

تحقیقی

اثر آنتاگونیستی باکتری‌های لاکتیک جدا شده از ماست بر علیه باکتری‌های بیماری‌زا

چکیده

زمینه و هدف: پروبیوتیک‌ها مکمل‌های غذایی میکروبی هستند که از طریق حفظ تعادل میکروبی روده تأثیرات سودمندی روی سلامت انسان دارند. باکتری‌های لاکتیک نقش مهمی در تولید و نگهداری مواد غذایی تخمیری و تهیه محصولات پروبیوتیکی ایفا می‌کنند. این مطالعه با هدف بررسی اثر ضد میکروبی باکتری‌های لاکتیک جدا شده از ماست‌های محلی استان گلستان بر علیه پاتوژن‌های شایع دستگاه گوارش انجام گردید.

روش بررسی: در این مقاله توصیفی اثر ضدباکتریایی ۹۶ سویه باکتری لاکتیک جدا شده از ۳۴ نمونه ماست محلی بر علیه ۷ گونه مهم پاتوژن‌های گوارشی به خصوص شیگلا دیسانتیره، یرسینیا انتروکولیتیکا، اشرشیاکلی و سالمونلا تیفی موریوم با دو روش انتشار در آگار به کمک دیسک و روش چاهک با استفاده از محلول روئی تهیه شده از محیط کشت باکتری‌ها بررسی گردید. قطر هاله عدم رشد در اطراف دیسک و چاهک اندازه‌گیری شد و به منظور کاهش خطا، هر آزمون حداقل سه بار تکرار گردید و میانگین قطر هاله عدم رشد روی محیط مولر هیتسون آگار اندازه‌گیری و ثبت شد و خاصیت آنتاگونیستی باکتری‌های لاکتیک با هم مقایسه گردید.

یافته‌ها: بیشترین اثر بازدارندگی مربوط به گونه‌های لاکتوباسیلوس کازئی و لاکتوکوکوس لاکتیس در روش چاهک بود و حداکثر میانگین قطر هاله عدم رشد آنها ۱۸ میلی‌متر ارزیابی شد. بیشترین و کمترین اثر مهارتی بر علیه باکتری‌های پاتوژن به ترتیب روی یرسینیا انتروکولیتیکا و باسیلوس سرفوس مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: گونه‌های هر دو جنس لاکتوباسیلوس و لاکتوکوک اثر مهارتی مناسبی روی باکتری‌های بیماری‌زا روده نشان دادند، ولی لاکتوباسیل‌های موجود در ماست‌های محلی استان گلستان نسبت به لاکتوکوک‌ها توانایی بیشتری در مقابله با پاتوژن‌ها از خود نشان دادند و این اثر مهارتی روی یرسینیا انتروکولیتیکا مشهودتر بود.

کلید واژه‌ها: اثر ضدباکتریال - پروبیوتیک - ماست - لاکتوباسیلوس - لاکتوکوکوس - گلستان

الهه کیانی

کارشناس ارشد میکروبی‌شناسی

دکتر نورامیر مظفری

دانشیار گروه میکروبی‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی ایران

حسین سمیع‌الادب

مربی گروه میکروبی‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان

نادر جندقی

مربی گروه آب‌پزیداری

دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

دکتر عزت‌الله قائمی

دانشیار گروه میکروبی‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی گرگان

نویسنده مسؤول: الهه کیانی

پست الکترونیکی: e_kiaie2004@yahoo.com

نشانی: گرگان، دانشگاه پژوهشگران جوان

دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان

تلفن: ۰۱۷۱-۳۳۵۳۰۰۰ (داخلی ۲۰۹)

