

تأثیر دو محیط آب - خزّه و خاک پیت ماس بر تعداد کوکون گذاری، وزن کوکون و تعداد تلفات زالوی شرقی (*Hirudo orientalis*)

حمیدرضا بیدمال^۱، محمد سوداگر^۲

۱-دانشجوی کارشناسی ارشد گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. bidmal@gau.ac.ir

۲-دانشیار گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۹/۴/۲۳ تاریخ پذیرش: ۹۹/۶/۳۰

چکیده

زمینه و هدف: در سال‌های اخیر، زالو در درمان برخی از بیماری‌ها، استخراج بسیاری از آنزیم‌ها و مواد موثر در درمان بیماری‌ها، مورد استفاده قرار گرفته است. این تحقیق به منظور تأثیر دو محیط آب-خزّه و خاک پیت ماس بر تعداد کوکون-گذاری، وزن کوکون-ها و تلفات در زالوی مولد شرقی است.

روش کار: بدین منظور ۳۰۰ قطعه زالوی مولد به مدت ۴۵ روز در ۶ تیمار و هر تیمار ۳ تکرار: تیمار (۱) ۱۰ قطعه زالو در محیط آب-خزّه، تیمار (۲) ۱۵ قطعه زالو در محیط آب-خزّه، تیمار (۳) ۲۵ قطعه زالو در محیط آب-خزّه، تیمار (۴) ۱۰ قطعه زالو در خاک، تیمار (۵) ۱۵ قطعه زالو در خاک، تیمار (۶) ۲۵ قطعه زالو در خاک تقسیم شدند. زالوهای مولد در محیط آب-خزّه در وان‌های حاوی ۵۰ لیتر آب شهری بدون کلر در دمای ۲۸-۲۷ درجه سانتی-گراد نگهداری شدند. خزّه‌ها ۲ مرتبه در هفته کنترل و کوکون‌های داخل خزّه‌ها جمع-آوری شدند. زالوهای مولد در محیط خاک پیت ماس در ظروف پلاستیکی ۱۰ لیتری نگهداری شدند. خاک پیت ماس هفته ای ۳ مرتبه بررسی و جهت حفظ رطوبت آب پاشی و کوکون‌های داخل خاک پیت ماس جمع آوری و نگهداری شدند.

یافته‌ها: نتایج حاصل نشان داد تعداد کوکون‌های تولید شده در محیط آب-خزّه و خاک پیت ماس تفاوت معنی داری با یکدیگر نداشتند ($p > 0.05$). وزن کوکون‌های تولید شده در دو محیط اختلاف معنی داری با یکدیگر نداشتند ($p > 0.05$). هم چنین تعداد تلفات زالوهای مولد در دو محیط دارای اختلاف معنی داری با یکدیگر نبود ($p > 0.05$).

نتیجه گیری: با توجه به یافته‌های تحقیق پیشنهاد می‌گردد با توجه کمبود آب در کشور و کاهش هزینه‌های تولید در دوران تکثیر زالوهای مولد داخل خاک پیت ماس نگهداری شوند.

واژه‌های کلیدی: آب-خزّه، خاک پیت ماس، کوکون گذاری، تلفات، زالوی شرقی.

مقدمه

عدد در بریتانیا ۷ میلیون قطعه زالو در بیمارستان‌های لندن در سال ۱۸۶۳ ثبت شده است (۷). در سال‌های اخیر استفاده از زالو در امور پزشکی و درمانی در حال افزایش است (۲،۳). به عنوان مثال زالوی هیروودو مدیسینالیس توسط جراحان پلاستیک برای ترمیم رگ‌ها در بافت‌های پیوندی که گردش خون در آن‌ها یک مشکل است، استفاده می‌شود (۱۵،۳۴،۳۵،۳۶،۴۱). زالوها برای کاهش تورم بعد از جراحی پلاستیک استفاده می‌شوند و آن‌ها تنها منبع قدرتمند ضد انعقاد هیروودین هستند (۷). در

کاربرد زالو و زالو درمانی در طب سنتی تاریخچه طولانی دارد و از چندین قرن قبل از میلاد مسیح جهت خونگیری (phlebotomy) وجود داشته و سابق آن در روم باستان، یونان، هند و چین به اثبات رسیده است (۷). چندین بررسی در مورد تاریخچه زالو وجود دارد (۱۴،۳۰،۳۶،۳۸). اوج زالو درمانی در قرن ۱۹ میلادی بوده است. پزشکان فرانسوی بیشترین استفاده از زالو را داشته‌اند و میزان واردات آن به فرانسه در سال‌های ۱۸۲۴ تا ۱۸۴۳ بین ۱۹ میلیون تا ۵۷ میلیون متغیر بوده است. این

