

## جداسازی و خواص ضد میکروبی اکتینومیست‌های جدا شده از کویرهای ایران

سعید ذاکر بستان آباد<sup>۱</sup>، عبدالرزاق هاشمی شهرکی<sup>۲</sup>، پروین حیدریه<sup>۳</sup>، میتاق حسینی<sup>۴</sup>

۱. دانشیار، دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند، پرند، ایران
۲. استادیار، بخش اپیدمیولوژی، انستیتو پاستور ایران
۳. استادیار، گروه پاتوبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی البرز
۴. دانشجوی دکتری، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

### چکیده

**سابقه و هدف:** غربال‌گری اکتینومیست‌ها توسط محققین، برای تولید آنتی‌بیوتیک‌های نو در سال‌های اخیر شتاب چشمگیری پیدا کرده است.

**مواد و روش‌ها:** از بیابان‌های کویر لوت، کویر استان سیستان و بلوچستان و بیابان‌های اهواز ۳۰ نمونه خاک جمع‌آوری گردید. اکتینومیست‌های هر نمونه خاک جداسازی و خواص ضد میکروبی آنها بر علیه تعدادی باکتری پاتوژن بررسی شد.

**یافته‌ها:** تعداد ۳۰۰ ایزوله اکتینومیست از نمونه‌های خاک جداسازی شد. از این تعداد ایزوله، ۲۴ ایزوله جدا شده دارای خواص ضد میکروبی مناسبی بر علیه حداقل یکی از باکتری‌های پاتوژن مانند *A. baumannii* و *K. pneumoniae*، *E. faecium*، *S. aureus* بودند.

**بحث:** این مطالعه نشان داد که خاک‌های بیابانی دارای گونه‌های متنوعی از اکتینومیست‌ها می‌باشند که تعدادی از آنها دارای خواص وسیع الطیف ضد میکروبی هستند و منابع بالقوه‌ای برای آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشند.

**کلمات کلیدی:** خاک‌های بیابانی، اکتینو میسیت‌ها، خواصیت ضد میکروبی

### مقدمه

شامل شاخه اکتینوباکتری<sup>۱</sup> و گرم مثبت‌هایی با محتوای G + C پایین که شامل جنس‌های شناخته شده باسیلوس<sup>۲</sup> و کلستریدیوم<sup>۳</sup> هستند. بسیاری از این گروه بزرگ از باکتری‌ها در درجه اول کموارگانوتروفیک<sup>۴</sup> شناخته شده‌اند و در پاسخ به گرسنگی یا مواد شیمیایی و یا شرایط فیزیکی سخت به تولید اسپور می‌پردازند. باکتری‌های گرم مثبت هوازی، به طور خاص اکتینومیست‌ها (در اینجا به عنوان باکتری‌ها در راسته

باکتری‌های گرم مثبت به دو بخش عمده تقسیم می‌شوند گرم مثبت‌هایی با محتوای G + C بالا، شاخه‌ای و فیلامنتوس

\*نویسنده مسئول: دکتر سعید ذاکر بستان آباد

پست الکترونیکی: Saeedzaker20@yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۳/۰۷/۲۲

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۳/۰۸/۳۰

<sup>1</sup> Actinobacteria

<sup>2</sup> Bacillus

<sup>3</sup> Clostridium

<sup>4</sup> chemoorganotrophic

هستند. از لحاظ تاریخی، اکتینومیست‌ها منشاء بیشترین تعداد داروهای آنتی‌بیوتیکی جدید و مولکول‌هایی با کاربرد در بسیاری دیگر از زمینه‌های درمانی بوده‌اند (۲۶، ۲۵، ۲۳، ۱۱، ۱۰). این تحقیق با هدف جداسازی و غربال-گری اکتینومیست‌های جدا شده از خاکهای کویری شامل کویر لوت، کویرهای سیستان و بلوچستان و خوزستان به عنوان منبع بیواکتیوهای فعال علیه باکتری‌های پاتوژن انجام شد.

