

Fitoplankton Sınıflarının Belirlenmesinde HPLC ve Spektroflorometrik Yöntemlerin Karşılaştırılması

Nebil YÜCEL^{1,2,*}

¹İskenderun Teknik Üniversitesi-Deniz Bilimleri ve Teknolojisi Fakültesi, Meydan Mah. 512, 31320, İskenderun / Hatay.

²Orta Doğu Teknik Üniversitesi Deniz Bilimleri Enstitüsü, PK:28, 33731, Erdemli/Mersin.

*Sorumlu Yazar Tel.: +90 3261693 (3720)

Geliş Tarihi: 18.01.2017

E-posta: nebilyucel@gmail.com

Kabul Tarihi: 23.02.2017

Öz

Bu çalışmada fitoplankton gruplarının tespit edilmesinde yaygın olarak kullanılan Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografik (HPLC) ve spektroflorometrik metotlar kıyaslanmıştır. Bu amaçla Mersin Körfezi – Rodos Adası arasında farklı ekosistemleri temsilen 5 farklı istasyondan 4 farklı dönemde (Temmuz-Eylül 2012 ve Mart-Mayıs 2013) 152 adet su örneği alınarak farklı tip filtrelere süzölmüştür. Klorofil-*a*, pikoplankton, nanoplankton ve mikropilankton parametreleri her iki metotla ölçölerek kıyaslanmıştır. HPLC cihazının spektroflorometreye göre daha hassas olduğu fakat yöntemde kullanılan GF/F filtrelerin pikoplanktonik hücreleri tutmada başarısız olduğu belirlenmiştir. Akdeniz gibi pikoplankton yoğunluğunun fazla olduğu denizlerde kullanılan GF/F filtreler, nükleopor polikarbonat filtrelere göre biyokütle kaybına neden olarak yanlış okumalara neden olabilmektedir. Toplam klorofil-*a* ve mikropilankton ölçömlerinde her iki yöntem birbirleriyle uyumlu bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Klorofil-*a*, Pigment, Pikoplankton, Nanoplankton, Mikropilankton.

Abstract

Comparison of HPLC and Spectrofluorometric Method for Determination of Phytoplankton Classes

In this study, High Performance Liquid Chromatographic (HPLC) and Spectrofluorometric methods commonly used in determining of phytoplankton groups were compared. For this purpose, totally 152 water samples were collected in four different periods (July-September 2012 and March-May 2013) from five stations representing different ecosystems between Mersin Bay and Rhodes Island filtered by using different types of filters. Chlorophyll *a*, picoplankton, nanoplankton and microplankton parameters were compared by using HPLC and spectrofluorometric methods. The HPLC was found to be more sensitive than the spectrofluorometer, but it was determined that the GF/F filters used in the method failed to retain the picoplanktonic cells. GF/F filters used in seas where the concentration of picoplankton is high, such as the Mediterranean, may cause biomass loss as compared to nucleopore polycarbonate filters, causing false readings. Chlorophyll-*a* and microplankton measurements were found to be compatible with each other when using both methods.

Keywords: Chlorophyll-*a*, Pigments, Picoplankton, Nanoplankton, Microplankton.

Giriş

Sucul ekosistemlerde fitoplankton tür ve miktarları direkt ya da dolaylı olarak farklı yöntemlerle yıllardır ölçölmektedir. En eski

yöntemlerden biri olan mikroskop kullanımı fitoplankton tanımlanmasında hücrenin tipi ve türü görülerek belirlenebilmektedir. Öte yandan

