

자기활성수가 소 정액 동결에 미치는 영향

서기범¹ · 이용승¹ · 이경진¹ · 유한준¹ · 정희태² · 양부근¹ · 이승환³ · 이진우⁴ · 박춘근^{1,*}

¹강원대학교 동물생명과학대학, ²강원대학교 수의학과, ³국립축산과학원 한우시험장, ⁴ROHAS TECH

Effect of Magnetized Water on Cryopreservation in Bovine Spermatozoa

Gi-Beom Seo¹, Yong-Seung Lee¹, Kyung-Jin Lee¹, Han-Jun Yu¹, Hee-Tae Cheong², Boo-Keun Yang¹,
Seung-Hwan Lee³, Jin-Woo Lee⁴ and Choon-Keun Park^{1,*}

¹College of Animal Life Sciences, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

²College of Veterinary Medicine, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

³National Institute of Animal Science, Hanwoo Ex, Kangwon 232-950, Korea

⁴ROHAS TECH, Gangneung 210-954, Korea

ABSTRACT

The purpose of this study was to improve of frozen-thawed sperm using magnetized water in Korean native cattle. Before cryopreservation, without egg-yolk Triladyl[®] solution was flowed though magnet [0, 2000, 4000 and 6000 Gauss(G)] for 5 min. The freezing of diluted semen added with Triladyl containing 20% egg-yolk. Analysis of frozen-thawed sperm was estimated viability with SYBR14/PI double stain, membrane intact with hypoosmotic swelling test (HOST), acrosome reaction with FITC-PNA, mitochondria membrane function with Rhodamin 123 by flow-cytometry. Sperm viability was significantly higher in 4000G group than other groups ($p < 0.05$). However, the Hypoosmotic Swelling Test (HOST) was significantly higher in fresh, 4000 and 6000G than 0 and 2000G ($p < 0.05$). In addition, mitochondria membrane damage and acrosome damage were significantly lower in 6000G group than other groups ($p < 0.05$). In conclusion we suggest that magnetized water could be improve ability of sperm on cryopreservation in Korean native cattle.

(Key words : Korean native cattle, Spermatozoa, Cryopreservation, Magnetized water)

서론

정자의 동결은 1776년 Spallanzani가 눈 (snow)을 이용하여 정자를 동결보존한 뒤 활동성 있는 정자의 회수에 성공한 이후, Mantegazza 등 (1866)이 빙점 이하인 -17°C에서 동결한 정자의 생존을 확인함으로써 본격적인 정자의 동결보존이 가능하게 되었다 (Trina, 1980). 동결보존에 있어서 가장 중요한 문제점은 동해로부터 정자세포를 보호하는 것이다. 동결과정 동안에 정자는 세포질 내 포함된 물로 인한 빙정 형성으로 세포질 균열, 세포 골격과 유전자 구조 손상에 영향을 미친다 (Isachenko, 2003). 이러한 문제들은 Polge 등 (1949)이 glycerol의 동해방지 효과를 발견함으로써 보다 효율적인 정자의 동결보존이 가능하게 되었다. Glycerol과 같은 동해방지제는 세포막 투과성이 높아 동결액 내에 첨가되어 동결과정 동안에 정자의 냉각과 동결 그리고 용해로 인한 물리화학적 충격 줄여주는 역할을 한다 (Gao 등, 1997; Purdy, 2006). 또한, 동해방지제는 정자막내 인지질과 단백질의

배열의 원인이 되고, 막 유동성을 향상시키며, 저온에서 탈수를 돕고, 세포내 빙정형성을 억제시켜줌으로써 동결 보존된 정자의 생존율을 향상시킨다 (review Holt, 2000).

