

Ингибирующий эффект иодмоноформазана в восстановлении иоднитротетразолия хлорида суспензией бактерии *Bacillus stearothermophilus* в физиологическом растворе

© 2026. А. А. Калинина, к. х. н., зав. кафедрой,

Т. Н. Соколова, д. х. н., профессор, П. С. Афанасьева, аспирант, м. н. с.,

А. О. Кувшинова, студент, техник, Т. М. Балуева, студент, техник,

А. Д. Тубакина, студент, техник,

Нижегородский государственный технический университет им. Р.Е. Алексеева,

603950, Россия, г. Нижний Новгород, ул. К. Минина, д. 24,

e-mail: 777aleksa777_87@mail.ru

Изучена скорость восстановления иоднитротетразолия хлорида бактерией *Bacillus stearothermophilus* в физиологическом растворе при температуре 37 °С, оптимальной для жизнедеятельности микроорганизмов. Выявлено, что скорость реакции замедляется при достижении конверсии реагента 60–70 %. Выдвинуто предположение об ингибирующей роли в восстановлении соли тетразолия продукта реакции иодмоноформазана. На основании экспериментальных данных зависимости текущей концентрации иодмоноформазана от времени экспозиции предложена формально-кинетическая схема реакции восстановления иодмоноформазана клеточными донорами электронов. В соответствии со схемой продукт реакции взаимодействует с клеточными редокс-центрами с образованием неактивных комплексов с константами ингибирования K_i . Диаграммным методом получено интегральное кинетическое уравнение, которое согласуется с экспериментальными данными. Определено численное значение константы ингибирования продуктом, равное $(1,42 \pm 0,12) \cdot 10^{-5}$ М.

Ключевые слова: иоднитротетразолия хлорид, *Bacillus stearothermophilus*, кинетическая схема ингибирования продуктом реакции, константа ингибирования.

Iodmonoformazan inhibits iodonitrotetrazolium chloride reduction by *Bacillus stearothermophilus* suspension in a saline solution

© 2026. А. А. Kalinina ORCID: 0000-0002-1551-5790, Т. Н. Sokolova ORCID: 0000-0002-5975-2608,

Р. S. Afanasieva ORCID: 0000-0002-3994-6907, А. О. Kuvshinova ORCID: 0000-0001-9322-1221,

Т. М. Balueva ORCID: 0009-0000-7195-7094, А. D. Tubakina ORCID: 0000-0001-9219-0769,

Nizhny Novgorod State Technical University n. a. R. E. Alekseev,

24, Minin St., Nizhny Novgorod, Russia, 603950,

e-mail: 777aleksa777_87@mail.ru

Tetrazolium salts are used in monitoring the ecological state of environmental objects, especially after exposure to factors unfavorable to organisms: forest fires, oil spills, industrial and household pollution. The possibility of identifying the indicator properties of iodonitrotetrazolium chloride (INT) to assess the viability of the aerobic bacterium *Bacillus stearothermophilus* is shown. The dependence of the concentration of the iodomonoformazan (IMF) reduction product on the exposure time at an optimal for the vital microorganisms' activity temperature of 37 °C was studied as a criterion for quantifying the bacterium reducing ability in relation to a tetrazolium salt. The IMF concentration was determined spectrophotometrically at 490 nm wavelength after extraction of an aliquot of the reaction mixture with ethyl acetate. It was found that the reaction rate slows down when the reagent conversion reaches 60–70 %. It has been suggested that a decrease in the regenerative capacity of bacterial cells may be due to the IMF recovery product inhibitory effect. Formazan is less polar than INT, and has a greater affinity for cellular components. This argument suggests that IMF forms inactive complexes with cellular reducing agents. The blocking of cellular redox centers by the reduction product may be the main reason for the decrease in reagent conversion over time. A formal kinetic scheme of the IMF reduction reaction by cellular electron donors is proposed based on experimental data on the dependence of the IMF current concentration on the exposure time. According to the scheme, the reaction product does not selectively interact with cellular redox centers to form inactive complexes with an inhibition constant K_i . The scheme is processed by the diagram method based

on the quasi-equilibrium approximation of kinetic scheme analysis. The integral kinetic equation in Walker-Schmidt coordinates, which are widely used in enzymatic catalysis, is obtained by the diagram method. The kinetic equation obtained is consistent with the experimental data. The numerical value of the inhibition constant by the product equal to $(1.42 \pm 0.12) \cdot 10^{-5}$ M was determined.