mikroskop kullanımının uzun yıllarda kazanılan deneyim ve bilgi birikimi gerektirmesi, pikoplankton (0.2-2.0 μm) gibi küçük hücrelerin tanımlanamaması ve zaman alan bir yöntem olmasından dolayı alternatif hızlı ve görece daha kolay metotlar geliştirilmiştir. Son yıllarda yaygın olarak kullanılmaya başlanan ve fitoplankton gruplarının hızlı bir şekilde tespit edilmesine yarayan fitoplankton belirteç pigmentlerinin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC) tekniği ile ölçülmesi mikroskoba alternatif bir yöntem olarak ön plana çıkmaktadır (Jeffrey vd., 1997; Ağırbaş, 2016). Fitoplankton kültürleriyle yapılan çalışmalara göre bazı fitoplankton gruplarına özgü belirteç pigmentler tespit edilmiştir (Jeffrey vd., 1997). Örneğin fukoksantin, zeaksantin ve divinil klorofil *a*'nın sırasıyla diatom, siyanobakteri ve proklorokokkus için belirteç pigment olduğu bulunmuştur. Bu belirteç pigmentler kullanılarak fitoplankton kompozisyonu ortaya çıkarılabilmektedir. Bilinen bu pigmentler kullanılarak prokaryotik pikoplankton, ökaryotik nanoplankton ve mikropilankton olarak ana gruplar da belirlenebilmektedir (Gibb vd., 2001; Yücel, 2013; Yücel ve Uysal, 2017). Ayrıca farklı göz açıklığına sahip filtreler (0.2, 2.0 ve 5.0 μm gibi) kullanılarak süzülen deniz suyu örneklerinde fitoplankton biyokütle göstergesi olan klorofil *a*'nın spektrofotometre'de ölçülmesi ile de fitoplankton boy grupları kompozisyonu tespit edilebilmektedir. Bu yöntem ile pikoplankton (0.2-2.0 μm), nanoplankton (2.0-5.0 μm) ve mikropilankton (>5 μm)'un fitoplankton kompozisyonuna yaptığı katkı belirlenebilmektedir (Yücel, 2013). Yukarıda bahsedilen HPLC ve spektrofotometrik yöntemler fitoplankton kompozisyonunun belirlenmesinde mikroskoba alternatif hızlı yöntemler olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Yücel, 2013). Fakat mikroskop da dâhil olmak üzere her yöntemin

avantajları olduğu gibi dezavantajları da bulunmaktadır. Bu nedenle mikroskop ile beraber mikroskopta tanımlanamayan küçük boydaki fitoplankton türlerini tespitinde daha başarılı farklı bir metot kullanılarak bulgular daha sağlıklı hale getirilebilir (Ağırbaş, 2016). Fakat bu çalışma şekli zaman, taksonomi konusunda uzman araştırmacı ihtiyacı ve ekstra bütçe artışına neden olacaktır. O yüzden HPLC ve spektrofotometre gibi hızlı ve görece daha basit yöntemlerin kullanılması zaman ve bütçe açısından daha uygun olacaktır.

Bu çalışmada fitoplankton çalışmalarında önemli bir aşamayı oluşturan kompozisyonunun belirlenmesinde mikroskoba alternatif olarak kullanılan HPLC ve spektrofotometrik yöntemlerin kıyaslanarak incelenmesi ve birbirlerine karşı olan avantaj ve dezavantajlarının ortaya konulması amaçlanmıştır.