자기활성수는 자력을 가진 자석에 물을 관류시켜 물 분자 구조를 이온 활성화시킨 생체수와 같은 육각형 구조로 바뀐 물로 자화육각수라고 불려진다. 이렇게 알려진 자화육각수는 임상적으로 신진대사 과정의 촉진, 혈액개선의 효과 등의 이유로 자연 치유력을 증강시킨다고 알려져 왔으나(Kang, 2005), 아직까지는 이에 대한 정확한 메카니즘 규명에 대한 실험연구는 미미한 실정이다. 하지만 물리학적으로 물에 높은 자력을 걸게 되면 물의 삼투압의 증가에 대한 세포막의 침투성이 강해지며(Lednev, 1991; Xu와 Sun, 2008), pH와 전기전도율이 높아지며(Xu와 Sun, 2008), 빙정(ice crystal)의 크기가 작아진다(Woo와 Mujumdar, 2010)는 보고가 있다.

따라서 세포막 침투성과 전기전도율이 높고, 빙정이 작게 형성되는 자기활성수를 소 정자의 동결에 이용하였을 시 동해보호제의 효과를 증가시켜 빙정 형성으로 인한 손상을 줄여줄 수 있을 것으로 판단하여 소 동결액을 고정

* 본 연구는 농촌진흥청 공동연구사업 (과제번호 : PJ 907008)의 지원에 의하여 이루어진 것임.

† Corresponding author : Phone: +82-33-250-8600, E-mail: parkck@kangwon.ac.kr

된 자석 사이에 관류시켜 동결액의 자기활성을 유도하고 이를 이용하여 소 정액을 동결 용해 후 정자의 생존율, 첨체 손상, 미토콘드리아 막 기능 그리고 원형질막 강도 검사(HOST) 분석을 통해 자기활성수의 소 정액동결 보존에서의 효과를 분석하고자 한다.

재료 및 방법

정액 채취

본 연구에 이용된 소 정액은 국립축산과학원 대관령 한우시험장에서 사육되고 있는 종모우의 정액을 이용하였다. 한우시험장내에서 인공질법을 통하여 채취된 정액은 곧바로 1차 동결액 20% egg-yolk이 첨가된 Triladyl (KRUUS, Cat. no. 340244)에 1차 희석하여 2시간 이내로 실험실로 운반하여 사용하였다. 실험에 사용된 정액은 80% 이상의 생존율을 나타내는 정액을 사용하였다.

정액 동결

정액동결을 위하여 egg-yolk가 포함되어 있지 않은 Triladyl(KRUUS, Cat. no. 340244) 용액을 peristaltic pump (BT100-2J, Longerpump, china)를 이용하여 100 rpm으로 자기활성장치(0, 2000, 4000, 6000G)가 설치된 관으로 5분간 순환하여 실험에 사용하였다. 1차 동결보존액을 처리한 정액은 4℃에 보존하였으며, 2차 동결보존액은 1차 동결보존액과 같은 Triladyl(KRUUS, Cat. no. 340244)에 20% egg-yolk를 첨가하여 원심분리(4,500 rpm, 45 min, 4℃)하여 상층액을 사용하였다. 그 후 1차 동결보존액이 첨가된 정액은 2차 동결보존액을 첨가하였을 때 정자의 최종 농도가 5×10^7 개/ml가 되도록 조정하여 4℃로 냉각하였다. 그 후 0.5 ml straw를 제작하였고, 6 cm 정도의 액체 질소가 담겨져 있는 용기 표면으로부터 10 cm 위에서 10분간 정치 후 액체 질소에 침지하여 동결 보존하였다.

동결정액 용해 및 성장검사

용해에 사용된 동결정액은 최소 7일 이상 보존된 것을 용해하여 실험에 사용하였다. 동결된 straw는 water bath를 이용하여 37℃에서 45초 동안 용해 후 Beltsville thawing solution(BTS) 희석제(205.4 mM glucose, 3.358 mM EDTA, 20.4 mM sodium citrate, 14.879 mM sodium bicarbonate, 10.06 mM potassium chloride)와 희석한 뒤 원심분리(1,500 rpm, 5 min)하여 상층액을 제거한 후 다시 BTS를 다시 부유한 뒤에 실험에 사용하였다. 정자의 성장검사는 생존율, 정자원형질막 기능 검사, 그리고 미토콘드리아 검사, 첨체 검사를 실시하였다.

