

AKIM SİTOMETRİ VE SU ÜRÜNLERİ UYGULAMALARI

Metin YAZICI¹, Remziye Eda YARDIMCI²

¹İskenderun Teknik Üniversitesi, Dörtüol Meslek Yüksek Okulu, Hatay

²İstanbul Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Yetiştiricilik Bölümü, Laleli-İstanbul

Received: 30.06.2015

Accepted: 20.11.2015

Published online: 21.06.2016

Corresponding author:

Metin YAZICI, İskenderun Teknik Üniversitesi, Dörtüol Meslek Yüksek Okulu, Hatay

E-mail: metin.yazici@iste.edu.tr

Öz:

Akım sitometri (AS), 0.2–150 µm büyüklüğündeki partiküllerin genellikle de hücrelerin tek tek, bir ışık demetinin önünden, bir sıvı içinde geçerken, anlık olarak ölçümlerini yapan daha sonra da çoklu fiziksel özelliklerini analiz eden bir teknolojidir. Akım sitometri, hücre biyolojisini birçok açıdan araştırmak ve istenilen hücreleri izole etmek için kullanılır. Akım sitometri çok sayıda tek hücrenin birçok karakteristiklerini hızlı bir şekilde ölçtüğünden hücre tabanlı analizde altın standart olarak kabul edilmiştir. Diğer tekniklerle karşılaştırıldığında, Akım sitometri'nin hızlı veri eldesini ve çok parametrelili analizi kolaylaştırması popülaritesinin artmasına ve uygulama alanlarının genişlemesine yol açmıştır. Bu derlemede, Akım sitometri'nin su ürünleri alanındaki mevcut durumu ve uygulamaları hakkında özet bir şekilde bilgi verilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Akım Sitometri, Balıklarda fagositik aktivite, Hücre tabanlı analiz, Akuatik toksikoloji, Plankton, Hemosit

Abstract:

Flow Cytometry and its Applications in Aquatic Sciences

Flow cytometry (FCM) is a technology that simultaneously measures and then analyzes multiple physical characteristics of 0.2–150 µm sized particles, usually cells, as they flow one by one in a fluid stream through a beam of light. Flow cytometry is used for investigating many aspects of cell biology and for isolating the cells desired. Since Flow cytometry measures the multiple characteristics of large numbers of individual cells rapidly, it has been accepted as the gold Standard in cell based analysis. Since Flow cytometry facilitates rapid data acquisition and eases multiparameter analysis, leading to increased popularity and widespread applications as compared to other analyzing techniques. In this review, the current status and utilization of Flow cytometry in aquatic sciences are briefly presented.

Keywords: Flow Cytometry, Phagocytic activity of fish, Cell-based analysis, Aquatic toxicology, Plankton, Haemocyte

Giriş

Akım sitometri (AS), süspansiyon halindeki hücrelerin veya partiküllerin belli bir hızda, sıvı bir sistem içerisinde, bir ışık kaynağının önünden tek tek geçerken farklı özelliklerine göre tanımlandığı bir sistemdir (Shapiro, 2003; Özdemir ve Artaç, 2013). Analiz için hücrelerin veya partiküllerin içinden tek sıra halinde geçtiği boru çapıyla bağlantılı olarak 0.2–150 µm büyüklüğünde partiküller veya hücreler uygundur. Katı dokulardan alınan hücre örnekleri analiz edilecekleri zaman süspansiyon hâle getirilmelidir (BD Biosciences, 2000).

AS her bir hücrenin birçok fiziksel ve kimyasal karakteristiğinin anlık olarak ölçülüp daha sonra analiz edilebildiği bir uygulamadır. Ölçülebilen özellikleri; hücrelerin ya da partiküllerin büyüklükleri, granüllük durumu ya da hücre içi kompleksliği ve florasan yoğunluğudur (BD Biosciences, 2000). Hücrelerin sayımı ve analizinde mikroskopik yöntemlere göre tek hücre seviyesinde, daha hızlı ve doğru sonuçlar elde edilmesi, karışık popülasyonlar içerisinde her bir hücrenin ayrı ayrı özelliklerin tespitine ve analizine imkân sağlamasından dolayı geleneksel yöntemlerin alternatifi olmuştur (Manti ve diğ., 2015).

AS hücrelerin sayımında, incelenmesinde ve sınıflandırılmasında kullanılan gelişmiş bir teknolojidir. AS'deki gelişmeler monoklonal antikör teknolojisindeki gelişmelerle paralellik gösterir (Shapiro, 2003). Ayrıca araştırmacılara ve klinisyenlere 3 önemli özellik sunar. Birincisi AS popülasyondaki her bir hücreyi ayrı ayrı analiz eder. Bu şekilde popülasyonda çok az miktarda bulunan hücrelerin incelenmesi mümkün olur. İkinci olarak olağanüstü derecede hızlıdır. Rutin örnek analizlerinde 100.000 hücre/sn. analiz edilip sayılabilir. Son olarak AS bir hücrenin birçok özelliğini anlık olarak ölçme kapasitesine sahiptir. Çoklu parametrelerin bir araya getirilmesi araştırmacılara bir hücre düzeyinde daha öncekinden hızlı bir şekilde veri elde edilmesini sağlar. Bu kapasitelerinden dolayı AS araştırmacılar ve klinisyenler için çoklu uygulamalarda kullandıkları güçlü bir araç olmuştur (BD Flow Cytometry, 2008).

Biyolojik partiküller florokrom olarak adlandırılan bir veya daha fazla florasan boya ile boyandıklarında hücrenin metabolik aktivitesi, DNA

içeriği, yüzey ve hücre içi işaretleyicileri hakkında ilave bilgiler sağlanır (Flow cytometry, 2006).

Modern AS'nin başlangıcı Fulwyler'in Coulter prensibini kullanarak hücre büyüklüklerine göre vede hücrelere elektrik yüklemeleri yaparak hücre sınıflandırıcısı geliştirmesiyle olmuştur. Daha sonra aynı anda çok parametrelili ölçümler yapabilen AS'ler geliştirilmiştir. 1970'li yılların ortalarında ticari olarak kullanılmaya başlanmıştır (Flow Cytometry, 2006). İlk olarak tıp alanında hematolojik çalışmalarda, kan hücrelerinin sayımında kullanılmıştır. AS hematolojide birçok farklı alanda kullanılmasının yanı sıra pek çok klinik uygulama ve araştırma alanında da kullanılmaktadır. Özellikle moleküler yöntemlerle kombine edilerek organ nakil üniteleri ve araştırma laboratuvarları ile mikrobiyoloji, patoloji, histoloji, biyokimya gibi klinik laboratuvarlarda da kullanılan önemli bir araştırma yöntemi olmuştur (BD Flow Cytometry, 2008).

AS'nin eşsiz gücü; her bir hücreyi anlık olarak bir çok parametreyle hızlı ve kantitatif olarak ölçüm yapabilmesi ve daha sonra istenen hücrelerin izole edilebilmesidir (Melamed, 2001). İlaveten, nadir popülasyonlarda ve stem hücreler, dentritik hücreler, antijen spesifik T hücreler ve genetik transfektanlar gibi hücreleri tespit etmede duyarlıdır (Flow Cytometry, 2006).

AS bağışıklık sistemi hücrelerinin metabolik aktivitesini izlemek için hem memelilerde hemde balıklarda önemli bir potansiyel sunmuştur (Stosik ve diğ., 2002). Moleküler etkileşimler, protein yapısı ve DNA dizilimleri hakkında bilgi sağlanabilmektedir. Safılık oranı %99'dan daha fazladır. Bu sınıflandırılmış partiküller daha sonraki çalışmalar için kullanılabilir.

AS çeşitli bilim dallarındaki insanların kullanabileceği karmaşık bir yapıdır. İmmunologlar, ekologlar, araştırmacı veya klinik laboratuvarında çalışanlar, birçok farklı uygulama için kullanılabilir. Bugün su ürünlerinde, bağışıklık çalışmalarında, antibiyotik duyarlılık çalışmalarında, ilaç, immunostimulant ve aşı etkinliğini ölçmede rutin olarak kullanılan bir yöntem olmuştur (Yentsch ve diğ., 1983; Wang ve diğ., 2010). Sonuç olarak AS uygulamaları her geçen gün boya kimyasında, elektronik ve bilgisayar teknolojisindeki ilerlemelere ve farklı analizler için monoklonal antikör üretimine bağlı olarak sürekli gelişme göstermek-

tedir. Hücre tabanlı analiz yapan hiçbir teknoloji bu kadar hızlı bir şekilde gelişmemiştir. AS endüstrisini geliştirme çabaları arasında otomasyon ve laboratuvar entegrasyonu yapılarak daha geniş alanlarda kullanımı da hedeflenmektedir (Melamed, 2001).

Bu derlemede AS'nin genel kullanımı ve çalışma prensibi kısaca özetlendikten sonra su ürünlerindeki AS'nin kullanım alanlarından, triploid çalışmalarını, planktonik organizmaların tanımlanması ve popülasyon yapılarının tespit edilmesi, balıklarda ve diğer akuatik organizmalarda bağışıklık sisteminin çeşitli etkenlere verdiği yanıtın incelenmesi, akuatik mikroorganizmaların tespiti ve sayılması gibi bir çok farklı alanlarda yapılan çalışmalar hakkında bilgi verilip, dünyada sürekli artan kullanımının ülkemizde de başta su ürünleri sektörü olmak üzere yaygınlaştırılmasına katkı sağlanması amaçlanmıştır.