## روش کار

### جمع‌آوری نمونه و ایزوله‌های مورد بررسی

از مناطق کویری ایران من جمله کویر لوت و بیابانهای استان سیستان و بلوچستان و مناطق بیابانی استان خوزستان یک گرم خاک (هنگام جمع‌آوری، pH و دمای خاک ثبت گردید) برداشته شد و در ۱۰۰ میلی‌لیتر از سرم فیزیولوژی حل شد. نمونه بلافاصله به آزمایشگاه منتقل شد. این نمونه‌ها سپس در یک انکوباتور شیکردار در ۲۸ درجه سانتی‌گراد با دور rpm ۲۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شدند. آن‌گاه به مخلوط زمانی داده شد تا رسوبات ته نشست شود، سپس با استفاده از سرم فیزیولوژی استریل رقت‌های پشت سر هم تا میزان ۵-۱۰ از آن تهیه گردید. مقداری معادل ۰/۱ میلی‌لیتر از هر رقت (۵-۱۰-۲-۱۰) برداشته و روی سطوح محیط‌های کشت‌های مورد اشاره در زیر کشت داده شد. لوله‌های کشت در دمای ۲۸ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه و بعد از گذشت ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت بررسی شدند.

برای کشت از محیط کشت‌هایی مانند ISP2 و Humic acid agar که حاوی ترکیبات ضد میکروبی مانند نالیدیکسیک اسید، نیستاتین، نوویوسین و سیکلوگرامید است با مقادیر ۵۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر استفاده شد. لازم به ذکر است تمامی محیط کشت‌های مورد اشاره در آزمایشگاه با فرمولاسیون‌های موجود در منابع معتبر تهیه شد چرا که بسیاری از آن‌ها به صورت تجاری موجود نبوده و یا بسیار گران‌قیمت بودند.

بعد از جداسازی ایزوله‌های مختلف رشد کرده بر روی محیط-های مورد اشاره ایزوله‌ها به طور متوالی چندین مرتبه، کشت داده شد و از خالص بودن آنها اطمینان حاصل گردید. از تعداد ۳۰ نمونه خاک برداشت شده از مناطق مختلف در مجموع ۳۰۰ کلنی جدا شد و پس از خالص‌سازی در محیط TSB حاوی گلیسرول در دمای ۸۰- نگهداری گردید.

اکتینومیستال<sup>۵</sup> تعریف شده و اعضای راسته باسیلوس، معمولاً ساپروفیت هستند و شامل موارد تولیدکنندگان شناخته شده از متابولیت‌های ثانویه مهم می‌باشند (۲۲، ۲۰، ۱۱، ۱۰، ۳).

باکتری‌های گرم مثبت که بیشتر مورد مطالعه قرار گرفته‌اند شامل موارد پاتوژنهای انسانی (به عنوان مثال سل، باسیل سیاه زخم) و اکتینومیست‌های تولیدکننده آنتی‌بیوتیک مشتق شده از خاک می‌باشند (۱۹، ۱۸، ۱۶، ۹، ۶).

اکتینومیست‌ها بزرگترین ژنوم را در بین باکتریها دارا هستند این ژنوم طولانی که دارای درصد، G + C بسیار بالاست توسط هزاران عامل نسخه‌برداری و بسته به نیاز خاص موجود، بیان می‌شود و به این دلیل هم، توانایی تولید انواعی از متابولیت-های ثانویه را دارند (۲۰، ۶).

نمایندگان این گروه در زیستگاه‌های متنوع، شامل خاک، ریزوسفر، و سیستهای آب شیرین و دریا یافت می‌شوند (۲۴، ۱۸، ۱۵، ۱۴، ۱۳، ۸). اگر چه اکتینومیست‌ها میکروارگانسیم‌هایی همه جا زی هستند اما مشخص شده است که خاک و مواد تشکیل دهنده آن از قبیل هوموس، کودهای آلی را ترجیح می‌دهند. این باکتری‌ها معمولاً در مقادیر زنده چندین میلیون سلول به ازای هر گرم خاک دیده می‌شوند و بیش از ۲۰ جنس از آنها از خاک جدا شده‌اند (۲۶، ۲۵، ۱۷، ۹).

