

# 하천복원용 콘크리트 소재가 무당개구리 (*Bombina orientalis*) 배아에 미치는 영향

## Effects of Concrete Materials for the Stream Restoration on *Bombina orientalis* Embryos

박찬진<sup>1</sup> · 안홍규<sup>2</sup> · 계명찬<sup>1\*</sup> · 이태형<sup>3</sup>

<sup>1</sup>한양대학교 생명과학과, <sup>2</sup>한국건설기술연구원 수자원하천연구소, <sup>3</sup>(주)SBB

Chan Jin Park<sup>1</sup>, Hong Kyu Ahn<sup>2</sup>, Myung Chan Gye<sup>1\*</sup> and Tae Hyeong Lee<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Life Science, Hanyang University, Seoul 133-791, Korea

<sup>2</sup>Hydro Science and Engineering Research Institute, Korea Institute of Civil Engineering and Building Technology, Goyang-si 411-712, Korea

<sup>3</sup>Sinwoo Bio Bank Co., 157-5, Jangbang-ro, Gimhae-si 621-871, Korea

Received 21 May 2015, revised 3 June 2015, accepted 23 June 2015, published online 30 June 2015

**ABSTRACT:** Various adverse effects can occur due to direct exposure from toxic substances when toxic materials are used to restore river ecosystems. Thus, this study performed analysis on the development of toxicity in terms of survival and abnormality rates using embryos of *Bombina orientalis* living in Korea to analyze the toxicity of materials used in the river projects. The results showed that the toxicity in cement (C group) was the strongest whereas the toxicity in plant-based polyurethane (P1 group) was the weakest. Survival rates of *B. orientalis* embryos were 100%, 94 - 95%, 66 - 89% and 0% in control, P1, polyurethane (P2) and C groups, respectively. Abnormalities of embryos were 10.5%, 5.3 - 10.5%, 26.3 - 27.8% and 35.7% in control, P1, P2 and C groups, respectively. Furthermore, we verified that having a sufficient curing time reduced toxic substances that were extracted. The above result suggest that cement and polyurethane hamper the early development of amphibians. In conclusion, it is highly important to review biological safety with respect to the selection of materials used to restore rivers. This study shows the importance of the selection of eco-friendly materials and processes.

**KEYWORDS:** Amphibian, Cement, Developmental toxicity, Plant-based polyurethane

**요약:** 독성 소재를 활용하여 하천생태복원 사업을 추진할 경우, 수생 생물이 직접적으로 독성물질에 노출되어 다양한 생물학적 문제를 야기할 수 있다. 따라서, 본 연구에서는 하천사업에 활용되는 콘크리트 소재의 독성을 분석하기 위해 한국산 무당개구리 (*Bombina orientalis*) 배아를 이용하여 생존율과 기형발생률 측면에서 발생독성 분석을 수행하였다. 콘크리트 바인더들의 독성을 평가한 결과, 무당개구리 배아의 생존율은 대조군 (control), 식물성 폴리우레탄 (P1), 우레탄 (P2), 시멘트 (C) 실험군에서 각각 100%, 94 - 95%, 66 - 89%, 0%로 나타났다. 기형발생률은 대조군, P1, P2, C 실험군에서 각각 10.5%, 5.3 - 10.5%, 26.3 - 27.8%, 35.7%로 나타났다. 시멘트의 독성이 가장 강하게 나타났으며, 상대적으로 식물성 폴리우레탄의 독성이 가장 약한 것으로 나타났다. 또한, 충분한 양생시간을 가짐으로써 용출되는 독성물질이 저감되는 것을 확인하였다. 이상의 결과들로서 시멘트와 폴리우레탄은 양서류의 초기발생을 저해하는 것이 확인되었다. 본 연구는 하천복원을 위한 소재의 선택에 있어 생물학적 안전성을 검토하는 것이 매우 중요하며, 친환경 소재 및 친환경 공정 선택의 중요성을 보여준다.

**핵심어:** 양서류, 시멘트, 발생독성, 식물성 폴리우레탄

\*Corresponding author: [mcgye@hanyang.ac.kr](mailto:mcgye@hanyang.ac.kr)

© Korean Society of Ecology and Infrastructure Engineering. All rights reserved.

