



TOPRAK BİLİMİ VE BİTKİ BESLEME DERGİSİ

<http://dergi.toprak.org.tr>



Domates bitkisinin tuz stresine karşı tepkisinde Nano Zn-Biyo gübre formülasyonlarının etkisi

Kağan Tolga Cinisli, Nesrin Yıldız *

Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Toprak Bilimi ve Bitki Besleme Bölümü, Erzurum

Özet

Çalışmanın amacı, çinkooksit nanopartikülleri (ZnO-Nps) ile *Bacillus* grubu (*Bacillus subtilis* (N28), *Bacillus pumilis* (N1) ve peynir kökenli *Lactobacillus casei* (Nm24) bakteri formülasyonun tuz stresi koşullarında domates bitkisinin gelişimi ve mineral içeriği üzerine etkilerinin araştırılmasıdır. Domates bitkisine tuz stresi oluşturmak amacıyla, 100 mg L⁻¹ çinkooksit nanopartikülleri ile birlikte 50 mMolar NaCl tampon karışımı hazırlanmıştır. Bu tampon mikroorganizmalar üzerinde standart disk difüzyon yöntemi kullanılarak petrilere yerleştirilip disklere (30 µg) emdirilerek bakterilere uygulanmıştır. Bu koşullarda, canlılıklarını devam ettiren üç mikroorganizma (*Bacillus subtilis* (N28), *Bacillus pumilis* (N1) *Lactobacillus casei* (Nm24) seçilerek taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve RAMAN spektroskopisi ile gözlemlenmiştir. Tuzluluk koşullarında denek bitki olarak Linda (*Lycopersicon esculentum*) seçilmiş ve sera koşullarında yetiştirme ortamı olarak her saksıya 1 kg kum ve 0,3 kg turba yosunu; üç doz çinko nanopartikül (0, 20, 40 mg L⁻¹ ZnO-Nps), 3 bakteri [*Bacillus pumilis* (N1), *Bacillus subtilis* (N28), *Lactobacillus casei* (Nm24)], karışım formülasyonları hazırlanarak dört tekrarlı olacak şekilde deneme kurulmuştur. Oluşturulan formülasyon bir dekarlık alan için 100 litre hesabı temeline dayalı olarak suya karıştırılıp uygulanmıştır. Uygulamaların kuru madde miktarı, bitkinin besin element içeriği üzerine etkisi (azot (N) potasyum (K), kalsiyum (Ca), magnezyum (Mg), fosfor (P), demir (Fe), bakır (Cu), çinko (Zn), mangan (Mn), bor (B)) içeriği üzerine etkileri değerlendirilmiştir. Uygulamalar sonucunda kuru madde içeriğinin (% 31,2), fosfor içeriği %15,64, potasyum içeriği % 2,75, kalsiyum içeriğini % 8,2, magnezyum içeriği % 17,19, *B. subtilis* (N28)+40 ZnNanops uygulama grubu çinko içeriği %19,01, demir içeriği % 7,75, mangan içeriği % 14,6, B bakır içeriğini % 12,71, *B. pumilis* bor içeriğini % 23,8, toplam azot içeriğinin ise yaklaşık 3 kat arttırdığı gözlemlenmiştir. Araştırma sonucuna göre tuz stresi altında bitkilerin fotosentetik tepki olarak tuz stresinden kurtulma adına karbonhidrat metabolizmasını köke yönlendirmesine neden olmuştur. Ürün verim ve verim unsurlarında meydana gelen kaybın azaltılması yönünde nanoboyutta çinko partikülleri ile *Bacillus pumilis* (N1), *Bacillus subtilis* (N28), *Lactobacillus casei* (Nm24) kombinasyonu bu tepkinin yönetilmesinde istatistiksel anlamda önemli katkılar sağlamıştır. Bitki besin ve iyon dengesinin sağlanmasına katkıları yanında enzimsel etki mekanizması yaratarak bitkinin bu stresini azaltma yönünde önemli etkileri olmuştur. Özellikle önümüzdeki 20-30 yıllık süreç içerisinde iklim bilimcilerinin ortaya koyduğu seneryolara göre bitkisel üretimde bu tür sorunların giderek artacağı yönündeki gelişmelere karşı bu yöndeki sorunlara çözüm olabileceği yönüyle oldukça anlamlı bir çalışmadır. Bu çalışmanın tarla koşullarında yapılacak çalışmalar ile kalibre edilmesi durumunda farklı tuz stresi koşullarına göre mevcut formülasyonların yada ilave gerekli nanobesinlerin verilmesi gerekli olabilmektedir.

Anahtar Kelimeler: Nanopartikül, çinko, *bacillus*, tuz, stres, domates.

Effect of Nano Zn -Bio fertilizer formulation on the response of tomato plant against salt stress

Abstract

The objective of this study was to determine the effects of zinc nanoparticles (ZnO-Nps) and *Bacillus* group bacteria on plant growth (dry matter production) and mineral content of tomato under salt stress conditions. For creating salt stress for tomato, 100 mg/L-1 zinc oxide nanoparticles were mixed with 50 Mmolar NaCl buffer. This buffer mixture was applied to bacteria using the standard disk diffusion method, 30 µg mixing buffer was applied to the disks. Three microorganisms (*Bacillus subtilis* (N28), *Bacillus pumilis* (N1) *Lactobacillus casei* (Nm24) were selected and observed by scanning electron microscopy (SEM) and Raman spectroscopy. Linda (*Lycopersicon esculentum*) was selected as the experimental plant in greenhouse conditions, 1 kg sand and 0,3 kg peat moss per pot were prepared and three doses of zinc nanoparticles (0, 20, 40 mg L-1 ZnO-NPS), 3 bacteria [*Bacillus pumilis* (N1), *Bacillus subtilis* (N28), *Lactobacillus casei* (Nm24) were tested with four replications. The prepared formulation was mixed with water and applied with a rate of 100 liter per decare. The effects of treatments on dry matter content, plant on nutrient content (nitrogen (N) potassium (K), calcium (Ca), magnesium (Mg), phosphorus (P), iron (Fe), copper (Cu), zinc (Zn), manganese (Mn) and boron (B) contents were evaluated. The results indicated that the increasing rates in dry matter content, phosphorus, potassium, calcium, magnesium, zinc, iron, manganese, copper, boron and total nitrogen contents of leaf were 31.3% 15.64 %, 2.75 %, 8.2 %, 17.19 %, 19.01 %, 7.75 %, 14.6%, 12.71 23.8% respectively, with *B. subtilis* (N28)+40 Znanops application. It was clearly shown that the

