Algae
Volume 17(2): 83-87, 2002

인제한에 따른 *Scenedesmus quadricauda*의 광합성 특성 및 질소, 인 함량 변화

안치용 · 김희식 · 윤병대 · 오희목*

(한국생명공학연구원 생물공정연구실)

Photosynthetic Characteristics and Cell Quota of Nitrogen and Phosphorus in *Scenedesmus quadricauda* under P Limitation

Chi-Yong Ahn, Hee-Sik Kim, Byung-Dae Yoon and Hee-Mock Oh*

Biomolecular Process Engineering Laboratory, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Aeun-dong, Yusong-gu, Taejon 305-333, Korea

Photosynthetic parameters of *Scenedesmus quadricauda*, such as the maximum photosynthetic rate (P_{max}), photosynthetic efficiency (α) and the initial saturation intensity of irradiance for photosynthesis (I_k), were obtained using photosynthesis-irradiance (P-I) curve in a phosphorus-limited chemostat. *S. quadricauda* exhibited no photoinhibition until at 200 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$. P_{max} ($r = 0.963$, $P = 0.002$) and I_k ($r = 0.904$, $P = 0.013$) showed linear relationships with growth rate. Chlorophyll-*a* concentration and cell dry weight decreased at higher growth rates, but chlorophyll-*a* content per cell dry weight increased. The increase in photosynthetic rates at higher growth rates was due to the increase of P_{max} and I_k, which was caused mainly by the increase in the absolute amount of chlorophyll-*a* rather than the increased photosynthetic efficiency of individual chlorophyll-*a*. The α did not show a significant relationship with growth rate ($r = 0.714$, $P = 0.111$). The cell quota of carbon ($r = 0.554$, $P = 0.254$) was not correlated with growth rate, but cell quota of nitrogen ($r = 0.818$, $P = 0.047$) and phosphorus ($r = 0.855$, $P = 0.030$) exhibited linear correlations with growth rate.

Key Words: cell quota, chemostat, photosynthesis, P-I curve, P limitation, *Scenedesmus quadricauda*

서 론

물의 깊이, 물의 흐름 또는 부력의 조절에 의하여 미세조류가 받는 빛의 세기와 양은 매우 다양하다. 일부는 강한 빛에 노출된 환경에서 생존하며, 일부는 약한 빛을 이용하여 살아가고 있다. 이와 같이 서로 다른 광 조건에서 미세조류가 살아간다는 것은, 강한 빛에 의한 스트레스를 최소화하거나 제한된 빛을 최대한 이용하기 위해 그들의 광합성 기관을 각 환경에 맞도록 적응시키며 살아가고 있다는 것을 의미한다.

광도가 증가함에 따라 광합성률은 증가하고 일정한계 이상이 되면 오히려 광합성을 저해하는 것으로 알려져 있다. 따라서, 다양한 광합성-광도 곡선(photosynthesis-irradiance, P-I curve)의 매개변수(parameters)를 통해 각 종마다 또는 각 환경 조건하에서의 광합성 특성을 파악할 수 있다. P-I curve를 표현하는 수식은 매우 다양하게 개발되어 있는데, 이 중에는 최대 광합성률(P_{max}), 광합성 효율(α), 광포화시의 광도(I_k)를 이용한 식이 일반적으로 가장 널리 쓰이고 있다(Kirk 1994).

P_{max}는 광포화 상태의 최대광합성률로, α는 빛을 필요로 하는 반응의 한계로, 그리고 I_k는 서로 다른 광 수준에의 적응 정도를 나타내는 척도로 생각되어져 왔다. P_{max}와 α는 온도(Coles and Jones 2000), 영양염류(Welschmeyer and Lorenzen 1981), 과거의 광조건(Payri *et al.* 2001), 계절(Fahnenstiel *et al.* 1989) 등에 따라 변화한다. 또한, α와 I_k는 광적응도의 좋은 지표 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Kim and Kim 1989). 담수 부착 규조류의 경우에

*Corresponding author (heemock@mail.kribb.re.kr)