AS'nin Çalışma Prensibi

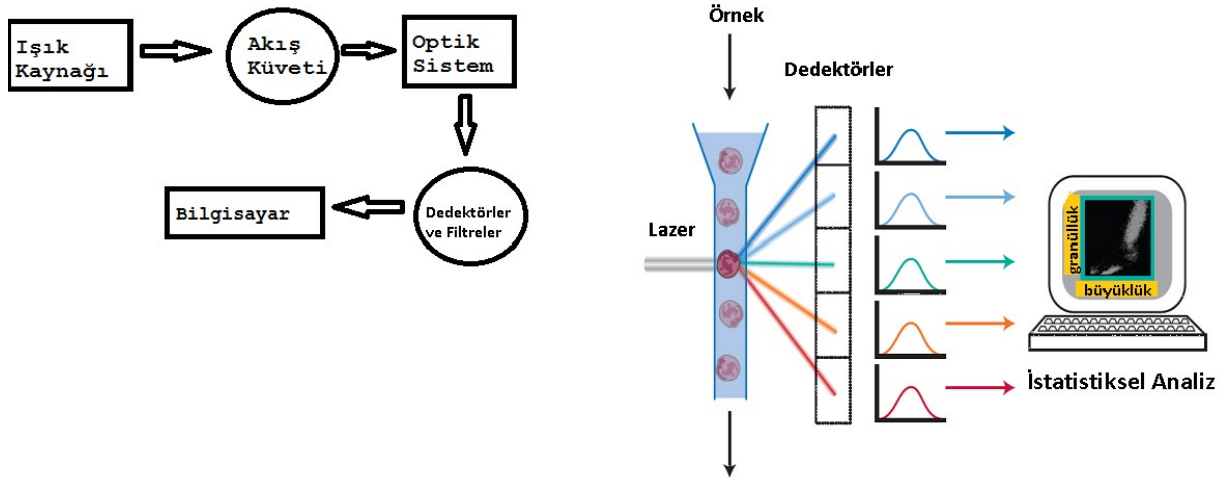
Süspansiyon halinde hazırlanan ve floresan ile boyanan hücreler tek sıra halinde akış kanalından geçerken lazer ışığı ile karşılaşır (Melamed, 2001). Her bir hücre yada partikül lazer ışığının önünden geçerken ışık saçar ve floresan ışıkta satabilir. Üzerinde floresan molekülü bulunan partiküller bu floresan ışığı yayar. Saçılmış ışık ve floresan ışık uygun bir şekilde yerleştirilmiş lens-

ler tarafından toplanır. Işık demeti dağıtıcısı ve filtrelerin kombinasyonu ile saçılmış ışık ve floresan ışık uygun detektörlere yönlendirilir. Detektörler tarafından alınan bu sinyaller daha sonra elektronik sistemler tarafından yorumlanabilecek dijital sistemlere dönüştürülür. Her partikül veya hücre için bir veri toplanır. Bu sinyaller bilgisayar ortamına aktararak hücrelerin büyüklüğü, granülaritesi, içyapısı ve floresan yoğunluğu hakkında bilgi verir. Bu veriler örnek içindeki alt popülasyonlar hakkında bilgi elde etmek için de analiz edilebilir (Yentsch ve diğ., 1983; Demers ve diğ., 1989). Şekil 1'de AS'nin temel çalışma prensibi gösterilmiştir. Bazı AS'lere kullanıcı isteklerine bağlı olarak hem tanımlama hemde sınıflama yapacak ekipmanlar eklenebilmektedir.

Hücre Karakteristiklerinin Ölçülmesi

Bir hücre lazer ışık demetinin önünden geçerken ışık Şekil 2'de görüldüğü gibi farklı yönlere saçılır. İleri saçılma hücrenin büyüklüğü, 90 derecelik yan saçılma da hücre içi kompleksliği hakkında bilgi verir. Bu bilgiler her bir noktanın bir hücreyi temsil ettiği noktasal grafikte gösterilir (Şekil 3).

Bugün AS ile aynı anda hücrelerin birden fazla popülasyonları üzerine araştırmacılar çalışabilir ve hücre kompleksliği ve büyüklüğü hakkında bilgi elde edebilir (Tung ve diğ., 2007).



Şekil 1. AS'nin temel çalışma prensibi ve genel görünümü (Shapiro, 2003).

Figure1. Basic working principle of FCM and genreal overview (Shapiro, 2003).

AS Cihazının Temel Bileşenleri

Bir AS 3 temel parçadan oluşur: akış sistemi, optik sistem ve elektronik sistem. Akış sisteminin amacı partikülleri bir sıvı içerisinde lazerle tek sıra halinde temas edeceği şekilde taşımaktır. Çalışılacak örneğe göre, akış hızı partiküllerin içinden geçtiği boru çapına ve çeşitli parametrelere göre ayarlanabilir (Şekil 4). Daha yüksek hızlı akış, immün fenotipleme gibi kalitatif çalışmalarda kullanılırken, daha düşük hızlı akış daha çok DNA analizi gibi uygulamalar için önemlidir (Shapiro, 2003; Ormerod, 2008; Seoane ve diğ., 2014).

Optik sistem uyarı optikleri ve toplama optiklerinden oluşur. Uyarı optikleri lazer ışığını şekillendirmekte ve odaklamada kullanılan lazerlerden ve lenslerden oluşur. Toplama optikleri partiküllerin lazerle temasından sonra saçılan ışıkları toplamak için kullanılan toplama lenslerinden ve belirli dalga boylarında toplanmış ışığı, uygun optik detektörlere yönlendiren filtrelerden oluşur. Çalışılacak parametre sayısına bağlı olarak, lazer, optik filtre ve dedektör sayıları artırılabilir (Shapiro, 2003; Ormerod, 2008; Seoane ve diğ., 2014).

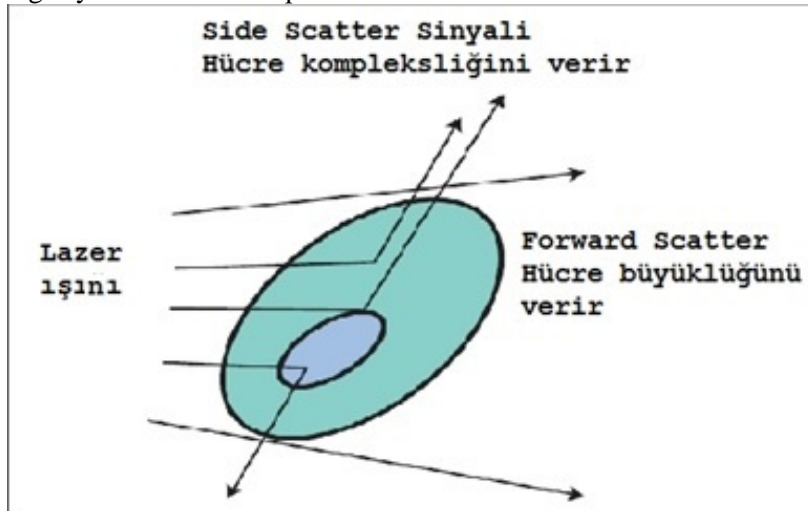
Elektronik sistem tespit edilen ışık sinyallerini, bilgisayarda işlenebilecek elektronik sinyallere çevirir. Veriler bilgisayar sisteminde toplanır ve

yazılım programları ile analizi yapılır. Optik sinyallerin veri aktarımını sağlamak üzere dijital sinyallere, voltaj değerlere, çevrimi sağlanır. Voltaj değerinin yüksekliği, genişliği ve alanı hesaplanır. Bilgi aktarımı görevi görür. Bazı hücre sınıflama özelliği ile donatılmış AS' lerde elektronik sistem bu sınıflandırma da kullanılır (Demers ve diğ., 1989; Ormerod, 2008; Seoane ve diğ., 2014).

Verilerin Değerlendirilmesi ve Saflaştırma

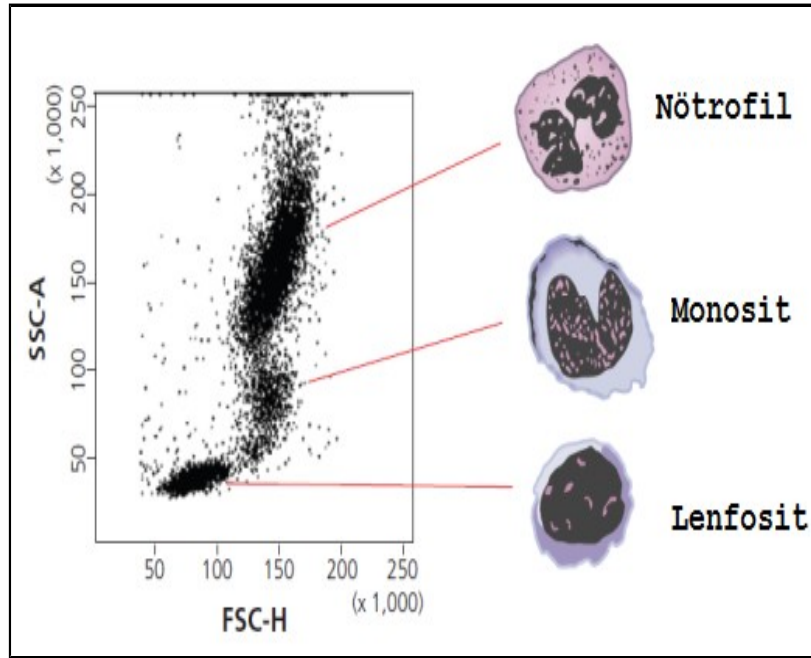
Hücreler analiz edilirken bilgisayar sisteminde toplanan veriler farklı grafikler kullanılarak ifade edilir. Nokta alan (dot-blot) ve histogram en çok kullanılan grafiklerdir. Nokta alan grafiğinde her bir nokta tek bir hücreyi göstermektedir. Histogram ise tek bir parametrenin floresan yoğunluğunu ifade etmektedir (Rahman, 2006).

AS ile hücre popülasyonları hem analiz edilebilir hem sınıflandırılabilir. Bu tek tip hücreyle çalışmak isteyen araştırmacılar için çok önemli bir özelliktir. Hücreleri ayırmak için başka yöntemler olmasına karşın, AS ile yapılan ayırma işleminde daha saf ve fazla miktarda hücre elde edilebilmektedir. İstenen hücreler tüplere, plakalara ve lamlara ayrılabilen ve hücre kültürü gibi çalışmalarda kullanılmaktadır (Demers ve diğ., 1992).



