

Влияние видовых различий бактерий родов *Bacillus* и *Pseudomonas*, суспендированных в физиологическом растворе, на скорость восстановления иоднитротетразолия хлорида

© 2022. А. А. Калинина, к. х. н., доцент, Н. В. Гурский, аспирант,
Т. Н. Соколова, д. х. н., профессор, О. В. Кузина, к. х. н., доцент,
В. Ф. Смирнов, д. б. н., профессор,

Нижегородский государственный технический университет им. Р. Е. Алексеева,
603950, Россия, г. Нижний Новгород, ул. К. Минина, д. 24,
e-mail: 777aleksa777_87@mail.ru

Соли тетразолия широко используются как неселективные индикаторы жизнеспособности клеток в экологических исследованиях. Методы и математический аппарат химической кинетики позволяют количественно определить восстановительную активность бактерий по отношению к солям тетразолия. Выявлено, что в ряду грамположительных бактерий рода *Bacillus* эффективные константы скорости восстановления иоднитротетразолия хлорида (ИНТ) близки по своим значениям при различном характере зависимости накопления продукта иодмоноформаза с течением времени. Бактерии видов *B. pumilus* и *B. stearothermophilus* при низких клеточных концентрациях иоднитротетразолия хлорида восстанавливают соль тетразолия по классической экспоненте при конверсии реагента 98–99%. Бактерии *B. subtilis* восстанавливают ИНТ не полностью до конверсии реагента 75% из-за влияния продукта восстановления. Сделано предположение, что различия в кинетике восстановления солей тетразолия связаны со сродством (субстантивностью) иодмоноформаза к мембранным компонентам бактерий.

В роду грамотрицательных бактерий *Pseudomonas* выявлен небольшой индукционный период при восстановлении ИНТ видом *P. aeruginosa*. Различий в значениях эффективных констант скорости восстановления ИНТ видами *P. aeruginosa* и *P. fluorescens* не выявлено. Сделано предположение, что липопротеиновая мембрана *P. aeruginosa* оказывает большие затруднения для транспорта ИНТ в клетку.

Ключевые слова: иоднитротетразолия хлорид, иодмоноформаза, бактерии, восстановление, эффективные константы скорости.

The effect of species differences in bacteria of the genera *Bacillus* and *Pseudomonas*, suspended in saline, on the rate of recovery iodonitrotetrazolium chloride

© 2022. A. A. Kalinina ORCID: 0000-0002-1551-5790, N. V. Gurskiy ORCID: 0000-0002-5161-4876,
T. N. Sokolova ORCID: 0000-0002-5975-2608, O. V. Kuzina ORCID: 0000-0002-8425-7887,
V. F. Smirnov ORCID: 0000-0002-9023-8690

Nizhny Novgorod State Technical University n. a. R. E. Alekseev,
24, Minina St., Nizhny Novgorod, Russia, 603950,
e-mail: 777aleksa777_87@mail.ru

Tetrazolium salts are widely used as non-selective indicators of cell viability in environmental studies. The methods and mathematical apparatus of chemical kinetics make it possible to quantify the reducing activity of bacteria with respect to tetrazolium salts. It was found that in the series of gram-positive bacteria of the genus *Bacillus*, the effective rate constants for the reduction of iodonitrotetrazolium chloride (INT) are close in their values with different character of the dependence of the accumulation of the product of iodomonoformazan over time. Bacteria of the species *B. pumilus*, *B. stearothermophilus* at low cellular concentrations of iodonitrotetrazolium chloride reduce the tetrazolium salt according to the classical exponent at a reagent conversion of 98–99%. *B. subtilis* bacteria partially reduce INT up to a reagent conversion of 75% due to the effect of the reduction product. It has been suggested that the differences in the reduction kinetics of tetrazolium salts are associated with the affinity (substantivity) of iodomonoformazans for membrane components of bacteria.

In the genus of gram-negative bacteria *Pseudomonas*, a short induction period was found during the reduction of INT by the species *P. aeruginosa*. Differences in the values of the effective rate constants of INT reduction by *P. aeruginosa* and *P. fluorescens* species were not revealed. It has been suggested that the lipoprotein membrane of *P. aeruginosa* makes it difficult for the transport of INTs into the cell.

Keywords: iodonitrotetrazolium chloride, iodine monoformazan, bacteria, reduction, effective rate constants.

