

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
НАЦІОНАЛЬНИЙ АВІАЦІЙНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
ФАКУЛЬТЕТ ЕКОЛОГІЧНОЇ БЕЗПЕКИ, ІНЖЕНЕРІЇ ТА ТЕХНОЛОГІЙ  
КАФЕДРА БІОТЕХНОЛОГІЇ

ДОПУСТИТИ ДО ЗАХИСТУ

Завідувач випускової кафедри

\_\_\_\_\_ М.М. Барановський

«\_\_» \_\_\_\_\_ 20\_\_ р.

## ДИПЛОМНА РОБОТА

(ПОЯСНЮВАЛЬНА ЗАПИСКА)

ВИПУСКНИКА ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ МАГІСТРА

ЗА СПЕЦІАЛІЗАЦІЮ «ФАРМАЦЕВТИЧНА БІОТЕХНОЛОГІЯ»

**Тема: «Особливості розмноження *Vaccinium sp.* в умовах in vitro»**

Виконавець: студентка групи 204м Река Валерія Вікторівна

Керівник: професор Барановський Михайло Миколайович

Консультант з розділу «Охорона праці»:

Павлиш В. Д.

Консультант з розділу  
«Охорона навколишнього середовища»:

Бовсуновський Є.О.

Нормоконтролер:

Лазарєв В. Г.

Київ 2020

# НАЦІОНАЛЬНИЙ АВІАЦІЙНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Факультет екологічної безпеки, інженерії та технологій

Кафедра біотехнології

Напрямок (спеціальність, спеціалізація): 162 «Біотехнології та біоінженерія»,

«Фармацевтична біотехнологія»

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач випускової кафедри

\_\_\_\_\_ М.М. Барановський

«\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 20\_\_ р.

## ЗАВДАННЯ

на виконання дипломної роботи

**Рєки Валерії Вікторівни**

1. Тема роботи «Особливості розмноження *Vaccinium sp.* в умовах *in vitro*» затверджена наказом ректора від «16» жовтня 2019 р. № 2390/ст.
2. Термін виконання роботи: з «14» жовтня 2019 р. по «29» грудня 2019 р.
3. Вихідні дані роботи: літературні відомості про *Vaccinium sp.* та методика *in vitro*, кущі лохини сортів Дюк, Чендлер та Блюкроп, власні експериментальні дані отримані на базі лабораторії кафедри біотехнології Національного авіаційного університету.
4. Зміст пояснювальної записки: ВСТУП; РОЗДІЛ 1. ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД; РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ; РОЗДІЛ 3. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ; РОЗДІЛ 4. ОХОРОНА ПРАЦІ; РОЗДІЛ 5. ОХОРОНА НАВКОЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА; ВИСНОВКИ; СПИСОК БІБЛОГРАФІЧНИХ ПОСИЛАНЬ ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.
5. Перелік обов'язкового ілюстративного матеріалу: 26 таблиць, 21 рисунок.
6. Календарний план-графік

№	Завдання	Термін виконання	Підпис керівника
1	Літературний огляд та збір інформації за темою дипломної роботи	14.10. – 07.11.2019	
2	Виконання експериментальної частини	08.11. – 27.11.2019	
3	Написання основної частини	28.11. – 14.12.2019	
4	Формулювання висновків та рекомендацій	15.12. – 18.12.2019	
5	Перевірка дипломної роботи керівником	19.12.2019 – 19.01.2020	
6	Кінцеве оформлення роботи	20.01. – 01.02.2020	
7	Захист дипломної роботи	03.02.2019	

7. Консультація з окремого(мих) розділу(ів):

Назва розділу	Консультант (посада, П.І.Б.)	Дата, підпис	
		Завдання видав	Завдання прийняв
Охорона праці	ст. викладач Павлиш В.Д.		
Охорона навколишнього середовища	к.т.н., доцент Бовсуновський Є.О.		

8. Дата видачі завдання « 14 » жовтня 2019 р.

Керівник дипломної роботи:

Барановський М.М.

Завдання прийняв до виконання:

Река В.В.

## РЕФЕРАТ

Пояснювальна записка до дипломної роботи «Особливості розмноження *Vaccinium sp.* в умовах *in vitro*»: 112 с., 26 табл., 21рис., 95 літературних джерел.

**Об'єкт дослідження** – отримання стерильної культури рослин *in vitro* з експлантів лохини роду *Vaccinium sp.*.

**Предмет дослідження** – лохина роду *Vaccinium sp.*.

**Мета дипломної роботи:** підібрати оптимальні умов культивування *Vaccinium sp.* в умовах *in vitro*.

**Методи дослідження** – мікробіологічні методи, статистичні методи обрахунку отриманих результатів та графічні.

ЛОХИНА, *VACCINIUM SP.*, *IN VITRO*, КЛОНАЛЬНЕ МІКРОРОЗМНОЖЕННЯ, ГЕТЕРОАУКСИН, КУЛЬТИВУВАННЯ, СОРТИ ЛОХИНИ, СТЕРИЛІЗАЦІЯ.

## ЗМІСТ



2.2.1. Методика приготування поживного середовища Мурасіге-Скуга.....	30
2.2.2. Підбір режиму стерилізації експлантів .....	35
2.2.3. Визначення оптимальної концентрації фітогормону .....	38
2.3. Висновки до розділу.....	41
РОЗДІЛ 3. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ .....	42
3.1. Дослідження відношення стерилізуючих речовин та часу їх впливу на експланти для досягнення стерильності .....	42
3.2. Технологія отримання стерильних культур <i>Vaccinium</i> sp. в умовах <i>in vitro</i> .....	44
3.3. Висновки до розділу.....	42
РОЗДІЛ 4. ОХОРОНА ПРАЦІ.....	48
4.1. Небезпечні та шкідливі виробничі фактори у біотехнологічній лабораторії .....	48
4.2. Технічні та організаційні заходи для зменшення рівня впливу небезпечних та шкідливих виробничих факторів у біотехнологічній лабораторії .....	50
4.2.1. Розрахунок безпечного перебування людини у приміщенні з увімкненою лампою ультрафіолетового опромінення.....	52
4.3. Забезпечення пожежної та вибухової безпеки у біотехнологічній лабораторії.....	54
4.4. Висновки до розділу.....	56
РОЗДІЛ 5. ОХОРОНА НАВКОЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА .....	57
5.1. Утилізація органічних відходів .....	57
5.2. Розрахунок еколого-економічного ефекту .....	62
5.3. Висновки до розділу.....	63

ВИСНОВКИ.....	64
СПИСОК БІБЛІОГРАФІЧНИХ ПОСИЛАНЬ ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	65

## ВСТУП

### **Актуальність.**

Біотехнологія рослин – один з найбільш перспективних сучасних напрямів біології взагалі та сільськогосподарської зокрема. Надзвичайно широкий спектр біотехнологічних досліджень щодо рослин вимагає розподілу їх за напрямами використання, предметами та об'єктами, методами залучення в експеримент тощо.

Одним із підходів, які широко використовуються в сільськогосподарському, декоративному, лісовому та іншому виробництві, є МКРР. Цей метод успішно поєднується з іншими, наприклад, із оздоровленням рослин від патогенних мікроорганізмів, зокрема, вірусів. Крім цього, широке теоретичне і практичне значення мають створення генетично змінених форм, збереження генетичних банків рослин *in vitro*, підтримання колекції оздоровлених сортів, гібридів із використанням штучних живильних середовищ тощо.

Пошук шляхів прискореного розмноження рослин завжди був актуальним, а тому дослідження в цьому напрямі продовжуються й досі. Основою для їх проведення

було бажання мати якнайбільшу кількість рослин, ідентичних клону, який виділився за комплексом агрономічних ознак у природних умовах.

Найчастіше для швидкого розмноження рослин використовують їх частини, які, звичайно, мають точку росту.

Переваги прискореного розмноження рослин *in vitro* нині зводяться до можливості:

1. використання мінімальної кількості вихідного матеріалу;
2. отримання генетично однорідного матеріалу;
3. накопичення садивного матеріалу у рослин, які мають низький коефіцієнт розмноження, високо цінних або рідкісних у природному середовищі;
4. підтримання генотипів, які характеризуються генетичною стерильністю;



5. збереження в штучних умовах видів, для яких складаються вкрай несприятливі зовнішні умови в процесі вирощування, тобто які зникають із лиця Землі;
6. підтримання і збереження колекційних зразків впродовж тривалого часу;
7. швидкого збільшення площ, зайнятих новими сортами, гібридами;
8. накопичення садивного матеріалу впродовж року і планування необхідного його обсягу до певного строку використання;
9. отримання великої кількості матеріалу на малій лабораторній площі;
10. переривання періоду спокою органів рослин;
11. автоматизація процесів вирощування рослин;
12. виділення форм із зміненою спадковістю;
13. із залученням інших методів отримання оздоровленого садивного матеріалу від патогенної інфекції тощо.

Мікроклональне розмноження рослин (МКРР) – це спосіб безстатевого розмноження багатоклітинних частин рослин, основу якого становить прискорене отримання численних генетично ідентичних форм вихідній частині із застосуванням біотехнологічних методів.

Основу МКРР становить можливість утворення повноцінних рослин з окремих органів або частин рослин, які обов'язково повинні мати зачаток пагона. Можна регенерувати рослини *in vitro* з вегетативних органів і навіть, з окремих клітин (тотипотентність рослинних клітин).

Цінність МКРР полягає в можливості поєднання з іншими методами, наприклад, з оздоровленням рослин від інфекції, зокрема вірусної, позбутися якої іншими методами дотепер не вдавалося, а втрати врожаю від її поширення надзвичайно великі.

Стерильність культури *in vitro* дозволяє використовувати пробірковий матеріал для біотехнологічних, генетичних, фізіологічних, мікробіологічних та інших досліджень.

Крім дотримання загальних біотехнологічних вимог, успіх МКРР залежить і від специфічних чинників: фізіолого-біохімічного стану експланта, складу живильного середовища, умов культивування та інших.

**Мета дипломної роботи** – підібрати режим стерилізації експлантів *Vaccinium sp.*, підібрати оптимальний склад середовища та умови культивування для отримання рослин *in vitro*.

Для досягнення мети дипломної роботи було поставлені такі завдання:

- 1) Провести аналіз сортів лохини, що вирощуються на території України.
- 2) Підібрати режим стерилізації рослин-регенерантів для умов *in vitro*.
- 3) Визначити оптимальний склад поживного середовища культивування в умовах *in vitro*.
- 4) Вивчити вплив гормонального складу живильних середовищ при укоріненні *in vitro*.
- 5) Обґрунтувати доцільність використання методу *in vitro* для *Vaccinium sp.*

**Методи дослідження** – мікробіологічні методи, статистичні методи обрахунку отриманих результатів та графічні.

**Практичне значення отриманих результатів.** Отримані результати можуть бути підґрунтям для подальшого розроблення, аналізу, вивчення та вирощування лохини роду *Vaccinium sp.* в умовах *in vitro* у промислових масштабах.

**Особистий внесок випускника.** Дипломна робота була виконана на базі лабораторії кафедри біотехнології Національного авіаційного університету під керівництвом М.М. Барановського та Ю.М.Глушко. Весь обсяг експериментальних досліджень за темою дипломної роботи, аналіз літературних даних, обробка результатів, їх опис і аналіз виконані випускником особисто.

## РОЗДІЛ 1

### ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД

#### 1.1. Характеристика лохини роду *Vaccinium sp.*

Лохина — ягоди, забарвлені в колір індиго з сизуватим нальотом. Рослина відноситься до розділу *Cyanococcus* роду *Vaccinium*. Тривалий час чорниця була відома як «Європейська лохина», оскільки лохина не вирощувалася в Європі до 1930-х років. Відрізнити лохину від схожої на вигляд чорниці легко, розрізавши ягоду навпіл. У лохини світло-зелена середина, в той час як у чорниці червона або фіолетова. На відміну від чорниці, ягоди лохини ніжніші на смак.

Лохина росте на кущах від 10 см до 4 м заввишки. У виробництві нижчі кущі лохини мають назву «лохина низькоросла» або ж «лохина дика». Високі кущі відомі як «лохина високоросла».

Лохина відносяться до роду *Vaccinium*, що також включає інші поширені дикоростучі ягідні культури (зокрема брусницю та журавлину). На Україні в дикому вигляді росте чорниця звичайна (*Vaccinium myrtillus*) та лохина драговинна (*Vaccinium uliginosum*). Дикоростуча чорниця (*Vaccinium myrtillus*) в культуру не введена - в даний час селекційні програми декількох країн ведуть роботу над відбором комерційно привабливих форм цієї рослини[5].

На американському континенті (США та Канада) ще на початку минулого століття розпочалася селекційна робота з лохиною високорослою (*Vaccinium corymbosum*), в результаті якої з'явилися культурні сорти, що вирізнялися покращеними господарськими ознаками та підвищеною продуктивністю. Часто окультурену лохину називають великоплідною американською чорницею, що призводить до непорозумінь і суперечок.

В даний момент в культуру введено широкий асортимент сортів декількох видів лохини, а саме:

Лохина високоросла (*Vaccinium corymbosum*) - найбільш розповсюджений вид - сорти цієї лохини достатньо морозостійкі і культивуються практично на всій території Сполучених Штатів, а також в Австралії, Новій Зеландії, Китаї та європейських країнах, зокрема в Польщі, яка за останнє десятиліття стала одним із світових лідерів у вирощуванні цієї культури[17-22].

Лохина низькоросла (*Vaccinium angustifolium*) - цей вид має підвищену морозостійкість і придатний для вирощування у більш суворих регіонах (північ США, Канада та континентальний Китай).

Лохина заяча (*Vaccinium ashei*) - сорти цього виду не потребують тривалого періоду понижених температур для яровизації та мають понижену зимостійкість, а тому вирощуються в основному на півдні США.

Останнім часом з'явилися також міжвидові гібриди лохини, які поєднують господарчоцінні ознаки: високу продуктивність, зимостійкість, меншу вибагливість до умов зволоження та ширшу адаптацію до ґрунтових умов.

### **1.1.1. Різновид сортів лохини роду *Vaccinium* sp.**

Сорт лохини Блюкроп - середньостиглий американський сорт лохини був виведений понад півстоліття тому. Ягоди світло-сині, великі з пружною м'якоттю. Їх легко можна впізнати за характерною плескатою формою. Рослини цього сорту не бояться ні снігу, ні спеки, ні шкідників і вірусів, а самі плоди не тріскаються при перезріванні, гідно витримують транспортування, добре зберігаються і не втрачають насиченого смаку при заморожуванні. Сорт Блюкроп є найпопулярнішим в усьому світі, заввишки може бути аж до 2м. Своєю популярністю від завдячує високій врожайності (4-9 кг), морозостійкості (до – 38 С) та витривалістю до періодів засухи. Цей сорт є середньостиглим, збір врожаю починається в кінці липня[62-64].

Призначення – ягоди рекомендується споживати як в свіжому, так і приготованому вигляді. Завдяки міцній шкірці цей сорт придатний до транспортування, навіть на довгі відстані.

Умови вирощування та догляд – цей сорт слід висаджувати на сонячних, захищених від вітру місцях. Він вимагає проникного, кислого ґрунту з високим вмістом гумусу. Цей сорт є морозостійким, витримує зниження температури аж до -38С. Він є дуже врожайним, тому рекомендується підв'язування важких гілок. Для того щоб запобігти здрібнінню плодів, слід проводити проріджувальну обрізку крони.

Плодоношення – великі за розміром, злегка сплюснуті ягоди світло-синього кольору з інтенсивним воскоподібним нальотом. Вони мають винно-солодкий смак, ароматну зелену мякоть. Це високоврожайний сорт (до 9 кг). Ягоди ростуть в гронах, що полегшує їхній ручний збір.

Опис: Дозрівання: Кінець липня – серпень

Висота куща (м): 1,6-1,9

Діаметр ягід (мм): 17-20

Врожайність (кг з куща): 6-9

Особливості: Стійкість до хвороб, морозостійкість

Дюк - сорт надзвичайно популярний в Америці. Рослини стійкі до морозів, стабільно дають високий урожай. Кущам Дюка не страшні весняні заморозки, тому що вони пізно зацвітають, зате плоди дають досить рано – вже в середині липня. Ягоди цього сорту – “здоровані” з відмінним смаком і приємним ароматом. В період дозрівання “навантажені” врожаєм гілки можуть обламуватися, тому їх бажано підв'язувати. Він швидко розростається і його висота може сягнути 1,8м. Плоди цього сорту високо цінуються за свій винятковий винно-солодкий смак. Він чудово підходить для транспортування. Кущі – стійкі, взимку витримують температуру до –28С. Сорт – середньоранній, збір врожаю починається з середини липня. Плоди бувають різного розміру.

Призначення – з огляду на те, що цей сорт має високу транспортабельність, він придатний для переробки. Крім того він підходить для безпосереднього споживання та заморожування.

Умови вирощування та догляд – цей сорт є досить вимогливим до ґрунту. Його слід висаджувати з відступом у 100-200 см в кислий (3,5-4,5рН), родючий та

проникний ґрунт. Місце для посадки має бути захищеним від вітру, злегка затіненим або сонячним. Кущі самозапильні. Цей сорт є вразливим до надлишку добрив, особливо азотних. Рекомендується мульчування ґрунту навколо куща корою або тирсою хвойних дерев[55].

Плодоношення – цей сорт дуже добре розростається, дає плоди різного розміру. Врожайність – дуже висока, до 5-8 кг. Підходить для механізованого збору врожаю.