بزاق زالو آنزیم‌های هیرودین، انگلین، بدلین و هیستامین به عنوان گشادکننده عروق مشاهده شده است (۷). کشف هیرودین در سال ۱۸۸۴ به عنوان ماده ضد انعقاد خون در بزاق زالو، منجر به افزایش محبوبیت زالو شد (۸). زالوها ارگانسیم‌های ضروری اکوسیستم آبی هستند. در سراسر جهان ۶۵۰ گونه از زالو شناسایی شده است (۸). در اکوسیستم‌های آب شیرین، رودخانه و دریا زندگی می‌کنند (۱۳). در سال‌های اخیر برخی از جمعیت‌های زالو به دلیل سوء استفاده بیش از حد برای ماهیگیری (به عنوان طعمه)، اهداف دارویی و آلودگی آب‌ها به طرز چشمگیری کاهش یافته است (۳۸، ۳۶، ۳۳، ۳۰، ۵). زالو به طور گسترده به عنوان یک حیوان مدل در مطالعات سم‌شناسی، فیزیولوژیکی، عصبی، بیوشیمیایی و بافت‌شناسی استفاده می‌شود (۴۲، ۳۹، ۳۷، ۳۳، ۸). چندین عامل در پخش و توزیع زالو در محیط‌های آب شیرین مانند عمق آب، سختی آب، اکسیژن محلول، ماهیت بستر، کدورت و شوری موثر می‌باشد (۳۷، ۲۲). زالوها موجوداتی هرمافرودیت بوده و جهت جفت‌گیری به زالوی دیگری نیاز داشته تا اسپرم خود را منتقل نماید (۳۷). دارای دو بادکش در ابتدا و انتهای بدن خود می‌باشند. زالوها با کمک بادکش انتهایی جایگاه خود را ثابت و با کمک بادکش ابتدایی نقطه موردنظر را چسبیده و با سه ردیف آرواره خود برشی را ایجاد و خون میزبان را می‌مکند. زالوهای نوجوان در محیط طبیعی اولین وعده غذایی خود را از دوزیستان مصرف می‌کنند در حالی که وعده‌های غذایی بعدی را از دوزیستان، ماهی‌ها و یا پستانداران به دست می‌آورند (۲۷). در تکثیر و پرورش صنعتی عمدتاً زالوها از خون گاو، گوسفند، بز، شتر تغذیه می‌شوند و جهت جلوگیری از لخته شدن خون از هیپارین سدیم استفاده می‌گردد. در خلال مصرف خون زالو انقباضات هماهنگ ماهیچه‌ای را به کار برده تا خون را داخل چینه‌دان بکشاند (۳۷، ۲۰). زالو جهت هضم و جذب غذا

نیاز به باکتری همزیست آئروموناس دارد. آئروموناس یک باکتری گرم منفی و بی‌هوازی اختیاری بوده که سه کار مهم و اساسی شامل ترشح آنتی‌بیوتیک جهت جلوگیری از رشد دیگر باکتری‌ها (۳۷)؛ تولید ویتامین‌های گروه (B) (۵،۴۰) و تولید آنزیم‌هایی که در هضم غذا نقش دارند (۳۷) را انجام می‌دهد. وضعیت جغرافیایی و توپولوژی به دست آمده یک رابطه خواهری بین گونه هیروود اورینتالیس و هیروودو مدیسینالیس را نشان می‌دهد (۲، ۳۹). گونه هیروودو اورینتالیس ناحیه پشت سبز چمنی و دارای نقاط پشتی سیاه گرد و یا چهار گوش است در حالی که در گونه هیروودو مدیسینالیس نقاط پشتی دراز و کشیده هستند. الگوی رنگ آمیزی ناحیه شکمی در گونه هیرو اورینتالیس منظم و بر روی یک پس زمینه عمدتاً سیاه قرار می‌گیرند، در حالی که رنگدانه‌های شکمی در گونه هیروودو مدیسینالیس به صورت الگوی نامنظم و اصطلاحاً جزیره ای پخش شده اند (۳۹). زالوها (clitellates) به وسیله ناحیه کلایتلومی قابل شناسایی و تشخیص هستند. ساختار این ناحیه ناپایدار بوده و برآمدگی و برجستگی در آن به عنوان بلوغ جنسی سیستم تولید مثلی ماده عنوان می‌شود (۲۱، ۲۲). در گونه هیروودو مدیسینالیس ناحیه کلایتلومی شامل ۱۵ حلقه است (۲۴). در حالت غیر تولید مثلی، سلول‌های غده ای ناحیه کلایتلومی به ندرت از سلول‌های معمولی غشایی قابل تشخیص می‌باشند (۹، ۱۹). در خلال فصل تولید مثلی سائز و محتوای ترشحاتی این سلول‌ها بسیار افزایش یافته، تا اندازه ای که کلایتلوم به شکل ناحیه خارجی قابل رویت می‌شود (۱۱، ۲۲). در اکثر گونه‌های زالو ۴ نوع سلول غددی در ناحیه کلایتلومی در تشکیل کوکون نقش دارند (۲۲). Vinkier و Malecha (۱۹۸۳) این سلول‌ها را از طریق محتوای ترشحاتی و توزیع در سلول‌های عصبی بدن زالو تشخیص دادند. از لحاظ شیمیایی کوکون حاوی پروتئینی شبیه به کراتین بوده و در ساختار آن کیتین و

