

Article

<https://doi.org/10.7745/KJSSF.2019.52.2.153>

pISSN : 0367-6315 eISSN : 2288-2162

Occurrence of Veterinary Antibiotics in the Groundwater of Arable Land

Young Kyu Hong, Won Suk Choi, Hye Ji Kim, Seung Yun Lee, and Sung Chul Kim*

Department of Bio-Environmental Chemistry, Chungnam National University, Daejeon 34134, Korea

*Corresponding author: sckim@cnu.ac.kr

ABSTRACT

Received: May 29, 2019

Revised: June 1, 2019

Accepted: June 3, 2019

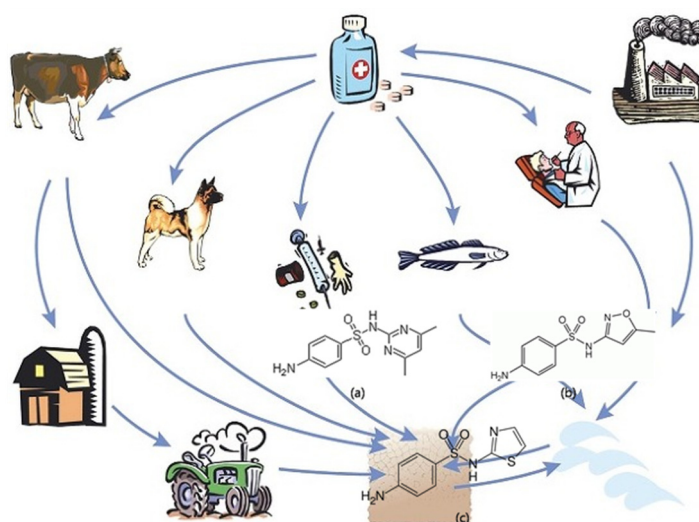
ORCID

Sung Chul Kim

<https://orcid.org/0000-0002-2521-6516>

Groundwater pollution has been concerned in the agricultural area due to release of fertilizer, pesticide, and veterinary antibiotics (VAs). Especially, emerging contaminants such as VAs can cause adverse effect not only on ecosystem but also on human health. Main objective of this research was to examine groundwater near at the animal feeding operation for evaluating occurrence of VAs. Groundwater sample was collected from five different province and three sulfonamides antibiotics (sulfamethazine: SMZ, sulfathiazole: STZ, sulfamethoxazole: SMX) were measured. Extraction of antibiotics was conducted with solid phase extraction and HPLC/MS/MS was used for quantification. Recovery of three antibiotics was ranged 88-126% and R^2 value of external calibration curve was 0.99 for all three compounds. Among 3 VAs, only SMZ was detected at the range of 26.6-40.0 ng L⁻¹. Comparing SMZ concentration between control (no animal feeding operation within 2 km radius) and sampling points (animal feeding operation within 0.5 km radius), no difference was observed. This result might indicated that occurrence of VAs in the groundwater can be originated from compost spread in the agricultural field and released into groundwater after rainfall as a nonpoint source. However, more detailed analysis is required for better understanding of VAs occurrence in the groundwater.

Keywords: Veterinary antibiotics, Groundwater, Sulfonamides, Nonpoint source



Occurrence of veterinary antibiotics in the groundwater.



Introduction

항생물질은 주로 인간과 가축의 질병 예방, 치료의 목적으로 사용되고 그 외에도 가축의 성장 촉진용으로 많이 사용되어 진다 (Kim et al., 2018; Seo et al., 2018). 그러나 환경 중에 항생물질의 잔류로 인한 항생물질 저항 박테리아 생성과 같은 문제가 발생하면서 1980년 말부터 항생물질을 신종 오염물질 (emerging contaminants)로 간주하였다 (Kivits et al., 2018).

