

بررسی تجمع برخی فلزات سنگین در بافتهای عضله، کبد و آبشش ماهی هامور (*Epinephelus coioides*)

عین الله گرجی پور^{(۱)*}؛ علی صدوق نیری^(۲)؛ احمد رضا حسینی^(۳) و سراج بیبا^(۴)

E.gorjipoor@hotmail.com

۱- مرکز تحقیقات ژنتیک و اصلاح نژاد ماهیان سردآبی، یاسوج صندوق پستی: ۷۵۹۱۴-۳۵۸

۲- دانشگاه علوم دریایی و دریانوردی چابهار

۳- دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر صندوق پستی: ۶۶۹

تاریخ دریافت: مرداد ۱۳۸۷ تاریخ پذیرش: اسفند ۱۳۸۷

چکیده

تحقیق حاضر، در پاییز ۱۳۸۵، به منظور تعیین غلظت فلزات سنگین (Cd, Pb, Cu, Ni) در بافتهای عضله، کبد و آبشش ماهی هامور معمولی (*Epinephelus coioides*) صید شده از آبهای هندیجان در استان خوزستان صورت گرفت. بافت ۳۰ نمونه هامور پس از انجام زیست‌سنجی، تفکیک شدند. برای استخراج فلزات از این بافتها از روش هضم شیمیایی توسط اسید نیتریک استفاده گردید و غلظت فلزات توسط دستگاه جذب اتمی (AAS) تعیین گردید. میانگین غلظت فلزات (برحسب ppm وزن خشک) با استانداردهای جهانی نظیر: سازمان بهداشت جهانی (WHO)، وزارت کشاورزی- شیلات و غذای انگلستان (UKMAFF) و انجمن بهداشت ملی و تحقیقات پزشکی استرالیا (NHMRC) مقایسه شد. میانگین غلظت کادمیوم و سرب بالاتر از حد مجاز (به استثناء بافت عضله) بود. یک رابطه خطی مثبت و معنی‌دار ($P < 0.05$) بین تجمع نیکل، سرب و مس با وزن و طول کل در بافت عضله دیده شد. بین میزان تجمع عنصر کادمیوم در بافت عضله با فاکتورهای طول و وزن کل رابطه معنی‌داری وجود نداشت ($P > 0.05$).

کلمات کلیدی: فلزات سنگین، ماهی هامور، هندیجان، خلیج فارس

مقدمه

پیشرفت‌های صنعتی علاوه بر اینکه مزیت‌هایی را در پی داشته است، ولی سبب بروز مشکلاتی از جمله آلودگی شدید دریاها شده است که موجب تخریب محیط زیست و سبب تهدید حیات آبریان شده است (امینی رنجبر و همکاران، ۱۳۸۴).

سن، طول، وزن، جنسیت، عادت تغذیه‌ای، نیازهای اکولوژیک، غلظت فلزات سنگین در آب و رسوب، مدت زمان ماندگاری ماهی در محیط آبی، فصل صید و خواص فیزیکی و شیمیایی آب (شوری، pH، سختی و دما) از عوامل مؤثر در تجمع فلزات سنگین در اندام‌های مختلف ماهی می‌باشند (Demirak et al., 2006). حتی به نظر می‌رسد میزان چربی بافتها نیز می‌تواند عامل مهمی در تجمع آلاینده‌ها در اندام‌های مختلف مانند استخوان، مغز، عضله، آبشش، گناد و کبد باشد (Farkas et al., 2003).

ماهی هامور معمولی (*Epinephlus coioides*) یکی از مهمترین ماهیان تجاری در حوضه خلیج فارس می‌باشد. جمعیت این ماهیان به علت بازارپسندی و صید نسبتاً آسان بوسیله تعداد زیادی از ادوات صید مانند تور گرگور در معرض فشار صید می‌باشند. این ماهی بنابر ارزش اقتصادی آن، بخش عمده‌ای از فعالیتهای شیلاتی در استان خوزستان را بخود اختصاص داده است و در بازارهای خلیج فارس، هند، سنگاپور، هنگ‌کنگ و تایوان ماهی رایج و گرانبه‌ای است. حوزه انتشار این ماهی در ایران از شمال خلیج فارس تا دریای عمان می‌باشد. در ایران کشور به رغم گستردگی منابع دریایی بخصوص در سواحل جنوبی استفاده وسیع مردم از آن، تاکنون تحقیقات اندکی در زمینه اندازه‌گیری فلزات سنگین در بافتهای مختلف انواع ماهیان صورت گرفته است. بدلیل آنکه ماهی هامور در اقتصاد شیلاتی ایران نقش بسیار مهمی دارد، لذا اهمیت این تحقیق در تعیین میزان آلاینده‌های فلزی به منظور اطمینان از سلامت مصرف و بهداشت مواد غذایی و بررسی میزان تجمع این فلزات در بافتهای مختلف این ماهی و همچنین بررسی روابط بین طول کل و وزن کل با میزان تجمع فلزات مذکور در بافت عضله و مقایسه آن با استانداردهای جهانی هدف اصلی در این تحقیق می‌باشد.

