**Journal of Aquaculture Development**
**Vol. 20, No. 4, 2027, Pages: 34-48**
**DOI:10.71901/jad-2026-1-867**

**RESEARCH PAPER** **OPEN ACCESS**

# The effect of blood and water containing *Lactobacillus plantarum* bacteria on the growth period of native Iranian medical leech (*Hirudo orientalis*) in vitro conditions

**Niloufar Parchami[1], Saeed Safavipour [1*], Hassan Mohabatkar[2], Mandana Behbani Esfahani[1]**

1-Department of Biotechnology, University of Isfahan, Isfahan, Iran
2- Young Researchers and Elites Club of Iran, Isfahan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran

**Received: 1 May 2025** **Accepted: 15 July 2025**

**Extended Abstract:**

**Introduction:** Leeches are one of the aquatic mollusks that have been of interest in the field of traditional medicine and treatment since long ago. one of the problems of the leech breeders is the time of quarantine and blood digestion by the leech between two feed, which causes the leeches to grow later and reach the desired size to be presented to the market. Therefore, the use of advanced techniques for faster and higher quality leech larvae breeding from birth to the market stage is one of the most important goals of the leech industry. The use of probiotics in livestock and aquatic animals facilitates the digestion of feed, but so far no research has been conducted on the indigenous Iranian medicinal leech (*Hirudo orientalis*).our goal in this research is to reduce the growth period and increase the power of blood digestion by adding the probiotic bacterium *Lactobacillus plantarum* as a nutritional supplement to the blood and water of leeches.

**Materials and Methods**: This study was conducted with seven treatments and five replications in laboratory conditions with a one-way statistical design. The treatments included blood and water each containing Lactobacillus plantarum bacteria with a concentration of $10^8$ CFU/mL, $10^6$ CFU/mL, and $10^4$ CFU/mL, and the control group without any concentration of bacteria. after feeding, 1 ml of *Lactobacillus plantarum* bacteria with a certain concentration was added to 200 ml of water for three skin absorption treatments. For blood feeding of leeches, a container containing water at a temperature of 25 °C was used to maintain a constant water temperature in which the leeches were located. The blood temperature was 38 °C to provide optimal conditions for leeches to feed. For feeding, one container was filled with water at 48 °C and another container was placed on top of it, so that the bottom of the upper container was in contact with the water surface of the lower container, and then water at a temperature of 38 °C was poured into the upper container, and the blood that had been in a shaking incubator at a temperature of 38 °C for 5 minutes was poured into latex gloves.

**Results and Discussion:** the results showed that Lactobacillus plantarum probiotic supplement with a concentration of $10^8$ CFU/mL through blood and also through skin absorption (dissolved in the water of leeches) had the greatest effect on the rapid digestion of consumed blood and the significant growth of

[ Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-07 ]

[ DOI: 10.71901/jad-2026-1-867 ]

leeches ($p< 0.05$), so it can be concluded that the use of some bacteria during leech breeding can increase farm productivity, shorten the growth period and accelerate the return on investment of leeche. However, based on relevant studies in aquatic animals and other animals, the following possible mechanisms can be deduced in leeches:

a) Improving the balance of the intestinal microbiome and inhibiting pathogens

b) Production of antimicrobial compounds:

c) Increasing the activity of leech digestive endocrine enzymes:

d) Strengthening intercellular bonds: Probiotics (Lacticaseibacillus rhamnosus) prevent the leakage of inflammatory compounds resulting from blood digestion into the leech body by increasing the production of tight junction proteins. They can also prevent damage to intestinal tissue and improve digestive health by reducing the production of inflammatory cytokines (such as TNF).

**Conclusion:** The importance of adaptation implicates the gut microbiome in vital functions of leeches, such as regulating blood digestion, nutrition, immune regulation, and growth rate. Simple, phylogenetically diverse models are essential to test the hypothesis because of the difficulty in determining causal relationships in complex gut microbiomes. But research on the effect of probiotics on blood digestion in medical leeches is still in its infancy. Therefore, leech farmers can use probiotics in the leech rearing stages and shorten the growth period by accelerating the digestion of blood consumed by leeches, and in addition to increasing the immunity of leeches to refeeding and reducing the quarantine period, this can increase the productivity of leech breeding and propagation farms. Overall, it can be concluded that probiotics probably improve the performance of leech breeding and propagation by improving the health of the stratum corneum, which is the site of storage and digestion of blood consumed by leeches, optimizing blood digestion and reducing inflammatory stress. However, the effectiveness depends on factors such as strain selection, dosage and environmental conditions (such as water temperature).

**Acknowledgment:** The authors of this article would like to express their special thanks to the relevant laboratory personnel, the Animal Biology Department, and the Biotechnology Department of the University of Isfahan. We also express our gratitude to the experts of the Iranian Leech Industry Knowledge-Based Group and the Iranian Bioseed Company, especially Engineer Seyed Mohammad Tavakoli Isfahani, who helped us in providing the conditions for conducting this research.

**Keywords:** Iranian medical leech, leech farming, probiotics, Lactobacillus plantarum, Hirudo orientalis

**Conflict of Interest:** The authors claim no conflict of interest throughout providing this paper.

* *Corresponding Author: s.safavipour@iau.ir*

[ Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-07 ]

[ DOI: 10.71901/jad-2026-1-867 ]

نشریه توسعه آبزی‌پروری، سال بیستم، شماره چهارم، زمستان ۱۴۰۵، صفحه های ۴۸-۳۴
DOI: 10.71901/jad-2026-1-867

"مقاله پژوهشی"

# اثر خون و آب مصرفی حاوی باکتری لاکتوباسیلوس *پلانتاروم* (*Lactobacillus plantarum*) بر دوره رشد زالوی طبی بومی ایران (*Hirudo orientalis*) در شرایط آزمایشگاهی

**نیلوفر پرچمی[۱]، سعید صفوی پور[۱*]، حسن محبتکار[۳]، ماندانا بهبانی[۱]**

۱- گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران
۲- باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان ایران، واحد اصفهان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۲/۱۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۴/۲۴

