

Міністерство освіти і науки України
Національний університет водного господарства та
природокористування

Навчально-науковий інститут будівництва, архітектури та дизайну
Кафедра водопостачання, водовідведення та бурової справи

03-06-188М

МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ

до лабораторних робіт
з навчальної дисципліни «Біотехнологічні та біоенергетичні об'єкти
і технології, організація виробництва та управління процесами»
для здобувачів вищої освіти другого (магістерського) рівня
за освітньо-професійною програмою
«Біотехнології» спеціальності G21 «Біотехнології та біоінженерія»
денної форми навчання

Рекомендовано
науково-методичною радою
з якості ННІБАД
Протокол № 2 від 21.10.2025 р.

Рівне – 2025

Методичні вказівки до лабораторних робіт з навчальної дисципліни «Біотехнологічні та біоенергетичні об'єкти і технології, організація виробництва та управління процесами» для здобувачів вищої освіти другого (магістерського) рівня за освітньо-професійною програмою «Біотехнології» спеціальності G21 «Біотехнології та біоінженерія» денної форми навчання [Електронне видання] / Грицина О. О. – Рівне : НУВГП, 2025. – 34 с.

Укладач: Грицина О. О., к.т.н., доцент кафедри водопостачання, водовідведення та бурової справи.

Відповідальний за випуск: Мартинов С. Ю., д.т.н., професор, завідувач кафедри водопостачання, водовідведення та бурової справи.

Керівник групи забезпечення
спеціальності

G21 «Біотехнології та біоінженерія»

Грицина О. О.

© О. О. Грицина, 2025

© НУВГП, 2025

З М І С Т

Вступ.....	4
Лабораторна робота №1. Виділення та ідентифікація мікроорганізмів із природного зразка.....	5
Лабораторна робота №2. Оптимізація поживного середовища для росту бактеріальної культури.....	10
Лабораторна робота №3. Культивування та іммобілізація клітин у матриці агар-гелю або альгінату.....	16
Лабораторна робота №4. Прості методи виділення та первинного очищення білка: осадження і діаліз.....	22
Лабораторна робота №5. Швидкий аналіз цільового продукту: визначення ферментної активності або агар-дифузійний тест.....	28
Рекомендована література.....	33

Вступ

Ці методичні вказівки призначені для здобувачів вищої освіти другого (магістерського) рівня денної форми навчання за освітньо-професійною програмою «Біотехнології» (спеціальність G21 «Біотехнології та біоінженерія»). Вказівки забезпечують уніфіковану методичну базу для проведення лабораторних робіт із дисципліни «Біотехнологічні та біоенергетичні об'єкти і технології, організація виробництва та управління процесами», поєднуючи теоретичні основи, стандартизовані експериментальні протоколи, метрологічні вимоги й інструкції з техніки безпеки.

Мета видання - сформувати у майбутніх магістрів практичні компетенції, необхідні для ефективного виконання прикладних біотехнологічних завдань: від виділення і культивування біологічного матеріалу до контролю якості та первинного очищення цільових продуктів. Особлива увага приділена реалізації програмної компетентності ПР07: виділенню, ідентифікації, зберіганню, культивуванню та іммобілізації біологічних агентів, оптимізації поживних середовищ і вибору адекватних аналітичних та технологічних методів.

Кожна лабораторна робота структурована так, щоб забезпечити відтворюваність і навчальну послідовність: мета і очікувані результати, коротка теоретична довідка, перелік обладнання й реагентів, детальний покроковий протокол із вказівкою обсягів, концентрацій, температури й часу, контрольні питання, критерії оцінювання та вимоги до оформлення звіту. Така побудова сприяє активному формуванню навичок планування експерименту, метрологічної фіксації даних і статистичної обробки результатів.

Методичні вказівки інтегрують сучасні стандарти й рекомендації (зокрема вимоги метрології, міжнародні настанови CLSI/EUCAST там, де доречно) та підкреслюють необхідність використання контрольних зразків, калібрувальних кривих і реплік для валідації результатів.

Послідовне застосування вказівок сприятиме розвитку критичного мислення, аналітичних навичок і здатності приймати обґрунтовані технологічні рішення в галузі біотехнології та біоенергетики.

Лабораторна робота №1. Виділення та ідентифікація мікроорганізмів із природного зразка.

Мета.

Сформувати практичні навички виділення та орієнтовної ідентифікації мікроорганізмів із природних зразків; навчити застосовувати асептичну техніку, стандартизувати параметри експерименту, проводити процедурні контролю та контроль стерильності середовища та оформлювати звіт відповідно до вимог.

Перелік обладнання та матеріалів.

Обладнання:

- Ламінарний бокс або спиртівка/газовий пальник для локального стерильного поля.
- Світловий мікроскоп (об'єктиви $\times 40$, $\times 100$, імєрсія).
- Автоклав; термостат/інкубатор (25–37 °C).
- Настільна центрифуга (за потреби).
- Аналітичні ваги; мірний посуд (мірні циліндри, колби, пробірки).
- Піпетки (мл, μl) та стерильні наконечники.
- Імерсійна олія, предметні й покривні скельця.

Матеріали та витратні засоби:

- Стерильні чашки Петрі, пробірки з кришками, одноразові/металеві петлі.
- Стерильні скляні палички, ватні тампони, маркери, етикетки.
- Поживні середовища (рецептури в додатку, одиниці $\text{г} \cdot \text{л}^{-1}$).
- Барвники: метиленовий синій; реактиви для фарбування за Грамом.
- Дезінфектанти: 70% етиловий спирт; розчин гіпохлориту натрію 0,5–1,0% для знезараження.
- ЗІЗ: халат, рукавички, захисні окуляри; маска за потреби.
- Контейнери для біологічних відходів.

Коротка теоретична довідка.

- Методи виділення: фільтрація (для води/повітря), седиментація, гомогенізація та серійні десяткові розведення (для ґрунту, харчових зразків, рослин).
- Ідентифікація: морфологія клітин (коки, бацили тощо),

культуральні ознаки колоній (форма, розмір, колір, поверхня, край, консистенція, прозорість), базові біохімічні тести; молекулярні методи (ПЛР, 16S) - теоретично для курсу.

- Асептика: базова вимога для зменшення контамінації; необхідні контролі стерильності та процедурні контролі.

Хід виконання:

1. Підготовка робочого місця та ЗІЗ:

- Обробити робочу поверхню 70% етиловим спиртом; надягти халат, рукавички, захисні окуляри; прибрати волосся.

- Підготувати (докладніше нижче): контроль стерильності середовища (негативний/blank), позитивний контроль (штам контроль), процедурний контроль стерильності маніпуляцій.

2. Відбір і підготовка зразка:

- Для твердих зразків: приблизно 1 г матеріалу + 9 мл дистильованої води → розведення 10^{-1} ; гомогенізувати; при потребі готувати подальші десяткові розведення (10^{-2} , 10^{-3} тощо).

- Для води: фільтрувати відомий об'єм (наприклад 100 мл) через стерильний мембранний фільтр; переносити фільтр на агар або розводити фільтрат і висівати.

3. Підготовка середовищ і стерилізація:

- Рецептури вказувати в $\text{г} \cdot \text{л}^{-1}$; контролювати pH і зафіксувати його в журналі.

- Автоклав: 121 °C при 15 psi надлишкового тиску ($\approx 2,03$ атм. абсолютного) протягом 15–20 хв для стандартних об'ємів; для більших об'ємів подовжити час.

- Сухожар для скляного посуду: 160–170 °C, 1–2 год за умови сумісності предмета.

- Термолабільні компоненти фільтрувати і додавати після автоклавовання.

4. Посіви:

- Розливати середовище під ламінарним боксом або на чистій поверхні, охолоджувати до $\approx 45\text{--}50$ °C перед додаванням термолабільних компонентів.

