

بررسی اثر کشندگی عصاره و اسانس گیاه زنیان بر روی کیست ژیا ردیا لامبلیا در شرایط آزمایشگاهی

دکتر ساعد شهابی^۱، فاطمه ایازی روزبهانی^{۲*}، مهندس محمد کمالی نژاد^۳، دکتر علیرضا ابدی^۴

^۱گروه انگل‌شناسی و فارچ‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
^۲بیمارستان شهید دکتر لویسانی، سازمان تأمین اجتماعی
^۳گروه فارماکولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
^۴گروه بهداشت و پزشکی اجتماعی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

چکیده

سابقه و هدف: ژیا ردیازیس عفونت انگلی روده کوچک با انتشار جهانی است که توسط تک‌یاخته تاژک‌داری بنام ژیا ردیا لامبلیا در انسان ایجاد می‌شود. بررسی‌های انجام شده مبین آن است که شیوع ژیا ردیا لامبلیا در نقاط مختلف جهان بین یک تا ۲۵٪ جمعیت متغیر است. ژیا ردیازیس در بین کسانی که در مناطق پرجمعیت و با تسهیلات بهداشتی کم زندگی می‌کنند، بیشترین شیوع را دارد. این تک‌یاخته یکی از عوامل مهم ایجادکننده اسهال بخصوص در کودکان سنین دبستان است. درمان دارویی این بیماری معمولاً بر اساس تجویز مترونیدازول صورت می‌گیرد که دارای اثرات جانبی متعدد است.

روش بررسی: در این مطالعه که به روش تجربی انجام شد، از گیاه زنیان با نام علمی *Carum copticum (L.) C.B. Clark* که دارای خواص ضد باکتریایی، ضد کرم و ضد قارچی به واسطه مواد فنلیک آن مثل تیمول و کارواکرول است، استفاده گردید. در این تحقیق در شرایط آزمایشگاهی، اثر عصاره هیدروالکلی، آبی و اسانس گیاه خوراکی زنیان بر علیه کیست ژیا ردیا مورد ارزیابی قرار گرفته است. **یافته‌ها:** پس از گذشت ۶۰ دقیقه از تماس بین عصاره یا اسانس با کیست ژیا ردیا لامبلیا، حداقل غلظت مهاری (MIC) عصاره هیدروالکلی و اسانس زنیان به ترتیب ۱۰۰ mg/ml و ۸، پس از ۱۲۰ دقیقه به ترتیب ۷۵ mg/ml و ۶، و پس از ۱۸۰ دقیقه به ترتیب ۷۵ mg/ml و ۴ به دست آمد.

نتیجه‌گیری: عصاره‌های الکلی و اسانس زنیان در محیط آزمایشگاه دارای اثر کشندگی بر روی کیست ژیا ردیا لامبلیا هستند. **واژگان کلیدی:** ژیا ردیا لامبلیا، ژیا ردیازیس، گیاه زنیان، حداقل غلظت مهارکننده، درمان، ضد انگل.

مقدمه

ژیا ردیازیس، عفونت انگلی روده کوچک تعداد زیادی از مهره‌داران به انضمام انسان با انتشار جهانی است که توسط تک‌یاخته تاژک‌داری بنام ژیا ردیا لامبلیا ایجاد می‌شود (۱ و ۲). انتقال بیماری از شخص به شخص، یا از طریق مصرف آب و غذای آلوده صورت می‌گیرد. این انگل، مهمترین عامل اسهال در کودکان، مسافران و افراد هم‌جنس‌باز محسوب می‌شود (۳).