생존율 검사(SYBR-14/PI Staining)

생존율 검사는 LIVE/DEAD sperm viability kit (Invitrogen)를 이용하였으며, 실험 과정은 100 μ l의 정액에 1 ml의 HEPES(Sigma)+0.1%BSA와 5 μ l의 SYBR-14 working stock (2 μ l SYBR-14+198 μ l DMSO)을 첨가하여 incubater(37℃) 상에서 10분간 정치시켰다. 10분 후 5 μ l의 PI(propidium iodide)를 첨가하여 incubater(37℃) 상

에서 10분간 정치 후 형광현미경(400배) 하에서 관찰하였다. SYBR-14는 live sperm이 DNA에 binding하여 녹색 형광을 띤다. Dead sperm은 죽거나 세포막에 손상이 생긴 세포의 경우 PI(propidium iodide)가 핵 내에 침투하여 DNA에 binding하여 붉은색 형광을 띄게 되는 원리를 이용하였다.

정자원형질막 기능 검사(Hypoosmotic Swelling Test)

정자원형질막 기능 검사(Hypoosmotic Swelling Test)는 정자 25 μ l에 Na-citrate, 2H₂O와 fructose가 혼합된 저장액 1 ml를 넣고 incubater에서 (37℃) 30분간 배양하여 표본들을 위상차현미경(400x) 하에서 관찰하였다. 원형질막이 보존되어 있으면 삼투압 작용이 정상적으로 이루어져 미부가 말리게 되고, 원형질막이 손상을 입으면 미부가 말리지 않는 원리를 이용한 방법을 사용하였다.

미토콘드리아 검사(Rhodamin123/PI Staining)

미토콘드리아 기능을 검사는 정액 25 μ l에 Beltsville thawing solution (BTS) 희석제 1 ml를 넣은 뒤 Rhodamin123 (Sigma)+1.5 ng을 넣고 incubater(37℃)에서 10분간 배양 후에 PI (propidium iodide) 염색약을 1 μ l를 넣고 다시 10분간 배양한다. 그 후 원심분리기(1,500 rpm 5 min) 후 상층액을 제거한 뒤 PBS를 1 ml 분주한 다음 flow cytometry (BD, FACS Calibur) 방법으로 형광의 발현차를 분석하였다. Fig. 1과 같이 Rhodamin123 (Sigma)에 의해 미토콘드리아가 염색된 것을(positive) activation된 미토콘드리아와 염색되지 않은 것을(negative) inactivation된 미토콘드리아로 판단 히스토그램 상에서 각각의 영역이 차지하는 부분의 비율을 분석하였다. PI에 의해 손상된 부분을 제외한 나머지 살아 있는 부분을 검사에 사용하였다.

첨체검사(FITC-PNA/PI Staining)

첨체 손상 검사는 정액 25 μ l에 Beltsville thawing solution (BTS) 희석제 1 ml를 넣은 뒤 Fluorescein isothiocyanate-labeled peanut-agglutinin (FITC-PNA)을 1 μ l

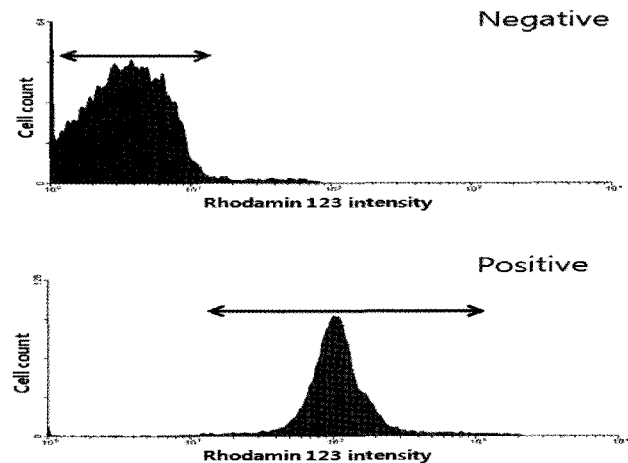


Fig. 1. Histograms of Rhodamin123-stained spermatozoa by flow cytometry. Negative: damaged mitochondria membrane; Positive: intact mitochondria membrane.