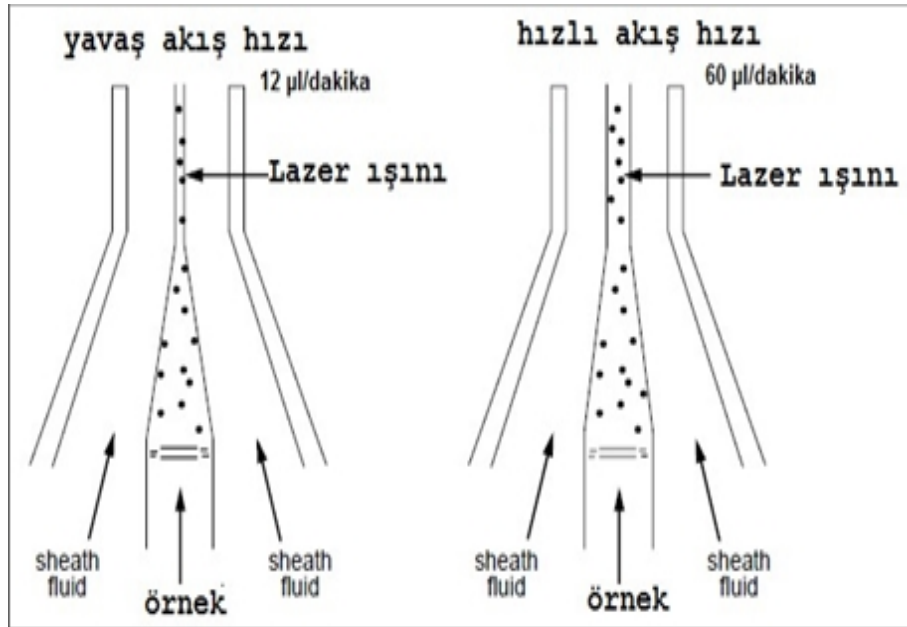
Şekil 2. Lazer ışınının önünden geçerken partiküllerden saçılan ışıklar (Seoane ve diğ., 2014).

Figure 2. Light scattering from the particles passing by the laser (Seoane ve diğ., 2014)



Şekil 3. Farklı kan hücrelerinin gösterildiği noktasal grafik (BD Flow Cytometry, 2008).

Figure 3. Dot plot showing various blood cell types (BD Flow Cytometry, 2008).



Şekil 4. Boru çaplarına göre hidrodinamik odaklanmanın düzenlenmesi (BD Biosciences, 2000).

Figure 4. Hydrodynamic focusing of the sample core through a flow cell (BD Biosciences, 2000).

Bazı sistemlerde aynı anda 4 sınıflandırma yapılabilir. Safılaştırma ya mekanik yolla ya da elektrostatik yolla yapılır. Elektrostatik yolla 100.000 hücre/sn.'ye ulaşılabilirken, mekanik yolla en çok 300 hücre/sn.'ye ulaşılabilir (BD Flow Cytometry, 2008).

Su Ürünlerinde AS Uygulamaları

AS'nin su ürünlerinde çok yaygın bir kullanım alanı bulunmaktadır. Bu kullanım alanlarından bazıları, çeşitli gruplar halinde özetlenmiştir.

Triploid Çalışmalarında

AS su ürünleri alanında ilk olarak 1980'li yıllarda hem balıklarda hem diğer su ürünlerinde triploidy çalışmalarında kullanılmaya başlanmıştır (Thorgaard, 1982; Yentsch, 1983; Allen, 1983; Lecommandeur ve diğ., 1994). Thorgaard 1982 yılında kendiliğinden gözlenen ve uyarılarak oluşturulan triploid gökkuşacağı alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) kırmızı kan hücrelerinin DNA içeriğinin AS ile analiz ederek tanımlanabileceğini belirtmiştir. Sazan ve salmonlarda poliploid durumun olup olmadığını, balıklarda kan hücreleri ve granülosit örnekleri, istiridyelerde ise hemolenfler AS ile inceleyerek başarılı bir şekilde tespit etmişlerdir (Allen, 1983). Chaiton ve Allen 1985'te Pasifik istiridyelerinde kromozom sayılarına bağlı olarak larval aşamada ploidy AS ile güvenilir bir şekilde kısa sürede tespit etmişlerdir. Lecommandeur ve diğ. (1994) larval aşamada gökkuşacağı alabalığında ploidy nin saptanmasında hızlı ve basit bir metot olarak AS'yi kullanmıştır. Bunun için gökkuşacağı alabalığı yumurtaları doğrudan bir buffer içine alınarak nükleik asitin serbest kalması sağlanmış ve DNA florokrom boya ile boyanarak AS ile analiz edilmiştir. Böylelikle AS ile birkaç dakika içinde diploid ve triploid ayrımı histogramlarla yüksek kalitede saptanabilmiştir. Su ürünlerinde biyoteknolojide sperm ve embriyo dondurma çalışmalarında da AS kullanılmıştır (Lezcano ve diğ., 2004). Lezcano ve diğ. (2004) penaeid karides (*Litopenaeus vannamei*) sperm veya embriyoların dondurularak saklanması çalışmalarında farklı solüsyonlar kullanarak dondurulan hücrelerin çözüldükten sonra canlılığının belirlenmesinde optik mikroskopun yanı sıra AS'yi kullanmıştır. Bunun için propidiumiodine kullanarak hücrelerin DNA' la-

rını işaretlemiş ve AS ile canlı hücreleri ayırt ederek spermin kalitesini belirlemişlerdir. Özellikle hızlı bir yöntem olması açısından dondurulma işlemi sırasında kullanılan kimyasal solüsyonların hücrede yaptığı etkilerin araştırılmasında, osmotik şok sonucu hücrede oluşabilecek olan şişkinlik ya da büzüşme gibi morfolojik bozuklukların tespiti yanı sıra çözünme işleminde canlı ve ölü hücrelerin ayırt edilmesinde de AS kullanılmaktadır (Lezcano ve diğ., 2004).

Planktonik Çalışmalarda

Deniz ekosistemi büyük ölçüde plankton ve onu kuşatan çevrenin etkileşimine bağlıdır. Plankton deniz biyomasının $\frac{3}{4}$ ünü oluşturur. AS'nin planktonik organizmalarda kullanılmasıyla mikrobiyal planktonun doğal popülasyonlarının ekolojik ve fizyolojik çalışmalarında, ekosistemin yapısı ve dinamiği hakkında önemli gelişmeler sağlanmıştır (Yentsch ve diğ., 1983; Demers ve diğ., 1989). Fitoplankton deniz besin zincirinin temelidir. Atmosferdeki karbon döngüsünde anahtar bileşendir ve sera etkisinin düzenlenmesinde anahtar rol oynar. Fitoplankton tarafından üretilen dimethylsulfoniopropionate (DMSP) bulut oluşumunda önemli rol oynar. Fitoplanktonun gerek sayılarında, gerek boyutlarında, gerekse de tür kompozisyonunda herhangi bir nedenle meydana gelebilecek değişimler tüm deniz canlılarını ve aynı zamanda etkileşim içinde bulunduğu biyosferi de etkileyecektir (Develi, 2009). Bu yüzden akuatik ortamda son derece bol miktarda bulunan, taksonomik olarak çok çeşitli, dinamik bir yapıları olan planktonik organizmaların takibi son derece önemlidir (Seoane ve diğ., 2014). Geniş bir yelpazeye sahip fitoplanktonun deniz ortamıyla etkileşimini daha iyi anlamak; küresel ısınma, iklim değişikliği ve kirlilik üzerine daha derin bilgilere sahip olmamıza ve deniz ekosistemi üzerine büyük ölçekte etkilerini tahmin etmemize olanak sağlar. Bugüne kadar bu konudaki araştırmalar için klasik ve teknolojik birçok yöntemler kullanılmıştır (Mohammed, 2015).

AS 30 yılı aşkın bir süre pikoplankton seviyesinden mikroplankton seviyesine kadar birçok farklı alanda tek hücre seviyesinde bu araştırmalarda en çok kullanılan yöntemlerden biri olmuştur (Veldhuis ve Kraay, 2000; Bonato ve diğ., 2015; Bonato ve diğ., 2015). Bu organizmaların tanımlanma-

sında, biyomas ve yoğunluklarının saptanmasında hızlı, kolay ve güvenilir ölçümler yapabilen AS'den faydalanma yoluna gidilmiştir. Veldhuis ve Kraay (2000) AS'nin her bir alg hücrelerinin fizyolojik durumu hakkında detaylı bilgi verdiğini ve yeni boyama yöntemleriyle bu hücrelerin arasında ölü ve canlılık ayırımının yapılabildiğini belirtmiştir.

Demers ve diğ. (1989) fitoplanktonun çevresel ve fizyolojik durumunu akım sitometriyle incelemişler ve ortamdaki besin durumunun fitoplanktonik organizmaların büyüklükleri üzerine etki ettiklerini öne sürmüşler. Marie ve diğ. (1997), doğal örneklerdeki hücresel DNA'yı boyayarak hem hücrelerin sayımını hem de hücre döngülerinin AS ile analizini yaparak okyanus ortamındaki pikoplankton dinamiğini ve yapısını anlamada AS'nin çok faydalı olabileceğini belirtmiştir.

Vives-Rego ve diğ. 2000 yılında yaptıkları bir çalışmada AS'nin akuatik ve çevresel mikrobiyolojide kullanılan çok değerli bir araç olduğunu belirtmişlerdir. AS'nin hücre büyüklüğünü ve dağılımını bunlara ek olarak heterojen bir popülasyondaki tek bir hücrenin fizyolojik ve biyokimyasal karakteristikleri gibi birçok özelliklerini hızlı ve direk olarak tespit etmede kullanılan bir yöntem olduğunu öne sürmüşlerdir (Vives-Rego ve diğ. 2000).

Planktonik ekosistemdeki canlı biyomasın önemli bir kısmını oluşturan, son derece küçük yapılarından ve çeşitliliğinden dolayı çalışılması zor olan nanoplanktonik organizmalar Rose ve diğ. (2004) tarafından AS ile incelenmiş ve bu organizmaların akuatik sistemdeki trofik dinamiğin ve enerji akışının anlaşılmasına katkı sağladığını belirtmişlerdir. Duhamel ve diğ. (2008) yaptıkları çalışmada fitoplankton popülasyonlarında hücre seviyesinde fosfataz aktivitesinin tespiti ile ilgili AS kullanmıştır. Lucasa ve diğ. (2010) tropikal karides havuzlarında yaptıkları yem girişindeki artışa eşzamanlı olarak stok karides biyomasını incelediği çalışmada AS ile havuzlarda 110 günlük periyotta fitoplankton ve bakteriyoplankton stok ve dinamiklerini izlemişlerdir. Çalışma sonucunda AS'nin su ürünleri sistemlerinde fitoplankton ve bakteri dinamiği komplekslerini anlamamızı geliştirmede ve hastalık gelişimi üzerine potansiyel etkilerini izlemede faydalı olduğunu öne sürmüşlerdir.