تولید آنتی‌بیوتیک‌ها به طور منحصر به فرد متعلق به گونه‌های استرپتومایسس بوده که تا به حال ۱۳۳ آنتی‌بیوتیک از آنها جدا شده است و در پزشکی، صنعت و کشاورزی کاربرد دارند. از جمله آنتی‌بیوتیک‌های مهم جدا شده از استرپتومایسس‌ها می‌توان به استرپتومیسین و اسپکتینومایسین جدا شده از گونه *S. griseus* تتراسایکلین از گونه *S. auerofaciens*، کلروتتراسیکلین و اریترومایسین از گونه *S. erythraeus* اشاره کرد (۲۱، ۱۲، ۴، ۱).

امروزه حدود ۱۴۰-۱۳۰ فرآورده میکروبی و تعداد مشابهی از مشتقات آنها در طب انسانی به خصوص شیمی درمانی و دامپزشکی کاربرد دارد و حدود ۱۵-۲۰ فرآورده نیز در بخش کشاورزی مورد استفاده قرار می‌گیرد. کشف ماده مؤثر از محصولات طبیعی در صنعت و آزمایشگاه‌های دانشگاهی به طور سنتی بر بهره‌برداری تجربی در مورد میکروب‌ها متمرکز است که پرکارترین گروه اکتینومیست‌ها<sup>۶</sup> و قارچ‌های رشته‌ای

<sup>5</sup> Actinomycetales

<sup>6</sup> Actinomycetes

## رنگ آمیزی

گیری بر علیه ۴ پاتوژن *S. aureus*، *E. faecium*، *K. pneumoniae* و *A. baumannii* مورد آزمایش قرار گرفتند.

## نتایج

از تعداد ۳۰۰ ایزوله جدا شده که به روش‌های استاندارد کشت داده شد و حساسیت آن‌ها روی باکتری‌ها بررسی شد تعداد ۲۲ ایزوله توانستند روی باکتری‌های مورد نظر تأثیر ضد باکتری‌های داشته و فعالیت آنها را مختل سازند (جدول ۱). به طور کلی نتایج حاصل از آنالیز خواص ضدباکتریایی ایزوله‌ها به قرار زیر بود:

- ایزوله‌های جدا شده از کویر لوت در این مطالعه دارای خواص ضد باکتریایی بهتری بودند. ایزوله شماره ۲، به هر سه روش غربال‌گری خواص ضد میکروبی، بر علیه دو باکتری *S. aureus* و *E. faecium* مؤثر بود.

- ایزوله شماره ۶، با هر سه روش غربال‌گری خواص ضد میکروبی، بر علیه دو باکتری *S. aureus* و *E. faecium*.  
- ایزوله‌های جدا شده از سیستان و بلوچستان، با هر سه روش غربال‌گری خواص ضد باکتریایی بهتری بودند. ایزوله شماره ۱۲، با هر سه روش غربال‌گری خواص ضد میکروبی، بر علیه باکتری *S. aureus* مؤثر بود.

- ایزوله شماره ۱۸، ۱۹ و ۲۰، با هر سه روش غربال‌گری خواص ضد میکروبی، بر علیه دو باکتری *S. aureus* و *E. faecium* مؤثر بودند.  
- ایزوله‌های شماره ۳۶ و ۳۷، با استفاده از روش سه روش غربال‌گری تلقیح نقطه‌ای بر علیه باکتری *E. faecium* مؤثر بود.

- ایزوله‌های شماره ۴۳ و ۴۴، با هر سه روش غربال‌گری خواص ضد میکروبی، بر علیه همه باکتری‌های *S. aureus*، *E. faecium*، *K. pneumoniae* و *A. baumannii* مؤثر بودند و نشان می‌داد که این ایزوله‌ها دارای توانمندی بالایی در تولید ترکیبات ضد باکتریال می‌باشند.

- ایزوله‌های شماره ۵۰، ۵۱، ۵۲، ۶۴ و ۹۶ و ۱۱۳ با روش غربال‌گری بر مبنای عصاره‌گیری بر علیه هر چهار باکتری مورد آزمایش یعنی *S. aureus*، *E. faecium*، *K. pneumoniae* و *A. baumannii* مؤثر بودند.