Table 1. Photosynthetic parameters of *Scenedesmus quadricauda* at various growth rates (for all data $P < 0.001$)

Growth rate (d^{-1})	I_k ($\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$)	P_{max} ($mgC\ gDW^{-1} \cdot h^{-1}$)	α ($mgC\ gDW^{-1} \cdot h^{-1} (\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1})^{-1}$)	r^2
0.18	50.3	3.3	0.066	0.785
0.40	48.3	5.9	0.122	0.970
0.47	50.0	8.1	0.162	0.930
0.88	64.9	12.7	0.196	0.966
1.00	151.5	23.6	0.155	0.967
1.43	212.8	36.4	0.171	0.968

는 광도에 따른 생장의 차이가 종의 천이에 영향을 미치는 것으로도 알려져 있다(Tuji 2000).

본 연구는 담수 수계에서 널리 분포하는 미세조류인 *Scenedesmus quadricauda*를 대상으로 인제한(P limitation) chemostat 배양을 실시하여 광합성 특성을 조사하였다. 즉, *S. quadricauda*의 생장률 변화에 따른 P_{max}, α, I_k와 질소, 인의 cell quota 그리고 건조중량, 엽록소-*a*의 변화를 알아보고, 이러한 변화가 나타내는 생리적, 생태적 의미를 고찰하였다.

재료 및 방법

인제한 조건에서 무균상태의 *Scenedesmus quadricauda*를 chemostat 배양하였다. 인제한을 위해 인 농도를 2 μM로 낮춘 GL 배지(Guillard and Lorenzen 1972)를 사용하였으며, 희석률(dilution rate)은 0.18부터 1.43 d^{-1}까지 6가지 조건으로 조정하였다. Chemostat은 800 ml의 working volume으로 운영하였고, 배양조건은 온도 25°C, pH 7.6, 평균 광도 71 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$였으며, 암주기는 없었다. Chemostat 배양이 정상상태(steady state)에 도달하면, 배양액의 일부는 광합성, 세포량, 세포구성 성분을 분석하는데 사용하고, 나머지는 원심분리로 세포만을 수거하여 -20°C에 보관하고 이후에 C, N, P 분석에 사용하였다.

광합성률 측정은 ^{14}C 측정법(Wetzel and Likens 1991)을 이용하였으며, 5에서 200 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$까지의 10가지 광도에서 30분간 실시하였다. 광합성량은 30분간 선형적으로 증가하였다. P_{max}, α, I_k는 Webb *et al.* (1974)의 P-I 곡선식(1)을 이용하여 구하였다. 이 식은 광저해(photoinhibition)까지 고려한 Platt *et al.* (1980)의 식에서 광저해 계수(photoinhibition coefficient, β)의 값을 0으로 한 것과 동일하다.

$$P = P_{max}(1 - e^{-\alpha I / P_{max}}) \quad (1)$$

여기서 P는 광합성률, I는 광도를 나타낸다.

I_k는 아래의 식(2)으로 구할 수 있다.

$$I_k = \frac{P_{max}}{\alpha} \quad (2)$$

세포내 탄소의 양은 TOC 분석기(Shimadzu, 5000A)를 사용하여 측정하였다. 총질소와 총인은 persulfate 산화를 통해 각각 질산염(D'Elia *et al.* 1977)과 정인산염(Menzel and Corwin 1965)으로 완전히 산화시킨 후, 질산염은 Szechrome법(Wynne and Rhee 1986)으로 정인산염은 phosphomolybdate법(Murphy and Riley 1962)을 사용하여 각각 측정하였다.

엽록소-*a*는 chloroform-methanol 혼합액(2:1, v/v)으로 추출한 후 형광분광분석기(Turner, 450)를 사용하여 측정하였다(Wood 1985). 세포 건조중량은 Whatman GF/C filter로 여과하여 105°C에서 약 10시간 건조시킨 후 측정하였다.