Keywords: iodonitrotetrazolium chloride, *Bacillus stearothermophilus*, kinetic scheme of inhibition by the reaction product, diagram method, inhibition constant.

Одно из главных химических свойств солей тетразолия – способность к мягкому восстановлению с раскрытием тетразолиевого цикла и образованием нейтральных интенсивно окрашенных (от вишнёво-красных до пурпурно-чёрных) соединений – формазанов [1, 2].

Впервые возможность использования солей тетразолия в качестве неселективных индикаторов дыхательной активности бактерий и в целом их жизнеспособности была доказана в работе [3]. С тех пор способность солей тетразолия к восстановлению клеточными ферментами микроорганизмов стала широко использоваться в мониторинге экологического состояния объектов окружающей среды, особенно после воздействия на неё неблагоприятных для живых организмов факторов: лесных пожаров, нефтяных разливов, промышленных и бытовых загрязнений и др. [4–7]. Тетразолиевый метод индикации позволяет относительно быстро получить информацию об уровне и типе нарушений природной среды естественными и техногенными физическими, химическими и биологическими факторами. Однако тест-системы на основе солей тетразолия не всегда объективны вследствие реализации в микробиологических сообществах разных межмикробных взаимодействий (конкуренция, антагонизм, мутуализм, комменсализм, кометаболизм субстратов и т. п.). Более того, некоторые жизнеспособные клетки не дают отклика на индикаторную соль тетразолия [8–10].

Для выявления биогенных факторов, определяющих способность бактерий *Bacillus subtilis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Escherichia coli* восстанавливать соль тетразолия, был использован кинетический метод [11–13]. Установлено, что скорость восстановления иоднитротетразолия хлорида (ИНТ) ($R_1 = C_6H_4I$, $R_2 = C_6H_4NO_2$; $R_3 = C_6H_5$) суспензией бактерий в физиологическом растворе описывается кинетическим уравнением реакции псевдопервого порядка. При этом эффективные константы скорости восстановления ИНТ суспензией грамположительных палочковидных бактерий в 8–10

раз превышают соответствующие величины при воздействии на ИНТ грамотрицательных бактерий. Был сделан вывод о роли строения клеточной стенки в скорости восстановления соли тетразолия [13]. В этой же работе было показано, что кинетическая кривая накопления йодмоноформаза (ИМФ) имеет монотонно возрастающий характер, переходящий в плато при конверсии реагента от 55 до 85 %. Было высказано предположение, что на конверсию реагента оказывает влияние продукт восстановления – ИМФ.

Особенно влияние продукта проявилось при использовании суспензии бактерии *B. stearothermophilus* [13]. Причём при начальной концентрации ИНТ, равной $5,88 \cdot 10^{-5}$ М, реакция протекала до конверсии реагента около 98 %, а скорость восстановления удовлетворительно описывалась кинетическим уравнением реакции псевдопервого порядка. При увеличении исходной концентрации ИНТ до $20 \cdot 10^{-5}$ М, его восстановление прекращалось примерно через 1 ч экспозиции при конверсии всего 27 %.

Предположение об ингибирующем влиянии формазана на восстановление ИНТ дополнительных подтверждений в работах [11–13] не получило.

Цель настоящей работы – выявление кинетическими методами возможности ИМФ оказывать ингибирующий эффект на восстановление ИНТ суспензией бактерии *Bacillus stearothermophilus* в физиологическом растворе.

Объекты и методы исследования

Выбор биологического объекта обусловлен имеющимися кинетическими результатами, представленными в работе [13], выявленной низкой конверсией реагента при исходной концентрации ИНТ более $8 \cdot 10^{-5}$ М, а также воспроизводимостью и согласованностью полученных данных при решении поставленной задачи с результатами работы.

В качестве тест-организмов использовались бактерии *Bacillus stearothermophilus* (предоставлены Всероссийской коллекци-

ей микроорганизмов, ФИЦ ПНЦБИ РАН, г. Пущино Московской обл.).

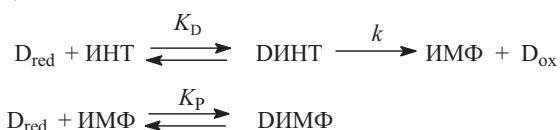
Методика кинетического эксперимента описана в работах [11–13]. Смыв суточной бактериальной культуры со скошенного мясопептонного агара (МПА) физиологическим раствором (0,9 % водный раствор хлорида натрия) доводили до оптической плотности $1,00 \pm 0,05$ (670 нм). К 12 мл бактериальной суспензии в стерильных условиях добавляли аликвоту 1,0 мМ водного раствора соли ИНТ в соответствии с начальной концентрацией, и смесь выдерживали в термостате при температуре 37 °С. Через временные интервалы, равные 5–20 мин в зависимости от глубины протекания реакции, 5 мл анализируемой смеси отбирали в пробирку с *B. stearothermophilus*. Далее смесь экстрагировали этилацетатом, сушили хлоридом кальция, после фильтрации 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 [2].

