



Review Papers / Derleme Makalesi
TOXICITY AND BIOLOGICAL TREATMENT OF CYANIDE

Ahmet ÇABUK^{*1}, Nazif KOLANKAYA²

¹*Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Meşelik-ESKİŞEHİR*

²*Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Beytepe-ANKARA*

Received/Geliş: 22.11.2010 Revised/Düzeltilme: 11.04.2011 Accepted/Kabul: 18.05.2011

ABSTRACT

Although cyanide is a hazardous substance and toxic pollutant, it exists in the environment as a product of industrial activities. Cyanide and its derivatives are used at textile, dye, fertilizer, pharmaceutical industry and the fields of metal extraction, mining, plating, photography, synthesis of organic materials, producing of disinfectant substance. Annually, these industries produce cyanide wastes above about three billion liter. Furthermore, cyanide generates also biologically despite of the fact that it is extremely toxic and microorganisms, one part of ecosystem, detoxify it. When the applications where the cyanide are used and the effects of cyanide on living things are taken into account, treatment of polluted environments is seen to be especially significant. In this review study, in addition to chemical and toxic properties of cyanide, the data related to biological methods at cyanide degradation and potential microorganisms are presented.

Keywords: Cyanide, biological treatment.

SİYANÜRÜN TOKSİSİTESİ VE BİYOLOJİK YIKIMI

ÖZET

Siyanür, tehlikeli bir madde ve toksik bir kirletici olmasına rağmen, endüstriyel aktivitelerin doğal bir ürünü olarak çevrede bulunur. Tekstil, boya, gübre ve farmasötik endüstrileri ile metal özütleri, kaplama, dezenfektan madde yapımları, organik maddelerin sentezi, madencilik, fotoğrafçılık alanlarında siyanür ve türevleri kullanılmaktadır. Bu endüstriler yıllık yaklaşık 3 milyar litrenin üzerinde siyanür atığı oluştururlar. Bununla birlikte siyanür, aşırı derecede toksik olmasına karşın, biyolojik olarak da oluşturulur ve ekosistemin bir parçası olan mikroorganizmalar tarafından detoksifiye edilir. Siyanürün kullanıldığı alanlar ve siyanürün canlılar üzerine olan etkileri dikkate alındığında, siyanür ve türevlerinin artımı ve siyanür ile kirlenmiş alanların iyileştirilmesinin çok önemli olduğu anlaşılmaktadır. Bu derlemede, bir kirletici olarak siyanürün kimyasal ve toksik özelliklerinin yanı sıra, siyanür yıkımında kullanılabilecek biyolojik yöntemler ve potansiyel mikroorganizmalar hakkında bilgi verilmektedir.

Anahtar Sözcükler: Siyanür, biyolojik artım.

1. GİRİŞ

Endüstriyel olarak gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde çevrede yüksek düzeyde kirleticilere rastlanması normal karşılanan bir durum haline gelmiştir. Ancak bu gelişmeye koşut olarak artan çevre kirliliği bu yüzyılın en önemli sorunları arasında girmiştir. Bilinen en zehirli maddelerden birisi olan siyanür de bu kirleticiler arasında önemli bir yere sahiptir. Pek çok

* Corresponding Author/Sorumlu Yazar: e-mail/e-ileti: acabuk@ogu.edu.tr, tel: (222) 239 37 50 / 2439

endüstride siyanürün yer aldığı teknolojik süreçler kullanılmakta ve bunun sonucu olarak endüstrilerin atığı olarak da çevrede siyanür ve türevlerine rastlanılmaktadır. Bunun yanı sıra pek çok bitkinin ve bir kaç mikroorganizmanın siyanojenik glikozitler şeklinde siyanür bileşiklerini sentezleme yeteneğine sahip oldukları da bilinmektedir. Ancak biyolojik olarak sentezlenen bu siyanür bileşikleri endüstrinin atık olarak çevreye verdiği siyanür miktarıyla kıyaslanamayacak kadar az düzeydedir.

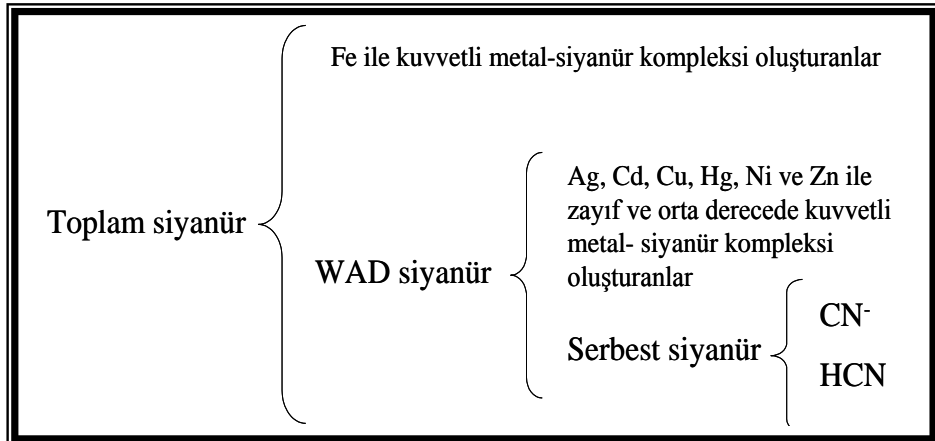
Siyanür ve türevlerinin arıtımı için çeşitli kimyasal ve biyolojik yöntemler kullanılmaktadır [1-3]. Ancak, biyolojik arıtım yöntemleri, bu yöntemler ile yapılan arıtım sonucunda ortamda toksik madde kalmaması ve ilave bir arıtıma gerek duyulmaması nedeniyle bir üstünlüğe sahiptir. Siyanürün biyolojik arıtımı amacıyla yapılan çalışmaların geçmişi çok eskilere dayanmaktadır. İlk çalışmalar 1970'li yıllarda başlamış ve ancak son yıllarda artış göstermiştir. Bu çalışmalarda pek çok mikroorganizma türünün etkin siyanür yıkım yetenekleri ortaya çıkarılmıştır [2].

2. SİYANÜR'ÜN GENEL ÖZELLİKLERİ

Siyanür, 1 C ve 1 N atomunun 3 bağ yaparak oluşturduğu anyonik karakterde ve alkali kationlarla tuz meydana getiren, çeşitli metal kationları ile de iyonik kompleksler oluşturabilen zehirli bir kimyasaldır. Na, K, Ca ile oluşturduğu tuzları oldukça toksiktir ve suda kolayca çözülebilir. Asitlerin etkisiyle HCN açığa çıkarılır. Cd, Cu ve Zn ile oluşturdukları zayıf ya da ılımlı kararlılıktaki kompleks bileşikler zayıf-asitte ayrışabilir siyanür (WAD: weak-acid dissociable) olarak tanımlanır. Metal-siyanür kompleksleri daha az toksik olmalarına rağmen, çözülmeleri sonucunda toksik olan hem serbest siyanür hem de metaller açığa çıkar [4-6].

Bilindiği üzere siyanür terimi 3 siyanür çeşidini belirten genel bir ifade olarak değerlendirilmektedir (Şekil 1). Bunlar:

- 1) toplam siyanür;
- 2) zayıf-asitte ayrışabilir (WAD) siyanür;
- 3) serbest siyanürdür.



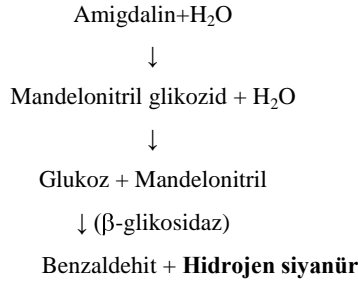
Şekil 1. Siyanür çeşitlerinin sınıflandırılması [2]

Siyanür çeşitleri içerisinde en zehirli olanı serbest siyanürdür. Şekil 1'den de görülebileceği gibi bu çeşit, hem gaz formunda hem de sıvı formda bulunabilen siyanür anyonunu (CN⁻) ve hidrojen siyanürü (HCN) içerir. pH değeri 9.3-9.5 olan çözeltilerde siyanür ile hidrojen

siyanür dengede ve eşit miktarda bulunur. pH 11.0 ve üzerinde çözeltideki siyanür miktarının %99'u CN formundayken pH 7.0 ve altındaki değerlerde % 99'u HCN formundadır. HCN, suda çok kolay çözünür olmasına karşın sıcaklığın ve tuz yoğunluğunun artmasına bağlı olarak çözünürlüğü azalmaktadır. Sulu çözeltilerde HCN'nin hem gaz hem de sıvı formu renksiz, acıbadem kokusuyla karakterize edilir. Ancak kokusuyla tanımlama yapmak toksik özelliği nedeniyle uygun değildir [4, 5]. Siyanür, altın, civa, kobalt ve demir ile zayıf asidik koşullarda bile oldukça kararlı kompleks bileşikler oluşturur. Bununla birlikte, doğrudan ultraviyole dalga boyundaki ışığa maruz kalan sulu çözeltilerdeki hem ferro- hem de ferri siyanürler ortamdaki serbest siyanürün kaynağı olurlar. Bu reaksiyon karanlık koşullarda tersine işler. Siyanür tuzlarının ve komplekslerinin kararlılığı çözeltinin (ortamın) pH değerine bağlıdır. Bu durum, siyanürün potansiyel çevresel önemi ve çevre ile etkileşimini doğrudan etkilemektedir. Aynı zamanda siyanür iyonları kükürtle birleşerek tiyosiyonat oluştururlar. Tiyosiyonat, hidrojen siyanüre göre çok daha az toksiktir. Fakat akciğerler üzerine çok tahriş edici etkiye sahiptir [4-6].