در مورد ایزوله‌های جدا شده از سیستان و بلوچستان، ایزوله‌های شماره ۱۲۹ و ۱۳۹، با روش غربال‌گری تلقیح نقطه‌ای دارای خواص ضد میکروبی بر علیه دو باکتری *S. aureus* و *E. faecium* بودند. همچنین ایزوله ۲۲۷ نیز با روش عصاره‌گیری

اسمیری از ایزوله‌ها بر روی یک اسلاید شیشه‌ای تمیز آماده شد و اجازه داده شد لام در هوا خشک و پس از آن با حرارت ثابت گردید. سپس لام تهیه شده با کریستال ویوله آب‌گرفتگی شد و پس از یک دقیقه آن را با آب شسته و آب‌گرفتگی باید گرم صورت گرفت. سپس اسمیرباتیل الکل ۹۵٪ رنگ بری شد، و پس از شستشو با آب اسمیر با سافرانین برای ۴۵ ثانیه آغشته شد. پس از شستشو با آب، لام با دستمال کاغذی خشک و با میکروسکوپ نوری (100X) مورد بررسی قرار گرفت.

ایزوله‌های متنوع از نظر مورفولوژی برای غربال‌گری اثر ضد باکتریایی آنها علیه سویه‌های پاتوژن با استفاده از روش‌های تلقیح نقطه‌ای - کشت خطی منفرد و عصاره‌گیری کشت داده شد.

## جداسازی باکتری براساس آزمون‌های فنوتیپی و ژنوتیپی

در طی دو سال (در فاصله زمانی بین سال‌های ۱۳۹۱ تا ۱۳۹۳) تمامی نمونه‌های خاک مورد بررسی در این مطالعه از مناطق مختلف در ظرف استریل جمع‌آوری و به آزمایشگاه میکروبیولوژی منتقل و مورد مطالعه قرار گرفتند.

نمونه‌ها از سه منطقه کویر لوت، بیابان‌های سیستان و بلوچستان و بیابانهای اهواز تهیه گردید. از هر منطقه بیابانی تعداد ۱۰ نمونه و در مجموع ۳۰ نمونه خاک مورد بررسی قرار گرفت.

در این مطالعه کلیه نمونه‌های خاک جمع‌آوری شده با استفاده از روش تیمار خاک با فتل ۱.۵٪ روی محیط کشتهای ISP2 و Humicacidagar کشت داده شد. از این محلول برای از بین بردن اسپور باسیلوس‌ها و همچنین آلودگی قارچی استفاده شد.

از ۳۰ نمونه خاک جمع‌آوری شده از مناطق مختلف ۳۰۰ ایزوله اکتینومیست با تست‌های شناسائی فنوتیپی ساده بر اساس مورفولوژی و رنگ‌آمیزی گرم در فرم خالص جداسازی شد. این ایزوله‌ها به صورت استوک دردمای  $80^{\circ}\text{C}$  قرار گرفت.

## تعیین حساسیت دارویی

تمام ۳۰۰ ایزوله جدا شده در این مطالعه با استفاده از سه روش تلقیح نقطه‌ای، روش کشت خطی منفرد و روش عصاره

در مطالعه کنونی تنها ۲۴ ایزوله دارای خاصیت ضد میکروبی بودند. دلیل اینکه این ایزوله‌ها خواص ضد میکروبی بالایی نشان دادند را می‌توان به دو دلیل عمده مرتبط دانست. اولین دلیل این است که شاید روش بررسی خواص ضد میکروبی روش مناسبی نبوده است و باید از راه‌های دیگر استفاده کرد. دلیل دوم می‌تواند این باشد با توجه به جداکردن این باکتری-ها از نواحی بیابانی، شاید خواص ضد میکروبی بالایی نداشته باشند. همچنین چون در این مطالعه تعیین هویت انجام نشد، احتمال اینکه استرپتومایسس جنس غالب نبوده نیز مطرح است. آنچه مسلم است اکتینومیست‌ها با منشاء بیابان بر اساس نتایج سایر مطالعات و مطالعه کنونی برای اولین بار در ایران، تنوع گونه‌ای بسیار بالایی دارند و بر اساس روش‌های مورد استفاده در این مطالعه برای تعیین و غربال‌گری خواص ضد میکروبی، پتانسیل خوبی برای تولید انواع ترکیبات ضد میکروبی را دارند.

