

Биологическая оценка отходов от процесса карбонитрации металлов с последующим оксидированием при помощи бактериальной тест-системы

Моисеева А. А.¹, Чекмарева О. В.¹, Нечитайло К. С.^{1,2}, Глуховская М. Ю.¹

¹ Оренбургский государственный университет
Оренбург, Россия

² Федеральный научный центр биологических систем и агротехнологий РАН
Оренбург, Россия

moiseiang@yandex.ru, olyachek@mail.ru, k.nechit@mail.ru, ecolog@mail.osu.ru

Машиностроительная отрасль занимает одну из лидирующих позиций в экономике страны. Во многом, ассортимент и качество изделий, выпускаемый данной отраслью, влияют и на развитие других отраслей экономики. Немаловажно, при производстве металлических изделий повышать такие показатели как долговечность, надежность, эксплуатационных свойств деталей различного назначения. Также, каждый этап производства должен быть направлен на минимизацию экологического воздействия на объекты окружающей среды. Для достижения упрочняющих свойств металла применяют процесс карбонитрации с последующим химическим оксидированием, в результате которого образуются отходы: отходы при очистке ванн карбонитрации металлических поверхностей (далее P1); отходы обработки металлических поверхностей методом химического оксидирования (далее P2). Исследование токсичных свойств отходов проводилось при помощи генно-инженерных люминесцирующих бактерий *Echerichia coli* K12 TG1, конститутивно экспрессирующие luxCDABE-гены природного морского микроорганизма *Photobacterium leiognathi* 54D10 (НВО «Иммунотех», г. Москва, Россия) в лиофилизированном состоянии под коммерческим названием «Эколом 10». Токсичные свойства образца P1 при тушении биосенсора $\geq 50\%$ зафиксированы при концентрациях от 100 % до 6,25 % в течение всего эксперимента, далее при разведении 3,13 % в начале исследования формируется люминесцентный отклик 20 %, но уже к 60 минуте экспозиции происходит тушение биосенсора более чем на 50 %. В диапазоне концентраций от 0,75 % до 0,10 % в первые минуты эксперимента образец P1 не проявляет токсичного действия, хотя в дальнейшем на всем временном промежутке наблюдается 20 % тушение свечения биосенсора по сравнению с контролем, токсичные свойства образца при данных концентрациях не зафиксированы. Оценка характера свечения бактерий позволила установить степень токсичности образца P2 после контакта *E. coli* K12 TG1 с клонированными luxCDABE-генами *P. leiognathi* 54 D10. В диапазоне концентраций от 100 % до 0,39 % образец P2 оказывает токсическое воздействие в течение всего эксперимента. При концентрации 0,20 % показатель токсичности полностью нивелируется на 60 минуте эксперимента, и далее в диапазоне концентраций от 0,098 % до 0,012 % токсичные свойства исследуемого образца отхода не фиксируются.

Ключевые слова: отходы, биолюминесценция, биологическая активность, карбонитрация, химическое оксидирование.

ВВЕДЕНИЕ

В наши дни машиностроительная отрасль занимает одну из лидирующих позиций в экономике страны. Во многом, ассортимент и качество изделий, выпускаемый данной отраслью, влияют и на развитие других отраслей экономики, поэтому, качество производимой продукции должно соответствовать требованиям надежности и долговечности.

Сегодня большое внимание производителей металлических изделий направлено на снижение металлоемкости при повышении таких показателей, как долговечность, надежность, эксплуатационных свойств деталей различного назначения. Для достижения этих показателей применяют всевозможные технологии химико-термической обработки металлов, одна из которых – карбонитрация. Данная технология поверхностного упрочнения является вариантом низкотемпературного цианирования, протекающая при температурах в диапазоне от 540 °C до 580 °C в расплавах цианатов. Процесс карбонитрации является альтернативой

газового азотирования, в результате которого происходит повышение эксплуатационных свойств деталей за более короткий временной промежуток (Цих, 2008, 2010).

