

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ ТА НАУКИ УКРАЇНИ
МИКОЛАЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**

**Факультет технології виробництва і переробки продукції тваринництва,
стандартизації та біотехнології**

Кафедра птахівництва, якості та безпечності продукції

БІОБЕЗПЕКА ВИКОРИСТАННЯ БІОТЕХНОЛОГІЙ

**методичні рекомендації для виконання практичних занять та самостійної
роботи для здобувачів вищої освіти СВО «Бакалавр»
спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»
денної форми навчання**

**Миколаїв
2020**

УДК 57.08

Б 63

Друкується за рішенням науково-методичної комісії факультету ТВППТСБ
Миколаївського національного аграрного університету від 20.02.2020 р.,
протокол № 7.

Укладачі:

Л. С. Патрєва – доктор с.-г. наук, професор, завкафедри птахівництва, якості та безпечності продукції Миколаївського національного аграрного університету;

О. О. Стародубець – кандидат сільськогосподарських наук, доцент кафедри птахівництва, якості та безпечності продукції;

І. М. Люта – асистент кафедри птахівництва, якості та безпечності продукції Миколаївського національного аграрного університету.

Рецензенти:

Г. А. Коцюбенко – доктор с.-г. наук, доцент кафедри птахівництва, якості та безпечності продукції Миколаївського національного аграрного університету;

О. І. Юлевич – кандидат т. наук, доцент кафедри генетики, годівлі тварин та біотехнології Миколаївського національного аграрного університету.

Зміст

Вступ	4
Практична робота №1. Основні вимоги і правила техніки безпеки у лабораторії біотехнології	5
Практична робота №2. Методи стерилізації ламінар-боксу, посуду, живильних середовищ та рослинного матеріалу	6
Практична робота №3. Тест Еймса: загальні положення та методика проведення	10
Практична робота №4. Застосування методу культури тканин у селекції рослин. Висів суспензії на селективне живильне середовище	13
Практична робота №5. Allium-тест: основні положення та методика проведення	16
Практична робота №6. Біологічне очищення стічних вод за допомогою активного мулу	24
Практична робота №7. Мікроклональне розмноження рослин	27
Практична робота №8. Виділення і культивування апікальних меристем картоплі	34
Практична робота №9. Виділення ядерної ДНК з рослинних тканин	36
Практична робота №10. Виділення плазмідної ДНК	38
Практична робота №11. Виділення рослинної РНК	40
Практична робота №12. Гель-електрофорез рослинної РНК	42
Практична робота №13. Вивчення захисної дії кріопротекторів на стійкість клітин до дії низьких температур	43
Практична робота №14. Особливості нехірургічного вимивання ембріонів	45
Практична робота №15. Пошук та морфологічна оцінка ембріонів	49
Практична робота №16. Нехірургічна трансплантація ембріонів	54
Практична робота №17. Законодавча база України з біобезпеки та її реалізація	57
Література	61

Вступ

Біобезпека вивчає спадковість і мінливість організмів з новими штучно утвореними ознаками, а також їх розповсюдження і можливі наслідки для екобіоценозів. Захист спадковості живого – це збереження життя на Землі у всьому його розмаїтті, його еволюції.

У зв'язку із зростанням взаємодії людини і природи, посиленням дії екзогенних факторів на спадковість живого, створенням нових генетично модифікованих організмів виникла проблема екологічних змін у навколишньому середовищі, що викликані її забрудненням і появою та розповсюдженням сучасних біотехнологій різного напрямку, включаючи і створення трансгенних організмів. Люди повинні знати наслідки неконтрольованої дії мутагенних факторів, що з'являються в довкіллі, на спадковість живих організмів; розуміти проблеми, що пов'язані з активним залученням генетично модифікованих організмів до вирішення проблем недостатчі харчових продуктів в країнах третього світу, очищення навколишнього середовища від токсикантів різної хімічної природи, синтезу та отримання фармакологічних препаратів, покращення якості вже існуючих сортів рослин та порід тварин, використання рослин як фабрик для направленої хімічного синтезу тих чи інших сполук і т.д.

Дисципліна займає одне з основних місць і відіграє важливу роль в формуванні біотехнолога. Без твердих знань біобезпеки біотехнологи не може бути допущений до організації, керівництва та безпосереднього виконання робіт на виробництві. Знання, отримані при вивченні дисципліни «Біобезпека використання біотехнологій» студенти використовують в навчанні – лабораторно-практичних заняттях, при проходженні всіх видів практик, а потім, будучи біотехнологом, постійно в своїй трудовій діяльності.

ПРАКТИЧНА РОБОТА №1

ТЕМА: Основні вимоги і правила техніки безпеки у лабораторії біотехнології

МЕТА ЗАНЯТТЯ: ознайомитися з правилами поведінки у лабораторії біотехнології

ЗМІСТ І МЕТОДИКА ПРОВЕДЕННЯ ЗАНЯТТЯ:

Перед проведенням лабораторної роботи студенти зобов'язані теоретично підготуватися до відповідної теми, використовуючи рекомендовану літературу.

Працювати у лабораторії студент може тільки в присутності викладача або лаборанта.

У лабораторії слід дотримуватися тиші, чистоти, порядку розміщення обладнання, апаратури та реактивів. Забороняється виносити реактиви з приміщення, переносити їх з-під витяжної шафи.

Під час роботи в асептичному приміщенні необхідно щільно закрити вікна і двері та одягти стерильний халат, шапочку або пов'язку. Провести дезінфекцію рук 96% етиловим спиртом. Протерти 96% етиловим спиртом робочі поверхні столів ламінар-боксів, близько розташовані електророзетки, пальники.

Усі досліди з отруйними речовинами або сполуками, що мають неприємний запах, слід проводити під витяжною шафою. Розігрівання живильного середовища необхідно проводити на водяній бані і розливати в колби, пробірки, пеніцилінові флакончики при температурі +45-50 °С.

Рідину в пробірці необхідно перемішувати за допомогою скляної палички. Уникати зайвих рухів над відкритими чашками Петрі. Проводячи висаджування рослинного матеріалу, посуд тримати під кутом, щоб уникнути прямого попадання пилу.

Посадку рослинного матеріалу проводять якнайшвидше, зменшуючи до мінімуму час, за якого культуральний посуд залишається відкритим.

Після закінчення роботи пробки культурального посуду накривають целофановими ковпачками. Бокові грані чашок Петрі заклеюють липкою стрічкою.

Під час роботи з концентрованими кислотами їх слід вливати у воду невеликими порціями, користуючись гумовими рукавичками.

Не слід пробувати реактиви на смак, втягувати піпеткою до рота розчин невідомої сполуки, оскільки вона може бути отруйною, вдихати глибоко

виділені гази або випари.

Реактиви необхідно зберігати у закритому посуді з етикеткою, де зазначена назва, формула і концентрація речовини.

Забороняється виливати у раковини вмивальників залишки розчинів, що містять концентровані кислоти. Їх слід зливати у спеціальні ємності, які знаходяться під витяжною шафою або поряд із раковиною вмивальника.

Працювати з реактивами, що подразнюють органи дихання або мають сильний запах, слід під витяжною шафою.

Сипкі реактиви треба набирати спеціальними ложечками або шпателем.

Під час роботи у лабораторії категорично забороняється залишати без нагляду установку, що працюють, а також електричні нагрівальні прилади.

Використані фільтри, папір, вату розбитий лабораторний посуд та уламки скла не викидати у раковини вмивальників. Необхідно користуватись ємностями, які знаходяться поряд з раковиною.

У разі виникнення пожежі необхідно: негайно вимкнути рубильники електромережі, прибрати у безпечне місце горючі речовини, вогнегасником загасити полум'я або засипати піском чи накрити азбестовим покривалом.

У разі виникнення пожежі в ламінар-боксі забороняється використовувати вогнегасник, полум'я необхідно загасити азбестовим покривалом або вологою ганчіркою.

Виходячи з лабораторії, обов'язково слід вимкнути електронагрівальні прилади, закрити водопровідний кран і витяжну шафу.

ПРАКТИЧНА РОБОТА №2

ТЕМА: Методи стерилізації ламінар-боксу, посуду, живильних середовищ та рослинного матеріалу

МЕТА ЗАНЯТТЯ: вивчити методи стерилізації ламінар-боксу, посуду, живильних середовищ та рослинного матеріалу

ЗМІСТ І МЕТОДИКА ПРОВЕДЕННЯ ЗАНЯТТЯ:

Інфекція, що спостерігається в культурах рослинних тканин може бути систематичною і випадковою. В першому випадку необхідно проаналізувати всі операції підготовки, стерилізацію середовищ, тканин, приміщення та ізолювання і пересадження тканин для пошуку помилки, яка визначає цю систематичну інфекцію.

Стерилізація – це повна інактивація здатності до розмноження всіх форм мікроорганізмів. Дія стерилізуючих агентів базується на інактивації процесів, які обумовлюють ріст і репродукцію клітин і, перш за все, денатурацію ферментів та інактивацію геному.

До агентів, що забезпечують стерильність відносять:

- тепло, включаючи пар (автоклавування, тиндалізація, кип'ятіння, пастеризація);
- гаряче повітря (нагрівання за допомогою гарячого повітря у спеціальних шафах при температурі +120-180 °С);
- токсичні хімічні сполуки;
- фізичні фактори: іонізуюче опромінення, головним чином γ -промені, оскільки ультрафіолетове опромінення не завжди є ефективним.

Основною умовою успішного культивування ізолюваних клітин, тканин, органів рослин є стерильність приміщення, ламінар-боксу, живильного середовища, посуду, допоміжних матеріалів, інструментів, посадкового матеріалу.

Стерилізація приміщення:

1. Підлогу кімнати миють водою з будь-яким миючим засобом.
2. Проводять стерилізацію кімнати ультрафіолетовим опроміненням, використовуючи лампи ПРК-7 (потужність 1000 Вт) або ПРК-4 (потужність 500 Вт) протягом 1,5-2 годин, в залежності від потужності ламп. Працювати в кімнаті можна тільки через 2 години після виключення ламп.

Стерилізація ламінар-боксу. Ламінар-бокс - лабораторний прилад для роботи з біологічними об'єктами в стерильних умовах. Являє собою шафу, обладнаний освітлювачами, ультрафіолетовими лампами і системою подачі стерильного повітря. Використовується при мікробіологічних, молекулярно-біологічних роботах, роботах з культурою клітин, тканин і органів. Стерильне повітря подається в бокс ламінарним потоком (рівномірний рух повітря). УФ лампи боксу можна залишати на ніч увімкненими для стерилізації внутрішньої поверхні. Безпосередньо перед роботою в ламінар-боксі його робочу поверхню протирають 96% етиловим спиртом.

Стерилізацію рук проводять за допомогою 96% етилового спирту після попередньо їх миття мильним розчином.

Стерилізація інструментів: ножиці, ланцети, пінцети, голки прожарюють в сушильній шафі протягом 2-3 годин при температурі 160-180 °С.

Перед роботою інструменти стерилізують 96% спиртом, обпалюють над полум'ям спиртівки, після чого кладуть на підставку для охолодження. Використовують стерильні інструменти тільки для однієї маніпуляції. Перед повторним використанням інструментів, стерилізацію їх повторюють в полум'ї спиртівки.

Стерилізація посуду. Обов'язковою умовою успішного культивування рослинних тканин є чисто вимитий стерильний посуд. Існує два методи миття посуду кислотний і лужний. Самим поширеним і надійним методом підготовки скляного посуду, особливо нового, є кислотний – замочування посуду на 4-6 год. у хромовій суміші (розчин біхромату калію ($K_2Cr_2O_7$) в концентрованій сірчаній кислоті). Потім посуд багаторазово промивають теплою проточною водою і ретельно ополіскують два рази дистильованою і один раз бідистильованою водою.

Використаний посуд звільняють від залишків середовища і ретельно миють з застосуванням звичайних мийних засобів (лужний метод) і ополіскують проточною та дистильованою водою. Вимитий посуд висушують і стерилізують в сушильній шафі при температурі 160-180 °C протягом 2-2,5 годин.

Крім сухоповітряного способу, посуд можна стерилізувати автоклавуванням протягом 20-25 хв. при 1-1,2 атм, попередньо загорнувши його в пергаментний папір. Стерильний посуд зберігають у закритих шафах, захищених від проникнення пилу, в чистоті, не допускаючи забруднення навіть слідами хімічних речовин.

У випадку інфікування культуральних рослин або клітин, перед їх знищенням і наступним миттям посуду, пробірки чи флакони з рослинним матеріалом автоклавують протягом 50-60 хв. при тиску 2 атм.

Стерилізація допоміжних матеріалів. Вату, марлю, ватні та силіконові пробки, целофан, папір, фольгу стерилізують автоклавуванням протягом 25 хв. при 1-1,2 атм.

Стерилізація живильних середовищ. Тверді (агаризовані) і рідкі середовища автоклавують в пробірках, колбах або іншому скляному посуді. Час стерилізації залежить від об'єму середовища (табл.1).

Складові живильних середовищ, що розкладаються чи коагулюють під час автоклавування (амінокислоти та їх аналоги, ферменти, антибіотики, мутагени) стерилізують механічним методом – через бактерицидні фільтри. Скляні фільтри після їх використання промивають концентрованою сірчаною

кислотою і декілька разів проточною водопровідною та дистильованою водою.

Таблиця 1

Режим автоклавування живильних середовищ

Об'єм середовища, мл	Час стерилізації (121 °С, 1 атм.), хв.
20-50	15
75	20
150-500	25
1000	30
2000	40

Стерилізація рослинного матеріалу. Одержання стерильного (асептичного) рослинного матеріалу - складне завдання, тому що необхідно нейтралізувати мікрофлору, не пошкодивши при цьому рослинну тканину. Для цього використовують різні стерилізуючі речовини (стериланти), які не проникають у тканину і легко змиваються водою.

Враховуючи, що в природних умовах на поверхні рослин знаходиться велика кількість грибів, їх спор, бактерій, рослинний матеріал попередньо занурюють в 70% етиловий спирт: насіння на 2-3 хв., листки, корені на 0,5-1 хв.

Для подальшої стерилізації використовують такі препарати:

1. Препарати з активним хлором; 0,5-5% гіпохлорит натрію NaClO ; 9% гіпохлорит кальцію Ca(ClO)_2 ; хлорамін, комерційний препарат «Білизна».
2. Ртутні препарати: 0,2-0,5% розчин сулеми HgCl_2 , діюцид, фалосепт.
3. 5-20 % розчин перекису водню H_2O_2 .
4. 1% бромна вода Br_2 .
5. 0,5-2 % азотнокисле срібло AgNO_3 .

Для підвищення стерилізуючого ефекту в розчини необхідно додавати незначну кількість емульгатору твін-80 або твін-200 (1 крапля на 100 мл розчину). Час стерилізації визначається експериментально і залежить від вибраної стерилізуючої речовини та об'єкту, який підлягає процесу стерилізації. Для видалення із тканин стерилізуючої речовини, проводять промивання експлантату чотири рази з періодом експозиції 15 хвилин. При порушенні такого режиму відбувається отруєння культури, що призводить до заторможення ростових процесів або повної загибелі рослин.

У випадку значного зараження досліджуваного матеріалу при введенні в

стерильну культуру необхідно застосовувати антибіотики, розчини яких стерилізують через мембранні фільтри. Серед них до одного із найбільш ефективних відноситься клафоран.

Простерилізований та відмитий матеріал занурюють на 3 год. у водний розчин клафорану (500 мг/л), а потім висаджують на агаризоване живильне середовище, яке містить 500 мг/л клафорану і 50 мг/л канаміцину.

Перед відкриванням колби чи пробірки зі стерильним живильним середовищем, їх протирають ватою, змоченою в 96% етиловому спирті, а горловину посудини обпалюють над полум'ям спиртівки.

При **висадженні експлантатів** колбу треба тримати під кутом поблизу полум'я спиртівки. Після закінчення посадки ковпачок із фольги або ватну пробку обпалюють над полум'ям спиртівки і швидко закривають колбу чи пробірку.

Розділення рослинного матеріалу на фрагменти (експлантати) зручно проводити в низьких чашках Петрі, на стерильних салфетках із фільтрованого паперу.

ПРАКТИЧНА РОБОТА №3

ТЕМА: Тест Еймса: загальні положення та методика проведення

МЕТА ЗАНЯТТЯ: ознайомитися з методикою проведення теста Еймса, здійснити оцінку мутагенного потенціалу хімічних сполук.

ЗМІСТ І МЕТОДИКА ПРОВЕДЕННЯ ЗАНЯТТЯ:

Схема постановки тесту Еймса. Тест Еймса (англ. Ames test) - генетичний тест з використанням бактерій *Salmonella typhimurium* як тест об'єкту. Призначений для оцінки мутагенного потенціалу хімічних сполук. Позитивний результат в тесті показує, що хімічна речовина може мати канцерогенні властивості. Так як малігнізація часто пов'язана з пошкодженням ДНК, тест також використовується як експресний метод оцінки канцерогенного потенціалу різних хімічних сполук, і як доповнення іншого подібного методу – стандартного тесту на гризунах.

