

FARKLI TUZ DOZLARINDA ÜRETİLEN MARULDA HUMİK ASİTİN BİTKİ GELİŞİMİNE ETKİSİ

Turgay KABAY

Yüzüncü Yıl Üniversitesi Erciş Meslek Yüksekokulu

tkabay@yyu.edu.tr

ÖZET

Günümüzde tarım yapılan alanların büyük kısmında tuzluluk problemi yaşanmaktadır. Bu gibi alanlarda yapılan üretimde verim ve kalite düşmektedir. Ancak yapılacak gübrelemeler bu zararı azaltılabilmektedir. Son yıllarda humik asit gibi birçok organik gübreler kimyasal gübrelere tercih edilmektedir. İyi bir belsime bitkinin biyotik ve abiyotik zararlara karşı direncini arttırmaktadır. Bu nedenle yılın 12 ay'ı tüketilen marul bitkisinin tuzlu ortamlarda gördüğü zararı, humik asit uygulayarak ne kadar azaltılabileceği amaçlanmıştır. Marul tohumları 2:1 oranında torf + perlit karışımı içeren 2 lt' lik saksılarda her saksıda 1 bitki oluşacak şekilde 2 adet tohum ekilmiştir. Denem tesadüf parselleri deneme desenine göre 4 tekrarlı ve her tekrarda 5 saksı olacak şekilde dizayn edilmiştir. Tohum ekiminden itibaren Hoagland besin çözeltisiyle hazırlanan suyla sulama yapılmıştır. Tohum ekiminden önce kontrol grubu dışındaki saksılara 1000 mg HA kg⁻¹ humik asit uygulandı. Marul fideleri 4 yapraklı olunca tuz çalışması olan saksılara 50, 100 ve 150 mmol tuz uygulamaları yapılmıştır. Tüm saksıdaki bitkiler Hoagland besin çözeltisiyle deneme sonlandırılıncaya kadar sulamaya devam edilmiştir. Tuz uygulamaları yapıldıktan 15 gün sonra deneme sonlandırılmıştır. Yapılan analiz ve ölçümler sonucunda humik asit'in bulunduğu saksılarda tuz uygulaması sonucu oluşan zararı azalttığı görülmüştür.

Anahtar kelimeler: Bitki gelişimi, Humik asit, Marul, Tuz stresi.

THE EFFECT OF HUMIC ACID ON PLANT DEVELOPMENT IN LETTUCE PRODUCED DIFFERENT DOSES OF SALT

ABSTRACT

Nowadays, a large part of agriculture land is faced with salinity problems. Yield and quality decreases if agricultural production make in such areas. However, fertilizers can reduce this damage. In recent years, many organic fertilizers such as humic acid are preferred to chemical fertilizers. Effective plant nutrition increases the resistance of the plant against biotic and abiotic damages. For this reason, it was aimed to determine how much salinity damage can be reduced salinity damage by applying humic acid in the lettuce that is consumed in 12 months of the year. Lettuce seeds were planted 2-liters pots containing 2: 1 peat + perlite mixture and 2 seeds planted in each pots. The study was designed to be 4 repetitions and 5 pots each repeat, according to randomized

experimental design. After seeds were planted, lettuce plants were irrigated with Hoagland nutrient solution. Before seed planting, 1000 mg HA kg⁻¹ humic acid was applied to the pots except the control groups. When the lettuce seedlings had 4-leaves, 50, 100 and 150 mmol salt applications were applied to the pots. The all plants were irrigated with Hoagland nutrient solution until the end of the experiment. The experiment was completed 15 days after the salt applications were made. As a result of the analyzes and measurements, it was observed that the salt stress damage was reduced in pots treated humic acid.

Keywords: Plant development, Humic acid, Lettuce, Salt stress.

