13(4) 301-306, Winter 2022

Journal of Animal Environment
(AEJ)
Journal homepage: http://www.aejournal.ir

Original Research Paper

The effect of different blood (goat and sheep) on sexual maturity, survival and the production of cocoons and larvae in oriental leech (*Hirudo orientalis*)

Hamid Reza Bidmal [1], Mohammad Sudagar*[1], Mahdi Shakouri [2]

[1] *Department of Aquaculture, Faculty of Fisheries and Environment, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran*
[2] *Iranian Fisheries Organization, Tehran, Iran*

Key Words
Blood
sexual maturity
cocooning
survival
oriental leech

Abstract

Introduction: The growing demand for medicinal leeches around the world has increased the need for new leech resources. In order to determine the appropriate blood for sexual intercourse and the amount of cocoon production in oriental leech.

Materials & Methods: For this purpose, 120 leeches with an average age of one week and an average weight of 0/1±0/04 in 2 treatments (feeding on goat and sheep blood) and each treatment with 3 repetitions were divided into 10-liter containers. To feed the leeches, the blood needed from the slaughterhouse was prepared and to prevent blood clotting, a blood vessel was taken and added to the blood of sodium heparin. To feed the leeches, the blood reached a temperature of 37 to 38 °c. For the first 48 hours after feeding to prevent loss and control of ammonia, container water was changed twice a day at a rate of 70%. Re-feeding was performed one month after the previous feeding and in 6 steps. In order to find out the sexuality of leeches, at the end of stages 5 and 6 of feeding, two leeches were randomly selected and described from each treatment.

Result: The results showed that the number of cocoons and larvae in goat-fed blood was significantly higher than in sheep-fed blood ($p<0.05$). The survival of goat-fed leeches was higher than that of sheep-fed blood, but there was no statistically significant difference.

Conclusion: The results of this study indicate that leeches feed effectively on goat's blood.

* Corresponding Author's email: sudagar_m@gau.ac.ir
Received: 26 March 2020; Reviewed: 29 April 2020; Revised: 6 July 2020; Accepted: 8 August 2020
(DOI): 10.22034/AEJ.2020.232247.2268

مقاله پژوهشی

تأثیر خون‌های بز و گوسفند بر رسیدگی جنسی، بازماندگی و میزان تولید کوکون و لارو در زالوی شرقی (*Hirudo orientalis*)

حمیدرضا بیدمال[۱]، محمد سوداگر[۱*]، مهدی شکوری[۲]

[۱] گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
[۲] سازمان شیلات ایران، تهران، ایران

کلمات کلیدی

خون
رسیدگی جنسی
کوکون‌گذاری
بازماندگی
زالوی شرقی

چکیده

مقدمه: افزایش تقاضای زالوهای دارویی در سراسر جهان، نیاز به‌منابع جدید زالو را افزایش داده است. این تحقیق به‌منظور تعیین خون مناسب بر رسیدگی جنسی و میزان تولید کوکون در زالوی شرقی انجام گرفت.

مواد و روش‌ها: بدین منظور ۱۲۰ قطعه زالو با سن متوسط یک هفته و با وزن متوسط ۰/۰٤±۰/۱ گرم در ۲ تیمار (تغذیه با خون بز وگوسفند) و هر تیمار با ۳ تکرار، در ظروف پلاستیکی۱۰ لیتری تقسیم شدند. جهت تغذیه زالوها، خون موردنیاز از کشتارگاه تهیه و برای جلوگیری از لخته شدن خون، به‌ظرف خونگیری منتقل گردید و به‌خون ۵ سی‌سی هپارین سدیم اضافه شد. جهت تغذیه زالو، خون به‌دمای ۳۷تا ۳۸ درجه سلسیوس رسید. ٤۸ ساعت اول بعد از تغذیه جهت جلوگیری از تلفات و کنترل آمونیاک، آب ظروف روزی ۲ مرتبه و به‌میزان ۷۰ درصد تعویض شد. تغذیه مجدد بعد از گذشت یک‌ماه از تغذیه قبل و طی ٦ مرحله انجام شد. به‌منظور اطلاع از رسیدگی جنسی زالوها، پایان مرحله ۵ و ٦ تغذیه از هر تیمار دو عدد زالو به‌صورت تصادفی انتخاب و تشریح شد.