- Стерилізувати петлю в полум'ї, дати охолонути; набирати інокулят.

- Виконувати посів методом штриха для ізоляції колоній або наносити визначений об'єм (наприклад 100 μl) розведень для підрахунку КУО.

- Пронумерувати чашки, фіксувати розведення, дату, оператора.

5. Інкубація:

- Розмістити чашки в інкубаторі, захистити від висихання (вологий контейнер).

- Орієнтовні умови: *E. coli* - 37 °C (12–24 год); дріжджі - 25–30 °C (24–48 год); *Lactobacillus* - 35–37 °C (24–48 год). Стандартний інтервал спостереження 24–72 год, при потребі продовжити до 96 год.

- Фіксувати щоденно вигляд і кількість колоній.

6. Опис і ізоляція колоній:

- Опис: форма, діаметр (мм), колір, поверхня, край, прозорість.

- Ізоляція: повторне штрихування чистих колоній на свіжому агарі.

7. Мікроскопія:

- Готувати нативний (нефарбований) та пофарбований мазок (метиленовим синім або за Грамом).

- Огляд при $\times 40$ і $\times 100$ (іммерсія); описувати форму, розташування, наявність спор/капсул/рухливості.

- Для кількісних робіт вимірювати OD600; орієнтири: OD600 $\approx$ 0.05–0.1 для інокуляції; OD600 > 0.8 $\rightarrow$ розведення перед подальшими вимірюваннями.

8. Контроль:

- Контроль стерильності середовища (негативний контроль / blank control): чашка Петрі або пробірка з розлитим середовищем, що не інокульована; призначена для перевірки стерильності середовища та процесу розливу. Виконувати паралельно з підготовкою середовищ.

- Позитивний контроль (growth control): чашка або пробірка інокульована стандартним штамом з відомою здатністю до росту (перевірка працездатності середовища та умов інкубації). Виконувати під час інкубації експериментальних зразків.

- Процедурний контроль стерильності маніпуляцій (procedural control): посів стерильною петлею/наконечником без інокуляту на агар (перевірка стерильності техніки оператора). Виконувати під час посівів.

- У звіті вносити результати кожного контролю в окремий

рядок таблиці; при позитивному рості в негативному або процедурному контролі - вважати експеримент скомпрометованим і описати подальші дії.

9. Дезінфекція та утилізація:

- Одноразові матеріали - у біоконтейнери; перед викиданням - обробка 0,5–1,0% розчином гіпохлориту натрію 30 хв або автоклавування 121 °C 15–20 хв.

- Скляні інструменти - автоклав/сухожаровий шафі.

- Обробити робочі поверхні 70% спиртом; ретельно вимити руки.

- Несанкціонований винос матеріалів за межі лабораторії - заборонено.

Параметри, точності та статистика:

- Одиниці: рецептури - $\text{г} \cdot \text{л}^{-1}$; об'єми - $\text{мл} / \mu\text{л}$; концентрації - % (мас./об.).

- Інокулят: стандартизувати при потребі через OD_{600} або $\text{КУО} \cdot \text{мл}^{-1}$ (орієнтир 106–107 $\text{КУО} \cdot \text{мл}^{-1}$ або $\text{OD}_{600} \approx 0.05$ при інокуляції 1–5 % v/v). Обов'язково зазначити метод стандартизації в звіті.

- Повтори: мінімум 3 біологічні повтори для кількісних результатів; технічні повтори за потреби. Статистика: середнє $\pm \text{SD}$; вказувати тести (ANOVA, t-test) і рівень значущості (наприклад $p < 0.05$).

Оформлення звіту:

1. Титульна сторінка (заклад, кафедра, назва роботи, прізвище та ініціали студента, група, дата, підпис викладача).

2. Тема й мета.

3. Матеріали та обладнання (уточнені рецептури з одиницями).

4. Короткі теоретичні відомості.

5. Методика (послідовний опис з об'ємами, температурами, часами, розведеннями).

6. Результати: таблиці сирих даних (включно з контролем), графіки, фото документація/замальовки колоній, приклади розрахунків ($\text{КУО} \cdot \text{мл}^{-1}$).

7. Обговорення та інтерпретація (включно з аналізом контролів).

8. Висновки та рекомендації.

9. Відповіді на контрольні питання.

10. Дата, підпис.

Очікувані результати:

- Уміння виконувати серійні розведення і отримувати ізольовані колонії.

- Навички підготовки і фарбування мікроскопічних мазків.

- Вміння фіксувати та інтерпретувати результати з урахуванням контролів.

Оцінювання (коротко):

- 2,0 бали - відмінно (95–100 %): повне володіння теорією, коректне виконання, зразкове оформлення та захист.

- 1,5–1,9 бали - добре (85–94 %).

- 1,0–1,4 бали - задовільно (65–84 %).

- 0–0,9 бали - незадовільно (<65 % або несвоєчасна робота).

Шаблон таблиці результатів (рядки для контролів обов'язкові)

- Зразок | Розведення | Склад середовища ($\text{г} \cdot \text{л}^{-1}$) | Інкубація (Т, h) | Кількість колоній | КУО $\cdot \text{мл}^{-1}$ | Опис колоній | Контроль (тип) | Примітки

Чек-лист перед початком:

- Надіти ЗІЗ; маркування посуду; підготовлені негативний/позитивний/процедурний контролі; перевірена стерильність інструментів і середовищ; журнал.

Лабораторна робота №2. Оптимізація поживного середовища для росту бактеріальної культури.

Мета.

Сформувати в студентів-магістрів спеціальності G21 Біотехнології та біоінженерія практичні навички підбору й модифікації поживних середовищ з урахуванням біологічних властивостей бактерій; оволодіти методами визначення компонентів та концентрацій середовищ; набуті вмінь оцінювати ріст культури й аналізувати ефективність модифікацій.

Перелік обладнання та матеріалів.

Обладнання:

- Скляний і пластмасовий посуд: пробірки, колби, мірні мензурки, чашки Петрі.
- Мікропіпетки та градуйовані піпетки.
- Інкубатор/термостат для підтримання сталої температури.
- Автоклав для стерилізації середовищ, посуду й інструментів (121 °C при 15 psi надлишкового тиску).
- рН метр.
- Магнітна мішалка і/або нагрівальна плита.
- Лабораторні ваги.
- Стерильні інструменти: бактеріологічні петлі, шпателі, Пастерівські піпетки.
- Ламінарна шафа або спиртівка для асептичних процедур.
- Шейкер для рідких культур (180–250 rpm).

Матеріали та реагенти:

- Стерильна дистильована вода.
- Поживні середовища (МПБ, МПА, агар Сабуро, агар МакКонкі тощо).
- Компоненти для приготування середовищ: агар; пептон; дріжджовий екстракт; м'ясний екстракт; глюкоза; NaCl; мінеральні солі K_2HPO_4 , $MgSO_4$, $CaCl_2$.
- Буферні розчини (фосфатний буфер, Tris).
- Термолабільні компоненти (вітаміни, фактори росту) для додавання після стерилізації.
- Стерильні фільтри, ватно-марлеві пробки.
- Робочі штами та контрольні культури.
- Маркувальні засоби і журнал для фіксації результатів.

- Розчини для дезінфекції: 70% етиловий спирт; розчини на основі натрію гіпохлориту згідно з локальними інструкціями.

- Засоби індивідуального захисту: халат, рукавички, окуляри, маска.

- Контейнери для безпечної утилізації біовідходів.

Теоретична довідка.

Роль поживного середовища.

Поживне середовище забезпечує бактерію джерелами вуглецю, азоту, мінералів, вітамінів та буферною ємністю для підтримки оптимального рН; ці чинники визначають швидкість росту, активність ферментів і продуктивність процесу.

