МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ЗАПОРІЗЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

БІОЛОГІЧНИЙ ФАКУЛЬТЕТ

Кафедра фізіології, імунології і біохімії з курсом цивільного захисту та медицини

Кваліфікаційна робота

магістра

на тему: ВПЛИВ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН *HIRUDO VERBANA* НА КУЛЬТУРИ РОСЛИН У РОСТОВОМУ ТЕСТІ

Виконала: студентка 2 курсу, групи 8.0914-з
спеціальності 091 Біологія та біохімія
освітньої програми Біологія
_____Циганок А.Ю._____
Керівник к.б.н., доц. Литвиненко Р.О._____
Рецензент к.б.н., доц. Гороховський Є.Ю.__

Запоріжжя – 2025

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ЗАПОРІЗЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Факультет біологічний
Кафедра фізіології, імунології і біохімії з курсом цивільного захисту та медицини
Рівень вищої освіти магістр
Спеціальність 091 Біологія та біохімія
Освітня програма Біологія

ЗАТВЕРДЖУЮ
Завідувач кафедри О.Г. Кущ
_____
“___” _____ 2024 року

З А В Д А Н Н Я
НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ СТУДЕНТЦІ
Циганок Анастасії Юріївні

1. Тема роботи: Вплив біологічно активних речовин *Hirudo verbana* на культури рослин у ростовому тесті
керівник роботи Литвиненко Раїса Олександрівна, к.б.н.
затверджені наказом ЗНУ від « 28 » березня 2025 р. № 454-с
2. Строк подання студентом роботи грудень 2025 року
3. Вихідні дані до роботи: аналіз літературних джерел (наукових статей, монографій, підручників, методичних рекомендацій та ін.) за темою роботи
4. Зміст розрахунково-пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити): 1) Визначити вплив біологічно активних речовин медичної п’явки виду *Hirudo verbana* на енергію проростання насіння та морфометричні показники тест-культур представників однодольних та дводольних рослин. 2) За допомогою ростового тесту провести оцінку токсичності культуральної води, де утримувалися медичні п’явки виду *H. verbana*. 3) Порівняти досліджувані тест-культури щодо їх чутливості та реакції на вплив біологічно активних речовин культуральної води з-під медичних п’явок виду *H. verbana.*
5. Перелік графічного матеріалу (з точним зазначенням обов’язкових креслень): таблиці: Енергія проростання та схожість насіння, морфометричні показники проростків, фітотоксичний ефект під дією культуральної води; рисунки: Енергія проростання насіння; додатки: Результати ростового тесту з насінням тест-культур.

6. Консультанти розділів роботи

Розділ	Прізвище, ім’я, по-батькові та посада консультанта	Підпис, дата	
		Завдання видав	Завдання прийняв
4	к.б.н., доц. Гороховський Є.Ю.		

7. Дата видачі завдання _____

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапів кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітки
1	Підбір та аналіз літератури за темою кваліфікаційної роботи.	листопад 2024 - квітень 2025	Виконано
2	Написання літературного огляду.	квітень 2025 – липень 2025	Виконано
3	Підбір матеріалів та методів для дослідження, формування розділу «Охорона праці».	квітень 2025 – червень 2025	Виконано
4	Оформлення розділу «Матеріали та методи дослідження».	травень 2025 – серпень 2025	Виконано
5	Формування бази даних експериментального дослідження, аналіз отриманих результатів та їх статистична обробка.	червень 2025 – вересень 2025	Виконано
6	Написання розділу «Експериментальна частина», висновків, практичних рекомендацій.	вересень 2025 – жовтень 2025	Виконано
7	Оформлення та попередній захист кваліфікаційної роботи.	листопад 2025	Виконано
8	Преставлення роботи до захисту.	грудень 2025	Виконано

Студентка А.Ю. Циганок

Керівник роботи Р.О. Литвиненко

Нормоконтроль пройдено

Нормоконтролер Є.Ю. Гороховський

РЕФЕРАТ

Робота викладена на 86 сторінках друкованого тексту. Проаналізовано 101 літературне джерело, 38 з яких іноземних. Включає 10 таблиць та 12 рисунків, 1 додаток.

Об’єктом дослідження є вплив біологічно активних речовин (БАР) медичної п’явки виду *Hirudo verbana* на тест-культури рослин *Triticum aestivum* L. і *Pisum sativum* L. у ростовому тесті.

Мета роботи: дослідити вплив БАР культуральної води з-під медичної п’явки виду *Hirudo verbana* на тест-культури рослин у ростовому тесті.

Методи дослідження: біоіндикаційні («ростовий тест»), аналітичні, статистичні.

Встановлено фітостимулювальну дію культуральної води, де утримувалися медичні п’явки *Hirudo verbana* на енергію проростання, схожість насіння та морфометричні показники *Triticum aestivum* L. і *Pisum sativum* L. Культуральна вода з-під *Hirudo verbana* фітотоксичного ефекту не проявляла. Середні показники фітотоксичного ефекту, розрахованого за двома параметрами (висота рослини та довжина коренів) були від’ємними. З двох випробуваних тест-систем більш чутливою до якості води за морфометричними показниками була тест-культура *Pisum sativum* L.

Новизна роботи: доповнено дані щодо впливу БАР *Hirudo verbana* на окремі тест-рослини.

Значущість роботи полягає у тому, що результати експериментальних досліджень можуть бути використані у рослинництві.

HIRUDO VERBANA, БІОЛОГІЧНО АКТИВНІ РЕЧОВИНИ, МЕДИЧНА П’ЯВКА, КУЛЬТУРАЛЬНА ВОДА, ФІТОІНДИКАЦІЯ, ТЕСТ-КУЛЬТУРА, РОСТОВИЙ ТЕСТ, БІОТЕСТУВАННЯ.

ABSTRACT

The work is presented on 86 pages of printed text. 101 literary sources were analyzed, 38 of which are foreign. Includes 10 tables and 12 figures, 1 appendix.

The object of the study is the influence of biologically active substances (BAS) of the medicinal leech *Hirudo verbana* on plants test cultures of *Triticum aestivum* L. and *Pisum sativum* L. in a growth test.

The purpose of the work: to investigate the influence of BAS of culture water from the medicinal leech *Hirudo verbana* on test cultures of plants in a growth test.

Research methods: bioindicative («growth test»), analytical, statistical.

A phytostimulating effect of culture water containing medicinal leeches *Hirudo verbana* on germination energy, seed viability, and morphometric parameters of *Triticum aestivum* L. and *Pisum sativum* L. was established. The culture water from *Hirudo verbana* did not exhibit a phytotoxic effect. The average values of the phytotoxic effect calculated by two parameters (plant height and root length) were negative. Of the two test systems tested, the *Pisum sativum* L. test culture was more sensitive to water quality in terms of morphometric parameters.

The novelty of the work: data on the effect of the BAS *Hirudo verbana* on individual test plants have been supplemented.

The significance of the work is that the results of experimental studies can be used in plant growing.

HIRUDO VERBANA, BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES, MEDICINAL LEECH, CULTURAL WATER, PHYTOINDICATION, TEST CULTURE, GROWTH TEST, BIOTESTING.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ 8
ВСТУП 9
1. ОГЛЯД НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ 12
1.1. Загальна біологія медичної п’явки *Hirudo verbana* 12
1.1.1 Систематика і фізіологія *Hirudo verbana.* 12
1.1.2 Екологія *Hirudo verbana* 21
1.1.3 Характеристика біологічно активних речовин секрету слинних залоз *Hirudo verbana.* 23
1.2 Використання медичних п’явок *Hirudo verbana* 28
1.2.1 Використання медичних п’явок у медицині і ветеринарії. 28
1.2.2 Застосування БАР *Hirudo verbana* у тваринництві. 31
1.2.3 Біопрепарати на основі біологічно активних речовин медичних п’явок 32
1.3 Утримання *Hirudo verbana* у штучних умовах 34
1.3.1 Культуральна вода біотехнології *H. verbana* 35
1.4 Значення води та мінеральних речовин для життєздатності рослин 36
1.5 Біотестування 39
1.5.1 Методи біоіндикації якості води 42
1.5.2 Фітоіндикація 44
2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ 46
2.1 Об’єкти та матеріали дослідження 46
2.2 Методи дослідження 48
2.2.1 Оцінка фітотоксичності води за допомогою «ростового тесту» 48
2.2.2 Методи статистичної обробки даних 51
3 ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА 53

3.1 Енергія проростання та схожість насіння пшениці ярої та гороху овочевого під дією культуральної води з-під *Hirudo verbana*. ..... **Error! Bookmark not defined.**

3.2 Морфометричні показники тест-культур рослин під дією культуральної води з-під *Hirudo verbana* у ростовому тесті……56

3.3 Фітотоксичний ефект культуральної води з-під *Hirudo verbana* на тест-культури рослин ……..……59

4 ОХОРОНА ПРАЦІ ……61

4.1 Поняття про охорону праці..... 61

4.2 Охорона праці у біотехнологічній лабораторії..... 61

4.3 Безпека в надзвичайних ситуаціях 67

4.4 Техніка безпеки при роботі на комп’ютері..... 68

ВИСНОВКИ 71

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ 72

ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ……73

ДОДАТКИ 84

Додаток А 84

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ

БАР – біологічно активні речовини

ГТ – гірудотерапія

МП – медична п’явка

КВ – культуральна вода

ФЕ – фітотоксичний ефект

ВСТУП

На сьогодні зазвичай перевага надається природним речовинам, які не шкодять живим організмам, у тому числі рослинам. До них належать і речовини, які отримують з секрету слинних залоз медичної п’явки (МП), які мають широкий спектр терапевтичних ефектів [1]. Існують сучасні методи стимуляції проростання насіння сільськогосподарських культур, які впливають на швидкість проростання, підвищення польової схожості, і в кінцевому результаті, продуктивності цієї культури. До них належать: яровізація, вологе заморожування, замочування в розчинах мікроелементів, дражування, інкрустація, протруювання. Новим перспективним напрямком підвищення схожості та проростання насіння є обробка його структурованою водою [2].

В даній роботі ми досліджували вплив біологічно активних речовин (БАР) культуральної води (КВ), де утримувалися МП виду *Hirudo verbana* на схожість та проростання насіння пшениці ярої (*Triticum aestivum* L.) і гороху овочевого сорту Альфа (*Pisum sativum* L.). Можливо, що перед посівна обробка насіння КВ з-під МП виду *Hirudo verbana* підвищить її схожість.

Дослідженнями встановлено, що чим вища лабораторна схожість насіння, тим менша різниця між лабораторною та польовою його схожістю [3].

МП *Hirudo verbana* є джерелом різних БАР, які виробляють її слинні залози. До складу БАР *Hirudo verbana* входять наступні ферменти: пептиди, білки та інші природні речовини [4, 5, 6, 7]. Відомо, що КВ, де утримують МП в умовах біотехнології, містить БАР, які виділяються у водне середовище разом із іншими продуктами життєдіяльності (екскременти, сеча, слиз та злущені залишки кутикули). В КВ з-під МП містяться деякі мікро- і макроелементи, необхідні рослинам. МП *Hirudo verbana* (Carena, 1820), занесенні до Червоної книги, як зникаючий вид [8], тому їх розводять на

біофабриках та в лабораторіях. МП для гірудотерапії та отримання екстрактів перед використанням утримуються кілька місяців у воді без годування.

Вважають, що більш важливим елементом технології вирощування рослин є передпосівна обробка насіння, що сприяє прискоренню в ньому біохімічних та фізіологічних процесів, підвищенню схожості насіння та сходу якісного посадочого матеріалу [9]. Відомо, що КВ з-під МП іноді використовується для поливу рослин, ріст яких притому покращувався.

Мета роботи: дослідити вплив біологічно активних речовин культуральної води з-під медичної п’явки виду *Hirudo verbana* на тест-культури рослин у ростовому тесті.

Для досягнення мети вирішувалися наступні задачі:

1) визначити вплив біологічно активних речовин медичної п’явки виду *Hirudo verbana* на енергію проростання насіння та морфометричні показники тест-культур представників однодольних та дводольних рослин *Triticum aestivum* L. і *Pisum sativum* L.;

2) за допомогою ростового тесту провести оцінку фітотоксичності культуральної води, де утримувалися медичні п’явки *Hirudo verbana*;

3) порівняти досліджувані тест-культури щодо їх чутливості та реакції на вплив біологічно активних речовин культуральної води з-під медичних п’явок виду *Hirudo verbana*.

Об’єктом дослідження є вплив БАР медичної п’явки виду *Hirudo verbana* на тест-культури рослин *Triticum aestivum* L. і *Pisum sativum* L. у ростовому тесті.

Предметом дослідження є фітотоксичні властивості культуральної води з-під медичних п’явок виду *Hirudo verbana* на тест-культури рослин *Triticum aestivum* L. і *Pisum sativum* L. у ростовому тесті.

Новизна роботи: доповнено дані щодо впливу БАР МП виду *Hirudo verbana* на окремі тест-рослини.

Методи дослідження: біоіндикаційні («ростовий тест»), аналітичні, статистичні.

Значущість роботи полягає у тому, що результати експериментальних досліджень можуть бути використані у рослинництві та у змісті окремих навчальних дисциплін (наприклад, «Методологія та організація наукових досліджень в біології») і можуть бути корисними для вчених-біологів та екологів. Отримані дані можуть бути використані для впровадження обробки насіння досліджуваних тест-культур КВ з-під МП *Hirudo verbana.*

1. ОГЛЯД НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Загальна біологія медичної п’явки *Hirudo verbana*

1.1.1 Систематика і фізіологія *Hirudo verbana*

Для лікування зазвичай використовують 3 види п’явок *Hirudo medicinalis* (Linnaeus, 1758), *Hirudo verbana* (Carena, 1820) та *Hirudo orientalis* (S. Utevsky et Trontelj, 2005). Частіше для гірудотерапії використовують вид *Hirudo verbana* – п’явка медична аптечна. Медична п’явка *Hirudo verbana* – це вид кільчастих червів з підкласу п’явок (*Hirudinea*), таблиця 1.1 [8, 10-13].

Таблиця 1.1 – Систематичне положення *Hirudo verbana*

Домен	Еукаріоти (Eucaryota)
Царство	Тварини (Animalia)
Тип	Кільчасті черви (Annelida)
Надклас	Пояскові черви (Clitellata)
Клас	П’явки (Hirudinea)
Підклас	П’явки (Hirudinea)
Ряд	Безхоботні п’явки (Arhynchobdellida)
Родина	Hirudinidae
Рід	Hirudo
Види	П’явка аптечна *Hirudo verbana* (Carena, 1820) П’явка медична *Hirudo medicinalis* (Linnaeus, 1758) П’явка східна *Hirudo orientalis* (S. Utevsky et Trontelj, 2005)

З таблиці 1.1 видно, що *H. verbana* відноситься до домену Еукаріоти (Eukaryota), царства Тварини (Animalia), типу Кільчасті черви (Annelida), надкласу Пояскові черви (Clitellata), класу П’явки (Hirudinida), підкласу

П’явки (Hirudinea), ряду Безхоботні п’явки (Arhynchobdellida), родини Hirudinidae, а також роду П’явка (Hirudo) [8, 11].

Біноміальна назва: *Hirudo verbana* (Carena, 1820), п’явка аптечна – вид п’явок із родини Hirudinidae, який часто використовують для проведення гірудотерапії і для отримання екстракту з п’явок. Вид *H. verbana* добре розмножується у неволі в напівпромислових умовах [11].

Медична п’явка *H. verbana* має злегка сплющене тіло, яке складається з 33 сегментів, а середні сегменти мають п’ять кілець. Це характерно для усіх представників класу Hirudinea. В середньому маса дорослої статевозрілої голодної п’явки, яка зустрічається в природних умовах, становить від 1,3-1,5 до 2-3 г. Передню присоску утворюють чотири передні сегменти. Сім останніх сегментів утворюють задню присоску. Тіло утворене останніми 22 сегментами. Кожний сегмент має по 3 або 5 кілець.

Поверхня тіла має численні дрібні сенсорні сосочки. Чутливі сосочки (папіли) розташовані на середньому кільці кожного сегменту. Сосочки видно тільки при скороченні тіла п’явки, так як м’язові клітини при тому піднімаються над поверхнею шкіри, утворюючи кілька рядів [12].

Зовні тіло п’явки покрите кутикулою, яка періодично скидається у процесі її зростання.

Довжина тіла дорослої п’явки у звичайному стані від 55,4 до 123,0 мм, а ширина тіла 8,5-13,1 мм. Забарвлення спини і черевця *H. verbana* значно відрізняються (рис. 1.1). Пігментація *H. verbana* складається з жовтого, червоного, зеленого та чорного кольорів. На спинному боці є червонувато-помаранчеві смуги, схожі на розарії, або вузькі чорні плями. Посередині спинного боку є темно-зелена або коричнева смуга. З обох бічних боків є дві помаранчеві смуги, які перериваються парою овальних плям.

Черевна сторона має жовтувато-зелену пігментацію, а на бічній стороні є чорні або темно-коричневі смуги. Іноді між двома бічними смугами також можна побачити кілька чорних плям. Поверхня тіла має численні дрібні сенсорні сосочки [12, 13].



Рисунок 1.1 – Зовнішній вигляд *H. verbana*: А – дорсальна поверхня тіла, В – вентральна поверхня тіла [12]

Медичні п’явки мають дві присоски, розміщені на задньому і передньому кінцях тіла: передню малу, яка призначена для закріплення і смоктання крові, і велику задню, яка допомагає рухатися і закріплюватися на жертві. У центрі передньої присоски розташовано ротовий отвір. Тварина чатує на жертву, перебуваючи у воді, прикріплюючись до підводних рослин або корчів. За одне годування голодна п’явка масою 1,5-2,0 г здатна висмоктувати до 15 мл крові, збільшуючись при цьому в 7-9 разів за масою. У центрі вентральної поверхні передньої присоски розташований ротовий отвір, обмежений трьома губами. Задня присоска більша за діаметром, служить п’явці для пересування і прикріплення. Діаметр передньої присоски *H. verbana* менший, ніж задньої. Розмір її передньої присоски становить 4,2-7,6 мм. Задня присоска *H. verbana* складає 7,0-9,1 мм. Передня присоска менша за задню (рис. 1.2), рот охоплює всю передню присоску, є три щелепи [12, 14, 15].