* Sorumlu yazar:

Tel. : 0 442 231 2464

E-posta : nyildiz@atauni.edu.tr

Geliş Tarihi : 6 Ağustos 2019

Kabul Tarihi : 23 Kasım 2019

e-ISSN : 2146-8141

DOI : 10.33409/tbbbd.668898

combination of zinc particles and *Bacillus pumilis* (N1), *Bacillus subtilis* (N28), *Lactobacillus casei* (Nm24) in nanoparticles had statistically significant effect on reducing crop yield loss and yield properties under salt stress conditions. Plant nutrients and ion balance in addition to their contribution to the enzymatic effect mechanism creating the plant has important effects in reducing stress. Especially in the next 20-30 years, according to scenario put forward by climatic scientists, this kind of problems in plant production will increase gradually against developments in this direction is a very valuable work in terms of solution to problems. If this study is calibrated with the studies to be done in field conditions, it may be necessary to give the existing formulations or additional needed Nano particular nutrient in the different salt stress conditions.

Keywords: Nanoparticle, zinc, bacillus, salt, stress, tomato

© 2019 Türkiye Toprak Bilimi Derneği. Her Hakkı Saklıdır

Giriş

Tuz stresi altındaki pekçok bitki, beslenme dengesizliklerinin bir sonucu olarak, oksidatif ve mekanik veya sekonder streslerden de etkilenir. ZnO-NP'ler, bitkilerde abiotik strese karşı tanınma ve yanıtta yer alan çeşitli mekanizmaların düzenlenmesinde güçlü bir rol oynamaktadır (Prasad ve ark., 2012). Yüksek bitkilerdeki tuzluluk ile ZnO arasındaki etkileşime ilişkin raporlar giderek artmaktadır, ancak halihazırda tuz stresinden kaynaklanan zararları azaltmak için ZnO-NP uygulamalarının olası yararlı etkileri hakkında çok az sayıda bilgi mevcuttur. Tuz stresi altında, Reaktif Oksijen Türlerinin (ROS) hücre içi düzeylerindeki artışların, hücre yapılarında ciddi hasarlara neden olduğu ve SOD ve GPX gibi bir dizi genin ekspresyonunu etkilediği görülmüştür (Gill ve Tuteja, 2010). Reaktif oksijen türleri (ROS), bir dizi genin ekspresyonunu etkilediği bilinmekte ve tuzluluk tarafından indüklenen abiyotik stres tepkilerinde birçok işleme katkıda bulunmaktadır.

Zhao ve ark. (2014) tarafından yapılan bir sera çalışmasında bir toprak karışımına 400 ve 800 mg kg⁻¹ ZnO-NP uygulanmasının ardından salatalık biyokütlesini arttırdığını bildirmişlerdir. Sonuçlar, meyvelerin kuru ağırlığının, kontrol grubuna kıyasla sadece % 6 ve % 8 oranında artmasına rağmen, bitki kökü kuru kütlesinin kontrol grubuna göre 1,1 ve 1,5 kat daha yüksek olduğunu ortaya koymuştur. Hasat edilmiş salatalık meyvelerinde, ZnO-NP'lerin uygulanması da, nişasta içeriğini (1.1-1.6 kat), glutelin (0.9-2 kat) ve Zn'yi (1.7-2.5 kat) arttırdığını bildirmiştir (Zhao ve ark., 2014). Lin ve Xing (2007), 2 mg L⁻¹ ZnO-NP uygulanmasının çimlendirilmiş turp tohumlarının kök uzamasını kontrole göre arttırdığını bildirilmişlerdir. Optimum konsantrasyonlarda Zn-NP'lerin kullanılması bu fideler üzerinde önleyici veya toksik etkilere sahiptir. Bununla birlikte, bu raporların hepsinde ZnO-NP'lerin ciddi fitotoksitesisi, 400 ila 2000 mg L⁻¹ arasındaki yüksek NP-Zn konsantrasyonlarında olduğu anlaşılmıştır (Lopez ve Satti, 1996; Lin ve Xing, 2007; Lee ve ark., 2010; Zhao ve ark., 2014). Zn nanomateryallerin çözünürlüğü, boyut, spesifik yüzey alanı, tepkimelerden etkilenmeyecek oluşu gübre olarak kullanılabilmesinin göstergesi olmuştur (Subramanian ve Sharmila, 2012; Mosanna ve Khalilvand, 2015). Örneğin sebzelerin tohumdan çimlenmesine çinko'nun olumsuz etkisi görülürken nano boyuttaki çinkooksit (ZnO) nanopartiküllerinin olumlu etkileri görülmüştür (Prasad ve ark., 2012). Fıstık tohum çimlenmesi, yaprak klorofil içeriği, kök ve gövde büyümesi, üzerine olumlu etkilerinin olduğu ortaya çıkmıştır (Singh ve ark., 2013). Tuza dayanıklılık yönünden değişik bitkiler arasında önemli farklılıklar görülebilir. Bitki dokularında K iyonu ile bitki polimerleri (Pas) arasında ilişki olduğu saptanmıştır (Smith 1985; Flores ve Galston 1982; Iqbal ve Ashraf, 2006). Ayrıca tuz stresi koşullarında bitki bünyesinde poliaminlerin birikimi görülmektedir. Tuz stesi koşullarında bitki dokularında iyon birikimi olduğu gibi poliaminlerin de biriktiği görülmüştür. Domates bitkisinin tuz stresi koşulları altında SOD ve GPX gen ekspresyonlarının değiştiği ortaya çıkmıştır (Gill ve Tuteja, 2010). Bitkiler tuz stresine karşı kendi metabolizmasını ayarlayarak bir savunma mekanizması oluşturmak için bünyelerinde bazı sinyal yollarını aktive ederek tuz stresine cevap verirler (Khan ve ark., 2016). Bu stratejiler stomaların kapanması ozmotik iyon taşıyıcılar, sekonder metabolitlerin taşınmasını içerir. Fitohormonlar yani salisilik asit (SA), jasmonik asit (JA), ve absisik asit (ABA) tuz stresine yanıt olarak hayati bir önem taşımaktadırlar (Kazan, 2015). Alharby ve ark. (2016) yapmış oldukları çalışmada NaCl stres altındaki her iki düzeyde (15 ve 30 mg L⁻¹) ZnO-NPs ile işlenmiş domates bitkilerinin, SOD ve GPX genleri mRNA ekspresyon seviyesinde arttığı gözlemlenmiştir. Görünüşe göre, ZnO-NP'lerin varlığı domates bitkilerinde mRNA'nın aktivitesini değiştirebilir ve bu tuzluluk stresi karşısında iyileştirici etki gösterebilir. Bunun için muhtemel bir açıklama, ZnO-NP'lerin düşük ve/veya uygun dozunun, bitki metabolizması üzerinde pozitif bir tepkiye sahip olduğunu belirten, daha sonra etkilenen azot gibi temel besin maddelerinin emilimi, iyon homeostazi, osmotik biyosentez, protein içeriği ve toksik radikal türetmenin arttırıldığı ortaya çıkmıştır (Laware ve Raskar, 2014). Bununla birlikte, SOD ve GPX genlerinin mRNA düzeylerindeki artışları, transkripsiyonlu mRNA'ların artmış kararlılığının bir sonucu olabilir (Soydam ve ark., 2013).

