

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KARBON NANOTÜPLERE TUTTURULMUŞ *ESCHERİCHİA COLİ* İLE
BAZI ESER ELEMENTLERİN AYRILMASI / ZENGİNLEŞTİRİLMESİ VE
ALEVLİ ATOMİK ABSORPSİYON SPEKTROMETRESİ İLE TAYİNİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
Nihat AYDEMİR**

Anabilim Dalı : Kimya

Programı : Kimya

HAZİRAN 2009

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KARBON NANOTÜPLERE TUTTURULMUŞ *ESCHERİCHİA COLİ* İLE
BAZI ESER ELEMENTLERİN AYRILMASI / ZENGİNLEŞTİRİLMESİ VE
ALEVLİ ATOMİK ABSORPSİYON SPEKTROMETRESİ İLE TAYİNİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
Nihat AYDEMİR
(509061217)**

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 29 Nisan 2009

Tezin Savunulduğu Tarih : 04 Haziran 2009

**Tez Danışmanı : Prof. Dr. Süleyman AKMAN (İTÜ)
Diğer Jüri Üyeleri : Prof. Dr. Birsen DEMİRATA ÖZTÜRK (İTÜ)
Yrd. Doç. Dr. Alper Tunga AKARUBAŞI (İTÜ)**

HAZİRAN 2009

ÖNSÖZ

Yüksek lisans tezimin danışmanlığını üstlenen, tez çalışmalarım boyunca yardım ve desteklerini esirgemeyen, tez başlangıcından sonlanmasına kadar bilimsel yönden her türlü desteği vererek beni yetiştiren değerli hocam Prof. Dr. Süleyman AKMAN'a , tez çalışmalarım boyunca benimle bilfiil ilgilenen, zorlukları yenmeme yardım eden ve ümitsizliğe düştüğümde bile bana ümit veren sayın hocam Doç.Dr. Nilgün TOKMAN'a, tez çalışmalarımda beni yönlendiren ve desteklerini her zaman hissettiren sayın hocam Yrd.Doç.Dr. Alper Tunga AKARSUBAŞI'na sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Hayatım boyunca beni her zaman maddi ve manevi olarak destekleyen, benim bu günlere gelmemde en büyük pay sahibi olan sevgili Annem, Babam ve ablalarım ; tez çalışmalarım süresince ilgi ve yardımlarını esirgemeyen, her zaman manevi desteklerini hissettiren canım ustam Ali KARADAŞ'a ve ailesine, Hakkı Gerçek ve Burhan KESKİN'e, sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Haziran 2009

Nihat AYDEMİR

İÇİNDEKİLER

	<u>SayfaNo</u>
ÖNSÖZ	iii
İÇİNDEKİLER.....	v
KISALTMALAR.....	vi
ÇİZELGE LİSTESİ.....	ix
ŞEKİL LİSTESİ.....	xi
ÖZET.....	xiii
SUMMARY.....	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. ESER ELEMENTLERİN ANALİZLERİ.....	3
2.1 Eser elementler.....	3
2.2 Eser Elementlerin Zenginleştirilmesi ve Ayrılması.....	4
2.2.1 Sıvı-sıvı ekstraksiyonu ile zenginleştirme.....	5
2.2.2 Katı faz ekstraksiyonu ile zenginleştirme.....	6
2.2.3 Birlikte çöktürme ile zenginleştirme.....	7
2.2.4 Uçurma ile zenginleştirme.....	8
2.2.5 Elektrolitik ile zenginleştirme.....	9
2.2.6 İyon değiştiriciler ile zenginleştirme.....	9
2.3 Eser Elementlerin Adsorpsiyonu.....	10
2.3.1 Mikroorganizmalarla adsorpsiyon.....	12
3. ATOMİK ABSORPSİYON SPEKTROSKOPİSİ.....	15
3.1 Genel.....	15
3.2 Absorpsiyonun Temel Kuralları.....	15
3.3 Atomik Spektrum ve Hat Genişlemesi.....	16
3.3.1 Doğal hat genişlemesi.....	17
3.3.2 Doppler hat genişlemesi.....	18
3.3.3 Basınç genişlemesi.....	18
3.3.4 İnce yapı genişlemesi.....	19
3.4 Atomik Absorpsiyon Spektrometresi.....	19
3.4.1 Işın kaynakları.....	20
3.4.1.1 Oyuk katot lambaları.....	20
3.4.1.2 Elektrotsuz boşalım lambaları.....	21
3.4.1.3 Yüksek ışımalı lambalar.....	22
3.4.1.4 Sürekli ışın kaynakları.....	22
3.4.2 Atomlaştırıcılar.....	22
3.4.2.1 Alevli atomlaştırıcılar.....	23
3.4.2.2 Elektrotermal atomlaştırıcılar.....	26
3.4.3 Monokromatörler.....	28
3.4.4 Dedektörler.....	28
3.5 Atomik Absorpsiyon Spektrometresinde Kantitatif Analiz.....	29
3.5.1 Lineer kalibrasyon yöntemi.....	29

3.5.2 Standart ekleme yöntemi.....	29
3.6 Girişimler.....	30
3.6.1 Spektral girişimler ve düzeltilmeleri.....	30
3.6.1.1 Çift hat yöntemi.....	31
3.6.1.2 Self absorpsiyonla zemin düzeltme yöntemi.....	32
3.6.1.3 Sürekli ışın kaynaklızemin düzeltme yöntemi.....	32
3.6.1.4 Zeeman etkili zemin düzeltme yöntemi.....	34
3.6.2 Spektral olamayan girişimler.....	35
4. DENEYSEL KISIM.....	39
4.1 Kullanılan Cihazlar.....	39
4.2 Kullanılan Kimyasallar ve Hazırlanışları.....	39
4.3 Bakteri Hücrelerinin Büyütülmesi ve Modifikasyon Şartları.....	40
4.3.1 Bakteri hücrelerinin büyütülmesi.....	40
4.3.2 Canlı bakteri hücrelerinin karbon nanotüp üzerine tutundurulması.....	40
4.3.3 Ölü bakteri hücrelerinin karbon nanotüp üzerine tutundurulması.....	41
4.4 Adsorpsiyon ve Desorpsiyon (Geri Kazanma) Prosedürünün Uygulanması.....	41
4.4.1 Filtre içinde sorbentin hazırlanması.....	42
4.4.2 Standart metal çözeltileri ile adsorpsiyon-desorpsiyon.....	43
4.4.3 Atık su numunesine adsorpsiyon-desorpsiyon prosedürünün uygulanması ve zenginleştirme metodu.....	43
5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	45
5.1 Adsorpsiyon Özelliklerinin İncelenmesine Ait Sonuçlar.....	45
5.1.1 pH etkisi.....	45
5.1.2 Sorbentin kapasitesi.....	47
5.1.3 Yabancı iyon etkisi.....	50
5.2 Geri Kazanma Özelliklerinin İncelenmesine Ait Sonuçlar.....	51
5.3 Metot Validasyonu.....	52
5.4 Tartışma.....	53
KAYNAKLAR.....	55
ÖZGEÇMİŞ.....	59

KISALTMALAR

AAS	: Atomik Absorpsiyon Spektrofotometresi
UV Bölge	: Ultraviyole Bölge
CCD	: Charge Coupled Device
FAAS	: Alevli (Flame) Atomik Absorpsiyon Spektrofotometresi
ETAAS	: Elektrotermal Atomik Absorpsiyon Spektrofotometresi
GFAAS	: Grafit Fırınlı Atomik Absorpsiyon Spektrofotometresi
MWCNT	: Multi-walled Carbon Nanotubes (Çok Yüzeyli Karbon Nanotüp)
E.Coli	: Escherichia Coli
SPE	: Solid Phase Extraction (Katı Faz Ekstraksiyon)
CWW-TM	: Certified Waste Water-Trace Metal (Sertifikalı Atık Su Numunesi-Eser Element)
ppb	: Parts per billion (Milyarda bir kısım)
ppm	: Parts per million (Milyonda bir kısım)

ÇİZELGE LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Çizelge 3.1 : AAS’de kullanılan çeşitli yakıcı ve yanıcı gaz türleri ve bunların oluşturduğu alevlerin maksimum sıcaklıkları.....	25
Çizelge 4.1 : Absorbans ölçümlerinde uygulanan aletsel parametreler.....	39
Çizelge 5.1 : Tayin elementlerinin (Cu, Co, Cd, Ni) ayrı ayrı olarak sorbent madde üzerinde alıkonma miktarları.....	48
Çizelge 5.2 : Tayin elementlerinin (Cu, Co, Cd, Ni) birlikte sorbent madde üzerinde alıkonma miktarları.....	48
Çizelge 5.3 : Tayin elementlerinin (Cu, Co, Cd, Ni) MWCNT üzerine modifiye edilmiş canlı <i>E. Coli</i> ile hazırlanan sorbent üzerinde alıkonmalarına yabancı iyonların etkisi.....	51
Çizelge 5.4 : Tayin elementlerinin (Cu, Co, Cd, Ni) MWCNT üzerine modifiye edilmiş ölü <i>E. Coli</i> ile hazırlanan sorbent üzerinde alıkonmalarına yabancı iyonların etkisi.....	51
Çizelge 5.5 : Tayin elementlerinin (Cu, Co, Cd, Ni) MWCNT üzerine modifiye edilmiş canlı <i>E. Coli</i> ile hazırlanan sorbent üzerinden geri kazanımı.....	52
Çizelge 5.6 : Tayin elementlerinin (Cu, Co, Cd, Ni) MWCNT üzerine modifiye edilmiş ölü <i>E. Coli</i> ile hazırlanan sorbent üzerinden geri kazanımı.....	52
Çizelge 5.7 : Sertifikalı referans atık su numunesi (CWW-TM) içerisindeki Cu, Co, Cd ve Ni miktarları.....	53

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 3.1 : Tek ışın yollu(a) ve çift ışın yollu(b) AAS cihazlarının şematik gösterimi.....	19
Şekil 3.2 : Oyuk katot lambasının yapısı.....	20
Şekil 3.3 : Elektrotsuz boşalım lambasının yapısı.....	21
Şekil 3.4 : Genel bir alev atomlaştırıcı.....	23
Şekil 3.5 : Alevde atomlaştırma sırasında oluşan süreçler.....	24
Şekil 3.6 : Grafit tüplü bir fırının basit şeması.....	27
Şekil 3.7 : Sürekli ışın kaynaklı zemin düzeltici bir atomik spektrofotometresini şematik gösterimi.....	33
Şekil 3.8 : Döteryum lambası(D2) ile zemin engellemelerinin düzeltilmesi.....	33
Şekil 3.9 : Manyetik bir alanda spektral bir hattan normal Zeeman etkisi yarılması.....	34
Şekil 3.10 : Zeeman etkili cihazların şematik gösterimi.....	35
Şekil 4.1 : MWCNT üzerine modifiye edilen E.Coli bakteri hücresinin SEM görüntüsü.....	41
Şekil 4.2 : MWCNT üzerine modifiye edilen E.Coli bakteri hücresinin SEM görüntüsü.....	42
Şekil 4.3 : Şırıngaya monte edilebilen filtre sistemi resmi.....	43
Şekil 5.1 : Tayin elementlerinin (Cu, Co, Cd ve Ni) MWCNT üzerine modifiye edilmiş canlı <i>E. Coli</i> ile hazırlanan sorbent tarafından alıkonma yüzdeleri üzerine pH'ın etkisi.....	46
Şekil 5.2 : Tayin elementlerinin (Cu, Co, Cd ve Ni) MWCNT üzerine modifiye edilmiş canlı <i>E. Coli</i> ile hazırlanan sorbent tarafından alıkonma yüzdeleri üzerine pH'ın etkisi.....	46
Şekil 5.3 : Tayin elementlerinin (Cu, Co, Cd, Ni) ayrı ve aynı ortamda canlı sorbent üzerinde adsorplama kapasitelerinin karşılaştırılması.....	49
Şekil 5.4 : Tayin elementlerinin (Cu, Co, Cd, Ni) ayrı ve aynı ortamda ölü sorbent üzerinde adsorplama kapasitelerinin karşılaştırılması.....	49
Şekil 5.5 : MWCNT üzerine modifiye edilmiş <i>E. Coli</i> 'nin canlı ve ölü olarak adsorplama kapasitelerinin karşılaştırılması.....	50

KARBON NANOTÜPLERE TUTTURULMUŞ *ESCHERICHIA COLI* İLE BAZI ESER ELEMENTLERİN AYRILMASI / ZENGİNLEŞTİRİLMESİ VE ALEVİLİ ATOMİK ABSORPSİYON SPEKTROMETRESİ İLE TAYİNİ

ÖZET

Atomik absorpsiyon ile eser element analizinde analit konsantrasyonu tayin edilemeyecek kadar küçük olduğunda ve/veya matriks girişimleri ortadan kaldırılamıyorsa, matriksin ayrılması ve analitin zenginleştirilmesi için çeşitli yöntemler (birlikte çöktürme, sıvı-sıvı ekstraksiyon, iyon değiştirici) kullanılmaktadır. Bu teknikler arasında, analitin bir sorbent üzerinde bağlanması ve daha sonra bir eluent ile geri kazanılması en yaygın kullanılan yöntemdir. Bu amaçla sorbent olarak çeşitli malzemeler (polimerik reçine, aktif karbon, silika, vb.) kullanılmaktadır. Bir yüzeye tutturulmuş (immobilize) bakteri ve mayalarda aynı amaçla başarılı bir şekilde kullanılmaktadır.

Biyokütle silika jel, sepiolit ve çok yüzeyli karbon nanotüp gibi destek maddeleri üzerine tutturulmaktadır. İmmobilize edilen hücre sistemleri metotlarının, serbest hücrelere göre tekrar kullanımının daha iyi olması, mekanik dayanıklılık ve çözelti ortamından kolay ayrılması gibi üstünlükleri vardır.

Bu çalışmada, biyosorbent olarak çok yüzeyli karbon nanotüp üzerine canlı veya cansız olarak tutturulmuş *Escherichia Coli* bakteri hücreleri; bakır, kobalt, kadmiyum ve nikelin alevli atomik absorpsiyon spektrometresi ile tayini öncesi ayrılması ve zenginleştirilmesi için kullanılmıştır. Bu amaçla, *Escherichia Coli* bakteri hücreleri canlı ve cansız olarak 1:1 (w/w) oranında çok yüzeyli karbon nanotüple (Multi-walled Carbon Nanotubes) 20 ml su içinde karıştırılıp, kurutuldu. Enjektöre takılabilen filtrenin içi sorbent ile dolduruldu ve örnek çözeltisi filtreden geçirildi. Analitlerin adsorpsiyonuna pH, yabancı iyon etkisi ve analitlerin geri kazanımları incelendi. Analitler $\text{pH} \geq 7$ 'de kantitatif olarak ($> \%95$) alıkondu ve $0,5 \text{ mol l}^{-1} \text{ HNO}_3$ ile yüksek duyarlılıkta ($\text{RSD} < \%5$) geri kazanıldı. Çalışılan analit elementler için biyosorbentin adsorpsiyon kapasitesi araştırıldı. Analitik parametreler belirlendi. Son olarak sertifikalı referans maddede eser element analizi yapıldı. Canlı *Escherichia Coli* bakteri hücresi ile modifiye edilen sorbentin, cansız *Escherichia Coli* bakteri hücresi ile modifiye edilen sorbente göre adsorpsiyon kapasitesinin, analitlerin geri kazanımının daha yüksek olduğu bulunmuştur. Çok yüzeyli karbon nano tüp üzerine tutturulmuş *Escherichia Coli* bakteri hücresi ile tasarlanan şırınga tekniğinin bakır, kobalt, kadmiyum ve nikelin alevli atomik absorpsiyon spektrometresi ile tayini öncesi ayrılma ve zenginleştirilmesi için hızlı, basit, pratik, kesin ve duyarlı bir yöntem olduğu gösterilmiştir.

DETERMINATION OF SOME TRACE ELEMENTS BY FLAME ATOMIC ABSORPTION SPECTROMETRY AFTER PRECONCENTRATION AND SEPARATION BY *ESCHERICHIA COLI* IMMOBILIZED ON MULTI WALLED CARBON NANOTUBES

SUMMARY

In the determination of trace elements by atomic absorption spectrometry (AAS) , when the analyte concentration is too low to be determined and / or the interferences due to the matrix can not be eliminated, the use of a separation / preconcentration technique is a necessity. There are many kinds of preconcentration / separation techniques e.g. coprecipitation, liquid-liquid extraction and ion change. Among these techniques, the collection of analyte on a sorbent and then its recovery with an eluent is one of the most widely used method. For this purpose; various materials such as polymeric resin , actived carbon, silica etc. have been used as a sorbent. Yeasts and bacteria, fixed on a surface, have been successfully used for the same purposes as well.

The biomass has been immobilized on a support material such as silica gel, sepiolite and multi-walled karbon nanotubes. Immobilized cell systems possess several advantages on freely suspended cells, better capability of re-using the biomass, excellent durability and easy separation of cells from the solution.

In this study, the use of non-living or living *Escherichia Coli* immobilized on multiwalled carbon nanotubes (MWCNT) has been used as a biosorbent for the separation and preconcentration of trace copper, cobalt, cadmium and nickel prior to their determination by flame atomic absorption spectrophotometry (FAAS). For this purpose, living and non-living *Escherichia Coli* bacteria cells were mixed with 1:1 (w/w) of ratio multi-walled carbon nanotubes in 20 ml water; and then dried. The cavity of a syringe-mountable filter system (SMFS) was filled with the sorbent and the sample solution was passed through the filter by means of syringe. Effect of pH, interfering ions on adsorption of analytes and recovery of analytes were investigated. The analytes were retained quantitatively (> 95%) at $\text{pH} \geq 7$ and eluted with $0.5 \text{ mol l}^{-1} \text{ HNO}_3$ with a high precision (RSD < 5%). The adsorption capacities of the sorbents with respect to analyte elements studied were investigated. Analytical parameters were determined. Finally , trace element analysis was done with certificated reference materials. Modified sorbent with living *Escherichia Coli* bacteria cells have higher adsorption capacity and higher recovery of analytes were found according to modified sorbent with non-living living *Escherichia Coli* bacteria cells. It was proved that the proposed syringe technique by the use of *Escherichia Coli* immobilized on multi-walled carbon nanotubes is a fast, simple, precise and sensitive method for the separation and preconcentration of copper, cobalt, cadmium and nickel prior to their determination by flame atomic absorption spectrometry.

1.GİRİŞ

Atomik absorpsiyon ile eser elementlerin tayininde en büyük sorunu, tayin edilecek analit konsantrasyonun çok düşük olması ve matriks ortamından kaynaklı girişimler nedeni ile tayinin doğru yapılamaması teşkil etmektedir. Matriks ortamından kaynaklanan girişimlerin engellenmesi ve analit konsantrasyonun tayin sınırının üstüne getirilmesi amacı ile ayırma/ön-zenginleştirme metotları yaygın olarak kullanılmaktadır. Bunlar arasında sıvı-sıvı ekstraksiyon, katı faz ekstraksiyon, birlikte çöktürme, iyon değıştiriciler ile zenginleştirme yaygın kullanılan metotlardır. Metal iyonlarının sulu çözeltilerden mikroorganizmalar ile tutulmasına biyosorpsiyon denir. Günümüzde ağır metalleri atık sulardan uzaklaştırmak, eser metalleri matriksten ayırmak ve zenginleştirmek için serbest veya bir materyal üzerine tutundurulmuş (immobilize edilmiş) mikroorganizmalarda (alg, mantar, maya, bakteri) sorbent olarak analitik çalışmalarda kullanılmaktadır [1]. İmmobilizasyonda silika jel, sepiolit, gözenekli cam ve çok yüzeyli karbon nanotüp gibi destek maddeleri kullanılmaktadır. İmmobilize mikroorganizmaların, serbest mikroorganizmalara göre kullanım süresi, mekanik dayanıklılık ve çözelti ortamından kolay ayrılması gibi üstünlükleri vardır [2-6].

Canlı hücrelerin, sulu çevrelerinden metal katyonlarını toplayarak, hücre içinde biriktirmeleri bilinen bir özellik olmasına rağmen, mikroorganizmaların ağır metal iyonlarını seçici olarak alıkoyma özelliğı üzerindeki çalışmalar yenidir. Öte yandan krom, kurşun, civa, bakır, çinko gibi ağır metallerin aşırısının yaşayan hücreler üzerinde toksik bir etkiye sahip oldukları da bilinmektedir. Gerek ağır metallerin toksik etkisi ve gerekse mikroorganizmalarla ağır metal adsorpsiyonunun mekanizmasının tam olarak açıklanamaması, konunun günümüze değin bir fenomen olarak anılmasına yol açmıştır.

