

ТАКСОНОМІЧНЕ ПОЛОЖЕННЯ ОКРЕМИХ ПРЕДСТАВНИКІВ СУЛЬФІДОГЕННОГО КОРОЗІЙНО-АГРЕСИВНОГО МІКРОБНОГО УГРУПОВАННЯ

З біоплівки, утвореної на сталі корозійно-небезпечним сульфідогенним угрупованням, виділені сульфатвідновлювальні бактерії та їх гетеротрофні супутники. Бактерії охарактеризовані за фенотиповими ознаками та досліджені за методами молекулярно-генетичного аналізу.

Згідно з фенотиповими ознаками досліджувані штами сульфатвідновлювальних бактерій віднесено до роду *Desulfovibrio*, грамозитивні штами гетеротрофних супутників віднесено до роду *Bacillus*, виду *B. firmus* та *B. subtilis*. Грамнегативні штами за фізіолого-біохімічними ознаками віднесено до роду *Pseudomonas*, виду *P. aeruginosa*, роду *Stenotrophomonas*, виду *S. maltophilia* та роду *Aeromonas*, виду *A. hydrophila/caviae*.

Таксономічне положення окремих представників угруповання підтверджено за допомогою молекулярно-генетичного методу. Порівняльний аналіз результатів секвенування засвідчив ідентичність сиквенсів ділянок ДНК, що кодують ген 16S рРНК досліджуваних бактерій з аналогічними послідовностями штампів із бази даних GenBank.

Нуклеотидна послідовність штаму 27 має гомологію 99% з депонованою у GenBank послідовністю *Pseudomonas aeruginosa*, штаму 36 до нуклеотидної послідовності *Bacillus subtilis*. Для сульфатвідновлювальних бактерій підтверджена лише належність до роду *Desulfovibrio*. Таким чином, результати сиквенс аналізу генів 16S рРНК узгоджуються з даними, одержаними за вивчення фенотипових ознак.

Ключові слова: ідентифікація, фенотипові ознаки, ген 16S рРНК, сиквенс, біоплівка, сульфідогенне угруповання.

В ґрунті, який безпосередньо прилягає до поверхні трубопроводів, «феросфері», формується корозійно агресивне мікробне угруповання, що фактично є біоплівкою, до складу якого входять бактерії різних фізіологічних груп: сульфатвідновлювальні, залізвідновлювальні, денітрифікувальні, амоніфікувальні та тіонові бактерії [1].

Домінуючу роль у мікробній корозії сталі в умовах підземного середовища відіграють сульфатвідновлювальні бактерії, які беруть безпосередню участь у біоелектрохімічному процесі, який відбувається на поверхні металу, в біоплівці. Тому дослідження сульфідогенних мікробних угруповань як чинників створення екстремальних корозійних ситуацій має надзвичайну актуальність.

Експериментально було доведено, що за формування на поверхні сталі біоплівки в мікробному угрупованні відбуваються сукцесійні зміни [4, 5]. На перших етапах формування біоплівки домінуюче положення займають денітрифікувальні та амоніфікувальні бактерії, які сприяють створенню анаеробних умов на поверхні сталі. Наступними у біоплівці розвиваються сульфатвідновлювальні та залізвідновлювальні бактерії. Домінування попередньої фізіологічної групи створює оптимальні умови для функціонування наступної.

З літературних джерел відомо, що гетеротрофні супутники сульфатвідновлювальних бактерій відіграють важливу роль як в адгезії, так і в формуванні структури біоплівки [1, 2, 9, 10]. У природних умовах у змішаній біоплівці присутність псевдомонад, що мають здатність до синтезу полісахаридів, може сприяти утворенню та стабілізації біоплівки [11, 12]. Взаємодіючи між собою, всі члени сульфідогенного угруповання вносять певний вклад в формування біоплівки та корозійний процес.

Метою нашої роботи було визначити таксономічне положення окремих представників сульфідогенного мікробного угруповання біоплівки, сформованої на сталі.