Использование солей тетразолия в научных и практических целях основано на их способности к восстановлению с образованием окрашенных формазанов. Впервые возможность применения этих солей для выявления жизнеспособности клеток и одноклеточных организмов была продемонстрирована в 1941 г. [1]. Начиная с середины прошлого столетия, происходит постоянное совершенствование методик использования солей тетразолия в разных областях научно-хозяйственной деятельности человека. Особенно широкое распространение тетразолиевые индикаторы получили в экологии, что связано с необходимостью постоянного мониторинга состояния почвы, воды, особенно после негативных воздействий на окружающую среду техногенных катастроф и природных катаклизмов [2–4].

В настоящее время в исследованиях применяются как непосредственно соли тетразолия, в основном нитросиний тетразолия хлорид [5–6], так и адаптированная к экологическим проблемам система мультисубстратного тестирования (МСТ) «Эколог» на основе трифенилтетразолия бромид [7]. Вместе с тем известно, что в отдельных случаях тетразолиевые индикаторы дают отрицательный результат при наличии в исследуемом объекте жизнеспособных бактерий. На этот эффект, в частности, указывали и разработчики системы МСТ «Эколог» [8] и более ранней системы «Biolog» [8–9].

Таким образом, возникает проблема поиска причин различной восстановительной способности бактерий, решение которой позволит организовать процесс использования тетразолиевых индикаторов более продуктивно и с меньшими погрешностями. Методы и математический аппарат формальной кинетики могут быть успешно использованы для выявления причин различного отклика микроорганизмов на тетразолиевые индикаторы [10–12]. Так, было установлено, что эффективная константа скорости $k_{эф.}$ восстановления иоднитротетразолия хлорида (ИНТ) грамположительными бактериями *Bacillus subtilis*, суспендированными в физиологическом растворе, рассчитанная по уравнению реакции первого порядка, существенно превышает

соответствующие значения, определённые при использовании грамотрицательных бактерий. Был сделан вывод, что определяющей в различиях восстановительной способности бактерий является диффузия соли тетразолия к мембранным сайтам восстановления, которая зависит от строения клеточной стенки [11].

Целью работы явилось определение влияния видовых различий на скорость восстановления ИНТ суспендированными в физиологическом растворе бактериями родов *Bacillus* и *Pseudomonas*.

Объекты и методы исследования

В качестве тест-организмов использовались музейные штаммы бактерий *Bacillus pumilus*, *B. stearothermophilus* и *Pseudomonas fluorescens*, *P. aeruginosa* (Всероссийская коллекция микроорганизмов, г. Пушкино Московской обл.).

Методика кинетического эксперимента описана в работах [10–11]. Смыв суточной бактериальной культуры со скошенного мясопептонного агара (МПА) физиологическим раствором (0,9% водный раствор хлорида натрия) доводили до оптической плотности $1,00 \pm 0,05$ (670 нм). К 12 мл бактериальной суспензии в стерильных условиях добавляли аликвоту 1,0 мМ водного раствора соли ИНТ в соответствии с начальной концентрацией, и смесь выдерживали в термостате при температуре эксперимента. По истечении определённого времени 5 мл анализируемой смеси отбирали в пробирку с *B. pumilus* и *B. stearothermophilus* и 0,2 мл раствора лизоцима – для *P. fluorescens*. Через 30 с смесь экстрагировали этилацетатом, сушили хлоридом кальция, после фильтрования анализировали спектрофотометрически при длине волны 490 нм, характерной для продукта восстановления – иодмоноформаза. Коэффициент экстинкции определяли по калибровочному графику. Его величина, равная $1,9 \cdot 10^4$ л/(моль · см), согласуется с литературными данными [12].

Текущие концентрации продукта восстановления ИНТ иодмоноформаза (ИМФ) определяли по результатам 5–6 независимых

экспериментов, среднеквадратичная ошибка определения составила 10–15%.

Спектры регистрировали на спектрофотометре «2802 UV/VisUnico». Исследования с применением культуры бактерий проводили в термостате марки «ТС-1/80 СПУ». В работе использовали следующие реактивы: иодтритетразолия хлорид (95%, Aldrich), иодмоноформаза (crystalline, Sigma), лизоцим (препарат «Лизобакт» Bosnalijek), этилацетат (ч. д. а.) в виде коммерческих препаратов.

Результаты и обсуждение

Известно, что в качестве доноров электронов в восстановлении ИНТ жизнеспособными бактериями выступают восстановленные формы коферментов мембранной электронно-транспортной цепи. В работе [11] с использованием ингибиторов и разобщителей электронного транспорта была определена их возможная природа. Нами установлено, что одним из главных мембранных доноров электронов у бактерий *B. subtilis* является флавинадениндинуклеотид (ФАДН₂), кофермент мембранной сукцинатдегидрогеназы. Кинетическим методом найдена константа обратимого конкурентного ингибирования малоновой кислотой нативной сукцинатдегидрогеназы.