همچنین، گروه متنوعی از عوامل اتیولوژیک از جمله تراکم جمعیت، نوع آب و هوا، وضعیت اقتصادی و بهداشت، شرایط مساعد آلودگی به این انگل را فراهم می‌کنند (۴ و ۵). آلودگی با این انگل در تمام نقاط جهان گزارش شده است و میزان آلودگی افراد در نقاط مختلف، ۱-۲۵٪ می‌باشد. در ایران آلودگی در بیشتر نقاط کشور گزارش شده است (۶). برای درمان این بیماری از داروهای کیناکرین، مترونیدازول و فورازولیدون استفاده می‌شود که داروهای فوق همگی دارای اثرات نامطلوب بویژه در کودکان و زنان هستند. لذا مصرف برخی از آنها در دوران بارداری ممنوع است (۷ و ۸).

* نویسنده مسئول مکاتبات: فاطمه ایازی روزبهانی؛ تهران، اتوبان شهید باسینی (سرخه‌حصار)، بیمارستان شهید دکتر لویسانی؛ پست الکترونیک: fati.ayazi@gmail.com

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۶/۱۱/۲۱

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸۷/۴/۲۵

در این مطالعه، گیاه زنیان با نام علمی *Carum copticum (L.)* از پژوهشکده گیاهان دارویی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهیه شد. شناسایی و تأیید نام آن نیز توسط متخصصین آن مرکز صورت گرفت. از گیاه زنیان، عصاره‌های آبی، هیدروالکلی و اسانس به روش‌های معمول تهیه شد (۱۵).

برای بررسی تأثیر عصاره گیاه زنیان بر روی کیست‌های ژیا ردیا لامبلیا، در ابتدا غلظت‌های مختلف از عصاره گیاه زنیان را به میزان یک میلی‌لیتر در لوله‌های آزمایش، تهیه کرده و سپس، حدود ۵۰۰۰۰ عدد کیست زنده ژیا ردیا به لوله‌های حاوی محلول اضافه شد. یک لوله کنترل حاوی آب مقطر و انگل که هیچ ماده‌ای به آن اضافه نشده بود نیز به عنوان گروه شاهد در هر سری آزمایش در نظر گرفته شد. لوله‌ها در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و شمارش تعداد انگل‌های زنده و مرده در زمان‌های ۶۰، ۱۲۰ و ۱۸۰ دقیقه صورت گرفت. در بررسی تأثیر عصاره هیدروالکلی گیاه زنیان از غلظت ۱۰ mg/ml تا غلظتی که باعث از بین بردن ۱۰۰٪ کیست‌های زنده شود استفاده شد و حداقل غلظتی که کشندگی کیست‌ها را ۱۰۰٪ داشت به عنوان MIC در نظر گرفته شد و غلظت‌های ۱/۲، ۱/۴ و ۳/۴ آن نیز مورد بررسی قرار گرفت.

اسانس، یک ترکیب روغنی است که در آب نامحلول است. به همین دلیل از تویین ۸۰ با غلظت ۵٪ به عنوان حلال استفاده می‌شود. پس از تهیه رقت‌های مورد نظر از اسانس به میزان یک میلی‌لیتر، در لوله‌های آزمایش حدود پنجاه هزار عدد کیست زنده ژیا ردیا به هر لوله اضافه شد. یک لوله کنترل حاوی تویین ۸۰ و انگل که هیچ ماده‌ای به آن اضافه نشده بود نیز به عنوان گروه شاهد در هر سری آزمایش منظور گردید. لوله‌ها در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و شمارش تعداد انگل‌های زنده و مرده در زمان‌های ۶۰، ۱۲۰ و ۱۸۰ دقیقه صورت گرفت. در بررسی تأثیر اسانس گیاه زنیان از غلظت ۱ mg/ml تا غلظتی که باعث از بین بردن ۱۰۰٪ کیست‌های زنده شود، استفاده شد و حداقل غلظتی که در آن غلظت، ۱۰۰٪ کیست‌ها کشته می‌شدند، به عنوان MIC در نظر گرفته شد و غلظت‌های ۱/۲، ۱/۴ و ۳/۴ آن نیز مورد بررسی قرار گرفت.

برای تعیین حیات کیست‌ها از رنگ آمیزی حیاتی کیست‌ها با آنوزین ۰/۰۱٪ استفاده شد.