خشکی داشته و در حاشیه آب‌بندان‌ها، روی چوب و خزه بعد از جفت‌گیری و انتقال اسپرم و در صورت ایجاد شرایط بهینه کوکون گذاری می‌کند. نوزادان خارج از کوکون، مستقل از والد خود بوده و ممکن است به دلیل رژیم غذایی متفاوت میزان بقا و رشد متفاوتی داشته باشند (۳۱، ۳۷). در ایران معمولاً تکثیر زالو و کوکون گذاری در بستر خزه-آب انجام می‌شود. خزه‌ها گیاهانی هستند که معمولاً در محیط‌های مرطوب و جنگل‌ها می‌رویند. تخته سنگ‌ها، تنه درختان در نقاط مردابی و جنگلی معمولاً پوشیده از خزه است. خزه‌ها امکان نگهداری رطوبت را در خود دارند و به همین دلیل در تکثیر زالو از آن‌ها استفاده می‌شود. در سال‌های اخیر با توجه به کمبود آب، افزایش هزینه آب و علاقه مندی به پرورش زالو در مناطق کم آب توجه به تکثیر در بسترهای مانند خاک پیت ماس که مصرف آب به مراتب کمتری دارند، بیشتر شده است. خاک پیت ماس بقایای نوعی خزه و جلبک است و تا چندین برابر وزن خود آب جذب می‌کند و pH خنثی دارد. خاک پیت ماس عمدتاً وارداتی بوده و از کشورهایی مانند هلند، روسیه، آلمان و استونی به ایران وارد می‌شود. کثیر و پرورش زالو برای اهداف پزشکی و تجاری از پتانسیل بالایی در دنیا برخوردار است (۱). البته در ایران نیز تکثیر و پرورش زالو با همین اهداف انجام می‌شود. به طوری که در سال‌های اخیر تکثیر و پرورش زالو در ایران با سرعت در حال رشد و پیشرفت می‌باشد؛ لذا پیدا کردن راه کارهایی که به تولید هر چه بهتر و با هزینه کم تر به پرورش دهندگان کمک کند، در این راستا ارزشمند است. در این بررسی، مقایسه تاثیر دو محیط متفاوت آب-خزه و خاک پیت ماس بر میزان کوکون گذاری، وزن کوکون و تعداد تلفات زالوی مولد هیروود اورینتالیس مورد ارزیابی قرار گرفت.

کلاژن موجود نمی‌باشد. کوکون دارای خاصیت الاستیک و کشسانی است و حالت اولیه خود را حفظ می‌کند (۳۷). زالو توسط غدد ترشحی ناحیه کلایتلومی داخل کوکون آلبومین ترشح می‌کند تا زالوها پس از خروج از تخم از آن تغذیه کنند (۳۷). در مدت فرآیند تولید مثل زالوی مولد ناحیه کلایتلوم خود را بر روی خاک قرار داده و کوکون را ترشح می‌کند. کوکون یک کیسه نرم و بی‌رنگ است و معمولاً دارای ۱۰ عدد تخم است که در داخل محلول غذایی چسبناک قرار می‌گیرد (۱). اجزا کوکون‌ها از غدد های تخصص یافته واقع در بخش داخلی قسمت های جنسی (Clitellar) رها می‌شوند. سپس غشا کوکون از سر زالو خارج و هر دو انتهای آن بسته می‌شود (۲۶). زالو کمربند پر از کف سفید رنگی را در ناحیه کلایتلومی خود ترشح می‌کند. سپس کوکون را در وسط آن کف قرار می‌دهد. آن کف سفید رنگ به مرور زمان سفت و تبدیل به غشا اسفنجی اطراف کوکون می‌شود (۲۹). کوکون‌های تازه تولید شده در ۳ الی ۵ روز ابتدایی انعطاف پذیر بوده و به تدریج بر اساس رشد جنین و مصرف آلبومین روزنه‌های هوایی در داخل کوکون ایجاد می‌شود و بعد از ۱۰ روز درپوش کوکون شروع به باز شدن می‌کند (۲۹). در مدت فرآیند تولید مثل زالوهای مولد کوکون‌های را ترشح می‌کنند که از تخم‌های در حال رشد محافظت می‌کند (۳۷). جنین‌ها بعد از خروج از تخم وابسته به مایع آلبومین داخل کوکون هستند و بعد از خروج از کوکون مستقل از کوکون هستند (۲۷). زالو کوکون‌های حاوی چند تخم را در حد فاصل آب و خشکی می‌گذارند (۳۸). برخی زالوها پيله های خود را که دارای پوشش بیرونی سخت هستند، در میان خزه، برگ یا هوموس به عنوان محافظت از شکارچیان قرار می‌دهند (۳۷). زالوها خاک مرطوب خارج از آب و یا مکان‌هایی در مناطق ساحلی را جهت کوکون گذاری ترجیح می‌دهند (۳۷). زالوی شرقی در باروری گرایش به