На рисунках 1 и 2 представлены кинетические кривые накопления продукта восстанов-

ления ИМФ суспензией бактерий *B. pumilus* и *B. stearothermophilus*.

Как следует из полученных данных, изученные виды бактерии р. *Bacillus* практически полностью восстанавливают ИНТ в течение 35–45 мин. Для сравнения кинетическая кривая накопления ИМФ с течением времени под воздействием суспензии бактерий *B. subtilis* имеет вид монотонно возрастающей зависимости, переходящей в плато [11]. Процесс протекал до конверсии реагента не более 75%, после чего замедлялся, вплоть до отрицательной динамики в накоплении продукта. Аналогичную зависимость наблюдали и при работе с культурой *P. aeruginosa* [11], когда восстановление ИНТ уже приостанавливалось при конверсии реагента 55–60%.

Нами было сделано предположение, что причиной такого поведения бактерий *B. subtilis* и *P. aeruginosa* может быть адсорбция ИМФ на окислительно-восстановительных центрах, вследствие чего происходит их экранирование для взаимодействия с реагентом.

Но, как показывают данные, приведённые на рисунках 1 и 2, явление замедления реакции не является общим даже в ряду бактерий одного рода. Если эффективные константы скорости восстановления ИНТ суспензией бактерий *B. subtilis* рассчитывались по модифицированному уравнению реакции первого порядка с учётом вида кинетической кривой и достижения плато [10], то полученные

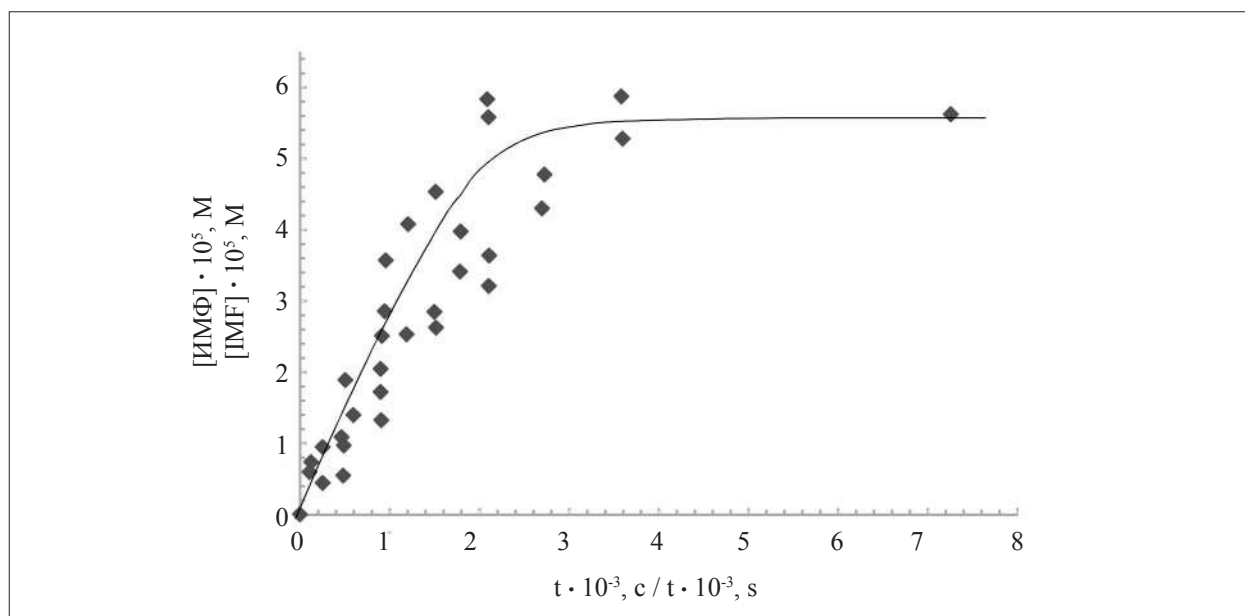


Рис. 1. Кинетическая кривая накопления ИМФ в присутствии бактерий *Bacillus pumilus* ([ИНТ]₀ = 5,88 · 10⁻⁵ М; 37 °С)

Fig. 1. Kinetic curve of IMF accumulation in the presence of bacteria *Bacillus pumilus* ([INT]₀ = 5,88 · 10⁻⁵ M; 37 °C)