Во многих случаях, для защиты металла от коррозии, после процесса карбонитрации применяют различные технологии оксидирования, в следствии чего на поверхности металла образуется защитная пленка.

От процесса карбонитрации с последующим химическим оксидированием образуются жидкие и твердые отходы в кусковой форме, опасность и токсичность которых не изучена до конца. Информация в доступных литературных источниках не в полной мере характеризует отходы от данных технологий. Поэтому, целью настоящих исследований является биологическая оценка отходов от процесса карбонитрации металлов с последующим оксидированием при помощи бактериальной тест-системы.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Процесс карбонитрации проводят в расплаве солей карбоната калия и цианата в температурном диапазоне от 560 °С до 600 °С, время процесса выдержки обусловлено требуемой величиной упрочняющего слоя и может находиться в интервале от 5 минут до 6 часов.

Состав ванн карбонитрации:

- поташ K_2CO_3 – 2,2 части, меламин $C_3H_6N_6$ – 1 часть, или
- поташ K_2CO_3 – 2,5 части, мелем $C_3H_3N_5$ – 1 часть.

В результате реакций образуется цианат калия.

Для нанесения антикоррозионного покрытия после технологии карбонитрации применяют химическое оксидирование.

Состав ванны химического оксидирования:

- едкий натр ГОСТ Р 55064-2012 (ГОСТ..., 2012) (700-800 г/л);
- нитрит натрия ГОСТ 19906-74 (ГОСТ..., 1974) (200-250 г/л);
- нитрат натрия ГОСТ 828-77 (ГОСТ..., 1977) (50-70 г/л) (Куксанов, 2019).

Для биологической оценки отходов от процесса карбонитрации металлов с последующим оксидированием были использованы:

- отходы при очистке ванн карбонитрации металлических поверхностей (далее P1);
- отходы обработки металлических поверхностей методом химического оксидирования (далее P2);
- генно-инженерные люминесцирующие бактерии *Echerichia coli* K12 TG1, конститутивно экспрессирующие *luxCDABE*-гены природного морского микроорганизма *Photobacterium leiognathi* 54D10 (НВО «Иммунотех», г. Москва, Россия) в лиофилизированном состоянии под коммерческим названием «Эколюм 10».

Исследования проводились при помощи микропланшетного анализатора Infinite 200 PRO ("Tecan Austria GmbH", Австрия) с программным обеспечением Magellan ("Tecan Austria GmbH", Австрия).

До проведения эксперимента штамм восстановили с помощью охлажденной дистиллированной воды, после чего, при температуре 2–4 °С его выдержали в течение 30 минут.

В дальнейшем, подготовленную суспензию с люминесцентными бактериями «Эколюм 10» и экстрактом, исследуемых образцов отходов в соотношении 1:1 внесли на 96-ти луночный планшет в трех параллелях. При помощи метода ступенчатого разведения с использованием дистиллированной воды были получены разведения, которые также нанесли на планшет (Данилов, 2002; Зарубина, 2005; Дерябин, 2009).

Пороговые уровни индекса токсичности определяли как:

- $T < 20$ – допустимая степень токсичности;
- $20 \leq T < 50$ – исследуемая проба токсична;
- $50 \leq T$ – проба сильно токсична (Ulitzur, 2002; Vetrova, 2007; Sizova, 2015).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследования с применением генно-инженерных люминесцирующих бактерий *Escherichia coli* K12 TG1, конститутивно экспрессирующие luxCDABE-гены природного морского микроорганизма *Photobacterium leiognathi* 54D10 (НВО «Иммунотех», г. Москва, Россия) в лиофилизированном состоянии под коммерческим названием «Эколюм 10» позволили определить биологическую активность образцов отходов от процесса карбонитрации металлов с последующим окислением.