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>), which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

## 1. 서론

하천에는 치수적인 안전성을 확보하고 생물의 서식처를 제공하며 인간의 친수적인 기능을 제공하기 위하여 다양한 형태의 기술이 적용되고 있다. 특히, 홍수에 견딜 수 있는 안전성 확보가 전제되는 하천 공간에서는 어쩔 수 없이 경제적으로도 값싼 콘크리트제품을 사용하는 경우가 많은 것이 현실이다. 최근에는 이러한 콘크리트제품의 독성을 최소화하기 위하여 소량의 시멘트를 사용하거나  $Cr^{+6}$ 을  $Cr^{+3}$ 로 낮은 고로 슬래그 시멘트를 넣어 제작한 제품, 우레탄 계통의 접착바인딩을 활용한 제품 등이 개발되고 있는 상황이다 (Sato et al. 2008).

특히, 시멘트의 독성에 관한 연구는 과거부터 많이 진행되어왔는데, 그 중 시멘트를 활용한 제품의 경우 pH는 매우 높은 알칼리성을 나타내었고 (실험 후 pH 12.4), Pb, Cr, F는 비교적 많은 양이 검출되었는데 포틀랜드 시멘트가 고로 슬래그 시멘트에 비하여 약 5배나 많이 검출되며 (Sato et al. 2008) 급성독성, 부식독성, 알러지 유발에 따른 피부 민감화 등 인간을 비롯한 생물들에 해로운 영향을 미치는 것으로 보고되고 있다 (Hutton and Samis 2000, Winder and Carmody 2002). 이처럼 시멘트계 소재를 수환경 복원에 사용할 경우, 중금속을 포함하여 각종 유해물질의 용출에 주의하여야 하는데, 그 중 아연과 카드뮴이 용출되어 생태계에 미치는 위험을 지적하였고 이러한 시멘트독성은 서서히 속도는 늦추어지지만 약 10년 동안 장기적으로 용출될 수 있음을 지적하였다 (Dote and Maruyama 1998, Ogunbileje et al. 2013). 이처럼 독성을 내포하고 있는 소재를 활용하여 하천 생태복원 사업을 추진할 경우, 수생 생물이 직접적으로 독성물질에 노출되어 급성독성 효과가 유발될 수 있다 (Lalonde et al. 2011). 특히 독성물질이 가두어진 공간에서는 어류와 같은 수생 생물들이 폐사되어 육안으로 확인이 가능하지만, 하천 본류와 같은 유수역에서는 다른 곳으로 이동을 반복하기 때문에 두드러진 영향을 파악하기는 어려운 경향을 가지고 있다. 따라서 이를 대체할 고분자 화합물을 개발 및 활용하기 시작하였으며, polymer concrete (PC)가 개발되었다. 우레탄을 포함하는 PC는 미국에서 1950년대부터 사용되어 왔으며, 기존의 시멘트의 단점을 보완

할 수 있는 콘크리트 소재로 부각되었다. 그러나 최근에 단가, 내열성, 독성 등의 문제로 이를 대체할 수 있는 소재의 필요성이 대두되었다 (Fowler 1999).

빙어 (*Hypomesus olidus*)를 대상으로 시멘트에 대한 독성영향을 분석한 사례가 보고된 바 있지만 (Lee and Hur 2005), 현재까지 국내에서 이러한 하천복원 소재가 하천생태계에 미치는 영향에 관한 연구는 매우 미흡한 것이 현실이다. 따라서 하천복원 소재에 대한 자생 생물을 이용한 생물학적 독성평가의 중요성이 대두되고 있다.