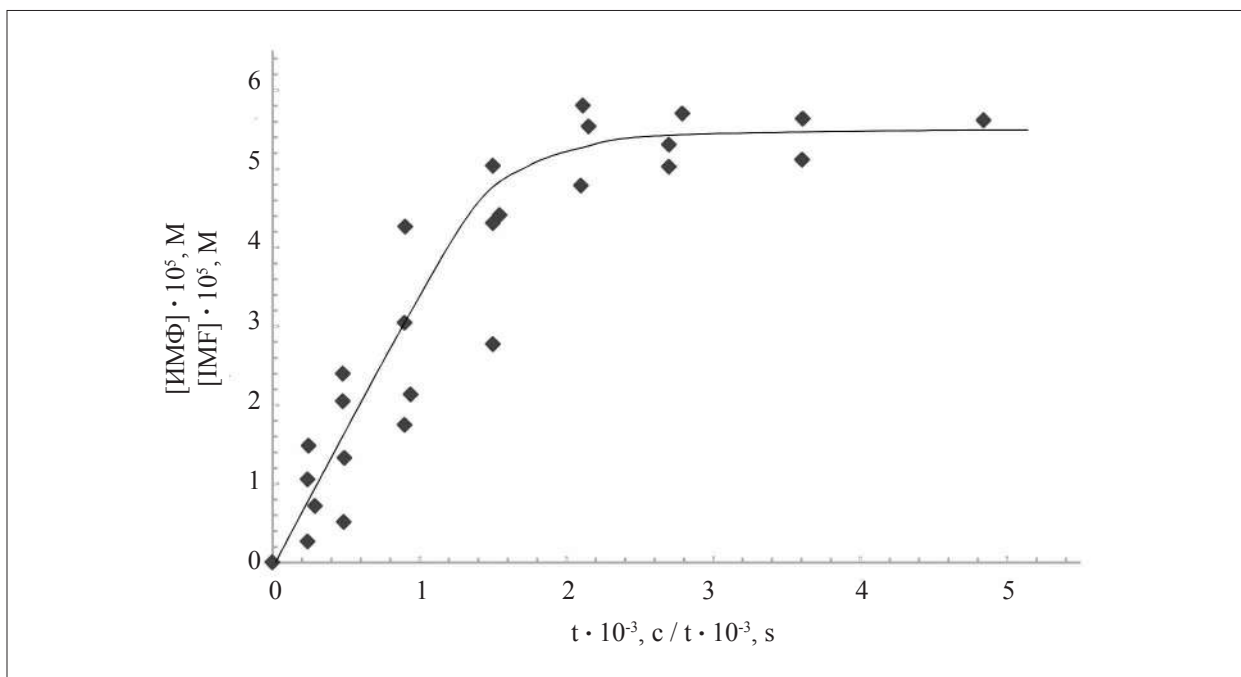


Рис. 2. Кинетическая кривая накопления ИМФ в присутствии бактерий *Bacillus stearothermophilus* ($[INT]_0 = 5,88 \cdot 10^{-5}$ М; 37 °С)
Fig. 2. Kinetic curve of IMF accumulation in the presence of bacteria *Bacillus stearothermophilus* ($[INT]_0 = 5,88 \cdot 10^{-5}$ М; 37 °С)

Таблица 1 / Table 1

Эффективные константы скорости восстановления иоднитротетразолия хлорида (ИНТ) суспензией бактерий *Bacillus pumilus* ($[INT]_0 = 5,88 \cdot 10^{-5}$ М; 37 °С)
 Effective rate constants for the reduction of INT by a suspension of *Bacillus pumilus* bacteria ($[INT]_0 = 5,88 \cdot 10^{-5}$ М; 37 °С)

Время, с (<i>t</i>) Time, s (<i>t</i>)	Текущая концентрация [ИМФ] _{<i>t</i>} · 10 ⁵ , М Current concentration [IMF] _{<i>t</i>} · 10 ⁵ , М	([ИНТ] ₀ – [ИМФ] _{<i>t</i>}) · 10 ⁵ , М ([INT] ₀ – [IMF] _{<i>t</i>}) · 10 ⁵ , М	Эффективная константа скорости <i>k</i> · 10 ⁴ , с ⁻¹ Effective rate constant <i>k</i> · 10 ⁴ , s ⁻¹
255	0,64	5,24	4,52
465	1,09	4,79	4,41
598	1,39	4,49	4,51
900	2,04	3,84	4,73
1191	2,53	3,35	4,72
1500	2,84	3,04	4,40
1786	3,41	2,47	4,85
2109	3,64	2,24	4,58
2730	4,77	1,11	4,51
7260	5,62	0,26	4,29
			<i>k</i> _{ср.} = 4,55 · 10 ⁻⁴ , с ⁻¹

в настоящей работе кинетические данные удовлетворительно описываются классическим экспоненциальным уравнением реакции первого порядка следующего вида:

$$k = \frac{1}{t} \ln \frac{[INT]_0}{([INT]_0 - [IMF]_t)} \quad (1)$$

В таблицах 1 и 2 представлены значения эффективной константы скорости, рассчитан-

ные по уравнению (1), для отдельных экспериментов из проведённой серии кинетических исследований.

