
Derleme Makalesi / Review Article

Hücre Dışı Polimerik Maddeler

Engin GÜRTEKİN^{1*}, Selman BULAK¹, Ergin TAŞKAN¹

¹Fırat Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Çevre Mühendisliği Bölümü, ELAZIĞ

Öz

Hücre dışı polimerik maddeler (HPM), mikroorganizmalar tarafından salgılanan, hücre parçalanmasından üretilen yüksek moleküler ağırlıklı kompleks bir polimer karışımından ve atıksudan adsorbe edilen organik maddelerden oluşmaktadır. HPM'nin başlıca bileşenleri (karbonhidratlar, proteinler, humik maddeler ve nükleik asitler) ve karakteristikleri (adsorpsiyon, biyolojik parçalanabilirlik ve hidrofilitik/hidrofobiklik) mikrobiyal agregaların özelliklerini önemli ölçüde etkilemektedir. HPM, çok kompleks özelliklere sahip olduğundan biyolojik atıksu arıtma tesislerindeki rollerini tam olarak anlamak için çok çalışma yapılması gerekmektedir. Bu çalışmada; HPM'nin bileşenleri ve dağılımı, HPM'nin karakteristikleri, HPM üretimine etki eden faktörler, HPM ekstraksiyonu, HPM analiz yöntemleri, mikrobiyal agregalarda HPM'nin rolü başlıkları altında HPM ayrıntılı olarak verilmiştir.

Anahtar kelimeler: Hücre Dışı Polimerik Maddeler (HPM), Çamur, Atıksu, Adsorpsiyon, Hidrofilitik/Hidrofobiklik.

Extracellular Polymeric Substances

Abstract

Extracellular polymeric substances (EPS) are a complex high-molecular-weight mixture of polymers excreted by microorganisms, produced from cell lysis and adsorbed organic matter from wastewater. Their characteristics (e.g., adsorption abilities, biodegradability and hydrophilicity/hydrophobicity) and the contents of the main components (e.g., carbohydrates, proteins, humic substances and nucleic acids) in EPS are found to crucially affect the properties of microbial aggregates. However, as EPS are very complex, much work is still required to fully understand their precise roles in the biological treatment process. A review concerning the composition and distribution, characterization, factors influencing production, extraction of EPS, analysis methods of EPS and role of EPS in microbial aggregates is given in this paper.

Keywords: Extracellular Polymeric Substances (EPS), Sludge, Wastewater, Adsorption, Hydrophilicity/Hydrophobicity.

1. Giriş

Hücre dışı polimerik maddeler (HPM); başlıca mikroorganizmaların yüksek moleküler ağırlıklı salgılarından, hücre parçalanması ürünlerinden ve makromoleküllerin hidrolizinden meydana gelmektedir. HPM'nin yapısına atıksuda bulunan bazı organik maddeler de adsorbe olmaktadır [1,2]. HPM'nin başlıca bileşenleri; karbonhidrat, protein, yağ, nükleik asit ve çeşitli heteropolimerlerdir [3]. HPM; bileşenlerinden dolayı, adsorpsiyon, biyolojik parçalanabilirlik ve hidrofilitik/hidrofobik özellikler göstermektedir [4]. HPM'nin temel fonksiyonları; bakteri hücrelerinin agregasyonu, yüzeylere yapışma, flok ve biyofilmlerin oluşumu, hücre-hücre birleşmesi, biyofilmlerin yapısal elemanları, hücreler için koruyucu bariyer ve hücrelerin kurumasını minimize etmek için su tutma, hücre dışı organik bileşenlerin sorpsiyonu, inorganik iyonların sorpsiyonu, enzimatik aktiviteler ve enzimlerle polisakaritlerin etkileşimidir [5].

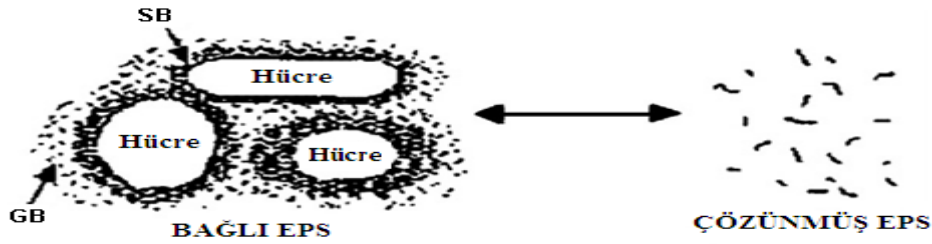
* Sorumlu yazar: egurtekin@firat.edu.tr

Geliş Tarihi:12/10/2017 Kabul Tarihi:18/01/2018

Hücre dışında mevcut olan HPM formları; bağlı HPM (kılıflar, kapsül polimerler, yoğun jeller, gevşek bağlı polimerler ve tutunmuş organik materyaller) ve çözülmüş HPM (çözülmüş makromoleküller, kolloidler ve salgılar) olarak ikiye ayrılabilir [1]. Bağlı HPM, hücrelerle sıkı bir biçimde bağlı iken, çözülmüş HPM hücrelerle zayıf olarak bağlıdır. Genel olarak, bu iki HPM tipi birbirinden santrifüj yardımıyla ayrılabilir. Çözülmüş HPM sıvının üstünde kalırken, bağlı HPM mikrobiyal pelletler oluştururlar. Çözülmüş HPM ve hücreler arasındaki bağ çok zayıf olmasına rağmen, önceki çalışmalar çözülmüş HPM'nin mikrobiyal aktivite ve çamurun yüzeysel karakteristiklerine önemli bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir [6]. Bağlı HPM'nin yapısı genel olarak iki tabakalı olarak gösterilmektedir (Şekil 1) [1]. İç tabaka, belirli bir şekle sahip olan sıkı bağlı HPM (SB-HPM)'den ibarettir ve hücre yüzeyine sıkı ve sabit olarak bağlıdır. Dış tabaka, dağılıbilir salgı tabakası biçiminde olan gevşek bağlı HPM (GB-HPM)'den ibarettir. Mikrobiyal agregalarda GB-HPM muhtevası SB-HPM muhtevasından daha az olmakla birlikte, mikrobiyal agregaların karakteristiklerine belirgin etkileri bulunmaktadır [7].