Малігнізація (лат. Malignus – шкідливий, згубний) – набуття клітинами нормальної або патологічно зміненої тканини організму (у тому числі доброякісної пухлини) властивостей злоякісної пухлини. У основі малігнізації лежать порушення процесів диференціювання і проліферації клітин.

Тест служить в якості швидкого і зручного аналізу для оцінки потенціалу канцерогенності з'єднання, оскільки стандартні канцерогенні аналізи на мишах і щурах забирають багато часу (від двох до трьох років) і дорого коштують. Проте, отримання помилкових результатів також зустрічається.

Методика була описана в ряді робіт на початку 1970-х Брюсом Еймсом і його групою в Каліфорнійському Університеті, Берклі.

Методика постановки тесту. У тесті використовуються деякі штами бактерії *Salmonella typhimurium* (рис. 1), які несуть мутації в генах, що беруть участь в синтезі гістидину (тобто це ауксотрофні мутанти, що потребують штучного внесення гістидину для зростання).

У тесті вивчається можливість передбачуваного мутагену викликати реверсивну мутацію даного гену, при якій штам набуває здатності рости на середовищі, що не містить гістидину. Призначені для тестування штами підібрані таким чином, щоб вони містили обидві рамки зчитування (наприклад, штами TA98, TA-1537 і TA-1538) і точкові мутації (наприклад, штами TA100, TA1535, TA-1531) в генах відповідальних за синтез гістидину, що дозволяє виявляти мутагени шляхом впливу на різні механізми. Деякі хімічні сполуки вкрай специфічні і тому викликають реверсії тільки в одному або двох штаммах.

Використовувані в тесті штами також несуть мутації в генах, відповідальних за синтез ліпополісахариду, роблячи клітинні стінки бактерій більш проникними. Крім того, відсутність деяких генів, відповідальних за репараційні процеси, робить тест більш чутливим.

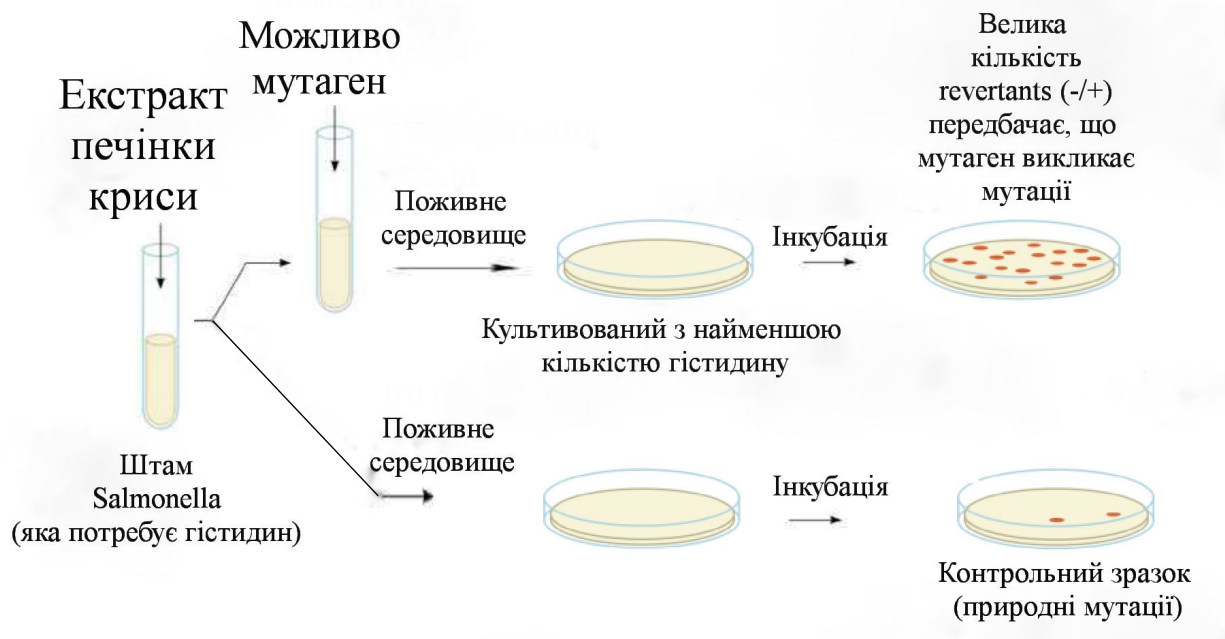


Рис.1. Схема проведення тесту Еймса

З огляду на корінні відмінності між метаболізмом бактерій і ссавців в тесті може бути використана витяжка з печінки щурів для імітації ефекту обміну речовин, так як деякі сполуки, наприклад бензапірени, не володіють мутагенною активністю, але їх похідні, які утворюються в процесі метаболізму, набувають генотоксичності.

Бактерії висіваються на агарному живильному середовищі в чашці Петрі. Середовище містить невелику кількість гістидину. Цієї кількості гістидину в середовищі досить, щоб забезпечити життєдіяльність і ріст бактерій протягом деякого часу і дати можливість встигнути за цей час мутувати. Після вичерпання гістидину, що містився в середовищі, виживають тільки ревертантні колонії, які набули здатність синтезувати власний гістидин. Контролем служать бактерії, посіяні на середовищі, що не містить досліджуваного мутагенного фактору. Інкубація проводиться протягом 48 годин. Мутагенний потенціал досліджуваної речовини оцінюється пропорційно кількості обстежених колоній.

Труднощі інтерпретації результатів. Так як сальмонели є прокаріотами, це не ідеальна модель для екстраполяції на людину. Початковий варіант тесту не брав до уваги метаболіти, які формуються в печінці. У модифікованому варіанті тесту використовується фракція печінки S9, яка допомагає більш повно

відтворити систему і досліджувати, чи здатні похідні вихідної речовини давати позитивний результат (тобто генотоксичність).

Ряд препаратів, які містять нітратні угруповання, насправді не представляють загрози здоров'ю, іноді дають хибно-позитивну відповідь в тесті Еймса. Нітрогліцерин - це приклад такої речовини. Він дає позитивний результат в тесті Еймса, хоча використовується в медицині досі. У тесті Еймса застосовуються дуже високі концентрації речовин спільно з нітратами, які здатні формувати оксид азоту (NO), важливу сигнальну молекулу, яка відповідальна за хибно-позитивні результати. Щоб спростувати позитивний результат в тесті Еймса необхідні подальші токсикологічні дослідження. Для перетворення результатів, отриманих в тесті Еймса, в інтегральний показник, використовується стандартна схема інтегральної оцінки мутагенного ефекту.

ПРАКТИЧНА РОБОТА №4

ТЕМА: Застосування методу культури тканин у селекції рослин.

Висів суспензії на селективне живильне середовище.

МЕТА ЗАНЯТТЯ: ознайомитися з нетрадиційними методами селекції рослин: вивчити селекцію мутантів на рівні клітинних колоній. Опрацювати методику посіву суспензії на селективне живильне середовище.

ЗМІСТ І МЕТОДИКА ПРОВЕДЕННЯ ЗАНЯТТЯ:

Успіхи, досягнуті в області культивування рослинних клітин відкривають нові потенційні можливості використання рослинного матеріалу для вирішення фундаментальних питань експериментального мутагенезу і селекції нових форм сільськогосподарських культур. Вихідним матеріалом для мутагенезу та селекції можуть слугувати калюсні і суспензійні культури, ізольовані протопласти, соматичні або андрогенні ембріїди, сегменти листків і меристем.

Для відбору мутантів використовують такі прийоми:

1. Пряма або позитивна селекція, при якій виживають тільки мутантні клітини певного типу.
2. Непряма (негативна) селекція, заснована на вибірковій загибелі клітин дикого типу, які діляться, і виживанні метаболічно неактивних клітин, що потребує додаткової ідентифікації у них мутаційних змін.

3. Тотальна селекція, при якій індивідуально тестуються всі клітинні клони.

4. Візуальна селекція і неселективний відбір проводяться в разі, коли варіантна лінія може бути ідентифікована серед популяції візуально або при використанні біохімічних методів.

Найбільш широко застосовується метод прямої селекції, головним чином для виділення рослин-регенерантів, стійких до гербіцидів, антибіотиків, токсинів, важких металів, солей та інших антиметаболітів.

Для проведення робіт з клітинної селекції рослин в умовах *in vitro*, як об'єкти дослідження можуть бути використані калусні, суспензійні культури або ізольовані протопласти. Вибір об'єкта залежить від наявності розроблених технологій для різних видів рослин, а також від кінцевої мети дослідження. Калусна тканина, як легкодоступний матеріал найчастіше використовується для клітинної селекції. Зазвичай, роботу проводять на первинній або перепасированій калусній тканині, що не втратила здатності до регенерації протягом ряду субкультивувань.

Разом з тим багато дослідників відзначають істотні недоліки цього об'єкта. В першу чергу - це повільний ріст калусної тканини, неоднаковий для всіх клітин вплив токсичних речовин, які застосовуються в ролі селективних факторів, втрата регенераційної здатності в процесі культивування калусних клітин. Слід відзначити, що проводити селекцію доцільно на рівні одиночних клітин (суспензійна культура або протопласти). Однак для багатьох видів рослин не розроблені ефективні технології та способи їх культивування. Тому, незважаючи на вказані недоліки, при використанні калусних культур, цей спосіб селекції залишається єдиним для деяких видів рослин.

Одержання стабільно стійких ліній в культурі *in vitro* – довготривалий процес. Селекція починається з одержання ізольованих рослинних експлантатів для отримання достатньої кількості калусної маси, яка надалі використовується для визначення сублетальної концентрації селективного фактора, при введенні якого водночас спостерігається ріст калусної тканини і загибель частини калусних колоній. Ця концентрація селективного фактора вважається оптимальною для використання в подальших експериментах.

Первинно отримані на середовищах з селективними агентами колонії клітин виникають внаслідок фізіологічної адаптації або певного стану диференціації клітин, і можуть бути генетично нестійкими. Тому протягом наступних чотирьох – шести субкультивувань на селективному середовищі

проводять оцінку стабільності стійкості отриманих клонів. Після цього їх переносять на живильне середовище без селективного фактора і субкультивують протягом двох-трьох пасажів. І тільки після повторного повернення в селективні умови відбирають стабільні клони, з яких одержують рослини-регенеранти.

Була проведена низка робіт із культивування калюсної тканини для одержання нового колекційного матеріалу на рослинах пшениці, ячменю, рису, сорго, а також картоплі, томатів, люцерни. Одержані рослини пшениці, рису, картоплі, стійкі до хлоридного засолення (NaCl); рослини-регенеранти моркви, які завдяки додаванню в живильне селективне середовище аналогів амінокислот, синтезують в 20 разів більше метіоніну, в 30 разів триптофану, у п'ять разів – лізину; рослини картоплі, стійкі до кільцевої гнилі. Що стосується рослин деревних порід, то роботи в цьому напрямку проводяться дуже рідко і часто носять пошуковий характер.

Поряд з калюсними та суспензійними культурами, як вихідний матеріал для селекції можуть бути використані ізольовані протопласти, культури статичних або андрогенних ембріодів, органогенні експлантати (сегменти листків або різні меристематичні чи стеблові частини рослин), а також культура ізольованих зародків. Шляхом культивування та селекції *in vitro* зародків з насіння отримані рослини ячменю, стійкі до аналогів амінокислот. Розроблено ефективний метод обробки пагонів та черешків картоплі мутагеном, що призводить до одержання хлорофілдефектних та антибіотикостійких химерних мутантів.

Подальше використання калюсної культури в селекційній практиці відкриває широкі можливості для створення нових форм рослин з господарсько - цінними ознаками шляхом проведення селекції на клітинному рівні, що дозволяє у два – чотири рази прискорити створення нових форм рослин, порівняно із традиційними методами.

Висів суспензії на селективне живильне середовище. Здатність клітин до поділу на селективних середовищах в присутності мутагенного фактора (більшість антибіотиків, в тім числі і стрептоміцину) носить мутагенний характер, що набуває особливого значення для відбору цитоплазматичних мутантів. В основу багатьох прийомів селекції покладено метод відбору мутантних клітинних ліній за їх здатністю до фотосинтезу на селективному середовищі, що є досить ефективним в селекції цитоплазматичних мутантів.

Селективне поживне середовище - поживне середовище, призначене

для виділення певного виду мікроорганізмів із сукупності різних видів.

Хід роботи:

1. Відбирають 1 мл клітинної суспензії, отриманої із мезофілу листків тютюну і висівають на середовище, яке складається:

Таблиця 2

Склад середовища

Речовина	Кількість
Макросолі МС	100
Мікросолі МС	1 мл
Fe-хелат	5 мл
Вітаміни МС	1 мл
ІОК	2 мг
БАП	0,5 мг
Стрептоміцин	0,5 мг/мл
Агар	8 г
Сахароза	20 г
pH	5,0-5,5

2. Чашки Петрі з висіяною суспензією поміщають в термостат для утворення калюсної тканини при регульованій температурі +25-26 °С і абсолютній темряві.

3. Присутність антибіотику стрептоміцину в живильному середовищі інгібує позеленіння калюсних тканин, але не пригнічує їх ріст. Ділянки калюсу з мутантними клітинами виявляють по їх зеленому забарвленню.

4. Для перевірки на стійкість до стрептоміцину, відділяють ділянки зелених тканин і розмножують на живильних середовищах того самого складу.

5. На середовищі без антибіотику проводять регенерацію зелених осередків тканин до цілих рослин. Для запобігання утворення химерних рослин їх доцільно підтримувати на середовищі, доповненому антибіотиком.

6. Через кожні сім діб проводять спостереження і роблять висновки.

ПРАКТИЧНА РОБОТА №5

ТЕМА: Allium-тест: основні положення та методика проведення

МЕТА ЗАНЯТТЯ: ознайомитися з методикою проведення Allium-тесту

ЗМІСТ І МЕТОДИКА ПРОВЕДЕННЯ ЗАНЯТТЯ:

Allium-тест – рослинна тест-система для оцінки мутагенного,

мітозмодифікованого і токсичного ефектів факторів хімічної та фізичної природи на основі рослини *Alliaceae* - цибуля ріпчаста (сорт Штутгартен).

У Allium-тесті використовуються корінці паростків цибулі *Alliaceae*, який вперше запропонований Шведською королівською академією наук як стандартний тест-об'єкт.

Allium-тест рекомендований експертами як стандарт в цитогенетичному моніторингу навколишнього середовища, так як результати, отримані під час проведення даного тесту, показують кореляцію з тестами на інших організмах: водоростях, рослинах, комахах, в тому числі на ссавцях та людині. Рекомендований в якості альтернативи генотоксикологічних тестів на лабораторних тваринах (в тому випадку якщо для одних і тих же досліджуваних речовин спостерігається однаковий результат в даному тесті і тестах на тваринах, тобто якщо показана кореляція).

Кореневі клітини містять певні ферменти, які виконують функції оксидаз, які сприяють перетворенню багатьох не мутагенних речовин в мутагенні. Ця система активації дозволяє виявити ті хімічні речовини, які посилюють свій токсичний ефект в процесі метаболізму.

Біотест може також використовуватися для вимірювання відносної токсичності нерозчинних у воді сполук, за умови, що вони можуть бути розчинені у відповідному розчиннику, а потім розбавлені у воді таким чином, що залишкова концентрація не перевищить певних меж. У таких випадках для контролю розчинників повинен також бути організований тестовий режим. Біотест діє в широкому діапазоні рН (3,5-11,0) без якихось очевидних ефектів на прирости корневих систем. Тому помірно кислі/лужні зразки води, хімічні розчини можуть бути досліджені без необхідного коригування рН.

Переваги рослинної тест-системи *Alliumceae*. Даний метод не вимагає знання каріотипу та ідентифікації типів ушкоджень хромосом, є простим, економним, швидким і досить чутливим для визначення мутагенності та цитотоксичності фактору.

Метод дозволяє реєструвати хромосомні мутації типу делецій і транслокацій, наслідком яких є наявність мостів і фрагментів в ана- і телофазі. Метод дозволяє виявляти зміни поведінки хромосом на веретені поділу. Allium-тест ідеально підходить для проведення мікроядерного тесту.

Використання цибулі *Alliumceae* в тестах. Цибуля має 16 хромосом ($2n = 16$), які добре зафарбовуються. Тривалість клітинного циклу становить приблизно 17,8 години. Мітотичний індекс може коливатися в різних коренях

однієї і тієї ж рослини, але всередньому дані є досить стійкими. Тривалість мітозу в різних тканинах кореня *Allium* spp. однакова і не змінюється по довжині кореня. Співвідношення різних фаз мітозу не залежить від часу фіксації.

Тести з використанням меристематичних тканин проростків корінців цибулі дозволяють реєструвати токсичні (приріст корінців), мітозмодифіковані (порушення мітотичної активності меристеми, патологія веретена поділу) і мутагенні ефекти (індукції мікроядер і хромосомні мутації).