양서류는 배아시기부터 유생시기까지 물속에서 생활하며 수중에 존재하는 오염물질에 직접적으로 노출된다. 이러한 특성은 어류 및 물벼룩 등과 유사하지만 독성실험에서 양서류가 갖는 가장 큰 장점은 어류와 물벼룩보다 인간과 진화적으로 더 가깝다는 것이다. 따라서 수중 노출실험이 가능한 생물들 중 가장 진화된 양서류를 이용한 독성평가는 특정 물질이나 혼합물이 인간에게 미칠 수 있는 영향을 간접적으로 확인할 수 있는 도구로서 활용되고 있다 (Kloas and Lutz 2006). 최근에는 이러한 양서류를 활용한 독성평가에서 자국에 서식하는 양서류 종을 활용하는 사례가 늘어나고 있으며, 국가마다 다른 종 분포, 산업구조, 환경오염특성을 반영한 생태독성평가가 발달하고 있다. 현재 국내에 서식하는 양서류 중 독성평가에 활용된 바 있는 종은 무당개구리 (*Bombina orientalis*)로서 현재까지 이를 이용한 단일물질 및 환경시료의 독성평가가 보고된 바 있다 (Park et al. 2010, 2014).

따라서, 본 연구에서는 하천사업에 활용되는 소재의 독성을 분석하기 위해 한국산 무당개구리 배아를 이용하여 생존율과 기형발생률 측면에서 시멘트, 폴리우레탄, 바이오우레탄, 일반 골재 등의 발생독성 분석을 수행하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1 실험동물 및 인공수정

발생독성평가에 사용된 무당개구리 배아는 성체 암컷과 수컷에 human chorionic gonadotropin (hCG; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 주사하고 포집을 유도하는 방법으로 획득하였다. 호르몬 주사

후 18시간 경과 시 수정란을 무당개구리 성체들로부터 분리하였으며, 3회 세척 후 포배단계 (blastula stage)까지 배양하였다. 배아의 발생단계가 포배단계에 도달 시 0.2% L-cysteine (pH 8.1)용액을 처리하여 젤리층을 제거하였으며, 정상적으로 포배단계에 도달한 배아만을 선별하여 실험에 사용하였다. 모든 실험과정에서 양서류 배아 배양액으로써 0.1X Marc's Modified Ringer's solution (0.1X MR; 0.01 M NaCl, 0.2 mM KCl, 0.1 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.2 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.5 mM HEPES, 0.01 mM EDTA, pH 7.4)을 사용하였다. 양서류 사육 및 모든 연구과정에서 ASIH (2004)의 제안사항을 준수하였다.

## 2.2 바인더, 골재 혼합 및 설치

본 연구에서 독성분석에 사용되는 모든 수조는 유리제품을 사용하여 플라스틱 유래 화학물질 용출을 차단하였다. 먼저 골재의 무게를 측정 후 식물성 폴리우레탄 (plant-based polyurethane), 폴리우레탄 (polyurethane), 시멘트 (cement) 등과 각각 혼합하였다. 이를 450 mm × 450 mm × 450 mm 크기의 유리 수조 바닥에 설치하였으며 (Fig. 1 a and b),

실험군은 총 6가지로 설정하였으며, 1) 식물성 폴리우레탄 200 g과 골재 10 kg을 배합 설치. 20분 경과 후 (양생 후) 양서류 배양액 (0.1X MR) 2 L 투입 (P1-1), 2) 폴리우레탄 200 g과 골재 10 kg을 배합 설치. 20분 경과 후 (양생 후) 양서류 배양액 (0.1X MR) 2 L 투입 (P2-1), 3) 식물성 폴리우레탄 200 g과 골재 10 kg을 배합 설치. 1일 경과 후 (양생 후)

양서류 배양액 (0.1X MR) 2 L 투입 (P1-2), 4) 폴리우레탄 200 g과 골재 10 kg을 배합 설치. 1일 경과 후 (양생 후) 양서류 배양액 (0.1X MR) 2 L 투입 (P2-2), 5) 시멘트 200 g과 골재 10 kg을 배합 설치. 1일 경과 후 (양생 후) 양서류 배양액 (0.1X MR) 2 L 투입 (C), 6) 골재 10 kg만 설치. 20분 경과 후 양서류 배양액 (0.1X MR) 2 L 투입 (Control group) 등으로 구분하였다.