Класифікація середовищ:

- Природні - невизначений склад.
- Напівсинтетичні - частково визначені.
- Синтетичні - хімічно визначені.
- За функцією - збагачувальні, селективні, диференціальні.

Основні компоненти та типові концентрації:

- Джерела вуглецю: глюкоза $5\text{--}20 \text{ г}\cdot\text{л}^{-1}$ (0.5–2.0% w/v); лактоза; гліцерин.

- Джерела азоту: пептон $5\text{--}15 \text{ г}\cdot\text{л}^{-1}$; дріжджовий екстракт $2\text{--}10 \text{ г}\cdot\text{л}^{-1}$; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ за потреби.

- Мінеральні солі: NaCl $5\text{--}10 \text{ г}\cdot\text{л}^{-1}$ (залежно від середовища), K_2HPO_4 $1\text{--}5 \text{ г}\cdot\text{л}^{-1}$, MgSO_4 $0.2\text{--}1 \text{ г}\cdot\text{л}^{-1}$.

- Агар: $15\text{--}20 \text{ г}\cdot\text{л}^{-1}$ (1.5–2.0% w/v).

- Буфери: фосфатний буфер для стабілізації рН.

Модель росту.

Фази росту: лаг, експоненціальна, стаціонарна, фаза загибелі; впливають субстратна доступність, C:N співвідношення, рН, температура і аерація.

Методи оптимізації:

- Однофакторний підхід: зміна одного фактора при фіксації інших.

- Плановані експерименти: повні факторні плани, Box–Behnken, центральні композиційні плани.

- Статистичний аналіз і моделювання (ANOVA, мінімум 3 біологічні повтори).

Хід виконання:

Планування експерименту:

12). 1. Вибір об'єкта: вказати штам (наприклад *Escherichia coli* K

2. Аналіз вимог штаму: температура, рН, потреба в кисні.

3. Формулювання цілей: критерії оптимізації (щільність біомаси, КУО·мл⁻¹, концентрація цільового метаболіту).

Підготовка і стерилізація:

1. Миття посуду мильним розчином, промивка дистильованою водою, сушка.

2. Стерилізація:

о Автоклавування середовищ і термостійкого посуду - 121 °С при 15 psi надлишкового тиску, орієнтовно 15–20 хв після виходу у робочий режим; для більших об'ємів збільшити час.

о В сухожаровій шафі стерилізація скляного посуду - 160–170 °С, 1–2 год залежно від предмета.

о Термолабільні компоненти - стерилізація фільтрацією; додавати після автоклавування.

3. Підготовка ватно-марлевих пробок і маркування посуду.

Приготування базового середовища:

1. Відміряти компоненти з уніфікованими одиницями (г·л⁻¹ або % w/v).

2. Розчинити у стерильній дистильованій воді.

3. Виміряти й при необхідності відрегулювати рН NaOH або HCl до цільового значення для обраного штаму.

4. Додати агар для твердих середовищ, розчинити, розлити у флакони, автоклавувати (121 °С, 15 psi, 15–20 хв), охолодити до 45–50 °С і лише тоді розлити у стерильні чашки Петрі/пробірки.

Контрольні посіви:

• Контроль стерильності середовища (негативний контроль/blank) - середовище без інокуляту для перевірки стерильності розливу.

• Процедурний контроль стерильності маніпуляцій - посів стерильною петлею/наконечником без інокуляту.

• Позитивний контроль (growth control) - середовище інокульоване стандартним штамом (перевірка працездатності середовища і умов інкубації).

Записувати результати кожного контролю окремо; при рості в негативному або процедурному контролі вважати експеримент скомпрометованим.

Модифікація середовища (етап оптимізації):

1. Сформувати експериментальний план: варіанти з різними концентраціями глюкози, пептону, солей, додаванням факторів росту тощо.

2. Готувати кожну комбінацію окремо; фіксувати склад, партію реактивів і умови у журналі.

3. Розливати варіанти в стерильний посуд і промарковувати.

Посів і інкубація:

1. Підготувати інокулят: одноденна культура або стандартизований інокулят; при потребі стандартизувати через OD600 або КУО·мл⁻¹ (орієнтир інокуляції: OD600 ≈ 0.05–0.1 або 1–5% v/v залежно від задачі).

2. Інокуляція в ламінарній шафі або над полум'ям, дотримуючись асептики.

3. Інкубація: *E. coli* - 37 °C (12–24 год); *Lactobacillus* - 35–37 °C (24–48 год); для повільноростучих/спороутворюючих - до 72 год.

4. Аерація для рідких культур на шейкері 180–250 rpm; ratio робочого об'єму до загального об'єму колби не більше 1:5.

Оцінка росту та збір даних:

- Візуальна оцінка: мутність рідких середовищ, морфологія колоній.

- Кількісна оцінка:

- о OD600 спектрофотометрично; лінійний діапазон приблизно 0.05–0.8; при OD600>0.8 робити розведення і корекцію.

- о Підрахунок КУО: серійні розведення і висів на тверде середовище; результати в КУО·мл⁻¹.

- о Визначення цільових метаболітів методами HPLC, біохімічними тестами тощо.

- Фіксація часу зняття показників, температури, умов аерації та номера партії середовищ.:

Статистична обробка

- Не менше 3 біологічних повторів на варіант.

- Розрахунок середнього, стандартного відхилення; порівняння груп ANOVA або t test при p<0.05.

- Візуалізація: графіки OD600 vs час, стовпчикові діаграми КУО, теплові карти для багатовимірних планів.

Оформлення лабораторного звіту:

Структура: титульна сторінка; тема й мета; обладнання та матеріали; теоретична частина; методика; результати (таблиці, графіки, фото); статистичний аналіз; обговорення; висновки; відповіді на контрольні питання; заходи безпеки й утилізація; журнал спостережень; підписи й дати.

Контрольні питання:

- Які основні компоненти поживного середовища і їх функції?

- Як впливає співвідношення вуглецю й азоту на ріст?
- Які методи оптимізації складу середовища і їхні переваги/недоліки?

- Чому необхідна стерилізація середовища й інструментів?
- Які фази росту бактеріальної популяції і як їх враховувати при плануванні експерименту?

- Які фактори можуть призвести до контамінації?
- Якими методами проводять кількісну оцінку росту мікроорганізмів?

- Як діяти при відсутності росту в усіх варіантах середовища?

- Які правила безпеки обов'язкові при роботі з бактеріями?
- Як оформити експериментальні дані у звіті?

Очікувані результати:

- Якісні й кількісні дані щодо росту на різних варіантах середовищ.

- Визначення оптимального складу поживного середовища для обраного штаму з підкріпленням статистикою.

- Набуття навичок приготування середовищ, стерилізації, інокуляції та оцінки росту.

- Опанування протоколів безпеки й асептичної техніки.

- Уміння вести лабораторний журнал та готувати структурований звіт.

Заходи безпеки та утилізація:

- Працювати в лабораторному халаті, рукавичках й окулярах; дотримуватися правил BSL відповідно до обраного штаму.

- Асептична техніка обов'язкова; критичні маніпуляції виконувати в ламінарній шафі.

- Ретельна дезінфекція робочих поверхонь 70% етиловим

спиртом до та після роботи.

- Біоматеріали утилізувати в спеціальні контейнери; автоклавувати або дезінфікувати 0.5–1.0% розчином гіпохлориту перед остаточною утилізацією згідно внутрішніх правил.
- Негайне повідомлення викладача або лаборанта про розливи та нещасні випадки; діяти за встановленим аварійним протоколом.

Можливі труднощі і рекомендації:

- Контамінація: регулярно виконувати контроль стерильності («пусті» посіви), тренувати асептичні прийоми.
- Неправильний склад: уніфікувати одиниці, готувати контрольні рецепти.
- Порушення режиму інкубації: контролювати температуру, рН та аерацію.
- Накопичення токсичних продуктів: планувати точки збору даних до і після стаціонарної фази.
- Неадекватний інокулят: перевіряти життєздатність і початкову концентрацію перед інокуляцією.