تعداد کیست‌های زنده و مرده (رنگ گرفته)، با شمارش تصادفی ۱۰۰ عدد کیست ژیا ردیا مشخص می‌شود. به منظور

از طرفی گزارش‌هایی از مقاومت این انگل نسبت به داروهای فوق وجود دارد و اثرات کارسینوژنیک و موتاژنیک برخی از آنها در مدل‌های حیوانی به تأیید رسیده است. لذا تلاش برای یافتن ترکیباتی که دارای اثرات جانبی کمتر یا بدون اثرات جانبی باشد، همیشه مد نظر بوده است. در سال‌های اخیر استفاده از داروهای گیاهی جهت درمان ژیا ردیازیس به واسطه اثرات جانبی کم آنها رو به افزایش است.

زنیان با نام علمی *Carum copticum* متعلق به خانواده چتریان می‌باشد. عصاره میوه این گیاه بصورت ضماد در التیام درد به کار می‌رود (۹). برای میوه این گیاه اثرات ضد تهوع، ضد کرم، مدر و اثر مقوی قوه باء قائلند (۱۰). میوه (بذر) گیاه زنیان دارای اسانس است. بیشترین میزان اسانس گیاه در بذر آن وجود دارد و مقدار آن با توجه به خصوصیات ژنتیکی و محیطی بین ۲ تا ۵ درصد متغیر است. اهمیت گیاه زنیان به علت اسانس و ترکیب‌های موجود در اسانس آن است. از ترکیب‌های عمده اسانس این گیاه، تیمول، ترپنین، فلاندرن، گروه پینن، گروه سیمین و میرسن هستند که عمدتاً از منوترپن‌های اکسیژنه می‌باشند (۱۱).

تعداد ترکیب‌های موجود در اسانس در منابع از ۱۱ تا ۱۷ مورد گزارش شده است. همچنین مقدار تیمول موجود در اسانس آن در منابع مختلف ۳/۳۹، ۲/۴۵ و ۷/۴۱ درصد ذکر گردیده است. در مطالعات انجام‌شده، اسانس زنیان شامل ۱۱ ترکیب که تیمول ۲/۴۵ و دلتاسیمین ۹/۴۱ درصد از ترکیب‌های اصلی آن بودند بر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی تأثیر داشته و از رشد چند قارچ مهم جلوگیری نموده است (۱۱-۱۳).

در این تحقیق، اثر اسانس و عصاره زنیان بر روی کیست ژیا ردیا لامبلیا، برای اولین بار مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

این تحقیق یک مطالعه تجربی است که با استفاده از کیست‌های ژیا ردیا از منبع انسانی (لامبلیا) انجام شد. این امر با مراجعه روزانه به آزمایشگاه‌های تشخیص طبی شهرستان دورود و بروجرد در سال ۱۳۸۵ با جمع‌آوری نمونه‌های مثبت انجام گرفت.

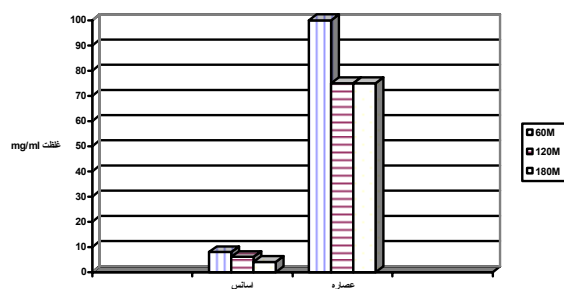
بعد از انتخاب مدفوع آلوده به تعداد فراوان کیست ژیا ردیا لامبلیا با استفاده از روش می‌یر، کیست‌های انگل از مدفوع جدا شد (۱۴).

زنیان با غلظتی تقریباً معادل $1/12$ عصاره هیدروالکلی پس از ۶۰ دقیقه، ۱۰۰٪ کیست‌های ژیا ردیا را از بین می‌برد.