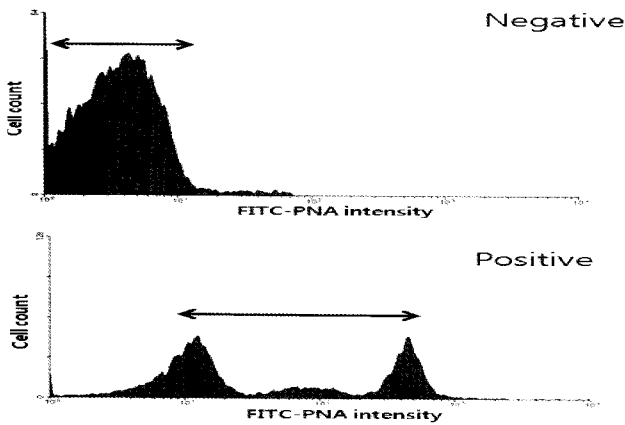


Fig. 2. Histograms of FITC-PNA stained spermatozoa by flow cytometry. Negative: intact acrosome membrane; Positive: damaged acrosome membrane.

넣고 incubator (37°C)에서 10분간 배양 후에 PI (propidium iodide) 염색약을 1 µl를 넣고 다시 10분간 배양한다. 그 후 원심분리기(1,500 rpm 5 min) 후 상층액을 제거한 뒤 PBS를 1 ml 분주한 다음 Flow cytometry (BD, FACS Calibur) 방법으로 형광의 발현차를 분석하였다. 침체의 손상은 Fig. 2와 같이 침체막이 손상되지 않은 부분과 손상된 부분을 히스토그램 상에서 분석하였다.

통계처리(Statistical Analysis)

본 실험에서 얻어진 결과에 대한 통계적인 분석은 SAS 9.2 통계 package를 사용하였으며, 자기력의 세기별 정액 성상의 유의성 검증을 위해 General linear model (GLM)을 적용하여 Duncan의 multiple range test를 이용하였다 ($p < 0.05$).

결 과

자기활성된 동결액 처리 후 생존을 평가

Egg-Yolk가 첨가되기 전의 동결액을 0, 2000, 4000 및 6000G 세기의 자석으로 처리하여 동결 용해 후 SYBR-14/PI로 형광염색한 소 정자를 형광현미경으로 분석하여 Fig. 3에 나타내었다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 동결을 하지 않은 신선정액의 생존율은 88.7±0.6%로 유의적으로 ($p < 0.05$) 가장 높은 생존율을 보였다. 한편, 자기활성 처리된 동결액에서 보존된 정자는 4000G에서 76±1.2%의 생존율로 신선 정액을 제외한 다른 처리군에 비하여 유의적으로 ($p < 0.05$) 높은 생존율을 보였다. 처리구에서 동결정액 중 2000G에서는 66.5 ±1.7%로 대조구에 비하여 유의적으로 ($p < 0.05$) 낮은 생존율을 보였다.