مواد و روش کار

در پاییز سال ۱۳۸۵، تعداد ۳۰ عدد ماهی هامور معمولی (*Epinephlus coioides*) بصورت تصادفی از صید صیادان، به

روش تور گوشگیر در منطقه سجافی واقع در بندر صیادی هندوچان تهیه و توسط یونولیت‌های محتوی یخ به آزمایشگاه شیمی دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر منتقل گردیدند. پس از زیست سنجی (اندازه‌گیری طول کل، طول استاندارد و وزن کل)، کالبد شکافی شدند و بافت عضله، کبد و آبشش جدا شد. این بافتها توسط آون در دمای ۱۰۵ درجه سانتیگراد به مدت ۴۸ ساعت خشک شدند و سپس با هاون چینی پودر شده و عمل هضم شیمیایی توسط ۶ میلی‌لیتر اسید نیتریک غلیظ به ازای یک گرم پودر از هر بافت انجام گرفت. پس از صرف حداقل زمان ۲ ساعت، جهت انجام عمل هضم مقدماتی در دمای اتاق، برای هضم کامل نمونه‌ها از دستگاه هیتردیجست در دمای ۱۴۰ درجه سانتیگراد بمدت ۵ ساعت استفاده گردید. پس از اتمام عمل هضم، نمونه‌ها را تبخیر شده و درست در لحظه‌ای که نمونه‌ها هنوز تر بودند از پلیت داغ برداشته شدند. نمونه‌ها با اسید نیتریک ۴ درصد رقیق شده و سپس توسط کاغذ صافی واتمن ۴۲ صاف گردیدند و پس از انتقال به بالنهای حجم سنجی ۲۵ میلی‌لیتری با آب مقطر به حجم رسانده شدند. به موازات آماده‌سازی نمونه جهت انجام عمل هضم شیمیایی، نمونه شاهد (Blank) نیز برای هر یک از نمونه‌ها بطور جداگانه تهیه گردید (Karadede et al., 2004).

پس از آماده‌سازی، عناصر سنگین توسط دستگاه جذب اتمی Unicam مدل ۹۱۹ آنالیز و میزان غلظت عناصر مورد نظر در بافتها تعیین شد. لازم به ذکر است، تمامی محلولهای استاندارد مصرفی بسته به نوع فلز مورد آنالیز، استاندارد مرک (Merck) با غلظت ppm ۱۰۰۰ بود. جهت انجام مطالعات آماری از نرم‌افزار SPSS 12 استفاده گردید و با استفاده از آزمون ANOVA، تفاوت غلظت فلزات در بافتهای مختلف بررسی شد و همچنین رسم نمودارها توسط نرم افزار Excel انجام گرفت. در تحقیق حاضر از آزمون آماری t-test، جهت مقایسه میانگین میزان فلزات سنگین اندازه‌گیری شده در بافت عضله با مقادیر استانداردهای جهانی و همچنین از ضریب همبستگی پیرسون، به منظور بررسی رابطه بین میزان تجمع فلزات سنگین در بافت عضله با عوامل طول کل و وزن کل استفاده گردید.

