

І. В. Чорна¹, здобувач

Г. В. Дроник², д.б.н., професор

І. С. Давиденко³, д.мед.н., професор, завідувач кафедри патологічної анатомії

¹Національний технічний університет «Харківського політехнічного інституту»
вул. Кирпичова, 2, Харків, 61000, Україна, e-mail: chorna8@ukr.net

²Буковинська державна сільськогосподарська дослідна станція НААН
вул. Богдана Крижанівського, 21, Чернівці, 58026, Україна

³ВДНЗУ «Буковинський державний медичний університет»
Театральна пл., 2, Чернівці, 58026, Україна

ГІСТОЛОГІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ПЕЧІНКИ ЩУРІВ, ЩО ВЖИВАЛИ ГЕННОМОДИФІКОВАНУ СОЮ, ОБРОБЛЕНУ ГЕРБИЦИДОМ «ROUNDUP»

Проведено гістологічне дослідження печінки щурів двох поколінь, яким згодували трансгенну сою, оброблену гербіцидом «Roundup». Виявлено що найбільше дистрофічні зміни спостерігаються у печінці щурів, які споживали генномодифіковану сою, оброблену гербіцидом та у щурів, які вживали гербіцид разом з питною водою. У наступному поколінні спостерігається підсилення дистрофічних змін у гепатоцитах щурів. Мікроскопічні зміни можуть вказувати на енергетичне навантаження та інтенсифікацію дезінтоксикаційних процесів цими клітинами.

Ключові слова: традиційна соя; генетично модифіковані організми; трансгенні організми; гліфосат-резистентна; гепатоцити; гербіцид «Roundup»; детоксикація.

Однією з найпоширеніших трансгенних рослин, яку широко використовують як у сільському господарстві, так і в харчовій промисловості являється генетично модифікована соя з новою ознакою «Roundup Ready». Ця трансгенна соя виявляє стійкість до гербіциду «Roundup» за рахунок внесення гену бактерії *Agrobacterium tumefaciens*. Трансгенна соя синтезує бактеріальну EPSPS, що замінює інгібований гербіцидом фермент у рослині. Тому генетично модифікована соя стійка до гліфосату і продовжує рости при обробці поля цим гербіцидом, тоді як бур'яни гинуть [10, 13, 14]. Широке використання трансгенної сої «Roundup Ready» та гербіциду «Roundup» залишає велику кількість пересторог у суспільстві щодо їх безпечності як для навколишнього середовища, так і для здоров'я тварин та людини [1, 2, 4]. Для того щоб оцінити безпечність вживання гліфосат-резистентної сої та гербіциду «Roundup» на здоров'я тварин, проводили патоморфологічні дослідження структури печінки двох поколінь щурів, бо саме печінка є основним детоксикаційним органом [5, 7, 11].

Метою досліджень було виявити та оцінити гістопатологічні зміни у печінці щурів під впливом гербіциду «Roundup» та трансгенної гліфосат-резистентної сої, обробленої цим гербіцидом.

Матеріали і методи дослідження

Для досліджень використовували боби трансгенної сої сорту лінії GTS 40-3-2 («Monsanto Canada Inc.») [12]. Лінія сої GTS 40-3-2 стійка до дії гербіцидів, що містять гліфосат, завдяки вставці гліфосат-резистентної форми гену, ферменту 5-enolpyruvylshikimat-3-phosphate synthase (EPSPS). [6, 12]. Також у експериментальних дослідженнях було використано традиційну сою вітчизняного сорту Чернівецька 9, яку нам надала Буковинська дослідна станція агропромислового виробництва УААН. Зразки сої обох сортів (Чернівецька 9 та лінії GTS 40-3-2) перевірялись на наявність генетичної модифікації, що підтверджено Українською лабораторією якості і безпеки продукції АПК протоколом №1691-Н. У зразку № 2 виявлені цільові послідовності промотора 35S вірусу мозаїки цвітної капусти (CaMV) та термінатора NOS (T-NOS) T1 плазмиди *Agrobacterium tumefaciens*. За результатами даних лабораторії соя сорту Чернівецька 9 за хімічним складом (вологість, масовою часткою білка, жирів, елементів) еквівалентна генетично модифікованому гліфосат-резистентному сорту сої лінії GTS 40-3-2. Виявлені за окремими показниками різниці знаходяться у межах біологічної норми.