نتایج: نتایج حاصل نشان داد تعداد کوکون و لارو در تیمار تغذیه شده با خون بز به‌طور معنی‌داری نسبت به تیمار تغذیه شده با خون گوسفند بالاتر بود ($p<۰/۰۵$). بازماندگی زالوهای تغذیه شده با خون بز نسبت به تیمار تغذیه شده با خون گوسفند بالاتر بوده ولی از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری و بحث: نتایج این تحقیق بر موثر بودن تغذیه زالو با خون بز دلالت می‌کند.

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: sudagar_m@gau.ac.ir

تاریخ دریافت: ۷ فروردین ۱۳۹۹؛ تاریخ داوری: ۱۰ اردیبهشت ۱۳۹۹؛ تاریخ اصلاح: ۱٦ تیر ۱۳۹۹؛ تاریخ پذیرش: ۱۸ مرداد ۱۳۹۹
(DOI): 10.22034/AEJ.2020.232247.2268

مقدمه

زالوها به‌عنوان شکارچی یا انگل خارجی مکنده خون نقش مهمی در اکوسیستم‌های آبی ایفا می‌کنند. بیش‌تر این گونه‌ها در زیستگاه‌های آب‌شیرین زندگی می‌کنند و گروه کاملاً کوچکی را تشکیل می‌دهند شامل ۶۸۰ گونه که به‌راسته Annelida تعلق دارند و در طب سنتی و مدرن استفاده می‌شوند. با توجه به‌مطالعات انجام شده بر روی گونه‌های مختلف هم‌چنان جزئیات کمی در مورد اکولوژی و ساختار تولیدمثلی گونه‌های مختلف وجود دارد (۲،۱). در حال حاضر زالوهای طبی و درمانی عمدتاً شامل سه گونه هستند: الف- *Hirudo verbena* (Linnaeus, 1785)، ب- *Hirudo medicinalis* (Carena, 1820)، ج- *Hirudo orientalis* (Utevsky & Trontelj, 2005) (۳، ۴). گونه زالوی شرقی که در کشورهای ازبکستان، آذربایجان و قزاقستان نیز گزارش شده است تنها گونه زالوی درمانی است که در ایران وجود دارد. تغذیه مناسب زالوها در تعداد کوکون و کوکون‌گذاری و تعداد زالوی داخل کوکون و هم‌چنین در میزان تبدیل تخم به لارو در داخل کوکون تاثیر به‌سزایی دارد. زالوی شرقی در باروری گرایش به خشکی داشته و در حاشیه آب‌بندان‌ها، روی چوب و خزه بعد از جفت‌گیری و انتقال اسپرم و در صورت ایجاد شرایط بهینه کوکون‌گذاری می‌کند. نوزادان خارج از کوکون، مستقل از والدخود بوده و ممکن است به‌دلیل رژیم غذایی متفاوت میزان بقا و رشد متفاوتی داشته باشند (۵، ۶). زمان رسیدگی جنسی زالو در طبیعت حداقل ۲ سال بوده، ولی بر اساس شرایط محیطی به ۳الی ۴ سال هم می‌رسد (۷). چنان‌چه تغذیه با خون پستانداران باشد بلوغ جنسی بین ۱۲ ماه تا ۱۵ ماه اتفاق افتاده ولی در تغذیه با خون دوزیستان زالو ۱۷ تا ۲۰ ماهگی هم به بلوغ نمی‌رسد (۸). با توجه به نیاز داخل کشور در زمینه طب سنتی و تولید فرآورده‌های درمانی، آرایشی و بهداشتی و دیگر محصولات جانبی از زالو، پتانسیل بالای زالو جهت صادرات به دیگر کشورها و علاقه‌مندی کارآفرینان برای ورود به عرصه تولید زالو یافتن راهکارهایی که منجر به تولید مدون، بهتر و با هزینه کم‌تر گردد، در این راستا ارزشمند و با اهمیت است. در این تحقیق، تأثیر خون‌های متفاوت بز و گوسفند بر رسیدگی جنسی، بازماندگی و میزان تولید کوکون و لارو در زالوی شرقی مورد ارزیابی قرار گرفت.