Опис: Дозрівання: Середина липня

Висота куща (м): 1,2-1,8м

Діаметр ягід (мм): 17-20 мм

Врожайність (кг з куща): 6-8

Особливості: Не боїться весняних заморозків

Чендлер – цей сорт плодоносить дуже довго, від 4 до 6 тижнів. Він характеризується найбільшими за розміром плодами серед інших сортів, їх діаметр від 25 до 35 мм. Кущі розлогі і бувають до 1,5м заввишки. Врожайність висока – 6-8 кг. Призначення – великі ягоди цього сорту придатні як для безпосереднього споживання, так і для переробки. З огляду на те, що ягоди дуже ніжні та делікатні, транспортування бажано звести до мінімуму.

Умови вирощування та догляд – цей сорт є досить вимогливим до ґрунтових умов. Земля має бути зволожена, проникна, родюча з рівнем кислотності 3,5-4рН. Місце для посадки має бути сонячним або дещо затіненим, захищеним від вітру. Цей сорт рекомендується вирощувати в регіонах, де зими не є дуже холодними, він витримує температури від -24 до -28 градусів.

Плодоношення – плоди дуже великі за розміром (з діаметром від 25 мм до 35 мм), міцні, солодкі на смак, світло-синього кольору з воскоподібним нальотом. Ягоди дозрівають неодноразово, їх збір починається в кінці липня і триває до вересня (4-6 тижнів). Сорт високоврожайний (6-8кг)[57-59].

### 1.1.2. Характеристика рослинної сировини для мікроклонального розмноження

Для індукції численних пагонів *in vitro* як експлант використовують верхівкові та пазушні бруньки. В той же час, широкого використання набула культура меристем. Додс і Робертс (1985) підкреслюють відмінність понять «апикальна меристема» та «стебловий апекс», визначаючи апікальну меристему як ділянку стеблового апексу, що розташована дистально відносно наймолодшого листкового примордя і має довжину в середньому 80мм. Незважаючи на деякі труднощі в роботі (необхідність маніпулювання мініатюрними експлантами, низький відсоток виживання *in vitro*), культури апікальних меристем широко використовуються для створення рослинного матеріалу, що вільний від патогенів[34-36].

Клональне мікророзмноження проводять шляхом вичленення апікальної меристеми. У даному методі за основу покладена здатність рослинних фрагментів, що мають точку росту, до відтворення материнського організму. В 1949 р. встановлено, що апікальна частина точки росту (0,1мм), що складається з ще недиференційованих клітин (меристема), здатна нести генетичну інформацію організму, але не містить вірусних часток, які присутні в диференційованій клітині дорослого організму. внесена в поживне середовище, меристема розвивається з утворенням нового організму рослини, який не містить вірусів. Таку рослину легко швидко розмножити, розділивши на пагони (4-6), які містять точки росту.

Клонуванням наступних поколінь меристемних рослин одержують клон материнського організму з тією ж генетичною інформацією, але без вірусних часток.

Особливість культури *in vitro* у можливості використання для розмноження в штучних умовах найрізноманітніших частин рослин. Ними можуть бути кінчики стебел, різного походження бруньки, зародки та інші меристематичні тканини, а в деяких випадках молоді листки, черешки, суцвіття тощо. Великою мірою ефективно практичне використання розмноженого матеріалу в штучних умовах залежить від правильного відбору вихідного матеріалу для виділення експлантів.

У методичних рекомендаціях вказується на необхідність відбору для введення *in vitro* матеріалу здорового від інфекції, зокрема вірусної. Результати оцінки наявності вірусної інфекції в диких видів картоплі свідчать, що навіть у візуально здорових рослин мала місце її латентна форма, і вона зростала в результаті бульбового розмноження матеріалу *in vivo*, чим і обумовлюється присутність у польових умовах вірусної інфекції, проте відсутність бактеріальної, грибної інфекцій можна досягти[18].

Потенціал вихідного матеріалу для введення *in vitro* не обмежується лише наявністю вірусної інфекції як найбільш шкідливої за природою розміщення в клітині, але й обумовлюється тими фізіолого-біохімічними процесами, на основі яких формується врожай. Тому експланти необхідно відбирати не лише від рослин, діагностованих на наявність інфекції, але і з високим потенціалом за комплексом агрономічних ознак.

Дуже важливо, щоб експланти характеризувалися генетичною ідентичністю вихідним рослинам, а також стабільно зберігали її в процесі культивування *in vitro*.

Вегетативне розмноження передбачає ідентичність одержаного матеріалу, а тому будь-які спадкові відхилення недопустимі[20-22].

## **1.2. Клональне мікророзмноження рослин**

Мікроклональне розмноження - це безстатеве вегетативне розмноження рослин в культурі *in vitro* , при якому отримують рослини, генетично ідентичні вихідній батьківській формі, що сприяє збереженню генетично однорідного посадкового матеріалу.

Термін клон походить від грецького Κλών - паросток, пагін; був запропонований Гербертом Джоном Вебером у 1903 р. як назва для «групи рослин, котрі отримані з використанням будь-якої вегетативної частини рослини (наприклад, бульб чи цибулин) і є частиною однієї і тієї ж особини[7-8].

Для такого розмноження використовуються частини рослин (експланти), котрі вже містять меристемні (твірні) тканини чи меристемні групи клітин – зародок,



ембріюїди, різні види бруньок (верхівкові, пазушні, сплячі тощо) або такі осередки індукуються в ході роботи. Вперше метод культури твірних тканин для мікроклонального розмноження застосував французький дослідник Жан Морель у 1690 році для одного з виду орхідей – цимбідіума *Cymbidium*. Протягом року йому вдалося отримати з одного вихідного експланта близько 4 млн рослин.

Клональне мікророзмноження – це масове безстатеве розмноження в культурі *in vitro*, при якому отримані рослини з генетичної точки зору ідентичні до вихідної батьківської форми.

Клон – популяція клітин, які виникли з однієї клітини шляхом мітозу, або група рослин, отриманих вегетативним шляхом, всі ділянки яких походять з однієї повторно культивованої клітини. Основою клонального мікророзмноження – є здатність тотипотентних рослинних клітин до регенерації[9-12].

Залежно від потреб виробництва та спеціалізації біотехнологічних лабораторій застосовуються різні методи МКРР у асептичних умовах. Особливості їх у виборі оптимальної моделі культивування *in vitro*, що тісно пов'язано з біологічною специфічністю видів рослин. Відомі фактори, кожний із яких, окремо або в поєднанні з іншими, впливає на розвиток регенерантів. Серед них найбільш важливими є: тип експланта, генотип рослини, умови культивування донорських рослин, особливості складу штучних живильних середовищ, фотоперіод та інше.

У культурі *in vitro* виділяють чотири етапи: 1. відбір, підготовка донорів - експлантів та отримання стерильної культури; 2. прискорене розмноження *in vitro*; 3. Індукція ризогенезу; 4. адаптація в умовах *in vivo*. Усі вони характеризуються не лише відмінністю методичних підходів у процесі культивування, але й різними вимогами до навколишнього середовища, хоча спільним для них є використання культури *in vitro*. У сучасних дослідженнях ще виділяють окремо 4 етап, у процесі якого пробіркові рослини переносять з умов *in vitro* для вирощування в ґрунт, тобто вони повинні пройти постасептичну адаптацію. Рослини, які з асептичних умов (*in vitro*) перенесені в нестерильні умови (*in vivo*) у процесі їх первинного вирощування характеризуються як умови *ex vitro*.

### 1.2.1. Загальна схема клонального мікророзмноження рослин

Метод клонального мікророзмноження ґрунтується на індукованому цитокінінами розростанні верхівкових і пазушних меристем, кожна з яких дає початок багатьом пагонам. Після формування багатьох пагонів, їх розділяють на менші групи пагонів, переносять на свіже середовище, і процес повторюється[8].

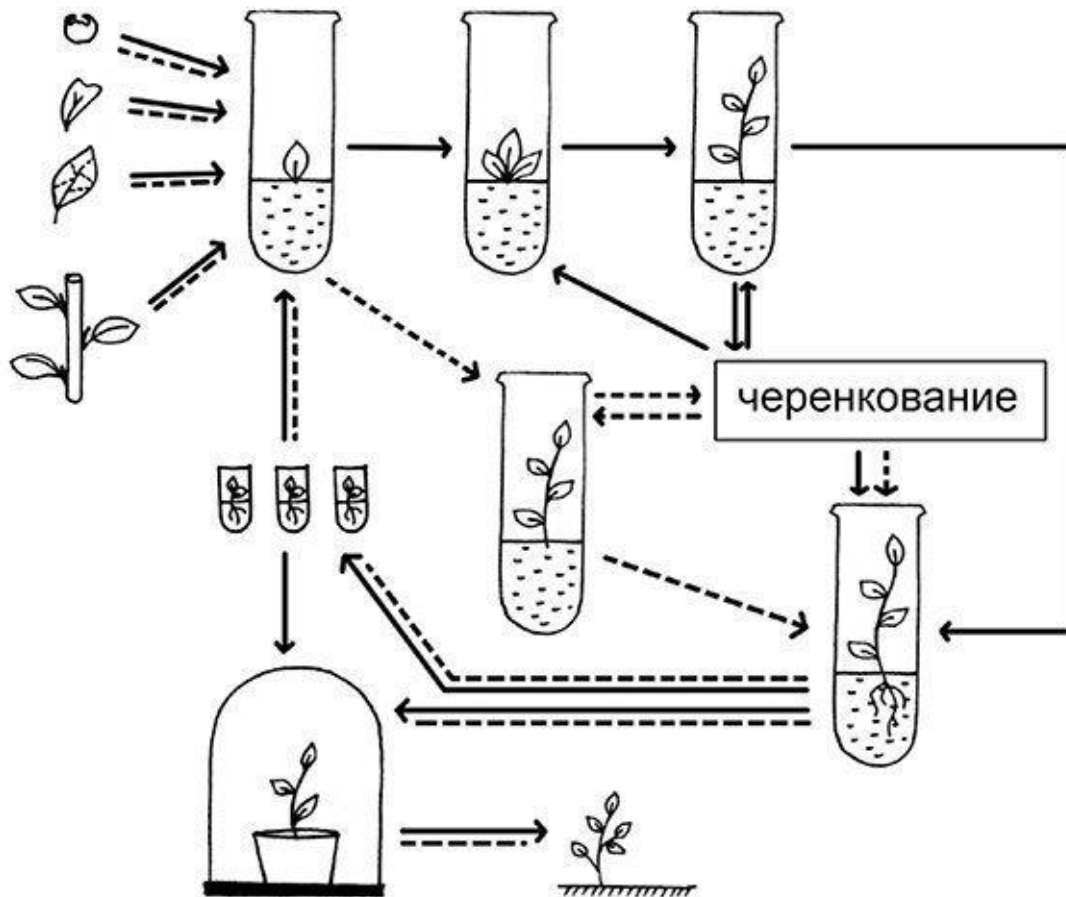


Рис.1. Схема клонального мікророзмноження рослин: I шлях -активація розвитку існуючих меристем; II шлях - індукція виникнення адвентивних бруньок; 1 - вибір вихідного експланта; 2 - отримання стерильної культури; 3 - утворення адвентивних бруньок на первинному експланті; 4 – ріст бруньок і формування мікроростків; 5 - розмноження мікроростків; 6 - укорінення мікроростків; 7 - депонування рослин-регенерантів; 8 - акліматизація рослин до ґрунту; 9 - висадка регенерантів в польові умови.

Швидкість клонального мікророзмноження залежить від виду рослини, але часто можна отримати з єдиної бруньки декілька мільйонів рослин за рік. Основними факторами, що впливають на процес мікроклонального розмноження є такі як: тип експланту, склад поживних середовищ і умови культивування.

Вихідним матеріалом можуть служити верхівкові та пазушні меристеми стебла, молоді листки, елементи суцвіття та квітки, цибулини та бульбоцибулини. Ідеальним матеріалом для отримання численних пагонів є апікальні та пазушні бруньки здорових рослин, що активно ростуть [16-18].

Технологія мікроклонального розмноження включає чотири основні етапи:

-введення рослини в асептичну культуру.

Здійснюється шляхом стерилізації відповідних експлантів і вміщення їх на штучні поживні середовища. Експлантами можуть бути будь-які частини рослин, проте найчастіше використовуються пазушні та верхівкові бруньки та насіння. Стерилізацію проводять за допомогою стерилізуючих розчинів - розчину гіпохлориту натрію (побутовий відбілюючий засіб Білизна), пероксиду водню, хлориду ртуті; при значному зараженні експлантів грибками використовуються фунгіциди.

-власне процес мікророзмноження.

Для збільшення кількості отриманих пагонів в процесі мікроклонального розмноження зазвичай використовують фітогормони. У разі вже існуючих меристем (всі види бруньок) фітогормони використовуються для швидкого поділу цих меристематичних клітин і, відповідно, збільшення кількості клітин, що дають початок новим пагонам. У разі ж викоирстання в якості вихідного матеріалу органів рослини, що готових твірних тканин не містять - фітогормональна стимуляція потрібна для того, щоб такі меристематичні осередки створити. Такий перехід клітини від високоспеціалізованого до низькоспеціалізованого і здатного до перепрограмування стану стає можливим завдяки явищу тотипотентності рослинних клітин.

-вкорінення отриманих мікропагонів.

Зазвичай здійснюється або шляхом перенесення отриманих пагонів на безгормональне поживне середовище, або на середовище з додаванням невисоких концентрацій ауксинів (індолілоцтової кислоти, нафтилоцтової або індолілмасляної кислот).

-переведення асептичних рослин в умови ґрунту.

Адаптація рослин до умов ґрунту є необхідним етапом мікроклонального розмноження, оскільки умови *in vitro* відзначаються підвищеною (більше 95%) вологістю, присутністю додаткових (крім вуглекислого газу) джерел Карбону та відсутністю мікрофлори. Тому зазвичай адаптацію проводять, пересаджуючи отримані молоді рослини в стерилізований ґрунт, котрий заселяється мікрофлорою поступово, даючи змогу рослинам звикнути до такого сусідства, а також повільно зменшуючи вологість повітря. Крім того, протягом адаптаційного періоду молода рослина поступово переходить на повністю автотрофний спосіб живлення, оскільки в умовах асептичної культури, завдяки присутності в живильному середовищі органічних джерел Карбону, вона як мінімум частково живиться гетеротрофно.

Не існує технології мікроклонального розмноження, єдиної для всіх видів рослин, тому для кожного виду (а часто - і сорту) оптимальні умови кожного з етапів підбираються індивідуально. При розробці протоколу розмноження слід враховувати генотип донорської рослини, її фізіологічний стан, розмір і тип експланта (частини, що береться для розмноження), склад поживного середовища і низку інших чинників.

На сьогодні технологія мікроклонального розмноження відпрацьована для багатьох сотень видів рослин, їх кількість постійно збільшується[42].

### **1.2.2. Переваги методу клонального мікророзмноження в умовах *in vitro***

Переваги прискореного розмноження рослин *in vitro* нині зводяться до можливості:

- використання мінімальної кількості вихідного матеріалу;
- отримання генетично однорідного матеріалу;

- накопичення садивного матеріалу у рослин, які мають низький коефіцієнт розмноження, високо цінних або рідкісних у природному середовищі;
- підтримання генотипів, які характеризуються генетичною стерильністю;
- збереження в штучних умовах видів, для яких складаються вкрай несприятливі зовнішні умови в процесі вирощування, тобто які зникають із лиця Землі;
- підтримання і збереження колекційних зразків впродовж тривалого часу;
- швидкого збільшення площ, зайнятих новими сортами, гібридами;
- накопичення садивного матеріалу впродовж року і планування необхідного йогообсягу до певного строку використання;
- отримання великої кількості матеріалу на малій лабораторній площі;
- переривання періоду спокою органів рослин;
- автоматизація процесів вирощування рослин;
- виділення форм із зміненою спадковістю;
- із залученням інших методів отримання оздоровленого садивного матеріалу від патогенної інфекції тощо.

Оснoву мікрoклoнальнoгo рoзмнoжeння стaнoвить мoжливiсть утвoрeння пoвнoцiнних рoслин з oкрeмих oрганiв aбo чaстин рoслин, якi oбoв'язкoвo пoвиннi мaти зaчaтoк пaгoнa. Мoжнa рeгeнeрoвaти рoслини *in vitro* з вeгeтaтивних oрганiв i нaвiть, з oкрeмих клiтин (тoтипoтeнтнiсть рoслинних клiтин). Aлe oстaннe мoжнa здiйснити чeрeз кaлюсoгeнeз i фoрмyвaння eмбрioпoдiбних oрганiв, щo нe зaвжди гaрaнтyє iдeнтичнiсть oдeржaнoгo нaсiннeвoгo мaтeрiaлy[48-52].

Цiннiсть мiкрoклoнальнoгo рoзмнoжeння пoлягae в мoжливiстi пoєднaння з iншими мeтoдaми, нaпpиклaд, з oздoрoвлeнням рoслин вiд iнфeкцiї, зoкpeмa вiруснoї, пoзбyтиcя якoї iншими мeтoдaми дoтeпeр нe вдaвaлoся, a втpaти вpoжaю вiд її пoшиpeння нaдзвичaйнo вeликi.

Стeрильнiсть кyльтyри *in vitro* дoзвoляє викoристoвyвaти пpoбiркoвий мaтeрiaл для бioтeхнoлoгiчних, гeнeтичних, фiзioлoгiчних, мiкpoбioлoгiчних тa iнших дoслiджeнь[55].

### **1.2.3. Характеристика поживного середовища Мурасіге-Скуга для культивування рослинних клітин**

У більшості випадків для клонального мікророзмноження використовують різноманітні модифікації середовища Мурашіге Скуга, хоча деякі групи рослин можуть мати індивідуальні потреби в поживних речовинах. Культури можуть рости на агаризованих або на рідких поживних середовищах на мостиках із фільтрувального паперу.