**چکیده**

زالوها از جمله نرم‌تنان آبزی هستند که از دیرباز تا کنون مورد توجه در حوزه طب سنتی و درمان می‌باشد. یکی از معضلات پرورش دهندگان زالو، زمان قرنطینه و هضم خون توسط زالو فی‌مابین دو تغذیه می باشد، که باعث می‌شود زالوها دیرتر رشد کنند و به سایز مورد نظر جهت ارائه به بازار برسند. لذا به کارگیری تکنیک‌های پیشرفته برای پرورش سریعتر و با کیفیت‌تر لارو زالو از بدو تولد تا مرحله بازار از مهمترین اهداف حوزه صنعت زالو است. استفاده از پروبیوتیک‌ها در دام و آبزیان باعث می‌شود، هضم خوراک تسهیل گردد، ولی تا کنون هیچ پژوهشی بر روی زالوی طبی بومی ایرانی (*Hirudo orientalis*) انجام نشده است. هدف ما در این تحقیق کاهش بازه زمانی دوره رشد و افزایش قدرت هضم خون با اضافه کردن باکتری پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* (*Lactobacillus plantarum*) به عنوان مکمل غذایی به خون و آب زالوها بود. این تحقیق با هفت تیمار و پنج تکرار در شرایط آزمایشگاهی با طرح آماری یک طرفه مورد بررسی قرارگرفت. تیمارها شامل خون و آب هر کدام حاوی باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* با غلظت $10^8$ CFU/mL و غلظت $10^6$ CFU/mL و غلظت $10^4$ CFU/mL و گروه شاهد بدون هیچ غلظتی از باکتری بودند. نتایج نشان داد که مکمل پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* با غلظت $10^8$ CFU/mL از طریق خون و نیز از طریق جذب پوست (محلول در آب زالوها) بیشترین تأثیر را در هضم سریع خون مصرفی و رشد معنی دار زالوها داشته است ($p<0/05$). بنابراین می‌توان گفت استفاده از برخی باکتری‌ها در دوره پرورش زالو می‌تواند بهره وری مزرعه را افزایش دهد، دوره رشد را کوتاهتر و بازگشت سرمایه پرورش دهندگان را تسریع بخشد.

**کلمات کلیدی:** زالوی طبی ایرانی، پرورش زالو، پروبیوتیک، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، *هیرودو اورینتالیس*

* عهده‌دار مکاتبات: s.safavipour@iau.ir

[ Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-07 ]

[ DOI: 10.71901/jad-2026-1-867 ]

**مقدمه**

زالوها از جمله جاندارانی هستند که از سالیان دور در پزشکی و طب سنتی مورد استفاده قرار می‌گرفتند (Khodadoust *et al.*, 2014). این جانداران شگفت انگیز امروزه نیز مورد توجه بسیاری از پزشکان و محققان علوم متنوع هستند. تعداد محدودی از انواع زالوهای درمانی در دنیا پیدا شده‌اند که خوشبختانه گونه هیرودواورینتالیس (*Hirudo orientalis*) یکی از گونه‌های منحصر به فرد زالوهای درمانی در ایران می باشد (Sket *et al.*, 2008). همچنین تحقیقات کاربردی بر روی زالوی بومی ایران محدود است، لذا با توجه به اهمیت زالوها و وجود گونه‌های بومی زالو در ایران مطالعه این جاندار با استفاده از علوم متنوع کاملاً توجیه-پذیر است. همچنین علاوه بر این‌ها می‌توان از زالو در زمینه‌های تجاری، ارزآوری و کارآفرینی نیز به خوبی استفاده نمود. با توجه به استقبال از زالو و استفاده و برداشت بی‌رویه این جاندار از طبیعت، متاسفانه جمعیت زالوها رو به کاهش است و خطر انقراض، این جانداران را تهدید می‌کند. لذا کشورهای مختلف از جمله آمریکا، روسیه، فرانسه، ترکیه و آلمان به منظور جلوگیری از وقوع این فاجعه و همچنین استفاده از زالو و فواید آن شروع به پرورش زالو کرده‌اند. همچنین پرورش زالو در ایران مورد استقبال قرارگرفته است و از این رو شرایط و روش‌های متفاوتی برای پرورش زالو مورد استفاده قرار می‌گیرد (Malek and Khodadoust, 2015). مورفولوژی زالو ساده و ظریف است اما این کرم حلقوی دارای بدنی ماهیچه‌ای قوی می‌باشد و دستگاه های داخلی پیشرفته دارد. به طور عادی زمانی که زالو بی‌حرکت است به شکل‌های تخم‌مرغی یا دراز دیده می‌شود. زالو به صورت شکمی-پشتی دیده می-شود و قدرت مانور زیادی نیز دارد. بدن زالو از خارج به داخل به ترتیب از یک لایهی خارجی از جنس کوتیکول، یک لایه‌ی اپیدرمی مترشحه و یک لایه درم تشکیل شده است. در لایه سوم یا همان درم عروق خونی و سلول‌های رنگدانه‌دار قرارگرفته‌اند که عامل رنگ ظاهری زالوها هستند (Safavipour *et al.*, 2017). فلور باکتریایی زالو دارای باکتری‌های همزیست برای تغدیه بهتر از خون است. زالوها به تنهایی قادر به تجزیه و استفاده از مواد مغذی خون نیستند، لذا باکتری-های همزیست در این روند دخیل هستند. تحقیقات صورت گرفته بر روی فلور میکروبی زالو و جداسازی نمونه از نفریدها و دستگاه گوارش و بررسی‌های مربوط به شناسایی باکتری‌ها از طریق توالی *16S rRNA* نشان داد که گونه‌های *Aeromonas veronii* و *Aeromonas jandaei* باکتری‌های همزیست با زالو هستند (Utevsky *et al.*, 2010). پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های مفیدی هستند که به هضم مواد در دستگاه گوارش و ایمنی کمک می‌کنند. این میکروارگانیسم‌های قادر به از بین بردن میکروب‌های مضر در دستگاه گوارش متنوع هستند. بعضی از آن‌ها به طور طبیعی جزء فلور طبیعی بدن جانداران مختلف‌اند و همچنین می‌توان آن‌ها را به غذای جانداران برای هضم بهتر و افزایش ایمنی اضافه نمود. دسته‌ای از این پروبیوتیک‌ها قادر به تولید ویتامین‌ها و آنتی‌بیوتیک‌ها نیز هستند (Mann, 2013) از پروبیوتیک‌ها برای هضم سریع‌تر و بهتر غذای آبزیان و همچنین جلوگیری از رشد میکروب‌های مضر در دستگاه گوارش آن‌ها استفاده می‌شود (Firouzbakhsh *et al.*, 2011). مطالعات مستقیم بر روی زالوهای طبی در دنیا محدود است، اما نتایج مشابه در سایر آبزیان (مانند ماهی و میگو) در استفاده از پروبیوتیک ها یا

[ Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-07 ]
[ DOI: 10.71901/jad-2026-1-867 ]

