

자연산 및 양식산 볼락, *Sebastes inermis*의 장내세균총 및 장내세균의 약제내성 비교

김석렬 · 김정호* · 정성주 · 오명주[†]

전남대학교 식품·수산생명의학부, *강릉대학교 해양생명공학부

Bacterial flora and antibiotics resistance of intestinal bacteria in the wild and cultured black rockfish *Sebastes inermis*

Seok-Ryel Kim, Jeong-Ho Kim*, Sung-Ju Jung and Myung-Joo Oh[†]

Division of Food Science and Aqualife Medicine, Chonnam National University, Yeosu 550-749, Republic of Korea

*Faculty of Marine Bioscience & Technology, Kangnung National University, Kangnung, 210-702, Republic of Korea

In this study, one hundred strains of bacterial flora were isolated from the intestine of cultured and wild black rockfish *Sebastes inermis* collected in Yeosu and examined for drug resistance to 9 antibiotics. From cultured fish, the isolated bacteria were *Photobacterium* group (26 strains) and *Acinetobacter* group (18 strains) of Gram-negative, and unidentified marine sediment bacterium (6 strains) of Gram-positive. From wild fish, *Photobacterium* group (18 strains), *Acinetobacter* group (12 strains) and *Shewanella* group (5 strains) of Gram-negative and *Bacillus* group (8 strains), *Staphylococcus* group (4 strains), and unidentified marine sediment bacterium (3 strains) of Gram-positive. Intestine flora of wild black rockfish was more diverse than that of one cultured. The drugs tested were tetracyclines (oxytetracycline), aminoglycosides (gentamicin), macrolides (erythromycin) and quinolones (flumequine, oxolinic acid, norfloxacin, ofloxacin, enrofloxacin and ciprofloxacin). Sensitivity to all seven antibiotics except oxytetracycline and oxolinic acid was higher in bacteria from wild fish than from cultured ones, although wild isolates were more resistant than control strain *Escherichia coli* ATCC9637. This suggests that use of antibiotics in the fish farm might have some resistance in intestinal flora of wild fish.

Key words: Black rockfish, Intestine, Flora, Antibiotics

서 론

볼락, *Sebastes inermis*는 양볼락과 (Family Scorpaenidae), 볼락아과 (Subfamily Sebastinae), 볼락속 (Genus)에 속하는 난태생 (ovoviviparous) 경골어류로서 11~12월에 0.4~0.5cm의 자어를 산출한다. 몸은 회갈색의 짧은 타원형 몸체이며, 입은 크고, 아래턱은 위턱보다 길다. 우리나라의 서남해 및 일본 연안의 해조가 무성한 천해 암반해역에 많이 분포하며 (Chyung, 1986;

Choi et al., 2005), 연안의 천해생물군집에서 중요한 생태지위를 차지하는 종으로 알려져 있다 (Hatanaka and Iizuka, 1962). 일반적으로 남해안 연안에서 이루어지고 있는 볼락의 양식은 자연산 치어를 채집하여 가두리에서 성어까지 육성시키는 방식으로 이루어지고 있고 산업적 관심이 집중되고 있다.

볼락은 출산에서부터 유어, 성어까지 한 살이를 연안에서 보내는 연안 정착성 어류로서 계절에 따른 수온변화에도 강하여 최근 우리나라

[†]Corresponding Author : Myung-Joo Oh, Tel: 061-659-3173, Fax: 061-659-3173, E-mail. ohmj@chonnam.ac.kr

의 해양목장화 관리대상 어종으로도 관심이 고조되고 있다 (KORDI, 1997). 이러한 볼락은 양식 대상 종으로서 상품성이 높고, 남해안 연안에서 연중 채집 가능한 정착성 어종으로서 자원 조성용 어종으로서도 유망하나, 각종 오염물질의 연안유입, 치어의 무분별한 남획 등으로 그 자원량이 급격하게 줄어들어 종묘생산과 방류를 통한 자원증대 연구가 진행 중에 있는 어종이다 (Kang et al., 2003; Choi et al., 2005; Gwak and Park, 2006).