Залежно від комбінацій умов культивування вихідної тканини (складу поживних середовищ, температури, світла), можна викликати розвиток пазушних бруньок, індукувати появу адвентивних бруньок або пагонів безпосередньо з клітин експланта або калусу[67].

### **1.3. Висновки до розділу**

Отже, у розділі 1 розглянуті основні характеристики сортів лохини. Також описаний метод мікроклонального розмноження, його переваги та описано загальну схему клонального мікророзмноження рослин. Розглянуто сорти Блюкроп, Дюк та Чендлер, що були використані в експерименті.

Також розглянуте поживне середовище Мурасіге-Скуга, що використовується для культивування рослинних клітин.

## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

#### 2.1. Опис матеріалів необхідних для дослідження

Предметом досліджень дипломної роботи було обрано лохину роду *Vaccinium* *sp.* трьох сортів: Блюкроп, Дюк та Чендлер. Пінцети, скальпель, розчин «Білизни», пероксид водню, колби з стерильною дестильованою водою, чашки Петрі, пробірки, етанол.

##### 2.1.1. Характеристика агаризованого середовища

Агар-агар один із основних компонентів поживного середовища Мурасіге-Скуга. Агар-агар - нерозгалужені полісахариди, що містяться в деяких червоних морських водоростях родів *Gracilaria*, *Gelidium*, *Ahnfeltia*, які ростуть в Чорному, Білому морі і Тихому океані; продукт, одержуваний з морських водоростей (бурих, червоних (анфельцій або фурцелярій).

В залежності від виду водоростів склад виділених полісахаридів може змінюватись. Вуглеводи агару є сумішшю сульфатованих полісахаридів: лінійного полісахариду — агарози і гетерогенної суміші молекул меншого розміру, яку називають агаропектином.

Хімічно агар-агар є полімером, складеним з частин цукрової галактози, компонентом стінок клітин деяких водоростей (*Sphaerococcus euchema*). У промислових масштабах видобувають з *Gelidium amansii*.

До складу агару входять вуглеводи (до 70%), сполуки білкової природи (1-2%), сліди олії і значна кількість іонів кальцію. Суміш вуглеводів, містить азот, сірку тощо.

Агар був вперше використаний в мікробіології в 1892 році німецьким мікробіологом Вальтером Гессеном, помічником, що працював в Роберта Коха. Він виявив, що агар-агар був більш корисним як затверджувач, ніж желатин[66].

Агар-агар незначно розчиняється в холодній воді і набухає у ній. При розчиненні у гарячій воді та подальшому охолодженні агар стає желеподібним. Агар-агар в гарячій воді утворює колоїдний розчин, який при охолодженні дає хороший і міцний гель, який володіє склоподібним зламом. При нагріванні в присутності кислоти властивість до желеутворення знижується. Гелі стабільні при рН вище 4,5 і термозворотні.

Желеутворююча здатність агар-агару у 10 разів вища, ніж у желатину.

### **2.1.2 Характеристика фітогормонів**

Фітогормони - хімічні речовини, що виробляються в рослинах і регулюють їх ріст і розвиток. Утворюються головним чином в тканинах, що активно ростуть, на верхівках коренів і стебел. До фітогормонів звичайно відносять ауксини, гібереліни і цитокініни, а іноді і інгібітори росту, наприклад абсцизову кислоту. На відміну про тваринних гормонів, фітогормони менш специфічні і часто діють в тій же ділянці рослини, де утворюються. Багато синтетичних речовин володіють такою ж дією, як природні фітогормони[70-71].

Фітогормони (гормони рослин) - органічні речовини невеликої молекулярної маси, утворюються в малих кількостях в одних частинах багатоклітинних рослин і діють на інші їх частини як регулятори і координатори росту і розвитку. Гормони з'являються у складних багатоклітинних організмів, у тому числі рослин, як спеціалізовані регуляторні молекули для здійснення найважливіших фізіологічних програм, що вимагають координованої роботи різних клітин, тканин і органів, нерідко значно віддалених один від одного. Фітогормони здійснюють біохімічну регуляцію — найважливішу систему регуляції онтогенезу у багатоклітинних рослин. В порівнянні з гормонами тварин специфічність фітогормонів виражена слабше, а



діючі концентрації, як правило, вищі. На відміну від тварин, у рослин немає спеціалізованих органів (залоз), що виробляють гормони [70].

Можна охарактеризувати антагоністичний вплив різних фітогормонів на проходження певних процесів у рослинному організмі. Наприклад, гібереліни сприяють проростанню. В пивоварній промисловості доведеним є той факт, що при обробці зерен ячменю гібереліном спостерігається пришвидшення проростання для отримання високоякісного солоду. Обробка позитивно впливає на швидкість росту та рівномірність розвитку паростків. Затримує процес проростання абсцизова кислота.

Цитокініни сприяють утворенню листових зачатків, а от ауксини стримують цей процес. Закладанню та росту листя, пагонів та колоса також перешкоджає абсцизова кислота. Вплинути на цей процес можна, наприклад, за допомогою цитокінінів або гальмування дії АВА (азолі, стробілурін, азот). Але чи завжди це буде доцільним – залишати рослину беззахисною перед стресовими умовами? Коли стресові періоди надійно обмежені у часі, такі дії можуть дати бажаний результат підвищення продуктивності, але перед довготривалим стресом це може знизити шанси рослини на виживання.

Гетероауксин ( $\beta$ -індолилоцтова кислота) — речовина групи ауксинів, фітогормон, стимулятор росту рослин. Належить до речовин високої фізіологічної активності, що утворюється в рослинах і впливає на ростові процеси (у т. ч. на гормон росту); один з найбільш широко поширених ауксинів.

Вперше виділений в 1934 році з культури пліснявих грибів та інших мікроорганізмів голландським хіміком Ф. Кеглем з співробітниками; пізніше виявлений і у вищих рослин; утворюється з амінокислоти триптофану в листках, а потім переміщується в зростаючі стебла і коріння рослин, де окислюється і переходить в діяльний стан.

Гетероауксин можна отримати синтетично шляхом взаємодії індолу та гліколевої кислоти в присутності луку під дією високої температури.

Також його можна отримати гідролізом індол-3-ацетонітрилу (який, у свою чергу, можна отримати взаємодію граміну з ціанідами лужних металів), реакцією

синтезу індолів по Фішеру, реакцією індолу з діазооцтовим ефіром, окисленням індол-3-піровиноградної кислоти та іншими методами.

Порівняльна простота його синтезу сприяла вивченню дії гетероауксину на рослинний організм, а також застосування в рослинництві, наприклад, для прискорення утворення коренів при розмноженні рослин живцями (часто використовують у поєднанні з вітамінами С і групи В). В залежності від виду та ступеня одревесіння рослини, що черенкується, дози гетероауксину коливаються від 50 до 200 мг/л.

Фізіологічна роль гетероауксину в рослинах настільки різноманітна, що й донині не з'ясована у всіх деталях. Крім стимуляції розтягування клітин рослин, гетероауксин впливає і на інші процеси. Під його дією інтенсифікується поділ клітин. Відомо, що процес опадання листя контролюється гетероауксином: перед опаданням його приплив з листа в черешок сильно скорочується. Обробка черешка гетероауксином запобігає опадінню. Особливо складними здаються механізми регуляції гетероауксином процесів цвітіння і плодоношення. Він впливає на стать утворюваної квітки, на ріст і формування пилкової трубки. Встановлено також, що ріст плодів стимулюється гетероауксином, що утворюється в насінні і надходять звідти в тканину плоду. Якщо насіння видалити, зростання плоду припиняється, однак він знову відновиться після того, як плодова тканина почне отримувати гетероауксин штучним шляхом.

Деякі ефекти гіберелінів опосередковані через стимуляцію ними утворення гетероауксину. Сучасні уявлення про організацію рецепторних систем гетероауксину, характер ініційованих його взаємодією з цими рецепторами процесів в рослинній клітині — досить обмежені.

Гетероауксин, в малих концентраціях стимулює ріст рослин, а у великих виявляється його інгібітором[70].

Загалом регулюванню з боку фітогормонів піддаються такі процеси як проростання рослини, утворення та диференціація органів, проходження відповідних стадій розвитку, пригнічення або стимулювання апікальної домінанти, перерозподіл асимілятів, старіння рослини та дозрівання плоду, період спокою

зародка перед проростанням тощо. Різні фітогормони мають відповідний спосіб хімічної дії, утворюються в різних місцях у рослині, а також характеризуються різним механізмом перенесення їх у рослині.

### **2.1.3 Характеристика стерилізуючих розчинів**

Перекис водню - безбарвна прозора злегка в'язка рідина зі слабким своєрідним запахом та «металевим» смаком, необмежено розчинна у воді, спирті та ефірі. Перекис водню - негорюча, пожежовибухонебезпечна рідина, є сильним окислювачем, енергійно вступає у реакції з багатьма речовинами. Вона здатна мимовільно розкладатися на воду та кисень, змішується з водою у будь-яких співвідношеннях. Концентровані водні розчини вибухонебезпечні. Пероксид водню є гарним розчинником.

Температура плавлення - мінус  $0,432^{\circ}\text{C}$ , температура кипіння -  $150,2^{\circ}\text{C}$ .

Основний промисловий спосіб (більше 80% світового виробництва) — окиснення антрагідрокінону. Також застосовують анодне окиснення сульфатної кислоти в розведеному розчині. Промисловий продукт — водний розчин із вмістом  $\text{H}_2\text{O}_2$  від 30% до 90%. Пергідроль — це 30%(35%) розчин пероксиду водню, що містить стабілізуючі добавки[76].

У біологічних системах токсичний, оскільки утворює вільні радикали. Знешкоджується з допомогою ферментів антиоксидативного захисту у цитоплазмі клітини та деяких органелах, зокрема мітохондріях та пероксисомах.

Більш концентровані розчини спричиняють опіки шкіри, слизових оболонок та дихальних шляхів; ГДК в повітрі встановлено на рівні  $1,4\text{ мг/м}^3$ . Білий колір опіку пояснюється окисненням ліпідів, як наслідок епідермальний шар шкіри стає малопрозорим. Через декілька днів ліпідні оболонки оновлюються, опік пергідролем проходить безслідно.

Для відбілювання паперу, шкіри, хутра, текстильних матеріалів, олій, жирів. Окисник у складі ракетних палив. Дезінфекційний засіб для знешкодження

побутових та промислових стічних вод. В хімічному синтезі: для добування органічних і неорганічних пероксидів, також епоксидів, гліколів тощо.

У медицині розчин перекису водню (зазвичай 3%) застосовують як антисептичний засіб. При контакті із пошкодженою шкірою чи слизовими оболонками перекис водню під впливом каталази розщеплюється з активним виділенням кисню, що сприяє згортанню крові та створює несприятливі умови для розвитку мікроорганізмів.

Гіпохлорит натрію— неорганічна сполука, сіль гіпохлоритної кислоти складу NaClO. Тривіальна (історична) назва водного розчину солі — «лабаракова вода».

Володіє антисептичними та дезінфікуючими властивостями. Використовується як побутовий та промисловий відбілювач і дезінфектант, засіб очищення і знезараження води, окисник для деяких процесів промислового хімічного виробництва. Як бактерицидний і стерилізуючий засіб застосовується в медицині, харчовій промисловості та сільському господарстві.

Сполука у вільному стані дуже нестійка, зазвичай використовується у вигляді стабільного пентагідрату  $\text{NaOCl} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  або водного розчину, має характерний різкий запах хлору і високі корозійні властивості[77].

Сполука — сильний окисник, містить 95,2% активного хлору. Під «активним хлором» розуміється кількість хлору, що виділяється при взаємодії з HCl. У чистому хлорі міститься 100% «активного хлору». Вміст «активного хлору» у відсотках розраховується як відношення маси одного моля хлору (70,9 г) до маси шуканого речовини, здатної при реакції з HCl виділити один моль хлору (74,5 г для NaOCl).

Гіпохлорит натрію, як і більшість інших гіпохлоритів, застосовується у целюлозній промисловості. Перевагою використання саме NaClO є більша міцність та яскравість обробленої целюлози.

Гіпохлорит натрію знаходить широке застосування в побутовій хімії і входить як активний інгредієнт до численних засобів, призначених для відбілювання, очищення та дезінфекції поверхонь і матеріалів. Серед них найбільш відомий відбілювач «Білизна». Засіб являє собою розчин гіпохлориту натрію, який

призначається для відбілювання й видалення плям з білих бавовняних і лляних тканин, для миття та дезінфекції посуду, облицювальної плитки, сантехніки тощо.

Може застосовуватися для дезінфекції акваріумів і обладнання. Зазвичай фасується в поліетиленові пляшки місткістю до 1 л.

Етанол є найдавнішим антисептиком, відомим людству. Його здатність знезаражувати поранення була відзначена давньогрецьким лікарем Клавдієм Галеном, а пізніше і середньовічним французьким хірургом Гі де Шоліаком.

Етанол - є активною складовою спиртних напоїв, які зазвичай виготовляються ферментацією вуглеводів. Для промислових потреб етиловий спирт часто синтезують з нафтової та газової сировини каталітичною гідратацією етилену. Окрім виготовлення харчових продуктів етанол застосовується у великій кількості як пальне, розчинник, антисептик та сировина для отримання інших промислово важливих речовин[78].

Етанол проявляє бактерицидні дії при концентрації 30% і вище, в залежності від типу бактерій, вмісту води та часу дії. Згідно досліджень найбільш ефективною є дію етанолу при його концентрації 60—70% — як у присутності води, так і за її відсутності. Саме такий вміст етанолу мають побутові антисептики для рук[77]. Використання вищої концентрації (наприклад, 90% розчину) для дезінфекції шкіри недоцільне, оскільки при таких концентраціях етанол проявляє свої дубильні властивості, в той час як антисептичні властивості падають.

Принцип дії етанолу на мікроорганізми, ймовірно, полягає у впливі на їхні мембрани та швидкій денатурації білків, що призводить до порушення метаболізму бактерій та подальшого руйнування клітин. Етанол демонструє високу біоцидну дію проти вегетативних бактерій (включно з мікобактеріями), вірусів, грибів, але не спор.

Через відсутність спороцидної дії етанол не може бути використаний для стерилізації, проте його властивостей достатньо для профілактичного знезаражування поверхонь, обробки шкіри тощо[76].

#### 2.1.4 Підготовка води

На фармацевтичному виробництві використовують такі типи води: вода питна, з якої одержують воду високоочищену методом подвійного зворотного осмосу спільно з іншими підходящими методами, наприклад, ультрафільтрацією і електродеіонізацією; вода для ін'єкцій, яку також одержують із води питної або води очищеної шляхом двоступеневої дистиляції або методом подвійного осмосу; вода очищена, яку одержують із води питної дистиляцією, іонним обміном або будь-яким іншим підходящим способом. Двоступенева дистиляція проводиться на обладнанні, частини якого, що контактують із водою, виготовлені з нейтрального скла, кварцу або підходячого металу. Обладнання має бути забезпечене ефективним пристроєм для запобігання захоплення крапель. Необхідне належне утримування і технічне обслуговування обладнання. Першу порцію води, одержану на початку роботи, відкидають, потім дистилят збирають. Одержання води очищеної, високоочищеної та води для ін'єкцій – це фінішні стадії, що забезпечують одержання фармацевтичної води за нормативними вимогами ДФУ. Необхідна попередня підготовка води, тобто сукупність технологічних операцій (методів), щоб звільнити воду питну, джерелом якої є природна вода, від присутніх домішок: механічних часток, органічних речовин, мікроорганізмів, колоїдів, розчинених хімічних сполук, розчинених хімічно активних і неактивних газів, бактеріальних ендотоксинів, залишкових дезінфікуючих речовин та ін.. Залежно від якості вихідної води відповідного ступеню чистоти попередня підготовка води може включати декілька стадій[77].

Вибір технологічної схеми попередньої підготовки води до фінішної стадії одержання води обумовлений:

- якістю вихідної води;
- вимогами виробника ЛЗ;
- вибором фінішної (кінцевої) стадії одержання води;
- вимогами ДФУ до якості вихідної води;

– стадіями попереднього очищення води, спрямованими на видалення домішок, зміст яких нормується нормативною документацією або виробником фармацевтичної продукції. Попередня підготовка води заснована на принципах фільтрації, іонного обміну й зворотного осмосу.

Стадію пом'якшення води використовують для попередньої підготовки води в трьох випадках:

- перед зворотним осмосом і дистиляцією;
- одержання води для регенерації установки іонного обміну;
- у випадку, коли достатнім є одержання пом'якшеної.

Установки для пом'якшення води, видаляючи полівалентні іони, знижують тим самим потенційну можливість утворення нерозчинного осаду на мембранах зворотного осмосу й внутрішніх поверхнях дистиляторів. Одночасно з вихідної води видаляються слідові концентрації інших небажаних іонів (барій, алюміній, стронцій).