Средние значения эффективной константы скорости, определённые по результатам 6 независимых экспериментов, представлены в таблице 3.

Как следует из данных (табл. 3), в ряду одного рода бактерий различия в значениях эффективной константы скорости вос-

Таблица 2 / Table 2

Эффективные константы скорости восстановления иоднитротетразолия хлорида (ИНТ) суспензией бактерий *Bacillus stearothermophilus* ($[ИНТ]_0 = 5,88 \cdot 10^{-5} \text{ М}$; $t = 37 \text{ }^\circ\text{С}$)
 Effective rate constants for the reduction of INT by a suspension of bacteria *Bacillus stearothermophilus* ($[ИНТ]_0 = 5,88 \cdot 10^{-5} \text{ М}$; $t = 37 \text{ }^\circ\text{С}$)

Время, с Time, s	Текущая концентрация [ИМФ] _t · 10 ⁵ , М / Current concentration [IMF] _t · 10 ⁵ , М	([ИНТ] ₀ – [ИМФ] _t) · 10 ⁵ , М ([INT] ₀ – [IMF] _t) · 10 ⁵ , М	Эффективная константа скорости $k \cdot 10^4, \text{ с}^{-1}$ Effective rate constant $k \cdot 10^4, \text{ s}^{-1}$
240	1,05	4,83	8,20
480	2,05	3,83	8,93
900	3,04	2,84	8,09
1500	4,31	1,57	8,80
2100	4,78	1,10	7,98
2510	5,16	0,72	8,37
3120	5,48	0,40	8,61
3610	5,64	0,24	8,86
			$k_{\text{ср.}} = 8,48 \cdot 10^{-4}, \text{ с}^{-1}$

Таблица 3 / Table 3

Эффективные константы скорости восстановления иоднитротетразолия хлорида (ИНТ) суспензией бактерий рода *Bacillus* (37 °С) / Effective rate constants for the reduction of INT by a suspension of bacteria of the genus *Bacillus* (37 °С)

Бактерия Bacterium	Кинетическое уравнение Kinetic equation	Эффективная константа скорости $k \cdot 10^4, \text{ с}^{-1}$ Effective rate constant $k \cdot 10^4, \text{ s}^{-1}$
<i>B. subtilis</i>	$k = \frac{1}{t} \ln \frac{([ИНТ]_0 - [ИМФ]_\infty)}{([ИНТ]_t - [ИМФ]_\infty)}$	9,58±1,24 [10]
<i>B. pumilus</i>	$k = \frac{1}{t} \ln \frac{[ИНТ]_0}{([ИНТ]_0 - [ИМФ]_t)}$	4,68±0,42
<i>B. stearothermophilus</i>	$k = \frac{1}{t} \ln \frac{[ИНТ]_0}{([ИНТ]_0 - [ИМФ]_t)}$	8,75±0,96

становления ИНТ незначительные. Однако кинетические закономерности описываются разными формами уравнения реакции первого порядка.

В то же время кинетическая кривая накопления ИМФ под воздействием грамотрицательных бактерий *P. fluorescens*, суспендированных в физиологическом растворе (рис. 3), повторяет вид кинетической кривой восстановления ИНТ суспензией бактерий *P. aeruginosa* [11].

Как видно из данных, представленных на рисунке 3, кинетический эксперимент завершён при конверсии реагента около 50%. После чего достоверные количественные данные из-за сложностей экстракции ИМФ и невозможности его полного извлечения из клеток получить не удалось.

Учитывая характер восстановления ИНТ, эффективную константу скорости восстановления определяли при использовании линейной анаморфозы кинетики первого порядка следующего вида:

$$\ln \frac{[ИМФ]_\infty - [ИМФ]_t}{[ИМФ]_\infty} = -k_{\text{эф.}} t. \quad (2)$$

При этом величину $[ИМФ]_\infty$ оценивали графической экстраполяцией кинетической кривой, представленной на рисунке 3, в область «плато» по аналогии с обработкой экспериментальных данных, полученных в работах [10–11], в которых участок «плато» был явно выраженным. Экстраполяционное значение $[ИМФ]_\infty$, равное $4,20 \cdot 10^{-5} \text{ М}$, в пределах ошибки согласуется с максималь-