2.1. Başlıca Siyanür Kaynakları

Genel anlamda siyanürün 2 temel kaynağı vardır. Bunlar, doğal olarak çeşitli organizmalar tarafından oluşturulan siyanür ile endüstriyel kaynaklı olan siyanür ve türevleridir. Siyanürler doğada siyanojenik glikozitler olarak acı badem, süpürge, kahve, nohut, elma, şeftali, kayısı, erik, vişne, kiraz, armut, kırmızıturp, patates, keten, mürver, tesbih ağacı, ortanca, şalgam ve değişik diğer *Rosacea* familyasına ait bitkiler tarafından üretilir. Bu bitki türlerinin sayısının 1000'den fazla olduğu bilinmektedir. Siyanojenik bitkiler olarak da isimlendirilen kayısı, badem, şeftali, elma ve vişne çekirdeklerinin yapısında amigdalin bileşiği bulunmaktadır. Bu meyvelerin çekirdekleri yendiği zaman amigdalin vücutta sindirilerek HCN' e dönüşmektedir. Amigdalin Şekil 2'de görüldüğü gibi hidrojen siyanüre hidroliz olmaktadır [7, 8]. Amigdalin, asidik ortamda daha yavaş hidroliz olur. Bu nedenle amigdalin içeren çekirdekler, mideden duodenuma geçerken alkali ortam olduğu için hidrolizle birlikte hidrojen siyanür ortaya çıkmaktadır [7, 8]. Bitkisel siyanür üretiminin olması nedeni ile Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği'ne göre meyve sularında 1 mg/kg, sert çekirdekli meyve konservelerinde 5 mg/kg, nugatlar ve badem ezmelerinde 50 mg/kg'a kadar hidrosiyanik asit (HCN) bulunmasına izin verilmektedir [8].



Şekil 2. Amigdalin'in hidrojen siyanüre dönüşümü [7, 8]

Diğer yandan Cassava ve Lima fasüyesinin yapısında bulunan Linamarin bileşiği de benzer şekilde HCN'e dönüşür. Bu tip meyvelerden hazırlanan meyve suları çekirdekli ve çekirdeksiz presleme tekniğine göre değişen miktarlarda hidrosiyanik asit (HCN) içerebilmektedir [7, 8].

Doğada mikropsal siyanür üretimi de görülmektedir. Knowles ve Bunch (1986)'a göre ilk olarak 1871 yılında *Marasmius oreades* olarak bilinen bir fungusun da siyanür ürettiği bildirilmiştir. Daha sonra çeşitli *Basidiomycetes*, *Ascomycetes* ve *Zygomycetes* sınıflarına ait çok

sayıda fungus türünün siyanür üretebildiği bildirilmiştir [9, 10]. Siyanürün bakteriyel üretiminin de olduğu 1913 yılından bu yana bilinmektedir [10]. Siyanür ürettiği belirlenen türler; *Chromobacterium violaceum*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas chloraphis*, *Pseudomonas aureofaciens*' dir. Şiddetli ve çok ağrı veren yanık yaralarının *P. aeruginosa* ile enfekte olduğu durumlarda, *P. aeruginosa* tarafından siyanür üretimi hastanın ölümüne neden olabilmektedir [11].

Fotosentetik mikroorganizmalardan *Chlorella vulgaris*, *Anacystis nidulans*, *Plectonema borganum* ve *Nostoc muscorum*' un siyanür ürettiği 1974 yılından beri bilinmektedir [1, 9, 11, 12]. Doğada siyanür üretebilen ve yukarıda sıralanan çeşitli organizmaların ürettiği siyanür miktarı endüstriyel ölçekte kullanılan ve/veya üretilen siyanür ve türevleri ile kıyaslanamayacak kadar oldukça düşük düzeydedir.

Tekstil, boya, metal özütleri, gübre, kaplama, dezenfektan madde yapımları, organik maddelerin sentezi, madencilik, fotoğrafçılık, farmasötik endüstrileri değişik amaçlarla siyanür ve türevlerini kullanmaktadır. Towill ve arkadaşlarının (1978) yaptığı bir çalışmaya göre endüstriyel toksik atıkların önemli bir grubunu oluşturan siyanürü kullanan endüstriler yıllık ortalama 3 milyar litrenin üzerinde siyanür atığı oluştururlar [1, 13, 14]. Endüstriyel kaynaklı siyanür türevleri ve kullanıldıkları yerler Çizelge 1'de verilmiştir.

Çizelge 1. Endüstride kullanılan başlıca siyanür türevleri ve kullanıldıkları yerler [11]

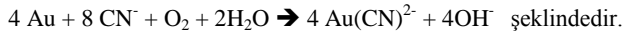
Siyanür türevleri	Kullanıldığı yerler
Hidrosiyanik asit HCN	- Koyunların dış parazitlerine karşı ve ev haşerelerinin yuvalarını yok etmede - Fotoğrafçılıkta
Siyanür tuzları KCN NaCN	- Altın ve gümüş madenciliğinde - Elektro platin - Organik sentezler - Metal parlatici - Toprak sterilizasyonu
Organik nitriller Iminodipropionitril Glikonitril Asetonitril Akrilonitril	Sentetik kauçuk, fumigan gazlar
Siyanamid	Siyanür salgılayan ilaçlar
Siyanojen klorür	Kimyasal analizler
Nitroprussid	Kimyasal sentez, antihipertansif ilaç

Sülfosiyanürler, ferri-, ferro siyanürler ve tiyosiyanatlar daha az toksik olan siyanür türevleridir. Toksikitesi hidrojen siyanüre göre çok daha az olan kalsiyum siyanamid, alkole direnci azaltır. Asetonitril ise yüksek performanslı sıvı kromatografisinde çok kullanılan bir çözücüdür. Asetonitril ile birlikte dimetilaminopropionitril farmasötik endüstrisinde sentez ara maddesi olarak kullanılır. Gübre olarak kullanılan ve kısmen hidroliz edilebilen kalsik siyanamid, suda çözünmez, katı haldedir ve hidrojen siyanür açığa çıkarmaz. İzosiyanatlar ise özellikle izoforon diizosiyanat (IPDI), heksameten- diizosiyanat (HDI) ve difenilmetan diizosiyanat (MDI) sentez ara maddesi olarak endüstride kullanılır. Metil izosiyanat ve karbamat, insektisitlerin sentezinde yararlanılan siyanür türevleridir. Siyanoakrilat, metil ya da etil polysiyanoakrilat içeren siyan akrolik tutkallar uçucu nitelikte monomerler olmasına karşın hidrojen siyanür açığa çıkarmazlar [11, 15].

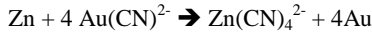
Poliüretan, akrilik banyo aksesuarları, ipek ve yün eşyaların yanması sonucu ve yangın olaylarında ortamda HCN gazı oluşmaktadır. Sigara dumanında da sigara başına ortalama 0.4-0.5 mg HCN gazı oluşmaktadır. Yangın sırasında siyanür, solunum yoluyla alınabileceği gibi deriden emilim yoluyla da alınabilmektedir [7].

Diğer taraftan, laboratuvar ortamlarında, asit bulunan lavabo ya da drenaj deliklerine siyanür tuzlarının boşaltılması ile de siyanür gazları ortaya çıkabilmektedir. Ayrıca, akut hipertansiyon krizinde kullanılan sodyum nitroprussid vücutta siyanüre dönüşmektedir; vücuda hızlı verilmesi, yüksek dozda uzun süreli kullanılması ya da böbrek yetmezliği olması durumunda toksik etkiler ortaya çıkardığı bilinmektedir. Kanser tedavisinde kullanılan Leatril (1g Leatril yaklaşık 60 mg siyanür içermektedir) tabletlerinden 12-13 adet alınarak gerçekleştirilen intihar girişiminde ciddi metabolik asidoz ve konvülsiyonlara neden olduğu bildirilmiştir [16].

Siyanürün çevrede bulunmasında önemli bir etkende madencilik alanında cevherlerden altın ve gümüşün ekonomik ve yüksek verimle kazanılmasında kullanılabilir olmasıdır. Altın içeren cevherlerden siyanür ile altının çözündürülmesi işlemi siyanürizasyon olarak bilinir. Bu reaksiyon Elsner eşitliğine göre:



Sementasyon işlemi yani Zn ile çöktürme işlemi aşağıda görüldüğü gibidir.

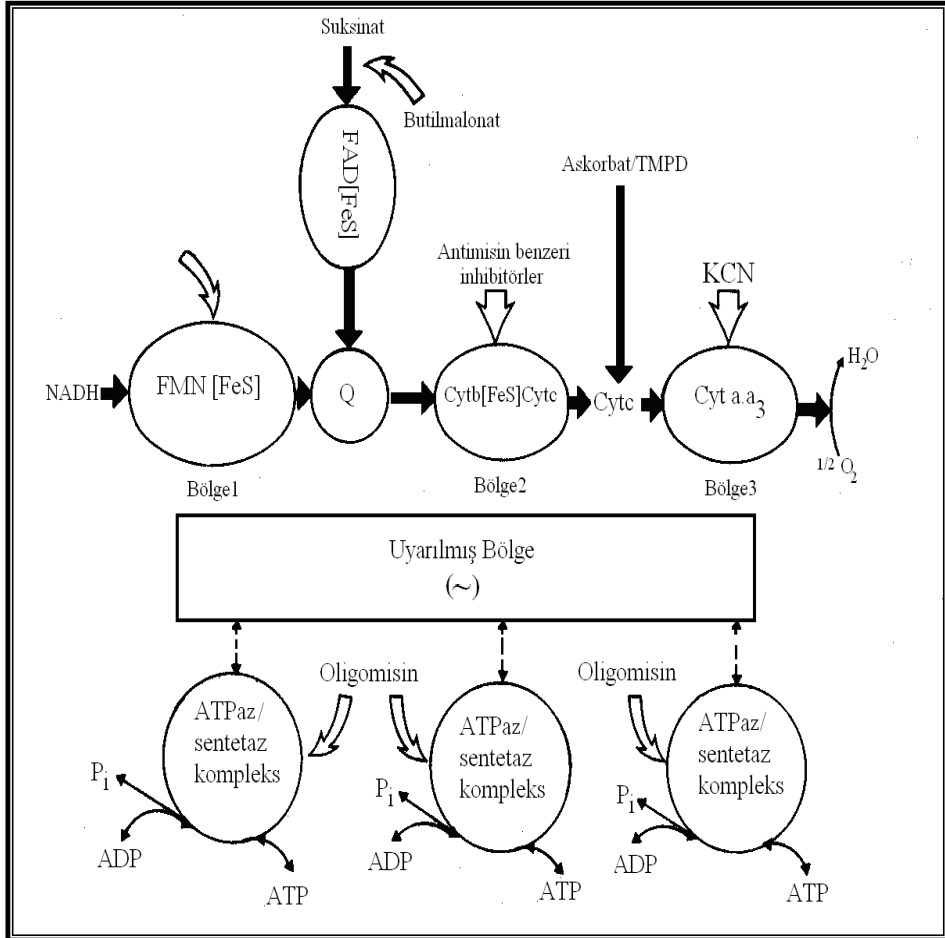


Siyanürizasyon işlemi sonucunda ortamda kalan siyanürün uygun bir yöntemle uzaklaştırılması çevre ve insan sağlığı açısından önem taşımaktadır.