Bu çalışmada, *Escherichia Coli* bakteri hücresinin çok yüzeyli karbon nanotüp üzerine tutundurulması ve sorbent madde olarak tayin elementlerinin alevli atomik absorpsiyon spektrometresi ile tayini öncesi ayırma/zenginleştirmesinde kullanılması amaçlanmıştır. Bu nedenle öncelikle *Escherichia Coli* bakteri hücresinin canlı ve

cansız (ölü) olarak çok yüzeyli karbon nanotüpe tutundurulması ve farklı pH değerlerinde tayin elementlerini tutma (adsorplama) yüzdelерinin incelenmesi ve optimum pH aralağının tespiti, tayin elementlerinin geri kazanımları için uygun eluentin belirlenmesi, modifiye sorbentin maksimum metal iyonu adsorplama kapasitesinin tayini ve tüm bu deneysel çalışmalarda modifiye sorbent madde (*Escherichia Coli* tutturulmuş çok yüzeyli karbon nanotüp) ile doldurulan içi açılabilen-çok kullanımlı filtre sisteminin kullanımının incelenmesi amaçlanmıştır.

2. ESER ELEMENT ANALİZLERİ

2.1. Eser Elementler

Eser element, bir sistemde diğer bileşenlere göre çok az bulunan elementlere denir. Eser element analizi terimi ise büyük miktardaki bileşenlerden oluşan ortam içindeki eser elementlerin tayini için kullanılmaktadır. İlk eser element tayini 1879'da Gutzeit tarafından nitel Marsh deneyi esas alınarak yapılan arsenik deneyidir. Analitik kimyanın en önemli araştırma alanı olan eser element tayini gün geçtikçe eser elementlerin yüksek saflıktaki malzemeler, jeokimya, hava, su ve toprak kirliliği elektronik sanayi, ilaç ve çevre kimyası, insan vücudu ve metabolizmasına etkileri gibi değişik alanlardaki işlevlerinin anlaşılması ile daha da önem kazanmıştır.

Eser konsantrasyon olarak kabul edilen konsantrasyon aralığı, atomik absorpsiyon spektrometrisi, plazma emisyon spektrometrisi, gaz kromatografisi, kütle spektrometrisi gibi eser analiz tekniklerinin gelişmesiyle değişim göstermiştir. Bugünkü yaygın kullanım şekli 10^{-2} - 10^{-6} konsantrasyon aralığı eser, 10^{-6} 'nın altındaki konsantrasyonlar ise ultra-eser olarak bilinmektedir. Eser konsantrasyon için milyonda, ppm (10^{-4}) ve milyarda ppb (10^{-7}) tanımları verilmiştir [7]. Günümüzde ng/g ve pg/g mertebesinde elementler uygun analitik yöntemlerle yüksek doğruluk ve güvenilirlikte tayin edilebilmektedir.

Eser element analiz yönteminde büyük miktardaki bileşenlerden oluşan ortam içinde çok küçük miktardaki elementlerin tayini yapılmaktadır. Pek çok durumda matriks yani analiz elementi dışındaki diğer bileşenler eser elementin tayinine olumsuz etki yapar ki bu da aynı konsantrasyondaki bir elementin farklı ortamlarda farklı büyüklükte analitik sinyaller oluşturması sonucu girişim etkisi olarak tanımlanır. Eser analizde kullanılan enstrümantal yöntemlerin bağıl yöntemler olduğu da düşünülürse, kalibrasyonda kullanılan standartlar ile numunenin fiziksel ve kimyasal özelliklerinin olabildiğince birbirine benzetilmesi gerekmektedir.

Eser element analizi;

- Numune hazırlanması (numune alma, taşıma, depolama, homojenize etme, toz haline getirme, kurutma, filtrasyon, eleme)
- Çözme
- Zenginleştirme
- Analiz
- Data proses

aşamalarını içerir.

Analizi yapılacak eser element çok düşük miktarlarda numunede bulunduğu için buna uygun olarak hassas analiz teknikleri kullanmak gerekmektedir. Tekniğin hassasiyeti, doğruluğu ve kesinliği analiz edilecek eser elemente, matrikse, analiz cihazına, reaktiflere ve deneysel koşullara büyük ölçüde bağlıdır. Ayrıca analizde, analitik kesinlik ve doğruluk için tayin edilecek elementin ölçüm basamağına kadar ortamdaki uzaklaşmaması ve dışarıdan gelebilecek olan kontaminasyonlar önemli rol oynar.

2.2. Eser Elementlerin Zenginleştirilmesi ve Ayrılması

Karmaşık ortamlarda bulunan eser elementlerin doğrudan tayini, derişim ve girişim etkileri sebebi ile çoğu zaman mümkün değildir. Bu nedenle, eser element tayini yapılmadan önce bir ayırma-zenginleştirme basamağının uygulanması zorunlu hale gelir. Zenginleştirme işlemleri ile tayin edilecek madde hem tayin tekniğine uygun olan ortama alınır hem de daha küçük hacim içerisinde toplanarak deriştirilir.

Ayırma, bir maddenin temasta bulunan iki faz arasında değişik oranda dağılması esasına dayanır. Bütün ayırma yöntemlerinde katı-sıvı, sıvı-sıvı, sıvı-gaz ve katı-gaz şeklinde olabilen iki faz bulunmaktadır.

Eser element analizlerinde kullanılan ayırma ve zenginleştirme yöntemleri sayesinde:

- 1- Eser element konsantrasyonu artırılarak yöntemin duyarlılığı artırılır.
- 2- Eser elementler uygun ortama alındığından, ortamdaki gelebilecek girişimler giderilir.
- 3- Büyük numune miktarları ile çalışılabildiği için numunenin homojen olmayışından gelebilecek hatalar önlenir.

- 4- Ayırma işlemi ile eser elementler bilinen ortam (matriks) içine alındığından, standartlar ile numune ortamını benzetmek kolaylaşır.
- 5- Bozucu etki gösteren ortam, uygun ortam ile yer değiştirdiği için zemin girişimleri azalır.
- 6- Seçimlilik artar.

Eser element analizinde kullanılan zenginleştirme yöntemlerinin değerlendirilmesinde en önemli parametreler;

- Geri kazanma verimi
- Zenginleştirme katsayısı
- Kontaminasyon ve kayıplar
- Uygulanabilirlik (Referans standart maddelere)
- Numunenin miktarı

Eser element zenginleştirme yöntemlerinden yaygın olarak kullanılanlar şu şekilde sıralanabilir:

- Sıvı-sıvı ekstraksiyonu ile zenginleştirme,
- Katı faz ekstraksiyonu ile zenginleştirme
- Birlikte çöktürme ile zenginleştirme
- Uçurma ile zenginleştirme
- Elektrolitik zenginleştirme
- İyon değiştiriciler ile zenginleştirme

2.2.1. Sıvı-sıvı ekstraksiyonu ile zenginleştirme

Ekstraksiyon, bir kimyasal bileşiğin bir sıvı fazdan bununla karışmayan başka bir sıvı faza geçmesi işlemidir. Ekstraksiyon yöntemi eser element analizinde kullanılan zenginleştirme yöntemleri arasında basitliği, geniş ve hızlı uygulanabilirliği sebebiyle önemli yer tutar. Eser element uygulamalarında, ekstraksiyon yönteminin bir fazı genellikle su, diğer fazı su ile karışmayan uygun bir organik çözücüdür. Herhangi bir bileşenin su fazından organik faza geçmesi bir denge olayıdır. Ekstraksiyon işleminde sulu fazdan organik faza geçen madde miktarının bağlı büyüklüğü olarak tanımlanan ekstraksiyon verimliliği, dağılma katsayısı (ekstraksiyon katsayısı) D ile belirlenir (2.1). D , denge kurulduğunda, elementin

organik fazdaki toplam konsantrasyonunun (bulunan bütün türlerinin derişimi, ΣC_0) sulu fazdaki toplam konsantrasyonuna (ΣC_{aq}) oranıdır.

$$D = \Sigma C_0 / \Sigma C_{aq} \quad (2.1)$$

Analitik amaçlarla %99 ekstraksiyon verimi yeterlidir. Ekstraksiyon yönteminin uygulamalarında ya ana bileşen organik faza geçip ortamdan uzaklaşırken, eser elementler sulu fazda bırakılır ya da sulu fazdaki eser elementler çoğunlukla şelatları veya değişik iyonik kompleksleri şeklinde organik faza geçirilirler. En yaygın uygulama şekli ikincisidir.

Ekstraksiyon yönteminde iki faz arasındaki dağılma katsayısını metal iyonu, pH, sulu fazdaki yan tepkimeler (maskelenme), ligant, çözücü türü ve sıcaklık etkiler. Seçimlilik bu değişikliklerden yararlanarak sağlanır.

2.2.2. Katı faz ekstraksiyonu ile zenginleştirme

Geleneksel sıvı-sıvı ekstraksiyon uygulamalarının fazla miktarda çözücü harcanması, çok zaman alması ve yüksek maliyetli olması gibi dezavantajları vardır. Ayrıca bu yöntemler, ekstraksiyon sırasında emülsiyon faz oluşması, gerekli saflığa sahip olmayan ekstraktlar elde edilmesi, çözücülerin yeterince uzaklaştırılamaması ve duyarlı kantitatif sonuçlar elde edilememesi gibi istenmeyen durumlara da neden olabilmektedir. Sıvı-sıvı ekstraksiyonu dışında santrifüj etme, süzme, distilasyon gibi diğer önemli ekstraksiyon metotları da benzer sakıncalara sahiptir.

Bu metotlara alternatif olarak, 1970'li yılların ortalarında yeni bir teknik olan katı faz ekstraksiyonu (solid phase extraction, SPE) metodu kullanılmaya başlandı. Bu yöntem, temel olarak küçük, tek kullanımlık ekstraksiyon kolon veya disklerine çeşitli tutucu maddelerin (adsorban) doldurulması ve sıvı numunelerin, ayırma, zenginleştirme amaçlarıyla hazırlanmış olan bu kolon ve disklerden geçirilmesi esasına dayanmaktadır. Sıvı örneğin kolondan geçirilmesi, yerçekimi vasıtasıyla gerçekleştirilebildiği gibi, zaman kaybının önüne geçmek amacıyla vakum manifoldları yardımıyla da yapılabilir. Katı faz ekstraksiyon metodunda kolondan geçirilme sırasında numune molekülleri ile tutucu madde arasında kimyasal bir etkileşim meydana gelir. Bu etkileşimden faydalanarak maddelerin ayrılma işlemi başlıca iki yolla gerçekleştirilir. Birinci yöntemde ilk aşamada, analiz edilecek bileşik tutucu maddeye bağlanarak kolon içinde tutulurken, çözelti ve istenmeyen bileşenler bu madde ile herhangi bir etkileşime girmezler. Daha sonra istenmeyen

bileşenler uygun yıkama çözeltisi ile uzaklaştırılır ve analiz edilecek bileşen tutucu maddeden uygun bir çözelti yardımıyla çözdürülerek alınır. Daha az tercih edilen ikinci yöntemde ise, istenmeyen bileşenlerin tutucu madde ile etkileşimi söz konusudur. Özellikle atık yağlar gibi matriksden ayrılması zor olan maddelerin analizinde kullanılan bu yöntemde, matriksteki istenmeyen bileşenler tutucu madde tarafından sıkı şekilde bağlanırlar. Asıl aranan madde ise tutucu madde ile etkileşime girmez ve uygun çözelti yardımıyla çözdürülerek toplanır. Bu yöntemde, kolon içerisindeki tutucu maddenin oluşturduğu katı faz filtre işlevi görmektedir. Katı faz ekstraksiyon metodu, klasik sıvı-sıvı ekstraksiyon ile karşılaştırıldığında daha hızlı, az çözücüye ihtiyaç duyan, emülsiyon oluşumun şekillenmediği, çok daha ucuz bir bir tekniktir [8].

2.2.3. Birlikte çöktürme ile zenginleştirme

Bu yöntem elementlerin ayrılmasında çöktürme metotlarının sulu çözeltilerdeki bileşiklerinin çözünürlüklerinin farklı olmasına dayanır. Çöktürme metotları çoğunlukla eser elementlerin ayrılmasında kullanıldığı gibi, ana bileşenin eser bileşenlerden ayrılmasında da kullanılır.

Eser elementlerin çözeltilerden birlikte çöktürme metodu ile kantitatif olarak ayrılmasında kollektör denilen bir ana çökelti kullanılır. Birlikte çöktürmenin mekanizması deneysel şartlara ve eser element ile taşıyıcının fiziksel ve kimyasal özelliklerine bağlıdır. Buna göre birlikte çöktürme, hapsolme, karışık kristal oluşumu veya adsorpsiyon şeklinde üç tür mekanizma ile gerçekleşir. Taşıyıcı ve eser maddeler benzer kimyasal özellik gösterirlerse, birlikte çöktürüldüklerinde istenilmeyen karışık-kristal yapısı gösterebilirler. Zıt özellikler (asit ve baz özelliği gibi) gösterirlerse, birlikte çöktürme işlemi kimyasal bileşik oluşumu ile sonuçlanır.

Karışık kristal oluşumunda çöktürme işlemi ne kadar yavaş yapılırsa, birlikte çökme o kadar çok olur. Eğer kristal oluşumu hızlı yapılırsa, kristal hızla büyürken çökelti yüzeyinde bulunan yabancı iyonlar ve çözücü molekülleri mekanik olarak hapsolür. Yavaş çökmede hapsolme ihtimali çok azdır.

Adsorpsiyonun çok olup olmaması oluşan çökeltinin yüzeyinin durumuna bağlıdır. Bir çökelti oluştuğunda yüzey anizotropik yük dağılımına sahiptir. Bu yüzden herhangi bir kristal, çözeltideki zıt yüklü iyonlarla etkileşir ve bu iyonlarla birlikte çökme sağlanır.

Numune çözeltisine, oluşan çökeltinin santrifüjlenip veya süzülerek kolayca ayrılabilceği miktarda çökelti oluşmasını sağlamak için yeterli miktarda taşıyıcı ilave edilmelidir. Aynı zamanda taşıyıcı miktarının girişim yapan iyonların adsorpsiyonunu önlemek için mümkün olduğu kadar az olması da gerekmektedir. Pratikte 50–200 ml’lik numune çözeltisi için 2–5 mg taşıyıcı kullanılır. Ana bileşeni eser bileşenden ayırmak için çöktürme işleminin kullanılması yaygın değildir. Çünkü ana bileşen çökerken eser bileşenleri de sürükleyip birlikte çöktürebilir. Bu da madde kaybına yol açar.

2.2.4. Uçurma ile zenginleştirme

İnorganik eser analizde, metallerin uçurma ile zenginleştirilmeleri yaygın değildir. Fakat kolay uçucu bazı elementler için vazgeçilmez bir yöntemdir. Uçurma ile zenginleştirmede matriks ile eser element arasında uçuculuk farkının büyük olması gerekir. Maddelerin uçuculuğu kimyasal yapılarına bağlıdır. İnorganik bileşiklerde kovalent karakter arttıkça uçuculuk artar.

Uçurma ile ayırma işlemi hem matriks hem de eser element uçurularak ayrılabilir. Prensipte olarak hangisi daha uçucu ise o uçurulur.

Eser elementlerin uçurulması işlemi, metalik özellik göstermeyen elementlerle, elementel halde veya halojen, hidrojen ve oksijen ile yapmış oldukları komplekslerinde yüksek buhar basıncı gösteren yarı metallerle uygulanır. AAS’de kullanılan hidrürüne çevirme (arsenik, civa selenyum, tellür, antimon için) buna örnektir. Ana bileşenin uçurularak (destilasyon, süblimleşme) uzaklaştırılması halinde, büyük miktarda reaktifte ihtiyaç duyulmadan eser elementler deriştirilebilir. Tercih edilen bu durumda, ana bileşen özellikle su gibi bir sıvı, bir organik çözücü, uçucu bir asit veya amonyak çözeltisidir. Ana bileşenin buharlaştırılması esnasında bazen eser bileşenlerin uçuculuğunu azaltıcı maddeler ilave edilebilir. Örneğin; birkaç damla derişik sülfirik asidin ilavesi uçucu metal klorürlerinin kaybını azaltır.

Bu yöntemin bazı dezavantajları bulunmaktadır. Bunlar:

1. Bazı elementler elementel veya bileşikleri halinde zenginleştirme sırasında buharlaşıp kaybolabilirler veya buharlaşmanın yapıldığı yüzeye adsorbe olurlar.

2. Eğer örneğin, toplam çözünmüş katı içeriği yüksekse, uçurma sonucu zenginleşerek tolere seviyesinin üzerine çıkar ve hatta bazı bileşiklerin çözünürlükleri aşarak çökelti oluşumu gibi yok olmalar gözlenebilir.

3. İşlem yavaştır, zenginleştirme faktörüne bağlı olarak fazla zaman alabilir ve dolayısıyla kontaminasyon riski artar.

4. Uçurma sırasında kabın dibinde oluşan geniş yüzeyli tortunun tayin elementini adsorplama riski büyüktür.

2.2.5. Elektrolitik ile zenginleştirme

Elektroliz yöntemleri ile çeşitli çözeltilerden ağır metallerin ayrılması eser miktarlar için uygun bir yöntemdir. Bir elementin elektrolitik olarak biriktirilmesi, büyük ölçüde elektrolit ve numunenin bileşimine, elektrot türüne ve şekline, elektroliz hücresine ve diğer deneysel değişkenlere bağlıdır.

Eser elementlerin zenginleştirilmesinde çok kullanılan potansiyel kontrollü elektrolizin yanı sıra, sıyırma yöntemleri de yaygın olarak kullanılır.

2.2.6. İyon değiştiriciler ile zenginleştirme

İyon değiştiricilerin kullanıldığı bu teknik, bir katı maddenin yapısında bulunan iyonları temasta bulunduğu çözelti içindeki aynı cinsten yüklü (pozitif iyonların pozitif iyonlarla, negatif iyonların negatif iyonlarla) başka iyonlarla bir dengeye göre değiştirmesi özelliğine dayanır. Bu amaçla kullanılan katı maddeler, çözelti ortamında çözünmeyen büyük moleküllü doğal ve yapay maddelerdir. Bunlar organik ve inorganik olabilirler. İnorganik olanlar çok eskiden beri bilinen killer ve zeolitlerdir. Zeolitler genel olarak $\text{Na}_2\text{Al}_2\text{Si}_4\text{O}_{12}$ formülüne sahip olup yapılarındaki Na^+ iyonları Fe^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} gibi iyonlarla değiştirme özelliğine sahiptir. Organik olanlar ise 1937'den beri kullanılmakta olan, yapılarında sayılamayacak kadar çok sayıda iyonlarına ayrılabilen fonksiyonel gruplar içeren, çapraz bağlı, büyük moleküllü polimer maddelerdir. Katyonik ($-\text{SO}_3\text{H}$, $-\text{COOH}$ ve $-\text{OH}$ gibi fonksiyonel gruplar içerenler) ve anyonik ($-\text{NR}_3^+$, $-\text{NR}_2^+$, $-\text{NRH}$ ve NH_2 gibi gruplar içerenler) değiştiriciler olarak ikiye ayrılır.

İyon değiştirme tekniği ile büyük hacimli çözeltiler küçük bir hacimden geçirilirken, eser elementlerin seçimli olarak adsorplanmaları sağlanır. Adsorplanan eser elementler küçük hacimli bir eluent ile ikinci faza alınarak zenginleştirilir.

Bu yöntemde, eser elementin dağılma katsayısının büyük, matriks elementinin dağılma katsayısının küçük olması durumunda eser element iyon değiştirici kolonda tutulur.

İyon değiştirici seçiminde, fonksiyonel grupların seçimliliği, değiştirme kapasitesi, değiştirme hızı, iyon değiştiricinin rejenerasyonu ve uygun eluent kullanılması dikkat edilecek husustur.

Eser elementlerin iyon değiştiricilerle matriksten ayrılması ve zenginleştirilmesi iki şekilde yapılmaktadır. Bunlar ;

1. Çalkalama (Batch) Metodu: Uygun pH 'daki belli miktar numune çözeltiye belli miktar iyon değiştirici reçine ilave edilerek karışım, tayin elementinin reçineye bağlanmış ve çözeltide kalan miktarları arasında denge kurulana kadar çalkalanır. Birçok uygulamada reçine tarafından alıkonma oranı %100 dür. Reaksiyon tamamlandıktan sonra reçine filtre edilerek tayin elementi ana çözeltideki matriksten ayrılmış olarak geri kazanılır.