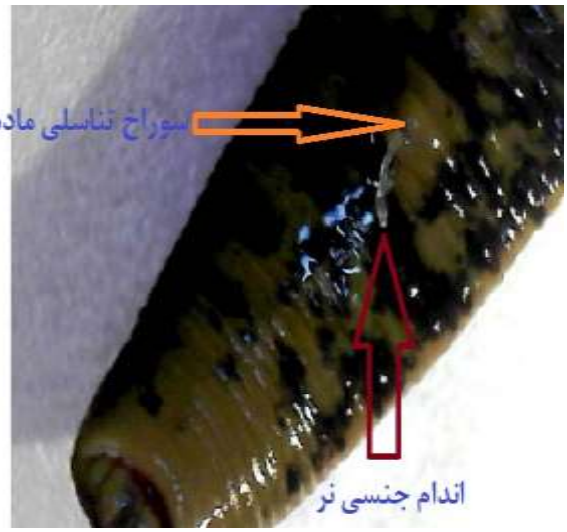
مواد و روش‌ها

این پژوهش، از آبان ۱۳۹۷ تا تیرماه ۱۳۹۸ در کارگاه شرکت ارمغان سلامت آوید واقع در روستای کریم‌آباد انجام شد. بدین‌منظور تعداد ۳۰ عدد کوکون از شرکت ارمغان سلامت آوید تهیه و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به‌مدت یک‌ماه در خزه مرطوب نگه‌داری شدند. در این مدت تخم‌های درون کوکون‌ها تفریخ شده و لاروها از مایع آلبومین داخل کوکون تغذیه کردند (۹). لارو زالوها بعد از گذشت ۲۱ روز تا یک‌ماه از داخل کوکون‌ها خارج شدند. سپس زالوهای نوجوان جمع‌آوری و تعداد ۱۲۰ قطعه شمارش و به سالن اصلی آزمایش منتقل گردیدند. زالوهای هفت روزه و با وزن متوسط ۰/۱±۰/۰۴ گرم در ۲ تیمار تغذیه ای شامل: خون بز و خون گوسفند و هر تیمار ۳ تکرار در ظروف پلاستیکی ۱۰ لیتری تقسیم و تغذیه شدند. مدت ۷۲ ساعت زالوها جهت آداپتاسیون و جلوگیری از تلفات در دمای ۲۰ درجه سلسیوس نگه‌داری و بعد از آن با خون مورد نظر تغذیه شدند. آب شهری استفاده شده در ظروف پلاستیکی فاقد کلر بوده و جهت هم‌دمایی داخل سالن یک منبع ۲ هزار لیتری تعبیه گردید. آب ظروف ۱۰ لیتری یک روز در میان و به‌میزان ۵۰ درصد تعویض می‌گردید (۱۰). جهت تغذیه زالوها، خون مورد نیاز براساس تیمارهای تحقیق شامل: خون بز و خون گوسفند از کشتارگاه واقع در اینچه‌برون تهیه شد. برای جلوگیری از لخته شدن خون، ظرف خونگیری را از قبل به هپارین سدیم آغشته و در حین خونگیری ۵ سی‌سی هپارین سدیم کم‌کم به خون اضافه و ظرف به‌صورت مداوم تکان داده شد (۱۱). بعد از رساندن خون به کارگاه، خون در ظروفی که از قبل ضدعفونی شده بودند، ریخته و روی آن یک الک پارچه‌ای قرار گرفت. دمای خون ۳۷ تا ۳۸ درجه سلسیوس بود. پس از گذشت ۲۰ دقیقه زالوهایی که تغذیه شدند از زالوهایی که تغذیه نشدند، جهت جلوگیری از هم‌جنس‌خواری جدا شدند (۱۲). زالوهای تغذیه‌شده، جهت شستشو و هم‌دمایی در ظروف دیگری که دمای آب در آن ۳۵ درجه سلسیوس بود، قرار داده شدند تا از شوک دمایی جلوگیری گردد. بعد از گذشت زمان و رسیدن دمای آب به ۲۰ درجه سلسیوس زالوها به ظروف پلاستیکی ۱۰ لیتری منتقل شدند و در مراحل بالاتر تغذیه و افزایش سایز به لگن‌های ۸۰ لیتری منتقل شدند و در دمای ۲۰ درجه سلسیوس و روشنایی ۱۲ ساعت و ۱۲ ساعت تاریکی در شبانه روز نگه‌داری شدند (۱۳). ۴۸ساعت اول بعد از تغذیه جهت جلوگیری از تلفات و کنترل آمونیاک، آب ظروف روزی ۲ مرتبه و به‌میزان ۷۰ درصد تعویض شد (۱۰). تغذیه مجدد بعد از گذشت یک‌ماه از تغذیه قبل انجام شد (۱۱). این کار ۶ مرتبه تکرار و زالوها ۶ بار توسط خون مورد نظر تغذیه شدند.