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» (United Products & Instruments, Inc, США). Исследования с применением культуры бактерий проводили в термостате марки «ТС-1/80 СПУ» (Смоленское СКТБ СПУ, Россия). В работе использовали следующие реактивы: йоднитротетразолия хлорид (95 %, Aldrich), иодмоноформазан (crystalline, Sigma), этилацетат (ч.д.а.) в виде коммерческих препаратов.

Результаты и обсуждение

Для объяснения влияния продукта на скорость восстановления ИНТ была предложена следующая кинетическая схема:

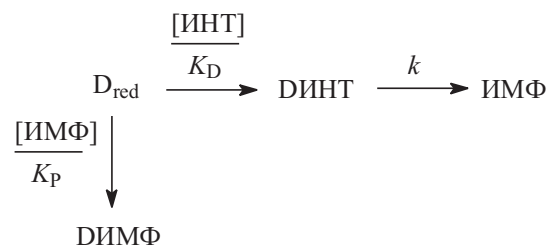


где D_{red} и D_{ox} – восстановленная и окисленная форма клеточного восстановителя, K_D – константа диссоциации промежуточного комплекса клеточного восстановителя и соли

тетразолия ИНТ (ДИНТ), K_P – константа ингибирования продуктом, обратно пропорциональная константе образования комплекса клеточного восстановителя и продукта восстановления ИМФ (ДИМФ), k – константа скорости продуктообразующей стадии.

В соответствии со схемой соль тетразолия образует комплекс с редокс-центром клеточного восстановителя, который впоследствии превращается в продукт. Нейтральный иодмоноформазан, обладая высоким сродством к восстановителю, блокирует редокс-центры, образуя неактивный комплекс ДИМФ.

Дифференциальную форму кинетического уравнения скорости восстановления ИНТ клеточным донором электронов находим диаграммным методом:



где состояния клеточного восстановителя – вершины, а линии, соединяющие вершины – дуги с определёнными численными значениями.

В соответствии со схемой:

$$V = -\frac{d[\text{ИНТ}]}{dt} = \frac{k[D_{\text{red}}][\text{ИНТ}]}{1 + \frac{[\text{ИНТ}]}{K_D} + \frac{[\text{ИМФ}]}{K_P}}$$

В условиях эксперимента (физиологический раствор, т. е. отсутствие внешнего источника питания) можно предположить, что клеточная концентрация восстановителя постоянна вследствие процессов саморегуляции содержания ключевых метаболитов в течение непродолжительного времени сохранения концентрации жизнеспособных клеток.

Поэтому можно ввести обозначение:

$$k_{\text{эф.}} = k[D_{\text{red}}] \tag{1}$$

Используя обозначение (1) и выражая концентрацию продукта через текущую концентрацию реагента

$$[\text{ИМФ}] = [\text{ИНТ}]_0 - [\text{ИНТ}] \tag{2}$$

имеем:

Таблица 1 / Table 1

Кинетические параметры восстановления ИНТ суспензией бактерии *Bacillus stearothermophilus* (37 °C) / Kinetic parameters of INT reduction by *Bacillus stearothermophilus* suspension (37 °C)

[ИНТ] ₀ = 8,82 · 10 ⁻⁵ , М [INT] ₀ = 8,82 · 10 ⁻⁵ , М		[ИНТ] ₀ = 10,30 · 10 ⁻⁵ , М [INT] ₀ = 10,30 · 10 ⁻⁵ , М		[ИНТ] ₀ = 20,40 · 10 ⁻⁵ , М [INT] ₀ = 20,40 · 10 ⁻⁵ , М	
[ИМФ] · 10 ⁵ , М [IMF] · 10 ⁵ , М	t, с t, s	[ИМФ] · 10 ⁵ , М [IMF] · 10 ⁵ , М	t, с t, s	[ИМФ] · 10 ⁵ , М [IMF] · 10 ⁵ , М	t, с t, s
0,93	600	2,54	602	2,28	600
1,72	1200	2,92	900	3,67	1200
1,94	1801	3,83	1800	4,55	1800
2,36	2400	4,03	2400	5,26	3000
2,39	3000	4,07	3600	5,36	3600
2,53	3600	4,43	5400	5,68	4202
2,65	4201	4,54	7200	–	–
–	–	4,59	8400	–	–

Примечание: ИНТ – иоднитротетразолия хлорид, ИМФ – иодмоноформазан. Прочерк означает, что исследования при данной концентрации не проводились, поскольку кинетические кривые выходили на плато.

