

Лиофилизированные микроорганизмы как основа биочувствительного элемента БПК-биосенсора

© 2024. Н. Ю. Юдина¹, к. х. н., с. н. с., Т. Н. Козлова¹, м. н. с.,
М. Г. Зайцев¹, к. х. н., доцент, В. А. Самойленко², к. б. н., с. н. с.,
С. В. Алфёров¹, к. х. н., зав. лабораторией,

¹Тульский государственный университет,
300012, Россия, г. Тула, пр. Ленина, д. 92,

²Институт биохимии и физиологии микроорганизмов имени Г. К. Скрыбина РАН –
обособленное подразделение ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических
исследований РАН»,
142290, Россия, г. Пушкино, пр. Науки, д. 5,
e-mail: tysia21-05-90@mail.ru

Разработаны и апробированы биосенсоры для определения биохимического потребления кислорода (БПК) на основе лиофилизированных бактерий *Paracoccus yeei* ВКМ В-3302 и дрожжей *Debaryomyces hansenii* ВКМ У-2482. Использование лиофилизированной формы микроорганизмов позволяет перейти на новый формат анализа – применение легкозаменяемых биочувствительных элементов с коротким сроком эксплуатации, что облегчит внедрение БПК-биосенсоров в лаборатории экологического мониторинга, занимающиеся рутинным определением БПК по методике, основанной на 5-ти суточной инкубации проб. Биосенсоры характеризуются высокой чувствительностью (нижняя граница определения БПК₅ 0,5 мгО₂/дм³), сходимостью результатов (4,5%), позволяют анализировать пробы воды, отнесённые к категории «чистые» (диапазон БПК₅ 0,05–0,5 мг/дм³), и получать результаты с высокой корреляцией (R=0,9951) к стандартному методу.

Ключевые слова: биосенсор, биохимическое потребление кислорода (БПК), лиофилизированные микроорганизмы, *Paracoccus yeei*, *Debaryomyces hansenii*.

Lyophilized microorganisms as a basis for biosensitive element of a BOD-biosensor

© 2024. N. Yu. Yudina¹ ORCID: 0000-0002-4054-9642, T. N. Kozlova¹ ORCID: 0000-0002-6928-0392,
M. G. Zaytsev¹ ORCID: 0009-0000-9686-5487, V. A. Samoilenko² ORCID: 0009-0006-9895-1200,
S. V. Alferov¹ ORCID: 0000-0002-5217-7815³

¹Tula State University,

92, Pr. Lenina, Tula, Russia, 300012,

²G. K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms,
Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences,
Federal Research Center,

5, Pr. Nauki, Pushchino, Russia, 142290,

e-mail: tysia21-05-90@mail.ru

Previously created laboratory models and commercially available BOD biosensors are usually formed using the biomass of microorganisms obtained by centrifugation of the culture fluid. In this work we developed and tested BOD biosensors based on lyophilized bacteria *Paracoccus yeei* VKM V-3302 and yeast *Debaryomyces hansenii* VKM Y-2482. The use of a lyophilized form of microorganisms makes it possible to switch to a new analysis format – the use of easily replaceable biosensitive elements with a short service life. It will simplify the introduction of BOD biosensors in environmental laboratories, enterprises and organizations involved in the routine determination of BOD using a methodology based on a 5-day sample incubation. The long shelf life (up to 2 years), low cost and easy applying of a dry preparation to the electrode will greatly facilitate the transportation of biosensitive elements to the end user, allow analysis in the field and at any time and will not require constant calibration of a sensor. It has been shown that the lyophilization process does not lead to significant changes in the metabolic activity of microorganisms. The biosensors are characterized by high sensitivity (the lower limit of BOD₅ determination is 0.5 mgO₂/дм³), convergence of results (4.5%) and are not inferior

to existing analogs in terms of basic characteristics. They make it possible to analyze water samples classified as “pure” (BOD_5 range 0.05–0.5 mg/dm³) and obtain results with a high correlation ($R=0.9951$) to the standard method. Thus, the use of bacteria *P. yeii* and yeast *D. hansenii* in a lyophilized form as part of the sensitive elements of BOD biosensors makes it possible to use them in prototypes of biosensors for mass production.

Keywords: biosensor, biochemical oxygen demand, lyophilized microorganisms, *Paracoccus yeii*, *Debaryomyces hansenii*.

Одним из важнейших параметров, характеризующих степень загрязнённости сточных вод легкоокисляемыми органическими соединениями, является биохимическое потребление кислорода (БПК). С целью сокращения времени измерения БПК разработаны экспресс-биосенсоры для оценки степени загрязнения воды. Принцип анализа заключается в том, что микроорганизмы, иммобилизованные на физико-химическом преобразователе, окисляют органические вещества, генерируя аналитический сигнал, регистрируемый преобразователем. Для экспресс-определения БПК используют микробные биосенсоры, основанные на применении целых клеток бактерий (*Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Bacillus polymyxa*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella*) и дрожжей (*Torulopsis candida*, *Arxula adenivorans*, *Hansenula anomala*, *Saccharomyces cerevisiae* и др.) [1]. Особо следует выделить дрожжи *Debaryomyces hansenii* [2] и бактерии *Paracoccus yeii* [3], способные окислять широкий спектр органических веществ и обладающие высокой устойчивостью к стрессовым факторам окружающей среды.

БПК-биосенсоры позволяют достигнуть высокой корреляции данных со стандартным методом определения БПК (не менее $R=0,9800$), однако большинство из них находятся на стадии научно-исследовательских разработок, что находит отражение в обзорных статьях [1, 4–6]. В целом за последние 5 лет в базе данных ScienceDirect опубликовано более 700 работ с ключевым словом «БПК-биосенсор».

Существующие коммерческие БПК-биосенсоры по конструкции представляют собой массивные биореакторные установки (до 200 кг), что затрудняет их повсеместное распространение в лабораториях и делает невозможным проведение анализа в полевых условиях. Поэтому создание компактного, автономного быстродействующего биосенсора является актуальной задачей. Большое внимание уделяется разработке медиаторных биосенсоров и микробных биотопливных элементов [4], однако их массовое производство и повсеместное распространение затруднено из-за сложного аппаратного оформления

и необходимости внесения дополнительных реагентов.

Все описанные ранее БПК-биосенсоры обладают низкой сходимостью, поскольку биочувствительные элементы в них сформированы с использованием «влажной» биомассы (живые клетки микроорганизмов, выращенные на жидкой питательной среде и отделённые от неё путём центрифугирования). Кроме конструктивных особенностей для конечного потребителя важное значение имеют, во-первых, простота закрепления биоматериала на электроде, а во-вторых, стабильность работы биочувствительного элемента БПК-биосенсора. Для решения первой проблемы разработано значительное количество биочувствительных элементов на основе микроорганизмов, иммобилизованных в различные матрицы [2, 3, 7, 8], но их существенными недостатками являются ограниченный срок хранения иммобилизованных микроорганизмов, постоянное изменение их активности в рецепторном элементе сенсора и, как следствие, сложность проведения стандартизации. В связи с этим перспективным направлением является создание БПК-биосенсоров на основе лиофилизированных микроорганизмов, которые способны сохранять жизнеспособность на высоком уровне до двух лет, что создаёт предпосылки к переходу на другой формат анализа. Так, использование лиофилизированной формы микроорганизмов позволит создавать легкозаменяемые (даже в полевых условиях) биочувствительные элементы с коротким сроком эксплуатации, а БПК-биосенсоры на их основе будут обладать высокой сходимостью результатов благодаря повышению устойчивости к неблагоприятным факторам окружающей среды [9]. Лيوфилизированные микроорганизмы уже используются для создания различных биосенсорных систем, например, биосенсоров на основе люминесцентных бактерий [10–12] и микробных топливных элементов для определения токсичности [13]. Совместно с научно-производственной фирмой ООО «Эконикс-Эксперт» разработан коммерчески доступный экспресс-анализатор биохимического потребления кислорода «Эксперт-009» на основе кислородного электрода

и аттестована методика экспресс-оценки БПК с использованием биологического сенсора (МУ 09-16/001).

В связи с этим целью работы является создание БПК-биосенсора на основе лиофилизированных бактерий *Paracoccus yeii* и дрожжей *Debaryomyces hansenii*.

Объекты и методы исследования

Культивирование микробных клеток.

Штаммы бактерий *Paracoccus yeii* ВКМ В-3302 и дрожжей *Debaryomyces hansenii* ВКМ У-2482 были получены из Всероссийской коллекции микроорганизмов Института биохимии и физиологии микроорганизмов имени Г. К. Скрыбина РАН – обособленное подразделение ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН» (г. Пушкино, Россия).

Для получения инокулята бактерий *P. yeii* В-3302 пересеивали в пробирки на скошенный мясо-пептонный агар (аминопептид – 5 г/дм³, триптон – 5 г/дм³, дрожжевой экстракт – 1 г/дм³, соевый экстракт – 5 г/дм³, агар-агар – 20 г/дм³) и культивировали в течение 24 ч. Полученную биомассу стерильно переносили в жидкую мясо-пептонную среду и культивировали 24 ч при температуре 28 °С.