Матеріали і методи. Виділення культур. З сульфідогенного мікробного угруповання сформованого на металі, тобто з біоплівки, виділені бактерії різних фізіологічних груп. Склад угруповання у біоплівці визначали шляхом висіву отриманої клітинної суспензії на елективні

поживні середовища відповідно до загальноприйнятих методик [3, 6]. Сульфатвідновлювальні бактерії (СВБ) виділяли на середовищі Постгейта «В», ацидофобні тіонові бактерії – на середовищі Бейєрінка, для виявлення денітрифікувальних бактерій (ДНБ) використовували середовище Гільтая, залізвідновлювальних бактерій (ЗВБ) – середовище Каліненка, амоніфікувальних (АБ) – м'ясо-пептонний бульон. Для одержання чистих культур здійснювали багаторазові пересіви окремих колоній на відповідних рідких та твердих поживних середовищах. Чисті культури мікроорганізмів виділяли за методом Коха [6]. Препарати клітин біоплівки забарвлювали за Грамом для визначення грамнегативних (G^-) та грампозитивних (G^+) бактерій [3, 6].

Для вивчення морфології бактерій використовували світлову і фазово-контрастну мікроскопію (мікроскоп Меїї MT5300H) за збільшення ($\times 1000$) та електронну мікроскопію за збільшення ($\times 6000$). Для електронно-мікроскопічного дослідження клітини фіксували 1,5 % розчином OsO_4 у 0,2М какодилатному буфері при рН 7,2 та температурі 4 °С протягом 90 хв. Після фіксації і зневоднювання етанолом клітини переносили у розчин пропілен оксиду на 10-15 хв. Зразки заливали епоксидною смолою Епон 812. Ультратонкі зрізи отримували на мікромомі УМТП-6. Контрастування зрізів проводили спиртовим розчином уренілацетату та цитратом свинцю за методикою Рейнольдса [13]. Зразки переглядали на електронному трансмісійному мікроскопі ПЕМ-100 за прискорювальної напруги 75 кВ.

Таксономічне положення сульфатвідновлювальних бактерій визначали за морфолого-культуральними і фізіолого-біохімічними властивостями.

Для вивчення здатності бактерій засвоювати різні джерела вуглецю, останні вносили у концентраціях 3,5 г/л (для органічних кислот та спиртів) та 2 г/л (для амінокислот) до середовища Постгейта «С» без дріжджового екстракту. Для визначення використання культурами акцепторів електронів у середовище Постгейта «В», позбавлене сульфатів, вносили сульфат, сульфід чи тіосульфат у концентрації 4,5 г/л.

Здатність мікроорганізмів до споруутворення перевіряли прогрівачи суспензії клітин у запаяних ампулах на водяній бані при температурі 100 °С протягом 10, 20 та 30 хв.

Ідентифікацію гетеротрофних мікроорганізмів проводили з використанням АРІ-систем: АРІ 20 NE та АРІ 20 E (Biomerieux, Франція). Одержані результати обробляли за допомогою програмного забезпечення АРІ Lab Plus. Тести для ідентифікації проводили відповідно до інструкції, наданої виробником.

Оксидазну і каталазну активність перевіряли за методами, описаними в [6]. Виділення сірководню у бактерій перевіряли за методом, описаним у [3]. Реакцію Фогес-Проскауера для визначення ацетилметилкарбінолу ставили відповідно до [6].