Оцінювання (коротко):

- 2,0 бали - відмінно (95–100 %): повне володіння теорією, коректне виконання, зразкове оформлення та захист.
- 1,5–1,9 бали - добре (85–94 %).
- 1,0–1,4 бали - задовільно (65–84 %).
- 0–0,9 бали - незадовільно (<65 % або несвоєчасна робота).

Шаблон таблиці для результатів:

- Назва зразка | Склад середовища ($\text{г} \cdot \text{л}^{-1}$) | Розведення | Інкубація (Т, h) | OD600 (часи) | КУО $\cdot \text{мл}^{-1}$ | Контроль (тип) | Примітки

Мінімальні вимоги до статистики:

- Мінімум 3 біологічні повтори; вказувати середнє $\pm$ SD; при порівнянні груп застосовувати ANOVA або t test; рівень значущості $p < 0.05$.

Лабораторна робота №3. Культивування та іммобілізація клітин у матриці агар-гелю або альгінату.

Мета.

- Навички: Сформувати вміння культивувати клітини у гелевих матрицях (агар-гелі, альгінаті) та виконувати їх іммобілізацію для біотехнологічних застосувань.
- Ознайомлення: Представити класичні та сучасні методи іммобілізації клітин різних типів (мікроорганізми, рослинні, тваринні).
- Аналіз: Підготувати до оцінювання ефективності методик у наукових, виробничих та біоенергетичних технологіях.

Обладнання, матеріали та реактиви:

- Лабораторний посуд: Колби (100, 250, 500 мл), мірні циліндри, чашки Петрі, пробірки, склянки, флакони; градуйовані піпетки, піпетки Пастера; ватно-марлеві пробки, шпателі, фільтрувальний папір, марля.
- Інструменти: Стерильні пінцети, ножиці, скальпелі, інокуляційні петлі/голки; магнітна мішалка, автоклав, сушильна шафа, термостат, ламінарна шафа, спиртівка, мікроскоп.
- Обладнання: Центрифуга; мембранні фільтри 0.22 мкм для стерилізації; CO₂ інкубатор; за наявності - ферментери.
- Хімічні реагенти: Стерильна дистильована/деіонізована вода; фізіологічний розчин; дезінфектанти (70% етанол, хлорвмісні засоби); агар агар; натрій альгінат; хлорид кальцію (CaCl₂); глюкоза/сахароза; поживні середовища (МС - Murashige & Skoog, 199, DMEM, LB тощо); буфери (розчин Хенкса); мікробіологічний бульйон; фітогормони (2,4 D, NAA, BAP - для рослинних клітин).
- Біологічний матеріал: Клітини рослин (калус/експланти), тваринні клітини (адгезивні/суспензійні), мікроорганізми (дріжджі, бактерії).
- Безпека: ЗІЗ (халат, рукавички, окуляри); засоби дезінфекції для поверхонь та інструментів.

Теоретична довідка.

- *In vitro* культивування: Кероване вирощування клітин поза організмом для досліджень, виробництва біоактивних речовин, біофармацевтики.

- Гелеві матриці - це полімерні структури, які забезпечують адгезію та ріст клітин, підтримують транспорт поживних речовин і газів, стабілізують ключові параметри (рН, осмотичний тиск, температуру) та створюють тривимірну (3D-) архітектуру середовища.

- Агар-агар: Природний полісахарид із червоних водоростей; інертний, термостабільний, придатний переважно для мікроорганізмів і рослинних клітин (калус).

- Натрій альгінат - похідна альгінової кислоти (отримується з бурих водоростей); утворює гель при іонному зшиванні з кальцієм (Ca^{2+}); біосумісний і нетоксичний полімер, придатний для інкапсуляції мікроорганізмів, а також рослинних і тваринних клітин за контрольованих умов зшивання.

- Імобілізація клітин: Фізичне закріплення клітин у гелі для збереження життєздатності/каталітичної активності та повторного використання; переваги - стабільність, захист, контроль ферментації, можливість циклічного застосування.

Хід виконання:

1. Культивування клітин в агар гелі (переважно мікроорганізми, рослинні клітини)

- Підготовка агар гелю:

- о Концентрація: 1.5–2.0% (мас./об.) для мікроорганізмів; 0.7–1.2% для м'яких рослинних матриць (калус/експланти).

- о Розчинення: у воді/середовищі (MC, DMEM, LB) при нагріванні до повного розчинення (~100 °C) з перемішуванням.

- о Охолодження: до 45–50 °C; термолабільні компоненти (вітаміни, фітогормони, антибіотики - за протоколом) додавати стерильно після охолодження.

- Стерилізація і розлив:

- о Автоклавування агару у флаконах (121 °C, 15–20 хв); розлив у стерильні чашки Петрі в ламінарній шафі; дати застигнути при кімнатній температурі.

- Посів клітин:

- о Підготовка суспензії: у стерильних умовах (для мікроорганізмів - стандартний інокулят; для рослинних - дисоціація тканин, асептика).

- о Інокуляція: орієнтовно $10^4 - 10^6$ клітин·мл⁻¹ (залежно від завдання). Для мікроорганізмів можливе інкапсулювання у

напівохолоджений агар ($\approx 40\text{--}45\text{ }^{\circ}\text{C}$), що ще залишається рідким, але вже не шкодить життєздатності клітин.; для тваринних/рослинних клітин - лише на застиглий гель або у холодні матриці.

- Інкубація:
 - о Бактерії/дріжджі: $28\text{--}37\text{ }^{\circ}\text{C}$; рослинні клітини: $25\text{--}28\text{ }^{\circ}\text{C}$ (темне/світле - за протоколом); тваринні клітини - не рекомендується в агарі через термічні/адгезивні обмеження.

- Спостереження:
 - о Макро/мікроскопія: утворення колоній, морфологія, колір, прозорість; документування в журналі з фото/замальовками.

2. Імобілізація клітин в альгінаті (інкапсуляція різних типів клітин):

- Підготовка розчину альгінату натрію:
 - о Концентрація: $1.5\text{--}2.0\%$ (мас./об.) типово; діапазон $1.0\text{--}4.0\%$ залежно від потрібної механіки/дифузії.
 - о Розчинення: у стерильній воді з ретельним перемішуванням; уникати бульбашок.

- о Стерилізація: переважно фільтрація $0.22\text{ }\mu\text{m}$; автоклавування допускається, але змінює реологію - у протоколі зафіксувати, якщо застосовано.

- Змішування клітин з альгінатом:
 - о Додавання клітин: у стерильних умовах до отримання однорідної суспензії ($10^5\text{--}10^6$ кл./мл); працювати швидко - клітини осаджуються.

- Формування гелю (зшивання CaCl_2):
 - о Капсулювання: піпеткою/шприцом формуйте краплі/нитки у розчин CaCl_2 .

- о Концентрація CaCl_2 : $50\text{--}200\text{ mM}$ ($0.05\text{--}0.2\text{ M}$); типово 100 mM - баланс жорсткості/дифузії.

- о Час зшивання: $5\text{--}15\text{ хв}$ для чутливих клітин; до 20 хв для більш жорстких кульок.

- Промивання та культивування:
 - о Промивання: стерильним буфером для видалення надлишку CaCl_2 .

- о Перенесення: у відповідне стерильне середовище; інкубувати з контролем температури, рН, аерації; для тваринних - у CO_2 інкубаторі ($5\%\text{ CO}_2$, зволоження камери).

- Оцінка життєздатності/активності:

- o Тваринні клітини: Trypan Blue, Calcein AM/PI.
- o Бактерії/дріжджі: CFU (посів), резазурин/AlamarBlue, Live/Dead BacLight.
- o Рослинні: TTC, флуоресцентні барвники; морфологічна оцінка калюсу/органогенезу.