М’язова система складається з чотирьох шарів волокон: зовнішніх циркулярних волокон, що забезпечують проковтування крові, середніх (діагональних) і глибоких (поздовжніх), що забезпечують скорочення тіла та спинно-черевних м’язів, які можуть сплощувати тіло в спинно-черевному

напрямку. Сполучна тканина, яка оточує м’язові волокна та органи, щільна та міцна на розрив.

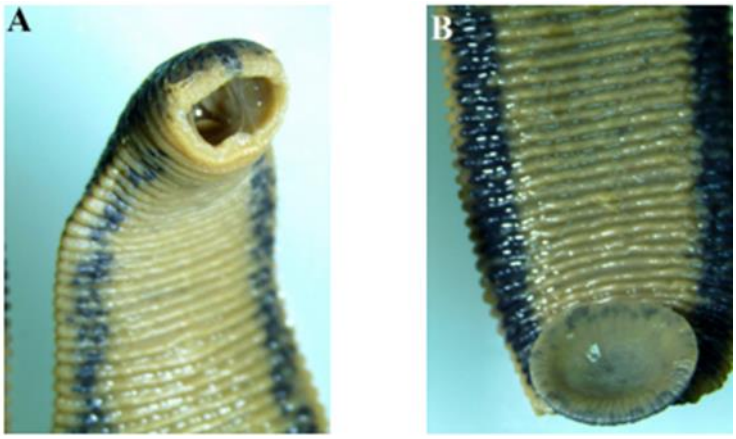


Рисунок 1.2 – Зовнішній вигляд присосок *Hirudo verbana*: А – передня присоска, В – задня присоска [12]

Медичні п’явки мають три щелепи, на кожній з яких розташовано по 90-100 гострих хітинових зубчиків, які добре розрізають шкіру. Щелепа розташована приблизно на 2-3 мм всередині передньої присоски. На щелепах є дуже тонкі зуби, які можна виявити лише за допомогою електронного мікроскопа, рис. 1.3 [12].

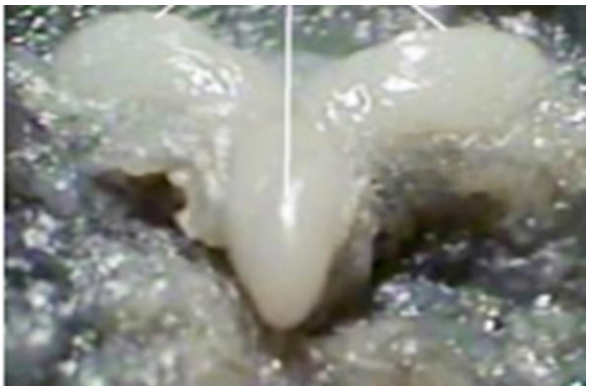


Рисунок 1.3 – Зовнішній вигляд щелеп *H. verbana* [12]

Щелепи виду *H. verbana* об’єднані навколо центру та розташовані на однаковій відстані одна від одної до периферії. Коли п’явка робить надріз, під

час смоктання крові, на шкірі можна побачити слід від щелепи у формі трикутної зірки (рис. 1.3).

На відміну від людини та інших теплокровних тварин, МП мають значну кількість очей. У *H. verbana* очі знаходяться над ротовим отвором. Їх п’ять пар. Очі складаються з очного яблука і 50 фоторецепторних клітин, кришталик відсутній [16, 17]. Очі розташовані у вигляді чорних крапок на передній спинній стороні у формі параболічної дуги (рис. 1.4). Іноді буває досить важко побачити деякі пари очей, якщо не придивлятися уважно, через чорні пігменти на спинній поверхні. Перші три пари очей розташовані одна за одною. Четверта пара очей відділена від третьої пари одним кільцем, а від п’ятої пари – двома кільцями [12].

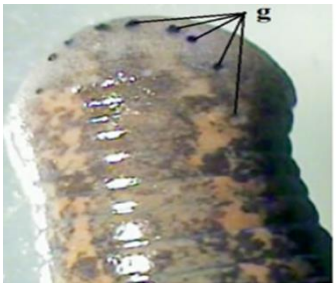


Рисунок 1.4 – Зовнішній вигляд очей видів медичних п’явок [12]

Медична п’явка *H. verbana* є абсолютним гематофагом. Вона пристосована до короткострокових контактів з господарями-годувальниками, швидкому поглинанню і тривалому зберіганню великого об’єму крові. При цьому її початкова вага зростає у 3-7 разів. Весь кишковий канал з його відростками можна розглядати як шлунок, який при смоктанні дуже швидко наповнюється кров’ ю, причому об’єм п’явки відповідно збільшується.

Травна система *H. verbana* складається з передньої, короткої середньої та задньої кишок. Власне перетравлення їжі відбувається в короткій середній і задній кишці, тоді як передня кишка (шлунок), являє собою циліндричне розширення з 11 парними кишенями, займає майже все тіло п’явки [14].

Травна система *H. verbana* починається ротом. Навколо трьох м'язових щелеп розташована глотка [17]. Рот знаходиться у них на передній присосці. У ротову порожнину відкриваються протоки слинних залоз, секрет яких попадає у ранку і перешкоджає згортанню крові. Слина *H. verbana* складається з великої кількості БАР. Глотка переходить у короткий стравохід, шлунок, потім у кишківник та анальний отвір [18]. У шлунку за рахунок антикоагулянтів зберігається поглинута кров. Травлення досягається багатьма ферментами і мікроорганізмами – симбіонтами [19, 20, 21]. Бактерії-симбіонти *Aeromonas hydrophila* допомагають переварювати кров у кишечнику МП та справлятися з чужерідними бактеріями, які можуть потрапити в шлунок разом із кров'ю, що поглинається. При смоктанні крові у рану потрапляє слина, яка містить широкий комплекс БАР. За один раз і п'явка випиває 5-15 мл [18, 22].

У травній системі кров, що з'їдається, піддається імунному контролю з боку медичної п'явки. Тут довго зберігають свою активність клітинні і гуморальні фактори крові. При дії негативних впливів на п'явку першою реагує її система травлення. Імунологічна функція з'їденої крові годувальника в нормі пригнічується МП певними механізмами [14]. По-перше, плазма крові господаря піддається швидкій дегідратації, втраті адгезивних властивостей формених елементів. По-друге, оптимальна температура організму медичної п'явки (оптимум +22-24°С) відрізняється від оптимальних температур теплокровних господарів-годувальників (+38,5°С для копитних і +37°С для людини). Це сприяє переважанню імунітету п'явки над імунітетом господаря-годувальника [12, 14]. По-третє, це може бути індукція апоптозу у лейкоцитах крові людини під впливом БАР медичної п'явки. Це питання знаходиться на стадії вивчення [14].

З'їдена п'явкою кров піддається змінам. Дослідження вчених показали, що максимальна тривалість існування клітин крові господаря-прогодувальника у травній системі МП становить для деяких нейтрофілів до 15 діб, для моноцитів до 18 діб, еозинофіли, лімфоцити та еритроцити можуть зберігатися протягом місяця. Однак загальна кількість клітин крові значно

знижується вже на першому тижні. Надалі дуже збільшується кількість детриту [14].

Кровоносна система складається з бокових судин – лакун, які розташовані з боків тіла та черевного синуса, який є ділянкою целому, наповненого кров'ю. У ньому міститься черевний нервовий ланцюжок. Целом у п'явок редукований, простір між органами заповнений перенхімою, в якій проходять дорсо-вентральні пучки м'язових волокон. Середину п'явки займає кишечник бічними кишенями. Кровоносні судини у п'явки редуковані і їх функції виконують рудименти целому, якими є розташовані у паренхімі лакуни – спинна, черевна і дві бічні з м'язистими стінками.

П'явки – гермафродити. Це означає, що кожна МП має обидва статеві органи: яєчники та сім'яники. Під час копуляції у п'явок виникають сперматофори за допомогою яких переносяться сперматозоїди від п'явки до п'явки. Під час розмноження клітеліум п'явки виділяє речовину, яка утворює кокон, рис. 1.5 [18].



Рисунок 1.5 – Утворення кокона *Hirudo verbana* (Carena, 1820) [18].

П'явки вилупляються з кокона (рис. 1.5) протягом місяця. Колонії бактерії допомагають синтезувати поживні речовини для перетравлення їжі. Ці речовини передаються в коконі потомству [18, 23]. Кокони п'явок різних видів мають різну кількість запліднених яєць [12, 18, 24, 25, 26]. За наявності харчування п'явка може жити в природі приблизно 18-27 років [12, 18].

Між чоловічим та жіночим статевими отворами *H. verbana* є п’ять кілець (рис. 1.6). Чоловічий статевий отвір (чоловіча гонопора) трохи більший за жіночий статевий отвір (жіноча гонопора). Чоловічий статевий отвір розташований між п’ятим і шостим кільцями 11-го сегмента, а жіночий статевий отвір — між п’ятим і шостим кільцем 12 сегменту. Придаток яєчка у *H. verbana* має невеликі розміри, а цибулина еякуляту довша у порівнянні з іншими МП. Пеніальна оболонка довга та виступаюча. Піхва *H. verbana* трубчаста і складчаста [12, 25].

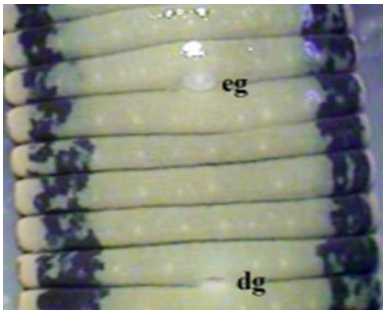


Рисунок 1.6 – Зовнішній вигляд статевих органів медичних п’явок: В – статеві отвори *Hirudo verbana* (eg – чоловічий статевий отвір, dg – жіночий статевий отвір) [12].

Між нервовим ланцюжком та органами виділення п’явки (метанефридії) лежить дев’ять пар кулястих насінників. Їхні вивідні протоки впадають з кожного боку в загальний сім’япровід, що проходить ззовні від насінників до переднього кінця тіла. У 10-му сегменті сім’япроводи з’єднуються по середній лінії в непарний сім’явипорскуючий канал. Тут сім’япроводи скручуються в клубочки – придатки сім’яників (насіннєві бульбашки). Сім’явипорскуванний канал переходить у мускулистий копулятивний орган з розширеним остуванням (передміхурової залозою) [13, 25].

Жіноча статева система (рис. 1.7) складається з однієї пари кулястих, дуже маленьких яєчників, знаходиться в 11 сегменті тіла, позаду копулятивного органу. Від них йдуть короткі яйцепроводи, які потім зливаються утворюючи мускулисту, скручену у вигляді петлі піхву, яка на 11

сегменті відкривається назовні. Після парування МП відкладають кокони з різною кількістю яєць.

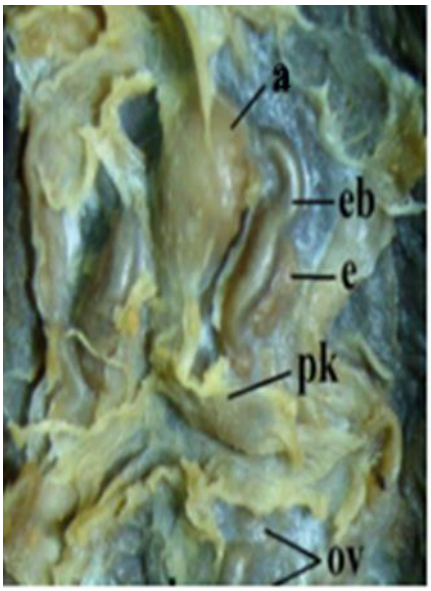


Рисунок 1.7 – Зовнішній вигляд репродуктивної системи видів медичних п’явок: В – репродуктивна система *Hirudo verbana* (a – генітальний атріум, e – епідідіміс / придаток яєчка, eb – сім’явивідна протока, od – яйцевід, ov – яєчниковий мішок, v – піхва, t – яєчковий мішок) [12]

Зовні тіло МП покрите одношаровим епітелієм, під яким знаходиться шар кільцевих м’язів, глибше – діагональний шар, а ще глибше потужний шар поздовжніх м’язів. Мускулатура може займати до 65% об’єму тіла п’явок. П’явки пересуваються за допомогою мускулатури та змінно прикріплюючи присоски до різних предметів і хвилеподібно згинаючись. Вони можуть плавати.

Дихання *Hirudo verbana* здійснює через всю поверхню тіла. Зябра відсутні [25].

Головний нервовий центр МП складається з церебрального ганглія, вентрального ганглія та заднього ганглія. Тіло п’явки містить різні сенсорні рецептори. За допомогою рецепторів п’явка може виявляти рух коло себе, вібрацію та різні хімічні речовини [16, 18, 27].

Завдяки сенсорним рецепторам п’явка знаходить місце хорошого кровотоку на тілі господаря. При несприятливих умовах або стресах п’явки виділяють на поверхню тіла слиз.

Для гірудотерапії використовуються МП, які вирощені на біофабриках [18, 26]. Вони повинні бути не молодшими 1-2 років пройти карантин, що включає голодування протягом п’яти місяців після останньої годівлі.

1.1.2 Екологія *Hirudo verbana*

На розповсюдження МП впливають кліматичні умови, температура повітря і води, ступінь забруднення водного середовища, солоність води. МП живуть у прісних водоймах зі спокійною водою. На суші вони пересуваються насилу. Щоб відкласти яйця закопуються в мул [28]. Перші п’явки та їх предки були прісноводними організмами, тому і їх нащадки не переносять солоність води понад 7%.

МП заселяють головним чином неглибокі болота із зарослими очеретом берегами. Також п’явки можуть селитися в будь-який інших стоячих водоймах-ставках, озерах, навіть на заливних рисових полях. Вони можуть жити і в річках, обираючи тихі заплави. Проточна вода несприятлива для п’явок. П’явки тримаються ближче до берега, зариваються в мул, ховаються серед водної рослинності. При посусі впадають у суху сплячку. У п’явок надзвичайно розвинені різноманітні органи чуттів. Вони добре сприймають механічні, хімічні та інші подразники.

При ясній погоді п’явки активні на дні. П’явки багато рухаються, щоб поглинути більше кисню через шкіру, тому що у них відсутні зябра. З настанням холодів вони впадають у стан заціпеніння. Бадьорість п’явок взимку можлива тільки в лабораторних умовах [18, 29].

В Запоріжжі проаналізована в межах о. Хортиця в акваторії Дніпра частота поширення МП *Hirudo verbana* з 2006 по 2009 [30].

МП при можливості нападає на тварин або людину, що купаються. Люди помітили поліпшення стану після укусу п’явками і почали використовувати їх для кровопускання. Згодом, популярність МП зростала. Для лікування застосовують 3 види МП [5, 6, 18, 19, 28, 31]. Один з цих видів *Hirudo verbana* Carena, 1820 – п’явка аптечна [11].

Протягом тисячоліть кровопускання вважалося найбільш популярним видом лікування [32, 33]. В давнину ще не були відомі властивості слини п’явки. Можливості медичного використання п’явок розглядали римський лікар Клавдій Галлен, таджицький медик Авіцена [32]. Пліній старший, який жив у першому столітті до н.е., який жив у 1 ст. до н.є., у своїй «Природній історії» описав кровососних п’явок, звернувши увагу на позитивні зміни в організмі людини. Коли медична практика перейшла до рук ченців, цей вид лікування був заборонений [32, 33]. В період розквіту цього методу лікування (кінець XVIII – початок XIX ст.) використовувалися мільйони п’явок. Нерозумний вилов МП призвів до їх массового вимирання, зникнення. У першій половині XIX ст. почали відкривати господарства з штучного розведення п’явок. Існували ферми, які являли собою звичайні ставки під відкритим небом.

У другій половині XIX ст. через бурхливий розвиток фармацевтики та біохімії інтерес до МП з боку медицини різко впав і потреби в п’явках поповнювалися з диких водойм. З середини XX ст., коли фармацевтичний ринок переситився синтетичними препаратами, лікарі та пацієнти повернулися назад до природи і п’явки виловлювалися в найбільших кількостях.

Безконтрольний вилов МП і необдумана меліорація призвели до різкого зниження популяції, а іноді до зникнення МП в природних водоймах. В 1984 році вид *Hirudo medicinalis* був занесений у Червону книгу [8] і заборонений вилов п’явок з метою продажу.

В наш час розроблені і використовуються різні методи по вирощуванню МП *H. verbana* в штучних умовах, які максимально наближені до природних, але в стерильних умовах. Для цього існують біофабрики та лабораторії по вирощуванню МП. П'явки виду *H. verbana*, вирощені в умовах біофабрики також використовують у медицині [18, 34].

1.1.3 Характеристика біологічно активних речовин секрету слинних залоз *Hirudo verbana*

Слина МП, у тому числі *Hirudo verbana*, містить понад 100 БАР, які володіють різними терапевтичними ефектами (таблиця 1.2) [18].

Таблиця 1.2 – Біологічно активні речовини п'явки аптекарської *Hirudo verbana* [18]

Речовини	Ефекти
1	2
Гіалуронідаза	Для проникнення та дифузії фармакологічно активних речовин в тканини, особливо при болях у суглобах і має антибіотичні властивості. Володіє протимікробною дією.
Гірудин	Дозволяє крові текти деякий час без її згортання. Він пригнічує згортання крові шляхом зв'язування з тромбіном.
Калін, сарацин, апіраза, декорсин	Пригнічують згортання крові, калін шляхом блокування зв'язування Фактору фон Віллебранда до колагену. Ефект може тривати до 12 годин.
Дестабілаза	Розчиняє фібрин і має тромболітичну дію.