Biyolojik atıksu arıtma sistemlerinde mikroorganizmaların çoğu çamur flokları, biyofilmler ve granüler gibi mikrobiyal agregalar formunda mevcuttur [8]. HPM; saf kültür, aktif çamur, granüler çamur ve biyofilmlerde saptanabilmekte ve çeşitli elektron mikroskopu teknikleri kullanılarak gözlenebilmektedir. HPM; mikrobiyal agregaların özellikleri ve fonksiyonları üzerinde önemli etkileri bulunduğu için, hem biyolojik atıksu arıtımının anlaşılması hem de işletme şartlarının optimize edilerek bu tesislerin iyileştirilmesi bakımından ayrıntılı olarak çalışılması konusunda büyük bir ilgi görmektedir [8].

Bu çalışmada; HPM'nin bileşenleri ve dağılımı, HPM'nin karakteristikleri, HPM üretimine etki eden faktörler, HPM ekstraksiyonu, HPM analiz yöntemleri, mikrobiyal agregalarda HPM'nin rolü başlıkları altında HPM ayrıntılı olarak incelenmiştir.



Şekil 1. HPM yapısı [1]

2. Hücre Dışı Polimerik Maddelerin Bileşenleri ve Boyutsal Dağılımı

HPM'nin başlıca bileşenleri karbonhidratlar ve proteinlerdir. Hüyük bes maddeleri de HPM'nin anahtar bileşenlerinden biridir ve yaklaşık olarak 20 % oranında bulunmaktadır [9,10]. Ayrıca; yağlar, nükleik asitler, üronik asitler ve bazı inorganik bileşenler de HPM muhtevasında bulunmaktadır [10,11]. HPM bileşenlerinin bulunma oranları, ekstraksiyon yöntemlerine ve çamur yapısına bağlıdır.

Çeşitli mikrobiyal agregalardan ekstrakte edilen HPM'nin muhtevası ve bileşeni heterojendir [5]. Ekstrakte edilen HPM'nin bileşenindeki farklılık; kültür, büyüme fazı, proses parametresi, biyoreaktör tipi, ekstraksiyon yöntemi ve kullanılan analitik yöntemler gibi birçok faktöre bağlıdır [1].

HPM'nin boyutsal dağılımı da heterojendir. HPM; biyofilmin başlıca yapı bileşeni olup, biyofilm derinliğindeki tabakalarda dağılmıştır ve onların miktarı biyofilm derinliği boyunca değişmektedir [12]. HPM bileşenlerinin dağılımları da heterojendir. HPM dağılımı, mikrobiyal agreganın tipine, yapısına ve kökenine bağlı olarak değişkenlik göstermektedir.

3. Hücre Dışı Polimerik Maddelerin Karakteristikleri

3.1. Adsorpsiyon

Mikrobiyal agregalarda HPM'nin protein bileşeninde aromatikler, alifatikler ve karbonhidrat bileşeninde hidrofobik kısımlar gibi metaller ve organik maddelerin adsorpsiyonu için gerekli birçok

içerik bulunmaktadır [13]. Bu, ağır metalin bakteri hücrelerine bağlanması ve salınmasında HPM'nin mevcut rolünü göstermektedir [14,15]. HPM yapısında karboksil, fosforil, sülfidril, fenolik ve hidroksil gibi birçok fonksiyonel anyonik grubun bulunmasından dolayı ağır metallerle kompleks oluşturabilmektedir [16,17]. Karboksil ve hidroksil grupların mevcut sayılarına dayanarak, HPM'nin çok yüksek bir bağlayıcı kapasiteye sahip olduğu görülmektedir [18]. HPM'de bulunan proteinler, karbonhidratlar ve nükleik asitler ağır metallerle kompleks oluşturma kabiliyetine sahiptir [19,20]. HPM ile ağır metaller arasındaki bağlama kabiliyeti ve bağların kuvvetinin güçlü olduğu bilinmektedir ve adsorpsiyon, Langmuir ve Freundlich denklemlerine uymaktadır [20,21]. Ayrıca, çözünmüş HPM bağlı HPM'e göre ağır metallerin adsorpsiyonunda daha fazla etkilidir [22].

Ca^{+2} ve Mg^{+2} gibi iki değerlikli kanyonlar ve HPM arasındaki bağlayıcılık, mikrobiyal agrega yapısının korunmasındaki temel iç moleküler çekimlerden biridir [23]. HPM, daima negatif yüklüdür ve elektrostatik çekim yoluyla pozitif yüklü organik kirleticileri bağlayabilmektedir [24]. Bunun yanında; proteinler, hümmik besi maddelerinden daha yüksek bağlayıcılık kuvveti ve kabiliyetine sahiptir.

3.2. Biyolojik parçanabilirlik

HPM, bakteriler tarafından karbon ve enerji kaynağı olarak da kullanılabilir. Genellikle, HPM'nin başlıca bileşenleri karbonhidratlar ve proteinler olup, biyolojik atıksu arıtma reaktörlerinde bu polimerlerin parçalanması için gerekli enzimler çokça bulunmaktadır. Aktif çamurdaki bakteriler, metabolik aktivite için diğer bakteriler tarafından salgılanan HPM'i kullanabilmektedirler [25]. Park ve Novak [26], çeşitli yöntemler kullanarak çamurdan ekstrakte edilen HPM'nin farklı biyolojik parçalanabilirliğe sahip olduğunu belirtmişlerdir. Örneğin; kanyon değiştirme reçine yöntemi kullanarak ekstrakte edilen HPM aerobik olarak parçalanabilir iken, sülfid yöntemi kullanarak ekstrakte edilen HPM anaerobik olarak parçalanabilir. HPM parçalanmasının bir sonucu olarak üretilen küçük moleküler besi maddeleri, nutrient yetersizliği durumunda hücre büyümesi için karbon ve enerji kaynağı olarak kullanılabilir.

3.3. Hidrofiliklik/hidrofobiklik

Mikrobiyal agregalarda HPM, birçok yük grubuna (karboksil, sülfidril, fenolik ve hidroksil gruplar) ve apolar gruba (proteinlerde aromatikler, alifatikler ve karbonhidratlarda hidrofobik bölgeler) sahiptir [13]. HPM moleküllerinde bulunan hidrofilik ve hidrofobik gruplardan dolayı, HPM amfoteriktir. Bu iki grubun nispi oranı HPM'nin kompozisyonuna bağlıdır. HPM'nin hidrofiliklik/hidrofobiklikliği, mikrobiyal agregaların hidrofobikliğini ve biyoreaktörlerdeki oluşumunu önemli şekilde etkileyebilmektedir [2].