GİRİŞ

Organik gübreler son yıllarda bitkisel üretimde sıkça kullanılmaya başlanmıştır. Bunun en önemli sebebi ise yıllarca yanlış gübreleme sonucu topraklarda tuzlulaşmanın artmasıdır (Çebi ve ark., 2018). Organik gübreler den en fazla kullanılanı yanmış ahır gübresi, humik asit ve solucan güresi dir. Bu gübrelerin kullanım amacı bitki başına verimi arttırmak ve abiyotik streslerden en fazla rastlanan kuraklık, tuzluluk, ve sıcaklık (yüksek ve düşük) zararlarına karşı bitkiyi güçlendirmektir. Humik + fulvik asit + K ile leonarditin yazlık kolza çeşidi olan Heros'un verim ve verim öğelerinde (bitki boyu, yan dal sayısı ve sapta kapsül sayısı) kontrol parselindeki bitkilerle kıyaslandığında istatistiksel olarak önemli derecede artışlara neden olduğu belirtilmektedir (Gürsoy ve Kolsarıcı, 2017). Toprağa uygulanan farklı dozlardaki humik asidin (0 (kontrol), 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 ve 1200 ml HA da⁻¹) mısır bitkisinde bitki boyu ve sap kalınlığı dışında incelenen özelliklerde istatistiki farklılık oluşturduğu, bitkideki yaprak sayısında artış olduğu; koçan kalınlığı, koçanda tane ağırlığı, bin dane ağırlığı ve dane verimi değerlerinin kontrol uygulamasına göre arttığı, 700 ml HA da⁻¹ uygulamasında en yüksek değere ulaşıldığı belirtilmiştir (Öktem ve ark., 2017). Kabak genotiplerinin tuzlu toprak koşullarında Arbusküler Mycorrhizal Fungi uygulamalarının fide döneminde bitki gelişimine etkileri çalışmasında, B33 genotipi A24 genotipinden tuzlu toprak koşullarında daha iyi gelişme gösterdiği, G. mosseae ırkı AMF uygulamasının diğerlerine göre tuzlu koşullarda fide gelişimine daha olumlu etkiler yaptığı belirtilmektedir (Abdulahdi, 2017). Tuzlu (100 mM NaCl konsantrasyonunda) koşullarda üretilen biber bitkisine uygulanan farklı dozlardaki humik asit (HA1; 750 mg kg⁻¹ toprak ve HA2; 1500 mg kg⁻¹ toprak) ve kalsiyum nitrat (Ca1; 60 mg / kg toprak ve Ca2; 120 mg kg⁻¹ toprak) uygulamaları sonucunda, humik asit ve kalsiyum nitrat (Ca1) uygulamalarının, büyüme parametrelerinde, fotosentetik pigmentlerde, mineral içeriğinde önemli artışlara neden olduğunu belirtilmektedir (Akladios ve Mohamed, 2018). Humik asit ve *Pseudomonas stutzeri* (PGPB) ile takviyesiyle biber bitkilerinin tuz stresini hafifletme kapasitesi çalışmasında, PGPB ve humik asitlerle aşılama, *in vitro* koşullarda çimlenmekte olan biber fideleri üzerinde tuzluluğun negatif etkilerini önemli ölçüde hafifletmiş olsa da, sera koşullarında ise biber verimi üzerinde hiçbir etki etmediği belirtilmektedir (Bacilio ve ark., 2017). Mısır bitkisinde tuz stresi (100 mM) uygulanması bitki taze ve kuru biyokütle, klorofil içeriği, yaprak suyu potansiyeli ve yaprak Ca, K, P ve N'de önemli bir düşüşe neden olduğu ancak uygulanan humik asit (HA 100 mM) ile taze ve kuru biyokütle, klorofil içeriği, yaprak suyu potansiyeli ve yaprak Ca, K, P ve N'de artışların olduğu belirtilmektedir (Kaya ve ark. 2018). Yer fıstığında tuz ve su stresi koşullarında humik asit ve salisilik asit etkisinin belirlendiği

çalışmada, hem humik asit hem de Salisilik asit, bitkideki kalite parametrelerini ve K / Na oranını önemli ölçüde artırdığı belirtilmektedir (Nigania ve ark., 2017) Soya fasulyesinde tuza dayanımı artırmak amacıyla uygulanan humik asit çalışmasında, yaprak alanı, bitkilerin yüksekliği, yer üstü kısmının taze ve kuru kütlesi, gövdelerin uzunluğu, klorofil içeriği, makro ve mikro element içeriklerinde, uygulanan humik asit ile tuzun verdiği zarar etkisini azalttığı belirtilmektedir (Matuszak-ve ark., 2017). Çerezlik kabak genotiplerin tuzlu toprak koşullarında *Arbusküler Mycorrhizal Fungi* uygulamalarının fide döneminde bitki gelişmesine etkilerini araştırıldığı çalışmada, tuzlu toprakta olumsuz etkilenen bitkilere *Mycorrhizal Fungi* uygulamalarının olumlu yönde etki ettiği belirtilmektedir (Abdulahdi ve ark 2017).