Hematolojik ve İmmünolojik Çalışmalarda

AS tek hücre seviyesinde çoklu ölçümlerin kolay ve hızlı bir şekilde uygulanabilmesine olanak sağlamasından dolayı balık hematolojisi, patolojisi ve immünolojisi alanlarında ki araştırmalar için de büyük potansiyeller taşır. İmmunologlar rutin olarak AS'yi lökosit alt popülasyonlarını fenotipik olarak karakterize etmek için kullanırlar (Chilmonczyk ve Monde, 1998). İmmun sistem hücrelerin metabolik aktivitelerini izlemek için potansiyel bir fırsat sunar. Çeşitli omurgalı türlerdeki lökosit kompozisyonun ölçülmesinde rutin olarak kullanılır. Bu da immün sistemin mevcut durumu hakkında önemli bir bilgi sağlar (Stosik ve diğ., 2002).

Valet (1984) kan hücrelerin sayımı ve farklı alt gruplara ayrılmasına yönelik AS kullanarak yeni bir yöntem kullanmıştır. Ellsaesser ve diğ. (1985) kanal kedi balığındaki (*Ictalurus punctatus*) lökositleri mikroskop ve AS yöntemi kullanarak tanımlamışlar ve ayırmışlar, stresli ve enfekte balıklarda önemli hematolojik değişiklikler olduğunu belirtmişlerdir. Donald ve diğ. (1987), kanal kedi balıklarının ön böbrek, dalak ve kandan elde ettikleri hücrelerinde bulunan spesifik olmayan sitotoksik hücreleri AS yöntemini kullanarak analiz etmişlerdir. Thuvander ve diğ. (1987), gökkuşuğu alabalığının periferik lökositleri arasında fagositik hücrelerin oranını in vitro olarak tespit etmek için AS ve elektron mikroskopu yöntemini kullanmışlardır. Morgan ve diğ. (1993) bazı salmonid balıklarda farklı kan hücre tiplerinin oranlarını ölçmek için AS yöntemini kullanmışlar ve bu yöntemin balık kanındaki hücre popülasyon dinamiğini izlemek için hızlı ve güvenilir bir yöntem olduğunu belirtmişlerdir.

Rombout ve diğ. (1993) sazanlarda AS yöntemi kullanarak, balıklarda mukozal bağışıklığı anlamak için mukus ve serum Ig arasındaki farkları araştırmışlardır. Balıklarda mukozal bağışıklık patojenik olarak yoğun ortamlarda yaşayan balıklarda çok önemli olabilmektedir. Kemenade ve diğ. (1994) sazanlarda (*Cyprinus carpio*) makrofaj ve nötrofillerin fagositik aktiviteleri in vitro olarak AS kullanarak analiz etmişlerdir. Rombout ve diğ. 1996 yılında yaptıkları bir diğer çalışmada ise spesifik monoklonal antikor kullanarak sazanlarda trombositleri karakterize etmişlerdir. Koumans-van Diepen ve diğ. (1994) sazanlarda

B hücreleri ve plazma hücrelerinin böbrek, dalak, timüs ve kandaki ontojenik gelişimlerini AS yöntemiyle tespit etmişler ve sonuçların sazanlarda humoral bağışıklık sisteminin anlaşılmasına katkı sağladığını belirtmişlerdir.

AS çeşitli balık türlerinde hücrel immun fonksiyonlarını ve balık lökosit alt popülasyonlarını analiz etmek için hızlı ve tekrarlanabilir bir yöntem olarak kullanılmaktadır. Chilmonczyk ve Monge (1998) gökkuşuğu alabalığında spesifik olmayan hücrel bağışıklık sistemiyle ilgili çalışmada bu yöntemi kullanmış ve patojen ve balık arasındaki ilişkiye yönelik faydalı bilgiler elde ettiğini belirtmiştir. İlaveten bu savunma mekanizmalarını ölçmek için (fagositik aktivite, oksidatif burst ve doğal sitotoksik test) patolojik şartlar altında hücrel cevapların düzenlenmesini analiz etmişlerdir. Farklı birçok balık türü bulunması verilerin yorumlanmasını zorlaştırmasına rağmen, AS'nin balıklarda immünolojik çalışmalar ve balık patolojisinin klinik boyutuyla ilgili çalışmalarda faydalı bir teknik olduğunu belirtmişlerdir (Chilmonczyk ve Monge, 1998).

Cuesta ve diğ. (1999) çipuralarda (*Sparus aurata*) kanser hücrelerine karşı ön böbrek lökositlerde spesifik olmayan sitotoksik aktivitesini ölçmek için kolay ve hassas iki renkli AS ve mikroskobik yöntemleri kullanmışlardır. Bu yöntemin balıklarda spesifik olmayan sitotoksik hücrelerin aktivitelerini ölçmede etkin bir yöntem olduğunu belirtmişlerdir. Pettersen ve diğ. (2000) AS ile, immunofloresans ve immunoenzim histokimya yöntemlerini kullanarak Atlantik salmon (*Salmo salar*) balıklarında kanda, dalakta ve ön böbrekteki spesifik monoklonal antikor gelişimini araştırmışlardır. Barreda ve diğ. (2000) AS kullanarak gold fish balıklarında makrofaj gelişim aşamalarının nasıl olduğunu göstererek, makrofaj biyolojisinin ve balıkların enfeksiyöz etkenlere karşı immun cevap oluşturma mekanizmasının anlaşılmasına önemli katkı sağlamışlardır.

Esteban ve diğ. (2000), levrek balıklarında (*Dicentrarchus labrax*) kan hücrelerinin alt popülasyonlarını AS kullanarak ilk kez izole etmişler daha sonra mikroskobik olarak karakterize etmişlerdir. Elektron mikroskobuyla AS'nin birlikte kullanımıyla levreklerde periferik kandaki farklı hücre tiplerinin yüksek kesinlikle karakterize edilebildiğini belirtmişlerdir.

Stosik ve diğ. (2002) sazanlarda çeşitli ontogenik evrelerde nötrofillerin solunum patlaması analizi AS ile yapmışlar ve elde edilen verilerin daha önce yapılan çalışmalarla paralellik gösterdiğini belirtmişlerdir. Inoue ve diğ. (2002) sazanlarda AS yöntemi ile kan hücrelerini hızlı ve basit bir şekilde analiz ederek kan hücre popülasyonlarını tanımlamış ve 5 farklı gruba ayrıldığını belirtmişlerdir. Ayrıca her bir kan hücresini saymada AS yöntemini kullanmışlardır.

Milston ve diğ. (2003), çevresel faktörlerin Chinook salmonların (*Oncorhynchus tshawytscha*) humoral bağışıklık sistemi üzerine etkilerini in vitro koşullarda AS ile araştırmışlardır. Bu yöntemin balık immünoloji çalışmalarında faydalı bir yöntem olduğunu belirtmişlerdir. Köllner ve diğ. (2004) AS ve immuno-elektron mikroskop kullanılarak gökkuşuğu alabalıklarında trombositlerin fonksiyonlarını ve immun cevaptaki potansiyel rollerini araştırmışlardır. Korytar ve diğ. (2013) çok renkli AS kullanarak gökkuşuğu alabalıklarında lökosit alt gruplarını tanımlamıştır. Bu çalışmadan elde edilen bulgularla hem patolojik hem fizyolojik cevap sırasında immun sistem hücre komponentlerinin doğru bir şekilde ölçülmesinin mümkün olduğunu ve bu durumda immun sistemi daha iyi anlamamızı ve gelecekteki aşı geliştirme çalışmaları için mükemmel bir potansiyel sağladığını öne sürmüşlerdir. Bu yöntemin hızlı, basit ve doğru sonuçlar veren bir yöntem olduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışmayla ayrıca lenfoid organlar arasında hücre trafiğinin nasıl olduğuna yönelik detaylı bilgi sahibi olduğu vurgulanmıştır. AS'de kullanılan kapılama (gating) yöntemiyle hücreler gruplara ayrılarak 90 dk içinde çok yüksek adette hücre kinetiğinin hızlı ve doğru bir şekilde ölçülmesi sağlanmıştır. Çalışmanın ilk aşamasında lökositler eritrositlerden ayrılmıştır. Sonraki aşamada hücre debrisleri çıkarılmıştır. En son aşamada da 6 adet monoklonal antikor ve çeşitli florokromlar kullanılarak lökosit alt grupları kapılama sistemiyle gruplara ayrılarak tanımlanmıştır (Korytar ve diğ., 2013).

Ito ve diğ. (2014) 3 balina köpek balığında kan parametrelerinin ölçümünde AS yöntemini kullanmışlar ve bu yöntemin basit, hızlı, pratik ve güvenilir bir hematolojik yöntem olduğunu öne sürmüşlerdir. Ayrıca bu yöntemin diğer kıkırdaklı balıkların hematolojik analizinde de kullanıla-

bileceğini öne sürmüşlerdir. Bununla birlikte lenfosit, trombosit ve 3 farklı granülosidin etkili bir şekilde ayrılmasına ihtiyaç duyulduğunu belirtmişlerdir.

Alcox ve Ford (1998) deniz bivalvierinde hematositlerin sayısı ve özelliklerindeki çeşitliliği ve çevresel koşullar altındaki ilişkilerini rapor ettiği çalışmada AS ile istiridyeye hemosit popülasyonunu küçük granüller içeren, granüller içeren ve granül içermeyen olmak üzere 3 farklı tip hücre yapısında olduğunu belirtmişlerdir. Hegaret ve diğ. (2003) ani sıcaklık değişimi gibi çevresel strese maruz kalmış istiridyelerdeki (*Crassostrea virginica*) bağışık yanıtı AS kullanarak araştırmışlardır. Bu çalışmada istiridyeye hemositleri karakterize edilmiş, sayılmış, canlılık durumları ve fagositik aktiviteleri tespit edilmiştir (Hegaret ve diğ., 2003). Goedken ve De Guise (2004) yaptıkları çalışmada AS'nin bivalve immün sistemini ve istiridyelerde hastalık patogenezi anlamada çok faydalı bir araç olduğunu belirtmişlerdir.