본 실험에서 바인더 소재의 독성을 평가하기 위해 모든 실험군에 동일한 무게의 골재를 투입하였으며, 식물성 폴리우레탄, 우레탄을 바인더로 사용한 실험군들은 양생 시간을 20분, 1일로 구분하였다. 시멘트를 바인더로 사용한 실험군은 1일간 양생하였다. 모든 수조에 사용한 배양액은 멸균 후에 투입하였다. 수조에 배양액을 넣은 후 7일 경과 시 배양액을 회수하여 유리병에 담았으며, 실험 전까지 냉장 보관하였다. 회수된 배양액은 모두 발생독성평가를 위해 10%, 50%, 100% (원수) 농도로 희석하였으며, 이들의 독성을 동일 조건에서 비교하였다.

## 2.3 발생독성 평가

포배기 배아에 각각의 테스트시료를 처리한 후 22°C 인큐베이터에서 배양하였으며, 7일간 배양하여 완전한 유생으로 초기발생을 마치는 것을 확인하였다. 7일 경과 시 각 실험군의 모든 개체의 기형여부를 확인하고 사진으로 기록하였다. 또한, 이미지분석 프로그램을 통해 모든 생존 개체의 몸길이, 꼬리길이 등을 측정하였다. 기형발생률 및 성장률 통계분석을



(a)



(b)

Fig. 1. Installation of aggregates and binder mixture (a) and curing the concrete surface (b) in glass tank (450 mm × 450 mm × 450 mm).

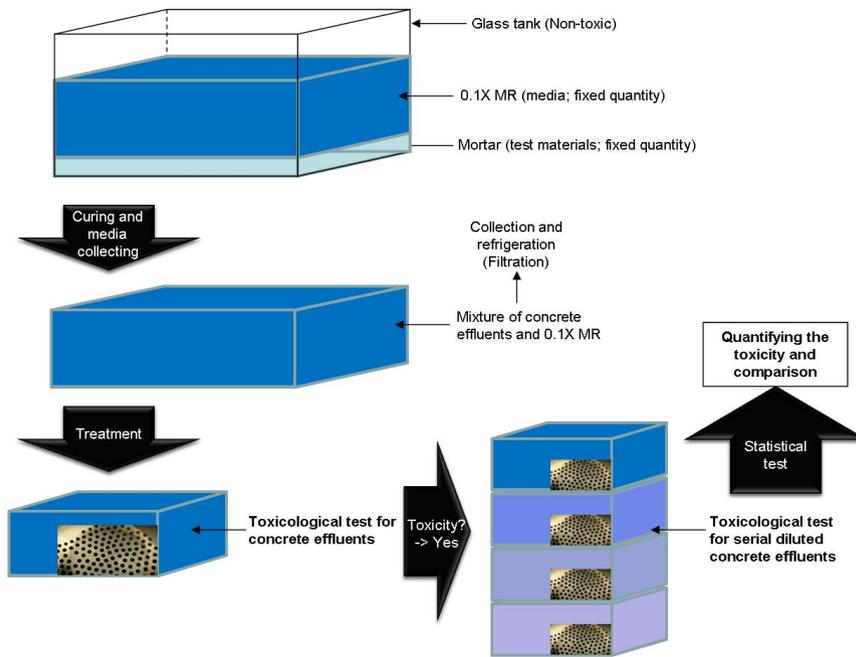


Fig. 2. Schematic drawing of preparations of test media for the toxicological experiment (MR, Marc's Modified Ringer's solution).

위해 일원배치 분산분석 (one-way ANOVA)을 사용하였다. 골재 및 바인더 설치, 발생독성 분석 과정을 다음과 같이 모식도로 나타내었다 (Fig. 2).

### 3. 결과

실험 개시 후 30분 경과 시 C 실험군 중 50%, 100% 시료에서 모든 배아가 폐사하였다 (Fig. 3). 그러나 C 실험군 10% 처리군에서는 폐사하지 않았다. 7일째 확인된 100% 시료에서 각 실험군의 생존율은 100% (Control), 95±10% (P1-1), 89±13% (P2-1), 94±13% (P1-2), 66±28% (P2-2), 0% (C)였으며, 50% 시료에서 각 실험군의 생존율은 86±13% (Control), 90±14% (P1-1), 70±41% (P2-1), 86±22% (P1-2), 83±17% (P2-2), 0% (C)였다. 10% 시료에서 각 실험군의 생존율은 100% (Control), 100% (P1-1), 100% (P2-1), 100% (P1-2), 95±10% (P2-2), 75±38% (C)로 확인되었다. 따라서 C 실험군을 제외한 나머지 실험군에서 물질 및 농도에 따른 배아의 생존율에 미치는 영향 차이는 뚜렷하게 나타나지 않았다. 특이할 점으로서 P2-2 실험군에서의 배아 생존율은 테스트 시료 농도 의존적으로 감소하는 것으로 나타났다