Bu çalışmada Yedikule marul bitkisinin tuz'un 50, 100 ve 150 mmol uygulamalarındaki ağırlık kaybı, yaprak oransal su içeriği, K, Ca, ve Na içeriklerinin humik asit etkisiyle ne oranda değiştiğini belirlemek amaçlanmıştır.

MATERYAL VE YÖNTEM

Tuz'un 50, 100 ve 150 Mmol dozlarında Yedikule marul çeşidinde bitki gelişimine humik asit'in "1000 mg HA kg⁻¹ (Gezgin ve ark. 2008). uygulamasının ne derece etki edeceğine bakılmıştır. Marul tohumları 2:1 oranında torf + perlit karışımı içeren 2 lt' lik saksılarda her saksıda 1 bitki oluşacak şekilde 2 adet tohum ekilmiştir. Denem tesadüf parselleri deneme desenine göre 4 tekrarlı ve her tekrarda 5 saksı olacak şekilde dizayn edilmiştir. Tohum ekiminden itibaren Hoagland besin çözeltisiyle sulama yapılmıştır. Tohum ekiminden önce kontrol grubu dışındaki saksılara 1000 mg HA kg⁻¹ humik asit uygulanmıştır. Marul fideleri 4 yapraklı olunca tuz çalışması olan saksılara 50, 100 ve 150 mmol tuz uygulamaları yapılmıştır. Tüm saksıdaki bitkiler Hoagland besin çözeltisiyle deneme sonlandırılıncaya kadar sulamaya devam edilmiştir. Tuz uygulamaları yapıldıktan 15 gün sonra çalışma sonlandırılmıştır. Çalışma sonunda tuz stresindeki marul bitkisinin bitki yaş ağırlığı, yaprak oransal su içeriği, K, Ca, ve Na içeriği analizleri yapılmıştır.

Bitki yaş ağırlıklarının belirlenmesi:

Hasat edilen tüm bitkiler hassas terazide tartılıp, bitki sayısına bölünerek bitki yaş ağırlıkları belirlenmiştir (Koç, 2005; Kusvuran, 2010; Bağci 2010; Kabay ve ark., 2017).

Yaprak oransal su içeriğinin belirlenmesi

Bitkilerden alınan yaprak örneklerinin yaprak oransal su içeriklerinin hesaplanması amacıyla yaprak taze ağırlıkları hassas terazide tartıldıktan sonra dört saat saf su içinde bekletilerek turgor ağırlıkları saptanmıştır. Daha sonra bu yapraklar 65 °C etüvde 48 saat bekletilip hassas terazide tartılmıştır. Gram cinsinden hassas terazide tartılan yaprak sonuçları aşağıdaki formüle göre hesaplanarak yaprak oransal su içerikleri yüzde cinsinden belirlenmiştir (Kusvuran, 2010; Bağci 2010; Kabay ve ark., 2017; Alp ve Kabay, 2017).

$$YOSİ = (TA-KA)/(TuA-KA) \times 100$$

TA: Taze Ağırlık KA: Kuru Ağırlık TuA: Turgor Ağırlığı

Mineral element analizleri

Hasat edilen bitkilerden alınan yaprak örnekleri mineral madde tayini için kullanılmıştır. Alınan bitkiler önce açıkta daha sonra 65 °C'de 48 saat etüvde kurutulmuştur. 200 mg tartılan kurutulmuş ve öğütülmüş bitki örnekleri etil alkolle ön yakma yapıldıktan sonra 550 °C kül fırınında kül oluşuncaya kadar yakılmıştır, elde edilen kül, % 3,3'lük HCl'de çözünmüş ve mavi bantlı filtre kağıdında süzildükten sonra Na, K, Ca okumaları Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma ve Uygulama Merkezinde atomik absorpsiyon cihazında yapılmıştır (Kusvuran, 2010; Bağcı 2010; Kabay and Sensoy, 2016).