Загальна схема роботи.

Етап	Агар-гель	Альгінат
Приготування матриці	Варіння/автоклавування; охолодження; додавання термолабільних компонентів	Розчинення; стерилізація фільтрацією 0.22 мкм
Внесення клітин	На застиглий гель або інкапсуляція (лише для мікроорганізмів)	Змішування клітин з альгінатом
Формування	Заливання у чашки/форми	Капсулювання у CaCl_2 (50–200 мМ)
Культивування	За стандартами стерильності й температури	У відповідному середовищі; CO_2 для тваринних
Оцінка життєздатності	Мікроскопія, підрахунок колоній	Мікроскопія, життєздатність (Trypan Blue/CFU)

Контрольні питання:

- Властивості матриць: Які фізико хімічні властивості агару та альгінату обґрунтовують їх застосування для іммобілізації?
- Асептика: Чому стерильність критична на етапах підготовки та культивування?
- Вибір матриці: Для яких типів клітин доцільно застосовувати агар, а для яких - альгінат?
- Концентрація гелеутворювача: Як вона впливає на дифузію, ріст і виживання клітин?
- Переваги/недоліки: У чому плюси та мінуси іммобілізації порівняно з вільним культивуванням?
- Стерильні умови: Які кроки забезпечують стерильність і як вони впливають на валідність експерименту?
- Контамінація: Які типові помилки ведуть до контамінації та як їх уникати?
- Застосування: У яких галузях використовують ці

методики (біофарма, біоенергетика, очисні технології)?

- Оцінка ефективності: Якими методами міряють життєздатність і активність іммобілізованих клітин?

- Показники: Які метрики використовують для порівняння методів іммобілізації?

Оцінювання (коротко):

- 2,0 бали - відмінно (95–100 %): повне володіння теорією, коректне виконання, зразкове оформлення та захист.

- 1,5–1,9 бали - добре (85–94 %).

- 1,0–1,4 бали - задовільно (65–84 %).

- 0–0,9 бали - незадовільно (<65 % або несвоєчасна робота).

Очікувані результати:

- о Знання: Принципи підготовки матриць (агар, альгінат), вимоги до стерильності.

- о Уміння: підготовка та стерилізація гелевих матриць; інкапсуляція клітин у контрольованих умовах; дотримання асептичної техніки при роботі з біологічними об'єктами.

- о Практика: Отримання життєздатних суспензій, колоній, кульок; макро/мікро контроль.

- о Якість: Виявлення контамінації; оцінка життєздатності/активності; повторюваність.

- о Звітність: Структурований звіт із даними, графіками/фото, інтерпретацією.

Оформлення звіту:

- о Титульний аркуш: Назва роботи, курс, група, ПІБ студента/викладача, дата.

- о Мета: Стисло, по суті.

- о Обладнання, матеріали та реактиви: Повний перелік.

- о Теорія: Короткі основи методів і вибору матриці.

- о Методика: Покроковий опис із обсягами, концентраціями, температурою, часом.

- о Результати: Таблиці, графіки, фото; спостереження макро/мікро.

- о Обговорення: Інтерпретація, чинники успіху/ризиків, обмеження.

- о Висновки: Узагальнення за метою.

- о Безпека та утилізація: Перелік заходів; утилізація

біовідходів і CaCl_2 розчинів.

о Відповіді на контрольні питання.

Вимоги безпеки:

- Інструктаж: Обов'язковий перед роботою; фіксація в журналі.

- ЗІЗ: Халат (бавовняний), закрите взуття, нитрилові/латексні рукавички, захисні окуляри.

- Асептика: Ламінарна шафа для робіт із клітинами; стерилізація термостійких матеріалів (автоклав), термолабільних - фільтрація; УФ - для поверхонь.

- Хімічна безпека: Робота з дезінфектантами/буферами у витяжній шафі; чітке маркування розчинів.

- Гігієна: Заборонено їжу/напої; миття рук до/після роботи; не торкатися обличчя.

- Утилізація: Біовідходи - у спеціальні контейнери; знезараження культур; розчини CaCl_2 - за локальним регламентом.

- Аварії: Розливи/контакт із шкірою - негайне повідомлення, перша допомога згідно інструкцій; фіксація інцидентів..

Лабораторна робота №4. Прості методи виділення та первинного очищення білка: осадження і діаліз.

Мета роботи.

- Практика: Опанувати базові методи виділення білків із біологічних зразків (осадження, діаліз) і отримати первинні білкові фракції, придатні для подальших досліджень.
- Розуміння: Зміцнити знання про фактори, що впливають на розчинність і стабільність білків (рН, температура, іонна сила, органічні розчинники).
- Аналітика: Навчитися контролювати перебіг осадження/діалізу та оцінювати наявність/якість білка простими якісними і кількісними тестами.

Обладнання та матеріали:

- Посуд і інструменти: пробірки зі штативами й кришками; мірні циліндри/склянки; градуйовані піпетки, піпетки Пастера; скляні палички, шпателі; ступка з товкачиком або гомогенізатор.
- Обладнання: Центрифуга зі змінними роторами; вакуум ексикатор або роторний випаровувач (за наявності); лабораторні ваги; секундомір/таймер; водяна баня або нагрівальна плітка з терморегуляцією; лійки, фільтрувальний папір; мембранні фільтри (за потреби).
- Контроль середовища: рН метр або рН індикаторний папір; холодильник або льодовий контейнер.
- Стерильність і безпека: Ламінарна шафа або стерильне робоче місце; ЗІЗ (халат, нітрилові/латексні рукавички, окуляри); маркери, етикетки; контейнер для біовідходів.
- Реактиви: Фосфатний буфер (напр., 50 mM, рН 7.0) або інший робочий буфер (Tris/HEPES); дистильована/деіонізована вода; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (сульфат амонію); етанол 95% (охолоджений, -20°C) - як альтернатива; CuSO_4 1% і NaOH 10% для біуретової реакції; діалізні мішки/мембрани з вказаним MWCO (напр., 10 кДа).
- Примітка: Для тканинних екстрактів бажано додавати коктейль інгібіторів протеаз (напр., PMSF, EDTA або комерційний набір) і працювати при 4°C .

Теоретична довідка.

- Білки у водних розчинах: Глобулярні білки формують колоїдні системи, стабілізовані гідратною оболонкою. Зміни рН,

іонної сили, температури або додавання осаджувачів порушують гідратацію й знижують розчинність.

- Ізоелектрична точка (pI): рН, за якого сумарний заряд білка дорівнює нулю; поблизу pI розчинність мінімальна, що полегшує селективне осадження (напр., казеїн при $\text{pH} \approx 4.7$).

- Осадження (висолювання): Додавання нейтральних солей (напр., $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) підвищує іонну силу, зменшує доступну воду для гідратації білка й сприяє утворенню осаду. Процес часто оборотний за м'яких умов. Фракціонування досягають поетапним підвищенням насиченості солі.

- Альтернативні осаджувачі: Органічні розчинники (етанол, ацетон) - ефективні за низьких температур ($-20\text{ }^\circ\text{C}$), але можуть денатурувати білок при неправильних режимах.

- Діаліз: Відокремлення низькомолекулярних сполук (солей/буферів) від білків через напівпроникну мембрану (MWCO задає поріг). Ефективність залежить від співвідношення об'ємів, перемішування й кількості замін зовнішнього буфера.

Хід виконання:

1. Виділення білка осадженням (висолюванням).

- Підготовка біологічного зразка (15–20 хв):

- о Для моделі: 1–2 г тканини (м'язова/печінка) або 1% розчин яєчного білка у фосфатному буфері (pH 7.0).