Bu metodun zenginleştirme oranının sınırlı olması, alıkonma veriminin yüksek olmaması, kontaminasyon ve madde kaybına neden olması ve tekrarlanabilirliğin az olması gibi dezavantajları olsa da çoğunlukla herhangi bir reçinenin numunedeki tayin edilecek eser elemente uygunluğu için yapılacak ön denemeler ve deneysel kriterlerin tespiti (adsorpsiyon pH aralığı, elusyon pH, çalkalama süresi vb.) için daha uygundur.

2. Kolon Metodu: Analitik uygulamalarda genellikle tercih edilen bu metotta uygun pH'daki numune çözelti reçine doldurulmuş kolondan geçirilir. Kolondaki reçine tarafından alıkonan iyonlar, küçük hacimde uygun bir reaktif ile elue edilir. Böylece hem tayin elementinin ana matriksten ayrılması hem de zenginleştirilmesi sağlanmış olur. Ayrıca alıkonma oranı çalkalama metoduna göre daha yüksektir.

2.3. Eser Elementlerin Adsorpsiyonu

Gaz, sıvı veya herhangi bir çözeltiden çözüneneye ait molekül ya da iyonların katı bir madde yüzeyinde tutunarak birikmesi olayına adsorpsiyon denir.

Adsorpsiyon olayı sabit sıcaklık ve sabit basınçta kendiliğinden olduğu için adsorpsiyon sırasındaki serbest enerji değişimi ΔG daima negatif işaretlidir. Diğer

tarafından gaz ya da sıvı ortamda daha düzensiz olan tanecikler katı yüzeyinde tutunarak daha düzenli hale geldiklerinden dolayı adsorpsiyon sırasındaki entropi değişimi ΔS de daima negatif işaretlidir. Bu durum adsorpsiyon sırasındaki entalpi değişiminin de negatif işaretli olmasını yani ekzotermik olduğunu gerektirmektedir [9].

Adsorpsiyon olayı maddenin sınır yüzeyinde, moleküller arasındaki kuvvetlerin denkleşmemiş olmasından kaynaklanır. Adsorpsiyon ısısı da katı yüzeyindeki denkleşmemiş kuvvetler ile adsorplanan tanecikler arasındaki etkileşimlerden ileri gelir. Adsorpsiyon ısısı -20 kJ/mol civarında olan etkileşimler sonundaki tutunmalara fiziksel adsorpsiyon, -200 kJ/mol civarında olan etkileşimler sonundaki tutunmalara ise kimyasal adsorpsiyon denir. Fiziksel adsorpsiyon sırasında atom, molekül ya da iyon şeklinde olabilen adsorplanan tanecikler ile katı yüzeyi arasında uzun fakat zayıf olan Van der Waals bağları, dipol-dipol etkileşimi ve hidrojen bağları oluşumu etkindir. Kimyasal adsorpsiyon sırasında ise, tanecikler ile yüzey arasında genellikle kovalent bağ olmak üzere bir kimyasal bağ oluşmaktadır. Kimyasal adsorpsiyon yalnızca tek tabakalı olabildiği halde, fiziksel adsorpsiyon tek tabakalı ya da çok tabakalı olabilir. Diğer taraftan fiziksel adsorpsiyon tersinir olarak yürütülebildiği halde kimyasal adsorpsiyon çoğunlukla tersinmezdir. Adsorpsiyon ve desorpsiyonun yavaş olmasından dolayı, eser elementlerin ayrılması ve zenginleştirilmesi için kimyasal adsorpsiyon çok uygun değildir.

Metaller ve plastikler de dahil olmak üzere bir kristal yapıya sahip olsun ya da olmasın tüm katılar az veya çok adsorplama gücüne sahiptir. Adsorplama gücü yüksek olan bazı doğal katılar, kömürler, killer, zeolitler ve çeşitli metal filizleridir. Yapay katılar ise, aktif kömürler, moleküler elekler, silika jeller, metal oksitleri ve özel polimerlerdir.

Adsorplayıcı maddeler polar (silika jel, Amberlit XAD reçineleri, alümina, zeolitler) ve apolar (kömürler, plastikler, grafit, parafin) olabilir. Polar adsorplayıcılarda elektriksel etkileşimler etkili olurken, apolar adsorplayıcılarda daha çok dispersiyon kuvvetleri etkili olmaktadır. Adsorplanan maddelerin elektriksel yükleri, polar olup olmayışları, iyon veya molekül çapları adsorpsiyon olayında etkilidir. Polar adsorbanlar doymamış veya polar molekülleri adsorplar. Adsorplanan maddenin içinde bulunduğu çözücünün özellikleri ve çözücü-adsorplanan madde etkileşimleri adsorpsiyon verimini etkiler.

Adsorbanın bağıl yüzey alanı ve tanecik boyutu da ayırma tekniklerinde önemli ölçütlerdendir. Adsorbanın seçiciliği doğrudan yüzey alanı ile ilişkili değildir. Ancak, artan yüzey alanı adsorplama kapasitesini artırır. Adsorbanın tanecik boyutunun azalması (ayırma gücünü) artırır.

2.3.1. Mikroorganizmalarla adsorpsiyon [4,10,11]

Mikroorganizmalarla metal adsorpsiyon kinetiği iki basamaktan oluşur. Birinci basamak organizma yüzeyinde fiziksel adsorpsiyon veya iyon değişimidir. Bu basamağa genellikle pasif giderim denir. Bu basamak çok hızlıdır ve mikroorganizma metal ile etkileştikten kısa bir süre sonra denge oluşur. Hızlı giderme genellikle yüzey adsorpsiyonu sonucudur. Mikroorganizmanın, sulu ortamdan hücre yüzeyine metal adsorplamasını açıklamaya çalışan çeşitli hipotezler ileri sürülmektedir. Bunlar;

i. Metal iyonları hücre yüzeyindeki negatif yüklü reaksiyon alanları ile kompleks oluşturarak ve/veya pozitif yüklü reaksiyon alanları ile yer değiştirerek adsorplanabilir. Bu olaya iyonik adsorpsiyon adı da verilir. Hücre duvarındaki polisakkaritler, sülfat, amino ve karboksil gruplarını içerir. Algal polisakkaritlerin çoğu, örneğin kahverengi ve kırmızı deniz alglerinin yapısal bileşeni sodyum, potasyum, kalsiyum ve magnezyum gibi metal katyonlarının tuzlarından oluşmaktadır. Çift değerlikli metal iyonları, polisakkaritlerin aynı yüklü iyonlarıyla yer değiştirir.

ii. Bazı mikroorganizmaların hücrelerinin dış zarlarından uzanan polimerler sentezleyebildikleri, bu polimerlerin çözüldükten metal iyonlarını bağlayabilme yeteneğine sahip olduklarıdır.

iii. Hücre duvarındaki proteinler metali bağlamak üzere aktif bölgeler oluştururlar. Ağır metallerin proteinlere karşı kuvvetli ilgisi vardır. Proteinlerin peptid bağlarının azot ve oksijeni, hidroksil, amino, fosfat gibi grupları, iyonların metal iyonları ile yer değiştirmesi için uygundur. Amfolit karakterde olan proteinlerinde, molekülün türüne göre belirli bir izoelektrik pH'sı vardır. Pozitif yüklü metal iyonlarının izoelektrik noktanın altında katyonik bir karakter taşıyan protein moleküllerinin içerdiği grupların aynı yüklü iyonlarıyla yer değiştirdikleri, izoelektrik noktanın üstündeki pH'larda ise negatif yüklü reaksiyon alanlarıyla

kompleksler oluşturarak adsorplandıkları düşünülebilir. Dolayısıyla ortam pH'nın ağır metal adsorpsiyonunda etkin bir parametre olması öngörülebilir.

iv. Bazı mikroorganizmaların yüzeylerinde yüksek moleköl ağırlıklı polifosfatlar veya kimyasal olarak bunlara benzeyen gruplar, metali kompleksleri şeklinde kendilerine bağlarlar.

Günümüze değin yapılan çalışmalar göstermektedir ki kullanılan mikroorganizmanın hücre tipi ve içerdığı temel bileşenler metal adsorpsiyon mekanizmasını belirlemektedir. Metal alımında ikinci basamak, metal iyonlarının hücre zarından içeri taşınımını da içeren, metabolik aktiviteye bağlı, daha yavaş, hücre içi giderim basamağıdır. Bu basamağa aktif giderim denir .

Isısal veya kimyasal yöntemlerle öldürölmüş mikroorganizmalarla yapılan adsorpsiyon işlemleri "biyosorpsiyon" olarak tanımlanmaktadır. Biyosorpsiyon aslında fiziksel ve kimyasal adsorpsiyon, iyon değışimi, koordinasyon, kompleksleşme, mikro-çökelme vb. gibi bir çok pasif giderim proseslerini adlandırmakta kullanılan ortak bir terimdir. Öte yandan bazı öldürme tekniklerinin biyokütlenin biyosorpsiyon kapasitesini arttırdığı da kanıtlanmıştır .

3. ATOMİK ABSORPSİYON SPEKTROSKOPİSİ

3.1. Genel

Atomik spektroskopisi 70 kadar metal ve yarımetalın eser miktarlarının analizinde kullanılan elektromanyetik ışının atomlar tarafından absorplanması prensibine dayanan bir metottur [12]. Atomik absorpsiyon spektroskopisi (AAS) ametallerin analizi ve kalitatif analiz için uygun değildir. Ametallerin, hava bileşenlerinin (N₂, O₂) ışını absorpladığı vakum UV (<200 nm) bölgede rezonans absorpsiyonu vermesi sebebiyle AAS ile analizleri yapılamamaktadır. Bu metodun her element için ayrı bir ışın kaynağına ihtiyaç duyması ve her seferinde enstrümantal koşulların ayarlanması gereksinimi sebebiyle kalitatif analiz yapılması laboratuvarında bulunan lamba sayısı ile kısıtlı, zaman alıcı bir işlem haline gelmektedir. Diğer emisyon teknikleriyle karşılaştırıldığında bu AAS metodunun en önemli dezavantajıdır. Günümüzde, sürekli ışın kaynaklı AAS (CS AAS: Continuum Source Atomic Absorption Spectrometry) cihazı geliştirilmiştir. Böylece çok sayıda farklı ışık kaynaklarına ihtiyaç duyulmaksızın, çok hızlı ve seri olarak çoklu element analizi gerçekleştirilir.

3.2. Absorpsiyonun Temel Kuralları

Kuantum teorisine göre $h\nu$ enerjili bir foton atom tarafından absorplanırsa atomun temel seviyesindeki değerlik elektronu uyarılır ve enerjisi daha büyük olan kararsız uyarılmış temel seviyeye geçer. İki enerji seviyesi arasındaki bu geçiş Planck tarafından aşağıdaki eşitlikte (3.1) ifade edilmiştir:

$$\Delta E = E_i - E_o = h\nu = hc/\lambda \quad (3.1)$$

E_i = Elektronun uyarılmış seviyedeki enerjisi

E_o = Elektronun temel seviyedeki enerjisi

h = Planck sabiti (6.62×10^{-27} erg.s.)

c = Işın hızı

ν = Absorplanan ışının frekansı

λ = Absorplanan ışının dalga boyu

1760 yılında Lambert homojen bir ortamdan geçen ışın miktarının ışının geçtiği tabaka kalınlığına (d) bağlı olduğunu, buna karşılık ortamı terkeden ışının şiddetinin (I) gelen ışının şiddetine (I_0) oranının ışın şiddetinden bağımsız olduğunu bulmuştur [13].

$$I=I_0.e^{-xd} \quad (3.2)$$

x ışının ortam içersinde absorplanmasının bir ölçüsü olup absorpsiyon faktörü olarak tanımlanır ve konsantrasyon ile orantılıdır.

$$x=k.c \quad (3.3)$$

Lambert yasası, Beer tarafından geliştirilmiş ve değiştirilerek günümüzde kullanılan şekline dönüştürülmüştür. Buna rağmen Lambert-Beer yasası olarak bilinmektedir.

$$A=\log I_0/I=k.c.d \quad (3.4)$$

A=Absorbans

I_0 / I =Gelen ışının şiddeti / Ortamı terkeden ışının şiddeti

k=Absorpsiyon katsayısı (Absorplayan maddenin cinsine ve dalga boyuna bağlıdır.)

c=Absorplanan maddenin konsantrasyonu

d=Işının geçtiği tabakanın kalınlığı

3.3. Atomik Spektrum ve Hat Genişlemesi

Planck eşitliğine göre (3.1) bir atom tarafından sadece iki enerji seviyesi arasındaki farka karşı gelen belirli dalga boyundaki ışınlar absorplanabilir ve absorpsiyon sonucunda atom yüksek enerjili (uyarılmış) hale geçer. Tekrar düşük enerjili yani temel hale dönerken absorpladığı enerjiyi genellikle ışın şeklinde geri verir [14].

Atomların (veya moleküllerin) termal ya da elektriksel olarak uyarılması sonucu absorplanan enerjinin ışın şeklinde geri verilmesine emisyon adı verilir. Eğer atomlar (veya moleküller) ışın tarafından uyarılacak olursa yapılan emisyon floresans olarak adlandırılır. Atomlar yalnızca belirli enerji seviyelerine sahip olduklarından atomik absorpsiyon ve emisyon spektrumları kesiklidir. Ancak atomik absorpsiyon hatları monokromatik değildir ve belirli bir hat genişliğine sahiptir.

Atomik absorpsiyon hatlarının genişlemesine etki eden faktörler şu şekilde sıralanabilir [15]:

- 1) Doğal hat genişlemesi
- 2) Doppler genişlemesi
- 3) Basınç genişlemesi
- 4) İnce yapı genişlemesi

3.3.1. Doğal hat genişlemesi

Doğal hat genişlemesi Heisenberg belirsizlik prensibinin bir sonucudur. Kuantum mekaniğinden bilindiği gibi bir atomun enerji seviyeleri belirli bir değerde olmayıp E_1 - E_2 geçişine ait enerji seviyeleri ΔE_1 ve ΔE_2 gibi enerji genişliğine (belirsizliğine) sahiptir. Bu durumda uyarılma sonucu tek bir enerji yerine iki enerji teriminin belirsizliklerinin toplamı ($\Delta E_1 + \Delta E_2$) mertebesinde hat genişlemesi söz konusudur.

Heisenberg Belirsizlik Kuralına göre E_1 ve E_2 seviyelerindeki belirsizliklere karşı gelen ΔE_1 ve ΔE_2 değerleri, atomların E_1 ve E_2 seviyelerindeki ortalama alıkonma süreleri olan Δt_1 ve Δt_2 ye

$$\Delta E_1 \cdot \Delta t_1 = h/2\pi \quad (3.5)$$

$$\Delta E_2 \cdot \Delta t_2 = h/2\pi \quad (3.6)$$

eşitliklerine göre bağlanabilir.

E_1 ve E_2 arasındaki geçiş için doğal hat genişliği (veya toplam belirsizlik),

$$\Delta E = (1/\Delta t_1 + 1/\Delta t_2) \cdot h/2\pi \quad (3.7)$$

veya

$$\Delta \nu_N = (1/\Delta t_1 + 1/\Delta t_2) \cdot 1/2\pi \quad (3.8)$$

şeklinde yazılabilir. Atomik absorpsiyonda alt seviye kararlı olduğundan alıkonma süresi Δt_1 sonsuzdur.

Bu durumda,

$$\Delta \nu_N = (1/\Delta t_2) \cdot 1/2\pi \quad (3.9)$$

olur. Δt_2 10^{-8} - 10^{-9} s olduğundan (3.9) eşitliğine göre E_1 - E_2 geçişi için bulunacak olan doğal hat genişliği 10^{-5} nm mertebesinde ve toplam hat genişlemesine katkısı ihmal edilebilir [15].

3.3.2. Doppler genişlemesi

Atomların ışık kaynağına doğru veya ışık kaynağından aksi yöne doğru ısısal hareketlerinden kaynaklanır. Işık kaynağına doğru hareket eden atomlar daha uzun dalga boylarını absorplarlar. Işın kaynağının aksi yönde hareket eden atomlar daha kısa dalga boylarını absorplarlar. Bu Doppler etkisi olarak bilinir. Doppler etkisine bağlı hat genişlemesi, sıcaklığın bir fonksiyonu olan atomların hız dağılımına bağlıdır. Doppler etkisi emisyon hatlarının da genişlemesine sebep olur. Dedektöre doğru hareket eden uyarılmış atomlar daha kısa dalga boylarına, dedektörün aksi yönüne hareket edenlerde daha uzun dalga boylarına kayarlar.

Eğer ν_0 frekansında absorpsiyon yapacak olan atomlar ışık kaynağından aksi yöne doğru v hızıyla (ışın kaynağına doğru $-v$ hızıyla) hareket ederlerse, Doppler kuralına göre ν_0 yerine $\Delta\nu_D$ kadar kayma yaparak ν_D frekansında absorplarlar. Doppler yarı genişliği,

$$\Delta\nu_D = 2 \nu_0 / c \left(2 \ln 2 \right)^{1/2} RT/M \quad (3.10)$$

veya

$$\Delta\nu_D = 7.16 \times 10^{-6} \nu_0 (T/M)^{1/2} \quad (3.11)$$

eşitliğine göre verilir.

M = Absorpsiyon yapan atomun atom ağırlığı

T = Mutlak sıcaklık

c =Işın hızı

3.3.3. Basınç genişlemesi

Absorpsiyon hatlarının genişlemesinin nedenlerinden birisi de absorpsiyon yapan atomların ortamda bulunan yabancı gaz atomları veya molekülleriyle çarpışmasıdır. Bu çarpışma sonucunda absorpsiyon hatları genişler, hat maksimumu kayar ve hat profilinin simetrisi bozulur. Basınç genişlemesi, yabancı gazın molekül ağırlığına, absorplama yapan atomun atom ağırlığına ve ortamın sıcaklığına bağlıdır. Deneysel olarak yabancı gazın basıncı arttıkça hat genişlemesinin, hat maksimumundaki kaymanın ve hat profilinin asimetrisinin arttığı gözlenmiştir.

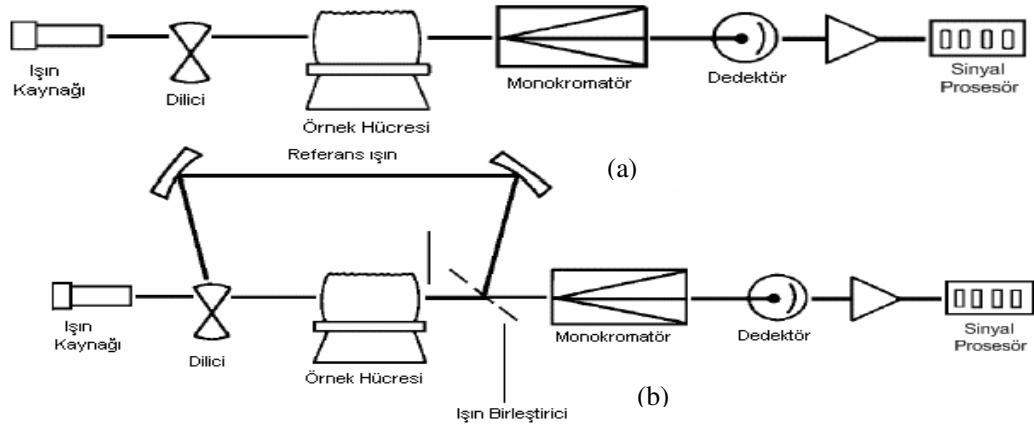
3.3.4. İnce yapı genişlemesi

Çekirdek spininin sıfırdan farklı olması ve/veya çeşitli izotopların varlığı nedeniyle ortaya çıkar. Böylece her hat birbirine çok yakın ve her biri ayrı bir absorpsiyon hattı gibi davranan farklı bileşenlere ayrılır.

Çekirdek spin momentiyile elektron spin momentinin etkileşmesi sonucu çekirdekle elektron yörüngesi arasında manyetik etkileşme olur ve elektronun enerji seviyeleri yarılır. İnce yapı yarılmaları 10^{-3} - 1 cm^{-1} mertebesindedir.