결 과

모든 생장률에서 광합성률은 광도의 증가에 따라 증가하였으며, 약 100 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$에서 포화상태에 이르렀다. 본 실험에 사용한 최고 광도인 200 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$까지 뚜렷한 광저해를 보이지 않았기 때문에 Webb *et al.* (1974)의 P-I 곡선식을 이용하여 P_{max}, α, I_k 값을 구하였다.

Table 1은 생장률 0.18부터 1.43 d^{-1}까지 P_{max}, α, I_k 값들을 보여준다. 모두가 상기의 P-I 곡선식으로 잘 표현되었다($P < 0.001$). 건조중량 기준의 P_{max} ($r = 0.963$, $P = 0.002$)와 I_k ($r = 0.904$, $P = 0.013$)는 생장률과 높은 상관관계를 나타내었다. α 또한 생장률과 함께 증가하는 경향을 보였으나, 유의한 관계는 없는 것으로 나타났다($r = 0.714$, $P = 0.111$). 즉, α는 생장률에 따라 큰 차이가 없으나, 생장률이 높아짐에 따라 광포화에 필요한 광도와 최대 광합성률이 증가하는 것으로 보인다. 이것은 P_{max}와 I_k가 높은 상관관계를 나타내며 동시에 증가하는 것으로도 알 수 있

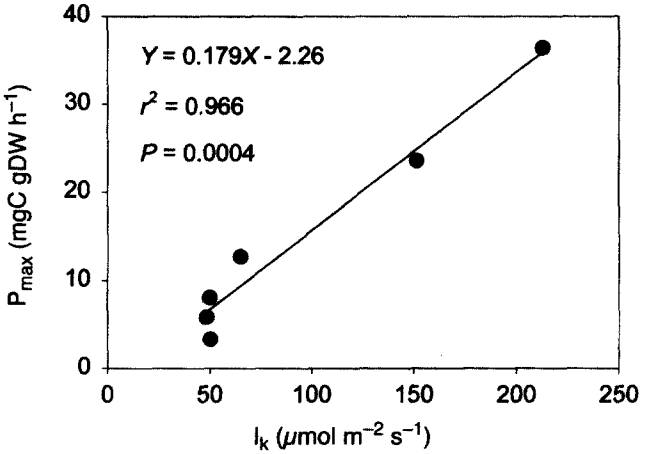

Fig. 1. Relationship between P_{max} and I_k of *Scenedesmus quadricauda* cultured in a P-limited chemostat.

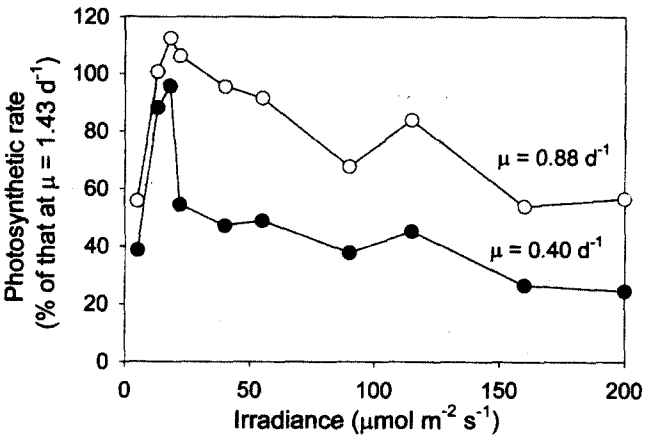

Fig. 2. Photosynthetic rate at growth rates of 0.40 and 0.88 d^{-1} relative to that of 1.43 d^{-1}. *Scenedesmus quadricauda* was cultured in a P-limited chemostat.