인간과 가축에게 투여되는 항생물질은 10-20%만이 생체 내에서 활용되고, 80-90%가 소변, 대변 등의 분뇨의 형태로 배출된다 (Kumar et al., 2005; Masse et al., 2014). 배출된 항생제는 비점오염원의 형태로 수계로 유입되며 항생물질이 환경 내에 잔류하게 되는 주요 경로는 인간과 가축에 사용된 후 환경에 배출되는 경로, 수산용으로 사용되는 항생물질이 수계 내로 유입되는 경로, 그리고 항생물질이 생산되는 과정에서 직접 유출되는 경로 등 크게 3가지로 나눌 수 있다 (Blackwell et al., 2009; Spielmeier et al., 2017).

2015년 지하수 조사 연보 통계에 의하면 우리나라 전국 156만개 관정에서 연간 전체 지하수 이용량 40.9억 $\text{m}^3 \text{yr}^{-1}$ 중 농업용으로 사용되는 지하수의 양은 약 21.1억 $\text{m}^3 \text{yr}^{-1}$ 으로 전체 이용량의 51.6%를 이용하고 있다. 하지만 2015년 지하수 수질검사 결과 농촌지역 지하수 수질 오염 기준 초과율이 약 17.8%로 일반지역 (6.3%)에 비해 약 3배의 오염 기준 초과율을 나타냈다. 특히 2011-2012년 구제역과 AI 등에 의해 전국 약 4,679 개소의 가축 매몰지가 생겨남에 따라 침출수에 의한 주변 관정 지하수의 안전성에 대한 우려가 높아지고 있다.

농촌 지역 지하수의 주요 오염원은 농경지에 사용된 비료 또는 농약, 그리고 축산폐수 및 가축 분뇨 등이지만 최근 항생물질 또는 항생물질 저항 유전자 (ARG, Antibiotic Resistance Genes)와 같은 신종오염물질의 농촌 지하수 유입에 대한 가능성이 높아지고 있다 (Kemper, 2008). 특히 축사 주변에 위치한 지하수의 경우 질산성 질소 또는 항생물질과 같은 오염물질의 유입을 초래할 수 있다 (Burri et al., 2019). 미국의 경우 대단위 가축 사육 농장 인근 지하수에서 설펜아미이드 계열의 sulfamethazine이 $3.6 \mu\text{g L}^{-1}$ 의 농도로 검출되었으며 독일의 경우 농촌지역의 105개 지하수에 대해 수질을 검사한 결과 22종류의 동물용 항생제가 최대 $0.41 \mu\text{g L}^{-1}$ 의 농도로 검출되었다 (Watanabe et al., 2010; Sacher et al., 2001). 국내의 경우 농촌 지역의 지하수를 대상으로 33개의 의약품에 대해 조사한 결과 약 31종류의 의약품이 not detected- 49.3 ng L^{-1} 범위 수준에서 검출되었다 (Lee et al., 2019).

본 연구에서는 농촌 지역의 지하수 수질 중 동물용 항생제의 잔류 특성을 모니터링 한 후 가축 농장으로부터 인근 지하수로의 동물용 항생제 유입 가능성을 평가하였다.

Materials and Methods

시약 및 재료 본 연구에서 사용된 항생물질은 설펜아미이드 (sulfonamide) 계열 항생제 3종인 설펜메타진 (sulfamethazine, SMZ), 설펜티아졸 (sulfathiazole, STZ) 그리고 설펜메토자졸 (sulfamethoxazole, SMX)이었으며 FLUKA (USA)의 제품을 사용하였다 (Fig. 1). 항생물질의 정량을 위한 내부 표준물질로는 Accustandard사의 Simeton (673-04-1, $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, USA)을 사용하였다. 기기 분석을 위해 사용한 유기 용매인 메탄올 (methanol, MeOH), 아세토나이트릴 (acetonitrile, ACN), 그리고 물은 모두 HPLC등급을 사용하였다.

