

Кинетическое исследование восстановления иоднитротетразолия хлорида суспензией в физиологическом растворе грамотрицательных бактерий *Pseudomonas aeruginosa* и *Escherichia coli*

© 2017. А. А. Калинина, к. х. н., доцент, А. С. Македошин, аспирант, Н. В. Гурский, магистрант, Т. Н. Соколова, д. х. н., профессор, В. Ф. Смирнов, д. б. н., профессор, Нижегородский государственный технический университет им. Р. Е. Алексеева, 603950, Россия, Нижний Новгород, ул. К. Минина, 24, e-mail: 777aleksa777_87@mail.ru

Соли тетразолия в последнее время активно используются для изучения жизнеспособности клеток микроорганизмов, в частности, для изучения состояния микробиологических сообществ при оценке негативных воздействий от различного рода загрязнений окружающей среды. В литературе описано использование для решения экологических задач системы мультисубстратного тестирования «Эколог», однако сами авторы отмечают, что система «Эколог» регистрирует отклик не всего микробного сообщества. В связи с этим, целью работы явился поиск дополнительного фактора использования солей тетразолия, а именно транспорт их в клетку. С использованием кинетических методов показана роль пассивной диффузии в восстановлении иоднитротетразолия клетками грамотрицательных бактерий *Pseudomonas aeruginosa* и *Escherichia coli*. Установлено, что восстановление иоднитротетразолия хлорида клеточными компонентами бактерий зависит от строения клеточной стенки бактерий и контролируется диффузией реагента в клетку.

Ключевые слова: соли тетразолия, формазаны, грамотрицательные бактерии, диффузия, кинетика.

Kinetic study of the reduction of iodonitrotetrazolium chloride by suspension of gram-negative bacteria *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* in a physiological solution

A. A. Kalinina, A. S. Makedoshin, N. V. Gurskiy, T. N. Sokolova, V. F. Smirnov, Nizhny Novgorod State Technical University n. a. R. E. Alekseev, Minina St., 24, Nizhny Novgorod, Russia, 603950, e-mail: 777aleksa777_87@mail.ru

Tetrazolium salts have recently been actively used to study the viability of microorganism cells, in particular to study the state of microbiological communities in assessing the negative effects of various kinds of pollution of the environment. The literature describes the use of the multisubstrate testing system (MTS) "Ecolog" for the solution of environmental problems. It is based on triphenyltetrazolium bromide, which has proven itself in assessing the negative consequences in the environment due to industrial and domestic pollution. In environmental studies, the viability of microorganisms and their communities is estimated in terms of the intensity of the restoration of tetrazolium salts, but the authors themselves note that MTS "Ecolog" does not register the response of the entire microbial community. In connection with this, the purpose of the work was to search for an additional factor for the use of tetrazolium salts, namely, transport them into the cell. The identification of the role of diffusion in the cellular formation of formazanes plays an important role in increasing the objectivity of research results, including ecological ones, with the participation of tetrazolium salts.

Using the kinetic methods, the role of passive diffusion in the reduction of iodonitrotetrazolium (INT) by cells of gram-negative bacteria *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* is shown. Applying the integral method of determining the general order, it is found that the reduction of INT by cell components of bacteria *Ps. aeruginosa*, suspended in physiological solution, is satisfactorily described by linear anamorphosis of the first order kinetics. It has been established that the reduction of iodonitrotetrazolium chloride by the cellular components of bacteria depends on the structure and chemical composition of the cell wall and biomembranes of bacteria and is controlled by the diffusion of the reagent into the cell. The linear dependence of the initial rate of reduction of INT from its initial concentration was revealed, which for biological objects involving cells is a sign of passive diffusion. A low temperature sensitivity of the reduction reaction of the INT is detected in the temperature range, which does not significantly exceed the optimum temperature for *Ps. aeruginosa* of 37 °C.

Keywords: tetrazolium salts, formazans, gram-negative bacteria, diffusion, kinetics.

Соли тетразолия широко применяют в научных исследованиях и практических целях в различных областях – гистологии, цитологии, биохимии, экофизиологии, экотоксикологии, океанологии, почвоведении, микробиологическом контроле воды и др. [1–9]. Их использование основано на способности к восстановлению с раскрытием цикла и образованием окрашенных продуктов – формазанов. Однозначно доказано, что донорами электронов являются клеточные компоненты – аэробные дегидрогеназы мембранной локализации, а также промежуточные переносчики электронов гидрохиноновой природы дыхательной цепи клеток [10–12]. На этом основании соли тетразолия используются как индикаторы дыхательной активности. В частности, в отдельных работах количество потреблённого клетками бактерий кислорода на 1 моль восстановленной соли тетразолия использовалось для оценки эффективности электронного транспорта в дыхательной цепи клетки [13].

В экологических исследованиях через интенсивность восстановления солей тетразолия оценивается в целом жизнеспособность микроорганизмов и их сообществ. Специально для решения экологических задач была разработана мультисубстратная тест-система (МСТ) «Эколог» на основе трифенилтетразолия бромида, которая хорошо зарекомендовала себя при оценке негативных последствий в окружающей среде вследствие промышленных и бытовых загрязнений [14–19], при анализе активного ила и других микробиологических сообществ [4], при выявлении воздействия обрастания микроорганизмами на металлоконструкции и корпуса судов [1, 6] и др.