Table 2. Chlorophyll-*a*, dry weight and cell quota of *Scenedesmus quadricauda* at various growth rates

Growth rate (d^{-1})	Chl-*a* ($\mu g \cdot L^{-1}$)	Dry weight ($mg \cdot L^{-1}$)	Chl-*a*/DW ($g \cdot g^{-1}$)	Q_C (mmol C·gDW^{-1})	Q_N (mmol N·gDW^{-1})	Q_P (mmol P·gDW^{-1})
0.18	497	123	0.0041	0.028	0.71	0.025
0.40	521	47.5	0.0110	0.047	2.17	0.088
0.47	469	57.5	0.0082	0.022	1.91	0.058
1.00	206	21.0	0.0098	0.021	1.71	0.249
1.24	266	10.0	0.0266	0.040	3.15	0.351
1.43	151	10.0	0.0151	0.073	5.74	0.200

다(Fig. 1). 여기서 구한 회귀직선의 기울기 0.179 mgC gDW^{-1}·h^{-1}(μmol·m^{-2}·s^{-1})$^{-1}$는 α의 평균인 0.145 ± 0.046 mgC gDW^{-1}·h^{-1}(μmol·m^{-2}·s^{-1})$^{-1}$와 유의한 차이를 보이지 않았다($T = 1.81$, $P = 0.070$). 그러나 엽록소-*a* 기준의 P_{max}와 I_k는 건조중량 기준에 비해서 생장률에 따른 증가가 뚜렷하게 나타나지 않았다. 즉, 생장이 빨라진다고 해서 단위 엽록소-*a*당 광합성량이 증가하는 것은 아니라고 볼 수 있다.

Fig. 2는 생장률 1.43 d^{-1}일 때의 광합성률에 대한 상대적 광합성률을 나타내고 있다. 생장률이 높아질수록 상대적 광합성률이 증가하는 것을 알 수 있다. 일부 구간의 낮은 광도에서는 광도의 증가가 상대적 광합성률을 증가 시키지만, 대부분의 구간에서는 광도가 증가할수록 상대적 광합성률은 감소하였다. 여기서 생장률이 높다는 것은 상대적으로 인제한 정도가 낮다는 것으로 해석할 수도 있으므로, 인제한이 약할수록 상대적 광합성률은 증가한다고 볼 수 있다.

생장률이 증가할수록 엽록소-*a* 농도와 건조중량은 감소하였다(Table 2). 그러나, 건조중량 당 엽록소-*a*의 함량은 통계학적으로 유의하지는 않았지만 증가하는 추세를 나타내었다($r = 0.737$, $P = 0.095$). 즉, 생장률이 증가할수록 건조중량 당 엽록소-*a*의 함량은 증가하며, 단위 엽록소-*a* 당 광합성량의 증가보다는 건조중량 당 엽록소-*a*의 양이 증가하기 때문에 건조중량 기준의 P_{max}와 I_k가 생장률에 따라 증가하는 것으로 볼 수 있다.

생장률이 높아짐에 따라 탄소($r = 0.554$, $P = 0.254$)의 cell quota는 일관된 증감 추세를 나타내지 않았지만, 질소($r = 0.818$, $P = 0.047$)와 인($r = 0.855$, $P = 0.030$)의 cell quota는 양의 상관관계를 나타내었다(Table 2). 이것은 높은 생장률을 유지하기 위해서는 많은 양의 질소와 인을 축적하는 것이 중요하다는 것을 나타내고 있으며, 실험조건이 인제한의 chemostat이었기 때문에 인의 상관도가 상대적으로 높은 것으로 볼 수 있다(Fig. 3).

고 찰

*Scenedesmus quadricauda*의 광합성-광도 관계는 Webb *et al.*(1974)의 P-I 곡선식에 의해 매우 잘 표현되었으며, 모든 생장률에서 광저해 효과는 나타나지 않았다. 실험조건과 유사한 실험실내 배양 환경조건에 적응한 *S. quadri-*

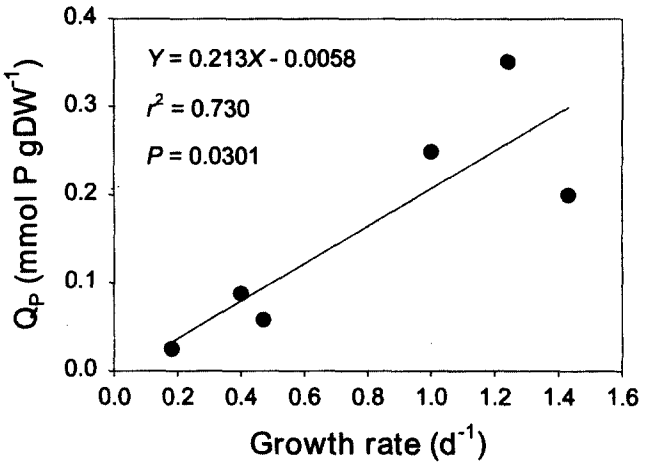

Fig. 3. Relationship between cell quota of phosphorus and growth rate of *Scenedesmus quadricauda* cultured in a P-limited chemostat.

