Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

Journal of Utilization and Cultivation of Aquatics
Print ISSN: 2345-427X
Online ISSN: 2345-4288

انجمن علمی ماهیان زینتی ایران
Iranian Ornamental Fish Society (IOFS)

(OPEN ACCESS)

The effect of some antibiotics on segmentating and vomiting in Eastern leech (*Hirudo orientalis*)

Mobin Maghsudlo Kamali[1], Mohammad Sudagar[*2], Siamak Yousefi Siahkalroudi[3], Mohammad Mazandarani[4], Fereshteh Khajavi[5]

1. Dept. of Aquaculture, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: mobinmaghsudlo@gmail.com
2. Corresponding Author, Dept. of Aquaculture, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: sudagar_m@gau.ac.ir
3. Iranian Fisheries Science Research Institute, Tehran, Iran. E-mail: siamak.yousefi1@gmail.com
4. Dept. of Aquaculture, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: mazandarani57@gmail.com
5. Dept. of General Courses, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: fkhajavi25@gmail.com

Article Info

Article type:
Full Length Research Paper

Article history:
Received: 06.01.2025
Revised: 06.05.2025
Accepted: 06.08.2025

Keywords:
Amoxicillin,
Antibiotic,
Ceftriaxone,
Ciprofloxacin,
Deformity,
Eastern leech,
Hirudo orientalis,
Vomiting

ABSTRACT

Background and Objectives: Leeches are among the oldest creatures utilized in disease treatment for centuries due to their numerous enzymes. This study aimed to determine the effect of a mixed antibiotic solution (amoxicillin, ceftriaxone, and ciprofloxacin) on reducing banding, regurgitation, and mortality in eastern leech after feeding from larval-needle size to cosmetic-medical size.

Materials and Methods: In this research, 360 eastern leech larva were reared in twelve 10 L tanks, each containing 4 L of water. Four treatment groups, with three replicates each, were compared: a Control group (no antibiotics), Treatment 1 (T1) receiving a 21.69 mg/L mixture of Ceftriaxone, Amoxicillin, and Ciprofloxacin, Treatment 2 (T2) receiving 31.98 mg/L of the mixture, and Treatment 3 (T3) receiving 41.86 mg/L of the mixture. Following each blood feeding session for the leeches, the specified antibiotic concentrations were added to the tank water of the respective treatment groups. Throughout the experimental period, leech deformity rates, vomiting frequency, and mortality rates were monitored and recorded. Data were organized using Microsoft Excel, and comparative charts were plotted for each variable.

Results: The findings of this study indicated that the application of the antibiotic mixture (Ceftriaxone, Ciprofloxacin, and Amoxicillin) in the rearing water of eastern leech larvae had a significant effect on reducing deformity, vomiting, and post-feeding mortality rates. Although statistical analysis showed no significant difference among the various antibiotic concentrations during some time intervals ($P>0.05$), the overall data trend suggested a marked improvement in the leeches' condition compared to the control group. Mortality assessment across three blood feeding cycles revealed that the control group experienced significant mortality (Cycle 1:

no significant difference, P>0.05; Cycle 2: 34.4%, P<0.05; Cycle 3: 8.5%, P<0.05). In contrast, the antibiotic-treated groups effectively prevented mortality. Notably, the highest concentration used (T3) showed a maximum mortality of 1.1% in the third cycle, while the intermediate concentration (T2) recorded zero mortality in the third cycle and showed no significant difference compared to other treatments in the first and second cycles (P>0.05). Evaluation of deformity rates yielded similar results. No significant difference was observed among treatments in the first cycle (P>0.05). However, in the second and third cycles, the antibiotic treatments significantly reduced deformity rates. In the second cycle, T2 and T3 recorded equal deformity rates of 1.1%, while T1 showed zero deformity, compared to 24.4% deformity in the control group (P<0.05). In the third cycle, T2 (0% deformity) and T3 (2.3% deformity) did not differ significantly (P>0.05), whereas the control group exhibited 13.2% deformity (P<0.05). Examination of blood vomiting frequency showed no vomiting events in any treatment group during the first cycle. In the second cycle, although there was no significant difference in vomiting frequency among the antibiotic treatments (P>0.05), the control group showed a significantly higher frequency (18 vomiting events, P<0.05). Similarly, in the third cycle, T1 and T3 had equal vomiting frequencies with no significant difference among them (P>0.05), while the control group, with 10 vomiting events, showed a significant difference compared to the other treatments (P<0.05).

Conclusion: These findings clearly demonstrate the effectiveness of the antibiotic mixture containing Ceftriaxone, Ciprofloxacin, and Amoxicillin in reducing post-feeding deformity, vomiting, and mortality rates in the eastern leech across various developmental sizes (larval, needle, matchstick, cosmetic, and medical).

Cite this article: Maghsudlo Kamali, Mobin, Sudagar, Mohammad, Yousefi Siahkalroudi, Siamak, Mazandarani, Mohammad, Khajavi, Fereshteh. 2026. The effect of some antibiotics on segmentating and vomiting in Eastern leech (*Hirudo orientalis*). *Journal of Utilization and Cultivation of Aquatics*, 15 (1), 155-172.

© The Author(s).
Doi: 10.22069/japu.2025.23706.1959
Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

نشریه بهره‌برداری و پرورش آبزیان
شاپا چاپی: ۲۳٤٥-٤۲۷X
شاپا آنلاین: ۲۳٤٥-٤۲۸۸

بررسی اثر آنتی‌بیوتیک‌های آموکسی‌سیلین، سفتریاکسون و سیپروفلوکساسین بر میزان بندی‌شدن و بالاآوردن خون در زالوی شرقی (*Hirudo orientalis*)

مبین مقصودلو کمالی[۱]، محمد سوداگر[*۲]، سیامک یوسفی سیاهکلرودی[۳]، محمد مازندرانی[٤]، فرشته خواجوی[٥]

۱. گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. رایانامه: mobinmaghsudlo@gmail.com

۲. نویسنده مسئول، گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. رایانامه: sudagar_m@gau.ac.ir

۳. مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، تهران، ایران. رایانامه: siamak.yousefi1@gmail.com

٤. گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. رایانامه: mazandarani57@gmail.com

٥. گروه دروس عمومی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. رایانامه: fkhajavi25@gmail.com

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:
مقاله کامل علمی- پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱٤۰٤/۰۳/۱۱
تاریخ ویرایش: ۱٤۰٤/۰۳/۱٥
تاریخ پذیرش: ۱٤۰٤/۰۳/۱۸

واژه‌های کلیدی:
آموکسی‌سیلین،
آنتی‌بیوتیک،
بالاآوردن خون،
بندی‌شدن،
زالوی شرقی،
سفتریاکسون،
سیپروفلوکساسین،
Hirudo orientalis

چکیده

سابقه و هدف: زالوها به دلیل داشتن آنزیم‌های متعدد یکی از قدیمی‌ترین موجوداتی هستند که در درمان بیماری‌ها از سالیان قبل مورد استفاده قرار می‌گرفته‌اند. هدف این پژوهش، تعیین تأثیر مخلوط آنتی‌بیوتیک‌های آموکسی‌سیلین، سفتریاکسون و سیپروفلوکساسین بر کاهش میزان بندی‌شدن، بالاآوردن خون و تلفات بعد از تغذیه، در زالوی شرقی از اندازه لارو- سوزنی تا آرایشی- طبی انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش، از ۳٦۰ قطعه زالوی شرقی در ٤ تیمار با سه تکرار برای هر تیمار بود که مورد مقایسه قرار گرفتند: تیمار شاهد (بدون آنتی‌بیوتیک)، تیمار ۱ (ترکیب ۱) که مخلوطی از سفتریاکسون، آموکسی‌سیلین و سیپروفلوکساسین با غلظت ۲۱/٦۹ میلی‌گرم بر لیتر دریافت کرد، تیمار ۲ (ترکیب ۲) که ۳۱/۹۸ میلی‌گرم بر لیتر از این مخلوط را دریافت نمود و تیمار ۳ (ترکیب ۳) که ٤۱/۸٦ میلی‌گرم بر لیتر از مخلوط را دریافت کرد. پس از هر نوبت تغذیه زالوها، غلظت‌های مشخص شده آنتی‌بیوتیک به تیمارهای مورد آزمایش اضافه گردید. در طول دوره آزمایش، میزان بندی‌شدن، بالاآوردن خون و تلفات زالوها پایش و ثبت شدند. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار مایکروسافت اکسل سازماندهی شده و نمودارهای مقایسه‌ای برای هر متغیر رسم گردید.