Точки контролю клітинного циклу (checkpoints) являють собою періоди циклу, де відбувається перевірка точності виконання попередньої стадії. Такий механізм оберігає клітини, які діляться від летального мітозу, зупиняючи розподіл і даючи час системі репарації для відновлення пошкоджень ДНК. Коли контролюючий механізм виявляє пошкоджену або не реплікаційну ДНК відбувається затримка в клітинному циклі, протягом якого відбувається коригування. Точками контролю є переходи G1-S і G2-M. Існує також особлива точка контролю при переході від метафази в анафазу. Збільшення кількості порушень при впливі генотоксикантів призводить до затримки клітинного циклу в точках контролю, що відбувається на кількості клітин, які діляться і на тривалості фаз клітинного циклу.

Як наслідок, для зменшення можливих помилково негативних відповідей при виявленні генотоксичних і канцерогенних факторів зручно використовувати такий показник як мітозмодифікована активність досліджуваного фактору, яка визначається за рівнем мітотичної активності тканини і відносної тривалості фаз мітозу. Дослідження мітозмодифікованої активності дозволяє виявити ранні зміни цитогенетичної системи організму, викликані комплексом різних порушень.

Мітозмодифікований ефект в меристемі кореня рослин досліджується паралельно з визначенням частоти хромосомних аберацій. Отже, в одному тесті можна зареєструвати широкий спектр порушень генетичних структур і генетичних процесів, що спрощує дослідження і зменшує витрати на його проведення.

Таким чином використання рослинної тест-системи дозволяє не тільки сказати про кількісний вплив досліджуваного фактору на живий об'єкт, але і визначити характер впливу по ураженим ділянкам генетичного матеріалу.

Методика проведення тестування

Хімічні реактиви, які використовуються для досліду, наведені в

таблиці 3.

Таблиця 3

Хімічні реактиви

Речовина	Методика приготування
Ацетоорсеїн 2%	2 г орсеїну розчиняють в 100 мл гарячої 45%-ої оцтової кислоти, доводять до таємного кипіння (кипіння не припустимо) і фільтрують. Використовується для забарвлення корінців.
Фіксатор Кларка	суміш 96% етилового спирту і крижаної оцтової кислоти в співвідношенні 3:1. Використовується для фіксації корінців.
Спирт 70%	суміш 96% етилового спирту і дистильованої води. Використовується для довготривалого зберігання корінців.
Оцтова кислота 40-45%	суміш крижаної оцтової кислоти і дистильованої води. Використовується для приготування препаратів.

Підготовка матеріалу: виберіть цибулини для дослідження. Вибірка повинна бути однорідною як в контрольному, так і в дослідному варіантах досліду. Середня маса посіву – 10-20 г, діаметром 1,5-2 см.

Вибрані цибулини не повинні бути пересушені. Це можна зрозуміти, знявши зайве лушпиння, яке до того ж може заважати проведенню досвіду. До початку експерименту у цибулин не повинно бути зелених паростків листя, які проклюнулися.

Підготовка фактору мутагенезу і процедура тестування. Існує два варіанти Allium-тесту: оригінальний і модифікований. В оригінальному варіанті тесту цибулини поміщають для пророщування корінців в чисту воду (прим: автор допускає використання водопровідної води. Слід взяти до уваги той факт, що в Швеції, звідки родом автор, водопровідна вода дійсно дуже чиста. Як варіант, можна використовувати очищену питну воду низької мінералізації). Після досягнення корінцями 1-2 см цибулини переносять в ємності з досліджуваним розчином на певний час (від 2 годин, у разі з розчином колхіцину – до 3 днів). Оригінальний варіант найбільш зручний при тестуванні фізичних факторів.

У модифікованому варіанті тесту цибулини поміщають безпосередньо в досліджуваний розчин без попереднього пророщування корінців. Даний варіант

частіше використовується при тестуванні хімічних речовин.

Для чистоти експерименту допустимо використання дистильованої води. При цьому цибулина буде рости за рахунок внутрішніх поживних резервів протягом усього експерименту, не відчуваючи пригніченості. В експериментах, де досліджуються хімічно активні речовини, переважно використовують дистильовану воду, щоб уникнути утворення інших сполук. Обмеження тут в тому, що дистильована вода є фізіологічно неповноцінною і в цілому ряді інших тестів її використовувати важко. Однак і в контролі, і в досліді в цьому випадку збиток від дистильованої води вважатимемо рівним, як і інші фонові умови.

Цибулини пророщують від 3 до 4 днів. Бажано використовувати ємності діаметром 1,5 см і заввишки 10 см, щоб у міру зростання коріння не впиралися в дно ємності, в якій вони знаходяться. Інакше це може призводити до деяких біологічних ефектів – реакція меристеми на перешкоду. Для проведення ана-телофазного аналізу беруть частину корінця довжиною близько 1 см. Проводять процедуру фіксації (для довготривалого зберігання). При необхідності корінці відмивають від фіксатора у воді, потім фарбують ацеторсеїном згідно зі стандартною методикою. Для мікроскопування використовують кінчик кореня завдовжки 1-2 мм – зона активного ділення меристематичних клітин.

Обробка матеріалу після проведення експерименту

Для **фіксації** корінці поміщають в ємності з фіксатором Кларка. Ємності герметично закривають і залишають для фіксації клітин на 1-2 дні. Потім матеріал промивають два рази від фіксатора в 70% спирті, і поміщають в ємності з 70% спиртом для довготривалого зберігання. Спирт повинен перевершувати матеріал за обсягом в 4-5 разів.

Забарвлення корінців виробляють 2% ацеторсеїном. Коріння відмивають від спирту у воді (зручно в чашках Петрі). Матеріал переносять в невеликі порцелянові тиглі з тримачем, які на 2/3 заповнюють барвником. Тигель накривають предметним склом. Нагрівають над полум'ям спиртів до таємного кипіння (запотівання покривного скла). Тигель з матеріалом залишають на деякий час для зафарбовування хромосом (від 2 годин до 1 доби). Після цього можна готувати препарати для мікроскопування.

Методика приготування препаратів для мікроскопічного аналізу. Готують тимчасові роздавлені препарати кореневих меристем. Для цього від пофарбованого корінця лезом відрізають кінчик меристеми довгою 2-3 мм (кінчик відрізняється по більш темному забарвленні і потовщенню), поміщають на предметне скло в краплю 45% оцтової кислоти, накривають покривним

склом і за допомогою сірника акуратно розчавлюють до отримання моношару клітин. Препарати аналізують під мікроскопом при збільшенні $12,5 \times 1,5 \times 40$. На препаратах розглядають дрібні, округло-квадратної форми клітини з добре профарбованими ядрами і неушкодженими клітинними стінками.

Скринінг-тест

Перед генетичним аналізом слід провести первинний скринінг-тест, який відразу покаже чи володіє фактор вираженою біологічною активністю. Основним і найбільш важливим досліджуваним макропараметром є ріст коренів. Але крім нього можуть ще вивчатися інші параметри:

- **Тургесценція.** Твердість кінчиків коренів пов'язана зі ступенем токсичності фактору. При високій токсичності фактору тургесценція падає, що може привести до загибелі коренів.

- **Зміна кольору.** Протягом експерименту може змінюватися колір корінців і причина тому - вміст у воді певних солей (наприклад, синьо-зелений від мідного купопросу). Крім того кінчики коренів можуть стати коричневими, що пов'язано з токсичним ефектом фактору, що викликає клітинну смерть.

В якості стандартних досліджуються такі параметри:

1. Форма коренів. Розбухання кінчиків коренів після 4-5 днів впливу свідчить про особливий тип порушення с-мітозі. Вигин коренів або їх кінчиків відбувається, як правило, після впливу розчинів певних солей.

2. Довжина коренів – це значення середньої довжини коренів (для 1 цибулини).

Методика вимірювання довжини коренів. Виміряти довжину коренів можна двома способами:

1. Зазвичай довжина кореневої системи вимірюється зовні ємності за допомогою рулетки (вимір для кожної цибулини). При цьому реєструється максимально досягнута довжина коренів (не враховуючи більш короткі коріння) для кожної цибулини. Потім обчислюється середнє по всій вибірці цибулин (від 3 до 5 штук) у варіанті дослідів. Цей метод дозволяє проводити вимірювання протягом експерименту.

2. Більш точним є другий спосіб. Після закінчення експерименту коріння зрізаються у цибулини під основу, вимірюється довжина кожного корінця, обчислюється середнє значення (середнє значення для кожної цибулини). Пошкоджені коріння не враховуються. Потім встановлюється середнє значення довжини коренів для всієї вибірки цибулин.

Обчислення параметра кореневого приросту можна здійснити двома

способами:

1. Розраховується середня довжина коренів для кожної цибулини в дослідних і контрольних групах. Потім обчислюється загальне середнє значення довжини для дослідної та контрольної груп. Обчислюється у скільки разів довжина коренів у дослідній групі більше / менше ніж у контрольній і виражається у відсотках. Статистичну обробку результатів проводять з використанням дисперсійного аналізу і / або критерію Стюдента.

Можна обчислювати середнє значення відразу в цілому по кожному варіанту експерименту (тобто не обчислюючи середнього значення для конкретної цибулини, оскільки вся група цибулин перебувала в однорідних умовах). Для порівняння сумарних вибірок з дослідної та контрольної груп можна використовувати дисперсійний аналіз і критерій Стюдента.

Зміна довжини коренів в Allium-тесті є показником токсичності. Це дуже чутливий показник, який легко реєструється візуально і не вимагає ніяких спеціальних реактивів і апаратури, добре корелює з мікроскопічними параметрами і тому запропонований як короткострокового скринінг-тест. Якщо відбувається значне пригнічення росту коренів у порівнянні з контролем, то відзначають токсичний ефект фактору. У разі значного приросту коренів, говорять про стимулюючий ефект.

Мікроскопічні дослідження і статистична обробка

Розрахунок частоти мутацій. У Allium-тесті для розрахунку частоти мутацій традиційно застосовується метод анателофазного аналізу частоти хромосомних аберацій.

На стадії анателофази реєструються мутації, пов'язані з грубим порушенням структури хромосом, а також з пошкодженням мітотичного веретена (веретена поділу) або зміною поведінки хромосом на веретені поділу: відставання хромосом, аберантні мітози (триполюсні мітози, чотирьохполюсні мітози, асиметричні мітози).

При оцінці мутагенної активності хімічних речовин досить використовувати лише анателофазний аналіз, тобто реєструвати мутації в фазах мітозу, так як меристеми протягом всього дослідження знаходяться в контакті з чинником, який на них впливає. У проміжках між опроміненнями відбувається перетворення індукованих в анафазі і телофазі хромосомних фрагментів - клітини виходять з мітозу і переходять в інтерфазу, а фрагменти стають мікроядрами. В результаті ці мутації залишаються неврахованими. У зв'язку з цим була запропонована модифікація методу Allium-тесту, яка дозволяє

враховувати всю суму мутацій.

На одному препараті було рекомендовано застосовувати ана-телофазний аналіз і мікроядерний тест. При цьому аналізується вся сукупність клітин (діляться і не діляться), що дозволяє уникнути помилково негативних результатів і отримати більш достовірні результати.

Розрахунок мітотичних індексів (табл. 4) можна проводити на тих же препаратах, що і анателофазний аналіз. Проглядається від 400 до 600 клітин (більше - краще). Підраховується загальна кількість клітин, які діляться і окремо клітини на різних стадіях мітозу.

Таблиця 4

Мітотичні індекси

Позначення фази/індексу	Характеристика	Розрахунок індексу
МІ	мітотичний індекс – відсоток клітин, що діляться від загальної кількості проаналізованих клітин, %.	$MI = \frac{P+M+A+T}{N} * 100\%, \text{ де}$ (P+M+A+T) – сума клітин, які знаходяться на стадії профазі, метафази, ана- і телофази, N – загальна кількість проаналізованих клітин
Рі	профазний індекс – відсоток клітин в профазі мітозу від загальної кількості проаналізованих клітин, %.	$Pi = \frac{P}{P+M+A+T} * 100\%, \text{ де } (P+M+A+T)$ – сума клітин, які знаходяться на стадії профазі, метафази, ана- і телофази, P – кількість профаз у порахованих клітинах
Мі	метафазний індекс – відсоток клітин в метафазі мітозу від загальної кількості проаналізованих клітин, %.	$Mi = \frac{M}{P+M+A+T} * 100\%, \text{ де}$ (P+M+A+T) – сума клітин, які знаходяться на стадії профазі, метафази, ана- і телофази, M – кількість метафаз у порахованих клітинах

		<i>клітинах</i>
Ai	анафазний індекс - відсоток клітин в анафазі мітозу від загальної кількості проаналізованих клітин, %.	$Ai = \frac{A}{P+M+A+T} * 100\%$, де (P+M+A+T) – сума клітин, які знаходяться на стадії профазі, метафази, ана- і телофази, A – кількість анафаз у порахованих клітинах
Ti	телофазний індекс - відсоток клітин в телофазі мітозу від загальної кількості проаналізованих клітин, %.	$Ti = \frac{T}{P+M+A+T} * 100\%$, де (P+M+A+T) – сума клітин, які знаходяться на стадії профазі, метафази, ана- і телофази, T – кількість телофаз у порахованих клітинах
A-Ti	ана-телофазний індекс - відсоток клітин в анафазі і телофазі мітозу від загальної кількості проаналізованих клітин, %.	$A-Ti = \frac{A+T}{P+M+A+T} * 100\%$, де (P+M+A+T) – сума клітин, які знаходяться на стадії профазі, метафази, ана- і телофази, A+T – кількість ана- і телофаз у порахованих клітинах

ПРАКТИЧНА РОБОТА №6

ТЕМА: Біологічне очищення стічних вод за допомогою активного мулу

МЕТА ЗАНЯТТЯ: ознайомитися з методикою очищення стічних вод за допомогою активного мулу.

ЗМІСТ І МЕТОДИКА ПРОВЕДЕННЯ ЗАНЯТТЯ:

Активний мул – метод біологічного очищення стічних вод, в основі якого лежить біотичний колообіг речовин, що включає процеси утилізації, трансформації та мінералізації органічних речовин за допомогою реалізації процесу аеробної ферментації органічних стоків специфічним комплексом мікроорганізмів з бактерій, черв'яків, грибів, водоростей, найпростіших, коловороток, нематод, кліщів та ін.

Вид біологічного очищення методом активного мулу є екологічно чистим та економічно найбільш раціональним заходом. Більше 90% стічних вод очищається саме цим методом. Біологічна очистка стічних вод, яка застосовується на очисних спорудах каналізації, складає блок біологічної очистки з аеротенків і вторинних відстійників і застосовується після механічної очистки стічних вод в блоках механічної очистки.

Аеротанк (аеротенк) – споруда для штучного біологічного очищення стічних вод за допомогою активного мулу (бактерії-мінералізатори та інші

нижчі організми) і продування повітрям (аерації).

Біотехнологія очищення стічних вод активним мулом була запропонована і реалізована в Англії у 1914 р. і відтоді принципово не змінилася.

Біологічне очищення стічних вод здійснюється за рахунок спроможності мікроорганізмів використати для свого живлення органічні речовини необхідні для їхньої життєдіяльності – азот, фосфор, калій з різноманітних сполучень, що містяться в стічних водах.

В процесі живлення мікроорганізми одержують матеріал для побудови свого тіла, внаслідок чого відбувається приріст маси активного мулу.

Активний мул являє собою складну екосистему, до складу якої входить велика кількість представників мікрофлори і мікрофауни: нитчасті бактерії, гіфи водних грибів, дріжджі, джгутикові, саркодієві, інфузорії, коловертки, водні черви та в невеликих кількостях інші багатоклітинні безхребетні (водяні кліщі, гастротрихт тощо). Активний мул на 95 і більше відсотків складається з прокаріотів, здебільшого бактерій, і тільки менше 5% біомаси мулу становлять найпростіші.

Основу цієї системи як у кількісному співвідношенні, так і за значимістю в процесі очищення складають бактерії у вигляді пластівцеподібних скупчень – *Zoogloea*.

Здатність активного мулу утворювати міцні пластівці, що швидко осідають (седиментаційна властивість) – відноситься до його головних технологічних властивостей, і їм належить найважливіша роль у забезпеченні надійності роботи біологічних очисних споруд.

Порушення седиментаційних властивостей активного мулу призводить до так званого «спухання» активного мулу – він починає мати малу щільність, займає великий об'єм, проходить збільшення мулового індексу до значень понад 150 мл/г, внаслідок чого активний мул не встигає повністю відокремитися від очищеної рідини після двогодинного відстоювання у вторинному відстійнику, починає виноситися з вторинних відстійників і вже не втягується в подальший процес очищення води.

Мікроорганізми активного мулу також є біоідентифікаційними методами моніторингу характеру забруднюючих речовин у стічних водах, а також ефективним індикатором виявлення якості активного мулу.

Ланки трофічного ланцюга. Більшості організмів активного мулу характерний гетеротрофний тип харчування, що передбачає засвоєння органічної речовини, яка в завислому або розчиненому стані надходить в

аеротенк разом зі стоками.

До 70% чисельності та біомаси організмів активного мулу складають гетеротрофні бактерії, хоча вміст цих бактерій в активному мулі, може бути різним, що залежить від умов проведення процесу. Часто, бактерії, завдяки характерному для кожного виду бактерій певному набору ферментів, спеціалізуються на тому чи іншому типі забруднення, що обумовлює їх паралельну роботу над нейтралізацією забруднюючих речовин стоків.