가축 매몰지 선정 및 시료채취 시료 채취는 전국 5개 지역 (강원, 경기, 충남, 충북, 전남)에서 축종별 (돼지,

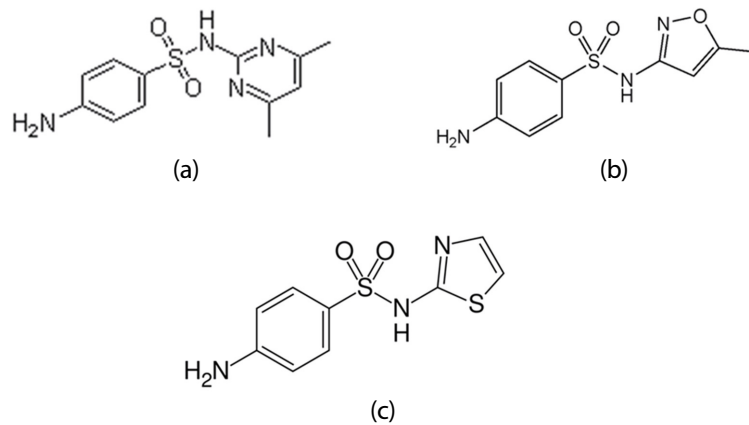


Fig. 1. Structure of sulfonamide antibiotics (a: SMZ, b:SMX, c:STZ)

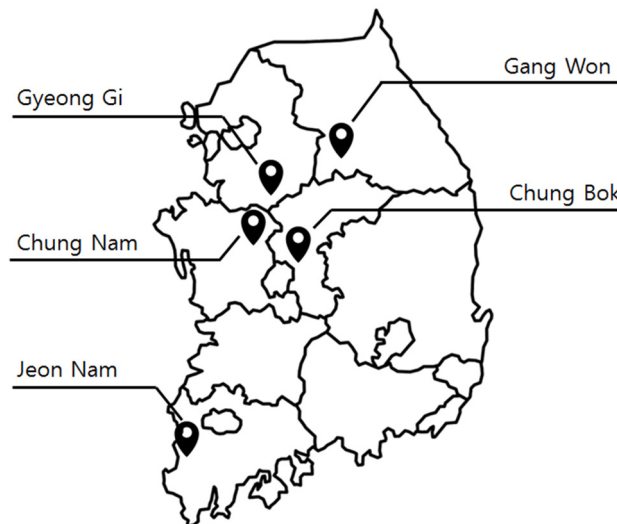


Fig. 2. Sampling location for analysis of veterinary antibiotics in groundwater.

소, 가금류) 농장이 위치한 지점을 중심으로 최소 반경 500 m 이내에 있는 지하수 관정에서 채취하였으며 대조구 시료는 최소 반경 2 km 이내에 가축 농장이 위치하지 않은 관정을 선택하여 채취하였다 (Fig. 2). 지하수 시료 채취는 베일러 (bailer)를 이용하였으며 채취된 시료는 500 mL 시료 채취용 백에 담은 후 실험실로 옮겨져 4°C에서 냉장보관을 하였다.

전처리 및 항생제 추출 항생제 분석을 위한 시료의 전처리는 시료 120 mL를 0.45 μm 여과지를 이용하여 감압 여과 후 250 mL 삼각플라스크에 취하였다. 여과된 시료에 40% H_2SO_4 (v/v)를 사용하여 시료의 pH를 2.5 ± 0.1 로 조절하고 5% EDTA (w/v) 500 μL 을 가한 후, 상온에서 150 rpm으로 15 분간 교반 하였다.

전처리 된 시료는 고형상 추출법 (SPE, solid phase extraction)을 이용하여 추출하였다. 메탄올, 0.5N HCl, 3차 증류수를 순서대로 3 mL씩 3 cc 60 mg 용량의 HLB 카트리지 (Oasis, Waters, USA)에 흘려보내 카트리지를 활성화 하였다. 시료를 카트리지에 통과시키기 위해 Teflon tube를 연결하여 유속을 2 mL min^{-1} 으로 조절하여 시료를 첨가하였으며 시료가 카트리지를 모두 통과하면 1분간 더 감압을 하여 카트리지를 완전히 건조시킨 후, 증류수 3 mL를 3회

카트리지에 흘려보내 세척 하였다. 카트리지에 흡착된 향생물질은 메탄올 5.0 mL를 이용하여 카트리지에서 분리한 후 추출액이 수집된 튜브에 내부표준물질인 simeton 50 μL (0.24 mg L^{-1})를 넣어 가볍게 흔들어주었다. 추출된 시료는 질소농축기 (N-EVAP-11, OASYS)에서 50°C 를 유지하면서 50 μL 까지 농축한 후 Mobile Phase A (0.1% formic acid + 99.9% 초순수 증류수) 70 μL 를 가하여 최종적으로 120 μL 를 Vial insert에 취해 -20°C 에서 냉동보관 하였다.