نتایج

جدول ۱ نشاندهنده خلاصه نتایج آماری حاصل از زیست‌سنجی و جدول ۲ نشاندهنده خلاصه نتایج آماری حاصل از اندازه‌گیری فلزات سنگین (Cd, Pb, Cu, Ni) در بافت عضله، کبد و آبشش ماهی هامور مورد مطالعه می‌باشد. همچنین نمودار ۱ نشاندهنده میانگین غلظت فلزات سنگین (Cd, Pb, Cu, Ni) در بافت عضله، کبد و آبشش ماهی هامور معمولی می‌باشد. آنالیز نمونه‌ها نشان داد که میانگین غلظت فلزات سنگین در بافت عضله در حداقل میزان و در بافت آبشش در حداکثر میزان می‌باشد. نتایج نشان داد که میزان سرب بترتیب بیش از نیکل، مس و کادمیوم در بافت عضله ماهی هامور بود. نتایج حاصل از آزمون انجام آنالیز همبستگی، حاکی از وجود رابطه خطی مثبت بین میزان تجمع فلزات سرب، نیکل و مس در بافت عضله ماهی با

عوامل طول و وزن کل می‌باشد ($P < 0.05$) (نمودار ۲، ۳، ۴، ۵، ۶ و ۷). در صورتیکه بین میزان تجمع عنصر کادمیوم با عوامل طول و وزن کل رابطه معنی‌داری وجود نداشت ($P > 0.05$) (نمودار ۸ و ۹).

نتایج آزمون آماری *t-test*، با مقایسه میانگین میزان تجمع فلزات سنگین (برحسب ppm) در بافتهای ۳۰ عدد ماهی هامور، با استانداردهای جهانی نظیر سازمان بهداشت جهانی (WHO)، وزارت کشاورزی- شیلات و غذای انگلستان (UKMAFF) و انجمن بهداشت ملی و تحقیقات پزشکی استرالیا (NHMRC)، نمایانگر بالا بودن غلظت عنصر کادمیوم در تمام بافتهای مورد بررسی و همچنین بالا بودن غلظت عنصر سرب (به استثناء بافت عضله) در مقایسه با استانداردهای ذکر شده بود (جدول ۳).

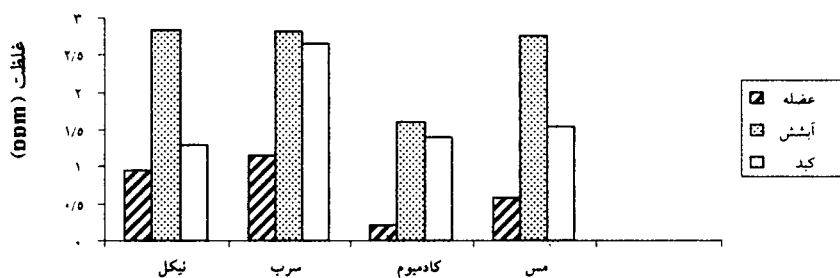
جدول ۱: نتایج آماری حاصل از زیست‌سنجی ماهی هامور معمولی ($n=30$)

متغیر	میانگین	انحراف معیار	حداقل	حداکثر
طول کل (سانتیمتر)	۳۵/۷۷	۴/۹۲	۲۷	۴۵
طول استاندارد (سانتیمتر)	۳۱/۳۴	۴/۸۳	۲۳	۴۰
وزن کل (گرم)	۶۰۴/۳۳	۱۹۳/۷۲	۲۷۰	۹۴۰

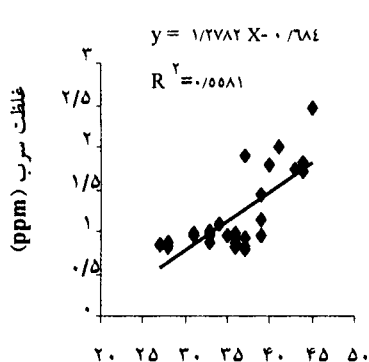
جدول ۲: نتایج حاصل از اندازه‌گیری فلزات سنگین مورد مطالعه در بافت عضله، کبد و آبشش ماهی هامور معمولی

(میکروگرم/گرم وزن خشک) ($n=30$)

عنصر	بافت	میانگین	انحراف معیار	حداقل	حداکثر
کادمیوم	عضله	۰/۲۳	۰/۴۲	۰/۱۳	۰/۲۷
	کبد	۱/۳۹	۰/۷۳	۰/۷۱	۲/۱۱
	آبشش	۱/۶۳	۰/۴۱	۰/۵۶	۱/۶۵
سرب	عضله	۱/۱۹	۰/۴۵	۰/۷۹	۲/۴۷
	کبد	۲/۶۶	۲/۹۵	۰/۸۷	۲/۶۸
	آبشش	۲/۸۱	۲/۶۳	۰/۱۵	۵/۹۱
مس	عضله	۰/۵۸	۰/۲۸	۰/۳۰	۱/۳۵
	کبد	۱/۵۴	۰/۶۲	۰/۴۵	۳/۸۹
	آبشش	۲/۷۵	۰/۷۱	۰/۵۲	۴/۱۳
نیکل	عضله	۰/۹۴	۰/۶۴	۰/۵۶	۲/۶۳
	کبد	۱/۳۱	۰/۶۶	۰/۵۸	۲/۳۱
	آبشش	۲/۸۴	۱/۴۷	۰/۹۱	۵/۱۵