Однако в МСТ «Эколог» регистрируется отклик не всего микробного сообщества, а только её части, которая активно способна восстанавливать используемую соль тетразолия. Об ограниченных возможностях солей тетразолия как объективных неселективных индикаторов жизнеспособности бактериальных клеток указывалось неоднократно, в том числе и разработчиками метода МСТ [20, 21] и более ранней тест-системы «Biolog» [4, 21, 22]. В связи с чем встаёт проблема выяснения причин столь широкого диапазона восстановительной способности микроорганизмов по отношению к солям тетразолия.

Известно, что сродство солей тетразолия к клетке зависит как от электростатического взаимодействия катиона тетразолия с отрицательно заряженными группами химических компонентов биомембран, так и Ван-дер-

Ваальсовыми взаимодействиями [11, 12, 23], а повреждения биомембран усиливают сродство [11]. Эти исследования могут свидетельствовать о том, что именно транспорт солей тетразолия в клетку может быть лимитирующим фактором в восстановлении. К настоящему времени имеются лишь единичные работы по исследованию диффузии солей тетразолия в клетки микроорганизмов [1, 24, 25]. Вместе с тем, выявление роли диффузии в клеточном образовании формазанов играет важную роль в повышении объективности результатов исследований, в том числе экологических, при участии солей тетразолия.

В связи с чем, целью работы явилось выявление кинетическими методами роли диффузии в восстановлении клетками бактерий иоднитротетразолия хлорида как индикатора жизнеспособности клеток.

Объекты и методы

В качестве индикатора использовалась соль иоднитротетразолия хлорид (ИНТ, 95%, Aldrich). Основными критериями при выборе данной соли были: способность к восстановлению без образования промежуточных полупродуктов; хорошее сродство к клеткам бактерий и, главное, возможность количественного выделения из клеток методом экстракции продукта восстановления.

В качестве тест-культур использовали грамотрицательные бактерии *Pseudomonas aeruginosa* (источник – почва г. Н. Новгород) и *Escherichia coli* (препарат «БИФИКОЛ», ФГБУЗ «Нижегородское предприятие по производству бактериальных препаратов «ИмБио») и *E. coli* (источник – почва г. Н. Новгород).

Методика проведения кинетического эксперимента. Смыв суточной бактериальной культуры со скошенного мясо-пептонного агара физиологическим раствором (0,9% водный раствор хлорида натрия) доводили до оптической плотности $1,00 \pm 0,05$ (670 нм). К 32 мл бактериальной суспензии в стерильных условиях добавляли аликвоту 1,0 мМ водного раствора соли иоднитротетразолия в соответствии с начальной концентрацией и смесь выдерживали в термостате при температуре эксперимента (оптимальной 37 °С; в опытах по выявлению температурной зависимости – 33 °С и 41 °С). Для разрушения клеточной стенки, с целью повышения степени извлечения продукта восстановления, по истечении определённого времени 5 мл анализируемой смеси отбирали в пробирку, содержащую 0,2 мл раствора ли-

зоцима (концентрация 0,2 мг/л). Через 30 с смесь экстрагировали этилацетатом, сушили хлоридом кальция, после фильтрования анализировали спектрофотометрически при длине волны 490 нм, характерной для продукта восстановления – иодмоноформаза (ИМФ). Коэффициент экстинкции определяли по экспериментальной зависимости оптической плотности в спектре поглощения от концентрации ИМФ. Его величина, равная $1,9 \cdot 10^4 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$, согласуется с литературными данными [26].

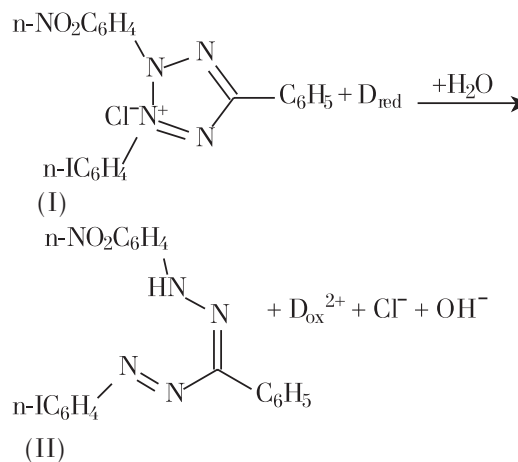
Текущие концентрации ИМФ определяли по результатам 5–6 независимых экспериментов, среднеквадратичная ошибка определения 10–15%.

Иоднитротетразолий (95%, Aldrich), иодмоноформаза (crystalline, Sigma), лизоцим (препарат «Лизобакт» Bosnalijek) использовали в виде коммерческих препаратов.

Спектры регистрировали на спектрофотометре «2802 UV/Vis Unico». Инкубацию культур бактерий и соответствующие исследования с применением этих культур проводили в термостате марки «ТС-1/80 СПУ».

Результаты исследований и их обсуждение

Восстановление ИНТ протекает по реакции [26]:



Здесь D – донор электронов биогенной природы соответственно в восстановленной (D_{red}) и окисленной (D_{ox}) формах.

