

بررسی تغییرات فصلی اسیدهای چرب در نرمتن *Nerita textiles*

در مناطق جزر و مدی خلیج چابهار (دریای عمان)

نوشین سجادی^{(۱)*}؛ پیمان اقتصادی عراقی^(۲) و کاظم درویش بسطامی^(۳)

noshinsadgadi@yahoo.com

۱-دانشکده علوم و فنون دریایی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، خیابان شهید فلاحی، پلاک ۱۴

۲ و ۳- موسسه ملی اقیانوس شناسی، تهران صندوق پستی: ۱۴۱۱۸-۱۳۳۸۹

تاریخ پذیرش: تیر ۱۳۹۰

تاریخ دریافت: شهریور ۱۳۸۹

نکات کلیدی: *Nerita textiles*، اسید چرب، خلیج چابهار، دریای عمان

نوع غذای در دسترس منجر به تغییرات فصلی در مقدار اسیدهای چرب شده و فاکتورهای بیولوژیک مانند تفاوت در جنسیت، تاثیر چرخه‌های تولید مثلی و توزیع رده‌های لیبید استری شده متفاوت در بافت بدنی آنها و نوع عملکرد این متغیرها موجب تغییرات و ایجاد تفاوت در ترکیب اسیدهای چرب می‌شود (McClintock & Baker, 2001). نرمتنان در خلیج فارس و دریای عمان از تنوع زیستی بالایی برخوردارند و از ذخایر مهم زیستی در این مناطق محسوب می‌شوند. تنوع و پراکنش نرمتنان در خلیج چابهار توسط نیکویان و همکاران (۱۳۷۷) بررسی گردیده است و بویژه در مناطق جزر و مدی خلیج چابهار و سواحل اطراف آن خانواده‌هایی از دوکفه‌ای‌ها مانند *Ostreidae*، *Mytilidae*، *Arcidae*، *Veneridae*، *Nuculidae* و *Cardiidae* شناسایی شدند. شکم‌پای *Nerita textiles* گونه‌ای از نرمتنان می‌باشد که در خلیج چابهار یافت می‌شود و تاکنون مطالعه‌ای در باره‌ی زیست‌شناسی تولید مثل و تغذیه این گونه در ایران و خارج از کشور انجام نشده است. همچنین تحقیقی در زمینه بررسی تغییرات فصلی اسید چرب در این منطقه

اسیدهای چرب از فراوانترین و جالب‌ترین گروهها در ترکیبات طبیعی هستند که از قارچها، جلبکها، ماهیان، نرمتنان و سایر موجودات دریایی جدا شده‌اند. اسیدهای چرب با زنجیره طولانی توسط آنزیم‌های جانداران به هیدروکربن‌های حلقوی یا غیرحلقوی تبدیل می‌شوند و این هیدروکربن‌ها بعنوان فرمون‌های تولید مثل جنسی، پروستاگلندین‌ها یا دفاع کننده‌های شیمیایی جانداران اهمیت دارند یا اسیدهای چرب هالوژن‌دار مانند اسیدهای چرب کلردار تشکیل می‌دهند که از سازندگان اصلی ترکیبات ارگانوهالوژن در جلبکها، ماهی‌ها، نرمتنان و سایر بی‌مهرگان بوده و این واکنش‌ها در حضور آنزیم‌هایی از گروه هالوپروکسیدازها انجام شده و نتیجه آن ایجاد ترکیباتی طبیعی مانند ایندولهای هالوژن‌دار است که فعالیت ضدالتهابی و ضدسرطانی دارند. از اسیدهای چرب بعنوان نشانگر (Biomarker) نیز در مطالعه تعیین رژیم غذایی بویژه نرمتنان نیز استفاده می‌شود. ترکیب اسیدهای چرب در نرمتنان یا سایر بی‌مهرگان دریایی توسط فاکتورهای محیط زیستی و بیولوژیک تغییر می‌کند. عوامل محیطی مانند دما، شوری، pH محیط و

ثبت گردید. همچنین بیشترین مقدار اسید چرب غیراشباع در زمستان و کمترین مقدار آن در تابستان ثبت گردید. بطور کلی مقدار اسیدهای چرب اشباع شده (۶۹/۱۱۰-۵۷/۹۶۰ درصد) غالب بر غیراشباعها بود (جدول ۱) و همچنین میزان اسید چرب اشباع و غیراشباع در فصول مختلف اختلاف معنی‌داری با هم نداشتند ($P>0.05$) (جدول ۱). نتایج حاصل از رابطه رگرسیونی نشان داده است که اسید چرب اشباع با درجه حرارت رابطه معنی‌دار و مستقیم ($P<0.05$, $R^2=0.99$) و رابطه اسید چرب غیراشباع با درجه حرارت رابطه معنی‌دار و معکوس ($P<0.05$, $R^2=0.99$) بوده است (نمودار ۱).