- о Гомогенізація: 3 охолодженим буфером 5–10 хв на льоду; додати інгібітори протеаз (за потреби).

- Поетапне осадження (30–40 хв):

- о Відберіть 3–5 мл зразка у пробірку.

- о Дозування $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: Додавайте поступово насичений/розрахований розчин до досягнення 40% насиченості (таблиця перерахунку - за температурою $4\text{ }^\circ\text{C}$). Перемішуйте; інкубуйте 10–15 хв на льоду.

- о Центрифугування: 3000–5000 g, 15–20 хв, $4\text{ }^\circ\text{C}$. Акуратно відберіть осад (пелет) і супернатант.

- о Другий цикл: До супернатанту додайте $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ до 60–80% насиченості; інкубуйте; центрифугуйте як вище. За потреби промийте осад холодним насиченим розчином $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

- Відновлення розчинності (10–15 хв):

- о Розчиніть осад у мінімальному об'ємі робочого буфера (напр., фосфатний 50 mM, pH 7.0) або у воді. Якщо розчинність

низька, перевірте рН, іонну силу; за потреби - 0.05% м'якого детергенту (NP 40/Triton X 100).

- Якісне підтвердження білка (біурет):
 - о До 0.5–1 мл проби додайте 1–2 краплі 1% CuSO_4 і 1–2 краплі 10% NaOH ; фіолетове забарвлення - позитивний результат (пептидні зв'язки).

- Альтернатива (осадження етанолом):
 - о Додавайте охолоджений етанол до 60–80% v/v при $-20\text{ }^\circ\text{C}$, інкубуйте 30–60 хв; центрифугуйте 10 000–12 000 g, 10–15 хв, $4\text{ }^\circ\text{C}$. Пам'ятайте про ризик денатурації.

2. Діаліз білкового розчину.

- Вибір мембрани:
 - о MWCO: 10 кДа - типово для видалення солей/малих молекул; обирайте вище, якщо домішки більші, але контролюйте ризик втрати білка.

- о Прееквілібрувати мембрану у робочому буфері 30–60 хв після промивання у воді для видалення консервантів; підтримувати легке перемішування та запобігати висиханню.

- Завантаження зразка:
 - о Акуратно перенесіть білковий розчин у діалізний мішечок; щільно зав'яжіть, залишивши простір для розширення.

- Проведення діалізу:
 - о Помістіть мішечок у великий об'єм буфера або води (співвідношення $\geq 50:1$, оптимально $100:1$); забезпечте легке перемішування.

- о Діалізуйте при $4\text{--}10\text{ }^\circ\text{C}$; замінійте зовнішній буфер 3–4 рази з інтервалами 2–4 год; загальний час 6–24 год (залежно від контрасту концентрацій).

- Контроль після діалізу:
 - о Перевірте рН, прозорість; біуретова проба; за можливості - вимір A_{280} (Nanodrop/спектрофотометр) або тест Bradford (BSA як стандарт).

Примітка: У межах двогодинного заняття - підготовка мембрани, завантаження зразка та 1–2 заміни буфера; завершення діалізу - на наступному занятті або як самостійна робота.

3. Додаткові якісні реакції (за наявності)

- Ксантопротеїнова реакція: Виявлення ароматичних амінокислот.

- Реакція Мілона: Виявлення тирозину.
- Примітка: Застосовуйте обережно (деякі реактиви агресивні), дотримуючись інструкцій безпеки.

Зразкова таблиця ходу дослідів.

№	Хід дослідів	Реагент / умова	Спостереження	Висновки
1	Осадження сульфатом амонію	(NH ₄) ₂ SO ₄ , pH 7.0, 4 °C, 40% насиченості	Осад; прозорий фільтрат	Менш розчинні фракції (напр., глобуліни)
2	Подальше осадження	(NH ₄) ₂ SO ₄ , 60–80% насиченості	Осад; мутна суспензія	Осад більш розчинних фракцій (напр., албуміноподібні)
3	Осадження етанолом (альтернативно)	Етанол 95% (–20 °C), до 60–80% v/v	Осад; мутна суспензія	Оборотне осадження за м'яких умов; можливий ризик денатурації
4	Діаліз	Мембрана MWCO 10 кДа; вода/буфер ≥ 100:1	Прозорий розчин; менше солей	Видалено іони осаджувача; білок знову розчинний
5	Біуретова проба	1% CuSO ₄ + 10% NaOH	Фіолетове забарвлення	Підтверджено пептидні зв'язки

Таблиця результатів (зразок)

Дослід	Агент	pH	Наявність осаду	Біуретова проба
1	(NH ₄) ₂ SO ₄ , 40%	7.0	Так	Фіолетовий
2	(NH ₄) ₂ SO ₄ , 80%	7.0	Так	Фіолетовий
3	Етанол 60–80% v/v	7.0	Так	Слабко фіолетовий
4	Діаліз (dH ₂ O/буфер)	7.0	Ні	Фіолетовий

Контрольні питання:

- **Суть висолювання:** У чому фізико-хімічна основа осадження білка солями?
- **Вибір осаджувача:** Чому доцільно використовувати $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ або інші нейтральні солі?
- **Розчинність:** Які чинники (рН, температура, іонна сила, органічні розчинники) впливають на розчинність білка?
- **Оборотність:** За яких умов осадження оборотне, а коли - ні?
- **Діаліз:** Принцип дії та межі; що видаляється ефективно, а що - ні?
- **Ізоелектрична точка:** Як змінюється розчинність білка поблизу рІ?
- **Параметри процесу:** Як температура, рН і концентрація осаджувача визначають перебіг осадження?
- **Помилки:** Які операційні помилки призводять до втрат білка при осадженні/діалізі?

Очікувані результати:

- **Навички:** Вибір осаджувача; проведення висолювання/фракціонування; коректний діаліз.
- **Розуміння:** Вплив рН, температури, іонної сили, послідовності осадження на успіх процедури.
- **Застосування:** Видалення низькомолекулярних домішок; переведення білка у робочий буфер; первинна оцінка чистоти/вмісту білка.
- **Підготовка:** Готовність до подальшого очищення (афінна/іонообмінна хроматографія, електрофорез).
- **Оцінка:** Усвідомлення лімітуючих чинників і потреби в повторних циклах для підвищення чистоти.

Оформлення звіту:

- **Структура:** Титульний аркуш; мета; обладнання й реагенти; коротка теорія; детальний хід досліду (обсяги, концентрації, температура, час); результати (таблиці, фото, спостереження); обговорення; висновки; відповіді на контрольні питання; список джерел.
- **Додатки:** Калібрувальні криві, додаткові таблиці/ілюстрації; посилання в тексті.

Оцінювання (коротко):

- 2,0 бали - відмінно (95–100 %): повне володіння теорією, коректне виконання, зразкове оформлення та захист.
- 1,5–1,9 бали - добре (85–94 %).
- 1,0–1,4 бали - задовільно (65–84 %).
- 0–0,9 бали - незадовільно (<65 % або несвоєчасна робота).

Можливі труднощі та поради:

- **Втрати продукту:** Надмірне нагрівання, грубе поводження, низька розчинність після осадження.
- **Неповне осадження:** Неточне дозування, невідповідний рН/іонна сила.
- **Залишкова сіль:** Недостатній діаліз; контролюйте кількість заміни буфера і співвідношення об'ємів.
- **Денатурація:** Різкі зміни температури/рН, агресивні осаджувачі; працюйте при 4 °С, коригуйте рН.
- **Контамінація:** Домішки інших білків/ДНК/РНК - повторіть фракціонування; додайте ДНКазу/РНКазу за потреби.
- **Мембрани:** Пошкодження/неповна герметизація - ризик втрати білка; ретельно зав'яжуйте, перевіряйте цілісність.