В работе [27] показано, что кинетическая кривая накопления ИМФ при участии бактерий *Ps. aeruginosa* (музейный штамм, г. Пущино) имеет S-образный вид с явно обозначенным индукционным периодом. Характер кинетической кривой при использовании в настоящем исследовании бактерий *Ps. aeruginosa* не противоречит данным работы [27], однако, индукционный период оказался по времени короче, а степень конверсии за этот период не превысила $\approx 0,5\%$ (рис. 1).

При использовании шкалы времени, удобной для представления высоких степеней кон-

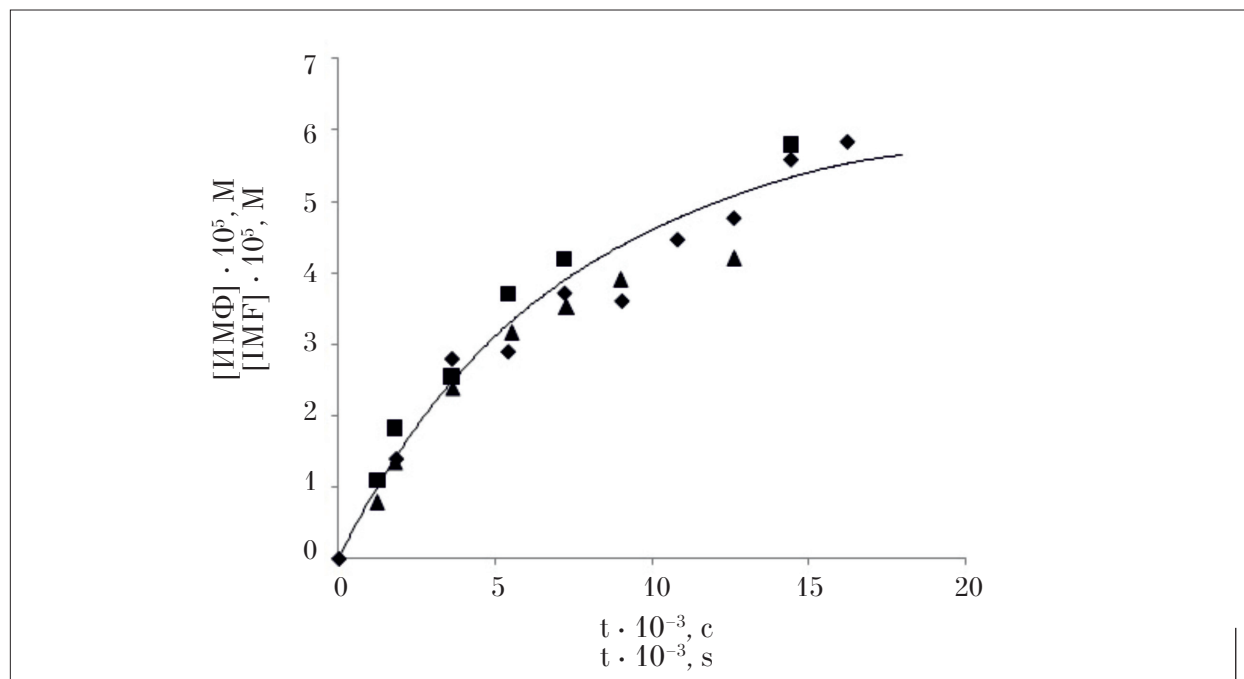


Рис. 1. Кинетическая кривая накопления иодмоноформаза (ИМФ) под воздействием *Ps. aeruginosa* ($[\text{ИНТ}]_0 = 10,0 \cdot 10^{-5} \text{ моль/л}$; $t = 37^\circ\text{C}$ (◆), $t = 33^\circ\text{C}$ (▲), $t = 41^\circ\text{C}$ (■) / Fig. 1. Kinetic curve of accumulation of iodomonoformazan (IMF) under the influence of *Ps. aeruginosa* ($[\text{INT}]_0 = 10.0 \cdot 10^{-5} \text{ mol/L}$; $t = 37^\circ\text{C}$ (◆), $t = 33^\circ\text{C}$ (▲), $t = 41^\circ\text{C}$ (■)