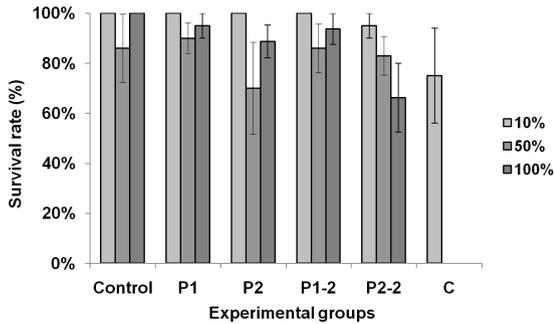
Fig. 3. *Bombina orientalis* embryos which died after 30 min when the treatment of 50% diluted cement effluent.

(Fig. 4).

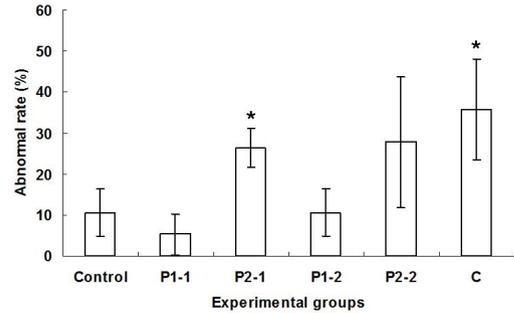
무당개구리 배아의 기형발생률은 실험개시 후 7일 경과 시 10% 시료에서 각 실험군의 기형발생률은 10.5±11.5% (Control), 5.3±10% (P1-1), 26.3±9.5% (P2-1), 10.5±11.5% (P1-2), 27.8±31.9% (P2-2), 35.7±10% (C)로 확인되었으며, 본 결과로서 C 실험군 배아의 기형률이 가장 높은 것으로 나타났다 (Table 1). 통계분석결과, P2-1, C 실험군에서 유의하게 기형발생률이 증가한 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 5). 관찰

된 기형의 유형으로는 복부 수포 (ventral blister; VB), 두부 기형 (head malformation; HM), 비정상적 장 꼬임 (abnormal gut coiling; AG), 혈종 (hematoma; HT), 꼬리 휨 (bent tail; BTL), 미부화 (unhatched;

UH) 등이었으며, 몸통 휨 (bent trunk; BT), 꼬리미 발생 (tail dysplasia; TLD) 등은 관찰되지 않았다 (Fig. 6). 특히, 초기발생을 마친 유생이 부화하지 못하는 현상 (UH)은 C 실험군에서만 관찰되었으며, 비



**Fig. 4.** Survival rate of *Bombina orientalis* embryos at 7 days after the treatment of test media. Embryos exposed to 10%, 50%, 100% diluted each test media, respectively. Error bars indicate SE (n=4) (Control, aggregates were cured for 20 minutes; P1-1, aggregates and plant-based polyurethane mixture was cured for 20 minutes; P2-1, aggregates and polyurethane mixture was cured for 20 minutes; P1-2, aggregates and plant-based polyurethane mixture was cured for 1 day; P2-2, aggregates and polyurethane mixture was cured for 1 day; C, aggregates and cement mixture was cured for 1 day).



**Fig. 5.** Percentages of Abnormal embryos at 7-days after treatment of each 10% diluted test media. Error bars indicate SE (n=4). \* indicates the significant difference from control at  $p < 0.05$  by one-way ANOVA (Control, aggregates were cured for 20 minutes; P1-1, aggregates and plant-based polyurethane mixture was cured for 20 minutes; P2-1, aggregates and polyurethane mixture was cured for 20 minutes; P1-2, aggregates and plant-based polyurethane mixture was cured for 1 day; P2-2, aggregates and polyurethane mixture was cured for 1 day; C, aggregates and cement mixture was cured for 1 day).