ترکیبات غیر قابل هضم که رشد باکتری‌های مفید دستگاه گوارش را تحریک می کنند، امیدوارکننده و قابل استنتاج است. به طوری‌که تحقیقات نشان داده اثر پروبیوتیکی استفاده از باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* بر برخی از شاخص‌های تغذیه و رشد در تاس‌ماهی سیبری (*Acipenser baerii*) باعث افزایش رشد و کاهش دوره پرورش می‌شود (Rezvani Gilkolaei *et al*., 2019). همچنین اثرپروبیوتیک *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* (*Lactobacillus plantarum*) بر عملکرد رشد و پارامترهای خون در بچه ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) نشان داد که بهبود عملکرد رشد (وزن نهایی، افزایش وزن، نرخ رشد ویژه، شاخص وضعیت و ضریب تبدیل غذایی) و همچنین افزایش تعداد گلبول‌های سفید و ایمنی این گونه را توسعه داده است (Khajeh Rahimi, 2012). تحقیقات جدید دانشمندان بر روی گونه زالوی طبی هیرودو وربانا (*H. verbana*) نشان داده است که با ترکیب در جمعیت باکتری *آئروموناس* رویکردهای بیوشیمیایی و مولکولی، پپتیدهای ضدمیکروبی (AMPs) تولید شده توسط دستگاه گوارش زالو و همزیستی آن، با باکتری‌های دستگاه گوارش رابطه مستقیمی دارند. آنها می‌تواند ژن‌های AMP زالو در سلول‌های اپیتلیال روده در هنگام کاهش بار باکتری *آئروموناس* داخلی (زالو گرسنه) القا گردد. در زمانی که بار میکروبی *آئروموناس* به حداکثر خود برسد (پس از تغذیه از خون) سرکوب می‌شوند. AMPs تولید مواد آنتی‌بیوتیک داخلی زالو را زیاد می‌کند. این امر محافظت متقابل در برابر باکتری‌های مهاجم را برای زالوها فراهم می‌کنند و به میکروفلور روده زالو کمک می‌کنند. این مزیت ایمنی را به طور قابل توجهی تقویت می نماید. در مجموع، این داده‌ها ممکن است بینش‌هایی در مورد فرآیندهای ارتباط مضر یا مفید گونه‌های زالو و باکتری *آئروموناس* و سایر گونه‌های باکتریایی در دستگاه گوارش زالو ارائه دهند (Grafskaia *et al*., 2020). تاکنون گزارشی مبنی بر بهینه‌سازی تغذیه زالو از طریق افزودن پروبیوتیک به خون ارائه نشده است، اما پرورش‌دهندگان زالو با اضافه کردن پروبیوتیک به آب زالوها افزایش رشد را به صورت تجربی مشاهده نمودند. لذا هدف از این تحقیق، با توجه به خواص پروبیوتیک‌ها و کاربرد آن‌ها در تغذیه‌های گوناگون، بررسی افزودن باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* به عنوان یک پروبیوتیک به خون مصرفی زالو و همچنین آب مصرفی در تانک مزرعه جهت بررسی شرایط رشد زالوها بود.

## مواد و روش‌ها

این تحقیق در تابستان ۱۴۰۰ درآزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه اصفهان انجام شد. در این آزمایش تعداد ۳۵ عدد زالوی آرایشی گونه بومی ایران با قرنطینه ۶ ماهه، *هیرودو اورینتالیس* (*H. orientalis*) در هفت تیمار و با پنج تکرار از گروه دانش بنیان صنعت زالوی ایران خریداری شد.

## شرایط و نحوه‌ی نگهداری از زالوها در شرایط آزمایشگاهی

شرایط استانداردی که زالوها باید در آن قرار بگیرند شامل شرایط دمایی و آبی به خصوصی است. زالوها در سطل نگهداری می‌شوند، در سطل های پلاستیکی به حجم ۵۰۰ میلی لیتر تعداد ۵ زالوی طبی قرار داده شد و به منظور جلوگیری از فرار، درب سطل ها با استفاده از تور و کش بسته شد تا جریان هوا نیز برقرار باشد.

[ Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-07 ]

[ DOI: 10.71901/jad-2026-1-867 ]

تعویض آب بسته به سن زالو متفاوت است. اگر زالو در شرایطی به منظور آماده‌سازی برای تغذیه باشد باید دمای محیط و آبی که در آن قرار دارد ۲۵ درجه سانتی‌گراد و در شرایط بعد از تغذیه باید دمای محیط ۱۸ درجه سانتی‌گراد باشد. به منظور جلوگیری از شوک دمایی زالو قبل و بعد تغذیه، افزایش دما باید به صورت روزانه با افزایش ۱ درجه سانتی‌گراد در روز انجام گیرد تا تغییر دمای ۴ درجه سانتی‌گراد باعث شوک زالو نشود. آب زالوها بعد از تغذیه تا ۲ هفته به صورت روزانه عوض می‌گردید. زیرا بیشترین آلودگی محیطی در این بازه زمانی ایجاد می‌شود. اما اگر زالوها در شرایط گرسنگی به منظور آماده‌سازی برای تغذیه باشند تعویض آب را ۳ تا ۴ روز یکبار تعویض می‌شد.

## تهیه نمونه خون

نمونه خون بهداشتی (استریل) از شرکت فناور زیست دانه ایرانیان با برند زلوک واقع در پارک علم و فناوری شهرکرد با گواهینامه سلامت آزمایشگاه معتمد سازمان دامپزشکی کشور خریداری شد. به منظور تغذیه زالوها چهار نمونه خون آماده شد. این نمونه‌ها ترکیبی از خون و باکتری پروبیوتیک و خون بدون باکتری بود. به طور عمده زالوها دو تا سه برابر وزن خود از خون تغذیه می‌کنند. به عنوان مثال یک زالو با وزن ۱ گرم تقریباً می‌تواند ۳ میلی لیتر خون بمکد. لذا برای هر زالو با وزن ۰/۲۵ گرم میزان ۱ میلی لیتر خون در نظرگرفته‌شد. این میزان برای پنج تکرار یعنی پنج زالو در هر هفت گروه آماده شد. سه نمونه از خون‌ها با سه غلظت تهیه شده از باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* ترکیب شد. و چهار نمونه‌ی دیگر برای گروه شاهد و تغذیه مکمل با جذب پوستی آماده شد (Safavipour *et al*., 2017).

## تهیه باکتری و آماده سازی آن

باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* با کد ATCC:13643 به عنوان باکتری پروبیوتیک از انستیتو پاستور ایران تهیه شد. برای نگه‌داری باکتری‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در دو محیط جامد و مایع MRS کشت داده شدند.

## محیط کشت MRS مایع

این محیط کشت مناسب لاکتوباسیلوس‌ها به خصوص کارآمد برای شمارش آنها می‌باشد. طبق دستور آماده‌سازی برای تهیه یک لیتر از این محیط کشت، میزان ۲۱ گرم از محیط کشت پودری را برداشته و در یک ارلن دو لیتری ریخته و با آب مقطر به حجم یک لیتر رسانده شد. سپس دهانه‌ی ارلن با پنبه و فویل بست شد. ودر اتوکلاو به مدت ۱۵ دقیقه با دمای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱ بار ضدعفونی شد (Lengauer *et al*., 1996).

## محیط کشت MRS جامد

برای تهیه محیط کشت به صورت جامد میزان ۲۱ گرم از محیط کشت پودری و ۲۰ میلی‌گرم آگار را در یک ارلن دو لیتری با آب مقطر به حجم یک لیتر رسانده‌شد. در شرایط مشابه محیط کشت مایع اتوکلاو شد. بعد از تهیه، محیط کشت جامد به میزان ۱۰ میلی‌لیتر در پلیت‌های ۸ سانتی‌متر قرار داده شده زیر هود و در شرایط استریل ریخته شد (Lengauer *et al*., 1996).

[ Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-07 ]

[ DOI: 10.71901/jad-2026-1-867 ]

جدول ۱: ترکیبات محیط کشت MRS

Table 1: Composition of MRS culture medium

| Compound name | Concentration (grams per liter) |
|---|---|
| Peptone | 10 |
| Yeast extract | 5 |
| Meat extract | 10 |
| Dipotassium phosphate | 2 |
| Sodium acetate | 5 |
| 3-ammonium citrate | 2 |
| Magnesium sulfate | 0.2 |
| Manganese sulfate | 0.05 |
| Polysorbate 80 | 1 |

## تهیه غلظت‌های لاکتوباسیلوس پلانتاروم

۱- بعد از گرماگذاری ۱۸ ساعته باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در محیط کشت مایع با استفاده از روش سری رقت و دستگاه اسپکتروفتومتر غلظت نیم مک فارلند از باکتری که جذب ۰/۱۳-۰/۰۸ دارد؛ تهیه و گرد آوری شد.

۲- سه غلظت $10^8$ CFU/ml، $10^6$ CFU/ml و $10^4$ CFU/ml از باکتری تهیه شد. به منظور حفظ و نگهداری باکتری برای مدت زمان طولانی استوک تهیه شد. بعد از سانتریفیوژ باکتری‌های کشت داده شده در محیط مایع سوپرناتانت خارج شد و به رسوب مورد نظر گلیسرول استریل افزوده شد. سپس برروی درب ویال پارافیلم زده و در فریزر ۵۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (Bradford *et al*., 1976).

## تیمارهای آزمایشی

برای تغذیه، زالوها به سه گروه تقسیم شدند یک گروه به عنوان شاهد انتخاب شد و دو گروه دیگر برای دریافت باکتری از طریق خون و پوست تقسیم بندی شدند و این گروه‌ها به شرح زیر بودند:

**الف) گروه دریافت کننده *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* از طریق خون:**

۱) زالوی تغذیه شده با خون حاوی باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* با غلظت $10^8$ (CFU/mL)

۲) زالوی تغذیه شده با خون حاوی باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* با غلظت $10^6$ (CFU/mL)

۳) زالوی تغذیه شده باخون حاوی باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* با غلظت $10^4$ (CFU/mL)

سپس به ۵ میلی‌لیتر خونی که زالوها با آن تغذیه شدند ۵ میلی‌لیتر باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* با غلظت مشخص شده برای هر گروه افزوده شد.

[ Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-07 ]

[ DOI: 10.71901/jad-2026-1-867 ]

**ب) گروه دریافت کننده *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* از طریق پوست:**

۱) زالوی تغذیه شده از طریق جذب پوستی با باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم با غلظت $۱۰^{۸}$(CFU/mL)

۲) زالوی تغذیه شده از طریق جذب پوستی با باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم با غلظت $۱۰^{۶}$(CFU/mL)

۳) زالوی تغذیه شده از طریق جذب پوستی با باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم با غلظت $۱۰^{۴}$(CFU/mL)

بعد از تغذیه به۲۰۰ میلی‌لیتر آب سه تیمار جذب پوستی میزان ۱ میلی‌لیتر باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* با غلظت معین، افزوده شد. برای تغذیه زالو از طریق خون از ظرف حاوی آب با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد برای ثابت نگه داشتن دمای آبی نگهداری زالو استفاده شد. دمای خون ۳۸ درجه سانتی‌گراد بود تا شرایط بهینه برای تغذیه زالو فراهم شود. برای تغذیه، یک عدد ظرف را با آب ۴۸ درجه سانتی‌گراد پر گردید و ظرف دیگر را روی آن قرار داده‌شد، به صورتی که کف ظرف بالایی با سطح آب ظرف زیرین در تماس باشد و سپس آب با دمای ۳۸ درجه سانتی‌گراد در ظرف رویی ریخته شد. خونی که به مدت ۵ دقیقه در انکوباتور شیکردار با دمای ۳۸ درجه سانتی‌گراد بود در دستکش لاتکس ریخته شد، به صورتی که دستکش حالت کشسان پیدا کرد. سپس درب آن بسته شد. در مرحله بعد دستکش حاوی خون در ظرف رویی قرارداده شد و با سنجش دمای آب با دماسنج و مطمئن شدن از دمای مناسب آن زالوها به صورت تک تک با پنس برداشته و بر روی دستکش قرار داده شدند. بعد از تغذیه زالوها درشتر شده و و از دستکش جدا شدند. سپس زالوها بعد از تغذیه در پت‌های جدید قرار می‌گرفتند. آنگاه آب با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد موجود در انکوباتور، روی آن‌ها ریخته شد. سپس سطل‌ها در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرارگرفتند. در روزهای بعد به مدت یک هفته آب زالوها روزانه تعویض شد. در هفته دوم بعد از تغذیه این روند به یک روز درمیان و در هفته سوم بعد از تغذیه، دو روز در میان ادامه پیدا کرد. از هفته سوم بعد از تغذیه با توجه به میزان دفع ضایعاتی که زالوها داشتند، تعویض آب به ۳ یا ۴ روز در میان تغییرکرد. در طول این مدت دمای انکوباتور به صورت روزانه یک درجه سانتی‌گراد از دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد کاهش یافت تا به دمای ۱۸ درجه سانتی‌گراد برسد. بعد از پایان تغذیه، زالوها به مدت یک ماه در انکوباتور قرارگرفتند تا به مرحله گرسنگی برسند (Elliott *et al*., 2011). نحوه تغذیه زالوها با استفاده از دستکش لاتکس، تغییر وزن و اندازه زالوها در شکل ۱ نشان داده شده‌است.



## تجزیه و تحلیل آماری

تمامی داده‌های بدست آمده از آزمون‌ها در برنامه‌ی اکسل وارد شد و نمودار مربوطه به هر آزمون رسم شد. میانگین و انحراف معیار مشخص شد. در نهایت با استفاده از نرم‌افزار تحلیل آماری SPSS v.۲۶ و آزمون آنالیز واریانس یک طرفه اختلاف معنی‌دار داده‌ها نسبت به کنترل در سطح ($p<۰/۰۵$) در نظرگرفته شد.

[ Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-07 ]

[ DOI: 10.71901/jad-2026-1-867 ]