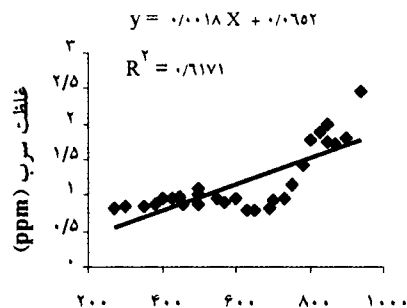


نمودار ۱: میانگین میزان تجمع فلزات سنگین در بافت عضله، کبد و آبشش ماهی هامور معمولی



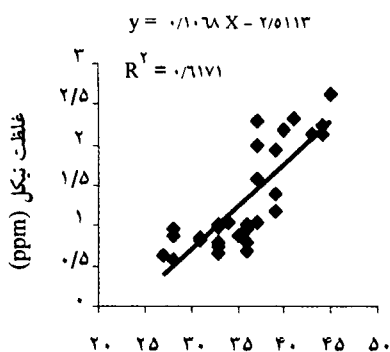
طول کل (سانتیمتر)

نمودار ۳: رابطه غلظت سرب در عضله با طول کل



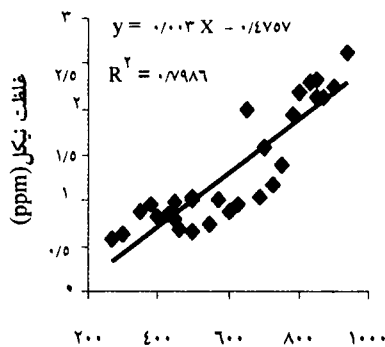
وزن کل (گرم)

نمودار ۲: رابطه غلظت سرب در عضله با وزن کل

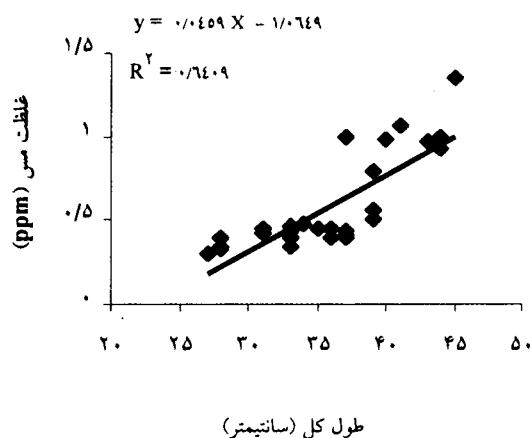
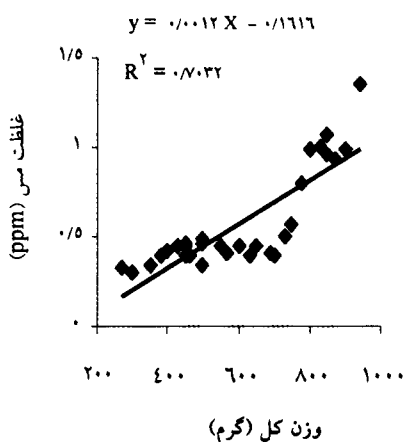


طول کل (سانتیمتر)

نمودار ۵: رابطه غلظت نیکل در عضله با طول کل (سانتیمتر)