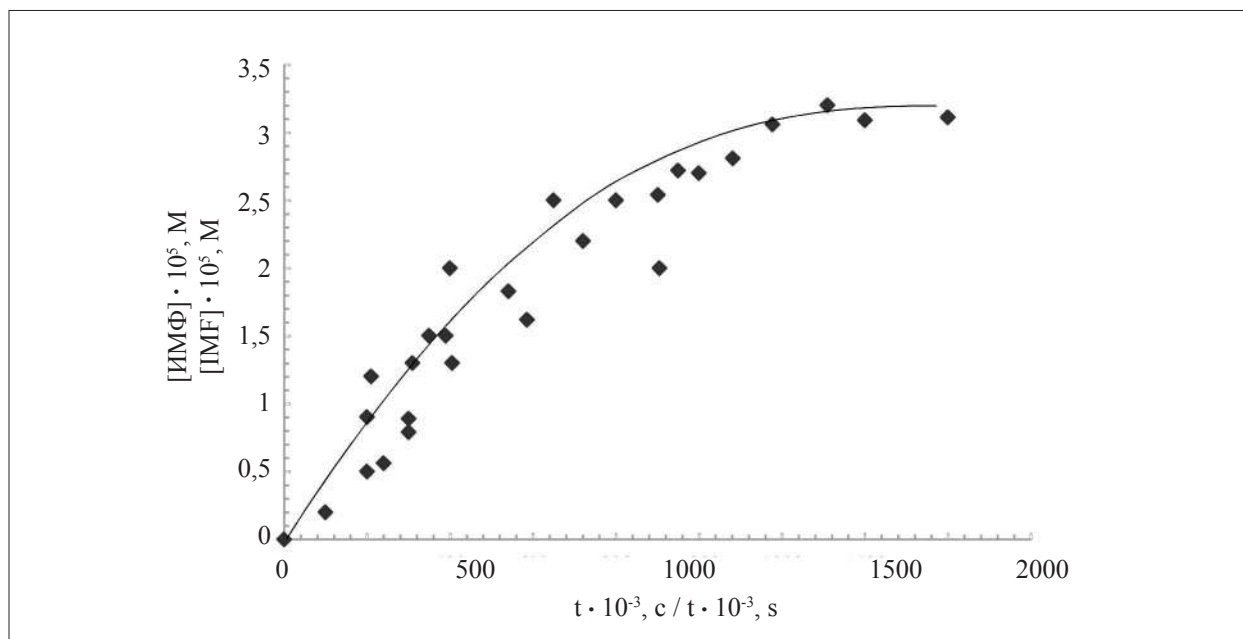


Рис. 3. Кинетическая кривая накопления ИМФ в присутствии бактерий *Pseudomonas fluorescens* ($[ИНТ]_0 = 5,88 \cdot 10^{-5} \text{ M}$; 27°C)
Fig. 3. Kinetic curve of IMF accumulation in the presence of bacteria *Pseudomonas fluorescens* ($[ИНТ]_0 = 5,88 \cdot 10^{-5} \text{ M}$; 27°C)

Таблица 4 / Table 4

Эффективные константы скорости восстановления иоднитротетразолия хлорида в среде суспендированными в физиологическом растворе бактериями *Pseudomonas fluorescens* ($[ИНТ]_0 = 5,88 \cdot 10^{-5} \text{ моль/л}$; 27°C)
 Effective rate constants for the reduction of iodonitrotetrazolium chloride in the medium by bacteria *Pseudomonas fluorescens* suspended in physiological solution ($[ИНТ]_0 = 5,88 \cdot 10^{-5} \text{ mol/L}$; 27°C)

Время, с Time, s	Текущая концентрация $[ИМФ]_t \cdot 10^5, \text{ M}$ Current concentration $[ИМФ]_t \cdot 10^5, \text{ M}$	Эффективная константа скорости $k \cdot 10^4, \text{ c}^{-1}$ Effective rate constant $k \cdot 10^4, \text{ s}^{-1}$
3590	1,22	0,96
5410	1,83	1,05
5860	1,62	0,83
7210	2,21	1,03
9010	2,59	1,06
10820	2,76	0,99
11770	3,06	1,11
16800	3,47	1,04
21100	3,68	0,99
		$k_{cp} = 1,01 \cdot 10^{-4}, \text{ c}^{-1}$

ным значением концентрации ИМФ, которое было зафиксировано экспериментально при длительной экспозиции реакционной смеси (более 15 ч) до проявления отрицательной динамики в накоплении ИМФ.

В таблице 4 представлены значения эффективной константы скорости, рассчитанные по уравнению (2).