При контакте образца P1 с клонированными lux CDABE-генами *P. leiognathi* 54 D10 были зафиксированы следующие результаты:

- при концентрации разведения образца P1 в диапазоне от 100 % до 50 % наблюдается полное тушение биосенсора (рис. 1);
- при концентрации 25 % вначале эксперимента фиксируется положительный люминесцентный отклик биосенсора, который в дальнейшем полностью нивелируется;
- при концентрации 12,5 % вначале опыта установлена положительная динамика свечения биосенсора, которое при истечении времени уменьшается и к завершению эксперимента (180 мин.) стабилизируется на уровне интенсивности бактериальной биолюминесценции, что составляет 6,92 % относительно контроля (табл. 1).

Характерной картиной начала эксперимента уровня относительной биолюминесценции *E. coli* K12 TG1 с клонированными lux CDABE-генами *P. leiognathi* 54 D10 при контакте с образцом P1 является отрицательная динамика свечения биосенсора по отношению к контролю. В дальнейшем на 60-ой минуте экспозиции при концентрациях 0,0010 %, 0,0005 % фиксируется положительный люминесцентный отклик биосенсора и к концу эксперимента относительное значение биолюминесценции стабилизируется на показателях 89,55 % и 90,56 % соответственно (табл. 1).

При исследовании образца P2 были получены следующие результаты динамики свечения *E. coli* K12 TG1 с клонированными lux CDABE-генами *P. leiognathi* 54 D10:

- в диапазоне концентрации разведения от 100 % до 1,56 % зафиксировано полное тушение биосенсора;
- при концентрации 0,78 % на 30-ой минуте экспозиции фиксируется положительная динамика свечения;
- на 60-ой минуте экспозиции при концентрации 0,20 % уровень люминесценции бактерий достиг уровня контрольного образца (рис. 3).

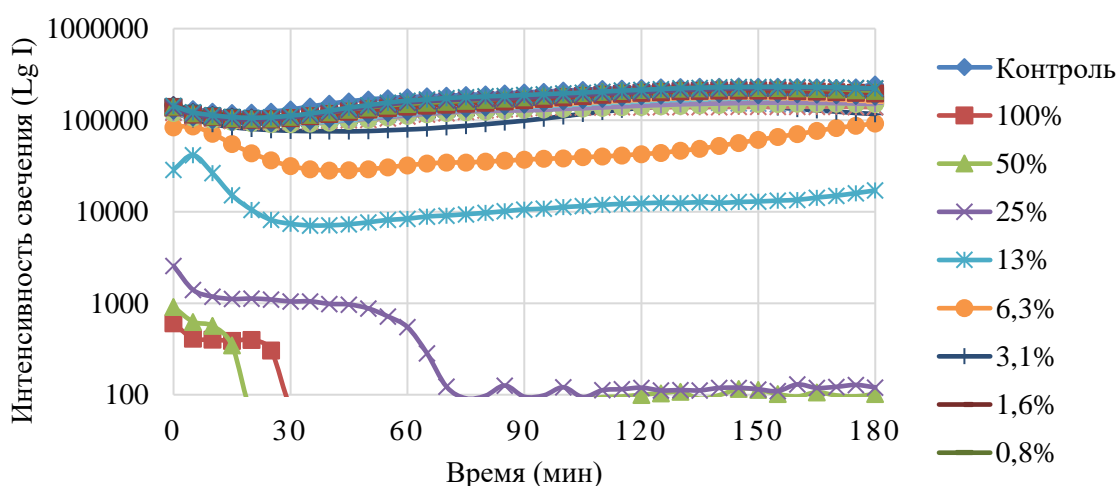


Рис. 1. Динамика свечения *Escherichia coli* K12 TG1 с клонированными lux CDABE-генами *Photobacterium leiognathi* 54 D10 при контакте с образцом P1

Таблица 1

Относительное значение биолюминесценции образца P1 после контакта *Echerichia coli* K12 TG1 с клонированными lux CDABE-генами *P. leiongnathi* 54 D10