Молекулярно-генетичні дослідження. Виділення та очищення ДНК проводили з 2-3 добрих культур бактерій за допомогою набору «ДНК Сорб-В» згідно з інструкцією виробника. Ампліфікацію фрагментів генів 16S рРНК проводили з використанням пари універсальних праймерів: прямого RNNF1 5'-CGG-CCC-AGA-CTC-CTA-CGG-GAG-GCA-GCA-3' та зворотного RNNR2 5'-GCG-TGG-ACT-ACC-AGG-GTA-TCT-AAT-CC-3' за допомогою ПЛР реакції на приладі «2720 Thermal Cycler». Об'єм ампліфікаційної суміші складав 50 мкл і містив такі компоненти: H_2O – 17 мкл, Mg^{2+} 5х буфер – 10 мкл, 10х суміші dNTP – 5 мкл, суміш праймерів прямого та зворотного (10 пмоль/мкл) – 5+5 мкл, Taq-polymerase (10 од/мкл) – 0,5 мкл та 7,5 мкл зразку бактеріальної ДНК. Температурний режим ампліфікації був таким: початкова денатурація + 94 °С x 5 хв, наступні 35 циклів – денатурація + 94 °С x 30 сек, гібридизація праймерів + 55 °С x 30 сек, полімеризація + 72 °С x 30 сек, а по закінченню 35 циклу фінальне охолодження до + 4 °С. Аналіз продуктів ПЛР проводили за допомогою електрофорезу у 1 % агарозному гелі, що містив етидій бромід у концентрації 1 мкл/мл, за напруженості поля 10 В/см. Час електрофорезу складав 20 хв. Як маркер молекулярної маси та кількості ДНК використовували SM0403 (Fermentas).

Виділення та очистку фрагментів з агарози проводили за допомогою центрифугування смужок гелю, що містили ДНК, крізь аерозольні фільтри. Преципітацію ДНК проводили таким чином: до отриманого розчину ДНК додавали 1/10 об'єму 3М ацетату натрію та 0,7 об'єму ізопропанолу. Для сиквенування осад розчиняли у 12 мкл ТЕ буферу.

Сиквенс проводили на сиквенаторі «3130 Genetic Analyzer» з набором реактивів «BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit»

Пошук гомологічних депонованих у GenBank нуклеотидних послідовностей, які кодують ген 16S рРНК, проводили за допомогою програми BLASTN.

Результати та їх обговорення. З біоплівки, утвореної на сталі корозійно-небезпечним сульфідогенним угрупованням, виділені чисті культури: 1 штам сульфатвідновлювальних бактерій та 6 штамів їх гетеротрофних супутників.

Дослідження сульфатвідновлювальної бактерії штам Київ-10 за морфолого-культуральними та фізіолого-біохімічними характеристиками дали такі результати: клітини штаму Київ-10 представлені паличками з закругленими кінцями, іноді спареними. Розмір клітин варіював в діапазоні 0,5-0,8 x 1,5-3,0 мкм (рис. 1). Бактерії мезофільні, грамнегативні, є факультативними анаеробами, спор не утворюють.

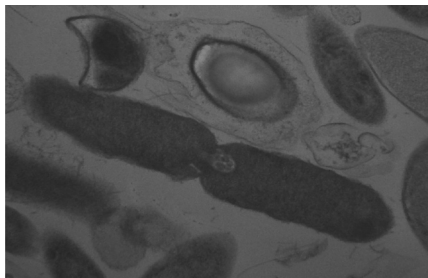


Рис. 1. Клітини культури сульфатвідновлювальних бактерій штам Київ-10 (електронна мікроскопія, ×6000)

Штам Київ-10 як джерело вуглецевого живлення може використовувати лактат, етанол, бутанол, ацетат, сукцинат, піруват та ін.). Як акцептори електронів використовував сульфат, сульфід та тіосульфат (табл. 1). За морфологічними та фізіологічними ознаками штам сульфатвідновлювальних бактерій Київ-10 згідно з Bergey's Manual of Systematic Bacteriology [7], можна віднести до роду *Desulfovibrio*.

Гетеротрофні супутники сульфатвідновлювальних бактерій відрізнялись за забарвленням по Граму. Встановлено, що 4 штами (27, 28, 30, 31) бактерій, виділених із сульфідогенного мікробного угруповання – це грамнегативні дрібні палички і 2 штами грампозитивні (34, 36) великі палички. При цьому було виявлено, що з шести досліджуваних штамів три мали флюоресціюючий пігмент.