Дослідження проводили на 4-місячних щурах лінії Вістар масою 180–200 г, які були поділені на п'ять груп, по 14 щурів у кожній групі: I – інтактні тварини (утримувалися на стандартному раціоні віварію); II – тварини, яким 20–26 % стандартного раціону замінено на традиційну сою (сорту Чернівецька 9) за поживною цінністю; III – щури, яким 20–26 % у стандартного раціону замінено на генетично модифіковану сою (лінії GTS 40-3-2), не оброблену гербіцидом «Roundup»; IV – щури, раціон яких містив 20–26 % трансгенної сої, яка була оброблена гербіцидом; V – щури, які отримували разом з питною водою гербіцид (0,1 мкг/л або 0,003 мкг/кг маси тварини), що є допустимою концентрацією в межах вимог Європейського Союзу. Боби традиційної та трансгенної сої перед додаванням у корми проходили термічну обробку при 140 °C протягом 2 год, для зниження уреазної активності та знешкодження антипоживних речовин.

В роботі дотримувалися нормативів поводження з лабораторними тваринами відповідно до Європейської конвенції із захисту хребетних тварин, що використовуються для експериментальних чи інших наукових цілей (Страсбург, 1986) [8].

Після 42 днів утримання на відповідному раціоні, щурів спаровували та одержали через 22–25 днів наступне покоління. Кількість приплоду в I, II, III та IV групах коливалася близько 10 щуренят у гнізді. Кількість приплоду в V групі становила близько 8 щуренят у гнізді в перший день після народження. Через два місяці було відібрано по 24 щурів другого покоління кожної групи,

які продовжували утримуватися на тому ж раціоні.

У віці 12-ти місяців щурів двох поколінь було декапітовано та проводили відбір шматочків печінки для гістологічного дослідження. Печінку фіксували у 10 % розчині нейтрального формаліну більше 48 годин. Після фіксації матеріал зневоднювали у розчинах етилового спирту і ущільнювали парафіном при температурі 58 °С. Парафінові гістологічні зрізи тканини печінки товщиною 5–7 мкм виготовляли санним мікротомом МС-2, після депарафінізації зрізи фарбували гематоксиліном та еозином. Мікропрепарати вивчали у світловому мікроскопі за оптичного збільшення – 200 з використанням окуляра 10х та об'єктива 20х. Цифрові копії оптичного зображення (цифрові світлини) отримували за допомогою цифрового фотоапарата Olympus SP550UZ. Ці цифрові світлини аналізували за допомогою ліцензійної копії комп'ютерної програми ImageJ (версія 1.48v, вільна ліцензія, W.Rasband, National Institute of Health, USA, 2015) [9]. Вказана комп'ютерна програма серед інших можливостей дозволяє підраховувати відсоток клітин у різному стані шляхом маркування їх з нумерацією, в результаті чого отримують число клітин у певному стані в полі зору та загальне число клітин в полі зору, а з цих даних обраховують відсоток клітин у певному стані (наприклад, у стані оборотного набухання чи у стані некрозу). У кожній тварини оцінювали по 1000 гепатоцитів.

Результати дослідження та їх обговорення

Досліджування морфологічних змін печінки проводилися на двох поколіннях щурів лінії Вістар, яку одержали після спаровування щурів покоління F_0 . У дослідних групах найбільша смертність щурят (покоління F_1) наступала у перші 5 діб життя. Протягом двох місяців смертність щуренят у I, II та III коливалася в межах фізіологічної норми (3,6–9,2 %). У IV та V дослідних групах смертність становила 12 % та 24 %. Після народження щуренят самки (покоління F_0) продовжували утримуватися на тому ж раціоні та разом з питною водою одержувати гербіцид. Дослідження мікроструктури печінки щурів двох поколінь усіх експериментальних груп відзначали часточкову будову органу, де гепатоцити були переважно з базофільною цитоплазмою. При гістологічному дослідженні печінки щурів контрольної групи та щурів, які вживали традиційну сою (II група), не виявлено патологічних змін, як у першому так (F_0) і у другому поколінні (F_1). У щурів III групи помітні слабко виражені зміни в гепатоцитах, зокрема, у цитоплазмі поодинокі виявляли невеличкі ліпідні краплі, така ж картина спостерігається і у другому поколінні.