Продовження табл. 1.2

1	2
Бделіни	Надають протизапальну дію і пригнічують трипсин, плазмін і акроцин.
Ацетилхолін	Судинорозширювальна дія.
Гістаміноподібні речовини	Судинорозширювальна дія, посилюють приплив крові до місця укусу.
Гірустазин	Інгібує калікреїн, трипсин, хімотрипсин і нейтрофільний катепсин G.
Егліни	Протизапальні. Вони пригнічують активність альфахімотрипсину, хімаза, субстилізин, еластаза та катепсин G.
Антистазин, гілантени, гуамерин, пігуамерин, бделастазин	Протизапальні речовини.
Інгібітор фактора Ха	Пригнічує активність фактора згортання крові Ха.
Інгібітори карбоксипептидази-А	Посилюють прилив крові.
Колагеназа	Зменшує колаген. Інгібітори комплементу Замінюють природні інгібітори комплементу, якщо вони є дефіцитними.
Інгібітор триптази	Пригнічує протеолітичні ферменти тучних клітин господаря.
Гелін, вітманін, уайтід	Антикоагулянтна дія.
Хлороміцетин, теромацин, термізин	Антимікробний ефект.

Секрет слинних залоз МП містить речовини вуглеводної, ліпідної та білкової структури [18]. БАР МП надають різний вплив на організм. До терапевтичних ефектів БАР МП відносяться: антикоагуляційний,

протимікробний, знеболюючий та противозапальний, загоєння ран судинорозширювальний, пригнічення функцій тромбоцитів [18, 19, 22, 28].

Секрет слинної залози МП містить речовини вуглеводної, ліпідної та білкової структури [4, 5, 28]. Виявлені сполуки стероїдної природи – вільні стероїдні гормони: кортизол, прогестерон, тестостерон, естрадіол, гістамін, серотонін, дегідроепіандростірон. Із відомих БАР у слині *H. verbana* містяться: гірудин, гіалуронідаза, калін, дестабілаза, апіраза, егліни (інгібітори еластази, катепсину G), бделіни, декорзин (антагоніст глікопротеїну, інгібітор агрегації тромбоцитів), гірустатин, пігуамерин (інгібітор плазмового калікреїну), тромбоцитарний антагоніст активації (антитромбічний ефект) інгібітора триптази, хлороміцентин (антибіотик), інгібітори карбоксипептидази А та ацетилхолін [35, 36, 37].

Увесь комплекс БАР МП можна розділити на 4 групи:

- літичні сполуки, які руйнують тканини жертви;
- антигемостатики, які блокують механізми механізми згортання крові при гірудотерапії (ГТ);
- блокатори захисних реакцій організму, які протидіють запальним реакціям та допоміжні речовини, що розвиваються в тканинах у відповідь на пошкодження та допоміжні речовини [37].

До літичних сполук відносяться: пептидазу (дестабілазу), гіалуронідазу, колагеназу [35, 37].

Пептидаза (дестабілаза) – це фермент, що руйнує певний тип зв’язків у молекулі білка, які утворюють поперечні зшивання.

Даний тип зв’язків утворюється при стабілізації фібрину, а їх руйнування забезпечує активність секрету.

Пептидаза – це фермент, що каталізує реакції, здатна впливати на функціональну активність різних клітин: ендотеліоцитів, лімфоцитів, тромбоцитів, макрофагів та ін. [35, 37]. Деполімеризація глікозоаміногліканів гіалуронової кислоти, які входять до складу базальної мембрани,

міжклітинного матриксу і базальних мембран капілярів і відіграє роль фактора проникнення і виникнення наступних фізіологічних реакцій [35, 37, 38].

Колагеназа збільшує проникнення до організму різних речовин і виконує бактерицидну та бактеріостатичну дії [37].

Антигемостатики – група БАР, які перешкоджають механізмам розвитку згортання крові при ГТ [37, 38, 39, 40, 41, 42]. Також вони підтримують у рідкому стані кров у кишечнику МП. До них відносять: калін, апіраза, антагоніст PAF, інгібітор Ха фактора, гірудин.

Калін – це інгібітор агрегації тромбоцитів [37, 38].

Апіраза має протисклеротичний вплив, знижує рівень загального холестерину і β-ліпопротеїдів низької щільності [35, 37].

Антагоніст PAF (фактору активації тромбоцитів) – перешкоджає активації тромбоцитів, міграції тромбоцитів і нейтрофілів до вогнища ураження. PAF, виділяючись у ранку, викликає запалення [19, 37, 41].

Інгібітор Ха фактора – це фермент, що каталізує перетворення протромбіну в тромбін у присутності іонів Ca_2^+, здійснює захист організму від венозного тромбоутворення [19, 37].

Гірудин – інгібітор тромбіну, він блокує всі відомі реакції, активатором яких виступає тромбін [38, 39, 40].

Блокатори запальних реакцій – це БАР поліпептидної природи, що слугують інгібіторами ферментів, продукуються в ході реакційної відповіді на пошкодження шкіри при ГТ. Речовини даної групи виконують захисну функцію. До них відносять: бделіни, гірустазин, LDTI, LCI та егліни.

Бделіни – поліпептиди, які є сильними інгібіторами трипсину, плазміну [35, 37].

Гірустазин інгібує тканинний калікреїн, трипсин, хімотрипсин, катепсин G нейтрофілів плазміну.

LDTI (leech derived tryptase ingibitor) – інгібітор триптази, яка приводить до руйнування білків екстраклітинного матриксу.

LCI (leech carboxypeptidase ingibitor) – збільшує кровоток при ГТ. Він інгібітор карбоксипептидази А.

Егліни – це низькомолекулярні білки, які інгібують активність α-хімотрипсину, хімази мастоцитів, субтилізину при запальних реакціях [37].

Допоміжні речовини – це БАР, які сприяють стабілізації, захисту, транспортуванню, посиленню дії інших БАР МП [35, 37]. У комплексі БАР МП є велика кількість ліпідів, які формують ліпідно-ферментні комплекси в яких молекули білка завдяки ліпідам не розпізнають чужих білків і не реагують на них при ГТ. У комплексі БАР МП наявні ліпосоми, до складу яких входять дестабілаза, гірудин, аналог простоцикліну, інгібітор калікреїну плазми крові. Завдяки здатності ліпосоми змінювати свою просторову орієнтацію вона безперешкодно проникає через мембрану клітини [37].

МП продукують і інші БАР: колагеназу, кініногеназу, ліпазу, простогландини, ацетилхолін, гістаміноподібні судинорозширювальні сполуки, антибіотик (хлорміцетин), фібриназа, колагеназа, анальгетикоподібні речовини). Доведена наявність у комплексі БАР МП стероїдних гормонів (прогестерону, естрадіолу, тестостерону, кортизону, дегідроепіандростерону та важливих нейромедіаторів (серотоніну та гістаміну) [37].

БАР МП проявляють бактеріостатичну дію на пігментоутворювані сапрофітні бактерії [37, 43]. Пригнічують життєздатність *E.coli*, порушують нормальну мікрофлору її клітин та антигенні властивості за рахунок антимікробної дії гіалуронідази, колагенази та антибіотика (хлорміцетину) [44].

Молекули гірудиноподібних факторів (HLF) приймають участь у інгібуванні тромбіну.

1.2 Використання медичних п’явок *Hirudo verbana*

1.2.1 Використання медичних п’явок у медицині і ветеринарії

Медична п’явка *Hirudo verbana*, як і медичні п’явки інших видів, завдяки цілющим властивостям своєї слини, широко використовується у медицині, дерматології і косметології, у клінічних дослідженнях для забору крові. Секрет слини МП справляє антикоагуляційний, знеболювальний, протизапальний, антимікробний ефекти по відношенню до широкого кола хвороб [28, 35, 37, 41, 45-51].

Механізми лікувальної дії МП (рис. 1.8) визначаються особливостями проведення процедур та властивостями секрету їх слинних залоз, який потрапляє в організм людини або тварини після прокушування п’явкою шкіри та продовжує надходити під час кровососання [35, 37, 41, 47].



Рисунок 1.8 – Узагальнена схема механізмів лікувальної дії гірудотерапії [19, 28, 37, 41, 47].

Зростаючий інтерес до ГТ та довгий список показань (рис. 1.9) обумовлений широким спектром її лікувальної дії.

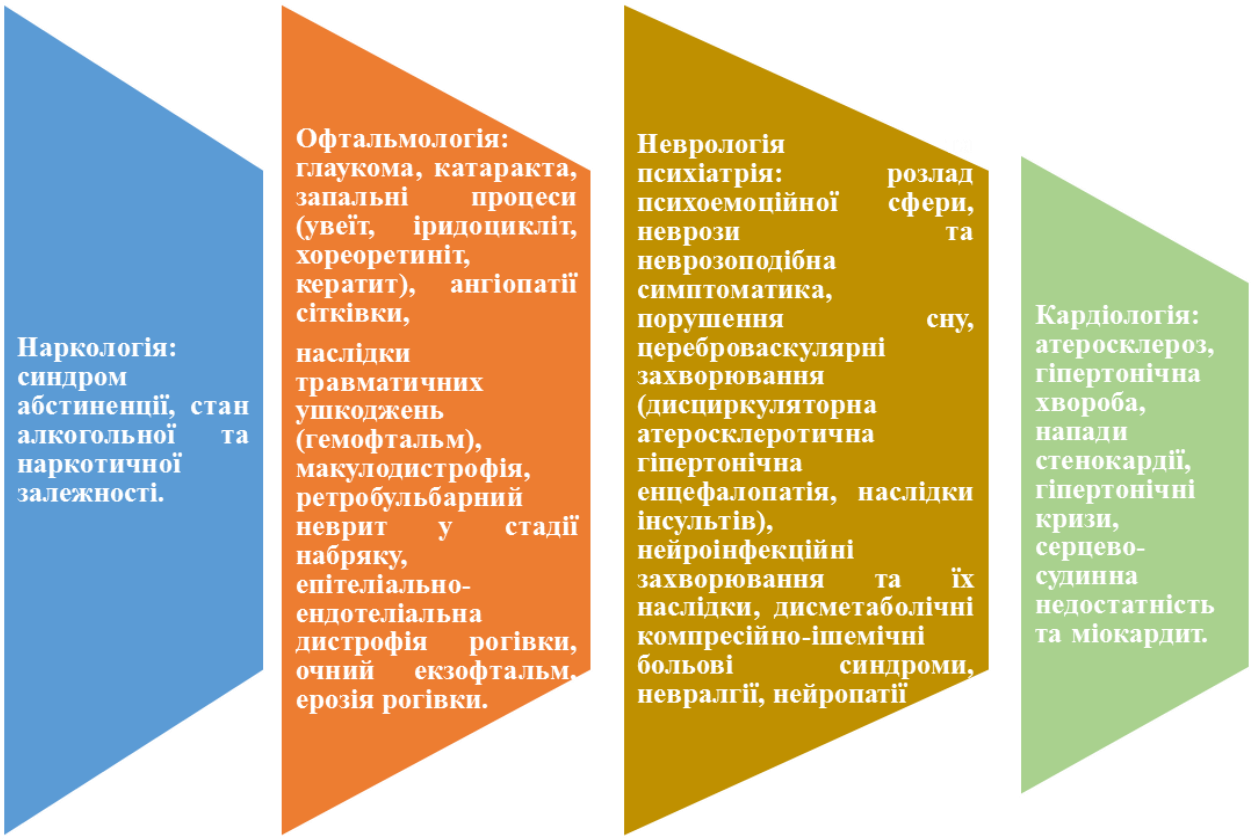


Рисунок 1.9 – Узагальнена схема основних показань до гірудотерапії [19, 28, 31, 37, 41, 47].

Ефективне використання ГТ доведено при лікуванні різних захворювань у всіх галузях медицини [48]:

- в кардіології при лікуванні серцевої недостатності, глаукоми, стенокардії, гіпертонії;
- у пластичній і реконструктивній хірургії для лікування післяопераційного венозного застою та відторгнення трансплантата [18, 22, 35, 37].

ГТ використовують при захворюваннях шкіри [18, 37], для зменшення зростання бактерій та запалення при абсцесі, в стоматології – при лікуванні кореневих каналів [18, 51].

Дослідження вчених показують, що БАР МП зміцнюють імунну систему для боротьби з подальшою інфекцією. Основну роль у відновленні імунної системи грає БАР апіраза, яка володіє імуномодулюючою дією. БАР

дестабілаза здатна впливати на функціональну активність клітин: лімфоцитів, тромбоцитів, макрофагів та інших [37, 41].

ГТ в першу чергу активує детоксикаційний, протизапальний, протибольовий та деконгестивний вплив, активізує механізми неспецифічного імунного захисту.

В Україні ГТ є офіційно дозволеним методом лікування (рис. 1.10) та використовується для терапії захворювань серцево-судинної системи, в неврології, урології, гінекології, офтальмології, при різних захворюваннях опорно-рухового апарату та інших галузях медицини.

БАР *H.verbana* активізує кровообіг, обмін речовин, підвищує захисні властивості організму. ГТ у косметології, виступає як альтернатива хірургічним способам підтяжки обличчя. При правильному застосуванні ГТ є безпечним методом лікування, з мінімальною кількістю побічних ефектів та має мінімальну кількість протипоказань (рис. 1.10).



Рисунок 1.10 – Узагальнена схема основних протипоказань до гірудотерапії [28, 41, 47].

1.2.2 Застосування БАР *Hirudo verbana* у тваринництві

П’явки широко використовуються у ветеринарії для забору крові з набряклої області, а також для зменшення тиску рідини в пошкоджених тканинах [18]. Останнім часом МП використовують у лікуванні хвороб тварин, зокрема й домашніх (табл. 1.3) [18, 37, 41, 45, 52].

ГТ підвищує репродуктивну здатність у корів. У кіз під дією ГТ підвищується апетит, зменшуються тріщини на рогах і копитах, вовняний покрив покращується, надої збільшуються [18, 37, 52].

Таблиця 1.4 – Приклади захворювань, які лікуються гірудотерапією у тварин [4, 41, 52].

Коти	Собаки	Коні
екзема	екзема вуха	лихоманка
післяопераційна рана	післяопераційна рана; тривале загоєння ран; післяопераційні рубці	ламініт
розтягнення зв’язок	остеоартрит хребта	артрит в області плеча
дисплазія	дисплазія стегна і ліктя	тендиніт
дископатії	дископатії	міозіти
неврит хребта	тендиніт, теносиновіт	остеоартроз
мастит	неврит коліна	атаксія
	мастит	

1.2.3 Біопрепарати на основі біологічно активних речовин медичних п’явок

Перспективним напрямком у сучасній медицині є застосування медичних та косметичних препаратів, що містять БАР МП, які є субстанціями природного походження, які мають велику цінність. Для отримання екстракту БАР МП не потрібні особливі витрати і він має широкий спектр лікувальних властивостей. Зокрема, вченими розглядаються питання отримання БАР МП із культуральної води при біотехнології МП та їх вплив на різні тест-культури [43, 44, 53].

Встановлено, що КВ МП містить білки сироватки крові годувальника п’явки: альбуміни, глобуліни, гірудин, гіалуронідазу, тригліцеридазу, еластазу, апіразу, амінокислоти (триптофан, глютамінова кислота, аланін, лізин, лейцин), біогенні елементи (калій, натрій, фосфор) і мікроелементи (селен, йод, бром, сірка). З них гіалуронідаза та колагеназа виконують бактерицидну та бактеріостатичну дію [37, 44]. Допускають, що КВ, де утримувалися МП, містить також антибіотик хлорміцетин, який виділяє МП [44, 54].

Були проведені дослідження стосовно загоєння ран у лабораторних щурів. При цьому, для лікування використовували крем, що містить 5% екстракту з МП. Його наносили *in vivo* на рани 1×1 см². У результаті крем проявив здатність у швидкому загоєнні ран і також сильний антикоагуляційний ефект [18, 55].

Проведено ґрунтовне дослідження (M. Alaama та співавтори, 2024) щодо історії використання екстракту МП як терапевтичного засобу [56]. Показано, що деякі фармацевтичні препарати на основі екстракту МП були вилучені з виробництва, а деякі все ще знаходяться на ринку. Якість та ефективність фармацевтичних препаратів на основі екстракту МП залежить перш за все від методів екстракції та повноти характеристики їх компонентів. Екстракт слини

МП є засобом вибору при лікуванні складних захворювань (наприклад, онкопатологія, діабет, вік-асоційована патологія), оскільки містить комплекс БАР, що поєднуються природним чином і проявляють різноманітну біологічну активність практично без побічних ефектів. Однак все ще необхідні додаткові дослідження, щоб з'ясувати повний хімічний склад та механізм дії кожної сполуки, що є в екстракті слини МП.

В Україні екстракт МП застосовується для досліджень, приготування мазі для лікування різних захворювань, пов'язаних із судинною системою, для лікування варикозу, зняття запалень, загоєння ран, покращення мікроциркуляції крові, а також кремів та гелів для догляду за шкірою і волоссям. Існують біофабрики, що спеціалізуються на виробництві МП для ГТ, а також лікувальних мазей та косметичних засобів на основі екстракту МП [57, 58]. Наприклад, підприємництво «Біокон» у Харкові вирощують МП *H. verbana*. На основі цілющого екстракту цих п'явок вчені підприємства створили серію засобів «Доктор Біокон», які актуальні при запаленнях, болях у суглобах, розширені вен, венозному застої. Гелі на основі екстракту з МП підвищують еластичність судин, відновлюють хрящову тканину, застосовуються як допоміжний медичний засіб при порушенні периферичного кровообігу, втоми ніг, при підвищених фізичних навантаженнях, для прискорення розсмоктування синців. Також випускаються профілактичні засоби на основі екстракту МП, що застосовуються у стоматології (ополіскувачі порожнини рота для профілактики карієсу та пародонтозу, зубні пасти) [57].

На підставі цих даних можна зробити висновок про необхідність подальших досліджень властивостей БАР МП.