یافته‌ها: بررسی میزان تلفات در سه دوره خون‌دهی نشان داد که تیمار شاهد در تمامی مراحل با درصد قابل‌توجهی از مرگ‌ومیر مواجه بوده است (مرحله اول خون‌دهی: بدون اختلاف

معنی‌دار، P>۰/۰۵؛ مرحله دوم خون‌دهی: ۳٤/٤ درصد، P<۰/۰۵؛ مرحله سوم خون‌دهی: ۸/۵ درصد، P<۰/۰۵). در مقابل، تیمارهای دریافت‌کننده آنتی‌بیوتیک، به‌طور مؤثری از وقوع تلفات جلوگیری نمودند. به‌طوری‌که (ترکیب ۳) حداکثر تلفات ۱/۱ درصد را در مرحله سوم خون‌دهی نشان داد، در حالی‌که غلظت میانی (ترکیب ۲) در مرحله سوم خون‌دهی تلفات صفر درصد را ثبت کرد و در دوره اول و دوم خون‌دهی اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها نداشت (P>۰/۰۵). ارزیابی میزان بندی‌شدن در زالوها نتایج مشابهی را نشان داد. در مرحله اول خون‌دهی، اختلاف معنی‌داری بین تیمارها مشاهده نشد (P>۰/۰۵). در دوره‌های دوم و سوم، تیمارهای آنتی‌بیوتیکی به‌طور چشمگیری میزان بندی‌شدن را کاهش دادند. در مرحله دوم خون‌دهی، ترکیب ۲ و ۳ با میزان بندی‌شدن ۱/۱ درصد برابر ثبت شدند و ترکیب ۱ نیز بندی‌شدن صفر درصد را نشان داد. در حالی‌که در تیمار شاهد ۲٤/٤ درصد بندی‌شدن را ثبت شد (P<۰/۰۵). در مرحله سوم خون‌دهی نیز، ترکیب ۲ با بندی‌شدن صفر درصد و ترکیب ۳ با ۲/۳ درصد اختلاف معنی‌داری نداشتند (P>۰/۰۵)، در حالی‌که تیمار شاهد ۱۳/۲ درصد بندی‌شدن را نشان داد (P<۰/۰۵). بررسی تعداد دفعات بالاآوردن خون در زالوها نشان داد که در مرحله اول خون‌دهی هیچ‌گونه بالاآوردن خونی در تیمارها ثبت نشد. در مرحله دوم خون‌دهی، اگرچه بین تیمارهای آنتی‌بیوتیکی اختلاف معنی‌داری در تعداد دفعات بالاآوردن خون وجود نداشت (P>۰/۰۵)، تیمار شاهد به‌طور قابل‌توجهی تعداد دفعات بیش‌تری از بالاآوردن خون را نشان داد (۱۸ بار، P<۰/۰۵) در مرحله سوم خون‌دهی نیز، تیمارهای ترکیب ۱ و ۳ تعداد دفعات بالا آوردن خون برابری داشتند و اختلاف معنی‌داری بین آن‌ها مشاهده نشد (P>۰/۰۵).

نتیجه‌گیری: این یافته‌ها بیانگر اثربخشی مخلوط آنتی‌بیوتیک‌های سفتریاکسون، سیپروفلوکساسین و آموکسی‌سیلین در کاهش میزان بندی‌شدن، بالاآوردن خون و تلفات پس از خون‌دهی در زالوی شرقی در اندازه‌های مختلف (لارو، سوزنی، کبریتی، آرایشی و طبی) بوده است.

استناد: مقصودلو کمالی، مبین، سوداگر، محمد، یوسفی سیاهکلرودی، سیامک، مازندرانی، محمد، خواجوی، فرشته (۱۴۰۵). بررسی اثر آنتی‌بیوتیک‌های آموکسی‌سیلین، سفتریاکسون و سیپروفلوکساسین بر میزان بندی‌شدن و بالاآوردن خون در زالوی شرقی (*Hirudo orientalis*). *نشریه بهره‌برداری و پرورش آبزیان*، ۱۵ (۱)، ۱۷۲-۱۵۵.

Doi: 10.22069/japu.2025.23706.1959

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

© نویسندگان.

مقدمه

زالودرمانی و استفاده از زالو برای فصد، سابقه‌ای چندین هزار ساله در تمدن‌های باستانی دارد. امروزه، زالوها علاوه بر درمان بیماری‌ها، منبع مهمی برای استخراج آنزیم‌ها و ترکیبات زیست‌فعال دارویی محسوب می‌شوند (۱). از بزاق زالو آنزیم‌های هیستامین، بدلین، هیرودین، اگلین و... استخراج شده است (۲). ترکیبات بزاق زالو، در دوزهای پایین، می‌توانند بر سلامت بدن تأثیر مثبت داشته و به عنوان مکمل در درمان‌های دارویی به‌کار روند. کاربرد گسترده زالو و آنزیم‌های بزاق آن در پزشکی، توجه پژوهش‌گران و پزشکان را به خود جلب کرده است (۳ و ٤).

زالوها در سراسر جهان و در زیستگاه‌های متنوعی پراکنده شده‌اند که شامل: آب‌های شیرین، دریاها و بیابان‌ها می‌شود (۵). این موجودات هرمافرودیت هستند، اما برای تولیدمثل به جفت‌گیری نیاز دارند و قادر به خودباروری نمی‌باشند (٦). زالوها در نژادهای مختلفی در دنیا شناخته شده‌اند ۳ گونه مهم پرورشی زالو شامل *Hirudo orientalis*، *Hirudo medicinalis* و *Hirudo verbena* در درمان بیماری‌ها بیش‌تر مورد استفاده قرار می‌گیرند (۷ و ۸). از گونه زالوی شرقی، برای کارهای درمانی در ایران استفاده می‌گردد (۹) (شکل ۱).

شکل ۱- سطح پشتی زالو (A)، سطح شکمی زالو (B).

Figure 1. Dorsal view of leech (A), Ventral view of leech (B).

زالوها در زیستگاه طبیعی خود مانند آب‌بندان‌ها، مرداب‌ها و شالیزارها، از خون حیواناتی مانند لاک‌پشت، قورباغه و ماهی تغذیه می‌کنند. در صنعت تکثیر و پرورش، غذای اصلی زالوها خون دام‌هایی مانند گاو، گوسفند، بز و شتر است (۱۰ و ۱۱).