Культивирование проводили в ферментере АНКУМ-2М (Россия) объёмом 10 л с заполнением на 60% средой следующего состава: печёночный экстракт (Himedia, India) – 10 г/дм³, дрожжевой пептон (Angel Yeasts, China) – 10 г/дм³, дрожжевой экстракт («Диа-М») – 5 г/дм³, сульфат магния – 0,2 г/дм³, сульфат марганца – 0,1 г/дм³, гидрофосфат калия – 0,5 г/дм³, дигидрофосфат калия – 1 г/дм³, пеногаситель Софэксил-1520 («Софэкс-Силикон», Россия) – 2 г/дм³, вода – до 6 л. Питательную среду стерилизовали автоклавированием при 120 °С и давлении 1,1 атм в течение 40 мин и далее стерильно подавали в ферментёр. Режим культивирования: 28 °С, 350 об./мин, рН 5,0. Полученную биомассу отделяли от супернатанта центрифугированием в течение 10 мин при 10000 g при комнатной температуре.

Инокулят дрожжевых клеток *D. hansenii* получали пересеиванием в пробирки со скошенным сусло-агаром (солодовый экстракт – 15,0 г/дм³, пептон – 0,75 г/дм³, мальтоза – 12,75 г/дм³, декстрин – 2,75 г/дм³, глицерин – 2,35 г/дм³, гидрофосфат калия – 0,4 г/дм³, хлорид аммония – 1,0 г/дм³, агар-агар – 20 г/дм³). Далее полученную биомассу стерильно пере-

носили в жидкую среду того же состава и культивировали при 28 °С в течение 48 ч.

Культивирование проводили в ферментёре АНКУМ-2М на среде следующего состава: дрожжевой пептон (Angel Yeasts, China) – 8 г/дм³, дрожжевой экстракт («Диа-М») – 5 г/дм³, глюкоза – 10 г/дм³, сульфат аммония – 3 г/дм³, сульфат магния – 0,3 г/дм³, дигидрофосфат калия – 1 г/дм³, пеногаситель Софэксил-1520 («Софэкс-Силикон», Россия) – 2 г/дм³, вода до 6 л.

Стадии получения лиофилизированных микроорганизмов. После концентрирования клеточную биомассу смешивали с защитной средой в соотношении 1:1. Для бактерий *P. yeii* в качестве защитной среды использовали раствор, содержащий 1% сухого молока («Диа-М»), 1% трегалозы («Диа-М») и 2% глутамата («Диа-М»). Для дрожжей *D. hansenii* раствор трегалозы был заменён на сахарозу. Концентрированную суспензию с защитной средой замораживали в кюветах при -40 °С. Лиофильную сушку проводили на установке КС-30 (компания «ЖАР-КО», г. Санкт-Петербург), сушку вели при начальной температуре (50–55) °С и давлении 1,25 Па. Через 2,5–3 ч включали нагрев полка до 35 °С. Продолжительность процесса сушки 19–20 ч. Сухую биомассу хранили при -20 °С в герметичной упаковке (рис. 1, см. цв. вкладку V).

Определение жизнеспособности лиофилизированных микробных клеток. Количество жизнеспособных бактерий *P. yeii* и дрожжей *D. hansenii* в 1 грамме лиофилизированного препарата определяли методом стандартных серийных разведений гомогенной суспензии микроорганизмов на чашки Петри с богатой питательной средой Лурия-Бертани. Высев проводился в трёх повторностях через 6, 12, 18 и 24 месяца хранения лиофилизированного препарата при -20 °С в герметичной упаковке.

Перед высевом высушенные образцы микроорганизмов регидратировали и гомогенизировали фосфатно-буферным (рН 6,8, концентрация солей 33 мМ) физиологическим (0,9% NaCl) раствором и инкубировали при 25 °С.

Формирование чувствительного элемента биосенсора. Лиофилизированные клетки фиксировали на поверхности кислородного электрода с помощью диализной мембраны Z742631 (4 кДа, Sigma-Aldrich, США) и резинового кольца. Массу лиофилизированных бактерий в биочувствительном элементе

Н. Ю. Юдина, Т. Н. Козлова, М. Г. Зайцев,
В. А. Самойленко, С. В. Алфёров
«Лиофилизированные микроорганизмы как основа
биочувствительного элемента БПК-биосенсора». С. 141.

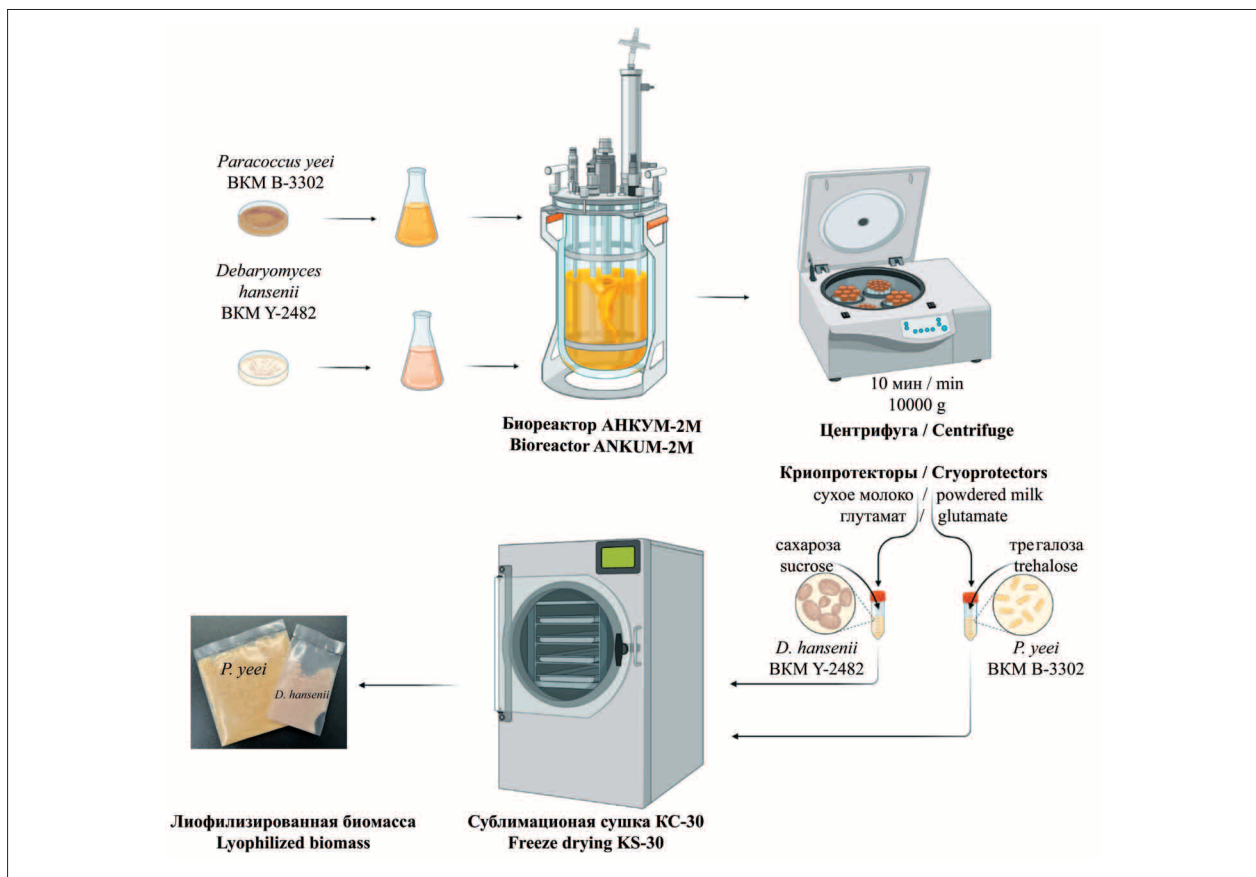


Рис. 1. Стадии получения лиофилизированных микроорганизмов
Fig. 1. Stages of obtaining lyophilized microorganisms

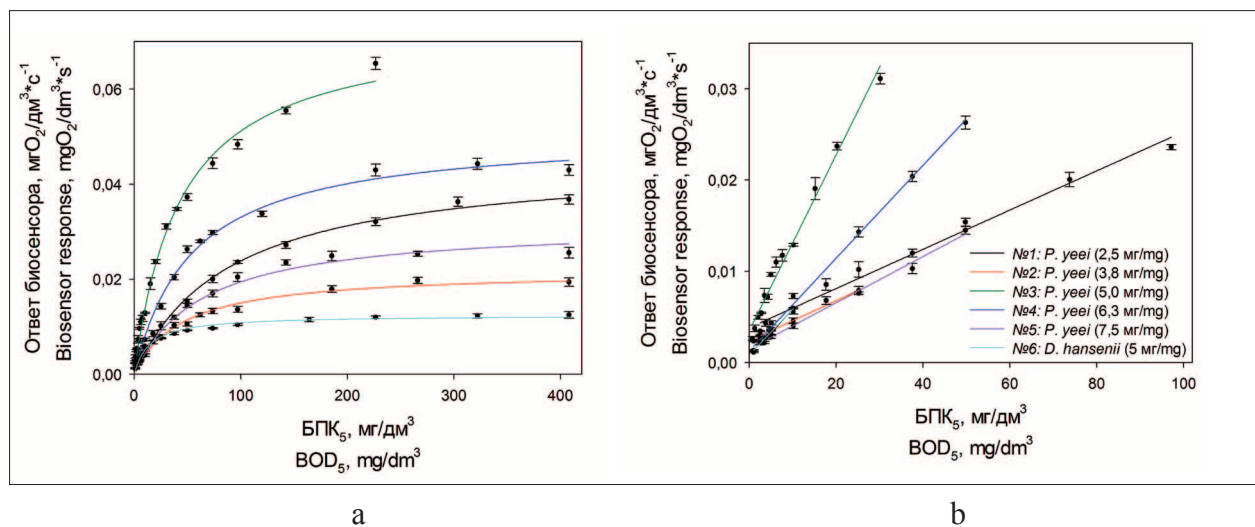


Рис. 6. Зависимость ответов ($\text{мг O}_2/\text{дм}^3\cdot\text{с}^{-1}$) разработанных биосенсоров от БПК₅:
а) гиперболические; б) линейные участки
Fig. 6. Dependence of responses ($\text{mg O}_2/\text{dm}^3\cdot\text{s}^{-1}$) of developed biosensors on BOD₅:
а) hyperbolic dependences; б) linear segments