Note: INT – iodinitrotetrazolium chloride, IMF – iodomonoformazane. A dash means that studies with this concentration were not conducted because the kinetic curves reached a plateau.

$$V = -\frac{d[\text{ИНТ}]}{dt} = \frac{k_{\text{эф.}} \frac{[\text{ИНТ}]}{K_D}}{1 + \frac{[\text{ИНТ}]}{K_D} + \frac{[\text{ИНТ}]_0}{K_P} - \frac{[\text{ИНТ}]}{K_P}}$$

После умножения числителя и знаменателя полученного выражения на $K_D K_P$ получаем:

$$-\frac{d[\text{ИНТ}]}{dt} = \frac{k_{\text{эф.}} K_P [\text{ИНТ}]}{K_D K_P + K_P [\text{ИНТ}] + K_D [\text{ИНТ}]_0 - K_D [\text{ИНТ}]} \quad (3)$$

После деления числителя и знаменателя выражения (3) на $K_P [\text{ИНТ}]$ имеем:

$$-\frac{d[\text{ИНТ}]}{dt} = \frac{k_{\text{эф.}}}{\frac{K_D}{[\text{ИНТ}]} + 1 + \frac{K_D [\text{ИНТ}]_0}{K_P [\text{ИНТ}]} - \frac{K_D}{K_P}}$$

или

$$-\frac{d[\text{ИНТ}]}{dt} = \frac{k_{\text{эф.}}}{\left(1 - \frac{K_D}{K_P}\right) + K_D \left(1 + \frac{[\text{ИНТ}]_0}{K_P}\right) \frac{1}{[\text{ИНТ}]}}$$

После разделения переменных

$$\left(1 - \frac{K_D}{K_P}\right) d[\text{ИНТ}] + K_D \left(1 + \frac{[\text{ИНТ}]_0}{K_P}\right) \frac{d[\text{ИНТ}]}{[\text{ИНТ}]} = -k_{\text{эф.}} dt \quad (4)$$

и интегрирования выражения (4) получаем:

С учётом обозначения (2)

$$\left(1 - \frac{K_D}{K_P}\right) [\text{ИМФ}] + K_D \left(1 + \frac{[\text{ИНТ}]_0}{K_P}\right) \ln \frac{[\text{ИНТ}]_0}{[\text{ИНТ}]_0 - [\text{ИМФ}]} = k_{\text{эф.}} t.$$

Полученное уравнение преобразуем в линейную зависимость в координатах

$$\frac{[\text{ИМФ}]}{t} = f \left(\frac{1}{t} \ln \frac{[\text{ИНТ}]_0}{[\text{ИНТ}]_0 - [\text{ИМФ}]} \right) :$$

$$\frac{[\text{ИМФ}]}{t} = \frac{k_{\text{эф.}}}{\left(1 - \frac{K_D}{K_P}\right) - \frac{K_D \left(1 + \frac{[\text{ИНТ}]_0}{K_P}\right)}{\left(1 - \frac{K_D}{K_P}\right)} \frac{1}{t} \ln \frac{[\text{ИНТ}]_0}{[\text{ИНТ}]_0 - [\text{ИМФ}]} \quad (5)$$

Кинетические данные, необходимые для построения линейной зависимости (5), представлены в таблице 1.

Как видно из рисунка 1, линейная зависимость (5) выполняется удовлетворительно.

Следует обратить внимание, что по оси ординат зависимостей, представленных на рисунке 1, отсекается отрезок, имеющий отрицательное значение. Отрицательное значение эффективной скорости ($[\text{ИМФ}]/t$) реакции свидетельствует о значительном ингибировании продуктом реакции, причём $K_P < K_D$.