## نتایج

### تغییرات وزن تیمارهای گروه دریافت کننده باکتری از طریق خون

با توجه به جدول ۲ که مربوط به تغییرات وزن زالوهای گروه دریافت کننده باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* از طریق خون است؛ میانگین وزن اولیه، قبل از تغذیه بین ۰/۱ تا ۰/۲۵ گرم اندازه‌گیری شد، که هیچ گونه اختلاف معنی‌داری بین گروه ها وجود نداشت ($p>۰/۰۵$). بعد از تغذیه وزن زالوها ۱ تا ۲ گرم رسیدند و بازهم اختلاف معنی‌داری بین گروه ها وجود نداشت ($p>۰/۰۵$). نتایج وزن زالوها تا ۳۵ روز بعد از تغذیه نشان داد که افزایش میزان باکتری باعث کاهش وزن زالو نسبت به گروه شاهد شده است. تیمار $۱۰^{۸}$ CFU/ml بین تمام تیمارهای مصرفی اختلاف معنی داری را در دو زمان اندازه گیری وزن ها ثبت کرده بود ($p<۰/۰۵$)، همچنین این گروه نسبت به گروه شاهد از روز پانزدهم تا سی و پنجم بعد از تغذیه با اختلاف معنی‌داری کاهش وزن را نشان داد ($p<۰/۰۵$). برای تیمار $۱۰^{۶}$ CFU/ml در روز پانزدهم بعد از تغذیه، کاهش وزن نسبت به شاهد و سایر تیمارهای آزمایشی معنی‌دار بود ($p<۰/۰۵$). ولی در روز سی و پنجم بعد از تغذیه نتایج نشان داد که اختلافی معنی‌دار بین تیمار $۱۰^{۶}$ CFU/ml و تیمار $۱۰^{۴}$ CFU/ml وجود نداشت ($p>۰/۰۵$). همچنین در این گروه تیمار $۱۰^{۴}$ CFU/ml اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه شاهد در روز پانزدهم بعد از تغذیه وجود نداشته است ($p>۰/۰۵$). اما در روز سی و پنجم بعد از تغذیه این اختلاف معنی‌دار شد ($p<۰/۰۵$). در کل در پایان سی و پنج روز بعد از تغذیه نتایج نشان داد بین تمام گروه‌های آزمایشی اختلاف معنی داری وجود داشت، اما نکته مهمی که شاهد آن بودیم این که تیمار $۱۰^{۸}$ CFU/ml توانسته بود بیشترین تاثیر را در کاهش وزن زالوها بعد از تغذیه در دو زمان ۱۵ روزگی و ۳۵ روزگی داشته باشد ($p<۰/۰۵$)، و بیانگر این است که با افزایش دوز مصرف باکتری هضم تسریع پیدا کرده بود.

جدول ۲: تغییرات وزن زالوهای طبی دریافت کننده ی باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم از طریق خون (گرم)

Table 2: Weight changes of medical leeches receiving Lactobacillus plantarum bacteria through blood (gr)

| Week after feeding | Treatments | | | |
|---|---|---|---|---|
| | Control | Conce-$10^{8}$ | Conce-$10^{6}$ | Conce-$10^{4}$ |
| Day 0 weight gain | 0.22± 0.012 | 0.21±0.012 | 0.19±0.012 | 0.25±0.012 |
| Day 1 after feeding | 1.44±0.18 | 1.65±0.18 | 1.74±0.18 | 1.54±0.18 |
| Day 15 after feeding | 0.97 $^{a}$± 0.011 | 0.83 $^{c}$±0.011 | 0.89 $^{b}$±0.011 | 0.95 $^{a}$±0.011 |
| Day 35 after feeding | 0.8 $^{a}$± 0.013 | 0.62 $^{c}$±0.013 | 0.79 $^{b}$±0.013 | 0.79 $^{b}$±0.013 |

در هر ردیف میانگین‌های دارای حروف متفاوت اختلاف معنی‌داری در سطح ۵ درصد از یکدیگر دارند ($p<۰/۰۵$).

In each row, means with different letters are significantly different from each other at the 5% level ($p<0.05$).

[ Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-07 ]

[ DOI: 10.71901/jad-2026-1-867 ]

## تغییرات وزن تیمارهای گروه دریافت کننده باکتری از طریق پوست

با توجه جدول ۳ که تغییرات وزن گروه دریافت‌کننده باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* از طریق پوست را نشان می‌دهد. میانگین وزن اولیه، قبل از تغذیه حدود ۰/۳ تا ۰/۴ گرم بود. بعد از تغذیه، وزن زالوها به حدود ۱/۵ تا ۲ گرم رسید، که هیچ گونه اختلاف معنی‌داری بین گروه ها قبل و بعد از تغذیه وجود نداشت. وزن تیمار ۱۰^۸ CFU/ml با اختلاف معنی‌داری نسبت به گروه شاهد از روز اول تا سی و پنجم کاهش یافت ($p<۰/۰۵$). نتایج این تیمار نشان داد که غلظت ۱۰^۸ CFU/ml در دو زمان پانزده روز و سی و پنج روز بعد از تغذیه بیشترین میزان کاهش وزن را داشته و از نظر آماری اختلاف معنی‌داری با سایر گروه های آزمایشی در زمان های مختلف داشته است ($p<۰/۰۵$). همچنین وزن تیمار ۱۰^۶ CFU/ml این گروه در روز پانزدهم اختلاف معنی‌اری نسبت به گروه شاهد و تیمار ۱۰^۴ CFU/ml وجود نداشت. اما در روز سی و پنج وزن گیری این تیمار با گروه شاهد اختلاف معنی‌داری از نظر آماری داشت ($p<۰/۰۵$). در روز سی و پنجم بعد از تغذیه نتایج نشان داد تمام تیمارهای آزمایشی با یکدیگر اختلاف معنی‌دار داشتند و کمترین کاهش وزن در گروه شاهد نسبت به سایر تیمارهای واجد باکتری از خود نشان داد ($p<۰/۰۵$).

جدول ۳: تغییرات وزن زالوهای طبی دریافت کننده ی باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم از طریق پوست (گرم)

Table 3: Weight changes of medical leeches receiving Lactobacillus plantarum bacteria through the skin (gr)

| Week after feeding | Treatments | | | |
|---|---|---|---|---|
| | Control | Conce-$10^8$ | Conce-$10^6$ | Conce-$10^4$ |
| Day 0 weight gain | 0.39 ±0.029 | 0.34 ±0.029 | 0.38 ±0.029 | 0.37 ±0.029 |
| Day 1 after feeding | 1.65 ±0.039 | 1.55 ±0.039 | 1.58 ±0.039 | 1.62 ±0.039 |
| Day 15 after feeding | 1.09 $^{a}$ ± 0.081 | 0.72 $^{c}$±0.081 | 0.89 $^{ab}$±0.081 | 0.92 $^{ab}$±0.081 |
| Day 35 after feeding | 0.77 $^{a}$±0.08 | 0.53 $^{c}$±0.08 | 0.63 $^{b}$±0.08 | 0.68 $^{b}$±0.08 |

در هر ردیف میانگین‌های دارای حروف متفاوت اختلاف معنی‌داری در سطح ۵ درصد از یکدیگر دارند ($p<۰/۰۵$).

In each row, means with different letters are significantly different from each other at the 5% level ($p<0.05$).