Засвоюють органічні речовини в розчиненому або завислому стані:

- бактерії:
- неспороутворюючі грамнегативні палички: *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Achromobacter*;
- водяні гриби родів: *Fusarium*, *Mucor*, *Saccharomyces*;
- джгутикові: *Tetrachymina pyriformis*.

Інфузорії активного мулу, а саме представники наступних родів характеризуються голозойним типом живлення: *Paramecium*, *Colpidium*, *Glaucocoma*, *Sentor*, *Vorticella*, *Carchesium*, *Eoistylis*, *Zoothamnium*, *Opercularia*.

Наступна ланка трофічного ланцюга належить джгутиковим, представникам рівновійкових (роди *Chilodonella*, *Colpoda*, *Trochilla*), спіральновійкових (роди *Aspisisca*, *Oxytricha*, *Opisthotricha*), а також деяким багатоклітинним безхребетним (нематоди, малощетинкові черви, коловертки).

Подальший етап пов'язаний з розвитком хижацтва: інфузорії родів *Euplotes*, *Didinium*, *Tokophria*, *Acineta*; деякі джгутикові: *Bodo edax*, *Peranema trichophorum*); коловертки та малощетинкові черви.

Типова технологічна схема такого очищення води. Стічна вода, з блоку механічної очистки, після механічного очищення від крупних часток, що осідають чи спливають у полі земного тяжіння, потрапляє в аеротенк – вузьку (3-11 м), глибоку (4-6 м) і довгу (50-250 м) споруду, де за допомогою дрібнобульбашкового аератора нагнітається повітря. В аеротенку, за постійної аерації стічна вода очищається складним гідробіоценозом – **активним мулом**. Обробка триває 6-24 (і навіть більше) годин.

Після обробки вода надходить у вторинний відстійник, в якому звільняється від активного мулу, а потім потрапляє для так званого третинного фізико-хімічного доочищення (іноді після хлорування) у проміжні водойми (ставки) і, нарешті, у річку. Частину активного мулу з сорбованими неокисленими забрудненнями, що осідає у вторинному відстійнику, повертають до біологічної очисної споруди – аеротанку.

За такої технології утворюється надлишковий мул, що створює складну для розв'язання еколого-технологічну проблему: його дуже багато і він містить небезпечні віріони, мікроорганізми, яйця гельмінтів тощо, а також іони важких металів, біологічно стійкі, токсичні і навіть мутагенні сполуки.

Умови проведення процесу залежать від наявності і оптимального співвідношення в стічних водах органічного вуглецю, азоту і фосфору, мікроелементів (сірки, марганцю, заліза, кобальту і ін.), дотримання гранично допустимих концентрацій забруднюючих речовин, відсутності в стічних водах токсичних для мікроорганізмів речовин, достатньої кількості кисню та інтенсивності аерації, температурного режиму, значення рН, навантаження на мул за кількістю забруднюючих речовин, часу контакту мулу і стічних вод, конструктивних і особливостей споруд та біологічної схеми очищення, і ін.

Надлишковий мул збирається та підсушується на мулових майданчиках. Способом утилізації надлишкового мулу, а також стічних вод органічного походження може бути метанова ферментація та біометаногенез з отриманням біогазу.

ПРАКТИЧНА РОБОТА №7

ТЕМА: Мікроклональне розмноження рослин

МЕТА ЗАНЯТТЯ: ознайомитися з методикою мікроклонального розмноження рослин.

ЗМІСТ І МЕТОДИКА ПРОВЕДЕННЯ ЗАНЯТТЯ:

Метод клонального мікророзмноження рослин – одержання в умовах *in vitro* нестатевим шляхом рослин, генетично ідентичних вихідному екземпляру. В його основу покладено унікальну здатність рослинної клітини до реалізації властивої їй тотипотентності, тобто під впливом екзогенних факторів давати початок цілому рослинному організму.

Порівняно із традиційними способами вегетативного розмноження, метод клонального мікророзмноження має ряд переваг:

1. забезпечує одержання генетично однорідного посадкового матеріалу, одержання безвірусних рослин;
2. високий коефіцієнт розмноження (105-106 – для трав'янистих і квіткових рослин, 104-105 – для чагарникових, деревних, 104 – для хвойних);
3. скорочення тривалості селекційного процесу;
4. прискорення переходу рослин від ювенільної до репродуктивної фази розвитку;

5. розмноження рослин, які не дають життєздатного насіння;
6. можливість проведення робіт протягом року та економію площ, необхідних для вирощування посадкового матеріалу;
7. автоматизацію процесу вирощування.

Вперше застосування методу клонального мікророзмноження було запропоновано наприкінці 1950-х рр. французьким ученим Ж. Морелем, якому вдалося одержати перші рослини-регенеранти орхідей. Досягненню успіху передувало розроблення техніки культивування апікальної меристеми рослин в умовах *in vitro*.

Процес клонального мікророзмноження можна розділити на чотири етапи (рис. 2):

1. Вибір рослини-донора, ізолювання експлантатів та одержання активно ростучої стерильної культури;
2. Власне мікророзмноження, в результаті чого досягається одержання максимальної кількості мікропагонів;
3. Укорінення розмножених пагонів і наступна їх адаптація до ґрунтових умов, а за необхідності – депонування рослин-регенерантів при знижених температурах (+4 – 2°C, +10°C);

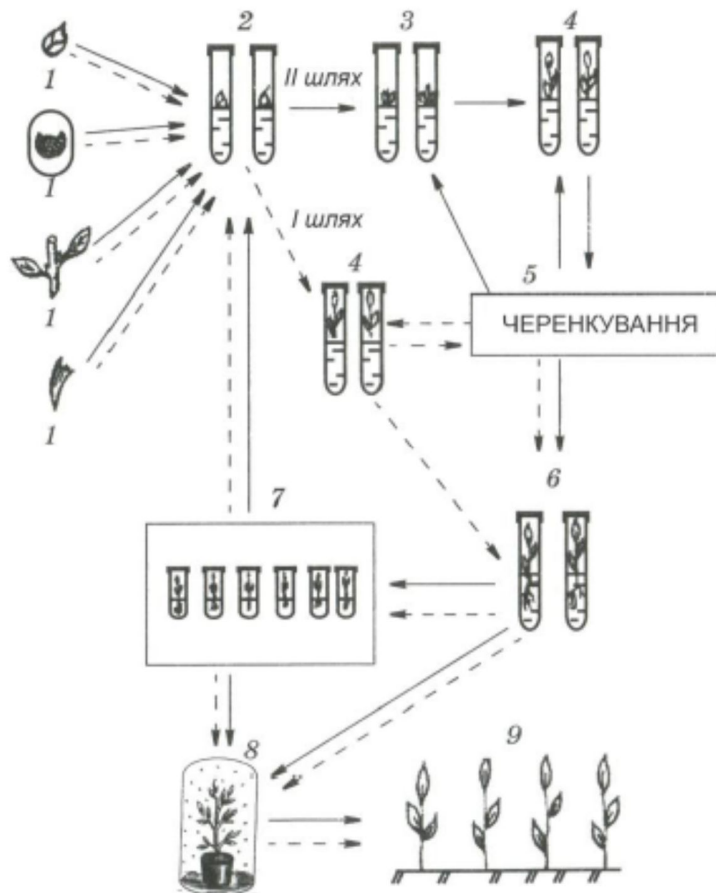


Рис. 2. Схема клонального мікророзмноження рослин методом активування розвитку меристемних тканин (I шлях) та індукція утворення адвентивних бруньок на первинному експлантаті (II шлях). 1 – вибір вихідного експлантату; 2 – одержання стерильної культури; 3 – утворення адвентивних бруньок безпосередньо на первинному експлантаті; 4 – ріст бруньок і формування мікропагонів; 5 – розмноження мікропагонів (мікроживцювання); 6 – укорінення мікропагонів; 7 – депонування рослин-регенерантів при зниженій температурі (+2 °C); 8 – переведення рослин у тепличні умови; 9 – висадження рослин-регенерантів у польові умови.

4. Вирощування рослин-регенерантів в умовах теплиці і підготовка їх до реалізації або висадження в польові умови.

Мікроклональне розмноження рослин може бути здійснене наступними методами:

- активуванням розвитку меристемних тканин рослин (апекс стебла, пазушні і сплячі бруньки та інтеркалярні зони стебла) (рис. 3);

- індукцією виникнення адвентивних бруньок безпосередньо тканинами експлантату;
- індукцією соматичного ембріогенезу;
- диференціацією адвентивних бруньок у первинної перепасированої калюсної тканини.

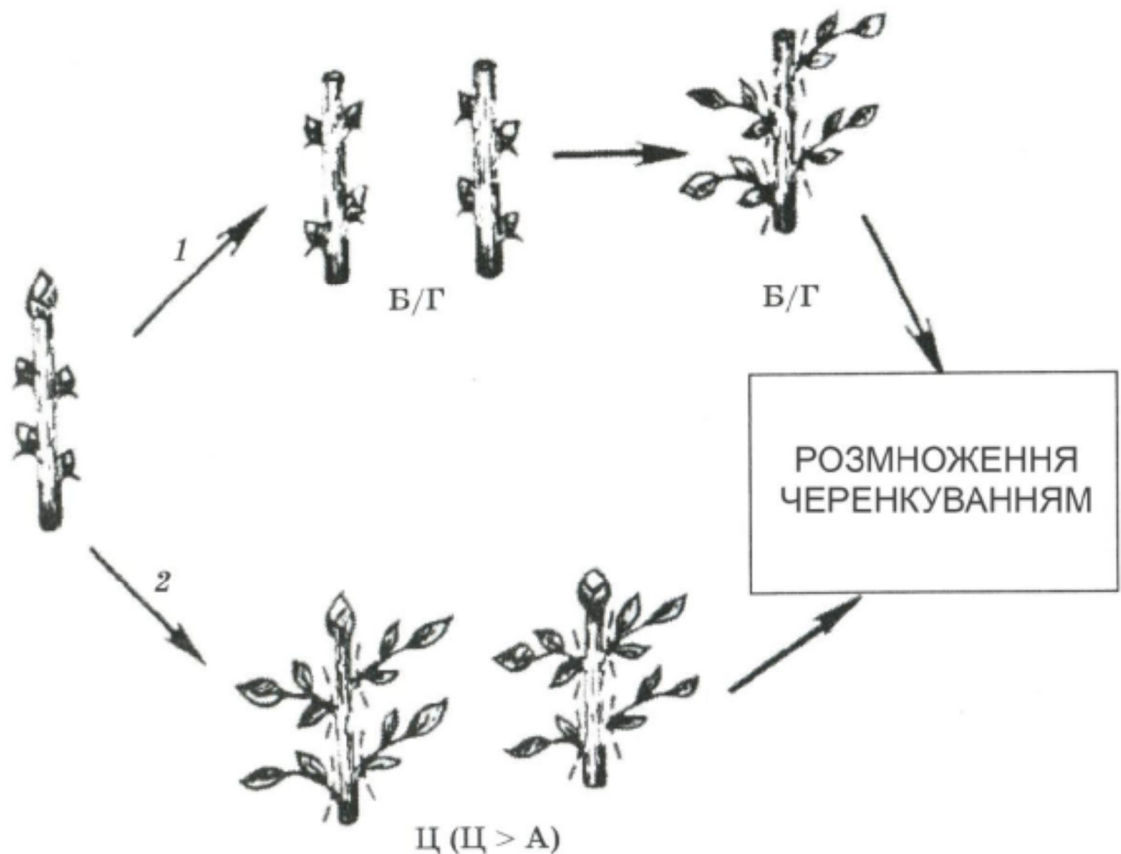


Рис. 3. Схема розмноження рослин методом активування меристемних тканин: 1 – видалення верхівкової меристеми; 2 – додавання в живильне середовище цитокінінів (Б/Г – безгормональне середовище; Ц – цитокініни; А – ауксини).

Серед методів клонального мікророзмноження рослин основним є **метод активування розвитку меристемних тканин рослини**, що базується на інгібуванні апікального домінування досягається двома шляхами:

- видаленням верхівкової меристеми стебла з подальшим мікроживцюванням пагона *in vitro* на безгормональному середовищі;
- додаванням у живильні середовища речовин цитокінінового типу дії, завдяки чому індукується розвиток численних пазушних пагонів.

Як цитокініни зазвичай використовують 6-бензиламінопурин (БАП) або 6-фурфуриламінопурин (кінетин), а також 2-ізопентениладенін і зеатин. Отримані таким способом пагони відокремлюють від первинного материнського експлантату і культивують на свіжоприготовленому живильному середовищі, стимулюючи проліферацію пазушних меристем і виникнення пагонів більш високих порядків.

Наразі цей метод широко застосовують у виробництві безвірусного посадкового матеріалу різних сільськогосподарських культур – овочевих (томати, картопля, огірок, перець, гарбуз, спаржа та ін.); культур промислового квітникарства (гвоздика, хризантема, троянда, гербера); плодових та ягідних культур (яблуня, слива, вишня, груша, виноград, малина, смородина, агрус та ін.); деревних порід (тополя, верба, вільха, береза, горобина, секвоя, туя, ялівець та ін.). Для деяких сільськогосподарських культур, зокрема картоплі, технологія клонального мікророзмноження поставлена на промислову основу. Застосування методу активування розвитку меристемних тканин рослин дозволяє одержувати з однієї меристеми картоплі більше 105 рослин на рік. Технологія передбачає також одержання в пробірках мікробульб – цінного безвірусного насіннєвого матеріалу.

Другий метод – індукція виникнення адвентивних бруньок безпосередньо тканинами експлантату – заснований на здатності ізольованих частин рослини при сприятливих умовах живильного середовища відновлювати органи і регенерувати цілі рослини. За допомогою цього методу можна досягти регенерації майже будь-яких органів і тканин рослини (ізольованих зародків, листків, стебел, сім'ядоль, лусочок і денця цибулин, сегментів коренів та зачатків суцвіть) за умов одержання безвірусного матеріалу. Цей процес, як правило, відбувається на живильних середовищах, що містять один із цитокінінів або при його поєднанні з речовиною групи ауксинів. Як ауксин у цьому випадку найчастіше використовують (3-індоліл оцтову кислоту (ІОК) або α -нафтилоцтову кислоту (НОК) у співвідношенні 10:1 або 100:1.

Індукція виникнення адвентивних бруньок – один із найбільш поширених методів мікроклонального розмноження вищих рослин. Так, багато цибулинних квіткових рослин (нарциси, лілії, гіацинти, гладіолуси, тюльпани) були розмножені з цибулинних лусочок, сегментів базальної частини денця цибулин, експлантатів листків; представники роду *Brassica* (капуста кольорова, качанна, брюссельська, листовая, брокколі) – із сегментів гіпокотилля, сім'ядоль, листків; цибуля та часник – з верхівкової меристеми, тканини дінця цибулини; томати –

з апікальних або пазушних меристем; петунія – із сегментів корінців; глоксинія, фіалки – із сегментів листових пластинок; деякі представники деревних порід – з ізольованих зрілих і незрілих зародків

Третій метод - одержав назву соматичного ембріогенезу і ґрунтується на диференціації із соматичних клітин зародкоподібних структур, які за зовнішнім виглядом нагадують зиготичні зародки. Основна відмінність утворення зародків *in vitro* від *in vivo* (у природних умовах) полягає в тому, що соматичні зародки розвиваються асексуально поза зародковим мішком і є біполярними структурами, в яких одночасно спостерігається розвиток апікальних меристем стебла і кореня. Метод використовується для розмноження більшості рослин із родин *Orchidaceae* та *Rutaceae*, деяких представників злакових (пшениця, ячмінь), люцерни, редису, винограду, а також деяких видів деревних порід (осика, евкаліпт, дуб, ялина звичайна).

Четвертий метод клонального мікророзмноження – диференціація адвентивних бруньок у первинній і перепасированій калюсній тканині. Обмеженою мірою застосовується для одержання посадкового матеріалу *in vitro*, що пов'язано з виникненням небажаних змін при періодичному пересаджуванні калюсних тканин на свіже живильне середовище в разі тривалого культивування. Вони полягають у зміні плідності культивованих клітин, структурних перебудовах хромосом, виникненні генних мутацій, втраті морфогенетичного потенціалу.

Основна перевага клонального мікророзмноження полягає в можливості одержання генетично однорідного, безвірусного посадкового матеріалу. Цього досягають, використовуючи меристематичні тканини апексів і пазушних бруньок органів стеблового походження. Як відомо апікальна меристема складається з конуса наростання, одного або двох листових зачатків (примордіїв) і є вільною від інфекцій.

Фактори, які впливають на процес мікроклонального розмноження. На ефективність мікроклонального розмноження впливають фізіологічні особливості рослини-донора, хімічні та фізичні умови культивування. Найбільш важливими факторами є вибір материнської рослини та експлантату. При *виборі материнської рослини* необхідно враховувати фізіологічні, сортові і видові особливості. Рослини-донори повинні бути здоровими, не уражені грибними, бактеріальними та вірусними хворобами і знаходитись у стані інтенсивного росту (вихід із фази спокою і перехід до активного росту).