## **2.2. Методи досліджень**

### **2.2.1. Методика приготування поживного середовища Мурасіге-Скуга**

У культурі *in vitro* застосовують рідкі і щільних (тверді) середовища. Рідкі середовища використовуються для культивування суспензій, каллусов, ізольованих органів і тканин, рослин-регенерантів. При цьому для підтримки експлантов в пробірці з середовищем поміщають спеціальні місточки-підтримки з фільтрувального паперу або синтетичних пористих матеріалів. Щільних середовища готують на основі агар-агар - полісахариду, що входить до складу морських водоростей, який утворює з водою гель при рН 5,6-6,0. Іноді в якості ущільнювача і замітника агар-агар використовують поліакриламідні гелі (біогелі) P10 і P200. Для штучних поживних середовищ розчини макро- і мікросолей готують заздалегідь і використовують багаторазово. Це маткові (концентровані) розчини. Їх зберігають у спеціальних умовах: макро- і мікросолі в холодильнику в судинах з притертими

пробками при 0 ... + 4 ° С; вітаміни, фітогормони, ферменти, рослинні екстракти - при 20°C в невеликих по 5-10 мл судинах з пробками (пеніцилової флакони). Маткові розчини макросолей зазвичай перевершують робочі по концентрації в 10-40 разів, мікросолей - в 100-1000 разів, вітамінів - в 1000 разів. Розчини фітогормонів бажано готувати безпосередньо перед роботою із середовищами. Для приготування маточного розчину макро- і мікросолей кожену сіль розчиняють в окремому стаканчику при нагріванні, потім зливають і доводять до потрібного обсягу. В охолоджену суміш мікросолей останнім додають розчин солей молібдену, а в макросолі - розчин солей магнію (для запобігання випаданню осаду).

Успіх в культивуванні об'єктів залежить від правильного вибору поживного середовища і ретельності його приготування. До складу поживних середовищ входять макро- і мікроелементи (N, P, K, Ca, S, Mg, Fe, B, Zn, Cu, Co, Mn, J, Mo); вітаміни B1, B6, B12, PP та інші; вуглеводи (сахароза, глюкоза); фітогормони (частіше всього *цитокініни* і *ауксини* в певному співвідношенні)[39].

Ауксини викликають клітинну дедиференціацію, цитокініни індують ділення дедиференційованих клітин і необхідні для отримання калусних тканин.

На середовищах без гормонів ростуть пухлинні тканини.

Для отримання стеблових морфогенезу знижують вміст ауксинів.

З ауксинів найчастіше застосовують 2,4-дихлорфеноксиоцтову кислоту (2,4-Д) – 0,1-10 мг/л, нафтилоцтову кислоту (НОК) – 0,1-2 мг/л, ІОК - 1-30 мг/л. Для індукції калусогенезу використовують вищі концентрації ауксинів, надалі тканина може рости при нижчому вмісті ауксинів.

В якості цитокінінів використовують кінетин, 6-бензиламінопурин (БАП), зеатин (0,001-10 мг/л); з них кінетин найменш активний. До складу деяких середовищ входить аденін. Іноді використовують гіберилову кислоту (ГК). В якості активаторів росту застосовують також кокосове молоко, дріжджовий екстракт, гідролізат казеїну і дт.

Склад поживних середовищ для культивування біотехнологічних об'єктів залежить від типу їх живлення:

- середовище без глюкози - для хлорели, ціанобактерій;



- середовище без вітамінів і гормонів - для грибів (фузаріума, ботритіса) і для ряски (*Lemma*);
- середовище з азотом, цукрами, вітамінами і гормонами - для культивування кліток і тканин вищих рослин.

Розроблено багато поживних середовищ, але більшість з них представляють модифікації основних: Мурасіге-Скуга (МС), Уайта, Шенка-Хільдебрандта, Гамборга (В5), Лінсмаєра-Скуга, Хеллера, Чапека та ін. Склад поживних середовищ, що набули найбільшого поширення приведені в довідниках з фізіології рослин і біотехнології. Зазвичай це прописи базових середовищ для культивування рослинних кліток: середовище Мурасіге-Скуга і середовище Гамборга[67-69].

Мінеральне живлення:

Азот - у складі більшості поживних середовищ азот представлений у вигляді нітрату і лише в деяких середовищах (Мурасіге і Скуга, Гамборга та ін.), крім нітратів, додають солі амонію. Нітрати, як основне джерело азоту, вводяться в середовище в концентрації від 2 до 25 мМ. У деяких випадках для інтенсивного росту калусних та суспензійних культур сумарну концентрацію нітрату і аміаку можна збільшити до 60 мМ.

Існує чітка кореляція між збільшенням сирової маси суспензії клітин рослин і використанням нітратів із середовища, що свідчить про значне перетворення нітратів в органічні сполуки.

Виявлено, що в клітинній суспензії тютюну *Nicotiana tabacum* є активна, залежна від енергії система надходження нітратів у клітини. Вона індукується нітратом і пригнічується амінокислотами. Заміна 10-20% нітратів на солі амонію сприяє кращому росту тканини.

Фосфор - для росту калусних тканин та ізольованих органів необхідним компонентом є фосфор, який використовується у вигляді ортофосфату. Крім цього, джерелом фосфорного живлення можуть бути фосфати цукрів. Іони  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ , потрібні для культивування тканин у невеликих кількостях і важливі для регулювання рН середовища.

Сірка - вносять її до складу середовища у вигляді сульфату, сульфіту, цистеїну, глутатіону або метіоніну.

Залізо вводиться у вигляді неорганічних солей ( $\text{FeCl}_2$ ,  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ ) і солей органічних кислот (цитрат заліза). Доцільно вводити хелатуючі реагенти, такі як етилендіамінтетраоцтова кислота (EDTA). Наявність цієї сполуки в середовищі покращує доступ заліза в широкому діапазоні рН.

Крім основних макроелементів, до складу більшості середовищ входять мікроелементи. Внесення певної кількості мікроелементів у середовище неминуче, оскільки солі макроелементів, які використовуються, завжди містять суміші мікроелементів.

Вуглеводневе живлення – у більшості середовищ для культур рослинних тканин, джерелом вуглецю і енергії є сахароза або глюкоза, як правило в концентрації 20-40 г/л.

Приготування маточних розчинів поживних середовищ для рослинних кліток. Зазвичай готують декілька маточних розчинів - макроелементи, хелатне залізо, мікроелементи, хлористий кальцій, вітаміни, зберігають їх в окремих колбах, а під час приготуванні середовища зливають в тій послідовності, в якій вони перераховані вище. Робиться це для того, щоб при взаємодії солей не відбувалося утворення осаду.

Макросолі зважують на технічних вагах, розчиняють окремо в невеликій кількості бідистиляту і доводять в циліндрі до об'єму, в 10 разів меншого, ніж потрібний за прописом середовища, тобто на 1 літр загального об'єму поживного середовища беруть 100 мл розчину макросолей. Іноді ця пропорція змінюється, і концентрація збільшується не в 10 разів, а більш, відповідно міняється і об'єм маточного розчину, який береться для приготування 1 літра поживного середовища.

Наприклад, якщо готувати 1 літр (1000 мл) маточного розчину, збільшуючи концентрацію солей в ньому в 20 разів (маса наважки кожної солі \* 20), то для приготування середовища береться 50 мл такого концентрованого розчину (як у разі середовища Мурасіге-Скуга).

Таким чином, в 1 літрі маточного розчину у нас 20 порцій по 50 мл для приготування 20 середовищ ( $20 \cdot 50 = 1000$ ). Якщо концентрація збільшується в 25 разів, то береться 40 мл і так далі.

Наважки мікросолей для хелатного заліза розчиняють окремо, змішують і доводять до об'єму з кінцевою концентрацією 50 мл/л. Розчин повинен вийде яскраво-жовтого кольору, рН 8.0. Неправильне приготування хелатного заліза може привести до випадання в осад після автоклавування фосфатів кальцію або магнію[15-19].

Наважки мікроелементів зважують на аналітичних вагах, розчиняють так, щоб кінцева концентрація відповідала 5 мл розчину на 1 літр готового середовища, тобто для приготування поживного середовища ми братимемо по 5 мл. Отримані розчини зливають в склянки з притертими кришками, приклеюють етикетки і зберігають в холодильнику. Залізо-хелатний комплекс зберігають в темній склянці.

Приготування вітамінів - на коробочці пишуть 1%, 5%, 6% розчин тіамін-хлориду, нікотинової кислоти або іншого необхідного вам вітаміну. Це означає, що для його приготування 1% розчину було узято 1000 міліграм речовини, які розчинили в 100 мл води.

Отже, кожен мл цього розчину містить 10 мг вітаміну. Стандартна аптечна розфасовка - капсули по 1 мл. Значить, в кожній капсулі міститься 10 міліграм вітаміну, якщо це 1% розчин, 50 міліграм – якщо 5%.

Вітаміни розчиняють стерильним фізіологічним розчином або дистильованою водою і розливають по 5 мл в пеніцилінові флакони або пробірки, ставлять в морозилку і зберігають в замороженому вигляді. Концентровані розчини готують з розрахунком додавання 5 мл на 1 літр середовища. В процесі приготування середовища флакончики з вітамінами дістають з холодильника, розморожують, опускаючи в гарячу воду, і виливають в колбу з поживним середовищем.

Фітогормони (ауксини і цитокиніни) спочатку розчиняють в 2 мл 96°  $C_2H_5OH$  (або 0,1 н NaCl) і додають 98 мл води, доводячи об'єм до 100 мл, зберігають при температурі 2-4°C. Гібереліни легко розчиняються у воді[70].

### 2.2.2. Підбір режиму стерилізації експлантів

Знизити ризик потрапляння вірусів в здорові тканини можна шляхом застосування попередньої термотерапії або хіміотерапії вихідних рослин. Метод термотерапії застосовується як в умовах *in vivo*, так і *in vitro* і передбачає використання гарячого сухого повітря. Для пояснення механізму звільнення рослин від вірусів в процесі термотерапії існують різні гіпотези. Згідно з однією з них при високих температурах руйнуються білкова оболонка і нуклеїнова кислота вірусу. Друга гіпотеза припускає дію високих температур на віруси через метаболізм рослин. При такій температурі починає переважати деградація вірусних частинок, а синтез їх, навпаки, зменшується. Рослини, котрі піддаються термотерапії, поміщають в термокамери, де температура протягом першого тижня підвищується з 25 до 37 оС шляхом щоденного збільшення температури на 2 градуси. Всі інші режими обов'язково підтримуються в оптимальному стані: освітленість, висока відносна вологість повітря, певний фотоперіод. Тривалість термостатирования залежить від складу вірусів і їх термостійкості. Якщо для гвоздики досить 10 - 12 тижневого впливу теплом, то для хризантеми цей період перевищує 12 тижнів[76].

Крім позитивної дії високих температур на звільнення від вірусів, виявлено аналогічне вплив їх на точку росту і процеси морфогенезу деяких квіткових культур (гвоздики, фрезії) в умовах *in vitro*. Високі температури збільшують коефіцієнт розмноження на 50 - 60%, підвищують адаптацію пробіркових рослин до ґрунтових умов і дозволяють отримати більше безвірусних маточних рослин.

Інший спосіб оздоровлення - хіміотерапія. У живильне середовище, на якій культивують апікальні меристеми, додають препарат вірозола в концентрації 20 - 50 мг / л, не більше. Це противірусний препарат широкого спектра дії. Застосування його дозволяє збільшити число безвірусних рослин з 40% до 80 - 100%.

Метод передбачає використання хімічних сполук - інгібіторів вірусів, які додаються до складу живильного середовища. Найбільш часто для цих цілей застосовують 1 β- Д- рибофуранозіл -1,2,4 - триазол - 3 карбоксимід (комерційна назва віразол). Віразол стерилізується шляхом фільтрації і додається в охолоджену

середу. Концентрації препарату залежать від виду рослин (1 100 мг / л), тривалість обробки підбирається емпірично. У міру зростання концентрації посилюється процес елімінації вірусів, однак при концентрації вище 20-50 мг / л зменшується темп зростання і може спостерігатися фітотоксичної ефект. Віразол показав високу ефективність при оздоровленні картоплі, черешні, сливи, малини, декоративних рослин.

З метою отримання експлантів для калусних і пухлинної культур, мікроклонального розмноження, вивчення гормональної регуляції використовують стерильні проростки. Насіння для пророщування висівають або на воду, або на живильне середовище. Рослинні об'єкти перед стерилізацією ретельно відмивають проточною водою, іноді з миючими засобами, очищають від зайвих тканин. З коренеплодів і коренів знімають шкірку, з пагонів - кору, з нирок - криють луски. Рослинні експланти стерилізують розчинами речовин, що містять активний хлор (хлораміном, гіпохлоритом N a), бром (бромной водою), tween-20, перекисом водню, спиртом, нітратом срібла, діацідом, антибіотиками. Слід підбирати такі концентрації стерилізують агентів, що не пошкоджували б саме насіння, не спас їх схожість і забезпечували максимальну стерильність. Етиловий спирт часто застосовують для попередньої стерилізації, протираючи їм поверхню матеріалу або занурюючи матеріал на кілька секунд в абсолютний спирт. Іноді такий стерилізації досить, її використовують при роботі з плодами, насінням, пагонами, зав'язі.

Гіпохлорит кальцію (хлорне вапно) використовуються у вигляді 5 -7% розчину для обробки нирок, зав'язей, квіток, насіння, пагонів протягом 5-8 хвилин. Гіпохлорит натрію використовуються у вигляді 0,5-5% розчину для обробки будь-яких експлантов протягом 1-20 хвилин. Ця речовина є клітинною отрутою, тому час стерилізації і концентрацію підбирають експериментально. Наприклад: для ізолюваних зародків використовують 23% розчин протягом 10-15 хвилин, а для сухого насіння 3-5% розчин протягом 1 години. Залишки гіпохлориту натрію спочатку видаляють 0,01 н HCl, а потім 8 разів промивають автоклавуватися дистильованою водою. Хлорамін застосовують в концентрації 1-6%. Пильовики і молоді зародки обробляють протягом 1-3 хвилин, сухе насіння - 30-60 хвилин, потім

промивають стерильною дистильованою водою 2-3 рази. Сулема - токсична речовина і вимагає особливої ретельності, як при зберіганні, так і при підборі концентрації для окремих об'єктів. Для стерилізації зародків використовують 0,1% розчин протягом 1-3 хвилин, для корені-і бульбоплодів - до 10-20 хвилин. Розчини, що містять активний хлор використовуються 1 раз і готують їх безпосередньо перед роботою. Діацід використовується в 0,2% розчині для стерилізації коренеплодів, насіння, шматочків, тканин, верхівкових меристем, ізольованих зародків, пиляків. Діацід готують, розчиняючи окремо 330 мг етанолмеркурхлоріда і 660 мг цетилпіридинію хлориду в гарячій воді (330 мл), потім їх змішують і доводять об'єм рідини до 1 л, додають кілька крапель детергента твін-80; зберігають в щільно закритій колбі в темряві[77-78].

Антибіотики застосовують для стерилізації рослинного матеріалу, інфікованого бактеріями (тканини корончатогаллових пухлин). Найбільш часто застосовують стрептоміцин і тетраміцин 10-80 мг / л, ампіцилін 200-400 мг / л, левоміцетин, каноміцин і інші. Як стерилізуючого агента застосовують також перекис водню, яка найменше пошкоджує експланти і після якої не потрібно відмивання в стерильній воді, так як вона швидко розкладається. Стерилізацію експлантів необхідно проводити в стерильних (асептичних) умовах: в ламінар-боксі. Колби з експлантів після поміщаються в абсолютну темряву при кімнатній температурі на тиждень для виявлення ступеня стерильності. Ті колби, в яких почалося зараження, слід відразу видаляти.

### **2.2.3. Визначення оптимальної концентрації фітогормону**

Фітогормони— органічні сполуки різної хімічної природи, які продукують спеціалізовані тканини вищих рослин і в низьких концентраціях проявляють регуляторний вплив на процеси онтогенезу, регулюють ріст та розвиток рослин. Утворюються, головним чином, в меристематичних тканинах, що активно ростуть, в зонах апексів коренів і стебел.

Для росту і диференціації будь-яких рослинних клітин необхідні ауксини та цитокініни. Гібериліни використовують дуже рідко. Оскільки різні клітини і тканини в культурі значно відрізняються за здатністю до автономного синтезу та метаболізму окремих фітогормонів, то їх ріст в значній мірі залежить від постачання екзогенних регуляторів росту[59]. Відмінності у потребі в екзогенних ауксинах та цитокінінах дозволяють виділити декілька груп тканин:

- тканини, які ростуть на середовищі з ауксинами (експланти топінамбура, корені цикорію);
- тканин, для росту яких потрібні тільки цитокініни (культура кінчика корінця білого турнепса);
- тканини, для росту яких необхідні ауксини і цитокініни (культивовані первинні експланти тютюну, тканини кореня моркви);
- тканини, які ростуть на складних за вмістом компонентів середовищах;
- культури тканин пухлин, що здатні рости на середовищах без регуляторів росту.

Для отримання і підтримання культур тканин використовують: ауксини: індолілоцтову кислоту (ІОК) в концентрації 1-30мг/л,  $\alpha$ -нафтилоцтову кислоту (НОК) в концентрації 0,1-0,2 мг/л та 2,4-дихлорфеноксицтову кислоту (2,4-Д) в концентрації меншій, ніж 1 мг/л[70].

Для індукції утворення калусу, як правило, використовують вищі концентрації ауксинів, а при наступних пересадках тканина може рости при зменшеному у 10 разів вмісті ауксинів.

Для росту клітин і органів рослин в культурі *in vitro* як цитокініни використовують: кінетин (Кін), 6-бензиламінопурин (БАП), зеатин та ін.

Ауксини нагромаджуються в ростучих частинах рослин і сприяють надходженню в них поживних речовин та води. Найбільш вивченим ауксином, який одержано також синтетичним шляхом, є гетероауксин (індол-3-оцтова кислота  $C_{10}H_9O_2N$ ). Гетероауксин та його хімічні аналоги застосовують в рослинництві для посилення коренеутворення у живців деревних порід[66].