1.3 Утримання *Hirudo verbana* у штучних умовах

МП *H. verbana* вирощують в умовах біофабрик та лабораторій з дотриманням санітарних норм. Технологія вирощування МП включає в себе наступні етапи:

1) п’явок-маток вагою 10-25 г, які готові до спаровування поміщають в ємності різного об’єму, наповнені водою до половини в кількості 20-100 особин на 40 днів за температури +24-26 ºС;

2) п’явок з кільцями оплодотворіння переміщують у зволожений торф, де вони відкладають кокони протягом 1-1,5 місяця при температурі +27ºС;

3) нитчаток, які вилупилися з кокона, потрібно годувати кров’ю;

4) щоб отримати п’явку вагою 0,8-1,5 г для ГТ потрібно вирощувати її 10-18 місяців;

5) зріла п’явка повинна голодувати 4-6 місяців (в цей час вона активно виробляє ферменти) [58]. Проте частіше їх розводять і утримують в лабораторних умовах для подальшого використання, для лікування та досліджень. При цьому необхідно підтримувати гігієнічні умови, щоб запобігти інфекціям під час використання [59].

Повинні дотримуватися певної температури води, кількості розчиненого у ній кисню, pH, катіонних елементів (літій, натрій, амоній, калій, магній, кальцій) і аніонних елементів (фторид, хлорид, тсульфат, нітрат, фосфат, бромід) [60]. Більші за вагою особини здатні давати більше коконів [18]. Чим молодша материнська п’явка, тим більше коконів вона дає [18]. Годування п’явок кров’ю курки або кози порівняно з годуванням кров’ю великої рогатої худоби є більш ефективним. Для запобігання згортання крові додається гепарин натрію. Кров під час годування нагрівають до +37-38ºС.

Кокони повинні інкубуватися окремо в банках під кутами 78,73º та 60,63º. Це забеспечує вентиляцію повітря всередині коконів і відсутність гнилі у них [61]. При цьому отримують більше нащадків з коконів.

Для зберігання МП використовують такі загальноприйняті методи:

1) у глиняних ємностях з додаванням каміння та бруду водних рослин;

2) баночний метод (утримання п’явок у скляних банках з отворами для вентиляції на кришках);

3) акваріумний метод (утримання п’явок в акваріумі із водою з додаванням водних рослин і сухих гілок).

При однакових оптимальних умовах ефективні усі три методи. Але акваріум можна використовувати для створення потрібного середовища з належною аерацією. В акваріумі легко змінити воду. При зміні води в акваріумі, раз у три доби, було найменше мікробне навантаження. Метод з використанням глиняних ємностей створює природне середовище для МП, але недолік пересаджування МП при зміні води. Баночний спосіб не створює природного середовища, хоч і простий.

1.3.1 Культуральна вода при біотехнології *Hirudo verbana*

В даний час велика увага вчених приділяється вивченню властивостей КВ, де утримувалися МП, так як доведено наявність у ній БАР МП та інших цінних речовин [7, 37].

Організм МП *H. verbana* продукує комплекс унікальних біологічно активних речовин (БАР) – гірудин, егліни, бделіни, ферменти (гіалуронідаза, дестабілаза, колагеназа, апіраза, еластаза та інші, які проявляють широкий спектр терапевтичних ефектів [18, 37, 41, 47].

Дослідженнями доведено, що екстракт слини МП *H. verbana* проявляє бактеріостатичну дію подібну до антибіотиків і при цьому не викликає побічних ефектів [37, 54].

При біотехнології МП *H. verbana* її БАР виділяються у водне середовище, де утримують п’явок. В цій воді (культуральна вода) разом з БАР

містяться і продукти життєдіяльності МП. Це екскременти, сеча, слиз, злущені залишки кутикули. Також встановлено, що КВ з-під МП, містить білки сироватки крові годувальника п’явки (альбуміни і глобуліни), амінокислоти (триптофан, глютамінова кислота, аланін, лізин, лейцин), біогенні елементи (натрій, натрій, калій, фосфор) мікроелементи (сірка, йод, бром, селен) [7, 37, 44].

Дослідження показали, що КВ, оброблена МП виявляє бактеріостатичну дію на окремі культури бактерії, імовірно, що серед БАР МП гіалуронідаза та колагеназа виконують бактерицидну та бактеріостатичну дію. Допускають, що КВ оброблена МП *Hirudo verbana* містить антибіотик хлорміцетин, який входить до складу БАР МП [43, 44, 53].

Можна допустити, що макро- та мікроелементи, а також амінокислоти БАР МП будують корисними для пророщування насіння, ферменти і гормони, амінокислоти можуть сприяти швидкому проростанню насіння, а при поливі рослин КВ МП може покращуватись стан через БАР (гірудин, ферменти, гормони, включаючи серотонін), вітаміни, амінокислоти, які можуть бути добривом для рослин, збагачуючи ґрунти та стимулюючи його мікрофлору. КВ з-під МП *H.verbana* може мати стимулюючий ефект для зростання рослин, роблячи їх стійкими до стресу.

В цій кваліфікаційній роботі визначали вплив БАР КВ, де утримувалися МП *H. verbana* на енергію проростання насіння та морфометричні показники тест-культур рослин та фітотоксичний ефект.

1.4 Значення води та мінеральних речовин для життєздатності рослин

Вода є основним компонентом всього живого. У рослинництві та землеробстві важлива роль належить воді та її якості. Вода потрібна рослинам як розчинник і транспортувач поживних речовин, для транспірації,

охолодження рослин. Вода впливає на проростання насіння та визначає його польову схожість, потрібна для поливу, внесення добрив. Тому, від якості води, у значній мірі, залежить урожайність. Вода, що використовується для пророщування рослин, повинна нести в собі комплекс поживних речовин та мати природну структуру.

Визначальна роль води у проростанні насіння це, перш за все, вплив на зародок майбутньої рослини. Важливе швидке проростання насіння. Однією з головних проблем у сільському господарстві є низька схожість насіння і отримання якісних проростків для отримання майбутніх рослин [2].

В цій кваліфікаційній роботідосліджувався вплив БАР МП *H. verbana* на енергію проростання *Pisum sativum* L. та *Triticum aestivum* L. Для цього при пророщуванні насіння використовували КВ, де утримувалися МП *H. verbana*. На сьогодні не існує труднощів щодо отримання КВ з-під МП, тому подальші дослідження використання КВ з-під МП мають велике значення.

Вода є однією з головних складових рослин. В середньому рослинна повинна містити 70-80% води від рослинної тканини. У сухому насінні її не більше 10%. Вода – це:

- середовище, в якому протікають процеси обміну речовин;
- субстрат і продукт біохімічних процесів;
- джерело кисню, що виділяється при фотосинтезі та водню, який використовується для відновлення вуглекислого газу;
- основа для встановлення тургорного тиску;
- основа цитоплазми і оболонок клітин рослин;
- основа конформації клітинного білку.

Ці функції забезпечують такі властивості води:

- молекула води є диполь;
- диполі можуть взаємодіяти один з одним, іонами та білковими молекулами;
- вода є гарним розчинником, тому добре поглинає та переносить речовини;

- терморегуляція рослин відбувається за рахунок випаровування води, яка має високу теплоємність і тому м’яко реагує на зміни температури навколишнього середовища.

Для проростання насіння необхідна якісна вода, яка має всі необхідні рослинні речовини. Рослини здатні поглинати з навколишнього середовища практично всі елементи. Але для нормальної життєдіяльності рослинам потрібні лише 19 поживних елементів. Серед них органогенними є вуглець (45% сухої маси тканин), кисень (45%), водень (6%), азот (1,5%). Вміст мінеральних елементів виражають у відсотках від маси сухої речовини [62].

Всі мінеральні елементи прийнято ділити на макроелементи та мікроелементи залежно від їх кількісного вмісту у рослині. Вміст макроелементів складає більше 0,01% від сухої маси. До макроелементів відносяться азот, фосфор, сірка, калій, кальцій і магній. Це залізо, марганець, мідь, цинк, бор, молібден, хлор, кобальт. Всі перелічені елементи потрібні рослині і не один із них не може бути замінений іншим. При концентрації більше 300 мг/л у поживному розчині вони можуть шкідливо впливати на рослину. Мікроелементи при концентрації 0,1-0,5 мг/л пригнічують зростання рослин. Потреба у елементах специфічна у різних рослин [62].

КВ, де утримувалися МП *H. verbana* містить калій і сірку. Вміст калію у рослинах у середньому 0,9%. 80% калію міститься у вакуолях і 1% – у мітохондріях. Калій підтримує гомеостаз клітини, збільшує здатність цитоплазми утримувати воду. Він необхідний для роботи продихового апарату. Також він активує понад 60 ферментів.

Сірка відіграє ключову роль у розвитку рослин, вона незамінний елемент живлення для рослин який виконує важливі функції:

1. Сірка необхідна для синтезу білків і амінокислот, що сприяє кращому засвоєнню азоту рослинами.

2. Бере участь у виробленні ферментів, які підвищують стійкість рослин до хвороб і шкідників.

3. Бере участь у синтезі хлорофілу, що необхідно для фотосинтезу і загального здоров’я рослин.

4. Вміст сірки позитивно впливає на вміст олії в олійних культурах, білка в бобових і глютену в зернових [62].

Також КВ з-під МП містить амінокислоти [37, 44], які беруть участь у фотосинтезі, покращують азотний обмін, допомагають рослинам переносити стреси, прискорюють зростання кореневої системи, підвищують стійкість до хвороб, збільшують енергію проростання.

1.5 Біотестування

Біотест – це процедура визначення токсичності навколишнього середовища з використанням тест-об’єктів, що вказують на небезпеку, незалежно від того, які речовини викликають зміни в життєдіяльності тест-об’єкта.

Біотест використовується як метод оцінки токсичності хімічних речовин, природних і сточних вод, грунтів, водного середовища і тощо.

Тестованим об’єктом є об’єкт, що дає інформацію про токсичність навколишнього середовища, він дозволяє швидко констатувати факт токсичності водного середовища, якщо це обумовлено присутністю речовини або комплексу речовин [63].

Тестований об’єкт з певним наближенням забезпечує кількісну оцінку рівня токсичності навколишнього середовища. Важливою умовою правильного біотесту є використання генетично однорідних лабораторних культур, вони проходять тести на чутливість, тому їх включають в спеціальні лабораторні умови, узгоджені стандартом, що забезпечують необхідну схожість і відтворюваність результатів дослідження, а також максимальну чутливість до шкідливих речовин.

Для характеристики реакції випробуваного на шкідливий вплив навколишнього середовища в біотесті використовується поняття токсичності [64]. В якості індикатору біотесту для тест рослин використовується енергія проростання насіння, довжина основного кореня тощо [63, 65].

Використання біотестування висуває кілька вимог, необхідних для отримання надійних результатів. До них відноситься відносна швидкість дослідження, отримання досить точних і відтворюваних результатів, наявність об'єктів, використовуваних в біотесті, з однорідними властивостями, а також діапазон похибку не більше 20% в порівнянні з іншими методами тестування. Суть методу біотесту полягає у визначенні впливу комплексу факторів навколишнього середовища на спеціально відібрані організми в стандартних умовах з реєстрацією різних показників цих систем. Методи біотестування мають багато переваг перед іншими методами дослідження навколишнього середовища:

- швидкість, доступність і простота проведення експериментів;
- відтворюваність і надійність результатів, отриманих з використанням статистичних методів обробки;
- економічна ефективність;
- об'єктивність отриманих даних.

Біотест може бути проведений на молекулярному, клітинному та біологічному рівнях. Один із варіантів достовірності отриманих результатів є проведення комплексного дослідження на основі різних тест-об'єктів. Дослідження проводяться протягом певного періоду часу, тривалість якого залежить від постановки цілей.

Методи біотестування можна класифікувати за наступними критеріями:

- по суб'єкту тестування;
- за тестовою системою;
- за тестовою реакцією;
- залежно від ступеня прояву тестової реакції;
- відповідно до критеріїв тестування;

- залежно від тривалості біотесту;

- залежно від засобів реалізації методу.

Тестований об’єкт являє собою чутливий біологічний елемент, здатний реагувати на зовнішні впливи.

Об’єктами тестування можуть бути клітини, тканини, одноклітинні та багатоклітинні організми одного або декількох видів.

Тест-система – це просторово обмежений набір чутливих біологічних елементів і середовища, в якому вони знаходяться. Останні можна розділити на кілька рівнів в залежності від тестованого об’єкта, який знаходиться в тест-системі [66, 67].

Тестова реакція – це одна з природних реакцій тест-системи або відповідь тестованого організму на вплив тестованих зовнішніх факторів. Біотести залежно від ступеня вираженості тестованих реакцій класифікуються наступним чином:

1) тест на гостру токсичність (загибель організму, або зміни поведінки протягом 5 днів);

2) тест на низьку токсичність (порушуються основні біологічні функції, погано ростуть, погано розмножуються, мають низьку життєздатність);

3) тест на нетоксичність (відсутність токсичного ефекту навіть в декількох поколіннях).

Критерій тестування – це показник, за допомогою якого оцінюються зміни в стані тест-системи. В якості критеріїв тестування можуть бути використані наступні ознаки: виживаність, фертильність, рухливість, загибель клітин, середня швидкість росту, швидкість проростання, довжина первинного кореня, морфофізіологічна енергія, зміни параметрів (для вищих рослин) [68, 69].

Залежно від тривалості біологічного аналізу тести діляться на:

1) експрес-метод (визначення гострих токсичних ефектів);
2) довгостроковий метод (визначення хронічних токсичних ефектів);
3) шляхом реалізації методу;

4) за допомогою приладів (мікроскопів, люмінометрів, флюориметрів, електрокардіографів, фотоелектрометрів, спектрометрів) [69].

1.5.1 Методи біоіндикації якості води

Для визначення токсичності води використовують біологічні методи [70]. Біотестування води вивчено багатьма вченими [71]. Для визначення рівня токсичності води необхідно правильно вибрати методику біотестування. При виборі методики необхідно врахувати чутливість організмів, використовуваних як тест-об'єкти, до присутності у воді токсичних хімічних речовин. Питання про чутливість організмів до токсичних речовин, розчинених у воді розглянуть в багатьох роботах [72, 73].

Чутливість відображає здатність організму реагувати на вплив хімічних речовин. Різні організми реагують на шкідливі впливи неоднаково. Тому, чутливість використовується для порівняння реактивності різних організмів, функції процесів на шкідливі впливи. У більш чутливого організму, який використовується як тест-культура, порушення процесів метаболізму, або ростових процесів, виникають раніше і за менших концентрацій токсичних речовин. При дослідженні впливу хімічних речовин на тест-організм його реакцію оцінюють за одним або кількома показниками.

Загальна чутливість організму встановлюється на основі більш чутливого з цих показників [72]. Використання поняття чутливості не обмежується фізіологічно-біохімічними процесами. В дослідженнях враховують і інші функції життєдіяльності організмів. У якості кількісного показника чутливості використовують мінімальну концентрацію токсичної речовини, яка призводить до зміни будь-якої функції організму протягом визначеного часу, або мінімальний час, необхідний для прояву змін при

даному впливі, або величину відповідної реакції при даному впливі та встановленому терміні досліду.

Одиниці вимірювання чутливості можуть бути виражені у відсотках, одиницях концентрації речовини або одиницях часу. Якщо чутливість виражена через концентрацію або час, визначена величина ефекту, яка повинна виникнути внаслідок впливу, фіксується заздалегідь. Часто використовується мінімальне статистично значуще відхилення відповідного показника від контрольної групи [72].

З урахуванням обмежуючих умов, поняття чутливості може бути визначене як найменша величина токсичної дії (концентрація або тривалість експерименту), що призводить до зміни будь-якого біологічного показника на величину, яка перевищує задані порогові значення протягом встановленого періоду. Метод біоіндикації якості води дає можливість визначити сумісну біологічну активність хімічних речовин водного середовища їх дію на організм (тест-культури). Дослідження, які виконані методами індикації досить об’єктивні, оскільки вони враховують вплив хімічних речовин, які неможливо визначити за допомогою фізико-хімічних методів [72]. Для біоіндикації впливу хімічних речовин, розчинених у воді, на рослини потрібно вибрати той чи інший вид рослин. Для цього існує багато рекомендацій в численних наукових публікаціях [63, 64, 65, 70, 73-77]. У методичних рекомендаціях щодо визначення токсичності різних субстратів показана ефективність застосування цибулі ріпчастої (*Allium cepa* L.), як ефективної тест-культури [77].

При проведенні досліджень забруднення грунтів методами біотестування було встановлено, що найкращими індикаторами є рослини, які мають термін схожості 4 доби (ячмінь, кукурудза і салат). Схожість інших культур триває 6-11 діб [75]. Капуста, редис, огірок, крес-салат мають дуже тонке та ніжне коріння. Пшениця та ячмінь утворюють багато бічних коренів. Водночас пшениця характеризується високою швидкістю проростання, що дозволяє призвести дослід у короткі терміни. Таким чином, вибір тест рослини

є важливою частиною дослідження. Біотестування якості середовища і субстратів з використанням тест-рослин є однією зі складових комплексних моніторингових дослідженнях, які можуть включати різні методи (наприклад, мікробіологічний моніторинг) [76, 77, 78].

1.5.2 Фітоіндикація

Біоіндикація – це використання біологічних об’єктів для оцінки впливу компонентів, які не так легко спостерігати (наприклад, забруднювачів). Біологічні об’єкти рослинного або тваринного походження називаються біоіндикаторами, а фактори впливу – індикатами.

Фітоіндикація – це розділ дисципліни біоіндикація. Вона розробляється для оцінки чинників довкілля з використанням рослин [79, 80].

Рослини, які використовують для оцінки якості навколишнього середовища називаються фітоіндикаторами [80].

Висока ефективність використання фітоіндикації обумовлена рядом переваг в порівнянні з тестами на інших організмах. Цей тест відносно недорогий, простий і недовготривалий, має високу чутливість. Тест-рослини активно використовуються для визначення токсичності навколишнього середовища, або впливу хімічних речовин водного середовища Перспективною областю тестування рослин є використання в якості тест-культур пророслого насіння. При цьому спостерігається мінімальна стійкість до несприятливих факторів і мінімальна чутливість до їх впливу [77].