지금까지의 볼락의 국내외 연구로서는 자연산 볼락의 생물학적 특성 및 교미 습성 규명 (Shinomiya and Ezaki, 1991), 생식과 체내자어 발달 (Lee and Kim, 1992), 초기생활사 (Kim et al., 1993; Kim and Han, 1993), 저연령군의 식성 (Huh and Kwak, 1998), 양식산 볼락의 성장 특성 (Choi et al., 2005), 자·치어의 성장에 따른 소화효소 활성 변화 (Gwak and Park, 2006) 등이 연구되어 있으나, 생물학적인 특성 중의 하나인 장내세균에 대한 연구는 보고되어 있지 않다. 특히, 자연산과 양식산의 장내세균을 비교분석한 보고는 거의 없는 실정이며, 연안 정착성 어종인 자연산 볼락과 양식산 볼락의 장내세균의 항생제 내성의 특성에 대한 연구 또한 거의 없다. 더욱이, 양식장을 포함한 연안생태계 내 서식어류의 장내세균의 비교, 장내세균의 약제에 대한 내성정도를 비교함으로써 연안수계의 항생제의 영향 등을 파악할 필요성이 있다고 생각된다.

본 연구에서는 전남 돌산도 연안에서 채집된 자연산 볼락과 양식산 볼락의 장내세균총의 분포와 이들 세균들의 약제 감수성에 대하여 조사하였다.

재료 및 방법

실험어

본 연구에서 장내세균의 분리를 위하여 사용한 자연산 볼락은 5월에서 6월까지 전남 돌산

군내리 연안에서 정치망으로 채집된 20마리를 사용하였고, 양식산 볼락은 전남 돌산 군내리 연안 가두리에서 사육되는 개체 20마리를 살아 있는 상태로 실험실에 운반하여 장내세균을 분리하여 실험에 사용하였다. 본 연구에 사용된 자연산 볼락은 평균체중 $126 \pm 13.1\text{g}$, 평균체장 $19.7 \pm 0.7\text{cm}$ 이었고, 양식산 볼락은 평균체중 $122 \pm 19.3\text{g}$ (106~156g), 평균체장 19.0cm (18.5~20.1cm)의 어체를 사용하였다.

장내세균 분리

볼락으로부터 장내세균의 분리를 위하여 볼락의 복부를 절개하여 위 이하부터 항문 위까지의 장을 적출하여, 9배의 phosphate buffered saline buffer (PBS)를 첨가하고, vortex mixer를 이용하여 장내세균이 PBS 용액에 잘 현탁되도록 하였다. 이와 같이 준비된 장내세균 부유액을 원액으로 하여 10배, 100배, 1,000배까지 PBS buffer로 희석하여 Marine broth (Difco, MI, USA)에 agar가 1.5% 첨가된 plate에 도말하여 세균을 분리하여 동정하였다.

균주 동정

양식 및 자연산 볼락의 장내에서 분리된 균주는 무작위로 각 군에서 50균주씩 선별하여 그람 염색과 16S rDNA 염기를 분석하여 균을 동정하였다. 간단히 설명하면, 분리된 균주를 Marine broth (MB), 25°C에서 18시간 동안 진탕배양하여 상법에 따라 genomic DNA를 분리하여 PCR 반응에 사용하였다. PCR 조건은 genomic DNA 25 ng, Taq DNA polymerase (Bioneer, Korea) 2.5 μl , 10X reaction buffer 5 μl , deoxynucleotide triphosphates (dNTP) 2.5 μl , 20 pmol의 forward primer; fD1 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'과 reverse primer; rP2 5'-ACGGCTACCTTGTTAC-GACTT-3'를 각 1 μl 씩 넣고 나머지는 멸균 증류수를 이용하여 50 μl 로 조정 후 PCR을 수행하였다. PCR 반응 조건은 먼저 94°C에서 5분간

pre-denaturation하고, 94°C에서 45초간 denaturation, 57°C에서 45초간 annealing, 72°C에서 45초간 extension을 30 cycle하고, 마지막으로 72°C에서 5분간 post-extension 후, 증폭된 PCR product는 1% agarose (Promega, USA) gel에 전기영동 후 0.5 µg/ml의 ethidium bromide (EtBr)로 염색하여 확인하였다. 증폭된 PCR product는 *AccuPrep* PCR purification kit (Bioneer, Korea)를 이용하여 정제 후 ABI 3100 Automated DNA sequencer로 염기서열을 분석하여 얻은 sequence를 BLAST하여 균의 속까지 동정하였다.