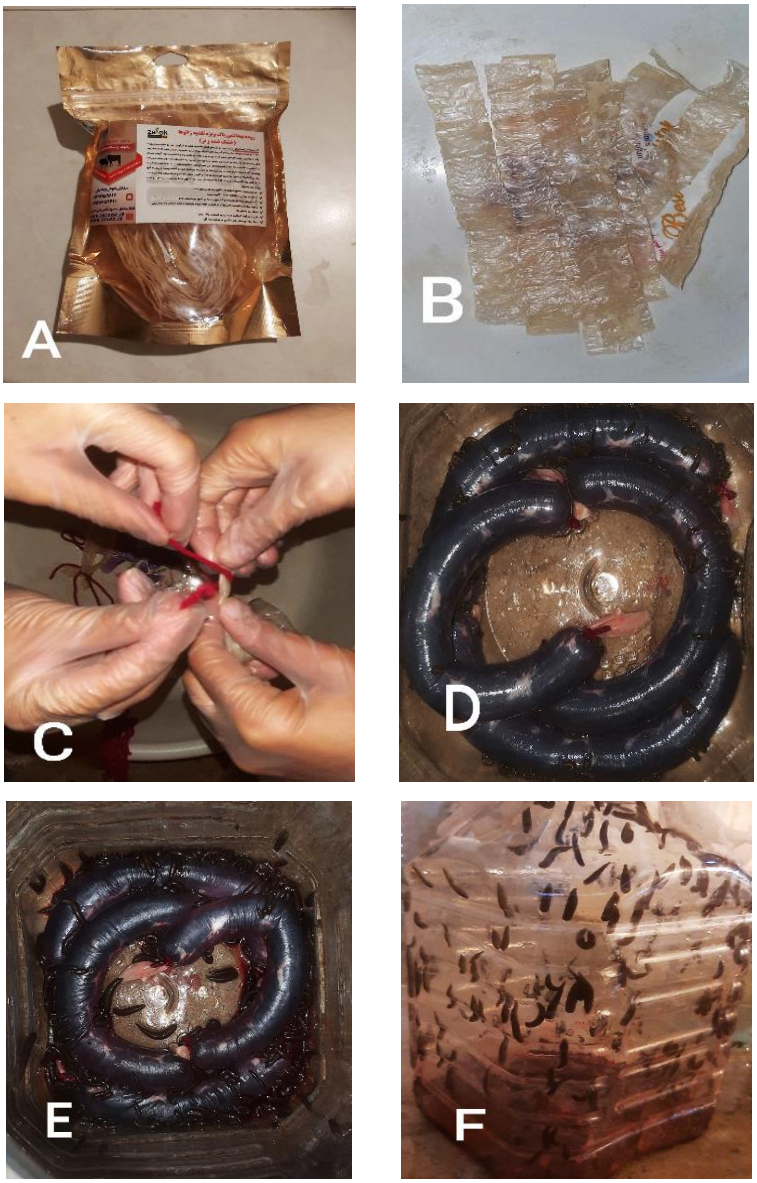
زالوی طبی پس از هر بار تغذیه با خون، می‌تواند تا یک سال و نیم بدون غذا زنده بماند، زیرا هنگام مکیدن خون، توانایی دارد تا ده برابر وزن خود خون ذخیره کند (۱۲). زالوها پس از تغذیه با خون، اغلب مقداری از آن را بالا می‌آورند که به اصطلاح بالاآوردن خون نامیده می‌شود. این فرآیند شامل: بازگرداندن مواد غذایی و ترشحات دستگاه گوارش زالو است که منجر به تغییر رنگ و آلودگی آب، کاهش اکسیژن و در نهایت افزایش تلفات زالوها می‌شود (۱۳ و ١٤). بالا آوردن محتویات دستگاه گوارش توسط زالو پس از تغذیه، آب را با باکتری‌ها و میکروارگانیسم‌های مضر آلوده می‌کند. این آلودگی کیفیت آب را کاهش داده و به ویژه باعث کاهش اکسیژن محلول در آب می‌شود (۱۵). از جمله دلایل بروز پدیده بالا آوردن خون در زالوها می‌توان به آلوده بودن خون مصرفی، آلودگی میکروبی آب محیط پرورش، شرایط نامناسب محیطی، آلودگی

ظروف نگهداری خون و هم‌چنین، تغذیه بیش از حد زالوها اشاره کرد (۱۶). هم‌چنین، بندی‌شدن زالو به تغییرات یا ناهنجاری‌های ساختاری در بدن آن‌ها گفته می‌شود. این مشکل می‌تواند ناشی از عوامل ژنتیکی، آلودگی‌های محیطی یا آسیب‌های جسمانی باشد. چنین ناهنجاری‌هایی عملکرد، بقا و تولیدمثل زالوها را تحت‌تأثیر قرار می‌دهد (۱۷). آنتی‌بیوتیک‌ها به‌طور گسترده برای پیشگیری و کنترل بیماری‌ها در آبزی‌پروری مورد استفاده قرار می‌گیرند (۱۸). استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها مانند سفتریاکسون، آموکسی‌سیلین و سیپروفلوکساسین، به‌عنوان یک راهکار برای کاهش مشکلاتی مانند بالاآوردن خون، بندی‌شدن زالوها و تلفات در محیط‌های پرورشی پیشنهاد شده است. سفتریاکسون از جمله آنتی‌بیوتیک‌های سفالوسپورین نسل سوم محسوب می‌گردد که مکانیسم اثر آن مبتنی بر مهار سنتز دیواره سلولی باکتری‌ها است. این آنتی‌بیوتیک دارای طیف اثر گسترده‌ای بوده و بر هر دو گروه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی اثر دارد (۱۹). آموکسی‌سیلین، یک آنتی‌بیوتیک نیمه‌سنتزی از خانواده پنی‌سیلین‌ها است که هم بر باکتری‌های گرم مثبت و هم گرم منفی مؤثر است. این دارو به‌طور گسترده‌ای برای درمان انواع عفونت‌ها کاربرد دارد و معمولاً در دوز ۵۰۰ میلی‌گرم تجویز می‌شود. آموکسی‌سیلین به‌دلیل مصرف بالا، جزو داروهای اساسی در بسیاری از پروتکل‌های درمانی است (۲۰). سیپروفلوکساسین به‌عنوان یک آنتی‌بیوتیک با طیف اثر گسترده در برابر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی شناخته می‌شود. این آنتی‌بیوتیک از قابلیت جذب بالایی در بدن برخوردار بوده و مکانیسم اثر آن از طریق مهار فرآیندهای حیاتی تکثیر DNA و رونویسی در سلول‌های باکتریایی اعمال می‌گردد؛ هم‌چنین، نقش به‌سزایی در کاهش میزان مرگ و میر ناشی از عفونت‌های باکتریایی ایفا می نماید (۲۱).

مواد و روش‌ها

مکان و زمان انجام آزمایش: تمامی مراحل این آزمایش در مرکز آبزی‌پروری شهید ناصر فضلی برابادی واقع در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان از مهر ۱۴۰۳ تا بهمن ۱۴۰۳ انجام گرفت.

تهیه زالو: برای انجام این پژوهش، تعداد ۳۶۰ قطعه لارو زالوی شرقی از مراکز مجاز تکثیر و پرورش زالو تهیه گردید. جهت تغذیه زالوها، از روده استریل گاو استفاده گردید. خون از طریق قیف به درون روده‌ها ریخته شد. روده‌های حاوی خون در آب گرم با دمای حدود ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند تا به دمای مناسب برسند. سپس روده‌ها درون پت قرار گرفتند و زالوها برای تغذیه از خون داخل روده‌ها بر روی آن‌ها قرار داده شدند. پس از گذشت حدود نیم ساعت، مشاهده شد که زالوها تغذیه کرده و به‌تدریج اندازه زالوها افزایش یافت (شکل ۲).



شکل ۲- A: روده استریل، **B**: بریدن روده به اندازه‌های مورد نیاز **C**: پر کردن روده از خون، **D**: خوندهی زالوها به روش سوسیسی، **E**: زالوهای در حال تغذیه، **F**: جدا شدن زالوها از روده‌ها.