3.4. Atomik Absorpsiyon Spektrofotometresi (AAS) [12,13,16]

Atomik absorpsiyon spektroskopisinin ana prensibi, temel haldeki analiz elementlerinin atomları üzerine absorpsiyon yapabilecekleri dalga boyunda ışın göndererek, gelen ve geçen ışık şiddetinin ölçülmesidir. Bu amaçla kullanılan atomik absorpsiyon spektrofotometreleri; analiz elementinin absorplayacağı dalga boyunda ışıma yapan bir ışın kaynağı, numune çözeltisi içindeki analiz elementini atomik gaz buhar bulutu haline getiren bir atomlaştırıcı, çalışılan dalga boyunu diğer dalga boylarından ayıran bir monokromatör, ışın şiddetini ölçen bir dedektör, çok sayıda elektronik devrelerden oluşan ve çeşitli sonuçların verildiği bir göstergedir. Şekil 3.1’ de tek yollu ve çift yollu atomik absorpsiyon spektrofotometreleri gösterilmektedir.



Şekil 3.1: Tek ışın yollu (a) , çift ışın yollu (b) AAS cihazlarının şematik gösterimi.

3.4.1. Işın kaynakları

Atomik absorpsiyon spektrofotometresinde tayin edilen elementlerin absorpsiyon hat genişliğinden daha dar emisyon spektrumu veren ışın kaynakları kullanılmalıdır. Aksi halde hassasiyeti düşüren düşük absorbans değerleri elde edilir.

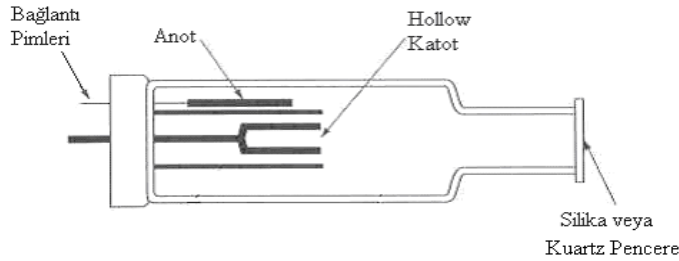
AAS’de kullanılan ışın kaynakları şu şekilde sınıflandırılabilir:

- 1) Oyuk katot lambaları
- 2) Elektrotsuz boşalım lambaları
- 3) Yüksek ışımalı lambalar
- 4) Sürekli ışın kaynakları

3.4.1.1. Oyuk katot lambaları

Atomik absorpsiyon spektrofotometresinde en çok kullanılan ışın kaynağı oyuk katot lambalarıdır. Oyuk katot lambaları ilk kez 1916 yılında Paschen tarafından dizayn edildikten sonra Walsh ve arkadaşları tarafından geliştirilerek basitleştirilmiştir [17]. Oyuk katot lambaları birkaç torr basınç altında inert bir gaz (neon veya argon) ile doldurulmuş 3–4 cm çapında 8–10 cm boyunda anot ve katot içeren bir cam silindirden oluşmaktadır (Şekil 3.2). Katot genellikle oyuk bir silindir şeklinde olup ya analiz elementinden yapılıp ya da analiz elementi ile kaplanır.

Katodun çapı 3–5 mm’dir. Anot ise tungsten, nikel, tantal veya zirkonyumdan yapılıp. Katodun tam karşısında UV ve görünür bölge ışınlarını geçiren kuartz veya camdan yapılmış bir pencere bulunur.



Şekil 3.2 : Oyuk katot lambasının yapısı.

Eğer lambadaki anot ile katot arasına 100–400 voltluk bir gerilim uygulanırsa lamba içindeki inert gaz atomları iyonlaşır. Pozitif yüklü gaz iyonları hızla katoda çekilirler ve yeterli enerjiye sahiplerse katottaki atomları yerlerinden kopararak bir atom bulutu oluştururlar. Bu atomların bir kısmı uyarılmış seviyededir ve temel hale

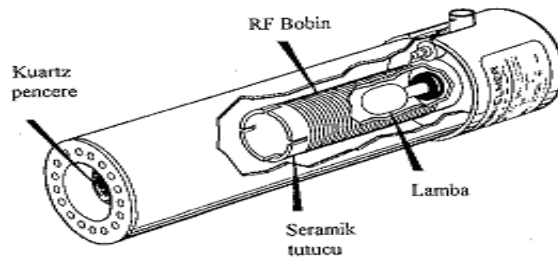
dönerken katottaki elementin karakteristik spektrumunu yayarlar. Oyuk katot lambalarında gereğinden daha yüksek potansiyel uygulanmamalıdır. Aksi takdirde gaz halinde çok fazla metal oluşturur ki bu metallerin de pek çoğu uyarılmamış halde olduklarından, uyarılmış atomların yaydığı ışığı adsorbe ederler (self absorpsiyon) ve ışın demetinin şiddetini düşürürler.

Atomik absorpsiyon spektroskopisi yönteminde her element için o elemente özgü bir oyuk katot lambasının spektrofotometreye yerleştirilmesi gerekir. Bu atomik absorpsiyon analizlerindeki en önemli dezavantajdır. Bu nedenle çok elementli oyuk katot lambaları düşünülmüştür. Bu amaçla kullanılacak metallere göre, katot alaşımlardan, metalik bileşiklerden veya toz haline getirilmiş metallerin karışımlarından yapılır. Çok elementli lambalar pratik olmasına rağmen her bir elementin emisyon şiddeti tekli lambanınkinden daha zayıftır. Bunun sonucunda da sinyal/gürültü oranı artar ve bu da kesinliği ve gözlenebilme sınırını etkiler.

3.4.1.2. Elektrotsuz boşalım lambaları

Elektrotsuz boşalım lambaları 8–10 cm uzunluğunda, 0,5–1 cm çapında, birkaç mg tayin elementini içeren (saf metal veya metal bileşiği) ve birkaç mmHg basıncında argonla doldurulmuş kapalı kuartz tüplerden oluşmuşlardır. Tüp yüksek frekanslı bir jenaratörün sarımları arasına yerleştirilmiştir ve birkaç wattan 200 watta kadar bir güçle uyarılır (Şekil 3.3). Elektrotsuz boşalım lambalarının ışın şiddeti oyuk katot lambasınınkinden daha fazladır.

Elektrotsuz boşalım lambaları özellikle vakum UV bölgede büyük avantaja sahiptir, çünkü bu bölgede tayin edilen elementler için uygun ışın kaynağı yoktur. Ayrıca yine bu bölgede hava, alev ve merceklerin absorpsiyonu ve aynaların zayıf yansıtma özellikleri nedeniyle yüksek ışın şiddeti oldukça önemlidir. Bu tür lambaların en büyük dezavantajı ise ömürlerinin kısa olmasıdır [16].



Şekil 3.3 : Elektrotsuz boşalım lambasının yapısı.

Elektrotsuz boşalım lambaları atomik absorpsiyon spektrofotometrelerinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır hatta birçok element için diğer ışın kaynaklarının yerini almaktadır. As, Se, Sb gibi uçucu ve küçük dalga boylarında (<200 nm) absorpsiyon ve emisyon yapabilen elementler için elektrotsuz boşalım lambaları kullanılır.

3.4.1.3. Yüksek ısımalı lambalar

Sullivan ve Walsh tarafından geliştirilen yüksek ısımalı lambalarda standart oyuk katottan başka bir çift yardımcı elektrot bulunmaktadır. Normal oyuk katot lambalarında katotta oluşan bütün atomlar uyarılmaz. Sadece uyarılan atomlar ışıma yapabileceklerinden yardımcı elektrotların amacı geriye kalan temel seviyedeki atomları uyarmak için gerekli ikinci akımı geçirmektir. Böylece ışın şiddetinde oyuk katot lambasına göre bir artış görülür.

3.4.1.4. Sürekli ışın kaynakları

Yeterli parlaklıkta ışıma yapan ışın kaynakları (hidrojen, döteryum, yüksek basınçlı ksenon veya halojen lambalar ilk bakışta bazı nedenlerden dolayı daha çekici görünebilir. Bunların emisyonu kararlıdır ve özellikle birden fazla element analizinde kullanışlı ve ucuzdurlar. Sürekli ışın kaynaklarının absorpsiyon hatlarının dar olması, yüksek kalitede bir monokromatörle bile analitik doğrusalıktan sapma gözlemlendiğinden ve yüksek absorpsiyonlarla çalışılmak mümkün olmadığından dolayı çok kısa bir zamana kadar bu lambalar atomik absorpsiyon spektrofotometresinde kullanılmıyordu. Son yıllarda CCD (Charge Coupled Device) dedektörlerinden yararlanarak özel olarak üretilen yüksek şiddetli sürekli ışın kaynaklarının kullanıldığı atomik absorpsiyon spektrofotometreleri geliştirilmiştir. Bu sayede çok sayıda element hemen hemen aynı anda tayin edilerek AAS'deki her element için lamba değiştirme dezavantajı ortadan kaldırılmaktadır [18-21].

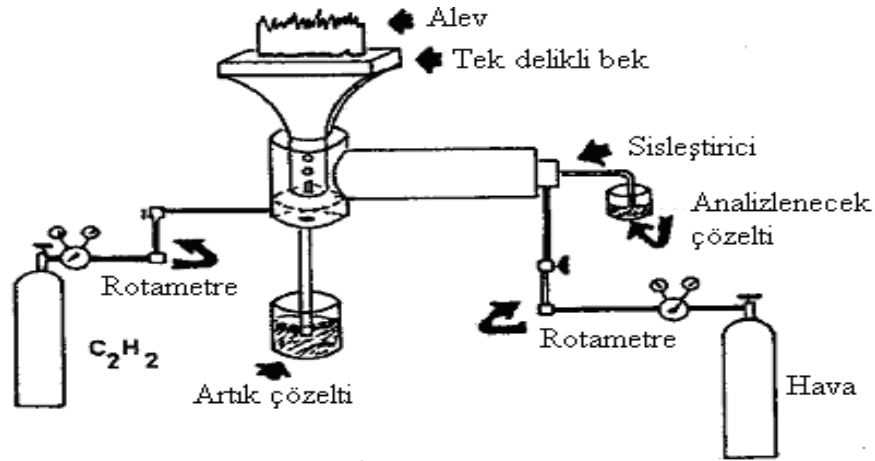
3.4.2. Atomlaştırmacılar [12,13]

Bir atomlaştırmacının (absorpsiyon hücresinin) en önemli görevi, bir numunede termal seviyede bulunan iyon ve moleküllerden analiz edilecek elementin atomlarını oluşturmaktır. Işın kaynağından gelen emisyon atomlaştırmacıdan geçirildiğinde bir kısmı termal ayrışma sonucu oluşturulan atomlar tarafından absorplanır. Bu nedenle AAS'de bir analizin başarısı, atomlaşmanın etkinliğine bağlıdır.

Uzun yıllar örneğin atomlarına ayrışması için atomik absorpsiyon spektrofotometresinde çözelti aleve püskürtülmüştür. Daha sonra alevsiz atomlaştırıcılar (grafit fırın tekniği, hidrür tekniği ve soğuk buhar tekniği) eser element veya ultra eser element analizinde büyük önem kazanmıştır. Atomlaştırıcılar alevli ve elektrotermal olmak üzere ikiye ayrılır.

3.4.2.1. Alevli atomlaştırıcılar [22]

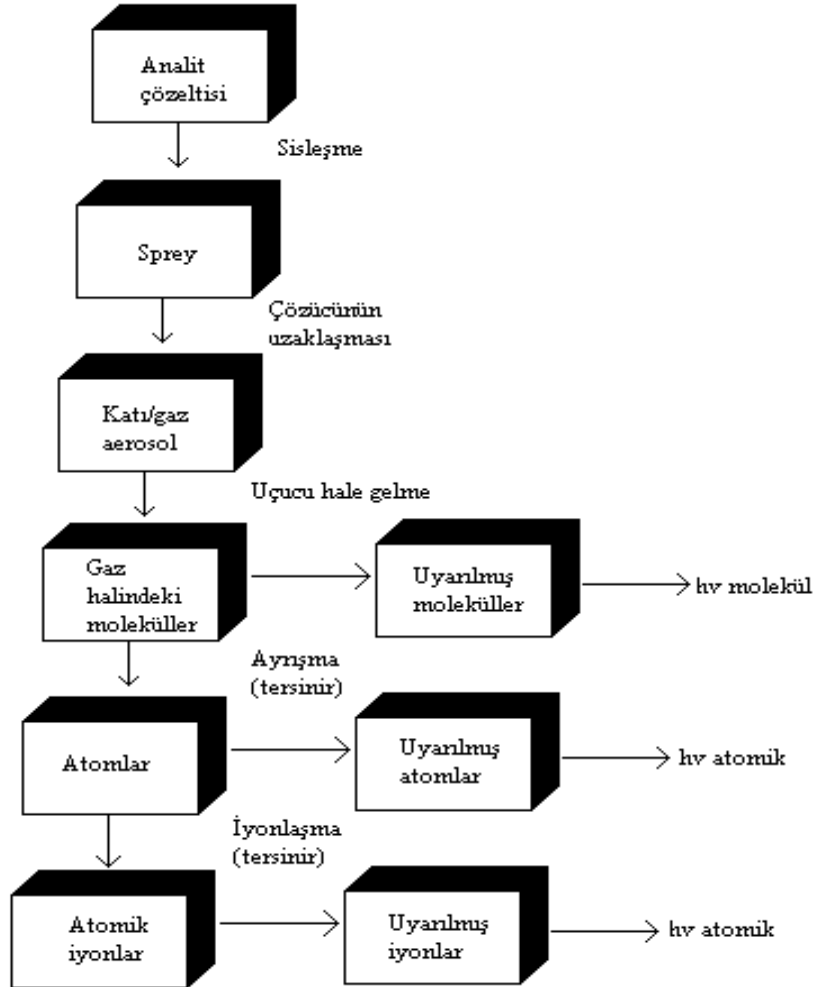
Alevli atomlaştırıcılarda numune çözeltisi aleve havalı (pnömatik) bir sisleştirci yardımıyla püskürtülür (Şekil 3.4). Böylece zamanla değişmeyen bir sinyal elde edilir ve bu sinyalin yüksekliği çözeltinin derişimiyle orantılı olup çözelti emilip püskürtüldüğü sürece değişmez.



Şekil 3.4 : Genel bir alev atomlaştırıcısı.

Numune çözeltisi aleve püskürtüldüğü zaman oluşan ilk olay çözücünün buharlaşmasıdır. Buharlaşma hızı, damlacıkların büyüklüğüne ve çözücü türüne bağlıdır. Buharlaşma sonucu oluşan katı parçacıklar (örneğin tuz kristalleri) ısı etkisi ile değişikliklere uğrar. Organik bileşikler yanarken inorganikler buharlaşır ve oluşan gaz moleküller atomlarına ayrılırlar. Bir alevde tayin edilen elementin ve numunedeki diğer elementlerin atomlarından başka CO, CO₂, C, H₂O, O₂, H₂, H, OH, NO, NO₂ gibi çeşitli yanma ürünleri de bulunmaktadır ve bunlar bazen aşırı miktarda olabilir. Ayrıca alevde çeşitli türler arasındaki denge tepkimeleri sonucunda yeni bileşikler oluşur. Eğer iki ayrı denge tepkimesi sonucu aynı ayrışma ürünü oluşuyorsa, tepkime ürünlerinin kısmi basıncı nedeniyle bu iki tepkime birbirini etkileyecektir. Ayrışmanın bu şekilde zayıflamasından başka analit atomlarının derişimi iyonlaşma ve/veya başka bir anyonla tepkimeye girmesi ile de etkilenebilir.

Bu nedenle alevdeki olaylar son derece karmaşıktır. Şekil 3.5’de alevde atomlaştırma sırasında oluşan süreçler şematik olarak gösterilmiştir. Çözeltilerde bulunan farklı maddeleri atom haline getirmek için farklı miktarda enerji gereklidir. Alev tarafından sağlanan enerji miktarı, alev sıcaklığıyla doğrudan orantılıdır. Alev sıcaklığındaki küçük değişiklikler yakıcı gazın, alevi besleyen yanıcı gaza oranını değiştirerek ayarlanabilir. İyi bir absorpsiyon ölçümü, atomlaşmanın tam olarak gerçekleştiği durumda yapılmalıdır. Bu nedenle alev atomlaşmanın tam olmasını sağlamalı ve analiz elementinin alev gazlarının tutuşma ürünleriyle ya da numunedeki bileşenlerle ikincil reaksiyonlarından kaçınılmalıdır. Alevin yükseltgen ya da indirgen karakteri oldukça önemlidir. Ayrıca AAS’de kullanılan alev, optik olarak geçirgen olmalıdır yani alevin kendisi herhangi bir absorpsiyon yapmamalı ve atomlaşma verimi yüksek olmalıdır.



Şekil 3.5 : Alevde atomlaştırma sırasında oluşan süreçler.

Çizelge 3.1: AAS’de kullanılan çeşitli yakıcı ve yanıcı gaz türleri ve bunların oluşturduğu alevlerin maksimum sıcaklıkları.

Yanıcı Gaz	Yakıcı Gaz	Maksimum Sıcaklık, °C
Doğal Gaz	Hava	1800
Propan	Hava	1900
Hidrojen	Hava	2000
Asetilen	Hava	2300
Hidrojen	Oksijen	2700
Hidrojen	Azotprotoksit	2650
Propan	Azotprotoksit	2650
Asetilen	Azotprotoksit	2800
Asetilen	Oksijen	3100

Çalışmaların çoğunda hava-asetilen alevi kullanılır. Azotprotoksit(N_2O)-asetilen(C_2H_2) alevi, hava-asetilen aleviyle tayin edilemeyen ısısal olarak daha kararlı elementler için kullanılabilir. Bu alevin sıcaklığı, hava-asetilen alevine göre daha yüksektir. Analiti en yüksek verimle atomlaştırabilmek için (analit atomları derişiminin yüksek olması için) alev türü seçiminde analitin kararlılığı kadar oluşan atomların alev gazlarıyla verebileceği tepkimeler ve dolayısıyla alev ürünleri önemlidir. Bu nedenle alev türü, yakıcı ve yanıcı gaz oranları ve alev içinde gözlemin yapıldığı bölge seçimi çok önemlidir. Bu faktörler için uygun değerler aletin el kitabında verilmekle birlikte analizci tarafından her numune için optimize edilmelidir. Yakıcı ve yanıcı gaza ek olarak sıcaklığı kontrol etmek için bazen ek alev gazları kullanılmaktadır. Bunlardan en çok kullanılanlara örnek olarak argon-oksijen-asetilen alevi ve helyum-oksijen-asetilen alevi verilebilir.

AAS’de kullanılan yakıcılar iki çeşittir:

- 1) Ön-karıştırmaz (turbulent) yakıcılar
- 2) Ön-karıştırmalı (premix burner) yakıcılar

Ön-karıştırmaz yakıcılarda, numune çözeltisi, yükseltgeyici (yakıcı gaz) ve yakıt (yanıcı gaz) birbiriyle karışmadan ayrı ayrı aleve taşınırlar ve yakıcı başlığının hemen çıkışında karışırlar. Bu yakıcıların avantajı, alev gazları yakılmadan önce karıştırılmadığı için patlama olasılığı ortadan kalkar ve çabuk alev alan gazların güvenli bir şekilde kullanılmasını mümkün kılar. Dezavantajı ise, aleve büyük bir

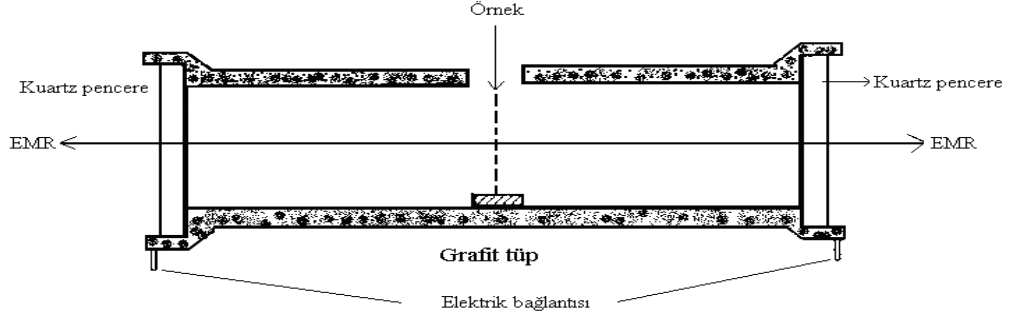
damla geldiği zaman tamamen buharlaşmayan katı taneciklere emisyon yaparak gürültüye (noise) sebep olmasıdır. Alevdeki gürültü, dedektör tarafından kaydedilen gürültü miktarını artırır. Bu da kararsız bir okumayla sonuçlanır. Numune damlacıklarının alevdeki alıkonma süresi içinde ancak buharlaşma tamamlandığı için örneğin küçük bir miktarı atomlaşır. Ayrıca bu yakıcılarda ışının alev içinde kat ettiği yol kısa olduğundan hassasiyet düşüktür. Bu sebeplerden dolayı bu tür yakıcılar AAS’de kullanılmaz.