항균제 감수성 시험

Oxytetracycline (OTC), flumequine (UB), oxolinic acid (OA), erythromycin (E), norfloxacin (NOR), gentamicin (GM), ofloxacin (OFX), enrofloxacin (ENO) 및 ciprofloxacin (CIP) 9종의 항균제 감수성 시험은 Sensi disk (BBL, MD, USA)를 이용한 디스크 확산법으로 볼락의 장내세균의 약제 감수성 검사를 실시하였다. PBS buffer에 현탁된 장내세균은 NaCl이 1.5%가 첨가된 Muller-Hinton agar plate (Difco, USA)에 도말하여 20°C에서 18-48시간 배양한 후, 감수성 여부를 판정하였다. 대조균주로는 *Escherichia coli* ATCC9637 균주를 사용하여 내성 정도를 비교하였다.

결과 및 고찰

양식산 및 자연산 볼락의 장내세균

총 100균주에 대한 16S rDNA sequence를 바탕

으로 장내세균을 동정한 결과를 Table 1에 나타내었다. 양식산 볼락의 장내에서 분리된 세균 중 Gram 음성균주로는 *Photobacterium* group (26 균주) 과 *Acinetobacter* group (18 균주) 순으로 우점하고 있었고, Gram 양성균주로는 아직 동정되지 않은 marine sediment bacteria (6 균주)가 우점하고 있었다. 자연산 볼락의 장내에서 분리된 세균의 Gram 음성균주로는 *Photobacterium* group (18 균주), *Acinetobacter* group (12 균주)과 *Shewanella* group (5 균주) 순으로 우점하고 있었고, Gram 양성균주로는 *Bacillus* group (8 균주), *Staphylococcus* group (4 균주)와 아직 동정되지 않은 marine sediment bacteria group (3 균주) 순으로 우점하고 있었다.

장내세균총은 다양한 지역에서 채집된 개체에 따라 지리적 특색을 나타내는 다양성을 가지고, 계절에 따라서도 변하며, 서식환경을 잘 반영하는 indicator로서 작용을 한다. *Vibrio* 속의 세균들은 어류질병과도 관련되어 있고, 경우에 따라 *Salmonella* spp. 등에 의해 인체에 해를 가한다는 보고도 있다 (Ahmed and Uddin, 2004; Fernandes et al., 1997; Muroga et al., 1990; Trust and Sparrow, 1974). 또한 *Lactobacillus leichmannii*는 차넬메기의 성장에도 관여하고 있다는 보고도 있다 (Robinson and Lovel, 1978; Limsuwan and Lovel, 1981). 본 연구에서 양식산과 자연산의 장내세균에서 공통으로 확인된 *Photobacterium* group, *Acinetobacter* group 과 marine sediment bacterium group은 샘플 장소가 인근하여 해당 수역내의 공통 수중세균 일 것으로 추정된다. 하지만, 양식산 볼락의 장내세균에서는 자연산 볼락의 세균총에서 보이는 *Shewanella*

Table 1. Dominant bacterial strains isolated from cultured and wild black rockfish

	Cultured black rockfish	Wild black rockfish
Gram-positive	<i>Photobacterium</i> sp. (26)	<i>Photobacterium</i> sp. (18)
	<i>Acinetobacter</i> sp. (18)	<i>Acinetobacter</i> sp. (12)
		<i>Shewanella</i> sp. (5)
Gram-negative	Marine sediment bacterium (NI)(6)	<i>Bacillus</i> sp. (8)
		<i>Staphylococcus</i> sp. (4)
		Marine sediment bacterium (NI)(3)

NI; not identified, The number in parentheses indicates the No. of fish cases.

group, *Bacillus* group 및 *Staphylococcus* group이 확인되지 않았는데, 이는 양식산과 자연산의 먹이 습성의 차이와 항생제 사용의 결과로 사료된다.