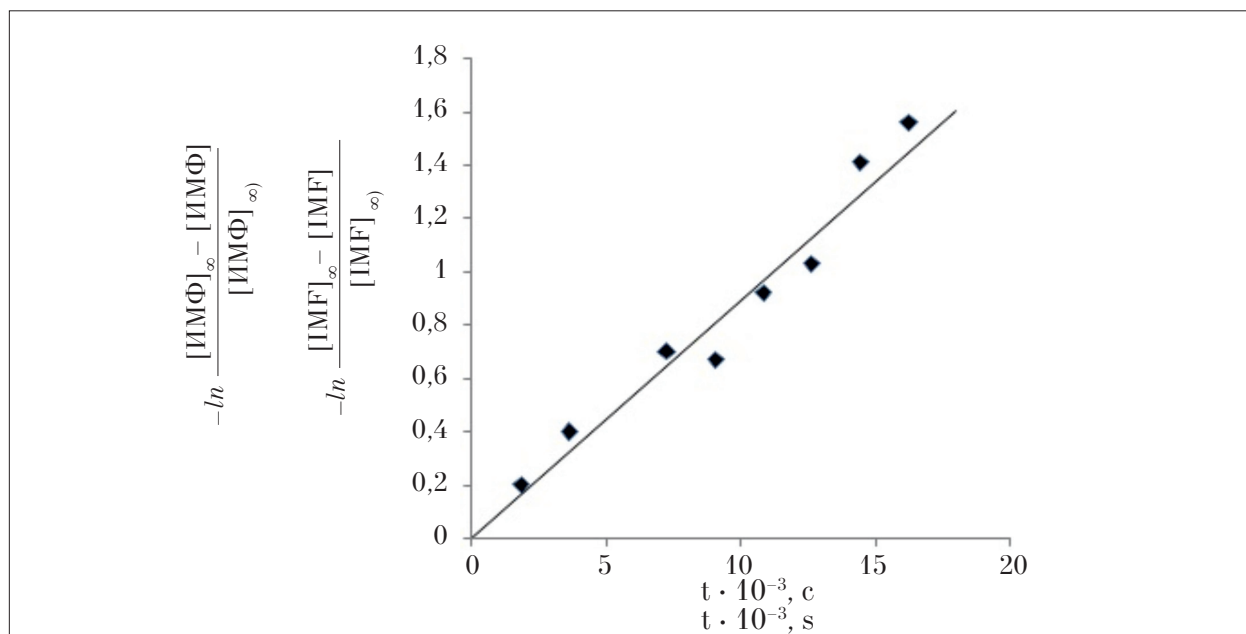


Рис. 2. Анаморфоза кинетики первого порядка реакции восстановления ИНТ клеточными компонентами бактерий *Ps. aeruginosa* ($[ИНТ]_0 = 10,0 \cdot 10^{-5}$ моль/л; $[ИМФ]_{\infty} = 7,4 \cdot 10^{-5}$ моль/л; $t = 37$ °С, $y = 8,9 \cdot 10^{-5}x$)
Fig. 2. Anamorphosis of the first-order kinetics of the reaction of the reduction of INT by cellular components of bacteria *Ps. aeruginosa* ($[ИНТ]_0 = 10,0 \cdot 10^{-5}$ моль/л; $[ИМФ]_{\infty} = 7,4 \cdot 10^{-5}$ mol/L; $t = 37$ °С, $y = 8,9 \cdot 10^{-5}x$)

версии (до 70%), кинетическая кривая имеет вид монотонно возрастающей зависимости, на которой индукционный период нивелируется (рис. 1).

Применяя интегральный метод определения общего порядка, найдено, что восстановление ИНТ клеточными компонентами бактерий *Ps. aeruginosa*, суспензированных в физиологическом растворе, удовлетворительно описывается линейной анаморфозой кинетики первого порядка (рис. 2):

$$\ln \frac{[ИНТ] - [ИНТ]_{\infty}}{([ИНТ]_0 - [ИНТ]_{\infty})} = -kt$$

или

$$\ln \frac{[ИМФ]_{\infty} - [ИМФ]}{[ИМФ]_{\infty}}$$

Константа скорости, определённая по угловому коэффициенту анаморфозы кинетики первого порядка, равна $8,90 \cdot 10^{-5} \text{ с}^{-1}$.

Среднее значение $k_{\text{эф}}$ по результатам шести независимых экспериментов составляет $(8,58 \pm 0,89) \cdot 10^{-5} \text{ с}^{-1}$.

В температурном диапазоне, который существенно не выходит за пределы оптимальной температуры для *Ps. aeruginosa*, равной 37 °С, обнаружена низкая температурная

чувствительность реакции восстановления ИНТ (рис. 1). Необычайно малое значение предэкспоненциального множителя уравнения Аррениуса ($E_a \approx 0$ кДж, $A \approx k_{\text{эф}}$) не типично для химического взаимодействия и определяет диффузионный контроль реакции.

Таким образом, можно предположить, что соль тетразолия медленно диффундирует через липопротеиновую и плазматическую мембраны грамотрицательной бактерии *Ps. aeruginosa* к клеточным сайтам восстановления.

Когда время не является координатой реакции, выполняется первый закон Фика, и можно предположить, что начальная скорость восстановления коррелирует со скоростью диффузии ИНТ в клетку. Как видно из рисунка 3, в координатах $V_0 = f([ИНТ]_0)$ при температуре, равной 37 °С удовлетворительно выполняется линейная зависимость, что согласуется с механизмом пассивной диффузии в биологических системах [28].

Таким образом, в восстановлении ИНТ, вероятно, и других солей тетразолия, важна не столько клеточная организация электронного транспорта в дыхательной цепи, сколько строение и химический состав клеточной стенки и биомембраны бактерий.