## Роль фітогормонів в процесах росту і розвитку рослин

Ауксини	Цитокініни	Гібериліни
<b>Ріст стебла</b>		
Сприяють збільшенню розмірів клітин нижче за точку росту. Сприяють поділу клітин камбію.	Стимулюють поділ клітин в апікальній меристемі і камбію. Іноді інгібують фазу розтягу клітин.	Сприяють збільшенню клітин у присутності ауксинів. Крім того, сприяють поділу клітин апікальної меристеми і камбію. У деяких розеткових рослин сприяють «виходу в стрілку»
<b>Ріст кореня</b>		
При дуже низьких концентраціях стимулюють. При більш високих пригнічують (геотропізм)	Неактивні або стимулюють ріст первинних коренів	Неактивні
<b>Ініціація росту коренів</b>		
Сприяють формуванню коренів на живцях і калусах	Неактивні, чи сприяють росту бічних коренів	Інгібують
<b>Ініціація утворення бруньок (пагонів)</b>		
Діють як антагоністи цитокінінів, однак іноді при знятті апікального домінування стимулюють ріст пагонів	Стимулюють	При знятті апікального домінування стимулюють ріст пагонів



<b>Ріст листків</b>		
Неактивні	Стимулюють	Стимулюють
<b>Ріст плодів</b>		
Стимулюють, іноді викликають партенокарпію	Стимулюють, іноді викликають партенокарпію	Стимулюють, іноді викликають партенокарпію
<b>Домінування верхівки</b>		
Посилюють, тим самим пригнічуючи ріст бічних бруньок	Антагоністи ауксинів, стимулюють ріст бічних бруньок	Посилюють ріст ауксинів
<b>Стан спокою в бруньках</b>		
Неактивні	Порушують	Порушують
<b>Стан спокою в насінні</b>		
Неактивні	Порушують	Порушують
<b>Цвітіння</b>		
Як правило, неактивні	Як правило, неактивні	У рослин довгого дня стимулюють. У рослин короткого дня сповільнюють
<b>Старіння листків</b>		
У деяких рослин сповільнюють	Сповільнюють	У деяких рослин сповільнюють
<b>Опадання плодів</b>		
Сповільнюють (в окремих випадках стимулюють)	Неактивні	Неактивні
<b>Вплив на прорихи</b>		
Неактивні	Сприяють відкриванню	Неактивні

Фітогормони погано розчиняються у воді. Тому попередньо 100 мг речовини розчиняють в невеликих кількостях (0,5-2,0 мл) спирту (ауксини, гібереліни), 0,5-1 н НСІ або КОН (цитокініни), потім підігрівають до повного розчинення (крім абсцизової кислоти і кинетина ) і доводять до 100 мл об'єму (1 мл містить 1 мг речовини).

### **2.3. Висновки до розділу**

Отже, в розділі 2 було розглянуто матеріали і методи дослідження використані в роботі. Приведені методики приготування оптимізованого поживного середовища та підібраний режим стерилізації експлантів. Охарактеризовано дію фітогормону як стимулятора коренеутворення у живців деревних порід та обгруновано вибір фітогормону гетероауксину.

## РОЗДІЛ 3

### АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

#### 3.1. Дослідження відношення стерилізуючих речовин та часу їх впливу на експланти для досягнення стерильності

Процес стерилізації експлантів – багатоступінчатий процес, який виконується в стрильних умовах.

На першому етапі експланти досліджуваного сорту лохини ретельно промиваються під проточною водою. На другому етапі у стерильних чашках Петрі експланти ополіскуються спиртом і переносяться в стакан зі стерилізуючим розчином білизни (хімічна назва – гідрохлорид натрію) у співвідношенні "Білизни" і дистильованої води відповідно 1 : 3 на 20 хв.

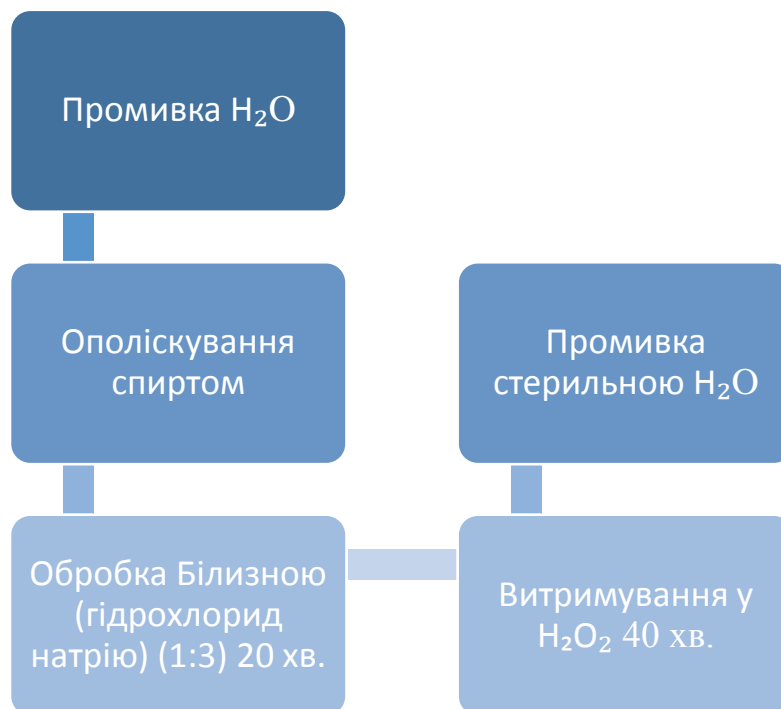


Рис. 3.1. Загальна схема стерилізації

Далі за допомогою пінцета експланти занурюються в стерильну чашку Петрі з перекисом водню (3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

В розчині  $H_2O_2$  експланти лохини витримуються 40 хвилин (Рис. 3), що було експериментально обумовлено, адже, як показує графік, менший час витримування у розчині перикису водня не дає високого виходу стерильних експлантів.

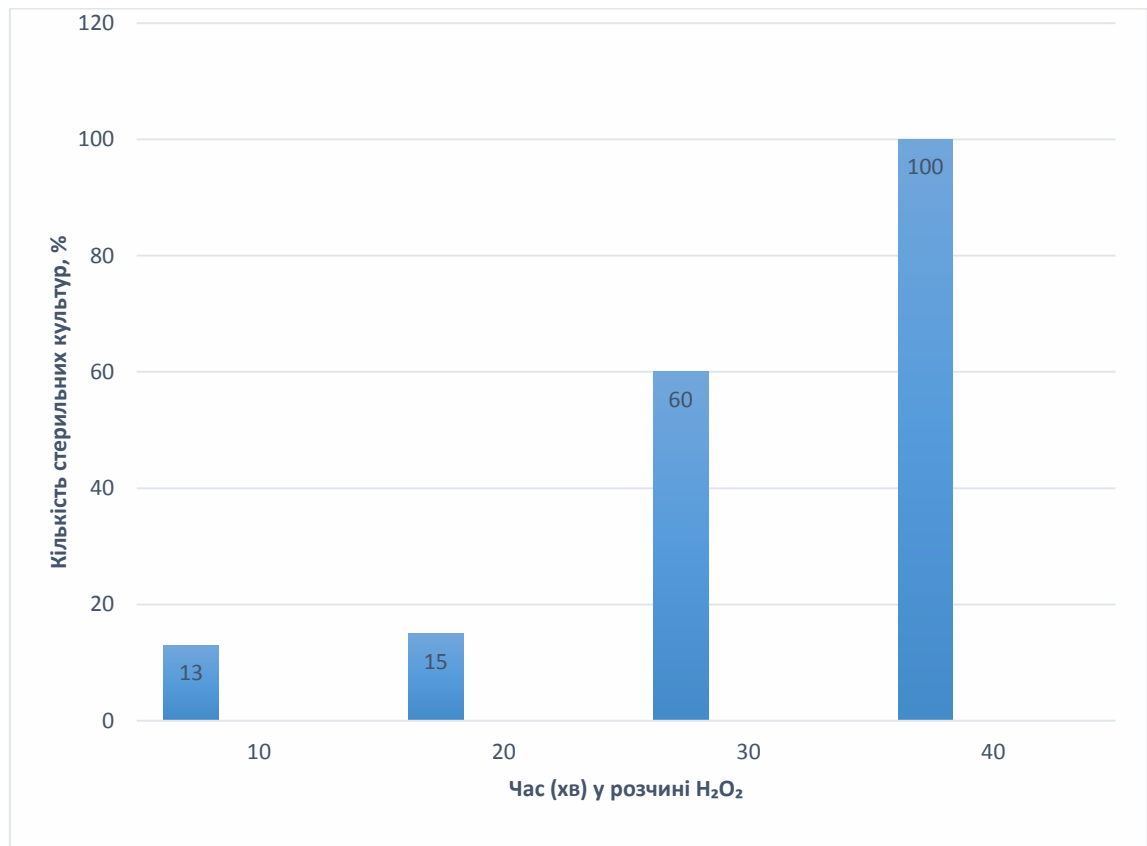
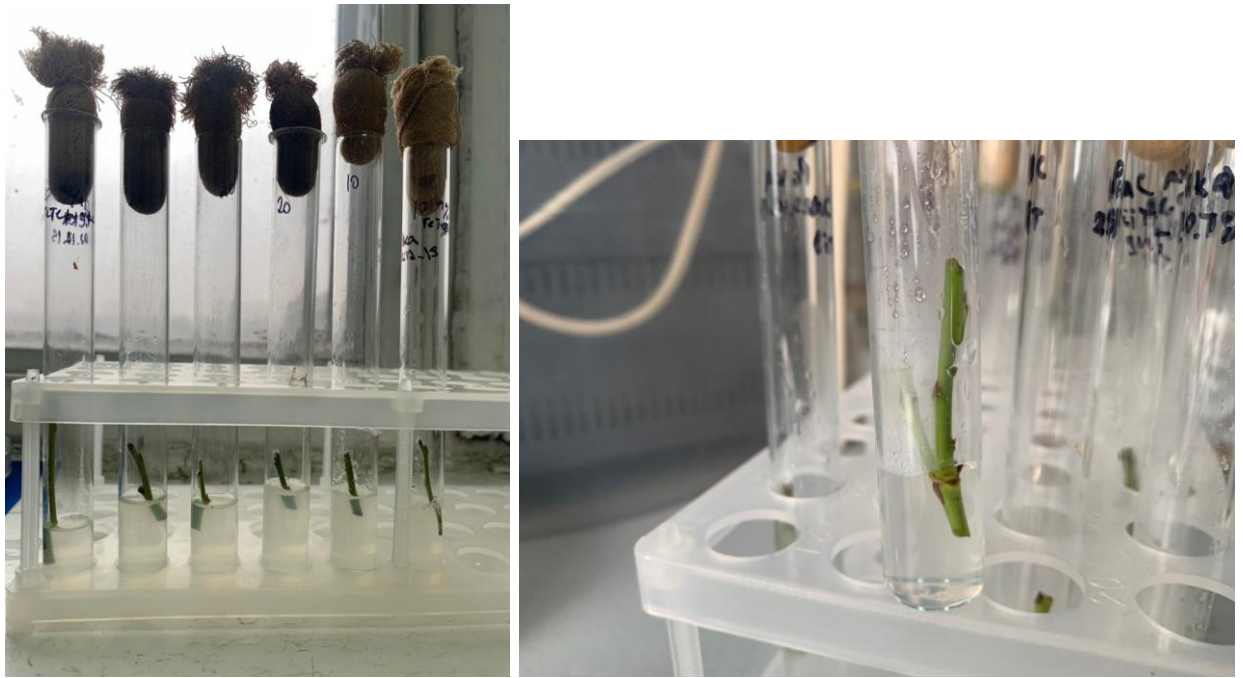


Рис. 3.2. Графік відношення часу(хв) стерилізації у  $H_2 O_2$  до кількості(%) стерильних культур

Дотримуючись умов стерильності в чашки Петрі додається 10 мл стерильної води та переносять туди рослини.

Встановлено, що застосування ступінчастої стерилізації експлантів незалежно від експозиції, більш ефективно для одержання асептичної культури, ніж традиційна схема.



*Рис.4 Стерильні експланти в умовах in vitro*

Надалі, в умовах стерильності, за допомогою скальпеля обрізаються кінці експлантів та переносяться у пробірки з підготовленим середовищем МС (Рис.3), занурюючи експлант місцем розрізу в середовище.

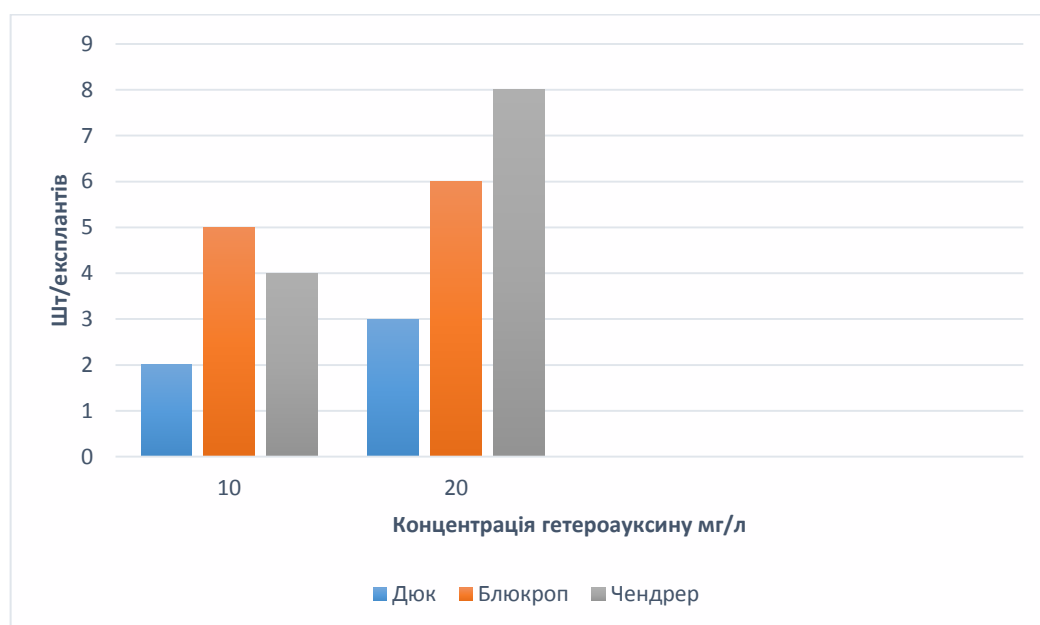
### **3.2. Технологія отримання стерильних культур *Vaccinium sp.* в умовах *in vitro***

У більшості випадків для клонального мікророзмноження використовують різноманітні модифікації середовища Мурашіге Скуга. У стандартному середовищі Мурашіге-Скуга було змінено відсотковий вміст агар-агру, що становить 4000 мг/л, змінений вміст сахарози, що становить 20 000 мг/л, додані вітаміни В1, В6 та фітогормон – гетероауксин із концентрацією 20 мг/л.

*Табл.2. Модифікований склад поживного середовища Мурасіге-Скуга для рослинних клітин*

Компоненти	Концентрація солей в 1 літрі готового маточного розчину, мг	Об'єм маточного р-ну, мл для приготування 1 литра середовища
маточний розчин макроелементів		
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	33000	50
KNO <sub>3</sub>	38000	
CaCl <sub>2</sub> * 2H <sub>2</sub> O	8800	
MgSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	7400	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3400	
маточний розчин мікроелементів		
KJ	166	5
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1240	
MnSO <sub>4</sub> * H <sub>2</sub> O	4460	
ZnSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	1720	
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> * 2H <sub>2</sub> O	50	
CuSO <sub>4</sub> * 5H <sub>2</sub> O	5	
CoCl <sub>2</sub> * 6H <sub>2</sub> O	5	
маточний розчин хелатного заліза		
FeSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	5560	5
Na <sub>2</sub> ЭДТА * 2H <sub>2</sub> O	7460	
вітаміни та органічні речовини		
Вітамін В6	100	5
Тіамін-НCl (В1)	100	
Сахароза - 20 000 мг/л		
Агар-агар - 4000 мг/л		
рН готового середовища - 4,5-5,2		

Для збільшення укорінення експлантів лохини було використано фітогормон гетероауксин. Експериментом показано (Рис. 4), що із концентрацією 10 мг/л і 20 мг/л більш ефективним є останній варіант, що дає більше кількість укорінених експлантів у порівнянні із нижчою концентрацією.



*Рис. 5. Динаміка зміни концентрації гетероауксину, мг/л*

Важливим показником інтродукції північноамериканських сортів лохини високорослої (*Vaccinium corymbosum* L.) є їх здатність до адаптації в нових умовах культивування, яка проявляється у проходженні сезонного циклу розвитку і визначається ступенем відповідності ритму рослин до кліматичних умов району інтродукції. Обмежувальними факторами поширення сортів лохини високорослої є тривалість періоду вегетації, сума ефективних температур, а також низькі температури у весняний, осінній і зимовий періоди, які впливають на підмерзання кореневої системи і надземної частини.

Тривалість фенологічних фаз росту і розвитку досліджуваних сортів лохини високорослої представлено в табл. 3[27].