자연산 및 양식산 볼락의 장내세균의 항균제 감수성 시험

자연산과 양식산 볼락의 장내세균에 대한 약제 감수성 결과를 Fig. 1에 나타내었다. Oxytetracycline에 대한 약제감수성에서 자연산, 양식산 및 대조균주인 *E. coli* ATCC9637의 inhibition zone이 각각 3.9mm, 4.6mm 및 18.7mm로 양식산과 자연산은 동등한 수준의 감수성을 나타내었고, 대조균에 비해 내성을 나타내었다. Flumequine에 대한 약제 감수성 시험 결과는 각각 13.7mm, 8.4mm 및 29.3mm로 자연산이 양식산 보다 약간 inhibition zone이 넓게 형성되었으나 대조균주와는 차이를 나타내었다. Oxolinic acid에 대한 약제감수성 시험 결과는 각각 9.7mm, 10.1mm 및 19.7mm로 자연산과 양식산이 비슷한 inhibition zone을 형성하여으나 대조균주와는 감수성의 차이를 보였다. Erythromycin에 대한 약제감수성 시험 결과는 각각 13.4mm, 7.3mm 및 22.0mm로 자연산이 양식산 보다 평균 inhibition zone이 약간 넓게 나타났으나 대

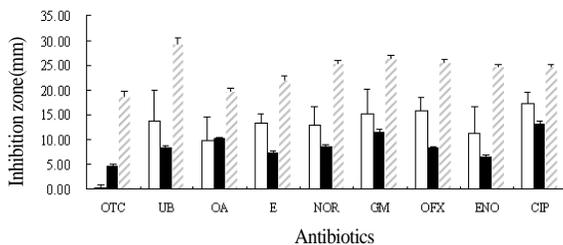


Fig. 1. Susceptibility of intestinal flora isolated from black rockfish against 9 antibiotics. □; wild black rockfish, ■; cultured black rockfish, ▨; control stain, *Escherichia coli* ATCC9637, OTC; oxytetracycline, UB; flumequine, OA; oxolinic acid, E; erythromycin, NOR; norfloxacin, GM; gentamicin, OFX; ofloxacin, ENO; enrofloxacin and CIP; ciprofloxacin

조균주만큼의 저지대를 형성하지는 못하였다. Norfloxacin에 대한 약제감수성 시험 결과는 각각 13.0mm, 8.6mm 및 25.3mm로 자연산이 양식산 보다 평균 inhibition zone이 다소 넓게 형성되었으나 대조균주와는 감수성의 차이를 보였다. Gentamicin에 대한 약제감수성 시험 결과는 각각 15.3mm, 11.5mm 및 26.3mm로 자연산이 양식산보다 평균 inhibition zone이 4mm 정도의 형성되었으나 대조균주와는 감수성의 차이를 보였다. Ofloxacin에 대한 약제감수성 시험 결과는 각각 13.0mm, 8.6mm 및 25.3mm로 자연산이 양식산 보다 평균 inhibition zone이 4.4mm 정도 넓게 형성되었으나 대조균주와는 감수성의 차이를 보였다. Enrofloxacin에 대한 약제감수성 시험 결과는 각각 11.4mm, 6.5mm 및 24.7mm로 자연산이 양식산 보다 평균 inhibition zone이 5mm 정도 넓게 형성되었으나 대조균주와는 감수성의 차이를 보였다. Ciprofloxacin에 대한 약제감수성 시험 결과는 각각 17.3mm, 13.3mm 및 24.7mm로 자연산이 양식산 보다 평균 inhibition zone이 4mm 정도 넓게 형성되었으나 대조균주와는 감수성의 차이를 보였다.

장내세균의 약제 감수성 시험에 사용된 항균제는 tetracycline계 1종 (oxytetracycline), aminoglycoside계 1종 (gentamicin), macroride계 1종 (erythromycin) 및 quinolone계 6종 (flumequine, oxolinic acid, norfloxacin, ofloxacin, enrofloxacin 및 ciprofloxacin)으로 총 9종이 사용되었다.

본 연구에 사용된 항균제 중 oxytetracycline와 oxolinic acid를 제외하고 gentamicin, erythromycin 및 quinolone계 항균제는 양식산 볼락의 장내세균이 자연산 볼락의 장내세균보다 약제 감수성이 평균적으로 약간 낮게 나왔으나 동등한 수준이었다. 이러한 결과는 양식산 볼락이 자연산 보다 항생제에 더 많이 노출되고 있음을 제시하고 있다고 사료되는데, 이는 Chopra and Roberts (2001)가 보고한 항생제 내성은 항생제의 사용 history와 밀접한 연관성이 있다는 보고에서도 찾아볼 수 있다.