Ön-karıştırıcılı yakıcılarda ise numune çözeltisi ve yakıcı gaz karışımı nebulizer adı verilen alev başlığı altındaki boşluğa emilir ve burada yanıcı gaz akımı ile karışarak küçük damlacıklar veya zerrecikler halinde sisleştirilir. Sisleştirilmiş numune ve gaz karışımı alev başına doğru taşınırken, akış yoluna yerleştirilmiş engellere çarpan büyük damlacıklar başlığın altında birikerek dışarı atılır ve aleve sadece çok küçük numune damlacıkları ulaşır. Püskürtme hücresinin görevi alevde buharlaşabilecek küçük parçacıkları seçip aleve göndermektir. Örneğin yaklaşık %90’ı ön karıştırma odasında kaybolur. Engellerin bir diğer görevi ise damlacıkların oksitleyici ve yanıcı gazlar ile aleve ulaşmadan önce tamamen karışmasını sağlamaktır.

Ön-karıştırmasız yakıcılarda aleve daha fazla numune girer. Ancak buharlaşma tamamlandığı için örneğin küçük bir miktarı atomlaşır. Ön-karıştırmalı yakıcılarda, daha düzgün yanan alev yüksek sinyal/gürültü oranı verdiği için nicel analizlerde tercih edilir. Bunların dezavantajı, yakıcı gaz ve yanıcı gaz ön karıştırma odasında yandığı zaman patlamalar oluşabilir.

3.4.2.2. Elektrotermal atomlaştırıcılar [12,22-24]

Elektrotermal atomlaştırıcılar (grafit fırınlar), gaz halinde serbest metal atomları oluşturmak için elektrikle ısıtılan grafit çubuklar, metal şeritler, metal bobinler ve grafit tüplerdir. En çok kullanılan elektrotermal atomlaştırıcı, dirençle ısıtılan grafit tüptür. Bu tip atomlaştırıcılar grafit fırınlı AAS olarak adlandırılır. Şekil 3.6’de grafit tüplü bir fırının basit bir şeması görülmektedir. Bu fırınlarda örneğin grafit tüpe enjekte edildiği küçük bir delik bulunmaktadır. Kaynaktan gelen ışın tüpün içersinden geçer. Bu fırınlarda örneğin atomik türlerinin fırın duvarlarına difüzlenmesini önlemek için genellikle pirolitik grafit ile kaplanır. Pirolitik grafit, karbonun inert atmosferde ısıtılmasıyla hazırlanır. Ayrıca fırın oksidasyona karşı Ar veya N₂ ile korunur.



Şekil 3.6 : Grafit tüplü bir fırının basit şeması.

Genellikle 10–50 µl arasındaki sıvı numune, numune verme oyuğundan, soğuk tüpün içine (tüp duvarlarına) veya tüpün içindeki platforma verilir. Bu amaçla otomatik pipetler veya daha yaygın olarak otomatik örnekleyiciler (autosampler) kullanılmaktadır. Tüp daha sonra programlanabilir bir güç kaynağı yardımıyla ısıtılır.

Elektrotermal atomlaştırıcılar alevle karşılaştırdığımızda,

Avantajları,

- 1) Duyarlılık $10^2 - 10^3$ kez daha büyüktür. Çünkü hem sisleştirciye gelen örneğin çoğu aleve ulaşmaz hem de analit atomları ve alev gazlarının tutuşma ürünleri arasındaki birleşme reaksiyonu nedeniyle atomlaşma verimi düşüktür.
- 2) Grafit tübe enjekte edilen numune miktarı 5–10 µl iken alevli atomlaşma için 1–2 ml numune gerekmektedir. Bu nedenle elektrotermal atomlaştırıcı kullanarak mikro analiz yapmak mümkündür.
- 3) Alevi söndüren viskoz sıvılar veya solventler elektrotermal analizde kullanılabilir.
- 4) Direk katı ve slurry analizleri mümkündür.

Dezavantajları,

- 1) Güç kaynağı ünitesi sebebiyle çok yer kaplayan bir alettir.
- 2) Sistem daha karmaşık ve bozulma riski daha yüksektir.
- 3) Elektrotermal atomik absorpsiyon spektrofotometresi (ETAAS) alevli atomik absorpsiyon spektrofotometresinden çok daha pahalıdır.
- 4) Çalıştırma masrafları çok daha fazladır.
- 5) Eğer temizleme gazı olarak azot kullanılırsa siyanür oluşma riski vardır. Ayrıca alev kullanılan durumlarda toksik yanma ürünleri oluşur.

3.4.3. Monokromatörler [13]

Spektroskopik yöntemlerin çoğunda aletin üstünlüğü doğrudan monokromatörün ayırıcılığına bağlı olduğu halde, atomik absorpsiyon spektroskopisi için bu o kadar önemli değildir.

Atomik absorpsiyon spektroskopisinde kullanılan monokromatörde ayırıcılık ve ışın miktarı ilişkisi göz önünde bulundurulmalıdır. AAS'nin elementleri ayırma ve spektral engellemeleri önleme yeteneği monokromatöre bağlı olmayıp oyuk katot lambasının yaydığı emisyon hatlarının genişliğine ve tayin elementinin absorpsiyon hatlarının genişliğine bağlıdır.

Monokromatörün esas görevi tayin elementinin rezonans hattını, oyuk katot lambasının yaydığı diğer hatlardan ayırmaktır.

Monokromatörler, iki yarık (bir giriş ve çıkış), bir dalga boyuna ayırma bileşeni (hemen hemen daima şebeke) ve yardımcı optik bileşenlerden oluşur. Giriş ve çıkış yarıkları, ışın kaynağından çıkarak monokromatöre giren ve dedektör üzerine düşen ışın oranını kontrol eder. Geniş giriş yarığı kullanılabildiğinde ışın enerjisinin daha büyük miktarı dedektöre ulaşır. Bu durumda gürültü, sinyale oranla küçüldüğünden sinyal kararlıdır, kesindir ve düşük derişimler ölçülebilir.

3.4.4. Dedektörler [13]

Dedektörler ışın kaynağından gelen ışının şiddetinin ölçülmesi amacıyla kullanılan bileşenlerdir. Işığın elektrik sinyaline dönüştürürler. Bir dedektörün, ışığa karşı duyarlı olması, ışın şiddeti ile doğru orantılı bir sinyal üretmesi, üzerine düşen ışığa cevap verme yani sinyal üretme süresinin kısa olması, kararlı olması ve üretilen elektriksel sinyalin yardımcı devrelerle çoğaltılabilmesi gibi özelliklere sahip olması istenir.

AAS'de ışın sinyalinin elektrik sinyaline dönüştürülmesi için fotoçoğaltıcılar kullanılır. Fotoçoğaltıcılar, ışığa duyarlı bir katot, bir anot ve oluşan akımı artıran dinot adı verilen katottan daha pozitif gerilimde elektrotlardan oluşur. Katot antimon, bizmut ve/veya gümüşlü alkali metal karışımları gibi kolaylıkla iyonlaşan bir malzemeye kaplanmıştır. Bir foto çoğaltıcının hassasiyeti, katodun kaplama maddesine bağlıdır. Pratikte ölçülebilen dalga boyu 193,7 nm (As) ve en yüksek dalga boyu da 852,1 nm (Cs)'dir.

3.5. Atomik Absorpsiyon Spektrometrisinde Kantitatif Analiz [12, 22]

Atomik absorpsiyon spektrometrisinde, kantitatif analiz için iki yöntem kullanılır.

3.5.1. Lineer kalibrasyon yöntemi

Analiz edilecek elementin saf bir bileşiğinden hazırlanmış, konsantrasyonları tam olarak bilinen bir dizi standart çözeltinin absorbensleri ölçülür. Konsantrasyon değerleri x ekseninde, absorbens değerleri y ekseninde olmak üzere bir grafik çizilir. Elde edilen bu grafiğe “kalibrasyon grafiği” denir. Nicel analiz, kalibrasyon grafiğinin doğrusal olduğu bölgede yapılır. Kalibrasyon grafiğinin doğrusal olduğu bu bölgeye “çalışma aralığı” denir. Kalibrasyon grafiği çizildikten sonra, aynı koşullar altında içindeki analit konsantrasyonunu bilinmeyen numune çözeltisinin absorbensı ölçülür. Daha sonra, kalibrasyon grafiğinden yararlanarak numune çözeltisi içindeki analit miktarı belirlenir.

3.5.2. Standart ekleme yöntemi

Lineer kalibrasyon yöntemi ile yapılan analizlerde standartlar tayin elementinin tuzundan hazırlanmış olup içinde numunedeki matriks bileşenleri yer almaz. Dolayısıyla matriks varlığında analitin hassasiyetinin değişmesi halinde numunedeki ve standartlardaki analit absorbenslerinin karşılaştırılması hatalı sonuçlara neden olur. Bu nedenle standartların numune ile aynı matrikste hazırlanması ve analitlerin aynı bileşimde olması istenir. Ancak bu her zaman mümkün ve pratik değildir. Genellikle örneğin bileşimi tam olarak bilinmez. Bilinse bile matriks ile aynı bileşimdeki standartları hazırlamak için kullanılacak ve analiti eser olarak dahi içermeyen çok saf reaktiflerin elde edilmesi mümkün olmaz veya bu çok masraflı olacaktır. Bu nedenle, tayin edilen elementin birlikte bulunduğu yabancı maddelerden gelen etkilerin niteliği bilinmediğinde analitin numune matriksindeki standardını hazırlamak için standart ekleme yöntemi uygulanır. Bu yöntemde, analiz çözeltisi uygun oranda seyreltikten sonra balonjojelere eşit hacimlerde alınır. Birinci kısım balonjojenin hacmine seyreltilip absorbensı ölçülür. Diğer kısımlara ise değişen miktarlarda (ya farklı konsantrasyonlarda eşit hacimde veya eşit konsantrasyonda farklı hacimlerde) standart analit çözeltisi ilave edilir ve balonjoje hacmine tamamlanarak absorbensler ölçülür. İlave edilen standart konsantrasyonları x ekseninde, absorbens değerleri y ekseninde olmak üzere bir grafik çizilir. Çizilen

grafikte elde edilen doğrunun, konsantrasyon eksenini kestiği noktanın absorbans eksenine olan uzaklığı numune içindeki analit konsantrasyonunu verir. Bu yöntemin başarısı analitin numunede bulunan ve standart olarak ilave edilen formlarının aynı davranışı gösterip göstermediğine (yani hassasiyetlerinin farklı olup olmadığına) bağlıdır. Örneğin; numunedeki analit organik bileşiği halinde ancak standart olarak kullanılan analit inorganik bileşiği halinde ise ve bunların uçuculukları, kararlılıkları ve atomlaşma verimleri farklı ise sonuçlar hatalı olacaktır. Benzer farklı davranış aynı elementin farklı değerlikli türleri içinde geçerlidir.

3.6. Girişimler [12, 16]

Atomik absorpsiyon spektroskopisinde girişimler nedenlerine bağlı olarak spektral ve spektral olmayan girişimler olmak üzere iki ana grupta toplanmaktadır.

3.6.1. Spektral girişimler ve düzeltilmeleri [13, 14, 25, 26]

Çalışılan dalga boyundaki ışının analit atomik absorpsiyon ölçümü sırasında gaz fazındaki diğer element atomları, ayrışmamış moleküller veya radikaller tarafından absorpsiyonu ve/veya katı partiküller tarafından saçılması sonucu oluşan girişimlere spektral girişimler adı verilir. AAS’de tavsiye edilen slit aralığı kullanılırsa atomik rezonans hatların direkt çakışması olayına pek rastlanılmaz. Ancak gaz fazındaki moleküller veya radikaller geniş bir dalga boyu aralığında kesiksiz bir absorpsiyon spektrumuna sahip olduklarından analit dalga boyunda da kaçınılmaz olarak absorpsiyon yaparak girişime neden olurlar. Spektral girişimlerin oluşmasının bir diğer nedeni ise atomik buhardaki küçük parçacıkların ışığı saçmasıdır. Bu olaya grafit fırınlı atomik absorpsiyon spektrometresinde alevli atomik spektrometresine oranla daha sık rastlanır. Grafit fırında yapılan analizlerde numunede bulunan yüksek konsantrasyondaki matriks bileşenlerinin atomlaşma basamağında tamamen ayrışmaması nedeniyle oluşan mikrokristaller veya soğuk uçlardaki numune kalıntılarının tekrar buharlaşmasıyla oluşan partiküller veya tüp duvarlarından gelen karbon tanecikleri de ışının saçılmasına neden olurlar. Bu iki etki (moleküler absorpsiyon+saçılma) genellikle zemin değeri veya zemin absorpsiyonu olarak tanımlanır. Tayin elementi atomlarının net absorbansını elde etmek için absorplanan (veya saçılan) ışın miktarı ölçülerek toplam absorbanstan bu değer çıkarılmasıyla elde edilir.

Alevli AAS’de moleküler absorpsiyon ve partiküller tarafından ışının saçılması ile oluşan spektral girişimlerin yok edilmesi için en iyi ölçümün yapıldığı yüksek sıcaklıklı alev kullanılmalıdır. İyi dizayn edilmemiş ön-karıştırıcı yakıcılar ve hava/asetilen alevinde ışın yolundaki moleküller veya parçacıklar girişime neden olurken daha sıcak azot protoksit/asetilen alevi kullanıldığında moleküllerin sayısı oldukça azalır ve bu etki hemen hemen hiç görülmez. Bununla birlikte bazı elementlerin hassasiyeti daha sıcak alev ortamında azaldığından azot protoksit alevini her zaman kullanmak mümkün değildir.

Grafit fırın tekniğinde ise matriks modifikasyonu ile spektral girişimler azaltılabilir. Tayin elementini daha kararlı yapmak veya matriks bileşenlerinin daha uçucu olmalarını sağlamak için örneğe yüksek konsantrasyonda bir reaktif ilave edilerek (matriks modifier) atomlaşma basamağından önce iyi bir ayırım gerçekleştirilir. Spektral girişimleri azaltmanın diğer bir yolu da analiz elementini içermeyen fakat diğer matriksleri içeren ve numune ile aynı zemin absorpsiyonunu oluşturan bir boş (blank) numunenin hazırlanarak absorbansının ölçülmesidir. Bu işlem pratikte çok kullanılmaz. Çünkü sentetik olarak blank numune hazırlanması her bir bileşenin yüksek saflıkta olması gerektiğinden oldukça zordur. Ayrıca numuneden numuneye bileşenlerin kompozisyonu farklılık gösterir.

Spektral girişimler aletsel olarak da düzeltilebilir. Gerçek aletsel zemin düzeltme yöntemleri şu şekilde sıralanabilir:

- 1) Çift hat yöntemi
- 2) Self absorpsiyonla zemin düzeltme yöntemi
- 3) Sürekli ışın kaynaklı zemin düzeltme yöntemi
- 4) Zeeman etkili zemin düzeltme yöntemi

3.6.1.1. Çift hat yöntemi

Çift hat yönteminde, tayin elementinin rezonans hattında toplam absorpsiyon (atomik ve zemin absorpsiyonu) ölçülür. Daha sonra başka bir elementin (veya aynı elementin) oyuk katot lambası kullanılarak tayin elementinin absorpsiyon yapmadığı ama absorpsiyon dalga boyuna en yakın dalga boyunda zemin absorpsiyonu ölçülür. Çift hat yönteminin otomatik ve hızlı bir şekilde uygulanması için iki kanallı atomik absorpsiyon spektrofotometresi kullanılmalıdır. Birinci kanala yerleştirilen monokromatörde analiz elementinin absorpsiyon dalga boyu seçilir, ikinci kanala

yerleştirilen monokromatörde zemin sinyali düzeltilmesi için dalga boyu seçilir. Bu yöntemde karşılaşılan sorunlardan biri en uygun ve yakın dalga boyunu bulmaktır. Özellikle grafit fırında zemin sinyalinin sabit olmaması yöntemin başarısını engeller. Bu yöntemin aletsel bir uygulaması yoktur.

3.6.1.2. Self absorpsiyonla zemin düzeltme yöntemi

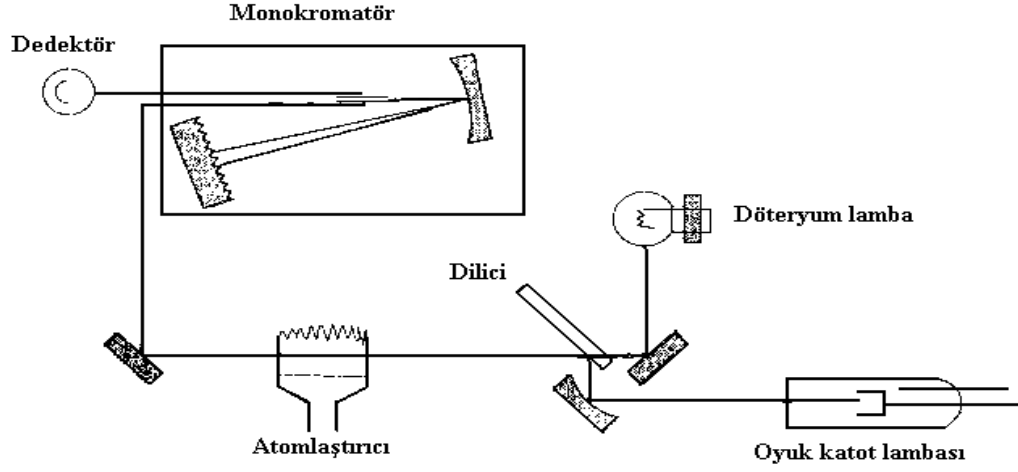
Self absorpsiyonla zemin düzeltme yöntemi, yüksek akım uygulaması ile katot lambasından yayılan ışının self absorpsiyon veya self reversal yapması prensibine dayanır. Oyuk katot lambasına yüksek akım uygulandığında büyük miktarda uyarılmamış atom üretilir ve bunlar uyarılmış atomlardan gelen ve yüksek akım nedeniyle genişlemiş emisyonun bandının merkezinin absorplanmasını (self-reversal) sağlar. Ayrıca yüksek akım uyarılmamış türlerin emisyon bandı belirgin bir şekilde genişletmektedir. Sonuçta absorpsiyonun meydana geldiği orta kısmın minimum olduğu bir bant oluşur.

Düzeltilmiş absorbansı ölçmek için lambanın birkaç milisaniye düşük akımda çalışması için program yapılır ve daha sonra yaklaşık 300 μ s yüksek akım uygulanır. Düşük akım uygulandığında toplam absorbansı yüksek akım uygulandığında ise zemin absorpsiyonu ölçülür. Elektronik aletler ile toplam absorpsiyondan zemin absorpsiyonu çıkartılır ve düzeltilmiş değer elde edilir.

3.6.1.3. Sürekli ışın kaynaklı zemin düzeltme yöntemi [25]

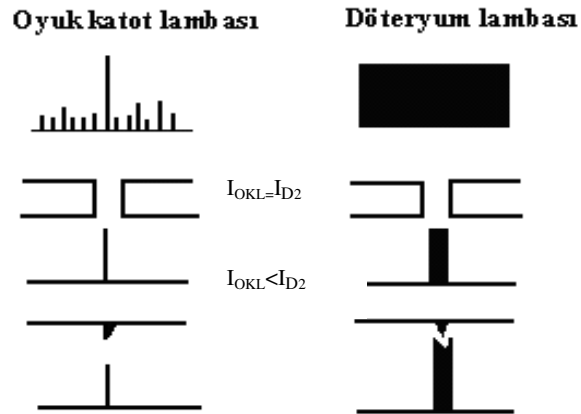
Sürekli ışın kaynaklı zemin düzeltme yönteminde, spektrofotometreye oyuk katot lambasına ek olarak döteryum veya halojen lambası gibi geniş bir dalga boyu aralığında sürekli ışın yapabilen bir ışın kaynağı yerleştirilir. Bu ışın kaynağı ile spektrofotometrenin spektral genişliği (0.2–0.7 nm) içinde zemin absorpsiyonu ölçülür. Temel bir ışın kaynağıyla (OKL) ise elementin rezonans hattındaki toplam absorbans (atomik absorpsiyon+zemin değer) değeri ölçülür. İki lambadan elde edilen absorbans değerleri aletsel olarak çıkarılır.