4. Hücre Dışı Polimerik Maddelerin Üretimine Etki Eden Faktörler

4.1. Büyüme fazı

HPM üretimi; büyümeye bağlı ya da bağımsız olabilmektedir [27]. Belirli şartlar altında HPM üretimi, mikrobiyal hücrelerden salgılanmanın ve tüketiminin sonucunda gerçekleşmektedir. Hücre büyümesi ve HPM üretimi arasındaki ilişki birçok çalışmada belirtilmiştir. Bununla beraber, literatürde belirtilen sonuçlar arasında az da olsa farklılıklar bulunmaktadır.

4.2. Karbon ve azot

HPM üretimi, besi maddesi tipine yani karbon ve azot kaynağına bağlıdır. Nutrient değerleri, HPM üretimi ve kompozisyonunda önemli bir etkiye sahiptir. Çamurun HPM muhtevası besi maddesi/mikroorganizma (F/M) oranıyla doğru orantılıdır [28]. Çünkü, HPM üretimi mikroorganizmaların büyümesine ve besi maddesi tüketimine bağlıdır.

HPM üretimi, C/N oranı ile de ilişkilidir. C/N oranı, mikrobiyal metabolizma üzerinde büyük bir etkiye sahip olduğundan HPM üretiminde de önemli bir yere sahiptir. Gerçekte C/N oranı, HPM üretiminde karbon ve azot kaynağına göre daha kritik öneme sahiptir. Literatürde, HPM üretimi için

optimum bir C/N oranı bulunmamaktadır. Bu, karbon, azot kaynaklarının ve mikroorganizmaların farklı olmasından kaynaklanmaktadır.

4.3. pH

pH, HPM üretimini önemli ölçüde etkilemektedir. Bununla beraber; HPM üretimine pH'ın etkisi, farklı mikroorganizmalar, işletme şartları ve ortam kompozisyonu ile değişmektedir [29]. Genel olarak; HPM üretimi için optimal ortam pH'ı 5 ile 7 arasında değişmektedir. Çeşitli mikroorganizmalar farklı ortamlar için pH 7'de HPM üretme kabiliyetine sahiptirler [30]. HPM üreten mikroorganizmaların çoğu maksimum HPM üretimi için sabit bir pH değerine ihtiyaç duyarlar. Mikroorganizmaların bazıları ise, asidik pH değerlerinde (5.5-6.5) daha fazla HPM üretmektedirler [31]. Ortamın ekstrem pH'ı (2-3 veya 10'dan büyük değerler) HPM biyosentezini etkilemektedir [32]. pH, HPM'nin moleküler ağırlık dağılımını da etkilemektedir. Düşük miktarda nispeten yüksek moleküler ağırlıklı HPM düşük pH değerlerinde elde edilirken, yüksek miktarda nispeten düşük moleküler ağırlıklı HPM daha yüksek pH değerlerinde elde edilmektedir [29].

4.4. Sıcaklık

Sıcaklık, HPM üretimini etkileyen en önemli parametrelerden biridir [5]. Mikroorganizmaların çoğunun aerobik şartlarda 25-30 °C sıcaklık aralığında daha yüksek konsantrasyonda HPM ürettiği belirtilmektedir. Buna zıt olarak, -2 °C ile 42 °C sıcaklık aralığında da HPM üretimi gözlenmiştir [5,33]. Maksimum HPM üretimi için optimum büyüme sıcaklığı, bakteri zincirine ve bakterinin doğal ortam sıcaklığına bağlıdır [5].

4.5. Metal iyonları

HPM, çok değerlikli metallerle iyon köprüleri oluşturarak hücrelerle bağlandıkları için, metal konsantrasyonu HPM muhtevasını da etkileyebilmektedir. Turakhia ve Characklis [34] ile Sheng ve ark. [35], Ca²⁺ konsantrasyonunun HPM üretimine etkisinin olmadığını belirtmişlerdir. Higgins ve Novak [36], daha yüksek Ca²⁺ ve Mg²⁺ konsantrasyonlarında HPM'nin protein bileşeninin arttığını ve daha yüksek Na⁺ konsantrasyonlarında ise protein bileşeninin azaldığını bulmuşlardır. Çamura beslenen Fe konsantrasyonunun artmasıyla, HPM karakteristikleri ve bileşenleri de değişebilmektedir [37]. Toksik besi maddelerin konsantrasyonu kritik değer altındayken HPM üretimine etkisi daha az olmaktadır [38]. Ağır metal gibi toksik besi maddelerin varlığında, aktif çamur ve biyofilmlerdeki mikroorganizmalar zorlu çevresel şartlardan kendilerini korumak için daha fazla HPM üretmektedirler [19,39]. Ayrıca, toksik şartlar altında HPM'nin protein bileşenindeki artış diğer bileşenlere göre daha fazladır.

4.6. Aerobik ve anaerobik şartlar

Aerobik ve anaerobik şartlar, HPM üretimini etkileyebilmektedir. HPM muhtevası anaerobik şartlarda azalmaktadır [40]. Aktif çamur floklarının, oksijen konsantrasyonunun sınırlayıcı ve besi maddesinin olmadığı şartlarda parçalanmaya meyilli olduğu belirtilmektedir. Böyle bir parçalanma, HPM üretiminin baskılanması veya HPM hidrolizi ile sonuçlanabilir.

5. Hücre Dışı Polimerik Maddelerin Ekstraksiyonu

HPM ekstraksiyonunun etkili olabilmesi için hücre parçalanması minimum olmalı ve HPM yapısı bozulmamalıdır [10]. Ekstraksiyon verimi; bir hücrenin toplam organik maddesinden ekstrakte edilen HPM'nin toplam miktarı veya toplam HPM muhtevasından ekstrakte edilen HPM'nin toplam miktarı olarak tanımlanabilir [1]. HPM ekstraksiyon verimi, kullanılan ekstraksiyon yöntemine göre önemli ölçüde değişiklik göstermektedir.

