüzey suyu kromatografik ayırma parametreleri.

Table 2. Chromatographic separation parameters for surface water in November 2014..

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

(t_R: pigmentin alıkonma zamanı, W_b: taban genişliği; N: teorik tabaka sayısı; k: piklerin alıkonma faktörü, α: seçicilik faktörü, R: çözünürlük değeri; R_s: çözünürlük).
(t_R: retention time of pigment, W_b: base width; N: theoretical layer number; k: retention factor of peaks, α: selectivity factor, R: solubility value; R_s: solubility).

Tablo 3. Mayıs 2015 dönemine ait yüzey suyu kromatografik ayırma parametreleri.

Table 3. Chromatographic separation parameters for surface water in May 2015.

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	-	-	-	-	-	-	-	-

(t_R: pigmentin alıkonma zamanı, W_b: taban genişliği; N: teorik tabaka sayısı; k: piklerin alıkonma faktörü, α: seçicilik faktörü, R: çözünürlük değeri; R_s: çözünürlük).
(t_R: retention time of pigment, W_b: base width; N: theoretical layer number; k: retention factor of peaks, α: selectivity factor, R: solubility value; R_s: solubility).

HPLC yöntemiyle pigmentlerin ayırma örneklerine ait ayırma parametrelerinin standart parametrelerinin değişkenliğini belirlemek için pigment pigmentlerle elde edilen değerlerle yakın olup olmadığı 3

temsili dönem (Kasım 2014, Mayıs 2015 ve Ağustos 2015) için hesaplanmıştır (Tablo 2-4). Kromatogramda ilgili pikin taban genişliği ve alıkonma zamanı kullanılarak ayırma parametreleri hesaplanmıştır. Piklerin taban genişliklerinin büyük olması kolon etkinliği ve dolayısıyla çözünürlüğün düşük olduğunun bir göstergesidir. Taban genişliği elüsyon çözeltilerinin içeriği, hareketli fazın akış hızı, kolon materyali ve kolon sıcaklığı gibi parametrelerin iyi seçimi ile iyileştirilebilir.

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 toplam etkilerini içermektedir. Çözünürlük komşu piklerden ne derece ayrılmanın olduğunu yansıttığı için komşu piki bulunmayan pikler için hesaplanamaz. Seçilen 3 döneme ait tablolar incelendiğinde, örnekte tespit edilmeyen piklerin ayırma parametreleri hesaplanamazken bu piklere komşu olan piklerin de seçicilik faktörü ve çözünürlüğünün hesaplanmadığı görülmektedir (Tablo 2-4). Lutein bileşiğinin standardına ait pik 458193,61 olarak hesaplanan en yüksek teorik tabaka sayısına sahip iken Mayıs 2015

yüzeysel suyu örneğinde 167394,38 ve Ağustos 2015 yüzeysel suyu örneğinde ise 114785,44 olarak kolon etkinliğinde %50 den fazla düşüş gözlenmiştir. Pik alanlarının yani konsantrasyonun artışı ile pik taban genişliklerinde artış beklenen bir durumdur ve bu da teorik tabakasayısı ve dolayısıyla çözünürlüğü düşürmektedir.

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 değerinde olmasına rağmen kolon etkinliğinin 2,73 kat düşük olmasının örneğin saf olmamasından 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. Ağustos 2015 dönemine ait yüzeysel suyu kromatografik ayırma parametreleri.

Table 4. Chromatographic separation parameters for surface water in August 2015.

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	-	-	-	-	-	-	-	-
Diadinoksantin	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

(t_r: pigmentin alıkonma zamanı, W_b: taban genişliği; N: teorik tabaka sayısı; k: piklerin alıkonma faktörü, α : seçicilik faktörü, R: çözünürlük değeri; R_s: çözünürlük).
(t_r: retention time of pigment, W_b: base width; N: theoretical layer number, k: retention factor of peaks, α : selectivity factor, R: solubility value; R_s: solubility).

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 verilmiştir (Tablo 5-8).

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 belirteç 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.

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.

Table 5. Kasım 2014 dönemine ait HPLC pigment konsantrasyonları (Tespit limiti<0,005 µg/L).

Table 5. HPLC pigment concentrations for the period of November 2014 (Detection limit <0.005 µg/L).

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

Table 6. Şubat 2015 dönemine ait HPLC pigment konsantrasyonları (Tespit limiti<0,005 µg/L).

Table 6. HPLC pigment concentrations for the period of February 2015 (Detection limit <0.005 µg/L).

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

Table 7. Mayıs 2015 dönemine ait HPLC pigment konsantrasyonları (Tespit limiti<0,005 µg/L).