Дослідження тканин печінки щурів IV та V груп вказує на пошкодження цього органу. При цьому у IV групі, тварини, які вживали генетично модифіковану сою, оброблену гербіцидом «Roundup», спостерігаються більш виражені морфологічні зміни (оборотне набухання у вигляді зернистої та гідропічної дистрофії), ніж у щурів V групи. Це може свідчити про накопичення гербіциду у насінні сої та підсилення впливу двох факторів на організм тварини. У дру-

гому поколінні у IV та V груп вплив трансгенної сої, обробленої гербіцидом та самого гербіциду підсилюється. Виявлено оборотне набухання гепатоцитів з поширеністю понад 50 % у IV групі першого покоління та понад 60% у другому поколінні.

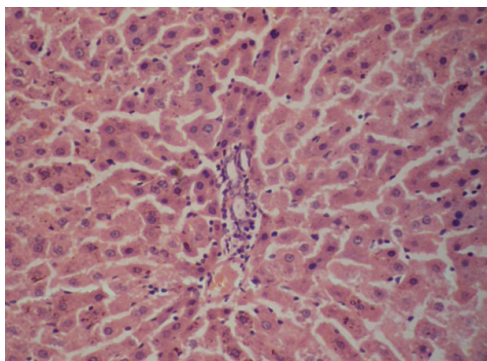


Рис. 1. Мікрофотографія фрагменту печінки інтактного щура
Примітка: Забарвлення гематоксиліном і еозином. Об.20х. Ок.10х

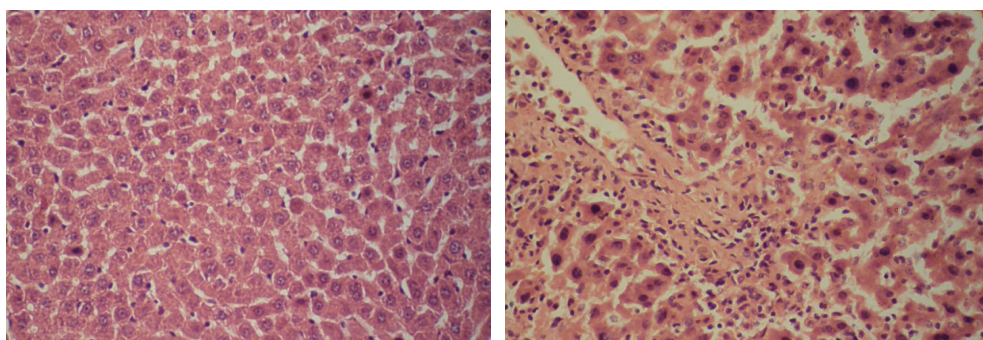


Рис. 2. Мікрофотографія фрагменту печінки щура при вживанні традиційної (а)
та трансгенної (б) сої

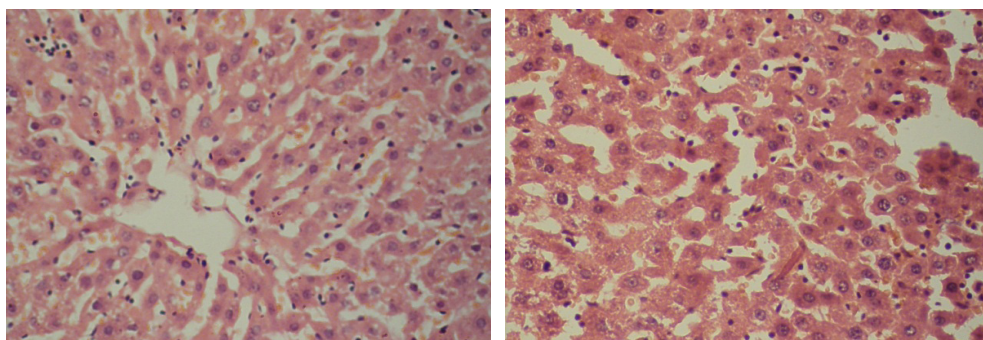


Рис. 3. Мікрофотографія фрагменту печінки щура при вживанні з питною водою гербіциду
«Roundup» у поколіннях F_0 (а) та F_1 (б)