Figure 2. A: Sterilization of the intestine, B: Sectioning the intestine to the required sizes, C: Blood-filling of the intestine, D: "Sausage-method" blood-feeding of leeches, E: Feeding leeches, F: Detachment of leeches from the intestines.

آماده‌سازی زالوها و آنتی‌بیوتیک‌ها: ۳٦۰ قطعه زالو براساس تیمارهای مشخص با ۳ تکرار که شامل مخلوط آنتی‌بیوتیک‌های (سفتریاکسون، آموکسی‌سیلین و سیپروفلوکساسین) با سه دوز (ترکیب ۱، ترکیب ۲ و ترکیب ۳) و یک تیمار شاهد در پت‌های ۱۰ لیتری توزیع شدند. در هر پت، ٤ لیتر آب کلرزدایی‌شده ریخته و ۳۰ قطعه زالو قرار داده شد. دهانه پت‌ها با توری و کش بسته شد تا از خروج زالوها جلوگیری شود.

ترکیب ۱ شامل ۲۱/٦۹ mg/L از مخلوط آنتی‌بیوتیک‌های (سفتریاکسون، آموکسی‌سیلین و سیپروفلوکساسین)

ترکیب ۲ شامل ۳۱/۹۸ mg/L از مخلوط آنتی‌بیوتیک‌های (سفتریاکسون، آموکسی‌سیلین و سیپروفلوکساسین)

ترکیب ۳ شامل ٤١/٨٦ mg/L از مخلوط آنتی‌بیوتیک‌های (سفتریاکسون، آموکسی‌سیلین و سیپروفلوکساسین)

استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها: پس از انتقال زالوها به پت‌ها، مخلوط آنتی‌بیوتیک‌ها با دوزهای تعیین‌شده به تیمارهای مورد آزمایش اضافه شد. این فرآیند به‌مدت ٤ روز متوالی تکرار گردید؛ هم‌چنین، تعویض آب هر ٢٤ ساعت یک‌بار انجام شد. برخی پارامترهای فیزیکیوشیمیایی (pH، اکسیژن و دما) آب ثبت گردید و در طول مدت آزمایش، میزان بالاآوردن خون، بندی‌شدن و تلفات در زالوها ثبت شد. در این پژوهش، ۳ مرحله خون‌دهی انجام شد که پس از هر مرحله خون‌دهی، مخلوط آنتی‌بیوتیک‌های سفتریاکسون، سیپروفلوکساسین و آموکسی‌سیلین، با دوزهای تعیین شده به تیمارهای مورد آزمایش افزوده شد.

پارامترهای فیزیک و شیمیایی آب: پارامترهای کیفی آب مانند: اکسیژن محلول و pH پس از هر نوبت خون‌دهی اندازه‌گیری و ثبت شدند. میانگین مقادیر اندازه‌گیری‌شده برای هر یک از این پارامترها در جدول زیر ارائه شده است (جدول ۱).

جدول ۱- میانگین برخی پارامترهای فیزیک و شیمیایی آب.

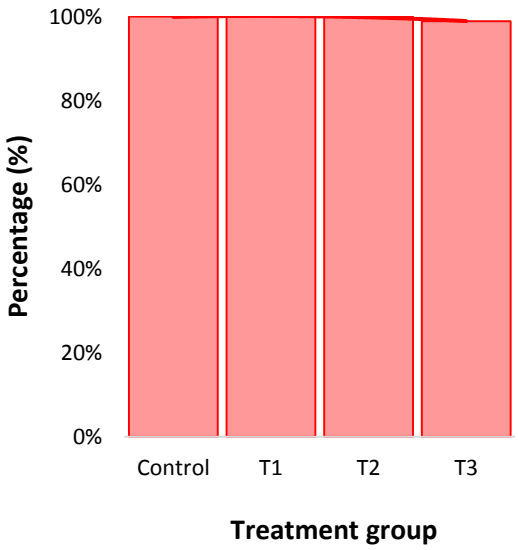
Table 1. Mean Values of Selected Physicochemical Parameters of Water.

تیمارها Treatments	اکسیژن Oxygen (mg/L)	pH	دما Temperature (°C)
شاهد (Control)	5.30±0.1	8.11±0.1	23±0.1
تیمار ۱ (Treatment 1)	5.30±0.1	8.08±0.2	23±0.2
تیمار ۲ (Treatment 2)	5.33±0.2	8.07±0.1	23±0.1
تیمار ۳ (Treatment 3)	5.32±0.1	8.21±0.2	23±0.1

تجزیه و تحلیل آماری: به‌منظور تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار آماری SPSS 25 و برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel استفاده شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه One-way ANOVA و اختلاف بین میانگین‌ها به‌وسیله آزمون چنددامنه‌ای دانکن تعیین شد. سطح معنی‌دار بودن در تمامی بررسی‌ها ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج و بحث

پس از خون‌دهی اول میزان تلفات زالوها (لارو- سوزنی) از نظر آماری اختلاف معنی‌داری را نشان نداده است (P>۰/۰۵). اگرچه میزان تلفات در ترکیب ۳ حدود یک درصد ثبت شده است (شکل ۳).

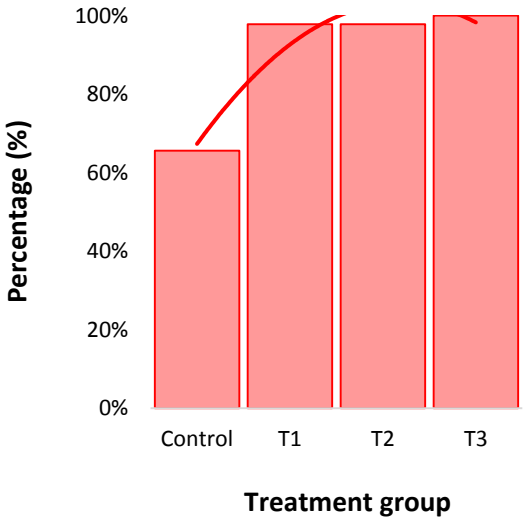


شکل ۳- میزان بازماندگی در تیمارهای مورد آزمایش (لارو).

Figure 3. Survival Rates in the Tested Treatments (Larvae).

نمودار نشان می‌دهد که استفاده از آنتی‌بیوتیک با دوزهای پایین‌تر (ترکیب ۱ و ۲) در خون‌دهی اول زالوها تأثیر منفی بر میزان تلفات نداشته و در پیشگیری از عفونت مفید بوده است، اما افزایش دوز آنتی‌بیوتیک در ترکیب ۳ منجر به تلفات اندکی شده است اگرچه این اختلاف معنی دار نبوده است (P>۰/۰۵).

پس از خون‌دهی دوم میزان تلفات زالوها (کبریتی- آرایشی) در ترکیب ۱ و ۲ از نظر آماری با یکدیگر برابر بودند. اگرچه میزان تلفات در ترکیب ۳ حدود یک درصد گزارش شده است ولی اختلاف معنی‌داری با ترکیب ۱ و ۲ نداشته است (P>۰/۰۵). این در حالی است که تیمار شاهد با ۳٤/٤ درصد تلفات اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها داشته است (P<۰/۰۵) (شکل ٤).

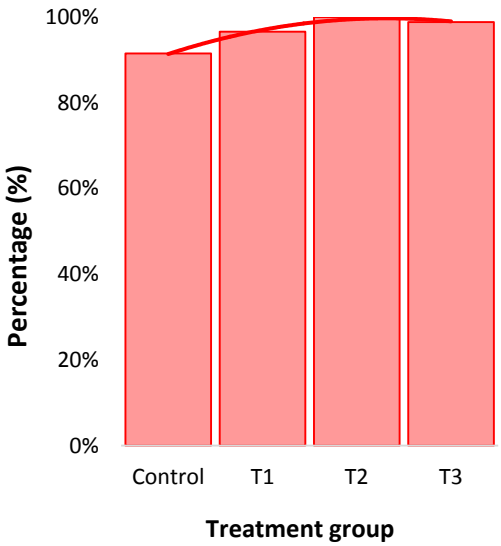


شکل ٤- میزان بازماندگی در تیمارهای مورد آزمایش (سوزنی- کبریتی).