При *виборі експлантату* необхідно враховувати його вік, будову і

походження. Для забезпечення максимальної стабільності клонованого матеріалу і запобігання появи аномальних рослин, як експлантат використовують молоді, слабо диференційовані тканини. Оскільки, експлантати від ювенільних рослин набагато краще укорінюються, порівняно із зрілими. Особливо це стосується деревних порід.

Тривалість культивування впливає на ефективність клонального мікророзмноження рослин. При тривалому культивуванні протягом декількох пасажів змінюється фізіологічний стан пагонів і зростає частота їх укорінення, а експлантат набуває ознак ювенільності, що впливає на підвищення морфогенетичного потенціалу.

Успіх введення в культуру *in vitro* рослинних тканин часто визначається ефективністю стерилізації і вибором стериліанту, який залежить від особливостей експлантату (ніжних, легко ушкоджуваних рослин і таких тканин, що мають більш щільну оболонку). Дуже часто внутрішнє ураження вихідних експлантатів патогенами буває набагато сильнішим поверхневого, тому їх попередньо обробляють фунгіцидами і антибіотиками для знищення грибних і бактеріальних інфекцій.

Залежно від виду рослин необхідно проводити дослідження для визначення оптимального *складу та консистенції живильних середовищ*. На клональне мікророзмноження впливають регулятори росту, біологічно активні речовини, мінеральні солі, вітаміни і вуглеводи.

До фізичних факторів вирощування відносяться температура і умови освітлення. На перших двох етапах освітленість коливається від 1000 до 3000 лк при фотоперіоді 14-16 годин, відносній вологості повітря – 65-70%, але величини цих параметрів залежать від конкретної культивованої культури. Висока інтенсивність світла може спричинювати хлорози і затримувати розвиток рослин-регенерантів. Однак при перенесенні в ґрунт, у них відмічається краща приживлюваність і більша активність росту.

Температура культивування зазвичай варіює в інтервалі 22-26 °С в денний період доби і 18-22 °С – в нічний. В деяких випадках зниження температури супроводжується підвищенням ефективності розмноження рослин. Для підвищення коефіцієнта розмноження необхідно для рослин кожного виду підбирати індивідуальні умови культивування з урахуванням його природного ареалу.

Адаптація рослин-регенерантів. Пересадження рослин-регенерантів в субстрат – відповідальний етап, який завершує процес клонального

мікророзмноження. Найбільш сприятливим періодом для пересадження пробіркових рослин є весна або початок літа. Рослини з двома – трьома листками і добре розвиненою кореневою системою обережно виймають із колб або пробірок пінцетом з довгими кінцями або спеціальним крючком. Корені ретельно відмивають від залишків агару і висаджують в ґрунтовий субстрат, попередньо простерилізований при +85 °С протягом 1-2 год. Для більшості рослин як субстрат використовують торф, пісок (3:1); торф, дерновий ґрунт, перліт (1:1:1); торф, пісок, перліт (1:1:1). Підготовленим ґрунтовим субстратом заповнюють пікірувальні ящики або торф'яні горшечки, в яких вирощують рослини-регенеранти. Горшечки з рослинами поміщають в теплиці з регульованим температурним режимом (+20-22 °С), освітленістю не більше 5000 лк і вологістю 65-90%. Для кращого росту рослин створюють умови штучного туману.

Через 20-30 днів після посадки, добре укорінені рослини підживлюють розчинами мінеральних солей Кнудсона, Мурасіге і Скуга, Чеснокова, Кнопа (залежно від виду рослин) або комплексним мінеральним добривом. По мірі росту рослин їх періодично пересаджують у більші ємності зі свіжим субстратом. В подальшому акліматизовані рослини вирощують відповідно до прийнятої агротехніки для кожного індивідуального виду рослин.

Процес адаптації пробіркових рослин до ґрунтових умов – найбільш дорога і трудомістка операція. Нерідко після пересаджування рослин в ґрунт спостерігається призупинення їх росту, опадання листків і загибель рослин. Ці явища пов'язані, в першу чергу, з порушеннями діяльності продихового апарату листків пробіркових рослин, внаслідок чого відбувається втрата великої кількості води. По-друге, у деяких рослин в умовах *in vitro* не утворюються кореневі волоски, що призводить до порушення поглинання кореневою системою води і мінеральних солей із ґрунту. Тому доцільно на третьому або четвертому етапах процесу клонального мікророзмноження застосовувати штучну мікоризацію рослин (для мікотрофних), яка відіграє позитивну роль у їх забезпеченні мінеральними і органічними поживними речовинами, водою, біологічно активними речовинами, а також в захисті рослин від патогенів.

ПРАКТИЧНА РОБОТА №8

ТЕМА: Виділення і культивування апікальних меристем картоплі

МЕТА ЗАНЯТТЯ: ознайомитися з методикою виділення і культивування апікальних меристем картоплі.

ЗМІСТ І МЕТОДИКА ПРОВЕДЕННЯ ЗАНЯТТЯ:

Для оздоровлення рослин і отримання безвірусного посадкового матеріалу практично усіх сільськогосподарських культур використовують культуру апікальних меристем.

Клітини конусу наростання, які активно діляться, розміщені на верхівці пагона, яка не містить вірусів. Зазвичай на живильне середовище висаджують невелику частину меристеми – не більше 0,5 мм. Чим менша величина ділянки меристеми, тим більша вірогідність отримання безвірусних рослин. Найбільш повно розроблена промислова технологія отримання безвірусного матеріалу картоплі.

В культурі *in vitro* для досягнення цієї мети використовують апекси верхівкових і бокових бруньок та меристеми бічних та придаткових коренів (рис. 4).

Тканини меристеми:

- 1 – в зародку насіння
- 2 – в пророщеній рослині
- 3 – на кінці кореня
- а – верхівкова меристема пагона
- б – верхівкова меристема кореня
- в – прокамбій
- г – інтеркалярна меристема листка
- д – інтеркалярна меристема пагона
- е – камбій
- ж – верхівкова меристема придаткового кореня
- з – верхівкова меристема бічного кореня
- и – верхівкова меристема пазушної бруньки
- к – ксилема
- л – перицикл
- м – флоема

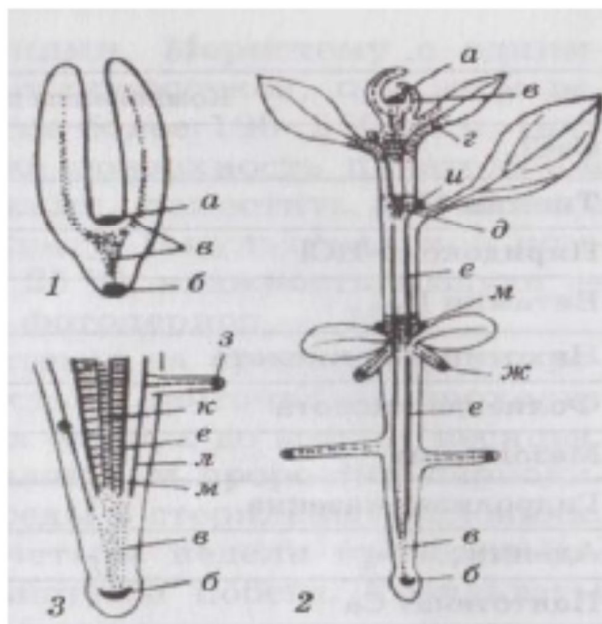


Рис. 4. Морфологічні особливості будови рослин картоплі

ХІД РОБОТИ

1. Приготувати живильне середовище для культивування апікальних меристем картоплі, згідно складу, наведеного в табл.5, розлити у пеніцилінові флакончики і простерилізувати.

Таблиця 5

Модифіковане живильне середовище Мурасіге-Скуга (МС) для культивування апікальних меристем картоплі

Компоненти живильного середовища	
Маточний розчин макросолей	50 мл/л
Маточний розчин мікросолей	1 мл/л
Fe-хелат	5 мл/л
CaCl ₂	5 мл/л
Тіамін - HCl	1 мл/л
Пірідоксин-HCl	1 мл/л
Вітамін B12	0,015 мг/л
Нікотинова кислота	2 мг/л
Фолієва кислота	0,5 мг/л
Мезоінозит	100 мг/л
Гідролізат казеїна	1 г/л
Аденін	40 мг/л
Пантотенат Са	10 мг/л
Рибофлавін	0,5 мг/л
Біотин	1 мг/л
Активоване вугілля	10 г/л
ГК	2 мг/л
Кінетин	0,5 мг/л
Сахароза	20 г/л
Глюкоза	20 г/л
Агар-агар	7 г/л
pH 5,7-5,8	

2. Поверхню ламінар-боксу, штативи, пробірки, мікроскоп обробити ультрафіолетом і 96% спиртом. Препарувальні голки, пінцети, скальпелі помістити в 96% спирт і перед кожною маніпуляцією обпалювати у полум'ї спиртівки.

3. Паростки довжиною 2 см відділити від бульб і помістити поетапно у чашки Петрі зі стерилізуючими розчинами: в діацид на 3-5 хв, в 70% спирт – на 1-2 хв., після чого промити 3 рази по 10 хв. стерильною дистильованою водою і перенести в стерильні чашки Петрі.

4. Тонкою препарувальною голкою видалити у паростків всі листки, послідовно оголюючи верхівкові і бокові меристеми із примодіями. Меристему з одним-двома примодіями відділити від проростків. При цьому величина експлантата повинна бути не більше 100-250 мкм.

5. Експлантати помістити в пробірки на поверхню живильного середовища. Пробірки закрити пробками і штатив перенести в культуральну кімнату, де необхідно підтримувати температуру +25 °С, вологість повітря – 70%, освітленість – 5 Клк і фотоперіод – 16 годин.

6. Від посадки меристеми на середовище до формування паростків із 5-6 листочками проходить в середньому 30-45 діб, в деяких випадках – від двох до восьми місяців. Живильне середовище по мірі його виснаження оновлюють, періодично пересаджуючи паростки на свіже середовище в стерильних умовах.

7. Через два, три і чотири тижні проводять спостереження за розвитком пагонів із апікальної меристеми. Утворені рослини-регенеранти замальовують і роблять висновки.

ПРАКТИЧНА РОБОТА №9

ТЕМА: Виділення ядерної ДНК з рослинних тканин

МЕТА ЗАНЯТТЯ: оволодіти методикою виділення рослинної ДНК.

ЗМІСТ І МЕТОДИКА ПРОВЕДЕННЯ ЗАНЯТТЯ:

Нуклеїнові кислоти – складні високомолекулярні біополімери, мономерами яких є нуклеотиди. Уперше амінокислоти виявили в ядрі клітин, звідки й походить назва цих сполук (від лат. нуклеус – ядро). Молекула нуклеотиду складається з трьох частин: нітратної основи, п'ятивуглецевого моносахариду (пентози) та ортофосфатної кислоти. Залежно від виду пентози, що входять до складу нуклеотиду, розрізняють два типи нуклеїнових кислот: дезоксирибонуклеїнову (ДНК) і рибонуклеїнові (РНК).

Молекули ДНК у клітинах еукаріотів містяться у ядрі, пластидах і мітохондріях, а в прокаріотів у цитоплазмі. Основна функція ДНК – це кодування збереження і реалізація спадкової інформації, передача її дочірнім клітинам при розмноженні. У клітинах прокаріотів та еукаріотів ДНК завжди складається з двох ланцюгів. Чітка відповідність нуклеотидів у двох ланцюгах має назву – **комплементарність**.

Реплікація – це самоподвоєння молекули ДНК. Реплікація ДНК –

напівконсервативний процес, тобто дві дочірні молекули ДНК містять один ланцуг успадкований від материнської молекули, а інший ново синтезований.

Американський біохімік Чаргаф у 1950 році встановив, що у молекулі ДНК кількість аденіну дорівнює кількості тиміну, а кількість аденіну – кількості цитозину: $A=T$, $G=C$ – правило Чаргаффа. Звідси виходить висновок, що $A+G = T+C$, тобто $(A+T) + (G+C) = 100\%$.

Транскрипція – переписування генетичної інформації з ДНК на РНК.

Трансляція – біосинтез білка.

Ядерну ДНК (знаходиться в ядрі клітини) використовують для аналізу соматичних гібридів. За допомогою методу Саузерн блот-гібридизації досліджують успадкування і організацію в геномах соматичних гібридів ядерної ДНК вихідних батьківських компонентів.

ХІД РОБОТИ

1. Приготувати буферний розчин, склад якого:

- 5М сечовина;
- 0,1М ЕДТО;
- 0,1М тріс-НСІ рН 8,0.

2. Взяти наважку 5-10 г листків або калюсної тканини і помістити в фарфорову ступку, ретельно розтерти з рідким азотом і додати 20 мл буферного розчину.

3. Провести гомогенізацію, додаючи 1 мл насиченого водою фенолу та 2 мл 20 % додецилсульфату натрію.

4. Одержаний гомогенат залишити для лізису при кімнатній температурі на 15-20 хв, відцентрифугувати суміш при 5000 g протягом 30 хвилин.

5. Перенести надосадову рідину у пробірку і провести двократну депротейнізацію сумішшю, яка містить:

- 75% фенолу;
- 24% хлороформу;
- 1% ізоамілового спирту.

Центрифугують протягом 3 хв при 1600g.

6. Відібрати водну фазу. Осадити ДНК, додаючи до водної фази два об'єми етанолу (відповідно до утвореної її кількості) і охолодити при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ протягом 30 хвилин.

7. Відцентрифугувати суміш протягом 10 хвилин при 4000g.

8. Злити надосадову рідину і розчинити одержаний осад ДНК в ТЕ буфері складу:

- 10 мМ тріс-НСl, рН-7,6;
- 1 мМ ЕДТО, рН-8,0;
- рН буферу 7,6.

9. Отриманий розчин ДНК зберігати в морозильній камері при температурі -20 °С.

ПРАКТИЧНА РОБОТА №10

ТЕМА: Виділення плазмідної ДНК

МЕТА ЗАНЯТТЯ: оволодіти методикою виділення плазмідної ДНК.

ЗМІСТ І МЕТОДИКА ПРОВЕДЕННЯ ЗАНЯТТЯ:

Плазміда – молекула ДНК, окрема від хромосомної ДНК та здатна до автономної реплікації. Вона звичайно кругла і дволанцюжкова. Плазміди в природі частіше за все зустрічаються у бактерій, іноді в еукаріотів. Плазміди здатні до реплікації, які широко використовуються в генетичній інженерії.

У одній клітині може бути від одної копії (особливо для великих плазмід) до кількох сотень або навіть тисяч копій тієї ж плазміди (особливо для певних штучних плазмід, сконструйованих для отримання високого числа копій).

Плазміди часто містять ген або кластер генів, які надають добірну перевагу бактерії-хазяїну, наприклад, роблячи бактерію резистентною (стійкою) до дії певного антибіотику. Кожна плазміда містить як мінімум одну послідовність ДНК, яка служить точкою початку реплікації (*ori*), яка надає можливість ДНК плазміди реплікуватися незалежно від хромосомної ДНК.

Гель-електрофорез – аналітичний метод хімії і молекулярної біології для розділення різних видів молекул (рис. 5).

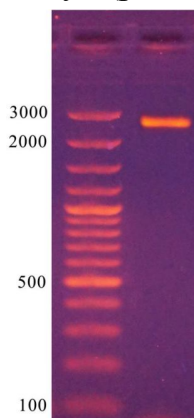


Рис.5. Гель-електрофорез плазмідної ДНК

Суміш молекул пропускається через гель, який являє собою молекулярне сито, яке легше пропускає дрібніші молекули, аніж великі. Рушійну силу

задає електричне поле, тому молекули мають бути заряджені.

Одне із застосувань методу – дослідження плазмідної ДНК. Вона зазвичай кільцева і утворює вторинні структури, наприклад, скручується в суперспіраль. Таким чином, щоб визначити розмір плазмиди, необхідно зруйнувати елементи вторинної структури. Для цього перед нанесенням на гель плазмиду «лініалізують» (роблять лінійною), тобто обробляють однією з рестриктаз (ендонуклеаз). Рестриктазу вибирають так, щоб вона розрізала плазмиду тільки в одному місці.

Метод використовується в молекулярній біології для розділення фрагментів дезоксирибонуклеїнової, рибонуклеїнової кислоти або білків, використовуючи електричне поле, що створюється в гелевій матриці. Метод зазвичай застосовується для аналітичних цілей, але може також використовуватися як попередня стадія таких методів як мас-спектрометрія, поліморфізм довжини рестрикційних фрагментів (ПДРФ), полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР), молекулярне клонування, секвенування ДНК, саузерн-блот, вестерн блот, що застосовуються для аналізу послідовностей молекул або визначення певних білків.

ХІД РОБОТИ

1. Приготувати середовище LB (Luria-Bertani) з ампіциліном, яке містить в 1 л:

- бакто-триптон – 10 г;
- бакто-дріжджовий екстракт – 5 г;
- NaCl – 10 г;
- ампіцилін – 1 мл.

2. В ламінар-боксі середовище LB розлити в колби по 5 мл і висіяти за допомогою бактеріальної петлі одну бактеріальну колонію. Інкубувати на шейкерній мішалці при +37°C протягом ночі при інтенсивному перемішуванні (нічна культура).