*cauda*가 광저해를 나타내지 않았거나, 실험에 사용한 최대 광도가 200 μmol·m^{-2}·s^{-1}으로 너무 낮았기 때문으로 생각된다. 자연계에서도 봄철에는 광저해 효과를 나타내다가, 여름철 높은 광도에 적응할 경우에는 광저해 효과를 나타내지 않는 것으로 알려져 있다(Fahnenstiel *et al.* 1989; Kim and Kim 1989).

광합성효율 즉, α(r = 0.714, P = 0.111)만이 통계학적으로 유의하지 못하였을 뿐 P_{max}(r = 0.963, P = 0.002)와 I_k(r = 0.904, P = 0.013)는 생장률과 유의한 비례관계를 보였다. 즉, 생장이 빠르고 인제한 정도가 약할수록 광합성률은 높아 지는 것으로 판단된다. 그런데 $\alpha \times I_k = P_{max}$의 관계가 있기 때문에 세 변수가 모두 동시에 선형적으로 증가할 수는 없다. 따라서, 통계학적으로 의미가 있었던 P_{max}와 I_k가 생장률의 증가와 비례관계에 있다고 가정하면, α는 생장률과 관계없이 일정해야 한다. *Frustulia vulgaris*와 *Ankistrodesmus convolutus*에서도 생장률에 따라 P_{max}와 I_k는 증가하였으나, α는 생장률에 관계없이 일정하였다(Oh *et al.* 1991a). P_{max}와 I_k가 매우 높은 수준의 상관관계를 보이는 것으로 보아 이러한 추론은 설득력이 있는 것으로 보인다(Fig. 1). 그러나 만약 세 변수가 생장률과 함께 증가한다면, P_{max}, α, I_k는 생장률과 선형적 비례관계가 아닌 다른 식의 관계에 있음을 의미한다고 할 수 있다. P_{max}와 I_k를 지수함수로 표현한 경우, 선형함수에 비해 상관계수가 증가한다(r = 0.970, r = 0.986)는 사실은 이러한 추론을 뒷받침 한다. *Microcystis aeruginosa*의 경우에는 P_{max}, α, I_k 모두가 생장률과 함께 동시에 증가하는 것으로 보고되었다(Oh *et al.* 1991a). 생장과 광합성은 언제나 직접적으로 연관되어 있지는 않지만(Rhee 1982), *M. aeruginosa*, *Merismopedia tenuissima*, *Oscillatoria* sp., *Aulacoseira granulata*, *A. convolutus*, *F. vulgaris*에서 P_{max}와 생장률은 높은 비례관계에 있었다(Oh *et al.* 1991a; Coles and Jones 2000). 또한, *Anabaena* sp.는 P_{max}와 α가 생장률에 따라 증가하기는 하지만, 뚜렷한 상관관계를 보이지는 않았으며, I_k는 생장률에 관계없이 일정하였다(Oh *et al.* 1991b). 즉, 모든 미세조류에 공통되는 광합성 변수들의 특성은 존재하지 않았으며, 종마다 서로 다른 특성을 보여주었다. 본 실험에 사용한 *S. quadricauda*는 남조류인 *M. aeruginosa*보다는 녹조류인 *A. convolutus*, 규조류인 *F. vulgaris*와 유사한 광합성 특성을 나타내었다.