Вимоги безпеки:

- **Нагляд:** Працювати під контролем викладача/лаборанта.
- **ЗІЗ:** Халат, рукавички, окуляри; за потреби - респіратор.
- **Хімічна безпека:** Концентровані кислоти/луги, солі важких металів - лише у витяжній шафі; чітке маркування.
- **Нагрівання/центрифугування:** Перевіряти заземлення; балансувати.
- **Перша допомога:** При контакті реагентів зі шкірою/слизовими - негайне промивання водою; звернення до медперсоналу.
- **Пожежна безпека:** Етанол та інші легкозаймисті - тримати подалі від вогню; обережно зі спиртівкою.
- **Утилізація:** Біо- та хімвідходи - згідно локальних інструкцій; розчини $\text{CuSO}_4/\text{NaOH}$ після біуретового тесту - у хімвідходи (попередня нейтралізація лугів).
- **Гігієна:** Заборонено їжу/напої в лабораторії; не зберігати сторонні речі на робочому місці.

Академічна доброчесність і звітність:

- **Індивідуальність:** Робота й звіт - індивідуальні; повний опис перебігу експерименту, розрахунки, таблиці.
- **Джерела:** Лише достовірні джерела й власні дані; фальсифікація - порушення.
- **Лабораторний журнал:** Вести покрокові записи, спостереження та короткі висновки; фіксувати рН, температури, об'єми, часи.
- **Контрольні питання:** Обов'язково включати; давати короткі аналітичні відповіді, пов'язані з отриманими результатами.

Лабораторна робота №5. Швидкий аналіз цільового продукту: визначення ферментної активності або агар-дифузійний тест.

Мета.

- Завдання: Сформувати навички швидкого біоаналітичного контролю якості цільового продукту (фермент, антибіотик, бактеріоцин, лізин тощо) за допомогою спектрофотометрії або зонного аналізу (агар дифузія).

- Результат: Визначити ферментативну активність у стандартизованих одиницях та/або встановити антимікробну активність за діаметром зон пригнічення.

Обладнання та матеріали:

- Аналітика: Спектрофотометр (200–700 nm), кювети (1 = 10 мм; скляні/кварцові відповідно до λ), термостат/інкубатор.

- Пробопідготовка: Центрифуга, порцелянова ступка з товчачиком, конічні колби (100 мл), піпетки і бюретки (1, 2, 5, 10 мл), лабораторні ваги, мірний посуд.

- Буфери й реагенти (ферменти): Ацетатний (pH 4.9) або фосфатний буфер (pH 7.0); індигокармін (0.0005 M); H₂O₂ (робочий 1–30 mM, оптимізація за протоколом); H₂SO₄ 20% - тільки у витяжній шафі; вода дистильована/деіонізована; товчене скло/кварцовий пісок (за потреби).

- Матеріали для зонного аналізу: Агар Мюллера–Хінтона (товщина шару $\approx$ 4 мм; орієнтовно 25 мл на стандартну чашку); мікропіпетки/градуйовані піпетки; шаблони для посіву; стерильні тампони, інокуляційні петлі; інкубатор.

- Безпека та асептика: Лабораторний журнал; ЗІЗ; ламінарна шафа.

- Примітка: Для роботи при pH $\approx$ 5 перевагу надавайте ацетатному/цитратному буферу (краща буферна ємність у кислому діапазоні).

Теоретична довідка.

- Ферменти та активність: Ферменти - білки/білкові комплекси з кофакторами, каталізують специфічні реакції. Активність: 1 U = 1 μ mol субстрату/продукту за 1 хв за визначених умов.

- Кінетика: Рівняння Міхаеліса–Ментен; для розрахунків

беруть початкові швидкості (лінійний інтервал), контролюють pH і температуру, мінімізують масопереносні обмеження.

- Закон Бугера–Ламберта–Бера.
- Агар дифузійний тест (Kirby–Bauer): Стандартизований інокулят 0.5 McFarland, агар Мюллера–Хінтона, інкубація $35 \pm 2^\circ\text{C}$, 16–18 год; оцінка зон у цілих мм; інтерпретація за таблицями CLSI/EUCAST або внутрішні криві.

Хід виконання:

1. Підготовка зразка:
 - Гомогенізація: 500 мг біоматеріалу у відповідному буфері з кварцовим піском; перенесення у мірну колбу й доведення до мітки буфером.
 - Стабілізація: Інкубація 10 хв на холоді; центрифугування; відбір супернатанту (ферментний екстракт).
2. Підготовка реакційної суміші (приклад):
 - Компоненти: 0.5 мл субстрату, 1.5 мл буфера, 0.5 мл ферментного екстракту, 0.5 мл H_2O_2 (робоча концентрація оптимізується у межах 1–30 mM для уникнення інгібування).
 - Реєстрація: Почати вимір через 20 с після змішування; знімати $A(t)$ у лінійному інтервалі 1–2 хв.
3. Довжина хвилі та ϵ :
 - Приклад 1 (гваякол/пероксидаза): $\lambda \approx 470 \text{ nm}$; використовувати відповідний ϵ .
 - Приклад 2 (індигокармін): λ максимуму поглинання зазвичай 610–620 nm у водних розчинах (виконати локальну спектральну зйомку); застосувати власний ϵ .
4. Розрахунок активності:
 - Швидкість: Визначити $\Delta A/\Delta t$ (лінійна ділянка).
 - Концентрація: $\Delta c/\Delta t = (\Delta A/\Delta t) / (\epsilon \cdot l)$.
 - Активність: $U \cdot g^{-1} = [(\Delta c/\Delta t) \cdot V_{\text{реакції}}] / m \text{ зразка}$; подати також у $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot g^{-1}$.
 - Звітування: Вказати ϵ , l , λ , pH, температуру, об'єми; надати середнє $\pm SD$ (≥ 3 репліки) і бланк/контроль.
5. Контролі:
 - Негативний: Замість H_2O_2 - вода/буфер.
 - Лінійність: Перевірка лінійності фотометричної відповіді в діапазоні вимірювання.

Хід виконання - агар дифузійний тест (зонний аналіз):

1. Підготовка середовища:
 - Приготування: За інструкцією; автоклав 121 °С, 15 хв; охолодити до ≈ 50 °С.
 - Розлив: У стерильні чашки Петрі; товщина шару ≈ 4 мм (орієнтовно 25 мл на стандартну чашку); дати застигнути.
2. Підготовка інокуляту:
 - Культура: Лог фаза 2–6 год; стандартизація до 0.5 McFarland (денситометром або візуальним стандартом).
 - Засів: Рівномірно тампоном у три перехресні паси; підсушити 10–15 хв.
3. Нанесення зразків:
 - Дисковий метод: Стерильними щипцями розмістити диски (діаметр 6 мм) з відомою дозою; центри ≥ 24 мм, щоб зони не перекривалися.
 - Лунковий метод: Лунки 6–8 мм; внести стандартизований об'єм/концентрацію зразка; чітке маркування.
4. Інкубація:
 - Режим: 35 ± 2 °С; 16–18 год (згідно стандарту та виду мікроорганізму); інвертоване положення чашок.
5. Вимірювання та інтерпретація:
 - Оцінка: Діаметри зон у цілих мм; калібрований інструмент/лінійка.
 - Інтерпретація: За CLSI/EUCAST або внутрішні калібрувальні криві; класифікація S/I/R або відносна активність (для біопрепаратів без таблиць).
 - QC штами: Рекомендовано *E. coli* ATCC 25922; за потреби - *S. aureus* ATCC 25923; *P. aeruginosa* ATCC 27853.
6. Якість і журнал:
 - Фіксація: Температура, склад і товщина агару, інокуляційна густина, об'єм/концентрація зразка, час інкубації; фото протокол.

Контрольні питання:

- Поняття: Що таке фермент і які властивості мають білкові каталізатори?
- Метод: У чому суть спектрофотометричного визначення ферментної активності?
- Розрахунок: Як обчислити активність за спектрофотометричними даними?