مطالعه کنونی علی‌رغم نتایج مناسب دارای محدودیت‌های جدی نیز بود که از مهم‌ترین آنها می‌توان به نحوه تعیین خواص ضد میکروبی و عدم شناسایی گونه‌ها اشاره نمود که این دو چالش باید در مطالعات بعدی مورد توجه قرار گیرد.

## سپاسگزاری

از معاونت تحقیقات و فن‌آوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند برای تأمین منابع مالی این پروژه تشکر و قدردانی می‌شود.

دارای خواص ضد میکروبی بر علیه هر ۴ باکتری مورد آزمایش بود. مابقی ایزوله‌های این منطقه خواص ضد باکتریال قابل قبولی نداشتند.

در مورد ایزوله‌های خوزستان، ایزوله ۲۹۲ با روش نقطه‌ای تنها بر علیه *S. aureus* و *E. faecium* دارای خاصیت ضد میکروبی بود درحالی که سه ایزوله ۲۸۲، ۲۹۶ و ۲۹۷ با روش عصاره‌گیری دارای خواص ضد میکروبی بر علیه هر ۴ باکتری مورد آزمایش بودند.

## بحث

در مطالعه‌ای در کشور ترکیه از ۵۰ ایزوله اکتینومیسیت جدا شده از خاک، ۳۴٪ دارای خاصیت ضد میکروبی بر علیه پاتوژن‌های مورد استفاده از خود نشان دادند. این مطالعه به خوبی نشان داد که اکتینومیست‌های خاک دارای توانایی بالایی برای تولید آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشند (۲).

در مطالعه دیگر ۳۳۵ ایزوله جدا شده اکتینومیست مورد بررسی قرار گرفتند. این ایزوله‌ها شامل ۲۳۵ ایزوله استرپتومایسس و مابقی متعلق به گونه‌های دیگر بودند. از بین ایزوله‌های استرپتومایسس، ۱۸۱ ایزوله (۷۷٪) دارای خاصیت ضد میکروبی بودند که به خوبی موید اهمیت اکتینومیست‌ها به خصوص گروه استرپتومایسس‌ها در تولید آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشد. ایزوله‌های متعلق به سایر جنس‌های اکتینومیست تنها ۴۰٪ دارای خاصیت ضد میکروبی بودند (۵).

## منابع

1. Abdelmohsen, U.R., et al., Isolation, phylogenetic analysis and anti-infective activity screening of marine sponge-associated actinomycetes. *Marine drugs*, 2010. 8(3): p. 399-412.
2. Antibacterial activity of some actinomycetes isolated from farming soils of Turkey , Mustafa Oskay, A. Üsame Tamer and Cem Azeri *African Journal of Biotechnology*, 2004. 3 (9): p. 441-446.
3. Alanis, A.J., Resistance to antibiotics: are we in the post-antibiotic era? *Arch Med Res*, 2005. 36(6): p. 697-705.
4. Baltz, R.H., Renaissance in antibacterial discovery from actinomycetes. *Curr Opin Pharmacol*, 2008. 8(5): p. 557-63.
5. Basilio A, González I, Vicente MF, Gorrochategui J, Cabello A, González A, Genilloud O .Patterns of antimicrobial activities from soil actinomycetes isolated under different conditions of pH and salinity. *J Appl Microbiol*. 2003;95(4):814-23.
6. Basilio, A., et al., Patterns of antimicrobial activities from soil actinomycetes isolated under different conditions of pH and salinity. *Journal of applied microbiology*, 2003. 95(4): p. 814-823.
7. Bian, J., et al., *Amycolatopsis marina* sp. nov., an actinomycete isolated from an ocean sediment. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2009. 59(Pt 3): p. 477-81.