مواد و روش ها

این پژوهش در کارگاه شرکت ارمغان سلامت آوید در روستای کریم آباد ایلوار از اوایل اردیبهشت سال ۹۷ لغایت ۱۵ خرداد ۱۳۹۷ به انجام رسید. بدین منظور تعداد ۳۰۰ قطعه زالوی مولد در سالنی به ابعاد ۸۰ متر مربع در ۶ تیمار با تعداد ۱۰، ۱۵، ۲۵ و ۳۰ قطعه زالو و هر تیمار ۳ تکرار در دو محیط متفاوت آب - خزّه و خاک پیت ماس قرار گرفتند. تیمار ۱۰، ۱۵، ۲۵ و ۳۰ قطعه زالو در محیط آب - خزّه (تیمار ۱)، تیمار ۱۵، ۲۵ و ۳۰ قطعه زالو در محیط آب - خزّه (تیمار ۲)، تیمار ۱۰، ۱۵، ۲۵ و ۳۰ قطعه زالو در خاک (تیمار ۳)، تیمار ۱۰، ۱۵، ۲۵ و ۳۰ قطعه زالو در خاک (تیمار ۴)، تیمار ۱۵، ۲۵ و ۳۰ قطعه زالو در خاک (تیمار ۵)، تیمار ۱۰، ۱۵، ۲۵ و ۳۰ قطعه زالو در خاک (تیمار ۶) مشخص شدند. متوسط وزن زالوهای مولد 0.90 ± 0.05 بود. سن زالوهای مولد حدود یک سال و همگی طی ۹ مرحله از خون تازه گوسفند تغذیه شده بودند. دمای آب جهت رشد، نگهداری و جلوگیری از تلفات زالوها ۱۸ درجه سانتی گراد بود. جهت آماده سازی محیط آب - خزّه، ۹ عدد وان به ابعاد $110 \times 90 \times 25$ به میزان ۵۰ لیتر آب شهری بدون کلر با دمای ۲۸-۲۷ درجه سانتی گراد پر شد. آب وان ها یک روز در میان به میزان ۵۰ درصد تعویض گردید (۴۴). جهت از بین بردن کلر آب، آب شهری مورد استفاده مدت ۴۸ ساعت در مخزن ۲ هزار لیتری نگهداری شد. پارامترهای کیفی آب از قبیل اکسیژن محلول در آب، pH، شوری و دما به صورت روزانه اندازه گیری و ثبت شدند. دما، pH و اکسیژن محلول با استفاده از دستگاه دیجیتالی (Horiba U10, Japan) اندازه گیری شد. میزان آمونیاک کل آب بر اساس روش (Verdouw et al. 1978) اندازه گیری شد. جهت هم دمایی آب مخزن به ابعاد ۲ هزار لیتر در سالن تعبیه گردید. جهت جلوگیری از فرار زالوها روی وان با توری پلاستیکی پوشیده و به مدت ۷۲ ساعت جهت آداپتاسیون زالوها در نظر گرفته شد. بعد از آداپتاسیون در

هر وان دو عدد سبد خزّه گذاشته و در طی مدت کوکون گذاری هفته ای دو مرتبه خزّه ها به آرامی کنترل و کوکون ها از داخل خزّه ها جمع آوری و درون بستری از خزّه در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ روز نگهداری شدند (۲۹، ۴۴). جهت آماده سازی محیط خاک پیت ماس ۲۰ کیلوگرم خاک پیت ماس از شرکت صنعت سبز آسمان خریداری گردید. خاک پیت ماس را در لگن ریخته و به ازای هر ۱ کیلوگرم خاک پیت ماس یک لیتر آب ریخته و مخلوط شدند. سپس خاک پیت ماس به شکل گلوله در داخل ظروف پلاستیکی ۱۰ لیتری تعداد ۱۰ عدد گلوله خاک پیت ماس قرار گرفت. دمای خاک پیت ماس ۲۸-۲۷ درجه سانتی گراد بود. رطوبت خاک پیت ماس هفته ای سه مرتبه چک شد. میزان رطوبت گلوله خاک در حدود ۷۰ تا ۷۵ درصد بود و با افزودن آب بدون کلر رطوبت آن ها حفظ و از خشک شدن آن ها جلوگیری شد (۲۵). هم زمان کوکون های تولید شده از داخل ظروف ۱۰ لیتری خارج و درون بستری از خاک پیت ماس در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ روز نگهداری شدند (۲۹، ۴۴).

زیست سنجی و بررسی شاخص های رشد، وزن کوکون ها و بازماندگی زالوها

اندازه گیری وزن زالوهای مولد در ابتدای دوره و وزن کوکون ها با استفاده از ترازوی دیجیتالی با دقت 0.01 گرم انجام شد. متوسط وزن زالوهای مولد 0.90 ± 0.05 گرم بود. متوسط وزن لاروها 0.1 ± 0.02 گرم بود. اندازه گیری لاروها با استفاده از خط کش با دقت ۱ میلی متر انجام شد. متوسط اندازه لاروها 4 ± 15 میلی متر بود. هم چنین میزان بازماندگی زالوها با مقایسه تعداد آن ها در انتهای دوره به دست آمد.

تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل داده ها با استفاده از نرم افزار آماری SPSS نسخه ی ۱۶ از آنالیز واریانس یک طرفه و به منظور تعیین اختلاف معنی داری در صورت موجود بودن بین

ولی از نظر محیط کوکون گذاری با هم تفاوت داشتند و دارای اختلاف معنی داری نبودند ($p > 0/05$). در تحقیق انجام شده و طبق جدول ۱ میانگین تعداد لارو تولید شده در دو تیمار ۳ و ۶ دارای اختلاف معنی داری با یکدیگر نبود ($p > 0/05$). در پژوهش انجام شده تعداد کوکون تولید شده (محیط آب-خزه) در تیمار ۳ (۲۵ قطعه زالو) دارای اختلاف معنی داری با تیمار ۲ (۱۵ قطعه زالو) و تیمار ۱ (۱۰ قطعه زالو) بود ($p < 0/05$)؛ اما اختلاف معنی داری بین تیمار ۱ و ۲ مشاهده نشد ($p > 0/05$).

در تحقیق انجام شده تعداد کوکون تولید شده (محیط خاک پیت ماس) در تیمار ۶ (۲۵ قطعه زالو) دارای اختلاف معنی داری با تیمار ۵ (۱۵ قطعه زالو) و تیمار ۴ (۱۰ قطعه زالو) بود ($p < 0/05$)؛ اما اختلاف معنی داری بین تیمار ۴ و ۵ مشاهده نشد ($p > 0/05$). در بررسی های به عمل آمده (طبق جدول ۲) میانگین وزن کوکون ها در ۶ تیمار اختلاف معنی داری با یکدیگر نداشتند ($p > 0/05$). در بررسی های انجام شده (جدول ۲) درصد بازماندگی زالوهای مولد در تیمارهای آب-خزه و خاک پیت ماس اختلاف معنی داری با یکدیگر نداشت ($p > 0/05$).