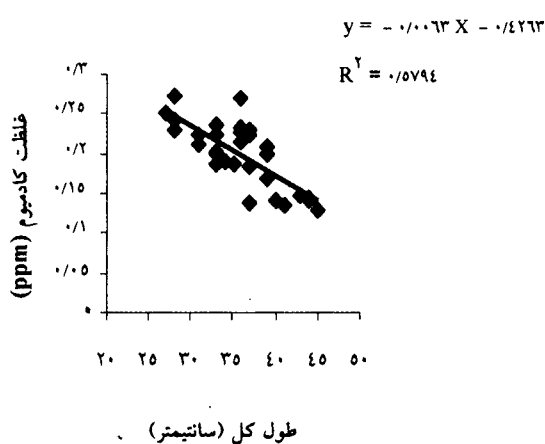
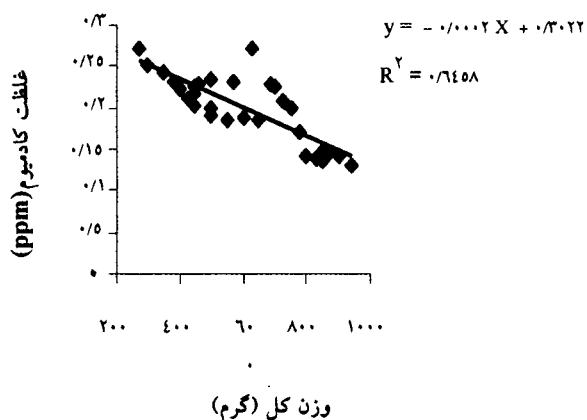


وزن کل (گرم)



نمودار ۷: رابطه غلظت مس در عضله با وزن کل (گرم)

نمودار ۶: رابطه غلظت مس در عضله با طول کل (سانتی متر)



نمودار ۹: رابطه غلظت کادمیوم در عضله با وزن کل (گرم)

نمودار ۸: رابطه غلظت کادمیوم در عضله با طول کل (سانتی متر)

جدول ۳: غلظت فلزات سنگین طبق استانداردهای جهانی (برحسب قسمت در میلیون وزن خشک)

استانداردهای جهانی	کادمیوم	سرب	مس	نیکل
WHO	۰/۲	-	۱۰	-
NHMRC	۰/۰۵	۱/۵	۱۰	-
UKMAFF	۰/۲	۲	۲۰	-

بحث

نتایج آماری حاصل از اندازه‌گیری غلظت فلزات سنگین نمونه‌های ماهی هامور مورد مطالعه (جدول ۲) بیانگر تجمع کمتر فلزات سنگین در بافت عضله نسبت به بقیه بافتها می‌باشد و میانگین غلظت فلزات در این بافت بترتیب عبارت است از: کادمیوم > مس > نیکل > سرب.

فلزات سنگین اندام هدف خود را براساس میزان فعالیت متابولیک آن انتخاب می‌کنند. این نکته، علت تجمع بیشتر فلزات در بافتهایی نظیر کبد، کلیه و آبشش‌ها را در مقایسه با بافت عضله (با فعالیت متابولیک پایین) تفسیر می‌نماید (Filazi et al., 2003).

در بافت عضله این ماهی هامور معمولی کادمیوم کمترین میزان را دار بود که با نتیجه آمینی رنجبر و همکاران (۱۳۸۴) در ارتباط با اندازه‌گیری فلزات سنگین در بافت عضله ماهی کفال طلائی (*Mugil auratus*) مطابقت دارد. میانگین میزان غلظت فلزات در بافت آبشش ماهی هامور بترتیب عبارت بود از: کادمیوم > مس > سرب > نیکل. همچنین میانگین غلظت فلزات سنگین در بافت کبد عبارت بود از: نیکل > کادمیوم > مس > سرب.

تفاوت غلظت فلزات سنگین در بافتهای مختلف ماهیان می‌تواند ناشی از متغیر بودن توان فلزات سنگین در زمینه غلبه بر پیوندهای فلزی پروتئین‌ها نظیر متالوتیونین‌ها باشد. همچنین تفاوت نیازهای اکولوژیک، فعالیتهای متابولیک ماهیان و نوسانات در آلودگی آب، غذا و رسوبات می‌تواند از دیگر عوامل مهم تلقی شوند (امینی رنجبر و همکاران، ۱۳۸۴). بافت کبد و آبشش شاخصهای خوبی از لحاظ در معرض قرار گرفتن طولانی مدت با فلزات سنگین محسوب می‌گردند. بدلیل آنکه این بافتها جایگاه متابولیسم فلزات هستند، می‌توانند نشانگر خوبی برای آلودگی آب توسط فلزات سنگین باشند (Filazi et al., 2003). در مطالعه حاضر، بافت عضله ماهی، به سبب نقش مهم در تغذیه انسان و لزوم اطمینان از سلامت آن بیشتر مورد توجه قرار گرفته است. در بین عناصر اندازه‌گیری شده در بافت عضله، میزان تجمع عنصر کادمیوم اندازه‌گیری شده در این مطالعه معادل 0.42 ± 0.23 است که از استانداردهای ذکر شده جهانی اندکی بیشتر است که این مقدار از میزان گزارش شده در عضله ماهی کفال طلائی (Filazi et al., 2003) و همچنین از گزارشات بر روی عضله ۶ گونه ماهی دریای مدیترانه کمتر است (Canli & Atli, 2003). وجود تفاوت معنی‌دار در میانگین غلظت فلزات سنگین در