Şekil 3.7’de sürekli ışın kaynaklı zemin düzelticili bir atomik absorpsiyon spektrofotometresi şematik olarak gösterilmiştir. Burada dilicinin görevi, oyuk katot lambasından ve sürekli ışın kaynağından gelen ışının atomlaştırıcıdan sıra ile geçmesini sağlamaktır.



Şekil 3.7: Sürekli ışın kaynaklı zemin düzeltici bir atomik spektrofotometresinin şematik gösterimi.

Şekil 3.8’de döteryum lambası (D_2) kullanılarak zemin engellemelerinin düzeltilmesi gösterilmiştir. Slit genişliği belirli bir aralıkta tutularak sürekli ışın kaynağından gelen ışının numune atomları tarafından absorplanan kesrinin önemsiz bir miktarda olması sağlanır. Öte yandan oyuk katot lambasından gelen dar emisyon hattı analiz elementinin absorpsiyonu yanında zemin absorpsiyonundan da etkilenirken sürekli ışın kaynağının geniş emisyon bandı yalnız zemin absorpsiyonundan etkilenir. Sürekli ışının absorbansı (zemin absorpsiyonu) oyuk katot lambanın absorbansından (zemin+atomik absorpsiyon) çıkarıldığında düzeltilmiş atomik absorbans değerleri elde edilmiş olur.



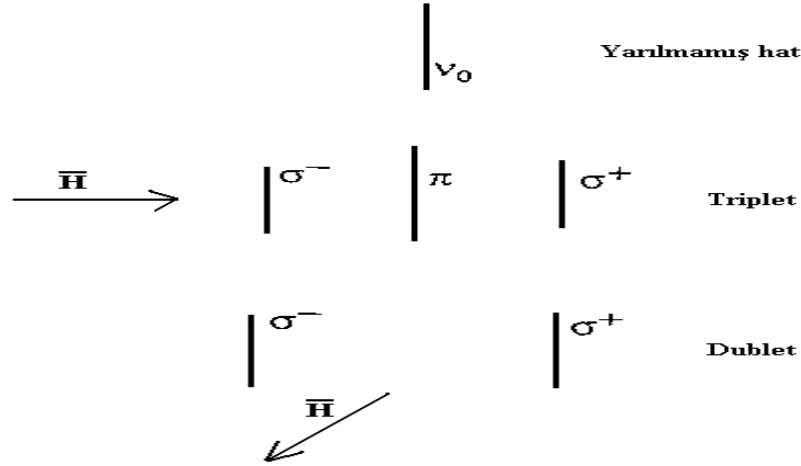
Şekil 3.8: Döteryum lambası (D_2) ile zemin engellemelerinin düzeltilmesi.

3.6.1.4. Zeeman etkili zemin düzeltme yöntemi

Bir atomik spektrum hattının kuvvetli bir manyetik alana maruz bırakıldığında birbirinden az farklı dalga boylarındaki bileşenlerine yarılması olayına “Zeeman etkisi” denilir. Bileşenlerin sayısı elemente bağlı olarak değişmektedir. Zeeman etkisi, normal Zeeman etkisi ve anormal Zeeman etkisi olmak üzere iki grupta toplanır.

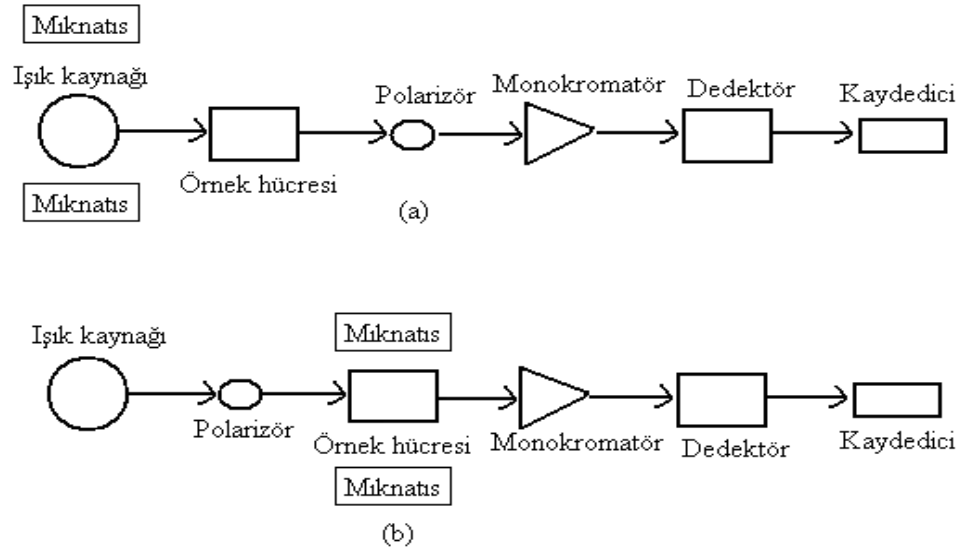
Normal Zeeman etkisinde atomun yayılan veya absorplanan hattı bir manyetik alan etkisiyle üç bileşene yarılır (Şekil 3.9). Merkez bileşen, π , manyetik alana paralel polarize ve orijinal absorpsiyon hattı ile aynı dalga boyundadır. Diğer iki bileşen σ^+ ve σ^- merkez bileşenin her iki tarafında eşit dalga boyunda uzaklıkta ve manyetik alana dik düzlemde polarizedir. Kaymanın derecesi uygulanan manyetik alanın kuvvetine bağlıdır. Bu üç bileşenin şiddetinin toplamı daima orijinal şiddete (etkilenmemiş hat) eşittir.

Anormal Zeeman etkisinde ise bileşen sayısı üçten fazladır yani π ve σ bileşenleri çok sayıda bileşene yarılır. σ bileşenlerinin dalga boyundaki kaymaları, hem normal hem de anormal Zeeman etkisinde uygulanan manyetik alan ile orantılı olarak değişmektedir.



Şekil 3.9 : Manyetik alanda spektral bir hattın normal Zeeman etkisi yarılmaması.

Zeeman etkisinin ışın kaynağına veya atomlaştırıcıya uygulaması Şekil 3.10’da şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 3.10: Zeeman etkili cihazların genel şematik gösterimi

(a) Işın kaynağına manyetik alanın uygulandığı

(b) Atomlaştırıcıya manyetik alanın uygulandığı

3.6.2. Spektral olmayan girişimler [22, 25]

Spektral olmayan girişimler analiz elementinin sinyalini doğrudan etkiler. Atomik absorpsiyon spektrometrisi numune ve referans absorbanslarının karıştırılması prensibine dayanan bir yöntem olduğundan numune içindeki analiz elementinin davranışının referansinkinden farklı olması girişime neden olur.

Fiziksel girişimler olarak adlandırılan girişimler, analizi yapılacak maddenin ve referans maddesinin viskozite, yüzey gerilimi ve yoğunluk gibi fiziksel özelliklerinin farklı olması durumunda oluşur ve alev ulaşan numune miktarı, aerosol boyutu ve numune buharlaşması gibi parametreler bu girişimleri etkiler. Bu tür girişimler numune absorbansının referansa (standart) göre hem daha büyük hem de daha küçük çıkmasına neden olabilirler. Grafit fırınlı atomlaştırma tekniğinde örneğin grafit tüpe sürekli püskürtülmesi işlemi olmadığından bu tür girişimlere hiç rastlanmaz.

Tayin elementinin alev ortamında standartlarda ve örnekte farklı bileşimde olması sonucu atomlaşma verimi aynı olmayabilir. Bu da hatalı sonuçlara neden olur. Yine tayin elementinin atomlaştıktan sonra örnekteki matriks bileşenleri ile alev ortamında oluşturduğu kararlı bileşenler duyarlılığın standartlara göre farklı olmasına ve dolayısıyla girişimlere neden olur.

Grafit fırındaki spektral olmayan girişimler yoğun faz ve/veya gaz fazı girişimleridir. Çözücünün buharlaştırılması ve ön atomlaşma sırasında analiz elementinin yeni bir kimyasal bileşiğe dönüşmesi ve bu bileşiğin atomlaşma öncesi moleküler veya atomal halde fırından uzaklaşması sonucu oluşan girişimler yoğun faz girişimleri olarak adlandırılır. Grafit fırın tekniğinde gözlenen yoğun faz girişimleri özellikle matriks varlığında analiz elementinin daha düşük sıcaklıkta atomlaşması sonucu kayıpların oluşmasına neden olur.

Gaz fazı girişimleri ise ya analiz elementinin matriksle buhar fazda daha zor ayrılan bir bileşiği halinde olması veya oluşan atomların gaz fazında matriks bileşenleri ile reaksiyona girmesidir. Gaz faz girişimleri, atomlaştırıcıda atomların önemli bir miktarının uygulanan sıcaklıkla iyonlaşması sonucu ortaya çıkar. Bu durum sinyalin küçülmesine neden olur. Gaz faz girişimleri, atomlaştırıcı sıcaklığının çok yüksek olduğu durumlarda oluştuğundan atomlaşma sıcaklığı düşürülerek iyonlaşma bir ölçüde engellenebilir. Fakat sıcaklık düşürüldüğünde de birçok element atomlaşmadığından bu yol tam bir çözüm değildir.

Genel olarak spektral olmayan girişimler numune ve referans çözeltilerinin matriks ortamlarının mümkün olduğunca birbirine benzer hale getirilmesi ile yok edilir. Bunun sonucunda numune ile referans çözeltilerin her ikisinin de analiz elementi üzerine matriks etkisinin aynı derecede olması nedeniyle hiçbir girişim gözlenmeyecektir. Bununla birlikte pratikte bu ideal duruma nadiren rastlanır. Bunun için hem matriks bileşenlerinin hem de örneğin çözülmesi sonucu analitin hangi kimyasal bileşiği olarak bulunduğu tam olarak bilinmesi gerekir. Ayrıca referans çözelti hazırlanırken yüksek saflıkta reaktiflerin kullanılması gerekmektedir. Özellikle alev tekniğinde ana matriks bileşeninin benzemesi ve aynı çözücünün kullanılması yeterlidir. Hatta rutin analizler doğrudan basit referans çözeltilere karşı yapılabilmektedir. Örneğin kompozisyonu tam olarak bilinmiyorsa veya aynı matriks standartlar için hazırlanamıyorsa standart ekleme metodu tavsiye edilmektedir. Grafit fırın tekniğinde ligandların ve kimyasal bağların bir elementin termal davranışı ve uçuculuğu üzerine etkisi olduğu için ilave edilen element farklı bir kimyasal bir bileşiği olarak bulunuyorsa davranışı örneğin davranışından tamamen farklı olabilir, bu durumda girişim yok edilemeyecektir. Bu yöntemin sınırlamaları daha önce bölüm 3.5.2 de tartışılmıştır. İdeal olarak standart ekleme metodu alev tekniğinde gözlenen fiziksel girişimler gibi girişimleri yok etmekte kullanılır. Öte yandan

iyonizasyon konsantrasyona bağlı olduğundan standart ekleme yöntemi bu girişim için  are değildir. İyonlaşma girişimlerini elimine etmek için standartlara ve örneğe kolayca elektron veren yani iyonlaşma enerjisi düşük bir element eklenerek ortamın elektron basıncı arttırılır ve analitin iyonizasyon denge reaksiyonu bastırılarak daha az iyon oluşturması sağlanır. Diğer yöntem sıcaklığın düşürülmesidir ancak analit içeren moleküllerin parçalanmasını engeller ve gazı fazı birleşme reaksiyon verimini arttırır. Grafit fırın tekniğinde, gaz faz girişimlerinin ve buharlaşmanın yok edilmesi ya da azaltılması için matriks modifikasyonu çok sık kullanılır. Bu amaçla analiz elementinin fiziksel ve kimyasal özelliklerini iyileştirmek için standartlara ve numune çözeltisine bir reaktif ilave edilerek ya analiz edilecek elementi daha az buharlaşabilen bir şekle dönüştürülür ya da matriks bileşenlerini daha uçucu hale getirilir. Böylece daha yüksek ön atomlaşma sıcaklığı uygulanarak analiz elementi henüz buharlaşmadan önce girişimlere neden olabilecek matriks bileşenlerinin ortamdan ayrılması sağlanır.

4. DENEYSEL KISIM

4.1. Kullanılan Cihazlar

Çözeltilerin hazırlanması esnasında katı maddelerin tartılması için GEC AVERY marka hassas terazi kullanılmıştır. pH ölçümleri WTW pH 340-A/SET2 pH-metre ile gerçekleştirilmiştir. Bakteri büyüme ve modifikasyon işlemlerinde liyofilizatör olarak Alpha 1-2 LD Plus marka liyofilizatör, santrifüjleme işlemlerinde Beckman Coulter, Allegro 25R marka santrifüj cihazı, karıştırma işlemlerinde Fisher Scientific FB15012 marka karıştırıcı, çalkalama işlemlerinde Forma Orbital marka çalkalayıcı, kurutma işlemlerinde Shel-Lab marka vakum etüvü, sterilizasyon işlemlerinde Tuttnauer Systec 3870 ELVC marka otoklav kullanılmıştır. Kadmiyum, kobalt, bakır ve nikel için Analytik Jena Vario 6 atomik absorpsiyon spektrofotometre ile yapılmıştır. Atomlaştırıcı olarak hava/asetilen alevi kullanılmıştır. Spektral ışın kaynağı olarak kadmiyum, kobalt, bakır ve nikel oyuk katot lambaları kullanılmıştır. Ölçümler esnasında uygulanan aletsel parametreler Çizelge 4.1’de gösterilmektedir.

Çizelge 4.1 : Absorbans ölçümlerinde uygulanan aletsel parametreler.

Element	λ ,nm	Yarık genişliği, nm	Lamba akımı, mA
Cu	324,8	0,5	5
Ni	232,0	0,2	25
Co	240,7	0,2	25
Cd	228,8	0,5	5

4.2. Kullanılan Kimyasallar ve Hazırlanışları

Kullanılan bütün kimyasallar analitik saflıktadır. Bakır, kobalt, nikel ve kadmiyum tayini için kullanılacak çözeltiler 1000 $\mu\text{g ml}^{-1}$ stok çözeltiden (Merck) destile-deiyonize su ile günlük olarak uygun konsantrasyonlarda hazırlanmıştır. Hidroklorik asit (%37 HCl, Merck), nitrik asit (%65 HNO₃, Merck), kullanılan diğer kimyasallardır. Matriks olarak kullanılan NaCl, MgCl₂, Na₂SO₄, KCl, NH₄Cl,

Na₂CO₃ tuzları analitik saflıktadır. Tayin elementlerini içeren sertifikalı atık su referans maddesi (CWW-TM) High Purity Standards firmasından temin edilmiştir. Tüm çözeltilerin hazırlanmasında Eppendorf otomatik pipetler kullanılmıştır. pH ayarlamaları 0,01 mol l⁻¹ HCl ve 0,01 mol l⁻¹ NaOH ile yapılmıştır.

Besiyeri hazırlanmasında tryptone (Difco), NaCl ve yeast extract (Difco) kimyasalları kullanılmıştır. Çok yüzeyli karbon nanotüp (MWCNT) olarak C_{tube}100 marka karbon nanotüp kullanılmıştır.

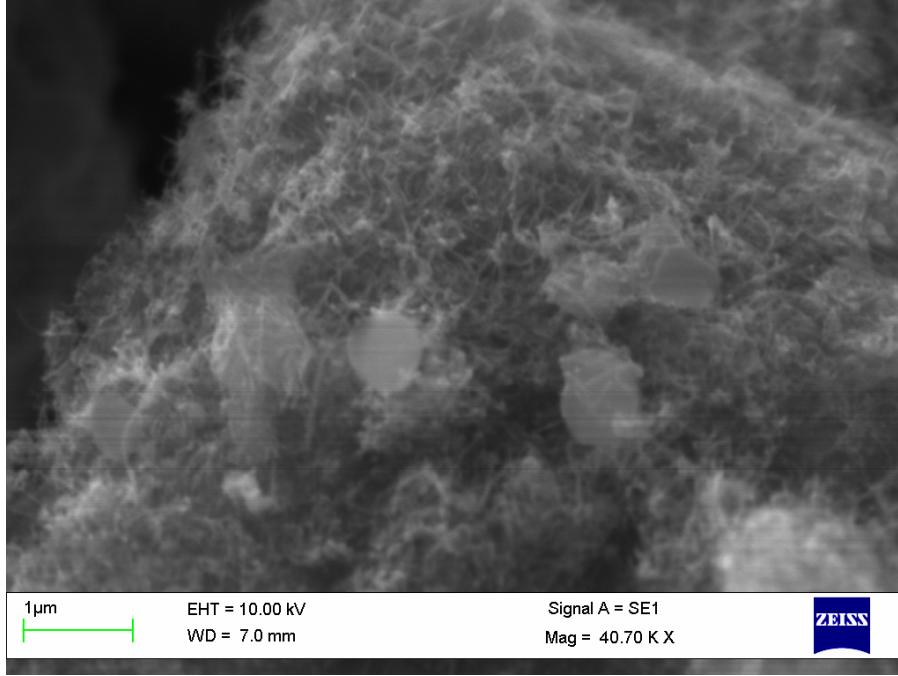
4.3. Bakteri Hücrelerinin Büyütülmesi ve Modifikasyon Şartları

4.3.1. Bakteri hücrelerini büyütleme koşulları

1 g tryptone, 1 g NaCl ve 0,5 g yeast extractın 100 ml distile-deiyonize su içinde çözündürülmesi ile hazırlanan sıvı besiyeri ortamı, sterilize edilmek için 120⁰C’de 20 dakika otoklavlanmıştır. Hazırlanan sıvı besiyerine (pH=7,2-7,4’e ayarlanmış) steril şartlarda 200 µl stok bakteri hücresinden ekim yapılmıştır. Ekimi yapılan bakteri kültürü karıştırıcıda sürekli karıştırılmak sureti ile sıcak odada 37⁰C ‘de 24 saat büyümeye bırakılmıştır. Büyütme sonrasında kontaminasyonu engellemek ve bakteri hücrelerinin uzun süre stabil kalması için +4⁰C’de muhafaza edilmiştir.

4.3.2. Canlı bakteri hücrelerinin karbon nanotüp üzerine tutundurulması (modifikasyonu)

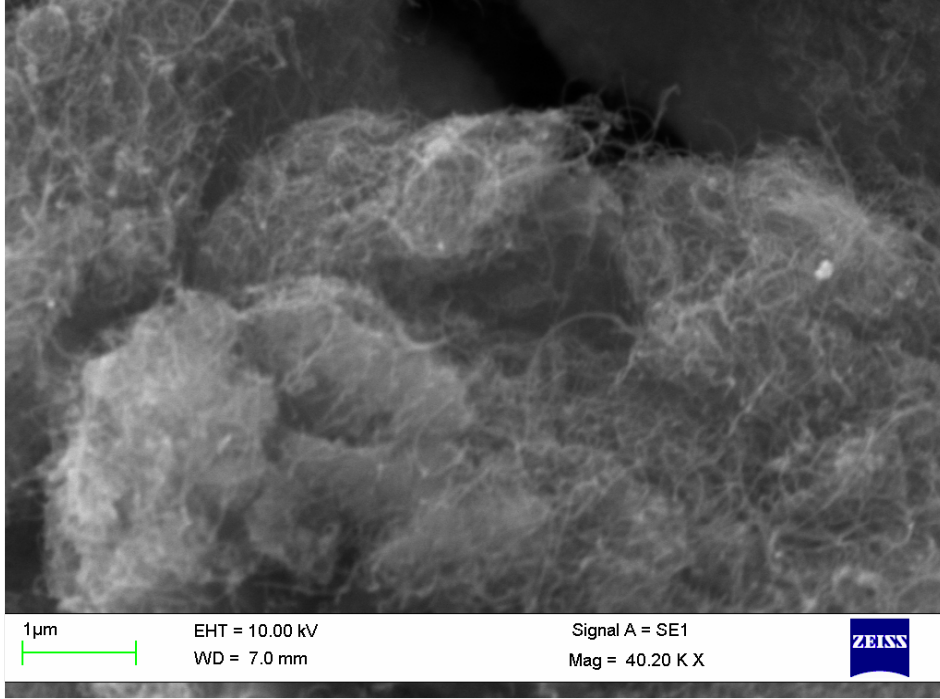
Büyütülmüş bakteri hücreleri 5000 rpm’de 10 dakika süre ile santrifüj edilerek sıvı ortamdan ayrılmıştır. Santrifüj sonrası sıvı ortamdan ayrılmış bakteri hücreleri kalıntısından 0,1 g canlı *Escherichia Coli* (*E.Coli*) (yaklaşık 150 ml çözeltiden elde edilmektedir) alınarak 0,1 g MWCNT ile 20 ml distile-deiyonize su içinde karıştırılıp, 200 rpm’de 2 saat çalkalanmıştır. Çalkalama sonrası *E.Coli* bakteri hücreleri ve MWCNT karışım ürünü 5000 rpm’de, 10 dakika santrifüj edilerek sıvı kısımdan ayrılmıştır. Elde edilen modifikasyon ürününün kuruması ve kararlı hale gelmesi için 80-105⁰C sıcaklıkta 24 saat süreyle vakumlu etüvde suyu uçurulmuş ve kurutulmuştur. Kurutma sonrası MWCNT ile modifikasyonu yapılan *E.Coli* bakteri hücresi öğütülmüştür. Modifikasyon sonucu elde edilen sorbentin SEM görüntüsü Şekil 4.1’de gösterilmektedir.