نمابر: ۳۳۵۱۹۱۳

وصول مقاله: ۸۴/۶/۹

اصلاح نهایی: ۸۵/۲/۲۵

پذیرش مقاله: ۸۵/۳/۲۰

مقدمه

ماست غذایی مختصر و سریع با کالری پایین است. گسترش تمایل به مصرف ماست به زمانی برمی گردد که پزشکی روسی به نام Metchnikoff در سال ۱۹۱۰ در روستاهای بلغارستان مشاهده کرد که خوردن یک نوع ماست تخمیر شده از شیر سبب افزایش عمر و حفظ سلامت روستاییان می گردد (۱). امروزه ثابت شده حضور انواع باکتری‌های لاکتیک در شیرهای تخمیر شده (۲) از جمله ماست اثرات سودمندی بر سلامت انسان دارد که شامل ایجاد تعادل در میکروفلور طبیعی بدن، مقاومت در برابر کلونیزه شدن باکتری‌های بیماری زا (۳)، کاهش میزان سرمی کلاسترول (۴)، جلوگیری از موتاژن‌سپته عوامل موجود در روده و کاهش تومورهای روده‌ای (۵)، جلوگیری از عفونت هلیکوباکتریلوری (۶) عفونت مجاری ادراری و به خصوص التهاب‌های حاد معده‌ای و روده‌ای (۷)، کاهش عدم تحمل به لاکتوز (۸) و کمک به جذب کلسیم در روده (۹) می‌باشد. از آنجا که ماست به صورت خوراکی مورد استفاده قرار می‌گیرد، جایگزینی و استقرار باکتری‌های لاکتیک موجود در ماست در روده می‌تواند از طریق تولید ترکیبات ضد میکروبی و کاهش Ph به حفظ سلامتی روده و ممانعت از رشد باکتری‌های پاتوژن کمک نماید و این یافته در یک مدل آزمایشگاهی و خارج از بدن تأییدی بر اثر ضد میکروبی مواد تخمیری به خصوص ماست در دستگاه گوارش می‌باشد.

با توجه به افزایش روزافزون مقاومت دارویی و با توجه به فراوانی بیماری‌های گوارشی در دنیا که بعد از عفونت‌های تنفسی شایع‌ترین بیماری‌های گوارشی محسوب می‌گردد، شناسایی و بررسی روش‌های درمانی جدید و یافتن راه‌حل‌های جان‌نشین ضروری به نظر می‌رسد. این مطالعه با هدف بررسی اثر ضد میکروبی باکتری‌های لاکتیک جدا شده از ماست‌های محلی (به علت تنوع باکتری‌های لاکتیک) استان گلستان بر علیه پاتوژن‌های شایع دستگاه گوارش انجام شد.

روش بررسی

در یک مطالعه مقطعی در طول ۸ ماه (مهر ۸۳ تا اردیبهشت ۸۴) خواص آنتاگونیستی باکتری‌های لاکتیک جدا شده از ۳۵ نمونه ماست‌های محلی شهرهای مختلف استان گلستان مورد

بررسی قرار گرفت.

الف) انتخاب و آماده‌سازی سویه‌های باکتری لاکتیک

۵۱ سویه لاکتوباسیلوس متعلق به ۱۲ گونه و ۴۵ سویه لاکتوکوکوس متعلق به ۵ گونه که از نمونه‌های ماست محلی استان گلستان مطابق روش استاندارد (Biokar, France, IDF, 1988b; 1991) جدا شده بود (۱۰) برای بررسی اثر آنتاگونیستی انتخاب شد. ۵-۴ کلنی یکدست از کشت ۲۴ ساعته هر کدام از سویه‌ها در محیط کشت اختصاصی آن (محیط‌های M17 Broth برای لاکتوکوک‌ها و MRS Broth برای لاکتوباسیل‌ها) تلقیح گردید و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد تا کدورت معادل ۰/۵ مک‌فارلند به دست آید. سپس روی آن پارافین استریل اضافه شد. محیط‌ها به مدت ۴ روز (فراهم آوردن زمان لازم برای تولید مواد ضد میکروبی) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد. آنگاه پارافین را خارج کرده و با انتقال محیط کشت به لوله استریل آنها را ۱۰ دقیقه در دور ۳۰۰۰ سانتریفیوژ نمودیم. رسوب در شرایط استریل حذف و محلول رویی برای ادامه مطالعه نگهداری شد (۱۱ و ۱۲).

ب) آماده‌سازی دیسک‌های حاوی محلول روئی

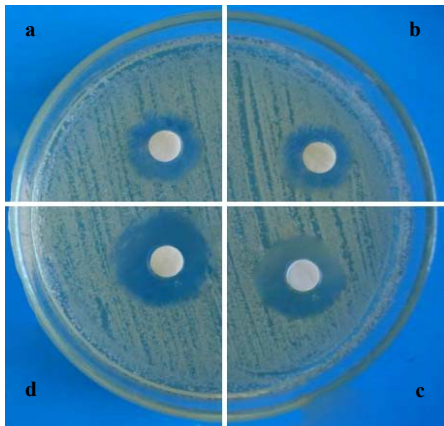
دیسک‌های کاغذی استریل به قطر ۶ میلی‌متر با میزان جذب ۱۱۵ μl به محلول رویی تهیه شده از باکتری‌های جدا شده از ماست به مدت ۳-۵ دقیقه آغشته شد. دیسک‌ها را در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ ساعت قرار دادیم تا خشک شد و برای ادامه مطالعه استفاده شد.