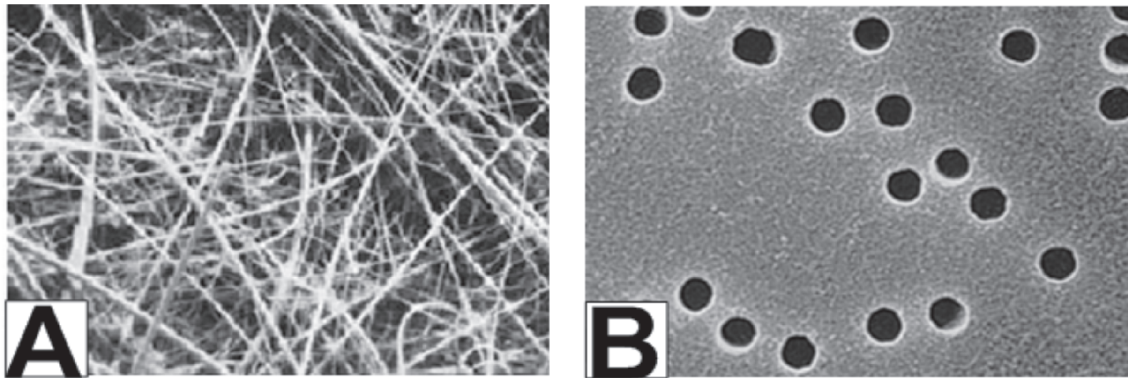
Materyal ve Yöntem

Bu çalışma kapsamında Kuzey Levant Denizi'nde Mersin Körfezi-Rodos Adası arasında farklı özellikteki bölgeleri temsilen 5 farklı istasyondan Temmuz ve Eylül 2012, Mart ve Mayıs 2013 aylarında dört farklı mevsimi kapsayan örneklemeler yapılmıştır. İstasyonlar ODTÜ - Deniz Bilimleri Enstitüsü'ne ait R/V Bilim-2 gemisi ile ziyaret edilmiştir. Deniz suyu örnekleri üzerinde Sea-Bird Electronics marka 911 plus model CTD bulunan çoklu su örnekleme sistemine takılı 5 lt kapasiteli Niskin şişeleri ile kıyı istasyonunda 6 derinlikten (0-40 metre aralığında) ve açık sularda 8 derinlikten (0-200 metre aralığında) toplamda 152 örnek alınmıştır. Alınan örnekler niskin şişelerinden her derinlik için 4 adet 2 lt'lik kahverengi polietilen örnekleme şişesine aktarılmıştır. Deniz suyu örnekleri pigment analizleri için gemide bulunan süzme sistemi kullanılarak düşük basınç altında (≈ 5 atm) 25 mm yarıçaplı, 0.7 μm göz açıklı-

ğına sahip Whatman GF/F filtreler ve klorofil *a* analizleri için 47 mm çaplı 0.2, 2.0 ve 5.0 µm göz açıklığına sahip Whatman nükleopor polikarbonat filtrelerden süzölmüştür. Daha sonra üzerinde fitoplankton toplanmış filtreler analiz zamanına kadar sıvı azot içerisinde (-196 °C) saklanmıştır. Kullanılan filtre tiplerine ait görüntü özellikleri Şekil 1'de sunulmuştur.

HPLC Analizleri; Pigment analizleri için filtreler önce 5 ml % 90'luk aseton içeren santrifüj tüplerine konularak ultra-sonikatörde parçalanmış ve bir gece +4 °C'de karanlıkta bekletilmiştir. Daha sonra örnekler filtre kalıntılarını ve diğer büyük partiküllerin çökmesini sağlamak için 5 dakika 5000 rpm hızda santrifüj edilmiştir (Barlow vd., 1993). Santrifüj edilen örneklerden ayrılan ve üstte kalan kısmından 500 µl örnek alınıp 0.2 µm göz açıklığına sahip

Millipore filtreden süzölererek 500 µl 1M amonyum asetat çözeltisiyle karıştırılıp 100 µl karışım Thermo Hypersil MOS-2 C8 kolon takılı Agilent 1100 HPLC cihazına verilerek analiz edilmiştir. Cihaz içerisindeki akış hızı 1ml/dk olarak ayarlanmıştır. Cihaz içerisinde mobil faz olarak iki çözelti (A: me-tanol ve 1M amonyum asetat (80:20 v/v) ve B: %100 metanol) kullanılmıştır. Analiz sırasında pigmentlerin birbirinden ayrılması için mobil fazda kullanılan iki çözelti farklı zamanla farklı miktarlarda karıştırılarak sisteme verilmesi için şu şekilde ayarlanmıştır; dakika; % çözelti A; % çözelti B: (0; 75; 25), (1; 50; 50), (20; 30; 70), (25; 0; 100), (32; 0; 100). Kemotaksonomik öneme sahip 7 farklı pigment (Tablo 1) Agilent marka değişken dalga boyuna sahip detektör yardımıyla 440 nm dalga boyunda tespit edilmiştir (Mantoura ve Llewellyn, 1983).