در تحقیق حاضر میزان اسیدهای چرب در گونه *N. textiles* در خلیج چابهار برای اولین بار مطالعه شده است. تاکنون مطالعاتی گوناگونی روی اسیدهای چرب شکم پایان انجام گرفته و نتایج حاکی از آن می‌باشد که بیشترین مقادیر اسیدهای چرب مربوط به اسیدهای پالمیتیک، آراشیدونیک، استئاریک، اولئیک و ایکوزاپنتانویک بوده و این اسیدها بعنوان اسیدهای چرب اصلی بسیاری از گونه‌های دیگر شکم‌پایان و نرمتنان گزارش شده است (Johns et al., 1972). در این تحقیق نیز بیشترین میزان اسید چرب مربوط به اسید پالمیتیک و استئاریک بود که با نتایج دیگران در این زمینه مطابقت دارد. هر چند تحقیق Phleger و همکاران (۲۰۰۱) نشان داد که میزان اسیدهای چرب اشباع حدود ۳۰-۴۰ درصد پروفیل اسید چرب را در نرمتنان بخود اختصاص می‌دهد. این تحقیق نشان داد که اسیدهای چرب اشباع شده بین ۶۹/۱۱۰-۵۷/۹۶۰ درصد در گونه *N. textiles* می‌باشد که با یافته‌های قبلی همخوانی ندارد. وجود مقادیر اسیدهای چرب با نسبت‌های متفاوت در بافتهای مختلف سایر گونه‌های نرمتنان نیز گزارش شده است. تفاوت در بافتهای مختلف مثل گنادها، اندامهای داخلی، پا یا جبه جانوران را می‌توان مربوط به متابولیسم و سوخت و ساز داخلی بدن جانور و همین‌طور دوران مختلف تولید مثلی آنها دانست (Galap, 1999) در مقدار کل اسیدهای چرب در سایر مراجع، وجود اسیدهای چرب غیراشباع غالب بر اسیدهای چرب اشباع دیده می‌شود (Feuntes et al., 2009) اما در این تحقیق اسیدهای چرب اشباع غالب بودند و این نتیجه با برخی گزارش‌های دیگر مطابقت دارد (Galap, 1999). میزان چربی در بدن موجودات تحت تاثیر

روی نرمتنان صورت نگرفته اما مطالعات فراوانی در این زمینه در خارج از کشور صورت گرفته است (Fried et al., 1993; Ackman et al., 1971). هدف از این تحقیق بدست آوردن اطلاعات پایه‌ای از میزان اسید چرب، بررسی تغییرات فصلی اسید چرب در *N. textiles* در سواحل چابهار و تعیین رژیم غذایی احتمالی این گونه با استفاده از بیومارکرهای اسید چرب می‌باشد.