مقایسه تعداد کیست زنده بعد از اضافه کردن غلظت‌های مختلف عصاره آبی زنیان با گروه شاهد پس از زمان‌های ۶۰، ۱۸۰ و ۱۲۰ دقیقه تفاوت چندانی نداشت. نتایج نشان می‌داد که عصاره آبی زنیان اثر چندانی روی کیست ژیا ردیا ندارد. بالاترین غلظت استفاده شده از عصاره آبی زنیان 700 mg/ml بود. درصد کشندگی انگل بعد از اضافه کردن غلظت‌های مختلف عصاره آبی زنیان پس از زمان‌های ۶۰، ۱۸۰ و ۱۲۰ دقیقه نشان می‌دهد عصاره هیدروالکلی زنیان در بالاترین غلظت استفاده شده (700 mg/ml) پس از ۱۸۰ دقیقه، حداکثر ۱۰٪ کیست‌ها را می‌کشد.

جدول (۱) مقایسه حداقل درصد کشندگی (MIC) و غلظت‌های $1/2$ ، $1/4$ و $3/4$ عصاره هیدروالکلی و اسانس گیاه زنیان، در زمان‌های ۶۰، ۱۲۰ و ۱۸۰ دقیقه

زنیان	غلظت (mg/ml)	درصد کشندگی بر حسب زمان (دقیقه)		
		۶۰	۱۲۰	۱۸۰
اسانس	۲	۵۲/۹	۷۵/۶	۹۶/۵
	۴	۸۰/۲	۹۵/۱	۱۰۰
	۶	۹۵/۵	۱۰۰	۱۰۰
	۸ (MIC)	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
عصاره هیدروالکلی	۲۵	۳۶/۵	۶۳/۷	۷۵
	۵۰	۷۶/۶	۹۳/۸	۹۵/۷
	۷۵	۹۴/۱	۱۰۰	۱۰۰
	۱۰۰ (MIC)	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰



نمودار (۱) مقایسه غلظت‌هایی از عصاره هیدروالکلی و اسانس زنیان که موجب از بین رفتن ۱۰۰٪ کیست‌های زنده ژیا ردیا شده‌اند. در زمان‌های ۶۰، ۱۲۰ و ۱۸۰ دقیقه

دقت بیشتر، هر آزمایش ده بار تکرار گردید. درصد زوال کیست‌ها از فرمول زیر محاسبه شد (۱۶):

$$K \% = \frac{MCC - MCT}{MCC} \times 100$$

در فرمول فوق:

K% = درصد کشندگی کیست‌ها

MCC = میانگین تعداد کیست‌های زنده در گروه شاهد

MCT = میانگین تعداد کیست‌های زنده در گروه آزمون

در این مطالعه، داده‌ها با استفاده از روش آنالیز واریانس و مقایسات چندگانه با استفاده از نرم افزار SPSS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. برای رسم نمودار از نرم‌افزار Excel استفاده شد.

یافته‌ها

جدول ۱، حداقل درصد کشندگی غلظت‌های مختلف عصاره هیدروالکلی و اسانس زنیان در مقایسه با گروه شاهد در دوز MIC و غلظت‌های $1/2$ ، $1/4$ ، $3/4$ آن را نشان می‌دهد.

در هر ۴ غلظت اسانس با انجام آنالیز واریانس میانگین تعداد انگل زنده با گروه شاهد دارای اختلاف معنی‌دار بود ($P < 0.001$). با انجام آزمون مقایسات چندگانه نیز اختلاف میان گروه شاهد با غلظت‌های مختلف معنی‌دار مشاهده شد ($P < 0.001$).

در هر ۴ غلظت عصاره هیدروالکلی زنیان، با انجام آنالیز واریانس، میانگین تعداد انگل زنده با گروه شاهد دارای اختلاف معنی‌دار بود ($P < 0.001$). با انجام آزمون مقایسات چندگانه نیز اختلاف میان گروه شاهد با غلظت‌های مختلف معنی‌دار مشاهده شد ($P < 0.001$).