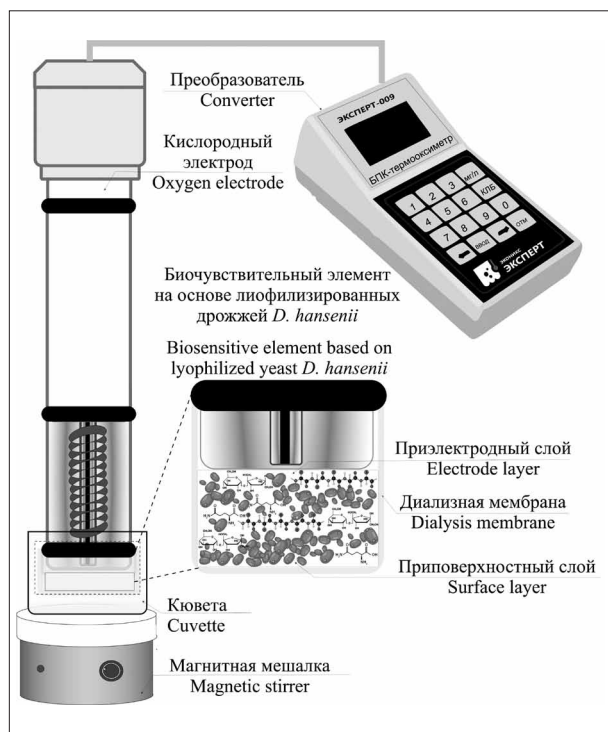


Рис. 2. Макет БПК-биосенсора на основе БПК-термооксиметра-ЭКСПЕРТ-009 и кислородного электрода типа Кларка
Fig. 2. Model of a BOD biosensor based on an EKSPERT-009/BOD thermo-oximeter and Clark oxygen electrode

варьировали от 2,5 до 7,5 мг (титр бактерий *P. yeii* $(14 \pm 1) \cdot 10^9$ КОЕ/г сухого препарата). Дрожжи *D. hansenii* наносили в количестве 5 мг (титр $(20 \pm 1) \cdot 10^4$ КОЕ/г сухого препарата).

Для активации лиофилизированного биоматериала электрод помещали на несколько часов в кювету с натрий-калиевым фосфатным буферным раствором (рН 6,8, концентрация солей 33 мМ) и периодически добавляли окисляемый субстрат.

Биосенсорные измерения. Измерения выполняли с помощью «БПК-термооксиметра-Эксперт-009» (ООО «Эконикс-Эксперт», Россия), подключенного к персональному компьютеру в режиме «термооксиметр», в программе EXP2PR (ООО «Эконикс-Эксперт», Россия). В качестве преобразователя использовали кислородный электрод типа Кларка, на котором были иммобилизованы микробные клетки (рис. 2). За ответ биосенсора принимали максимальную скорость изменения концентрации кислорода от времени ($\text{мг O}_2/\text{дм}^3 \cdot \text{с}^{-1}$). Измерения проводили в кювете объёмом 5 см³ при постоянном перемешивании на магнитной мешалке (250 об./мин). Для измерений использовали натрий-калиевый фосфатный буферный рас-

твор (рН 6,8). Аликвоты проб вводили автоматическими микропипетками переменного объёма (500–5000 мкл, 100–1000 мкл, 30–300 мкл, 10–100 мкл, 2–20 мкл, Thermo Fisher Scientific, США).

В качестве раствора для калибровки БПК-биосенсоров использовали смесь глюкозы и глутаминовой кислоты (ГГС) с концентрацией 150 мг/дм³ каждого компонента (суммарно 300 мг/дм³, что соответствует БПК₅ 205 мг/дм³ согласно методикам ПНД Ф 14.1:2:3:4.123-97 и ISO 5815-1:2019).

Статистическая обработка экспериментальных данных. Была проведена с использованием пакета программ Microsoft Office. Все эксперименты проводили не менее чем в 5 независимых опытах с 3 параллельными измерениями в каждом. Выводы сделаны при вероятности безошибочного прогноза $P \geq 0,95$. Достоверность различия результатов определена с помощью критерия Стьюдента.

Определение БПК₅ стандартным методом разбавления. Отбор проб производился в соответствии со стандартной методикой (ГОСТ 31861-2012).

В качестве референтного метода для определения БПК₅ был использован метод разбавления в соответствии с ПНД Ф 14.1:2:3:4.123-97. Определение содержания растворённого кислорода в исследуемых пробах выполняли амперометрическим методом.

Результаты и обсуждение

Формирование биочувствительных элементов БПК-биосенсоров на основе лиофилизированных микроорганизмов. В работах [2, 14] показано применение дрожжей *D. hansenii* и бактерий *P. yeii* в «сыром» виде для создания чувствительных элементов БПК-биосенсоров, характеризующихся высокой стабильностью. Поэтому были получены лиофилизированные препараты этих микроорганизмов. Для быстрой оценки окислительной активности клеток иммобилизацию лиофилизированных микроорганизмов проводили с использованием химически инертной диализной мембраны [15].

Исследование жизнеспособности лиофилизированных микроорганизмов. Для получения стабильных лиофилизатов решающее значение имеет выбор вспомогательных веществ наряду с оптимизацией параметров процесса [16]. Для успешной лиофилизации бактерии *P. yeii* и дрожжи *D. hansenii* смешивались с криопротекторами поликомпонентного состава, как описано выше. Выбранная

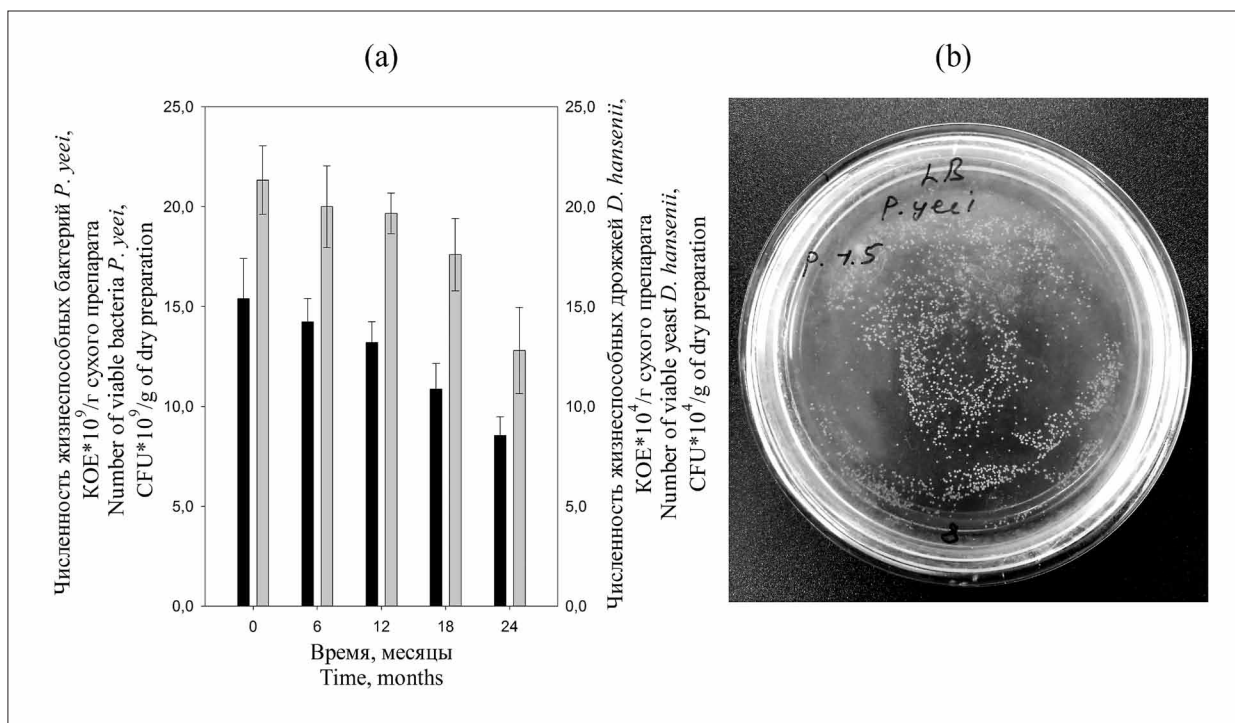


Рис. 3. Жизнеспособность лиофилизированных микроорганизмов в процессе хранения: (a) гистограммы выживаемости бактерий *P. yeii* и дрожжей *D. hanseni*;

Fig. 3. Viability of lyophilized microorganisms during storage: (a) survival histograms of *P. yeii* bacteria and *D. hanseni* yeast; (b) inoculation of *P. yeii* bacteria from the lyophilized preparation