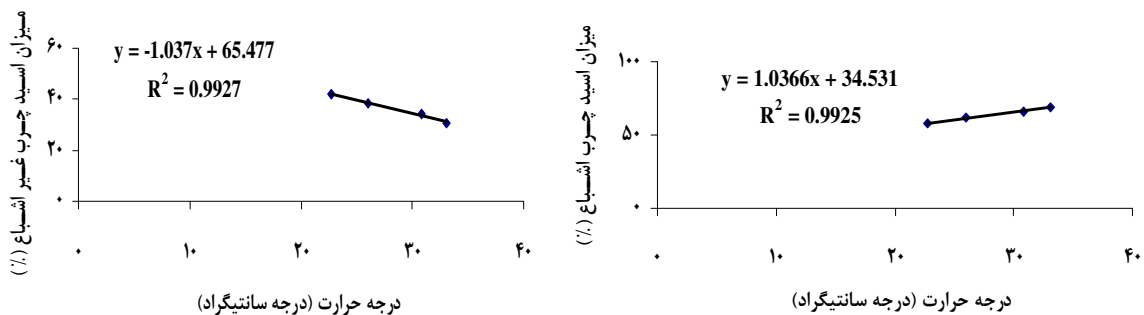
پس از بررسی شرایط زیست محیطی چهار ایستگاه انتخاب شد و سپس در این ایستگاهها پراکنش گونه *N. textiles* مورد بررسی قرار گرفت و نتیجه حاصله انتخاب یک ایستگاه مناسب (تیس) بود. پس از تعیین ایستگاه مناسب جمع‌آوری نمونه‌ها بطور فصلی به مدت یکسال (ماههای فروردین (۸۶/۱/۲۴)، مرداد (۸۶/۵/۱۰)، آبان (۸۶/۸/۲۰) و بهمن (۸۶/۱۱/۲۰)) در ساعت‌های جزر و در هر نوبت ۱۵۰ عدد *N. textiles* جمع‌آوری شد. همزمان پارامترهای اکولوژیک منطقه توسط دستگاه CTD ثبت شد. پس از آماده‌سازی نمونه‌ها و تهیه متیل استر نمونه‌ها به روش Jones و همکاران (۱۹۷۲) و Morrison و Smith (۱۹۶۴) برای آنالیز نمونه‌ها برای تعیین اسید چرب از دستگاه گاز کروماتوگرافی (Agilent Technolgoies, 6890) با شناساگر جرمی (N۶۹۷۳) و ستون موبینه HP-5 (طول ۳۰ سانتیمتر، قطر داخلی ۳۲۰ میکرومتر و ضخامت فیلم یک میکرومتر) استفاده شد. برای تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از انجام آزمایش ابتدا نرمال بودن داده‌ها توسط آزمون کولموگراف اسمیرنوف صورت گرفت. برای مقایسه بین اسید چرب در فصول مختلف و نیز وجود اختلاف معنی‌دار بین فصول در سطح احتمال ۰/۰۵ درصد از آنالیز واریانس یک طرفه ANOVA و آزمون Tukey استفاده گردید. کلیه آنالیزهای آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS (ویرایش ۱۳) و ترسیم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel در محیط ویندوز انجام شد. تغییرات فصلی، دما و شوری نشان دادند که کمترین میزان درجه حرارت در زمستان (بهمن) و بیشترین میزان درجه حرارت در تابستان (مرداد) ثبت گردید همچنین شوری در طول یکسال تغییرات چندانی نداشت. در نتیجه آنالیز ترکیبات اسیدهای چرب، در مجموع سیزده نوع اسید چرب در گونه مورد نظر شناسایی شد که در طول چهار فصل تغییراتی در مقدار آنها مشاهده گردید. بیشترین مقدار اسید چرب اشباع در تابستان و کمترین مقدار آن در زمستان

عوامل مختلفی از جمله درجه حرارت، رژیم غذایی و تولید مثل قرار دارد. تاکنون میزان ترکیب اسیدهای چرب در گونه‌ها مختلفی از نرم‌تنان مورد مطالعه قرار گرفته است و نتایج حاکی نشان داد که میزان اسید چرب در فصول مختلف تغییر می‌کند اما در این بررسی میزان اسید چرب اشباع و غیراشباع در فصول مختلف با یکدیگر اختلاف معنی‌داری نداشتند ($P < 0.05$).

جدول ۱: تغییرات درصد اسیدهای چرب اشباع و غیراشباع (میانگین \pm انحراف استاندارد) در شکم‌پای *N. textiles* در فصول مختلف در خلیج چابهار (۱۳۸۶)