Denemelerde kullanılan istatistik analizi

Tesadüf parselleri deneme deseni uygulanan çalışmada farklı tuz dozlarındaki stres ortamında humik asit etkisinin tespiti amaçlanmıştır. Varyans analizi sonucunda önemli bulunan farklılıklar Duncan çoklu karşılaştırma testine göre yapılmıştır (Yesilova and Denizhan, 2016). Genel istatistik analizler SAS 9.4 istatistik yazılım programı kullanılarak yapılmıştır (SAS, 2018).

BULGULAR VE TARTIŞMA

Humik asit gibi organik maddelerin tarımda kullanımı son zamanlarda artmıştır. Bu gibi organik maddelerin bitkilerde verim ve olumsuz çevre koşullarında nasıl bir etki yaptığı sürekli araştırılmaktadır. Yapılan çalışmada tuzun artan dozlarıyla bitki ağırlığında istatistiksel olarak önemli azalmalar olurken, uygulanan humik asit ile bitki ağırlıklarında artışların olduğu görülmektedir. En fazla ağırlık kaybının olduğu 150 mmol tuz dozunda kontrol bitkisinin ağırlığı 36.77 g ve yaprak oransal su içeriği %38.75 olurken, humik asit + 150 mmol dozunda ki bitkinin ağırlığı 113.75 g ve yaprak oransal su içeriği %53.77 olmuştur (Çizelge 1). Humik + fulvik asit + K ile leonarditin yazlık kolza çeşidi olan Heros'un verim, bitkiboyu, yan dal sayısı ve sapta kapsül sayısını arttırdığı belirtilmektedir (Gürsoy ve Kolsarıcı, 2017). Toprağa uygulanan farklı dozlardaki humik asidin mısır bitkisinde yaprak sayısında artış olduğu; koçan kalınlığı, koçanda tane ağırlığı, bin dane ağırlığı ve dane verimi değerlerinin kontrol uygulamasına göre arttığı belirtilmiştir (Öktem ve ark., 2017). Kabak genotiplerinin tuzlu toprak koşullarında Arbusküler Mycorrhizal Fungi uygulamalarının fide döneminde bitki gelişimine olumlu etkiler yaptığı belirtilmektedir (Abdulhadi, 2017). Tuzlu (100 mM NaCl konsantrasyonunda) koşullarda üretilen biber bitkisine uygulanan farklı dozlardaki humik asit (HA1; 750 mg / kg toprak ve HA2; 1500 mg / kg toprak) ve kalsiyum nitrat (Ca1; 60 mg / kg toprak ve Ca2; 120 mg kg⁻¹ toprak) uygulamaları sonucunda, humik asit ve kalsiyum nitrat (Ca1) uygulamalarının, büyüme parametrelerinde, fotosentetik pigmentlerde, mineral içeriğinde önemli artışlara neden olduğunu belirtilmektedir (Akladios ve Mohamed, 2018).

Çizelge 1. Tuz dozlarındaki marul bitkisine uygulanan humik asitin bitkideki taze ağırlık (g) ve yaprak oransal su içeriğine (%) etkisi

Tuz	Bitki	Bitki	YOSİ	YOSİ
Miktarı	Ağırlığı	Ağırlığı	H. asitsiz	H. asitli
	H.asit 0	H.asit 1000	0	1000
0 mmol	312.22a	396.75a	78.58a	89.12a
50 mmol	185.85b	201.58b	58.86b	68.77b
100mmol	81.74c	125.52c	49.84c	57.77c
150mmol	36.77d	113.74d	38.75d	53.77c