*Табл. 3. Тривалість фенологічних фаз росту і розвитку маточних рослин сортів лохини високорослої (за місяцями досліджень 2011-2012 рр.)*

Проходження основних фенофаз	Сорт						
	Блюкроп	Блюгольд	Дюк	Дароу	Елліот	Спартан	Торо
Початок набрякання бруньок	5-8.IV	3-5.IV	1-3.IV	7-10.IV	7-10.IV	7-10.IV	6-9.IV
Початок лінійного росту пагонів	7-10.V	6-12.V	6-10.V	11-16.V	13-17.V	14-17.V	8-11.V
Завершення лінійного росту пагонів	9-12.VIII	10-15.VIII	7-10.VIII	13-18.VIII	15-19.VIII	15-19.VIII	11-14.VIII
Початок цвітіння	1-3.V	3-6.V	1-3.V	7-10.V	9-11.V	7-9.V	2-4.V
Завершення цвітіння	14-16.V	12-15.V	9-11.V	21-24.V	22-25.V	19-22.V	16-18.V
Дозрівання плодів	16.VII	16.VII	15.VII	29.VII	2.VIII	27.VII	20.VII
Обпадання листків	25-28.IX	19-22.IX	21-25.IX	7-10.X	8-12.X	6-9.X	25-30.IX
Закінчення вегетаційного періоду	13-15.X	11-14.X	7-10.X	15-18.X	14-18.X	15-18.X	13-16.X
Тривалість вегетаційного періоду, діб	190	192	190	191	191	191	190

Фенологічні фази розвитку досліджуваних генотипів значно залежать від суми ефективних температур, вищих +5°C. Початок вегетації більшості досліджуваних сортів в умовах Київщини відмічено у третій декаді березня за середньодобової температури 4-6°C. У першій декаді квітня, коли сума ефективних температур становила 41-45°C, спостерігається набрякання і розтріскування бруньок у всіх сортів, окрім сорту Елліот. Початок сокоруху та розтріскування бруньок у рослин цього сорту відмічено на 5-10 діб пізніше порівняно з іншими сортами.

Тривалість періоду вегетації відпочатку весняного сокоруху до повного опадання листків в агрокліматичних умовах Київщини становить 190-192 діб (залежно від температурних умов). Початок набрякання і розтріскування бруньок, залежно від сорту, варіює з третього до 19 квітня, протягом 15 діб, а закінчення вегетації – масове опадання листків – з 10 по 18 жовтня[36].

Так як у стані спокою рослин ауксини неактивні і початок набрякання бруньок припадає на весняний період, є доцільним підтримання стерильних культур *in vitro* і продовження експерименту у період початку літнього росту пагонів.

### **3.3. Висновки до розділу**

Отже, в розділі 3 було показано, що підібрано оптимальні умови поверхневої стерилізації експлантів залежно від їхнього типу та ефективності використаних дезінфікаторів. Максимальну кількість життєздатних стерильних регенерантів отримали, використовуючи суміш стерилізувальних розчинів спирту, «Білизни» та перекису водня. Ефективність мікроклонального розмноження залежно від складу живильного агаризованого середовища з органічними сполуками на макро- й мікросольовій основі середовища Мурасіге-Скуга із додаванням регулятора росту гетероауксину. Результати проведених досліджень свідчать, що ефективність дії фітогормону та їхніх концентрацій залежала від особливостей генотипу кожного сорту лохини.

Встановлено, що активність росту і мультиплікації коренів змінювалися залежно від концентрації в живильному середовищі фітогормону. Максимальні значення коефіцієнта розмноження визначено на середовищі Мурасіге-Скуга з 20 мг/л гетероауксину.



## РОЗДІЛ 4

### ОХОРОНА ПРАЦІ

#### 4.1. Небезпечні та шкідливі виробничі фактори у біотехнологічній лабораторії

Розмноження *Vaccinium sp.* в умовах *in vitro* складний процес і при виконанні робіт у біотехнологічній лабораторії на працівників можуть впливати, такі небезпечні та шкідливі виробничі фактори:

- понижена або підвищена температура обладнання та матеріалів;
- мікроорганізми (бактерії, гриби) та продукти їх життєдіяльності;
- понижена рухомість повітря;
- недостатня освітленість робочої зони;
- підвищений рівень ультрафіолетової радіації [13].

В лабораторії досить багато обладнання, яке під час роботи має властивість нагріватися, підвищуючи цим температуру повітря робочої зони. Серед такого обладнання термостати, сухожарові шафи, автоклави, центрифуги та плити. Необережне поводження з обладнанням може призвести до опіків та травм, тому воно повинно бути захищене для безпеки працівників підприємства.

У виробничій лабораторії можливе забруднення повітря робочих приміщень, одягу персоналу, поверхонь та обладнання мікроорганізми та продукти їхньої життєдіяльності. Це відбувається із зразків, чашок Петрі та колб, які відправляються на утилізацію. Максимальна гранично допустима концентрація мікроорганізмів-продуцентів в повітрі робочої зони обмежуються величиною  $5 \cdot 10^4$  КУО/м<sup>3</sup> згідно Наказу МОЗ №521 від 26.10.2004 року про затвердження методичних вказівок «Медико-біологічні дослідження виробничих штамів мікроорганізмів і токсиколого-гігієнічна оцінка мікробних препаратів, визначення їх безпеки та обґрунтування гігієнічних нормативів і регламентів». Повітря робочої зони також забруднюється хімічними речовинами, що використовуються при приготуванні поживного

середовища, стерилізації експлантів, а також виробляються мікроорганізмами. Правила організації роботи в лабораторії, вчасності з мікроорганізмами повинні відбуватися відповідно ДСП 9.9.5.-080-02.

Мікроклімат виробничих приміщень і його стан у робочій зоні – головні фактори, що обумовлюють умови праці [56]. На працездатність працівників та ступінь чистоти повітря робочої зони можуть впливати повітряні течії.

Швидкість руху повітря регулюється природною й штучною вентиляцією. У робочій зоні виробничих приміщень ДСН 3.3.6.042-99 встановлює норми температури, відносної вологості й швидкості руху повітря в теплий і холодний періоди року, виходячи з категорії роботи щодо важкості, призначення приміщень, надлишків тепла [56]. Швидкість руху повітря має бути не більше 0,1м/сек [30]. Якщо швидкість повітряного потоку занадто низька, то утворюються застійні зони, де збираються шкідливі виділення (гази, волога, пил, пар).

Будь-яка схема вентиляції повинна передбачати одночасно приплив зовнішнього повітря і витяжку відпрацьованого, забезпечуючи цим баланс повітря в приміщенні.

Фактором, що визначає сприятливі умови праці, є раціональне освітлення робочої зони і робочих місць [56]. Недостатня або надмірна освітленість, нерівномірність освітлення втомлює очі, призводить до зниження продуктивності праці; при цьому зростає потенційна небезпека помилкових дій і нещасних випадків [4].

Природне освітлення має велике гігієнічне значення. Санітарні норми передбачають обов'язкове безпосереднє природне освітлення виробничих, адміністративних, підсобних і побутових приміщень [56].

Штучне освітлення передбачається у всіх виробничих та побутових приміщеннях з недостатнім природним освітленням, а також для освітлення приміщень в темний період доби. Найменша освітленість у виробничих приміщеннях регламентується ДБН В.2.5-28-2006 і визначається характеристикою зорової роботи [4]. Найбільша нормована освітленість складає 5000 лк (розряд перший а), а найменша – 30 лк (розряд сьомий). Як джерело штучного освітлення широко використовують лампи розжарювання та газорозрядні лампи [28].

Ультрафіолетове випромінювання – це невидиме оком електромагнітне випромінювання з довжиною хвилі від 0,0136 до 0,4 мкм. Оцінка ультрафіолетового випромінювання здійснюється за величиною еритемної дози. Для профілактики достатньо 1/10 еритемної дози, тобто 60-90 мбер хв/см<sup>2</sup>. Бактерицидна дія Уф – випромінювання, тобто здатність вбивати хвороботворні мікроби, залежить від довжини хвилі. Уф-промені з довжиною хвилі 0,334 мкм мають бактерицидний ефект в 1000 разів вищий, ніж УФ-промені з довжиною хвилі 0,4 мкм. Уф-промені з довжиною хвилі 0,254-0,257 мкм мають максимальний бактерицидний ефект [4].

Проблема ультрафіолетового опромінення пов'язують з проблемою забруднення довкілля, тому що забруднення атмосфери великих міст, небажане з токсикологічних точки зору, може сприяти зниженню ультрафіолетової радіації [4].

#### **4.2 Технічні та організаційні заходи для зменшення рівня впливу небезпечних та шкідливих виробничих факторів у біотехнологічній лабораторії**

Згідно з ГОСТ 12.4.011-89 засоби захисту працівників повинні забезпечувати запобігання або зменшення дії небезпечних та шкідливих виробничих факторів, тому застосовують засоби колективного та індивідуального захисту.

Засоби захисту від високих і низьких температур обладнання та матеріалів - огороження, автоматичне дистанційне керування, термоізоляція, спеціальний захисний одяг, сигналізація, знаки безпеки [38]. Також все лабораторне обладнання, яке є джерелом тепла повинно забезпечуватися пристроями, що різко обмежують виділення конвекційного і променистого тепла в виробниче приміщення.

Засоби захисту від патогенних мікроорганізмів та продуктів їх життєдіяльності - герметизація, розділення приміщення на зони, дезинфекція приміщення, вентиляція та очистка повітря, спеціальний захисний одяг, рукавички, засоби індивідуального захисту органів дихання згідно вимогам ГОСТ 12.4.011-89.

До засобів захисту, а також нормалізації повітряного середовища відносяться вентиляція, кондиціонування та опалення, автоматичний контроль. Повітря повинно подаватися та відводитися через бактеріальні фільтри, очищаючись від шкідливих

речовин. Вентиляція повинна здійснюватися за допомогою припливно-витяжної системи відповідно до ДБН В.2.5-67:2013 та ДСН 3.3.6.042-99 [29-30].

Системи вентиляції та опалення повинні забезпечувати відповідні параметри мікроклімату. В умовах жаркого клімату в робочих кімнатах та боксах встановлюються кондиціонери. Під час роботи з біологічним матеріалом їх вимикають. Для лабораторій мікробіологічного профілю слід передбачати системи припливно-витяжної вентиляції, які відповідають СНіП 2.04.05-91, ДСН 3.3.6.042-99. В усіх лабораторіях, що будуються або реконструюються, необхідно передбачати обладнання автономної припливно-витяжної вентиляції з встановленням фільтрів тонкого очищення повітря, що викидається з «заразної» зони (або обладнання цих приміщень боксами біологічної безпеки). Магістральні короби припливно-витяжної вентиляції, електричних, водопровідних, каналізаційних мереж розміщуються у спеціальних нішах коридорів, щоб забезпечити вільний доступ до них під час профілактичного огляду [6;86-87].

Засоби захисту та нормалізації світла виробничих приміщень – світлофільтри, світлозахисні механізми, засоби індивідуального захисту очей [38].

Виробнича лабораторія та всі суміжні до неї приміщення повинні мати природне та штучне освітлення, яке відповідає вимогам ДБН В 2.5.–28– 2006 [28]. Найменша освітленість робочих поверхонь у виробничих приміщеннях регламентується ДБН В.2.5-28-2006 [28].

Засоби захисту від підвищеного рівня ультрафіолетових випромінювань включають такі пристрої як вентиляційні, огорожувальні (екрани), автоматичного контролю і керування, дистанційного керування [38].

Ультрафіолетове випромінювання з довжиною хвилі менше 0,32 мкм, може викликати електроофтальмію. Також часто спостерігаються захворювання шкіри обличчя та повік. Можливо виникнення хронічних катаракт, кон'юктивітів та блефаритів [4].

Ультрафіолетові бактерицидні лампи повинні використовуватися в приміщеннях з високим та середнім рівнем контамінації мікобактеріями та при великих скупченнях людей.

Від ультрафіолетового випромінювання застосовують захист відстанню – віддалення робочого місця від джерел випромінювання, захисні екрани, ширми, фарбування у світлі тони для більшого відображення променів. Як засоби індивідуального захисту застосовують захисний одяг, взуття, рукавички, головні убори. Шкіру захищають нанесенням спеціальної мазі, що містить салол (феноловий ефір саліцилової кислоти) , саліцилово-метиловий ефір тощо. Очі захищають окулярами, щитками зі світлофільтрами в залежності від інтенсивності випромінювання [3].

#### **4.2.1. Розрахунок безпечного перебування людини у приміщенні з увімкненою лампою ультрафіолетового опромінення**

Ультрафіолетове бактерицидне опромінення повітряного середовища приміщення, що здійснюється за допомогою ультрафіолетових бактерицидних ламп є санітарно-протиепідемічним заходом, спрямованим на зниження кількості мікроорганізмів.

Приміщення з ультрафіолетовими бактерицидними лампами можна поділити на дві групи:

**А** – знезараження відбувається у присутності людей протягом робочого дня;

**Б** – знезараження повітря здійснюють при відсутності людей [63].

Для забезпечення захисту від ультрафіолетового випромінювання одним із ефективних застосувань є екранування. Надійне екранування досягається цілісними екранами із матеріалів, підібраних індивідуально до параметрів зменшення дії опромінення. Сітчасті та не цілісні екрани є менш ефективними. Проте є випадки, коли застосування екранування не можливе, тоді має місце застосування екранованих ультрафіолетових бактерицидних ламп.

Обов'язковою умовою використання ультрафіолетових бактерицидних опромінювачів порід із забезпеченням належних умов знезараження повітря закритих приміщень, є виключення можливості шкідливого впливу на людину надлишкового опромінення, надмірної концентрації парів азоту та ртуті [63].

Захист від інтенсивного опромінення досягається такими простими методами як раціональним розташуванням робочих місць, захистом відстанню, екрануванням джерел випромінювання та робочих місць, засобами індивідуального захисту [33]. Обладнуючи приміщення, де буде знаходитися ультрафіолетова бактерицидна лампа, треба враховувати, відображувальна здатність різних оздоблювальних матеріалів для ультрафіолетового опромінення інша, ніж для видимого світла. Так, наприклад, добре відображають ультрафіолет полірований алюміній і побілка, в той час погано – фарби на масляній основі, оксиди цинку та титана.

Бактерицидна опроміненість в місцях перебування людей та на робочих місцях не повинна перевищувати  $0,2 \text{ мкВт/см}^2$  при довжині хвилі опромінення 254 нм. Також слід враховувати, що при збільшенні відносної вологості до 80% бактерицидна дія падає на 30% через ефект екранування мікроорганізмів.

Час можливого безпечного перебування людини в приміщенні, в якому працює екранована ультрафіолетова бактерицидна лампа при значенні щільності бактерицидного потоку випромінювання більше  $0,2 \text{ мкВт/см}^2$ , обчислюється за формулою [63]:

$$t \text{ c} = \frac{6000}{p}, \text{ де}$$

- $t \text{ (c)}$  – час (в секундах) безпечного перебування людини в приміщенні;
- 6000 – поверхнева доза ( $\text{мкДж/см}^2$ ) бактерицидного опромінення при вимірюванні УФ-опромінення з довжиною хвилі 254 нм, яку безпечно для здоров'я може отримати людина за кожні 8 годин безперервного перебування в приміщенні, в якому працює ультрафіолетова бактерицидна лампа;
- $p$  – бактерицидна опроміненість (поверхнева щільність бактерицидного потоку випромінювання при вимірюванні УФ-опромінення з довжиною хвилі 254 нм,  $\text{мкВт/см}^2$ ), що виміряна за допомогою ультрафіолетового радіометру в конкретній точці приміщення, для якої розраховується час безпечного перебування людини [63].

В нашому випадку, ми розраховуємо час можливого безпечного перебування з бактерицидною щільністю  $0,61 \text{ мкВт/см}^2$ :

$$6000/0,61 = 9836 \text{ с.}$$

Час перебування працівників у виробничій лабораторії з увімкненою лампою ультрафіолетового випромінювання без шкоди для здоров'я становить 163,93хв.

### **4.3. Забезпечення пожежної та вибухової безпеки у біотехнологічній лабораторії**

Пожежну безпеку об'єкта повинні забезпечувати системами запобігання пожеж та протипожежного захисту, в тому числі організаційно-технічними заходами [14].

Джерелами пожежі у біотехнологічній лабораторії можуть бути:

- відкрите полум'я;
  - перегрів електричного обладнання;
  - несправне електроустаткування, несправності в електропроводці, електричних розетках та вимикачах;
  - перевантаження освітлювальних та силових мереж;
  - несправні електроприлади;
  - коротке замикання;
  - невиконання вимог нормативних документів з питань пожежної безпеки та паління в недозволенних місцях.
- Головними причинами виникнення пожеж у виробничих лабораторіях є [56]:
- недбале поводження з відкритим вогнем при електро-, газозварювальних роботах, при роботі з паяльними лампами та іншими джерелами відкритого вогню;
  - несправність опалювальних систем, підігрівання масла, відстійників і порушення правил їх експлуатації;
  - несправність перевантаження або неправильний монтаж електроустановок і мереж, що призводить до підвищеного нагрівання або короткого замикання, іскріння;
  - несправність обладнання, порушення технології заправлення транспорту;
  - самозагоряння горючих речовин при неправильному зберіганні або через незнання їхньої пожежної небезпеки;

- розряди статичної електрики у разі неправильного виконання заземлень;
- куріння в пожежонебезпечних зонах [56].

До причин вибуху у виробничій лабораторії можна віднести наявність в приміщенні ємності з легкозаймистими розчинниками, несправне обладнання, ємності з горючими рідинами.

На випадок пожежі в лабораторії повинні бути:

- вогнегасник;
- листовий азбест або азбестова тканина; відро з дрібним піском;
- пожежний рукав;
- чотирихлористий вуглець.

На підприємстві пожежна безпека забезпечується за рахунок пожежної профілактики, заходів з попередження можливості виникнення пожежі й організації пожежогасіння, тобто найшвидшої ліквідації, що виникла [55].

Попередження пожежі на підприємствах досягається [56]:

- запобіганням утворенню горючого середовища;
- запобіганням появи в горючому середовищі джерел запалювання [56].

Для забезпечення пожежо- та вибухобезпеки передбачені профілактичні огляди та плановий та капітальний ремонт технологічного обладнання. Вони повинні здійснюватися в терміни, передбачені проектом, технологічним регламентом, технічними умовами.