В этом отношении показательными оказались исследования восстановления ИНТ

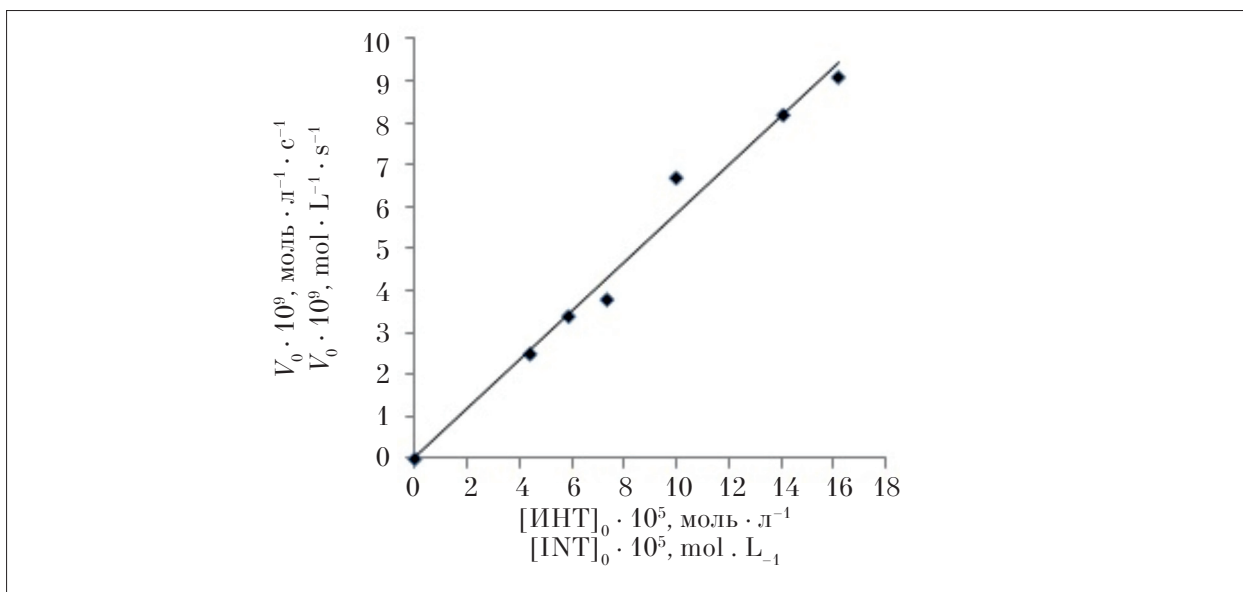


Рис. 3. Зависимость начальной скорости восстановления ИНТ под воздействием *Ps. aeruginosa* от начальной концентрации реагента
Fig. 3. Dependence of the initial rate of reduction of INT under the influence of *Ps. aeruginosa* on the initial concentration of reagent

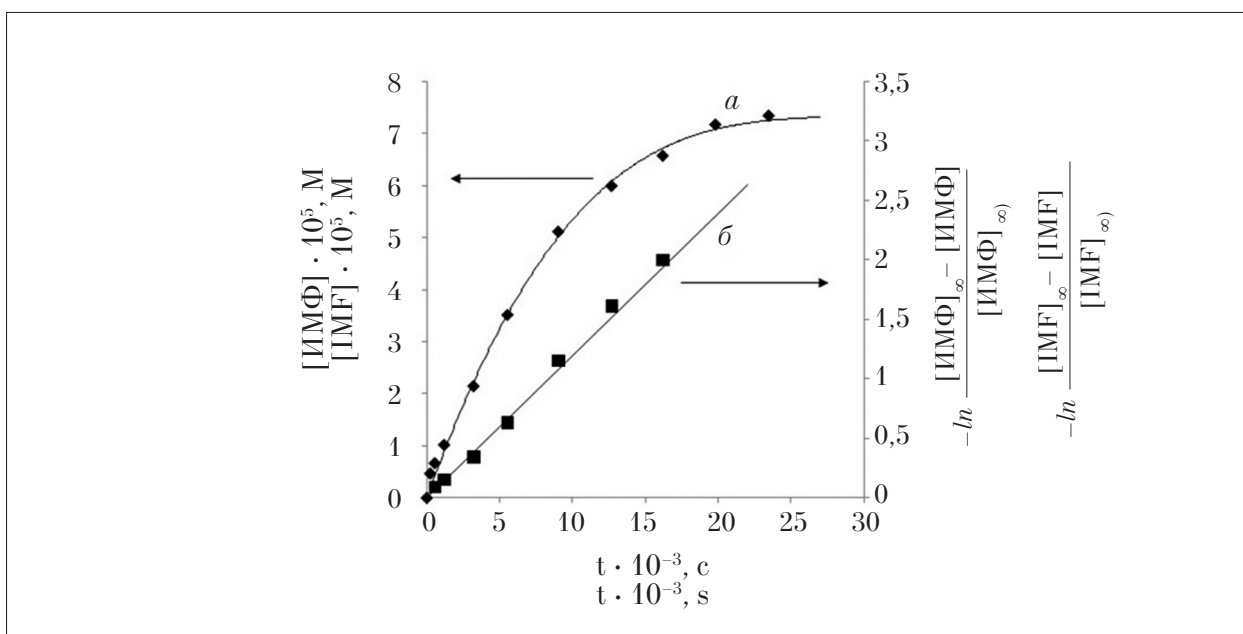


Рис. 4. Кинетическая кривая накопления иодмоноформазана под воздействием *E. coli* (а) и её анаморфоза в координатах (б) ($[ИНТ]_0 = 1,0 \cdot 10^{-4}$ моль/л; $[ИМФ]_\infty = 7,6 \cdot 10^{-5}$ моль/л; $t = 37^\circ\text{C}$, $y = 1,2 \cdot 10^{-4}x$)
Fig. 4. Kinetic curve of accumulation of iodomonoformazan under the influence of *E. coli* (а) and its anamorphosis in coordinates (б) ($[ИНТ]_0 = 1.0 \cdot 10^{-4}$ моль/л; $[ИМФ]_\infty = 7.6 \cdot 10^{-5}$ mol/L; $t = 37^\circ\text{C}$, $y = 1.2 \cdot 10^{-4}x$)

бактериями *E. coli*. В одной серии опытов использовали бактерии, выделенные из препарата «Бификол» (ФГБУЗ «Нижегородское предприятие по производству бактериальных препаратов «ИмБио»), в котором бактерии подвергались лиофилизации, вследствие чего возможны изменения проницаемости

липопротеиновой и плазматической мембран. Получены положительные результаты, представленные на рисунке 4.