## بحث

میکروبیوم های دستگاه گوارش نقش مهمی در سلامت و تغذیه آبزیان دارند. زالو طبی ایرانی به دلیل داشتن میکروبیوم طبیعی محدود در مقایسه با سایر مدل‌های رایج آبزیان، توانایی پرورش فراوان‌ترین میکروب‌ها و دستکاری ژنتیکی یکی از آنها، مثل باکتری آئروموناس ورونی(*Aeromonas veroni*) به عنوان یک مدل قدرتمند هضمی برای مطالعه همزیستی‌های میکروبی روده را دارد( Kikuchi *et al*., 2007). زالوها پس از مصرف خون، می‌توانند برای مدت طولانی تا ۶ ماه دوره گرسنگی را تحمل کند و غذا نخورند. این فاصله طولانی تغذیه فرصتی برای نظارت بر ترجیح‌ها و استفاده از مواد مغذی خون توسط

[ Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-07 ]

[ DOI: 10.71901/jad-2026-1-867 ]

میکروبیوم روده آنها به شیوه‌ای موقتی فراهم می‌کند، که ممکن است منعکس کننده الگوهای مشابهی از میکروارگانیسم های مفید و غیر مفید دستگاه گوارش زالو باشد (Rio *et al*., 2009). بنابراین گلبول های قرمز ذخیره شده در چینه دان های زالو بعد از تغذیه به آرامی به روده منتقل می‌شوند. در آنجا تجزیه و مواد مغذی آزاد شده آنها جذب می‌شوند. در روده زالو باکتریهای همزیست‌های آئرومونا‌س (*Aeromonas*) و ریکنلا (*Rikenella*) وجود دارند و از نظر عددی فراوان هستند (Whitaker *et al*., 2011)، بنابراین می‌توان این طور بیان نمود که استفاده از یک پروبیوتیک و اضافه شدن آن به جمعیت میکروارگانیسم‌های گوارشی زالو تاثیرات مهمی در رقابت با آنها و تسریع عمل هضم خون داشته است. تحقیقات نشان داده است که در زالو تماس با پوست ترشحات دفعی و دهان زالوی مولدین در طول رسوب و تشکیل پیله می‌تواند مسیری ساده و مستقیم برای انتقال عمودی همزیست‌های میکروبی از مولدین مادر به پیله یا لاروها را فراهم کند (Indergand *et al*., 2000). تحقیقات نشان داده است که نقش *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در سلامت دام و آبزیان به عنوان یک پروبیوتیک، شامل تنظیم سیستم ایمنی بدن، کاهش سطح کلسترول، حفظ تعادل فلور میکروبی روده و کاهش خطر تومورها نقش دارد. طبق تعریفی که FAO و WHO ارائه داده‌اند، پروبیوتیک، میکروارگانیسم زنده است که هنگام مصرف در مقادیر کافی تاثیر مثبت بر فلور باکتریایی میزبان دارد. نقش پروبیوتیک در سلامتی آبزیان باعث افزایش تمایل به توسعه غذاهای جدید دارای میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک شده است. پروبیوتیک‌ها علایم عدم تحمل لاکتوز را کاهش می‌دهند، از انواع بیماری‌های روده جلوگیری می‌کنند و باعث افزایش تعادل میکروارگانیسم‌های روده می‌شوند. *لاکتوباسیلوس پلانتاورم* به طور قابل ملاحظه‌ای اسید لاکتیک، ترکیبات زیست فعال باکتریایی و اگزوپلی ساکارید برای نشان دادن پتانسیل مقابله در برابر فعالیت پاتوژن های غذایی روده‌ای تولید می‌کند. این عمل می‌تواند روی هضم پذیری مواد در دستگاه گوارش موجود زنده تاثیر بسزایی بگذارد (Wang *et al*., 2017). در این پژوهش با رویکرد متفاوتی با استفاده از باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم به عنوان مکمل در دو حالت تغذیه از طریق خون و پوست زالوها مورد بررسی قرارگرفتند و میزان تأثیر پروبیوتیک به عنوان مکمل بر رشد زالوها مورد سنجش قرارگرفت. از جمله مهم‌ترین روش‌هایی که مزرعه داران به دنبال آن هستند و در صنعت زالو کاربرد دارد کاهش بازه‌ی زمانی رشد زالو است. هرچه زالوها سریعتر خون را هضم کنند، زودتر به وزن ایده‌ال می‌رسند. اما تاکنون تحقیقاتی مبنی بر کاهش بازه زمانی رشد زالو ارائه نشده است. (Giri *et al*., 2013). در گزارش‌های دیگری بیان شده که مهم‌ترین محصول حاصل از متابولیسم پریبیوتیک‌های لاکتوباسیل، اسیدهای چرب زنجیرکوتاه است که از طریق اپیتلیوم روده جذب و به عنوان یک منبع انرژی مهم برای میزبان تلقی شده و باعث بهبود جذب مواد غذایی می‌شوند. تولید اسیدهای چرب زنجیر کوتاه مانند استات، پروپیونات، بوتیرات و اسید لاکتیک ناشی روده از تخمیر پرو و پری بیوتیک‌ها، منجر به کاهش pH دستگاه گوارش شده که شرایط مناسب را برای رشد باکتری دیگر فراهم می‌کند و هضم را تسریع می‌بخشند . این امر نشان می دهد استات نقش عمده‌ای در زالوها تولید را دارد (Dawood *et al*., 2019)، که با نتایج

[ Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-07 ]

[ DOI: 10.71901/jad-2026-1-867 ]

بدست آمده این تحقیق هم سو می‌باشد. با توجه به اینکه گزارشات گسترده ای برای فلور میکروبی و دستگاه گوارش زالو وجود ندارد، اما *هیرودو مدیسینالیس* (*Hirudo medicinalis*) (و سایر گونه‌های *هیرودو*) دارای میکروبیومی هستند که باکتری‌هایی مانند *آئروموناس* (*Aeromonas*) و باکتری‌های شبیه *ریکنلا* (*Rikenella-like*) در آن برجسته هستند. *باسیلوس سابتیلیس* (*Bacillus subtilis*) نیز به عنوان بخشی از این میکروبیوم شناسایی شده‌است (Nelson and Graf, 2012). میکروبیوم زالو، از جمله *باسیلوس سوبتیلیس*، می‌تواند در هیرودوتراپی (زالو درمانی) مرتبط باشد. زالوها پپتید های ضد میکروبی AMP هایی تولید می‌کند که می‌توانند رشد باکتری‌ها، از جمله *باسیلوس سوبتیلیس* را مهار کنند. در حالی که زالوها برای درمان‌های مختلف استفاده می‌شوند، هم‌زمان می‌توانند *باسیلوس سوبتیلیس* از جمله پاتوژن‌های فرصت‌طلب را منتقل کنند. با توجه به احتمال وجود عوامل بیماری‌زای فرصت‌طلب، غربالگری گسترده زالوهای مورد استفاده در پزشکی برای به حداقل رساندن خطرات عفونت توصیه می‌شود. بنابراین بررسی مقدار *باسیلوس سابتیلیس* می‌تواند نشان دهد که حجم باکتری مفید دستگاه گوارش چه تاثیری بر انتقال عفونت در حوزه درمان داشته است (Neupane *et al*., 2019). براساس استناد به گزارش‌های سایر دانشمندان روی مهره داران آبزی عملکرد استفاده از پروبیوتیک‌ها موجب افزایش کیفیت جیره و راندمان غذا شده و سبب بهبود بازده رشد، نرخ رشد ویژه و کارایی مواد مغذی می‌شود (Al-Dohail *et al*., 2009). محققان نیز نتایج مشابهی در ماهی سیم سرطلایی (*Sparus aurata*) (Soares *et al*., 2018) و تیلاپیای آبی مشاهده نمودند (Aly *et al*., 2008). در حقیقت بهبود فاکتورهای رشد در ماهی تغذیه شده از باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* می‌تواند در نتیجه افزایش راندمان دستگاه گوارش و هضم و جذب بهتر شود که با نتایج بدست آمده این تحقیق هم سو می‌باشد. براساس مطالعات مرتبط در آبزیان و حیوانات دیگر، مکانیسم‌های احتمالی زیر در زالوها قابل استنتاج است:

الف) بهبود تعادل میکروبیوم روده و مهار پاتوژن ها: پروبیوتیک‌ها (مانند لاکتوباسیلوس (*Lactobacillus*) و *باسیلوس سابتیلیس* (*Bacillus subtilis*)) با چسبیدن به دیواره روده، از اتصال باکتری‌های بیماری‌زای زالو مثل *آئروموناس* (*Aeromonas*) جلوگیری می‌کنند. این باکتری‌ها می‌توانند باعث عفونت و اختلال در هضم خون شوند (Waterworth and *et al*., 2020). ب) تولید ترکیبات ضد میکروبی: سویه‌هایی مانند *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* با تولید موادی مانند باکتریوسین‌ها، اسیدهای آلی (مانند اسید لاکتیک) و پراکسید هیدروژن، محیط روده را اسیدی کرده و رشد پاتوژن‌ها را مهار می‌کنند. این امر از تجزیه نامطلوب خون و تولید سموم جلوگیری می‌کند که منجر به کاهش بار باکتری‌های مضر و جمعیت باکتری‌های بیماری‌زا تا ۴۰٪ می‌شود (Waterworth and *et al*., 2020). ج) افزایش فعالیت آنزیم‌های درون ریز گوارشی زالو: پروبیوتیک‌ها با تحریک ترشح آنزیم‌های تجزیه‌کننده پروتئین‌های خون (مانند پروتئازها و پپتیدازها) به هضم سریع‌تر خون کمک می‌کنند. این امر به ویژه در تبدیل هموگلوبین به آهن و اسیدهای آمینه ضروری است. بنابراین در برخی سویه‌ها (مانند *لاکتوباسیلوس*) گزارشات نشان داده است که با کاهش pH روده، جذب آهن هِم (Heme iron) را افزایش می‌دهند. این مکانیسم در زالوها می‌تواند به تأمین بهتر

[ Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-07 ]
[ DOI: 10.71901/jad-2026-1-867 ]

مواد مغذی برای رشد شود. همچنین تحقیقات نشان داده است که پروبیوتیک ها می‌توانند بهبود کارایی ضریب تبدیل غذا شوند، که احتمالاً در زالوها نیز قابل تکرار است (Karasartov *et al*., 2025). د) تحکیم پیوندهای بین سلولی: پروبیوتیک‌ها (مانند *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* (*Lacticaseibacillus rhamnosus*)) با افزایش تولید پروتئین‌هایی با اتصالات محکم (*Tight Junctions*)، از نشت ترکیبات التهابی ناشی از هضم خون به بدن زالو جلوگیری می‌کنند. همچنین آنها می توانند با کاهش تولید سیتوکین‌های التهابی (مانندTNF)، پروبیوتیک‌ها از آسیب به بافت روده جلوگیری کرده و سلامت گوارشی را بهبود می‌بخشند (Babenko *et al*., 2020). در این پژوهش استفاده از باکتری پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* به عنوان مکمل تغذیه زالو توانسته است راندمان دستگاه گوارش زالو را بهبود بخشد و به عنوان روشی برای کاهش بازه زمانی رشد زالوها ارائه شد. این روش نوآورانه، باعث کاهش وزن زالوها و به عبارتی هضم سریعتر خون شد. با توجه به نتایج به دست آمده می‌توان گفت که غلظت $10^8$ CFU/ml از مکمل پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* هم از طریق خون و از راه پوست (محلول در آب زالوها)، بیشترین تأثیر را در هضم سریع خون مصرفی نشان داده است بنابراین پرورش دهندگان زالوی طبی می‌توانند استفاده از پروبیوتیک‌ها را در مراحل پرورش زالو مورد استفاده قرار داده و با تسریع هضم خون مصرفی زالوها دوره رشد را کوتاهتر و زالوها علاوه بر افزایش ایمنی برای تغذیه مجدد و کاهش بازه قرنطینه کمک کنند.

## نتیجه‌گیری

در کل می‌توان چنین نتیجه گرفت که پروبیوتیک‌ها احتمالاً از طریق بهبود سلامت چینه‌دان‌ها که محل ذخیره و هضم خون مصرفی زالوها هستند، بهینه‌سازی هضم خون و کاهش استرس التهابی، عملکرد زالوهای طبی را ارتقا می‌دهند. با این حال، اثربخشی به عواملی مانند انتخاب سویه، دوز مصرفی و شرایط محیطی (مانند دمای آب) بستگی دارد. بنابراین پژوهش‌های دیگر روی مدل‌های زالو برای تأیید این مکانیسم‌ها ضروری به نظر می‌رسد.

## سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله از پرسنل آزمایشگاه مرتبط، گروه زیست جانوری و گروه بیوتکنولوژی دانشگاه اصفهان تشکر ویژه می‌نماید. همچنین از کارشناسان گروه دانش بنیان صنعت زالوی ایران و شرکت زیست دانه ایرانیان به ویژه مهندس سید محمد توکلی اصفهانی که بخاطر فراهم نمودن شرایط انجام این تحقیق کمال تشکر و قدردانی را ابراز می‌نماییم.

## منابع

1. Al-Dohail, M.A., Hashim, R. and Aliya-paiko, M., 2009. Effects of the probiotics,Lactobacillus acidiphilus, on the growthperformance, hematology parameters andimmunoglobulin concentration in Africancatfish fingerling. *Aquaculture Research*, *40*(14), pp.1642-1652. DOI: 10.1111/j.1365-2109.2009.02265.x
2. Aly, S,M., Mohamed, M.F. and George, J., 2008. Effect of probiotics on the survival, growth and challenge infection in Tilapia nilotica (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture Research, 39*(6), pp.647 – 656. DOI: 10.1111/j.1365-

[ Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-07 ]

[ DOI: 10.71901/jad-2026-1-867 ]