بافتهای متفاوت ماهیان توسط محققین زیادی گزارش شده است. اختلاف در میانگین غلظت هر یک از فلزات در بافتهای مختلف، احتمالاً می‌تواند ناشی از تفاوت در عملکرد فیزیولوژیک و متابولیسم سلولی هر یک از بافتها باشد (Du-Prez & Steyn, 1992). بررسی حاضر نشان داد که ماهی هامور معمولی حاوی مقادیر متفاوتی از فلزات در بافتهای خود می‌باشد. گزارشات محققین دیگر نشان داده است که در تمام گونه‌های ماهی هامور، عضله حاوی کمترین مقادیر فلزات سنگین نسبت به بافتهای کبد و آبشش می‌باشد. از طرفی بیان شده که غلظت کادمیوم در بافت عضله ماهی خاردار آمریکایی (Perch) نسبت به بافتهای دیگر (به استثناء استخوان) از مقادیر بسیار کمی برخوردار است (Moore & Ramamoorthy, 1984). از تحقیقات اکثر محققین چنین استنباط می‌شود که بیشتر فلزات سنگین (به استثناء آرسنیک و جیوه) مقادیر بسیار کمتری را در بافت عضلانی نسبت به سایر اندامها دارا می‌باشند (Gibbs & Miskiewicz, 1995). نتایج این تحقیق نشان داد که عموماً تجمع فلزات در آبشش در بالاترین مقدار بود. حال آنکه در ماهیچه گونه مورد مطالعه این میزان کم بوده است. این مورد در بسیاری از گونه‌های ماهی مشهود است، اگر چه تفاوتی بین نیازهای اکولوژیک، رفتارهای شنا و فعالیتهای متابولیسمی در میان گونه‌های مختلف ماهی باشد. تفاوت در غلظت فلزات در بافتها ممکن است ناشی از ظرفیت آنها برای القاء پروتئین‌های نگهدارنده فلزی از قبیل متالوتیونین‌ها باشد. بالا بودن غلظت فلزات در آبشش و پایین بودن آن در عضله با گزارش بسیاری از محققان مطابقت دارد و نتیجه مشابهی در مورد اندازه‌گیری غلظت فلزات سنگین در ۶ گونه ماهی در بافت ماهیچه، آبشش و کبد (*Sardina*, *Scomberesox saurus*, *pilchardus*, *Trigla cuculus*, *Mugil cephalus*, *Atherina hepsetus*, *Sparus auratus*) بدست آمد (Canli & Atli, 2003). نظر به اینکه از دیگر اهداف این تحقیق بررسی روابط بین غلظت فلزات سنگین در بافت عضله ماهی هامور با عوامل طول کل و وزن کل می‌باشد، با استفاده از ضریب همبستگی پیرسون این نتیجه حاصل شد که رابطه مثبت معنی‌دار بین میزان تجمع فلزات سرب، مس و نیکل با عوامل مذکور برقرار است. همچنین بین میزان تجمع فلز کادمیوم با عوامل یاد شده، رابطه معنی‌دار دیده نشد. براساس نتایج بدست آمده می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که بدلیل ورود آلاینده‌های مختلف از جمله آلاینده‌های حاصل

Du-Preez H.H. and Steyn G.J., 1992. A preliminary investigation of the concentration of selected metals in the tissues and organ of the tiger fish (*Hydrocynus vittatus*) from Olifant River, Kruger National Park, South Africa. Water, South Africa. Vol. 18, No. 2, 136P.

Farkas A., Salanki J. and Specziar A., 2003. Age and size specific patterns of heavy metals in the organs of freshwater fish *Abramis brama* L. Populating a Low-contaminated site. Water Research, Vol. 37, pp.959-964.

Filazi A., Baskaya R. and Kum C., 2003. Metal concentration in tissues of the Black Sea fish *Mugil auratus* from Sinop-Icliman, Turkey. Human & Experimental Toxicology, Vol. 22, pp.85-87.

Gibbs P.J. and Miskiewicz A.G., 1995. Heavy metal in fish near a major primary treatment sewage plant outfall. Marine Pollution Bulletin, Vol. 30, No. 10, pp.667-674.