جدول ۱، درصد کشندگی انگل بعد از اضافه کردن غلظت‌های مختلف عصاره هیدروالکلی و اسانس زنیان را پس از ۶۰، ۱۲۰ و ۱۸۰ دقیقه نشان می‌دهد: اسانس زنیان با غلظت 8 mg/ml پس از ۶۰ دقیقه، با غلظت 6 mg/ml پس از ۱۲۰ دقیقه و با غلظت 4 mg/ml پس از ۱۸۰ دقیقه، ۱۰۰٪ کیست‌های ژیا ردیا را از بین می‌برد.

عصاره هیدروالکلی زنیان با غلظت 100 mg/ml پس از ۶۰ دقیقه، با غلظت 75 mg/ml پس از ۱۲۰ و ۱۸۰ دقیقه، ۱۰۰٪ کیست‌های ژیا ردیا را از بین می‌برد.

بررسی MIC عصاره هیدروالکلی و اسانس گیاه زنیان نشان می‌دهد که تفاوت معنی‌داری بین MIC عصاره الکی گیاه زنیان با اسانس آن وجود دارد ($P < 0.001$). به طوریکه اسانس

بحث

در این تحقیق اثر گیاه زنیان بر روی کیست ژیا ردیا لامبلیا در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت و عصاره آبی، الکلی و اسانس زنیان در غلظت‌های مختلف در زمان‌های ۶۰، ۱۲۰ و ۱۸۰ دقیقه بررسی شد.

تحقیقات نشان داده‌اند که اسانس زنیان شامل ۱۱ ترکیب که تیمول و دلتاسیمین از ترکیب‌های اصلی آن بودند، بر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی تأثیر دارد و از رشد چند قارچ جلوگیری می‌نماید (۱۱ و ۱۲). در طب سنتی، زنیان به عنوان ضد نفخ، ضد تهوع، مقوی، ضد کرم، مدر، کاهش‌دهنده کلسترول خون، خلط‌آور و تسکین‌دهنده اسپاسم استفاده می‌شود. این گیاه، محرک اشتها بوده و میوه گیاه به طور سنتی به عنوان طعم‌دهنده در غذا به کار می‌رود و اثرات ضد باکتریایی، ضد انگلی و ضد قارچی آن به تأیید رسیده است (۹ و ۱۰).

در این تحقیق میزان غلظتی از عصاره الکلی و اسانس گیاه زنیان، که توانایی کشتن ۱۰۰٪ از کیست‌های ژیا ردیا لامبلیا را دارد، مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد که اثر کشندگی اسانس زنیان از عصاره الکلی آن بیشتر بود. به طوری که نتایج ۶۰ دقیقه بعد از اضافه کردن عصاره و اسانس زنیان، نشان دادند که عصاره الکلی با غلظت ۱۰۰ mg/ml و اسانس زنیان با غلظت ۸ mg/ml باعث زوال کیست‌های ژیا ردیا به میزان ۱۰۰٪ می‌شوند.

در مرحله بعد، نتایج ۱۲۰ دقیقه بعد از اضافه کردن عصاره و اسانس زنیان، نشان داد که عصاره الکلی با غلظت ۷۵ mg/ml و اسانس زنیان با غلظت ۶ mg/ml نیز ۱۰۰٪ از کیست‌های ژیا ردیا را از بین می‌برد. در مرحله بعد، نتایج ۱۸۰ دقیقه بعد از اضافه کردن عصاره الکلی نشان داد که غلظت ۷۵ mg/ml از عصاره الکلی و غلظت ۴ mg/ml از اسانس زنیان باعث زوال کیست‌های ژیا ردیا به میزان ۱۰۰٪ می‌شود.