نمونه‌برداری از کیسه اسپرمی: به‌منظور اطلاع از رسیدگی جنسی زالوها، پایان مرحله ۵ و ۶ تغذیه از هر تیمار دو عدد زالو به صورت تصادفی انتخاب و تشریح شد. برای تشریح و جداسازی کیسه اسپرمی و رنگ‌آمیزی کیسه اسپرمی ابتدا زالوها در الکل اتانول ۱۰

درصد بی‌هوش شدند، سپس ناحیه پشتی برش داده شد و داخل بدن با سرم فیزیولوژی شستشو داده شد (۱۴). کیسه اسپرمی بلافاصله بعد از برش و جداکردن در فرمالین ۱۰درصد فیکس گردید و نمونه‌ها به آزمایشگاه حکیم جرجانی جهت رنگ‌آمیزی منتقل شدند.

اندام‌های تناسلی در زالو



شکل۱: ناحیه تناسلی *هیرودو اورینتالیس*. اندام‌های جنسی واقع در ناحیه تناسلی(کلایتلومی)

شکل۲: دستگاه تناسلی نر. ۱- اپی دیدیم، ۲- پروستات

تکثیر زالو: بعد از اطمینان از رسیدگی جنسی زالوها جهت جفت‌گیری و کوکون‌گذاری، زالوها به لگن‌های ۸۰ لیتری منتقل شدند. دمای آب طی یک هفته به ۲۷ درجه سلسیوس رسید و زالوها دو ماه در این دما نگه‌داری شدند. با توجه به کوکون‌گذاری زالو در محیط مرطوب، در هر لگن خارج از آب مقداری خزه در سبد میوه گذاشته شد تا بستر مناسبی برای کوکون‌گذاری زالوها فراهم شود. خزه‌ها قبل از انتقال به لگن‌ها با آب کاملاً شستشو شدند. طی مدت کوکون گذاری هفته‌ای دو مرتبه خزه‌ها به آرامی کنترل و کوکون‌ها از داخل خزه جمع‌آوری شدند و درون بستری از خزه در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به‌مدت ۱ ماه نگه‌داری شدند. زالوهای نوجوان بعد از خارج شدن از کوکون جمع‌آوری و شمارش شدند.

تجزیه و تحلیل آماری: تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری Spss نسخه ۱۶ از آنالیز t-test در سطح معنی‌داری α=۰/۰۵ استفاده شد (۱۵).