2.2. Siyanürün Toksik Özellikleri

Siyanür, aşırı derecede toksik olmasına karşın, biyolojik olarak da oluşturulur ve detoksifikasyonu ile yaşadığımız ekosistemin bir parçasıdır [17]. Siyanür, Environmental Protection Agency (EPA) tarafından bilinen en toksik madde olarak tanımlanmıştır. Geçmişten günümüze değin siyanür en öldürücü ve yıkıcı zehir olarak bilinmekte ve tanımlanmaktadır [18]. Siyanürün solunum üzerine olan inhibitör etkisi 1920'lerden beri bilinmektedir. İlk kez Keilin (1933), siyanürün sitokrom oksidazdaki 3 değerlikli demir ile kombine olduğunu göstermiştir [19].

Siyanür bileşikleri çok toksik olmalarına karşın kaza zehirlenmelerine ve ölümlere beklenilenden daha az yol açar. Siyanür ve türevleri etki şekline göre dejeneratif, kimyasal yapısına göre gaz ve uçucu zehirler arasında sınıflandırılırlar. Hidrosiyanik asit ve tuzları (Na, K, Ca, Cu) en yaygın bulunan siyanür bileşikleridir. Yüksek yoğunluktaki HCN'nin birkaç kez solunması NaCN ya da KCN'nin 50-100 mg'nin ağız yoluyla alınmasına eş değerdir ve çok kısa sürede anoksi ve ölüme neden olabilir. Daha düşük dozları, mental konfüzyon, baş dönmesi, baş ağrısı, solunum yavaşlaması gibi belirtilere neden olur. Deri, mukoza ve diğer yollarla da organizmaya girebilir. Emilimi çok hızlıdır, solunum yoluyla birkaç saniye, sindirim yoluyla birkaç dakikadır. Kana ulaştığında alyuvarlara ve çok az miktarda da plazma proteinlerine bağlanır. Dokulara dağılımı çok hızlıdır. Karaciğer ve böbrekte rodanaz ya da tiyosülfat-sülfür transferaz enzimi ile tiyosiyanatların biyotransformasyonu gerçekleştirilir. Fakat bu durum akut zehirlenme olaylarında çabuk geçer. Siyanürün az bir bölümü hidroskobalamininden (B12 vitamini prekürsörü) siyanokobalamin oluşumunda rol oynar. Sülfö-, ferri- ve ferrosiyanürler fazla toksik değildir. Kalsiyum siyanamid ve akrilonitril düşük toksisiteye sahiptir. Siyanür bileşikleri hangi yolla vücuda girerse girsin etki mekanizması aynıdır. Mitokondrial sitokrom a³'ü bloke eder (Şekil 3). Sitokrom oksidaz- siyanür komplekslerinin oluşması ile hızlı bir şekilde sitokrom oksidaz inhibisyonu gerçekleşir. Sonuçta elektron taşıma sistemi bloke olur. Sitokrom oksidaz bloke olunca Krebs döngüsündeki piruvat transformasyonu inhibe olur ve sonuçta laktat birikimi ve metabolik asidoz oluşur [11, 18, 20].



Şekil 3. Mitokondrial oksidatif fosforilasyonun şematik gösterimi [20].

Siyanür metabolizmasında, akciğerden atılım, sisteine bağlanma, oksidasyon ve tiyosülfat yol izleri gibi mekanizmalar rol oynar ancak söz konusu reaksiyonlar detoksifikasyon için yeterli olamamaktadırlar. Siyanürün öldürücü en az dozu farklı siyanür bileşikleri için değişiklik gösterir. Ölümden önce büyük bir kısmı emilmeden atılır. Erişkinlerde (70 kg) öldürücü en az doz değerleri NaCN için; 150 mg, KCN için 200 mg, HCN için 100 mg'dır. Akut HCN zehirlenmelerinde ilk olarak merkezi sinir sistemi etkilenmektedir. Siyanürün besin zincirinde birikimi (biyomagnifikasyon) bildirilmemiştir. Gaz haldeki HCN'nin LD₅₀ değeri 100-300 mg/l'dir. Solunum yolu ile alınan siyanür 10-60 dakika içerisinde ölüme neden olur. Siyanür konsantrasyonu arttıkça ölüm süresi azalır. Eğer 2000 mg/l HCN solunum yolu ile alınırsa 1 dakika içerisinde ölüm gerçekleşir [11, 21].

İnsanlarda fizyolojik olarak siyanür metabolizmasının birkaç mekanizması vardır. Hidroksi kobalamin siyanürü zararsız siyano kobalamine dönüştürüp tiyosiyanat oluşturur. Tiyosiyanat amino asitlerle birleşerek dokularda oksitlenip karbondioksit, format vb. bileşiklere dönüştürülür. Siyanürün zararsızlaştırıldığı diğer mekanizma ise rodanaz enziminin sadece serbest siyanürlerle tiyosiyanatlara dönüştürülmesidir. Öldürücü olmayan dozlarda siyanür

karaciğerde rodanaz enzimi yardımıyla 20 dakika ile 1 saatlik bir zaman aralığında tiyosiyana (SCN⁻) dönüşerek idrar ile vücuttan atılır [4-6, 22].

Siyanürün hücrenin solunum aktivitesini tamamen durdurmadığı durumlar da söz konusudur. Tam etkilediği hücrede bile az da olsa bir miktar solunum devam eder. Düşük düzeyde veya kalıntı solunumu sitokrom-b aktive eder. Kalıntı veya düşük solunumu siyanürle zehirlenmiş hücrede flavin aerobik dehidrogenaz enzim aktivitesini de görebilir.

Birçok bitki tohum ve meyvelerin yapısında bulunan ve enzimatik ürün olarak siyanür oluşturan siyanojenik glikozitler ve amigladini günlük beslenme alışkanlıklarımızla bünyemize almamıza rağmen toksik etki oluşmamaktadır. Bunun nedeni alınan siyanür miktarının toksik etki oluşturacak konsantrasyonda olmamasıdır. Amigladin (C₂₀H₂₇NO₁₁) enzimatik hidroliz ile glikoza dönüşürken toksik hidrojen siyanür ve benzaldehit oluşur (Şekil 2).

Alkali siyanür tuzlarının suda çözünürlüğü fazla olduğu için deri yolu ile vücuda girişi önemsiz miktardadır çünkü deriden emilim daha çok yağda çözünürlükle doğru orantılıdır. Bu nedenle sadece ağız yolu ile toksik etki gösterebilir. Hidrojen siyanür'ün (sıvı ya da gaz) siyanür tuzlarına göre deriden geçişi daha kolaydır, bu nedenle ağız, deri ve solunum olmak üzere her üç yolla toksisitesini gösterebilir. Solunum yolu ile hidrojen siyanür, ağız yolu ile alınan siyanür bileşiklerine göre vücuda daha hızlı girer ve dolayısıyla toksik etkiler daha hızlı ortaya çıkar. İnsanlarda kaza ya da intihar girişiminde alkali siyanür tuzlarının ağız yolu ile alındığında ölüme neden olan dozun en az 200-300 mg, hidrojen siyanürün ağız yolu ile alındığında ise ölüm oluşturan en küçük dozun 50-100 mg olduğu görülmüştür [16, 23].

Akut siyanür zehirlenmelerinde antidot tedavisi uygulanır. 4-5 kez amil nitrit solunum yoluyla verilir. Nitriller kanda methemoglobulin oranını artırır. Methemoglobulin siyanür ile zayıf kompleks (siyan methemoglobin) yapar. Daha sonra tiyosülfat bileşikleri verilerek siyanmethemoglobinden ayrılan serbest siyanürün inaktif tiyosiyonat kompleksi oluşturması sağlanır. Sodyum tiyosülfat, intravenöz yolla yavaş verilir ve siyanür iyonlarını siyanokobalamine dönüştürür. Günümüzde hidrosikobalamin ve sodyum tiyosülfat içeren ampuller (Cyanokit adı ile) piyasada bulunmaktadır [11].

3. ÇEVRESEL AÇIDAN SİYANÜRÜN ÖNEMİ

Siyanürün çoğu formu toksiktir. Tuzları veya kompleks bileşikleri dışında sadece CN⁻ iyonu olarak tanımladığında serbest siyanürler ifade edilmektedir. Çevresel alıcı ortamlarda, siyanürün bulunduğu ortamın özelliklerinin ve siyanür bileşik türünün kesinlikle saptanması gerekir [4, 5, 22].

pH değeri 8 olan sulu HCN çözeltisinde siyanür serbest halde değildir. Bununla birlikte toksik bir özellik taşımaktadır. Toksisitesi pH'la beraber değiştiği için özellikle atık sular ve doğal sularda pH değerinin belirlenmesi ile ayrışan ve ayrışmadan kalan siyanürün bulunması sayesinde daha sağlıklı yargılara ulaşılabilmektedir. Asidik karakterdeki sularda kompleks ve basit siyanür bileşikleri hidrolize olup serbest siyanür oluşturur ve dolayısıyla da gaz formuna geçerek bulunduğu ortama, atmosfere karışmaktadır. Birkaç siyanür bileşiği dışında siyanür bileşiklerinin sucul ortamda toksik etkileri, kalıcılıkları, kararlılıkları ve kimyasal davranışları incelenmemiştir. Dolayısıyla bu konuda literatürde bilgi eksikliği dikkat çekmektedir [22, 24].