Время, мин	Концентрация, %												
	100	50	25	12,5	6,25	3,13	1,56	0,78	0,39	0,20	0,10	0,05	0,02
0	0,41	0,63	1,76	19,71	57,47	84,12	96,27	100,28	100,43	95,91	92,87	84,43	82,71
30	0,06	0,06	0,80	5,64	24,08	58,52	78,90	84,75	81,33	78,33	79,34	74,16	73,09
60	0,03	0,05	0,31	4,68	17,97	44,22	66,47	71,25	71,92	71,14	73,55	67,69	61,71
90	0,03	0,04	0,05	5,26	18,41	49,09	67,94	69,43	69,17	74,14	75,72	78,10	66,53
120	0,04	0,04	0,05	5,46	18,88	60,22	64,79	71,50	70,68	78,68	78,92	74,37	61,29
150	0,04	0,05	0,05	5,54	26,11	60,88	65,37	75,91	74,74	78,62	79,55	64,91	59,92
180	0,03	0,04	0,05	6,92	37,27	47,35	61,09	72,16	72,29	76,09	72,88	56,65	56,32

Превышение уровня свечения по отношению к контрольной пробе при всех концентрациях разведения, на всем временном промежутке эксперимента не зафиксировано (рис. 2).

При дальнейших разведениях, в частности при концентрациях 0,098 % и 0,049 % вначале эксперимента уровень относительной биолюминесценции *E. coli* K12 TG1 с клонированными lux CDABE-генами *P. leiongnathi* 54 D10 составляет 69,86 % и 91,63 % соответственно, а уже на 30-ой минуте экспозиции данный показатель превышает уровень биолюминесценции контрольной пробы (табл. 2).

Такая же картина с превышением уровня относительной биолюминесценции *E. coli* K12 TG1 с клонированными lux CDABE-генами *P. leiongnathi* 54 D10 контрольной пробы зафиксирована при концентрации 0,024 %. При данной концентрации превышение уровня относительной биолюминесценции контрольной пробы наблюдается вначале эксперимента и

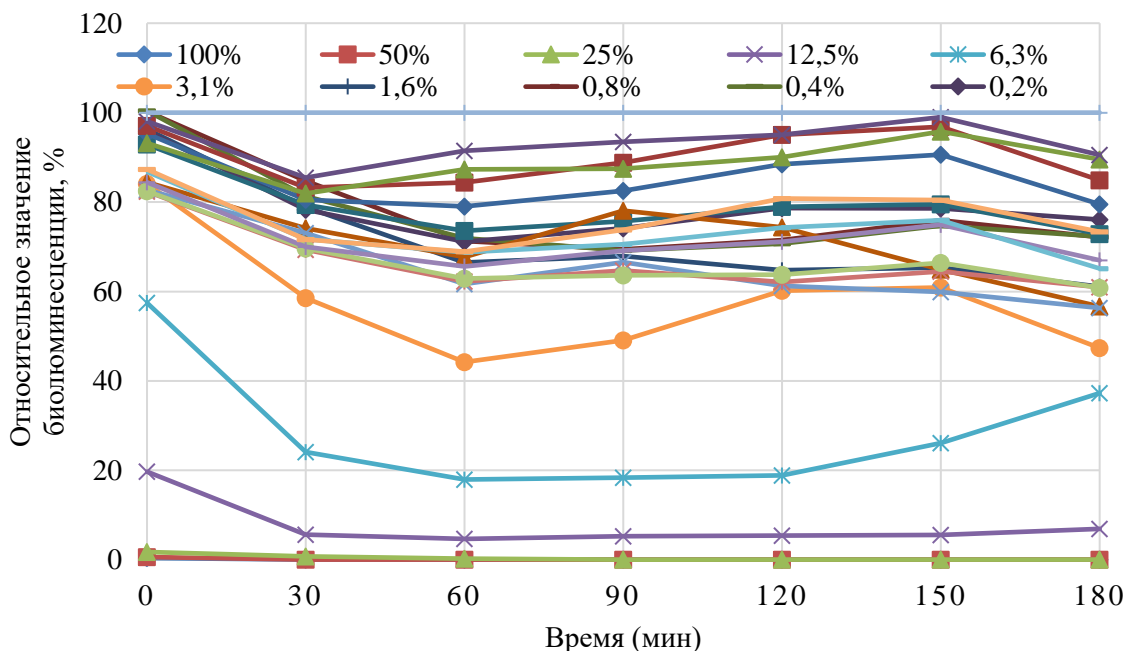


Рис. 2. Динамика относительной биолюминесценции *Echerichia coli* K12 TG1 с клонированными lux CDABE-генами *Photobacterium leiongnathi* 54 D10 при контакте с образцом P1

к концу времени экспозиции (60 минут) составляет 225,68 %. Возможно, полученные результаты эксперимента говорят о патологическом воздействии исследуемого образца P2 на бактерии (рис. 4).