Table 7. HPLC pigment concentrations for the period of May 2015 (Detection limit <0.005 µg / L).

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

Table 8. Ağustos 2015 dönemine ait HPLC pigment konsantrasyonları (Tespit limiti<0,005 µg/L).

Table 8. HPLC pigment concentrations for the period of August 2015 (Detection limit <0.005 µg / L).

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	0,25	0,25	<0,005	0,86
Trabzon	15	0,17	<0,005	0,20	0,18	<0,005	0,47	<0,005	1,09

TARTIŞMA

Fitoplankton biyomasının bir göstergesi olan klorofil-*a*'nın Karadeniz'deki değişim Tablo 9'da verilmiştir. Karadeniz geneli için 1964-1986 yılları arasında ortalama klorofil-*a* konsantrasyonu 0,15±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* konsantrasyonunun 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 periyotlar 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.

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 çekmektedir. Tespit edilen bu farklılıklar temelde yöntem farklılıklarından (spektrofotometre, florometre, floresan ölçümleri, HPLC ve uydu oşinografisi vb.) kaynaklanabileceği gibi bölgesel farklılıklar, örnekleme dönemi farklılığı, örnekleme sıklığı, örnekleme derinliği ve ekosistem koşulları altında değişen fitoplankton komünite yapısı gibi faktörler de etkili olabilmektedir.

Tablo 9. Karadeniz’de yürütülen klorofil-*a* çalışmaları.
Table 9. Chlorophyll-*a* studies conducted in the Black Sea.

Bölge	Dönem	Klorofil- <i>a</i> (µg/L)	Referans
Tüm Havza	1964-1986	0,15	Yuney vd., 2002
	1992	0,99	
	1993	0,26	
Tüm Havza	1998-2001	0,59-0,69	Kopelevcecih 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

Belirteç pigmentleri belirlemeye yönelik yürütülen çalışmalar her geçen gün giderek artmaktadır (Tablo 10). Güneybatı Karadeniz’de tek dönemde yürütülen bir çalışmada belirteç 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 bolluğu ile arasındaki korelasyon ortaya konulmuştur (Ediger vd., 2006). Ağırbaş (2010) tarafından Güneydoğu 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 değişim gösterdiği rapor edilmiştir. Koca (2014) tarafından Güneydoğu Karadeniz Rize sahillerinde yüzey suyunda yürütülen başka bir çalışmada ise fotosentetik pigmentlerden diadinoksantin, zeaksantin, klorofil-*b* ve β-Karoten’in aylık değişimleri ortaya konulmuştur. Artvin-Giresun arasında mevsimsel

olarak yürütülen başka bir çalışmada ise pigment kompozisyonu ve pigmente dayalı fitoplankton 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 değiştiğini rapor etmiştir. Genç (2018) tarafından Güney Doğu Karadeniz’de aylık olarak yürütülen çalışmada fukoksantin, peridinin ve 19-heksanoloksifukoksantin bölgede öne çıkan pigmentler olduğu ve konsantrasyonlarının sırasıyla 0,03-2,94 µg/L, 0,11-2,29 µg/L ve 0,03-1,76 µg/L arasında değiştiği rapor edilmiştir. Karadeniz (2019) tarafından Güneydoğu 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-*c*₂ (0,001-0,75 µg/L) öne çıkan pigmentler olmuştur.

Bölgede daha önce yürütülen çalışmalar ile mevcut çalışmadan elde edilen bulgularla 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 10. Karadeniz’de belirteç pigmentler üzerine yürütülen çalışmalar.

Table 10. Studies on marker pigments in the Black Sea.

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

Yarı kapalı ve dünyanın en büyük anoksik havzalarından biri olan Karadeniz ekosistemi antropojenik ve iklimsel değişimlere karşı oldukça hassastır. Yapısında meydana gelen ekolojik değişimler fitoplanktonik yapının ve dolayısıyla pigment kompozisyonunun da önemli oranda değişmesine yol açabilmektedir. Buna bağlı olarak fitoplankton kompozisyonunda 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 değişimlerin 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 pigment kompozisyonunun zamansal ve alansal dağılımı belirlenmiştir.

Pigment standartlarına ait elde edilen ayırma parametreleri fitoplankton gruplarına özgü olan belirteç pigmentlerin belirlenmesinde mevcut yöntemin kullanılabilirliğini 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, besin tuzu dinamiği, fiziko-kimyasal parametreler, uydu verisi vb) ve sürekli izleme programlarına ihtiyaç duyulmaktadır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma TÜBİTAK 113Y189 numaralı proje ile desteklenmiştir. Deniz çalışmaları esnasında yardımlarından dolayı proje ekibine, “R/V SÜRAT ARAŞTIRMA I” ve “R/V KARADENİZ ARAŞTIRMA” gemilerinin kaptan ve gemi adamlarına teşekkür ederiz.