Figure 4. Survival Rates in the Tested Treatments (Needle and Matchstick Stages).

خون‌دهی دوم، برای زالوها، به‌دلیل افزایش استرس فیزیولوژیک، ضعف سیستم ایمنی و افزایش مشکلات گوارشی با افزایش خطر تلفات همراه است. اما استفاده از آنتی‌بیوتیک در هر سه دوز مورد آزمایش به‌طور مؤثری از تلفات جلوگیری کرده و با افزایش دوز، درصد بازماندگی زالوها بهبود یافته است. براساس نتایج به‌دست آمده، مخلوط آنتی‌بیوتیک مورد استفاده، از زالوها در برابر عوامل بیماری‌زا یا شرایط نامساعد محیطی محافظت کرده و از بروز تلفات جلوگیری نموده است. هم‌چنین، در مطالعه‌ای، ۹۰ قطعه زالوی شرقی، پس از خون‌دهی در سه گروه کبریتی، آرایشی و طبی تقسیم شدند و هر گروه به مدت یک هفته در محلول لینکومایسین با غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر نگهداری شد. نتایج نشان داد که پس از دو هفته درمان، میزان تلفات زالوها به‌طور چشمگیری کاهش یافت و پس از چهار هفته،۹۰ درصد زالوهای کبریتی، ۸۰ درصد زالوهای آرایشی و ٦۰ درصد زالوهای طبی زالوها بهبود یافتند؛ به‌طوری‌که لینکومایسین توانست به‌عنوان یک گزینه مؤثر در درمان، میزان تلفات زالوها را کاهش دهد (۲۲).

پس از خون‌دهی سوم میزان تلفات زالوها (آرایشی- طبی) تلفات در تیمارهای مخلوط آنتی‌بیوتیک معنی‌دار نبود اما تمام تیمارها با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری را نشان داد ($P<0/05$) (شکل ۵).



شکل ۵- میزان بازماندگی در تیمارهای مورد آزمایش (آرایشی- طبی).

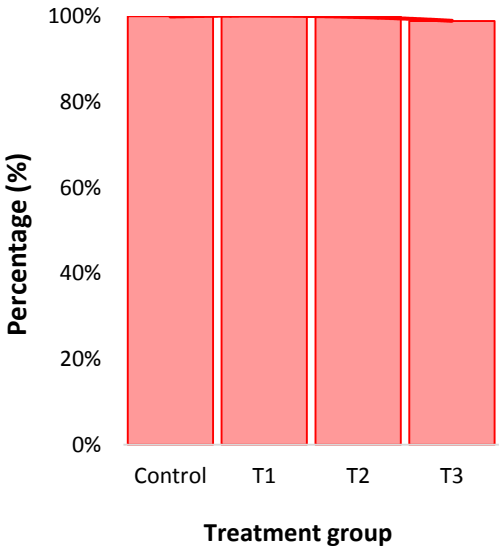
Figure 5. Survival Rates in the Tested Treatments (Arranged and Medicinal Leeches).

عملکرد بهتر ترکیب ۲ ناشی از فراهم کردن غلظت بهینه آنتی‌بیوتیک برای کنترل طیف وسیعی از باکتری‌های مضر می‌باشد. استفاده از آنتی‌بیوتیک به‌دلیل کنترل مؤثر عفونت‌های باکتریایی و کاهش استرس فیزیولوژیک ناشی از آن‌ها است که به حفظ سلامت و بقای زالوها کمک کرده و اجازه می‌دهد انرژی بیش‌تری صرف ترمیم بافت شود. هم‌چنین، در مطالعه‌ای پس از تغذیه ۷۵ قطعه زالوی شرقی با خون گاو، محلول سفتریاکسون (با غلظت ۱ گرم در ۳ لیتر آب) به‌مدت پنج روز به ظروف نگهداری اضافه شد و وضعیت زالوها تا ۲۸ روز پس از تغذیه پایش گردید. کاهش تلفات مشاهده‌شده بیانگر ایمنی این دوز آنتی‌بیوتیک برای زالوها بود (۱۷) (شکل ٦).

شکل ٦- تلفات زالو پس از بندی‌شدن.

Figure 6. Leeches Mortality After segmentation.

پس از خون‌دهی اول میزان بندی‌شدن زالوها (لارو- سوزنی) از نظر آماری اختلاف معنی‌داری نشان نداده است (P>۰/۰۵). اگرچه میزان بندی‌شدن در ترکیب ۳ حدود یک درصد ثبت شده است (شکل ۷).

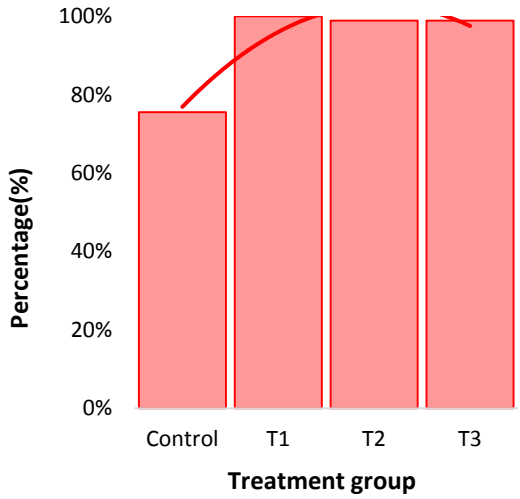


شکل ۷- میزان زالوهای سالم در تیمارهای مورد آزمایش (لارو).

Figure 7. Number of Healthy Leeches in the Tested Treatments (Larvae).

نمودار نشان می‌دهد که کاربرد آنتی‌بیوتیک در دوزهای پایین‌تر (ترکیب ۱ و ۲) طی اولین خون‌دهی زالوها تأثیر منفی بر تلفات نداشته و نقش پیشگیرانه در برابر عفونت ایفا کرده است؛ در حالی‌که افزایش دوز در ترکیب ۳ با ۱/۱ درصد بندی‌شدن همراه بوده، هر چند این تفاوت از نظر آماری معنادار نبوده است (P>۰/۰۵).

پس از خون‌دهی دوم میزان زالوهای دفرمه (کبریتی- آرایشی) در ترکیب ۲ و ۳ از نظر آماری با یکدیگر اختلاف معنی‌داری مشاهده نشده است (P>۰/۰۵)؛ هم‌چنین، میزان زالوهای دفرمه در ترکیب ۱ صفر درصد ثبت شده است. در حالی‌که تیمار شاهد با ٢٤/٤ درصد زالوی دفرمه، بیش‌ترین میزان بندی‌شدن را نشان داده و این اختلاف به‌طور معناداری نسبت به سایر تیمارها قابل‌توجه بوده است. (P<۰/۰۵) (شکل ۸).

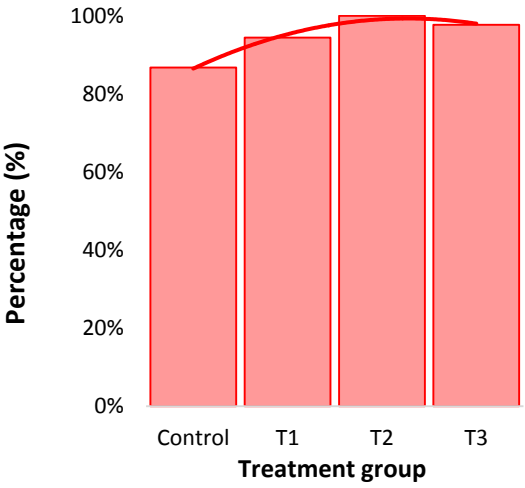


شکل ۸- میزان زالوهای سالم در تیمارهای مورد آزمایش (سوزنی- کبریتی).