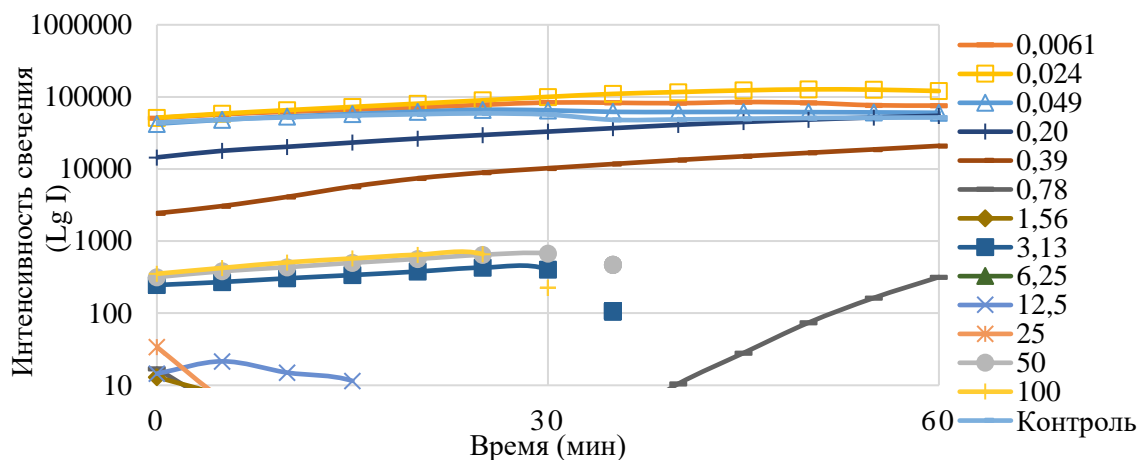


Рис. 3. Динамика свечения *Escherichia coli* K12 TG1 с клонированными lux CDABE-генами *Photobacterium leiognathi* 54 D10 при контакте с образцом P2

Таблица 2

Относительное значение биоломинесценции образца P2 после контакта *Escherichia coli* K12 TG1 с клонированными lux CDABE-генами *Photobacterium leiognathi* 54 D10

Время, мин	Концентрация, %												
	0,024	0,049	0,098	0,20	0,39	0,78	1,56	3,13	6,25	12,5	25	50	100
0	111,21	91,63	69,86	31,29	5,25	0,04	0,03	0,53	0,02	0,03	0,07	0,68	0,76
30	190,26	123,96	109,32	62,75	19,47	0,00	0,00	0,77	0,00	0,00	0,00	1,28	0,43
60	225,68	112,59	123,96	102,47	39,19	0,59	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