Константа скорости, определённая по тангенсу угла наклона линейной анаморфозы кинетики первого порядка, равна $11,94 \cdot 10^{-5} \text{ с}^{-1}$ (рис. 4б).

Ранее восстановление ИНТ штаммом *E. coli* К-12 было изучено в работе [29], где также выявлена восстановительная способность ИНТ и показано влияние на процесс ингибиторов и разобщителей электронного транспорта. При использовании нами в качестве тест-культуры *E. coli* (источник – почва г. Нижнего Новгорода) восстановления ИНТ не наблюдалось на протяжении 6–8 часов экспозиции.

Очевидно, что даже в рамках одного вида грамотрицательных бактерий, вследствие отличительных особенностей в структурной организации липопротеиновой мембраны возможен широкий диапазон восстановительной способности к солям тетразолия.

Заключение

Таким образом, при использовании кинетических методов показано, что восстановление ИНТ клетками бактерий удовлетворительно описывается линейными анаморфозами реакции первого порядка, что позволяет количественно через эффективные константы скорости реакции определить восстановительную активность бактерий по отношению к ИНТ. Выявлена линейная зависимость начальной скорости восстановления ИНТ от его начальной концентрации, что для биологических объектов с участием клеток является признаком пассивной диффузии. Невыполнение уравнения Аррениуса в температурном интервале, благоприятном для жизнедеятельности бактерий *Ps. aeruginosa*, подтверждает диффузионный контроль восстановления соли тетразолия.

Выявлено, что отклик на индикатор – соль тетразолия, у грамотрицательных бактерий зависит от особенностей строения и химического состава клеточной стенки, что может оказывать влияние на объективность результатов экологического исследования с использованием солей тетразолия.

Литература

1. Sabaeifard P., Abdi-Ali A., Reza Soudi M., Dinarvand K. Optimization of tetrazolium salt assay for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm using microtiter plate method // *Journal of Microbiological Methods*. 2014. V. 105. P. 134–140.
2. Yang Q., Wang X., Shen Y. Comparison of soil microbial community catabolic diversity between rhizosphere and bulk soil induced by tillage or residue retention // *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*. 2013. V. 13. No. 1. P. 187–199.

3. Mondini C., Insam H. Community level physiological profiling as a tool to evaluate compost maturity: a kinetic approach // *European Journal of Soil Biology*. 2003. V. 39. No. 3. P. 141–148.
4. Gryta A., Fraç M., Oszust K. The application of the Biolog EcoPlate approach in ecotoxicological evaluation of dairy sewage sludge // *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2014. V. 174. No. 4. P. 1434–1443.
5. Siciliano S.D., Thereot C.M., de Freitas J.R., Hucl P.J., Germida J.J. Differences in the microbial communities associated with the rots of different cultivars of canola and wheat // *Canadian Journal of Microbiology*. 1998. V. 44. No. 9. P. 844–851.
6. Grayston S.J., Wang S.Q., Campbell C.D., Edwards A.C. Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere // *Soil Biology and Biochemistry*. 1998. V. 30. No. 3. P. 369–378.
7. Campbell C.D., Grayston S.J., Hirst D.J. Use of rhizosphere carbon sources in sole carbon source tests to discriminate soil microbial communities // *Journal of Microbiological Methods*. 1997. V. 30. No. 1. P. 33–41.
8. Фокина А.И., Домрачева Л.И., Зыкова Ю.Н., Скугорева С.Г., Лялина Е.И., Трефилова Л.В. Совершенствование тетразольно-топографического метода биотестирования с использованием цианобактерий // *Теоретическая и прикладная экология*. 2017. № 1. С. 31–41.
9. Домрачева Л.И., Кондакова Л.В., Ашихмина Т.Я., Огородникова С.Ю., Олькова А.С., Фокина А.И. Применение тетразольно-топографического метода определения дегидрогеназной активности цианобактерий в загрязненных средах // *Теоретическая и прикладная экология*. 2008. № 2. С. 23–28.
10. Thorm S.M., Horobin R.W., Seidler E., Barer M.R. Factors affecting the selection and use of tetrazolium salts as cytochemical indicators of microbial viability and activity // *Journal of Applied Bacteriology*. 1993. V. 74. No. 4. P. 433–443.
11. Pearse A.G., Hess R. Substantivity and other factors responsible for formazan patterns in dehydrogenase histochemistry // *Experientia (Basel)*. 1961. V. 17. P. 136–141.
12. Kalina M., Plapinger R.E., Hoshino Y., Seligman A.M. Nonosmiophilic tetrazolium salts that yield osmiophilic, lipophobic formazans for ultrastructural localization of dehydrogenase activity // *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 1972. V. 20. No. 9. P. 685–695.
13. Raap A.K. Studies on the phenazine methosulphate-tetrazolium salt capture reaction in NAD(P)⁺-dependent dehydrogenase cytochemistry. III. The role of superoxide in tetrazolium reduction // *Histochemistry*. 1983. V. 15. P. 977–986.
14. Горленко М.В., Кожевин П.А. Мультисубстратное тестирование природных микробных сообществ. М.: МАКС Пресс, 2005. 88 с.
15. Горленко М.В., Терехов А.С., Марченко С.А., Марченко А.И., Воробьев А.В., Кожевин П.А. Индикация

загрязнения почвы полициклическими ароматическими углеводородами по функциональной реакции почвенного микробного комплекса // Вестник Московского университета. Серия 17. Почвоведение. 2003. Т. 1. С. 46–49.