여러 가지 광도의 조건하에서 인제한의 광합성률에 대한 효과를 보기 위해 본 실험에 사용한 최대 생장률인 1.43 d^{-1}에서의 광합성률에 대한, 생장률 0.40, 0.88 d^{-1}에서의 광합성률의 상대적 비율을 구하였다(Fig. 2). 낮은 광도에서는 급격히 광합성률의 상대적 비율이 증가하지만, 점차 광도가 증가함에 따라 감소하는 것을 볼 수 있다. Oh *et al.* (1991a)에 의하면, 남조류 *M. aeruginosa*는 광도가 증가함에 따라 광합성률의 비율이 증가하였으며, 녹조류 *A. convolutus*와 규조류 *F. vulgaris*는 이와 반대로 광도 증가에 따라 감소하는 경향을 보였다. *S. quadricauda*는 생장률이 증가할수록 즉, 인제한 정도가 약할수록 상대적 비율도 높아졌다. 그리고 동일한 인제한 조건에서는 광도가 낮을수록 상대적 비율이 높아졌다. 이것은 생장률이 증가할수록 P_{max}가 증가함을 의미하며, 생장률이 증가할수록 높은 광도에서의 광합성률의 상대적 비율의 증가가 낮은 광도에서의 증가보다 더 크다는 것을 의미한다. 또한, 이것은 α가 P_{max}와 같은 비율로 증가하지 못함을 나타낸다. 실제로 *A. convolutus*, *F. vulgaris*, *M. aeruginosa* 세 종의 P_{max}는 α에 비해 인제한에 더욱 민감한 것으로 나타났다(Oh *et al.* 1991a). 그리고 Richardson *et al.* (1983)에 의하면 P_{max}는 α보다 환경조건의 변화에 더욱 신속하게 적응하는 것으로 나타났다. *S. quadricauda*도 이들과 동일한 경향을 보여 P_{max}가 다른 광합성 변수들에 비해 인제한에 더욱 민감하게 반응하였다.

희석률을 높일수록 chemostat에서의 세포농도는 감소하기 때문에 엽록소-*a* 농도나 건조중량의 농도는 감소하였다(Table 2). 그러나 건조중량 당 엽록소-*a*의 농도는 증가하였다. 엽록소-*a* 기준의 P_{max}(r = 0.897, P = 0.015)와 α(r = 0.245, P = 0.640)보다 건조중량 기준의 P_{max}(r = 0.963, P = 0.002)와 α(r = 0.714, P = 0.111)가 생장률과 더 높은 상관관계를 나타내는 것으로 보아, 단위 엽록소-*a* 당 광합성률이 증가하는 것보다는 엽록소-*a*의 절대량이 많아지기 때문에 높은 생장률에서 광합성률도 증가하는 것으로 판단된다.

탄소의 cell quota는 가장 높은 생장률에서 가장 높은

값을 나타냈지만, 유의한 상관관계는 없었다($r = 0.554$, $P = 0.254$). 반면, 질소($r = 0.818$, $P = 0.047$)와 인($r = 0.855$, $P = 0.030$)의 cell quota는 생장률과 매우 높은 상관도를 나타내었다. 이것은 질소와 인이 미세조류 생장에 주요한 제한인자로 작용하며, cell quota에 따라 생장속도가 결정된다는 이론과도 부합되는 결과이다. 인제한 조건의 chemostat이었기 때문에 인과의 상관 정도가 다른 영양염류에 비해 상대적으로 높은 것으로 생각된다.

자연계는 여러 조류종이 혼합된 상태로, 광합성 특성을 나타내는 변수들은 지역과 계절에 따라 양 또는 음의 상관을 보이거나, 별 상관이 없는 등 매우 다양한 양상을 나타낸다(Kim and Kim 1989; 조 등 1995; 한 등 1999). 따라서, 자연계에서 일어나는 광합성 현상을 보다 정확하게 이해하기 위해서는 수계에서 우점하는 조류종에 대하여 개별적인 광합성 특성 연구가 후속되어야 할 것이다.

참고문헌

조경제, 신재기, 이진애, 문병용. 1995. 도시근교 하천 조만강의 식물플랑크톤 일생산량 추정. 한국육수학회지 **28:** 101-110.