ج) آماده‌سازی باکتری‌های پاتوژن

۷ سویه استاندارد پاتوژن دستگاه گوارش شامل شیگلا دیسانتری (PTCC1188)، یرسینیا انتریکولیتیکا (PTCC1151)، سدوموناس انروژینوزا (PTCC1430)، اشرشیاکلی (PTCC1399)، استافیلوکوکوس اورئوس (PTCC1431)، باسیلوس سرئوس (ATCC1252)، سالمونلا تیفی موریوم (ATCC1596) از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه گردید و بعد از احیاء در BHI (عصاره مغز و قلب) آن را در محیط آگاردار کشت دادیم تا کلنی‌های خالص ظاهر شد. ۵-۴ کلنی یکدست از کشت ۲۴ ساعته هر سویه را به ۳ سی سی محیط نوترینت برات اضافه کردیم و در

به منظور افزایش دقت و حساسیت، هر آزمون حداقل سه بار تکرار و میانگین قطر هاله عدم رشد بعد از سه بار ثبت گردید.

نتایج حاصله با استفاده از نرم‌افزار SPSS مورد ارزیابی قرار گرفت.



تصویر ۲: اثر ترکیب ضد میکروبی تولید شده به وسیله

(a) لاکتوکوکوس پلاناروم، (b) لاکتوکوکوس گراویه

(c) لاکتوکوکوس لاکتیس، (d) لاکتوکوکوس پیسیوم علیه سالمونلا

تایفی موریوم (ATCC 1596)

یافته‌ها

در این تحقیق اثر آنتاگونیستی ۹۶ سویه باکتری لاکتیک جدا شده از ۳۴ نمونه ماست محلی علیه ۷ گونه مهم پاتوژن گوارشی بررسی گردید. نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که بیشترین اثر مهارکنندگی رشد علیه پاتوژن‌های مورد مطالعه مربوط به لاکتوباسیلوس کازئی (۱۵/۳ درصد) و لاکتوکوکوس لاکتیس (۲۱/۴ درصد) به ترتیب میانگین قطر هاله عدم رشد ۱۵/۸ و ۱۶/۳ میلی‌متر می‌باشد. درصد حساسیت باکتری‌های پاتوژن نسبت به باکتری‌های لاکتیک در نمودار یک آمده است.

در بررسی تاثیر ضد باکتریایی، یرسینیا انتروکولیتیکا (۷۹/۲ درصد) با میانگین قطر هاله عدم رشد ۱۷/۸ میلی‌متر و سالمونلا تیفی موریوم (۸۲/۹ درصد) با میانگین قطر هاله عدم رشد ۱۵/۴ میلی‌متر بیشترین حساسیت را نسبت به ترتیب لاکتوباسیل‌ها و لاکتوکوک‌ها از خود نشان دادند.

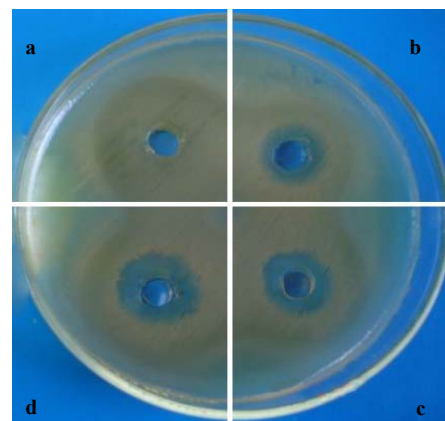
اکثر باکتری‌های لاکتیک از تولید پیگمان سودوموناس اثرژیونوزا و ۲۰ درصد از رشد این باکتری جلوگیری کردند. جدول یک موثرترین لاکتوباسیل‌ها و لاکتوکوک‌های جدا

دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲-۱ ساعت قرار دادیم تا به کدورت معادل ۰/۵ مک‌فارلند $1/5 \times 10^8$ cfu/ml رسید (NCCLS).

(د) بررسی اثر ضد میکروبی

اثر ضد میکروبی با دو روش مورد ارزیابی قرار گرفت.