Şekil 1. Whatman GF/F (A-membrane-solution.com) ve Whatman nükleopor polikarbonat (B-fishersci.com) filtrelerin elektron mikroskopundaki görüntüsü.

Tablo 1. Fitoplankton grupları için kullanılan belirteç pigmentler ve buldukları gruplar (Jeffrey vd., 1997; Vidussi vd., 2001)

Pigment	Belirteç Olarak Kullanılan Grup	Ana Gruplar
Zeaksantin	Siyanobakteriler	Prokaryotik
Divinyl Klorofil <i>a</i>	Proklorofitler	Pikoplankton
19'-Butanoloksifukoksantin	Krizofitler	Ökaryotik Nanoflagellatlar
19'-Heksanoloksifukoksantin	Primnesiyofitler	
Klorofil <i>b</i>	Klorofitler	Ökaryotik Mikroplankton
Fukoksantin	Diatomlar	
Peridinin	Dinoflagellatlar	

Veri analizi ve pigment konsantrasyonları PC-based Chemstation Chromatography paket programı kullanılarak hesaplanmıştır. Cihaz kalibrasyonu Sigma-Aldrich (klorofil *a* ve *b*) ve VKI-Danimarka (peridinin, 19- butanoyloxy-fucoxanthin, fukoksantin, 19-hexanoyloxy-fucoxanthin, zeaksantin, divinyl klorofil *a*) firmalarından temin edilen konsantrasyonları belli pigment standartları kullanılarak yapılmıştır. Cihazın ölçüm hassasiyeti tüm pigmentler için 0.005 - 0.007 µg/l aralığındadır. Her pigment konsantrasyonu aynı koşullarda cihaza verilen pigment standartlarına göre hesaplanmıştır (Jeffrey vd., 1997).

Ölçülen pigmentler Tablo 1'de listesi verilen fitoplankton grupları için belirteç olarak kullanılmış ve bu gruplar büyüklüklerine göre üç ana gruba ayrılmıştır (Bidigare vd., 1990; Gibb vd., 2000; Yücel ve Uysal, 2017). Ana grupların miktarı belirteç pigmentlerin konsantrasyonları kullanılarak hesaplanmıştır.

Spektroflorometrik Analizler; Klorofil *a* (Klo-*a*)'nın spektroflorometrik analizi için filtreler 10 ml % 90'lık aseton içeren santrifüj tüplerine konularak ultra-sonikatörde parçalanmış ve bir gece +4 °C'de karanlıkta bekletilmiştir. Daha sonra örnekler filtre kalıntıları ve büyük partiküllerin çökmesini sağlamak için 5 dakika 5000 rpm hızda santrifüj edilmiştir. Santrifüj edilen örneklerden HPLC yönteminde olduğu gibi ayrılan ve üstte kalan kısımdan 2 ml örnek küvete aktarılarak HITACHI - F-2500 marka spektroflorometre'de Strickland ve Parsons

(1972) ve UNEP/MAP (2005)'e göre ölçülerek hesaplamaları yapılmıştır. Cihaz kalibrasyonu Sigma-Aldrich firmasından temin edilen Klo-*a* standartlarıyla minimum 5 farklı seyreltme yapılar hazırlanan standartlarla, aynı örnek ölçüm koşulları ve dalga boylarında okuma yapılarak yapılmıştır. Cihazın ölçüm hassasiyeti 0.01 µg/l olarak belirlenmiştir. Ana

grupların miktarı Tablo 2'de verilen şekilde hesaplanmıştır.

Tablo 2. Filtre göz açıklığına göre belirlenen fitoplankton boy grupları (Yücel, 2013)

Filtre göz	Fitoplankton
0.2 - 2.0 µm	Pikoplankton
2.0 - 5.0 µm	Nanoplankton
>5 µm	Mikroplankton

Gruplar arasındaki olası ilişkilerin ortaya çıkarılması için SPSS 22.0 programı kullanılarak Pearson korelasyon analizi yapılmış ve korelasyon katsayıları ve p değerleri elde edilmiştir.