Среднее значение эффективной константы скорости, определённое по шести независимым экспериментам, составило $(1,12 \pm 0,19) \cdot 10^{-4} \text{ c}^{-1}$. Для сравнения эффективная константа скоро-

сти восстановления ИНТ суспензией бактерий *P. aeruginosa* равна $(0,86 \pm 0,09) \cdot 10^{-4} \text{ c}^{-1}$ [11]. Однако следует отметить, что в работе [11] результаты восстановления ИНТ мембранными компонентами бактерий *P. aeruginosa* представлены в масштабе времени, удобном для представления экспериментальных данных при длительной экспозиции и расчёта эффективной константы скорости реакции, при этом нивелировался небольшой по продолжительности индукционный период. При выявлении возможных видовых различий

в р. *Pseudomonas* был повторно исследован начальный период восстановления ИНТ суспендированными бактериями *P. aeruginosa* (рис. 4).

Как видно из рисунка 4, на котором представлен фрагмент начального участка кинетической кривой восстановления ИНТ суспендированными в физиологическом растворе бактериями вида *P. aeruginosa*, реакция протекает с непродолжительным индукционным периодом (примерно 10 мин при общей экспозиции более 6 ч).

Заключение

Установлено, что эффективные константы скорости восстановления ИНТ суспензией в физиологическом растворе бактерий *B. pumilus* и *B. stearothermophilus* рассчитываются по экспоненциальному уравнению реакции первого порядка. Выявлено отсутствие существенных различий в значениях эффективных констант скорости в ряду грамположительных бактерий рода *Bacillus*. Показано, что видовые различия бактерий проявляются через характер кинетических кривых и конверсию реагента при его клеточной концентрации, не превышающей $5,88 \cdot 10^{-5}$ М. При использовании бактерий вида *B. subtilis* кривая накопления ИМФ носит монотонно возрастающий характер, переходя в плато при конверсии реагента около 75% [10], в то время как бактерии видов

B. pumilus и *B. stearothermophilus* восстанавливают ИНТ по классической экспоненте с конверсией реагента 98–99%. В работах [10, 11] было высказано предположение, что причиной неполного восстановления ИНТ клеточными компонентами бактерий может быть блокирование продуктами восстановления редокс-центров бактерий. Исходя из полученных данных, можно сделать вывод, что бактерии рода *Bacillus* разных видов отличаются своей субстантивностью к ИМФ. Бактерии вида *B. subtilis* сильнее необратимо адсорбируют нейтральные продукты восстановления оксидоредуктазными центрами, чем бактерии *B. pumilus* и *B. stearothermophilus*. Можно предположить, что мембранные оксидоредуктазы, как ключевые восстановители ИНТ, в рамках одного рода представлены разными генетическими вариантами, различающимися по гидрофобности: $B. subtilis > B. pumilus > B. stearothermophilus$. Вследствие чего экраняющий эффект продукта по отношению к окислительно-восстановительным центрам бактерий *B. pumilus* и *B. stearothermophilus* не проявляется, и восстановление протекает до практически полной конверсии реагента.

В ряду грамотрицательных бактерий рода *Pseudomonas*, обладающего низкой восстановительной способностью к ИНТ, особых кинетических различий не выявлено. Кинетические кривые накопления ИМФ под влиянием бактерий видов *P. aeruginosa* [11]

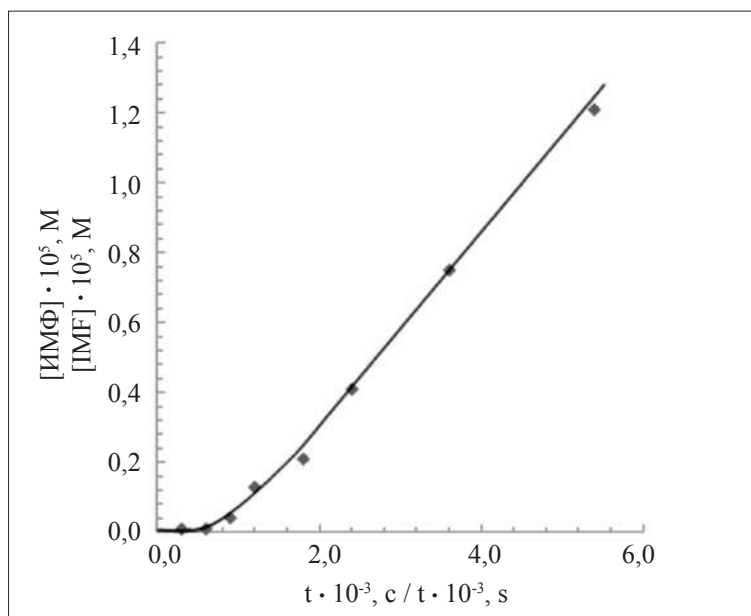


Рис. 4. Фрагмент кинетической кривой накопления ИМФ в присутствии бактерий *Pseudomonas aeruginosa* ($[INT]_0 = 8,82 \cdot 10^{-5}$ М; 37 °С)