Bu çalışmanın amacı; nanomateryaller ve bitkiler açısından faydalı mikroorganizmaları içeren yeni bir formülasyonun oluşturulup, bitki gelişimini stres koşullarında teşvik etme potansiyeline sahip yeni bir ürünün oluşturulma basamaklarından bir kısmını esas almaktadır.

Materyal ve Yöntem

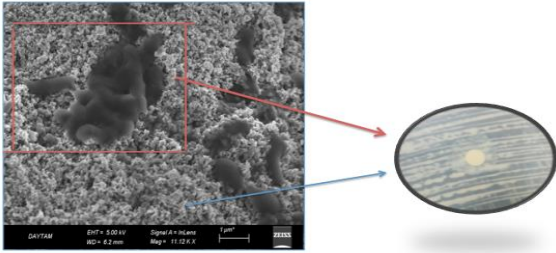
Araştırmada mineral gübre kaynağı olarak çinkooksit nanopartikülleri (cas number 1314-13-2, <100 nm particle size (TEM), ≤40 nm avg. part. size (APS), 20 wt. %in H₂O) sigmadan hazır olarak satın alınmış, kullanılan mikroorganizmalar Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümünden temin edilmiş, denek bitki olarak domates bitkisinin Linda çeşidi (*Lycopersicon esculentum*) fide olarak temin edilmiş olup sera denemesinde tuzluluk stresine indikatör bitki olarak kullanılmıştır. Bitkinin yetiştirilme ortamı olarak kum ve turba yosun karışımı (w/w, 3/1) oranında kullanılmıştır. Biyo canlılığın sürdürülebilirliğini sağlamak için ortam olarak şilempe kullanılmıştır.

Saf bakteri kültürlerinin besiyeri ortamında geliştirilmesi ve sterilizasyonu

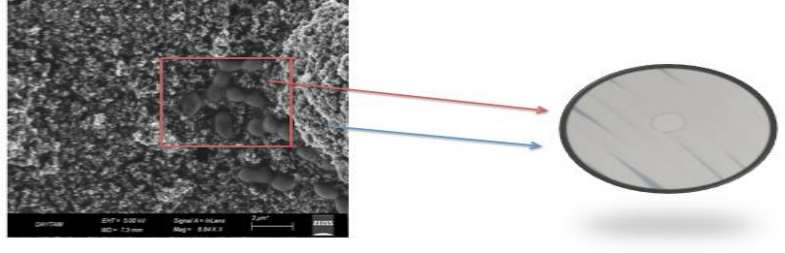
Nutrient agar ve M17 besiyerleri hazırlanarak 121°C de 15 dk steril edildikten sonra 45°C ye kadar soğutularak steril petrilere dökülerek katılaşmaya bırakılmıştır.

Disk difüzyon yöntemi ile nanopartiküllerle birlikte tuzlu koşullarda gelişimini sürdüren bakterilerin seçimi

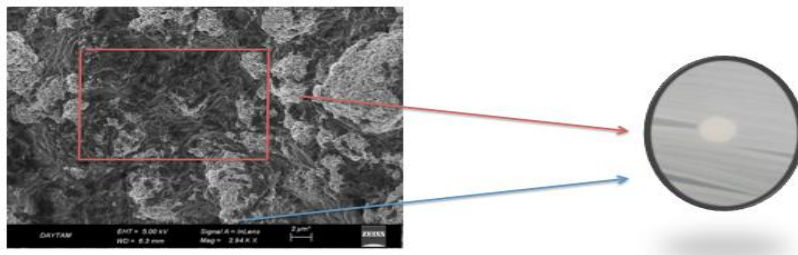
50 mMolar NaCl ve 100 mg L-1 çinkooksit nanopartikülleri birlikte tampon karışımı hazırlanmıştır. Yirmi mikroorganizma üzerinde MuellerHintonagar besiyeri standart disk difüzyon yöntemi kullanılarak petrilere yerleştirilen disklere 30 µl karışım tampon emdirilmiştir. 3 gün süre ile 37 de etüvde bekletildikten sonra üç mikroorganizmanın (*Bacillus subtilis* (N28), *Bacillus pumilis* (N1) ve peynir kökenli *Lactobacillus casei* (Nm24) petrilinde disk çevresinde üremenin görüldüğü tespit edilmiştir (Şekil 1-4).



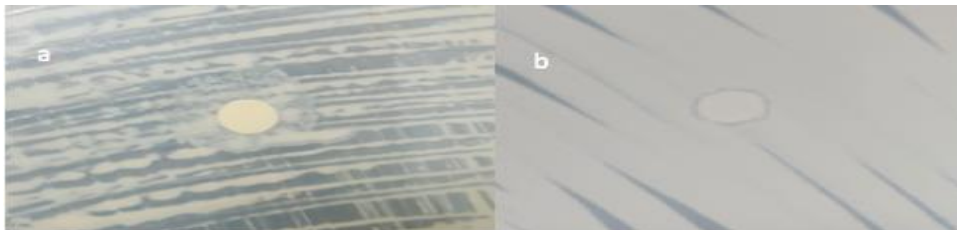
Şekil 1. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile *Lactobacillus casei* (Nm24) için disk difüzyon yöntemi kullanılarak nanopartiküllerle olan sinerjik etkisi



Şekil 2. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile *Bacillus pumilis* (N1) için disk difüzyon yöntemi kullanılarak nanopartiküllerle olan sinerjik etkisi



Şekil 3. Dayanıklı mikroorganizmaların seçimi için karışım tamponunun disklere emdirilerek petrilere yerleştirilmesi



Şekil 4. Disklere emdirilen karışım tamponunun 20 mikroorganizma da denenmesi a) Mikroorganizmaların seçiminde nanopartikül ve tuz karışımına karşı canlılıklarını devam ettirebildiği b) Mikroorganizmaların nanopartikül ve tuz karışımına karşı canlılıklarını devam ettiremediğinin göstergesidir.