میانگین ها، از آزمون تفکیکی دانکن در سطح احتمال $\alpha = 0/05$ صورت گرفت.

نتایج

در بررسی به عمل آمده (جدول ۱) میانگین تعداد کوکون بین تیمار ۱ (۱۰ قطعه زالو در محیط آب-خزه) و تیمار ۴ (۱۰ قطعه زالو در محیط خاک پیت ماس) اختلاف معنی داری وجود نداشت ($p > 0/05$). در تحقیق انجام شده تعداد کوکون تولید شده در دو تیمار ۲ و ۵ با توجه به اختلاف در محیط کوکون گذاری دارای اختلاف معنی داری نبود ($p > 0/05$). در بررسی های به عمل آمده (جدول ۱) تیمار ۳ با ۲۵ قطعه زالو در محیط آب-خزه و تیمار ۶ با ۲۵ قطعه زالو در محیط خاک اختلاف معنی داری مشاهده نشد ($p > 0/05$). در پژوهش انجام شده میانگین تعداد لارو تولید شده در تیمار ۱ (۱۰ قطعه زالو در محیط آب-خزه) با تیمار ۴ (۱۰ قطعه زالو در محیط خاک پیت ماس) که از نظر تعداد باهم برابری بودند، دارای اختلاف معنی داری نبود ($p > 0/05$). در تحقیق انجام شده (جدول ۱) میانگین تعداد کوکون تولید شده در تیمار ۲ و تیمار ۵ که از نظر تعداد زالو با یکدیگر برابر بودند

جدول ۱- تعداد کوکون و لاروهای به دست آمده از تیمارهای مختلف زالو گونه هیروود اورینتالیس

متغیر	تیمار ۱	تیمار ۲	تیمار ۳	تیمار ۴	تیمار ۵	تیمار ۶
کوکون (تعداد)	$9 \pm 3/51^d$	$13 \pm 1/77^{cd}$	$20 \pm 1/16^{ab}$	$12 \pm 1/53^{cd}$	$16 \pm 1/53^{bc}$	$23 \pm 2/08^a$
لارو (تعداد)	$83/33 \pm 33/74^c$	$129 \pm 15/23^{bc}$	$200 \pm 20/07^a$	$117 \pm 18/01^{bc}$	$165 \pm 24/41^{ab}$	$223 \pm 16/51^a$
	$(20-135-95)^*$	$(159-108-122)^*$	$(180-180-240)^*$	$(135-81-135)^*$	$(130-153-212)^*$	$(190-240-239)^*$

حروف انگلیسی غیر مشترک در هر ستون، نشان دهنده اختلاف معنی دار می باشد ($p < 0/05$)

* اعداد داخل پرانتز به صورت میانگین تکرارها می باشد.

جدول ۲- میانگین وزن کوکون و درصد بازماندگی در تیمارهای مختلف زالو گونه هیروود اوریتنالیس

متغیر	تیمار ۱	تیمار ۲	تیمار ۳	تیمار ۴	تیمار ۵	تیمار ۶
وزن کوکون (گرم)	۱/۱۰ ± ۰/۰۵ ^a	۱/۱۰ ± ۰/۱۱ ^a	۱/۱۰ ± ۰/۰۵ ^a	۱/۰۰ ± ۰/۰۵ ^a	۱/۰۳ ± ۰/۱۴ ^a	۱/۱۰ ± ۰/۰۵ ^a
بازماندگی (درصد)	۸۸/۳۳ ± ۳/۳۳ ^a	۷۵/۵۵ ± ۸/۰۱ ^a	۸۴/۰۰ ± ۲/۳۰ ^a	۸۰/۰۰ ± ۵/۷۷ ^a	۷۳/۳۳ ± ۳/۸۵ ^a	۸۲/۶۶ ± ۳/۵۲ ^a

حروف انگلیسی غیر مشترک در هر ستون، نشان دهنده اختلاف معنی دار می باشد (p < ۰/۰۵).

بحث و نتیجه گیری

گونه هیروود مدیسینالیس در محیط های طبیعی و باتلاقی معمولاً در مکانی مرطوب و درست بالاتر از خط آب و در ساحل کوکون گذاری می کند. در کشور مالزی، تایلند و ویتنام زالوهای مولد جهت کوکون گذاری در محیط گل نگهداری می شوند (۴۴). زالو هنگام کوکون گذاری جهت تنفس به محیط مرطوب نیاز دارد. از طرفی کوکون تولید شده جهت جلوگیری از خشک شدن و از دادن رطوبت باید در محیط مرطوب نگهداری شود. Zulhisyam و همکاران (۲۰۱۱) جهت کوکون گذاری زالوهای مولد در محیط آب از خاک مرطوب با سیستم جزیره سازی در محیط پرورش استفاده کردند. آن ها جهت تغذیه زالوها از خون مارماهی و یک نوع خون دستی استفاده کردند. در تحقیق حاضر تعداد کوکون و وزن کوکون ها تولید شده در دو بستر آب-خزه و خاک پیت ماس در تراکم مشابه تفاوت معنی داری با یکدیگر نداشتند. علت آن را با توجه کوکون گذاری زالو در محیط مرطوب و خارج از آب و تا حدی تاریک، می توان تامین رطوبت لازم جهت تنفس و تبادل گازهای تنفسی زالو در هر دو بستر آب-خزه و خاک پیت ماس دانست. همچنین در این تحقیق تعداد لارو تولید شده در دو محیط آب-خزه و خاک پیت ماس در تراکم های مشابه اختلاف معنی داری با یکدیگر نداشتند و تفاوت در محیط تأثیری بر افزایش و یا کاهش تولید لارو نداشت. Ceylan و همکاران (۲۰۱۹) در تحقیقی بر روی زالوی مولد *Hirudo* در محیط خاک پیت ماس به این نتیجه رسیدند تعداد ۲ عدد زالوی مولد در هر لیتر تراکم مناسبی برای تکثیر زالو است. لازم به ذکر است آن ها زالوهای مولد را با خون تازه گاو تغذیه کرده بودند و زالوها به مدت ۴ ماه