Таблиця 1

Характеристика *Desulfovibrio sp.* Київ-10

Ознака	Характеристика ознаки	Наявність (+) чи відсутність (-) ознаки
Морфологія клітин	Забарвлення за Грамом	-
	Форма клітин	Вигнуті палички
	Розмір клітин, мкм	0,5-0,8× 1,5-3,0
	Рухливість	+
	Спороутворення	-
Ріст за температури, °С	20	+
	30	++
	40	+
	50	-
	60	-
Ріст за присутності NaCl, %	0.5	+
	1	++
	2	++
	3	+
	4	+
	Споживання кисню	факульт анаероб
Акцептор електронів	Сульфат	+
	Сульфід	+
	Тіосульфат	+

Засвоєння як джерела вуглецю	Лактат	++
	Етанол	+
	Бутанол	+
	Ацетон	+
	Ацетат	+
	Сукцинат	+
	Піруват	++
	Аланін	+
	Серин	+
	Лізин	+
	Триптофан	+
	Аспарагін	+
	Аргінін	-
	Фенол	-
	Форміат	-
	Бутират	-
	Оксалоацетат	-
	Малеат	-
	Глутамат	-
Аспарагінат	-	

Штами 34 та 36 – це грампозитивні великі палички, які здатні рости при температурі 42°C і не ростуть при 5°C. На МПА утворюють молочно-бежеві колонії, здатні продукувати сірководень, не утворюють індол. Відрізняються за спектром зброджуваних вуглеводів (табл. 2) та утворенням ацетилметилкарбінолу (реакція Фогес-Проскауера). Обидва штами каталазопозитивні, але лише штам 36 оксидазопозитивний.

За морфолого-культуральними і фізіолого-біохімічними характеристиками штам 34 можна віднести до виду *Bacillus firmus*, а штам 36 – до виду *Bacillus subtilis*.

Штами 27, 28, 31, 32 грамнегативні маленькі палички, ростуть при температурі 20°C, 32°C та 42°C, штами 31 і 32 ростуть при 4°C. Всі штами продукують сірководень, не утворюють індол, асимілюють глюкозу. Досліджувані штами відрізняються за асиміляцією ряду цукрів, активністю аргініндегідролази, β-глюкозидази (табл. 3). За фізіолого-біохімічними характеристиками штами 27, 28 можна віднести до виду *Pseudomonas aeruginosa* (ID 99,9%), штам 31 до виду *Stenotrophomonas maltophilia* (ID 99,9%), штам 30 до виду *Aeromonas hydrophila/caviae* (ID 99,9%).

Для підтвердження видової належності членів сульфідогенного угруповання була проведена ідентифікація цих штамів із використанням молекулярно-генетичного методу, а саме полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Проведений частковий сиквенс ділянки ДНК, що кодує ген 16S рРНК штамів Київ-10, 27 та 36. Ампліфікацію фрагментів генів 16S рРНК проводили з використанням пари універсальних праймерів: прямого RNNF1 та зворотного RNNR2. Аналіз продуктів ПЛР проводили за допомогою електрофорезу у 1,0% агарозному гелі (рис. 2).

За допомогою ПЛР-аналізу одержані ампліфіканти гену 16S РНК, які були сиквензовані. При порівняльному аналізі нуклеотидних послідовностей гену 16S РНК бактерій, що вивчалися з аналогічними послідовностями бактерій родів *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Desulfovibrio* із бази даних GenBank за допомогою програми BLASTN було встановлено, що нуклеотидна послідовність штаму 27 має гомологію 99% з депонованою у GenBank нуклеотидною послідовністю *P. aeruginosa* ATCC 23993 (FJ652615.1), а нуклеотидна послідовність штаму 36 виявила подібність 99% до послідовності *B. subtilis* ZFJ-8 (EU931563.1) (табл. 4). Для сульфатвідновлювальних бактерій підтверджена лише належність до роду *Desulfovibrio*.