HPM ekstrakte edildiği zaman hücre parçalanması da gerçekleşmektedir. Bununla beraber, ekstraksiyon sırasında meydana gelen hücre parçalanmasının büyüklüğünü tayin etmek zordur. Bazı çalışmalarda, hücre parçalanmasının göstergesi olarak HPM'nin protein ve nükleik asit muhtevası

kullanılmıştır [41]. Fakat, HPM yapısının büyük miktarda protein ve az miktarda nükleik asit içerdiği ortaya koyulduğundan, her iki makromolekül de doğru bir gösterge değildir. Ayrıca, HPM’de nükleik asit muhtevası genellikle çok düşük olduğundan, HPM ekstraksiyonundan sonra yüksek miktarda nükleik muhtevası belli ölçüde hücre parçalanmasına işaret eder. Adenozin trifosfat ve glikoz-6-fosfat dehidrogenaz gibi hücre içi enzimler hücre içinin belirlenmesinde kullanılabilirler [10]. Mikroskopik yöntemlerle birlikte hücre sayımı ve canlı/ölü hücre sayımı veya boyama metotları da hücre parçalanmasını değerlendirmede kullanılmaktadır. Bu, hücre duvarının bütünlüğüne bağlıdır ve buradan hücre duvarı dağılımı hücre içi muhtevanın salımını ifade eder. Bununla beraber; bu, hücreden salınan hücre içi maddeleri tayin etmek yerine sadece hücrelerin parçalanıp parçalanmadığını tayin etmede kullanılabilir.

Tipik bir ekstraksiyon işlemindeki adımlar şöyle sıralanabilir [1]: (1) Örnek alma, depolama, yıkama ve homojen hale getirmeden ibaret bir ön arıtım. Bu adım mikrobiyal hücrelerin dağılmasını sağlar. Biyofilm ve mikrobiyal granüllerden HPM ekstraksiyonu için homojen hale getirme işlemi daima gereklidir. (2) Ön arıtım adımından sonra HPM ekstraksiyonu. (3) Analiz için saflaştırma işlemi. Bu adımların içinde ikinci adım önemlidir. HPM bileşenleri, uygun bir ekstraksiyon işlemi kullanılarak ekstrakte edilmelidir. Çözülmüş HPM için, daima santrifüjleme kullanılmaktadır, burada bağlı HPM için ise farklı ekstraksiyon yöntemleri geliştirilmekte ve yeni yöntemler de bulunmaya devam etmektedir [1]. Ekstraksiyon yöntemleri; fiziksel yöntemler, kimyasal yöntemler ve fiziksel ve kimyasal yöntemlerin kombinasyonu olarak sınıflandırılabilir. Fiziksel ekstraksiyon yöntemlerinde; hücrelerden HPM’i ayırmak ve çözümlüde çözmek için ultrason, santrifüjleme ve ısı genellikle kullanılmaktadır. Kimyasal ekstraksiyon yöntemleri; HPM’nin çözünürlüğü hızlandırmak ve HPM ile hücre arasında bağlayıcı kuvvetleri dağıtmak için kimyasal bileşiklerin ilavesini içermektedir. En iyi ekstraksiyon yöntemi, HPM bileşenlerini bir arada tutan kuvvetlerin tipine bağlıdır. HPM yapısında polimerlerin bağlayıcılığında etkili olan kuvvetler; van der Waals kuvvetleri, elektrostatik etkileşim, hidrojen bağları, hidrofobik etkileşim [42] ve bazı durumlarda glikoproteindeki disülfid bağları olarak kovalent bağlar’dır [43]. Etkin kuvvetler, HPM yapısına bağlı olarak değişmektedir. Bu nedenle, farklı ekstraksiyon yöntemleri denenmelidir [44]. Genel olarak; fiziksel ekstraksiyon yöntemlerinin ekstraksiyon verimleri kimyasal ekstraksiyon verimlerinden daha azdır.

Çok sayıda yöntem, saf veya karışık kültürlerden HPM’i ekstrakte etmek için geliştirilmiş ve uygulanmıştır. Katyon değiştirme reçinesi [10], EDTA [45] ve HCHO/NaOH [46] gibi kimyasal yöntemlerin ekstraksiyon verimleri fiziksel yöntemlerden daha yüksektir. Fakat kimyasal ilavesi, ekstraksiyon işleminde ve sonrasındaki HPM analizinde belirli problemler meydana getirmektedir. Alkali işlem, belirli ölçüde hücre parçalanmasına ve makromoleküllerin parçalanmasına neden olabilmektedir. EDTA yöntemi, yüksek ekstraksiyon verimine sahip olup düşük hücre parçalanmasına neden olmaktadır. Bununla beraber; artık EDTA, HPM ekstraksiyonunu bozabilir [47] ve daha sonra Lowry yöntemiyle protein tayininde girişime neden olabilir. EDTA ile ekstraksiyon yönteminde daima diyaliz gereklidir. HCHO/NaOH ekstraksiyon yönteminde HCHO dozajı, HPM karakteristiklerini değiştirip, karbonhidrat tayininde önemli girişimlere neden olmaktadır. Yüksek verim ve düşük hücre parçalanmasından dolayı katyon değiştirme reçinesi yöntemi, HPM ekstraksiyon yönteminde en yaygın şekilde kullanılan ekstraksiyon yöntemi olmuştur.

Bu yöntemlerden hiçbiri mikrobiyal yapıdan bütün HPM’i ekstrakte edememektedir. Katyon değiştirme reçinesi Ca^{2+} ve Mg^{2+} bağlı HPM için oldukça yüksek seçicilik özelliğine sahipken, sülfid ekstraksiyon yöntemi Fe bağlı HPM için seçicilik özelliğine sahiptir. Diğer taraftan, alkali ekstraksiyon işleminin bu iki yöntemden daha az spesifik olduğu bulunmuştur. Fakat Al bağlı HPM’i ekstrakte etmek için daha etkilidir [26]. Mikrobiyal yapıdan HPM’nin nicel ekstraksiyonu için ortak bir ekstraksiyon yöntemi bulunmamaktadır. Çamur karakteristikleri dikkate alınarak, her bir durum için farklı bir yöntem seçilmeli ve optimize edilmelidir. Birkaç HPM ekstraksiyon yöntemi karşılaştırılmalı ve en uygun yöntem dikkatli bir şekilde seçilmelidir. Bir kombine ekstraksiyon, farklı HPM kısımlarını ekstrakte etmek için gereklidir ve yüksek ekstraksiyon verimi elde etmek için ekstraksiyonların tekrarlanarak gerçekleştirilmesi daima gereklidir. Hücre parçalanması, birleşik ve tekrarlı ekstraksiyonlarda dikkatli bir şekilde değerlendirilmelidir [8].