اسید چرب	بهار	تابستان	پاییز	زمستان
۰:۱۴	۳/۳۳۲ \pm ۰/۳۳۶	۴/۴۶۹ \pm ۰/۳۴۲	۵/۵۷۸ \pm ۰/۵۹۲	۳/۳۰۳ \pm ۰/۱۳۶
Me-۱۳:۰	۲/۷۵۷ \pm ۰/۰۸۱	۲/۲۹۳ \pm ۰/۳۶۸	۱/۴۰۹ \pm ۰/۸۹۶	۳/۷۸۳ \pm ۰/۲۶۹
۱۵:۰	۱/۸۳۴ \pm ۰/۱۲۵	۲/۷۹۶ \pm ۰/۰۷۴	۲/۷۵۳ \pm ۲/۵۱۴	۱/۵۳۵ \pm ۰/۳۹۲
۱۶:۰	۳۸/۱۸۳ \pm ۲/۲۱۳	۴۱/۸۱۹ \pm ۰/۱۵۳	۲۷/۸۰۹ \pm ۱/۹۸۳	۲۸/۷۹۷ \pm ۴/۴۸۵
۱۷:۰	۲/۱۲۰ \pm ۰/۴۵۳	۲/۵۱۰ \pm ۰/۰۶۸	۶/۹۶۹ \pm ۱/۱۸۴	۲/۵۱۷ \pm ۰/۸۰۰
Me-۱۷:۰	۵/۵۰۳ \pm ۱/۷۲۴	۴/۶۷۹ \pm ۰/۸۴۴	۴/۱۵۴ \pm ۱/۱۶۲	۲/۹۱۱ \pm ۰/۱۶۷
۱۸:۰	۱۲/۱۹۶ \pm ۱/۲۲۸	۱۰/۵۴۴ \pm ۰/۰۷۵	۱۳/۱۸۰ \pm ۱/۳۹۴	۱۵/۱۱۲ \pm ۰/۷۲۲
۱۶:۱ n-۹	۲/۷۵۲ \pm ۱/۲۵۷	۲/۹۰۴ \pm ۰/۰۱۳	۲/۹۲۹ \pm ۰/۳۲۸	۱/۴۵۴ \pm ۰/۲۹۹
۱۸:۱ n-۹	۱۳/۱۵۰ \pm ۱/۱۷۳	۶/۳۷۱ \pm ۰/۵۱۱	۹/۳۸۲ \pm ۰/۴۷۴	۱۰/۵۳۵ \pm ۲/۴۹۸
۲۰:۱ n-۱۱	۴/۹۸۹ \pm ۰/۲۶۷	۹/۷۱۵ \pm ۰/۸۷۱	۴/۹۴۴ \pm ۰/۸۷۴	۸/۹۱۸ \pm ۱/۱۵۳
۱۸:۲ n-۶	۵/۷۷۵ \pm ۰/۸۴۹	۲/۰۵۹ \pm ۰/۳۶۰	۶/۱۴۸ \pm ۰/۷۸۸	۵/۴۳۰ \pm ۱/۰۰۷
۲۰:۴ n-۶	۴/۹۴۶ \pm ۰/۶۸۲	۶/۱۶۰ \pm ۱/۱۰۲	۷/۵۲۷ \pm ۰/۶۴۰	۹/۱۴۷ \pm ۲/۸۴۴
۲۰:۵ n-۳	۲/۴۶۳ \pm ۰/۹۳۴	۳/۶۸۰ \pm ۰/۸۹۹	۷/۲۱۸ \pm ۱/۲۲۰	۶/۵۵۷ \pm ۰/۸۱۱
TSFA*	۶۵/۹۱۵ \pm ۱۳/۱۸۱ ^a	۶۹/۱۱۰ \pm ۱۴/۳۶۹ ^a	۶۱/۸۵۰ \pm ۹/۱۹۶ ^a	۵۷/۹۶۰ \pm ۱۰/۱۶۶ ^a
TUSFA*	۳۴/۰۸۰ \pm ۳/۸۹۲ ^a	۳۰/۸۹۰ \pm ۲/۸۳۲ ^a	۳۸/۱۵۰ \pm ۲/۲۳۸ ^a	۴۲/۰۴۰ \pm ۳/۳۹۲ ^a
TSFA/ TUSFA*	۱/۹۳۴	۲/۲۳۷	۱/۶۲۱	۱/۳۷۹
n - \sqrt n - ۳	۴/۳۵۲	۲/۲۳۳	۱/۸۹۴	۲/۲۲۳

* TSFA = کل اسید چرب اشباع، TUSFA = کل اسید چرب غیر اشباع، TSFA/TUSFA = نسبت کل اسید چرب اشباع به کل اسید چرب غیر اشباع. حروف یکسان در هر ردیف نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار می‌باشد ($P > 0.05$).



نمودار ۱: رابطه بین درجه حرارت و اسید چرب اشباع و اسید چرب غیر اشباع در *N. textiles* ($P < 0.05$).