Karadede H., Oymak S.A. and Unlu E., 2004. Heavy metals in mullet, *Liza abu*, and catfish, *Silurus triostegus*, from the Ataturk Dam Lake (Euphrates), Turkey Environment International, Vol. 30, pp.183-188.

Moore J.W. and Ramamoorthy S., 1984. Heavy metal in natural waters. Springer-Verlag, New York, USA. 268P.

از صنایع پتروشیمی، آلاینده‌های ناشی از فعالیتهای کشاورزی، صنایع موجود در استان خوزستان و فعالیتهای انسانی نظیر فاضلابهای شهری که در نهایت پساب آنها به خلیج فارس وارد می‌شود، با توجه به نقش و اهمیت عضله در تغذیه انسانی نیاز است که مدیریت بهتر و بیشتری در جهت کنترل منابع آلاینده صورت گیرد تا ذخایر آبریان که بعنوان یکی از منابع مهم پروتئینی است، دچار صدمات کمتری ناشی از عوامل آلاینده شوند. برای جلوگیری از ورود این آلاینده‌ها بایستی تمهیداتی اتخاذ شود و همچنین منابع ایجاد آلودگی آنها بخصوص صنایع در مسیر رودخانه‌ها کنترل و پساب حاصل از آنها تصفیه شود. سنجش میزان آلاینده‌ها صرفاً در قالب پروژه‌های دانشجویی نباشد بلکه ارگانهای مرتبط مانند سازمان محیط زیست، سازمان شیلات، شرکت ملی نفت در جهت این مهم نیز گامی برداشته و ارائه گزارشی را نیز در این زمینه داشته باشند.

منابع

امینی رنجبر، غ. و ستوده‌نیا، ف.، ۱۳۸۴. تجمع فلزات سنگین در بافت عضله ماهی کفال طلائی (*Mugil auratus*) در ارتباط با برخی مشخصات بیومتریکی (طول استاندارد، وزن، سن و جنسیت)، مجله علمی شیلات ایران، سال چهاردهم، شماره ۳، پاییز ۱۳۸۴، صفحات: ۱ تا ۱۹.

Canli M. and Atli G., 2003. The relationship between heavy metal (Cd, Cr, Cu, Fe, Pb, Zn) levels and the size of six Mediterranean fish species. Environment Pollution, Vol. 121, pp.129-136.

Demirak A., Yilmaz F., Tuna A.L. and Ozdemir N., 2006. Heavy metals in water, sediment and tissues of *Leuciscus cephalus* from a stream in southwestern Turkey. Chemosphere, Vol. 63, Issue 9, pp.1451-1458.

Accumulation of heavy metals in the muscle, liver and gill tissues of *Epinephelus coioides*

Gorjipoor E.^{(1)*} ; Sadough Niri A.⁽²⁾ ; Hosseini A.R.⁽³⁾ and Bitra S.⁽⁴⁾

E.gorjipoor@hotmail.com

1- Cold Water Fishes of Breeding and Genetics Research Center, P.O.Box: 75914-358 Yasoj, Iran

2- Navigation and Marine Science University of Chabahar , Iran

3- Faculty of Natural Resources, Marine Science and Technology of Khoramshahr University,
P.O.Box: 663 Khoramshahr, Iran

Received: August 2008

Accepted: March 2009

Keywords: Heavy Metals, *Epinephelus coioides*, Hendijan, Persian Gulf, Iran

Abstract

We studied concentration of heavy metals Cd, Pb, Cu, Ni in the muscle, liver and gill tissues of *Epinephelus coioides* caught in autumn 2006 from Hendijan Coastal waters in the Persian Gulf. After biometrical measurements, the muscle, liver and gill tissues of 30 randomly selected fish were separated; metals were extracted from the tissues using chemical digestion method with pure nitric acid and their concentrations were determined by AAS.

Mean concentrations (ppm/dry weight) were compared with the international standards such as WHO, UKMAFF and NHMRC. The mean concentration for Cd and Pb in all tissues with the exception of muscle tissue, were found higher than permissible limit. We found a positive linear relationship between accumulation of Ni, Pb and Cu in muscle tissue with total weight and total length factors ($P < 0.05$). There was no significant relationship between mean concentration of Cd in muscle tissue with total weight and total length factors ($P > 0.05$).

* Corresponding author