LC-MS/MS 분석 향생물질 분석에 사용된 기기는 충남대학교 공동실험실습관의 High Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometer (HPLC/MS/MS, 4000 Q trap, ABSCIEX, USA)를 사용하였으며, 이 동상의 조성은 A, 99.9% HPLC grade water + 0.1% formic acid(v/v); B, 99.9% acetonitrile + 0.1% formic acid(v/v)를 사용하였다. 향생제 분석에 사용된 컬럼은 공극 크기 (pore size)가 3.5 μm 이며, 내경이 4.6 mm인 Zorbax Eclipse Plus-C₁₈ (Agilent Technologies, USA)을 사용하였다. 향생제 분석을 위한 HPLC/MS/MS 조건은 다음과 같다 (Table 1).

향생제 분석에 대한 QA/QC 향생제 농도 정량을 위한 검량 곡선은 각 성분별로 표준용액 (100 mg L^{-1})을 이용하여 0.01, 0.02, 0.05, 0.10, 0.25, 0.50, 1.00 mg L^{-1} 의 농도로 제조한 후 작성하였다. 향생물질 각 성분에 대한 회수율은 대조구 (향생물질이 들어있지 않은 순수한 증류수)에 0.10, 1.00 mg L^{-1} 농도의 향생물질을 인위적으로 주입한 후 시료 분석 방법과 동일한 방법으로 추출하여 정량 산출하였다.

Table 1. optimized condition of HPLC/MS/MS for VAs analysis.

Equipment	Agilent 1200 High performance liquid chromatograph-API 4000 liquid chromatograph Tandem Mass spectrometry	
	Column	Zorbax Eclipse Plus-C ₁₈ 3.5 μm (4.6 \times 150 mm)
	Guard Column	Security Guard cartridge Kit
	Column temperature	25°C
	Mobile Phase	A : 99.9% HPLC grade water + 0.1% formic acid (v/v) B : 99.9% acetonitrile + 0.1% formic acid (v/v)
	Flow rate	0.7 mL/min
HPLC	Inject volume	5 μL
	Gradient condition	0 min : A 90% + B 10% 2 min : A 90% + B 10% 8 min : A 50% + B 50% 10 min : A 100% + B 0% 11 min : A 0% + B 100% 11.1 min : A 90% + B 10% 15 min : A 90% + B 10%
	Mode	Electronic Spray Ionisation (ESI)
	Drying and Nebulizer gas	Nitrogen gas
MS/MS	Drying gas flow	10.0 L/min
	Drying gas temperature	350°C
	Capillary Voltage	5,500 V