[*] Bu Çalışma Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Su Ürünleri Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans Tez Çalışması Olarak Sunulan “Pigment Analizinde Kromatografik Ayırma Parametreleri” İsimli Tezden Üretilmiştir.

KAYNAKLAR

- Ağırbaş, E., Koca, L. & Aytan U. (2017). Spatio-Temporal Pattern of Phytoplankton and Pigment Composition in Surface Waters of South-Eastern Black Sea. *Oceanologia*, **59**, 283-299.
- 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, 199s.
- Barlow, R.G., Aiken, J., Holligan, P.M., Cummings, D.G., Maritorena, S. & 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. & 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. & 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. & Worm, B. (2010).** Global phytoplankton decline over the past century. *Nature*, **466**(7306), 591-596.
- Ediger, D., Soydemir, N. & 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., Berthon J.F., Canuti, E., Slabakova, N., Moncheva, S., Shtereva G. & Dzhurova, B. (2012).** Phytoplankton taxonomy based on CHEMTAX and microscopy in the Northwestern Black Sea. *Journal of Marine Systems*, **94**, 18-32.
- Eker-Develi, E., Berthon, J.F. & Linde, D. (2008).** Phytoplankton class determination by microscopic and HPLC-CHEMTAX analyses in the southern Baltic Sea. *Marine Ecology Progress Series*, **359**, 69-87.
- Eker-Develi, E. & 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.
- Falkowski, P.G. & Raven, J.A. (2007).** *Aquatic photosynthesis*, Princeton University Press, Second edition, 484s.
- Genç, N. (2018).** *Güneydoğu Karadeniz'de pigmente dayalı fitoplankton boy gruplarının fotik bölge dinamiği*. Yüksek Lisans Tezi, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü-, Rize, Türkiye, 48s.
- Gibb, S.W., Barlow, R.G., Cummings, D.G., Rees, N.W., Trees, C.C., Holligan, P. & 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. & Mantoura C. (2001).** Phytoplankton pigment chemotaxonomy of the northeastern Atlantic. *Deep Sea Research II*, **48**, 795-823.
- Gieskes, W.W.C. & 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. & Liaen-Jensen, S. (1985).** Synechococcus spp. as likely Zeaxanthin-dominant Ultraphytoplankton in the North Atlantic. *Limnology and Oceanography*, **30**, 412-414.
- Jeffrey, S.W. & 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, 19-36pp.
- Karadeniz, M.N. (2019).** *Güneydoğu Karadeniz Fitoplankton Pigment Profili Ve Fitoplankton Boy Grupları*. Yüksek Lisans Tezi, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 70s.
- 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, 73s.
- Kopelevcih, O.V., Burenkov, V.I., Ershova, S.V., Sheberstov, S.V. & 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. & Ağırbaş, E. (2012).** Picoplankton Dynamics during Late Spring 2010 in the South-Eastern Black Sea. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **12**, 397-405.
- 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. & 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. & 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. & 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. & 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.
- 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.
- Stauber, J.L. & Jeffrey, S.W. (1988).** Photosynthetic Pigments in fifty-one Species of Marine Diatoms. *Journal of Phycology*, **24**, 158-172.
- Tait, R. V. & Dipper, F. A. (2001).** Elements of Marine Ecology, Butterworth-Heinemann Pub., forth edition, Gread Britaiin, 462s.
- Takahashi, T., Sutherland, S.C., Sweeney, C., Poisson, A., Metzl, N., Tilbrook, B., Bates, N., Wanninkhof, R., Feely, R.A., Sabine, C., Olafsson, J. & 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, 61s.
- Uitz, J., Claustre, H., Morel, A. & Hooker, S.B. (2006).** Vertical distribution of phytoplankton communities in open ocean: An assessment based on surface chlorophyll. *Journal of Geophysical Research-Oceans*.
- Uitz, J., Claustre, H., Brian Griffiths, F., Ras, J., Garcia, N., & 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.
- Utermohl, H. (1958).** Zur Vervollkommnung der quantitativen phytoplankton: Methodik Mitteilung Internationale Vereinigung Theoretische und Angewandte Limnologie 9, 1-38.
- Wright, S.W. & 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. & 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.
- Yılmaz, A., Tugrul, S., Polat, C., Ediger, D., Çoban, Y. & 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.
- Yuney, O., Vladimir, A., Baştürk, Ö., Yılmaz, A., Kideys, A.E., Moncheva, S. & Kononov, 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.