3. Перенести 1,5 мл нічної культури в пробірку і центрифугувати протягом 1хв при 10000 об/хв. Решту нічної культури зберігають в холодильній камері при температурі +4 °C.

4. Супернатант злити, а до утвореного осаду додати 0,35 мл розчину, що містить 8% сахарози, 0,5% тритону X-100, 50 мМ ЕДТО, 10 мМ тріс-НСl рН-8,0.

5. Додати 25 мкл розчину лізоциму (10 мг/мл в 10 мМ тріс-НСl рН-8,0) і перемішати скляною паличкою протягом 3 секунд.

6. Пробірку помістити на киплячу водяну баню (100 °C) на 40 секунд.

7. Вміст пробірки центрифугують при 14000 об/хв протягом 10 хв в умовах кімнатної температури.

8. Супернатант перенести в іншу пробірку і додати 40 мкл 2,5 М ацетату натрію та 420 мкл ізопропанолу. Вміст пробірки перемішати, витримати на бані з сухим льодом протягом 15 хвилин і центрифугувати при 14000 g, температурі +4°C протягом 15 хвилин.

9. Супернатант злити, а осад в пробірці висушити при кімнатній температурі, після чого розчинити в 50 мкл буферу TE рН-8,0, який містить РНКазу (50 мг/мл). Одержану суміш інкубують на водяній бані при температурі +37 °С протягом 10 хв. В результаті такої обробки видаляється РНК.

10. Осадити ДНК центрифугуванням при 14000 g протягом 15 хв за умов кімнатної температури.

11. Осад висушити, розчинити в 50 мкл TE буферу, розлити в пробірки по 15 мкл і зберігати при температурі – 20 °С.

12. Одержані фрагменти ДНК аналізують за допомогою гел'єлектрофорезу.

ПРАКТИЧНА РОБОТА №11

ТЕМА: Виділення рослинної РНК

МЕТА ЗАНЯТТЯ: оволодіти методикою виділення РНК.

ЗМІСТ І МЕТОДИКА ПРОВЕДЕННЯ ЗАНЯТТЯ:

Молекули **РНК** клітин прокариотів і еукариотів складаються з одного ланцюга. Молекули рибонуклеїнової кислоти (РНК) лінійні, їх будова схожа на один із ланцюгів ДНК, тобто вони є полімерами і складаються з нуклеотидів, сполучених між собою фосфодіефірними зв'язками. РНК складається із 5-вуглецевого цукру – рибози, залишків фосфорної кислоти та азотистих основ: аденіну, гуаніну, цитозину, урацилу.

За молекулярною масою, структурою і функціями визначають три типи РНК: **мРНК** (матрична, інформаційна), **рРНК** (рибосомна) і **тРНК** (транспортна).

Рибосомні й транспортні РНК становлять близько 98 % усіх молекул РНК. Усі види РНК синтезуються на ДНК під час реакцій матричного синтезу. Молекули всіх типів РНК утворені лінійними послідовностями нуклеотидів. В окремих ділянках молекули РНК можуть утворювати комплементарні зв'язки.

Генетичну інформацію з ядра в цитоплазму переносить мРНК, де разом з рибосомами утворює білок-синтетичний комплекс у процесі трансляції. Її називають також інформаційною РНК, тому що вона несе в собі генетичну інформацію для побудови білка.

Молекули рибосомної РНК найбільші серед РНК, містять до 5000 нуклеотидів. Вони мають лінійну, розгалужену структуру, утворюють петлі різної форми за рахунок комплементарного поєднання окремих основ. Утворюється рРНК на специфічних ділянках ДНК (рРНК-генах), що є в ядерці. Разом з білками рРНК входить до складу малої і великої субодиниць рибосом. У цитоплазмі субодиниці поєднуються на мРНК і утворюють рибосоми; тРНК кодується на специфічних ділянках ДНК (тРНК-генах). Одноланцюгова молекула частково подвоєна. Основна її функція — транспортування амінокислот до місць синтезу.

ХІД РОБОТИ

1. Приготувати буферний розчин для екстракції РНК, склад якого:
 - 0,02 М тріс-НСІ рН-8,9;
 - 2 мМ SDS, 4% бентоніт;
 - 20% фенол.
2. Наважку листків або калюсних тканин в кількості 1 г розтерти в ступці з рідким азотом і додати 2 мл буферу для екстракції РНК.
3. Отриманий гомогенат перенести в пробірку і центрифугувати при 5000 g протягом 30 хв і температурі +4 °С.
4. До супернатанту додати рівний об'єм 80% фенолу в 0,5М тріс-НСІ рН-7,6 і суміш хлороформ: ізоаміловий спирт (24:1) для депротейнізації.
5. Суміш центрифугують при 5000 g протягом 5 хв і температурі +4 °С.
6. Осадити РНК в надосадовій рідині ацетатом амонію до концентрації 0,5 М та 2,5 об'єму 960 етанолу і витримати в холодильній камері при температурі –20 °С протягом 2 годин.
7. Розчин РНК центрифугують при 5000 g і при температурі +4 °С протягом 30 хв.
8. Отриманий осад РНК висушити та розчинити в деіонізованій воді.
9. Переосадити РНК таким же об'ємам ацетату амонію та етанолу, витримуючи в морозильній камері при температурі –70 °С протягом 30 хвилин.
10. Осадити РНК центрифугуванням при 10000 об/хв і температурі +4 °С протягом 3 хвилин.
11. Супернатант злити, а осад висушити, розчинити в тридистильованій

воді, розлити в пробірки і зберігати в холодильній камері при температурі -20°C .

ПРАКТИЧНА РОБОТА №12

ТЕМА: Гель-електрофорез рослинної РНК

МЕТА ЗАНЯТТЯ: визначення молекулярної маси РНК методом електрофорезу в агарозному гелі після денатурації РНК гліоксалем і диметилсульфоксидом.

ЗМІСТ І МЕТОДИКА ПРОВЕДЕННЯ ЗАНЯТТЯ:

Електрофорез – метод поділу макромолекул, що розрізняються за такими параметрами, як розміри (або молекулярна маса), просторова конфігурація, вторинна структура та електричний заряд.

Відомо 2 методи, які найчастіше використовують при розділенні та визначенні молекулярної маси РНК.

1. Електрофорез в агарозному гелі після денатурації РНК гліоксалем і диметилсульфоксидом.

2. Електрофорез в агарозному гелі, який містить формальдегід або гідроксидметил ртуті.

ХІД РОБОТИ

1. Приготувати розчин гліоксалю, обробляючи його іонообмінною смолою (Bio-Rad AG 501-X8) до нейтральної реакції ($\text{pH} = 7,0$), після чого розділити на невеликі аліквоти, зберігаючи в холодильній камері при температурі -20°C .

2. Приготувати розчин фосфату натрію, розчиняючи 0,1 моль NaH_2PO_4 в мінімальному об'ємі води. Довести pH розчину до 7,0 концентрованою фосфорною кислотою (H_3PO_4) і додати дистильованої води до загального об'єму розчину 1 л.

3. В пробірці змішати:

- 2,7 мкл 6М гліоксалю;
- 8,0 мкл диметилсульфоксиду (DMSO);
- 1,6 мкл 0,1 М NaH_2PO_4 pH 7,0;
- 3,7 мкл РНК.

4. Отриманий розчин РНК інкубують на водяній бані при температурі $+50^{\circ}\text{C}$ протягом 60 хвилин.

5. Приготувати 0,8% агарозний горизонтальний гель.

6. Розчин РНК охолодити і додати 4 мкл буферу для нанесення проби РНК

на гель.

7. Гель занурити в фосфатний буфер і пропустити через нього електричний струм при напрузі поля 30-40 В і постійному перемішуванні буферу.

8. Після закінчення електрофорезу для забарвлення гелю додати фарбник бромистий етидій (концентрація 0,5 мкг/мл) і сфотографувати.

ПРАКТИЧНА РОБОТА №13

ТЕМА: Вивчення захисної дії кріопротекторів на стійкість клітин до дії низьких температур

МЕТА ЗАНЯТТЯ: вивчити вплив різних кріопротекторів на стійкість клітин до низьких температур.

ЗМІСТ І МЕТОДИКА ПРОВЕДЕННЯ ЗАНЯТТЯ:

Кріопротектор – речовина, що захищає живі об'єкти від шкідливої дії заморожування. Кріопротектори використовують при **кріоконсервації** – низькотемпературному зберіганні живих об'єктів (іншими словами, при заморожуванні клітинних культур, крові, сперми, ембріонів, ізольованих органів і біологічних об'єктів цілком).

При заморожуванні на живі об'єкти впливають два фактори ушкодження: формування внутрішньоклітинного льоду і зневоднення. Переміщення живих об'єктів у розчини кріопротекторів і заморожування в цих розчинах знижує або виключає повністю формування внутрішньоклітинного льоду і зневоднення.

При дії негативних температур в міжклітинниках рослинних тканин утворюються кристали льоду, що призводить до ушкодження клітинних мембран і зневоднення цитоплазми. За відповідного ступеня зневоднення, індивідуального для кожної рослинної клітини, цитоплазма починає коагулювати.

Кристали льоду можуть утворюватися і безпосередньо в клітинах. Вони механічно діють на мембрани цитоплазми, порушують проникність плазмалем, а при тривалій експозиції на морозі спричиняють загибель клітин, швидкість відмирання яких залежить від температури, часу експозиції та водоутримуючої здатності самої клітини.

Збільшення кількості кріопротекторів у зимуючих органах рослин підвищує водоутримуючу здатність тканин та призводить до підвищення їх морозостійкості.

ХІД РОБОТИ

1. Для приготування охолоджувальної суміші змішують три частини снігу чи льоду з однією частиною кухонної солі. Температура охолоджувальної суміші становить близько -20°C .

2. З коренеплодів цукрових буряків вирізають декілька пластинок товщиною 5 мм.

3. За допомогою пробкового свердла діаметром 5-6 мм роблять висічки з цих пластинок.

4. Висічки ретельно промивають водою до повного видалення решток клітинного соку і по три-чотири поміщають в пробірки. Пробірки підписують відповідно до схеми досліду:

- в пробірку № 1 наливають 5 мл дистильованої води (контроль);
- в пробірку № 2 – 2,5 мл 1 М розчину сахарози і 2,5 мл води;
- в пробірку № 3 – 5 мл 1 М розчину сахарози;
- в пробірку № 4 – 2,5 мл 1 М розчину гліцерину і 2,5 мл води;
- в пробірку № 5 – 5 мл 1 М розчину гліцерину;
- в пробірку № 6 – 2,5 мл 1 М розчину сахарози і 2,5 мл 1 М розчину гліцерину.

5. Пробірки з рослинним матеріалом на 15-20 хв поміщають в свіжоприготовлену охолоджувальну суміш, після чого їх обережно виймають і розморожують в стакані води кімнатної температури.

6. Після розморожування візуально проводять порівняння інтенсивності забарвлення висічок і кольору рідин в пробірках, відзначають і пояснюють їх відмінності.

7. Для перевірки життєздатності клітин із аналізованих висічок виготовляють тонкі зрізи за допомогою скальпеля і препарувальної голки поміщають їх на предметне скло, накривають покрівельним скельцем, поміщають на столик мікроскопу і розглядають при збільшенні $\times 10$ в краплі розчину, в якому вони знаходились. Підраховують в одному полі зору загальну кількість і число знебарвлених клітин, з яких відбулося видалення бетаціаніну.

8. Визначення життєздатності клітин можна проводити також шляхом плазмолізу. Для цього тонкі зрізи клітин із аналізованих висічок поміщають на 10 хв в 8% розчин NaCl. Після чого препарати продивляються під мікроскопом і підраховують відсоток плазмолізованих клітин в полі зору (не менше п'яти полів зору).

9. Результати досліду занотувати і зробити висновки про захисну дію

кріопротекторів на цитоплазму рослинних клітин.

ПРАКТИЧНА РОБОТА №14

ТЕМА: Нехірургічне вимивання ембріонів великої рогатої худоби

МЕТА ЗАНЯТТЯ: ознайомитися з методикою нехірургічного вимивання ембріонів ВРХ.

ЗМІСТ І МЕТОДИКА ПРОВЕДЕННЯ ЗАНЯТТЯ:

Ефективним методом біотехнології прискореного розмноження високоцінних племінних тварин є **трансплантація ембріонів**. Поглиблені дослідження репродуктивної функції тварин, її можлива регуляція, мікрохірургічні маніпуляції із зародками показали, що метод трансплантації є основою прискореного відтворення високопродуктивних корів і цілих популяцій. Практичне застосування цього методу в молочному скотарстві забезпечує інтенсивне розмноження тварин з високою генетичною цінністю, прискорене отримання високоцінних племінних биків, матерями яких є видатні родоначальниці, сприяє підвищенню ефективності племінної роботи, оздоровленню стад від ряду захворювань.

Ефективність методу трансплантації ембріонів залежить від способу вимивання ембріонів, кваліфікації спеціалістів, умілого використання інструментів, приладів. Після запліднення ембріон за 4-5 днів проходить яйцепровід і на стадії ранньої морули (8-16 клітин) надходить в порожнину матки для подальшого розвитку. Ще через 2-3 дні він розвивається до бластоцисти. Саме на цій стадії розвитку (7-8 днів) найкраще одержувати і пересаджувати ембріони. Крім того, на цій стадії розвитку ембріони добре переносять кріоконсервування і розморожування.

Останнім часом в умовах практичного застосування трансплантації ембріонів використовують лише **нехірургічний метод вимивання ембріонів**. Цей спосіб відносно простий і надійний, дозволяє успішно одержувати ембріони безпосередньо на тваринницьких фермах, використовуючи донора багаторазово (до 20 і більше разів) майже без зниження його відтворювального потенціалу.

Тварину фіксують у станку, звільняють пряму кишку від калових мас, оцінюють стан статевих органів, визначають кількість жовтих тіл на кожному яєчнику. Зовнішні статеві органи й оточуючу їх ділянку обробляють теплою водою з милом і дезінфікують.

Для часткового знерухомлення тварин вводять препарати ксилазину: рометар, седазин в дозі 0,1 мл на 100 кг живої маси внутрішньовенно. З метою знеболення органів тазової порожнини та зняття напруження прямої кишки проводять сакральну епідуральну анестезію введенням 5 мл 2 % розчину новокаїну між останнім крижовим і першим хвостовим хребцями. Якщо через 5-7 хв знерухомлення хвоста не настає, анестезію повторюють.

Для вимивання ембріонів використовують здебільшого модифікаційний двоходовий катетер Фоллея чи триходовий катетер виробництва французької фірми "IMW", останній на практиці використовується рідше через складність будови і високу вартість.

При використанні двоходового катетера фірми «Minitüb» і його модифікацій вітчизняного виробництва, на всю довжину катетера вставляють металевий стилет та інструмент обережно вводять в один із рогів матки, постійно контролюючи цей процес через пряму кишку. Перед введенням катетера, його бажано зсирити препаратом «Керолан» або змазати водорозчинним гелем "К-У".

Найскладнішим моментом техніки вимивання ембріонів є проведення катетера через шийку в роги матки. Якщо катетер введений у шийку, але його просування затруднене внаслідок вузькості проходу (телиці-донори) або утворення спайок в каналі (наслідки важких отелень), то використовують спеціальні дилататори (розширювачі). Використовують металеві та скляні дилататори без отвору або з отвором, куди надходить слиз. Після розширення каналу шийки матки введення катетера повторюють. Інструменти повинні бути в санітарних чохликах, які розривають у момент підведення їх до каналу шийки матки.

Катетер фіксують, наповнюючи повітряний балончик з допомогою шприца 10-15 см повітря. Показником правильного розміщення інструмента в розі матки є вільний вихід прозорої промивної рідини з матки. Відсутність рідини після вливання через катетер буває через одну із причин: проколення рога матки; перегинання катетера під час його введення; закупорка отворів слизом. Забарвлення рідини кров'ю свідчить про: травмування ендометрію при введенні катетера (особливо з металевим наконечником); надмірне наповнення повітряного балончика; стоншення ендометрію внаслідок захворювання матки.

Використовуючи двоходовий катетер, можна промивати роги матки двома методами: порційним і гравітаційним. **Порційний метод** більш простий і практичний в умовах ферм і непристосованих приміщень. Підігріту до 30-40°C

вимивну рідину вводять через зафіксований катетер шприцом порціями по 30-50 мл, проводять легкий масаж рога і зворотний збір рідини в цей же шприц. Середовище після кожного взяття зливають у зливну посудину або пропускають через фільтр. На один ріг матки використовують 300-500 мл середовища.

Головним недоліком методу є недостатній контроль при введенні-виведенні розчинів, що може призвести до переповнення рога, затікання середовища в яйцепровід за балончик або до геморагічного пошкодження ендометрію. Внаслідок відкритого перенесення рідини метод не мав достатнього асептичного захисту.

Гравітаційний метод промивання вигідний у стаціонарних умовах центрів і пунктів, він є атравматичним і має закриту систему обігу промивної рідини, захищену від попадання забруднень із зовнішнього середовища (рис. 6).