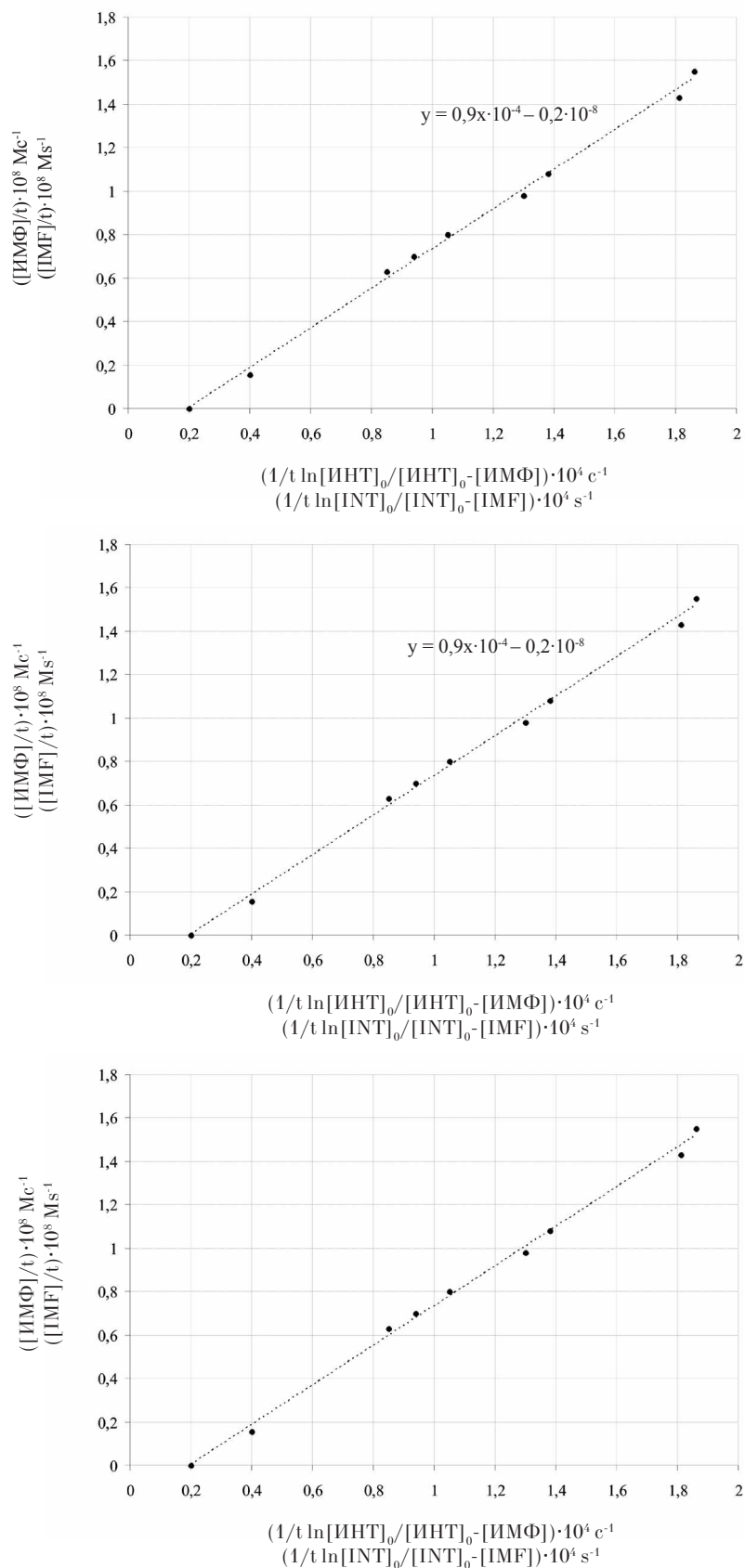


Рис. 1. Ингибирующее влияние продукта на скорость восстановления ИНТ (37 °С) суспензией бактерии *Bacillus stearothermophilus* при начальной концентрации ИНТ: а) $8,82 \cdot 10^{-5}$ М, б) $10,30 \cdot 10^{-5}$ М, в) $20,40 \cdot 10^{-5}$ М / **Fig. 1.** Product inhibitory effect on the INT reduction rate (37 °C) by *Bacillus stearothermophilus* suspension with $8.82 \cdot 10^{-5}$ M (a), $10.30 \cdot 10^{-5}$ M (b), and $20.40 \cdot 10^{-5}$ M (c) INT initial concentration