Bihari ve diğ. (2003) Adriyatik denizinde farklı 17 noktadan toplanan midyelerde (*Mytilus galloprovincialis*) kaslarındaki hemositlerde DNA hücre döngülerindeki farklılıkları tespit etmek için AS kullanmış ve kas hemosit DNA sında hücre döngüsü karakteristiklerindeki değişiklikleri tespit etmek için çok güçlü bir teknik olduğunu vurgulamışlardır. İstiridyelerde (*Crassostrea ariakensis*) yapılan bir diğer çalışmada ise Donaghy ve diğ. (2009) AS'yi hemositlerin morfolojik ve immünolojik aktivitelerini incelemek amacıyla kullanmış, hyalinosit, granulosit ve blast benzeri hücre olmak üzere 3 tip hemosit hücre tanımlamıştır. Taylor ve diğ. (2009) doğal ve yetiştiricilik ortamındaki kerevitlerin fizyolojik durumunun incelenmesinde AS'yi hemositlerin karakterizasyonunda kullanmış, omurgasız hemosit sınıflandırmasında belirtildiği gibi, hücreleri hyaline, semigranüler ve granüler hemosit olmak üzere tanımlamıştır. Geliştirdikleri metotla 3 farklı göldeki doğal ve üretimi yapılan kerevit popülasyonlarının total hemosit değerlerini ve diferansiyel hemosit değerini hesaplamışlardır. AS'nin kerevitlerin fizyolojik durumunu tespit etmede çok faydalı bir araç olduğunu belirtmişlerdir (Taylor ve diğ., 2009).

Akuatik Organizmaların Fagositik Aktivitelerinde

Balıklarda bağışıklık sisteminde rol alan hücrelerin fagositik aktiviteleri; çevresel kirleticilerin immunotoksik etkilerini, su ürünlerinde kullanılan immunostimulant ve aşılarda etkinliğini ve patojenlere karşı balıkların immun cevabını ölçmek gibi çeşitli amaçlar için kullanılmaktadır. AS ile hücreler büyüklük, granüllük durumu ve florasan sinyallerini emiş durumuna göre alt popülasyonlara ayrılır ve florasan maddelerin fagositik hücreler tarafından absorbe edilmelerine ve solunum patlamasından dolayı boyaların azalmalarına bağlı olarak ölçümler yapılır. Örneklerde incelenmek istenmeyen hücreler kapılama (gating) yöntemiyle dışarıda bırakılır. Böylelikle hem fagositik aktivite hemde solunum patlaması analizi sonuçlarının etkilenmesi önlenmiş olur (Haugland ve diğ., 2014).

Esteban ve diğ. (1998) çipura balıklarındaki lökositlerin *Vibrio anguillarum*'a karşı fagositik aktivitelerini ölçmek ve fagositik hücreleri karakterize etmek için AS yöntemini optimize edecek bir çalışma yapmışlardır. Çalışma sonucunda *Vibrio anguillarum* bakterisinin makrofajlar ve asidofilik granulositler tarafından aktif bir şekilde fagosite edildiklerini tespit etmişlerdir (Esteban ve diğ., 1998).

AS'nin fagositik hücre oranlarının tam ve doğru olarak sayılmasında ve fagositik aktivitelerin ölçülmesinde uygun bir yöntemdir ve günümüzde birçok immünolojik çalışmada hastalık süresince veya aşılama sonrasında fagositoz aktivitesinin ölçülmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Lehmann ve diğ., 2000; Ortuno ve diğ., 2000).

Ortuno ve diğ. (2000) in vitro koşullarda çipura ön böbrek lökositlerinin solunum patlaması aktivitesi esnasında hidrojen peroksit üretiminin kinetiğini ölçmek için AS yöntemini kullanmıştır. Sazanlarda çeşitli ontogenik evrelerde nötrofillerin solunum patlaması analizi AS ile yapılmıştır. Elde edilen veriler daha önce yapılan çalışmalarla paralellik göstermiştir (Stosik ve diğ., 2002). Moritomo ve diğ. (2003) Ayu (*Plecoglossus altivelis*) balığının kan ve böbreğindeki Nötrofil burst aktivitesini sazan, gökkuşağı alabalığı, yılan balığı ve havuz balığının Nötrofil burst aktivitesiyle AS yöntemi kullanarak karşılaştırmıştır. Harford ve diğ. (2006), Avustralya'da tatlı sularda yaşa-

yan 3 balığın (*Macquaria ambigua*, *Bidyanus bidyanus*, *Melanotaenia fluviatilis*) fagositoz aktivitesini ölçmek için AS yöntemini kullanmış ve gelecekte immunotoksik teslerde kullanılabileceğini öne sürmüşlerdir.

Newaj-Fyzul ve diğ. (2007), gökkuşağı alabalığında patojenik olan *Aeromonas* enfeksiyonlarına karşı probiyotik etkinliği geliştirmek için *Bacillus subtilis* bakterisini kullanmışlardır. Bu bakteriyle etkileşimde gökkuşağı alabalığının kan hücrelerinde meydana gelen değişiklikleri AS yöntemi ile ölçülmüştür. Gomez ve diğ. (2014) çipuralarda peritoneal exudattaki mast hücrelerinin fraksiyonlarının analizinde AS yöntemini daha sonra da elektron mikroskobu kullanarak balık mast hücrelerinin diğer hücrelerden ayrılmasının daha gelişmiş omurgalıların inflamasyon mekanizmasını anlamamızda önemli bir adım olduğunu belirtmişlerdir. Corytar ve diğ. (2013) çok renkli AS kullanarak gökkuşağı alabalıklarında lökosit alt bölümlerini tanımlamış ve bu çalışmadan elde edilen bulgularla hem patolojik hem fizyolojik cevapta daha iyi aşı geliştirme çalışmalarına katkı sağlayacağını belirtmiştir. Atienza ve diğ. (2015) su ürünlerinde kullanılabilir potansiyel probiyotiklerin bağışıklık sistemi üzerine etkilerini; lökosit canlılığı, solunum patlaması ve fagositik aktiviteleri yönünden in-vitro olarak ölçmek için AS' nin çok faydalı bir araç olduğunu belirtmişlerdir.

Toksikoloji Çalışmalarında

Su ortamındaki bütün kirleticiler biyotik komüniteleri etkiler ve ekosistemin yapısını değiştirir. AS su ürünlerinde toksikoloji çalışmalarda, immunostimulantlar, probiyotikler ve çevresel kirleticilerin immunotoksikolojik değerlerinin ölçülmesinde kullanılmaktadır. Örneğin bakır yüksek konsantrasyonlarda mikroalgler için toksik etki gösterebilir. Mikroalglerde büyümeyi ve fotosentezle ilişkili diğer parametreleri etkiler (Cid ve diğ., 1995; Shelleyve diğ., 2009).

Cid ve diğ. (1995) deniz diatomlarından olan *Phaeodactylum tricornutum*'da fotosentez ve ilişkili parametreleri üzerine etkisinin araştırıldığı çalışmada klorofil a seviyesi AS ile pigment analizi ise HPLC (yüksek performanslı likit kromatografi) ile yapılmıştır. Sauve ve diğ. (2002) çeşitli metal bileşiklere deneysel koşullarda in vitro

olarak maruz bırakılan bazı deniz ve tatlısu bivalvialarındaki hemositlerin fagositik aktivitelerini AS kullanarak tespit etmişlerdir.

Hadjoudja ve diğ. (2009) havuzlarda plankton patlamasına karşı algasit olarak kullanılan bakır sülfata 24 ve 48 saat süreyle kısa süreli maruz bırakılmış *Microcystis aeruginosa* ve *Chlorella vulgaris* adlı cyanobakteriler üzerine bakır toksitesinin etkisini AS, Wu ve diğ. (2012) ise inorganik civa ve metil civanın toksik etkisinin bir deniz diatomu olan *Thalassiosira weissflogii*'in büyüme oranına ve fotosentez yapmasına etkisini AS ve FLIM yöntemleri kullanılarak araştırmıştır. Shelley ve diğ. (2009) AS kullanılarak chlorothalonil, cypermethrin ve pentachlorophenol isimli 3 pestisidin juvenil gökkuşağı alabalığının immun sistemi üzerine etkisi in vivo olarak incelemiştir.

Akuatik türlerde kimyasal yaralanmaların mekanizmasını anlamak için AS uygulaması çok faydalı bir yöntem olmuştur. Çevrede çok fazla miktarda bulunan kirleticilerden olan PBDE balıklarda, yaban hayatında ve insan dokularında kalıntıya sebep olur. Bu kimyasalın alabalık solungaçlarına verdiği zararı anlamak için Shao ve diğ. (2009) AS ile bir çalışma yapmış ve AS' nin akuatik türlerde kirleticilerin balıklardaki yaralanma mekanizmasını anlama fırsatı sağladığını belirtmişlerdir. Danion ve diğ. (2011) çalışmada kronik hidro karbon (petrol) kullanılmıştır ve petrol kirliliğine maruz kalan levrek balıklarının sağlık durumu ve immun sistem üzerine etkisini deneysel olarak araştırmıştır. Ham petrolün kas ve safradaki konsantrasyonu gaz kromatografisi ve kitle spektrometrisiyle ölçülürken lökosit ve farklılaşmış lökosit hücreleri klasik hematolojik yöntemlerle yapılmıştır.

AS ile hücre ölümleri ve lökositlerin fagositik aktiviteleri araştırılmıştır. Xian ve diğ. (2012) kaplan karideslerinin (*Penaeus monodon*) hemositleri üzerine nitritin toksitesini invitro olarak araştırdığı çalışmada reaktif oksijen ve nitritoksik üretimi, esteraz aktivitesi yanı sıra hematozis hücrelerin apoptozu AS kullanarak incelenmiştir. Bir başka çalışmada da As ile Xian ve diğ. (2013) kaplan karideslerinin hemositleri üzerine kadmiyumun toksik etkisini araştırmış ve intraselüler nitrit oksit üretimimin ölçümü için AS metodu ile 4-amino-5-methylamino-2',7'- difluorofluorescein

diacetate (DAF-FM DA) işaretli fluoresen bir prob kullanarak hemositlerdeki nitritoksiti saptamıştır.

Polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH) toksik ve kanserojen etkiye sahip organik yapıda bileşiklerdir ve çevrede uzun süre kalmaları sonucunda çevre kirlenmesine sebep olurlar. Mikroorganizmalar tarafından PAH'ların parçalanmalarının araştırılması çevrenin daha kısa bir sürede temizlenmesi açısından önemlidir (Alver ve diğ., 2012). Ayrıca PAH'lar balık popülasyonları içinde kanserojen ve immunotoksik potansiyeline sahiptir. Nogueira ve diğ. (2009) AS ile juvenil yılan balığının (*Anguilla anguilla*) (dmba) 7,12-dimethylbenz[a]anthracene'e akut olarak maruz kalması sırasında veya sonrasında karaciğer, solungaç ve kan hücrelerindeki moleküler cevabı analiz etmişler ve bu çalışmada hidrokarbon kirliliğine karşı moleküler biyomarker geliştirmişlerdir. MacDonald ve diğ. (2012) petrolü kumlardan türemiş naftenik asidin gökkuşağı alabalığı üzerine immunotoksik etkisini araştırmada, immun sistemi harekete geçirmek için inaktive edilmiş *Aeromonas* suşları kullanmıştır. Kandaki ve lenfatik dokudaki T-lenfositler, B-lenfositler trombositler ve myeloid hücrelerin AS ile sayılmasıyla immun sistem hücreleri üzerine toksik etkileri tespit edilmiştir. Phalen ve diğ. (2013) ise PAH'ın alabalıklarda immun doku hücre popülasyon seviyesi üzerine etkisini tespit etmek için yaptıkları çalışmada yeni immunotoksikolojik model geliştirilmesinde temsilen benzo[a]pyrene kullanılmış ve AS yöntemi ile dalak, ön böbrek ve kandaki farklılaşmış lökositlerin tam sayımı yapılmıştır. AS farklı bilim dallarıyla işbirliği yapılarak ta yaygın bir şekilde kullanılabilir.

Akuatik Mikroorganizmaların Tespitinde ve Sayımında

Mikroorganizmalar yüksek konsantrasyonlarından ve aktivitelerinden dolayı akuatik ekosistemin temel parçalarındandır. Bu yüzden onların davranışlarını ve farklı problemlerdeki rollerini anlamak son derece önemlidir. Klasik yöntemler bu araştırmaları yapmada genellikle yetersiz kalmaktadır. AS son zamanlarda akuatik çevredeki mikroorganizmalar ile ilgi çalışmalarda kullanılmıştır. Yapılan çalışmalar göstermiştir ki AS akuatik mikrobiyal ekoloji için gelecek vaat eden bir yöntem olmuştur (Troussellier ve diğ., 1993).

AS hem tek hücre hem de popülasyon düzeyinde mikrobiyal analize olanak sağladığı için her geçen gün akuatik mikrobiyoloji alanında esansiyel bir araç olmuştur (Troussellier ve diğ., 1993). Diğer tekniklerle karşılaştırıldığında hızlı veri toplanabilmesi ve çok parametrelili analizler yapılabilmesi AS'nin popüleritesinin artmasına ve birçok farklı alanda uygulanmasına olanak sağlamıştır. Başlangıçta sadece mikroorganizma sayımı yapılabilirken zamanla yeni florasan boyaların ve elektronik sistemlerin geliştirilmesiyle komünite yapısının analizi ve tek hücre seviyesinde mikroorganizmaların fizyolojik analizleri de yapılabilmektedir. En önemli özelliklerinden biri incelenecek mikroorganizmaların kültüre alınıp alınmasına bakılmaksızın analizlerinin yapılabilmesidir (Meyers, 2000).

Balıklarda hastalıklara yol açan patojen mikroorganizmaların teşhisinde de AS kullanılmaktadır. Endo ve diğ. (1998) AS'yi patojen olan *Lactococcus garvie*'nin hızlı tespitinde de kullanmış ve *L. garvie*'ye karşı antiserum hazırlamış ve immunolojik açıdan incelemiştir.

Joachimsthal ve diğ. 2003 yılında yaptıkları bir çalışmada AS'nin deniz suyu ve gemilerin balast suyundaki mikroorganizmaların analizinde oldukça hızlı ve hassas bir yöntem olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca AS'nin sağlık riski oluşturan mikroorganizmaların ölü ve canlı olarak bulunmasını sağladığını belirtmişlerdir.

Köllner ve diğ. (2002), *Aeromonas salmonicida* ile enfekte edilmiş gökkuşağı alabalığındaki lökosit popülasyonlarının sıcaklığa bağlı olarak aktive olmasını AS ile araştırmışlar ve spesifik antikor cevabın daha düşük sıcaklıklarda daha iyi geliştiğini öne sürmüşlerdir.

Flavobacterium psychrophilum alabalıklarda soğuk su hastalığı etkeni olarak bilinen ve ciddi kayıplara yol açan bir patojendir. Bu yüzden bu hastalık etkeninin erken teşhisi, hastalığın önlenmesi ve tedavisinde son derece önemlidir. Bu patojenin teşhisinde immunomanyetik ayırma yöntemi ve AS ile birlikte kullanılmış ve iki saatte daha kısa bir sürede bakterinin tespiti yapılabilmektedir (Hibi ve diğ., 2008).

Oligotrofik sulardan izole edilmiş bakterilerdeki fosfat aktivitesi de AS ile ölçülmüştür. Bu şe-

kilde heterotrofik bakterilerin sınırlamasına karşı verdiği fizyolojik cevabı anlamamızı sağlayan bir yöntem olarak kabul edilmiştir (Duhamel ve diğ., 2008). Duan ve diğ. (2013) tarafından iyi pişmemiş deniz ürünlerinden insanlara geçebilen bir zoonoz etkeni olan *Vibrio parahaemolyticus*'un anlık tespiti için çift renkli AS geliştirilmiştir.

Ölü veya canlı bakterilerin ve toplam bakteri miktarının doğru olarak tespiti birçok mikrobiyolojik uygulamada önemlidir. Klasik olarak kullanılan kültür tabanlı testler zaman alır. Yavaş gelişen ve kültüre alınamayan bakterilerde (Czechowska ve diğ., 2008; Alsharif ve Godfrey, 2002) ve gerçek zamanlı sonuçlara ihtiyaç duyulan durumlarda klasik yöntemler yetersiz kalırken AS ile başarılı sonuçlar elde edilmiştir.

AS ile ölü ve canlı bakteriler hücre membranının Propidium iodide gibi boyaları geçirme durumuna göre ayırt edilebilirler. Böylece örnekteki bakteriler ölü, canlı veya total olarak AS ile sayılabilirler (Alsharif ve Godfrey, 2002). Nuding ve Zabel (2013) AS kullanarak, 10 tane farklı bakterinin tanımlanmasını ve çeşitli antibiyotiklere karşı duyarlılıklarını tespit etmiştir.

AS uygulaması medikal ve çevresel ortamdaki virüs ve virüs konakçı ilişkileri ile ilgili araştırmalarda büyük potansiyele sahiptir (Corina ve diğ., 2004). İntraselüler bir patojen olan İnfeksiyöz Pankreatik Nekrozis (IPN) virüsü deneysel uygulamadan sonra salmon lökositlerinde AS ile tespit edilmiştir. IPN virüsü ile aşılanmış, aşılanmamış ve intraperitoneal olarak virüs ile enfekte edilmiş salmonlar farklı zamanlarda analiz edilmiştir. Çalışma sonucunda AS'nin in-vivo uygulamadan sonra intraselüler virüs tespitinde ve taşıyıcı balıklarda virüs tespitinde (Rodríguez Saint-Jean ve diğ., 2001; Corina ve diğ., 2004) hassas olduğu gösterilmiştir (Rønneseth ve diğ., 2013).

Sonuç

AS bileşenlerindeki gelişmelere ve gelişen taleplere göre sürekli gelişme göstermektedir. İlk çıkış noktası sadece hücre sayımı iken zaman içerisinde bu hücrelerin yapısı, gelişme aşamaları, içerikleri, fizyolojik tepkileri gibi farklı alanda da bilgi sahibi olmamıza olanak sağlamıştır. Bugün otomatize hale getirilmiş sürümleriyle rutin ola-

rak akuatik ortamın izlenmesi mümkün olmaktadır.

AS ile biyolojik indikatör olarak kullanılan canlılarda hücresel düzeyde fizyolojik çalışmalar yapılarak ortamdaki canlılarda klasik yolla tespit edilemeyen büyüme sınırlandırıcı etkenleri erken bir aşamada tespit etmek mümkün olmaktadır. Bu şekilde antibiyotik ve diğer canlılar için toksik olabilecek maddelerin hedef kitle dışındaki canlıların üzerine etkileri kısa bir sürede tespit edilebilmektedir (Seoane ve diğ., 2014).

AS'nin diğer bir güçlü yanı farklı moleküler tekniklerle birlikte kullanılarak, tek hücre seviyesinden popülasyon seviyesine kadar akuatik mikrobiyolojinin çok geniş uygulama alanlarında kullanılan güçlü bir teknik olmasıdır. Kullanılan florasan boyaların ve monoklonal Antikorların artmasıyla AS mikrobiyal çeşitliliği ileri derecede araştırmak için kullanılabilir. Daha ileri aşamalarda AS portatif ve online olarak akuatik sistemdeki mikrobiyal toplulukların yönetimi ve izlenmesinde daha hızlı ve etkili bir şekilde kullanılabilir (Wang ve diğ., 2010).

AS rutin olarak plankton analizi yapılmasıyla okyanuslarda dahil olmak üzere akuatik ortamdaki pikoplankton gibi çok küçük olanları dahil olmak üzere planktonik organizmaların yapısını ve dinamiklerini anlamamıza katkı sağlayacaktır (Marie ve diğ., 1997). Su ürünlerinde potansiyel immunostimulant, probiyotik tespiti ve aşı geliştirme çalışmalarında diğer moleküler tekniklerle uyumlu bir şekilde kullanılabilir. Memelilerde kullanılan boyaların büyük bir çoğunluğu balıklardaki araştırmalar içinde uygundur. Bu yüzden AS kan yapıcı hücreler ve hücresel aktiviteleri ile ilgili çalışmalarda çok faydalı bir araç olarak ortaya çıkmaktadır (Chilmonczyk ve Monge, 1998; 1999).