Canlı yaşamı açısından siyanürün düşük derişimleri, özellikle mikrobiyal yaşam açısından önemlidir. Kanalizasyon sistemlerinde bulunması halinde birçok tür bakterinin aktivitelerinin olumsuz yönde etkilenmesiyle biyolojik oksidasyon mekanizması engellenir. Dolayısıyla doğal sulara yapılan deşarjlarda siyanürün olabilecek en az düzeyde tutulması veya hiç bulunmaması önemlidir. Balık ve diğer su ortamındaki canlılarda siyanürün toksik etkisi; pH, sıcaklık, çözünmüş oksijen ve diğer minerallerin derişimlerine bağlı olarak değişir. Yüksek sıcaklıklarda artan her 10 °C için siyanürün toksik etkisi iki-üç kat artmaktadır. Düşük oksijen seviyesi siyanürün toksikliğini arttıran bir diğer unsurdur. Alabalıklar üzerinde yapılan

deneylerde 17 °C su sıcaklığında oksijen doygunluğu; %95 iken 8 saat, %73 iken 5 saat, %45 iken 10 dakika 0,105 mg/l CN⁻ derişiminde yaşayabildikleri saptanmıştır [4-6].

Bazı organizmalarda ise toksik etki sınırı daha yüksek sınırlarda olmaktadır. Tatarcık larvaları ve *Cricotopus bicinctus*'lar 3,2 mg/l'lik siyanür derişimine sahip elektro kaplama sularında yaşamlarını sürdürmüştür. *Daphnia magna* 3,4 mg/l, *Mayorelle palestinensis* 130 mg/l'lik siyanüre dayanıklılık gösterdiği deneylerle kanıtlanmıştır [25].

Konuyu insan sağlığı açısından ele alacak olursak; besinlerle azda olsa bir miktar siyanürü bünyemize almaktayız. İçme suyu yolu ile günde 4,7 mg/l siyanürün alınmasının zararlı etki gösterdiği bilinmektedir. Normal olarak 2 l su tüketen bir insan, bu suda 2,3 mg/l siyanür derişimi bulunması halinde zarar görmeyecektir. Buna karşın toksik etkisinin güvenli bir sınırdaki tutulması için içme sularında 0,1 mg/l derişimi aşılması önerilir [26].

Endüstriyel atıksularda siyanür iyonu ağır metal iyonları ile metal siyanür kompleksleri oluşturur. Bu komplekslerin kararlılığı oldukça değişkendir. Çinko ve kadmiyum bileşikleri dayanıksız olup ayrışmaları nötral ve düşük asidik ortamda olabilmektedir. Bununla birlikte, kobalt siyanür kompleksi ise asidik ortamda bile oldukça zor ayrışır. Bir diğer dayanıklı bileşik olan demir siyanür kompleksi güneş ışığında (UV) fotokimyasal oksidasyon ile bozunur ama gece bu reaksiyon geri dönerek tekrar demir siyanür kompleksini oluşturur ki bu durum örnek alma yeri ve zamanı açısından büyük önem taşır. Suda HCN'ün koku sınırı 0,001 mg/l'dir. Çevreden ve endüstrilerden gelecek siyanüre dayanılabilecek en yüksek güvenli sınır 18 mg/gün olarak tahmin edilmektedir [26].

Birçok organik bileşiğin yapısında siyanür fonksiyonel bir grup olarak bulunur. Bu tür bileşikler nitriller olarak adlandırılır ve pek azı ayrışarak hidrojen siyanürü iyon veya moleküler olarak ortama verir. Organik asitler, alkoller, esterler ve amidler siyanürü radikal olarak bulundurulur. Bu grupta olanlar çok sayıda siyanür bileşiği oluşturur veya yan ürün olarak ortaya verilirler. Siyanürün sularında kalıcılığı oldukça değişken olup siyanür bileşiğinin yapısına, derişimine ve diğer bileşenlerin durumuna bağlıdır. Permanganat ve klor gibi kuvvetli oksitleyicilerle zararlılığı giderilmeye çalışılması halinde bile reaksiyonun tamamlanamaması nedeniyle kalan ve/veya oluşan siyanojen klorür bileşiği toksik etkisini korur. pH'sı düşük ve iyi havalandırılması yapılan sularda hidrojen siyanür oluşarak gaz halinde atmosfere karışır. Mikrobiyotaya yardımıyla atık su arıtma tesislerinde veya çevrede aerobik ve anaerobik mikroorganizmalar sayesinde siyanürün düşük derişimleri veya toksisitesi parçalanabilir [22, 27].

4. SİYANÜRÜN ARITIMINDA KULLANILAN YÖNTEMLER

Atık suda eğer siyanür bulunuyorsa, bu atık su çevreye deşarj edilmeden önce mutlaka siyanür konsantrasyonu 1 mg/l düzeyinin altına indirilmelidir [1]. Bunun için 2 yol izlenebilir: kimyasal arıtım ve biyolojik arıtım.

Siyanür içeren atık suların detoksifikasyonu çoğunlukla kimyasal arıtım yöntemleri ile yapılmaktadır. Ancak kimyasal arıtım yöntemlerinde yan ürün olarak yine toksik bileşikler oluşmaktadır. Ayrıca kimyasal yöntemlerin yüksek maliyetli olması da bir dezavantaj olarak karşımıza çıkmaktadır. Biyolojik yöntemler ise hem siyanürün hem de kimyasal arıtımla oluşabilecek diğer toksik yan ürünlerin dönüşümü ve yıkımında alternatif potansiyel bir yaklaşımdır [1-3, 9, 28-30].

Siyanürün arıtımında kullanılan kimyasal yöntemler şunlardır:

- Alkali klorlama
- Ozonlama
- Nemli-hava oksidasyonu
- Kükürt temelli teknolojiler
- Caro's asit (H₂SO₅) uygulaması
- H₂O₂ uygulaması
- Fe-CN presipitasyonu

- Aktif karbon uygulaması
- Anodik oksidasyon
- Elektrodiyaliz
- Ters osmoz
- Hidroliz ve distilasyon
- AVR (asidifikasyon/buharlaştırma/yeniden nötralize etme)
- Yüzdürme
- Reçine uygulaması
- Katalitik oksidasyon
- Fotoliz

Siyanür ve türevlerini arıtabilmek için burada sıralanan arıtım yöntemlerini tek başına veya bir arada kullanmanın avantajlı olduğu durumlar olabilmektedir. Ancak, bu yöntemlerin en önemli dezavantajları daha önce de belirtildiği gibi uygulama maliyetlerinin yüksek olması ve sonuçta oluşan son ürün ve/veya ara ürünlerin toksik olabilmesi durumudur. Bu gerekçeler ile son yıllarda pek çok kirleticinin arıtımında olduğu gibi siyanür içeren atıkların da arıtımı için biyolojik yöntemlerin öne çıktığı görülmektedir. Anaerobik koşullarda siyanür yıkımı ile birlikte biyogaz üretiminin yapılabilirliğinin gösterilmesi, biyolojik yöntemlerin daha da ekonomik olabileceğini ortaya koymuştur [12]. Ancak, siyanürün anaerobik koşullarda yıkımı için unutulmaması gereken bir durum da tiyosiyanat bileşiklerinin anaerobik koşullarda arıtımının henüz yapılamamasıdır. Bununla birlikte anaerobik süreçler yavaş seyretmekte ve anaerobik mikroorganizmalar ortamda bulunabilecek diğer toksik bileşenlere karşı duyarlıdır. Bunlar literatürde siyanürün biyolojik yıkımı için daha çok aerobik süreçlerin tercih edilmesinin gerekçeleri olarak karşımıza çıkmaktadır.

Biyolojik arıtma yöntemlerinin dayandığı 2 temel mekanizma zehirsizleştirme (detoksifikasyon) ve biyoyıkım (biyodegradasyon) dir. Biyolojik arıtma çalışmalarında pek çok fungus, bakteri ve bazı bitkilerin kullanıldığı bilinmektedir [1, 12, 31, 32].

Aerobik koşullar altında mikrobiyal aktivite ile siyanürün amonyak ve daha sonra oksidasyonla nitrata dönüştürülebildiği bilinmektedir. Bu aktivitenin 200 mg/l'ye kadar etkin olduğu gösterilmiştir [22].

Dünyada ilk defa 1980'li yıllarda siyanürün biyolojik arıtımı için ABD'de başarılı bir tesis kurulmuştur [2]. Bu arıtım tesisinde aerobik biyolojik arıtım yapılmakta ve günümüze kadar etkin bir biçimde kullanılmış ve halen kullanılmaya devam etmektedir.

Siyanürün arıtımı için hangi yöntemin seçilmesinin daha uygun olacağı Botz tarafından (2001) özetlenmiştir (Çizelge 2) [2].

Çizelge 2. Siyanür arıtım sürecinde yöntem seçimi için genel bir karşılaştırma [2].

Arıtım yöntemi	Fe-CN uzaklaştırılması	WAD CN uzaklaştırılması	Çamur uygulamaları	Çözelti uygulamaları
SO ₂ /Hava	✓	✓	✓	✓
H ₂ O ₂	✓	✓		✓
Caro's asit		✓	✓	
Alkali klorlama	✓	✓		✓
Fe presipitasyonu	✓	✓	✓	✓
Aktif karbon	✓	✓		✓
Biyolojik	✓	✓		✓
CN geri kazanımı		✓	✓	✓
Doğal	✓	✓	✓	✓

Bazı mikroorganizmalar düşük derişimlerdeki siyanür bileşiklerini oksitleyebilir. Siyanür oksitleyen mikroorganizmalar, siyanür bileşikleri içeren ortamlardan izole edilip daha

yüksek siyanür derişimlerine alıştırıldıktan sonra kullanılır. Alıştırma sırasında siyanür derişimi kademeli olarak artırılır ve ortam şartları optimize edilir. Siyanürün aerobik metabolizma ürünleri CO₂, NH₃ ve H₂O, anaerobik ürünleri ise CH₄, CO₂ ve NH₃'dir. Siyanürün biyoyıkımı üzerine yapılan çalışmaların tarihi çok eskiye dayanmamaktadır. Bu çalışmaların sonucunda etkin birçok mikroorganizma izole edilmiştir. Yapılan çalışmalarda izole edilen ve etkinliği gösterilen mikroorganizmalar Çizelge 3'de verilmektedir.