Nano-biyo gübrenin taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüleri

Nanopartikülün hazırlanan formülasyon içerisindeki morfolojik analizleri için Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) kullanılmıştır. SEM analizinde iletkenliğini sağlamak için örnekler altınla kaplanmıştır. Bu kaplamadaki amaç altının yüksek iletkenlik ve oksitlenmeme özelliğinin olmasıdır. 20.000 x, 30.000 x ve 50.000 x olarak üç farklı büyütme oranlarıyla nanopartiküllerin SEM görüntüleri alınmıştır.

Nano-biyo gübrenin RAMAN spektroskopisi ile görüntüleri

Oluşturduğumuz formülasyonun nanopartikül içeriğinin iyice doğrulanması adına kullanılan nanopartiküllerin molekülleri içerisindeki bağlar ve bu bağların üzerine düşürülen ışığı esnek olmayan şekilde saçması yöntemine göre çalışan RAMAN spektroskopisi ile doğrulamak amacıyla 785 nm lik lazer kaynağı ile çinkooksit nanopartikülleri analiz edilmiştir (Şekil 5). Genel olarak oluşturulan formülasyonda 10 mikrometrelik mikroorganizmalar üzerindeki ZnO nanopartiküllerin genel olarak yüzde 22 si nanopartikül geri kalan kısmı ise mikroorganizmalardan oluşmaktadır.



Şekil 5. Raman cihazıyla nano-biyo gübrenin a) ZnO nanopartikülü görüntülenmesi b) Bakteri yüzey görüntülenmesi

Dökme plaka yöntemi ile bakterilerin (*Bacillus Subtilis* (N28), *Bacillus Pumilis* (N1) *Lactobacillus Casei* (Nm24) sayımlarının yapılması

Bakteri stok suşlarından 100 mikrolitre alınarak son hacim 1 ml olacak şekilde fizyolojik tuzlu su içerisinde çözdürülerek 10⁻¹'lik ilk dilüsyon hazırlanmıştır. Her bir dilüsyondan iki steril petri kutusuna birer ml aktarılmış ve üzerine 45 °C'ye soğutulmuştur. 37 °C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır (48 saatte üreme olmazsa petriler 24 saat daha inkübasyona tabi tutulur). Oluşan koloniler sayılarak (kob/ml olarak) hesaplama yapılmıştır. Hesaplama yapılırken, ard arda iki seyreltmeden yapılan ekim sonuçlarının aritmetik ortalaması alınmış numune içindeki mikroorganizma sayısı hesaplanmıştır. Hesaplama kullanılan formül; $N = C / [V \times (n_1 + 0,1 \times n_2) \times d]$ şeklindedir. 12 Burada; N = örneğin Bir gram veya 1 ml'sinde mikroorganizma sayısı C = Sayımı yapılan tüm petri kutularında bulunan koloni sayısı toplamı V = Sayımı yapılmış petri kutularına aktarılan hacim miktarı (ml) n1= ilk seyreltmeden yapılan sayımlarda sayım yapılan petri kutusu adedi n2= ikinci seyreltmeden yapılan sayımlarda sayım yapılan petri kutusu adedi d= Sayımın yapıldığı ardışık iki seyrelti

Bakterilerin canlılık testi ve sıvı taşıyıcı ortamın seçilmesi

Bakterilerin formülasyonlarımız içerisinde yaşamlarını devam ettirebilmeleri için taşıyıcı ortam olarak şeker şurubu şilempe kullanılmıştır. Şilempe saf su ile (w/w, 1/10, 1/20, 1/50, 1/100) oranında seyreltilerek üç farklı bakteri türüne uygulanmıştır. Uygulamada 1/100 seyreltmede bakterilerin ürediği görülmüş elde edilecek ürünün maliyetinin daha düşürmek adına bu seyreltik oran formülasyonlar için kullanılmıştır.

Deneme deseni ve deneme konuları

Ülkemizde yaygın olarak kullanılan Linda domates (*lycopersicon esculentum mill*) çeşidi tuz stresine maruz bırakılmıştır. Tam şansa bağlı deneme modeline (3x3x4) göre çalışma üç doz (0, 20, 40 mg L⁻¹ ZnO-Nps (sigma cas number 1314-13-2, <100 nm particle size (TEM), ≤40 nm avg. part. size (APS), 20 wt. % in H₂O) × 3 bakteri [*Bacillus pumilis* (5,7x10⁷ cfu/ml) N1, *Bacillus subtilis* (1x10⁸ cfu/ml) N28, *Lactobacillus casei* (2,9x10⁸ cfu/ml) Nm24] × 4 (tekerrür) olacak şekilde deneme kurulmuştur. Oluşturulan bir litrelik formülasyon 1 dekarlık alana 100 litre saf suya karıştırılıp uygulanacak şekilde ayarlanmıştır. Bitki fideleri 10 cm lik derinlikte saksılara yerleştirilecek yetiştirme ortamı olarak kuartz kum ve turba yosunu (1:3) oranında karıştırılarak 1,1 litrelik (30 cm) saksılara uygulanmıştır. Oluşturulan formülasyonda bakteriler için sıvı taşıyıcı ortam olarak şilempe kullanıldığı için v/v 1/100 olarak şekilde uygulanmıştır. Bitkinin besin ihtiyacını karşılamak Arnon (1938) besin çözeltisi uygulamaları haftada bir kez yapılmıştır. Bitkilere yapay

tuz stresi yaratmak için sodyum klorür ile (Kotuby ve ark., 1997; Bayraklı, 1998; Kanber ve ark., 1992) muameleler, 3-4 yapraklı fideler saksılara aktarıldıktan hemen sonra uygulanmaya başlanmıştır. NaCl 50 mM saksılara haftada üç kez uygulanmıştır. Uygulama Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi seralarında sürdürülmüştür.

Fide Temini Bakım, Hasat İşlemleri ve Örnekleme İşlemlerinin Yapılışı

Linda çeşidi domates fideleri Akdeniz bölgesi Antalya ilinden temin edilmiştir. Denemeler Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Toprak Bilimi ve Bitki Besleme Bölümü seralarında saksılarda kurulmuş ve doğal ışık altında yürütülmüştür. Biyolojik gübre ile nanopartikül karışım süspansiyonları tuz stresi altında yetiştirilen bitkilerin kök bölgesine enjekte edilmiştir. Deneme periyodu boyunca bitkilere kimyasal ilaç uygulanması yapılmamış, yabancı ot elle kontrol edilmiştir. Tuz stresi koşullarına bağlı olarak iki ay çalışma sürdürülmüş, kontrol grubunun durumu ve çiçeklenme dönemi dikkate alınarak hasat işlemi gerçekleştirilmiştir. Saksı içeriğinin tamamı örneklenmiştir. Örnekler yıkanmış, 65°C'ye ayarlı kurutma dolabında son tartım sabit kalıncaya kadar kurutulmuş ve bitki öğütme değirmeninde öğütülerek analize hazır hale getirilmiştir (Kacar ve İnal, 2008).