Literatür

- Alcox, K.A. & Ford, S.E. (1998). Variability in molluscan hemocytes: a flow cytometric study. *Tissue Cell*, 30(2), 195-204.
- Allen, S.K. (1983). Flowcytometry: Assaying experimental polyploid fish and shellfish. *Aquaculture*, 33(1-4), 317-328.
- Alsharif, R. & Godfrey, W. (2002). Bacterial detection and Live/Dead discrimination by

- flow cytometry. Immunocytometry systems, BD Biosciences, San Jose, USA.
- Alver, E., Demirci, A. & Özçimder, M. (2012). Polisiklik Aromatik Hidrokarbonlar ve Sağlığa Etkileri. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 3(1), 45-52.
- Barreda, D.R., Neumann, N.F. & Belosevic, M. (2000). Flow cytometric analysis of PKH26-labeled goldfish kidney-derived macrophages. *Developmental & Comparative Immunology*, 24(4), 395-406.
- BD Biosciences (2000). Introduction to flow cytometry: A learning guide. Available at: <https://tr.scribd.com/doc/184733295/Introduction-to-Flow-Cytometry-A-Learning-Guide> (Accessed April 8, 2015).
- BD Flow Cytometry (2008). Technical Bulletin. https://www.bdbiosciences.com/documents/BD_Research_FlowCyto_TechBulletin.pdf (Accessed May 18, 2015).
- Bihari, N., Mičić, M., Batel, R. & Zahn, R.K. (2003). Flow cytometric detection of DNA cell cycle alterations in hemocytes of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) off the Adriatic coast, Croatia. *Aquatic Toxicology*, 64(2), 121-129.
- Bonato, S., Christaki, U., Lefebvre, A., Lizon, F., Thyssen, M. & Artigas, L.F. (2015). High spatial variability of phytoplankton assessed by flow cytometry, in a dynamic productive coastal area, in spring. *The Eastern English Channel, Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 154, 214-223.
- Chaiton, J.A. & Allen, S.K. (1985). Early detection of triploidy in the larvae of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, by flow cytometry. *Aquaculture*, 48(1), 35-43.
- Chilmonczyk, S. & Monge, D. (1999). Flow cytometry as a tool for assessment of the fish cellular immune response to pathogens. *Fish & Shellfish Immunology*, 9(4), 319-333.
- Chilmonczyk, S. & Monge, D. (1998). Cellular Immune Response in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*): Flow Cytometric Study. *Acta Veterinaria Brno*, 67, 207-213.
- Cid, A., Herrero, C., Torres, E. & Abalde, J. (1995). Copper toxicity on the marine microalga *Phaeodactylum tricorutum*: effects on photosynthesis and related parameters. *Aquatic Toxicology*, 31(2), 165-174.
- Corina, P. & Brussaard, D. (2004). Optimization of Procedures for Counting Viruses by Flow Cytometry. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(3), 1506-1513.
- Cuesta, A., Esteban, M.A. & Meseguer, J. (1999). Natural cytotoxic activity of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) leucocytes: Assessment by flow cytometry and microscopy. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 71(3-4), 161-171.
- Czechowska, K., Johnson, D.R. & Van der Meer, J.R. (2008). Use of flow cytometric methods for single-cell analysis in environmental microbiology. *Current Opinion in Microbiology*, 11, 205-212.
- Danion, M., Le Floch, S., Kanan, R., Lamour, F. & Quentel, C. (2011). Effects of in vivo chronic hydrocarbons pollution on sanitary status and immune system in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Aquatic Toxicology*, 105(3-4), 300-11.
- Demers, S., Davis, K. & Cucci, T.L. (1989). A Flow Cytometric Approach to Assessing the Environmental and Physiological Status of Phytoplankton. *Cytometry*, 10, 644-652.
- Demers, S., Kim, J., Legendre, P. & Legendre, L. (1992). Analyzing Multivariate Flow Cytometric Data in Aquatic Sciences. *Cytometry*, 13, 291-298.
- Develi, E.E. (2009). Denizel Fitoplanktonun Ekolojik Önemi ve Küresel İklim Değişikliğindeki Rolü. *Mersin Üniversitesi Eğitim Fakültesi Dergisi*, 5(2), 285-293.
- Donaghy, L., Kim, B.K., Hong, H.K., Park, H.S. & Choi, K.S. (2009). Flow cytometry studies on the populations and immune parameters of the hemocytes of the Suminoe oyster, *Crassostrea ariakensis*. *Fish & Shellfish Immunology*, 27(2), 296-301.
- Duan, N., Wua, S.J., Yu, Y., Ma, X.Y., Xia, Y. & Chen, X.J. (2013). A dual-color flow cytometry protocol for the simultaneous detection of *Vibrio parahaemolyticus* and *Salmonella typhimurium* using aptamer conjugated quantum dots as labels. *Analytica Chimica Acta*, 804, 151-158.
- Duhamel, S., Gregori, G., Wambeke, F.V., Mauriac, R. & Nedoma, J. (2008). A method for

- analysing phosphatase activity in aquatic bacteria at the single cell level using flow cytometry. *Journal of Microbiological Methods*, 75(2), 269–278.
- Ellsaesser, C.F., Miller, N.W., Cuchens, M.A., Lobb, C.J. & Clem, L.W. (1985). Analysis of Channel Catfish Peripheral Blood Leucocytes by Bright-Field Microscopy and Flow Cytometry. *Transactions of the American Fisheries Society*, 114(2), 279-285.
- Endo, H., Nakayama, J., Ushio, H., Hayashi, T. & Watanabe, E. (1998). Application of flow cytometry for rapid detection of *Lactococcus garvieae*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 75(2- 3), 295-306.
- Esteban, M.A., Mulero, V., Muñoz, J. & Meseguer, J. (1998). Methodological aspects of assessing phagocytosis of *Vibrio anguillarum* by leucocytes of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) by flow cytometry and electron microscopy. *Cell and Tissue Research*, 293(1), 133-141.
- Esteban, M.Á., Muñoz, J. & Meseguer, J. (2000). Blood cells of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). Flow cytometric and microscopic studies. *The Anatomical Record*, 258(1), 80-89.
- Flow cytometry, Guide to flow cytometry 2006. Dako, Carpinteria California, USA. http://www.dako.com/08065_15dec05_guide_to_flow_cytometry.pdf (Accessed April 18, 2015).
- Goedken, M., De Guise, S. (2004): Flow cytometry as a tool to quantify oyster defence mechanisms. *Fish & Shellfish Immunology*, 16(4), 539-52.
- Hadjoudja, S., Vignoles, C., Deluchat, V., Lenain, J.F., Jeune, A. & Baudu, M. (2009). Short term copper toxicity on *Microcystis aeruginosa* and *Chlorella vulgaris* using flow cytometry. *Aquatic Toxicology*, 94(4), 255-264.
- Harford, A.J., O'Halloran, K. & Wright, P.F.A. (2006): Flow cytometric analysis and optimisation for measuring phagocytosis in three Australian freshwater fish. *Fish & Shellfish Immunology*, 20(4), 562-573.
- Haugland, G.T., Rønneseth, A. & Wergeland, H.I. (2014). Flow cytometry analyses of phagocytic and respiratory burst activities and cytochemical characterization of leucocytes isolated from wrasse (*Labrus bergylta* A.). *Fish & Shellfish Immunology*, 39(1), 51-60.
- Hegaret, H., Wikfors, G.H. & Soudant, P. (2003). Flow cytometric analysis of haemocytes from eastern oysters, *Crassostrea virginica*, subjected to a sudden temperature elevation II. Haemocyte functions: aggregation, viability, phagocytosis, and respiratory burst. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 293(2003), 249-265.
- Hibi, K., Ushio, H., Fukuda, H., Mitsubayashi, K., Hayashi, T., Ren, H. & Endo, H. (2008). Immunomagnetic separation using carbonyl iron powder and flow cytometry for rapid detection of *Flavobacterium psychrophilum*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391(4), 1147-1152.
- Inoue, T., Moritomo, T., Tamura, Y., Mamiya, S., Fujino, H. & Nakanishi, T. (2002). A new method for fish leucocyte counting and partial differentiation by flow cytometry. *Fish & Shellfish Immunology*, 13(5), 379-390.
- Ito, K., Ghattas, S., Yanagisawa, M., Uchida, S., Sakail, H. & Yanail, T. (2014). Assessment of Flow Cytometry in Counting Blood of Whale Sharks as a Rapid and Reliable Method. *International Journal of Scientific Research*, 3(12), 389-397.
- Joachimsthal, E.L., Ivanov, V., Tay, J.H. & L. Tay, S.T. (2003). Flow cytometry and conventional enumeration of microorganisms in ships ballast water and marine samples. *Marine Pollution Bulletin*, 46(3), 308-313.
- Kemenade, B., Groeneveld, A., Rens, B. & Rombout, J. (1994). Characterization of macrophages and neutrophilic granulocytes from the pronephros of carp (*Cyprinus carpio*). *Journal of Experimental Biology*, 187, 143-158.
- Korytar, T., Dang Thi, H., Takizawa, F. & Köllner, B. (2013). A multicolour flow cytometry identifying defined leukocyte subsets of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish & Shellfish Immunology*, 35(6), 2017-2019.
- Koumans-van Diepen, J.C.E., Taverne-Thiele, J.J., van Rens, B.T.T.M. & Rombout, J.H.W.M. (1994). Immunocytochemical and