Çizelge 3. Siyanür biyoyıkımında etkin olarak kullanıldığı bildirilen mikroorganizmalar

Mikroorganizma	Bildirilen çalışmalar
<i>Agrobacterium radiobacter</i>	[56]
<i>Bacillus megaterium</i>	[57]
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	[58]
<i>Bacillus pumilus</i>	[59, 60]
<i>Burkholderia cepacia</i>	[14, 35]
<i>Citrobacter</i> sp.	[61]
<i>Staphylococcus seiuri</i>	[56]
<i>Escherichia coli</i>	[62]
<i>Methylobacterium</i> sp.	[63]
<i>Klebsiella oxytoca</i>	[36, 39, 64]
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	[17, 31, 38, 48-55, 65-67]
<i>Pseudomonas acidovarans</i>	[68]
<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	[69]
<i>Pseudomonas putida</i>	[56, 70-72]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	[73]
<i>Pseudomonas</i> sp.	[61, 65]
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	[74]
<i>Pseudomonas diminuta</i>	[56]
<i>Pseudomonas</i> sp.	[3]
Karışık bakteri kültürü	[75]
<i>Chlorella</i> sp.	[37]
<i>Scenedesmus obliquus</i>	[37, 40]
<i>Stemphylium loti</i>	[33]
<i>Stemphylium loti</i> , <i>Gloeocercospora sorghi</i> <i>Fusarium moniliforme</i>	[76]
<i>Rhizopus oryzae</i>	[77]
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	[22, 34]
<i>Cryptococcus humicolus</i>	[78]
<i>Gliocladium virens</i>	[28]
<i>Mucor</i> sp.	[28]
<i>Trichoderma koningii</i>	[28]
<i>Fusarium oxysporum</i>	[28, 43, 63, 79].
<i>Fusarium solani</i>	[80, 81]
<i>Trichoderma</i> sp.	[32, 44, 82]
<i>Trichoderma harzianum</i>	[44]
<i>Trichoderma pseudokoningii</i>	[44]
<i>Arthrospira maxima</i>	[37]
<i>Pleurotus sajor-caju</i>	[22]
<i>Trametes versicolor</i>	[22, 29]

Çizelge 3. Siyanür biyoyıkımında etkin olarak kullanıldığı bildirilen mikroorganizmalar (devamı)

<i>Trametes versicolor</i>	[22, 29]
<i>Polyporus arcularius</i>	[23]
<i>Schizophyllum commune</i>	[23]
<i>Ganoderma lucidum</i>	[23]
Karışık fungal kültür	[43]
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	[83]
Biyolojik aktif çamur	[84]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	[85]
<i>Aspergillus nidulans</i> , <i>Neurospora crassa</i>	[86]
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	[87]
<i>Rhizopus oryzae</i>	[30]
<i>Pseudomonas putida</i>	[88]
<i>Azotobacter vinelandii</i>	[89]
<i>Klebsiella oxytoca</i>	[90]
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ve <i>Ralstonia</i> sp.	[41]
<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	[91]
<i>Polyporus arcularius</i> , <i>Schizophyllum commune</i> , <i>Clavariadelphus truncatus</i> , <i>Pleurotus eryngii</i> , <i>Ganoderma applanatum</i> , <i>Trametes</i> <i>versicolor</i> , <i>Cerrena unicolor</i> , <i>Schizophyllum commune</i> , <i>Ganoderma lucidum</i>	[92]

Siyanürün biyolojik yıkımı üzerine yapılan ilk çalışmaların 1970'li yıllarda olduğu görülmektedir. *Stemphylium loti* kullanılarak Fry ve Millar tarafından yapılan çalışma 1972 yılında yayımlanmıştır [33]. Siyanürün biyolojik olarak yıkımı üzerine yapılan çalışmaların 1990 ve 2000'li yıllarda daha fazla olduğu ve her geçen gün siyanür yıkım yetenekleri ortaya çıkarılan mikroorganizma sayısının da arttığı görülmektedir.

Shah ve arkadaşları (1991) bir beyaz çürükçül fungus olan *Phanerochaete chrysosporium* türü ile yapmış oldukları çalışmanın sonucunda bu türün siyanürü mineralize edebilme yeteneğine sahip olduğunu bildirmişlerdir [34].

Adjei ve Ohta (1999) tarafından yapılan çalışmada, KCN ilave edilmiş ortam ile topraktan seçici izolasyon yapılmış ve etkin kültür *Burkholderia cepacia* olarak tanımlanmıştır. Çalışmada mineral tuz ortamına glukoz ve KCN ilave edilerek bakteriyal büyüme ve buna bağlı siyanür kullanımı takip edilmiştir. Büyüme eğrisi ile siyanür kullanımı ilişkilendirilmeye çalışılmıştır. Substrat seçiciliğinin belirlenmesi amacıyla organik ve inorganik siyanür kaynakları ortama ilave edilmiştir. Ham enzim aktivitesi oluşan amonyak miktarına bakılarak ölçülmüştür. Sonuç olarak, *B. cepacia*'nın erken ve durgunluk safhasındaki hücrelerinin ve ayrıca ham hücre özütünün siyanür yıkımında etkin bir şekilde kullanılabileceğini bildirilmiştir [14].

Adjei ve Ohta (2000) yaptıkları çalışmada *B. cepacia* ile siyanür biyoyıkımında pH'nın (pH 3-11 aralığında), sıcaklığın (20-50 °C aralığında), karbon kaynağının, metal iyonlarının, azot kaynağının ve siyanür içeren atık suda bulunabilecek diğer kontaminantların etkileri araştırılmış ve sonuç olarak etkinliği daha önceden yine kendileri tarafından bildirilmiş olan *B. cepacia* için uygun koşullar ortaya konmuştur [35].

Siyanür içeren atık sudan izole edilen ve *Klebsiella oxytoca* olarak tanımlanan mikroorganizma ile yapılan bir araştırmada; siyanür ölçümü pikrik asit yöntemine göre yapılmıştır. Format belirlenmesinde ticari format dehidrojenaz kullanılmıştır. Metan oluşumu gaz kromatografisi ile belirlenmiştir. *K. oxytoca*'nın siyanürü azot kaynağı olarak kullandığını ve sonuçta amonyak oluşturduğunu bildirmişlerdir [36].

Gurbuz ve arkadaşları (2004) 3 farklı alg türü ile yapmış oldukları çalışmada koşulların optimizasyonunu incelemişlerdir. Sonuç olarak *Scenedesmus obliquus* türünün serbest siyanürü etkin bir şekilde detoksifiye edebildiğini bildirmişlerdir [37].

Çabuk ve arkadaşları (2006) tarafından *Basidiomycetes* üyeleri *Trametes versicolor*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus sajor-caju* arasından siyanür yıkım yetenekleri açısından etkin tür olarak seçilen *T. versicolor* hücreleriyle inkübasyon süresi, biyokütle miktarı, başlangıç siyanür konsantrasyonu, sıcaklık, pH ve karıştırma hızı gibi parametreler optimize edilmiştir. Belirlenen optimum koşullarda amonyak, format ve formamit gibi siyanür yıkımı sonucu oluşan bazı ürünlerin varlığı araştırılmıştır. Aynı zamanda, siyanür içeren atıklarda bulunabilecek etanol, metanol ve fenol gibi kirleticilerin *T. versicolor* hücrelerinin siyanür biyoyıkımı üzerine etkisi araştırılmıştır [29].

Dash ve arkadaşları, 2007 yılında yaptıkları çalışmada ferrosiyaniür içeren atık suyu eş zamanlı olarak hem adsorpsiyon hem de biyolojik yıkım uygulamalarına tabi tutmuş ve her iki sürecin birlikte kullanımının daha etkili olduğu sonucuna varmışlardır. 50 ve 100 mg/L siyanür konsantrasyonlarında ferrosiyaniürü her iki süreç sayesinde %99.9 oranında uzaklaştırabildiklerini bildirmişlerdir. Elde edilen sonuçlara göre biyolojik yıkımla birlikte adsorpsiyon teknolojisi de kullanıldığında daha etkin sonuçlara ulaşılmıştır [38].

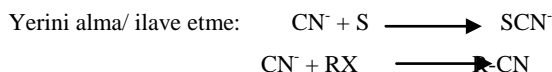
Chen ve ark, 2008 yılında siyanür içeren atık suların izole ettikleri *Klebsiella oxytoca* ile siyanür yıkımını gerçekleştirdiklerini ve toksik olmayan son ürünler elde ettiklerini bildirmişlerdir. Aljinat ve selüloz triasetatta immobilize *K. oxytoca* hücreleri ile azot kaynağı olarak KCN kullandıklarında 0,224 ve 0,192 mM/h oranında bir uzaklaştırma elde ettiklerini bildirmişlerdir [39].

Gürbüz ve arkadaşları (2009) *Scenedesmus obliquus* ile siyanür içeren atık suda etkin bir siyanür yıkımı elde etmişlerdir. Bu çalışmada 77,9 mg/L konsantrasyonundaki siyanürü 77 saatte 6 mg/L'ye düşürmüşlerdir [40].

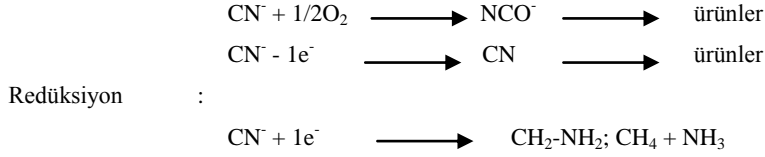
Chaudhari ve arkadaşları 2010 yılında yaptıkları bir çalışmada ise *Klebsiella pneumoniae* ve *Ralstonia sp.*'yi birlikte kültüre ederek tiyosiyaniürü yıkıma uğratmışlardır. 2500 mg/L başlangıç konsantrasyonuna sahip tiyosiyaniürü, tiyosiyaniür hidrolaz yoluyla pH 6.0'da 37 °C'de, 500 mg/L/d oranında yıkıma uğrattıklarını bildirmişlerdir [41].