한편, oxytetracycline에 대한 감수성 시험 결과, 대

조균주로 사용하였던 *E. coli* ATCC9637과 비교하면 높은 내성을 나타내고 있다. Oxytetracycline는 양식 현장에서 가장 많이 사용되고 있는 항생제 중 하나라고 알려져 있고, 본 연구에서 자연산 볼락의 장내세균이 양식산 장내세균과 비슷한 수준의 감수성을 보이는 것은 수중환경에 oxytetracycline 내성 균주가 광범위하게 분포하고 있다는 보고와 맥을 같이하고 있고(Kim et al., 2004; Jun et al., 2004; Miranda et al., 2003), oxytetracycline가 내성균의 증가로 인하여 이미 항균제로의 본래 기능이 많이 협소해지고 있다는 보고에 힘을 실어주고 있는 대목이다(Chopra and Roberts, 2001).

또한, 자연산 볼락의 장내세균에 대한 oxolinic acid의 감수성 시험 결과, 양식산과 비슷한 수준이었으나, oxolinic acid에 대한 감수성은 다른 quinolone계 항생제 보다 낮게 나왔다. 이는 oxolinic acid가 quinolone계 1세대인 nalidixic acid의 유도체로서 항균범위가 fluorinated quinolone (-floxacin) 항균제의 항균범위 보다 협소하고, 자연수계에 서식하는 어류에게도 지속적으로 oxolinic acid에 노출되어 내성을 획득하였거나, oxolinic acid에 대한 내성 메커니즘을 가진 다른 세균으로부터 내성 정보를 획득한 것으로 사료된다. oxolinic acid의 내성균주에 대해서는 해양수계에 광범위하게 분포되어 있음이 이미 보고되어 있다(Rigos et al., 2004).

본 연구를 통해서 전남 여수시 돌산 연안에 분포하고 있는 볼락의 장내세균총의 분포와 양식현장에서 사용되고 있는 항균물질이 환경수와 sediment를 오염시킴으로 인하여 자연산 볼락의 장내세균도 양식산과 비슷한 내성을 갖고 있다고 생각된다.

요 약

볼락은 산업적 잠재 가치가 높은 어종으로 각광받으면서 양식 가능성에 대한 연구가 일부 진행되어 왔으나, 장내세균에 대한 연구는 미미한 실정이었다. 본 연구에서는 전남 돌산도 연안에서 채집된

자연산 볼락과 양식산 볼락의 장내세균총의 분포와 이들 세균들의 약제 감수성에 대하여 조사하였다. 두 분류의 볼락에서 분리된 균주의 16S rDNA 염기를 바탕으로 장내세균을 동정한 결과, 양식산 볼락의 장내에서는 *Photobacterium* group, *Acinetobacter* group과 marine sediment bacteria group이 우점하고 있었고, 자연산 볼락의 장내에서는 *Photobacterium* group, *Acinetobacter* group, *Bacillus* group, *Shewanella* group, *Staphylococcus* group 및 marine sediment bacteria group이 우점하고 있었다. 자연산과 양식산 볼락의 장내세균의 약제 감수성 결과로는 본 연구에서 사용된 9종의 항균제 중 oxytetracycline와 oxolinic acid는 자연산과 양식산이 비슷한 수준의 감수성 나타냈으나, flumequine, erythromycin, norfloxacin, gentamycin, ofloxacin, enrofloxacin 및 ciprofloxacin은 평균 저지대에서 양식산 볼락의 장내세균이 자연산 볼락의 장내세균 보다 약간 낮은 감수성을 보였으나, 자연산 볼락의 장내세균 또한 감수성 시험 대조균주로 사용한 *E. coli* ATCC9637 보다 현저하게 낮은 감수성을 보였다. 이는 양식현장에서 사용되고 있는 항균물질이 자연 서식 어류생물군의 장내 세균에도 영향을 미칠 수 있음을 시사한다.

참 고 문 헌

- Ahmed, H.A. and Uddin, M.N.: Seasonal variation in the intestinal bacterial flora of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* × *Oreochromis aureus*) cultured in earthen ponds in Saudi Arabia. *Aquaculture*. 229:37-44. 2004.
- Choi, H.J., Hong, K.P., Oh, S.Y., Noh, C.H., Park, Y.J., Myoung, J.G., Kim, J.M., Hur, J.W., Zhang, C.I. and Park, I.S.: Growth characteristics of cultured dark-banded rockfish, *Sebastes inermis*. *Cuvier. J. Aquaculture*. 18:147-153. 2005.
- Chopra, I. and Roberts, M.: Tetracycline antibi-

