

우리나라 양식 자주복, *Takifugu rubripes* (Temminck & Schlegel, 1850)에서 발생한 *Vibrio atlanticus*의 첫 감염 사례 보고

이남실 · 조미영 · 정승희 · 원경미[†]

국립수산물과학원 병리연구과

The first case report on *Vibrio atlanticus* infection in cultured tiger puffer, *Takifugu rubripes*

Nam-Sil Lee, Miyoung Cho, Sung-hee Jung and Kyoungmi Won[†]

Fish Pathology division, National Fisheries Research and Development Institute, Busan 46083, Korea

A case of disease was occurred in tiger puffer, *Takifugu rubripes*, reared in circulated system (water temperature was about 20°C) on land in Korea. Diseased fish showed a unique external sign, the cloudy skin ulcer in various sizes. We investigated the cause of disease, and isolated one pure cultured bacterium, TP01. This had 99.7% homology with *Vibrio atlanticus* by sequence analysis of the 16S rRNA and *rpoA* genes. TP01 showed some differences with other reported *V. atlanticus* strains in the biochemical characteristics as like Voges-Proskauer test and gelatin hydrolysis.

Key words: Skin ulcer, Tiger puffer, *Takifugu rubripes*, *Vibrio*, *Vibrio atlanticus*

자주복, *Takifugu rubripes*(Temminck and Schlegel)는 복어목(Order Tetraodontiformes), 참복과(Family Tetradontidae)에 속하는 품종으로(Abe, 1949), 우리나라를 비롯해 중국과 일본에서 주로 양식되고 있다. 자주복 양식은 일본에서 종묘의 인공생산이 성공한 이래로 지속·발전하고 있으며(Hujita et al, 1966), 중국에서는 최근 기대치가 높은 양식품종으로 각광받고 있다(Lin et al., 2017; Wan et al., 2006).

우리나라에서도 복어 양식이 시작되던 시기, 고급적인 이미지와 수익성으로 인해 그 가치를 인정받아 축양과 가두리 양식의 형태로 성행되었다

(Han, 1999; NIFS, 2006). 그러나 양식이 까다롭고 중국에서 수입이 가능해지면서 산업적 가치가 점점 줄어들고 있다. 또한 최근에는 경남, 제주지역에서 한정되어 양식되고 있으며 최근 2016년과 2017년도의 연간 생산량은 모두 21톤으로 타 양식 어류와 비교하면 매우 낮은 수준이다(MOF, 2018).

양식 자주복에서 주로 발생하는 질병으로는 양성시기의 구백증이 가장 잘 알려져 있으며, 그 외에도 황지병과 같은 영양성 질병, 트리코디나 등 외부 기생충 감염증이 있다. 자주복의 양식에서 나타나는 질병의 다수가 원인불명으로 보고되는 경우가 많은데 이런 경우는 사료영양과 관련성이 있을 것으로 추측되고 있다(NIFS, 2006; Nakanishi & Matsuura, 2016).

최근 자주복의 육상양식장에서 사육 중이던 체장 17~18cm의 어체에서 다양한 크기의 흰 구름

[†]Corresponding author: Kyoungmi Won
Tel: +82-51-720-2483, Fax: +82-51-720-2498
E-mail: kmwon@korea.kr

모양의 궤양 부위가 등쪽에서 관찰되기 시작하여 심해지면 몸 전체에 궤양부위가 증가하고 등쪽에 궤양이 심한부위는 근육이 드러나는 질병이 나타났다. 폐사율은 비교적 낮지만 사료섭이율이 저하되고 상품가치가 떨어지는 등 피해가 발생하므로 그 원인을 알아보고자 다양한 미생물학적 분석을 실시하였다.

재료 및 방법

감염어

2016년 4월, 경상남도 통영 소재의 자주복 육상 양식장에서 체장 17-18 cm의 개체에서 피부, 특히 등쪽에 다양한 크기의 궤양부를 형성하는 병적 증상을 보인 개체가 증가하여 실험실로 수송하였다. 당시, 양식장의 수온은 20℃ 정도로 유지되었으며 1일 2회 순환의 조건으로 사육수를 환수하는 조건 이외에 다른 사육조건에 변화가 발생하지는 않았고, 실험에 사용한 검체는 10마리였다.