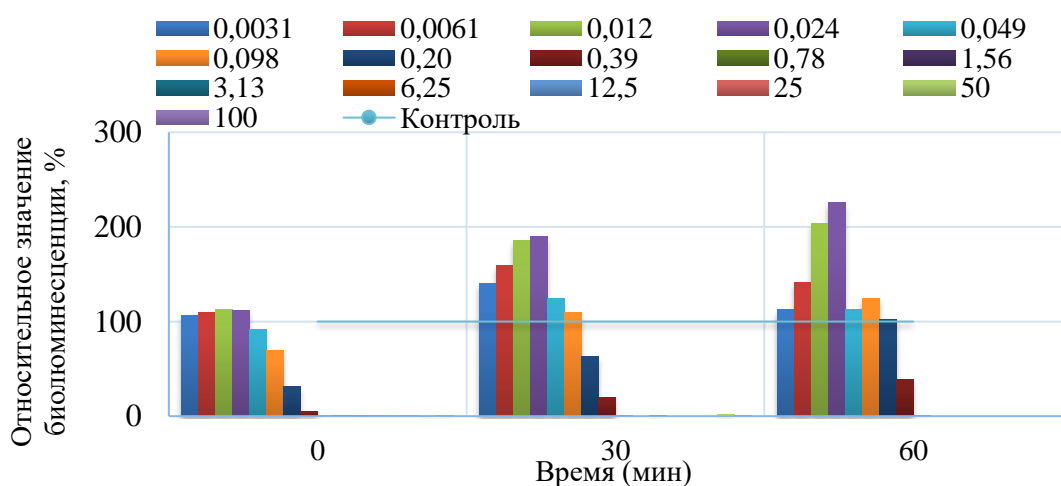


Рис. 4. Динамика относительной биоломинесценции *Escherichia coli* K12 TG1 с клонированными lux CDABE-генами *Photobacterium leiognathi* 54 D10 при контакте с образцом P2

На основании порогового уровня токсичности были определены токсичные свойства экстракта образцов при различных концентрациях:

- тушение люминесценции <20 % – образец «не токсичен»;
- тушение люминесценции находится в диапазоне от 20 % включительно и до 50 % – образец относительно токсичен;
- тушение люминесценции ≥ 50 % – образец токсичен.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Токсичные свойства образца P1 при тушении биосенсора ≥ 50 % зафиксированы при концентрациях от 100 % до 6,25 % в течение всего эксперимента, далее при разведении 3,13 % в начале исследования формируется люминесцентный отклик 20 %, но уже к 60 минуте экспозиции происходит тушение биосенсора более чем на 50 %. В диапазоне концентраций от 0,75 % до 0,10 % в первые минуты эксперимента образец P1 не проявляет токсичного действия, хотя в дальнейшем на всем временном промежутке наблюдается 20 % тушение свечения биосенсора по сравнению с контролем, токсичные свойства образца при данных концентрациях не зафиксированы. При дальнейших разведениях (от 0,05 % до 0,0061 %) формируется люминесцентный отклик в 50 % к середине эксперимента, возможно такая нехарактерная картина эксперимента говорит о патологическом действии образца P1. Дальнейшие разведения не оказывают токсичного воздействия при контакте *E. coli* K12 TG1 с клонированными lux CDABE-генами *P. leiognathi* 54 D10.

Оценка характера свечения бактерий позволила установить степень токсичности образца P2 после контакта *E. coli* K12 TG1 с клонированными lux CDABE-генами *P. leiognathi* 54 D10. В диапазоне концентраций от 100 % до 0,39 % образец P2 оказывает токсическое воздействие в течение всего эксперимента. При концентрации 0,20 % показатель токсичности полностью нивелируется на 60 минуте эксперимента, и далее в диапазоне концентраций от 0,098 % до 0,012 % токсичные свойства исследуемого образца отхода не фиксируются.