(۱) روش انتشار در آگار (NCCLS): از سوپانسیون باکتری پاتوژن با سوآپ سرپنبه‌ای استریل به محیط کشت مولر هینتون به طور یکنواخت تلقیح شد. سپس دیسک‌های (ب) آغشته به محلول روئی باکتری‌های لاکتیک با فاصله معین از یکدیگر و از لبه پلیت روی سطح آگار قرار داده شدند. پلیت‌ها ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند و سپس با اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد در اطراف دیسک‌ها نتایج مورد بررسی قرار گرفت (تصویر ۱) (۱۳).



تصویر ۱: اثر ترکیب ضد میکروبی تولید شده به وسیله

(a) لاکتوباسیلوس موریوس، (b) لاکتوباسیلوس فرمنتوم

(c) لاکتوباسیلوس دلبروکسی، (d) لاکتوباسیلوس برویس علیه

سودوموناس اثرژیونوزا (PTCC 1430)

۲- روش چاهک: از سوپانسیون باکتری پاتوژن با سوآپ سرپنبه‌ای استریل به محیط کشت مولر هینتون به طور یکنواخت تلقیح شد. بعد با کمک پیست پاستور استریل چاهک‌هایی به قطر ۶ میلی‌متر در محیط حفر کرده و از محلول روئی باکتری‌های جدا شده از ماست به مقدار ۲۰۰ μ l در داخل چاهک ریخته شد و پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند و بعد از ۲۴ ساعت قطر هاله عدم رشد اندازه‌گیری شد (تصویر ۲) (۱۲).

بحث

فعالیت ضد میکروبی و تولید باکتریوسین لاکتوکوکوس پلانتاروم و لاکتوباسیلوس برویس به وسیله Ogunbanw و همکاران مورد بررسی قرار گرفت. آنها توانستند با کمک روش چاهک نشان دهند که این دو لاکتوباسیل از رشد اشیرشیا کلی (۸-۶ میلی متر) و باسیلوس سرئوس (۱۰-۸ میلی متر) و یرسینیا انتروکولیتیکا (۷-۶ میلی متر) جلوگیری می کنند (۱۴). در مطالعه ما نیز لاکتوباسیلوس برویس اثر مهارری روی تمام سویه های مورد بررسی نشان داد و لاکتوکوکوس پلانتاروم از رشد استاف اورئوس (۱۳ میلی متر) جلوگیری نمود.

Kabir و همکاران با استفاده از روش چاهک نشان دادند که مخلوط شیر تخمیر شده شامل لاکتوباسیلوس کازئی رشد پاتوژن های روده ای شامل شیگلا دیسانتری (۸ میلی متر) و سالمونلا تیفی موریوم (۹ میلی متر) و اشیرشیا کولی (۸/۲ میلی متر) را مهار می سازد. در غذاهای حاوی این میکروارگانیزم ها، PH کاهش می یابد و می تواند از ایجاد اسهال در موش جلوگیری نماید (۱۵). در این مطالعه اثر انتاگونستی لاکتوباسیلوس کازئی (فراوان ترین سویه لاکتوباسیل جدا شده) روی تمام باکتری های پاتوژن مورد آزمون مشاهده گردید.

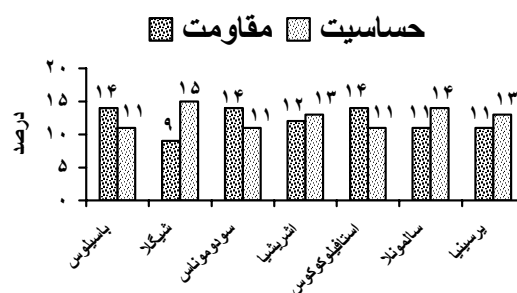
Conconnier و همکاران گزارش کردند که مصرف محلول روئی کشت لاکتوباسیلوس فرمنتوم و لاکتوباسیلوس کازئی و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوکوکوس لاکتیس اثر باکتریسیدالی بر ضد طیف وسیعی از باکتری های گرم مثبت و گرم منفی پاتوژن ایجاد می کنند (۳).

مطالعه ما نشان داد که گونه های لاکتوباسیلوس کازئی، برویس و فرمنتوم و گونه های لاکتوکوکوس لاکتیس و پیسیوم روی هر سه باکتری اصلی پاتوژن روده یعنی سالمونلا تیفی موریوم، شیگلا دیسانتری و یرسینیا انتروکولیتیکا در محیط کشت اثر مهارری خوبی نشان می دهند.