**Table 1.** Occurrence of various abnormality in *Bombina orientalis* by treatment of 10% diluted concrete effluent.

Abnormality*	Experimental groups**						Total
	Control	P1-1	P2-1	P1-2	P2-2	C	
VB	1	1	2	1	2	1	8
HM	0	0	1	1	1	1	4
AG	0	0	2	0	0	0	2
HT	1	0	0	0	1	0	2
BTL	0	0	0	0	1	1	2
UH	0	0	0	0	0	2	2
BT	0	0	0	0	0	0	0
TLD	0	0	0	0	0	0	0
Total	2	1	5	2	5	5	20
Survival embryos	19	19	19	19	18	14	108
Abnormal rate (%)***	10.5±11.5	5.3±10	26.3±9.5	10.5±11.5	27.8±31.9	35.7±10	18.5±19.6

\* VB: Ventral blister, HM: Head malformation, AG: Abnormal gut coiling, HT: Hematoma, BTL: Bent tail, UH: Unhatched, BT: Bent trunk, and TLD: Tail dysplasia.

\*\* Control, aggregates were cured for 20 minutes; P1-1, aggregates and plant-based polyurethane mixture was cured for 20 minutes; P2-1, aggregates and polyurethane mixture was cured for 20 minutes; P1-2, aggregates and plant-based polyurethane mixture was cured for 1 day; P2-2, aggregates and polyurethane mixture was cured for 1 day; C, aggregates and cement mixture was cured for 1 day.

\*\*\* Mean±SD (n=6)

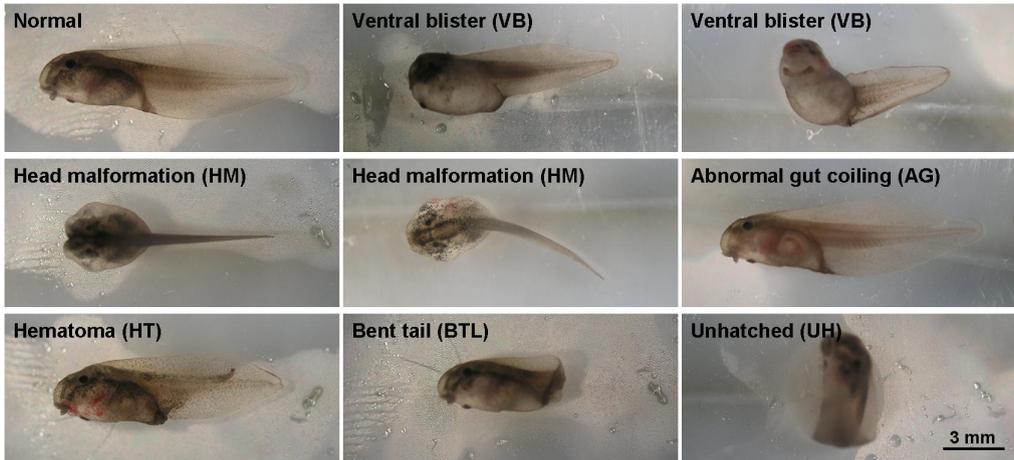


Fig. 6. Occurrence of various abnormality in *Bombina orientalis* by treatment of the concrete effluents.

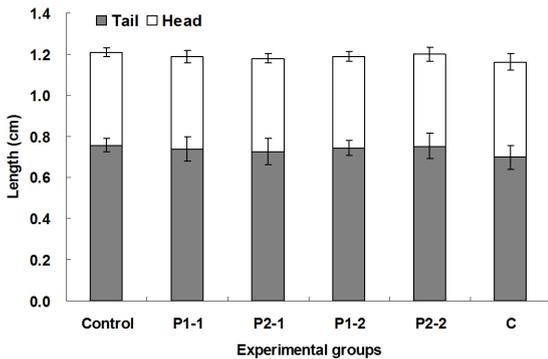


Fig. 7. The average body and tail length of *Bombina orientalis* embryos at 7 days after treatment of each 10% diluted test media. Error bars indicate SD (n>8) (Control, aggregates were cured for 20 minutes; P1-1, aggregates and plant-based polyurethane mixture was cured for 20 minutes; P2-1, aggregates and polyurethane mixture was cured for 20 minutes; P1-2, aggregates and plant-based polyurethane mixture was cured for 1 day; P2-2, aggregates and polyurethane mixture was cured for 1 day; C, aggregates and cement mixture was cured for 1 day).