Şekil 4.1 : MWCNT ile modifiye edilen canlı *E.Coli* bakteri hücresinin SEM görüntüsü.

4.3.3. Ölü bakteri hücrelerinin karbon nanotüp üzerine tutundurulması (modifikasyonu)

Büyütülmüş bakteri hücreleri 5000 rpm’de 10 dakika süre ile santrifüj edilerek *E.Coli* bakteri hücreleri sıvı ortamdan ayrılmıştır. Santrifüj sonrası sıvı ortamdan ayrılmış *E.Coli* bakteri hücreleri 2-3 kere 0,1 mol l⁻¹ HCl ile muamele edilmiş ve daha sonra 3 kere distile-deiyonize su ile bakteri hücreleri yıkanmıştır. Her asit ile muamele ve yıkama aşaması sonrası santrifüj yapılmıştır. Asit ile muamele edilerek ölü hale getirilen ve yıkanan *E.Coli* bakteri hücreleri yıkama sonrası suyun uçurulması amacı ile 24 saat süre ile liyofilizatöre konulmuştur. Kuru ve ölü olarak elde edilen *E.Coli* bakteri hücrelerinden 0,1 g tartılmış ve 0,1 g MWCNT ile 20 ml distile-deiyonize su içinde karıştırılıp, 200 rpm’de 2 saat süre ile çalkalanmıştır. Çalkalama sonrası *E.Coli* bakteri hücreleri ve MWCNT karışım ürünü, 5000 rpm’de 10dakika santrifüj edilerek sıvı kısımdan ayrılmıştır. Elde edilen modifikasyon ürününün kuruması ve kararlı hale gelmesi için 80-105 °C sıcaklıkta 24 saat süreyle vakumlu etüvde suyu uçurulmuş ve kurutulmuştur. Kurutma sonrası *E.Coli* bakteri hücresi ve MWCNT modifiye ürünü öğütülmüştür. Modifikasyon sonucu elde edilen sorbentin SEM görüntüsü Şekil 4.2’de gösterilmektedir.

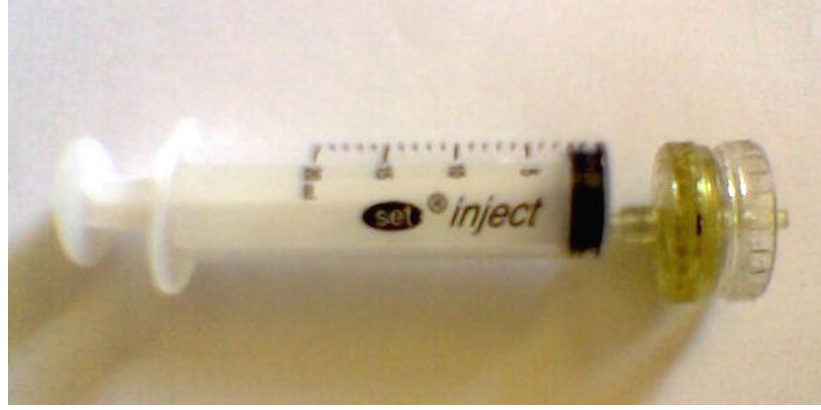


Şekil 4.2 : MWCNT ile modifiye edilen ölü *E.Coli* bakteri hücresinin SEM görüntüsü.

4.4. Adsorpsiyon ve Desorpsiyon (Geri Kazanma) Prosedürünün Uygulanması

4.4.1. Filtre içinde sorbentin hazırlanması

Sırasıyla 0,1 mol l⁻¹ HNO₃, distile-deiyonize su, 0,1 mol l⁻¹ NaOH ve son olarak distile-deiyonize su ile yıkanmış filtre içine altta ve üstte 0,45 µ boyutunda iki ayrı membran filtre kağıdı yerleştirilmiş ve iki membran filtre kağıdı arasına canlı veya ölü modifiye sorbent maddelerinden (MWCNT- *E. Coli*) 0,1 g konulmuştur. Filtre kapakları iki membran filtre kağıdı arasında modifiye sorbent madde olacak şekilde kapatılmıştır. Filtreye daha sonra 50 ml hacimli şırınga takılmıştır. Şekil 4.3’de filtre-şırınga sistemi gösterilmektedir.



Şekil 4.3 : Şırıngaya monte edilebilen filtre sistemi resmi.

4.4.2. Standart metal çözeltileri ile adsorpsiyon-desorpsiyon

1000 $\mu\text{g ml}^{-1}$ konsantrasyondaki stok metal çözeltilerden 50 ml, 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ bakır, kobalt, kadmiyum ve nikel standart çözeltileri hazırlanmış , çözelti pH'ı 0,01 mol l^{-1} NaOH ve 0,01 mol l^{-1} HCl ile 7-8 arasında ayarlanmıştır. pH'ı ayarlanan çözelti daha sonra şırınga kullanılarak filtre içindeki modifiye sorbentten geçirilmiştir. Geri kazanım için 50 ml hacminde farklı konsantrasyonlarda (1 mol l^{-1} ve 0,5 mol l^{-1}) farklı asit çözeltileri (HNO_3 ve HCl) adsorpsiyon prosedürü ile aynı şekilde filtre içindeki modifiye sorbentten geçirilmiştir. Blankler de aynı işleme tabi tutulmuştur. Adsorpsiyon ve desorpsiyon sonucunda elde edilen çözeltilerin alevli atomik absorpsiyon spektrofotometresinde (FAAS) sulu ve asitli standartlara karşı ölçümü yapılmıştır.

4.4.3. Atık su numunesine adsorpsiyon-desorpsiyon prosedürünün uygulanması ve zenginleştirme metodu

Standart atık su numunesinden 250 ml, 0,025 $\mu\text{g ml}^{-1}$ konsantrasyonlarında tayin elementlerini (Cu, Co, Cd ve Ni) içeren çözeltiler hazırlanmıştır. Hazırlanan atık su numunesi filtre içindeki sorbentten standart metal çözeltilerine uygulanan yöntemeye göre (4.4.2) geçirilmiştir. 12,5 ml, 0,5 mol l^{-1} HNO_3 asit çözeltisi filtredeki sorbentten geçirilerek analitler geri kazanılmıştır. Blankler de aynı işleme tabi tutulmuştur.

5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

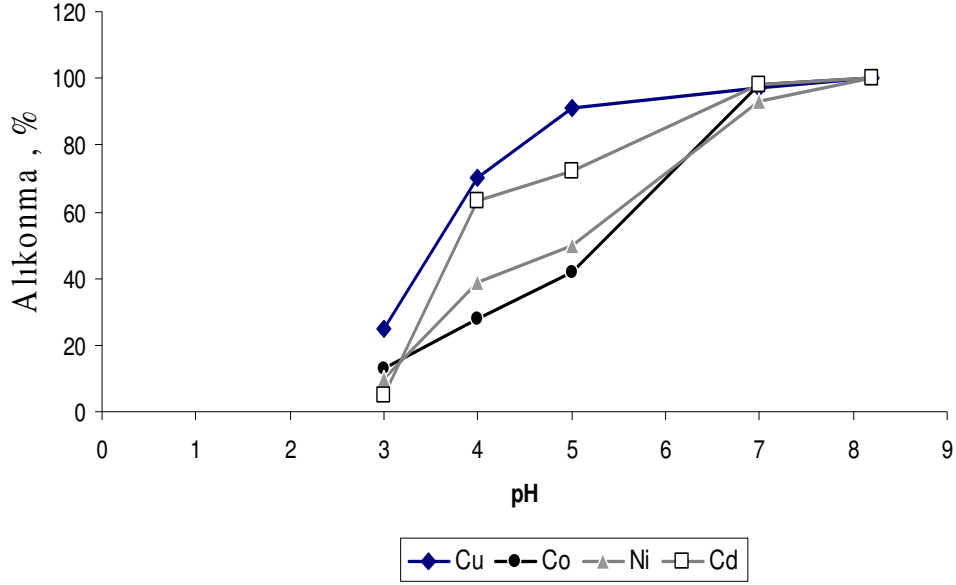
Bu çalışmada MWCNT (çok yüzeyli karbon nanotüp; multi-walled carbon nanotube) üzerine modifiye edilen canlı veya ölü *Escherichia Coli* (*E. Coli*) ile hazırlanan sorbentin tayin elementlerini (Cu, Co, Cd ve Ni) adsorplama ve geri kazanma (desorpsiyon) özellikleri araştırılmıştır. Sorbent miktarı, örneğin pH'ı, örnek hacmi, yabancı iyonlar adsorpsiyonu etkileyen parametrelerdir. Çalışmanın birinci kısmında maksimum adsorpsiyon için optimum parametre değerleri bulunmuştur. Çalışmanın ikinci kısmında ise sorbent tarafından adsorplanan tayin elementlerini nicel olarak geri kazanmak için farklı konsantrasyonlarda farklı asitler kullanılarak uygun elusyon (desorpsiyon) şartları belirlenmiştir. Son olarak da sertifikalı atık su numunesi kullanılarak metot valide edilmiştir.

Adsorpsiyon, desorpsiyon parametreleri incelenirken yapılan tüm deneysel çalışmalar, Bölüm 4.4.1'de hazırlanan filtre-şırınga sisteminde, filtre içinde 0,1 g sorbent (MWCNT üzerine modifiye edilen canlı veya ölü *E. Coli*) ile yapılmıştır. Sorbent miktarı (0,1 g) ve akış hızı (1-2 ml/dak) tüm deneyler süresince sabit tutulmuştur.

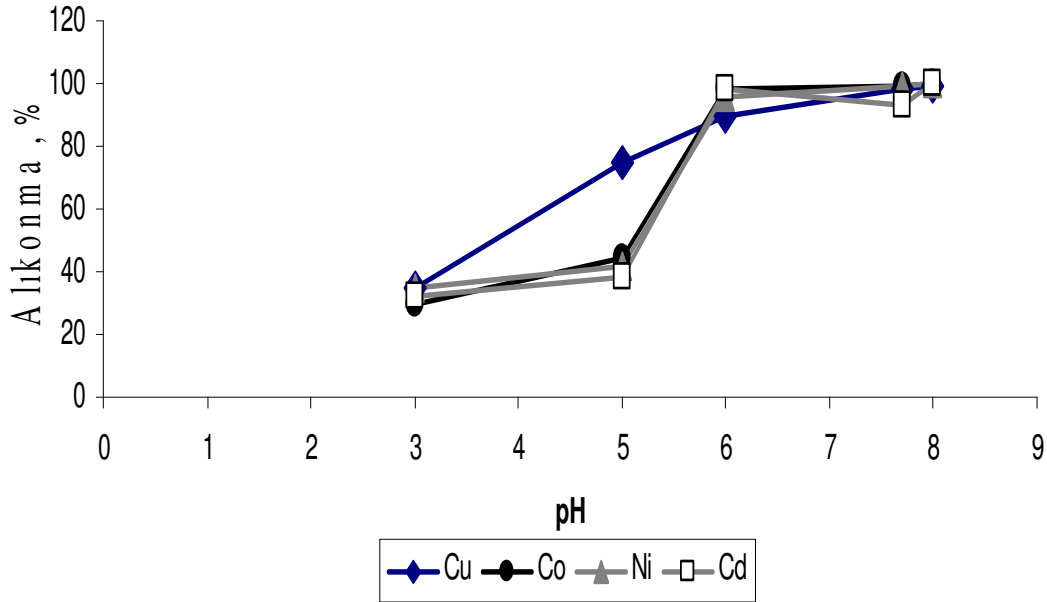
5.1. Adsorpsiyon Özelliklerinin İncelenmesine Ait Sonuçlar

5.1.1. pH etkisi

Genel olarak, tayin elementlerinin adsorplanmasını etkileyen en önemli parametrelerden bir tanesi örneğin pH'ıdır. Bu nedenle, maksimum adsorpsiyon için optimum pH aralığını belirlemek amacıyla farklı pH değerlerinde (pH=3.0-8.0) deneyler yapılmış ve bulunan sonuçlar Şekil 5.1 ve 5.2'de gösterilmiştir. Şekillerden de görüleceği üzere örneğin pH değeri pH=7.0-8.0 arasında olduğunda *E. Coli* MWCNT üzerine ister canlı ister ölü modifiye edilsin tayin elementleri sorbent tarafından nicel olarak (>%95) adsorplanmıştır. Bu nedenle tüm deneyler pH=7.0-8.0 arasında yapılmıştır.



Şekil 5.1 : Tayin elementlerinin (Cu, Co, Cd ve Ni) MWCNT üzerine modifiye edilmiş **canlı** *E. Coli* ile hazırlanan sorbent tarafından alıkonma yüzdeleri üzerine pH'ın etkisi.



Şekil 5.2 : Tayin elementlerinin (Cu, Co, Cd ve Ni) MWCNT üzerine modifiye edilmiş **ölü** *E. Coli* ile hazırlanan sorbent tarafından alıkonma yüzdeleri üzerine pH'ın etkisi.

Asidik ve bazik pH'larda metallerin bağlanması iki fonksiyonel grup (Lewis baz ; $=CO$, $-OH$ ve Lewis asit; $-NH_2$) üzerinden olmaktadır [3]. Asidik pH'larda analit ve hidronyum iyonları arasında rekabet meydana gelmektedir. Düşük pH değerlerinde hücre yüzeyi daha fazla pozitif yüklüdür ve sorbent üzerindeki fonksiyonel gruplar ve metal iyonları arasında çekme gücünde azalmalar olmakta ve metal iyonlarının bağlandığı uçlar protonlar tarafından doldurulmaktadır [5,31]. Bu nedenle düşük pH'larda tayin elementleri sorbent tarafından adsorplanamamıştır. Bunun aksine yüksek pH'larda ($pH=7.0-8.0$) çekim gücü arttığından tayin elementleri sorbent tarafından adsorplanmıştır.

5.1.2. Sorbentin kapasitesi

MWCNT üzerine modifiye edilmiş canlı veya ölü *E. Coli* ile hazırlanan sorbent tarafından adsorplanan metal miktarlarını, yani sorbentin kapasitesini belirlemek amacıyla hem tek bir metali içeren hem de tüm metalleri içeren çözeltiler kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 5.1 ve 5.2'de gösterilmiştir. Sonuçlardan da görüldüğü üzere MWCNT üzerine modifiye edilmiş canlı *E. Coli* ile hazırlanan sorbent tarafından adsorplanan tayin elementi miktarı, ölü *Escherichia Coli* ile hazırlanan sorbent tarafından adsorplanan tayin elementi miktarından daha fazladır. Başka deyişle; canlı *E. Coli* ile hazırlanan sorbent kapasitesi ölü *E. Coli* ile hazırlanan sorbentin kapasitesinden daha yüksektir. Bu durum, tek bir tayin elementi içeren çözeltiler ve tüm tayin elementlerini içeren çözelti için benzer şekildedir.

Canlı *E. Coli* ile hazırlanan sorbent kapasitesinin yüksek olmasının nedenlerinden biri, canlı ve ölü bakteri hücrelerin MWCNT'e bağlanmasındaki farklılık olabilir. Bakteri hücrelerinin modifikasyon öncesi asitle muamele edilmesi (yalnızca ölü bakteri ile modifikasyon yapılırken) sonucu bakteri hücre duvarlarının yok olması karbon nano tüplere bağlanma özelliklerini değiştirebilir. Mikroorganizmalarla metallerin ayrılması hücre duvarı bileşenleri ve metal arasındaki etkileşimin bir sonucu olduğu için hücre duvarında meydana gelen değişiklikler adsorplama kabiliyetlerini etkileyebilmektedir [32].

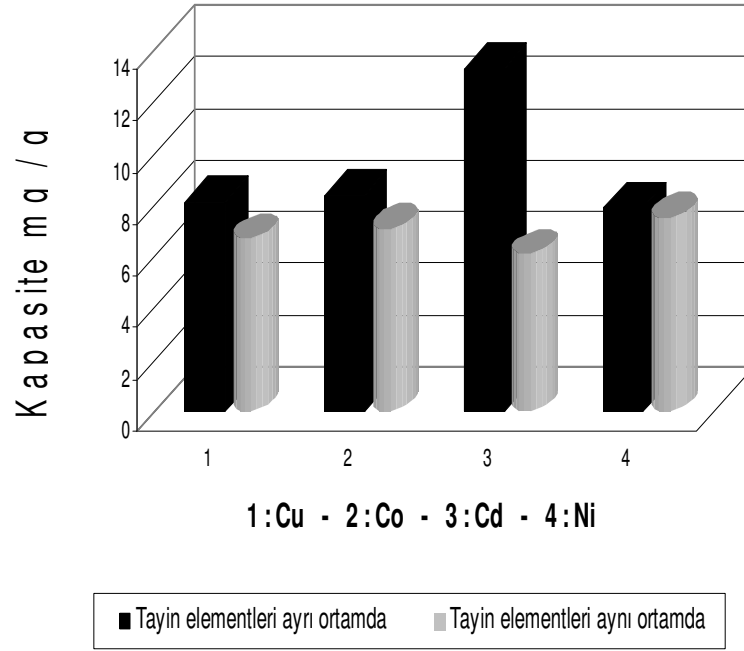
Çizelge 5.1 : Tayin elementlerinin (Cu, Co, Cd, Ni) ayrı ayrı olarak sorbent madde üzerinde alıkonma miktarları .(Sorbent : 0,1 g, çözelti hacmi: 25 ml)

Element	Konsantrasyon ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	MWCNT üzerine modifiye edilmiş canlı <i>E. Coli</i> sorbent	MWCNT üzerine modifiye edilmiş ölü <i>E. Coli</i> sorbent
Cu	50	8,1 mg / g	1,9 mg / g
Co	50	8,4 mg / g	3,1 mg / g
Cd	50	13,3 mg / g	3,3 mg / g
Ni	50	7,9 mg / g	2,5 mg / g

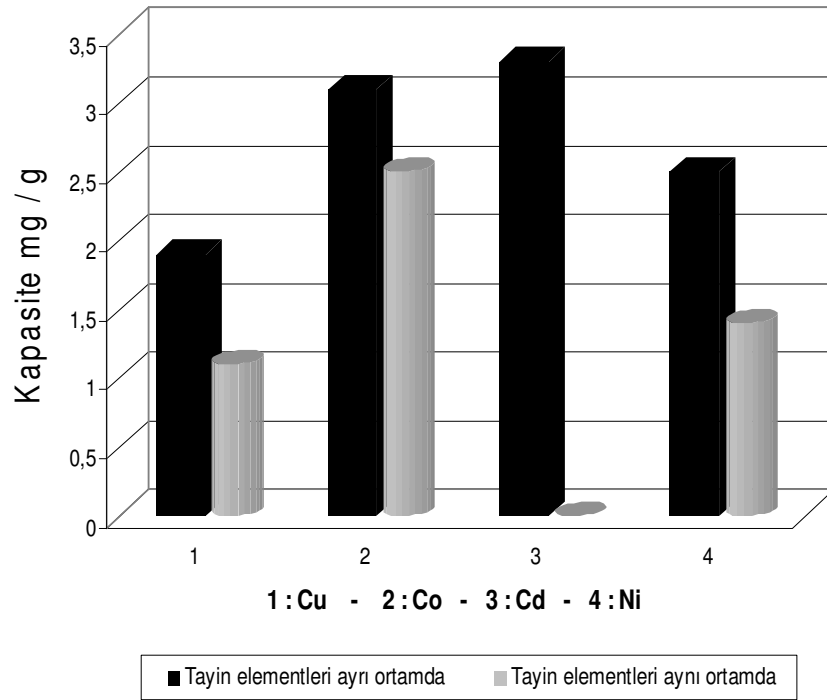
Çizelge 5.2 : Tayin elementlerinin (Cu, Co, Cd, Ni) birlikte sorbent madde üzerinde alıkonma miktarları .(Sorbent : 0,1 g, çözelti hacmi: 25 ml)