در پژوهش Wolf بیان گردید که لاکتوباسیلوس دلبروکی زیر گونه بولگاریکوس بعد از مصرف خوراکی با تولید باکتریوسین در دهان باعث افزایش فعالیت سیستم ایمنی در افراد بالغ می گردد (۱۶).

شده از نمونه های ماست را علیه باکتری های پاتوژن دستگاه گوارش معرفی می کند.

در این مطالعه ۵۹/۳ درصد لاکتوباسیل ها و ۵۲ درصد لاکتوکوک ها توانستند از رشد باکتری های پاتوژن جلوگیری نمایند. میانگین قطر هاله عدم رشد در روش چاهک ۱۴ میلی متر و در روش دیسک کاغذی ۱۲ میلی متر برآورد شد و بر این اساس مشخص می شود که قطر هاله در روش چاهک بیشتر از روش دیسک می باشد.



نمودار ۱: درصد حساسیت باکتری های پاتوژن نسبت به باکتری های لاکتیک

لاکتوباسیلوس سیک، لاکتوکوکوس گراویه و لاکتوکوکوس لاکتیس زیر گونه لاکتیس و لاکتوکوکوس پیسیوم مانع رشد تمام پاتوژن ها گردیدند، اما میزان هاله عدم رشد بر علیه هر یک از پاتوژن ها متفاوت بود.

جدول ۱: معرفی مؤثرترین لاکتوباسیل ها و لاکتوکوک های موجود در نمونه های ماست علیه باکتری های پاتوژن

باکتری پاتوژن	لاکتوباسیلوس	لاکتوکوکوس
باسیلوس سرئوس	کاندلری	پیسیوم
شیگلا دیسانتری	کازئی	گراویه
سودوموناس انتروژینوزا	دلبروکی	لاکتیس
اشیرشیا کلی	سیک	لاکتیس
استافیلوکوکوس اورئوس	سیک	پلانتاروم
سالمونلا تیفی موریوم	برویس	پیسیوم
یرسینیا انتروکولیتیکا	کازئی	گراویه

ماست‌های گلپایگان را با دو روش دیسک و چاهک برعلیه اشرشیاکلی (۹ میلی متر)، استاف اورئوس (۱۱/۳ میلی متر) و لیستریا مونوسایتوژنز (۹/۴ میلی متر) را نشان داد (۱۸).

نتیجه گیری

در این مطالعه باکتری‌های لاکتیک جدا شده از نمونه‌های ماست طیف متغیری از فعالیت آنتاگونیستی بر علیه پاتوژن‌های دستگاه گوارش نشان دادند.

این که آیا وجود این باکتری‌ها در ماست مصرفی می‌تواند در پیشگیری یا درمان بیماری‌های ناشی از باکتری‌های فوق در *in vivo* هم موثر باشد یا خیر، مسأله‌ای است که نیاز به تحقیقات بیشتری دارد. همچنین مطالعه اثر سینرجیسمی باکتری‌های لاکتیک فوق در مهار رشد پاتوژن‌های روده‌ای برای مطالعات آینده پیشنهاد می‌گردد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از جناب آقایان سعید میکائیلی مسؤول آزمایشگاه میکروبی‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان و مهندس ناصر بهنام‌پور که در اجرای پروژه به ما یاری رساندند، قدردانی می‌شود.

Miake و همکاران اثر ضد میکروبی باکتری‌های لاکتیک به خصوص لاکتوباسیلوس فرمنتوم در شرایط *In vitro* برعلیه سودوموناس اثر وژینوزا را مورد ارزیابی قرار دادند و سپس مشاهده کردند که این اثر مهاری در موش‌های آلوده با این باکتری از طریق افزایش فعالیت ماکروفازها افزایش می‌یابد (۱).

در واقع در مطالعه ما نیز این باکتری تنها توانست از تولید پیگمان سودوموناس اثر وژینوزا ممانعت کند و اثر مهاری بر رشد نداشت.

در مطالعه ما لاکتوباسیلوس دلبروکی زیر گونه لاکتیس و لاکتوکوکوس لاکتیس توانستند مانع رشد و تولید پیگمان سودوموناس اثر وژینوزا گردند.