Отже, визначення таксономічного положення окремих представників угруповання за фізіолого-біохімічними характеристиками підтверджено за допомогою молекулярно-генетичного методу, а саме: порівняльним аналізом нуклеотидних послідовностей 16S рРНК бактерій.

**Характеристика грампозитивних штамів гетеротрофних супутників
сульфатвідновлювальних бактерій**

№ п/п	Характеристика	<i>Bacillus firmus</i> 34	<i>Bacillus subtilis</i> 36
1.	Забарвлення по Граму	+	+
2.	Анаеробний ріст	-	+
3.	Рухливість	+	+
4.	Гідроліз желатину	+	+
5.	Гідроліз крохмалю	+	+
6.	Оксидазна активність	-	+
7.	Каталазна активність	+	+
8.	Активність фенілаланін дезамінази	-	-
9.	Уреазна активність	-	-
10.	Активність β-галактозидази	+	+
11.	Утилізація цитрату	+	+
12.	Утилізація малонату	-	-
13.	Утворення індолу	-	-
14.	Утворення сірководню	+	+
15.	Ріст при 5°C	-	-
16.	Ріст при 20°C	+	+
17.	Ріст при 32°C	+	+
18.	Ріст при 42°C	+	+
19.	Лізиндекарбоксилаза	-	-
20.	Орнітиндекарбоксилаза	-	-
21.	Аргініндегідролаза	+	+
22.	Ферментація - Глюкози	-	+
23.	Манніту	+	+
24.	Інозиту	-	+
25.	Сорбіту	-	+
26.	Рамнози	-	+
27.	Сахарози	-	+
28.	Мелібіози	-	+
29.	Амігдаліну	-	+
30.	Арабінози	-	+
31.	Редукція нітратів до нітритів	+	+
32.	Реакція Фогес-Проскауера	-	+

Примітка: тут і в таблиці 3 «+» – наявність ознаки, «-» – відсутність ознаки.

Наші дослідження показали, що основними компонентами сульфідогенного мікробного угруповання, крім сульфатвідновлювальних бактерій, є бактерії родів: *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, які взаємодіючи між собою у біоплівці, можуть активізувати корозію.

Одержані результати сприятимуть подальшим розробкам і пошуку нових ефективних заходів проти мікробної корозії, що діятимуть на більш тонких рівнях структурної організації корозійного-агресивного угруповання мікроорганізмів.

**Характеристика грамнегативних штамів гетеротрофних супутників
сульфатвідновлювальних бактерій**

№ п/п	Характеристика	27 <i>P. aeruginosa</i>	28 <i>P. aeruginosa</i>	30 <i>A. hydrophila/ caviae</i>	31 <i>S. maltophilia</i>
1	Флюор. пігмент	+	-	+	-
2	Оксидазна активність	+	+	+	-
3	Каталазна активність	+	+	+	+
4	Ріст при 4°C	-	-	-	+
5	Ріст при 20°C	+	+	+	+
6	Ріст при 32°C	+	+	+	+
7	Ріст при 42°C	+	+	+	+
8	Зброджування D-Глюкози	-	-	+	-
9	Утворення індолу	-	-	-	-
10	Редуція нітратів до нітритів	+	+	+	+
11	Аргініндегідролаза	+	+	+	-
12	Уреаза	+	+	+	-
13	β-глюкозидаза	-	-	+	+
14	β-галактозидаза	-	-	+	+
15	Гідроліз желатину	+	+	+	+
16	Утворення сірководню	+	+	+	+
17	Асиміляція як єдиного джерела вуглецю D-Глюкози	+	+	+	+
18	L-арабінози	-	-	+	-
19	D-манози	-	-	+	+
20	D-маніт	+	+	+	-
21	N-ацетилглюкозаміну	+	+	+	+
22	D-мальтози	-	-	+	+
23	Глюконату	+	+	+	-
24	Капринової кислоти	+	+	+	-
25	Адипінової кислоти	+	+	+	-
26	Яблучної кислоти	+	+	+	+
27	Цитрату	+	+	+	+
28	Фенілоцтової кислоти	-	-	-	-