Тому рослини на даному етапі життєвого циклу є найбільш привабливими об’єктами біотесту, а різні біологічні параметри є ефективними показниками впливу навколишнього середовища. Висока чутливість рослин визначається наявністю в них високочутливого до будь-яких впливів фотосинтетичного апарату, якого немає у консументів і редуцентів. Тому

автотрофний білок виступає основою структури і функціонування екосистеми та є більш чутливими індикатором [80].

Для виявлення рівня зв’язку біоіндикаторів з індикаторами (об’єктами індикації) використовують такий показник як достовірність.

Фітотестування – це аналіз забруднення води, повітря, ґрунту певними речовинами. Біотести являють собою рослини, насіння, проростки, а також органи рослин (висічки листків, корені). Рослинні тест-системи є досить зручними та надійними у виявленні рівня токсичності певних речовин. Фітотоксичність – здатність води, грунту, повітря здійснювати гальмування росту рослинних організмів [80]. При цьому пригнічуються фізіологічні процеси, знижується продуктивність і якість врожаю. Прикладом фітотестування можуть служити дослідження, в яких фітоіндикаторами були насіння гороху овочевого і насіння ярої пшениці.

2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Об’єкти та матеріали дослідження

Об’єктами дослідження були БАР культуральної води, де утримувалася МП виду *Hirudo verbana* (Carena, 1820) та тест-культури з класу однодольних та дводольних рослин – насіння пшениці м’якої (звичайної) *Triticum aestivum* L. і гороху посівного *Pisum sativum* L.

Triticum aestivum L. або пшениця м’яка / ярова (основний вид пшениці), є однорічною злаковою рослиною, яка відома своїми високовражайними сортами та широким використанням у світовому харчовому виробництві. Вона утворює добре розвинену, розгалужену кореневу систему. Із зародка виростає 4-6 однаково розвинутих зародкових коренів, утворюючи первинну кореневу систему. Основна маса кореневої системи розміщується в орному шарі землі, але окремі корені проростають на глибину 1,5-2 м і більше. Розвиток кореневої системи залежить від біологічних особливостей сорту. При зниженні температури відносно краще ростуть корені, при підвищенні – надземні органи. Азотні добрива сприяють кращому росту надземної маси, а фосфорні – коренів рослин. Також поліпшують розвиток коренів калійні добрива. Ріст зачаткового стебла починається з часу проростання зерна. У пшениці воно має назву – соломина, яка складається з 4-7 міжвузлів, розділених стебловими вузлами. Стебло росте у висоту за рахунок поділу клітин біля вузлів. Одночасно стебло росте і верхівкою всередині листової трубки. Після закінчення цвітіння ріст стебла припиняється. Листок пшениці складається з листкової пластинки та листкової піхви, що охоплює стебло. Першими утворюються прикореневі листки, які формуються з підземних вузлів. Потім з надземних вузлів ростуть стеблові листки, які укріплюють міцність стебла і є сховищем поживних речовин [81]. Першими цвітуть квітки середньої частини колоса. Квітки, що цвітуть першими – формують найкрупніше зерно. Пшениця самозапильна рослина. Зерно овальне, яйцеподібне. Під оболонками в нижній

частині зерна розміщується зародок. Зародок має щиток, що є сім'ядолею зернівки. Зернівка – це плід пшениці. Найбільшу частину зернівки займає ендосперм. Сім'ядоля зернівки потрібна для вбирання поживних речовин з ендосперму. Зовнішній (алейроновий) шар клітин ендосперму багатий на азотні сполуки. Білок цього шару не еластичний і непружний. Під алейроновим шаром міститься основна (борошниста) частина ендосперму. Вона складається з клітин, наповнених крохмаленими зернами, між якими містяться білкові речовини, переважно у вигляді клейковини [81, 82].

Pisum sativum L. – овочевий горох посівний сорту Альфа. Ранньостигла, дводольна, однорічна, холодостійка рослина з короткими міжвузлями і добре розвиненою кореневою системою. Стручок із загостреним кінчиком, квіти – білі [83]. Висота рослини – 50-60 см. Щоб підтримувати стебло від листя відходять гіллясті вусики, що чіпляються за інші рослини. Для гороху характерне утворення на коренях невеликих наростів – бульбашок. Такі утворення є наслідком діяльності специфічних бульбочкових бактерій. Бактерії потрапляють всередину кореня і розмножуються там, що викликає збільшення кореня у формі новоутворень. Бульбочкові бактерії переробляють атмосферний азот, а коли гинуть, грунт насичується азотними речовинами, як добривами. У сільському господарстві поля, де вирощували горох, пізніше засівають хлібними злаками, які завдяки отриманню азотних добрив дають хороший врожай [83, 84]. До складу насіння входять насичені жирні кислоти, харчові волокна, вуглеводи, мінеральні речовини та вітаміни. До складу цієї рослини входять магній, кальцій, фосфор, калій, сірка, хлор. Горох містить мікроелементи: цинк, залізо, йод, марганець, мідь, хром, селен, молібден, фтор, нікель та інші. Значний вміст білка дозволяє гороху замінювати в харчуванні м'ясні продукти. Горох володіє великою кількістю амінокислот, крохмалю і рослинного жиру, корисних ферментів і клітковини. Насіння – злегка стислі горошини. При набуханні насіння поглинає до 120% води від своєї маси. Воліє до вологих, але не перезволожених грунтів. Листочки від 2

до 7 см. Продихи розташовані на верхній і нижній сторонах листкової пластинки.

Культуральну воду для дослідження готували з води, отриманої при культивуванні 35-40 товарних МП *Hirudo verbana* середнього віку (7-8 місяців) протягом трьох діб, які до цього голодували не менше чотирьох місяців. МП вирощували на базі навчально-науково-дослідної лабораторії клітинної та організменної біотехнології ЗНУ згідно з ТУУ05.0-021.25.243-002:2009 «П'явка медична» (санітарно-епідеміологічний висновок МОЗ України №05.03.02-06/49982, від 12.08.2009р.) [85]. МП в умовах лабораторії утримують в трьохлітрових ємностях із дехлорованою відстояною водогінною водою, об'ємом 2л (МП матки по 4-8 осіб в бутлі, МП голодні – по 20-40 в бутлі) при температурі оточуючого середовища +22-24^{0}С [18].

2.2 Методи дослідження

2.2.1 Оцінка фітотоксичності води за допомогою «ростового тесту»

Для оцінки фітотоксичності КВ, де утримувалися МП виду *Hirudo verbana* використано метод біоіндикації довкілля за допомогою «ростового тесту» [65].

Суть тесту полягає в обліку змін показників схожості індикаторних культур, вирощених на пробах води. Цей метод дозволяє оцінити як інгібуючий, так і стимулюючий вплив БАР КВ з-під МП на рослини [65, 86].

Для досліду взяли дві рослинні тест-системи: пшениця ярова (*Triticum aestivum* L.) та горох овочевий сорту Альфа (*Pisum sativum* L.). Ці тест-рослини відрізняються швидким проростанням насіння та підвищеною чутливістю до полютантів. Ми обрали дрібне насіння з обмеженим запасом поживних речовин, які частіше використовують для оцінки токсичності [75].

Для дослідження токсичності проб КВ з-під МП *Hirudo verbana* з використанням цього методу пробу води в кількості 250 мл наливали в лабораторні склянки. Насіння індикаторних культур (по 20 насінин *Pisum sativum L.* та по 20 насінин *Triticum aestivum* L.) пророщували на спеціальних плаваючих кільцях з пінопласту, обтягнутих марлею. Протягом перших кількох днів склянки з досліджуваним насінням закривали склом. Два рази на день скло знімали на 10-15 хвилин для провітрювання. На четвертий день склянки з насінням поставили на підвіконня, де підтримували постійну освітленість протягом 14 годин (з 6:00 до 20:00). Повторювали дослід три рази. Контроль – відстояна водогінна вода.

Впродовж двох тижнів проводили дослід, фіксуючи наступні показники:

- час появи сходів і їхню кількість (щодобово);
- довжину надземної частини проростків та їх приріст (кожну добу);
- загальну кількість пророслих насінин (на кінець експерименту);
- довжину проростків та кореневої частини (на кінець експерименту).

Під час експерименту звертали увагу на морфологічні особливості рослин, такі як ранні пожовтіння, особливості розвитку кореневої системи.

Після закінчення експерименту рослини виймали з ємностей та вимірювали довжину проростків та корінців.

Для оцінки ступеня токсичності БАР КВ, де утримувалася МП *Hirudo verbana,* обрані: схожість та енергія проростання насіння (%), морфологічні показники тест-рослини.

Енергію проростання та схожість насіння вираховували за формулами 2.1 та 2.2 [9]:

Енергія проростання:

$$\mathrm{E} = \frac{n1}{\mathrm{N}} \times 100\% \qquad (2.1)$$

Схожість:

$$C = \frac{n2}{N} \times 100\%, \quad (2.2)$$

де, Е – енергія проростання насіння, %;

С – схожість насіння, %;

n_1 – загальна кількість насіння, пророслого на 3-й день після висіву, шт.;

n_2 – загальна кількість насіння, пророслого на 7-й день після висіву, шт.

N – загальна кількість висіяного насіння, шт.

Після проведення вимірювання для кожного з досліджуваних варіантів обчислювали середню висоту проростків і довжину корінців.

Фітотоксичний ефект визначали у відсотках за двома параметрами (висота проростків і довжина корінців) за формулою:

$$ФЕ = \frac{M0 - M2}{M0} \times 100\%, \quad (2.3)$$

де: M_0 – значення біопараметра (висота проростків, довжина корінців);

M_x – значення аналогічного біопараметра з досліджуваним субстратом.

Отримані значення фітотоксичності оцінювали за шкалою рівня токсичності.

Таблиця 2.1 – Рівень токсичності

Рівні пригнічення ростових процесів (фітотоксичний ефект), %	Рівень токсичності
0 – 20,0	Відсутність або слабкий рівень
20,1 – 40,0	Середній рівень
40,1 – 60,0	Вище середнього рівня
60,1 – 80,0	Високий рівень
80,1 – 100,0	Максимальний рівень

Шляхом визначення біоіндикаційних досліджень можна виявити рівень впливу БАР КВ, де утримувалися МП виду *Hirudo verbana*.

2.2.2 Методи статистичної обробки даних

Після проведення вимірювань для кожного з досліджуваних варіантів обчислюють середнє значення.

Середня арифметична:

$$\bar{x} = \frac{xi}{n}, \tag{2.4}$$

де $\bar{x}$ – середня арифметична;

n – число повторів досліду [63].

Помилка середнього арифметичного обчислюється за формулою:

$$m = \sqrt{\frac{G^2}{N}} \tag{2.5}$$

N – кількість результатів;

G^2 – дисперсія, яку визначають за виразом [63]:

$$G^2 = \frac{\sum(xi - \bar{x})^2}{N} \tag{2.6}$$

Достовірність різниці середніх арифметичних «t» розраховуються за критерієм Ст’юдента:

$$t = \frac{\bar{x}_1 - x_2}{\sqrt{m_1^2 + m_1^2}} \quad (2.7)$$

де $\bar{x}$ – середнє арифметичне значення показника в контрольному досліді;

$\bar{x}_2$ – середнє арифметичне значення показника у досліджуваному варіанті;

m_1 – помилка середнього арифметичного в контрольному досліді;

m_2 – помилка середнього арифметичного в досліджуваному варіанті [63].

Якщо фактично встановлені величини t більше або дорівнює критичному (стандартному) значенню t_{st} роблять висновок про існування статистично достовірної різниці між середніми арифметичними у досліджуваному та контрольному варіанті. Якщо фактична величина t менша за t_{st}, різницю між середніми вважають статистично недостовірною. Вимагання ймовірності беспомилкових прогнозів відповідають ймовірності 0,95 (рівень значимості $p < 0,01$), при високих вимогах надійності – ймовірність – 0,999 (рівень значимості $p < 0,001$) [87].

t_{st} брали з таблиці критеріїв Ст'юдента за рівнем значимості $p \leq 0,05$ і за кількістю ступенів свободи [88].

Якщо фактична величина t менша за t_{st}, різницю між середніми вважають статистично недостовірною. Відсутність статистично достовірної різниці між середніми значеннями біопараметра у контрольному та досліджуваному варіанті свідчить про відсутність значних змін ростових процесів у біоіндикаторів, в порівнянні з контрольним варіантом. Тобто вода у досліджуваному варіанті майже такої якості, як і в контрольному досліді та не має токсичних властивостей. Статистично достовірна різниця між варіантом та контрольним дослідом вказує на те, що досліджуваний зразок має фітотоксичні властивості.

3 ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

3.1 Енергія проростання та схожість насіння пшениці ярої та гороху овочевого під дією культуральної води з-під *Hirudo verbana*

Для оцінки можливої токсичності БАР КВ, де утримувалися МП виду *Hirudo verbana* (Carena, 1820), критерієм є оцінка таких параметрів, як енергія проростання насіння тест-культур та морфометричні показники ростових процесів індикаторних рослин. Зазначені параметри використовуються для визначення впливу БАР КВ з-під МП на фізіологічні процеси рослин та їх розвиток, дозволяючи зробити припущення про можливу фітотоксичність КВ.

Енергія проростання – показник, який характеризує швидкість проростання насіння. При порушенні технології вирощування насіння цей показник знижується значно інтенсивніше, ніж схожість. Численними дослідженнями встановлено, що насіння з високою енергією проростання дає ранні, дружні сходи, ніж насіння з однаковою схожістю, але з низькою енергію проростання. Висока енергія проростання характеризує здатність насіння швидко проростати. Швидке проростання насіння свідчить про міцність і стійкість проростків до несприятливих умов навколишнього середовища [89].

Середні показники енергії проростання та схожість насіння гороху овочевого сорту Альфа та пшениці ярої в контролі та під дією БАР КВ з-під МП представлені в таблиці 3.1, 3.2.

Таблиця 3.1 – Енергія проростання та схожість насіння гороху овочевого сорту Альфа (*Pisum sativum* L.) під дією культуральної води

Показник,%	Контроль (n=3), $\bar{x}$±m	КВ з-під МП *Hirudo verbana* (n=3), $\bar{x}$±m
Енергія проростання	35,0±1,40	80,0±0,00*
Схожість	94,0±0,33	100,0±0,00*

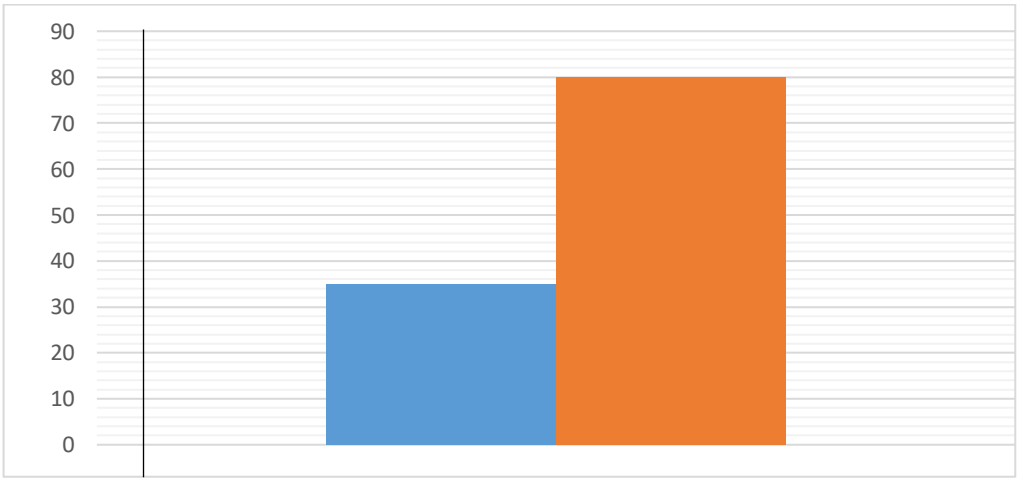
Примітка. * - відмінності від контролю суттєві при $p \leq 0,05$.

Таблиця 3.2 – Енергія проростання та схожість насіння пшениці ярої (*Triticum aestivum* L.) під дією культуральної води

Показник, %	Контроль (n=3), x̄±m	КВ з-під МП *Hirudo verbana* (n=3), x̄±m
Енергія проростання	44,0±0,80	80,0±0,47*
Схожість	93,0±0,82	100,0±0,00*

Примітка. * - відмінності від контролю суттєві при p≤0,05.

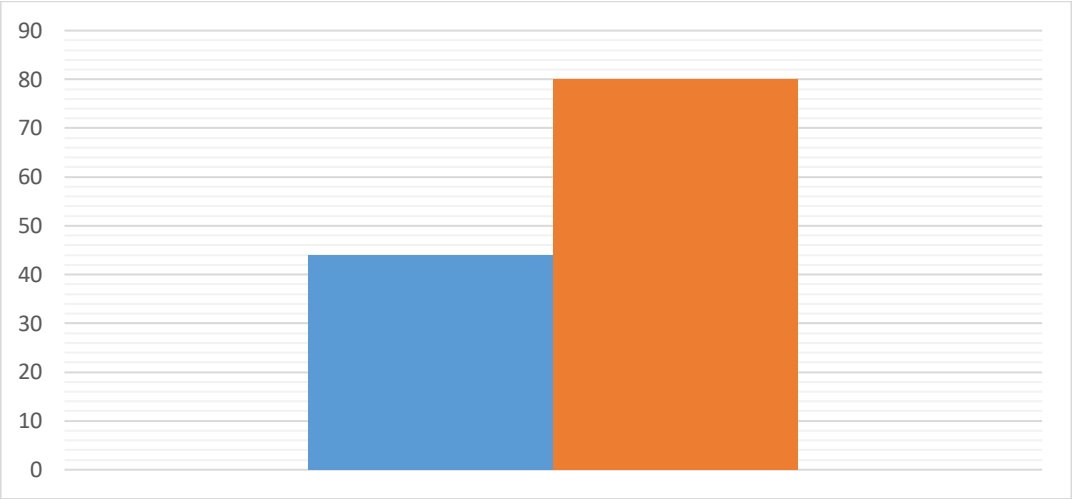
У результаті проведення дослідження впливу БАР КВ, оброблених МП *Hirudo verbana* на енергію проростання пшениці і гороха виявлено схожість у реакціях тест-культур. Нами не виявлено гальмування проростання насіння *Pisum sativum* L. та *Triticum aestivum* L., що вирощувалися на КВ з-під МП. Енергія проростання насіння гороху овочевого сорту Альфа (*Pisum sativum* L.) і пшениці ярої (*Triticum aestivum* L.) під дією культуральної води однакові та вищі контролю приблизно вдвічі. Так, енергія проростання *Pisum sativum* L. за зволоження водогінною відстояною водою склала 35,0±1,40%, а *Triticum aestivum* L. – 44,0±0,80%. За використання КВ енергія проростання насіння *Pisum sativum* L. і *Triticum aestivum* L. зростає у 2 рази і становить 80% (p≤0,05).