Bulgular

Bu çalışmada fitoplankton gruplarının tespit edilmesinde kullanılan HPLC ve spektroflorometrik metotlar kıyaslanmıştır. Analizlerde toplamda her parametre için iki farklı yöntemle ölçülerek elde edilen 152 adet verinin sonucu kıyaslanmıştır. Yapılan ölçüm sonuçlarına göre Klo-*a* HPLC'de 0-0.578 µg/l aralığında ölçülürken, spektroflorometre (SPEK)'de 0.010-1.365 µg/l aralığında ölçülmüştür. Düşük SPEK sonuçlarına göre yüksek HPLC ölçümleri kaydedilmiştir (Tablo 3, Şekil 2).

Büyük hücrelerin tespitine yönelik yapılan ölçüm sonuçlarına göre iki yöntemin sonuçlarının birbirine benzer olduğu belirlenmiştir (Tablo 3, Şekil 2). Nanoplanktonik hücrelerin tespit edilmesinde yaklaşık 2 katlık farklılık bulunmuştur. SPEK ile yapılan ölçümler HPLC sonuçlarından daha yüksek çıkmıştır. En küçük grup olan pikoplankton ölçüm sonuçlarına göre HPLC ile tespit edilen değerler SPEK ile ölçülen değerlerden 8-10 kat farklı bulunmuştur (Tablo 3).

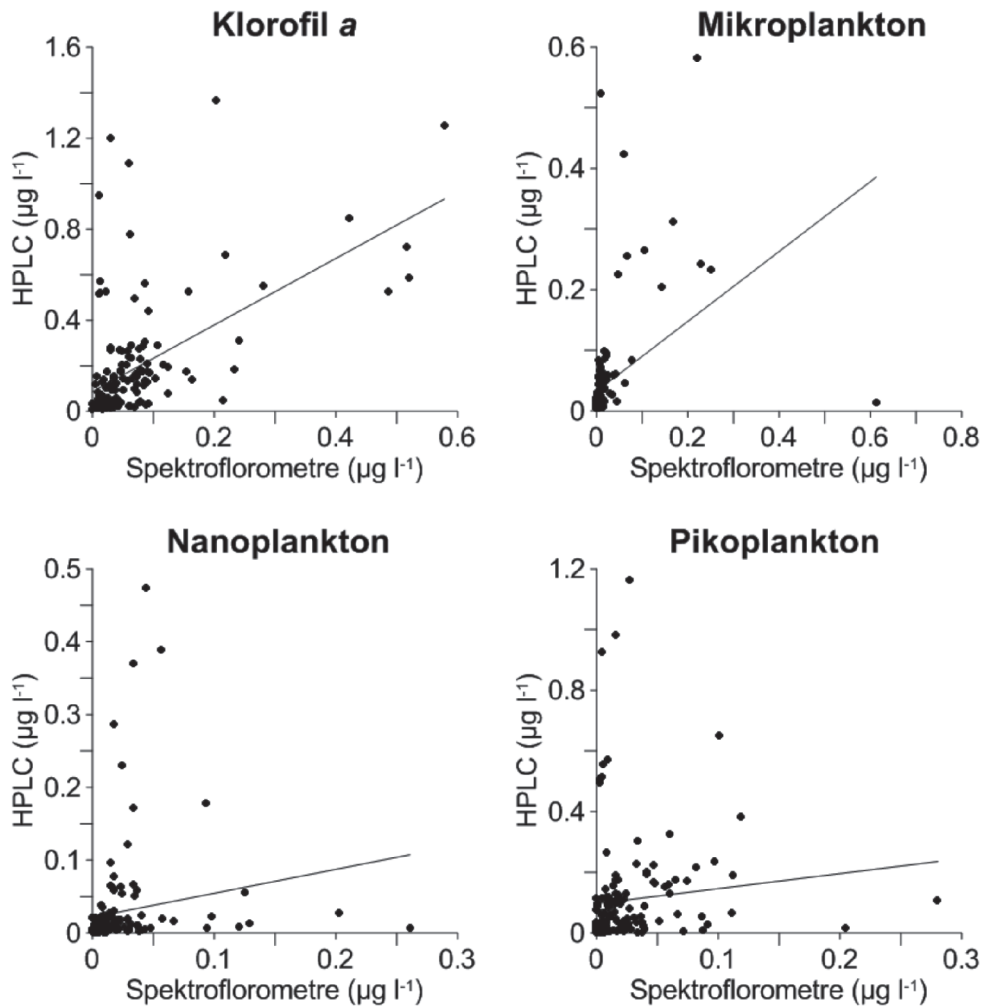
Korelasyon analizi sonuçlarına göre iki farklı yöntemle ölçülen Klo-*a* ve Mikrop-lankton arasında yüksek oranda anlamlı pozitif ilişki ($p<0.01$) bulunmuştur (Tablo 4).