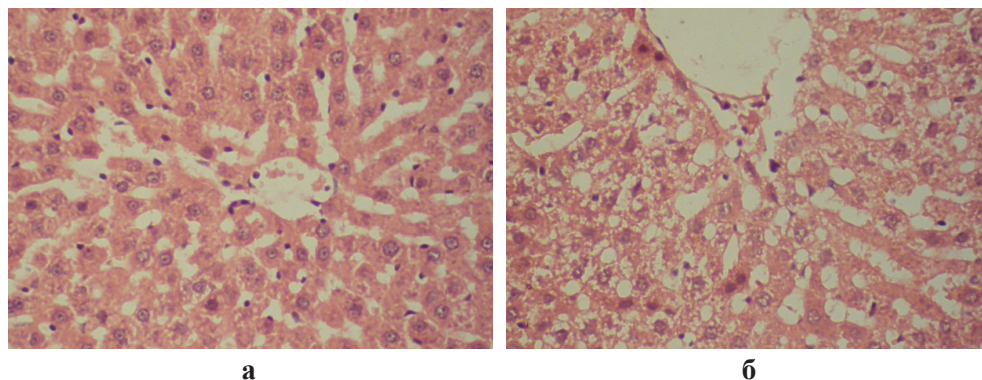


Рис. 4. Мікрофотографія фрагменту печінки щура при вживанні генетично модифікованої сої, обробленої гербіцидом «Roundup» у поколіннях F_0 (а) та F_1 (б)

У щурів IV та V групи додатково до описаних змін були виявлені некротичні зміни в окремих гепатоцитах у вигляді зморщування клітинного ядра (каріопікноз). Таким чином, вживання генетично модифікованої сої, обробленої гербіцидом «Roundup» та гербіциду разом з питною водою (0,1 мкг/л) призводить до морфологічних змін у гепатоцитах і до некротичних змін окремих клітин, це в свою чергу веде до порушення у роботі печінки. Такі зміни можуть бути пов'язані не лише з оборотним набуханням у вигляді зернистої та гідропічної дистрофії, але й із змінами у будові окремих органел, як свідчать літературні джерела, це проявляється у вигляді гіперхромного деформованого або фрагментованого ядра з наявністю двох і більше ядерць. Гепатоцити, які розташовані біля некротичних клітин мають виражені ознаки внутрішньоклітинної регенерації та адаптації, що проявляється гіпертрофією та поліплодією [3, 5] Також при довготривалому вживанні трансгенної сої щурами у наступних поколіннях може спостерігатися зміни у мітохондріях більшості гепатоцитів (набування мітохондрій і руйнування крист) та збільшення числа первинних лізосом та мітохондрій у перинуклеарній зоні [5]. Крім того втрачається гетерогенність клітин печінки щурів, що добре було виражено на мікрофотографіях гістологічних зрізів контрольної групи. Все це може бути ознакою функціональної напруги та зменшення адаптаційних резервів печінки.

Висновки

1. Вживання щурами традиційної та генетично модифікованої сої, не обробленої гербіцидом «Roundup», не призводить до значних порушень у структурі печінки як у першому, так і у другому поколінні.

2. При введенні гербіциду «Roundup» у дозі 0,003 мкг/кг маси тварини, виявлені патоморфологічні зміни (оборотне набухання гепатоцитів та некротичні зміни в окремих гепатоцитах) у печінці щурів першого та другого покоління. У другому поколінні у більшій кількості гепатоцитів виявлені некротичні зміни у

вигляді зморщування клітинного ядра (каріопікноз), що може бути причиною тривалішої дії гербіциду та посилення його впливу у другому поколінні.

3. Довготривале згодовування щурам трансгенної сої, обробленої гербіцидом «Roundup» призводить до оборотного набухання гепатоцитів як у першому, так і у другому поколінні. Слід відзначити, що у другому поколінні на 10 % більше гепатоцитів з оборотним набухання, ніж у першому поколінні цієї ж групи. Також у окремих клітинах спостерігається явище каріопікнозу, як прояв некротичних змін цих клітин, при цьому цей процес більше виявлений у щурів другого покоління.