Примітки. – контроль (35%).

– КВ з-під МП *H. verbana* (80%).

Рисунок 3.1 – Енергія проростання (%) насіння *Pisum sativum* L.



Примітки. ■ – контроль (44%); ■ – КВ з-під МП *H. verbana* (80%).

Рисунок 3.2 – Енергія проростання (%) насіння *Triticum aestivum* L.

Лабораторна схожість насіння *Pisum sativum* L. і *Triticum aestivum* L. за зволоження водогінною відстояною водою становить 94,0±0,33% і 93,0±0,82% відповідно, а за зволоження КВ з-під МП *H.verbana* зростає на 6% і 7% відповідно до рівня 100% ($p \leq 0,05$).

Також спостерігається вплив КВ на тривалість проростання насіння *Triticum aestivum* L. та *Pisum sativum* L. Зокрема, початок проростання насіння тест-рослин спостерігали на другу добу після закладання на пророщування незалежно від варіанту. Сім'ядольні листки на обох варіантах тест-культур *Pisum sativum* L. і *Triticum aestivum* L. також настали одночасно – на третю добу. В той же час перший справжній листок у гороху овочевого *Pisum sativum* L. за зволоженням КВ з'явився на 1 добу раніше, ніж на варіанті з використанням водогінної води. Також спостерігається вплив передпосівного оброблення насіння досліджуваних тест-культур КВ з-під МП *H. verbana* на висоту її проростків, зокрема, на третю добу пророщування насіння довжина проростків рослин *Pisum sativum* L. за використання КВ склало 1 см, пшениці *Triticum aestivum* L. – 0,8 см, що на 0,4 і 0,3 см більше, ніж довжина проростків рослин за використанням водогінної води.

Як видно, з рисунків 3.1, 3.2 насіння *Pisum sativum* L. і *Triticum aestivum* L. мають однакову енергію проростання, яка приблизно вдвічі більше за контроль (80,0%). Проте, слід зазначити, що схожість насіння гороху та пшениці, як у контролі, так і в досліді, була досить високою (контроль – 93%, 94% відповідно; дослід – 100%), хоча схожість насіння пророщених на КВ з-під МП *Hirudo verbana* все ж таки вища.

Очевидно, що БАР КВ, де утримувалися МП *Hirudo verbana* позитивно впливають на енергію проростання досліджуваного насіння.

3.2 Морфометричні показники тест-культур рослин під дією культуральної води з-під *Hirudo verbana* у ростовому тесті

Фітотоксичність КВ, де утримувалися МП *Hirudo verbana* визначали за морфометричними показниками (висота паростків, довжина коренів) тест-культур *Pisum sativum* L. і *Triticum aestivum* L (таблиця 3.3, 3.4).

Значення висоти паростків гороху овочевого сорту Альфа (*Pisum sativum* L.) статично достовірно ($p \leq 0,05$) відрізняються від контрольного досліду, $t=4,91$, що більше $t_{st}=2,02$. Це вказує на те, що токсичність води відсутня, порівняно з контролем. Тобто, КВ, де утримувалися МП *H. verbana,* не має токсичних властивостей і пригнічувальний вплив цієї води на рослини відсутній, навпаки показники висоти паростків вищі за контроль.

Значення довжини кореня *Pisum sativum* L. статично достовірно ($p \leq 0,05$) відрізняються від контрольного досліду $t = 7,45$, що вище $t_{st} = 2,02$. Тобто, висота рослини *Pisum sativum* L. достовірно відрізняється до контрольного варіанту і КВ з-під МП *Hirudo verbana* не має токсичних властивостей.

Як свідчать дані таблиці 3.3, середня висота рослини та довжина коренів *Pisum sativum* L. відмічались високими показниками на відміну від контролю, що свідчить про те, що є присутність стимулюючого ефекту КВ, де

утримувалися МП *Hirudo verbana* на ріст тест-культури. Ростові процеси тест-культури *Pisum sativum* L. за вирощування на досліджуваній воді стимулювалися. Середні показники висоти рослин при дії КВ перевищували в 1,54 рази показники контролю. Середні показники довжини корінців були вищими в 3,74 рази за контроль.

Таблиця 3.3 – Морфометричні показники тест-культури *Pisum sativum* L. за ростовим тестом

Варіант	Показник	Середнє, $\bar{x}\pm m$	t-критерій
Контроль, (К1, відстояна водогінна вода)	Висота паростків (n=20), см	9,6±0,85	-
	Довжина коренів (n=20), см	2,27±0,37	-
Проба 1 (П1, КВ з-під МП *H. verbana*)	Висота паростків (n=20), см	14,80±0,63*	4,91
	Довжина коренів (n=20), см	8,50±0,75*	7,45

Примітка. * - відмінності від контролю суттєві при $p\leq0,05$.

Відповідно до таблиці 3.4 насіння тест-культури *Triticum aestivum* L. під дією КВ відрізнялися більш високими показниками у порівнянні з насінням тест-культури у контрольному варіанті та становили: висота рослини 15,7±0,91 см ($p\leq0,05$), довжина корінців становить 19,3±0,59 см ($p>0,05$). Значення t-критерію для довжини корінців у пробі з КВ з-під МП *H.verbana* (Р2) 1,73 (при $t_{st}=2,02$) свідчить, що отримані результати недостовірно відрізнялися від контрольного варіанту. Це означає, що культуральна вода на тест-культуру *Triticum aestivum* L. не проявляє пригнічуючого впливу.

Таблиця 3.4 – Морфометричні показники тест-культури *Triticum aestivum* L. за ростовим тестом

Варіант	Показник	Середнє, x̄±m	t-критерій
Контроль (К2, відстояна водогінна вода)	Висота паростків (n=20), см	9,6±0,85	-
	Довжина коренів (n=20), см	17,5±0,86	-
Проба 1 (П2, КВ з-під МП *Hirudo verbana*)	Висота паростків (n=20), см	15,7±0,91*	4,89
	Довжина коренів (n=20), см	19,3±0,59	1,73

Примітка. * - відмінності від контролю суттєві при p≤0,05..

Середні показники висоти рослин *Triticum aestivum* L. перевищували показники в контролі в 1,63 рази (p≤0,05).

З огляду на отримані результати таблиць 3.2, 3.3 та 3.4 можна сказати, що насіння тест-культури *Pisum sativum* L. відрізнялися більш високими показниками у порівнянні з насінням тест-культури *Triticum aestivum* L. Різниця між середніми морфологічними показниками висоти паростків та довжини коренів тест-культури *Pisum sativum* L. в пробі (Р1) і в контролі (К1) набагато вище (1,54 та 3,74 рази), ніж тест-культури *Triticum aestivum* L. (1,63 та 1,103 рази) в пробі (Р2) і в контролі (К2). Це свідчить про більш високу чутливість тест-культури *Pisum sativum* L. до БАР КВ, де утримувалися МП *H. verbana*, порівняно з тест-культурою *Triticum aestivum* L.

Отже, КВ з-під МП *H.verbana,* має фітостимулюючий ефект на тест-культури *Triticum aestivum* L. та *Pisum sativum* L. Очевидно, що передпосівна обробка насіння цих рослин буде корисною і збільшить як схожість проростання насіння цих рослин так і їх морфологічні показники.

3.3 Фітотоксичний ефект культуральної води з-під *Hirudo verbana* на тест-культури рослин

Фітотоксичність – це властивість хімічних речовин надавати токсичний (отруйний) вплив на рослину. Наслідками фітотоксичності при пророщуванні насіння може бути зниження їх схожості та енергії проростання, зменшення накопичення сухої речовини, раннє пожовтіння сходів. При пророщуванні насіння велике значення має якість води, на якій пророщується насіння. Вплив хімічних речовин, які знаходяться у воді, може призвести до зниження кількості пророщеного насіння, що ускладнює вирощування культур. Відомо, що у випадку фітотоксичності на горох овочевий Альфа, цей ефект може виявлятися у формі різноманітних змін у зовнішньому вигляді рослин, зменшення енергії проростання, схожості насіння, морфометричних показників досліджуваних тест-культур тощо. Деякі рослини можуть бути більш чутливими до певних хімічних речовин порівняно з іншими, що може призвести до більш виражених змін.

В нашому дослідженні ми визначали фітотоксичний вплив БАР КВ, де утримувалися МП *H. verbana*, таблиця 3.5, 3.6.

Таблиця 3.5 – Фітотоксичний ефект КВ з-під МП *H. verbana* з використанням тест-культури *Pisum sativum* L.

Показник	ФЕ, % (П1)
ФЕ (висота рослини)	-54,16
ФЕ (за довжиною коренів)	-274,44
ФЕ (середнє)	-164,3

Проведений аналіз результатів ростового тесту показав відсутність фітотоксичності культуральної води, де утримувалися МП *H. verbana* і

наявність її стимулювального ефекту відносно тест-культури *Pisum sativum* L. (ФЕ $_{\text{висота рослини}}$ = -54,16%; ФЕ $_{\text{довжина коренів}}$ = - 274,44%).

Таблиця 3.6 – Фітотоксичний ефект КВ з-під МП *H.verbana* з використанням тест-культури *Triticum aestivum* L.

Показник	ФЕ, % (П2)
ФЕ (висота рослини)	-63,54
ФЕ (за довжиною коренів)	-10,28
ФЕ (середнє)	-36,9

Визначення фітотоксичності КВ з-під МП *H.verbana* показало також стимулювальний ефект ростової активності тест-культури *Triticum aestivum* L. (таблиця 3.6).

В результаті дослідження фітотоксичного впливу КВ, де утримувалися МП *H. verbana,* встановлено, що середні показники фітотоксичного ефекту (ФЕ сер.), розрахованого за двома параметрами (висота рослин і довжина корінців), свідчать про стимулювальну дію БАР КВ, де утримувалися *H. verbana.* Для тест-культури *Pisum sativum* L. ФЕ сер.= -164,3%, а для тест-культури *Triticum aestivum* L. – ФЕ сер.= -36,9%.

Наше дослідження показало, що *Pisum sativum* L., як тест-культура, виявилася досить чутливим біологічним індикатором фітотоксичності води. Це дозволяє використовувати її насіння в якості тест-культури для оцінки токсичності води.

У цілому, можна зробити висновок, що БАР КВ з-під МП *H. verbana* не мають фітотоксичних властивостей і КВ може бути використана для передпосівної обробки насіння. Отримані результати можуть бути використані для стимуляції проростання насіння і для подальшого дослідження впливу БАР КВ з-під МП *H. verbana* для підвищення врожайності.

4 ОХОРОНА ПРАЦІ

4.1 Поняття про охорону праці

Правовою основою законодавства щодо охорони праці є Конституція України та Закони України. Відповідно до Конституції України всі її громадяни мають право на охорону здоров'я та праці та право вимагати їх дотримання. Основним законом правової основи охорони праці є Закон України «Про охорону праці».

Охорона праці – це система правових, соціально-економічних, організаційно-технічних, санітарно-гігієнічних і лікувально-профілактичних заходів та засобів, спрямованих на збереження життя, здоров'я і працездатності людини у процесі трудової діяльності. Мета охорони праці – забезпечення здоров'я та безпечних умов праці. Робітникам було надано право відмовитися від роботи у випадку існування ситуації, що загрожує їх життю і здоров'ю. Чинність правових норм забезпечується нормативно-правовими актами щодо охорони праці [90].

4.2 Охорона праці у біотехнологічній лабораторії

Експериментальну частину роботи ми виконували на базі навчально-науково-дослідної лабораторії клітинної та організменної біотехнології науково-дослідної частини Запорізького національного університету. Лабораторія оснащена сучасним устаткуванням і має різні відділи, відокремлені один від одного: підготовчий, стерилізаційний з сухоповітряними шафами, центрифугами, біотехнології безхребетних, науковий відділ із комп'ютером, холодильником, морозильною камерою,

культури клітин, люмінесцентний, тимчасового утримання лабораторних тварин тощо.

При виконанні експериментальної частини кваліфікаційної роботи на тему «Вплив біологічно активних речовин *Hirudo verbana* на культури рослин у ростовому тесті» я могла зіткнутися із деякими небезпечними чинниками. При виконанні робіт у лабораторії на нас могли впливати небезпечні та шкідливі виробничі фактори:

- біологічні (мікроорганізми – бактерії), діагностичні препарати;
- хімічні (реактиви, дезінфекційні засоби і інші речовини);
- механічні (виробниче обладнання, лабораторне скло, центрифуга, горсті краї та ін.);
- фізичні (електричний струм, недостатня освітленість, відхилення вологості і температури робочої зони від встановлених норм, підвищена (знижена) рухомість повітря, підвищений вміст шкідливих речовин у повітрі робочої зони, підвищений шум, гаряча вода та пара – пожежонебезпека.

Ми проводили дослідження, які включали у себе роботу з тест-рослинами та медичною п’явкою.

Техніка безпеки поряд із виробничою санітарією є частиною охорони праці. Під технікою безпеки розуміють сукупність технічних засобів і прийомів виконання операцій, що зводить до мінімуму ризик на роботі. Необережність у роботі з хімікатами і приладами, неуважність і неправильне проведення роботи можуть мати важкі наслідки. Аби уникнути небезпечних випадків і виробничих травм в ході експериментів, перед початком роботи науковим керівником зі мною був проведений інструктаж з охорони праці.

Проведені інструктажі про роботу з електричними приладами та інструктаж з пожежної безпеки. Після інструктажу була проведена усна перевірка набутих мною знань і умінь щодо безпечної роботи у лабораторії.

Для підтримки санітарно-гігієнічних заходів у лабораторії (параметри вологості, температури та освітленості) при проведенні експерименту керувались вимогами ДСН 3.3.6.04299 [91].

Робота у лабораторіях повинна забезпечуватись відповідно до вимог безпеки при виконанні навчальних та науково-дослідних робіт СТ ВНЗ 20.5-0:2013 та інших діючих нормативних актів [92].

Безпечна робота дослідника має забезпечуватись відповідністю санітарно-гігієнічному режиму лабораторії встановленим нормам. У робочій зоні лабораторії повинні дотримуватися визначені параметри: освітлення, температури, вологості, швидкості переміщення повітря згідно вимог до норм мікроклімату виробничих приміщень [93].

Приміщення лабораторії має бути оснащене приточно-витяжною вентиляцією [94]. Бажано відкривати вікна в лабораторії задля постійного руху повітря, яке повинно відповідати ДСТУ 1201005-88 [95], щоб у випадку витоку отруйних та неприємно пахнучих речовин вивітрити їх припливно-витяжною вентиляцією.

У лабораторії повинно бути природне і штучне освітлення за допомогою ламп накалювання або люмінесцентних ламп, яке відповідає вимогам ДБНВ.2.5-28:2018 «Природне і штучне освітлення» [96]. Освітлення у лабораторії під час дослідницьких робіт повинно бути не менше 750 Лк, при цьому не важливо якої природи освітлення (природне або штучне) [97]. Основним джерелом освітленості в лабораторії є лампи розжарювання і люмінесцентні лампи. Штучне освітлення у лабораторії використовують через дефіцит природного сонячного світла. Усі необхідні для кваліфікаційної роботи дослідження проводились у халаті. Задля безпеки при роботі з біологічним матеріалом використовувались одноразові гумові рукавиці [98].

Під час виконання завдань кваліфікаційної роботи дотримувались чистоти на робочому місці. Безпосередньо біля входу в лабораторію мають бути умивальники з підведеною холодною та гарячою водою. Тут же розміщують дозатори з миючими засобами та дезсасобами, електросушарки та тримачі з одноразовими рушниками. Крани повинні рухатися за допомогою ліктя.

Поверхні стелі та підлоги в лабораторії повинні бути водостійкими для можливості їх дезинфекції [94].

Приміщення лабораторії має опалюватись централізовано згідно СніП 2.04.05-91. Санітарні норми дозволяють установку в лабораторії кондиціонера.

При роботі з хімічними реактивами обов'язковий спецодяг (халат з бавовняної тканини) згідно ст. 163 кодексу законів про працю України і НПАОП 73.1-1.11-12 [99]. У тканині не повинно бути добавок синтетичних волокон, тому що у випадку займання плавлені частини халату важко видалити з одягу.

При проведенні дослідів у лабораторії ми застосовували скляний хімічний посуд загального призначення. При виконанні роботи зі скляним посудом, мої дії були визначені інструкцією з охорони праці. Перед початком роботи я завжди перевіряла цілісність скляного посуду і його придатність для виконання необхідної роботи. Під час миття лабораторного посуду треба стежити, щоб йоршиком не вибити дно або стінку скляного посуду і не поранитись. Крім того, кожен використаний посуд маркують для ідентифікації. Після завершення роботи скляний посуд промивався проточною водою і зберігався у спеціальному контейнері для подальшого миття. Нетермостійкий скляний посуд використовувався лише для робіт, які не потребували нагрівання.