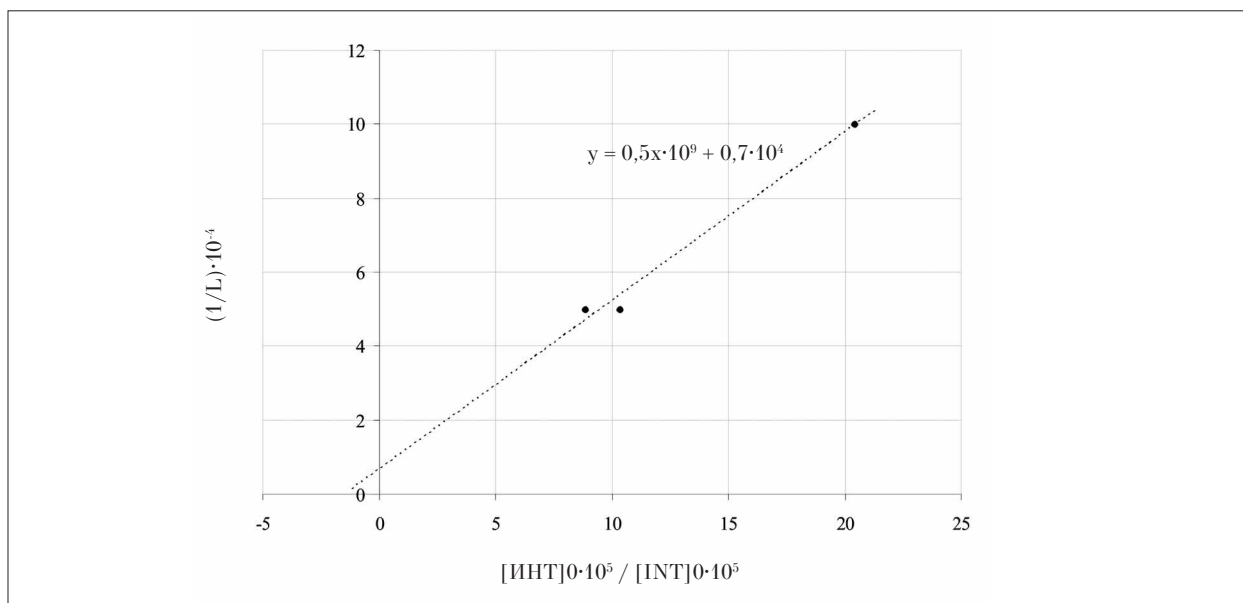


Рис. 2. Определение константы ингибирования продуктом реакции восстановления ИНТ суспензией бактерии *Bacillus stearotherophilus* в физиологическом растворе
Fig. 2. Determination of the inhibition constant by the product of the INT reduction reaction by *Bacillus stearotherophilus* suspension in a saline solution

Отрезок, отсекаемый по оси абсцисс, равен

$$L = \frac{k_{\text{эф.}}}{\left(1 + \frac{[\text{ИНТ}]_0}{K_p}\right)} \quad (6)$$

Разделив единицу на левую и правую части выражения (6), получаем уравнение прямой линии в координатах $1/L = f([\text{ИНТ}]_0)$, которое удовлетворительно согласуется с экспериментальными данными (рис. 2):

$$\frac{1}{L} = \frac{K_D}{k_{\text{эф.}}} + \frac{K_D}{k_{\text{эф.}} K_p} [\text{ИНТ}]_0 \quad (7)$$

Как следует из графических зависимостей, представленных в качестве примера на рисунках 1 и 2, действительно, ИМФ оказывает ингибирующее действие на восстановление ИНТ суспензией бактерии *B. stearotherophilus* с константой ингибирования, равной $1,40 \cdot 10^{-5}$ М (рис. 2).

Среднее значение K_p , определённое по результатам пяти экспериментальных серий, равно $(1,42 \pm 0,12) \cdot 10^{-5}$ М.

Заключение

Установлено, что при высоких концентрациях ИНТ (более $8,0 \cdot 10^{-5}$ М, восстановление соли тетразолия суспензированными в физиологическом растворе клетками *B. stearotherophilus* ингибируется иодмоно-

формазаном. Предложена кинетическая схема ингибирования реакции продуктом. Интегральным методом получено кинетическое уравнение ингибирования продуктом, которое представляет собой линейную зависимость в координатах $\frac{[\text{ИМФ}]}{t} = f\left(\frac{1}{t} \ln \frac{[\text{ИНТ}]_0}{[\text{ИНТ}]_0 - [\text{ИМФ}]}\right)$.

Найдено численное значение константы ингибирования продуктом, равное $(1,42 \pm 0,12) \cdot 10^{-5}$ М.

Полученные результаты могут быть использованы в экологических исследованиях для оценки уровня биохимической активности в водных и почвенных объектах, а также для разработки биосенсоров и методов контроля экологического загрязнения. Факторы влияния клеточной стенки бактерий, а также процессов метаболизма на скорость восстановления необходимо учитывать при проведении экологического исследования методом визуализации отклика бактерий на соли тетразолия. Изменение цвета соли тетразолия в начальный момент времени исследования может привести к неправильному выводу об отсутствии в исследуемом объекте жизнеспособных грамотрицательных бактерий, поскольку их отклик на ИНТ существенно медленнее, чем грамположительных бактерий. Также выявленный ингибирующий эффект продукта восстановления – моноформаза, может быть использован при разработке препаратов с бактерицидным действием.