- otics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65:232-260. 2001.
- Chyung, M.K.: The fishes of Korea, Iljisa. Seoul, p.727, 1986. (in Korean)
- Fernandes, C.F., Flick, G.J., Silva, J.L. and McCasky, T.A.: Influence of processing schemes on indicative bacteria and quality of fresh aquacultured catfish filets. *J. Food Prot.* 60:54-58. 1997.
- Gwak, W.S. and Park, D.W.: Developmental changes in digestive enzymes activity of black rockfish *Sebastes inermis*. *J. Aquaculture.* 19:125-132. 2006.
- Hatanak, M. and Iizuka, K.: Studies on the fish community in the *Zostera* area-III. Efficiency of production of *Sebastes inermis*. *Bull. Jap. Fish. Soc.*, 28:305-313, 1962.
- Huh, S.H. and Kwak, S.N.: Feeding habits of *Sebastes inermis* in the eelgrass (*Zostera marina*) bed in Kwangyang bay. *J. Korean Fish. Soc.*, 31:168-175. 1998.
- Jun, L.J., Jeong, J.B., Huh, M.D., Chung, J.K., Choi, D.L., Lee, C.H. and Jeong, H.D.: Detection of tetracycline-resistance determinants by multiplex polymerase chain reaction in *Edwardsiella tarda* isolated from fish farms in Korea. *Aquaculture*, 240:89-100. 2004.
- Kim, S.R., Nonaka, L. and Suzuki, S.: Occurrence of tetracycline resistance genes *tet(M)* and *tet(S)* in bacteria from marine aquaculture sites. *FEMS Microbiol. Letter.* 237:147-156. 2004.
- Kim, Y.U. and Han, K.H.: The early life history of the rockfish, *Sebastes inermis*. 1. Egg development and morphology of larvae by artificial treatment in aquarium. *J. Korean Fish. Soc.*, 26:458-464. 1993.
- Kim, Y.U., Han, K.H. and Byun, S.K.: The early life history of the rockfish, *Sebastes inermis*. 2. Morphological and skeletal development of larvae and juveniles. *J. Korean Fish. Soc.*, 26:465-476. 1993.
- KORDI.: A study for the marine ranching program in Korea. Exosystem management model and stocking technique. Korea Ocean Research and Development Institute, BSPE 97602-00-1073-3, p.361.
- Lee, T.Y. and Kim, S.Y.: Embryonic development within the maternal body of ovoviparous teleost, *Sebastes inermis*. *J. Korean Fish. Soc.* 25:413-431. 1992.
- Limsuwan, T. and Lovel, R.T.: Intestinal synthesis and absorption of vitamin B-12 in channel catfish. *J. Nutr.* 111:2125-2132. 1981.
- Miranda, C.D., Kehrenberg, C., Ulep, C., Schwarz, S. and Roberts, M.C.: Diversity of tetracycline resistance genes in bacteria from Chilean salmon farms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47:883-888. 2003.
- Muroga, K., Yasunobu, H., Okada, N. and Masumura, K.: Bacterial enteritis of cultured flounder *Paralichthys olivaceus* larvae. *Dis. Aquat. Org.* 9:121-125. 1990.
- Rigos, G., Nengas, I., Alexis, M. and Troisi, G.M.: Potential drug (oxytetracycline and oxolinic acid) pollution from Mediterranean sparid fish farms. *Aquatic Toxicology*, 69:281-288. 2004.
- Robinson, E.H. and Lovel, R.T.: Essentiality of biotin for channel catfish, *Ictalurus punctatus* fed lipid and lipid-free diets. *J. Nutr.* 108:1600-1611. 1978.
- Shinomiya, A. and Ezaki, O.: Mating habits of the rockfish, *Sebastes inermis*. *Environ. Biol. Fish.*, 30:9-13. 1991.

Trust, T.J. and Sarrow, R.A.H.: The bacterial flora in the alimentary tract of freshwater salmonid fishes. *Can. J. Microbiol.* 20:1219-1228. 1974.

Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A. and Lane, D.J.: 16S ribosomal DNA amplifica-

tion for phylogenic study. *J. Bacteriol.* 173:697-703. 1991.

Manuscript Received : July 30, 2007

Revision Accepted : December 2, 2007

Responsible Editorial Member : Ju-Chan Kang
(Pukyong Univ.)