Elementel analiz (Sodyum, Potasyum, Kalsiyum, Demir, Bakır, Çinko, Manganez, Fosfor, Magnezyum, Bor)

Domates örneklerinin P, K, Mg, Ca, Fe, Na, Mn, Zn, Cu, ve B içerikleri nitrik asit-hidrojen peroksit (2:3) asit ile üç aşama (1. aşama; 145°C de %75 mikrodalga gücün de 5 dakika, 2. aşama; 180°C'de % 90 mikrodalga gücün de 10 dakika ve 3. aşama 100°C'de % 40 mikrodalga gücün de 10 dakika) 40 bar basınca dayanıklı olan mikrowave yaş yakma ünitesinde (speedwave MWS-2 Berghof productts + Instruments Harresstr.1. 72800 Enien Gernmany) yakılmış (Mertens, 2005a) sonra ICP-OES spektrofotometresinde okunmak suretiyle belirlenmiştir (Mertens, 2005b).

Toplam Azot Tayini

Bitki örneklerinin toplam azot içeriğini belirlemek açısından azot içeriği salisilik + sülfürik asit + tuz karışımı ile yaş yakmaya tabi tutulduktan sonra mikrokjheldahl yakma ünitesinde destilasyon sonucu titrasyon ile tam otomatik azot analizöründe belirlenmiştir (Bremner, 1996).

İstatistiksel Değerlendirmeler

Tam şansa bağlı faktoriyel deneme desenine göre, varyans analizleri, ortalamaların karşılaştırılması ve Duncan çoklu karşılaştırma testleri yapılmıştır (Yıldız ve Bircan, 1994). Elde edilen veri setleri SPSS-22 software kullanılarak değerlendirilecektir.

Biyo-Nanoçinkooksit (NP-ZnO) Gübre Formülasyonlarının Oluşturulması

Formülasyon için kullanılacak bakteriler üretilerek nanopartiküllerle canlılık tesleri yapılmıştır. Her bakteri türü ayrı ayrı seçilmiş farklı konsantrasyonlardaki nanopartiküllerle sıvı bir formülasyon oluşturulacak şekilde taşıyıcı ortam (silempe) eklenerek oluşturulmuştur.

İş Akış Şeması, Bakteriyel Canlılık Testi ve Sıvı Taşıyıcı Ortamın Kullanılması

Çalışma Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Toprak Bilimi Bitki Besleme Bölümü ve Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

Bakteriyel canlılık testi ve sıvı taşıyıcı ortamın kullanılması

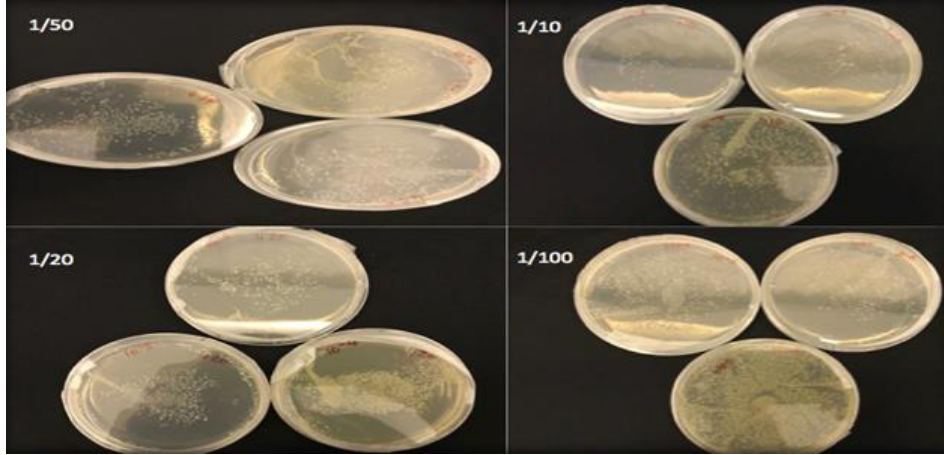
Yapılan bu deneyler sonucunda 10⁹ oranında seçilen bu üç bakterinin ortamda bulunan çinkooksit nanopartikülleri ve tuzluluk koşullarından etkilenmedikleri tespit edilmiştir. Kullanılan şilempe sayesinde ortamda bakteriyel canlılıklar devam ettirilmiştir. Sıvı taşıyıcı olarak şilempe (w/w, 1/100 deynize su) ve 40 mg ZnO nanopartikülü Raliya ve ark. (2015) tarafından yapılan çalışmaya göre bitkiye toksik etki oluşturmayacak konsantrasyon değerleri dikkate alınarak bu doz seçilmiştir) ayrı ayrı eklenerek birer litrelik üç farklı formülasyon için karıştırılarak üç adet biyo-nano gübre formülasyonu elde edilmiştir.

Çizelge 1. Üç Farklı Nano-Biyo Gübre formülasyonlarının bir mililitresinde bulunan Bakteri Sayısı

Bakteri	Kod	kob/ml
<i>Bacillus subtilis</i>	N28	1x10 ⁸
<i>Bacillus pumilis</i>	N1	5,7x10 ⁷
<i>Lactobacillus casei</i>	Nm24	2,9x10 ⁸



Şekil 6. Bakteriler için sıvı taşıyıcı olarak kullanılan şilempede yapılan seyreltmeler



Şekil 7. Sıvı nano-biyo formülasyonlarında bakterilere besin sağlamak için kullanılan şilempenin üç haftalık inkübasyonu sonucunda (w/w, 1/10, 1/20, 1/50, 1/100) seyreltik oranlarına üç bakteride gelişim durumları

Yapılan deneyler sonucunda seçilen bu üç bakterinin (*Bacillus pumilis* (N1), *Bacillus subtilis* (N28), *Lactobacillus casei* (Nm24) ortamda bulunan çinkooksit nanopartikülleri ve tuzluluk koşullarından etkilenmedikleri tespit edilmiştir. Kullanılan şilempe sayesinde ortamda bakteriyel canlılıklar devam ettirilmiştir. Sıvı taşıyıcı olarak şilempe (w/w, 1/100 deiyne su) ve 40 mg ZnO nanopartikülü (Raliya vd, 2015 yılında yaptıkları çalışmaya göre bitkiye toksik etki yaratmayacak şekilde bu doz seçilmiştir) ayrı ayrı eklenerek birer litrelik üç farklı formülasyon için karıştırılarak üç adet biyo-nano gübre formülasyonu elde edilmiştir. Yapılan sera deneme sürecinde merkezi otomasyon sistem tarafından ortam şartları kontrollü bir şekilde takip edilmiştir. Deneme, domateslerin çiçeklenme başlangıcına kadar 8 hafta uygulanmış ve sonlandırılmıştır.