Results and Discussion

시료의 이화학적 특성 시료의 이화학적 특성은 Table 2에 정리하였다. 각 지역별로 가축 농장의 영향을 받지 않은 대조구는 A로 표시하였으며 농장 인근 지역의 지하수는 B로 표시하였다. 수질의 pH 범위는 6.2-7.6으로 농업용 지하수의 수질 기준인 6.0-8.5 범위 내에 존재하였다. 전기전도도인 EC와 암모니아태 질소의 농도 범위는 각각 175.5-809.0 $\mu\text{S cm}^{-1}$ 와 0.1-0.6 mg L^{-1} 였으며, 이는 2016년 환경부에서 조사한 지하수 수질 측정망의 자료 (EC: 18-13,092 $\mu\text{S cm}^{-1}$, 평균값 437 $\mu\text{S cm}^{-1}$)와 비교하였을 경우 농촌 지역 지하수의 수질 특성과 큰 차이가 없었다. 염소 이온 (Cl^-)과 질산태 질소 이온 (NO_3^-)의 농도 범위는 각각 3.1-132.3과 1.1-83.0 mg L^{-1} 였으며, 농업용 지하수의 수질 기준과 비교하였을 경우 염소 이온은 모두 기준 이하였고 질산태 질소 이온의 경우 강원 지역 농장 인근 지하수를 제외하고는 모두 기준 이하인 것으로 조사되었다. 강원 지역 농장 인근 지하수의 경우 기준인 20.0 mg L^{-1} 에 비해 약 4배 이상 높은 83.0 mg L^{-1} 의 질산성 질소 농도가 검출되었으며 이 지역은 축사 내에 지하수 관정이 위치해 있어 축산 분뇨에 의한 질소 유입 가능성이 있는 것으로 사료 된다.

항생제 분석의 회수율 설폰아마이드 계열의 3가지 항생제에 대한 검량선 작성 결과 R^2 는 평균 0.99로 측정되었으며 회수율은 SMZ, SMX, STZ 각각의 성분에 대해 129, 106, 88%의 회수율을 나타내었다 (Table 3). 환경부에서 제시한 QA/QC 핸드북에 의하면 유기 오염 물질의 회수율 범위는 70-130%로 되어 있으며 3가지 항생제 모두 허용 범위 내에 존재하였다.

Table 2. Summary of chemical properties of sample.

Region	pH	EC	NH_4^+	Cl^-	NO_3^-
		$\mu\text{S cm}^{-1}$		mg L^{-1}	
Gangwon A	7.1	122.3	0.3	3.1	5.4
Gangwon B	7.5	394.0	0.2	37.9	83.0
Gyeonggi A	7.4	203.9	0.4	12.3	1.1
Gyeonggi B	7.5	376.0	0.6	19.7	16.5
Chungnam A	6.9	274.0	0.3	15.1	10.2
Chungnam B	6.4	202.9	0.1	10.1	5.3
Chungbuk A	7.1	244.4	0.1	14.2	3.5
Chungbuk B	6.2	175.5	0.1	16.4	4.5
Cheonnam A	7.6	809.0	0.2	108.8	13.6
Cheonnam B	7.0	297.0	0.2	132.3	2.5
Groundwater quality in agricultural area	6.0 - 8.5	-	-	below 250	below 20

Table 3. Coefficient of determination and recovery of three sulfonamide compounds.

	Sulfonamides		
	SMZ	SMX	STZ
Recovery (%)	129	106	88
R^2	0.99	0.99	0.99

Table 4. Concentration of Sulfonamide in the groundwater.

Region	SMZ	SMX	STZ
	ng L ⁻¹		
Gangwon A	35.0	BDL	BDL
Gangwon B	26.6	BDL	BDL
Gyeonggi A	40.0	BDL	BDL
Gyeonggi B	40.0	BDL	BDL
Chungnam A	39.0	BDL	BDL
Chungnam B	35.7	BDL	BDL
Chungbuk A	BDL	BDL	BDL
Chungbuk B	BDL	BDL	BDL
Cheonnam A	BDL	BDL	BDL
Cheonnam B	BDL	BDL	BDL

BDL: Below detection limit (Detection limit for SMZ, SMX, STZ was 0.01 $\mu\text{g L}^{-1}$)