16. Семенова И.Н., Ильбулова Г.Р., Суюндуков Я.Т. Функциональная активность микробных сообществ черноземов Башкирского Зауралья в условиях техногенного загрязнения // Поволжский экологический журнал. 2012. Т. 3. С. 311–318.

17. Yakushev A.V., Byzov B.A. Microbiological characterization of vermicomposts by the method of multisubstrate testing // Pochvovedenie. 2008. V. 11. P. 1381–1387 (in Russian).

18. Горленко М.В., Якименко О.С., Голиченков М.В., Костина Н.В. Функциональное биоразнообразие почвенных микробных сообществ при внесении органических субстратов различной природы // Вестник Московского университета. Серия 17. Почвоведение. 2012. Т. 2. С. 20–27.

19. Blagodatskaya E., Kuzyakov Y. Active microorganisms in soil: Critical review of estimation criteria and approaches // Soil Biology and Biochemistry. 2013. V. 67. P. 192–211.

20. Preston-Mafham J., Boddy L., Randerson P.F. Analysis of microbial functional diversity using sole-carbon-source utilization profiles – a critique // FEMS Microbiology Ecology. 2002. V. 42. P. 1–14.

21. Круглов Ю.В. Микробное сообщество почвы: физиологическое разнообразие и методы исследования // Сельскохозяйственная биология. 2016. Т. 51. № 1. С. 46–59.

22. Smolla K., Wachtendorf U., Heuer H., Li W.T., Forney L. Analysis of BIOLOG GN substrate utilization patterns by microbial communities // Applied and Environmental Microbiology. 1998. V. 64. P. 1220–1225.

23. Horobin R.W. Selection of optimum tetrazolium salts for use in histochemistry: the value of structurestaining correlations // The Histochemical Journal. 1982. V. 14. No. 2. P. 301–310.

24. Rodriguez G.G. Use of a fluorescent redox probe for direct visualization of actively respiring bacteria // Applied Environmental Microbiology. 1992. V. 58. No. 6. P. 1804–1808.

25. Seidler E. The tetrazolium-fonnazan system: design and histochemistry. New York: G. Fischer. Stuttgart. 1991. 79 p.

26. Радостин С.Ю., Калинина А.А., Македошин А.С., Соколова Т.Н., Кузина О.В., Карташов В.Р. Восстановление иоднитротетразолия клетками бактерий как метод оценки их коррозионной активности // Коррозия: материалы, защита. 2015. № 11. С. 45–48.

27. Ленгелер Й., Древе Г., Шлегель У. Современная микробиология: Прокариоты. В 2 т. М.: Мир. 2005. 654 с., 496 с.

28. Smith J.J., McFeters G.A. Mechanisms of INT (2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl tetrazo-

lium chloride), and CTC (5-cyano-2,3-ditoly tetrazolium chloride) reduction in *Escherichia coli* K-12 // Journal of Microbiological Methods. 1997. V. 29. No. 3. P. 161–175.

References

1. Sabaeifard P., Abdi-Ali A., Reza Soudi M., Dinarnvand K. Optimization of tetrazolium salt assay for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm using microtiter plate method // Journal of Microbiological Methods. 2014. V. 105. P. 134–140.

2. Yang Q., Wang X., Shen Y. Comparison of soil microbial community catabolic diversity between rhizosphere and bulk soil induced by tillage or residue retention // Journal of Soil Science and Plant Nutrition. 2013. V. 13. No. 1. P. 187–199.

3. Mondini C., Insam H. Community level physiological profiling as a tool to evaluate compost maturity: a kinetic approach // European Journal of Soil Biology. 2003. V. 39. No. 3. P. 141–148.

4. Gryta A., Fraç M., Oszust K. The application of the Biolog EcoPlate approach in ecotoxicological evaluation of dairy sewage sludge // Applied Biochemistry and Biotechnology. 2014. V. 174. No. 4. P. 1434–1443.

5. Siciliano S.D., Thereot C.M., de Freitas J.R., Hucl P.J., Germida J.J. Differences in the microbial communities associated with the rots of different cultivars of canola and wheat // Canadian Journal of Microbiology. 1998. V. 44. No. 9. P. 844–851.

6. Grayston S.J., Wang S.Q., Campbell C.D., Edwards A.C. Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere // Soil Biology and Biochemistry. 1998. V. 30. No. 3. P. 369–378.

7. Campbell C.D., Grayston S.J., Hirst D.J. Use of rhizosphere carbon sources in sole carbon source tests to discriminate soil microbial communities // Journal of Microbiological Methods. 1997. V. 30. No. 1. P. 33–41.