شناساگر حضور زئوپلانکتونهاست. اسیدهای ۰:۱۴، ۱:۱۶، ۲:۱۶ و ۵:۲۰ اسیدهای چرب اصلی دیاتومه‌ها و جلبکهای قرمز و قهوه‌ای هستند (Ackman et al., 1971) و ۱:۱۸، ۰:۱۶، ۴:۱۸ و ۶:۲۲ در داینوفلاژله‌ها غالبند و ۰:۱۷، ۰:۱۵ و ۷-۱۸n:۱ نیز مشخصه سلولهای باکتریایی است (Zhukova & Svetashev, 1986). با توجه به مطالب ذکر شده و وجود این اسید چرب‌های در *N. textiles* رژیم غذایی احتمالی این گونه شامل فیتوپلانکتون، زئوپلانکتون، باکتریها، دیاتومه‌ها، داینوفلاژله‌ها و جلبکهای قهوه‌ای و قرمز می‌باشد. نسبت ۳-n/۱۸n در این گونه، در تمام فصول سال بیشتر از یک بوده است. این یافته نشان می‌دهد که بر طبق آنچه قبلاً بعنوان شاخص کیفیت تغذیه‌ای گوشت (۱/۱ تا ۲) در گزارشهای پیشین تعریف شده است، *N. textiles* با توجه به محتوای چربی، دارای کیفیت بد از لحاظ کیفیت تغذیه‌ای در فصول مختلف سال می‌باشد.

منابع

نیکویان، ع؛ سواری، ا. و عطاران فریمان، گ.، ۱۳۷۷. بررسی تنوع دوکفه‌ای‌ها در خلیج چابهار. مجله علمی شیلات ایران، سال هفتم، بهار ۱۳۷۳، صفحات ۹۵ تا ۱۰۶.
حسین‌زاده صحافی، ه.، ۱۳۷۹. اطلس نرم‌تنان خلیج فارس، مؤسسه تحقیقات شیلات ایران، مرکز تحقیقات شیلاتی دریای عمان. ۲۴۸ صفحه.

Ackman R.G., Hooper S.N. and Kep J., 1971. The distribution of saturated and isoprenoid fatty acids in the lipids of three species of mollusks *Littorina littorea*, *Crassostrea virginica* and *Venus mercenaria*. Comparative Biochemistry Physiology B, 39:579-587.

Feuntes A., Fernandez Segovia I., Escriche I. and Serra J.A., 2009. Comparison of physico-chemical parameters and composition of mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lmk) from different Spanish origins. Food Chemistry, 112:295-302.

در دریای عمان جریانهای آب با تغییر جهت باد، تغییر می‌کند. بررسی‌ها نشان می‌دهد از اردیبهشت تا شهریور یعنی در هنگام وزش بادهای موسمی جنوب غربی، آب به داخل دریای عمان در جهتی بین شمال و غرب جریان دارد که بعضی مواقع در خلاف جهت به طرف عمان نیز حرکت می‌کند. همین طور جریان دیگری از آب، از ماه آبان تا اسفند یعنی زمان بادهای موسمی شمال شرقی از عمان به سمت بیرون جریان می‌یابد. در این مناطق که جزو مناطق پرتولید است همیشه فراجوشی‌هایی در طول خط ساحلی داریم که موجب شکوفایی ذخایر آبزیان می‌شود. خواص بیولوژیکی اکوسیستم دریای عمان بطور عمده تحت تاثیر بادهای مانسونی (شمال شرقی) در طول زمستان و جنوب غربی در طول تابستان است. بنابراین به نظر می‌رسد که عدم تغییر اسید چرب در این گونه در فصول مختلف بدلیل حاصلخیزی زیاد این منطقه در فصول مختلف می‌باشد. Sanina و همکاران (۲۰۰۲) رفتار دمایی فسفولیپیدها را در بی‌مهرگان دریایی بررسی نموده و دریافتند پس از یک دوره افزایش دما، کاهش در ضریب اشباع‌زدایی و افزایش در نسبت اسیدهای چرب اشباع به غیراشباع دیده شده است. همچنین تغییراتی در ترکیب اسیدهای چرب بطور خاص در اسیدهای چرب غیراشباع مشاهده شد، بطوریکه با افزایش دما نسبت ایکوزاپنتانویک و دوکوزا هگزانویک کاهش و در عوض مقدار آراشیدونیک اسید افزایش یافت و این موضوع با توجه به اینکه دمای بالا روی سیالیت فسفولیپیدهای غشایی تاثیر دارد قابل توجه است زیرا امکان دارد که تغییر در حالت فیزیکی، فسفولیپیدها را بعنوان سازندگان فسفولیپیدهای سلولی در دسترس قرار داده و در نتیجه آزادسازی اسیدهای چرب در پاسخ به تغییرات دمایی ایجاد می‌شود (Samples, 1999). در این مطالعه رابطه معکوسی بین میزان اسید چرب غیراشباع با درجه حرارت مشاهده شد که با نتایج دیگران در این زمینه همخوانی دارد. علت وجود دامنه گسترده‌ای از اسیدهای چرب در آبزیان تنوع غذایی آنهاست که حاوی مجموعه زیادی از اسیدهای چرب است. مثلا گونه‌های پلاژیک از جمعیت‌های پلانکتونی شناور تغذیه می‌کنند که دارای غلظت‌های قابل توجهی از EPA و DHA است، یا وجود اسیدهای ۱:۲۰ و ۱:۲۲ به دلیل اکسایش الکل‌های بلند زنجیر در استرهای کوپه‌پودا است. حضورمقادیر بالای C20 و C22 نیز