한명수, 이동석, 유재근, 박용철, 유광일. 1999. 팔당호의 생태학적 연구 3. 식물플랑크톤의 일차생산력과 광합성 모델 parameters. 한국육수학회지 **32:** 8-15.

Coles J.F. and Jones R.C. 2000. Effect of temperature on photosynthesis-light response and growth of four phytoplankton species isolated from a tidal freshwater river. *J. Phycol.* **36:** 7-16.

D' Elia C.F., Steudler P.A. and Corwin N. 1977. Determination of total nitrogen in aqueous samples using persulfate digestion. *Limnol. Oceanogr.* **22:** 760-764.

Fahnenstiel G.L., Chandler J.F., Carrick H.J. and Scavia D. 1989. Photosynthetic characteristics of phytoplankton communities in Lakes Huron and Michigan: P-I parameters and end-products. *J. Great Lakes Res.* **15:** 394-407.

Guillard R.R.L. and Lorenzen C.J. 1972. Yellow-green algae with chlorophyllide *c*. *J. Phycol.* **8:** 10-14.

Kim B.-C. and Kim D.-S. 1989. Primary productivity measurement by photosynthesis-irradiance model method in Lake Soyang and the behavior of model parameters. *Kor. J. Limnol.* **22:** 167-177.

Kirk J.T. 1994. *Light and Photosynthesis in Aquatic Ecosystems.* 2nd ed. Cambridge University Press, Cambridge.

Menzel D.W. and Corwin N. 1965. The measurement of total phosphorus in seawater based on the liberation of organically bound fraction of persulfate oxidation. *Limnol. Oceanogr.* **10:** 280-282.

Murphy J. and Riley J. 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Anal. Chim. Acta.* **27:** 31-36.

Oh H.-M., Maeng J. and Rhee G-Y. 1991a. Effects of P limitation on carbon fixation in three freshwater algae. *Kor. J. Phycol.* **6:** 83-89.

Oh H.-M., Maeng J. and Rhee G-Y. 1991b. Nitrogen and carbon fixation by *Anabaena* sp. isolated from a rice paddy and grown under P and light limitations. *J. Appl. Phycol.* **3:** 335-343.

Payri C.E., Maritorena S., Bizeau C. and Rodière M. 2001. Photoacclimation in the tropical coralline alga *Hydrolithon onkodes* (Rhodophyta, Corallinaceae) from a French Polynesian reef. *J. Phycol.* **37:** 223-234.

Platt T., Gallegos C.L. and Harrison W.G. 1980. Photoinhibition of photosynthesis in natural assemblages of marine phytoplankton. *J. Mar. Res.* **38:** 687-702.

Rhee G-Y. 1982. Effects of environmental factors and their interactions on phytoplankton growth. *Adv. Microb. Ecol.* **6:** 33-74.

Richardson K.J., Beardall J. and Raven J.A. 1983. Adaptation of unicellular algae to irradiance: an analysis of strategies. *New Phytol.* **93:** 157-191.

Tuji A. 2000. The effect of irradiance on the growth of different forms of freshwater diatoms: implications for succession in attached diatom communities. *J. Phycol.* **36:** 659-661.

Webb W.L., Newton M. and Starr D. 1974. Carbon dioxide exchange of *Alnus rubra*: A mathematical model. *Oecologia* **17:** 281-291.

Welschmeyer N.A. and Lorenzen C.J. 1981. Chlorophyll-specific photosynthesis and quantum efficiency at subsaturating light intensities. *J. Phycol.* **17:** 283-293.

Wetzel R.G. and Likens G.E. 1991. *Limnological Analyses.* 2nd ed. Springer-Verlag, New York.

Wood L.W. 1985. Chloroform-methanol extraction of chlorophyll-*a*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **42:** 38-43.

Wynne D. and Rhee G-Y. 1986. Effects of light intensity and quality on the relative N and P requirement (the optimum N:P ratio) of marine planktonic algae. *J. Plankton Res.* **8:** 91-103.

Accepted 25 May 2002