5. SİYANÜR YIKIMINDA ETKİLİ OLAN ENZİMLER

Siyaniür üzerine etkili olan enzimatik reaksiyonlar genel olarak dört gruba ayrılabilir [1]:



Oksidasyon :

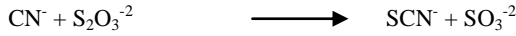


Her bir reaksiyon çeşidinin kendine has özellikleri vardır ve siyanür yıkımında önemli rol oynar. Bununla birlikte kofaktör gereksinimleri, arıtım sürecinde hücre canlılığının devamlılığı, siyanürün ve oluşan enzimatik reaksiyonlar sonucu ortaya çıkan ürünlerin de kullanılabilirliği daha ileri düzeyde yıkımlar için önemlidir [1]. Siyanür yıkımında rolü olduğu bilinen enzimler ve gerçekleştirdikleri reaksiyon tipleri Çizelge 4’de verilmiştir.

Çizelge 4. Siyanür yıkımında görev alan enzimler ve oluşturdukları reaksiyonlar [1, 12]

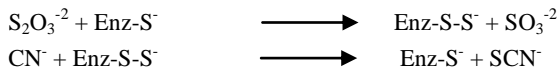
Enzim	Reaksiyon tipi
Rodanaz (Tiyosülfat:siyanür sülfürtransferaz) (EC 2.8.1.1)	Yerini alma/ ilave etme
Formamid hidrolizaz (Siyanür hidrataz) (EC 4.2.1.66)	Hidroliz
β -siyanoalanin sentetaz (EC 4.4.1.9)	Yerini alma/ ilave etme
γ -siyano- α -aminobutirik asit sentetaz	Yerini alma/ ilave etme
Merkaptopiruvat sülfürtransferaz (EC 2.8.1.2)	Yerini alma/ilave etme
Siyanaz (Siyanat amidohidrolizaz) (E.C. 3.5.5.3)	Oksidasyon
Nitrojenazlar	Redüksiyon
Siyanidaz	Hidroliz
Siyanür oksijenaz	Oksidasyon

Siyanürü substrat olarak kullanan ve yerini alma/ekleme tipinde reaksiyon sergileyen Rodanaz (Tiyosülfat:siyanür sülfürtransferaz) (EC 2.8.1.1) enzimi aşağıdaki reaksiyonu katalizler:



Siyanür, zayıf asitlerle birleşir ve yer değiştirme reaksiyonlarında kuvvetli bir nükleofildir. Aynı zamanda siyanür, sülfüre özellikle persüfit formuna (R-S-S-) karşı büyük bir ilgiye sahiptir.

Rodanaz enziminin varlığı hayvanlarda, bitkilerde, funguslarda ve diğer mikroorganizmalarda gösterilmiştir [28, 32, 36, 42-44]. Rodanaz enzimi için bakteriyel kaynaklar *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Thiobacillus denitrificans*, *Rhodospirillum palustris*, *Klebsiella pneumoniae* ve *Azotobacter vinelandii*’ dir. Rodanazın fizyolojik fonksiyonları çok iyi bilinmemekle birlikte bulunduğu canlılarda çok amaçlı bir role sahip olduğu düşünülmektedir. Memelilerin karaciğer hücrelerinde mitokondrilerde rodanaz enziminin yoğun olarak bulunması ve sitokrom c oksidazın inaktivasyonuna karşı koruyucu bir görev üstlenmesi siyanür detoksifikasyonunda rol aldığı savını desteklemektedir [1]. Rodanaz enzimi pek çok kaynaktan saflaştırılmış olmakla birlikte, en fazla çalışmalar sığır böbreğinden saflaştırılan enzimle yapılmıştır. Enzimin tek polipeptid zinciri 32900 daltondur. Metal ve ek bir kofaktör içermemektedir. Enzimin üç boyutlu yapısı Hol ve arkadaşları tarafından (1983) difraksiyon yöntemi ile aydınlatılmıştır. Kinetik çalışmalar reaksiyonun 2 basamakta gerçekleştiğini desteklemektedir. Birinci basamakta, enzim persüfit ara köprüsünden proteinin sistin sülfidriline tiyosülfat bağlanır. İkinci basamakta ise siyanür bağlanır [1, 41].



Protein, benzer yapıda fakat aminoasit dizileri farklı olan iki kısım içerir. Aktif bölge iki kısmın ara yüzeyindedir. Aktif bölgedeki sülfidril Cys 247 hidrofobik bir ceple kapalıdır.

Anyonik karakterdeki substrat zincirde bağlanmayı kolaylaştıran katyonik bölge sayesinde Arg 186 ve Lys 249 ile bağlanır [1].

Merkaptopiruvat sülfürtransferaz (EC 2.8.1.2) rodanaz enzimine benzer bir enzimdir. Ko-substrat olan merkaptopiruvat sistinin biyokimyasal olarak transaminasyonundan meydana gelir. Enzimin hayvanlarda, funguslarda ve bakterilerden *E. coli* ile *A. vinelandii*' de varlığı gösterilmiştir. Merkaptopiruvat sülfürtransferaz, fare karaciğerinden, *E. coli* ve sığır böbreğinden saflaştırılmıştır. Sığır böbreğinden saflaştırılan enzim tek bir zincir içermektedir. Bu zincirde metal ve kofaktör bulunmamaktadır. Yapılan çalışmalar, merkaptopiruvat sülfürtransferaz'ın rodanaz kadar yaygın olarak bulunmaması ve reaksiyon için ko-substrata gereksinim duyması pratikte kullanılabilirlik açısından rodanazın daha avantajlı olduğunu göstermiştir [1].

β -siyanoalanin sentetaz (EC 4.4.1.9) enzimi siyanürün aminoasitteki üç karbonla yer değiştirmesini katalizler. Enzim aktivitesi *E. coli*, *Bacillus megaterium*, ve *Chromobacterium violaceum* gibi bakterilerde gösterilmekle birlikte bazı alg ve yüksek bitkilerde de aktivite bildirilmiştir [1, 42]. Bugüne kadar hiçbir fungal kaynaktan β -siyanoalanin sentetaz aktivitesinin var olduğu bildirilmemiştir [32].

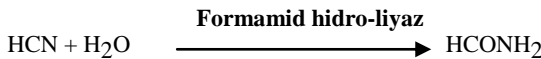
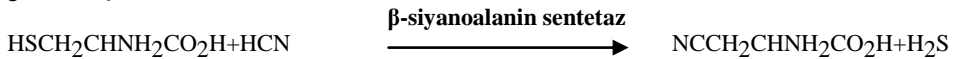
Bazı fitopatogenik funguslar tarafından siyanür yıkımı formamit hidro-liyaz (siyanür hidrataz) (EC 4.2.1.66) enzimi aracılığı ile gerçekleştirilir ve son ürün formamittir. Enzim aktivitesi ilk kez Fry ve Millar tarafından 1972 yılında *Stemphylium loti*'de gösterilmiştir [33]. Maksimum aktivitenin pH 7.0-9.0 arasında olduğu ve enzimin EDTA, amonyum klorür, potasyum klorür, magnezyum klorür ve kalsiyum klorür ile inhibe olmadığı bildirilmiştir. Fry ve Evans (1977) tarafından yapılan çalışmada 31 fungal türde formamid hidro-liyaz aktivitesi taranmış ve sonuç olarak patojenik olmayan 6 türde, siyanojenik olmayan bitki patojenlerinin 14 türünün dokuzunda, 11 siyanojenik bitki patojeninde pozitif sonuç bulduklarını bildirmişlerdir [46].

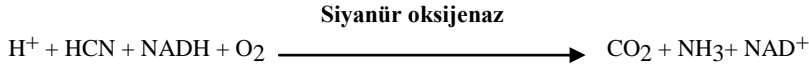
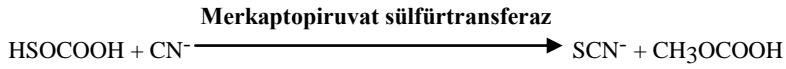
Siyanidaz enziminin aktivitesi sonucunda siyanür yıkım ürünleri olarak formik asit ve amonyak oluşmaktadır. Ingvorsen ve arkadaşları (1988) *Alcaligenes xylosoxidans subsp. denitrificans*'in etkin bir siyanidaz üreticisi olduğunu bildirmişlerdir [47]. Araştırmacılar, bu mikroorganizmadan saflaştırdıkları siyanidazın karakterizasyonunu yapmışlardır. Bu geliştirdikleri preparat günümüzde CYANIDASE ismiyle piyasada bulunmaktadır [1, 47].

Siyanür oksijenaz enziminin katalizlediği reaksiyonun ürünleri ise karbondioksit ve amonyaktır. Bu enzim *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11764'den izole edilmiş ve üzerinde çok sayıda çalışma yapılmıştır [17, 31, 48-54].

Neredeyse tüm yaşam formlarına karşı toksik etkiye sahip olması nedeniyle siyanüre karşı geliştirilmiş çeşitli metabolik yıkım yollarının olması da doğaldır. Ancak siyanür içeren endüstriyel kaynaklı atık suların arıtımı için en iyi kaynağın mikroorganizmalar olduğu düşünülmektedir [1]. Günümüze kadar siyanür üzerine etkili olan enzimlerin aktivitelerini ve özelliklerini aydınlatmaya yönelik yapılan çalışmaların sonucunda, bütün reaksiyonların tam anlamıyla aydınlatılmamış olduğu vurgulanmaktadır. Yalnız sadece yerini alma/ekleme reaksiyonları hakkında yeterli bilgi olduğu ve hangi proteinlerin siyanür yıkımını katalizlediği ve sınırlamaların neler olduğu bilinmemektedir.

Yukarıda özellikleri belirtilen bazı enzimlerin katalizlediği reaksiyonlar aşağıda gösterilmiştir.