감염어의 생검

질병 증상을 보이는 복어의 아가미, 체표 및 각 내부 장기를 일부 잘라내어 슬라이드글라스에 생검하여 조직의 상태 및 기생충 감염 여부를 육안 및 현미경적으로 확인하였다.

바이러스 검사

해산어에서 주로 검출되는 바이러스의 감염 여부를 확인하기 위하여 참돔이리도바이러스 (red seabream iridovirus, RSIV), 바이러스성출혈성패혈 증바이러스 (viral hemorrhagic septicaemia virus, VHSV)를 포함하여 바이러스성신경괴사증바이러스 (viral nervous necrosis virus, VNNV), 히라메랍도바이러스 (hirame rhabdovirus, HRV) 및 해산 버나바이러스 (marine birnavirus, MBV)에 대한 polymerase chain reaction (PCR) 분석을 시행하였다.

검사용 시료는 감염어를 무균적으로 해부하여 적출한 신장, 비장 및 뇌를 사용하였다. PCR을 위한 DNA는 시판되는 High pure PCR template preparation kit (Roche, Germany)를 사용하여 매뉴얼에 따라 분리하였으며, RNA는 매뉴얼에 따라 TRIZOL

® Reagent (Invitrogen, USA)로 분리한 후, Super Script™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen, USA)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. RSIV의 PCR 분석에는 분리된 DNA를 template로 사용하였으며, 그 외 VHSV, VNNV, HRV 및 MBV의 PCR 분석에는 분리된 RNA에서 합성한 cDNA를 사용하였다. PCR 분석은 ExTaq® (TaKaRa, Japan)을 이용하여 매뉴얼에 따랐으며, 사용된 primer set 및 PCR 조건은 Table 1에 나타내었다. 증폭된 산물은 전기영동으로 확인하였으며, 모든 PCR 분석은 양성대조 및 음성대조를 함께 비교하였다.

세균 검사

시험어를 무균적으로 해부하여 신장, 비장, 간의 내부 장기 및 체표 환부를 NaCl 1.5% 첨가 TSA 배지, BHIA 배지, TCBS 배지, SS 배지 등에 접종하여 20℃, 24~48시간 배양하여 균의 성상을 확인하였으며 이를 계대배양하여 이후의 실험에 사용하였다.

1) 생화학적 분석

분리균의 종 분류를 위한 생화학적 분석에는 1.5% NaCl을 첨가한 TSA배지에서 20℃, 24시간 배양된 균주를 사용하였다. 먼저 상법에 따라 Gram stain 염색성과 형태를 관찰하고 세균의 운동성을 판정하였다. Oxidase test는 cytochrome oxidase 시험지법, catalase test는 3% H₂O₂를 이용한 slide 반응법으로 실시하였다. 그 외의 다양한 생화학적 시험은 Mafaddin (2000)의 방법을 따랐으며 API 20E kit (BioMerieux, France)를 함께 사용하여 *Vibrio anguillarum* KCTC2711을 표준균주로 함께 비교 분석하였다.

2) 16S rRNA 및 rpoA 유전자에 대한 염기서열 분석

분리균의 종 동정을 위해 16S rRNA 및 rpoA 유전자에 대한 염기서열 분석을 실시하였다. 분리균의 genomic DNA 추출과 PCR 분석은 상기와 동일하게 High pure template preparation kit (Roche, Germany)와 ExTaq® (Takara, Japan)을 사용하였다. 16S rRNA 유전자는 27F (5'-CTGAGCCAGGATC AACTCT-3')와1429R (5'-CGTTACCTTGTTACG

Table 1. Oligonucleotide primers used in PCR amplification

Virus*		Nucleotide sequence of primer	PCR condition	size (bp)
RSIV	Forward	5'-CTCAAACACTCTGGCTCATC-3'	94°C (30sec)-58°C (1min)-72°C (1min) [30cycle]	570
	Reverse	5'-GCACCAACACATCTCCTATC-3'		
	Forward	5'-CGGGGGCAATGACGACTACA-3'	94°C (30sec)-58°C (1min)-72°C (1min) [30cycle]	568
	Reverse	5'-CCGCCTGTGCCTTTTCTGGA-3'		
VHSV	Forward	5'-ATGGAAGGAGGAATTCGTGAAGCG-3'	94°C (30sec)-55°C (30sec)-68°C (1min) [35cycle]	505
	Reverse	5'-GCGGTGAAGTGCTGCAGTCCCC-3'		
VNNV	Forward	5'-CGTGTCAAGTCATGTGTCGCT-3'	95°C (40sec)-50°C (40sec)-72°C (40sec) [25cycle]	427
	Reverse	5'-CGAGTCAACACGGGTGAAGA-3'		
HRV	Forward	5'-ACCCTGGGATTCCCTTGATTC-3'	94°C (30sec)-55°C (10sec)-72°C (45sec) [30cycle]	600
	Reverse	5'-TCTGGTGGGCACGATAAGTT-3'		
MBV	Forward	5'-GCACCACGAAGGTACGAAAT-3'	94°C (1min)-55°C (1min)-72°C (1min) [30cycle]	430
	Reverse	5'-GTACGTTGCCGTTTCCTGAT-3'		