Yedikule marul bitkilerinin tuzun artan dozlarında K ve Ca İçeriklerinde azalma olurken Na içeriğinde artış olmuştur. Ancak verilen humik asitle marul bitkilerinde K ve Ca içeriklerinde artış olurken, Na içeriğinde azalma olduğu görülmektedir (Çizelge 2). Uyguladığımız tuzun en yüksek dozu olan 150 mmol tuz dozunun K içeriği % 5.17, Ca içeriği % 1.96 iken, humik asit uygulamasında ise K % 5.67, Ca % 2.27 olduğu görülmüştür. Na ise 150 mmol tuz dozunun kontrol bitkisinde %1.49 iken humik asit uygulamasında ise 1.34'e düşmüştür (Çizelge 2). Tuz stresindeki biber bitkilerine uygulanan humik asit ve *Pseudomonas stutzeri* (PGPB)' in *in vitro* koşullarda çimlenmekte olan biber fideleri üzerinde tuzluluğun negatif etkilerini önemli ölçüde hafifletmiş olduğu (Bacilio ve ark., 2017). Mısır bitkisinde tuz stresi uygulanması bitki taze ve kuru biyokütle, klorofil içeriği, yaprak suyu potansiyeli ve yaprak Ca, K, P ve N'de önemli bir düşüşe neden olduğu ancak uygulanan humik asit (HA 100 mM) ile taze ve kuru biyokütle, klorofil içeriği, yaprak suyu potansiyeli ve yaprak Ca, K, P ve N'de artışların olduğu belirtilmektedir (Kaya ve ark. 2018). Yer fıstığında tuz ve su stresi koşullarında humik asit ve salisilik asit etkisinin belirlendiği çalışmada, hem humik asit hem de salisilik asit, bitkideki kalite parametrelerini ve K / Na oranını önemli ölçüde artırdığı belirtilmektedir (Nigania ve ark., 2017) Soya fasulyesinde tuza dayanımı artırmak amacıyla uygulanan humik asit çalışmasında, taze ve kuru ağırlığı, makro ve mikro element içeriklerinde, uygulanan humik asit ile tuzun verdiği zarar etkisini azalttığı belirtilmektedir (Matuszak-ve ark., 2017). Kabak genotiplerinin tuzlu toprak koşullarında *Arbusküler Mycorrhizal Fungi* uygulamalarının fide döneminde bitki gelişmesine olumlu etki ettiği belirtilmektedir (Abdulhadi ve ark 2017).

Çizelge 2. Tuz dozlarındaki marul bitkisine uygulanan humik asitin bitkideki K(%), Ca(%) ve Na(%) içeriğine etkisi

Tuz	K	K	Ca	Ca	Na	Na
Miktarı	H.asit	H.asit	H.asit	H.asit	H.asit	H.asit
	0	1000	0	1000	0	1000
0 mmol	5.86a	5.98a	2.63a	2.96a	0.12d	0.083c
50 mmol	5.28b	5.73b	2.32b	2.51b	0.23c	0.18b
100mmol	5.12c	5.61c	2.24c	2.42c	1.41b	1.37a
150mmol	5.17c	5.67d	1,96d	2.27d	1.49a	1.34a

SONUÇ

Humik asit son yıllarda bitkisel üretimde sık kullanılan organik gübredir. Yaprığı yenen marulda tuz yapraklara büyük zarar vermektedir. Humik asit kullanarak bu zararın azaldığı görülmüştür. Yaptığımız çalışmada da görüldüğü gibi tuz dozlarının artması bitki de taze ağırlığı, yaprak oransal su içeriğini, K ve Ca miktarlarını azalttığı görülmüştür. Ancak artan tuz oranlarında ise Na miktarını arttığı görülmüştür. Kullanılan humik asit uygulaması bitki de taze ağırlığı, yaprak oransal su içeriğini, K ve Ca miktarlarını arttırdığı görülürken, Na miktarında azaldığı görülmüştür.

KAYNAKLAR

- Abdulhadi, S. A. A. 2017. Tuzlu toprak koşullarında çerezlik kabakta arbusküler mikoriza fungi uygulamalarının fide gelişmesine etkisi (Doctoral dissertation, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü).
- Abdulhadi, S., Seymen, M., Turkmen, Ö., 2017. Effect of Arbuscular Mycorrhiza Fungi application on seedling development in squash in saline soil conditions. *Manas Journal of Agriculture Veterinary and Life Sciences*, 7(2).
- Akladios, S. A., Mohamed, H. I., 2018. Ameliorative effects of calcium nitrate and humic acid on the growth, yield component and biochemical attribute of pepper (*Capsicum annuum*) plants grown under salt stress. *Scientia Horticulturae*, 36, 244-250.
- Alp, Y., Kabay, T. 2017. Kuraklık stresinin bazı yerli ve ticari domates çeşitlerinde bitki gelişimi üzerine etkileri. Yüzüncü Yıl Üniversitesi *Tarım Bilimleri Dergisi*, 27(3), 387-395.
- Bacilio, M., Moreno, M., Lopez-Aguilar, D. R., Bashan, Y. 2017. Scaling from the growth chamber to the greenhouse to the field: Demonstration of diminishing effects of mitigation of salinity in peppers inoculated with plant growth-promoting bacterium and humic acids. *Applied Soil Ecology*, 119, 327-338