Görüldüğü gibi, siyanürün yıkım reaksiyonlarını gerçekleştirmede iş gören metabolik yol izlerinde aydınlatılması gereken pek çok nokta karşımızda durmaktadır. Yapılan çalışmalarda hücrelerin sahip oldukları enzimlerin farklı çevresel koşullarda siyanür yıkımı için alternatif olabilecekleri de görülmektedir. Bu nedenle, yapılacak çalışmalar ile bir yandan daha etkin siyanür yıkımını gerçekleştirebilecek mikroorganizmalar belirlenirken, diğer taraftan ilgili enzimlerin gerçekleştirdikleri reaksiyonlar da aydınlatılarak alternatif çözüm yolları üretilebilecektir. Elde edilen sonuçlar ile, siyanür ile kirlenmiş/kirletilmiş ortamların biyolojik iyileştirilmesinde kullanılabilir mikroorganizmalarda belirlenmiş olacaktır.

REFERENCES / KAYNAKLAR

- [1] Raybuck S.A., "Microbes and Microbial Enzymes for Cyanide Degradation", Biodegradation, 3, 3-18, 1992.
- [2] Botz M.M., "Overview of Cyanide Treatment Methods", Mining Environmental Management, Mining Journal Ltd., London, UK., 28-30, 2001.
- [3] Akcil A., Karahan A.G., Ciftci H. et al., "Biological Treatment of Cyanide by Natural Isolated Bacteria (*Pseudomonas* sp.)", Minerals Engineering 16, 643-649, 2003.
- [4] Greenwood N.N., Earnshaw A., "Chemistry of Elements", Butterworth, Heinemann, 1984, 1542.
- [5] Boikesss R., Breslauer K., Edelson E., "Elements of Chemistry, General, Organic, and Biological", Prentice-Hall., 1986, 768p.
- [6] Skoog D.A., West D.M., Holler, F.J., "Fundamentals of Analytical Chemistry", 7th edition, Saunders College Publishing, 1996.
- [7] Gossel A., Bricker J., "Principles of Clinical Toxicology Cyanide", 1984, 90- 94.
- [8] Vural N., "Toksikoloji Akut Zehirlenmelerde İlk Yardım ve Antidot Tedavisinin Prensipleri", 1996, 278 – 279.
- [9] Knowles C.J., Bunch A.W., "Microbial Cyanide Metabolism", Advances in Microbial Physiology, 27, 73-111, 1986.
- [10] Evered, R. ve Harnett, S., "Cyanide Compounds in Biology", John Wiley and Sons, London, England, 1988.
- [11] Dökmeci, İ., Toksikoloji, Zehirlenmelerde Tanı ve Tedavi. Nobel Tıp Kitabevleri, 749s., 2001.
- [12] Ebbs S., "Biological Degradation of Cyanide Compounds", Current Opinion in Biotechnology, 15, 231 – 236, 2004.
- [13] Towill L., Drury J., Whitfield B. et al., 1978, "Reviews of the Environmental Effects of Pollutants: V. Cyanide", U.S. Oak Ridge National Laboratory, U.S. Environmental Protection Agency Health Effects Research Lab, EPA-600/1-78-027.
- [14] Adjei M.D., Ohta, Y., "Isolation and Characterization of a Cyanide-Utilizing *Burkholderia cepacia* Strain", World Journal of Microbiology & Biotechnology, 15, 699-704, 1999.
- [15] On-line: www. cyantists.com. [accessed June 12, 2006].
- [16] Türk Toksikoloji Derneği Panel Notları, 1999.

- [17] Kunz D.A., Chen J.L., Pan G., "Accumulation of α -keto Acids as Essential Components in Cyanide Assimilation by *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11764", Applied and Environmental Microbiology, 64, 4452-4459, 1998.
- [18] Chin R.G., Calderon Y., "Acute Cyanide Poisoning: A Case Report", The Journal of Emergency Medicine, 18, 441-445, 2000.
- [19] Keilin D., "Cytochrome and Intracellularrespiratory Enzymes", Eng. Enzymforsch., 2, 239-271, 1933.
- [20] Cain K., Skilleter D.N., "Preparation and Use of Mitochondria in Toxicological Research". Biochemical toxicology, a practical approach, Eds. Snell, K., Mullock, B., IRL Press, 1987, 286.
- [21] On-line: www.cyanicode.org [accessed August 25, 2005]
- [22] Çabuk, A., "Beyaz Çürükçül Funguslarla Siyanür Biyodegradasyonu", Doktora Tezi, O.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, 60 s, 2005.
- [23] Özel Y.K., "Çeşitli Makrofungus İzolatlarının Siyanür Biyodegradasyon Yeteneği Açısından Değerlendirilmesi ve Optimum Koşulların Belirlenmesi", Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 81s, 2008.
- [24] Train, E. Russel, "Quality Criteria for Water", Castle House Publication, LTD, London, 1979, 65.
- [25] Reich. K., "The Effect of Cyanide and Azide on the Respiration of the *Amoeba, mayorella palestinesis*", Physiological Zoology, 28, 145-151, 1955.
- [26] DSÖ, "Guidelines for Drinking Water Quality", Printed in Belgium, 1984, 50-55.
- [27] Bodansky M., Levy M.D., "Some Factors Influencing the Detoxication of Cyanides in Health and Disease", Archives of Internal Medicine, 31, 373-389, 1923.
- [28] Pereira P.T., Arrabaça, J.D., Amaral Collaço M.T., "Isolation, Selection and Characterization of a Cyanide-Degrading Fungus from an Industrial Effluent", International Biodeterioration & Biodegradation, 37, 45-52, 1996.
- [29] Çabuk A., Unal A.T., Kolankaya N., "Biodegradation of Cyanide by a White Rot Fungus *Trametes versicolor*", Biotechnology Letters, 28, 1313-1317, 2006.
- [30] Dash RR., Balomajumdar C., Kumar A., "Removal of Metal Cyanides from Aqueous Solutions by Suspended and Immobilized Cells of *Rhizopus oryzae* (MTCC 2541)", Engineering in Life Sciences, 9, 53-59, 2009.
- [31] Harris, R.E., Knowles, C.J., "The Conversion of Cyanide to Ammonia by Extracts of a Strain of *Pseudomons fluorescens* that Utilizes Cyanide as a Source of Nitrogen for Growth", FEMS Microbiology Letters 20, 337 - 341, 1983.
- [32] Ezzi M.I., Lynch J.M., "Cyanide Catabolizing Enzymes in *Trichoderma* spp.", Enzyme and Microbial Technology, 31, 1042 - 1047, 2002.
- [33] Fry W.E., Millar R.L., "Cyanide Degradation by An Enzyme from *Stemphylium loti*", Archives of Biochemistry and Biophysics, 151, 468-74, 1972.
- [34] Shah M.M., Grover T.A., Aust S.D., "Metabolism of Cyanide by *Phanerochaete chrysosporium*", Archives of Biochemistry and Biophysics 290, 173 - 178, 1991.
- [35] Adjei M.D., Ohta Y., "Factors Affecting the Biodegradation of Cyanide by *Burkholderia cepacia* Strain C-3", Journal of Bioscience and Bioengineering, 89, 3, 274 - 277, 2000.
- [36] Kao, C.M., Liu J.K., Lou, H.R. et al., "Biotransformation of Cyanide to Methane and Ammonia by *Klebsiella oxytoca*", Chemosphere, 50, 1055-1061, 2003.
- [37] Gurbuz F., Ciftci H., Akcil A. et al., "Microbial Detoxification of Cyanide Solutions: A New Biotechnological Approach Using Algae", Hydrometallurgy, 72, 167 - 176, 2004.
- [38] Dash, R.R., Balomajumder, C., Kumara, A., "Treatment of Metal Cyanide Bearing Wastewater by Simultaneous Adsorption and Biodegradation (SAB)", Journal of Hazardous Materials 152, 387-396, 2007.
- [39] Chen C. Y., Kao C. M., Chen S. C., "Application of *Klebsiella oxytoca* Immobilized Cells on the Treatment of Cyanide Wastewater", Chemosphere, 71, 133-139, 2008.

- [40] Gurbuz F., Ciftci H., Akcil A., "Biodegradation of Cyanide Containing Effluents by *Scenedesmus obliquus*", Journal of Hazardous Materials 162, 74-79, 2009.
- [41] Chaudhari A.U., Kodam K.M., "Biodegradation of Thiocyanate Using Co-culture of *Klebsiella pneumoniae* and *Ralstonia* sp.", Applied Microbiology and Biotechnology, 85, 1167-1174, 2010.
- [42] Blumenthal S.G., Hendrickson H.R., Abrol, Y.P., "Cyanide Metabolism in Higher Plants. 3. The Biosynthesis of Beta-cyanolanine", The Journal of Biological Chemistry, 243, 5302-5307, 1968.
- [43] Barclay M., Hart A., Knowles C.J. et al., "Biodegradation of Metal Cyanides by Mixed and Pure Cultures of Fungi", Enzyme and Microbial Technology 22, 223-231, 1988.
- [44] Ezzi M.I., Pascual J. A., Gould B.J. et al., "Characterization of the Rhodanese Enzyme in *Trichoderma* spp.", Enzyme and Microbial Technology, 32, 629-634, 2003.
- [45] Hol W.G.J., Lijk, L.J., Kalk, K.H., "The High Resolution Three Dimensional Structure of Bovine Liver Rhodanese", Fundamental and Applied Toxicology, 3, 370-376, 1983.
- [46] Fry W.E., Evans P. H., "Association of Formamide Hydrolyase with Fungal Pathogenicity to Cyanogenic Plants", Phytopathology, 67, 1001-1006, 1977.
- [47] Ingvorsen K., Yde B., Godtfredsen S. et. al., "Microbial Hydrolysis of Organic Nitriles and Amides. Cyanide Compounds in Biology". Eds: Evered, D and Harnett, S., John Wiley & Sons, New York, 1988, 16-31.
- [48] Rollinson G., Jones R., Meadows M.P. et al., "The Growth of a Cyanide Utilising Strain of *Pseudomonas fluorescens* in liquid Culture on Nickel Cyanide as a Source of Nitrogen", FEMS Microbiology Letters, 40, 199 -205, 1987.
- [49] Door, P.K., Knowles C.J., "Cyanide Oxygenase and Cyanase Activities of *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11764", FEMS Microbiology Letters, 60, 289-294, 1989.
- [50] Kunz D.A., Nagappan O., Avalos J.S. et al., "Utilization of cyanide as a nitrogenous substrate by *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11764: Evidence for Multiple Pathways of Metabolic Conversion", Applied and Environmental Microbiology, 58, 2022 - 2029, 1992.
- [51] Kunz D. A., Wanf C.S., Chen J.L., "Alternative Routes of Enzymatic Cyanide Metabolism in *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11764", Microbiology, 140, 1705 - 1712, 1994.
- [52] Suh Y.J., Park J.M., Yang J.W., Biodegradation of Cyanide Compounds by *Pseudomonas fluorescens* Immobilized on Zeolite, Enzyme and Microbial Technology, 16, 529-533, 1994.
- [53] Wang, C.S., Kunz, D.A., Veanables, B.J., "Incorporation of Molecular Oxygen and Water During Enzymatic Oxidation of Cyanide by *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11764", Applied and Environmental Microbiology, 62, 2195-2197, 1996.
- [54] Chen J.L., Kunz, D.A., "Cyanide Utilization in *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11764 Involves a Putative Siderophore", FEMS Microbiology Letters, 156, 61 - 67, 1997.
- [55] Kunz D.A., Fernandez R.F., Parab, P., "Evidence that Bacterial Cyanide Oxygenase is a Pterin-Dependent Hydroxylase", Biochemical and Biophysical Research Communications, 287, 514-518, 2001.
- [56] Kowalska M., Bodzek M., Bohdziewicz J., "Biodegradation of Phenols and Cyanides Using Membranes with Immobilized Microorganisms", Process Biochemistry, 33, 189-197, 1998.
- [57] Castric A.P., Strobel G.A., "Cyanide Metabolism by *Bacillus megaterium*", Journal of Biological Chemistry, 244, 4089-4094, 1969.
- [58] Atkinson, A., "Bacterial Cyanide Detoxification", Biotechnology and Bioengineering, 17, 457-460, 1975.
- [59] Skowronski, B., Strobel, G.A., Cyanide Resistance and Cyanide Utilization by A Strain of *Bacillus pumilus*, Canadian Journal of Microbiology 15, 93-98, 1969.