Під час роботи необхідно дотримуватися певних правил і заходів безпеки. Заборонено проводити дослідження в брудному або недостатньо чистому посуді, а також рекомендується виконувати завдання у положенні стоячи. Однак, при безпечних роботах дозволяється сидіти. При пересуванні склянки з гарячою водою по поверхні стола слід тримати її подалі від себе з підкладеною ганчіркою під дно. Заборонено проводити аналіз будь-яких речовин на смак чи запах, а також пити воду з хімічного посуду, оскільки більшість використовуваних речовин є отруйними.

У лабораторії дотримуються правил щодо утримання та використання небезпечних матеріалів, таких як кислоти, горючі речовини та інші, які повинні залишатися в межах добових норм і дотримуватися правил суміщення при зберіганні реактивів. Експерименти з використанням легкозаймистих речовин та роботи з відкритим полум'ям не слід поєднувати. Під час роботи в лабораторії також важливо дотримуватися положень з охорони праці. Всі прилади, де це передбачено, повинні бути заземлені. Електронагрівальні прилади мають бути розміщені на вогнетривкій основі та обов'язково заземлені. Не рекомендується працювати в лабораторії самотужки. Після завершення роботи необхідно виконати такі кроки: вимити забруднений посуд, нейтралізувати та знезаразити використані реактиви та розчини, вимкнути живлення та закрити приміщення.

Концентровані розчини кислот і лугів, що мають різкий запах, та отруйні речовини не можна виливати у раковину попередньо не розбавивши або не нейтралізувавши їх задля уникнення їх випаровування та отруєння повітря. Для уникнення руйнування каналізаційної мережі не можна виливати концентровані розчини у каналізаційні мережі.

Для надання невідкладної допомоги у лабораторії має бути аптечка. В аптечці необхідно мати: етиловий спирт, настоянку йоду, сухий марганцево-кислий калій, перев'язувальні засоби, необхідний набір антибіотиків тощо.

Перед початком роботи у лабораторії необхідно [92]:

- отримати завдання від керівника робіт;
- одягнути спецодяг, що зберігається в індивідуальних шафах окремо від верхнього одягу;
- ознайомитись із правилами безпеки робіт, обладнанням, матеріалами та інструментами;
- мати власний рушник для витирання рук, індивідуальні засоби захисту;
- перевірити справність приладів: заземлення (занулення), цілісність дротів;

- впевнитись у наявності засобів пожежогасіння і засобах надання першої долікарської допомоги;

- не дозволяється одному працювати в лабораторії через неможливість надання першої допомоги;

- приміщення лабораторії прибрати вологим способом чистою ганчіркою, зволожений розчином, що дезінфікує; стерти пил з поверхні столів, приладів, обладнання, підвіконь;

- ганчіркою змоченою 3% розчином хлораміну (карболовою кислотою) протерти підлогу;

- включити припливно-витяжну вентиляцію за 10-15 хв. до початку роботи;

- при необхідності включити вентиляцію у витяжній шафі;

- переконатися у справності приладів, обладнання; наявності необхідних реактивів, хімічного посуду, які необхідні для виконання роботи;

- не починати роботу при несправності обладнання або засобів захисту;

- перевірити цілісність скляного хімічного посуду;

- про несправності сповістити керівника робіт.

Всі роботи виконували відповідно до методичних рекомендацій.

Вимоги безпеки після закінчення роботи у лабораторії:

- вимкнути обладнання, електроприлади, газові пальники, вимкнути електроенергію, закрити воду; реактиви, хімікати покласти у відведене для них місце;

- прибрати робоче місце;

- спецодяг, спецвзуття та засоби індивідуального захисту, покласти у відведене для них місце;

- доповісти керівнику робіт про всі недоліки, які мали місце під час роботи [92].

4.3 Безпека в надзвичайних ситуаціях

При виконанні моєї роботи можуть статися такі нещасні випадки: ураження електричним струмом, займання у приміщенні лабораторії, попадання біологічного матеріалу на одяг, шкіру або слизові оболонки. В надзвичайній ситуації важливо вміти надати першу медичну допомогу собі або співробітникам [100].

При роботі з культуральною водою можливо потрапляння її на одяг, шкіру, слизові оболонки, тому біологічні препарати для досліджень є потенційно небезпечними (згідно приказу №120 МОЗ України від 20.05.00 розроблена перша допомога у цих випадках). При потраплянні КВ на халат, потрібно знати зняти його і замочити у дезінфікуючому розчині на 1 годину. У якості дезінфікуючого розчину можна використати 0,5% розчин хлорантоіну, 0,05% розчин бактоліну, 0,5% розчин дезактину. При потраплянні біологічних матеріалів на шкіру, треба обробити уражену ділянку 70% спиртом, 3% розчину перекису водню або 5% розчином йоду. Після цього промити шкіру двократно проточною водою з милом, висушити стерильним рушником і знову обробити дезинфікуючим розчином.

Коли біологічна речовина потрапляє на слизові оболонки очей потрібно промити очі великою кількістю води та закапати 30% розчином альбуциду. При потраплянні на слизові оболонки ротової порожнини прополоскати рот 70% спиртом. Про небезпечний випадок повідомити керівництво лабораторії.

При торканні за дріт, який знаходиться під напругою, може виникнути електротравма. Електротравма може призвести до серйозного ураження і навіть зупинки серця. При ураженні електричним струмом людина не може самостійно звільнитися через скорочення м’язів. Тому треба звільнити потерпілого від джерела струму. При цьому дотримуватись правил техніки безпеки. По-перше, повернути вимикач, вимкнути рубильник, вивернути пробки на щитку. Після чого звільнити потерпілого. Якщо зупинити дію

електричного струму неможливо, треба одягти гумові рукавички, або обмотати руки шматком шовкової тканини і користуючись сухою дерев'яною палкою, звільнити потерпілого. Надати першу допомогу. По-третє, накласти асептичні пов'язки та відвезти потерпілого до лікарні [100].

Пожежна безпека в лабораторії повинна забезпечуватися проведенням певних заходів відповідно до правил пожежної безпеки в Україні [100]. При виникненні пожежі необхідно викликати пожежну охорону, зачинити вікна та кватирки, вимкнути вентиляцію та електроприлади, винести з приміщення горючі рідини.

Для безпеки від пожежі не допускається:

- палити у приміщенні лабораторії;
- залишати легкозаймисті матеріали або папір на шафах і за шафами, на радіаторах центрального опалення, близько до електропроводів і електроприладів;
- нагрівати легкозаймисті речовини на відкритому вогні, електроплитах тощо (нагрівати треба на піщаній або водяній бані);
- залишати без нагляду ввімкнені електроприлади, плити, електричне освітлення;
- електропроводи, електровимикачі та розетки повинні бути доступними для обслуговування;
- завішувати картинами, плакатами, або заставляти шафами електропроводку.

4.4 Техніка безпеки при роботі на комп'ютері

Інформацію, отриману під час проведення експерименту, я обробляла за допомогою комп'ютерної техніки.

До роботи на комп’ютері допускаються особи, що пройшли навчання та інструктаж з охорони праці. Усі особи, що працюють на комп’ютері, повинні знати міри захисту та прийоми надання першої долікарської допомоги при ураженні електричним струмом.

Вмикання комп’ютерів до електромережі здійснюється через спеціально встановлені електричні розетки або вилки із заземленням. Підключення комп’ютера дротом без вилки забороняється. Покриття стола повинно бути матовим з коефіцієнтом відбиття 0,25 – 0,4.

Освітлення робочих місць в горизонтальній площині на рівні 0,8 м від підлоги повинно бути не менше 400 лк. Для штучного освітлення, як правило, слід застосовувати люмінесцентні лампи. Перед початком роботи перевірити захисне заземлення (занулення), упевнитись у наявності засобів гасіння вогню. Відстань від очей користувача до екрану дисплея повинна становити 50 – 70 см, кут зору 10-20^0, але не більше 40^0. Переважним є розташування площі екрана перпендикулярно до лінії зору користувача. Руки користувача повинні розташовуватися на робочому столі в горизонтальному положенні, або злегка нахилені, кут ліктя повинен складати 70-90^0, необхідна гарна опора для спини та сідниць. Необхідно передбачити дотримання регламентованих перерв, активне їх проведення, регулярне заняття виробничою гімнастикою, рівномірне розподілення завдань.

При доторканні до пошкодженої проводки відчувається проходження струму. При спалахуванні проводки в середині апаратури – необхідно вимкнути електроспоживання ЕОМ, вимкнувши вилку. Після закінчення робіт необхідно від’єднати апаратуру від електромережі [100]. Таким чином, знання дисципліни охорони праці в галузі, допомогли мені уникнути небезпечних випадків та травмувань.

При тривалій роботі з комп’ютером приміщення іонізується «плюс» та «мінус» іонами. «Плюс» іони негативно впливають на здоров’я. Бажано робити короткі перерви, під час яких вмикати вентиляцію, яка видаляючи аеронізоване повітря з приміщення і заміняла його свіжим. Норма становить

мінімум 160-5000 аеронів у 1 $см^3$. Оскільки робота за комп'ютером вимагає тривалого перебування у фіксованій позі, під час перерви я виконувала фізичні вправи і вправи для очей [100, 101].

Таким чином, дотримання правил техніки безпеки допомогли мені уникнути небезпечних випадків та травмувань під час досліджень у лабораторії і виконати завдання кваліфікаційної роботи без травм і шкоди для здоров'я.

ВИСНОВКИ

1. Встановлено фітостимулювальну дію культуральної води, де утримувалися медичні п’явки *H. verbana*, на енергію проростання і схожість насіння досліджуваних тест-культур. Обробка насіння гороху овочевого (*Pisum sativum* L.) сорту Альфа культуральною водою з-під медичної п’явки сприяє підвищенню ($p \leq 0,05$) його енергії проростання на 45%, а схожості на 6% порівняно з контролем. При обробленні пшениці ярої (*Triticum aestivum* L.) культуральною водою з-під медичної п’явки її енергія проростання підвищувалася ($p \leq 0,05$) на 36%, а схожість на 7% порівняно з контролем. Перші справжні листки в обох тест-рослин з’являлися на 1 добу раніше порівняно з контролем.

2. Культуральна вода з-під медичної п’явки фітотоксичного ефекту на досліджувані тест-культури не проявляла. Середні показники фітотоксичного ефекту (ФЕсер), розрахованого за двома параметрами (висота рослини та довжина коренів) були від’ємними, що свідчить про стимулювальну дію БАР культуральної води з-під медичної п’явки *H. verbana* на *Pisum sativum* L. та *Triticum aestivum* L. (ФЕсер становив -164,3% та -36,9% відповідно).

3. З двох випробуваних тест-систем більш чутливою до якості культуральної води за морфометричними показниками була тест-культура *Pisum sativum* L.

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

Використання насіння рослин як тест-об’єктів може знайти широке застосування у наукових дослідженнях. Отримані дані можуть бути використані для впровадження обробки насіння досліджуваних тест-культур КВ з-під МП *Hirudo verbana*.

Результати роботи можуть бути впровадженні при викладанні дисципліни «Методологія та організація наукових досліджень в біології» за освітньою програмою Біологія для здобувачів магістратури.

ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ

1. Aminov R., Aminova A. Indirect effect of substances of the hemophagous parasite *Hirudo verbana* on the immune system of the host rats. *Annals of Parasitology*. 2021. Vol. 67(4). P. 603–610. URL: https://doi.org/10.17420/ap6704.376

2. Ткачук О.П., Демчук О.А., Кравченко В.С. Вплив структурованої води на енергію проростання та схожість насіння редьки посівної (*Raphanus sativus* L.) *Вісник Уманського нац. університету садівництва.* 2020. №1. С. 67-70. DOI: https://doi.org/10.31395/2310-0478-2020-1-67-70

3. Добринюк Ю.М., Калинин М.И., Гузь М.М., Шаблій І.В. Лісове насінництво : навч. посібник. Львів : Камула, 1998. 432 с.

4. Abdisa T. Therapeutic importance of leech and impact of leech in domestic animals. *MOJ Drug Design Development & Therapy.* 2018. Vol. 2(6). P. 235-242. URL: https://doi.org/10.15406/mojddt.2018.02.00068.

5. Hirudo medicinalis — historical and biological background and their role in microsurgery. Review article / A.K. Yapici, et al. *Hand Microsurg*. 2017. Vol. 6. P. 34-38.

6. Medicinal Leech Therapy and Related Case Study: Overview in Current Medical Field / A.V. Dudhrejiya, et al. *J Pharmacogn Phytochem*. 2023. Vol. 12(1). P. 21-31. URL: https://doi.org/10.22271/phyto.2023.v12.i1a.14543.

7. Abdullah S., Dar L.M., Rashid A., Tewari A. Hirudotherapy/leech therapy: applications and indications in surgery. *Arch Clin Exp Surg*. 2012. Vol. 1(3). P. 172-180. URL: https://doi.org/10.5455/aces.20120402072447.

8. П’явка медична.Червона книга України. URL: https://redbook-ua.org/ (дата звернення: 30.08.2025)

9. Бойко Г.О., Пузріна Н.В. Схожість та енергія проростання насіння сосни звичайної (*Pinus sylvestris* L.) різного кольору. *Науковий вісник Національного університету біоресурсів і природокористування України.*

Серія : Лісівництво та декоративне садівництво. 2015. Вип. 219. С. 113-117. URL: http://nbuv.gov.ua/UJRN/nvnau_lis_2015_219_18

10. Effect of Water Quality on Monthly Density Variation of the Endangered Southern Medicinal Leech *Hirudo verbana* Carena, 1820 (Hirudinea: Arhynchobdellida: Hirudinidae) / N. Sağlam et al. *Acta Zoologica Bulgarica*. 2018. Vol. 70, No. 3. P. 433–441.

11. Медична п’явка. URL: https://uk.wikipedia.org/wiki/Hirudo (дата звернення: 30.08.2025)

12. Sağlam N. Internal and External Morphological Characteristics of the Medicinal Leech Species *Hirudo sulukii* and *Hirudo verbana*. *Turkiye parazitolojii dergisi*. 2019. Vol. 43(4). P. 204–209. URL: https://doi.org/10.4274/tpd.galenos.2019.6422

13. Mory R.N., Mindell D., Bloom D.A. The leech and the physician: biology, etymology, and medical practice with Hirudinea medicinalis. *World J Surg* 2000. Vol. 24. P. 878-883.

14. Фролов О. К., Литвиненко Р. О. Морфофункціональні стани п’явки виду *Hirudo verbana* в найближчі проміжки часу після сеансів гірудотерапії. *Вісник Запорізького національного університету. Біологічні науки*. 2013. № 3. С. 127-133.

15. Kovalenko M. V., Utevsky S. Yu. Transitional Morphology in Hybrids of *Hirudo verbana* and *H. orientalis* (Clitellata, Hirudinida). *Vestnik Zoologii*. 2013. T. 47, № 6. P. 557–561. URL: http://nbuv.gov.ua/UJRN/vzl_2013_47_6_13

16. Faleh N., Hassan Z.N., Shafeeq M.A.A. Leeches review: biology, ecology and medical important. *Indian journal of public health research & development*. 2019. Vol. 10, No 10. P. 3275-3279.

17. Ayhan H., Özyurt Koçakoğlu N., Candan S. Functional morphology of the suckers and teeth of the medicinal leech Hirudo verbana Carena, 1820 (Annelida; Clitellata; Hirudinida): A scanning electron microscope study. *Microsc Res Tech*. 2021. Vol. 84(12). P. 2930-2935. URL: https://doi.org/10.1002/jemt.23851.

18. Амінов Р.Ф. Медичні п’явки в штучних умовах: отримання, зберігання та використання: монографія. Запоріжжя : Запорізький національний університет, 2023. 140 с.

19. Medicinal leech therapy – an overall perspective/ A.K. Sig, et al. *Integr Med Res.* 2017. Vol. 6, No 4. P. 337-343.

20. Leech therapy in flap salvage: systematic review and practical recommendations / C. Herlin et al. *Ann. Chir. Plast.Esthet*. 2016. Vol. 62. P. 1-13.

21. Frolov A.K., Litvinenko R.A. Basic morphofunctional features of pharmaceutic leech (Hirudo verbana Carena, 1820) tissues in various forms of response after hirudotherapeutic procedures. *Annals of Parasitology*. 2015. Vol. 61(1). P. 27–35.

22. Fort C.W. Leech therapy: current uses for an old treatment. *DNA Reporter*. 2001. Vol. 26. P. 16-17.

23. Microbial-feeding interactions reveal the effects of feeding blood on the gut microbiota of the aquaculture leech (Hirudo nipponica) / Q. Tian, et al. *Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgeh*. 2023. Vol. 75 (1). P. 1–13. URL: https://doi.org/10.46989/001c.70958.

24. Elaborate ultrastructure of the Hirudo (Annelida: Hirudinae) cocoon surface / W.M. Saidel, et al. *Journal of morphology*. 2018. Vol. *279*(4). P. 545–553. URL: https://doi.org/10.1002/jmor.20787

25. Вичалковська Н.В. Методичні рекомендації для виконання лабораторних робіт з зоології безхребетних для студентів біологічного факультету вищого навчального закладу. Миколаїв, 2014. URL: https://studfile.net/preview/5548969/ (дата звернення: 30.08.2025)

26. Ceylan M., Çetinkaya O., Küçükkara R., Akçimen U. Reproduction Efficiency of the Medicinal Leech Hirudo verbana Carena, 1820. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 2015. Vol. 15. P. 411-418. DOI: 10.4194/1303-2712-v15_2_27

27. Amarprakash P.D. Case study of leech application in diabetic foot ulcer. *International Journal of Research in Ayurveda & Pharmacy*. 2012. Vol. 3(5). P. 748-751. URL: https://doi.org/10.7897/2277-4343.03536.

28. Куплевська Л., Куплевська І. Натуропатична медицина. Гірудотерапія і фізіологія здоров'я. Львів : ЗУКЦ, 2024. 287 с.