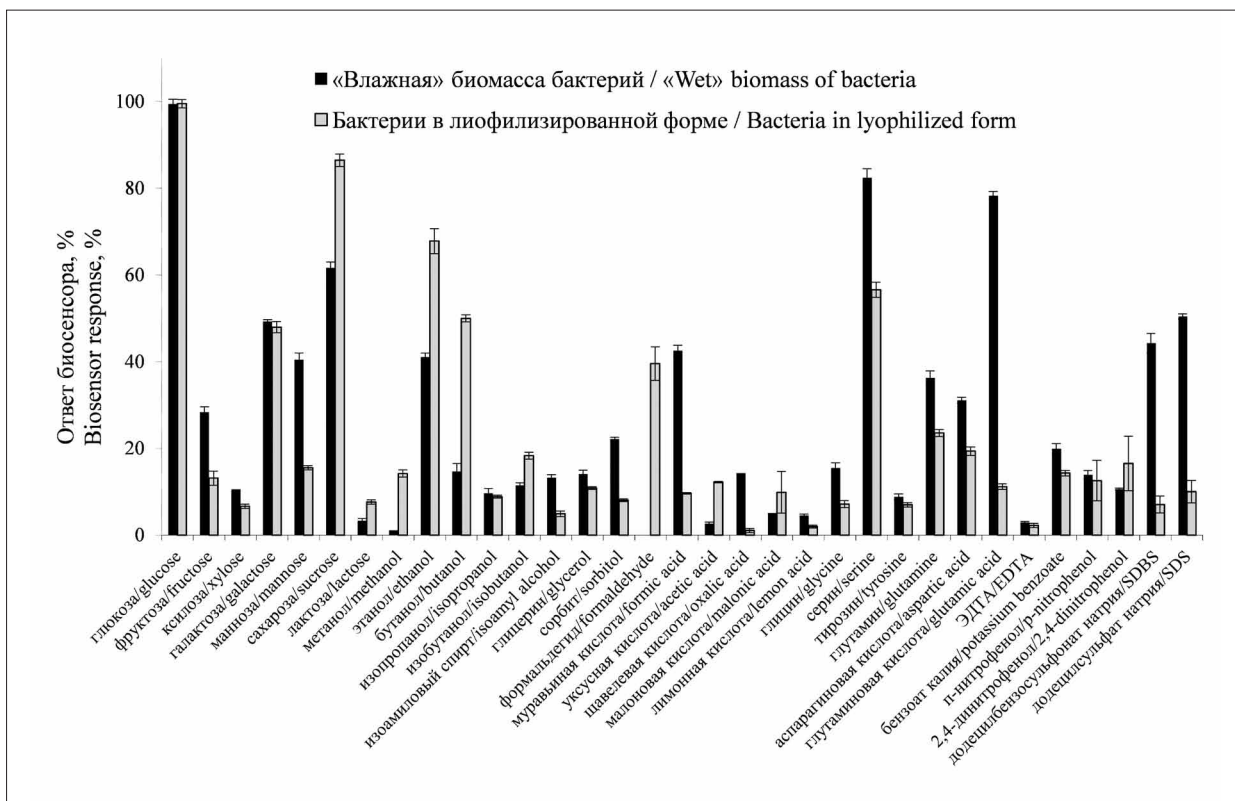


Рис. 4. Сравнение спектров окисляемых веществ бактериями *P. yeii* во «влажной» и лиофилизированной формах

Fig. 4. Comparison of the spectrums of oxidizable substances by *P. yeii* bacteria in “wet” and lyophilized forms

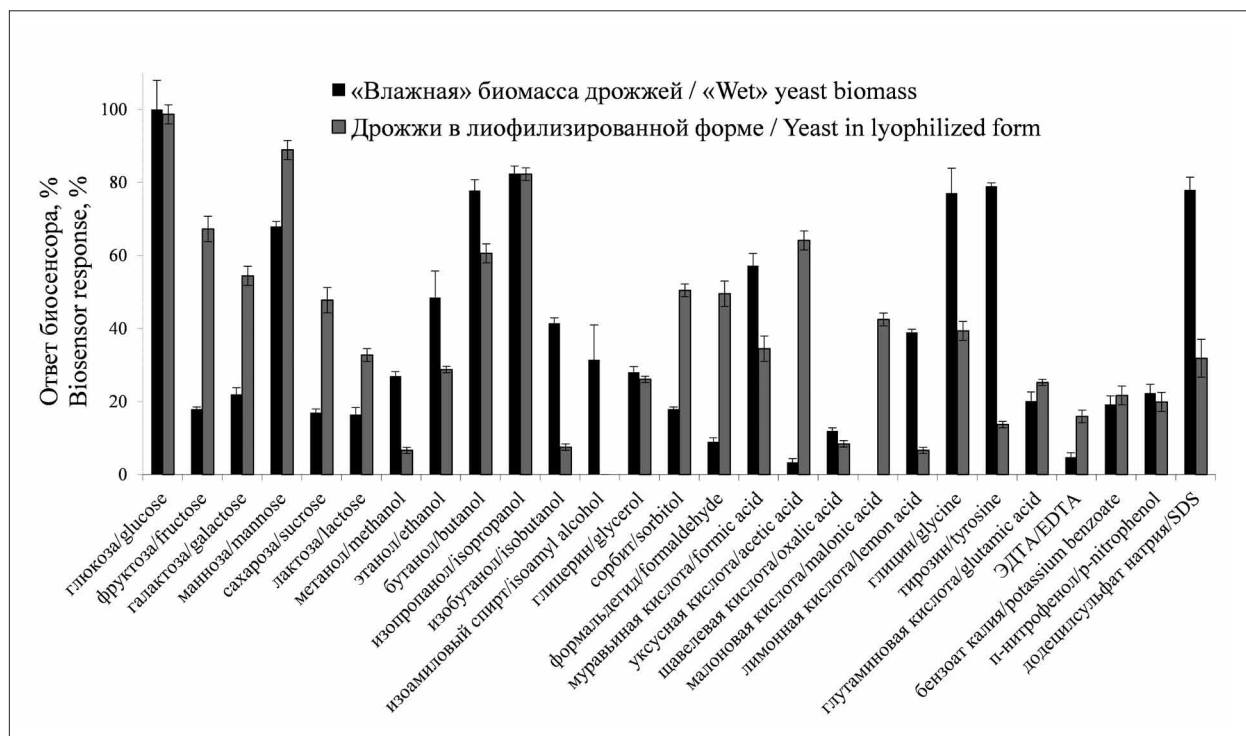


Рис. 5. Сравнение спектров окисляемых веществ дрожжами *D. hansenii* во «влажной» и лиофилизированной формах
 Fig. 5. Comparison of the spectrums of oxidizable substances by *D. hansenii* yeast in “wet” and lyophilized forms

комбинация соединений, характеризующихся своим механизмом защитного действия, имеет ряд преимуществ. Сахара, как защитные агенты, могут быть использованы микроорганизмами после регидратации в качестве источника энергии [17]. В присутствии дисахаридов увеличивается вязкость сконцентрированных замораживанием внеклеточных растворов, что способствует снижению подвижности молекул воды и приводит к обезвоживанию клеток, предотвращая, таким образом, образование внутриклеточного льда, нарушающего целостность мембран [18]. Белок, содержащийся в сухом молоке, приобретает аморфную стеклообразную структуру, обеспечивающую высокую стабильность микроорганизмов в дегидратированном состоянии после лиофильной сушки [19, 20]. Применение глутамата в качестве компонента защитной среды объясняется его способностью взаимодействовать с липидным бислоем клеточной мембраны, что увеличивает текучесть мембраны и, в свою очередь, толерантность микроорганизмов к сублимационной сушке [21].

При использовании выбранной комбинации криопротекторов начальный титр бактерий *P. yeii* в 1 г сухого препарата составил $(15 \pm 1) \cdot 10^9$ КОЕ, а для дрожжей *D. hansenii* – $(21 \pm 1) \cdot 10^4$ КОЕ. Для оценки жизнеспособ-

ности лиофилизированных микроорганизмов при хранении в работе была исследована выживаемость бактериальных и дрожжевых клеток через 6, 12, 18 и 24 месяца (рис. 3).

Выживаемость обоих микроорганизмов остаётся высокой (более 50%) спустя 24 месяца хранения в морозильной камере при -20°C в герметичной упаковке. Данный факт свидетельствует о том, что используемые параметры лиофильной сушки и состав применяемых защитных сред позволяют получить лиофилизированные бактерии *P. yeii* и дрожжи *D. hansenii* с высоким процентом выживаемости при длительном сроке хранения до 24 месяцев, что является несомненным преимуществом при использовании чувствительных элементов БПК-биосенсоров на их основе.

Сравнение спектров окисляемых субстратов «влажными» и лиофилизированными микроорганизмами. Эвтрофикация водоёмов происходит из-за наличия органических веществ, поэтому для определения БПК₅ с использованием сенсоров в составе биочувствительного элемента должны применяться микроорганизмы, окисляющие широкий спектр органических соединений. Известно, что лиофилизация микроорганизмов вызывает стресс и часто приводит к изменению метаболической активности [16]. Поэтому

в работе было проведено сравнение спектров окисляемых веществ «влажными» и лиофилизированными клетками бактерий (рис. 4) и дрожжей (рис. 5).