نتایج

در تحقیق حاضر میانگین تعداد کوکون در تیمار خون بز و گوسفند اختلاف معنی‌داری با یکدیگر داشت(p<۰/۰۵). طبق نتایج به‌دست آمده میانگین تعداد لارو بین تیمارها اختلاف معنی‌داری داشت(p<۰/۰۵) و بالاترین میانگین (۲۹±۲۳۱/۱) تعداد لارو مربوط به تیمار خون‌بز بود. در پژوهش حاضر میانگین وزن کوکون‌های تولید شده در ۲ تیمار خون بز و گوسفند اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نداشتند (جدول ۱).

جدول۱: داده‌های تولید کوکون، لارو و وزن کوکون در زالوی شرقی (میانگین ± انحراف معیار)

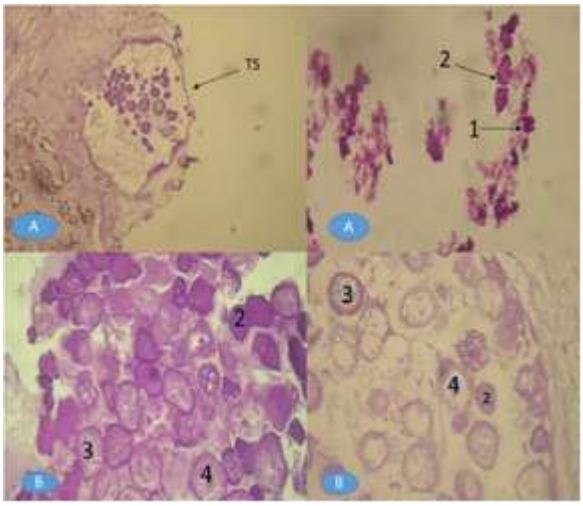
متغیر	تیمار بز	تیمار گوسفند	سطح معنی‌داری
کوکون (تعداد)	۲۱/۶۷±۲/۵۱	۱۴/۳۳±۰/۵۷	p value=۰/۰۰۸
لارو (تعداد)	۲۳۱±۲۹/۱	۱۵۱±۲/۵۱	p value=۰/۰۴۱
جمع کل کوکون	۶۵	۴۳	
جمع کل لارو	۶۹۳	۴۵۵	
وزن کوکون	۱/۰۳±۰/۰۵	۰/۹۷±۰/۰۸	p value=۰/۵۱

بازماندگی زالوها: در تحقیق حاضر درصد بازماندگی زالوها بین دو تیمار خون بز و خون گوسفند دارای اختلاف معنی‌داری نبود، و بالاترین بازماندگی مقدار (۹۱/۶۷±۲/۸۸) در تیمار تغذیه شده با خون بز بود. در پژوهش حاضر بالاترین درصد تلفات مقدار (۷/۶۳± ۱۶/۶۷) در تیمار خون گوسفند مشاهده شد.

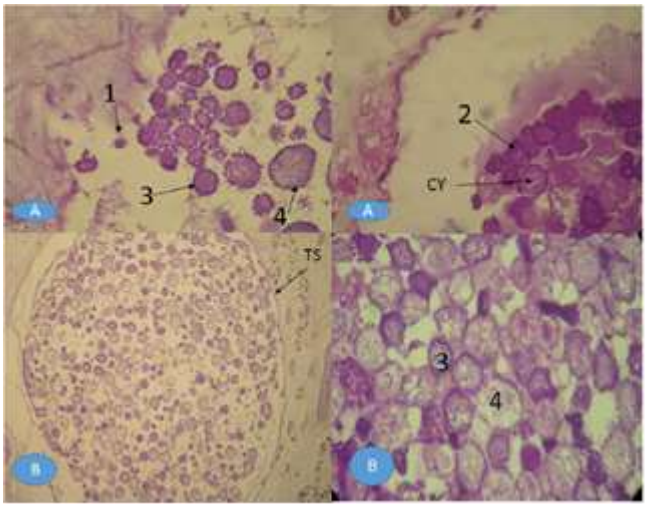
جدول۲: مقایسه درصد بازماندگی و درصد تلفات در زالوی شرقی(میانگین ± انحراف معیار)