Nanoplankton açısından düşük oranda ilişki ($p<0.05$) saptanırken, pikoplankton açısından iki yöntem arasında her hangi bir ilişki bulunmamıştır.

Tablo 3. Farklı yöntemlerle ölçülen parametrelerin minimum, ortalama ve maksimum değerleri

Parametre	HPLC ($\mu\text{g/l}$)	Spektroflorometre
	Min-Ort-Maks	Min-Ort-Maks
Klorofil <i>a</i>	ÖLA -0.065- 0.578	0.010 -0.181- 1.365
Ökaryotik Mikroplankton (Mikroplankton)	ÖLA -0.019- 0.613	0.004 -0.044- 0.581
Nanoplankton	ÖLA -0.020- 0.261	ÖLA -0.028- 0.473
Pikoplankton	ÖLA -0.025- 0.280	ÖLA -0.109- 1.16

ÖLA: Ölçüm Limitinin Altında



Şekil 2. Klorofil *a* ve fitoplankton gruplarının belirlenmesinde iki farklı yöntemin kıyaslanması.

Tablo 4. Değişkenler arasındaki Pearson korelasyon tablosu

Değişkenler	HPLC	SPEK
Klo- <i>a</i>	0.547**	
Mikroplankton	0.415**	
Nanoplankton	0.166*	
Pikoplankton	0.102	

**. $P < 0.01$, *. $P < 0.05$, N:152.

Tartışma

Cihaz kalibrasyon hassasiyetlerine veya yapılan çalışmalara göre HPLC cihazının SPEK'den daha hassas ve hızlı ölçüm sonuçları verdiği bilinmektedir (Murray vd., 1986). Bu çalışmada fitoplankton gruplarının belirlenmesinde taksonomik yaklaşımda yaygın olarak kullanılan iki yöntem (HPLC ve SPEK) kıyaslanmıştır. HPLC yönteminde fitoplankton belirteç pigment sonuçlarına göre sınıflandırma yapılırken, SPEK yöntemde farklı filtre göz açıklığına sahip nükleopor polikarbonat filtreler kullanılarak ana gruplar belirlenmektedir (Tablo 2, Şekil 1). Bu iki yöntem de Klo-*a* miktarının tespit edilmesinde de kullanılmaktadır. Yapılan bu ve diğer çalışmalara göre toplam Klo-*a* ve mikroplankton belirlenmesinde iki yöntemin birbiri ile uyumlu olduğu bulunmuştur ($p < 0.01$, Tablo 4). Fakat ölçümü yapılacak hücre tipleri küçüldükçe (nanoplankton ve pikoplankton) iki yöntem arasında bariz farklılıklar ortaya çıkmaktadır. Cihaz ölçüm hassasiyetlerinin dışında fitoplankton gruplarının belirlenmesinde HPLC ve SPEK yöntemlerinde ayrıca filtre faktörü de ciddi bir farklılık meydana getirmektedir (Morán vd. 1999).