2109.2008.01932.x
3. Babenko, V.V., Podgorny, O.V. and Manuvera, V.A., 2020. Draft genome sequences of Hirudo medicinalis and salivary transcriptome of three closely related medicinal leeches. *BMC Genomics*, *21*(1), pp.1-16. DOI: 10.1186/s12864-020-6748-0
4. Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem,* 72*(1-2)*, pp.248–54. DOI: 10.1016/0003-2697(76)90527-3
5. Dawood, M,A,O., Magouz, F,I., Salem,M,F,I. and Daim, H,A.A., 2019 . Modulation ofdigestive enzyme activity, blood health,oxidative responses and growth-related geneexpression in GIFT by heat-killed *Lactobacillus plantarum* (L-137). *Aquaculture*, *505*(6), pp.127-136. DOI:10.1016/j.,aquaculture.2019.02.053
6. Elliott, J.M., Kutschera, U. and Zinenko, O., 2011. Medicinal leeches: historical use, ecology, genetics and conservation. *Freshwater Reviews, 4*(1), pp.21–41. DOI: 10.1608/FRJ-4.1.417
7. Firouzbakhsh, F., Noori, F., Khalesi, M.K. and Jani-Khalili, K., 2011. Effects of a probiotic, protexin, on the growth performance and hematological parameters in the Oscar (*Astronotus ocellatus*) fingerlings. *Fish Physiology and Biochemestry*. *37*(4), pp.833–842. DOI: 10.1007/s10695-011-9481-4
8. Giri, S.S., Sukumaram,V. and Oviya, M., 2013. Potential probiotic *Lactobacillus plantarum* VGS3 improve the growth,immunity and disease resistance of tropicalfreshwater fish, *Labeo rohita*. *Fish and Shellfish Immunology*, *34*(2), pp.660-666. DOI: 10.1016/j.fsi.2012.12.008
9. Grafskaia, E., Pavlova, E,, Babenko, V.V., Latsis, I., Malakhova, M., Lavrenova, V., Bashkirov, P., Belousov, D., Klinov, D. and Lazarev, V., 2020. The Hirudo Medicinalis Microbiome Is a Source of New Antimicrobial Peptides. *International Journal Maculae Science*, *21*(19), 7141. DOI:10.3390/ijms21197141
10. Indergand, S. and Graf, J., 2000. Ingested blood contributes to the specificity of the symbiosis of *Aeromonas veroniibiovar sobria* and *Hirudo medicinalis*, the medicinalleech. *Applied and Environmental Microbiology, 66*(1), pp.4735-4741. DOI: 10.1128/AEM.66.11.4735-4741.2000
11. Karasartova, D., Arslan-Akveran, G., Sensoz, S., Mumcuoglu, K.Y. and Taylan-Ozkan, A., 2025. Hirudo verbana Microbiota Dynamics: A key factor in hirudotherapy-related infections? *Microorganisms*, *13*(4), 918. DOI:10.3390/microorganisms13040918
12. Khajeh Rahimi, A., 2012. The effect of probiotic Lactobacillus plantarum on growth indices and blood parameters in juvenile common carp (*Cyprinus carpio*). *Journal of Marine Medicine*, *4*(4), pp.254-260. [In Persian]
13. Khodadoust, K., Khalili, M., Shoja, M., Qabili, K., Prapari, S. and Khodadoust, K., 2014. Leech therapy in traditional Iranian medicine. *Journal of Traditional Medicine of Islam and Iran*, *5*(1), pp.41-46. [In Persian]
14. Kikuchi, Y. and Graf, J., 2007. Spatial and temporal population dynamics of a naturally occurring two-species microbialcommunity inside the digestive tract of the medicinalleech. *Applied and Environmental Microbiology*, *73*(6), pp. 1984-1991. DOI: 10.1128/AEM.01833-06
15. Lengauer, T., Rarey, M. and Martínez, M., 1996. Computational methods for biomolecular docking. *Current Opinion in Structural Biology*, *6*(3), pp.402–406. DOI: 10.1016/s0959-440x(96)80061-3
16. Malek, M. and Khodadoust, M., 2015. Iranian medical leech, the wonder of creation over time. *Nesha Alam Journal*, *6*(1), pp.80-73. [In Persian]

[ Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-07 ]
[ DOI: 10.71901/jad-2026-1-867 ]

17. Mann, K.H., 2013. Leeches (*Hirudinea*) their structure, physiology, ecology and embryology. Elsevier, 224 P.
18. Nelson, M.C. and Graf, J., 2012. Bacterial symbioses of the medicinal leech Hirudo verbana. *Gut Microbes Journal, 3*(4), pp.322-31. DOI: 10.4161/gmic.20227
19. Neupane, S., Modry, D., Pafčo, B. and Zurek, L., 2019. Bacterial Community of the Digestive Tract of the European Medicinal Leech (*Hirudo verbana*) from the Danube River. *Microbe Ecology, 77*(4), pp.1082-1090. DOI: 10.1007/s00248-019-01349-z
20. Rezvani Gilkolaei, A., Shoaibi Omrani, B. and Afraei Bandpey, M.A., 2019. The effect of dietary probiotic *Lactobacillus plantarum* on nutrition performance in Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*). *Journal of Aquaculture Development*, *13*(1), pp.79-88. [In Persian]
21. Rio, R.V.M., Maltz, M., McCormick, B., Reiss, A. and Graf, J., 2009. Symbiont succession during embryonic developmentof the European medicinal leech, Hirudoverbana. *Applied and Environmental Microbiology*, *75*(21), pp.6890-5. DOI: 10.1128/AEM.01129-09
22. Safavipour, S., Modaresi, M. and Emadinia, A., 2017. Leechology (2nd editidtion), Isfahan Islamic Azad University Publications, pp.120-125. [In Persian]
23. Sket, B. and Trontelj, P., 2008. Global diversity of leeches (*Hirudinea*) in freshwater. *Hydrobiologia*, *595*(1), pp.129–37. DOI: 10.1007/s10750-007-9010-8
24. Soares, M.P., Oliviera, F.C., Cardoso, I.L.,Urbianty, E.C., Campos, C.M. and Hisano, H., 2018. Glucan-MOS® improved growth andinnate immunity in pacu stressed andexperimentally infected with *Aeromonas hydrophila*. *Fish and Shellfish Immunology*, 73, pp.133-140. DOI: 10.1016/j.fsi.2017.11.046
25. Utevsky, S., Zagmajster, M., Atemasov, A., Zinenko, O., Utevska, O. and Utevsky, A., 2010. Distribution and status of medicinal leeches (genus *Hirudo*) in the Western Palaearctic: anthropogenic, ecological, or historical effects. *Aquatic Conserve Mar Freshw Ecosystem, 20*(2), pp.198–210. DOI: 10.1002/aqc.1071
26. Wang, T., Cheng, Y., Chen, X., Liu, Z. and Long, X., 2017. Effects of small peptides, probiotics, prebiotics, and synbiotics ongrowth performance, digestive enzymes, andoxidative stress in orange-spotted grouper, Epinephelus coioides, juveniles reared inartificial seawater. *Chines Journal of Oceanology and Limnology ,* 35, pp.89–97. DOI: 10.1007/s00343-016-5130-1
27. Waterworth, S.C., Flórez, L.V., Rees, E.R., Hertweck, C., Kaltenpoth, M. and Kwan, J.C., 2020. Horizontal Gene Transfer to a Defensive Symbiont with a Reduced Genome in a Multipartite Beetle. *Microbiome Journal*, *11*(1), e02430-19. DOI: 10.1128/mbio.02430-19
28. Whitaker, I.S., Josty, I.C., Hawkins, S., Azzopardi, E., Naderi, N. and Graf, J., 2011. Medicinal leeches and themicrosurgeon: a four-year study, clinical series andrisk *benefit review. Microsurgery*; *31*(4), pp.281-287. DOI: 10.1002/micr.20860

[ Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-07 ]

[ DOI: 10.71901/jad-2026-1-867 ]