Стаття надійшла до редакції 27.09.2018

Список використаної літератури

1. Власик Л. І. Особливості патоморфологічних змін у внутрішніх органах щурів у наслідок під гострого впливу срібних нанодекатрів / Л. І. Власик, Н. Й. Андрійчук, І. С. Давиденко // Клінічна та експериментальна патологія. – 2014. – Т. XIII, № 3 (49). – С. 33–36.
2. Вудамаска І. В. Оцінка якості та безпеки генетично модифікованих організмів / І. В. Вудамаска, Р. П. Параняк, Д. О. Янович // Біологія тварин. – 2007. – Т. 9, № 1–2. – С. 23–29.
3. Кулик Я. М. Морфофункціональні зміни печінки, нирок та наднирників експериментальних тварин при довготривалому згодовуванні раундапостійкої генетично модифікованої сої / Я. М. Кулик, А. О. Гаврилюк, В. Т. Рауцкієне., О. В. Хіміч // Вісник морфології. – 2014. – Том 20, № 1. – С. 149–153.
4. Саліха Н. О. Генетично модифіковані рослини та їх вплив на організм тварин / Н. О. Саліха, В. В. Снігінський // Біологія тварин. – 2010. – Т. 12, № 2– С. 61–74.
5. Самсонюк І. М. Ультраструктурна характеристика печінки щурів третього покоління за впливу генетично модифікованої та традиційної сої / І. М. Самсонюк, Г. І. Коцюмбас // Біологія тварин. – 2014. – Т. 16, № 2– С. 91–100.
6. Сичевський М. П. Тест-система для ідентифікації сої лінії GTS 40-3-2./ М. П. Сичевський., Я. Ф. Жукова, М. І. Вакуленко // Товари і ринки. – 2016 – № 2 – С. 99–108.
7. Brake D.G. A generational study of glyphosate-tolerant soybeans on mouse fetal, postnatal, pubertal and adult testicular development / D. G. Brake, D. P. Evenson // Chemical Toxicology. – 2004. – № 23. – P. 45–46
8. European convention for the protection of vertebrate animals used forexperim. and other scientific purposes. Coun. of Europe, Strasbourg – 1986. – 53 p.
9. Ferreira T. ImageJ . User Guide / T. Ferreira, W. Rasband. – New York: National Institute of Health. - 2012. – 187 p.
10. James C. Global status of commercialized blotech GM croup: ISAAA Brief, Ithaha. – 2013. – № 244. – P. 24–28.
11. Malatesta M. Hepatoma issue culture (HTC) cells as a model for investigating the effects of low concentrations of herbicide on cell structure and function / M. Malatesta, F. Perdoni, G. Santin // Toxicol in vitro. – 2008. – no. 22. – P. 58–60.
12. Padgette S. R. The composition of glyphosate-tolerant soybean seeds is equivalent to that of conventional soybeans / S. R. Padgette, N. B. Taylor, D. L. Nida, M. R. Bailey, J. MacDonald, L. R. Holden, R. L. Fuchs // J. Nutr. – 1996. – 126 (3), – P. 702–716.
13. Sahai S. Genetically Modified Crops: a resource guide for the Asia Pacific, Consumers International Asia Pacific office / S. Sahai – Kuala Lumpur – 2003. – 289 p.
14. Wilson A. Transformation-Induced Mutations in Transgenic plants: Analysis and biosafety implications // Biotechnology and genetic engineering reviews. – 2006 – Vol. 23. – P. 209–237.

Черная И.В.¹, Дронь Г.В.², Давыденко И.С.³

¹Национальный технический университет «Харьковский политехнический институт»

Харьков, ул. Кирпичева, 2, 61000, Украина, chorna8@ukr.net

²Буковинська государственная сельскохозяйственная опытная станция НААН
ул. Богдана Крыжановского, 21, Черновцы, 58026, Украина

³ВГУЗУ «Буковинский государственный медицинский университет»
Черновцы, Театральная пл., 2, 58026, Украина

ГИСТОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПЕЧЕНИ КРЫС, УПОТРЕБЛЯВШИХ ГЕННОМОДИФИЦИРОВАННУЮ СОЮ, ОБРАБОТАННУЮ ГЕРБИЦИДОМ «ROUNDUP»

Резюме

Проблема. В последние годы широко используются генетически модифицированные растения как в сельском хозяйстве, так и в пищевой промышленности. Больше всего в сельском хозяйстве выращивают сою с новым признаком «Roundup Ready», которая является устойчивой к гербициду «Roundup». В мире использование гербицида «Roundup» ежегодно увеличивается, поэтому есть много предостережений относительно его влияния на организм человека и животных.