HPLC yönteminde kullanılan cam fibreden yapılmış GF/F filtreler 0.7 μm göz açıklığına sahiptir. Öte yandan bazı Proklorokokus ve Merismopedia gibi pikoplankton türleri 0.7 μm 'den küçüktür (Olenina vd.,

2006). Bu nedenle küçük pikoplanktonlar GF/F filtrelerden geçerek biyokütle kaybına ve yanlış-eksik ölçümlere neden olabilmektedir (Morán vd., 1999). Akdeniz gibi verimsiz açık sularda fitoplankton kompozisyonunun % 70'ini pikoplanktonun oluşturduğu düşünülürse, bu bölgede GF/F kullanılarak yapılan ölçümlerde pikoplanktonun bir kısmının süzme işlemi esnasında kaybedildiği anlaşılmaktadır (Li vd., 1993; Morán vd., 1999; Yücel, 2013). HPLC'nin cihaz hassasiyeti daha iyi olmasına rağmen, SPEK yönteminde kullanılan 0.2 μm göz açıklığına sahip nükleopor polikarbonat filtreler küçük fitoplankton gruplarını tutmada GF/F filtrelere göre daha başarılı ve güvenilirdir (Laxen ve Chandler, 1982; Morán vd., 1999).

Bu dezavantajlar akla örneklerin farklı göz açıklığına sahip nükleopor polikarbonat filtrelere süzülerek HPLC cihazında ölçülebileceğini getirebilir. Fakat Burford ve Pollard (1994)'ın yaptığı çalışmada pigment ekstraksiyonu sırasında kullanılan asetonun nükleopor polikarbonat filtreleri tamamen çözerek kolloid bir yapı meydana getirdiği ve bu yapının filtrasyon veya santrifüj yöntemiyle elimine edilemediğini göstermişlerdir. Bu şekilde örneğin HPLC cihazına verilmesi yanlış okumalara neden olacaktır.

Sonuç olarak HPLC ve SPEK kendi içlerinde büyük hücreler (Mikroplankton) ve toplam Klo-*a* belirlenmesinde tutarlı olsa da HPLC'de kullanılan GF/F filtreler küçük hücrelerin tespitinde çok başarılı olmadığı anlaşılmıştır. Akdeniz açık suları gibi fitoplankton kompozisyonunun büyük çoğunluğunun 2.0 μm 'den küçük pikoplanktonik hücrelerin oluşturduğu sularda, GF/F tipi filtreler kullanılarak kompozisyonun belirlenmesi yöntemi biyokütle kaybına neden olarak yanlış ölçümlere neden olabilmektedir. Bu nedenle yapılacak çalışmanın amacına ve çalışma bölgesine göre uygun

filtre ve metot seçilmelidir. Çalışmanın amacına göre ve çalışılan bölgede daha kesin sonuçlar elde edilmek isteniyorsa çalışma mikroskop kullanılarak desteklenmelidir.

Teşekkür

Bu çalışma TÜBİTAK-111Y023 numaralı proje tarafından desteklenmiştir. Prof. Zahit Uysal ve Prof. Süleyman Tuğrul'a önerileri ve yorumları için, çalışmaların gerçekleştirilmesinde ve parametrelerin ölçülmesindeki katkılarından dolayı Şehmus Başduvar, Esabil Kakaç ve R/V Bilim-2 gemisi mürettebatına teşekkür ederim.