ترکیبات شیمیایی و محتوی انرژی خون میزبان، عملکرد تولید مثل زالو و کوکون گذاری را تحت تأثیر می گذارد. این عوامل در رشد و بقای زالو نیز مهم و تأثیرگذار است (۳۶). Mcloughlin, Davies (۱۹۶۶) نشان دادند زالو بعد از ۸ الی ۹ بار تغذیه و به فاصله هر ماه یک بار و بعد از ۲۸۹ روز به بلوغ جنسی رسیدند و قابلیت تکثیر و تولید کوکون داشتند. زالوی مولد بعد از رسیدگی اسپرم در کیسه های اسپرمی و انتقال به اندام های جنسی، آماده جفت گیری و کوکون گذاری در فصل گرم می شود (۳۷). زالوی شرقی در باروری گرایش به خشکی داشته و در حاشیه آب بندان، روی چوب و خزّه در صورت ایجاد شرایط بهینه کوکون گذاری می کند (۳۱). Ceylan و همکاران (۲۰۱۹) در یک مطالعه نشان دادند از مجموع ۹۳ زالو مولد *Hirudo verbena* با وزن متوسط ۵/۱۹۴/۰۶ ± در خاک پیت ماس تعداد ۱۲۶ کوکون در ۶۰ روز جمع آوری شد. در تحقیقی دیگر Ceylan و همکاران (۲۰۱۵) نشان دادند که از ۲۵ زالو با وزن متوسط ۶/۲۹۱/۲۰ ± تعداد ۱۰۶ کوکون در خاک پیت ماس جمع آوری گردید. در مطالعه حاضر در دو محیط آب-خزه و خاک پیت ماس از مجموع ۳۰۰ قطعه زالوی مولد تعداد ۲۷۸ عدد کوکون جمع آوری شد. دلیل تفاوت در تعداد کوکون گذاری را می توان تفاوت در نوع گونه، تغذیه مولدین و روش نگهداری مولدین دانست. Zhang و همکاران (۲۰۰۸) نشان دادند زالوها در بالای خاک و در محیط مرطوب و خارج از آب کوکون گذاری می کنند. این مکانیسم مشابه کوکون گذاری در محیط طبیعی و مزارع برنج است. Elliot و Mann (۱۹۷۹) زالوی مولد

قطعه زالو) و تیمار ۲ (۱۵ قطعه زالو) هم دارای اختلاف معنی داری نبود. هم چنین در مطالعه حاضر تعداد لارو و کوکون تولید شده در محیط خاک پیت ماس در تیمار ۶ (۲۵ قطعه زالو) نسبت به تیمار ۴ با ۱۰ قطعه زالو و تیمار ۵ با ۱۵ قطعه زالو بالاتر بود. از طرفی این افزایش تراکم بر روی تلفات زالوی مولد در ۳ تیمار محیط خاک پیت ماس تاثیری نداشت. با توجه به یافته‌های پژوهش می‌توان احتمال داد افزایش تراکم زالوها باعث افزایش جفت‌گیری و انتقال اسپرم در زالوهای مولد شده و این افزایش جفت‌گیری منجر به تولید کوکون بیشتر و هم چنین افزایش تعداد لارو شود. البته با توجه کمبود اطلاعات و منابع در مورد زالوی هیروود اورینتالیس می‌بایست مطالعات بیشتری با تراکم‌های متفاوت در این باره انجام پذیرد. ممکن است افزایش بیش از حد تراکم زالوی مولد منجر به افزایش تلفات و یا کاهش تولید کوکون و لارو شود. در پایان با توجه به یافته‌های تحقیق، پیشنهاد می‌گردد در کارگاه‌های تکثیر زالو با توجه به طولانی بودن مدت تکثیر (۲ الی ۳ ماه) به جهت صرفه جویی در مصرف آب و امکان پرورش در مناطق کم آب، کم شدن فضای تکثیر، کاهش هزینه‌های برق و گاز جهت سرمایش و گرمایش محیط خاک پیت ماس جایگزین بستر آب-خزه شود.