Целью наших исследований было оценить гистопатологические изменения в печени крыс двух поколений под влиянием гербицида «Roundup» и трансгенной глифосат-резистентной сои, обработанной этим гербицидом.

Основные результаты исследования. Исследования проводили на крысах линии Вистар массой 180–200 г в возрасте 4 месяца. Было сформировано 5 групп животных, по 14 крыс в каждой (7 самок и 7 самцов): I – интактные животные (содержались на стандартном рационе вивария) II – животные, которым 20–26 % стандартного рациона заменено на традиционную сою (сорт Черновицкая 9); III – крысы, которым 20–26 % стандартного рациона заменено на генетически модифицированную сою (линии GTS 40-3-2), не обработанные гербицидом «Roundup»; IV – крысы, рацион которых содержал 20–26 % трансгенной сои, которая была обработана гербицидом; V – крысы, которые получали вместе с питьевой водой гербицид (0,1 мг / л или 0,003 мг / кг массы животного). После 42 дней содержания на соответствующем рационе, крыс спаривали и получали через 22–25 дней следующее поколение (F₁). После получения приплода самки всех групп продолжали получать тот же рацион и гербицид вместе с водой, как и поколение F₁. В возрасте 12-ти месяцев крыс декапитировали и проводили отбор фрагментов печени для гистологического исследования. В печени крыс первого поколения, которым скармливали генетически модифицированную сою, обработанную гербицидом, обнаружили дисконформацию пластинчатого строения, а также зернистую дистрофию гепатоцитов. Такая же картина наблюдается и у крыс, употреблявших гербицид вместе с питьевой водой. Во втором поколении дистрофические изменения гепатоцитов усиливаются.

Выводы. Гистологическое исследование печени крыс всех экспериментальных

груп двох поколінь показало, що найбільші дистрофічні зміни спостерігаються в печінці крыс, яким годували генетично модифіковану сою, оброблену гербіцидом і у крыс, які приймали гербіцид разом з питтєвою водою. В наступному поколінні спостерігається посилення дистрофічних змін в гепатоцитах крыс. Мікроскопічні зміни вказують на енергетичну навантаження і інтенсифікацію дезінтоксикаційних процесів цими клітинами.

Ключевые слова: традиційна соя; генетично модифіковані організми; трансгенні організми; глифосат-резистентна; гепатоцити; гербіцид «Roundup»; детоксикація.

Chorna I. V., Dronik G. V., Davydenko I. S.

National Technical University “Kharkiv Polytechnic Institute”, 2 Kirpichova str.,
Kharkiv, 61000, Ukraine

Bukovyna State Agricultural Experimental Station NAAS, 21 Bohdan
Kryzhanivsky str., Chernivtsi 58026, Ukraine

Bukovyna State Medical University, 2 Teatralna sq., Chernivtsi, 58026, Ukraine

HISTOLOGICAL STUDY OF THE LIVER OF RATS CONSUMING GENETICALLY MODIFIED SOYBEAN, PROCESSED WITH HERBICIDE "ROUNDUP"

Abstract

Introduction. In last years the genetically modified plants have been widely used in agriculture, as well as in the food industry. The use of “Roundup” herbicide in the world increases every year, so there is a great warning as to its impact on the health of humans and animals.

Purpose. The aim of the paper is to evaluate histopathological changes in the liver of two generations of rats under the influence of “Roundup” herbicide and transgenic glyphosate-resistant soya treated with this herbicide.

Results. The subject of the study were the male rats of the Vistar line at the age of 4 months weighing 180-200 g. Experimental animals were grouped into 5 groups of 14 rats in each (7 females and 7 males). Group I - intact animals (kept on a standard vivarium diet); Group II - animals, which had up to 20-26% of the standard diet replaced with traditional soya; Group III - rats up with to 20-26% of the standard diet replaced with genetically modified soybeans not treated with herbicide “Roundup”; Group IV - rats, whose ration contained up to 20-26% of genetically modified soybean, treated with herbicide “Roundup”; Group V - rats that received used “Roundup” herbicide with drinkable water at a concentration (0.003 µg / kg of animal weight).