Bağcı E. 2010. Nohut Çeşitlerinde kuraklıkğa bağlı oksidatif stresin fizyolojik ve biyokimyasal parametrelerle belirlenmesi (Doktora tezi basılmamış). Ankara üniversitesi Fen Bilimleri Fakültesi, s. 403 Ankara.

Çebi, U. K., Aydın, B., Selçuk, Ö. Z. E. R., Altıntaş, Z., Öztürk.S. 2018 O. Farklı Tuzluluk Düzeyindeki Sulama Sularının Örtü Altında Yetiştirilen Brokoli Bitkisinin Enerji Kullanım Etkinliği Üzerine Etkisi. *Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi*, 5(2), 100-108.

Gezgin, S., Dursun, N., Gökmen, F. 2008. Artan dozlarda uygulanan farklı humik asit kaynaklarının marulun verim ve besin elementleri içeriğine etkileri. *TKİK Araştırmaları*, Ankara.

Gürsoy, M., Kolsarıcı, Ö. 2017. Ankara koşullarında leonarditle kaplanmış toprakta yazlık kolza (*Brassica napus ssp. oleifera* L.)'ya uygulanan farklı humik asit dozlarının verim ve verim öğelerine etkilerinin belirlenmesi. *KSÜ Doğa Bilimleri Dergisi*, 20, 186-191.

Kabay T, Şensoy S. 2016. Kuraklık Stresinin Bazı Fasulye Genotiplerinde Oluşturduğu Enzim, Klorofil ve İyon Değişimleri. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi*, 26(3), 380-395

Kabay T, Erdinç Ç, Şensoy S 2017. Effects of drought stress on plant growth parameters, membrane damage index and nutrient content in common bean genotypes. *The Journal Of Animal Plant Sciences*, 27(3), Page: 940-952

Kaya, C., Akram, N. A., Ashraf, M., Sonmez, O. 2018. Exogenous application of humic acid mitigates salinity stress in maize (*Zea mays* L.) plants by improving some key physico-biochemical attributes. *Cereal Research Communications*, 46(1), 67-78.

Koç, S., 2005. Fasulyelerde tuzluluğa tolerans bakımından genotipsel farklılıkların erken bitki gelişimi aşamasında belirlenmesi. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enst. Yüksek Lisans tezi s. 87.

Kuşvuran, Ş. 2010. Kavunlarda kuraklık ve tuzluluğa toleranslı fizyolojik mekanizmaları arasındaki bağlantılar (Doktora tezi, basılmamış). Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü s. 356, Adana.

Matuszak-Slamani, R., Bejger, R., Cieśla, J., Bieganski, A., Koczańska, M., Gawlik, A., Gołębiewska, D. 2017. Hüyük asit moleküler fraksiyonlarının, soya fasulyesi fidelerinin tuz stresi altında büyümesi ve gelişmesi üzerindeki etkisi. *Bitki Büyüme Yönetmeliği*, 83 (3), 465-477.

Nigania, S., Sharma, Y., Kumar, B. 2017. Role of humic acid and salicylic acid on quality parameters and K/Na ratio of Groundnut (*Arachis hypogaea* L.) under salt and water stress. *IJCS*, 5(6), 278-283.

Öktem, A., Çelik, A., Öktem, A. G. 2017. Toprağa humik asit uygulamasının mısır bitkisinin (*Zea mays* L. *indendata*) verim ve bazı verim karakterleri üzerine etkisi. *Doğa Bilimleri Dergisi*, 20, 268.

SAS (2018). SAS/Stat Software Hangen and Enhanced, SAS Institute Incorporation.

Yesilova, A., Denizhan, E. (2016). Modelling mite counts using poisson and negative binomial. *Fresenius Environmental Bulletin*. 25:5062-5066