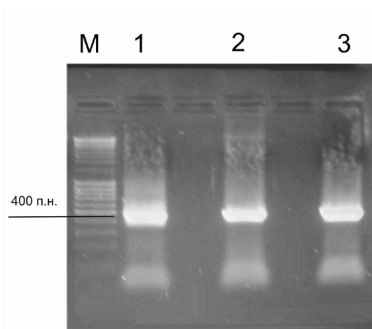


Рис. 2. Електрофореграма продуктів ПЛР 16 S рРНК: М – маркер молекулярної маси MassRuller DNA Ladder Mix SM0403; 1 – штам 27; 2 – штам 36; 3 – штам Київ-10

Ідентифікація бактерій за допомогою часткового сиквенсу гену 16S рРНК

Штам	Довжина фрагменту гена, пп	Результати BLASTN-аналізу		
		Подібність, %	Гомологічний вид	Код GenBank
27	338	99	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> culture-collection MTCC:7926	GQ461355.1
			<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain ATCC 23993	FJ652615.1
36	276	99	<i>Bacillus subtilis</i> strain FQ06	GQ360038.1
			<i>Bacillus subtilis</i> strain ZFJ-8	EU931563.1
10	389	86	<i>Desulfovibrio</i> sp. VKM B-2200	FJ606758.1
			<i>Desulfovibrio</i> sp. STL13	AJ006613.1

Л.Г. Асауленко, Д.Р. Абдуліна, Л.М. Пуриш

Інститут мікробіології та вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, Київ

**ТАКСОНОМИЧЕСКОЕ ПОЛОЖЕНИЕ
ОТДЕЛЬНЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ СУЛЬФИДОГЕННОГО
КОРРОЗИОННО-АГРЕССИВНОГО МИКРОБНОГО СООБЩЕСТВА**

Резюме

Из биопленки, которая формируется на стали коррозионно-опасным сульфидогенным микробным сообществом, выделены сульфатредуцирующие бактерии и их гетеротрофные спутники. Идентификацию микроорганизмов проводили как классическими: физиолого-биохимическими, так и методами молекулярно-генетического анализа.

Исходя из физиолого-биохимических характеристик, исследованные штаммы сульфатредуцирующих бактерий отнесены к роду *Desulfovibrio*, грамположительные штаммы – к роду *Bacillus*, вида *B. firmus*, *B. subtilis*. Среди грамотрицательных штаммов выявлены представители рода *Pseudomonas*, вида *P. aeruginosa*, рода *Stenotrophomonas*, вида *S. maltophilia*, рода *Aeromonas*, вида *A. hydrophila/caviae*.

Сравнительный анализ результатов секвенирования показал 99 % идентичность сиквенсов 16S рРНК с аналогичными последовательностями штаммов из базы данных GenBank. Таким образом, результаты сиквенс анализа генов 16S рРНК согласуются с данными, полученными при изучении фенотипических свойств бактерий.

Ключевые слова: идентификация, фенотипические свойства, ген 16S РНК, сиквенс, биопленка, сульфидогенное сообщество.

L.G. Asaulenko, D.R. Abdulina, L.M. Purish

*Zaboloty Institute of Microbiology and Virology,
National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv*

**TAXONOMIC POSITION OF CERTAIN REPRESENTATIVES
OF SULFIDOGENIC CORROSIVE MICROBIAL COMMUNITY**

S u m m a r y

Sulfate-reducing bacteria and their heterotrophic satellites have been isolated from the biofilm formed on steel by sulfidogenic corrosive microbial community. Bacteria were characterized according to phenotypical features and investigated by the methods of molecular-genetic analysis.

In accordance with the phenotypical features the studied strain of sulfate-reducing bacteria were related to *Desulfovibrio* genus, Gram-positive strains of heterotrophic satellites were related to *Bacillus* genus, *B.firmus* and *B.subtilis* species. Gram-negative strains, as to their physiological-biochemical characteristics were related to *Pseudomonas* genus, *Paeruginosa* species, *Stenotrophomonas* genus, *S.maltophilia* species, and *Aeromonas* genus, *A.hydrophila/caviae* species.