Figure 8. Number of Healthy Leeches in the Tested Treatments (Needle and Matchstick Stages).

افزایش خطر بندی‌شدن در زالوها پس از خون‌دهی دوم یک مسأله چندعاملی است که ناشی از استرس و ضعف فیزیولوژیکی ناشی از خون‌دهی اول و تضعیف سیستم ایمنی می‌باشد. در این میان، عملکرد بهتر ترکیب ۱، ۲ و ۳ در جلوگیری از بندی‌شدن به دلیل کنترل مؤثر عفونت‌های ثانویه می‌باشد. هم‌چنین، در مطالعه‌ای ۹۰ عدد زالوی شرقی را در سه گروه مختلف (کبریتی، آرایشی و طبی) دسته‌بندی کرده و پس از خون‌دهی، آن‌ها را به‌مدت یک هفته در محلول آنتی‌بیوتیک لینکومایسین با غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر قرار دادند. نتایج نشان داد که بندی‌شدن به‌طور چشمگیری کاهش یافت و پس از چهار هفته درمان، ۹۰ درصد زالوهای کبریتی، ۸۰ درصد آرایشی و ۶۰ درصد طبی که دفرمه شده بودند، به حالت طبیعی بازگشتند، که نشان‌دهنده اثربخشی بالای لینکومایسین در بهبود این عارضه است (۲۲).

پس از خون‌دهی سوم میزان زالوهای دفرمه (آرایشی- طبی) در ترکیب آنتی‌بیوتیک ۱، ۲ و ۳ با هم اختلاف معنی‌داری نداشته ولی با شاهد اختلاف آن‌ها معنی‌دار بود ($P<0/05$) (شکل ۹).



شکل ۹- میزان زالوهای سالم در تیمارهای مورد آزمایش (آرایشی- طبی).

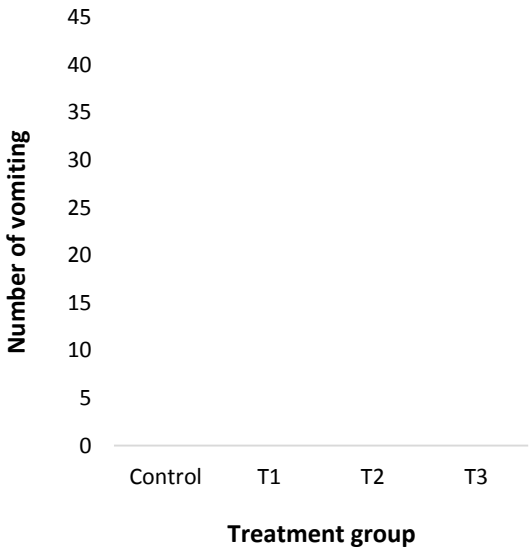
Figure 9. Number of Healthy Leeches in the Tested Treatments (Arranged and Medicinal Leeches).

عملکرد مناسب ترکیب ۱، ۲ و ۳ در جلوگیری از بندی‌شدن در خون‌دهی سوم به احتمال زیاد ناشی از توانایی آن در حفظ تعادل است. این دوز به اندازه‌ای بهینه است که می‌تواند از رشد عوامل بیماری‌زای فرصت‌طلب، که در شرایط کاهش ایمنی ناشی از خون‌دهی‌های مکرر فعال می‌شوند، جلوگیری کند. هم‌چنین، در مطالعه‌ای با استفاده از آنتی‌بیوتیک سفتریاکسون، پس از تغذیه زالوهای شرقی با خون گاو، روزانه ۳ سی‌سی از محلول ۱ گرم سفتریاکسون در ۳ لیتر آب را به‌مدت پنج روز به تیمارهای مورد آزمایش افزودند و با تصویربرداری دوره‌ای کاهش بندی‌شدن بدن زالو را پیگیری کردند؛ نتایج نشان داد تا دو هفته پس از درمان، حدود ۹۰-۷۰ درصد زالوها بهبود یافتند (۱۷) (شکل ۱۰).

پس از خون‌دهی اول در تیمارهای مختلف هیچ بالاآوردن خونی مشاهده نگردید (شکل ۱۱).

شکل ۱۰- زالوهای بندی پس از خون‌دهی.

Figure 10. Bound Leeches After Blood Feeding.

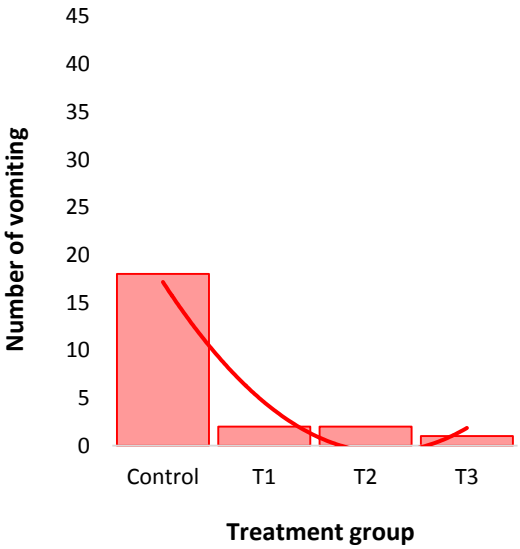


شکل ۱۱- تعداد دفعات بالاآوردن خون در تیمارهای مورد آزمایش (لارو).

Figure 11. Frequency of Regurgitation Events in the Tested Treatments (Larvae).

عدم مشاهده بالاآوردن خون در هیچ‌یک از تیمارها در خون‌دهی اول به‌دلیل آمادگی فیزیولوژیکی مناسب زالوها برای اولین تغذیه و عدم مواجهه با عوامل تحریک‌کننده است. نتایج نشان می‌دهد که آنتی‌بیوتیک‌ها با دوزهای مختلف در این مرحله تأثیر مستقیمی بر بروز پدیده بالا آوردن خون نداشته‌اند و این مشکل بیش‌تر تحت‌تأثیر عوامل فیزیولوژیکی و شرایط اولیه تغذیه قرار گرفته است. با این‌حال، عدم بروز بالاآوردن خون در خون‌دهی اول به معنای عدم وقوع آن در خون‌دهی‌های بعدی نیست، زیرا با تکرار تغذیه و تغییر وضعیت زالوها، احتمال بروز این مشکل ممکن است افزایش یابد.

پس از خون‌دهی دوم تعداد دفعات بالاآوردن خون در ترکیب ۱، ۲ و ۳ اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نداشتند (P>۰/۰۵). این در حالی است که تعداد بالاآوردن خون تیمار شاهد، ۱۸ بار ثبت شده است. داده‌ها نشان می‌دهد که اختلاف تیمار شاهد با سایر تیمارها معنی‌دار بوده است (P<۰/۰۵) (شکل ۱۲).



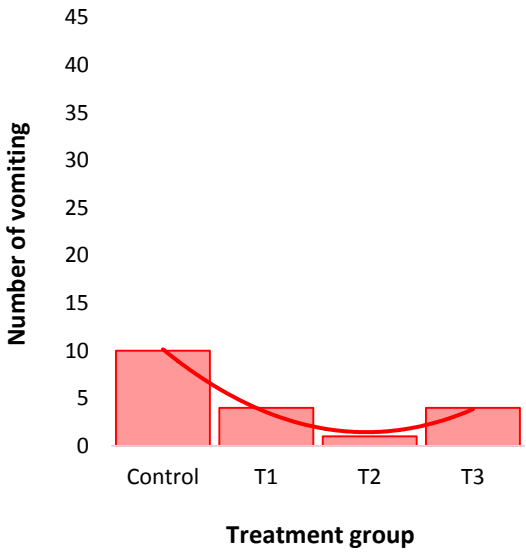
شکل ۱۲- تعداد دفعات بالاآوردن خون در تیمارهای مورد آزمایش (سوزنی- کبریتی).