6. Hücre Dışı Polimerik Maddelerin Analiz Yöntemleri

Klasik kimyasal kolorimetrik analizler, HPM'nin bileşenlerini tayin etmede kullanılabilir [48]. Genel olarak, karbonhidrat muhtevası anthrone yöntem veya fenol-sülfirik asit kullanılarak tayin edilmektedir. HPM'deki karbonhidratın tayini için iki yöntem arasında karşılaştırma yapıldığında, iki yöntemin benzer sonuçlar verdiği, fakat anthrone yönteminin varyasyon katsayısının fenol-sülfirik asit yöntemine göre daha düşük olduğu belirlenmiştir [10]. Protein muhtevası Lowry yöntem, Bradford yöntem veya toplam N muhtevası yöntemi kullanılarak tayin edilmektedir. Lowry yönteminde Bradford yöntemine göre daha fazla ürün kazanımı söz konusudur [10]. Toplam azot muhtevası daha doğru bir yöntemdir, fakat yapılan işlemler kompleksdir. Böylece, Lowry yöntem HPM karakterizasyonu çalışmalarında protein analizinde sıklıkla kullanılmaktadır. Hümik asitlerin fenolik fonksiyonel grupları Lowry çözeltileri ile reaksiyona girdiğinden, uygun düzeltmeler daima gereklidir.

Hümik besi maddeleri çok kompleksdir ve HPM'de bulunan muhtevalarını tayin etmek için birkaç yöntem mevcuttur. Frolund ve ark. [9], protein girişimini engelleyerek hümik besi maddesi muhtevasını tayin etmek için değiştirilmiş Lowry yöntemini önermişlerdir. Üronik asit muhtevası, m-hidroksidifenil sülfirik asit yöntemi kullanılarak ölçülebilmektedir [49]. DNA ve nükleik asit muhtevası; DAPI floresan yöntemi [10], UV absorbans yöntemi [45] veya difenilamin yöntemi [46] kullanılarak ölçülmektedir. UV absorbans yönteminin uygulanması kolaydır, ancak yöntemde proteinler ile girişim söz konusudur. DNA hesaplama çalışmalarında DAPI yöntemi uygundur, ancak işlemler kompleksdir. Bu nedenle, difenilamin yöntemi daha güvenilir ve yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.

Kompleks bileşenler; HPM şeklini, yapısını, dağılımını ve fonksiyonlarını analiz etmeyi zorlaştırmaktadır. Bununla beraber, analitik kimyadaki gelişmeler ile birlikte HPM karakterizasyonu için yeni enstrümental teknikler ortaya çıkmıştır. Bundan dolayı, HPM'nin yapısal ve fonksiyonel özellikleri ile çevresel durumu hakkında çok fazla bilgi edinilmiştir. Kromatografi, kütle spektrometresi ve onların kombinasyonu HPM bileşenlerinin nitel ve nicel analizinde kullanılabilir [11]. X-ray fotoelektron spektroskopisi [50,51], Fourier dönüşüm kızılötesi spektroskopisi [50,52], 3 boyutlu uyarılma-emisyon matris floresan spektroskopisi [53,54] ve nükleer manyetik rezonans [55,56]. gibi spektroskopi yöntemleri HPM ve mikrobiyal yapıda bulunan k-fonksiyonel grupları ve element kompozisyonunu belirlemek için kullanılabilir. HPM, büyük miktarlarda aromatik yapılar ve floresan karakteristiklere sahip çeşitli fonksiyonel grupları bulunan doymamış yağ zincirleri içermektedir. Hızlı, seçicilik özelliğine sahip ve hassas bir teknik olarak 3 boyutlu uyarılma-emisyon matris floresan spektroskopisi HPM'nin fizikokimyasal özelliklerini belirlemede faydalı bir yöntemdir. Çünkü, floresan karakteristikleri moleküllerdeki yapısal ve fonksiyonel gruplara büyük ölçüde bağlıdır. Yüksek hassasiyet, iyi seçicilik özelliğine sahip olmaları ve çamur numunelerin bozulmamasından dolayı bu spektroskopi yöntemleri HPM'nin fonksiyonel gruplarındaki değişimlerden HPM'deki adsorplanmış kirleticileri karakterize etmeye kadar geniş bir alanda kullanılabilir [50,54,55].

7. Mikrobiyal Agregalarda Hücre Dışı Polimerik Maddelerin Rolü

7.1. Flokülasyon

HPM, atıksu arıtma sistemlerinin flokülasyon proseslerinde etkin bir faktördür. HPM, mikrobiyal agregaların yapısında ve hücreler arasındaki etkileşimde yer almaktadır. Van der Waals kuvvetleri ve hidrojen bağlarına [23] ilaveten, polimer yoğunluğu [57], HPM ile iyon bağları ve elektrostatik çekimi [58] içeren hücreler arasındaki başlıca moleküler içi etkileşim, mikrobiyal agregaların stabilitesine katkı sağlamaktadır. HPM belli bir büyüklüğe kadar mikrobiyal agregaların stabilitesinde etkilidir. Çamurda daha büyük HPM muhtevası olması daha büyük çamur stabilitesiyle sonuçlanır [57].

Flokülasyonda HPM bileşenlerinin rolü de önemlidir. Protein, karbonhidrat ve nükleik asitler flokülasyonda önemli rol oynamaktadır. Wilen ve ark. [59], protein muhtevasında artış veya hümik besi maddesi muhtevasında azalma ile çamurun flokülasyon kabiliyetinin arttığını ve toplam HPM muhtevasındaki artışla azaldığını bulmuşlardır. Bu sonuçlar, mikrobiyal agregaların flokülasyonuna her bir HPM bileşeninin etkisinin kompleks olduğunu göstermektedir. HPM bileşenlerinin oranlarının mikrobiyal flokülasyonda etkisi daha fazladır [60].

Çok değerlikli katyonlar ile HPM arasındaki iyon bağları etkileşimi de mikrobiyal flokülasyonda önemli rol oynamaktadır [61,62]. Çok değerlikli katyonlar, HPM ile köprü oluşturmakta

ve böylece mikrobiyal agregalarda flokülasyon iyileşmektedir [36,63]. Aktif çamurda tek değerlikli katyonların artışı çamur karakteristiklerini ve flok yapısını bozmaktadır [64]. Aktif çamurda dağılmış hücreler Ca^{2+} ilavesiyle yeniden floküle olma eğilimi göstermektedir [65]. Aktif çamurun flokülasyon kabiliyetini iyileştirmede çok değerlikli katyonların doğrudan ilavesi faydalı bir yaklaşımdır [66].