Element	Konsantrasyon ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	MWCNT üzerine modifiye edilmiş canlı <i>E. Coli</i> sorbent	MWCNT üzerine modifiye edilmiş ölü <i>E. Coli</i> sorbent
Cu	50	6,7 mg / g	1,1 mg / g
Co	50	7,1 mg / g	2,5 mg / g
Cd	50	6,1 mg / g	-
Ni	50	7,5 mg / g	1,4 mg / g

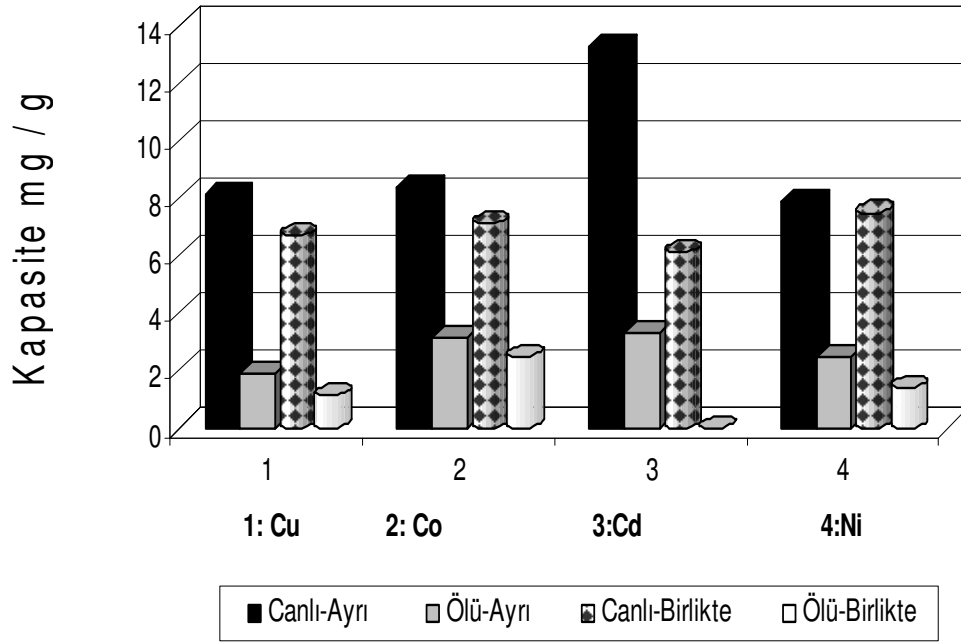
Tayin elementlerinin birlikte aynı ortam içinde bulunmaları durumunda, beklendiği gibi ayrı çözeltiler halinde bulunmaları durumuna göre hem canlı hem de ölü *E. Coli* ile hazırlanan sorbent tarafından alıkonma yüzdelerinde bir azalma görülmüştür. Bu durum canlı ve ölü sorbent üzerinde tayin elementlerinin ayrı olarak ve aynı ortamda tüm tayin elementlerinin maksimum adsorplanmasının karşılaştırılması gösterildiği Şekil 5.3 - 5.4'te daha iyi anlaşılmaktadır. Şekil 5.5'te ise canlı ve ölü sorbent üzerinde tayin elementlerinin adsorplanma kapasiteleri toplu olarak gösterilmiştir



Şekil 5.3 : Tayin elementlerinin (Cu, Co, Cd, Ni) ayrı ve aynı ortamda **canlı** sorbent üzerinde adsorplama kapasitelerinin karşılaştırılması



Şekil 5.4 : Tayin elementlerinin (Cu, Co, Cd, Ni) ayrı ve aynı ortamda **ölü** sorbent üzerinde adsorplama kapasitelerinin karşılaştırılması



Şekil 5.5 : MWCNT üzerine modifiye edilmiş *E. Coli*'nin canlı ve ölü olarak adsorplama kapasitelerinin karşılaştırılması

5.1.3. Yabancı iyon etkisi

MWCNT üzerine modifiye edilmiş canlı veya ölü *E. Coli* ile hazırlanan sorbent tarafından tayin elementlerinin adsorplanmasını ortamdaki yabancı iyonlar etkilemektedir. Bu etkiyi incelemek için tayin elementlerini (herbirinin konsantrasyonu $1 \mu\text{g ml}^{-1}$) içeren ortama her bir iyondan (Na^+ , Cl^- , Mg^{2+} , SO_4^{2-} , K^+ , NH_4^+ , CO_3^{2-} iyonları) $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ olacak şekilde tuzlar ilave edilmiştir. Tuz çözeltisi içerisindeki tayin elementi iyonlarının canlı veya ölü bakteri hücresi ile hazırlanan sorbent tarafından alıkonma yüzdeleri Çizelge 5.3 ve Çizelge 5.4'de verilmiştir. Çizelgeden de görüleceği üzere yabancı iyonların bulunduğu ortamda tayin elementleri nicel olarak sorbent tarafından (%89-100) adsorplanmıştır.

Çizelge 5.3: Tayin elementlerinin (Cu, Co, Cd, Ni) MWCNT üzerine modifiye edilmiş **canlı** *E. Coli* ile hazırlanan sorbent üzerinde alıkonmalarına yabancı iyonların etkisi. (Analit: 1 µg ml⁻¹, sorbent: 0,1 g, çözelti hacmi: 50 ml)

Yabancı İyon	Konsantrasyon (µg ml ⁻¹)	% Adsorpsiyon			
		Cu	Co	Cd	Ni
Na ⁺ , K ⁺ , NH ₄ ⁺ Mg ²⁺	100	99±3 ^a	96±2 ^a	91±1 ^a	100±2 ^a
Cl ⁻ , SO ₄ ²⁻ , CO ₃ ²⁻					

^aOrtalama±Standart sapma

Çizelge 5.4 : Tayin elementlerinin (Cu, Co, Cd, Ni) MWCNT üzerine modifiye edilmiş **ölü** *E. Coli* ile hazırlanan sorbent üzerinde alıkonmalarına yabancı iyonların etkisi. (Analit: 1 µg ml⁻¹, sorbent: 0,1 g, çözelti hacmi: 50 ml)

Yabancı İyonlar	Konsantrasyon (µg ml ⁻¹)	% Adsorpsiyon			
		Cu	Co	Cd	Ni
Na ⁺ , K ⁺ , NH ₄ ⁺ Mg ⁺	100	95±1 ^a	95±2 ^a	89±1 ^a	98±1 ^a
Cl ⁻ , SO ₄ ²⁻ , CO ₃ ²⁻					

^a Ortalama±Standart sapma

5.2. Geri Kazanma Özelliklerinin İncelenmesine Ait Sonuçlar

MWCNT üzerine modifiye edilmiş canlı veya ölü *E. Coli* ile hazırlanan sorbent tarafından adsorplanan tayin elementleri iyonlarının geri kazanımında farklı konsantrasyonlarda hazırlanan hidroklorik ve nitrik asit çözeltileri kullanılmış ve bulunan sonuçlar Çizelge 5.5 ve 5.6'da gösterilmiştir. Çizelgeden de görüldüğü gibi 0,5 mol l⁻¹ HNO₃ kullanıldığında tayin elementleri nicel olarak (>%95) geri kazanılmıştır.

Çizelge 5.5 : Tayin elementlerinin (Cu, Co, Cd, Ni) MWCNT üzerine modifiye edilmiş **canlı** *E. Coli* ile hazırlanan sorbent üzerinden geri kazanım. (Analit: 1 µg ml⁻¹, sorbent: 0,1 g, çözelti ve eluent hacmi: 25 ml)

Elüsyon Çözeltisi	Konsantrasyon (mol l ⁻¹)	% Geri Kazanım			
		Cu	Co	Cd	Ni
HCl	0,5	85±2 ^a	88±7 ^a	80±3 ^a	84±3 ^a
HCl	1	86±6 ^a	95±6 ^a	85±4 ^a	98±3 ^a
HNO ₃	0,5	98±2 ^a	98±1 ^a	97±1 ^a	96±1 ^a
HNO ₃	1	85±2 ^a	98±3 ^a	85±1 ^a	85±2 ^a

^a Ortalama±Standart sapma

Çizelge 5.6 : Tayin elementlerinin (Cu, Co, Cd, Ni) MWCNT üzerine modifiye edilmiş **ölü** *E. Coli* ile hazırlanan sorbent üzerinden geri kazanım. (Analit: 1 µg ml⁻¹, sorbent: 0,1 g, çözelti ve eluent hacmi: 25 ml)

Elüsyon Çözeltisi	Konsantrasyon (mol l ⁻¹)	% Geri Kazanım			
		Cu	Co	Cd	Ni
HCl	0,5	62±7 ^a	60±5 ^a	74±4 ^a	74±3 ^a
HCl	1	76±2 ^a	73±4 ^a	89±5 ^a	90±2 ^a
HNO ₃	0,5	97±1 ^a	97±1 ^a	98±2 ^a	99±1 ^a
HNO ₃	1	84±5 ^a	80±4 ^a	85±3 ^a	88±3 ^a

^a Ortalama±Standart sapma

5.3. Metot Validasyonu

Bulunan sonuçların gerçek örneğe uygulanarak metodun valide edilmesi için sertifikalı atık su örneği (CWW-TM) kullanılmıştır. Her biri 0,025 µg ml⁻¹ konsantrasyonda tayin elementlerini içeren referans madde 20 kat zenginleştirme yapılarak 0,5 mol l⁻¹ HNO₃ çözeltisi ile geri kazanılmış ve sonuçlar Çizelge 5.7’de gösterilmiştir. Sertifikalı atık su örneğindeki tayin elementlerinin canlı *E. Coli* ile hazırlanan sorbent tarafından adsorplanması ve daha sonra 0,5 mol l⁻¹ HNO₃ çözeltisi ile geri kazanılmaları neticesinde bulunan sonuçlar ölü *E. Coli* ile hazırlanan sorbente kıyasla daha yüksek bulunmuştur.

Çizelge 5.7 : Sertifikalı referans atık su numunesi (CWW-TM) içerisindeki Cu, Co, Cd ve Ni miktarları. (Sorbent: 0,1 g, çözelti hacmi: 250 ml, eluent hacmi: 12,5 ml)

Element	Konsantrasyonlar ($\mu\text{g ml}^{-1}$)			% Geri Kazanımlar	
	Referans Değerler	Bulunan Değerler			
			Canlı	Ölü	Canlı
Cu	0,0250	0,0243±0,001	0,0245±0,001	97	98
Co	0,0250	0,0242±0,003	0,0241±0,002	97	96
Cd	0,0250	0,0246±0,002	0,0245±0,001	98	98
Ni	0,0250	0,0245±0,002	0,0244±0,001	98	98

5.4. Tartışma

Atomik absorpsiyon ile eser elementlerin tayininde en büyük sorunu, tayin edilecek analit konsantrasyonun çok düşük olması ve matriks ortamından kaynaklı girişimler nedeni ile tayinin doğru yapılamaması teşkil etmektedir. Bu nedenle, bu çalışmada çok yüzeyli karbon nanotüp (MWCNT) üzerine canlı veya ölü olarak tutturulmuş *Escherichia Coli* bakteri hücresi sorbent madde olarak seçilmiş ve eser elementlerin tayini öncesi sulu çözeltilerden ayrılması/zenginleştirilmesi amacı ile başarıyla kullanılmıştır. Tayin elementlerinin (Cu, Co, Cd ve Ni) modifiye edilmiş sorbent tarafından adsorpsiyonu pH'a bağlıdır ve en iyi adsorpsiyon pH= 7.0-8.0 arasında elde edilmiştir.

Daha önceden yapılan benzer çalışmalarda kolon yöntemi kullanılırken bu çalışmada filtre-şırınga sistemi kullanılmıştır. Bu yöntemde şırıngaya takılı filtre çok yüzeyli karbon nano tüp üzerine tutturulmuş *Escherichia Coli* bakteri hücresi ile doldurulmuş ve düşük sorbent miktarı (0,1 g) ile yüksek miktarda tayin elementi adsorplama kapasitesi elde edilmiştir. Ayrıca düşük konsantrasyondaki asit çözeltisi ($0,5 \text{ mol l}^{-1} \text{ HNO}_3$) ile tayin elementleri başarılı bir şekilde geri kazanılmıştır.

Tasarlanan filtre-şırınga sistemi tayin elementlerini içeren sertifikalı atık su numunesi (Certified Waste Water - Trace Metals) ile valide edilmiş ve başarılı sonuç elde edilmiştir.

Deneysel çalışmalardan elde edilen sonuçlar doğrultusunda canlı *Escherichia Coli* bakteri hücresi tutturulmuş MWCNT modifiye sorbentin, ölü *Escherichia Coli* bakteri hücresi tutturulmuş MWCNT modifiye sorbent maddesine göre tayin elementlerini daha yüksek miktarda adsorpladığı ve geri kazanımın daha iyi olduğu gözlemlenmiştir. Bu da bize canlı bakteri hücresinin modifikasyonun daha iyi sonuç verdiğini ve ölü bakteri hücresi ile yapılan modifikasyonun bakteri hücrelerinin cansız hale getirilmesi ile hücre duvarlarının zarar görmesi sonucu yüzeysel adsorplama yetilerini kaybedebileceğini göstermiştir.

Çok yüzeyli karbon nanotüp üzerine tutturulmuş *Escherichia Coli* bakteri hücresi ile tasarlanan filtre-şırınga tekniğinin bakır, kobalt, kadmiyum ve nikelin alevli atomik absorpsiyon spektrometresi ile tayini öncesi ayrılma ve zenginleştirilmesi için pratik ve basit kullanımı, hızlı, kesin ve duyarlı bir yöntem olması sistemin en büyük avantajıdır.

KAYNAKLAR

- [1] Madrid, Y. ve Camara , C., 1997. Biological Substrates for Metal and Preconcentration and Speciation, *Trends in Anal.Chem.*, **16**, 36-44.
- [2] Mahan, C.A. ve Holcombe, J.A., 1992. Immobilization of Algae Cells on Silica Gel and Their Characterization for Trace Metal Preconcentration, *Anal. Chem.*, **64** (17), 1933-1940.
- [3] Bağ H., Lale, M. ve Türker A. R., 2000. Determination of Cu, Zn, Fe, Ni and Cd by flame atomic absorption spectrophotometry after preconcentration by *Escherichia coli* immobilized on sepiolite, *Talanta*, **51**, 1035–1043.
- [4] Maquieria, A., Elmahadi, H.A.M. ve Puchades, R., 1994. Use of *Sacchar. cerevisiae* in Flow Injection Atomic Absorption Spectrometry for Trace Metal Preconcentration, *Anal. Chem.*, **66** (9), 1462-1467.
- [5] Lale, M., Şahin, N., Temoçin, Z., 2005. Adsorption of Fe²⁺ ions with *Saccharomyces cerevisiae* immobilized Pumice stone, *G.U. Journal of Science*, **18**(3), 365-373.
- [6] Mahan, C.A. ve Holcombe, J.A., 1992. Preconcentration of Trace Metals Using Silica-Immobilized Algae Cells in a Chromatographic Separation Procedure, *Spectrochimica Acta*, **47B**, 1483-1490 .
- [7] Kaiser, H., 1973. Guiding concepts relating to trace analysis, *Pure Appl. Chem.*, **34**,35-61.
- [8] Yavuz, O., Aksoy, A., 2006. Örnek hazırlamada katı faz ekstraksiyonu metodu, *F.Ü.Sağlık Bil. Dergisi*, **20**(3), 259–269.
- [9] Sarıkaya, Y.,1997. Fizikokimya, Gazi Büro, Ankara.
- [10] Kuyucak, N. ve Volesky, B., 1988. Biosorbents for recovery of metals from industrial solutions, *Biotechnology Letters*, **10** (2), 137-142.
- [11] İleri, R., Sümer, B. ve Şengörür, B., 1993. Biyosorpsiyon Kinetiği ve İzotermlerinin Araştırılması, *Çevre Dergisi*, **7**, Nisan.
- [12] Welz, B. ve Sperling, M., 1999. Atomic Absorption Spectrometry, 3rd Completely Revised Edition, Wiley-VCH, Weinheim.
- [13] Welz, B., 1985. Atomic Absorption Spectrometry, 2nd Ed., Federal Republic of Germany, Weinheim.
- [14] Skoog, D.A., Holler, F.J. ve Nieman, T.A., 1998. Principles of Instrumental Analysis, Sounders College Publishing, Philadephia.
- [15] Akman, S., 1980. Atomik absorpsiyon spektroskopisinde grafit fırında (HGA-74) atomlaşma mekanizmasının incelenmesi, *Doktora Tezi*, Hacettepe Üniversitesi, Ankara.

- [16] **Lajunen, J.L.H.J.**, 1992. Spectrochemical Analysis by Atomic Absorption and Emission, The Royal Society of Chemistry, Cambridge.
- [17] **Gündüz, T.**, 1990. İstrumental Analiz, Bilge Yayıncılık, Ankara.
- [18] **Yıldız, A., Genç, Ö. ve Bektaş, S.**, 1997. Enstrümental Analiz Yöntemleri, Hacettepe Üniversitesi Yayınları, Ankara.
- [19] **Harnly, J.M., Smith, C.M.M., Wiechems, D.N., Ivaldi, J.C., Lundberg, P.L. ve Radziuk, B.**, 1997. Use of a segmented array charge coupled device detector for continium source atomic absorption spectrometry with graphite furnace atomization, *J. Anal. At. Spectrom.*, **12**, 617-627.
- [20] **Harnly, J.M.**, 1999. The future of atomic absorption spectrometry: a continium source with a charge coupled array dedectororbances, *J. Anal. At. Spectrom.*, **14**, 137-146.
- [21] **Schuetz, M.**, 1997. Investigations into the effect of the correction for background absorption in continium souce atomic absorption, *Ph. D. Thesis*, Technical University of Berlin, Germany.
- [22] **Baysal, A.**, 2005. Slurry tekniği ile eser elementlerin zenginleştirilmesi ve atomik absorpsiyon spektrometrisi ile tayini, *Yüksek Lisans Tezi*, İ.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [23] **Braun, R.D.**, 1987. Introduction to Instrumental Analysis, McGraw - Hill International Editions, Singapore.
- [24] **Jackson, W.K.**, 1999. Electrothermal Atomization for Analytical Atomic Spectrometry, John Wiley&Sons, New York.
- [25] **Yıldız, A. ve Genç, Ö.**, 1993. Enstrümental Analiz Yöntemleri, Hacettepe Üniversitesi Yayınları, Ankara.
- [26] **Skoog, D.A.**, 1985. Principles of Instrumental Analysis, 3rd Ed., CBS College Publishing, New York. Sounders College Publishing, Philadephia.
- [27] **Bağ, H., Lale, M. ve Türker, A. R.**, 1998. Determination of iron and nickel by flame atomic absorption spectrophotometry after preconcentration on *Saccharomyces cerevisiae* immobilized sepiolite, *Talanta* , **47**, 689–696.
- [28] **Bağ, H., Lale, M. ve Türker, A. R.**, 2000. Separation and speciation of Cr(III) and Cr(VI) with *Saccharomyces cerevisiae* immobilized on sepiolite and determination of both species in water by FAAS, *Talanta* , **51**, 895–902.
- [29] **Tüzen, M. ve Soylak, M.**, 2007. Multiwalled carbon nanotubes for speciation of chromium in environmental samples, *Journal of Hazardous Materials*, **147**, 219–225.
- [30] **Tüzen, M., Saygi, K. Ö., Usta, C., Soylak, M.**, 2008. Pseudomonas aeruginosa immobilized multiwalled carbon nanotubes as biosorbent for heavy metal ions, *Bioresource Technology*, **99**, 1563–1570.

- [31] **Robles, L.C. ve Aller, A.J.**, 1994. Preconcentration of Beryllium on the Outer Membrane of *Escherichia coli* and *Pseudomonas putida* Prior to Determination by Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry, *J. Anal. A.Spectrum.*, **9**, 871-878.
- [32] **Özer, A. ve Özer, D.**, 1998. Nikel(II) iyonlarının iki kademeli kesikli kapta *Cladophora crispata* ile giderilmesi, *J. of Engineering and Environmental Science*, **22**, 305-313.

ÖZGEÇMİŞ



Ad Soyad : Nihat AYDEMİR

Doğum Yeri ve Tarihi : Çorum / 20.01.1983

Lisans Üniversite : Marmara Üniversitesi / Kimya Bölümü