در گزارش‌های موجود، آویشن، گیاهی است که عصاره و اسانس آن، اثرات مشابهی با نتایج به دست آمده در این مطالعه دارد. در تحقیق فرسنگی و همکاران در دانشگاه علوم پزشکی بوشهر (۱۳۸۰)، اثر کشندگی اسانس و عصاره جوشانده آویشن بر روی کیست ژیا ردیا در شرایط آزمایشگاهی بررسی شده و نشان داده شده است که غلظت تام اسانس آویشن دارای میانگین ۹۱/۱٪ و غلظت تام عصاره جوشانده آویشن با میانگین کشندگی ۷٪ بعد از ۶۰ دقیقه دارای بیشترین اثر کشندگی بر روی کیست‌های ژیا ردیا می‌باشد و در نتیجه

اسانس آویشن اثر کشندگی بیشتری نسبت به عصاره آن دارد (۱۷). مهمترین ترکیب اصلی گیاه آویشن، همانند گیاه زنیان، تیمول موجود در آن است که بر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی، مؤثر است و از رشد چند نوع قارچ نیز جلوگیری می‌کند.

نکته قابل توجه در این تحقیق این است که هر چه زمان مجاورت انگل با عصاره و اسانس زنیان طولانی‌تر باشد، با غلظت کمتری از آنها می‌توان رشد انگل را در محیط کشت مهار کرد. نتایج تحقیقات فرسنگی نیز نشان‌دهنده این است که زمان، تأثیر بسیار مهمی در کشتن کیست‌های ژیا ردیا دارد (۱۷).

همین طور در این مطالعه مشخص شد که عصاره آبی زنیان اثر کشندگی بر روی کیست‌های ژیا ردیا ندارد و احتمالاً علت اصلی عدم تأثیر عصاره آبی بر روی کیست‌های ژیا ردیا این است که ماده مؤثره موجود در گیاه زنیان، در آب حل نمی‌شود و جوشاندن و حرارت‌دادن آن جهت تهیه عصاره آبی منجر به تبخیر و خروج مواد مؤثره گیاه از آن می‌گردد. این نتیجه، مشابه نتیجه فرسنگی و همکاران در دانشگاه علوم پزشکی بوشهر است که در مطالعه اثر گیاه آویشن بر روی کیست ژیا ردیا مشخص گردید عصاره جوشانده گیاه، اثر قابل ملاحظه‌ای بر روی کیست‌های ژیا ردیا نداشته است (با میانگین کشندگی ۷٪) (۱۷).

یافته‌های این تحقیق نشان می‌دهد که می‌توان از عصاره هیدروالکلی و اسانس زنیان در درمان کیست‌های ژیا ردیا استفاده کرد. چون ژیا ردیا ابتدا بصورت کیست وارد بدن می‌شود و به صورت کیست نیز از طریق مدفوع از بدن دفع می‌گردد، مسلماً اثر کشندگی عصاره و اسانس زنیان برای جلوگیری از آلودگی و همین طور زمانی که این ماده به مقدار مناسب در معده و روده حضور داشته باشد، با کشتن کیست از پدیده Excystment و تبدیل آن به شکل تروفوزوئیتی و در نتیجه، استقرار بیماری جلوگیری می‌کند.

با توجه به اثر کشندگی اسانس و عصاره هیدروالکلی زنیان بر روی کیست‌های ژیا ردیای مورد استفاده در این تحقیق می‌توان گیاه زنیان را گیاهی مؤثر در از بین بردن کیست‌های ژیا ردیا در شرایط آزمایشگاهی معرفی کرده و جهت استفاده کلینیکی از اسانس و عصاره این گیاه انجام تحقیقات بیشتری همچون بررسی مواد شیمیایی مؤثر در اسانس و عصاره گیاه زنیان، بررسی اثر اسانس و عصاره گیاه زنیان روی تروفوزوئیت ژیا ردیا لامبلیا، تغییرات حاصل از حرارت‌دادن اسانس و عصاره گیاه زنیان و ... را توصیه نمود.