Figure 12. Frequency of Regurgitation Events in the Tested Treatments (Needle and Matchstick Stages).

کاهش قابل‌توجه بالاآوردن خون در تیمارهای مورد آزمایش در خون‌دهی دوم احتمالاً ناشی از توانایی آنتی‌بیوتیک در کاهش بار میکروبی و جلوگیری از عفونت‌های ثانویه در سیستم گوارشی زالوها است، که می‌تواند از تحریک و التهاب جلوگیری کند. هم‌چنین، آنتی‌بیوتیک ممکن است با کاهش تولید مواد محرک توسط باکتری‌ها یا تأثیر بر فلور طبیعی دستگاه گوارش، به‌طور غیرمستقیم از بروز بالاآوردن خون پیشگیری نماید. حساسیت بیش‌تر زالوها به استرس پس از خون‌دهی اول نیز می‌تواند در افزایش بالاآوردن خون در گروه شاهد نقش داشته باشند، در حالی‌که آنتی‌بیوتیک با کاهش عوامل استرس‌زا مانند: عفونت ممکن است این حساسیت را کاهش دهد. در مجموع نتایج نشان داد که عوامل میکروبی نقش مهمی در تحریک بالاآوردن خون زالوها در خون‌دهی دوم ایفا کرده و استفاده از آنتی‌بیوتیک با کنترل این عوامل به‌طور مؤثر از بالاآوردن خون جلوگیری می‌کند. هم‌چنین در مطالعه دیگری، بالاآوردن خون پس از استفاده از آنتی‌بیوتیک لینکومایسین در زالوها به‌طور کامل متوقف شد (۲۲).

پس از خون‌دهی سوم تعداد دفعات قی‌کردن خون در زالوهای (آرایشی- طبی) در تیمارهای ترکیب ۱ و

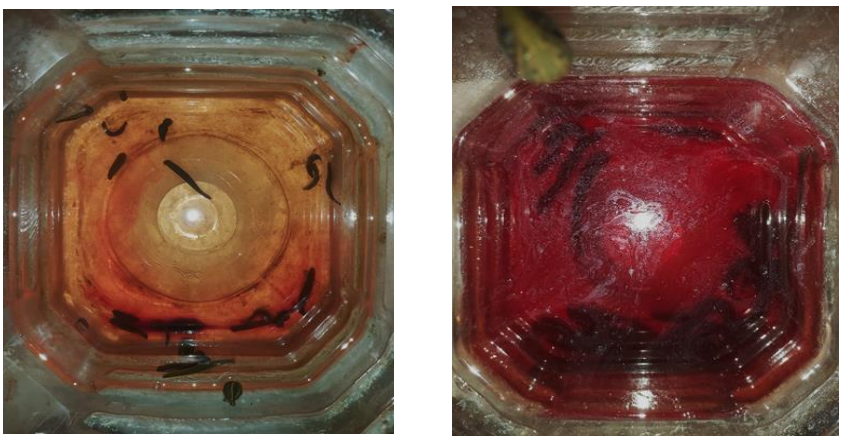
ترکیب ۳، برابر ثبت شد. این در حالی است که بیش‌ترین تعداد قی‌کردن در تیمار شاهد (۱۰ بار) و کم‌ترین تعداد در ترکیب ۲ مشاهده شده است. داده‌ها نشان می‌دهد که اختلاف تیمار شاهد با سایر تیمارها معنی‌دار بوده ($P<0/05$)، در حالی‌که بین سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید ($P>0/05$) (شکل ۱۳).



شکل ۱۳- تعداد دفعات بالاآوردن خون در تیمارهای مورد آزمایش (آرایشی- طبی).

Figure 13. Frequency of Regurgitation Events in the Tested Treatments (Arranged and Medicinal Leeches).

کاهش بالاآوردن خون در زالوهای دریافت‌کننده آنتی‌بیوتیک در خون‌دهی سوم به‌دلیل تداوم کنترل بار میکروبی و پیشگیری از عفونت‌های گوارشی است. عملکرد بهتر ترکیب ۲ در این مرحله نشان‌دهنده ایجاد تعادل بهینه در کنترل عوامل بیماری‌زا می‌باشد. در عین‌حال، تغییر در عملکرد ترکیب ۳ ممکن است ناشی از تغییرات در فلور میکروبی یا ایجاد مقاومت دارویی باشد. هم‌چنین در مطالعه‌ای، برای پیشگیری از بالاآوردن خون توسط زالوی شرقی، از آنتی‌بیوتیک سفتریاکسون پس از خون‌دهی به زالوها استفاده شد. نتایج این مطالعه نشان داد که استفاده از این آنتی‌بیوتیک می‌تواند سبب جلوگیری از بالاآوردن خون در زالوی شرقی گردد (۱۷) (شکل ١٤).



شکل ١٤- بالاآوردن خون توسط زالوها.

Figure 14. Vomiting Blood by Leeches.

در یک آزمایشی که انجام شد، پژوهش‌گران تلاش کردند با استفاده از آنتی‌بیوتیک لینکومایسین از بروز مشکلات رایج پس از تغذیه مانند بندی شدن بدن و بالاآوردن خون در زالوی شرقی جلوگیری کنند. نتایج نشان داد بالا آوردن خون به‌طور کامل مهار شد و زالوها از نظر ظاهری و رفتاری فعال‌تر شدند. به‌طور کلی، لینکومایسین توانست به‌عنوان یک گزینه درمانی مناسب، موجب کاهش تلفات و بهبود سلامت عمومی زالوها شود، هرچند اثربخشی آن در زالوهای بزرگ‌تر کم‌تر بود که نیاز به بررسی دوز و مدت درمان بیش‌تر را مطرح می‌کند (۲۲).

در مطالعه دیگری، با هدف تعیین تأثیر یک ترکیب آنتی‌بیوتیکی شامل: پنی‌سیلین، سیپروفلوکساسین، تتراسایکلین و لینکومایسین بر روی زالوی شرقی انجام شد تا اثر آن بر مشکلات رایج در پرورش زالو، یعنی بالاآوردن خون و بندی‌شدن ارزیابی شود. پژوهش‌گران پس از آماده‌سازی محلول آنتی‌بیوتیکی با غلظت‌های مشخص برای هر آنتی‌بیوتیک، ۹۰ قطعه زالو به سه تیمار شاهد (بدون آنتی‌بیوتیک) و دو تیمار (زالوهای کبریتی- آرایشی و زالوهای طبی در معرض محلول آنتی‌بیوتیک) تقسیم شدند. نتایج حاصل از مشاهدات روزانه نشان داد که تیمار آنتی‌بیوتیکی توانست به‌طور کامل از رفتار بالاآوردن خون در تمام زالوها جلوگیری کند، در حالی‌که این مشکل در تیمار شاهد ادامه داشت. با این‌حال، در خصوص بهبود علائم بندی‌شدن بدن، تنها حدود ۲۰ درصد از زالوها به‌طور کامل بهبود یافتند، هرچند درمان در زالوهای کبریتی و آرایشی سریع‌تر از زالوهای طبی مشاهده شد. این نتایج نشان‌دهنده اثربخشی قابل‌توجه ترکیب آنتی‌بیوتیک‌ها در کنترل بالاآوردن خون ناشی از عفونت باکتریایی در زالوها بود، اما نیاز به بررسی بیش‌تر برای بهبود کامل بندی‌شدن را مطرح می‌کند (۲۳).