*, RSIV, red seabream iridovirus; VHSV, viral hemorrhagic septicaemia virus; VNNV, viral nervous necrosis virus; HRV, hiram rhabdovirus; MBV, marine birnavirus.

ACTT-3') primer sets를 이용하여 1,505bp의 산물을 얻었으며, *rpoA* 유전자는 *rpoA*-01-F (5'-ATGCAGGGTTCTGTDAG-3')와 *rpoA*-03-R (5'-GHGGCARTTTTCGARRCGC-3') primer sets (Thompson et al., 2005)를 이용하여 951bp의 산물을 얻었다. 증폭된 PCR 산물은 전기영동으로 band를 확인한 후, Gel SV kit (GeneAll, Korea)로 정제하고 Topo TA cloning® (Invitrogen, USA)을 이용하여 cloning하여 염기서열을 확인하였다.

염기서열의 분석에는 Genetyx Ver. 8.0 (SDC Software Development, Japan)을 사용하였으며, NCBI에서 제공되는 BLAST program 정보를 이용하여 상동성을 비교하였다.

결 과

감염어의 증상

감염어는 가슴지느러미를 비롯한 각 부위의 지느러미 껍양, 탈락과 더불어 등쪽에 흰색의 구름 모양의 껍양부위가 다양한 크기로 관찰되며, 배쪽의 체표에도 적점과 함께 나타나는 소형의 껍양이 관찰되고 등쪽의 심한 경우에는 등쪽의 근육이 드러나 보이는 특징적인 증상을 보이며 폐사하였다 (Fig. 1). 그러나 체표 껍양 이외의 특징적인 외부 및 내부 증상은 관찰되지 않았다.

감염어의 생검

병든 자주복의 아가미, 체표 및 내부 장기를 생



Fig. 1. Skin ulcer at up side(Left) and down side(Right) of diseased tiger puffer.

검하여 검정한 결과, 기생충은 관찰되지 않았다 (data not shown).

바이러스 검사

해산어에서 주로 검출되는 바이러스 5종(RSIV, VHSV, VNNV, HRV 및 MBV)에 대한 PCR 분석을 실시한 결과, 모두 음성으로 확인되었다 (data not shown).

세균 검사

모든 자주복 병어의 신장과 비장의 시료를 배양한 배지에서 단일한 colony가 형성되었다. 분리균은 25°C, 1.5% NaCl이 첨가된 TSA 배지에서 투명한 크림색의 colony를, TCBS 배지에서 노란색 colony를 형성하여 *Vibrio* sp.로 추정되었으며, 이 균주를 TP01로 정하고 이후의 분석을 실시하였다.

TP01균주는 gram 음성 flagellated rod로, catalase와 oxidase를 생성하였으며, nitrate, indole 그리고 methyl red에도 양성반응을 나타내었다. Arginine dihydrolase, lysine decarboxylase 그리고 ornithine decarboxylase 생성은 없었다. Glucose, mannitol 그리고 sucrose를 이용하여 산을 생성하였으며, gelatin은 가수분해 되는 것으로 나타났다. Voges-Proskauer test에서 음성을, O/129에 대한 감수성은 양성으로 나타나 *V. splendidus* 혹은 *V. cyclitrophicus*와 유사한 생화학적 특징을 가지는 것으로 확인되었다(Table 2).

TP01의 16S rRNA 유전자 1,505 bp와 *rpoA* 유전자 951 bp의 염기서열을 분석한 결과, *V. atlanticus* Cmj 13.4 (FN582257)균주와 99.77%의 상동성을 나타내었다. *Vibrio* sp. 가운데 가깝게 연결된 균주들의 계통수를 Fig. 2에 나타내었다.