- flow cytometric analysis of B cells and plasma cells in carp (*Cyprinus carpio* L.); an ontogenetic study. *Fish & Shellfish Immunology*, 4(1), 19-28.
- Köllner, B., Fischer, U., Rombout, J.H.W.M., Taverne-Thiele, J.J. & Hansen, J.D. (2004). Potential involvement of rainbow trout thrombocytes in immune functions: a study using a panel of monoclonal antibodies and RT-PCR. *Developmental & Comparative Immunology*, 28(10), 1049–1062.
- Köllner, B. & Kotterba, G. (2002). Temperature dependent activation of leucocyte populations of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, after intraperitoneal immunisation with *Aeromonas salmonicida*. *Fish & Shellfish Immunology*, 12(1), 35-48.
- Lecommandeur, D., Haffray, P. & Philippe, L. (1994). Rapid flow cytometry method for ploidy determination in salmonid eggs. *Aquaculture and Fisheries Management*, 25, 345-350.
- Lehmann, A.K., Sørnes, S. & Halstensen, A. (2000). Phagocytosis: measurement by flow cytometry. *Journal of Immunological Methods*, 243(1-2), 229-242.
- Lezcano, M., Granja, C. & Salazar, M. (2004). The use of flow cytometry in the evaluation of cell viability of cryopreserved sperm of the marine shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Cryobiology*, 48(3), 349-56.
- Lucasa, R., Courties, C., Herbland, A., Gouletquer, P., Marteau, A.L. & Lemonnier, H. (2010). Eutrophication in a tropical pond: Understanding the bacterioplankton and phytoplankton dynamics during a vibriosis outbreak using flow cytometric analyses. *Aquaculture*, 310(1-2), 112-121.
- MacDonald, G.Z., Hogan, N.S., Köllner, B., Thorpe, K.L., Phalen, L.J., Wagner, B.D. & Heuvel, M.R. (2012). Immunotoxic effects of oil sands-derived naphthenic acids to rainbow trout. *Aquatic Toxicology*, 126, 95-103.
- Manti, A., Papa, S. & Boi, P., (2015). What Flow Cytometry Can Tell Us About Marine Micro-Organisms– Current Status and Future Applications Department of Earth, Life and Environmental Sciences, University of Urbino “Carlo Bo”, Italy, <http://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/37421.pdf> (Accessed April 10, 2015).
- Marie, D., Partensky, F., Jacquet, S. & Vaultot, D. (1997). Enumeration and Cell Cycle Analysis of Natural Populations of Marine Pico-plankton by Flow Cytometry Using the Nucleic Acid Stain SYBR Green I. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 1186-193.
- Melamed, M.R. (2001). A Brief History of flow cytometry and sorting. *Methods in Cell Biology* Volume 63, Part A.
- Meyers, S.P. (2000): Developments in Aquatic Microbiology, *International Microbiology*, 3, 203-211.
- Milston, R.H., Vella, A.T., Crippen, T.L., Fitzpatrick, M.S., Leong, J.C. & Schreck, C.B. (2003). In vitro detection of functional humoral immunocompetence in juvenile Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) using flow cytometry. *Fish & Shellfish Immunology*, 15(2), 145-158.
- Mohammed, J.S. (2015). Micro and nanotechnologies in plankton research. *Progress in Oceanography*, 134, 451-473.
- Morgan, J.A.W., Pottinger, T. G. & Rippon, P. (1993). Evaluation of flow cytometry as a method for quantification of circulating blood cell populations in salmonid fish. *Journal of Fish Biology*, 42(1), 131-141.
- Moritomo, T., Serata, K., Teshirogi, K., Aikawa, H., Inoue, Y., Itou, T. & Nakanishi, T. (2003). Flow cytometric analysis of the neutrophil respiratory burst of ayu, *Plecoglossus altivelis*: comparison with other fresh water fish. *Fish & Shellfish Immunology*, 15(1), 29-38.
- Muñoz-Atienza, E., Araújo, C. Lluch, N., Hernández, P.E., Herranz, C. Cintas, L.M. & Magadán, S. (2015): Different impact of heat-inactivated and viable lactic acid bacteria of aquatic origin on turbot (*Scophthalmus maximus* L.) head-kidney leucocytes. *Fish & Shellfish Immunology*, 44(1), 214-223.
- Newaj-Fyzul, A., Adesiyun, A., Mutani, A., Ramsubhag, A., Brunt, J. & Austin, B. (2007). *Bacillus subtilis* AB1 controls *Aeromonas* infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Journal of Applied Microbiology*, 103(5), 1699-1706.

- Nogueira, P., Lourenço, J., Rodriguez, E., Pacheco, M., Santos, C., Rotchell, J.M. & Mendo, S., (2009). Transcript profiling and DNA damage in the European eel (*Anguilla anguilla* L.) exposed to 7,12-dimethylbenz[a]anthracene. *Aquatic Toxicology*, 94(2), 123-130.
- Nuding, S. & Zabel, L.T. (2013). Detection, Identification, and Susceptibility Testing of Bacteria by Flow Cytometry. *Journal of Bacteriology & Parasitology*, S5:005.
- Ormerod, M.G. (2008). Flow Cytometry—A Basic Introduction. <http://flowbook.denovosoftware.com/>
- Ortuno, J., Esteban, M.A. & Meseguer, J. (2000). Kinetics of hydrogen peroxide production during in vitro respiratory burst of seabream (*Sparus aurata* L.) head-kidney leucocytes, as measured by a flow cytometric method. *Fish & Shellfish Immunology*, 10(8), 725-729.
- Özdemir, H. & Artaç, H. (2013). Akım sitometri ve temel özellikleri. *Selçuk Pediatri*, 1(1), 12-15.
- Pettersen, E.F., Bjerknes, R. & Wergeland, H.I. (2000). Studies of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) blood, spleen and head kidney leucocytes using specific monoclonal antibodies, immunohistochemistry and flow cytometry. *Fish & Shellfish Immunology*, 10(8), 695-792.
- Phalen, L.J., Köllner, B., Leclair, L.A., Hogan, N.S. & Heuvel, M.R. (2013). The effects of benzo[a]pyrene on leucocyte distribution and antibody response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology*, 147, 121-128.
- Rahman, M. (2006). Introduction to flow cytometry. Serotec Ltd. Oxford (UK). Published by Serotec Ltd.
- Rombout, J.H.W.M., Taverne, N., Van de Kamp, M. & Taverne-Thiele, A.J. (1993): Differences in mucus and serum immunoglobulin of carp (*Cyprinus carpio* L.), *Developmental & Comparative Immunology*, 17(4), 309-317.
- Rombout, J.H.W.M., Van diepen, J.C.E.K., Emmer, P.M., Tavernethiele, J.J. & Taverne, N., 1996. Characterization of carp thrombocytes with specific monoclonal antibodies. *Journal of Fish Biology*, 49, 521-531.
- Rønneseth, A., Haugland, G.T. & Wergeland, H.I. (2013). Flow cytometry detection of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) within subpopulations of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) leucocytes after vaccination and during the time course of experimental infection. *Fish & Shellfish Immunology*, 34(5), 1294-305.
- Rose, J.M., Caron, D.A., Sieracki, M.E., Poulton, N. (2004). Counting heterotrophic nanoplanktonic protists in cultures and aquatic communities by flow cytometry. *Aquatic Microbial Ecology*, 34, 263-277.
- Saint-Jean, S.R., Borrego, J.J. & Perez-Prieto, S.I., (2001). Comparative evaluation of five serological methods and RT-PCR assay for the detection of IPNV in fish. *Journal of Virological Methods*, 97, 23-31.
- Sauve, S., Brousseau, P., Pellerin, J., Morin, Y., Senécal, L., Goudreau, P. & Fournier, M. (2002). Phagocytic activity of marine and freshwater bivalves: in vitro exposure of hemocytes to metals (Ag, Cd, Hg and Zn). *Aquatic Toxicology*, 58(3-4), 189-200.
- Seoane, M., Rioboo, C., Herrero, C. & Cid, Á. (2014). Toxicity of three antibiotics used in aquaculture on the marine microalgae *Tetraselmis suecica* (Kylin) Butch. *Marine Environmental Research*, 101, 1-7.
- Shao, J.L., Dabrowski, M.J., White, C.C., Kavanagh, T.J. & Gallagher, E.P. (2010). Flow cytometric analysis of BDE 47 mediated injury to rainbow trout gill epithelial cells. *Aquatic Toxicology*, 97(1), 42-50.
- Shapiro, H.M. (2003). Practical Flow Cytometry. 4th Edition, Wiley-Liss, New York.
- Shelley, L.K., Balfry, S.K., Ross, P.S. & Kennedy, C.J. (2009). Immunotoxicological effects of a sub-chronic exposure to selected current-use pesticides in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology*, 92(2), 95-103.
- Stosik, M., Deptula, W., Wiktorowicz, K., Travnicek, M. & Baldy-Chudzik, K. (2002). Respiratory burst in neutrophilic granulocytes of carps (*Cyprinus carpio*): cytometric studies. *Veterinary Medicine - Czech*, 47(1), 17-20.

- Taylor, S., Landman, M.J. & Ling, N. (2009). Flow Cytometric Characterization of Freshwater Crayfish Hemocytes for the Examination of Physiological Status in Wild and Captive Animals. *Journal of Aquatic Animal Health*, 21(3), 195-203.
- Thorgaard, G.H., Rabinovitch, P.S., Shen, M.W., Galla, G.A.E., Propp, J. & Utters, F.M. (1982). Triploid Rainbow Trout Identified By Flow Cytometry. *Aquaculture*, 29, 305-309.
- Thuvander, A., Norrgren, L. & Fossum, C. (1987). Phagocytic cells in blood from rainbow trout, *Salmo gairdneri* (Richardson), characterized by flow cytometry and electron microscopy. *Journal of Fish Biology*, 31(2), 197-208.
- Troussellier, M., Courties, C. & Vaquer, A. (1993). Recent applications of flow cytometry in aquatic microbial ecology. *Biology of the Cell*, 78(1-2), 111-121.
- Tung, J.W., Heydari, K., Tirouvanziam, R., Sahaf, B., Parks, D.R. & Herzenberg, L.A. (2007). Modern Flow Cytometry: A Practical Approach. *Clinics in Laboratory Medicine*, 27(3), 453-468.
- Valet, G. (1984). A new method for fast blood cell counting and partial differentiation by flow cytometry. *Blut*, 49(2), 83-90.
- Veldhuis, M.J.W. & Kraay, G.W. (2000). Application of flow cytometry in marine phytoplankton research: current applications and future perspectives. *Scientia Marina.*, 64(2), 121-134.
- Vives-Rego, J., Lebaron, P., & Nebe-von Caron, G. (2000). Current and future applications of flow cytometry in aquatic microbiology. *FEMS Microbiology Reviews*, 24(4), 429-48.
- Wang, Y., Hammes, F., Roy, K.D., Verstraete, W., & Boon, N. (2010). Past, present and future applications of flow cytometry in aquatic microbiology. *Trends in Biotechnology*, 10, 28(8), 416-24.
- Wu, Y., Zeng, Y., Qu, J.Y., & Wang W. (2012). Mercury effects on *Thalassiosira weissflogii*: Applications of two-photon excitation chlorophyll fluorescence lifetime imaging and flow cytometry. *Aquatic Toxicology*, 110-111, 133-140.
- Xian, J.A., Wang, A.L., Hao, X.M., Miao, Y.T., Li, B., Ye, C.X., & Liao, S.A. (2012). In vitro toxicity of nitrite on haemocytes of the tiger shrimp, *Penaeus monodon*, using flow cytometric analysis. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 156(2), 75-9.
- Xian, J.A., Wang, A.L., Miao, Y.T. & Li, B. (2013): Flow cytometric analysis of in vitro cytotoxicity of cadmium in haemocytes from the tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 90(1), 46-50.
- Yentsch, C.M., Horan, P.K., Muirhead, K., Dortch, Q., Haugen, E., Legendre, L., Murphy, L.S., Perry, M.J., Phinney, D.A., Pomponi, S.A., Spinrad, R.W., Wood, M., Yentsch, C.S., & Zahuranec, B.J. (1983). Flow cytometry and cell sorting: A technique for analysis and sorting of aquatic particles. *Limnology and Oceanography*, 28(6), 1275-1280.