정상적인 장 꼬임 (AG)는 P2-1 실험군에서만 확인되었다.

무당개구리 배아의 성장률은 실험개시 후 7일 경과 시 확인하였으며, 몸길기와 꼬리길기로 나누어 분석하였다. 모든 실험군에서 무당개구리 배아는 전체 길이 1.18±0.03 mm 범위로 부화하였다. 대조군의 꼬리길이는 0.76±0.02 mm로 나타난 것에 비해 C 실험군에서 꼬리길이가 0.72±0.04 mm로 확인되어 시멘트에 의한 성장률 감소현상이 관찰되었다. 그러나

실험군간에 통계적으로 유의한 차이는 확인되지 않았다 (Fig. 7).

#### 4. 고찰

무당개구리 배아의 생존율 측면에서 시멘트를 사용한 그룹에서 가장 높은 독성을 보였는데, 50% 희석시료에서 배아가 30분 이내에 세포용해 (lysis) 현상을 나타내며 모두 폐사하였다. 또한, 10% 시멘트 희석 시료 처리 시 배아의 생존율은 75% 정도로 확인되었지만, 생존한 배아 중 35%가 기형으로 확인되었다. 특히, 시멘트 희석시료 처리 시 초기발생을 마친 배아가 부화하지 못하는 것이 확인되었으며, 이는 시료 내에 존재하는 미지의 물질에 의해 무당개구리 배아의 부화 능력 상실 또는 배아를 둘러싼 난막의 변형이 원인인 것으로 사료된다.

식물성 폴리우레탄과 골재를 섞은 시료에서는 시간이 경과하여도 생존율에는 변화가 없었으나, 폴리우레탄과 골재를 섞은 시료에서는 시간이 경과함에 따라 생존율이 감소하는 양상을 나타내었다. 그러나 폴리우레탄과 골재를 혼합하여 설치하고 1일간 양생한 경우에는 20분간 양생한 경우보다 독성이 저감되는 것을 확인하였다. 배아의 기형발생률 측면에서도 폴리우레탄 그룹이 식물성 폴리우레탄 그룹보다 높은 기형유발률을 나타내었다. 특히, 폴리우레탄 용출수에 노출된 실험군에서 장 기형 (abnormal gut coiling) 이 확인되었으며, 이는 폴리우레탄을 이용해 콘크리

트 제작 시 양서류 배아의 장 형성에 영향을 미치는 물질이 용출될 수 있음을 의미한다.

기준에 보고된 바에 의하면 콘크리트에 대한 어류 (*Oncorhynchus mykiss*)의 96시간 반수치사농도 (96 hour median lethal rate; 96h LC50) 값은 박테리아 (*Vibrio fischeri*)와 물벼룩 (*Daphnia magna*)의 96 h LC<sub>50</sub> 값에 비해 약 1.5-1.6배 낮은 것으로 나타났다 (Lalonde et al. 2011). 이러한 결과는 원핵생물과 무척추동물에 비해 척추동물의 콘크리트 독성에 대한 민감도가 더 높을 수 있음을 의미한다. 어류만을 대상으로 한 연구에서 포틀랜드 시멘트를 빙어에 처리한 결과, 100 ppm 농도에서 96시간 노출 시 50%가 사멸하였으며, 500 ppm 96시간 노출 시 100%가 사멸하였다. 동일한 연구에서 배양액을 채수하여 pH를 측정할 결과, 대조군의 pH는 8.3으로 나타난 반면에 500 ppm 처리군에서는 pH가 10.9까지 상승한 것으로 나타났다 (Lee and Hur 2005). 이러한 결과는 급격한 pH 변화에 의해 수생 생물이 폐사할 수 있음을 보여주며, 본 연구에서 시멘트 침출수에 의해 모든 배아가 30분 이내에 폐사한 결과 역시 급격한 pH 변화에 따른 것으로 사료된다.