고 찰

16S rRNA 및 *Vibrio*속 균종을 구분하는데 유용한 것으로 보고된 유전자 부위중의 하나인 *rpoA*의 유전자 염기서열 분석으로 TP01은 *Vibrio atlanticus*로 확인되었다(Thompson et al., 2001, 2004, 2005, 2006; Tomoo et al, 2007). *V. atlanticus*는 바지락(*Ruditapes philippinarum*.)에서 처음 분리되었

Table 2. The results of biochemical test of TP01 strain

Tested items	isolate <i>Vibrio</i> sp. (TP01)	<i>V. anguillarum</i> (KCTC2711)
Arginine dihydrolase	-	+
Lysine decarboxylase	-	-
Ornithine decarboxylase	-	-
Catalase	+	+
Oxidase	+	+
Nitrate	+	+
Indole	+	+
Methyl red	+	+
Voges-Proskauer	-	-
Urease	-	-
Citrate	-	-
Kohn's gelatin	+	+
β-Galactosidase(ONPG)	+	+
Acid production from :		
Amygdalin	-	+
Glucose	+	+
Inositol	-	-
Mannitol	+	+
Melibiose	-	-
Rhamnose	-	-
Sorbitol	-	+
Sucrose	+	+
O/129 (150 µg/disc) sensitivity	+	+

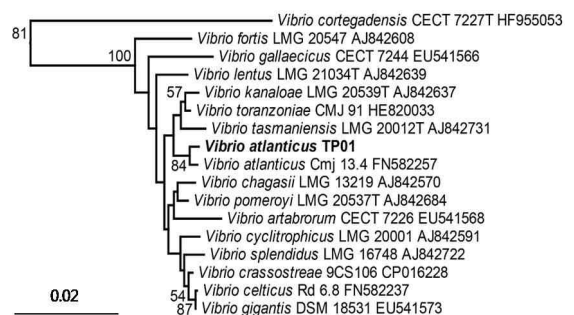


Fig. 2. Neighbour-joining tree showing the phylogenetic position based on housekeeping gene *rpoA* and the 16S rRNA gene. Bar, 0.02 substitutions per nucleotide position. Numbers at nodes show percentage bootstrap values.

으며 Ana 등(2011)이 다른 *Vibrio*균들과 비교한 내용을 보고하고 있다. 본 내용에서는 분리된 5균주

의 생화학 test에 대한 결과를 보여주고 있는데, 이들의 생화학적 특징을 *V. atlanticus* TP01균주와 비교하였을 때, Voges-Proskauer test 와 Gelatin 가수분해능에 대한 결과에서 차이를 나타내어 생화학 test 결과만으로 비교했을 때는 *V. splendidus* 혹은 *V. cyclitrophicus*와 유사한 결과를 보인 검사항목이 다수였다. Ana 등(2011)의 보고에서도 바지락에서 분리된 *V. atlanticus* 균주의 경우 AFLP(amplified fragment length polymorphism)와 16S rRNA 유전자 염기서열 분석에서 *Vibrio* 속 가운데에도 *V. splendidus* 에 가까운 것으로 설명하고 있고, 5개의 *V. atlanticus*균주에 대한 생화학test의 결과에서 5균주 모두 일치하는 결과가 아니었던 점을 감안하면 TP01의 생화학적 특징에 대한 결과는 가변적일 수 있음을 예상할 수 있다.

양식 자주복에서 잘 알려진 질병으로 구백증(Kuchijiro-shyo)이 있다. 이 질병은 입주위로 궤양이 발생하여 흰색의 환부를 형성하는 것이 특징으로 초기에는 영양성 질병의 의혹도 있었으나 이후 RNA 바이러스를 그 원인으로 보고하였다(Hashimoto et al. 2008). 본 연구에서의 질병발생 예는 구백증과 같은 백색궤양이 주증상이지만 구백증과는 달리 주둥이에는 뚜렷한 증상이 없지만 등쪽 백색 궤양부 형성을 주 증상으로 하였다. 외부기생충이나 바이러스의 감염은 없었으며, 세균분석 결과 *V. atlanticus*가 순수하게 분리되었다.