- [60] Meyers P.R., Rawlings D.E., Woods D.R. et al., "Isolation and Characterization of a Cyanide Dihydratase from *Bacillus pumilus* C1", *Journal of Bacteriology*, 175, 6105-6112, 1993.
- [61] Patil Y.B., Paknikar, K.M., "Development of a Process for Biodegradation of Metal Cyanides from Waste Waters", *Process Biochemistry*, 35, 1139-1151, 2000.
- [62] Figueira M.M., Ciminelli V.S.T., Andrade M.C. et al., "Cyanide Degradation by an *Escherichia coli* Strain". *Canadian Journal of Microbiology*, 42, 519-523, 1996.
- [63] Campos M.G., Pereira P., Roseiro J.C., "Packed-bed Reactor for the Integrated Biodegradation of Cyanide and Formamide by Immobilised *Fusarium oxysporum* CCM1 876 and *Methylobacterium* sp. RXM CCM1 908", *Enzyme and Microbial Technology*, 38, 848 – 854, 2006.
- [64] Kao C.M., Chen K.F., Liu J. K. et al., "Enzymatic Degradation of Nitriles by *Klebsiella oxytoca*", *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71, 228-233, 2006.
- [65] Kang M.H., Park J.M., "Sequential Degradation of Phenol and Cyanide by a Commensal Interaction Between Two Microorganisms", *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 69, 226–230, 1997.
- [66] Dursun, A.Y., Çalik, A., Aksu, Z., "Degradation of Ferrous (II) Cyanide Complex Ions by *Pseudomonas fluorescens*", *Process Biochemistry*, 34, 901-908, 1999.
- [67] Dursun A.Y., Aksu Z., "Biodegradation Kinetics of Ferrous (II) Cyanide Complex Ions by Immobilized *Pseudomonas fluorescens* in a Packed Bed Column Reactor", *Process Biochemistry*, 35, 615-622, 2000.
- [68] Shivaraman N., Parhad N.M., "Biodegradation of Cyanide by *Pseudomonas acidovorans* and Influence of pH and Phenol", *Indian Journal of Environmental Health*, 27, 1-8, 1985.
- [69] Luque-Almagro V.M., Huertas M.J., Blasco R. et al., "Bacterial Degradation of Cyanide and its Metal Complexed Under Alkaline Conditions", *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 940–947, 2005.
- [70] Silvos-Avilos J., Richmond M.G., Nagappan O. et al., "Degradation of Metal-Cyanide Complex Tetracyanonickelate (II) by Cyanide-Utilizing Bacterial Isolates", *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 3664–3670, 1990.
- [71] Babu G.R.V., Wolfram J.H., Chapatwala K.D., "Conversion of Sodium Cyanide to Carbon Dioxide and Ammonia by Immobilized Cells of *Pseudomonas putida*", *Journal of Indian Microbiology* 9, 235–238, 1992.
- [72] Chapatwala K.D., Babu G.R.V., Vijaya O.K. et al., "Biodegradation of Cyanides, Cyanates and Thiocyanates to Ammonia and Carbon Dioxide by Immobilized Cells of *Pseudomonas putida*", *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 20, 28–33, 1998.
- [73] Cunningham L., Williams H.D., "Isolation and Characterization of Mutants Defective in the Cyanide-Intensive Respiratory Pathway of *Pseudomonas aeruginosa*", *Journal of Bacteriology*, 177, 432-438, 1995.
- [74] Watanabe, A., Yano, K., Ikebukuro, K. et al., "Cyanide Hydrolysis in a Cyanide-Degrading Bacterium", *Pseudomonas stutzeri* AK61, by cyanidase", *Microbiology*, 144, 1677-1682, 1998.
- [75] White, D.M., Schnabel, W., "Treatment of Cyanide Waste in a Sequencing Batch Biofilm Reactor", *Water Research*, 32, 254-257, 1998.
- [76] Nazly N., Knowles C.J., Beardsmore A.J. et al., "Detoxification of Cyanide Degradation by an Immobilized Fungi", *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 33, 119–126, 1983.
- [77] Padmaja G., Balagopal, C., "Cyanide Degradation by *Rhizopus oryzae*", *Canadian Journal of Microbiology*, 31, 663-669, 1985.
- [78] Kwon H.K., Woo S.H., Park, J.M., "Degradation of Tetracyanonickelate (II) by *Cryptococcus humicola* MCN2", *FEMS Microbiology Letters*, 214, 211-216, 2002.

- [79] Pereira P., Pires A.S., Roseiro, J.C., “The Effect of Culture Aging, Cyanide Concentration and Induction Time on Formamide Hydro-lyase Activity of *Fusarium oxysporum* CCM1 876”, Enzyme and Microbial Technology, 25, 736-744, 1999.
- [80] Dumestre A., Chone T., Portal J.M. et al., “Cyanide Degradation Under Alkaline Conditions by A Strain of *Fusarium solani* Isolated from Contaminated Soils”, Applied and Environmental Microbiology, 63, 2729-2734, 1997.
- [81] Barclay M., Tett V.A., Knowles, C.J., “Metabolism and Enzymology of Cyanide/Metalocyanide Biodegradation by *Fusarium solani* Under Neutral and Acidic Conditions”, Enzyme and Microbial Technology 23, 321 – 330, 1988b.
- [82] Ezzi I.M., Lynch J.M., “Biodegradation of Cyanide by *Trichoderma* spp. and *Fusarium* spp.”, Enzyme and Microbial Technology, 36, 849-954, 2005.
- [83] Dash R.R., Balomajumder C., Kumar A., “Treatment of Metal Cyanide Bearing Wastewater by Simultaneous Adsorption and Biodegradation (SAB)”, Journal of Hazardous Materials, 152, 387-396, 2008.
- [84] Sirianuntapiboon S., Chairattawan K., Rarunroeng M., “Biological Removal of Cyanide Compounds from Electroplating Wastewater (EPWW) by Sequencing Batch Reactor (SBR) System”, Journal of Hazardous Materials, 154, 526-534, 2008.
- [85] Cipollone R., Ascenzi P., Tomao P. et al., “Enzymatic Detoxification of Cyanide: Clues from *Pseudomonas aeruginosa* Rhodanase”, Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology, 15, 199-211, 2008.
- [86] Basile L.J., Willson R.C., Sewell B.T. et al., “Genome Mining of Cyanide-Degrading Nitrilases from Filamentous Fungi”, Applied Microbiology and Biotechnology, 80, 427-435, 2008.
- [87] Podol'skaya V.I., Yakubenko L.N., Hryshchenko N.I. et al., “Influence of Highly-Disperse Silicas on Microbial Degradation of Cyanide Complexes”, Journal of Water Chemistry and Technology, 30, 59-64, 2008.
- [88] Dash R.R., Balomajumder C., Kumar A., “Treatment of Cyanide Bearing Water/Wastewater by Plain and Biological Activated Carbon”, Industrial & Engineering Chemistry Research, 48, 3619-3627, 2009.
- [89] Kaewkannetra P., Imai T., Garcia-Garcia F.J. et al., “Cyanide Removal from Cassava Mill Wastewater Using *Azotobacter vinelandii* TISTR1094 with Mixed Microorganisms in Activated Sludge Treatment System”, Journal of Hazardous Materials, 172, 224-228, 2009.
- [90] Chen C.Y., Kao C.M., Chen S.C. et al., “Biodegradation of Tetracyanoickelate by *Klebsiella oxytoca* under Anaerobic Conditions”, Desalination, 249, 1212-1216, 2009.
- [91] Huertas M.J., Saez L.P., Roldan M.D. et al., “Alcaline Cyanide Degradation by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 in a Batch Reactor. Influence of pH”, Journal of Hazardous Materials, 179, 72-78, 2010.
- [92] Ozel Y.K., Gedikli S., Aytar P. et al., “New Fungal Biomasses for Cyanide Biodegradation”, Journal of Bioscience and Bioengineering, 110, 431-435, 2010.