اشعری و میردامادی (۱۳۸۱) دریافتند که لاکتوباسیلوس دلبروکی جدا شده از نمونه ماست‌های محلی قم از رشد اشرشیاکلی (۱۰/۲mm) استاف اورئوس (۹/۸mm) جلوگیری می‌نماید (۱۷).

پورا احمد نیز فعالیت ضد میکروبی لاکتوباسیلوس بولگاریکوس و استریپتوکوکوس ترموفیلوس جدا شده از

References

- 1) Havenaar R, Huis In't Veld JMJ. Probiotics: A general view. In: Wood BJB, ed. The Lactic Acid Bacteria in Health and Disease. Vol 1. Amsterdam: Elsevier Applied Science Publishers, 1992:151-170.
- 2) Dave RI, Shah NP. (1997d). *Viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts made from commercial starter cultures*. Int J Dairy. 1997; 7 (1), 31-41.
- 3) Coconnier MH, Liévin V, Hemery E, Servin AL. *Antagonistic activity against Helicobacter infection in vitro and in vivo by the human Lactobacillus acidophilus strain LB*. Appl Environ Microbiol. 1998; 64 : 4573-4580.
- 4) Hepner G, Fried R, St Jeor S, Fusetti L, Morin R. *Hypocholesterolemic effect of yogurt and milk*. Am J Clin Nutr. 1979;32(1):19-24.
- 5) Reddy GV, Friend BA, Shanhani KM, Farmer RE. *Antitumor activity of yogurt components*. J. Food Protection, 1983;46(4):8-11.
- 6) Sullivan A, Nord CE. *The place of probiotics in human intestinal infections*. Int J Antimicrob Agents. 2002;20(5):313-9.
- 7) Sullivan A, Nord CE. *Probiotics in human infections*. J Antimicrob Chemother. 2002;50(5):625-7.
- 8) Martini MC, Bollweg GL, Levitt MD, Savaiano DA. *Lactose digestion by yogurt beta-galactosidase: influence of PH and microbial cell integrity*. Am J Clin Nutr. 1987;45(2):432-6.
- 9) Anon E. *Yoghurt and other fremented milk*. Journal of Dairy science and technology. 1986; 82(4): 1-5.
- 10) Birollo GA, Reinheimer JA, Vinderola CG. *Viability of lactic acid microflora in different types of yoghurt*. Food Research International. 2000; 30(2): 799-805.

11) Laukova, A Vlaemynck G. *Use of bacteriocin preparation with anti-microbial activity in Saint-Paulin cheese*. In Bulletin of Veterinary Institute in Pulawy. 2003; 47(4): 497-505.

12) Badis A, Guetarni D, Moussa Boudjema BM, Henni DE, Kihal M. *Identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from raw goat milk of four Algerian races*. Article Food Microbiology. 2004; 21(Issue 5): 579-588.

13) Nitisinprasert V, Nilphai P, Bunyun P, Sukyai K, Sonomoto DK. *Screening and identification of effective thermotolerant Lactic Acid Bacteria producing antimicrobial activity against Escherchia coli and Salmonella sp. Resistant to Antibiotic.*, Kasetsart J. 2000; 34: 387-400.

14) Ogunbanwo ST, Sanni AI, Onilude A A. *Characterization of bacteriocin produced by Lactobacillus plantarum F1 and Lactobacillus brevis OGI*. African Journal of Biotechnology. 2003; 2(8): 219-227.

15) Tamime A, Robinson R. *Nutritional value of yoghurt*. Journal of Dairy science and technology. 1999; 1: 365-369.

16) Wolf L, Erickson KL, Hubbard N. *Bacteriocins of lactic acid bacteria*. Journal Nutrition .2000;130(2):403-409.

۱۷) اشعری، ن. میردامادی، س. جداسازی و بررسی باکتری‌های لاکتیک تولید کننده مواد ضد رشد باکتری‌ها در صنایع غذایی. سال ۱۳۸۱. پایان نامه کارشناسی ارشد میکروبیولوژی. دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم. سال ۱۳۸۱. صفحات ۸۷ و ۹۹ و ۱۱۲ و ۱۱۸.

۱۸) پور احمد، ر. استفاده از سویه‌های میکروبی بومی در تولید ماست. دکترای صنایع غذایی. دانشکده صنایع غذایی. دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران. سال ۱۳۸۲. صفحات ۹۸ تا ۱۱۵.