양식 자주복에서 발생하는 주요 세균성질병으로는 활주세균 감염(Japanese Sea National Fisheries Research Institute; JSNFI, 2002)과 치어 등에 일본에서 해마다 많은 피해를 주는 *V. anguillarum* 감염이 보고(Muroga et al., 1987, 1995; Kusuda and Kawai, 1998)되고 있으며, 피부 육아종과 관련이 있는 *V. harveyi* 감염에 대한 보고(Mohi et al, 2010)도 있지만 *V. atlanticus* 감염 예는 본 연구에서 분리한 TP01 이 처음이다.

일본 국립연구개발법인 일본해구수산연구소의 2000년 재배수산동물방역대책에 관한 보고서(JSNFI, 2000)에 따르면 1999년과 2000년 즈음에 일본 복어양식장에서 복부궤양을 동반하는 원인 불명의 질병발생사례가 나타났다. 본 질병발생 예는 양식개시 2년이 지나고 발생하며, 6~10월경

고수온기에 많이 나타나며, 종묘, 사료, 사육밀도나 사육조건 등과 관계없이 발생하였다. 증상은 초기에 체표에 하얀 상처가 나타나고, 하악에서 복부로 발적이나 궤양이 진행되고, 복부에 구멍이 생기는 정도까지 진행되었다. 외부 관찰과 세균 배양으로 환부주위로 기생충과 활주세균이 관찰되었으나 원인으로 보기는 힘든 정도였다. 혈액검사도 진행되었으며 간 기능장해를 의심할만한 결과를 얻었지만 정확한 원인을 밝히지는 못했다(JSNFI, 2000). 같은 기관의 2002년 보고에서도 자주복 양식장에 대한 질병진단 결과, 세균성이 33.3%로 가장 높았지만 기생충이 원인인 경우도 27.8%, 원인이 밝혀지지 않은 원인불명의 경우도 22.2%의 비율로 나타났으며, 세균 중에서는 활주세균종이 많았다(JSNFI, 2002). 최근 일본의 어류질병의 현상에 관한 보고(Nakanishi and Matsuura, 2016)에서도 복어류의 질병 발생상황을 보면 원인불명이 20.0%로 가장 많고 구백증(19.5%)과 아가미충(14.7%)이 그 뒤를 이었다.

이처럼 양식 자주복의 질병은 원인을 명확히 알지 못하는 경우가 많이 나타나고, 다른 어종에서도 *V. atlanticus*가 질병의 원인으로 분리, 보고된 예는 아직 없다. 원인조사에서 기생충이나 바이러스와 같은 다른 미생물학적 원인이 발견되지 않았고, 세균학적 검사에서 *V. atlanticus*가 순수하게 분리되어 본 궤양병의 주요 원인으로 판단하였으나, *V. atlanticus*는 앞서서도 언급한 것처럼 바지락에서 분리된 세균으로 아직은 잘 알려지지 않은 균종으로 병원성에 대한 증명이 필요할 것으로 보이며, 사료영양적인 영향이 복합적으로 작용했을 경우도 배제할 수 없으므로 다양한 접근으로 원인분석이 이루어져야 할 것으로 보인다.

요 약

본 연구는 육상 순환 양식장, 약 20℃의 수온에서 양식 중이던 자주복에서 체표에 백탁과 궤양을 보이는 개체가 다수 발생하여 그 원인을 밝히고자 하였다. TCBS 선택배지에서 순수 배양된 균체를 확인하고 계대 배양하여 16S rRNA와 *rpoA* 유전자의 염기서열 분석을 실시하였으며, 그 결과는

*Vibrio atlanticus*와 99.77%의 상동성을 가지는 것으로 나타났다. 생화학적 특징을 이미 보고된 같은 균종과 비교한 결과, Voges-Proskauer test 와 Gelatin 가수분해능에 대한 결과에서 차이를 나타내는 것으로 확인하였다.

감사의 글

본 연구는 국립수산물과학원 (병리연구과 R2018 064-주요 4종 수산생물 질병진단법 연구)의 지원에 의해 수행되었습니다.