정자의 원형질막 검사(Hypoosmotic Swelling Test)

자기활성된 동결액을 처리하여 동결 용해 후 원형질막 기능 검사를 한 결과는 다음과 같이 Fig. 4에 나타냈다. Fig. 4와 같이 정자의 원형질막 기능을 검사한 결과, 신선정액 (36.0±1.6%), 4000G (37.7±0.6%) 그리고 6000G (35.0±1.1%)에서 유의적으로 ($p < 0.05$) 높게 나타났다. 한편, 동결

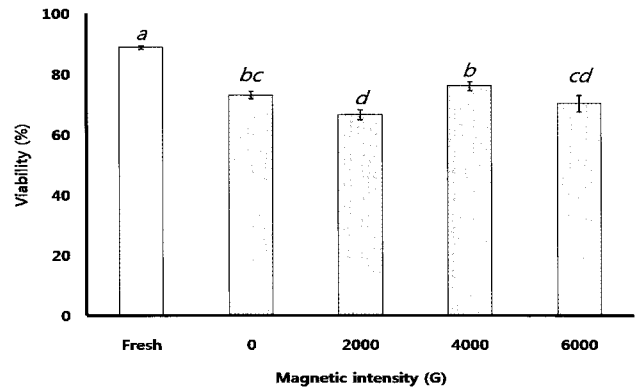


Fig. 3. Change of viability by magnetic intensity in fresh and cryopreserved semen of bulls. ^{a-d} Values in the same column with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$)

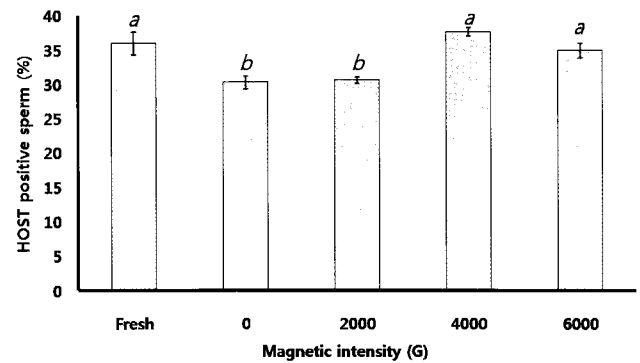


Fig. 4. Change of membrane intact by magnetic intensity fresh and cryopreserved semen in bulls. ^{a,b} Values in the same column with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$)

처리한 다른 처리구와 비교하여 보았을 때 0G (30.3±0.9%), 2000G (30.7±0.5)에서는 유의적으로 ($p < 0.05$) 낮게 나타났다.

정자의 미토콘드리아 검사

미토콘드리아 검사는 Rodamin123(sigma)에 의해 염색된 신선정액과 동결정액을 activation (intact)과 inactivation (damaged)으로 된 비율을 table 1에 나타내었다. Table 1에 나타낸 바와 같이 신선정액은 99.87±0.04%로 동결된 정액들에 비해 정상적인 기능을 하는 미토콘드리아 비율이 유의적으로 가장 높았으며, 손상율은 0.13±0.04%로 가장 낮게 나타났다 ($p < 0.05$). 자기활성 처리된 동결 정액은 처리하지 않은 동결정액 0G에서 2.72±0.35%로 유의적으로 ($p < 0.05$) 높은 손상율을 나타냈다. 처리구 내에서는 6000G에서는 1.40±0.08%로 유의적으로 ($p < 0.05$) 가장 낮은 손상율을 나타내었다. 미토콘드리아의 손상의 차이를 나타내기 위해 flow cytometry의 histogram을 이용하여 자력의 세기에 따른 미토콘드리아 손상의 차이를 Fig. 5에서 나타낸 결과 Table 1과 같은 경향을 나타냈다.

자기활성된 동결액 처리 후 정자의 침체 손상 검사

동결 전 자기활성된 동결액을 처리하여 동결 용해한

Table 1. Mitochondria function of frozen-thawed bull sperm by magnetic

Mitochondria function	Magnetic intensity (G)				
	Fresh	0	2000	4000	6000
Activation (Intacted)(%)	99.87±0.04 ^a	97.28±0.35 ^c	98.31±0.33 ^b	97.98±0.27 ^{bc}	98.60±0.08 ^b
Inactivation (Damaged)(%)	0.13±0.04 ^c	2.72±0.35 ^a	1.69±0.33 ^b	2.02±0.27 ^{ab}	1.40±0.08 ^b