Bulgular ve Tartışma

Bu çalışmada üç farklı mikroorganizma (*Bacillus subtilis* 1×10^8 , *Bacillus pumilis* $5,7 \times 10^7$, *Lactobacillus casei* $2,9 \times 10^8$) ile birlikte çinkooksit nanopartikül içerikli formülasyonu (0, 20, 40 mg /l) olacak şekilde sera koşullarında uygulanarak bitkinin 90 günlük periyotta gelişme sürecine etkileri araştırılmıştır. 90 günlük yetiştirme periyodu sonucunda alınan üst aksam ve kök kısımları analiz yapılarak değerlendirilmiştir.

Saksı Bitkilerin Üst Aksam Analiz Sonuçları

Domates bitkisine ait sera denemesi sonucu hasat edilen bitki yapraklarının analizi sonucunda ortaya çıkan değerler Çizelge 2, 3 ve 4'de verilmiştir.

Nano-biyo gübrenin taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile görüntülenmesi

Taramalı elektron mikroskop analizleriyle numunelerin görüntüleri alınmıştır. Burada 2 mikrometrelik bakteri boyutlarıyla birlikte çinkooksit nanopartiküllerinin boyutları 35 nm ve hegzagonal yapıya olduğu, ZnO nanopartikülleri ile birlikte bakteri gruplarının birlikte yaşadığı Nano-Biyo gübre formülasyonları görülmektedir.

Çizelge 2. Bakteri uygulamaları, nanopartikül ve nano-bakteri uygulamalarının domates bitkisinin makro element (Toplam Azot, Fosfor, Kalsiyum, Potasyum, Magnezyum) üzerine etkilerine ait analiz sonuçları

Uygulamalar	Tuz (dS/m)	N (%)	Mg (mg/kg)	P (%)	K (%)	Ca (%)
Kontrol	50	1,960 ± 0,200 c	0,159 ± 0,001bc	0,368 ± 0,038 b	2,523 ± 0,001 d	0,810 ± 0,005 b
ZnNanops	50	2,980 ± 0,120 d	0,161* ± 0,001 bcd	0,365* ± 0,001 a	2,626 ± 0,001 h	0,790* ± 0,004 b
<i>B. pumilis</i> (N1)	50	2,320 ± 0,440 d	0,156* ± 0,002 b	0,387* ± 0,009 c	2,571 ± 0,009 f	0,800* ± 0,005 b
<i>B. pumilis</i> (N1)+20 ZnNanops	50	3,750 ± 0,220 cd	0,152* ± 0,001 ab	0,395* ± 0,001 d	2,776 ± 0,001 ı	0,810* ± 0,003 b
<i>B. pumilis</i> (N1)+40 ZnNanops	50	4,500 ± 0,340	0,170 ± 0,003 e	0,386* ± 0,001 c	2,464 ± 0,001 c	0,840 ± 0,004 c
<i>B. subtilis</i> (N28)	50	1,650 ± 0,900 c	0,192 ± 0,003 f	0,402 ± 0,001 e	2,433 ± 0,001 a	0,870 ± 0,003 de
<i>B. subtilis</i> (N28)+20 ZnNanops	50	3,010 ± 0,220 cd	0,141 ± 0,004 a	0,429 ± 0,001 f	2,446 ± 0,002 b	0,882 ± 0,005 e
<i>B. subtilis</i> (N28)+40 ZnNanops	50	3,290 ± 0,560 ef	0,170 ± 0,001 de	0,436 ± 0,002 g	2,594 ± 0,003 g	0,881 ± 0,003 e
<i>L. casei</i> (Nm24)	50	5,230 ± 0,12ab	0,172 ± 0,001 e	0,430 ± 0,001 f	2,439 ± 0,002 a	0,860 ± 0,005 cd
<i>L. casei</i> (Nm24)+20 ZnNanops	50	5,560 ± 0,180ab	0,170 ± 0,001 de	0,371* ± 0,001 b	2,522* ± 0,002 d	0,783 ± 0,005 a
<i>L. casei</i> (Nm24)+40 ZnNanops	50	6,120 ± 0,760a	0,167 ± 0,001 cde	0,386* ± 0,001 c	2,561 ± 0,001e	0,866 ± 0,005 cde
Ortalama		2,550 ± 0,210	0,166 ± 0,001	0,396 ± 0,001	2,542 ± 0,002	0,834 ± 0,005

Çizelge 3. Bakteri uygulamaları, nanopartikül ve nano-bakteri uygulamalarının domates bitkisinin yaprak kuru madde miktarı ve mineral içerik (Sodyum, Çinko, Demir) üzerine etkilerine ait analiz sonuçları

Uygulamalar	Tuz (dS/m)	Kuru madde miktarı (g)	Na (mg/kg)	Zn (mg/kg)	Fe (mg/kg)
Kontrol	50	1,85 ± 0,10abc	778± 0,71e	38,77±0,1a	141,27±0,145b
ZnNanops	50	1,97 ± 1,14abc	742±0,73d	39,61*±0,1ab	143,69± 0,035c
<i>B. pumilis</i> (N1)	50	2,33 ± 0,20bcd	683±0,69a	43,89±0,05cd	144,26±0,350cd
<i>B. pumilis</i> (N1)+20 ZnNanops	50	2,39± 0,16 e	605±0,75c	40,85±0,15b	155,71±0,1f
<i>B. pumilis</i> (N1)+40 ZnNanops	50	2,19 ± 0,06bcd	805±0,72b	43,52±0,045cd	144,79±0,250cd
<i>B. subtilis</i> (N28)	50	1,19 ± 0,08a	921±0,76f	44,32±0,2de	131,1±0,40a
<i>B. subtilis</i> (N28)+20 ZnNanops	50	1,5733±0,288d	612±0,69l	45,53±0,1e	148,28±0,185e
<i>B. subtilis</i> (N28)+40 ZnNanops	50	1,24 ± 0,36 cd	694±0,71k	47,87±0,1f	143,39± 0,130c
<i>L. casei</i> (Nm24)	50	2,50 ± 0,56 ef	757±0,59ı	47,42±0,05f	145,75±0,1d
<i>L. casei</i> (Nm24)+20 ZnNanops	50	2,57 ± 0,54ef	720±0,62h	42,8±0,1c	149,15±0,15e
<i>L. casei</i> (Nm24)+40 ZnNanops	50	2,65 ± 0,12ef	726±0,64g	38,22*±0,78a	149,17± 0,29g
Ortalama		1,86 ± 0,28e	731,68 ± 0,65	430,95±0,18	146,1818±0,19