تشکر و قدردانی

محترم آزمایشگاه فارماکوتوزی دانشکده داروسازی دانشگاه شهید بهشتی به خاطر رهنمودهای ارزنده‌شان تشکر می‌نماییم.

از اعضای هیات علمی گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی و اساتید

REFERENCES

1. Mahbubani MH, Bej Ah, Perlin MH, Schaefer III FW, Jakubow ski W, Atlas RM. Differentiation of *Giardia duodenalis* from other SPP by using polymerase chain reaction a gene probes. *J Clinical Microbiol* 1992;30:74-78.
 2. Mayrhofer G, Andrews RH, Ey PL, Chilton NB. Division of *Giardia* isolates from humans into two genetically distinct assemblages by electrophoretic analysis of enzymes encoded at 27 loci and comparison with *Giardia muris*. *Parasitol* 1995;111:11-17.
 3. Lujan HD, Mowatt MR, Nash TE. The molecular mechanisms of *Giardia* Encystation. *Parasitol today* 1998;14:446-50.
 4. Garcia, Lynne Shore. *Diagnostic medical parasitology*. ASM Press. 2001; pp. 36-49.
 5. Schmidt, G.D., Roberts L.S. *Foundation of parasitology*. Mc Graw-Hill Book Co. 2000; pp. 83-88.
 6. Saebi. *Porotozal disease in iran, Text book of clinical parasitology*. 1998; pp.81-95.
 7. Abdi YA, Gustafsson LL, Ericsson O, Hellgren U. *Handbook of drugs for tropical parasitic infections*. United Kingdom, London: Taylor & Francis Ltd.;1995, pp 12-16.
 8. Craun GF. Wasterborne outbreaks of giardiasis: current status. In S. L. Erlandsen, and E. A. Meyer (ed.). *Giardia and giardiasis: biology, pathogenesis, and epidemiology*. Plenum Press, New York, 1996, pp. 243-261.
- ۹- جلال، جامی رودی، بررسی و شناسایی مواد موجود در اسانس میوه و اندام هوایی گیاه *carum copticum*. پایان نامه ۵۰۳، تهران، ۱۳۷۶-۱۳۷۷.
- ۱۰- زرگری، علی، گیاهان دارویی، انتشارات دانشگاه تهران، ۱۳۷۲، ص ۳۶-۳۰.
11. Nagulakshmi S, Shankaracharya NB, Naik JP, Rao LJM. Studies on chemical and technological aspects of ajowan aspects (*Trachyspermum ammi*). *J food sci techol mysore* 2000;39:277-81.
 12. Krishnamoorth V. mada lagevio MB. *Trachyspermum ammi* essential crop for north karnataka. *J medic aromatic plant sci* 1999;4:996-98.
 13. Steveson F, Jonn sron M, Peckie J. Towntey L. Cattle manure as a Corps in zero and conventional tillago systems can. *J Plant sci* 1998;78:409-10.
 14. Meyer, E. A. Isolation and axenic cultivation of *Giardia* trophozoites from the rabbit, chinchilla, and cat. *Exp Parasitol* 1970;27:179-83.
۱۵. مصمصام شریعت سید هادی. عصاره‌گیری و استخراج مواد مؤثره گیاهان دارویی و روش‌های شناسایی و ارزشیابی آنها. انتشارات مانی، ۱۳۷۱.
16. Hill, DR, Pohl R, Pearson RD. *Giardia lamblia*: a culture method for determininig parasite viability. *Am J Trop Med Hyg* 1986;35:1129-33.
۱۷. فرسنگی محمدحجت، صاحبانی نعمت‌اله، موحد علی. اثرات کشندگی آویشن بر روی کیست ژیا ردیا در شرایط آزمایشگاهی. طب جنوب، سال چهارم، (شماره ۲) ۱۳۸۰؛ ص ۹۵-۸۸.