8. Chang, X., W. Liu, and X.H. Zhang, *Spinactinospora alkalitolerans* gen. nov., sp. nov., an actinomycete isolated from marine sediment. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2011. 61(Pt 12): p. 2805-10.
9. Davies, J., How to discover new antibiotics: harvesting the parvome. *Curr Opin Chem Biol*, 2011. 15(1): p. 5-10.
10. Demain, A.L. and S. Sanchez, Microbial drug discovery: 80 years of progress. *J Antibiot (Tokyo)*, 2009. 62(1): p. 5-16.
11. Enright, M.C., The evolution of a resistant pathogen--the case of MRSA. *Curr Opin Pharmacol*, 2003. 3(5): p. 474-9.
12. Gharaibeh, I.S.R., The Streptomyces flora of Badia region of Jordan and its potential as a source of antibiotics active against antibiotic-resistant bacteria. *Journal of Arid Environments* 2003. 53: p. 365-371.
13. Goodfellow, M.a.J.A.H., Actinomycetes in Marine Sediments, in *Biological, Biochemical and Biomedical Aspects of Actinomycetes*, L. Ortiz-Ortiz, C.F. Bojali and V. Yakoleff, Editor. 1984, Academic Press: New York, London. p. 453.
14. Hongjuan Zhaoa, b., Rachel L. Parrya, David I. Ellisa, b, Gareth W. Griffitha, Royston Goodacre, The rapid differentiation of Streptomyces isolates using Fourier transform infrared spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy*, 2006 : (٢)٤ .p. 213-218.
15. Huck, T.A., N. Porter, and M.E. Bushell, Positive selection of antibiotic-producing soil isolates. *Journal of General Microbiology*, 1991. 137(10): p. 2321-2329.
16. Kariminik, A. and F. Baniasadi, Pageantagonistic Activity of Actinomycetes on Some Gram Negative and Gram Positive Bacteria. *World Appl. Sci. J*, 2010. 8: p. 828-832.
17. Kim, B.S., J.Y. Lee, and B.K. Hwang, Diversity of actinomycetes antagonistic to plant pathogenic fungi in cave and sea-mud soils of Korea. *J. Microbiol*, 1998. 36(2): p. 86-92.
18. Kumar K. Siva, H.R., Mohan Y.S.Y.V. Jagan and Ramana T., Screening of Marine Actinobacteria for Antimicrobial Compounds. *Reasearch journal of microbiology*, 2011. 6(4): p. 385-393.
19. Medema, M.H., et al., antiSMASH: rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences. *Nucleic Acids Res*, 2011. 39(Web Server issue): p. W339-46.
20. Oskay, A.M., T. Üsame, and A. Cem, Antibacterial activity of some actinomycetes isolated from farming soils of Turkey. *African journal of Biotechnology*, 2004. 3(9): p. 441-446.
21. Pandey, A., et al., ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF ACTINOMYCETES FROM SOIL AND EVALUATION OF ANTIBACTERIAL ACTIVITIES OF ACTINOMYCETES AGAINST PATHOGENS. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical technology*, 2011. 2(4).
22. Rajesh, R., P.M. Helen, and S.J. Sree, Screening of Antibiotic Producing Actinomycetes from Coconut Husk Retting Sample. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical* : (١)٤ .٢٠١٣ ,p. 67-74.
23. Ramazani, A., et al., SCREENING FOR ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF STREPTOMYCES SPECIES ISOLATED FROM ZANJAN PROVINCE, IRAN. *INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICAL, CHEMICAL AND BIOLOGICAL SCIENCES*, 2013.
24. Sripreechasak, P., et al., Identification and antimicrobial activity of actinobacteria from soils in southern Thailand. *Trop Biomed*, 2013. 30(1): p. 46-55.
25. Velayudham, S. and K. Murugan, Diversity and Antibacterial Screening of Actinomycetes from Javadi Hill Forest Soil ,Tamilnadu, India. *Journal of Microbiology Research*, 2012. 2(2): p. 41-46.

26. Xiao, J., Y. Luo, and J. Xu, Genome sequence of *Serinicoccus profundus*, a novel actinomycete isolated from deep-sea sediment. *J Bacteriol* : (۲۲)۱۹۳.۲۰۱۱ ,p. 6413.