Литература

1. Altman F.P. Tetrazolium salts and formazans // Prog. Histochem. Cytochem. 1976. V. 9. No. 3. P. 1–56. doi: 10.1016/s0079-6336(76)80015-0

2. Seidler E. The tetrazolium-formazan system: design and histochemistry // Prog. Histochem. Cytochem. 1992. V. 24. No. 1. P. 1–86. doi: 10.1016/S0079-6336(11)80060-4

3. Kuhn R., Jerchel D. Über Invertseifen, VIII. Reduktion von tetrazoliumsalzen durch bakterier, gärende hefe und keimende samen // Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1941. V. 74. No. 6. P. 949–952. doi: 10.1002/cber.19410740615

4. Isa H.W.M., Johari W.L.W., Syahir A., Abd Shukor M.Y., Nor Azwady A.A., Shaharuddin N.A., Muskhazli M. Development of a bacterial-based tetrazolium dye (MTT) assay for monitoring of heavy metals // Int. J. Agric. Biol. 2014. V. 16. No. 6. P. 1123–1128. doi: 13-317/2014/16-5-1123-1128

5. Плакунов В.К., Мартыанов С.В., Тетенева Н.А., Журнина М.В. Универсальный метод количественной характеристики роста и метаболической активности микробных биоплёнок в статических моделях // Микробиология. 2016. Т. 85. № 4. С. 484–489 doi: 10.7868/S0026365616040157

6. Testolin R.C., Almeida T.C.M., Polette M., Branco J.O., Fischer L.L., Niero G., Poyer-Radetski G., Silva V.C., Somenzi C.A., Corrêa A.X.R., Corrêa R., Rörig L.R., Itokazu A.G., Féraud J.-F., Cotelle S., Radetski C.M. Comparing different methods for fast screening of microbiological quality of beach sand aimed at rapid-response remediation // Mar. Pollut. Bull. 2017. V. 118. No. 1–2. P. 206–212. doi: 10.1016/j.marpolbul.2017.02.069

7. Домрачева Л.И., Кондакова Л.В., Ашихмина Т.Я., Огородникова С.Ю., Олькова А.С., Фокина А.И. Применение тетразолюно-топографического метода определения дегидрогеназной активности цианобактерий в загрязнённых средах // Теоретическая и прикладная экология. 2008. № 2. С. 23–28.

8. Круглов Ю.В. Микробное сообщество почвы: физиологическое разнообразие и методы исследования (обзор) // Сельскохозяйственная биология. 2016. Т. 51. № 1. С. 46–59. doi: 10.15389/agrobiology.2016.1.46rus

9. Горленко М.В., Кожевин П.А. Мультисубстратное тестирование природных микробных сообществ. М.: МАКС Пресс, 2005. 88 с.

10. Виноградова Ю.А., Лаптева Е.М., Перминова Е.М., Анисимов С.С., Новаковский А.Б. Микробные сообщества подзолистых почв на вырубках среднетаёжных еловых лесов // Известия Самарского научного центра РАН. 2014. Т. 16. № 5. С. 74–80.

11. Kalinina A.A., Makedoshin A.S., Radostin S.Yu., Gursky N.Yu., Sokolova T.N., Kartashov V.R. Application of chemical kinetics methods to the study of iodinitrotetrazolium chloride reduction in the presence of *Bacillus subtilis* cells // Moscow Univ. Chem. Bull. 2019. V. 74. No. 1. P. 20–24. doi: 10.3103/S0027131419010048

12. Калинина А.А., Македошин А.С., Гурский Н.В., Соколова Т.Н., Смирнов В.Ф. Кинетическое исследование восстановления иоднитротетразолия хлорида суспензией в физиологическом растворе грамотрицательных бактерий *Pseudomonas aeruginosa* и *Escherichia coli* // Теоретическая и прикладная экология. 2018. № 1. С. 25–32. doi: 10.25750/1995-4301-2018-1-025-032

13. Калинина А.А., Гурский Н.В., Соколова Т.Н., Кузина О.В., Смирнов В.Ф. Влияние видовых различий бактерий рода *Bacillus* и рода *Pseudomonas* суспендированных в физиологическом растворе, на скорость восстановления иоднитротетразолия хлорида // Теоретическая и прикладная экология. 2022. № 1. С. 145–152. doi: 10.25750/1995-4301-2022-1-145-152