7.2. Kurutma

HPM, atıksu çamurunun yoğunlaştırılması ve kurutulması proseslerinde anahtar bir faktördür [67]. Yoğunlaştırma ve kurutma proseslerinde su molekülleri ve HPM arasında iki tip bağlayıcı mekanizma bulunmaktadır: elektrostatik çekim ve hidrojen bağları. Elektrostatik bağlar, HPM'nin fonksiyonel grupları ile suyun kalıcı dipolü arasında aktiftir. Hidrojen bağları ise, HPM'nin hidroksil grupları ile su molekülleri arasında aktiftir [68]. HPM, çamur kurutmada hem olumlu hem de olumsuz etkilere sahiptir. HPM muhtevası artınca çamur kurutma kabiliyeti kötüleşmektedir ki muhtemelen HPM tarafından oluşturulan sterik kuvvet hücreler arasındaki teması engellemektedir. Buna ilave olarak; HPM'deki makromoleküller çamur floklarında fazla suyun bulunmasına ve bu floklarda ara su miktarında artışa neden olmaktadır. HPM, flok gözeneklerinden suyun sızmasını engelleyen bir stabil jel de oluşturarak çamurun kurutulma kabiliyetini bozabilmektedir. HPM uzaklaştırıldıktan sonra çamur kurutma kabiliyeti iyileşebilmektedir [68,69].

Bazı çalışmalar ise, HPM muhtevasının artmasıyla çamur kurutma kabiliyetinin iyileştiğini göstermişlerdir [70,71]. Daha yüksek HPM muhtevası durumunda, aktif çamur daha düşük bir kesme hassaslığına ve dağılma derecesine sahip olacağından iyi bir çamur kurutma yeteneğine sahip olacaktır [71]. Ayrıca, HPM'nin farklı bileşenlerinin mikrobiyal agregaların kurutma kabiliyetine değişik etkileri bulunmaktadır. Proteinler, yüksek su tutma kapasitesine sahiptirler. Böylece; HPM'deki indirgenmiş protein oranı, çamur kurutma kabiliyetini iyileştirmektedir [72]. HPM'de artan karbonhidrat muhtevası ise, çamur kurutma kabiliyetini azaltmaktadır [73].

7.3. Biyosorpsiyon

HPM'nin biyosorpsiyon kapasitesi protein, karbonhidrat ve yağ muhtevasından kaynaklanmaktadır. HPM, katyonlar ve biyokütle arasında güçlü çekim kuvvetlerine neden olan farklı fonksiyonel gruplara (amino, karboksil, hidroksil ve fosfat v.s.) sahiptirler [74]. HPM yapısında bulunan toplam bağlayıcı kısımlar HPM'nin biyosorpsiyon kapasitesini vermektedir. Biyosorpsiyon; fiziksel adsorpsiyon, iyon değişimi, kompleksleşme ve çökelme gibi birçok mekanizmayı içermektedir [6]. HPM'nin biyosorpsiyon etkinliği; pH, sıcaklık, HPM ile adsorblayan arasındaki etkili temas alanına, temas süresine, iyonik kuvvete ve adsorblayan konsantrasyonuna, adsorblayanın yapısına ve mikroorganizma tipine bağlıdır [22,74].

8. Sonuçlar

HPM, biyolojik atıksu arıtma tesislerinde mikrobiyal agregalar için çok önemlidir. Bununla beraber, mikrobiyal agregaların fonksiyonları ve karakteristiklerinde HPM'nin rolü ile ilgili halen çok bilinmeyen bulunmaktadır. HPM muhtevasının yapısını, bileşenlerini ve karakteristiklerini belirlemek HPM'nin rolünü belirlemek açısından yararlı olacaktır. HPM yapısı kompleks olduğundan, HPM üretimini birçok faktör etkilemektedir. Mikrobiyal agregalarda HPM ekstraksiyonu, HPM karakteristiklerini ve HPM'nin rolünü belirlemek için bir temel teşkil etmektedir. Modern analitik tekniklerin gelişimiyle HPM bileşenlerini tespit etmek ise mümkün olacaktır. HPM'deki her bir bileşenin kendine özel bir etkisi bulunduğundan bütüncül etkinin ne olacağını belirlemek zorlaşmaktadır. Bu nedenle, mikrobiyal agregalarda HPM bileşenlerinin rolünün tespit edilmesi için yoğun çalışmalar yapılması gerekmektedir. Bu çalışmada HPM ayrıntılı olarak incelenerek, bu konuda yapılacak çalışmalara faydalı bir kaynak olması amaçlanmıştır.

Kaynaklar

1. Nielsen P.H., Jahn A. 1999. Extraction of EPS, in *Microbial extracellular polymeric substances: characterization, structure and function*, Edited by Wingender J, Neu T.R., Flemming H.C. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 49–72.
2. Liu Y., Fang H.H.P. 2003. Influence of extracellular polymeric substances (EPS) on flocculation, settling, and dewatering of activated sludge, *Critical Reviews Environmental Science and Technology*, 33: 237–273.
3. Lazarova V., Manem J. 1995. Biofilm characterization and activity analysis in water and wastewater treatment, *Water Research*, 29: 2227–2245.
4. More T.T., Yadav J.S.S., Yan S., Tyagi R.D., Surampalli R.Y. 2014. Extracellular polymeric substances of bacteria and their potetial environmental applications, *Journal of Environmental Management*, 144: 1-25.
5. Wingender J., Neu T.R., Flemming H.C. 1999. What are bacterial extracellular polymeric substances?, in *Microbial extracellular polymeric substances: characterization structures and function*, Edited by Wingender J, Neu TR, Flemming H.C. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag., 1-18.
6. Sheng G.P., Yu H.Q. 2007. Formation of extracellular polymeric substances from acidogenic sludge in H₂-producing process, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74: 208–214.
7. Li X.Y., Yang S.F. 2007. Influence of loosely bound extracellular polymeric substances (EPS) on the flocculation, sedimentation and dewaterability of activated sludge, *Water Research*, 41: 1022–1030.
8. Sheng G.P., Yu H.Q., Li X.Y. 2006. Stability of sludge flocs under shear conditions: Roles of extracellular polymeric substances (EPS), *Biotechnology and Bioengineering*, 93: 1095–1102.
9. Frolund B., Griebe T., Nielsen P.H. 1995. Enzymatic activity in the activated-sludge floc matrix, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 43: 755–761.
10. Frolund B., Palmgren R., Keiding K., Nielsen P.H. 1996. Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin, *Water Research*, 30: 1749–1758.
11. Dignac M.F., Urbain V., Rybacki D., Bruchet A., Snidaro D., Scribe P. 1998. Chemical description of extracellular polymeric substances: implication on activated sludge floc structure, *Water Science and Technology*, 38: 45–53.
12. Zhang X.Q., Bishop P.L. 2003. Biodegradability of biofilm extracellular polymeric substances, *Chemosphere*, 50: 63–69.
13. Flemming, H.C., Leis A. 2002. *Sorption properties of biofilms*, Edited by Flemming H-C, Bitton G, Vol 5, 2958–2967.
14. Guine V., Spadini L., Sarret G., Muris M., Delolme C., Gaudet J.P., Martins J.M.F. 2006. Zinc sorption to three gram-negative bacteria: combined titration, modeling, and EXAFS study, *Environmental Science and Technology*, 40: 1806–1813.
15. Hu Z.Q., Jin J., Abruna H.D., Houston P.L., Hay A.G., Ghiorse W.C., Shuler M.L., Hidalgo G., Lion L.W. 2007. Spatial distributions of copper in microbial biofilms by scanning electrochemical microscopy, *Environmental Science and Technology*, 41, 936–941.
16. Josh R.M., Juwarkar A.A. 2009. In vivo studies to elucidate the role of extracellular polymeric substances from *Azotobacter* in immobilization of heavy metals. *Environmental Science and Technology*, 43: 5884–5889.
17. Ha J., Gelabert A., Spormann A.M., Brown G.E. 2010. Role of extracellular polymeric substances in metal ion complexation on *Shewanella oneidensis*: batch uptake, thermodynamic modeling, ATR-FTIR, and EXAFS study, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 74: 1-15.