^{a-d} Values in the same column with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

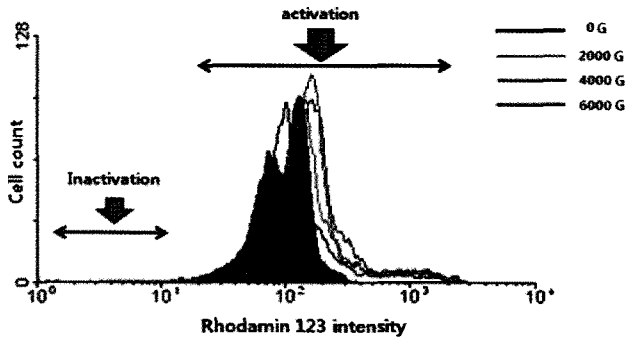


Fig. 5. Flow cytometric analysis of difference in mitochondria function of frozen-thawed bull sperm by magnetic water. Sperm was stained with Rhodamin123 and measured overlay by flow cytometric histogram.

정자를 FITC-PNA/PI로 형광 염색하여 flow cytometry를 통하여 첨체 손상 여부를 분석한 것을 Fig. 6에 나타내었다. 그 결과 Fig. 6에서 보는 바와 같이 0G, 2000G에서는 각각 44.4±2.3%와 46.2±4.2%로 유의적으로 ($p < 0.05$) 높은 첨체 손상을 나타냈다. 한편, 신선정액은 8.3±0.5%의 낮은 손상을 보인데 비해 다른 처리구들은 유의적으로 ($p < 0.05$) 높은 손상을 나타냈지만, 동결 용해한 처리구에 대해서 6000G가 26.7±2.9%로 유의적으로 ($p < 0.05$) 낮은 손상을 나타냈다. 자력의 세기에 따른 첨체의 손상의 차이를 나타내기 위해 flow cytometry로 분석된 결과를 Fig. 7에서와 같이 histogram으로 분석한 결과는 Fig. 6과 같은 경향을 나타냈다.

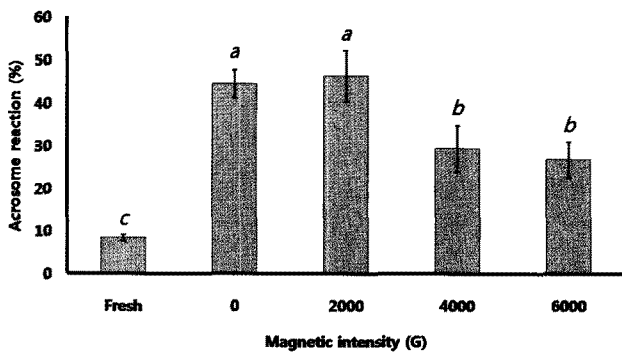


Fig. 6. Effect of magnetic water on acrosome damage in bull spermatozoa. ^{a-c} Values in the same column with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

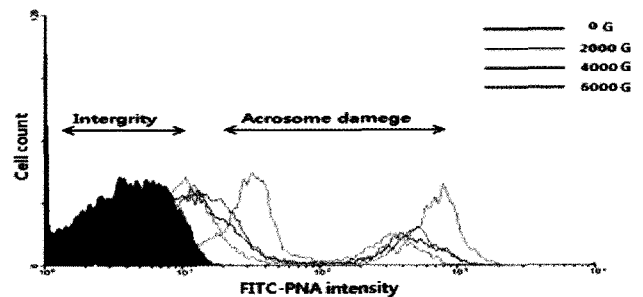


Fig. 7. Flow cytometric analysis of difference in acrosome damage of frozen-thawed sperm treated with magnetic water in bulls. Sperm was stained with FITC-PNA and measured overlay by flow cytometric histogram.