After 42 days of keeping to a respective diet rates were mated and after 22-25 days the next generation was obtained (F₁). After giving birth to offspring, all females continued to receive the same diet and the herbicide with water as (F₁) generation. At the age of 12 months, the rats were decapitated and sampling of liver fragments

for histological test was performed. In the liver of the first generation rats, fed with genetically modified soya processed with the herbicide, discomplexation of lamellar structure, as well as cloudy degeneration of hepatocytes. The same condition was observed in rats that consumed the herbicide with drinkable water. Degenerative changes of hepatocytes aggravated in the second generation.

Conclusions. Histological analysis of the liver of rats of all experimental groups of two generations showed that the most dystrophic changes are observed in the liver of rats which ate genetically modified soya treated with the herbicide and of rats which consumed the herbicide with drinking water. In the next generation, an increase in dystrophic changes in hepatocytes is observed. Microscopic changes indicate the energy load and intensification of detoxification processes by these cells.

Keywords: traditional soya, genetically modified organisms, transgenic organisms, glyphosate-resistant, hepatocytes, herbicide “Roundup”, detoxification.

References

1. Vlasyk L.I., Andriychuk N.J., Davydenko I.S. (2014) «Peculiarities of pathomorphological changes in internal organs of rats as a result of subacute effect of silver nanodecahedrons», *Clinical and Experimental Pathology*, Vol. XIII, No. 3 (49), pp. 33-36.
2. Woodmaska I.V., Paranyak R.P., Yanovich D.O. (2007) «Assessment of the quality and safety of genetically modified organisms», *The Animals Biology*, Vol. 9, No. 1-2, pp. 23 -29.
3. Kulik Y.M., Gavrilyuk A.O., Rauzkiene V.T., Khimich O.V. (2014) Morphofunctional changes in the liver, kidneys and adrenal glands of experimental animals with prolonged feeding of round-resistant genetically modified soy, *Bulletin of morphology*, 20 (1), pp. 149–153.
4. Saliha N.O., Snitinsky V.V. (2010) Genetically modified plants and their influence on the organism of animals, *The Animals Biology*, 12(2), pp. 61–74.
5. Samsonuyk I.M., Kotcumbas G.I. (2014) Ultrastructural characteristic of rats liver of the third generation with the influence of genetically modified and traditional soybean, *The Animal Biology*, Vol. 16, No. 2, pp. 91-100.
6. Sychevsky M.P., Zhukov Ya.F., Vakulenko M.I. (2016) Test system for the identification of soybean line GTS 40-3-2, *Goods and markets*, №2, pp. 99-108.
7. Brake D.G., Evenson D.P. (2004) A generational study of glyphosate-tolerant soybeans on mouse fetal, postnatal, pubertal and adult testicular development, *Chemical Toxicology*, No. 23, pp. 45– 46.
8. European convention for the protection of vertebrate animals used for experim. and other scientific purposes. Coun. of Europe (1986), Strasbourg, 53 p.
9. Ferreira T., Rasband. W. (2012) *ImageJ . User Guide*, New York: National Institute of Health, 187 p.
10. James C. (2013) Global status of commercialized biotech GM crops: ISAAA Brief, Ithaha, No. 244, pp. 24–28.
11. Malatesta M., Perdoni F., Santin G. (2008) Hepatoma issue culture (HTC) cells as a model for investigating the effects of low concentrations of herbicide on cell structure and function. *Toxical in vitro*, No. 22.– pp. 58–60.
12. Padgett S.R. Taylor N.B., Nida D.L., Bailey M.R., MacDonald J., Holden L.R., Fuchs R.L. (1996) The composition of glyphosate-tolerant soybean seeds is equivalent to that of conventional soybeans, *J. Nutr.*, 126 (3), pp. 702–716.
13. S. Sahai (2003) *Genetically Modified Crops: a resource guide for the Asia Pacific*, Consumers International Asia Pacific office , Kuala Lumpur, 289 p.
14. Wilson A. (2006) Transformation-Induced Mutations in Transgenic plants: Analysis and biosafety implications, *Biotechnology and genetic engineering reviews.*, Vol. 23, pp. 209–237.