در جدول ذیل وزن زالو در اندازه‌های لارو، سوزنی، کبریتی، آرایشی و طبی قبل و بعد از تغذیه با خون (بر حسب گرم) آورده شده است.

جدول ۲- وزن زالو در اندازه‌های مختلف قبل و بعد از تغذیه.

Table 2. Weight of Leeches at Different Sizes Before and After Feeding.

لارو Larvae (g)		سوزنی- کبریتی Needle–Matchstick Stage (g)		آرایشی- طبی cosmetic-medical Stage (g)	
قبل از تغذیه Before Feeding	بعد از تغذیه After Feeding	قبل از تغذیه Before Feeding	بعد از تغذیه After Feeding	قبل از تغذیه Before Feeding	بعد از تغذیه After Feeding
0.03	0.25	0.16	0.99	0.87	2.32

نتیجه‌گیری کلی

استفاده از مخلوط آنتی‌بیوتیک‌ها (سفتریاکسون، سیپروفلوکساسین و آموکسی‌سیلین) به‌طور چشمگیری باعث کاهش بندی‌شدن و بالاآوردن خون در زالوی شرقی پس از تغذیه شد. این ترکیب آنتی‌بیوتیکی هم‌چنین، میزان تلفات را در مقایسه با گروه شاهد به‌طور مؤثر کاهش داد. به‌طورکلی، آنتی‌بیوتیک‌ها به بهبود وضعیت سلامتی و افزایش بقای زالوها در مراحل مختلف رشد کمک کردند.

منابع

1. Bidmal, H. R., Sudagar, M., & Shakouri, M. (2022). The effect of different blood (camel and frogs) on sexual maturity, survival and the production of cocoons and larvae in oriental leech (*Hirudo orientalis*). *Journal of Aquaculture Development*, 16(1), 33-42. **http://dx.doi.org/10.52547/aqudev.16.1.33.**
2. Swyer, P. R. (1987). New perspectives in neonatal nutrition. *Biol Neonate*, 52(Suppl 1), 4-16. **https://doi.org/10.1159/000242734.**
3. Montinari, M. R., & Minelli, S. (2022). From ancient leech to direct thrombin inhibitors and beyond New from old. *Biomedicine and pharmacotherapy*, 149, 112878. **http://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.112878.**
4. Ceylan, M., Küçükkara, R., & Karataş, E. (2023). Effects of cocoon incubation angle on hatching success of medicinal leeches (*Hirudo* spp.). *Invertebrate Reproduction and Development*, 67(3-4), 121-128. **http://doi.org/10.1080/07924259.2023.2241418.**
5. Gouda, H. A. (2006). The effect of peritrich ciliates on some freshwater leeches from Assiut, Egypt. *Journal of Invertebrate Pathology*, 93(3), 143-149.
6. Firouzbakhsh, S., & Sudagar, M. (2024). A review of reproduction and cocoon deposition in leeches. *Ornamental Aquatic Fish Quarterly*, 11(4), 53-64. **https://doi.org/10.22034/11.4.53.**
7. Zulhisyam, A. K., Ismail, A. A., & Omar, I. C. (2011). Optimization of growth conditions of *Hirudinea* sp. *Aust. J. Basic Appl. Sci*. 5(3), 268-275.
8. Saglam, N. (2018). The effects of environmental factors on leeches. *Adv. Agr. Environ. Sci*. 1(1), 00001.
9. Utevsky, S. Y., & Trontelj, P. (2005). A new species of the medicinal leech (Oligochaeta, Hirudinida, *Hirudo*) from Transcaucasia and an identification key for the genus Hirudo. *Parasitology Research*, 98, 61-66.
10. Sawyer, R. T. (1986). Leech biology and behaviour. Feeding, Biology, *Ecology and Systematics*, 1, 3.
11. Lent, C. M., & Dickinson, M. (1988). The neurobiology of feeding in leeches Scientific. 258(6), 98-103.
12. Habdija, I., Primc-Habdija, B., Špoljar, M., & Sertić Perić, M. (2011). Ecological determinants of rotifer vertical distribution in a coastal karst lake (Vrana Lake, Cres Island, Croatia). *Biologia*, 66(1), 130-137. **https://doi.org/10.2478/s11756-010-0144-1.**
13. Ceylan, M., & Erbatur, İ. (2012). A study on nutrition of medicinal leech (*Hirudo verbana*) Carena, 1820): Cannibalism. *Su Ürünleri Dergisi*, 29(4), 167-170. **https://doi.org/10.12714/egejfas.2012.29.4.03.**
14. Kwak, H. J., Kim, J. H., Kim, J. Y., Jeon, D., & Lee, D. H. (2021). Behavioral variation according to feeding organ diversification in glossiphoniid leeches (Phylum: *Annelida*). *Sci Rep.* 11, 10940. **http://doi.org/10.1038/s41598-021-90421-1.**
15. Kalatehjari, P., & Sudagar, M. (2018). Review on optimum propagation and rearing conditions of medicinal leeches (*Hirudo* spp.). *Journal of the Caspian Aquatic Sciences*, 3(1), 45-54.
16. Ceylan, M., Küçükkara, R., Erbatur, İ., Karataş, E., Tunç, M., & Sağlam, N. (2021). Growth, survival and reproduction of the Turkish medicinal leech, *Hirudo sulukii*. *Invertebrate Reproduction & Development*, 65(1), 57-68.
17. Firouzbakhsh, S., Heydari, S., Maghsudlo Kamali, M., & Sudagar, M. (2025). Effect of the antibiotic ceftriaxone on segmentation and vomiting in the eastern leech (*Hirudo orientalis*). *Ornamental Aquatic Fish Quarterly*, 12(1), 25-35. **https://doi.org/10.22034/12.1.25.**
18. Li, Z., He, H., Ding, J., Zhang, Z., Leng, Y., Liao, M., & Xiong, W. (2024). Effects of Three Antibiotics on

Nitrogen-Cycling Bacteria in Sediment of Aquaculture Water. *Water*, 16(9), 1256. **https://doi.org/10.3390/w16091256.**

19. Shohrati, M., Hosseini, S. M. J., Rahimian, S., & Parande Afshar, P. (2010). Evaluation of the rational use of ceftriaxone in internal medicine and surgical wards. *Kowsar Medical Journal*, 15(3), 171-176.
20. Dias Paulo, G., Mazzuco, A. P., Rodolpho, J. C., Salgado, H. R. N., & de Haro Moreno, A. (2011). Estudo comparativo de cápsulas contendo amoxicilina obtidas de algumas farmácias magistrais. *Revista Brasileira Multidisciplinar*, 14(2), 50-60. **https:// doi.org/10.25061/2527-2675/ReBraM/ 2011.v14i2.111.**
21. Gauba, P., & Saxena, A. (2023). Ciprofloxacin properties, impacts, and remediation. CABI Reviews, (2023). **https:// doi.org/ 10.1079/ cabireviews. 2023.000.**
22. Heydari, S., Firouzbakhsh, S., Maghsudlo Kamali, M., Yousefi Siahkalroudi, M., & Sudagar, M. (2025). The effect of lincomycin antibiotic on body segmentation and vomiting in the eastern leech (*Hirudo orientalis*). (In Press)
23. Firouzbakhsh, S., Sudagar, M., Maghsudlo Kamali, M., & Heydari, S. (2025). Efficacy of an antibiotic combination (penicillin, ciprofloxacin, tetracycline and lincomycin) on vomiting and improving the healing process in the eastern leech (*Hirudo orientalis*). (In Press)