За 100% принят ответ биосенсора на глюкозу (концентрация субстратов 24 ммоль/дм³). Для исследования выбран ряд веществ, значительно снижающих уровень растворённого кислорода в водных объектах. Для лиофилизированной формы бактерий *P. yeii* зарегистрирован ответ биосенсора на формальдегид, что не наблюдалось для «влажной» формы, а также повышение окислительной активности в отношении метанола. Оба вещества являются высокотоксичными, и их окисление лиофилизированными бактериями может свидетельствовать об активации ферментных систем бактерий после воздействия стрессовых факторов при лиофилизации [16].

Для лиофилизированной формы дрожжей зафиксировано увеличение относительной окислительной активности к углеводам по сравнению с «влажной» биомассой. Процесс лиофилизации не оказывает существенного влияния на спектр окисляемых субстратов бактериями *P. yeii* и дрожжами *D. hansenii*, что даёт возможность успешно применять лиофилизированную форму микроорганизмов для оценки БПК₅.

Характеристики БПК-биосенсоров. Для создания быстро и легко заменяемых (или одноразовых) чувствительных элементов БПК-биосенсоров предполагается фасовка лиофилизированных микроорганизмов в требуемом количестве в герметичную упаковку. Поэтому необходимо подобрать массу наносимых на кислородный датчик лиофилизированных клеток. С этой целью было сформировано пять биочувствительных элементов на основе бактерий *P. yeii* с массой лиофилизированных микроорганизмов от 2,5 до 7,5 мг ((14±1)·10⁹ КОЕ/г сухого препарата). При этом выбраны бактериальные, а не сложноорганизованные дрожжевые клетки, поскольку они позволяют получать более быстрые отклики биосенсора. Для дрожжей *D. hansenii* создан биочувствительный элемент с массой 5 мг ((20±1)·10⁴ КОЕ/г сухого препарата). По экспериментальным данным построены градуировочные зависимости откликов биосенсоров от БПК₅ (рис. 6а, см. цв. вкладку V).

Биокатализаторы на основе целых клеток микроорганизмов являются рецепторами каталитического типа, так как ответ в таких системах обеспечивается ферментативными реакциями микроорганизмов. В связи с этим зависимости, приведённые на рисунке 6а, хорошо аппроксимируются уравнением типа Михаэлиса-Ментен:

Таблица 1 / Table 1

Основные характеристики БПК-биосенсоров на основе лиофилизированных бактерий *P. yeii* и дрожжей *D. hansenii* / Main characteristics of BOD biosensors based on lyophilized bacteria *P. yeii* and yeast *D. hansenii*

Характеристики / Characteristic	Микроорганизмы / Microorganism					
	<i>P. yeii</i>					<i>D. hansenii</i>
Номер биочувствительного элемента No. of the biosensitive element	1	2	3	4	5	6
Масса микроорганизмов на электроде, кг·10 ⁻⁶ Mass of microorganisms on the electrode, kg·10 ⁻⁶	2,5	3,8	5,0	6,3	7,5	5,0
Коэффициент чувствительности, с ⁻¹ ·10 ⁻⁵ Sensitivity coefficient, s ⁻¹ ·10 ⁻⁵	20,0±1,4	20,0±2,6	100±6	50,0±2,2	30,0±2,3	50±4
Диапазон определения БПК ₅ , мг/дм ³ Range of determined BOD ₅ contents, mg/dm ³	2,8–90	1,2–40	0,5–44	1,0–54	0,8–60	0,4–14
Операционная стабильность (15 измерений), % Operational stability (15 measurements), %	3,0	6,6	4,4	3,8	3,8	4,5
Долговременная стабильность, сутки Long-time stability, days	9	6	12	6	7	42
Время единичного анализа, мин Duration of single measurement, min	6–8	6–8	5–7	5–7	6–8	5–7

Примечание: титр бактерий *P. yeii* составлял (14±1) · 10⁹ КОЕ/г сухого препарата, титр дрожжей *D. hansenii* – (20±1) · 10⁴ КОЕ/г сухого препарата.

Note: the titer of *P. yeii* bacteria was (14±1) · 10⁹ CFU/g of dry preparation, the titer of *D. hansenii* yeast was (20±1) · 10⁴ CFU/g of dry preparation.

Таблица 2 / Table 2

Сравнение характеристик разработанных БПК-биосенсоров с существующими аналогами
Comparison of the developed BOD biosensor characteristics with existing analogues

Микроорганизм / метод иммобилизации Microorganism / method of immobilization	Диапазон БПК ₅ , мг/дм ³ Range BOD ₅ , mg/dm ³	Операционная и долговременная стабильность Operational and long-time stability	Время анализа, мин Measurement time, min	Ссылка Link
<i>P. yeii</i> В-3302 лиофилизированные / капсулирование (КОЕ 7·10 ⁸) lyophilized / encapsulation (CFU 7·10 ⁸)	0,5–44	4,4% / 12 дней / days	5–7	данные авторов authors' data
<i>P. yeii</i> В-3302 / включение в гель entrapment in gel	0,05–5,0	7% / 45 дней / days	4–6	[26]
<i>D. hansenii</i> Y-2482 лиофилизированные / капсулирование (КОЕ 1·10 ³) lyophilized / encapsulation (CFU 1·10 ³)	0,4–14	4,5% / 42 дня / days	5–7	данные авторов authors' data
<i>D. hansenii</i> / включение в гель entrapment in gel	0,7–206,7	4,2% / 20 дня / days	5–7	[2]
<i>D. hansenii</i> Y-2482 / включение в золь-гель (КОЕ 6,5·10 ⁶) entrapment in sol-gel (CFU 6.5·10 ⁶)	0,5–5,0	6,7% / 40 дня / days	–	[27]
<i>Pseudomonas putida</i> / адсорбция adsorption	0,5–10	10 дней / days	15	[28]
<i>Escherichia coli</i> / адсорбция (10 ⁶ –10 ⁸ КОЕ/мл) adsorption (10 ⁶ –10 ⁸ CFU/mL)	До 225	42 дня / days	–	[29]
Биоплёнка микроорганизмов из сточных вод / включение в гель Biofilm of microorganisms from waste water / entrapment in gel	2–64	2,1% / 60 дней / days	10	[30]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> / включение в гель (2·10 ⁵ КОЕ/см ²) entrapment in gel (2·10 ⁵ CFU/cm ²)	5–100	3,6%	10	[31]
Активный ил / включение в гель Activated sludge / entrapment in gel	1–100	2,9% / 65 дней / days	9	[32]
<i>P. yeii</i> SPB1 / адсорбция adsorption	1,3–200	2,9% / 22 дня / days	4–6	[33]
<i>Bacillus subtilis</i> / включение в гель entrapment in gel	4–60	60 дней / days	15	[34]

Примечание: прочерк означает отсутствие данных.
Note: a dash indicates no data.

$$R = \frac{R_{\max} [S]_0}{K_M + [S]_0} \quad (1)$$

где R_{\max} – максимальный ответ биосенсора (при бесконечно большой концентрации субстрата); K_M – эффективная константа Михаэлиса, численно равная концентрации субстрата, при которой скорость ферментативной реакции достигает половины максимального значения.

Для уменьшения погрешности анализа используют, как правило, линейный уча-

сток градуировочной кривой, ограниченной сверху константой Михаэлиса K_M (рис. 6б, см. цв. вкладку V). Нижняя граница линейного участка соответствует нижней границе определяемых содержаний и рассчитывается статистическим методом, исходя из критерия значения относительного стандартного отклонения результатов измерения ($S_r(C) < 0,33$). Определение основных аналитических и метрологических характеристик БПК-биосенсоров проводили с использованием ГГС (табл. 1).

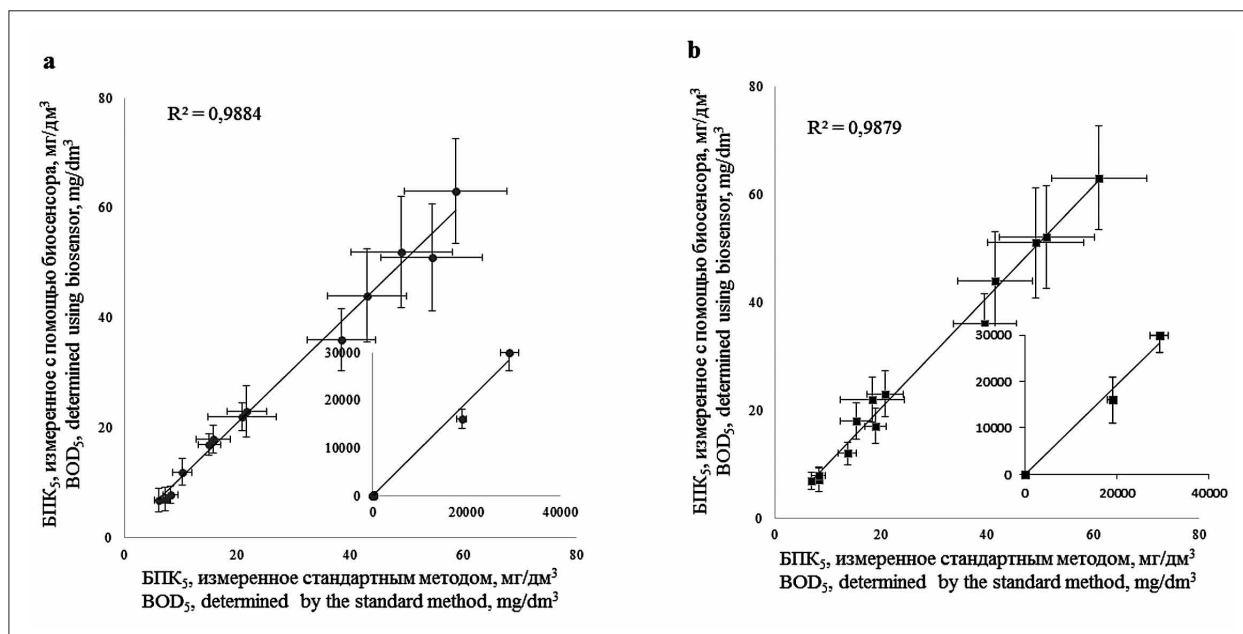


Рис. 7. Корреляция данных, полученных стандартным методом и с помощью биосенсора:

(а) – дрожжи *D. hansenii*, (б) – бактерии *P. yeii*

Fig. 7. Correlation of the results obtained by the standard method and determined using the biosensors: (a) yeast *D. hansenii*, (b) bacteria *P. yeii*

Примечание: во вставках представлена корреляция значений БПК₅ в интервале от 1 до 30000 мг/дм³
 Note: the insets show the correlation of values BOD₅ in the range from 1 to 30000 mg/dm³

При разработке БПК-биосенсоров ключевую роль играют такие характеристики, как нижняя граница определяемых содержаний, чувствительность и операционная стабильность. Для биосенсора на основе бактерий *P. yeii* наибольший коэффициент чувствительности ($100 \pm 6 \text{ с}^{-1} \cdot 10^{-5}$) зарегистрирован при нанесении на кислородный электрод 5 мг сухого препарата. Нижняя граница определяемых содержаний БПК₅ составляет 0,5 мг/дм³, что позволяет анализировать образцы воды категории «чистые» [22]. При дальнейшем увеличении количества биоматериала в биочувствительном элементе коэффициент чувствительности снижается, что является типичным для такого рода систем [23, 24]. При высокой плотности микроорганизмов на электроде практически весь субстрат израсходуется уже в приповерхностных слоях биочувствительного элемента (рис. 2), а в приэлектродном слое происходит обеднение субстратом, т. е. процесс контролируется внутренней диффузией.

Показано (табл. 1), что лиофилизированные бактерии могут функционировать на кислородном электроде в течение 12 сут (снижение окислительной активности микроорганизмов на 50% от максимальной), а дрожжи до 42 сут, что объясняется повышенной устойчивостью эукариотических клеток к негативным факторам окружающей

среды [25]. Применение лиофилизированной формы микроорганизмов создаёт предпосылки к переходу на новый формат анализа – формирование легкозаменяемых биочувствительных элементов с коротким сроком эксплуатации, что позволит избежать возможной контаминации биоматериала.

Из таблицы 2 следует, что после лиофилизации бактерий и дрожжей в целом не происходит значительного изменения основных характеристик БПК-биосенсоров по сравнению с аналогами, где применялась «влажная» биомасса микроорганизмов, иммобилизованных в различные матрицы [2, 26, 27].

БПК-биосенсоры на основе лиофилизированных микроорганизмов превосходят прототипы [28–34] по значению нижней границы определяемых содержаний БПК₅ и отличаются меньшим временем единичного анализа [28–32, 34] (табл. 2). Показано, что повторяемость результатов, полученных на 5 разных электродах с одинаковой массой лиофилизированных бактерий (5 мг), составляет 90%.

Использование нового формата проведения анализа с кислородными датчиками на основе легкозаменяемых биочувствительных элементов с коротким сроком эксплуатации избавит от трудоёмкой и рутинной ежедневной стандартизации.

Анализ образцов воды. Проведён анализ образцов модельных (полупродукты брожения) и природных вод (болотная, вода из прудов и рек в пределах городской зоны) с использованием разработанных БПК-биосенсоров на основе лиофилизированных бактериальных и дрожжевых клеток.

Значения БПК₅, определённые с помощью созданных биосенсоров совпадали со значениями БПК₅, полученными по стандартной методике с учётом доверительного интервала (в интервале от 1 до 30000 мг/дм³). Для биосенсора на основе высушенных дрожжей коэффициент корреляции составил R=0,9969, на основе бактериальных клеток – R=0,9951. Коэффициент корреляции для созданных биосенсоров сопоставим со значениями R, полученными для большинства ранее описанных аналогов [1–3, 26, 29–34].

Заключение

В работе показана возможность использования лиофилизированных бактерий *Paracoccus yeei* ВКМ В-3302 и дрожжей *Debaryomyces hansenii* ВКМ У-2482 для формирования чувствительных элементов БПК-биосенсоров. Применение в биочувствительном элементе лиофилизированных микроорганизмов позволяет облегчить внедрение БПК-биосенсоров в лаборатории экологического мониторинга, на предприятия и в другие организации, занимающиеся рутинным определением биохимического потребления кислорода по стандартной 5-суточной методике. Длительный срок хранения сухого препарата (до 2 лет) значительно облегчит транспортировку биочувствительных элементов до конечного потребителя, а их низкая стоимость и простота нанесения позволят выполнять анализ в полевых условиях и в любое время, а также не будет требовать постоянной калибровки сенсора. Показано, что процесс лиофилизации не приводит к значительным изменениям метаболической активности микроорганизмов. БПК-биосенсоры на основе лиофилизированных микроорганизмов дают возможность анализировать образцы воды категории «чистая» и не уступают по основным характеристикам ранее разработанным аналогам. С применением лиофилизированных микроорганизмов можно определять индекс БПК проб воды с высокой корреляцией со стандартным методом. Таким образом, применение бактерий *P. yeei* и дрожжей *D. hansenii* в лиофилизированной форме в составе чувствительных элементов БПК-

биосенсоров даёт возможность использования их в прототипах опытных образцов биосенсорных анализаторов для серийного производства.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках государственного задания в области научной деятельности проект № FEWG-2024-0003 (Биокаталитические системы на основе клеток микроорганизмов, субклеточных структур и ферментов в сочетании с наноматериалами).

Литература

1. Jouanneau S., Recoules L., Durand M.J., Boukache A., Picot V., Primault Y., Lakel A., Sengelin., Barillon B., Thouand G. Methods for assessing biochemical oxygen demand (BOD): A review // Water research. 2014. V. 49. P. 62–82. doi: 10.1016/j.watres.2013.10.066
2. Arlyapov V.A., Yudina N.Y., Asulyan L.D., Alferov S.V., Alferov V.A., Reshetilov A.N. BOD biosensor based on the yeast *Debaryomyces hansenii* immobilized in poly(vinyl alcohol) modified by N-vinylpyrrolidone // Enzyme Microb. Technol. 2013. V. 53. No. 4. P. 257–262. doi: 10.1016/j.enzmictec.2013.05.004
3. Kamanina O., Arlyapov V., Rybochkin P., Lavrova D., Podsevalova E., Ponamoreva O. Application of organosilicate matrix based on methyltriethoxysilane, PVA and bacteria *Paracoccus yeei* to create a highly sensitive BOD // 3 Biotech. 2021. V. 11. No. 7. Article No. 331. doi: 10.1007/s13205-021-02863-z
4. Do M.H., Ngo H.H., Guo W., Chang S.W., Nguyen D.D., Liu Y., Varjani S., Kumar M. Microbial fuel cell-based biosensor for online monitoring wastewater quality: a critical review // Sci. Total Environ. 2020. V. 742. Article No. 135612. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.135612
5. Arlyapov V.A., Plekhanova Y.V., Kamanina O.A., Nakamura H., Reshetilov A.N. Microbial biosensors for rapid determination of biochemical oxygen demand: Approaches, tendencies and development prospects // Biosensors. 2022. V. 12. No. 10. Article No. 842. doi: 10.3390/bios12100842
6. Rojas-Villacorta W., Rojas-Flores S., De La Cruz-Noriega M., Chinchay Espino H., Diaz F., Gallozzo Cardenas M. Microbial biosensors for wastewater monitoring: Mini-review // Processes. 2022. V. 10. Article No. 2002. doi: 10.3390/pr10102002
7. Commault A.S., Weld R.J. Whole-cell biosensors for monitoring bioremediation // Biofilms in bioremediation: Current research and emerging technologies / Ed. G. Lear. Ch. 5. Caister Academic Press, 2016. P. 75–92. doi: 10.21775/9781910190296.05
8. Fang D., Gao G., Shen J., Yu Y., Zhi J. A reagentless electrochemical biosensor based on thionine wrapped *E. coli* and chitosan-entrapped carbon nanodots film modified glassy carbon electrode for wastewater toxicity