Список литературы

- ГОСТ 19906-74. Нитрит натрия технический. Технические условия (с Изменениями № 1-5). – Введ. 1976-01-01. – М.: Издательство стандартов, 1991. – 21 с.
- ГОСТ Р 55064-2012. Натр едкий технический. Технические условия. – Введ. 2013-10-01. – М.: Стандартинформ, 2013. – 50 с.
- ГОСТ 828-77. Натрий азотнокислый технический. Технические условия (с Изменениями № 1-5). – Введ. 1979-01-01 – М.: ИПК Издательство стандартов, 2002. – 22 с.
- Данилов В. С., Зарубина А. П., Ерошников Г. Е., Соловьева Л. Н., Карташев Ф. В., Завильгельский Г. Б. Сенсорные биолюминесцентные системы на основе lux-оперонов разных видов люминесцентных бактерий // Вестник Московского университета. Сер. Биологическая. – 2002. – № 3. – С. 20–24.
- Дерябин Д. Г. Бактериальная биолюминесценция: фундаментальные и прикладные аспекты // М.: Наука. – 2009. – 246 с.
- Зарубина А. П., Мажуль М. М., Новоселова Л. А., Гапочка М. Г. Бактериальный люминесцентный биотест // Сенсор. – 2005. – № 3. – С. 14–21.
- Куксанов В. Ф., Моисеева А. А., Чекмарева О. В., Оценка токсичности отходов от процесса химического оксидирования металлов // Экономика строительства и природопользования. – 2019. – № 3 (72). – С. 76–82
- Цих С. Г., Лисицкий В. Н. Опыт применения карбонитрации стальных деталей и инструмента в машиностроении // Вестник МГТУ им. Г. И. Носова. – 2008. – № 4. – С. 32–38.
- Цих С. Г., Лисицкий В. Н., Глебова Ю. А. Современные технологии химико-термической обработки в машиностроении // Современные технологии химико-термической обработки в машиностроении. – 2010. – № 1. – С. 66–70.
- Vetrova E. et al. A bioluminescent signal system: detection of chemical toxicants in water // Luminescence. – 2007. – Vol. 22, N 3. – P. 206–214.
- Sizova E. et al. Comparative characteristic of toxicity of nanoparticles using the test of bacterial bioluminescence // OSPC – Biosciences, Biotechnology Research Asia – Vol. 12 (Spl. End. 2). – P. 361–368.
- Ulitzur S., Lahav T., Ulitzur N. A novel and sensitive test for rapid determination of water toxicity // Environmental Toxicology – 2002. – Vol. 17, N 3. – P. 291–296.

Moiseeva A. A., Chekmareva O. V., Nechitailo K. S., Glukhovskaya M. Yu. Biological Assessment of Waste from the Process of Carbonitriding Metals Followed by Oxidation Using a Bacterial Test System // Ekosistemy. 2024. Iss. 40. P. 32–38.

The machine engineering industry holds one of the leading positions in the country's economy. In many ways, the range and quality of products manufactured by this industry influence the development of other sectors of the economy. It is crucial to enhance indicators such as durability, reliability, and operational properties of parts intended for various applications during the production of metallic products. Furthermore, each stage of the production process should be aimed at minimizing negative impact on environment. To achieve the strengthening properties of the metal, the carbonitriding process with subsequent chemical oxidation is used, which results in waste production: waste from cleaning the carbonitriding baths of metal surfaces (hereinafter P1); waste from processing metal surfaces by the chemical oxidation method (hereinafter P2). The study of the toxic properties of the waste was carried out using genetically engineered luminescent bacteria *Echerichia coli* K12 TG1, constitutively expressing *luxCDABE* genes of the natural marine microorganism *Photobacterium leiongnathi* 54D10 (NVO Immunotech, Moscow, Russia) in a lyophilized state marketed under the commercial name "Ecolum 10". Toxic properties of sample P1 with biosensor quenching $\geq 50\%$ were recorded at concentrations ranging from 100 % to 6.25 % throughout the experiment. Then, at a dilution of 3.13 %, a luminescent response of 20 % was initially observed, but by the 60th minute of exposure the biosensor was quenched by more at the beginning of the study than 50 %. In the concentration range from 0.75 % to 0.10 % in the first minutes of the experiment sample P1 does not exhibit any toxic effect. However, later over the entire time interval, a 20 % quenching of the biosensor glow was observed compared to the control. Toxic properties of the sample at these concentrations were not recorded. The assessment of the nature of the bacteria glow allowed determine the degree of toxicity of sample P2 after contact of *E. coli* K12 TG1 with cloned *lux CDABE* genes of *P. leiongnathi* 54 D10. In the concentration range from 100% to 0.39%, sample P2 had a toxic effect throughout the experiment.

Key words: waste, bioluminescence, biological activity, carbonitration, chemical oxidation.

Поступила в редакцию 23.10.24
Принята к печати 28.11.24