در دمای ۲۸-۲۷ درجه سانتی گراد محیط نگهداری شدند. Zhang و همکاران (۲۰۰۸) در یک مطالعه تعداد ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰ و ۵۰ قطعه زالوی مولد *Hirudinaria manillensis* در ۱۲۵ لیتر آب بدون کلر در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد جهت کوکون گذاری نگهداری و مشاهده کردند بالاترین تعداد کوکون تولید شده در تیمار ۵ قطعه زالوی مولد در هر لیتر آب بود. زالوهای مولد همگی از خون تازه و هپارینه گاو تغذیه شدند. Zulhisyam و همکاران (۲۰۱۱) در تحقیقی جهت به‌دست آوردن شرایط بهینه برای تکثیر زالوی مولد (Buffalo Leech) مخازن بتنی هزار لیتری را از آب بدون کلر پر کرده و تعداد ۱۰۰۰ زالو در آن رها کردند. آن‌ها جهت کوکون-گذاری از خاک (جزیره مرطوب) استفاده کردند. Mcloughlin, Davies (۱۹۶۶) در مطالعه ای ۳۰ عدد زالوی مولد *Hirudo medicinalis* را در ۳۰ عدد آکواریوم ۵ لیتری که حاوی ۱ لیتر آب بدون کلر بود، نگهداری کردند. در تحقیق حاضر تولید کوکون و لارو در محیط آب خزه در تیمار ۳ با تراکم ۲۵ قطعه زالو نسبت به تیمار ۱ با تراکم ۱۰ قطعه زالو و تیمار ۲ با تراکم ۱۵ قطعه زالو بالاتر بود. از طرفی افزایش تراکم زالوها در این سه تیمار تاثیری بر میزان تلفات زالوهای مولد نداشت. تولید کوکون و تولید لارو بین تیمار ۱ (۱۰

منابع

1. Abdul Kari, A.K., Che O. (2011). Optimization of growth conditions of *Hirudinea* sp. Australian Journal of Basic and Applied Sciences, 5(3); 268-275.
2. Baskova, I.P., Cherkesova, D.U., Mosolov, V.V., (1983). Hirudin from leech heads and whole leeches and "pseudo-hirudin" from leech bodies. Thrombosis Research 30 (5); 459-467.
3. Baskova, I.P., Khalil, S., Nartikova, V.F., Paskhina, T.S., (1992). Inhibition of plasma kallikrein, kininase and kinin-like activities of preparations from the medicinal leeches. Thrombosis Research 67 (6); 721-730.
4. Blackshaw, S.E., Nicholls, J.G. (1995). Neurobiology and development of the leech. Journal of Neurobiology, 27 (3); 267-276.
5. Buchner, P. (1965). Endosymbiosis of animals with plant microorganisms. Book in Germany. Endosymbiose, PP. 371-5.
6. Davies, R.W., 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.
7. Elliott, J.M., 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.
8. Elliott, J., Kutschera, U. (2011). Medicinal leeches: Historical use, ecology, genetics and conservation. Freshwater Journal, 4(21); 41.
9. Elliott, J.M., 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.
10. Elliot, J.M., Mann, K.H. (1979). A key to the British freshwater leeches with notes their life cycle and ecology. Fresh water Biological. Scientific Publication ,40;1-72.
11. Farnesi, K., Vagnetti, A. (1973). Esterase activity in certain glands of leech. *Comp. Biochem. Physiol*, 25(2); 447-56.
12. Gondran, E. (1955). The effect of selected free-living and oligochaetes (Annelida). *Acta Mus Maced. Sic*, 2(10/21); 199-221.
13. Gouda, H.A. (2006). The effect of peritrich ciliates on some freshwater leeches from Assiut, Egypt. *Journal of Invertebrate Pathology.*, 93; 143-149.
14. Herter, K. (1968). *Der medizinische Blutegel und seine Verwandte*. In *Die Neue Brehm-Biicherei*, No. 381. Berlin, Wittenberg Lutherstadt, A. Ziemsen Verlag.
15. Huang, A.M., Li, Z.Y., Liao, G.S., Huang, H.K., Ban, J.D., Lin, F.Q. (2006). The anticoagulant effect of Bufrudin on human plasma in vitro and rabbit plasma in vivo. *Journal of Guangxi Medical University*, 23(1); 30-32 (In Chinese).
16. Huguet, G., Molinas, M. (1992). Changes in epithelial cells in *Hirudo medicinalis* during wound healing. *Journal of Invertebrate Pathology*, 59; 11-17.
17. Huguet, G., Molinas, M. (1996). Myofibroblast-like cells and wound contraction in leech wound healing. *Journal of Experimental Zoology*, 275; 308-316.
18. Lapkina, L.N. (1992). Comparative study of lethal and sublethal effects of trichlorphon on leeches. *Information bulletin IBVV. RAN*, 94; 67-73 (In Russian).
19. Lent, C. M., Dickinson, M. (1988). The neurobiology of feeding in leeches. *Scientific*, 258(6); 98-103.
20. Malecha, J. (1979). Contribution a l etude de la biologie de sciences et Techniques de Lille. no. 423. 160pp., 242 figes.
21. Malecha, J., Prensier, G. (1974). Particularites ultrastructurales de la meiose chez *Branchellion trpedinis* (Sav), 20; 81a-82a.
22. Malecha, J., Vinkier, B. (1983). L, osmo regulation chez *Hirudinee rhynchobdelle* (O.F.M). *Location experimental de la .Gen.Comp. Endocrinol*, 49; 344-51.
23. Mann, K.H. (1954). The anatomy of the horse leech. *Haemopsis sanguisuga*(L) with particular reference to the excretory system. *Proc. Zool*, 124; 69-88.
24. Mann, K.H. (1962). *Leeches (Hirudinea): Their structure, physiology. Ecology and Embryology*, p. 200. Oxford, London.
25. Mason, T.A., Mcllroy, P.J., Shain, D.H. (2004). A cysteine-rich protein in the *Theromyzon* (Annelide: Hirudinea) cocoon membrane. *FEBS Letters.*, 561; 167-172.
26. Marotta, R., Shain, D.H. (2007). Irregular helicoids in leech cocoon membranes. *Journal of Structural Biology*, 158; 336-343.
27. Murat M., Mustafa C., Hakan M. (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.
28. Mustafa, C., Osman, C., Ramazan, K., Ufuk, A. (2015). Reproduction efficiency of the medicinal leech *Hirudo verbana* Carena, 1820. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 15; 411-418.
29. Payton, B. (1981). History of medicinal leeching and early medical references. In *Neurobiology of the leech*, ed. by K.J. Muller, J.G. Nicholls and G.S. Stent, 27-34. Cold Spring Harbor Laboratory, USA.
30. Peterson, E.L. (1983). Visual processing in the leech central nervous system. *Nature* 303; 240-2.
31. Petrauskienė, L. (2001). Water toxicity assessment using medicinal leeches. *Aquatic Ecosystem Health & Management*, 4; 203-208.
32. Petrauskienė, L. (2003). Water and sediment toxicity assessment by use of behavioural responses of medicinal leeches. *Environment International*, 28; 729-736.
33. Rigbi, M., Levy, H., Iraqi, F., Teitelbaum, M., Orevi, M., Alajoutsijärvi, A. (1987). The saliva of the medicinal leech *Hirudo medicinalis* I. Biochemical characterization of the high molecular weight fraction. *Comparative Biochemistry and Physiology B*, 87(3); 567-573.
34. Roters, F.J., Zebe, E. (1992). Proteinases of the medicinal leech, *Hirudo medicinalis*: purification and partial characterization of three enzymes from the digestive tract. *Comparative Biochemistry and Physiology B*, 102; 627-634.
35. Sawyer, R. (1986). *Leech biology and behaviour*, Volume I. Clarendon Press. Oxford.
36. Sawyer, R., 1986. *Leech biology and behaviour*, Volume II. Clarendon Press. Oxford.
37. Simmonds, P. L. (1870). The trade in leeches. *Pharm. J.*, 3; 521-2.
38. Utevsky, S., Trontelj, P. (2005). A new species of the medicinal leech (Oligochaeta, Hirudinida, *Hirudo*) from *Trans caucasia* and an