본 연구결과로서 시멘트는 양서류 배아에 대해 매우 높은 독성을 나타내었고, 폴리우레탄에서도 높은 기형 유발률을 보였으며, 상대적으로 식물성 폴리우레탄을 소재로 사용한 경우에 가장 낮은 독성을 나타내었다. 본 연구는 배아주기가 짧은 무당개구리를 이용하여 콘크리트 소재의 독성을 분석하였고 향후, 어류 및 저서동물을 대상으로도 생물학적 안정성 분석 실험이 추가로 이루어져야 할 것으로 판단된다. 따라서 하천복원을 위한 소재의 선택에 있어 생물학적 안전성을 검토하는 것이 매우 중요하며, 친환경소재 및 친환경공정 선택의 중요성이 요구된다. 따라서 하천을 삶의 터전으로 살아가는 수생 생물들의 삶에 무해한 하천복원소재를 활용한 복원이 이루어져야 할 것으로 판단된다.

## 감사의 글

본 연구는 국토교통부 물관리연구사업의 연구비 지원 (12기술혁신C02)에 의해 수행되었습니다.

## References

- ASIH. 2004. Guidelines for Use of Live Amphibians and Reptiles in Field and Laboratory Research. Herpetological Animal Care and Use Committee (HACC) of the American Society of Ichthyologists and Herpetologists, Lawrence, KS, USA. <http://www.asih.org/files/hacc-final.pdf>.
- Dote, Y. and Maruyama, T. 1998. Dissolution of heavy metals from ground materials solidified with Portland cement. Japan Society of Material Cycles and Waste Management 9: 188-197. (in Japanese)
- Fowler, D.W. 1999. Polymers in concrete: a vision for the 21st century. Cement and Concrete Composites 21: 449-452.
- Hutton, K.E. and Samis, S.C. 2000. Guidelines to Protect Fish and Fish Habitat from Treated Wood Used in Aquatic Environments in the Pacific Region. Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Sciences 2314. Fisheries and Oceans Canada, Vancouver, Canada.
- Kloas, W. and Lutz, I. 2006. Amphibians as model to study endocrine disrupters. Journal of Chromatography A 1130:16-27.
- Lalonde, B.A., Ernst, W., Julien, G., Jackman, P., Doe, K. and Schaefer, R. 2011. A comparative toxicity assessment of materials used in aquatic construction. Archives of Environmental Contamination and Toxicology. 61: 368-375.
- Lee, J.Y and Hur, J.W. 2005. Acute toxicity of cement on mortality of pond smelt (*Hypomesus olidus*). Korean Journal of Environmental Biology 23: 89-92. (in Korean)
- Ogunbileje, J.O., Sadagoparamanujam, V.M., Anetor, J.I., Farombi, E.O., Akinosun, O.M. and Okorodudu, A.O. 2013. Lead, mercury, cadmium, chromium, nickel, copper, zinc, calcium, iron, manganese and chromium (VI) levels in Nigeria and United States of America cement dust. Chemosphere 90: 2743-2749.
- Park, C.J., Ahn, H.M., Cho, S.C., Kim, T.H., Oh, J.M., Ahn, H.K., Chun, S.H. and Gye, M.C. 2014. Developmental toxicity of treated municipal wastewater effluent on the *Bombina orientalis* (Amphibia: Anura) embryos. Environmental Toxicology and Chemistry 33: 954-961.
- Park, C.J., Kang, H.S., Gye, M.C. 2010. Effects of nonylphenol on early embryonic development, pigmentation and 3,5,3'-triiodothyronine-induced metamorphosis in *Bombina orientalis* (Amphibia: Anura). Chemosphere 81: 1292-1300.
- Sato, S., Kuwabara, T., Ashida, H and Nonaka, T. 2008. Studies on dissolution characteristic of heavy metals from cement hydrates and its safety evaluation. Proceeding of Annual Conference in Japan Concrete Institute 30: 343-348. (in Japanese)
- Winder, C. and Carmody, M. 2002. The dermal toxicity of cement. Toxicology and Industrial Health 18: 321-331.