고찰

최근에 자석에 물을 통과시켜 물 분자 구조를 이온화시킨 자화수의 관심이 증가하고 있다. 이러한 자화수가 물속에 있는 전해질들은 이온화 정도가 높는데, 여기에 자기 처리를 하면 이온의 운동에너지가 전기에너지로 변화되면서 물의 화학적, 물리적 특성이 변화되어 전해질 이온은 다른 것과 결합하기 쉬운 상태로 활성화 된다. 이렇게 활성화 된 전해질들은 체내에서 흡수가 빨라지게 되어 조직 세포에서의 생체 활성이 촉진되어 체내 대사 과정에서 효소의 작용을 활성화시킬 수 있다 (Kang, 2005). 자화수는 체내에서 흡수되면 간 문맥을 통해 심장으로 가서 전신으로 순환하는데 혈액 속의 운동에너지 일부가 전기에너지로 변화하여 혈액 속에 새로운 전기가 발생되며, 전기에 의하여 지금까지 이온으로 되어 있지 않은 전해질들도 이온으로 바뀐다 (Kang, 2005). 이런 이온들이 자율신경에 작용하면 혈액순환을 원활하게 하므로 혈액순환과 관련된 여러 질환들을 치료하는 효과를 증진시킬 수 있을 것이다. 자화수의 생리적 효과로 신장이나 요도에서의 결석 형성을 저해하는 효과가 있는 것이 보고되었다 (Zhang 등, 1984).

본 연구는 소 정액 동결보존에 자기 활성화수 처리를 함에 있어서의 정자에 미치는 영향에 대해서 분석하기 위하여 수행되었다. 그동안 알려진 자기 활성화수의 효과들 중에 Ma 등 (1992)이 물을 자화시키면 물 분자 속의 수소결합이 깨져서 물의 분자간 힘이 감소되고, 그로 인해 자화수에 있는 물질들의 용해도가 증가한다고 보고하였다. Xu와 Sun (2008)은 물에 높은 자력을 걸게 되면 물의 삼투압의 증가에 대한 세포막의 침투성이 강해지고, pH

와 전기전도율이 높아진다고 보고하였다. 또한, Woo와 Mujumbar (2010)이 세포내 빙정의 크기가 작아진다는 보고들을 바탕으로 정자의 동결보존 과정에서 빙정 형성으로 인한 세포 손상을 줄여줄 수 있을 것으로 생각하여 소정액 동결보존 효율 증진을 기대하였다. 동결보존 과정 중 냉각충격이 야기되면 그로 인한 운동성 상실과 침체막 붕괴를 초래하게 된다 (Plummer와 Watson, 1985). 특히 정액 동결 시 정자의 생존율이 급격히 떨어지는 것은 동결 과정 중 급속한 냉각 또는 용해에 의한 온도변화에 따라 발생한다 (Huang 등 1999). 본 연구에서도 이와 같은 점에 초점을 맞춰 생존율, 침체손상율, 정자의 운동에 필요한 에너지를 생산하는 미토콘드리아 막 기능성 검사 그리고 동결과정 중 삼투손상의 정도를 분석하기 위해 저삼투압액을 이용한 정자 원형질막 강도검사 (HOST) 등을 실시하였다. 그 결과 자기활성된 동결액은 4000G의 세기에서 처리한 정자에서 다른 처리군에 비해 유의적으로 높은 생존율을 나타냈다($p < 0.05$). 이러한 결과는 원형질막 검사에서도 마찬가지로 4000G에서 높은 원형질막 기능 비율이 나타났다. 미토콘드리아의 막 기능 활성율에서 또한 자기력의 세기가 높을수록 미토콘드리아의 막 기능손상이 유의적으로 감소하는 것으로 나타났다 ($p < 0.05$). 또한, 침체 손상율에서도 자력의 세기가 높아질수록 침체 막의 손상이 유의적으로 낮아지는 것을 확인할 수 있었다 ($p < 0.05$). 이와 같은 결과들은 자기활성수에 의해 세포내 빙정의 크기가 작아진다는 보고 (Woo와 Mujumbar, 2010)에 부합하여 동결과정 중 빙정으로 인한 막 손상이 감소하였다는 것을 의미할 수 있다.