References

- Abe, T.:Taxonomic studies on the puffers (Tetraodontidae, Teleostei) from Japan and adjacent regions,V, Synopsis of the puffers from Japan and adjacent regions. Bull. Biogeograph. Soc. Jap., 14, 1-15, 89-140, 1949.
- Ana, L. D., Roxana, B.-H., Ilse, C., Sabela B., Paul de Vos and Jesus L. R.:*Vibrio atlanticus* sp. nov. and *Vibrio artabrorum* sp. nov., isolated from the clams *Ruditapes philippinarum* and *Ruditapes decussatus*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 61, 2406-2411, 2011.
- Han, K.-N.: Development of eggs, larvae and juveniles of the puffer, *Takifugu rubripes* reared in the Laboratory. J. Aquaculture, 12:255-266, 1999.
- Hashimoto, E., Miyadai, T., Ohtani, M. and Oh, M.J.: Proliferation of kuchijirosho causative agent in a fugu-derived cell line. J. Fish Dis., 31: 443-339, 2008
- Hujita, S., Kniyama T. and Yogata T.:An artificial ovulation of the puffer, *Fugu niphobles*, by hormone injection, with a description of a practical incubation method with strong aeration. Aqu. Sci., 14:31-36, 1966.
- Japanese Sea National Fisheries Research Institute (JSNfri); <http://jsnfri.fra.affrc.go.jp/pref/fukui/2000/pdf/43-46.pdf>, 2000
- Japanese Sea National Fisheries Research Institute (JSNfri); <http://jsnfri.fra.affrc.go.jp/pref/fukui/2002/pdf/61-63.pdf>, 2002
- Kusuda, R. and Kawai, K.:Bacterial diseases of cultured marine fish in Japan. Fish Pathol., 33, 221-227, 1998.
- Lin, Z., Wang, H., Yu, C., Lv, F., Liu, H. and Zhang Tao.: Commercial production of tiger puffer (*Takifugu rubripes*) in Winter using a recirculating aquaculture system. Journal of Ocean University of China, 16, 107-113, 2017.
- Mafaddin, J.F.: Biochemical tests for identification of medical bacteria. 3ed. Awolter Klvwer Company, 2000.
- Ministry of oceans and fisheries (MOF): Oceans and fisheries statistical system, statistics by fishery and by kind. www.mof.go.kr/statPortal/, 2018.
- Mohi, M.M., Kuratani, M., Miyazaki, T. and Yoshida, T.:Histopathological studies on *Vibrio harveyi* infected tiger puffer, *Takifugu rubripes* (Temminck et Schlegel), cultured in Japan. J. Fish Dis., 33, 833-840, 2010.
- Muroga, K., Tanasomwang, V. and Momoyama, K.: *Vibrio anguillarum* infection in tiger puffer (*Takifugu rubripes*) fingerlings. Fish Pathol., 22, 29-30, 1987.
- Muroga, K.: Viral and bacterial diseases in larval and juvenile marine fish and shellfish: a review. Fish Pathol. 30, 71-85, 1995.
- Nakanishi, T. and Matsuura, Y.:Current status and issues of fish diseases in Japan. J. Jap. Vet. Medi. Assoc., 69 27-35, 2016.
- National Institute Fisheries Sciences (NIFS): Aquaculture Manual of River Puffer (*Takifugu obscurus*), Serial Number ED-2006-AQ-001, 2006.
- Thompson, F.L., Gevers, D., Thompson, C.C., Dawyndt, P., Naser, S., Hoste, B., Munn C.B. and Swings J.: Phylogeny and Molecular Identification of Vibrios on the Basis of Multilocus Sequence Analysis. Applied and Environmental Microbiology. 71, 5107-5115, 2005.
- Thompson, F.L. Austin, B. and Swings, J.: The biology of vibrios, Taxonomy of the vibrios, p.29-43, ASM Press, Washington, DC., 2006.
- Thompson, F.L., Hoste, B., Vandemeulebroecke, K. and Swings, J.: Genomic diversity amongst *Vibrio* isolates from different sources determined by fluorescent amplified fragment length polymorphism. Syst. Appl. Microbiol. 24: 520-538, 2001.
- Thompson, F.L., Iida, T. and Swings, J.: Biodiversity of vibrios. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 64:403-431, 2004.
- Tomoo, S., Kita-Tukamoto, K. and Thompson, F.L.: Inferring the Evolutionary History of Vibrios by means of Multilocus sequence analysis. Journal of Bacteriology. 189, 7932-7936, 2007.
- Wan, Z.Z., Gao, T.X., Zhang, X.M., Chen, C. and Yu, C.H.: Histological study on the digestive system development of *Takifugu rubripes* larvae and juvenile. J. Ocean Univ. China, 5, 39-44, 2006.

Manuscript Received : Oct 8, 2018

Revised : Nov 23, 2018

Accepted : Nov 23, 2018