Fig. 4. Fragment of the kinetic curve of IMP accumulation in the presence of *Pseudomonas aeruginosa* bacteria ($[INT]_0 = 8,82 \cdot 10^{-5}$ М; 37 °С)

и *P. fluorescens* имеют одинаковый характер с тем отличием, что на кинетической кривой *P. aeruginosa* можно выявить индукционный период в шкале времени, удобной для представления экспериментальных данных начального периода реакции. Вероятно, что липопротеиновая мембрана грамотрицательных бактерий *P. aeruginosa* в большей степени вызывает диффузионные затруднения к сайтам восстановления, чем бактерий вида *P. fluorescens*.

References

1. Kuhn R., Jerchel D. Reduktion von Tetrazoliumsalzen durch Bakterier garende Hefe und keimende Samen // Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft. 1941. V. 74. P. 949–970 (in Germany). doi: 10.1002/cber.19410740615
2. Wasoh M.H., Lutfi W., Syahir A., Yunus A.S.M., Azwady A., Shahrudin N.A., Muskhazli M. Development of a bacterial-based tetrazolium dye (MTT) assay for monitoring of heavy metals // International Journal of Agriculture and Biology. 2014. V. 16. No. 6. P. 1123–1128. doi: 13-317/2014/16-5-112
3. Testolin R.C., Almeida T.C.M., Polette M., Branco J.O., Fischer L.L., Niero G., Poyer-Radetski G., Silva V.C., Somensi C.A., Corrêa A.X.R., Corrê R., Rörig L.R., Itokazu A.G., Férard J.-F., Cotelle S., Radetski C.M. Comparing different methods for fast screening of microbiological quality of beach sand aimed at rapid-response remediation // Marine Pollution Bulletin. 2017. V. 118. No. 1–2. P. 206–212. doi: 10.1016/j.marpolbul.2017.02.069
4. Fokina A.I., Domracheva L.I., Zykhova Yu.N., Skugoreva S.G., Lyalina E.I., Trefilova L.V. Improvement of the tetrazole-topographic method of bioassay using cyanobacteria // Theoretical and Applied Ecology. 2017. No. 1. P. 31–41 (in Russian). doi: 10.25750/1995-4301-2017-1-031-041
5. Auclair C., Voisin E. Nitroblue tetrazolium reduction // Handbook of methods for oxygen radical research / Ed. R.A. Greenwald. CRC Press, Boca Raton, 1985. P. 123–132. doi: 10.1201/9781351072922
6. Belov D.V., Kalinina A.A., Sokolova T.N., Chelnokova M.V., Kartashov V.R., Smirnov V.F. Role of superoxide anion radicals in the bacterial corrosion of metals // Applied Biochemistry and Microbiology. 2012. V. 48. No. 3. P. 270–274. doi: 10.1134/S00036838120300273
7. Gorlenko M.V., Terekhov A.S., Marchenko S.A., Marchenko A.I., Vorobyov A.V., Kozhevnikov P.A. Multisubstrate testing of natural microbial communities in the soil // Bulletin of Moscow University. Soil Science. 2003. No. 17. P. 46–49 (in Russian).
8. Kruglov Yu.V. Soil microbial community: physiological diversity and research methods (review) // Agricultural Biology. 2016. V. 51. No. 1. P. 46–59 (in Russian). doi: 10.15389/agrobiology.2016.1.46rus
9. Garland J.L., Mills A.L. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization // Applied and Environmental Microbiology. 1991. V. 57. P. 2351–2359. doi: 10.1128/AEM.57.8.2351-2359.1991
10. Kalinina A.A., Makedoshin A.S., Radostin S.Yu., Gursky N.Yu., Sokolova T.N., Kartashov V.R. Application of methods of chemical kinetics in the study of the reduction of iodinitrotetrazolium chloride in the presence of bacterial cells *Bacillus subtilis* // Moscow University Chemistry Bulletin. 2019. V. 74. No. 1. P. 20–24. doi: 10.3103/S0027131419010048
11. Kalinina A.A., Makedoshin A.S., Gursky N.V., Sokolova T.N., Smirnov V.F. Kinetic study of the reduction of iodinitrotetrazolium chloride by a suspension in physiological solution of gram-negative bacteria *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* // Theoretical and Applied Ecology. 2018. No. 1. P. 25–32 (in Russian). doi: 10.25750/1995-4301-2018-1-025-032
12. Seidler E. The tetrazolium-fonnazan system: Design and histochemistry // Prog Histochem Cytochem. 1991. V. 24. No. 1. P. 1–86. doi: 10.1016/s0079-6336(11)80060-4