- assessment // *Electrochim. Acta*. 2016. V. 222. P. 303–311. doi: 10.1016/j.electacta.2016.10.174
9. Козлова Т.Н., Косаренина М.М., Юдина Н.Ю. Влияние негативных факторов среды на окислительную активность лиофилизированных бактерий *Paracoccus yeei* в составе БПК-биосенсора // *Известия ТулГУ. Естественные науки*. 2023. № 4. С. 67–75. doi: 10.24412/2071-6176-2023-4-67-75
10. Шемшединова Э.Ш., Абдураманова Э.Р., Морозкина Е.В., Кацев А.М. Люминесцентные цельноклеточные биосенсоры в детекции экотоксикантов (обзор) // *Теоретическая и прикладная экология*. 2020. № 2. С. 6–13. doi: 10.25750/1995-4301-2020-2-006-013
11. Abbas M., Adil M., Ehtisham-ul-Haque S., Munir B., Yameen M., Ghaffar A., Shar G.A., Tahir M.A., Iqbal M. *Vibrio fischeri* bioluminescence inhibition assay for ecotoxicity assessment: a review // *Sci. Total Environ*. 2018. V. 626. P. 1295–1309. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.01.066
12. Mohseni M., Abbaszadeh J., Maghool S.S., Chaichi M.J. Heavy metals detection using biosensor cells of a novel marine luminescent bacterium *Vibrio* sp. MM1 isolated from the Caspian Sea // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2018. V. 148. P. 555–560. doi: 10.1016/j.ecoenv.2017.11.002
13. Cho J.H., Gao Y., Ryu J., Choi S. Portable, disposable, paper-based microbial fuel cell sensor utilizing freeze-dried bacteria for *in situ* water quality monitoring // *ACS omega*. 2020. V. 5. No. 23. P. 13940–13947. doi: 10.1021/acsomega.0c01333
14. Arlyapov V.A., Kharkova A.S., Kurbanaliyeva S.K., Kuznetsova L.S., Machulin A.V., Tarasov S.E., Melnikov P.V., Ponamoreva O.N., Alferov V.A., Reshetilov A.N. Use of biocompatible redox-active polymers based on carbon nanotubes and modified organic matrices for development of a highly sensitive BOD biosensor // *Enzyme Microb. Technol.* 2021. V. 143. Article No. 109706. doi: 10.1016/j.enzmictec.2020.109706
15. Pasquarelli A. Bioreceptor immobilization // *Biosensors and Biochips. Learning Materials in Biosciences*. Cham: Springer, 2021. P. 161–184. doi: 10.1007/978-3-030-76469-2_7
16. Abla K.K., Mehanna M.M. Freeze-drying: A flourishing strategy to fabricate stable pharmaceutical and biological products // *Int. J. Pharm.* 2022. V. 628. Article No. 122233. doi: 10.1016/j.ijpharm.2022.122233
17. Arellano-Ayala K., Lim J., Yeo S., Bucheli J.E.V., Todorov S.D., Ji Y., Holzapfel W.H. Rehydration before application improves functional properties of lyophilized *Lactiplantibacillus plantarum* HAC03 // *Microorganisms*. 2021. V. 9. No. 5. Article No. 1013. doi: 10.3390/microorganisms9051013
18. Fonseca F., Marin M., Morris G.J. Stabilization of frozen *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* in glycerol suspensions: Freezing kinetics and storage temperature effects // *Appl. Environ. Microbiol.* 2006. V. 72. No. 10. P. 6474–6482. doi: 10.1128/AEM.00998-06
19. Crowe J.H., Carpenter J.F., Crowe L.M. The role of vitrification in anhydrobiosis // *Annu. Rev. Physiol.* 1998. V. 60. No. 1. P. 73–103. doi: 10.1146/annurev.physiol.60.1.73
20. Nahr F.K., Mokarram R.R., Hejazi M.A., Ghanbarzadeh B., Sowti Khiyabani M., Benis K.Z. Optimization of the nanocellulose based cryoprotective medium to enhance the viability of freeze dried *L. plantarum* using response surface methodology // *LWT – Food Science and Technology*. 2015. V. 64. No. 1. P. 326–332. doi: 10.1016/j.lwt.2015.06.004
21. Martos G.I., Minahk C.J., de Valdez G.F., Morero R. Effects of protective agents on membrane fluidity of freeze-dried *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* // *Lett. Appl. Microbiol.* 2007. V. 45. No. 3. P. 282–288. doi: 10.1111/j.1472-765X.2007.02188.x
22. Гусева Т.В., Молчанова Я.П., Заика Е.А., Виниченко В.Н., Аверочкин Е.М. Гидрохимические показатели состояния окружающей среды: Справочные материалы. М.: Международный социально-экологический союз, 2000. 148 с.
23. Renslow R.S., Babauta J.T., Majors P.D., Beyenal H. Diffusion in biofilms respiring on electrodes // *Energy Environ. Sci.* 2013. V. 6. No. 2. P. 595–607. doi: 10.1039/c2ee23394k
24. Swaminathan R., Chitra Devi M., Rajendran L., Venugopal K. Sensitivity and resistance of amperometric biosensors in substrate inhibition processes // *J. Electroanal. Chem.* 2021. V. 895. Article No. 115527. doi: 10.1016/j.jelechem.2021.115527
25. Jarque S., Bittner M., Blaha L., Hilscherova K. Yeast biosensors for detection of environmental pollutants: Current state and limitations // *Trends Biotechnol.* 2016. V. 34. No. 5. P. 408–419. doi: 10.1016/j.tibtech.2016.01.007
26. Arlyapov V.A., Yudina N.Y., Asulyan L.D., Kamanina O.A., Alferov S.V., Shumsky A.N., Machulin A.V., Alferov V.A., Reshetilov A.N. Registration of BOD using *Paracoccus yeei* bacteria isolated from activated sludge // *3 Biotech*. 2020. V. 10. No. 5. Article No. 207. doi: 10.1007/s13205-020-02199-0
27. Ponamoreva O.N., Afonina E.L., Kamanina O.A., Lavrova D.G., Arlyapov V.A., Alferov V.A., Boronin A.M. Yeast *Debaryomyces hansenii* within ORMOSIL shells as a heterogeneous biocatalyst // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2018. V. 54. No. 7. P. 736–742. doi: 10.1134/S0003683818070062
28. Chee G.J. Development and characterization of microbial biosensors for evaluating low biochemical oxygen demand in rivers // *Talanta*. 2013. V. 117. P. 366–370. doi: 10.1016/j.talanta.2013.09.031
29. Zhao L., He L., Chen S., Zou L., Zhou K., Ao X., Liu S., Hu X., Han G. Microbial BOD sensors based on Zr(IV)-loaded collagen fiber // *Enzyme Microb. Technol.* 2017. V. 98. P. 52–57. doi: 10.1016/j.enzmictec.2016.11.010
30. Liu L., Zhai J., Zhu C., Gao Y., Wang Y., Han Y., Dong S. One-pot synthesis of 3-dimensional reduced graphene

oxide-based hydrogel as support for microbe immobilization and BOD biosensor preparation // *Biosens. Bioelectron.* 2015. V. 63. P. 483–489. doi: 10.1016/j.bios.2014.07.074

31. Hu J., Gao G., Xia S. Development of a mediator-type bioelectrochemical sensor based on polypyrrole immobilized ferricyanide and microorganisms for biochemical oxygen demand fast detection // *Int. J. Electrochem. Sci.* 2015. V. 10. No. 11. P. 9695–9705.

32. Niyomdech S., Limbut W., Numnuam A., Asawatreratanakul P., Kanatharana P., Thavarungkul P. A novel BOD biosensor based on entrapped activated sludge in a porous chitosan-albumin cryogel incorporated with graphene and methylene blue // *Sens. Actuators B: Chem.* 2017. V. 241. P. 473–481. doi: 10.1016/j.snb.2016.10.102

33. Харькова А.С., Арляпов В.А., Туровкая А.Д., Автух А.Н., Стародумова И.П., Решетиллов А.Н. Медиаторный БПК-биосенсор на основе клеток микроорганизмов, выделенных из активного ила // *Прикладная биохимия и микробиология.* 2019. Т. 55. № 2. С. 199–209. doi: 10.1134/S0555109919010082

34. Hu J., Li Y., Gao G., Xia S. A mediated BOD biosensor based on immobilized *B. subtilis* on three-dimensional porous graphene-polypyrrole composite // *Sensors.* 2017. V. 17. No. 11. Article No. 2594. doi: 10.3390/s17112594

References

1. Jouanneau S., Recoules L., Durand M.J., Boukabache A., Picot V., Primault Y., Lakel A., Sengelin., Barillon B., Thouand G. Methods for assessing biochemical oxygen demand (BOD): A review // *Water research.* 2014. V. 49. P. 62–82. doi: 10.1016/j.watres.2013.10.066

2. Arlyapov V.A., Yudina N.Y., Asulyan L.D., Alferov S.V., Alferov V.A., Reshetilov A.N. BOD biosensor based on the yeast *Debaryomyces hansenii* immobilized in poly(vinyl alcohol) modified by N-vinylpyrrolidone // *Enzyme Microb. Technol.* 2013. V. 53. No. 4. P. 257–262. doi: 10.1016/j.enzmictec.2013.05.004

3. Kamanina O., Arlyapov V., Rybochkin P., Lavrova D., Podsevalova E., Ponamoreva O. Application of organosilicate matrix based on methyltriethoxysilane, PVA and bacteria *Paracoccus yeei* to create a highly sensitive BOD // *3 Biotech.* 2021. V. 11. No. 7. Article No. 331. doi: 10.1007/s13205-021-02863-z

4. Do M.H., Ngo H.H., Guo W., Chang S.W., Nguyen D.D., Liu Y., Varjani S., Kumar M. Microbial fuel cell-based biosensor for online monitoring wastewater quality: a critical review // *Sci. Total Environ.* 2020. V. 712. Article No. 135612. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.135612

5. Arlyapov V.A., Plekhanova Y.V., Kamanina O.A., Nakamura H., Reshetilov A.N. Microbial biosensors for rapid determination of biochemical oxygen demand: Approaches, tendencies and development prospects // *Biosensors.* 2022. V. 12. No. 10. Article No. 842. doi: 10.3390/bios12100842