identification key for the genus *Hirudo*. *Parasitol Res*, 98;61–66.

39. Wigglesworth, V.B. (1965). *The principles of insect physiology*. Methuen, London, 195-306.

40. Whitaker, I.S., Izadi, D., Oliver, D.W., Monteath, G., and Butler, P.E. (2004). *Hirudo medicinalis* and the plastic surgeon. *British Journal of Plastic Surgery*, 57; 348–353.

41. Wells, S., Coombes, W. (1987). The status of and trade in the medicinal leech. *Traffic Bulletin*, 8; 64–69.

42. Yang, T. (1996). *Fauna sinica* (Annelida Hirudinea). Science Press, Beijing, China, pp: 117-129 (In Chinese).

43. Zhang, B., Lin, Q., Lin, X. (2008). Effects of broodstock density and diet on reproduction and juvenile culture of the leech, *Hirudinaria manillensis* Lesson, 18421276(1-4); 198-204 .

45. Zulhisyam, A.K., Anwar Ismail, A., Che Omar, I. (2011). Optimization of growth conditions of *Hirudinea* sp. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 5(3); 268-275.



The Effect of Two Environment Water - Moss and Peat Moss Soil on the Number of Cocoons, the Weight of the Cocoon and the Number of Casualties of Oriental Leech (*Hirudo orientalis*)

H. Bidmal¹, M. Sudagar ²

1. MSc student :Department of Aquaculture, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. bidmal@gau.ac.ir

2. Associate Professor. Department of Aquaculture, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

Received:2020.13.7

Accepted: 2020.20.9

Abstract

Inroduction & Objective: In recent years, leeches have been used to treat some diseases, extract many enzymes and substances that are effective in treating diseases. This study aims to influence the two environments of water-moss and peat moss soil on the number of cocoons, the weight of the cocoons and the losses in the oriental leech

Material and Methods: For this purpose, 300 productive leeches for 45 days in 6 treatments and 3 repetitions per treatment: treatment (1) 10 leeches in water-moss, treatment (2) 15 leeches, treatment (3) 25 pieces Leeches, treatment (4) 10 pieces of leeches in Peat mosss, treatment (5) 15 pieces of leeches, treatment (6) 25 pieces of leeches. Reproductive leeches were kept in a water-moss environment in tanks containing 50 liters of chlorine-free water at 28-27°C. The mosses were controlled and sprayed twice a week, and the cocoons inside the mosses were collected and stored at 25°C. Productive leeches were kept in a 10-liter plastic container in the soil of Peat mosss. The peat moss soil was inspected 3 times a week and sprayed to retain moisture, and cocoons were collected inside the moss soil and stored at 25 °c in the peat moss soil.

Results: The results showed that the number of cocoons produced in water-moss and paet moss soil did not differ significantly ($p > 0.05$). The weight of the cocoons produced in the two environments did not differ significantly ($p > 0.05$). Also, the number of casualties of productive leeches in the two environments showed no significant cifferece ($p > 0.05$).

Conclusion: According to the findings of the study, it is recommended to be kept in the soil of Peat moss during the reproduction of productive leeches due to the blue water in the country and the reduction of production costs.

Keywords: Water-Moss, Peat Moss Soil, Cocooning, Casualties, Oriental Leeches.