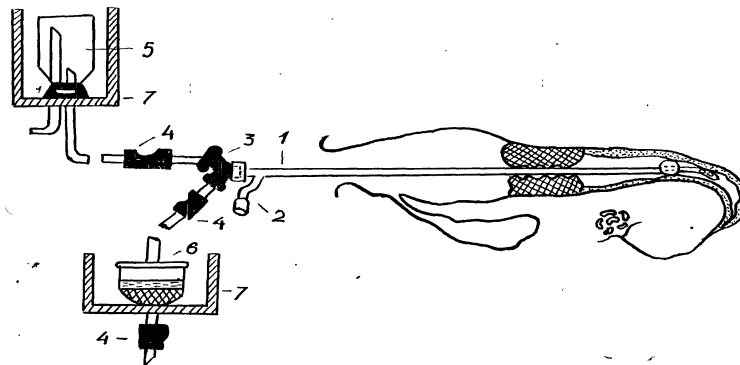


Рис. 6. Схема вимивання ембріонів гравітаційним способом

- 1 - катетер фірми "MINITUB"; 2 - канал для нагнітання повітря в балончик;
3 - двійний перехідник; 4 - затискач; 5 - середовище Дюльбекко; 6 - посудина з ситечком для збирання ембріонів; 7 -термостат.

При цьому способі трубки з силікону чи іншого біологічно нешкідливого матеріалу з'єднують з катетером Фоллея через скляний, пластмасовий або металевий трійник. На впускній і випускній трубках встановлені ручні затискачі. Флакон із середовищем встановлюють на рівні 1 м над донором, а зливну посудину (чи фільтр) – якомога ближче до підлоги. На одне промивання рога матки витрачають від 20 до 70 мл рідини.

З метою ефективнішої роботи та скорочення часу при вимиванні і пошуку ембріонів доцільно використовувати спеціальні фільтри для проціджування середовища. Вимивне середовище пропускають через фільтр, у корпусі якого залишають постійно 50-60 мл середовища і вимиті ембріони. Після цього фільтр змивають і проводять пошук ембріонів.

Приготування і використання середовищ. Середовища для короткотривалого забезпечення життєздатності гамет мають простіший склад, ніж для тривалого культивування чи розмноження клональних клітин.

У практиці трансплантації ембріонів великої рогатої худоби для вимивання ембріонів широко використовується фосфатно-сольове буферне середовище Дюльбекко (ФБС). Безпосередньо перед його використанням додають піруват натрію – 0,036 г/л, глюкозу – 1,0 г/л; фетальну сироватку теляти (ФСТ) з розрахунку 10-20 г на 1 л або 4 г бичачого сироваткового альбуміну (БСА). При застосуванні вимивних фільтрів краще використовувати БСА для запобігання утворення піни розчинів, що ускладнює пошук ембріонів.

Для короткотривалого культивування чи зберігання ембріонів використовують середовище Дюльбекко, яке відрізняється від вказаного підвищеним вмістом фетальної сироватки (20-30 %). Його використовують і при заморожуванні ембріонів завдяки властивості стабільно підтримувати рН у процесі заморожування. У цьому випадку до середовища, крім названих компонентів, додають ще й кріопротектори, серед яких широко застосовують гліцерин, сахарозу, в концентраціях відповідно, 1,0-1,4 М і 0,25-0,5 М.

Найпоширенішими середовищами для культивування ембріонів є мінімальне середовище Ігла (MEM), мінімальне середовище Ігла в модифікації Дюльбекко (DMEM), середовище для тканинних культур TCM-199, стабілізоване буфером HEPES. До їх складу входять неорганічні солі, амінокислоти, вітаміни, фактори росту, ліпіди.

При застосуванні вищевказаних середовищ для культивування і зберігання ембріонів, їх спочатку стабілізують буфером HEPES, а безпосередньо перед використанням обов'язково додають фетальну сироватку крові великої рогатої худоби (10 мл на 100 мл середовища) або бичачий сироватковий альбумін (4 г на 1 л середовища), а також один з антибіотиків (пеніцилін – 100 од./мл, гентаміцин – 50 мг/мл, ампіцилін – 50 од/мл).

ПРАКТИЧНА РОБОТА №15

ТЕМА: Пошук та морфологічна оцінка ембріонів

МЕТА ЗАНЯТТЯ: ознайомитися з методикою пошуку та морфологічної оцінки ембріонів.

ЗМІСТ І МЕТОДИКА ПРОВЕДЕННЯ ЗАНЯТТЯ:

Після вимивання ембріонів промивне середовище переносять у стерильний бокс, де воно відстоюється 20-30 хв при температурі не нижче +25°C. Верхню частину відстояного середовища відсмоктують у попередньо приготовлену посудину за допомогою шприца і тонкої прозорої трубки, залишаючи 60-80мл. Відстояне середовище розливають у 2-3 чашки Петрі, які для зручності пошуку ембріонів ззовні розграфлені на квадрати 10x10 мм. Посудина, в якій проводилось осадження ембріонів, і ситечко, через яке проціджували промивне середовище, споліскують чистим розчином Дюльбекко за допомогою шприца і розливають в чашки Петрі для відшукування ембріонів.

Якщо у середовищі є багато слизу і крові, то необхідно розлити його в чашки Петрі у меншій кількості, розбавивши його середовищем Дюльбекко, і обережно маніпулюючи голкою, досліджувати слиз. Після перегляду середовища в одній площині, чашкою Петрі потрібно зробити 2-3 обертові рухи, щоб виключити втрати ембріонів, які можуть прилипнути до стінки чашки.

Під мікроскопом МБС-9, МБС-10 при 15-20-кратному збільшенні знаходять ембріони і мікропіпеткою переносять їх у маленьку чашку Петрі з поживним середовищем. Перед використанням поживне середовище обов'язково проціджують через фільтри Millipore (діаметр 0,22 мкм). Після короткотривалого витримування у поживному середовищі ембріони оцінюють під мікроскопом при збільшенні в 100-150 разів.

Для спрощення і прискорення техніки виявлення ембріонів використовують спеціальні пристосування. Їх можна розділити на дві групи: седиментаційні, які базуються на властивості ембріонів опускатися під власною вагою на дно посудини, і фільтраційні, розраховані на діаметр пор фільтрів до 60 мкм, через які не може пройти ембріон.

Найпростіший пристрій фірми IMW складається із зігнутої металевої трубки, загнутої вниз, яка має отвір для відбору рідини з літрової посудини приблизно на рівні 80-100 мл. Осад з ембріонами на цьому рівні залишається після видалення надосадової рідини методом сифону. Для повільного витікання рідини на відвідній трубці є ручний регулюючий затискач.

Головною умовою використання будь-яких пристосувань седиментаційної дії є відсутність втрат з витікаючою надосадовою рідиною та внаслідок прилипання зародків до стінок і перехідних стиків. Використання фільтруючих

елементів при зборі ембріонів у 2-3 рази скорочує час їх виявлення. Виробляють зручні в роботі фільтри (діаметр 80 мкм) поєднані з чашкою для пошуку ембріонів (рис. 7).

Після закінчення промивання рогів матки донора така розграфлена чашка з невеликою кількістю залишеної рідини переноситься безпосередньо під мікроскоп. Час від одержання промивного середовища до виявлення ембріонів – 10-15 хвилин. Головна умова при використанні всіх фільтруючих систем – ретельне промивання потоком середовища фільтруючих елементів, де можуть затримуватися ембріони.

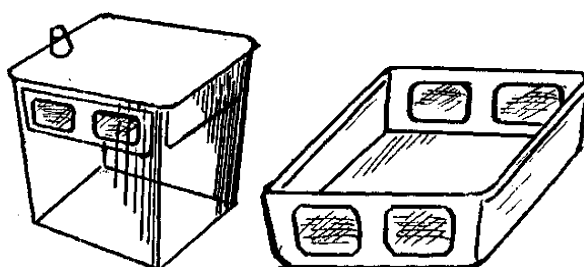


Рис.7. Фільтр для пошуку ембріонів

Виявлені ембріони і яйцеклітини переносять у чисті стерильні середовища для оцінки якості і санітарної обробки. Їх кількість може відповідати або перевищувати кількісь жовтих тіл в яєчниках донора. Причиною недоодержання передбачуваної кількості ембріонів і яйцеклітин можуть бути захворювання яйцепроводів (сальпінгіти, пухлини) у донора, або втрати при вимиванні, відстою, фільтрації. У першому випадку донора вибраковують, у другому — знаходять і усувають причину втрат вимивної рідини і ембріонів.

Після виявлення ембріонів їх переносять у чисте середовище, а потім методом поступового відмивання звільнюють від крові і бактеріального забруднення. Суть методу прогресуючого розчинення полягає у тому, що відмивання ембріонів у декількох стерильних середовищах знижує концентрацію вірусів і бактерій до безпечного субінфекційного рівня вже після третьої чашки із стерильним середовищем.

Технічно метод відмивання ембріонів полягає у поступовому перенесенні мікропіпеткою ембріонів з мінімальною кількістю рідини (біля 0,01 мл) з одної стерильної чашки з 1 мл розчину середовища у другу. Розбавлення концентрації початкового розчину таке, що з третьої чашки перевищує 1000 разів, а в дев'ятій

чашці середовище вважають стерильним. Додаткові гарантії блокування мікробної контамінації дає додавання в середовище антибіотиків.

Будь-які маніпуляції з ембріонами проводять стерильними інструментами у хімічно чистих посудинах. При відсутності бактерицидних ламп і одноразових інструментів, у тимчасовій виїзній лабораторії використовують стерилізацію 70 % етиловим спиртом і кип'ятінням.

Маніпуляції з ембріонами проводять поблизу спиртівки, відкрите полум'я якої створює стерильні умови у радіусі 20 см. У стаціонарних лабораторіях роботу з пошуку, оцінки і мікроманіпуляцій з ембріонами проводять у ламінарних шафах, які забезпечують потік профільтрованого чистого повітря.

Морфологічна оцінка ембріонів. Перед трансплантацією ембріонів необхідно оцінити їх якість. Для цього існує декілька способів: морфологічна оцінка під мікроскопом, короткотривале культивування, використання барвників тощо. На практиці в основному використовують морфологічні методи оцінки.

Головна мета ембріолога – визначити приховані дефекти розвитку ембріона, із збільшенням частки яких зменшуються шанси виживання ембріона після пересадки.

Після вимивання ембріонів проводять морфологічну оцінку їх якості. При цьому враховують нижче наведені критерії окремих структурних компонентів ембріонів.

Прозора оболонка (zona pellucida) – тріщини в оболонці нативних і розморожених ембріонів вважають відхиленням від норми, оскільки вони пов'язані з травмуванням і деформацією зародків під час маніпуляцій, а також з можливим утворенням кристалів солей і води при кріоконсервуванні.

Перивітеліновий простір – в ідеалі вільний від включень (бластомерів, їх фрагментів і залишків цитоплазми).

Клітинна маса – при нормальному розвитку на стадії морули темна, чітко окреслена, з виступаючими бластомерами, які нагадують щільне виноградне гроно. Просвітлення (розпушення) клітинної маси, розпливчасті межі бластомерів або їх лізис, поява цитоплазматичних гранул серед зруйнованих бластомерів належить до дефектних ознак і вважається неприпустимими.

Бластопорожнина – має важливе значення при оцінці якості деконсервованих ембріонів. Її тимчасове стиснення – функціонально обернена ознака, яка не свідчить про дефектність ембріона.

Біологічно якісними і здатними до подальшого розвитку після трансплантації вважають ембріони, які мали правильну кулясту форму, непошкоджену прозору оболонку, однакового розміру бластомери з щільним міжклітинним сполученням. За рівнем дроблення вік ембріонів повинен відповідати періоду від запліднення яйцеклітин до моменту вимивання.

Неповноцінними вважають ембріони, які мають будь-які з вище означених дефекти та відстають в розвитку.

Стадію розвитку ембріонів визначають за кількістю бластомерів і циклів дроблення. Подвоєння кількості бластомерів в ембріонах великої рогатої худоби відбувається приблизно через 12 годин за винятком 1-го циклу дроблення. Бластомери якісних ембріонів мають округлу або овальну форму.

Рання морула характеризується початком ущільнення клітин, бластомери не завжди однакової величини, що залежить від можливого асинхронного поділу, утворення мікро- і макробластомерів. Деякі клітини виступають в перивітеліновий простір, що допускається.

Для компактної морули характерним є закінчення процесу ущільнення бластомерів, рівномірності розташування клітинної маси, яка займає 60-80 % перивітелінового простору, вільного від бластомерів.

Нерідко у вимивному середовищі знаходять незапліднені яйцеклітини у стані дегенерації, які мають зморщену, неправильної форми, інколи зруйновану цитоплазму. Дегенерованим яйцеклітинам властива неправильна форма перивітелінового простору через розрив оолеми, фрагментація цитоплазми, оскільки фрагментарний розпад ооплазми, що є ознакою можливого некрозу, призводить до утворення псевдобластомерів.

При класифікації ембріонів користуються чотирибальною системою:

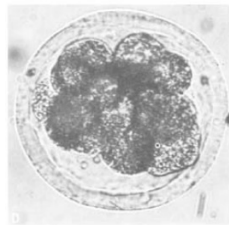
1) *відмінні* (++): ембріони, вік яких відповідає стадії розвитку, однорідні, мають округлу форму, непошкоджену прозору оболонку, прозорий перивітеліновий простір, чіткі однакові за розміром бластомери.

2) *добрі* (+): ембріони, вік яких відповідає стадії розвитку, однак, відрізняються від відмінних незначними відхиленнями – виділенням одного або двох бластомерів від клітинної маси; збільшенням перивітелінового простору, наявністю незначної кількості мертвих клітин в перивітеліновому просторі.

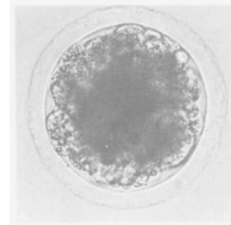
3) *задовільні (+)*: ембріони із значними відхиленнями в структурі бластомерів – неоднорідним затемненням клітинної маси, наявністю мертвих клітин або їх фрагментів у перивітеліновому просторі.

4) *незадовільні (-)*: ембріони з часто деформованою прозорою оболонкою, наявністю до 50 % затемненої маси, що свідчить про значну дегенерацію бластомерів, порушеним зв'язком між бластомерами, їх ущільненням і зморщенням.

Відмінні, добрі і задовільні ембріони вважають придатними або умовно придатними до кріоконсервації та пересадки. Інші за морфологічними ознаками оцінюють як непридатні до трансплантації і заморожування, сюди включають і незапліднені яйцеклітини.



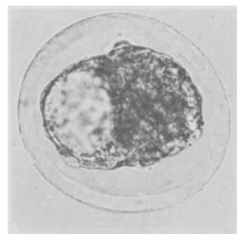
1



2

Рис. 8. Морули відмінної якості

1 – рання морула; 2 – компактна морула



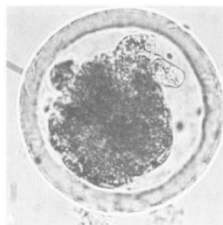
1



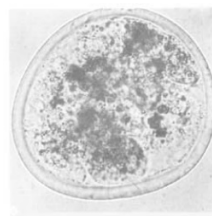
2

Рис. 9. Бластици відмінної якості

1 – бластоциста рання; 2 – бластоциста експандована



1



2

Рис. 10. Дегенеровані морули

1 – дегенерована рання морула; 2 – дегенерована компактна морула.

ПРАКТИЧНА РОБОТА №16

ТЕМА: Особливості нехірургічного вимивання ембріонів

МЕТА ЗАНЯТТЯ: ознайомитися з методикою нехірургічної пересадки ембріонів ВРХ.

ЗМІСТ І МЕТОДИКА ПРОВЕДЕННЯ ЗАНЯТТЯ:

Суть нехірургічного методу трансплантації зводиться до трансцервікального введення інструмента з ембріоном у просвіт рога матки. Підготовка реципієнтів аналогічна підготовці донорів для нехірургічного вимивання ембріонів. Тварину фіксують у станку, зовнішні геніталії і перинеальну ділянку ретельно миють теплою водою з милом, і роблять сакральну епідуральну анестезію 2 % розчином новокаїну (5 мл). Для часткового знерухомлення реципієнтів внутрішньовенно (у хвостову вену) вводять препарати ксилазину (рометар, седазин) в дозі 0,1 мл на 100 кг живої маси. В окремих випадках тваринам вводять матковий міорелаксant внутрішньом'язово за 15-20 хвилин до пересадки ембріонів.

Нехірургічну пересадку ембріонів проводиться за допомогою спеціальних катетерів. Найбільш поширені катетери фірм "Minitüb" (Німеччина) та IMW (Франція). Катетер фірми "Minitüb" складається з металевої трубки, зйомного наконечника і стилета, а фірми IMW — із металевої трубки, стилета та одноразового запасного чохлика, що дозволяє використовувати його безліч разів, міняючи чохлики. Для пересадки ембріонів коровам-реципієнтам, фірмою IMW розроблено катетер, у якому всередині металевої трубки знаходиться телескопічний зонд, що дозволяє вводити його у верхівку рога матки.