*Uygulama grupları arasında kontrole göre oluşan fark önemli (p<0,05) değil

Çizelge 4. Bakteri uygulamaları, nanopartikül ve nano-bakteri uygulamalarının domates bitkisinin yaprakta mikro element (Mangan, Bakır, Bor) üzerine etkilerine ait analiz sonuçları

Uygulamalar	Tuz (dS/m)	Mn (mg/kg)	Cu (mg/kg)	B (mg/kg)
Kontrol	50	55,80±0,106ab	63,76±0,148d	15,07±0,141b
ZnNanops	50	57,02±0,127c	60,99±0,304a	16,02±0,127cd
<i>B. pumilis</i> (N1)	50	55,80*±0,707ab	61,57±0,007ab	17,08±0,509ef
<i>B. pumilis</i> (N1)+20 ZnNanops	50	59,02±0,127d	67,62±0,127e	17,84±0,254f
<i>B. pumilis</i> (N1)+40 ZnNanops	50	58,38±0,282d	61,78±0,141bc	19,52±0,190e
<i>B. subtilis</i> (N28)	50	64,15±0,424ef	62,92*±0,113cd	19,71±0,381f
<i>B. subtilis</i> (N28)+20 ZnNanops	50	56,74*±0,141bc	73,12±0,466g	13,17±0,707a
<i>B. subtilis</i> (N28)+40 ZnNanops	50	63,22±0,424e	68,40±0,142e	20,59±0,042f
<i>L. casei</i> (Nm24)	50	65,27±0,212f	61,09±0,572ab	17,67±0,0636e
<i>L. casei</i> (Nm24)+20 ZnNanops	50	55,05*±0,424a	68,88±0,145f	15,46*±0,127bc
<i>L. casei</i> (Nm24)+40 ZnNanops	50	57,55±0,141c	63,56*±,212d	16,85±0,190de
Ortalama		59,05±0,191	64,88±0,155	17,184 ± 1,870

*Uygulama grupları arasında kontrole göre oluşan fark önemli ($p \leq 0,05$) değildir

Çalışmada kullanılan ZnO nanopartikül tabanlı biyolojik gübreninde mineral içerik açısından kontrole göre *B. subtilis* (N28) + 40 ZnNanops uygulama grubu fosfor içeriğini %15,64, potasyum içeriğini % 2,75, *B. subtilis* (N28) + 40 ZnNanops uygulama grubu kalsiyum içeriğini % 8,2 *B. subtilis* uygulama grubu magnezyum içeriğini % 17,19 *B. subtilis* (N28) +40 ZnNanops uygulama grubu çinko içeriğini % 19,01, *B. subtilis* uygulama grubu demir içeriğini % 7,75 *L. casei* uygulama grubu mangan içeriğini % 14,6, *B. subtilis* (N28)+20 ZnNanops uygulama grubu bakır içeriğini % 12,71, *B. pumilis* (N28)+40 ZnNanops bor içeriğini % 23,8, *L. casei* (Nm24) + 40ZnNanops uygulama grubu toplam azot içeriğini yaklaşık üç kat arttırdığı gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda nanopartikül ve bakteri uygulamalarının bitkinin tuz stresine karşı bir direnç oluşturabileceği gözlemlenmiştir. Uygulamalar sonucunda kuru madde içeriğinin (% 31,2), fosfor içeriği %15,64, potasyum içeriği % 2,75, kalsiyum içeriğini % 8,2, magnezyum içeriği %17,19, *B. subtilis* (N28)+40 ZnNanops uygulama grubu çinko içeriği %19,01, demir içeriği %7,75, mangan içeriği % 14,6, B bakır içeriğini %12,71, *B. pumilis* bor içeriğini % 23,8, toplam azot içeriğinin ise yaklaşık 3 kat arttırdığı gözlemlenmiştir. Tüm bu bilgilerin ışığında bakteri, nanopartikül, bakteri ile birlikte nanopartikül uygulamaları tuz stresi koşullarında bitkinin mineral içeriğini yer yer kritik aralık düzeyine yükseltmiştir. Ancak bitkiler henüz genç çiçeklenme aşamasına geçmediği için mineral içerik değerlerindeki yükselme normal kabul edilmektedir. Her besin elementi için her bitkinin belirli ve genetik olarak değişmeyen besin alım potansiyeli vardır. Genetik olarak denetlenen besin alım potansiyeli nedeniyle, yeşil bitki dokularının azot (N) ve fosfor (P) kapsamalarının 10, mikro besin elementleri kapsamalarının 100-1000 katı fazla olabilmektedir. Bu genel görünüm tüm yüksek bitkiler için geçerlidir. Aynı bitkide değişik organların mineral kapsamaları da farklıdır. Genelde yaprak, sap ve kök gibi vejetatif organların mineral içerikleri meyve, yumru ve tohum gibi üretken organlara göre daha değişkendir. Genç bitki dokularının N, P ve potasyum K yönünden varsıl olmalarına karşın, yaşlı bitkiler ve olgun dokular kalsiyum (Ca), mangan (Mn), demir (Fe) ve bor (B) yönünden daha varsıldılar (Mengel ve Kirkby, 2001). Fakat bitkilerin gelişim periyodu boyunca genç ve yaşlılık durumlarında mineral içerikleri değişebileceğinden uygulamalarımızın domates verim ve kalitesi üzerinde olumlu ya da olumsuz bir etki yaratabileceğini hakkında bir varsayımında bulunmak için erken olacaktır. Araştırma çalışmasında nanopartikül ve mikrobiyal gübre gibi iki önemli unsurun birlikte kombinasyon oluşturabildiğini, biyolojik aktivitenin çalışır olduğu ve kısmen organomineral gübreymiş gibi yeni bir formülasyonun (mikroorganizmaların farklı nano tabanlı minerallerle birleştirilip) akademik ölçekte kullanışlı olup olmadığını deneyerek, gerek bilimsel çalışmalarla ve gerekse tarım sektörü açısından birçok yeniliğe olası ışık tutabileceğine dikkat çekilmeye çalışılmıştır. Gübre sektörü açısından yeni bir ürünün altyapısı, araştırmacılar açısından bitki besleme veri tabanında, tarımsal nanobiyoteknoloji bilimsel disiplini ölçüğünde öncü bir çalışmanın altyapısını oluşturabileceği muhtemeldir.