18. Guibaud G., Tixier N., Bouju A., Baudu M. 2003. Relation between extracellular polymers composition and its ability to complex Cd, Cu and Pb, *Chemosphere*, 52: 1701-1710.
19. Priester J.H., Olson S.G., Webb S.M., Neu M.P., Hersman L.E., Holden P.A. 2006. Enhanced exopolymer production and chromium stabilization in *Pseudomonas putida* unsaturated biofilms, *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 1988-1996.
20. Zhang D., Wang J., Pan X. 2006. Cadmium sorption by EPSs produced by anaerobic sludge under sulfate-reducing conditions, *Journal of Hazardous Materials*, 138: 589-593.
21. Moon S.H., Park C.S., Kim Y.J., Park Y.I. 2006. Biosorption isotherms of Pb (II) and Zn (II) on Pestan, an extracellular polysaccharide, of *Pestalotiopsis* sp. KCTC 8637P, *Process Biochemistry*, 41: 312-316.
22. Comte S., Guibaud G., Baudu M. 2006. Biosorption properties of extracellular polymeric substances (EPS) resulting from activated sludge according to their type: soluble or bound, *Process Biochemistry*, 41, 815-823.
23. Mayer C., Moritz R., Kirschner C., Borchard W., Maibaum R., Wingender J., Flemming H.C., 1999. The role of intermolecular interactions: studies on model systems for bacterial biofilms. *International Journal of Biological Macromolecules*, 26: 3-16.
24. Esparza-Soto M., Westerhoff P. 2003. Biosorption of humic and fulvic acids to live activated sludge biomass, *Water Research*, 37: 2301-2310.
25. Zhang X.Q., Bishop P.L. 2003. Biodegradability of biofilm extracellular polymeric substances, *Chemosphere*, 50: 63-69.
26. Park C., Novak J.T. 2007. Characterization of activated sludge exocellular polymers using several cation-associated extraction methods, *Water Research*, 41: 1679-1688.
27. Barker D.J., Stuckey D.C. 1999. A review of soluble microbial products (SMP) in wastewater treatment systems, *Water Research*, 33: 3063-3082.
28. Jang N, Ren X, Kim G, Ahn C. 2007. Characteristics of soluble microbial products and extracellular polymeric substances in the membrane bioreactor for water reuse, *Desalination*, 202: 90-98.
29. Shu C.H., Lung M.Y. 2004. Effect of pH on the production and molecular weight distribution of exopolysaccharide by *Antrodia camphorata* in batch cultures, *Process Biochemistry*, 39: 931-937.
30. Gandhi H.P., Ray R.M., Patel R.M. 1997. Exopolymer production by *Bacillus* species, *Carbohydrate Polymers*, 34: 323-327.
31. Lee J.W., Yeomans W.G., Allen A.L., Deng F., Gross R.A., Kaplan D.L. 1999. Biosynthesis of novel exopolymers by *Aureobasidium pullulans*, *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 5265-5271.
32. Czaczyk K., Myszk K. 2007. Biosynthesis of extracellular polymeric substances (EPS) and its role in microbial biofilm formation. *Polish Journal Environmental Studies*, 16: 799-806.
33. Nichols C.M., Bowman J.P., Guezennec J. 2005. Effects of incubation temperature on growth and production of exopolysaccharides by an antarctic sea ice bacterium grown in batch culture, *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 3519-3523.
34. Turakhia M.H., Characklis W.G. 1989. Activity of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms: effect of calcium, *Biotechnology and Bioengineering*, 33: 406-414.
35. Sheng G.P., Yu H.Q., Yue Z.B. 2006. Factors influencing the production of extracellular polymeric substances by *Rhodospseudomonas acidophila*, *International Biodeterioration and Biodegradation*, 58: 89-93.
36. Higgins M.J., Novak J.T. 1997. Characterization of exocellular protein and its role in bioflocculation, *Journal of Environmental Engineering*, 123: 479-485.