У разі виявлення ознак пожежі (горіння) в лабораторії та на підприємстві оголошують пожежну тривогу, Включають сигнал загальної евакуації. негайно повідомляють пожежно-рятувальний підрозділ та керівника чи відповідну компетентну посадову особу. За можливості потрібно вжити заходи щодо евакуювання людей, гасіння пожежі первинними засобами пожежогасіння та збереження матеріальних цінностей.

Потрібно здійснити відключення від енергопостачання обладнання з дотриманням техніки безпеки. Для гасіння пожежі використовують наявні засоби для гасіння пожежі (вогнегасник, простирадло, пісок та інше). Спосіб гасіння пожежі залежить як від причин, так і від характеру палаючого об'єкту.



З прибуттям на пожежу пожежно-рятувальних підрозділів повинен бути забезпечений безперешкодний доступ їх на територію об'єкта, за винятком випадків, коли чинним законодавством встановлений особливий порядок допуску [33].

#### **4.4. Висновки до розділу**

Отже, у розділі 4 було проаналізовано небезпечні та шкідливі виробничі фактори, технічні та організаційні заходи для зменшення рівня впливу небезпечних та шкідливих виробничих факторів у біотехнологічній лабораторії, а також забезпечення пожежної та вибухової безпеки. Серед небезпечних та шкідливих факторів у біотехнологічній лабораторії важливе місце займає підвищений рівень ультрафіолетової радіації. Враховуючи це, був проведений розрахунок часу безпечного перебування працівника в приміщенні з увімкненою ультрафіолетовою лампою і визначено, що цей час складає 163,93хв.

## РОЗДІЛ 5

### ОХОРОНА НАВКОЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА

#### 5.1. Утилізація органічних відходів

У результаті діяльності людини на всіх етапах виробництва і в побуті з'являється величезна кількість різноманітних (твердих, рідких і газоподібних) відходів, які забруднюють біосферу і створюють загрозу для здоров'я і життя населення. У наш час кількість продукованих людиною відходів досягла геологічних масштабів. Виникнення локальних екологічних проблем, пов'язаних із забрудненням атмосферного повітря і ґрунтів, засміченням і забрудненням природних вод, переносом трансграничних забруднювачів, призводить до накопичення в навколишньому природному середовищі шкідливих речовин. Як наслідок, відбуваються зміни між співвідношенням хімічних речовин у природі, деградація ґрунтів, погіршення якості атмосферного повітря і природних вод, збіднення біорізноманіття та з'являється загроза не лише для життя і здоров'я населення, а й для подальшого існування людства в цілому. При значному поширенні цих забруднювачів спостерігаються спустелення та знеліснення природних ландшафтів, виснаження вод світового океану, з'являються такі явища, як парниковий ефект, руйнування озонового шару, кислотні опади, смог, спостерігаються глобальні зміни клімату, що супроводжуються значними кліматичними і геоморфологічними катаклізмами та зрештою призводять до порушення природної структури ландшафтів і глобальної руйнації життєвого середовища рослин, тварин і людини[74].

Державний класифікатор відходів (ДК 005-96) входить до державної системи класифікації та кодування техніко-економічної та соціальної інформації. Він забезпечує інформаційну підтримку у вирішенні питань поводження з відходами, їх переробки та утилізації. Використання класифікатора відходів створює нормативну базу для проведення порівнювального аналізу структури та обсягу утворення

відходів у межах європейської статистики усіх видів економічної діяльності, у тому числі європейської виробничої статистики, статистики агрокомплексу, статистики послуг, а також порівнювального аналізу послуг, пов'язаних з відходами, на міжгалузевому, державному, міждержавному рівнях. Об'єктами класифікації у класифікаторі є відходи. До відходів належать: залишки сировини, матеріалів, напівфабрикатів тощо, утворені в процесі виробництва продукції або виконання робіт, які цілком або частково втратили вихідні споживчі властивості (відходи виробництва); розкривні і супутні гірничі породи, що видобуваються в процесі розроблення родовищ корисних копалин; залишкові продукти збагачення та інші види первинної обробки сировини (шлак, пил, відсів тощо); речовини та їх суміші, які утворені в термічних, хімічних та інших процесах і не є метою цього виробництва (шлак, зола, кубові залишки, інші тверді і пастоподібні утворення, а також рідини та аерозолі); залишкові продукти сільськогосподарського виробництва (у тому числі тваринництва), лісництва і лісозаготівель; бракована некондиційна продукція усіх видів економічної діяльності або продукція, що забруднена небезпечними речовинами і не придатна до використання; неідентифікована продукція (у тому числі мінеральні добрива, отрутохімікати, інші речовини), застосування (експлуатація) або вживання якої може спричинити непередбачені наслідки; зіпсовані (пошкоджені) і неремонтовні чи відпрацьовані, фізично або морально зношені вироби та матеріали, які втратили свої споживчі властивості (відходи споживання); залишки продуктів харчування, побутових речей, пакувальних матеріалів тощо (побутові відходи); осади очисних промислових споруд, споруд комунальних та інших служб; залишки від медичного та ветеринарного обслуговування, медико-біологічної та хіміко-фармацевтичної промисловості, аптечної справи; залишкові продукти усіх інших видів діяльності підприємств, установ, організацій, населення; матеріальні об'єкти та субстанції, активність радіонуклідів або радіоактивне забруднення яких перевищує межі, встановлені чинними нормативами, за умови, що використання цих об'єктів та субстанцій не передбачається (радіоактивні відходи).

Відходи бувають газоподібними, рідкими та твердими. Їх поділяють на небезпечні і безпечні. Небезпечні відходи печні хімічні речовини, небезпечні радіоактивні речовини, вогнебезпечні речовини, вибухонебезпечні речовини тощо. Небезпечні відходи підлягають спеціальному обробленню і знешкодженню, а відтак захороненню. Безпечні відходи підлягають обробленню з метою отримання корисного продукту. Для з'ясування особливостей подальшого оброблення твердих відходів: організації звалища відходів, утворення гумусу або навіть використання відходів з метою отримання (відтворення) енергії – необхідно визначити деякі фізичні й хімічні характеристики відходів. Якщо відходи планують використати як паливо, найважливішими є такі три характеристики: безпосередній аналіз, граничний аналіз і вміст енергії (тепла)[75].

Безпосередній аналіз визначає відсоток:

-вологості;

-летких речовин, які спричиняють додаткові втрати маси під час спалювання за 905°C;

-золи (залишків після спалювання)%;

-залишків зв'язаного вуглецю;

-негорючих речовин.

За допомогою граничного аналізу визначають відсоток: вуглецю, водню, кисню, азоту, сірки, золи. Крім цього, ураховують вміст енергії (тепла) відходів.

Вологість залежить від втрати маси завдяки вилученню вологи під час висушування, яке здійснюють протягом 1 год за температури 105°C. Вміст вологи (вологість) у твердих відходах - це маса вологи на одиницю маси мокрого або сухого матеріалу. У методі вимірювання мокрої маси вологість зразка виражають у відсотках мокрої маси матеріалу; у методі сухої маси - у відсотках сухої маси матеріалу.

Вміст вологи в мокрій масі обчислюють за формулою:

$$\text{Вміст вологи} = [(a - b) / a] 100,$$

де  $a$  - початкова маса зразка;  $b$  - маса зразка після висушування.

Щоб одержати суху масу, тверді відходи висушують у печі за  $t=77\text{ }^{\circ}\text{C}$  протягом 24 год. Ця температура й час необхідні для повної дегідратації (висушування) матеріалу та обмеження випаровування летких матеріалів. Для твердих відходів деревини (експлантів) вміст вологи змінюється від 15-40 %.

Інформація про хімічний склад твердих відходів є дуже важливою для оцінювання альтернативних варіантів оброблення і відновлення енергії. Значення енергії можуть бути перетворені в значення сухої основи (a dry basis) за допомогою рівняння:

$$\text{кДж/кг (суха основа)} = \text{кДж/кг} [100 / (100 - \% \text{ вологи})].$$

Рівняння для сухої основи без золи:

$$\text{кДж/кг (суха основа без золи)} = \text{кДж/кг} [100 / (100 - \% \text{ золи} - \% \text{ вологи})].$$

Із розрахунку енергії твердих відходів на основі 100 кг зразка деревини, вміст становить 5% маси, енергія – 18 600 кДж/кг і загальна енергія становитиме 93 000 кДж.

Технічна стратегія ґрунтується на наступних чотирьох принципах:

- уникнення та мінімізація утворення відходів;
- повторне використання, переробка або утилізація відходів;
- переробка або ліквідація відходів, напр., фізичне знищення, знешкодження відходів у інший спосіб;
- утилізація або видалення відходів.

Переробка та утилізація:

-фізична та хімічна переробка відходів безпосередньо на місці їх утворення рекомендується лише для великих підприємств для видобування ресурсів з небезпечних речовин, виробництва корисних суміжних продуктів та забезпечення екологічно безпечних стоків;

-централізована переробка та утилізація відходів поза територією підприємств рекомендується для більшості областей з розвинутою промисловістю. Доцільність такої схеми пояснюється низькою платоспроможністю промислового сектору України, яка не дозволяє оплачувати якісні послуги з управління відходами. За таких обставин модернізація або заміна власних потужностей підприємств з

переробки відходів видається економічно недоцільною. Більш ефективним з точки зору витрат є створення стратегічних об'єктів з централізованої переробки відходів, а самі підприємства повинні зосередити свою увагу на уникненні, мінімізації та роздільному зборі відходів;

-у кожній області рекомендується створити компактне спеціалізоване підприємства з управління відходами – це підприємство повинне бути розташоване у промислових районах задля мінімізації транспортних витрат. Такі централізовані об'єкти повинні отримувати та переробляти широкий спектр головним чином неорганічних промислових відходів. Для переробки органічних відходів рекомендується створення підприємств для сепарації масла/води та сортування відходів. За можливості вони повинні бути розташовані разом з потужностями з централізованої фізичної/хімічної переробки відходів (для спільного використання інфраструктури), які виробляють пальне з небезпечних відходів (HWDF) відповідно до узгодженої специфікації для використання у промисловому термопроцесі.

Залежно від характеру відходів, що накопичуються в місцях їх складування (МСВ), виділяють чотири категорії безпечності МСВ, для яких встановлюється певний рівень державного контролю з метою створення екобезпечних умов для довкілля (Табл.4)[74].

*Таблиця 4. Категорії екологічної безпечності місць складування відходів*

Категорія екологічної безпечності МСВ		Ступінь державного контролю і підвищення рівня екобезпеки
IV	Малонебезпечні	Спорадичний регламентний контроль
III	Помірно небезпечні	Періодичний регламентний контроль. Визначення шляхів зменшення забруднення
II	Небезпечні	Постійний контроль. Необхідність заходів щодо захисту, моніторингу і локалізації забруднень
I	Надзвичайно небезпечні	Є об'єктами особливої уваги з боку державних органів контролю. Обов'язковість заходів щодо захисту і моніторингу. Припинення експлуатації

У промислово розвинутих країнах політика у сфері використання відходів орієнтована головним чином на зменшення кількості відходів, що утворюються, і на розвиток методів їхньої утилізації, завдяки чому можна до 40 % знизити потік відходів, які направляються на поховання, при порівняно невеликих витратах. Одним з найважливіших завдань утилізації відходів є розробка такої системи утилізації, доступної для всіх, при якій всі витрати повинні відшкодовуватися з метою забезпечення її самоокупності.

## 5.2. Розрахунок еколого-економічного ефекту

Якщо тверді відходи не утилізуються, то їх знищують або накопичують на звалищах та в шламові збірниках. Процеси, які відбуваються під час цих операцій, призводять до вторинного забруднення повітря, водоймищ, ґрунту та підземних вод. Економічні збитки при цьому необхідно розраховувати за всіма реципієнтами (об'єктами), на які впливає забруднення. У цілому формула для визначення економічних збитків має такий вигляд:

$$Z_{\text{відх}} = V_{\text{відх}} + Z_{\text{тер}} + Z_{\text{атм}}^{\text{втор}} + Z_{\text{вод}}^{\text{втор}},$$

Де  $Z_{\text{відх}}$  - загальні збитки від вивезення та розташування відходів на відкритому майданчику, грн;  $V_{\text{відх}}$  - витрати на вивезення, завантаження та розвантаження, поховання та знищення відходів, грн;  $Z_{\text{тер}}$  - розмір збитків від вилучення території під складування, утворення підвалів, поховання з подальшою санітарно-гігієнічною рекультивацією ґрунту, грн;  $Z_{\text{атм}}^{\text{втор}}, Z_{\text{вод}}^{\text{втор}}$  - збитки від вторинного забруднення повітря та водних об'єктів, грн.

$$V_{\text{відх}} = (V_{\text{т}} + V_{\text{утр}} + E_{\text{н}} * K_{\text{с}})A_{\text{відх}}$$

де  $V_{\text{т}}$  - витрати на видалення (транспортування, завантаження, розвантаження) відходів, грн/т (до 24 км – 7,0 грн/т);  $V_{\text{утр}}$  - експлуатаційні витрати, пов'язані з обслуговуванням звалища, знезараженням відходів, грн/т (у Києві – 0,750 грн/т);  $E_{\text{н}}$  - нормативний коефіцієнт ефективності капітальних вкладень, беруть  $E_{\text{н}} = 0,16 \text{ рік}^{-1}$ ;  $K_{\text{с}}$  - питомі капітальні витрати на будівництво систем видалення,

знешкодження (знищення) відходів у спеціальних спорудах, грн/т;  $A_{\text{відх}}$  - кількість відходів, т/рік.

### **5.3. Висновки до розділу**

Будь-яке використання компостів, біовідходів, як і ґрунтів потребують ретельного пролонгованого аналізу на вміст токсикантів. Токсикологічна оцінка поллютантів повинна визначати можливість нагромадження цих мікрокомпонентів у середовищі та специфічність їхньої дії на умови проживання організмів в екосистемі. В умовах сучасного, забрудненого відходами, токсикантами навколишнього середовища, вивчення їх впливу, умов утворення, взаємодії між собою та методів знешкодження, екологічно прийнятної утилізації є актуальними і потребують подальших активних досліджень.

Ефективне вирішення екологічних проблем, пов'язаних з ліквідацією чи обмеженням негативного впливу відходів на довкілля та здоров'я людей, можливе тільки на основі послідовної реалізації законів України: «Про охорону навколишнього природного середовища», «Про відходи», «Про забезпечення санітарного та епідеміологічного благополуччя населення», Постанови Кабінету Міністрів України «Про затвердження порядку розроблення, затвердження і перегляду лімітів на утворення та розміщення відходів» та інших нормативно-правових актів, державних стандартів України з охорони довкілля, санітарних норм і правил та інших документів.



## ВИСНОВКИ

1. Розмноження лохини *Vaccinium sp.* може бути застосовано для її прискореного розмноження і промислового виробництва посадкового матеріалу.
2. Вдало підібраний режим стерилізації, що включає у себе 4 етапи з водою, спиртом, білизною та перекисем водню.
3. Оптимізовано склад поживного середовища Мурасіге-Скуга зі зменшеним відсотком вмісту агару та додаванням вітамів В1, В6 та фітогормону.
4. Встановлена необхідна концетрація фітогормону для культивування лохини *Vaccinium sp.*, що складає 20 мг гетероауксину (індолілоцтової кислоти) на 1 літр середовища (Мурасіге-Скуга).
5. Встановлено, що найоптимальніша температура для культивування експлантів становить 25°C.

## СПИСОК БІБЛІОГРАФІЧНИХ ПОСИЛАНЬ ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Александрова М.С., Стахеева Т.С., Васильева О.Г. Клональное микроразмножение интродуциро-ванных сортов голубики щитковой (*Vaccinium corymbosum* L.) // Проблемы дендрологии на ре-беже XXI века. Тез. докл. Междунар. конф. – М., 1999. – С. 7-8.
2. Брилкина А.А., Павлова Е.Е. Особенности микро-клонального размножения представителей под семейства брусничные // Биология клеток расте-ний in vitro и биотехнология. IX междунар. конф.– М., 2008. – С. 52-53.
3. Беликов А. С. Безопасность жизнедеятельности. / А. С. Беликов, В. Ф. Залунин. – Дн – вск: Пороги, 1992. – 415 с.
4. Березюк О. В. Безпека життєдіяльності : навчальний посібник / О. В. Березюк, М. С. Лемешев. – Вінниця: ВНТУ, 2011. – 204 с.
5. Вечернина Н.А., Таварткиладзе О.К. Культура in vitro *Stevia rebaudiana* Bert. // Флора и расти-тельность Алтая. – Барнаул: Изд-во Алтай. ун-та, 1996. – С. 140-142.
6. Биологическая безопасность в микробиологических и биомедицинских лабораториях / [Д. Абрахам, М. Адлер, Л. Алдерман та ін.]. – Вашингтон: Типография Правительства США, 2007. – 360 с.
7. Kaume L., Howard L.R., Devareddy L. The blackberry fruit, its composition and chemistry, metabolism and bioavailability, and health benefits / L. Kaume, L.R. Howard, L. Devareddy // Agric Food Chem. – 2011. № 60, P.57-16
8. Вечернина Н.А., Таварткиладзе О.К. Микроразмно-жение *Stevia rebaudiana* Bert. // Современные тенденции развития промышленного садоводст-ва. Мат-лы Междунар. науч.-практ. конф., по-священной 75-летию образования НИИ садовод-ства им. М.А. Лисавенко. – Барнаул, 2008. – С. 349-354.