شاخص‌های رشد	تیمار بز	تیمار گوسفند	سطح معنی‌داری
بازماندگی (درصد)	۹۱/۶۷ ±۲/۸۸	۸۳/۳۳ ±۷/۶۳	p value=۰/۱۵۲
تلفات (درصد)	۸/۳۳ ±۲/۸۸	۱۶/۶۷ ±۷/۶۳	p value=۰/۱۵

کیسه‌های اسپرمی در زالوهای تغذیه شده با خون بز و گوسفند



شکل۳: برش کیسه‌های اسپرمی مراحل ۵ و ۶ تیمار تغذیه با خون گوسفند. A (کیسه اسپرمی مرحله ۵ تغذیه)، B (کیسه اسپرمی مرحله ۶تغذیه). ۱- (خوشه اسپرمی مرحله۱)، ۲- (خوشه اسپرمی مرحله۲)، ۳- (خوشه اسپرمی مرحله۳)، ۴- (خوشه اسپرمی مرحله ۴). TS: کیسه بیضه



شکل۴: برش کیسه‌های اسپرمی مراحل ۵ و ۶ تیمار تغذیه با خون بز. A (کیسه اسپرمی مرحله ۵ تغذیه). B (کیسه اسپرمی مرحله ۶ تغذیه). ۱- (خوشه اسپرمی مرحله ۱). ۲- (خوشه اسپرمی مرحله ۲). ۳- (خوشه اسپرمی مرحله۳). ۴-(خوشه اسپرمی مرحله۴). CY: سیتوفور. TS: کیسه بیضه

بحث

در زالوی خون‌خوار همولیز گلبول‌های قرمز در نتیجه فعالیت باکتری همزیست آئروموناس می‌باشد (۱۶، ۱۷). باکتری آئروموناس هم‌چنین مسئول حفاظت طولانی از گلبول‌های قرمز بود و این محافظت از طریق ترشح آنتی‌بیوتیک انجام می‌شود و مانع فساد خون ذخیره شده توسط دیگر میکروارگانیسم‌ها می‌گردد (۵). چرخه زندگی زالو با تغذیه ارتباط مستقیم دارد (۱۴) و به‌نظر می‌رسد خون‌خواری با بلوغ جنسی ارتباط مستقیم دارد (۱۴). در بدن زالوی بالغ مراحل اسپرماتوژنز و اووژنز کامل شده است و زالو آمادگی جفت‌گیری، انتقال و دریافت اسپرم و نهایتاً تولید کوکون را دارد. Mcloughlin و Davies، نشان دادند زالو بعد از ۸ الی ۹ بار تغذیه و به‌فاصله هر ماه یک‌بار و بعد از ۲۸۹ روز به بلوغ جنسی رسیدند (۱۱). محتوای انرژی بیش‌تر در خون میزبان به‌طور مثبت عملکرد تولیدمثلی زالو را تحت تاثیر می‌گذارد. ترکیبات شیمیایی خون میزبان زالو و هم‌چنین میزان انرژی آن متفاوت است و این عامل در رشد و بقای زالو مهم است. ترکیبات شیمیایی خون برای مهره‌داران مشابه می‌باشد اما در غلظت گلبول‌های قرمز تفاوت عمده‌ای وجود دارد که در پستانداران میزان این تفاوت بسیار بیش‌تر از دیگران است. بنابراین از لحاظ بیولوژیکی این نکته دور از ذهن نیست که پستانداران غنی از گلبول‌های قرمز نقش نامناسبی در تغذیه زالو دارند (۵). میزان گلبول قرمز (RBC) در خون بز ۱۴/۴۱ میلیون در میلی‌لیتر است (۱۸) و میزان گلبول قرمز خون گوسفند ۱۱/۸۴ میلیون در میلی‌لیتر است (۱۹). هم‌چنین میزان پروتئین خون بز g/cc ۹/۱ و میزان پروتئین خون گوسفند g/cc ۷/۴ گزارش شده است (۲۰). در مطالعه حاضر زالو بعد از گذراندن از ۶ مرحله تغذیه، جهت کوکون‌گذاری به بستر خزه منتقل شد و نتایج نشان داد (جدول۱) میزان تولید کوکون در تیمار خون بز نسبت به تیمار خون گوسفند بالاتر بود. در برش کیسه اسپرمی بعد از مرحله ۵ تغذیه (شکل‌های ۳ و ۴) نمونه‌ای که دارای خوشه اسپرمی مرحله ۴ باشد به‌ندرت یافت شد و نمونه‌ها نابالغ بودند. در برش کیسه اسپرمی بعد از مرحله ۶ تغذیه (شکل‌های ۳ و ۴)، تعداد اسپرماتوزوا (مرحله ۴ اسپرماتوژنز) تیمار تغذیه با خون بز بیش‌تر از گوسفند بود. دلیل آن را می‌توان تفاوت در غلظت گلبول قرمز و میزان پروتئین گلبول قرمز دانست. بیش‌تر زالوهاکم‌وبیش از خون مهره‌داران تغذیه می‌کنند و خون مهره‌داران منبع غذایی بسیار موثری مخصوصاً از لحاظ انواع پروتئین‌ها است. Murat و همکاران اعلام کردند هرچند اولویت میزبان زالو شناخته شده است (خون گاو و خوک)، اما تاثیرات میزبان روی عملکرد تولیدمثل و رشد ناشناخته است و تعیین این منابع به‌طور قابل توجهی در ایجاد پروتکل تولید