29. Herrmann S.J. Systematics, Distribution, and Ecology of Colorado Hirudinea. *The American Midland Naturalist*. 1970. Vol. 83(1). P. 1–37. URL: https://doi.org/10.2307/2424004

30. Фролов О. К., Копійка В. В., Федотов Є. Р., Литвиненко Р. О. Трофічні властивості екотипів медичної п'явки в природних водоймищах і в умовах біотехнології. *Вісник Запорізького національного університету. Біологічні науки*. 2011. №1. С. 117-122.

31. Сучасне лікування за допомогою п'явок. URL: https://uozter.gov.ua/ua/pages/338 (дата звернення: 30.08.2025)

32. Гірудотерапія. URL: http://www.doctorbiokon.com/leech-therapy (дата звернення: 30.08.2025)

33. Okka B. Hirudotherapy from past to present. *Eur. J. Basic. Med. Sci*. 2013. Vol. 3(3). P. 61-65.

34. Біофабрика п'явки URL: https://dr-kuplewska.com/biofactory/ (дата звернення: 30.08.2025)

35. Амінов Р. Ф. Вплив гірудопунктури та екстракту з тканин медичної п'явки на імунну реактивність самиць та приплоду щурів у постембріональному онтогенезі: дис. … канд. біол. наук: 03.00.09. К., 2018. 149 с.

36. A systematic overview of the medicinal importance of sanguivorous leeches / S.M. Zaidi, et al. *Altern med rev*. 2011. Vol. 16(1). P. 59-65.

37. Литвиненко Р. О. Імуномодуляторні властивості біологічно активних речовин медичної п'явки в умовах гірудовпливу : дис. … канд. біол. наук: 03.00.09. Запоріжжя, 2016. 169 с.

38. Pharmacological Activities and Mechanisms of Hirudin and Its Derivatives – A Review / C. Junren, et al. *Front. Pharmacol*. 2021. Vol. 12. P. 660757. URL: https://doi: 10.3389/fphar.2021.660757.

39. Wu S., Zhou Y., Wang Y., Zhang Z. Therapeutic Potentials of Medicinal Leech in Chinese Medicine. *The American journal of Chinese medicine*. 2024. Vol. 52(4). P. 1027–1051. URL: https://doi.org/10.1142/S0192415X24500423

40. Chinese Medicinal Leech: Ethnopharmacology, Phytochemistry, and Pharmacological Activities / H. Dong, et al. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2016. Vol. 2016. P. 7895935. doi: 10.1155/2016/7895935.

41. Амінов Р. Ф. Природний імуномодулятор із тіл медичних п’явок: отримання та застосування : монографія. Запоріжжя : ЗНУ, 2022. 164 с.

42. Борисенко О.М., Бедзик О.В., Міщанчук Н.С. Гірудотерапія при комплексному лікуванні осіб з гострою сенсоневральною приглухуватістю. *Журнал вушних, носових і горлових хвороб*. 2005. № 3. С. 80-83.

43. Фролов О.К., Копійка В.В., Федотов Є.Р., Литвиненко Р.О. Вплив екзогенних біологічно активних речовин медичної п’явки на пігментоутворення сапрофітних бактерій. Матеріали науково-практичних конференцій студентів, молодих вчених, лікарів та викладачів «*Актуальні питання теоретичної медицини», «Актуальні питання клінічної медицини», «Мікроелементози в клінічній медицині», Суми, 21-23 квітня 2010 р., «Actual problems of fundamental and clinical medicine (in english)*», Суми, 22-23 квітня 2010 р. Суми, 2010. С. 63.

44. Фролов О. К., Литвиненко Р. О., Ребець О. Л., Юрчук І. С. Вплив екзогенних біологічно активних речовин медичної п’явки на біологічні властивості Escherichia coli 3912/41. *Мікробіологія і біотехнологія*. 2014. № 2. С. 94-100. URL: http://nbuv.gov.ua/UJRN/MiB_2014_2_12

45. Lemke S., Müller C., Hildebrandt J.-P. Be ready at any time: postprandial synthesis of salivary proteins in salivary gland cells of the haematophagous leech *Hirudo verbana*. *J Exp Biol*. 2016. Vol. 219, No. 8. P. 1139–1145.

46. Sudhadevi M. Leech therapy: A holistic treatment. International Journal of *Advance Research in Nursing*. 2020. Vol. 3(1). P. 130-132. URL: https://doi.org/10.33545/nursing.2020.v3.i1b.88.

47. Коритнюк Р., Борисенко Т. Піявочка–козявочка. *Фармацевт–практик*. 2009. № 1. С. 34–37.

48. Кузнєцова Л.В., Фролов В.М., Пересадін М.О., Круглова О.В. Сучасні підходи до гірудорефлексотерапії при захворюваннях серцево–судинної системи. *Український морфологічний альманах*. 2010. № 8(1). С. 32-35.

49. Prolonged bleeding on the neck in leech therapy:case report / A. Savrun, et al.. *Arch. Clin. Exp. Surg. (ACES)*. 2015. Vol. 4. P. 234–237.

50. Hamidizadeh N., Azizi A., Zarshenas M.M., Ranjbar S. Leech therapy in treatment of cutaneous leishmaniasis: a case report. *Journal of integrative medicine*. 2017. Vol. 15, Is. 5. P. 407–410. URL: https://doi.org/10.1016/s2095-4964(17)60366-2.

51. Thakur I., Reddy B.H.S., Patil S., Rajendra K. Hirudotherapy in dentistry. *Int J Oral Health Sci.* 2016. Vol. 6. P. 65–69. DOI:10.4103/2231-6027.199987

52. Sobczak N., Kantyka M. Hirudotherapy in Veterinary Medicine. *Annals of parasitology*. 2014. Vol. 60(2). P. 89–92.

53. Литвиненко Р.О. Мікробіологічна небезпека при гірудотерапії. *Сьогодення біологічної науки :* матеріали III Міжнародної наукової конференції (15-16 листопада 2019 р., м. Суми). Суми : ФОП Цьома С. П., 2019. С. 273-277.

54. Kohanski M. A., Dwyer D. J., Collins J. J. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nature reviews. Microbiology*. 2010. Vol. *8*(6). P. 423–435. URL: https://doi.org/10.1038/nrmicro2333

55. Semi-Solid Product of Medicinal Leech Enhances Wound Healing in Rats / L. Amani, et al. *Jundishapur J Nat Pharm Prod.* 2021. Vol. 16, No 4. P. e113910. URL: https://doi.org/10.5812/jjnpp.113910.

56. Development of Leech extract as a therapeutic agent: A chronological review / M. Alaama, et al. *Pharmacological Research - Modern Chinese Medicine*. 2024. Vol. 10. P. 100355. URL: https://doi.org/10.1016/j.prmcm.2023.100355.

57. Екстракт п'явки. ТМ «Доктор Біокон». URL: http://www.doctorbiokon.com/extract-medicina-leech (дата звернення: 30.08.2025)

58. Львівська біофабрика п'явки. URL: https://dr-kuplewska.com/biofactory/ (дата завернення: 30.08.2025)

59. Uğural B., Serezli R. Effects of various environments on number of cocoon and offspring in breeding of southern medicinal leech, Hirudo verbana Carena, 1820. *Ege Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 2020. Vol. 37, No 3. P. 207-211. URL: https://doi.org/10.12714/egejfas.37.3.01.

60. Effect of Water Quality on Monthly Density Variation of the Endangered Southern Medicinal Leech Hirudo verbena Carena, 1820 (Hirudinea: Arhynchobdellida: Hirudinidae) / N. Sağlam, et al. *Acta zool. bulg*. 2018. Vol. 70, No 3. P. 433-441.

61. Ceylan M., Küçükkara R., Karataş E. Effects of cocoon incubation angle on hatching success of medicinal leeches (Hirudo spp.). *Invertebrate Reproduction & Development*. 2023. Vol. 67(3–4). P. 121–128. URL: https://doi.org/10.1080/07924259.2023.2241418.

62. Фізіологія рослин : навчальний посібник. Ч. 1 / С.В. Прилуцька та ін. Київ : НУБІП України, 2023. 224 с.

63. Біоіндикація. Методичні рекомендації до виконання лабораторних робіт студентами напряму підготовки 6.040106 «Екологія, охорона навколишнього середовища та збалансоване природокористування» / А.І. Горова, А.В. Павличенко, О.О. Борисовська, В.Ю. Грунтова. Дніпропетровськ : Національний гірничий університет, 2014. 76 с.

64. Науково-дослідницький практикум з біотестування : навчальний посібник для підготовки магістрів зі спеціальностей 014. Середня освіта

(Біологія та здоров'я людини), 091. Біологія. Херсон : ФОП Вишимирський В.С., 2019. 80 с.

65. Горова А., Кулина С. Оцінка токсичності ґрунтів Червоноградського гірничопромислового району за допомогою ростового тесту. *Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол.* 2008. Вип. 48. С. 189–194.

66. Грицаєнко З.М., Грицаєнко А.О., Карпенко В.П. Методи біологічних та агрохімічних досліджень рослин і ґрунтів. Київ : ЗАТ Нічлава, 2003. 320 с.

67. Визначник рослин України : учбовий посібник / А.І. Барбарич та ін.; відп. ред. Д. К. Зеров ; вид. друге, випр. і доп. Київ : Урожай, 1965. 875 с.

68. Джура Н., Подан І. Екологічні наслідки довготривалого нафтовидобутку на Старосамбірському родовищі Львівської області. *Вісник Львівського університету. Серія біологічна*. 2017. Вип. 76. С. 120-127. URL: http://nbuv.gov.ua/UJRN/VLNU_biol_2017_76_17

69. Pavlychenko A., Kovalenko A. The investigation of rock dumps influence to the levels of heavy metals contamination of soil. *Mining of Mineral Deposits*. Leiden, The Netherlands: CRC Press. Balkema, 2013. P. 237–238.

70. Мальцев В. І., Карпова Г. О., Зуб Л. М. Визначення якості води методами біоіндикації : науково-методичний посібник. Київ : Науковий центр екомоніторингу та біорізноманіття мегаполісу НАНУ, Недержавна наукова установа Інститут екологіх (ІНЕКО) Національного екологічного центру України, 2011. 112 с.

71. Гаранько Н.М., Ісламов В.О. Оцінка якості питної води за допомогою методів біотестування. *Екологія довкілля та безпека життєдіяльності*. 2003. №5. С. 34-37.

72. Бешлей З.М., Бешлей С.В., Баранов В.І., Терек В.І. Використання рослинних тест-систем для оцінки токсичності техногенно-забруднених субстратів. В*існик Харківського національного аграрного університету. Серія: Біологія*. 2014. Вип. 1 (31). С. 97-102. URL: http://nbuv.gov.ua/UJRN/Vkhnau_biol_2014_1_12

73. Дідух Я.П. Основи біоіндикації : монографія. Київ : Наук. думка НАН України, 2012. 344 с.

74. Liang S., Zhang J. The method of lower and upper solutions for 2nth-order multi-point boundary value problems. *Nonlinear Analysis: Theory, Methods & Applications.* 2009. Vol. 71, Is. 10. P. 4581-4587. URL: https://doi.org/10.1016/j.na.2009.03.015.

75. Крайнюков О.М., Кривицька І.А. Удосконалення способу визначення ступеня забрудненості ґрунтів методом біотестування. *Вісник Запорізького національного університету. Біологія*. Запоріжжя: ЗНУ, 2018. №1. С. 83-89. URL. https://doi.org/10.26661/2410-0943-2018-1-12

76. Аналіз фітотоксичного ефекту небезпечних пестицидних препаратів за допомогою біоіндикації / Р.В. Петрук та ін. *Техногенно-екологічна безпека*. 2019. №2 (6). С. 42-48.

77. Фітотестування як експрес-метод оцінки токсичності нафто-забруднених ґрунтів / М. Горон та ін. *Вісник Львівського університету. Серія біологічна*. 2012. Вип. 58. С. 185-192.

78. Костюченко Н.І. Мікробіологічна характеристика джерельних вод о.Хортиця. *Вісник Запорізького національного університету. Збірник наукових праць. Біологічні науки.* Запоріжжя: ЗНУ, 2013. № 1. С. 115-120. URL: http://nbuv.gov.ua/UJRN/Vznu_bio_2013_1_18

79. Гончаренко І.В. Фітоіндикація антропогенного навантаження : монографія. Дніпро : Середняк Т.К., 2017. 127 с.

80. Бессонова В. П. Фітоіндикація та фітомоніторинг : навч. посіб. Дніпро : ВТК «Друкар», 2024. 206 с.

81. Методичні вказівки для виконання практичних і самостійних робіт з „Рослинництва” (Модуль 2. Змістовий модуль 2. Озимі зернові культури) студентами факультету плодоовочівництва, екології та захисту рослин підготовки за спеціальностями: 203 − садівництво та виноградарство, 202 − захист і карантин рослин / уклад. С.П. Полторецький, Н.М. Полторецька. Умань : Уманський НУС : Редакційно-видавничий відділ, 2019. 23 с.

82. Мазур В.А., Поліщук І.С., Телекало Н.В., Мордванюк М.О. Навчальний посібник з дисципліни «Рослинництво» для студентів галузі знань 20 «Аграрні науки та продовольство» спеціальності 201 «Агрономія» першого бакалаврського рівня. Вінниця : Видавництво ТОВ «Друк», 2020. 352 с.

83. Горох Альфа. Веснодар. URL: https://vesnodar.com.ua/ua/semena-goroha-alfa (дата звернення: 30.08.2025)

84. Методичні вказівки для виконання практичних і самостійних робіт з „Рослинництва" (Модуль 2. Змістовий модуль 4. Зернобобові культури) студентами факультету плодоовочівництва, екології та захисту рослин підготовки за спеціальностями 203 − садівництво та виноградарство та 202 – захист і карантин рослин / уклад. С.П. Полторецький, Н.М. Полторецька. Умань : Уманський НУС : Редакційно-видавничий відділ, 2019. 26 с.

85. Фролов О.К. Методичні рекомендації до технологічного регламенту ботехнології медичної п'явки. Запоріжжя : Copy Art, 2012. 36 с.

86. Никифоров В. В., Дігтяр С. В., Мазницька О. В., Козловська Т. Ф. Біоіндикація та біотестування : навчальний посібник. Кременчук : Вид-во ПП Щербатих О. В., 2016. 76 с.

87. Горобчик А.П., Сальнікова С.А. Аналіз даних соціологічних досліджень засобами SPSS : навчально-методичний посібник. Луцьк : Вежа, 2008. 164 с.

88. Соціальна медицина, громадське здоров'я. навч. посіб. : у 4 т. / за заг. ред. В.А. Огнєва. Харків : ХНМУ, 2023. Т. 1. Біологічна статистика. 316 с.

89. Решетник Л.Л. Насіннева продуктивність сосни звичайної : монографія. Житомир : Полісся, 2010. 154 с.

90. Млавець Ю.Ю. Охорона праці (конспект лекцій). Ужгород : ДВНЗ «УжНУ», 2015. 56 с.

91. ДСН 3.3.6.042 99 Санітарні норми мікроклімату виробничих приміщень: [чинний від 1999-12-01] Вид. офіц. Київ: МОЗ України 1999. 10 с.

92. СТВНЗ 20.5 - 0:2013. Вимоги безпеки при виконанні навчальних та науково-дослідних робіт. Харків, 2013. 59 с.

93. Наказ МОЗ від 14.07.2020 № 1596 «Про затвердження гігієнічних регламентів допустимого вмісту хімічних і біологічних речовин у повітрі робочої зони». URL: https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z0741-20#Text (дата звернення: 30.08.2025)

94. Кобилянський О.В. Основи охорони праці (в двох частинах). Ч. 1. Навчальний посібник. Вінниця : ВНТУ, 2007. 183 с.

95. ДСН 3.3.6.037. Санітарні норми виробничого шуму, ультразвуку. Вид.офіц. Київ: МОЗ України 1999. 24 с. URL: https://zakon.rada.gov.ua/rada/show/va037282-99#Text (дата звернення: 30.08.2025)

96. ДБН В.2.5-28:2018. Природний і штучне освітлення [чинний від 2018-03.10.]. Вид. офіц. Київ : ДП «Державний науково-дослідний інститут будівельних конструкцій» (НДІБК), 2018. URL: https://online.budstandart.com/ua/catalog/doc-page.html?id_doc=79885 (дата звернення: 30.08.2025)

97. Зеркалов Д. В. Охорона праці в галузі: загальні вимоги : навч. посібник. Київ : Основа, 2011. 551 с.

98. ДНАОП 0.00-4.26-96. Положення про порядок забезпечення працівників спеціальним одягом, спеціальним взуттям та іншими засобами індивідуального захисту. [Чинний від 1996-29-10]. Київ : Держнаглядохоронипраці України, 2007. 79 с.

99. НПАОП 73.1-11-12. Правила охорони праці під час роботи в хімічних лабораторіях: [чинний від 2012-10-26]. Вид. офіц. Київ : МНС України, 2012. 128 с.

100. Савчук О. М. Основа охорони праці : конспект лекція в 2-х ч. Запоріжжя : Просвіта, 2000. 124 с.

101. Випромінювання іонізуюче : словник-довідник з екології : навч.-метод. посіб. / уклад. Лановенко О.Г., Остапішина О.О. Херсон ПП Вишемірський В., 2013. 36 с.

ДОДАТКИ

Додаток А.1

Результати ростового тесту на плаваючих дисках з насінням тест-культур *Triticum aestivum* L. та *Pisum sativum* L.:

А) на 4 добу



Б) на 10 добу



Додаток А.2

Результати ростового тесту на плаваючих дисках з насінням тест-культур *Triticum aestivum* L. та *Pisum sativum* L.:

А) на 13 добу експерименту



А – *Triticum aestivum* L.



Б – *Pisum sativum* L.

Додаток А.3

Морфологічні показники тест-культур *Triticum aestivum* L. та *Pisum sativum* L. на 14 добу експерименту



К1 – контроль *Pisum sativum* L.

П1 – проба з культуральною водою *Pisum sativum* L.

К2 – контроль *Triticum aestivum* L.

П2 – проба з культуральною водою *Triticum aestivum* L.