- Fried B., Rao, K.S., Sherma J. and Huffman J.E., 1993.** Fatty acid composition of *Goniobasis virginica*, *Physa* sp. and *Viviparous malleatus* (Mollusca: Gastropoda) from Lake Musconetcong. New Jersey. Journal of Biochemical Systematic and Ecology, 21:809-812.
- Galap C., Netchitailo P., Leboulenger F. and Grillot J.P., 1999.** Variations of fatty acid contents in selected tissues of the female dog cockle (*Glycymeris glycymeris* L., Mollusca, Bivalvia) during the annual cycle, Comparative Biochemistry and Physiology Part A 122:241-254.
- Johns R.B., Nichols P.D. and Perry G.J., 1972.** Fatty acid composition of ten marine algae from Australian waters. Phytology Chemistry, 18:799-802.
- McClintock J.B. and Baker B.J., 2001.** Marine Chemical Ecology, 584P.
- Morrison W.R. and Smith, L.M., 1964.** Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol. Journal of Lipid Research, 5:600-608.
- Phleger C.F., Nelson M.M. and Perry N., 2001.** Inter-annual variations in the lipids of the Antarctic pteropods *Clione limacina* and *Clio pyramidata*. Comparative Biochemistry and Physiology B, 128:553-564.
- Samples B.L. and Pool G.L., 1999.** Polyunsaturated fatty acids enhance the heat induced stress response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) leukocytes. Comparative Biochemistry and Physiology B, 123(4):389-97.
- Sanina N.M. and Kostetsky E.Y., 2002.** Thermotropic behavior of major phospholipids from marine invertebrates: changes with warm-acclimation and seasonal acclimatization. Comparative Biochemistry and Physiology B, 133:143-153.
- Zhukova N.V. and Svetashev V.I., 1986.** Non-methylene-interrupted dienoic fatty acids in molluscs from the Sea of Japan. Comparative Biochemistry and Physiology B, 83:643-646.

Seasonal changes of fatty acids in *Nerita textiles* on intertidal area of Chabahar Bay (Oman Sea)

Sajjadi N.*⁽¹⁾; Eghtesadi P.⁽²⁾ and Darvish Bastami K.⁽³⁾

nooshinsadjadi@yahoo.com

1-Marine Science and Technology Faculty, Islamic Azad University, No. 14, Shahid Falahi Ave.,
Tehran, Iran

2,3- Iranian National Institute for Oceanography (INCO), P.O.Box: 13389-14118 Tehran, Iran

Received: September 2010

Accepted: July 2011

Keywords: *Nerita textiles*, Fatty acids, Gulf of Chabahar, Oman Sea

Abstract

The aim of this research was to identify and isolate the fatty acids composition of *Nerita textiles* in intertidal area of Chabahar Bay, and also to explore the seasonal changes of fatty acid content in *Nerita textiles*. GC/MS resulted thirteen fatty acids, that saturated fatty acids (SFA) of palmitic acid (16:0) was the most abundant category of fatty acid obtained in total lipids. There were no significant differences in total saturated fatty acids between different seasons. No significant differences were also observed in total unsaturated fatty acids between different seasons. The majority of unsaturated fatty acid reached their maximum levels during winter, while saturated acids reached their maximum levels in summer. Saturated acids were more than unsaturated fatty acids. Statistical analysis showed the positive significant correlation between temperature and saturated fatty acids and a negative significant correlation between temperature and unsaturated fatty acids. Biomarker fatty acids revealed that diet of *Nerita textiles* probably includes phytoplankton, zooplankton, detritus, bacteria, diatoms, red and brown algae. The results showed that meat quality indicated n-6/n-3 ratio in the range of 1.9 to 4.3.

*Corresponding author