زالو کمک خواهد کرد (۲۱). در این مطالعه بالاترین لارو تولید شده در تیمار تغذیه با خون بز و کم‌ترین در گوسفند بود. دلیل آن را می‌توان پروتئین کم‌تر خون گوسفند نسبت به خون بز دانست. این کمبود پروتئین می‌تواند در تولید و رهاسازی تخم داخل کوکون موثر باشد. اگرچه می‌بایست مطالعات بیش‌تری در این‌خصوص صورت پذیرد. زالو دارای طیف گسترده‌ای از میزبان ازجمله پرندگان، ماهی، دوزیستان و پستانداران (۱۳، ۲۲، ۲۳). با توجه به‌نقش اساسی تغذیه در رشد و بازماندگی زالو یکی از عوامل مهم در توزیع و تراکم زالوها وجود مواد غذایی و میزبان در زیستگاه زالو است (۵). در مطالعه حاضر درصد بازماندگی تیمار تغذیه با خون گوسفند نسبت تیمار خون بز کم‌تر بود. دلیل آن را می‌توان به ترکیبات شیمیایی متفاوت خون میزبان زالو دانست و این عامل در رشد و بقای زالو مهم است. اگرچه می‌بایست مطالعات بیش‌تری در این‌خصوص صورت پذیرد. در پایان با توجه به یافته‌های تحقیق، پیشنهاد می‌گردد در کارگاه‌های تکثیر و پرورش زالو با توجه به بالا بودن هزینه‌های تولید و اهمیت زمان در تکثیر و پرورش زالو از خون بز در تغذیه زالوها استفاده شود و زالو با خون گوسفند تغذیه نگردد.