Taxonomic position of certain representatives of the community is confirmed by the molecular-genetic methods. A comparative analysis of the sequencing results has evidenced for the identity of sequences of 16S rRNA of the studied bacteria with analogous sequence of strains from the GenBank database.

Nucleotide sequence of strain 27 has a 99 % homology with the sequence of *Pseudomonas aeruginosa*, strain 36 deposited at GenBank to nucleotide sequence of *Bacillus subtilis*. As to sulfate-reducing bacteria, only their belonging to *Desulfovibrio* genus has been confirmed. Thus the results of sequence-analysis of 16S rRNA genes are in agreement with the data obtained from studying the phenotypical features.

The paper is presented in Ukrainian.

К e y w o r d s: identification, phenotypical characteristics, gene 16S RNA, sequence, biofilm, sulfidogenic community.

The author's address: *Asaulenko L.G.*, Zabolotny Institute of Microbiology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D03080, Ukraine.

1. Андреев К.И., Козлова И.П., Коптсва Ж.П., Заніна В.В., Піляшенко-Новоухатний А.І., Пуріш Л.М. Мікробна корозія підземних споруд. – Київ: Наук. думка, 2005. – 258 с.
2. Асауленко Л.Г., Пуріш Л.М., Козлова І.П. Етапи формування біоплівки сульфатредуючими бактеріями // Мікробіол. журн. – 2004. – **66**, № 3. – С. 72–79.
3. Методы общей бактериологии / Под ред. Ф. Герхардта и др. – М.: Мир, 1984. – 264 с.
4. Пуріш Л.М., Асауленко Л.Г. Динаміка сукцесійних змін у сульфідогенній мікробній асоціації за умов формування біоплівки на поверхні сталі // Мікробіол. журн. – 2007. – **69**, № 6. – С. 19–25.
5. Пуріш Л.М., Асауленко Л.Г., Остапчук А.М. Особливості розвитку моно- й асоціативних культур сульфатвідновлювальних бактерій та утворення екзополімерного комплексу // Мікробіол. журн. – 2009. – **71**, № 2. – С. 20–26.
6. Практикум по микробиологии / Под ред. Н.С. Егорова. – М.: Изд-во Моск. ун-та, 1976. – 306 с.
7. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* // Second edition, Volume two, Part C, Eds D.Brenner, N.R.Krieg, J.T.Staley. -- New York: Springer, 2005. – 1388 p.
8. Costerton J.W., Lewandowski Z., Caldwell D.E. et al. Microbial Biofilms // *Ann. Rev. Microbiol.* – 1995. – **49**. – P. 711–745.
9. Hamilton W.A. Microbially Influenced Corrosion in the Context of Metal Microbe Interactions // *Microbial Corrosion* / Ed by C.A.C. Sequeira. – London: European Federation of Corrosion, IOM Communications, 2000. – P. 3–17.
10. Hamilton W.A. Sulfate-reducing bacteria and anaerobic corrosion // *Ann. Rev. Microbiol.* – 1985. – **39**. – P. 195–217.
11. Itoh T., Okabe S., Saton H., Watanabe Y. Successional development of sulfate-reducing bacterial populations and activities in a wastewater biofilm growing under microaerophilic // *App. And Environ. Microbiol.* – 2002. – **68**, N 3. – P. 1392–1402.
12. James G.A., Beaudette L., Costerton J.W. Interspecies bacterial interactions in biofilm // *J. Ind. Microbiol.* – 1995. – **15**, N 4. – P. 237–262.
13. Reynolds E.S. The use of lead citrate at pH as an electron-opaque strain in electron microscopy // *J. Cell. Biol.* – 1963. – **17**, N 1. – P. 208–212.

Отримано 19.03.2009