Kaynaklar

- Ağırbaş, E. 2016. Fitoplankton Pigment Konsantrasyonunun ve Boy Gruplarının HPLC Tekniği ile Belirlenmesi (Güneydoğu Karadeniz, Rize). Yunus Araştırma Bülteni, (2): 81-90, doi:10.17693/yunus.20918
- Barlow R. G., Mantoura R. F. C., Gough, M. A. ve Fileman, T. W. 1993. Pigment signatures of the phytoplankton composition in the north-eastern Atlantic during the 1990 spring bloom. *Deep Sea Research, II*, 40 (1-2): 459-477. doi:10.1016/0967-0645(93)90027-K.
- Bidigare, R. R., Ondrusek, M. E., Morrow, J. H. ve Kiefer, D. A. 1990. In vivo adsorption properties of algal pigments. *SPIE Ocean Optics*, 1302: 290-302. doi:10.1117/12.21451.
- Burford, M. A. ve Pollard, P. C. 1994. Pigment contaminants in polycarbonate filters. *Marine Ecology Progress Series*, 103: 203-206
- Gibb, S. W., Barlow, R. G. ve Cummings, D. G. 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, doi:10.1016/S0079-6611(00)00007-0
- Gibb, S. W., Cummings, D. G., Irigoien, X., Barlow, R. G., Fauzi, R. ve Mantoura, C. 2001. Phytoplankton pigment chemotaxonomy of the northeastern Atlantic. *Deep Sea Research. Part II: Topical Studies in Oceanography*, 48 (4-5): 795-823. doi:10.1016/S0967-0645(00)00098-9
- Jeffrey, S. W., Mantoura, R. F. C. ve Wright, S. W. 1997. *Phytoplankton pigments in oceanography: Guidelines to modern methods*. UNESCO Publishing Paris, 37-84, ISBN: 9231032755.
- Laxen, D. P. H. ve Chandler, I. M. 1982. Comparison of filtration techniques for size distribution in freshwater. *Anal. Chem.*, 54, pp. 1350-1355
- Li, W. K. W., Zohary, T., Yacobi, Y. Z. ve Wood, A. M. 1993. Ultraphytoplankton in the eastern Mediterranean Sea: towards deriving phytoplankton biomass from flow cytometric measurements of abundance, fluorescence and light scatter. *Marine Ecology Progress Series*, 102: 79-87.
- Mantoura, R. F. C. ve Llewellyn, C. A. 1983. The rapid determination of algal chlorophyll and carotenoid pigments and their breakdown products in natural waters by reverse-phase high-performance liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*, 151:297-314. doi:10.1016/S0003-2670(00)80092-6.
- Morán, X. A. G., Gasol, J. M., Arin, L. ve Estrada, M. 1999. A comparison between glass fiber and membrane filters for the estimation of phytoplankton POC and DOC production. *Marine Ecology Progress Series* 187:31-41
- Murray, A. P., Gibbs, C. F., Longmore, A. R. ve Flett, D. J. 1986. Determination of chlorophyll in marine waters: intercomparison of a rapid HPLC method with full HPLC, spectrophotometric and fluorimetric methods. *Marine Chemistry*, 19:211-227
- Olenina, I., Hajdu, S., Edler, L., Andersson, A., Wasmund, N., Busch, S., Gobel, J., Gromisz, S., Huseby, S., Huttunen, M., Jaanus, A., Kokkonen, P., Ledaine, I., ve Niemkiewicz, E. 2006. Biovolumes and size-classes of phytoplankton in the Baltic Sea, HEL-COM Baltic Sea Environment Protection Commission, 106, 1-144, 2006.
- Strickland, J. D. H. ve Parsons, T. R. 1972. *A Practical Handbook of Seawater Analysis*, 2nd edition. Bulletin of the Fisheries Research Board of Canada, No. 167, 310 pp.
- UNEP/MAP. 2005. Sampling and analysis techniques for the eutrophication monitoring strategy of MED POL, MAP Technical Reports Series No. 163, Athens.

Vidussi, F., Claustre, H., Manca, B., Luchetta, A. ve Marty, J. C. 2001. Phytoplankton pigment distribution in relation to upper thermocline circulation in the eastern Mediterranean Sea, during winter. *Journal of Geophysical Research*, 106, 19, 939-19, 956.

Yücel, N. 2013. Monthly Changes in Primary and

Bacterial Productivity in the North-Eastern Mediterranean Shelf Waters. Doktora Tezi. Mersin, Ortadoğu Teknik Üniversitesi.

Yücel, N. ve Uysal, Z. 2017. Kuzeydoğu Akdeniz'de Kıyısız ve Açık sularda Fitoplankton Dinamikleri. *Yunus Araştırma Bülteni*, 17(1), doi: 10.17693/yunusae.v17i26557.280523