منابع

1. **Elliott, J. and Kutschera, U., 2011.** Medicinal leeches: Historical use, ecology, genetics and conservation. Freshwater Journal. 4(21): 41.
2. **Neubert, E. and Nesemann, H., 1999.** Annelida, Clitellata: Branchiobdellida, Acanthobdellea, Hirudinea. Berlin: Süβwasserfauna von Mitteleuropa 6/2 Spektrum Akademischer Verlag.
3. **Kutschera, U., 2012.** The *Hirudo medicinalis* species complex. Naturwssenschaften. 99: 433-434.
4. **Roman, C., Milan, J. and Barbara, I., 2017.** First reliable records of *Hirudo verbena* carena, 1820 (Annelida: Hirudinea) from Slovakia and notes on its syntopy with *Hirudo medicinalis* Linnaeus, 1785. Folia faunistica. 22: 63-66.
5. **Sawyer, R., 1986.** Leech biology and behaviour, Volume I. Clarendon Press. Oxford.
6. **Peterson, E.L., 1983.** Visual processing in the leech central nervous system. Nature. 303: 240-242
7. **Elliott, J.M. and Mann, K.H., 1979.** A key to the British freshwater leeches with notes on their life cycles and ecology. Freshwater Biological Association Scientific Publications. No. 40.
8. **Sineva, M.V., 1944.** Observation on breeding the medicinal leech. Zoologickeskii Zhuanal. 23: 293-303.
9. **Sawyer, R., 1986.** Leech biology and behaviour, Volume II. Clarendon Press. Oxford.
10. **Zhang, B., Lin, Q. and Lin, X., 2008.** Effects of broodstock density and diet on reproduction and juvenile culture of the leech, *Hirudinaria manillensis* Lesson, 18421. 276(1-4): 198-204.
11. **Davies, R.W. and McLoughlin, N.J., 1996.** The effects of feeding regime on the growth and reproduction of the medicinal leech *Hirudo medicinalis*. Freshwater Biology. 36: 563-568. Doi:10.1046/j.1365-2427.1996.00121. x.
12. **Kutschera, U. and Roth, M., 2005.** Cannibalism in a population of the medicinal leech (*Hirudo medicinalis* L.). Biology Bulletin. 32(6): 626-628. Doi:10.1007/s10525.005. 0154.7.
13. **Elliott, J.M. and Dobson, M., 2015.** Freshwater leeches of Britain and Ireland: keys to the Hirudinea and a review of their ecology. Freshwater Biological Association. Scientific Publication, London No. 69.
14. **Ganjavi, M.K., Mahdavi, N., Ghasemzadeh, F., Shriatzadeh., M.A. and Mirshamsi, O., 2014.** The Study of Testis Sac Structure and Its Relation to Body Length, Width and Weight in *Hirudo orientalis*, Using Morphometrical and Histological Methods. Journal of Cell & Tissue (JCT). 4(4): 425-434.
15. **Ribeiro, E.A., Genofre, G.C. and McNamara, J., 2001.** Identification and uantification of carotenoid pigments during the embryonic development of the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* (Crustacea, Decapoda). Mar. Freshw. Behav. Physiol. 34.
16. **Busing, K.H. and Doll, W.J., 1953.** Die Bakterienflora der medizinischen Blutgel. Arch. Microbiol. 19(1): 52-86.
17. **Jenning, J.B. and Van Der Land, V.M., 1967.** Histochemical and bacteriological studies on digestion in nine species of leeches. Biol. Bull. 133(1): 166-83.
18. **Dini, V., Latifi, F. and Zalla, P., 2016.** Haematological blood parameters in indigenous goats. Analele IBNA. 31: 37-40.
19. **Nikbakhtb Borojni, Gh. and Talebi, M.A., 2000.** Determining of hematological values in Lori Bakhtiari sheep. Journal of Veterinary Research. 55(2): 9-13. (In Persian)
20. **Wilkin, P.J., 1989.** The medicinal leech, *Hirudo medicinalis* (L.) (Hirudinea: Gnathobdellae) at Dungeness. Kent. Bot. J. Linn. Soc. 101: 45-57. https://doi.org/10.1111/ j.1095.
21. **Windsor, D.A., 1970.** Faeces of the medicinal leech, *Hirudo medicinalis*, are haem. Nature, Lond. 227: 1153-1154.

22. **Murat, M., Ceylan, M. and Murat, H., 2019.** Investigation of reproductive efficiency, growth performance and survival of the southern medicinal leech, *Hirudo verbana* Carena, 1820 fed with mammalian and poultry blood. Animal Reproduction Science. 206: 27-37.

23. **Elliott, J.M. and Tullett, P.A., 1984.** The status of the medicinal leech *Hirudo medicinalis* in Europe and especially in the British Isles. Biological Conservation. 29: 15-26. doi:10.1016/0006-3207(84)90011-9.

24. **Wilkin, P. and Scofield, A., 1991.** Growth of the medicinal leech, *Hirudo medicinalis* under natural and laboratory conditions. 25(3): 547-553.