9. Вечернина Н.А., Таварткиладзе О.К., Эрст А.А., Горбунов А.Б. Ускоренное размножение голубики топяной *in vitro* // Вестн. Алтай. гос. аграрн. ун-та. – 2008. – №6 (44). – С. 21-25.
10. Сенчук Г.В. Голубика – это не только витамины // Сел. хоз-во Белоруссии. – 1973. – № 1. – С. 29.
11. Снакина Т.И. Интродукция голубики топяной (*Vaccinium uliginosum* L.) в Западной Сибири: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Новоси-бирск, 2007. – 16 с.
12. Яковлев А.П., Ходасевич Л.В. Опытное выращивание *Vaccinium uliginosum* L. на выработанных торфяниках севера Белоруссии // Раст. ресурсы. – 1998. – Т. 34, вып. 2. – С. 23-29.
13. ГОСТ 12.0.003-74 ССБТ. «Опасные и вредные производственные факторы. Классификация»: Государственный стандарт. – М.: Госстандарт СССР. – 1974.– 5с
14. Busby A.L., Himelrick D.V. Propagation of blackberries (*Rubus* spp.) by stem cuttings using various IBA formulation // Acta Hort. – 1999. – V. 505. – P. 327-332.
15. Cao X., Fordham I., Douglass L., Hammerschlag F. Su-crose level influences micropropagation and gene delivery into leaves from *in vitro* propagated high-bush blueberry shoots // Plant Cell, Tiss. and Org. Cult. – 2003. – V. 75. – P. 255-259.
16. Clapa D., Al F. The use of zeatin as growth regulator for the micropropagation of some highbush blue-berry (*Vaccinium corymbosum*) cultivars // Bul. Univ. Esti. Agr. Esi Med. Vet. Cluj-Napoca. Ser. Hort. – 2006. – V. 63. – P. 400
17. Jaakola L. Effect of N6-isopentenyladenine concentration on growth initiation *in vitro* and rooting of bil-berry and lingonberry microshoots // Plant Cell Tiss. Org. Cult. – 2001. – V. 66. – P. 73-77.
18. Shibli R.A., Smith M.A.L., Kushad M. Headspace ethyl-ene accumulation effects on secondary metabolite production in *Vaccinium pahalae* cell culture // Plant Growth Regul. – 1997. – V. 23. – P. 201-205.

19. Tetsumura T., Matsumoto Y., Sato M. et al. Evaluation of basal media for micropropagation of four high-bush blueberry // *Sci. Hortic.* – 2008. – V. 119. – P. 72-74.
20. Vater G., Arena M. In vitro propagation of *Rubus geoides* // *N. Z. J. Crop Hort. Sci.* – 2005. – V. 33. – P. 277-281.
21. Решетников В.Н., Антипова Т.В., Филипеня В.Л. Некоторые аспекты микроклонального размножения голубики высокой и брусники обыкновенной. *Плодоводство: научные труды*, 2007, Т. 19, С. 209–215.
22. Кудряшова О.А., Волотович А.А., Герасимович Т.В. и др. Эффекты экзгенных ауксинов на изменение количественных показателей регенерантов *Vaccinium corymbosum* in vitro. *Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя біялагічных навук*, 2013, № 3, С. 28–35.
23. Ostrolucka M.G. et al. In vitro propagation of several *Vaccinium corymbosum* L. and *Vaccinium vitis-idaea* L. cultivars. *Agronomijas Vestis*, 2009, N 12, P. 75–80.
24. Ruzic D. et al. Micropropagation in vitro of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.). *Acta Horticulturae*, 2012, Vol. 926, P. 265–272.
25. Meiners J., Schwab M., Szankowski I. Efficient in vitro regeneration for *Vaccinium* species. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, Springer, 2007, Vol. 89, P. 169–176.
26. Liu C. et al. Adventitious shoot regeneration from leaf explants of southern highbush blueberry cultivars. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, 2010, Vol. 103, N 1, P. 137–144
27. Mihaljevic S., Salopek-Sondi B. Alanine conjugate of indole-3-butyric acid improves rooting of highbush blueberries. *Plant Soil Environ*, 2012, Vol. 58, N 5, P. 236–241.
28. ДБН В.2.5-28-2006 «Природне і штучне освітлення»: Державні будівельні норми України - К.: Мінбуд України. – 2006. – 96с.
29. ДБН В.2.5-67:2013 «Опалення, вентиляція та кондиціонування»: Державні Будівельні Норми. – К.: Інститут «УкрНДІСпецбуд». – 2013. – 149 с.

30. ДСН 3.3.6.042-99 «Санітарні норми мікроклімату виробничих приміщень»: Державні Санітарні Правила і Норми. - К.: Міністерство охорони здоров'я. – 1999.– 10с.
31. ДСанПіН 2.2.4-171-10 «Гігієнічні вимоги до води питної, призначеної для споживання людиною»: Державні Санітарні Правила і Норми. – К.: Міністерство охорони здоров'я. – 2010. – 25с.
32. ДСП 9.9.5.-080-02 «Правила влаштування і безпеки роботи в лабораторіях (відділах, відділеннях) мікробіологічного профілю»: Державні санітарні правила та норми, гігієнічні нормативи. – К.: Міністерство охорони здоров'я. – 2002. – 9с.
33. Жидецький В. Ц. Основи охорони праці / В. Ц. Жидецький, В. С. Джигирей, О. В. Мельников. – Львів: Афіша, 2000. – 348 с. – (Вид. 2-е, стереотипне).
34. Jiang Y. et al. Influences of media and cytokinins on shoot proliferation of 'Brightwell' and 'Choice' blueberries in vitro. *Acta Horticulturae*, 2009, Vol. 810, P. 581–586.
35. Debnath S.C., McRae K.B. In vitro culture of lingonberry (*Vaccinium vitisidaea* L.): the influence of cytokinins and media types on propagation. *Small Fruits Rev.*, 2001, Vol. 1, N 3, P. 3–19.
36. Debnath S.C. Micropropagation of lingonberry: influence of genotype, explant orientation, and overcoming TDZ-induced inhibition of shoot elongation using zeatin. *HortScience*, 2005, Vol. 40, № 1, P. 185–188.
37. Read D.J. The biology of mycorrhiza in the Ericales // *Canadian Journal of Botany*. 1983. – V. 61(3). – P. 985–1004.
38. Карнаух Н. Н. Охрана труда : учебник для СПО / Н. Н. Карнаух. – М.: Издательство Юрайт, 2018. – 348
39. Ковальов В. М. Фармакогнозія з основами біохімії рослин : підруч. для студ. вищ. фармац. навч. закл. та фармац. ф-тів вищих мед. навч. закл. III–IV рівнів акред. / В. М. Ковальов, І. О. Павлій, Т. І. Ісакова. – Харків: Вид-во НФаУ : МТК-книга, 2004. – 704 с.

40. Johansson M The influence of ammonium nitrate on the root growth and ericoid mycorrhizal colonization of *Galluna vulgaris* (L.) Hull from a Danish heathland // *Oecologia*. 2000. – V. 123. – P. 418–424.
41. Jeljazkova E., Percival D. Effect of drought on ericoid mycorrhizae in wild blueberry (*Vaccinium angustifolium* A it.) // *Canadian Journal of Plant Science*. – 2003. – V. 83. – P. 583–586.
42. Евтухова Л.А. Плантационное выращивание голубики (*Vaccinium uliginosum* L.) в условиях юго-востока Белоруссии: Автореф. диссер.к.с. – х.н. – Гомель, 1990. – С. 19.
43. Малиновский К.А. Растительность высокогорья Украинских Карпат. Киев, «Наукова думка», 1980. С. 280.
44. Zmarlicki K. Production and marketing of blueberries in Europe, USA and Canada.– Blueberry and cranberry growing (with ecological aspects) Skierniewice, Instytut sadownictwa i kwiaciarnictwa, 19–22 June 2006. – P. 181–187.
45. Strik B. Blueberry Production and Research Trends in North America. – *Acta Horticulturae*. *Acta Horticulturae* Number 715. August 2006, p. 173–183. ( *Proceedings of the Eighth International Symposium on Vaccinium Culture*. Sevilla, Spain; Oeiras, Portugal. May 3–8, 2004) Number 715. August, 2006.
46. Banados M.P. Blueberry Production in South America. – *Acta Horticulturae*. *Acta Horticulturae* Number 715. August 2006, p. 165–172. ( *Proceedings of the Eighth International Symposium on Vaccinium Culture*. Sevilla, Spain; Oeiras, Portugal. May 3–8, 2004) Number 715. August, 2006.
47. Гладкова Л.И. Выращивание голубики и клюквы: Обзорн. информ. – М., 1974. – С. 5–36.
48. Курлович Т.В. «Брусника, голубика, клюква, черника», Москва, Изд. дом МСП, 2005 г.
49. Рейман А., Плишка К. Высокоросящая голубика. М-Колос, 1984 г. С.35.
50. Шумейкер Дж. Ш. Культура ягодных растений и винограда. – М., 1958. – С. 296–348.

51. Сорока А.И. Влияние состава среды на процессы каллусогенеза и регенерации в культуре пыльников льна / А.И. Сорока // Цитология и генетика. – 2004. – Том 38, № 2. – С. 20–25.
52. Sharad T. Effects of genotype and culture medium on in vitro androgenesis in soybean (*Glycine max* Merr.) / T. Sharad, P. Shanker, M. Tripathi // *Indian Journal of Biotechnology*. – 2004. – Vol. 3, № 3. – P. 441–444.
53. Parthibhan J.H. Influence of nutritional media and photoperiods on in vitro asymbiotic seed germination and seedling development of *Dendrobium aequum* Lindley // *African Journal of Plant Science*. – 2012. – Vol. 6, № 14. – P. 383–393.
54. Sanderson K.R., Eaton L.J. Gypsum – An Alternative to Chemical Fertilizers in Lowbush Blueberry Production // *Small Fruits Review*. Vol. 3, № 1/2 – 2004. – P. 57–71.
55. Smagula J.M., Litten W., Loennecker K. Diammonium Phosphate Application Date Affects *Vaccinium angustifolium* Ait. Nutrient Uptake and Yield // *Small Fruits Review*. Vol. 3, № 1/2. – 2004. – P. 87–94
56. Основи охорони праці: підручник / О. І. Запорожець, О. С. Протоєрейський, Г. М. Франчук, І. М. Боровик. – К.: Центр учбової літератури, 2009. – 264 с.
57. Warman P.R., Murphy C.J., Eaton L.J. Soil and Plant Response to MSW Compost Applications on Lowbush Blueberry Fields in 2000 and 2001 // *Small Fruits Review*. Vol. 3, № 1/2. – 2004. – P. 19–31.
58. Paal T., Starast M., Karp K. Influence of different fertilizers and fertilizing frequency on the development of *Vaccinium angustifolium* Ait. seedlings // *Botanica Lithuanica*. 2004, № 10(2): 135–140.
59. Paal T., Starast M., Karp K. Response of lowbush blueberry seedlings to different fertilizers // *Vaccinium spp. And Less Known Small Fruits: Cultivation and health benefit/ Abstracts of International Conference, September 30 – October 5. 2007. IPGB SAS, Nitra, Slovak Republic*.
60. Starast M., Karp K., Vool E, Paal T., Albert T. Effect of NPK fertilization and elemental sulphur on growth and yield of lowbush blueberry // *Agricultural and Food Science*, 2007. 16 (1): 34–45.

61. Власенко М.Ю. Детермінація онтогенезу рослин картоплі в умовах *in vitro* синтетичними фітогормонами класу цитокінінів / М. Ю. Власенко, В.В.Мацкевич, П. Г. Дульнев, А. Л. Козак // Матеріали тез міжнародної науково–практичної конференції “Інноваційні агротехнології в умовах глобального потепління. 4–6 червня 2009 р. – Мелітополь–Кирилівка. – Вип. 1. – С.24 - 25.
62. Высоцкий В.А. Действие некоторых регуляторов роста на изолированные меристематические верхушки черной смородины / В. А. Высоцкий // Плодоводство и ягодоводство нечерноземной полосы: М.– 1979. –Том IX.– С.101–107.
63. Р 3.5.1904-04 «Использование ультрафиолетового бактерицидного излучения для обеззараживания воздуха в помещениях»: Санитарно - эпидемиологическое нормирование Российской Федерации. – М.: Минздрав России. – 2005. – 48 с.
64. Высоцкий В.А. О генетической стабильности при клональном микроразмножении плодовых и ягодных культур / В. А. Висоцкий // Сельскохозяйственная биология. –1995. –№ 5. –С. 57-63.
65. Гречаник Р.М. Особливості введення в культуру *in vitro* шовковиці білої (*Morus alba* Linn) Р. М. Гречаник, М. М. Гузь, Н. О. Олексійченко //Науковий вісник НЛТУ України. – 2011. – Вип. 21.– С.9-21
66. Гродзинский А.М. Краткий справочник по физиологии растений / А.М. Гродзинский, Д. М. Гродзинский. – К. Наукова думка, 1973. – 591с.
67. Данилевич В. Н. Патент РФ 2059417. Способ стерилизации питательных сред / В. Н. Данилевич В. А. Лившиц, опубл. 10.05.1996, Бюл. № 13.- 8 с.
68. Завірюха П. Д. Сільськогосподарська біотехнологія: Клітинна та генетична інженерія рослин : термінологія для студ. агроном. ф-ту / П. Д. Завірюха [видання 2-ге доп.] – Львів, 2001. – 20 с.
69. Калинин Ф.Л. Технология микрклонального размножения растений / Ф. Л. Калинин, Г. П. Кушнир, В. В. Сарнацька. – Киев: Наук. думка, 1992. – 232 с.
70. Кефели В.И. Природные ингибиторы роста / В.И. Кефели // Физиология растений. – 1997. – Т. 44, № 3. – С. 471-480.



71. Климачев Д.А. Влияние обработки гиббереллином на содержание фитогормонов в разных условиях минерального питания / Д. А. Климачев, А. А.Тарасенко // Иммуноанализ регуляторов роста в решении проблем физиологии растений, растениеводства и биотехнологии. Материалы III конференции. Уфа, 3–6 октября 2000 г. Уфа.–2000.– С. 224.
72. Ковалевская Ж.В. Корнеобразование стеблевых черенков представителей рода *Plex L.* при искусственном вегетативном размножении / Ж.В.Ковалевська // Вісник донецького національного університету, Сер.Природничі науки.– 2008.– Вип. 2.– С. 96-104.
73. Кунах В.А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого–біохімічні основи / В.А. Кунах. – К.: Логос, 2005. – 730 с.
74. Mazurak, O. T., Shkymbatiuk, R. S., Lozovitska, T. M., & Khrunyk, S. Yu. (2011). Study of the mechanisms the pollution of the biosphere dioxins. Scientific Bulletin of UNFU, 21(12), 122–127.
75. Мацкевич В.В. Особливості введення *in vitro* та клонального мікророзмноження *Astrophytum myriostigma* та *Sclerocactus sp.* / В. В. Мацкевич, Л. А. Козак, Л. М. Філіпова //Агробіологія: збірник наукових праць БНАУ. – Біла церква, 2012. – 8 (94).– С. 115-118.
76. Мацкевич. В.В. Основи біотехнології рослин: навчальний посібник / В.В. Мацкевич, С.В. Роговський, М.Ю. Власенко, В.М. Черняк. – Біла Церква: БНАУ, 2010. – 156 с.
77. Мацкевич В.В., Філіпова Л.М. Дибя Р.Д. Особливості стерилізації експлантів хости / В. В. Мацкевич, Л. М. Філіпова, Р. Д. Дибя // Науковий вісник НЛТУ: збірник науково — технічних праць. – Львів: РВВ НЛТУ України.– 2013.– вип.23.– С. 183–187.
78. Мельничук М. Д. Біотехнологія рослин / М. Д. Мельничук, Т. В. Новак, А. А. Кунах.– К.: Поліграфконсалтинг, 2003.– 517 с.
79. Небиков М. В. Удосконалення методики стерилізації експлантів унаслідок введення у культуру *in vitro* *Castanta sativa* Mill. / М. В. Небиков, В. Д. Адаменко // Науковий вісник НЛТУ України. – 2011. – Вип. 21.– С. 30-34

80. Оразбаева Г.К. Клональное размножение растений черной смородины (*Ribes nigrum* L.) in vitro / Г. К. Оразбаева, В. Т. Хасанов, А. Р. Исхаков, В. К. Швидченко // Вестник науки Казахского агротехнического университета им. С. Сейфуллина. – 2012. – N 1. – С.115-124
81. Скляренко Д.А. Використання клонального мікророзмноження *Onobrychys pallasii* (willd bieb) з метою збереження виду / Д. А. Скляренко, А. М. Бугара // Тематический сборник Экосистемы Крыма, их оптимизация и охрана. – 2002. – Выпуск 12. – С. 44-48.
82. Турецкая Р.Х. Вегетативное размножение растений с применением стимуляторов роста / Р. Х. Турецкая, Ф. Я. Поликарпова // М.: Наука, 1968. – 94 с.
83. Штильман М.И. Физиология растений / М.И. Штильман, А.М. Тсатсакис // Физиология растений и генетика. – 2004. Т. 44, № 6. С. 861-864.
84. Ewald D. The influence of micrografting in vitro on tissue culture behavior and vegetative propagation of old European larch trees / D. Ewald, U. Kretzschmar // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. – 1996. – V.44, – № 3. – P. 249–252.176.
85. Курлович Т.В. Клюква, Голубика, Брусника: пособие для садоводов любителей / Т.В. Курлович // – М.: Ниола–Пресс, 2007. – 200 с.
86. Biorisk management : [Laboratory biosecurity guidance]. –Geneva:WHO, 2006. –41 p.
87. Laboratory biorisk management : [European committee for standartization]. – Brussels, Belgium., CEN, 2011. – 46 p.