Підготовка інструментів для пересадки ембріонів проводиться в стерилізаційній кімнаті. Катетери стерилізують кип'ятінням протягом 20 хвилин, висушують або стерилізують сухим жаром при температурі 160-180°C 60 хвилин. Санітарну обробку інструментів і робочого місця проводять 70 % етиловим спиртом, ультрафіолетовим опроміненням. Французькі катетери комплектуються стерильними разовими чохлами, які не потребують додаткової стерилізації. На стерильний катетер або разовий чохлик натягують санітарний чохлик, який захищає інструмент від забруднення та інфекції до входження його в шийку матки.

Перед початком пересадки проводять ректогенітальну пальпацію яєчників у телиць, які були в охоті у день осіменіння донора (для персадок свіжоодержаних ембріонів) або синхронних з віком заморожених ембріонів

(день охоти дорівнює 0). При цьому оцінюють наявність або відсутність жовтого тіла статевого циклу (+ або -) і фіксують, на якому яєчнику воно сформоване (лівий або правий). Також визначають якість жовтого тіла: відмінне (++), добре (+), або сумнівне (\pm). Відмінне жовте тіло може бути у вигляді грибка або чітко вираженого піку, яєчники правильної яйцеподібної форми, причому розміри яєчника порівняно з жовтим тілом, як правило, більші в два і більше разів. Менш виражена жовте тіло, нетипова форма яєчника (у вигляді вісімки, трикутника, диска та ін.), наявність з жовтим тілом фолікулів чи кист, знижує його якість до оцінки добре (+). Сумнівне жовте тіло (\pm) може незначно збільшуватися у вигляді рисового зерна, знаходиться на яєчнику дещо меншого розміру (до 1,5 см) при гіпофункції, розлита і невиражена його конфігурація може свідчити про персистентність жовтого тіла, м'яка консистенція — про кістозне переродження (лютеїнова кіста. Пересадки ембріонів реципієнтам з сумнівним жовтим тілом ведуть до втрати тільності і виконують їх у виняткових випадках.

Дані про якість і розміщення жовтого тіла реєструють у картці реципієнта. За 5–7 хвилин до розміщення ембріона в катетер ембріолог дає номери телиць для проведення сакральної анестезії. Показником правильно проведеної блокади є повне розслаблення м'язів кореня хвоста. При відсутності ефекту через 2–3 хвилини анестезію повторюють.

Нехірургічну трансплантацію реципієнтам молочних і комбінованих порід виконують як в стаціонарних, так і у виробничих приміщеннях на прив'язі. Якщо роботу планують на довготривалу перспективу, на фермі встановлюють нескладні зварювальні конструкції на 20-30 місць, які обмежують бокові переміщення реципієнтів. Пересадку ембріонів реципієнтам м'ясних порід виконують у станках з жорсткою фіксацією.

Перед пересадкою соломинку (пайєту) з ембріоном поміщають у катетер. Пайєту з ембріоном у катетер фірми "Minitüb" вставляють у зйомний наконечник, який приєднується до металічної трубки з стилетом, а у катетер фірми IMW – безпосередньо в металічну трубку, після чого на неї насаджують одноразовий захисний чохлик.

Безпосередньо перед введенням у статеві органи інструмент зрошують кероланом або гелем "K-Y" і поміщають в санітарний поліетиленовий чохлик.

Підготовлений до пересадки катетер у санітарному чохлику обережно вводять у піхву до каналу шийки матки, проривають чохлик і під ректальним

контролем вводять катетер через цервікальний канал у ріг матки, на стороні якого виявлено жовте тіло у яєчнику (рис. 11).

Обережними рухами просувають катетер якомога ближче до верхівки рога матки, постійно контролюючи ректальне положення передньої частини катетера. Впевнившись у правильності введення інструмента, помірним натисканням стилета катетера витискають вміст пайєти в просвіт рога матки. Після цього плавними і обережними рухами виймають катетер з порожнини матки. Аналогічним чином можна ввести катетер у другий ріг матки при білатеральній пересадці ембріонів.

При трансплантації ембріонів декільком реципієнтам після пересадки кожного ембріона катетер миють, дезінфікують спиртом його внутрішню порожнину, промивають стерильним середовищем Дюльбекко, вставляють пайєту з ембріоном, поверхню зрошують препаратом "Керолан" або змазують гелем "К-У", поміщають у санітарний чохлик і проводять пересадку.

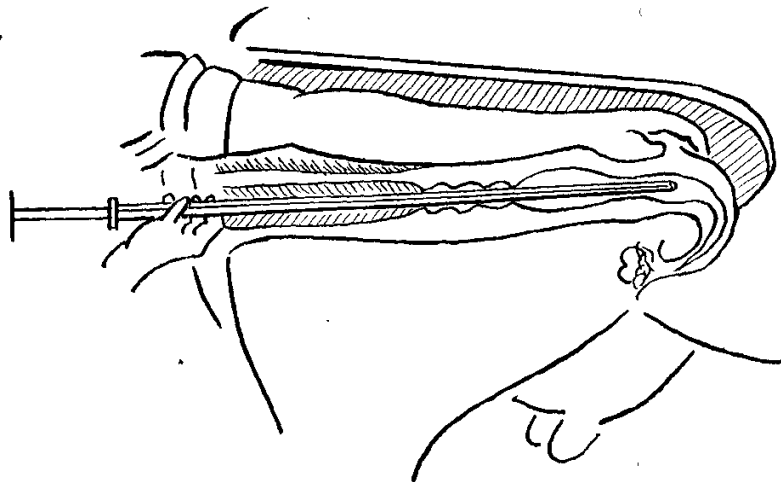


Рис. 11. Схема нехірургічної пересадки ембріонів

У катетері французької фірми IMW знімають одноразовий захисний чохлик, заправляють пайєту з ембріоном, натягують новий чохлик, прикріплюючи його замком до металевої частини інструмента, проводять операції із зрошування поверхні аналогічно попередньому катетеру, вставляють катетер в санітарний чохлик і проводять пересадку.

Приблизно у 5 % реципієнтів буває важкопрохідна і непрохідна шийка матки. Труднощі з проходженням шийки матки, як правило, не відбиваються на приживленні ембріонів. При неможливості провести катетер через шийку, його повертають у лабораторію для стерилізації і перезаряджання. В середньому на пересадку ембріона досвідчений спеціаліст витрачає 1-2 хвилини.

Телиці, які не підлягають трансплантації ембріонів внаслідок відсутності охоти та повноцінного жовтого тіла, можуть бути повторно використані в програмах синхронізації статевих циклу або передані для осіменіння.

Після закінчення пересадки тварин годують і утримують в звичайних умовах, не допускаючи стресових ситуацій. Після пересадки ембріонів ведуть контроль за можливими проявами повторної охоти. З метою раціонального використання телиці, при виявленні у них після ембріопересадок статевої охоти (30-32-й день), осіменяють.

Потрібно строго контролювати випадки і частоту абортів тільних реципієнтів. Через 60-90 днів після пересадки тварин досліджують на тільність методом ректальної діагностики. Кінцеві показники пересадки ембріонів вираховують за результатами отелень.

Нехірургічний метод трансплантації дозволяє транспортувати і пересаджувати свіжоодержані ембріони за декілька кілометрів від центру. Для цього заряджений катетер поміщають у теплий контейнер з температурою 37 °С. Пайети з ембріонами для пересадки перевозять у цьому ж контейнері.

Після транспортування ембріонів перевіряють збереження встановленої послідовності заправки пайет повітрям та середовищем і за відсутності порушення заправляють пайету в катетер та проводять пересадку.

ПРАКТИЧНА РОБОТА №17

ТЕМА: Законодавча база України з біобезпеки та її реалізація

МЕТА ЗАНЯТТЯ: ознайомитися із законодавчою базою України з біобезпеки та її реалізація

ЗМІСТ І МЕТОДИКА ПРОВЕДЕННЯ ЗАНЯТТЯ:

Вбудовування в геном організму – хазяїна нових конструкцій, спрямоване на покращання корисних для людини властивостей і зниження собівартості виробництва. Проте разом з набуттям тієї чи іншої ознаки, організм дістає цілий набір нових якостей, опосередкованих як плейотропною дією нового білка, так і властивостями самої вбудованої конструкції, в тому числі, її нестабільністю і регуляторною дією на сусідні гени. Всі небажані явища і події, що відбуваються при обробітці і споживанні ГМО об'єднують в три групи: харчові, екологічні та агротехнічні ризики.

Основними принципами державної політики в галузі генетично-

інженерної діяльності та поводженні з генетично модифікованими організмами на сучасному етапі в Україні є:

- пріоритетність збереження здоров'я і охорони навколишнього природного середовища, порівняно з економічними перевагами від застосування ГМО;

- забезпечення заходів щодо дотримання біологічної і генетичної безпеки при створенні, дослідженні та практичному використанні ГМО в господарських цілях;

- контроль за ввезенням на митну територію України ГМО та продукції, отриманої з їх використанням, їх реєстрацією та обігом;

- загальнодоступність інформації про потенційні ризики від застосування ГМО, які передбачається використовувати у відкритій системі, та заходи щодо дотримання біологічної та генетичної безпеки;

- державна підтримка генетично-інженерних досліджень та наукових і практичних розробок у галузі біологічної і генетичної безпеки при створенні, дослідженні та практичному використанні ГМО в господарських цілях.

Регулювання поводження з ГМО здійснюється відповідно до законів України:

- Закон України «Про дитяче харчування» від 14.09.2006 р.;

- Закон України «Про захист прав споживачів» в редакції від 01.12.2005 р.;

- Закон України «Про якість та безпеку харчових продуктів та продовольчої сировини» в ред. від 06.09.2005 р.;

- Закон України «Про пріоритетні напрями інноваційної діяльності в Україні» в ред. від 09.02.2006 р.;

- Закон України «Про забезпечення санітарного та епідемічного благополуччя населення» в ред. від 07.02.2002 р.;

- Закон України «Про основи національної безпеки України» в ред. від 15.12.2005 р.;

- Закон України «Про захист населення від інфекційних хвороб» від 09.02.2006 р.;

- Закон України «Про тваринний світ» 13.12.2001 р.;

- Закон України «Про державну систему біобезпеки при створенні, випробуванні, транспортуванні та використанні генетично модифікованих організмів» від 31 травня 2007 р.

Закон України «Про державну систему біобезпеки при створенні, випробуванні, транспортуванні та використанні генетично модифікованих організмів» від 31 травня 2007 р. регулює відносини між органами виконавчої влади, виробниками, продавцями (постачальниками), розробниками, дослідниками, науковцями та споживачами генетично модифікованих організмів і продукції, виробленої за технологіями, що передбачають їх розробку, створення, випробування, дослідження, транспортування, імпорт, експорт, розміщення на ринку, вивільнення у навколишнє середовище та використання в Україні із забезпеченням біологічної і генетичної безпеки. Водночас цей Закон не застосовується до людини, тканин та окремих клітин у складі організму людини.

Закон має виконувати такі завдання:

- охорона здоров'я людини і навколишнього природного середовища при здійсненні генетично-інженерної діяльності та поводженні з ГМО;
- забезпечення права громадян на безпечне використання ГМО;
- створення умов для безпечного практичного використання ГМО в господарських цілях;
- визначення прав і обов'язків суб'єктів регулювання при поводженні з ГМО та встановлення їх відповідальності за порушення законодавства;
- захист громадян у разі заподіяння шкоди їх здоров'ю, внаслідок споживання ГМО;
- встановлення правових основ міжнародного співробітництва в галузі генетично-інженерної діяльності та поводження з ГМО.

Регулюванню Законом підлягають:

1. Генетично-інженерна діяльність, що здійснюється у замкненій системі. *Закрита система* — це система здійснення генетично-інженерної діяльності, при якій генетичні модифікації вносяться в організм або ГМО, культивуються, обробляються, зберігаються, використовуються, підлягають транспортуванню, знищенню або похованню в існуючих умовах систем захисту, що запобігають контакту з населенням та навколишнім середовищем.

2. Генетично-інженерна діяльність, що здійснюється у відкритій системі. *Відкрита система* — це система здійснення генетично-інженерної діяльності, що передбачає контакт ГМО з населенням та навколишнім середовищем при запланованому вивільненні їх у навколишнє середовище, застосуванні у сільськогосподарській практиці, промисловості, медицині та в природоохоронних цілях, передачі технологій та інших сферах обігу ГМО.

3. Державна реєстрація ГМО та продукції, виробленої з їх використанням. **Державна реєстрація ГМО** - це занесення ГМО до реєстру з урахуванням оцінки їх ризику щодо впливу на здоров'я людини та стан навколишнього природного середовища з метою подальшого отримання дозволу на практичне використання ГМО в Україні відповідно до їх господарського призначення.

4. Введення в обіг ГМО та продукції, виробленої з їх використанням; експорт, імпорт і транзит ГМО. Обіг ГМО - це переміщення (транспортування) або зберігання та будь-які дії, пов'язані з переходом права власності чи володіння, включаючи продаж, обмін або дарування.

Забезпечення виконання Закону «Про державну систему біобезпеки при створенні, випробуванні, транспортуванні та використанні генетично модифікованих організмів» покладено на центральні органи виконавчої влади у межах повноважень і в порядку, передбаченому законодавством України, зокрема на Кабінет Міністрів України (ст. 7), центральний орган виконавчої влади з питань освіти і науки (ст. 8), центральний орган виконавчої влади з питань екології та природних ресурсів (ст. 9), центральний орган виконавчої влади з питань охорони здоров'я (ст. 10), центральний орган виконавчої влади з питань аграрної політики (ст. 11).

Порушення вимог зазначеного Закону і прийнятих на його основі нормативно-правових актів тягне за собою цивільну, адміністративну, дисциплінарну або кримінальну відповідальність згідно із законом.

Відповідальність несуть особи, які винні у:

- приховуванні або перекрученні інформації, що може спричинити або спричинило загрозу життю та здоров'ю людини чи навколишньому природному середовищу;
- недотриманні або порушенні вимог стандартів, регламентів, санітарних норм і правил використання, транспортування, зберігання, реалізації ГМО;
- використанні незареєстрованих ГМО або продукції, отриманої з їх використанням (за винятком науково-дослідних цілей);
- порушенні правил утилізації та знищення ГМО;
- невиконанні законних вимог посадових осіб, які здійснюють державний нагляд і контроль.

Література

1. Біотехнологія / М. Д. Мельничук, О. Л. Кляченко, Ю. В. Коломієць, И. А. Антіпов. - К. : ТОВ «Аграр Медіа Груп», 2013. – 350 с.
2. Біотехнологія рослин. Практикум / М. Д. Мельничук, І. П. Григорюк, Т. В. Новак та ін. – К. : ТОВ «Аграр Медіа Груп», 2012. – 215 с.
3. Загоскина Н. В. Биотехнология: теория и практика / Л. В. Назаренко, Е. А. Калашникова, Е. А. Живухина. - Москва : ОНИКС, 2009. – 493 с.
4. Практикум / М. Д. Мельничук, О.Л. Кляченко, Ю. В. Коломієць та ін. - К. : ТОВ «Аграр Медіа Груп», 2013. – 150 с.
5. Практикум / Д. О. Мельничук, С. Д. Мельничук, Л. Г. Калачнюк та ін. - Біохімія. К. : НУБіП України, 2012. – 528 с.
6. Мельничук М. Д. Біотехнологія в агросфері : навчальний посібник для студентів вищих навчальних закладів / М. Д. Мельничук, О. Л. Кляченко – Київ : 2014. – 247 с.
7. Сергеев Н. И. Руководство по трансплантации эмбрионов крупного рогатого скота: / Н. И. Сергеев, Н. М. Решетникова, А. И. Абилов и др. Дубровицы – 2008. – 115 с.
8. Шаран М. М. Застосування комплексу біологічно активних речовин для підвищення приживлення ембріонів у телиць-реципієнтів / М. М. Шаран. - Наук.-тех.бюл. Інституту біології тварин УААН і ДНКІ ветпрепаратів та кормових добавок. Львів. : 2008. – Випуск 9. - №4. – С.202-208.
9. Шаран М. М. Застосування трансплантації ембріонів у молочному і м'ясному скотарстві / М. М. Шаран. – Львів : 2009. – С. 6-9.
10. Шевелуха В. С. Сельскохозяйственная биотехнология / В. С. Шевелуха. – Москва : Высшая школа, 2008. – 708 с.

Навчальне видання

БІОБЕЗПЕКА ВИКОРИСТАННЯ БІОТЕХНОЛОГІЙ

методичні рекомендації для виконання практичних занять та самостійної роботи
для здобувачів вищої освіти СВО «Бакалавр»
спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»
денної форми навчання

Укладачі:

Патрєва Людмила Семенівна
Стародубець Олексій Олександрович
Люта Ірина Миколаївна

Формат 60×84 1/16 Ум. друк. арк. 3,9
Тираж 15 прим. Зам №_____

Надруковано у видавничому відділі
Миколаївського національного аграрного університету
54020, м. Миколаїв, вул. Георгія Гонгадзе, 9
Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 4490 від 20.02.2013 р.