6. Rojas-Villacorta W., Rojas-Flores S., De La Cruz-Noriega M., Chinchay Espino H., Diaz F., Gallozzo Cardenas M. Microbial biosensors for wastewater monitoring: Mini-review // *Processes.* 2022. V. 10. Article No. 2002. doi: 10.3390/pr10102002

7. Commault A.S., Weld R.J. Whole-cell biosensors for monitoring bioremediation // *Biofilms in bioremediation: Current research and emerging technologies* / Ed. G. Lear. Ch. 5. Caister Academic Press, 2016. P. 75–92. doi: 10.21775/9781910190296.05

8. Fang D., Gao G., Shen J., Yu Y., Zhi J. A reagentless electrochemical biosensor based on thionine wrapped *E. coli* and chitosan-entrapped carbon nanodots film modified glassy carbon electrode for wastewater toxicity assessment // *Electrochim. Acta.* 2016. V. 222. P. 303–311. doi: 10.1016/j.electacta.2016.10.174

9. Kozlova T.N., Kosarenina M.M., Yudina N.Yu. Influence of negative environmental factors on oxidative activity of lyophilized bacteria *Paracoccus yeei* in BOD biosensor composition // *Izvestiya Tul'skogo gosudarstvennogo universiteta. Yestestvennyye nauki.* 2023. No. 4. P. 67–75 (in Russian). doi: 10.24412/2071-6176-2023-4-67-75

10. Shemshedinova E.Sh., Abduramanova E.R., Morozkina E.V., Katsev A.M. Luminescent whole-cell biosensors in detection of environmental contaminants (review) // *Theoretical and Applied Ecology.* 2020. No. 2. P. 6–13 (in Russian). doi: 10.25750/1995-4301-2020-2-006-013

11. Abbas M., Adil M., Ehtisham-ul-Haque S., Munir B., Yameen M., Ghaffar A., Shar G.A., Tahir M.A., Iqbal M. *Vibrio fischeri* bioluminescence inhibition assay for ecotoxicity assessment: a review // *Sci. Total Environ.* 2018. V. 626. P. 1295–1309. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.01.066

12. Mohseni M., Abbaszadeh J., Maghool S.S., Chaichi M.J. Heavy metals detection using biosensor cells of a novel marine luminescent bacterium *Vibrio* sp. MM1 isolated from the Caspian Sea // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2018. V. 148. P. 555–560. doi: 10.1016/j.ecoenv.2017.11.002

13. Cho J.H., Gao Y., Ryu J., Choi S. Portable, disposable, paper-based microbial fuel cell sensor utilizing freeze-dried bacteria for *in situ* water quality monitoring // *ACS omega.* 2020. V. 5. No. 23. P. 13940–13947. doi: 10.1021/acsomega.0c01333

14. Arlyapov V.A., Kharkova A.S., Kurbanaliyeva S.K., Kuznetsova L.S., Machulin A.V., Tarasov S.E., Melnikov P.V., Ponamoreva O.N., Alferov V.A., Reshetilov A.N. Use of biocompatible redox-active polymers based on carbon nanotubes and modified organic matrices for development of a highly sensitive BOD biosensor // *Enzyme Microb. Technol.* 2021. V. 143. Article No. 109706. doi: 10.1016/j.enzmictec.2020.109706

15. Pasquarelli A. Bioreceptor immobilization // *Biosensors and Biochips. Learning Materials in Biosciences.* Cham: Springer, 2021. P. 161–184. doi: 10.1007/978-3-030-76469-2_7

16. Abla K.K., Mehanna M.M. Freeze-drying: A flourishing strategy to fabricate stable pharmaceutical and biological products // *Int. J. Pharm.* 2022. V. 628. Article No. 122233. doi: 10.1016/j.ijpharm.2022.122233
17. Arellano-Ayala K., Lim J., Yeo S., Bucheli J.E.V., Todorov S.D., Ji Y., Holzapfel W.H. Rehydration before application improves functional properties of lyophilized *Lactiplantibacillus plantarum* HAC03 // *Microorganisms*. 2021. V. 9. No. 5. Article No. 1013. doi: 10.3390/microorganisms9051013
18. Fonseca F., Marin M., Morris G.J. Stabilization of frozen *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* in glycerol suspensions: Freezing kinetics and storage temperature effects // *Appl. Environ. Microbiol.* 2006. V. 72. No. 10. P. 6474–6482. doi: 10.1128/AEM.00998-06
19. Crowe J.H., Carpenter J.F., Crowe L.M. The role of vitrification in anhydrobiosis // *Annu. Rev. Physiol.* 1998. V. 60. No. 1. P. 73–103. doi: 10.1146/annurev.physiol.60.1.73
20. Nahr F.K., Mokarram R.R., Hejazi M.A., Ghanbarzadeh B., Sowti Khyabani M., Benis K.Z. Optimization of the nanocellulose based cryoprotective medium to enhance the viability of freeze dried *L. plantarum* using response surface methodology // *LWT – Food Science and Technology*. 2015. V. 64. No. 1. P. 326–332. doi: 10.1016/j.lwt.2015.06.004
21. Martos G.I., Minahk C.J., de Valdez G.F., Morero R. Effects of protective agents on membrane fluidity of freeze-dried *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* // *Lett. Appl. Microbiol.* 2007. V. 45. No. 3. P. 282–288. doi: 10.1111/j.1472-765X.2007.02188.x
22. Guseva T.V., Molchanova Ya.P., Zaika E.A., Vinichenko V.N., Averochkin E.M. Hydrochemical indicators of environmental conditions: Reference materials. Moskva: Mezhdunarodnyy sotsialno-ekologicheskii soyuz, 2000. 148 p. (in Russian).
23. Renslow R.S., Babauta J.T., Majors P.D., Beyenal H. Diffusion in biofilms respiring on electrodes // *Energy Environ. Sci.* 2013. V. 6. No. 2. P. 595–607. doi: 10.1039/c2ee23394k
24. Swaminathan R., Chitra Devi M., Rajendran L., Venugopal K. Sensitivity and resistance of amperometric biosensors in substrate inhibition processes // *J. Electroanal. Chem.* 2021. V. 895. Article No. 115527. doi: 10.1016/j.jelechem.2021.115527
25. Jarque S., Bittner M., Blaha L., Hilscherova K. Yeast biosensors for detection of environmental pollutants: Current state and limitations // *Trends Biotechnol.* 2016. V. 34. No. 5. P. 408–419. doi: 10.1016/j.tibtech.2016.01.007
26. Arlyapov V.A., Yudina N.Y., Asulyan L.D., Kamanina O.A., Alferov S.V., Shumsky A.N., Machulin A.V., Alferov V.A., Reshetilov A.N. Registration of BOD using *Paracoccus yeei* bacteria isolated from activated sludge // *3 Biotech.* 2020. V. 10. No. 5. Article No. 207. doi: 10.1007/s13205-020-02199-0
27. Ponamoreva O.N., Afonina E.L., Kamanina O.A., Lavrova D.G., Arlyapov V.A., Alferov V.A., Boronin A.M. Yeast *Debaryomyces hansenii* within ORMOSIL shells as a heterogeneous biocatalyst // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2018. V. 54. No. 7. P. 736–742. doi: 10.1134/S0003683818070062
28. Chee G.J. Development and characterization of microbial biosensors for evaluating low biochemical oxygen demand in rivers // *Talanta*. 2013. V. 117. P. 366–370. doi: 10.1016/j.talanta.2013.09.031
29. Zhao L., He L., Chen S., Zou L., Zhou K., Ao X., Liu S., Hu X., Han G. Microbial BOD sensors based on Zr(IV)-loaded collagen fiber // *Enzyme Microb. Technol.* 2017. V. 98. P. 52–57. doi: 10.1016/j.enzmictec.2016.11.010
30. Liu L., Zhai J., Zhu C., Gao Y., Wang Y., Han Y., Dong S. One-pot synthesis of 3-dimensional reduced graphene oxide-based hydrogel as support for microbe immobilization and BOD biosensor preparation // *Biosens. Bioelectron.* 2015. V. 63. P. 483–489. doi: 10.1016/j.bios.2014.07.074
31. Hu J., Gao G., Xia S. Development of a mediator-type bioelectrochemical sensor based on polypyrrole immobilized ferricyanide and microorganisms for biochemical oxygen demand fast detection // *Int. J. Electrochem. Sci.* 2015. V. 10. No. 11. P. 9695–9705.
32. Niyomdech S., Limbut W., Numnuam A., Asawatreratanakul P., Kanatharana P., Thavarungkul P. A novel BOD biosensor based on entrapped activated sludge in a porous chitosan-albumin cryogel incorporated with graphene and methylene blue // *Sens. Actuators B: Chem.* 2017. V. 241. P. 473–481. doi: 10.1016/j.snb.2016.10.102
33. Kharkova A.S., Arlyapov V.A., Turovskaya A.D., Avtukh A.N., Starodumova I.P., Reshetilov A.N. A mediated BOD biosensor based on microbial cells isolated from activated sludge // *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya*. 2019. V. 55. No 2. P. 199–208 (in Russian). doi: 10.1134/S0555109919010082
34. Hu J., Li Y., Gao G., Xia S. A mediated BOD biosensor based on immobilized *B. subtilis* on three-dimensional porous graphene-polypyrrole composite // *Sensors*. 2017. V. 17. No. 11. Article No. 2594. doi: 10.3390/s17112594