References

1. Altman F.P. Tetrazolium salts and formazans // Prog. Histochem. Cytochem. 1976. V. 9. No. 3. P. 1–56. doi: 10.1016/s0079-6336(76)80015-0

2. Seidler E. The tetrazolium-formazan system: design and histochemistry // Prog. Histochem. Cytochem. 1992. V. 24. No. 1. P. 1–86. doi: 10.1016/S0079-6336(11)80060-4

3. Kuhn R., Jerchel D. Über Invertseifen, VIII. Reduktion von tetrazoliumsalzen durch bakterier, gärende hefe und keimende samen // Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1941. V. 74. No. 6. P. 949–952 (in German). doi: 10.1002/cber.19410740615

4. Isa H.W.M., Johari W.L.W., Syahir A., Abd Shukor M.Y., Nor Azwady A.A., Shaharuddin N.A., Muskhazli M. Development of a bacterial-based tetrazolium dye (MTT) assay for monitoring of heavy metals // Int. J. Agric. Biol. 2014. V.16. No. 6. P. 1123–1128. doi: 13-317/2014/16-5-1123-1128

5. Plakunov V.K., Mart'yanov S.V., Teteneva N.A., Zhurina M.V. A universal method for quantitative characterization of growth and metabolic activity of microbial biofilms in static models // Mikrobiologiya. 2016. V. 85. No. 4. P. 484–489 (in Russian) doi: 10.7868/S0026365616040157

6. Testolin R.C., Almeida T.C.M., Polette M., Branco J.O., Fischer L.L., Niero G., Poyer-Radetski G., Silva V.C., Somenzi C.A., Corrêa A.X.R., Corrêa R., Rörig L.R., Itokazu A.G., Féraud J.-F., Cotelle S., Radetski C.M. Comparing different methods for fast screening of microbiological quality of beach sand aimed at rapid-response remediation // Mar. Pollut. Bull. 2017. V. 118. No. 1–2. P. 206–212. doi: 10.1016/j.marpolbul.2017.02.069

7. Domracheva L.I., Kondakova L.V., Ashikhmina T.Ya., Ogorodnikova S.Yu., Olkova A.S., Fokina A.I. Application of the tetrazole-topographic method in defining dehydrogenizing activity of cyanobacteria in polluted environments // Theoretical and Applied Ecology. 2008. No. 2. P. 23–28 (in Russian).

8. Kruglov Yu.V. Microbial community of soil: physiological diversity patterns and assessment // Agricultural biology. 2016. V. 51. No. 1. P. 46–59 (in Russian). doi: 10.15389/agrobiology.2016.1.46rus

9. Gorlenko M.V., Kozhevin P.A. Multisubstrate testing of natural microbial communities. Moskva: MAKS Press, 2005. 88 p. (in Russian).

10. Vinogradova Yu.A., Lapteva E.M., Perminova E.M., Anisimov S.S., Novakovskiy A.B. Microbe communities in podzolic soils at logged spruce forest areas of the middle taiga zone // Izvestiya of Samara Scientific Center of Russian Academy of Sciences. 2014. V. 16. No. 5. P. 74–80 (in Russian).

11. Kalinina A.A., Makedoshin A.S., Radostin S.Yu., Gurskiy N.Yu., Sokolova T.N., Kartashov V.R. Application of chemical kinetics methods to the study of iodonitrotetrazolium chloride reduction in the presence of *Bacillus subtilis* cells // Moscow Univ. Chem. Bull. 2019. V. 74. No. 1. P. 20–24. doi: 10.3103/S0027131419010048

12. Kalinina A.A., Makedoshin A.S., Gurskiy N.V., Sokolova T.N., Smirnov V.F. Kinetic study of the reduction of iodonitrotetrazolium chloride by suspension of gram-negative bacteria *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* in physiological solution // Theoretical and Applied Ecology. 2018. No. 1. P. 25–32 (in Russian). doi: 10.25750/1995-4301-2018-1-025-032

13. Kalinina A.A., Gurckiy N.V., Sokolova T.N., Kuzina O.V., Smirnov V.F. The effect of species differences in bacteria of the genera *Bacillus* and *Pseudomonas*, suspended in saline, on the rate of recovery iodonitrotetrazolium chloride // Theoretical and Applied Ecology. 2022. No. 1. P. 25–32 (in Russian). doi: 10.25750/1995-4301-2022-1-145-152