8. Fokina A.I., Domracheva L.I., Zykova Yu.N., Skugoreva S.G., Lyalina E.I., Trefilova L.V. Improving tetrazol-topographic method of biotesting using cyanobacteria // Teoreticheskaya i prikladnaya ekologiya. 2017. No. 1. P. 31–41 (in Russian).

9. Domracheva L.I., Kondakova L.V., Ashikhmina T.Ya., Ogorodnikova S.Yu., Olkova A.S., Fokina A.I. Application of tetrazole-topographic method in defining dehydrogenizing activity of cyanobacteria in polluted environments // Teoreticheskaya i prikladnaya ekologiya. 2008. No. 2. P. 23–28 (in Russian).

10. Thorm S.M., Horobin R.W., Seidler E., Barer M.R. Factors affecting the selection and use of tetrazolium salts as cytochemical indicators of microbial viability and activity // Journal of Applied Bacteriology. 1993. V. 74. No. 4. P. 433–443.

11. Pearse A.G., Hess R. Substantivity and other factors responsible for formazan patterns in dehydrogenase histochemistry // Experientia (Basel). 1961. V. 17. P. 136–141.

12. Kalina M., Plapinger R.E., Hoshino Y., Seligman A.M. Nonosmiophilic tetrazolium salts that yield osmiophilic, lipophobic formazans for ultrastructural localization of dehydrogenase activity // *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 1972. V. 20. No. 9. P. 685–695.
13. Raap A.K. Studies on the phenazine methosulphate-tetrazolium salt capture reaction in NAD(P)⁺-dependent dehydrogenase cytochemistry. III. The role of superoxide in tetrazolium reduction // *Histochemistry*. 1983. V. 15. P. 977–986.
14. Gorlenko M.V., Kozhevnikov P.A. Multisubstrate testing of natural microbial communities. Moskva: MAKS Press, 2005. 88 p. (in Russian).
15. Gorlenko M.V., Terekhov A.S., Marchenko S.A., Marchenko A.I., Vorob'ev A.V., Kozhevnikov P.A. Indication of soil pollution by polycyclic aromatic hydrocarbons according to the functional reaction of the soil microbial complex // *Vestnik Moskovskogo universiteta. Seriya 17. Pochvovedenie*. 2003. V. 1. P. 46–49 (in Russian).
16. Semenova I.N., Il'bulova G.R., Suyundukov Ya.T. Functional activity of microbial communities of chernozems of the Bashkirian TransUral region under technogenic pollution // *Povolzhskiy ekologicheskiy zhurnal*. 2012. V. 3. P. 311–318 (in Russian).
17. Yakushev A.V., Byzov B.A. Microbiological characterization of vermicomposts by the method of multisubstrate testing // *Pochvovedenie*. 2008. V. 11. P. 1381–1387 (in Russian).
18. Gorlenko M.V., Yakimenko O.S., Golichenkov M.V., Kostina N.V. Functional biodiversity of soil microbial community structure influenced by organic substrates of various nature // *Vestnik Moskovskogo universiteta. Seriya 17. Pochvovedenie*. 2012. V. 2. P. 20–27 (in Russian).
19. Blagodatskaya E., Kuzyakov Y. Active microorganisms in soil: Critical review of estimation criteria and approaches // *Soil Biology and Biochemistry*. 2013. V. 67. P. 192–211.
20. Preston-Mafham J., Boddy L., Randerson P.F. Analysis of microbial functional diversity using sole-carbon-source utilization profiles – a critique // *FEMS Microbiology Ecology*. 2002. V. 42. P. 1–14.
21. Kruglov Yu.V. Microbial community of soil: physiological diversity patterns and research methods // *Selskohozyaystvennaya biologiya*. 2016. V. 51. No. 1. P. 46–59 (in Russian).
22. Smolla K., Wachtendorf U., Heuer H., Li W.T., Forney L. Analysis of BIOLOG GN substrate utilization patterns by microbial communities // *Applied and Environmental Microbiology*. 1998. V. 64. P. 1220–1225.
23. Horobin R.W. Selection of optimum tetrazolium salts for use in histochemistry: the value of structure-staining correlations // *The Histochemical Journal*. 1982. V. 14. No. 2. P. 301–310.
24. Rodriguez G.G. Use of a fluorescent redox probe for direct visualization of actively respiring bacteria // *Applied Environmental Microbiology*. 1992. V. 58. No. 6. P. 1801–1808.
25. Seidler E. The tetrazolium-fornazan system: design and histochemistry. New York: G. Fischer. Stuttgart. 1991. 79 p.
26. Radostin S.Yu., Kalinina A.A., Makedoshin A.S., Sokolova T.N., Kuzina O.V., Kartashov V.R. Reduction of iodinitrotetrazolium by bacterial cells as a method for evaluating their corrosive activity // *Korroziya: materialy, zashhita*. 2015. No. 11. P. 45–48 (in Russian).
27. Modern microbiology: Prokaryotes / Eds. J. Lengele, G. Drevs, U. Shlegel. Moskva: Mir, 2005. 654 p., 496 p. (in Russian).
28. Smith J.J., McFeters G.A. Mechanisms of INT (2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl tetrazolium chloride), and CTC (5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride) reduction in *Escherichia coli* K-12 // *Journal of Microbiological Methods*. 1997. V. 29. No. 3. P. 161–175.