37. Li J.Y. 2005. Effects of Fe (III) on floc characteristics of activated sludge. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 80: 313–319.
38. Sheng G.P., Yu H.Q., Yue Z.B. 2005. Production of EPS from *Rhodopseudomonas acidophila* in the presence of toxic substances, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 69: 216–222.
39. Aquino S.F., Stuckey D.C. 2004. Soluble microbial products formation in anaerobic chemostats in the presence of toxic compounds, *Water Research*, 38: 255–266.
40. Nielsen P.H., Frolund B., Keiding K. 1996. Changes in the composition of extracellular polymeric substances in activated sludge during anaerobic storage, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 44: 823–830.
41. Brown M.J., Lester J.N. 1980. Comparison of bacterial extracellular polymer extraction methods, and *Environmental Microbiology*, 40, 107–185.
42. Christensen B.E., Characklis W.G. 1990. *Physical and chemical properties of biofilms*, Edited by Characklis, W.G., Marshall K.C. Wiley, New York, NY, 93–130.
43. Emerson D., Ghiorse W.C. 1993. Role of disulfide bonds in maintaining the structural integrity of the sheath of *Leptothrix discophora* SP-6, *Journal of Bacteriology*, 175: 7819–7827.
44. Salama Y., Chennaoui M., Sylla A., Mountadar M., Rihani M., Assobhei O. 2016. Characterization, structure, and function of extracellular polymeric substances (EPS) of microbial biofilm in biological wastewater treatment systems: a review, *Desalination and Water Treatment*, 57: 16220-16237.
45. Sheng G.P., Yu H.Q., Yu Z. 2005. Extraction of the extracellular polymeric substances from a photosynthetic bacterium *Rhodopseudomonas acidophila*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67: 125–130.
46. Liu H., Fang H.H.P. 2002. Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) of sludges, *Journal Biotechnology*, 95: 249–56.
47. Comte S., Guibaud G., Baudu M. 2006. Relations between extraction protocols for activated sludge extracellular polymeric substances (EPS) and EPS complexation properties. Part I. Comparison of the efficiency of eight EPS extraction methods. *Enzyme Microbiology and Technology*, 38: 237–245.
48. Raunkjaer K., Hvitved-Jacobsen T., Nielsen P.H. 1994. Measurement of pools of protein, carbohydrate and lipid in domestic wastewater. *Water Research*, 28: 251–261.
49. Blumenkrantz N., Asboe-Hansen G. 1973. New method for quantitative determination of uronic acids, *Analytical Biochemistry*, 54: 484–489.
50. Omoike A., Chorover J. 2006. Adsorption to goethite of extracellular polymeric substances from *Bacillus subtilis*, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 70: 827–838.
51. Ortega-Morales B.O., Santiago-Garcia J., Chan-Bacab M., Moppert X., Miranda-Tello E., Fardeau M.L., Carrero, J., Bartolo-Perez P., Valadez-Gonzalez A., Guezennec J. 2007. Characterization of extracellular polymers synthesized by tropical intertidal biofilm bacteria, *Journal of Applied Microbiology*, 102: 254–264.
52. Sheng G.P., Yu H.Q. 2006. Relationship between the extracellular polymeric substances and surface characteristics of *Rhodopseudomonas acidophila*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72: 126–131.
53. Esparza-Soto M., Westerhoff P. 2001. Fluorescence spectroscopy and molecular weight distribution of extracellular polymers from full-scale activated sludge biomass, *Water Science and Technology*, 43: 87–95.
54. Sheng G.P., Yu H.Q. 2006. Characterization of extracellular polymeric substances of aerobic and anerobic sludge using 3-dimensional excitation and emission matrix fluorescence spectroscopy, *Water Research*, 40: 1233–1239.

55. Manca M.C., Lama L., Improt, R., Esposito E., Gambacorta A., Nicolaus B. 1996. Chemical composition of two exopolysaccharides from *Bacillus thermoantarcticus*, *Applied and Environmental Microbiology* 62: 3265–3269.
56. Lattner D., Flemming H.C., Mayer C. 2003. ¹³C-NMR study of the interaction of bacterial alginate with bivalent cations, *International Journal of Biological Macromolecules*, 33: 81–88.
57. Mikkelsen L.H., Nielsen P.H. 2001. Quantification of the bond energy of bacteria attached to activated sludge floc surfaces, *Water Science and Technology*, 43: 67-75.
58. Klausen M.M., Thomsen T.R., Nielsen J.L., Mikkelsen L.H., Nielsen P.H. 2004. Variations in microcolony strength of probe-defined bacteria in activated sludge flocs, *FEMS Microbiology Ecology*, 50: 123-132.
59. Wilen B.M., Jin B., Lant P. 2003. The influence of key chemical constituents in activated sludge on surface and flocculation properties, *Water Research*, 37: 2127–2139.
60. Liao B.Q., Allen D.G., Droppo I.G., Leppard G.G., Liss S.N. 2001. Surface properties of sludge and their role in bioflocculation and settleability, *Water Research*, 35: 339–350.
61. Sobek D.C., Higgins M.J. 2002. Examination of three theories for mechanisms of cation induced bioflocculation, *Water Research*, 36: 527–538.
62. Nguyen T.P., Hankins N.P., Hilal N. 2007. A comparative study of the flocculation behaviour and final properties of synthetic and activated sludge in wastewater treatment, *Desalination*, 204: 277–295.
63. Liu X.M., Sheng G.P., Yu H.Q. 2007. DLVO approach to the flocculability of a photosynthetic H₂-producing bacterium, *Rhodospseudomonas acidophila*, *Environmental Science and Technology*, 41: 4620–4625.
64. Kara F, Gürakan G.C., Sanin F.D. 2008. Monovalent cations and their influence on activated sludge floc chemistry, structure, and physical characteristics, *Biotechnology and Bioengineering*, 100, 231–239.
65. Zita A. Hermansson M. 1994. Effects of ionic-strength on bacterial adhesion and stability of flocs in a wastewater activated sludge system, *Applied and Environmental Microbiology*, 60: 3041–3048.
66. Higgins M.J., Tom L.A., Sobek D.C. 2004. Case study I: application of the divalent cation bridging theory to improve biofloc properties and industrial activated sludge system performance - direct addition of divalent cations, *Water Environment Research*, 76: 344–352.
67. Houghton J.I., Quarmby J., Stephenson T. 2001. Municipal wastewater sludge dewaterability and the presence of microbial extracellular polymer, *Water Science and Technology*, 44: 373-379.
68. Neyens E., Baeyens J., Dewil R., De heyder B. 2004. Advanced sludge treatment affects extracellular polymeric substances to improve activated sludge dewatering, *Journal of Hazardous Materials*, 106: 83-92.
69. Chen Y., Yang H., Gu G. 2001. Effect of acid and surfactant treatment on activated sludge dewatering and settling, *Water Research*, 35: 2615-2620.
70. Jin B., Wilen B.M., Lant P. 2004. Impacts of morphological, physical and chemical properties of sludge flocs on dewaterability of activated sludge, *Chemical Engineering Journal*, 98. 115-126.
71. Mikkelsen L.H., Keiding K., 2002. Physico-chemical characteristics of full scale sewage sludges with implications to dewatering. *Water Research*, 36: 2451-2462.
72. Sponza D.T. 2002. Extracellular polymer substances and physicochemical properties of flocs in steady- and unsteady-state activated sludge systems, *Process Biochemistry*, 37: 983–998.
73. Çetin S., Erdinçler A. 2004. The role of carbohydrate and protein parts of extracellular polymeric substances on the dewaterability of biological sludges, *Water Science and Technology*, 50: 49-56.

74. Solis M., Solis A., Perez H.I., Manjarrez N., Flores M. 2012. Microbial decolouration of azo dyes: a review, *Process Biochemistry*, 47: 1723-1748.