Teşekkür

Doktora tez kapsamında hazırlanan bu yayında benden desteğini hiç esirgemeyen değerli danışmanım Prof. Dr. Sayın Nesrin YILDIZ başta olmak üzere, Prof. Dr. Sayın Neslihan DİKBAŞ, Prof. Dr. Faruk ÖZKUTLU, Prof. Dr. Sayın Metin TURAN ve Doc.Dr. Müdahir ÖZGÜL hocalarıma ayrı ayrı teşekkür ederim.

Kaynaklar

- Alharby HF, 2016. The alteration of mRNA expression of SOD and GPX genes, and proteins in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) under stress of NaCl and/or ZnO nanoparticles. *Saudi Journal of Biological Sciences* 23: 773-781
- Bilgin N, Yıldız, N, 2008. Besin kültüründe yetiştirilen (Kaya-F1) domates çeşidinin (*Lycopersicon esculentum*) artan nacl uygulamalarına toleransı ve tuzluluk stresinin kuru madde miktarı ile bitki mineral madde içeriğine etkisi. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi* 9: 15-21
- Bremner JM, 1996. Nitrogen Total. In: Sparks, D.L., Ed., Methods of Soil Analysis Part 3: Chemical Methods, SSSA Book Series 5, Soil Sci. Soci. of America, Madison, Wisconsin, 1085-1122.
- Flores HE, Galston AW, 1982. Analysis of polyamines in higher plants by high performance liquid chromatography. *Plant Physiology* 69, 701-706.
- Gill SS, Tuteja N, 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 48, 909-930.
- Iqbal M, Ashraf M, 2006. Wheat seed priming in relation to salt tolerance: growth, yield and levels of free salicylic acid and polyamines. *Annales Botanici Fennici* 43, 250-259.
- Kazan K, 2015. Diverse roles of jasmonates and ethylene in abiotic stress tolerance. *Trends in Plant Science* 20, 219-229.
- Khan MIR, Iqbal N, Masood A, Mobin M, Anjum NA, Khan NA, 2016. Modulation and significance of nitrogen and sulfur metabolism in cadmium challenged plants. *Plant Growth Regulation* 78: 1-11.
- Kotuby J, Koenig R, Kitchen B, 1997. Salinity and Plant Tolerance. Utah State University Extension. AG-SO-03., Utah.plants. Environ. Sci. Technol. 48, 4376e4385.
- Lee CW, Mahendra S, Zodrow K, Li D, Tsai Y, Braam J, 2010. Developmental phytotoxicity of metal oxide nanoparticles to *Arabidopsis thaliana*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 29, 669-675.
- Lin D, Xing B, 2007. Phytotoxicity of nanoparticles: inhibition of seed germination and root growth. *Environmental Pollution* 150, 243-250.
- Lopez MV, Satti SME, 1996. Calcium and potassium-enhanced growth and yield of tomato under sodium chloride stress, *Plant Science* 114, 19-27.
- Mengel K, Kirkby EA, 2001. Principles of Plant Nutrition. ISBN 0-7923-7150-X (HB) Published by Kluwer Academic Publishers. The Netherlands.
- Mertens D, 2005a. AOAC official method 922.02. In: Horwitz, W., Latimer, G.W. (Eds.), Plants Preparation of Laboratory Sample. Official Methods of Analysis, 18th ed. AOAC-International Suite, Gaithersburg, MD, USA, (Chapter 3), pp. 1-2. [18].
- Mertens D, 2005b. AOAC official method 975.03. In: Horwitz, W., Latimer, G.W.(Eds.), Metal in Plants and Pet Foods. Official Methods of Analysis, 18th ed. AOAC-International Suite, Gaithersburg, MD, USA, (Chapter 3), pp. 3- 4.
- Mosanna R, Khalilvand BE, 2015. Morpho-physiological response of maize (*Zea mays* L.) to zinc nano-chelate foliar and soil application at different growth stages. *Journal on New Biological Reports* 4, 46-50.
- Prasad TN, Sudhakar P, Sreenivasulu Y, Latha P, Munaswamy V, Raja Reddy, K Sreepasad TS, Sajanlal PR, Pradeep T, 2012. Effect of nanoscale zinc oxide particles on the germination, growth and yield of peanut. *Journal of Plant Nutrition* 35, 905-927.
- Singh NB, Amist N, Yadav K, Singh D, Pandey JK, Singh SC, 2013. Zinc oxide nanoparticles as fertilizer for the germination, growth and metabolism of vegetable crops. *Journal of Nanoengineering and Nanomanufacturing* 3, 353-364.
- Smith W.E, Dent G, 2005. Modern Raman Spectroscopy – A Practical Approach, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, s.135-136.
- Smith, TA, 1985. Polyamines. *Annual Review of Plant Physiology* 36, 117-143.
- Soydam S, Aras S, 2013. Relationships among lipid peroxidation, SOD enzyme activity, and SOD gene expression profile in *Lycopersicon esculentum* L. exposed to cold stress. *Genetics and Molecular Research* 12, 3220-3229.
- Subramanian KS, Sharmila RC, 2012. Ball milled nanosized zeolite loaded with zinc sulfate: a putative slow release Zn fertilizer. *Int. J. Innov. Hortic.* 1, 33-40.
- Yıldız N, 2012. Bitki Beslemenin Esasları ve Bitkilerde Beslenme Bozukluğu Belirtileri. Eser ofset matbaacılık, Erzurum.
- Yıldız N, Bircan H, 1994. Araştırma ve Deneme Metodları Atatürk Üni. Ziraat Fak. Yay. No. 697. Erzurum.
- Yıldız N, Canbolat M. ve Aydın A, 2000. Influence of increasing NaCl and NaHCO₃ on tomato plant grown in hydroculture. Workshop on Environmental impact of water quality, irrigation practices. Soil type and crop interactions. November 7, 2000. Antalya-Turkey.
- Zhao L, Peralta-Videa JR, Rico CM, Hernandez-Viezcas JA, Sun Y, Niu G, Servin A, Nunez JE, Duarte-Gardea M, Gardea-Torresday JL, 2014. CeO₂ and ZnO nanoparticles change the nutritional qualities of cucumber (*Cucumis sativus*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 62, 2752-2759.