- Принцип: На чому ґрунтується агар дифузійний тест і як вимірюється діаметр зони?

- Точність: Які фактори впливають на точність зонного аналізу?

- QC: Як обирати контрольні штами для валідації якості продукції?

- Безпека: Які вимоги безпеки при роботі з біозразками, ферментами й зонними тестами?

- Помилки: Які причини хибних результатів у ферментативному та зонному аналізі?

- Інтерпретація: Як тлумачити результати в біотехнологічній лабораторії?

- Звітність: Як оформити звіт згідно з фаховим шаблоном?

Очікувані результати:

- Ферменти: Оперативне визначення активності у $\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$ або $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ з реплікаціями та контролюями.

- Антимікробна активність: Точне вимірювання діаметра зон пригнічення (мм) за стандартизованою методикою.

- Валідація: Підтвердження відповідності результатів нормативам/внутрішнім стандартам; QC штами й бланки.

- Наукова узгодженість: Сумісність практичних даних із теорією ферментативної кінетики та стандартами чутливості.

Оформлення звіту:

- Титульна сторінка: Назва ЗВО; кафедра; спеціальність; група; ПІБ; назва роботи; код (як є); ПІБ викладача; дата.

- Розділи:

- o Тема роботи.

- o Мета.

- o Обладнання, матеріали та реактиви.

- o Хід роботи: Точні обсяги, концентрації, температура, час; фотодокументація за потреби.

- o Результати: Сирі дані, таблиці, графіки, розрахунки, бланки й контрольні записи; середнє $\pm$ SD.

- o Обговорення: Аналіз результатів; причини відхилень; оцінка репрезентативності/надійності.

- o Висновки: Досягнення мети; якість продукту; конкретні числові показники.

- o Відповіді на контрольні питання.

- о Список джерел і додатки.

Можливі труднощі та поради:

- Калібрування: Регулярно калібрувати спектрофотометр; перевіряти лінійність; застосовувати бланки.
- Оптимізація H₂O₂: Підібрати концентрацію (1–30 mM), щоб уникнути інгібування ферменту.
- Зонні тести: Дотримуватися 0.5 McFarland, товщини агару ≈ 4 мм, інтервалів між дисками; вимірювати зони у цілих мм.
- Репліки й контролю: Не менше трьох реплік; позитивні та негативні контролю; QC штами.
- Протоколювання: Фіксувати всі параметри (pH, T, час, об'єми, λ , ϵ , I) для відтворюваності.

Техніка безпеки:

- Інструктаж: Перед роботою; робота у ЗІЗ (халат, рукавички, окуляри; за потреби - респіратор).
- Хімічна безпека: Концентровані кислоти/луги, H₂O₂, органічні розчинники - лише у витяжній шафі; «додавати кислоту у воду».
- Асептика: Ламінарна шафа; контроль стерильності «порожніх» посівів.
- Маніпуляції: Не набирати рідини ротом; використовувати грушу/дозатор.
- Організація: Не працювати поодиночі; знати розташування аптечки, вогнегасників, евакуаційних виходів.
- Інциденти: При контакті реагентів зі шкірою/слизовими - негайне промивання; звернення до медперсоналу.
- Утилізація: Біо та хімвідходи - у марковані контейнери за локальними інструкціями.
- Завершення: Дезінфекція й прибирання робочого місця; перевірка калібрування та працездатності приладів.

Рекомендована література

1. Саблій Л. А., Бунчак О. М., Жукова В. С. та ін. Обладнання та проектування в біоенергетиці та водоочищенні та управління безпекою праці : підручник для студ. закл. вищ. освіти спец. «Біотехнології та біоінженерія» / за ред. Л. А. Саблій ; КПІ ім. Ігоря Сікорського. 2-ге вид., перероб. і доп. Рівне : НУВГП, 2018. 377 с.

2. Державна фармакопея України : в 3 т. / 2-ге вид. Харків : ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2015. Т. 1. 1128 с.

3. Жученко А. І., Ладієва Л. Р., Піргач М. С. та ін. Математичне моделювання процесів і систем [Електронний ресурс] : навч. посіб. / КПІ ім. Ігоря Сікорського. Київ : КПІ ім. Ігоря Сікорського, 2021. 351 с.

4. Шапран Ю. П. Біотехнологія, генна інженерія : навч.-метод. посіб. Переяслав-Хмельницький (Київ. обл.) : Домбровська Я., 2019. 132 с.

5. Краснопольський Ю. М., Пилипенко Д. М. Фармацевтична біотехнологія: сьогодення та майбутнє : навч. посіб. Харків : Друкарня «Мадрид», 2022. 151 с.

6. Комариста Б. М., Бендюг В. І. Основи інженерії та технології сталого розвитку : конспект лекцій для студ. другого (магістерського) рівня підготовки усіх спец. Київ : КПІ ім. Ігоря Сікорського, 2019. 267 с.

7. Комариста Б. М., Бендюг В. І. Основи інженерії та технології сталого розвитку : метод. вказівки до проведення семінарських занять, самост. роботи та виконання індивід. завдання для студ. другого (магістерського) рівня підготовки усіх спец. Київ : КПІ ім. Ігоря Сікорського, 2017. 78 с.

8. Джигирей І. М. Основи інженерії та технології сталого розвитку. Оцінювання життєвого циклу продукційних систем [Електронний ресурс] : навч. посіб. для здобувачів ступеня магістра / КПІ ім. Ігоря Сікорського. Київ : КПІ ім. Ігоря Сікорського, 2020. 47 с.

9. Огурцов О. М., Близнюк О. М., Масалітіна Н. Ю. Біонанотехнологія та нанобіофізика : у 2 ч. Ч. 1 : Біонаноструктури. Харків : НТУ «ХПІ», 2019. 256 с.

10. Biotechnological Approaches in Waste Management

[Electronic resource] / edited by Rangabhashiyam S., Ponnusami V., Pardeep Singh. 1st ed. Boca Raton : CRC Press, 2022. 278 p. ISBN 9781003188292 (eBook). DOI: <https://doi.org/10.1201/9781003188292>.

11. Biotechnological Transformation for Sugarcane Management [Electronic resource] / edited by Krishan K. Verma, Xiu-Peng Song, Munna Singh, Jian-Ming Wu, Yang-Rui Li. 1st ed. New York : Apple Academic Press, 2024. 378 p. ISBN 9781003536376 (eBook). DOI: <https://doi.org/10.1201/9781003536376>.

12. Bioenergy and Biochemical Processing Technologies: Recent Advances and Future Demands [Electronic resource] / edited by Augustine O. Ayeni, Samuel Eshorame Sanni, Solomon U. Oranusi. 1st ed. Cham : Springer, 2022. VIII, 403 p. (Green Energy and Technology). ISBN 978-3-030-96721-5 (eBook), ISBN 978-3-030-96720-8 (Hardcover), ISBN 978-3-030-96723-9 (Softcover). DOI: <https://doi.org/10.1007/978-3-030-96721-5>.

13. Photosynthesis: Biotechnological Applications with Microalgae [Electronic resource] / edited by Matthias Rögner. Berlin ; Boston : De Gruyter, 2021. 310 p. (De Gruyter STEM). ISBN 9783110716979 (eBook), ISBN 9783110716917 (Paperback). DOI: <https://doi.org/10.1515/9783110716979>.

14. Supply Chain and Logistics Management: Concepts, Methodologies, Tools, and Applications [Electronic resource] / Information Resources Management Association. Boca Raton : IGI Global, 2019. 2148 p. ISBN 9781799809463 (eBook), ISBN 9781799809456 (Hardcover), ISBN 1799809455 (Print). DOI: <https://doi.org/10.4018/978-1-7998-0945-6>.