본 연구의 결과를 종합해 보면 소 정액 동결액내에서 자기활성 처리를 하였을 때 4000G의 세기에서 처리하였을 때 다른 처리군에 비하여 유의적으로 높은 생존율을 나타냈다 ($p < 0.05$). 한편, 자기의 세기가 높아질수록 정자 막 손상 정도 점진적으로 낮아지는 것을 볼 수 있었다. 이러한 점을 보았을 때 동결 보존액에서의 자기활성 처리를 하였을 때 자력의 세기가 강할수록 빙정이 작게 형성되어서 침체 손상에 있어서 막 손상을 줄여주는 것을 볼 수 있을 것이다. 하지만 너무 강한 세기를 주었을 시에는 오히려 생존율이나 원형질막에서 유의적으로 낮게 나타나는 것으로 나타났다. 앞으로 자기 활성을 통한 정자 동결시스템의 적용 시 정액보존효율이 개선될 수 있을 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구를 수행하는데 있어서 정액 정상분석을 하는데 FACS와 기타 장비를 사용하는데 있어서 도움을 준 강원대학교 동물자원공동연구소와 공동실험실습관에 감사드립니다.

인용문헌

- Gao DY, Mazur P, Critser JK (1997): Fundamental cryobiology of mammalian spermatozoa. In: Karow AM, Critser JK (eds) Reproductive Tissue Banking. Academic press, San Diego 263-327.
- Holt WV (2000): Basic aspects of frozen storage of semen. Anim Reprod Sci 62:3-22.
- Huang SY, Kuo YH, Lee WC, Tsou HL, Lee YP, Chang HL, Yang JJ (1999): Substantial decrease of heat-shock protein 90 precedes the decline of sperm motility during cooling of boar spermatozoa. Theriogenology 51:1007-1016.
- Isachenko E (2003): Vitrification of mammalian spermatozoa in the absence of cryoprotectants: from past practical difficulties to present success. Reprod Biomed Online 6(2):191-200.
- Kang BJ (2005): Magnetized Water. Seoul : Soe-Um Media Pub Co. : 49-63.
- Lednev VV (1991): Possible mechanism for the influence of weak magnetic field on biological system. Bioelectromagnetics 12(2):71-75.
- Ma YL, Ren H, Ren S, Zhen EK, Hao G, Zhao YW (1992): A study of the effect of magnetized water on enzyme activities by potentiometric enzyme electrode method. J Tongji Med Univ 12 (4):193-196.
- Plummer JM, Watson PF (1985): Ultrastructural localization of calcium ions in ram spermatozoa before and after cold shock as demonstrated by a pyroantimonate technique. J Rprod Fertil 75:255-263.
- Polge C, Smith AU, Parkes AS (1949): Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperature. Nature 164:666-676.
- Purdy PH (2006): A review on goat sperm cryopreservation. Small Rum Res 6:215-225.
- Trina V (1980): Artificial insemination and semen banks in Italy. In: Human Artificial Insemination and Semen Preservation. Plenum, New York, p 51.
- Woo MW, Mujumdar AS (2010): Effects of electric and magnetic field on freezing and possible relevance in freeze drying. Drying Technology 28(4):433-443.
- Xu YB, Sun SY (2008): Effect of stable weak magnetic field on Cr (VI) bio-removal in anaerobic SBR system. Biodegradation 19(3):455-462.
- Zhang YS, Wu HW (1984): Effect of magnetic water on urinary calculi-an experimental and clinical study. Acta Acad Med Wuhan 4(1):31-37.
- Zhang YS, Wu HW (1987): Effect of magnetic water on urinary calculi-an experimental and clinical study. Z Urol Nephrol 80(9):517-523.

(접수일자: 2011. 9. 7 / 채택일자: 2011. 9. 19)