농촌 지하수 내 항생제 잔류 농도 총 3종류의 설파아마이드 계열 항생제에 대한 잔류 농도는 Table 4에 정리하였다. 3종류의 항생제 중 설파메타진 (SMZ) 만이 26.6-40.0 ng L⁻¹의 농도 범위에서 검출되었으며 나머지 2종류의 항생제인 SMX와 STZ는 모두 검출 한계 미만으로 분석되었다. Hannappel et al. (2014)와 Balzer et al. (2016)의 연구에 의하면 가축 농장 밀집 지역의 지하수에서 설파아마이드 계열의 항생제를 분석한 결과 설파메타진 (SMZ)과 설파디아진 (sulfadiazine)이 12 ng L⁻¹ 미만의 농도로 검출되었으며 설파메토자졸 (SMX)이 약 950 ng L⁻¹을 초과하였다. 네델란드의 경우 설파아마이드 계열의 항생제 중 SMZ와 SMX의 최대 검출 농도가 각각 21, 50-75 ng L⁻¹로 조사되었으며 설파디아진의 경우 검출 최대 농도가 30 ng L⁻¹로 보고되었다(Chitescu et al., 2012). 본 연구에서 검출된 항생제의 농도와 선행 연구의 결과를 비교하였을 경우 지하수에서 검출되는 설파아마이드 계열의 항생제 평균 농도는 100 ng L⁻¹ 미만으로 사료된다.

동물용 항생제는 항생제 각각의 특성에 따라 환경에 유입될 경우 이동 및 거동의 형태가 다르다. 설파아마이드 계열의 항생제는 다른 계열의 동물용 항생제 (Tetracycline, Macrolide, β -Lactam, Lincosamide, Quinolone etc)에 비해 흡착 계수(Kd) 범위가 0.2-3.1 L kg⁻¹로 매우 낮으며 이는 환경에 유입될 경우 고형상에 흡착되는 형태 보다는 물에 용존되어 지하수로 유입될 수 있는 가능성이 높은 항생제이다. 이와 반면 tetracycline (Kd: 400-1,620 L kg⁻¹)과 quinolone (Kd: 310-430 L kg⁻¹) 계열의 항생제는 환경에 유입된 후 고형상에 흡착되어 지하수로의 유입 가능성이 매우 낮다(Kivits et al., 2018). 따라서 본 연구에서 검출된 설파아마이드 계열의 항생제는 가축에게 투여된 항생제가 체외로 배출된 후 강우와 같은 비점오염원의 형태로 지하수로 유입된 것으로 판단된다.

강원, 경기, 충남 지역의 대조구와 가축 농장 인근 지하수 내의 SMZ 농도를 비교하였을 경우 농도차가 없는 것으로 조사되었다. 이는 지하수로 유입되는 항생제의 경우 가축 농장에서 유출되는 분뇨의 영향 보다는 농경지에 투입되는 퇴비 내에 잔류하는 항생제가 강우에 의해 지하수로 유입되는 것으로 판단되었다. 하지만 이에 대한 보다 자세한 연구는 필요하다.

Conclusions

농촌 지역 지하수 내의 동물용 항생제 잔류 가능성을 평가하기 위해 설파아마이드 계열 항생제인 SMZ, SMX, STZ

를 분석하였다. 분석 결과 3 종류의 항생제 중 SMZ만이 26.6-40.0 ng L⁻¹ 수준에서 검출되었으며 나머지 2종류의 항생제는 검출 한계 미만으로 조사되었다. 고형상 매질과 흡착이 잘 이루어지지 않으며 물에 잘 녹는 특성을 가진 설폰아마이드 계열의 항생제는 가축에 투여된 후 체외로 배출되어 비점오염원의 형태로 농장 인근 지하수로 유입되었을 것으로 추정되었다. 향후 다양한 계열의 동물용 항생제에 대한 지하수 유입 가능성을 평가하여 안전한 농촌 지하수를 확보하기 위한 관리 방안이 필요할 것으로 사료 된다.

Acknowledgement

This study was financially supported by research fund of Chungnam National University in 2017.

References

- Balzer, F., S. Zuhlke, and S. Hamnappel. 2016. Antibiotics in groundwater under locations with high livestock density in Germany. *Water Sci. Technol. Water Supply*. 16:1361-1369.
- Blackwell, P.A., P. Kay, R. Ashauer, and A.B.A. Boxall. 2009. Effects of agricultural conditions on the leaching behaviour of veterinary antibiotics in soils. *Chemosphere*. 75:13-19.
- Burri, N., R. Weatherl, C. Moeck, and M. Schirmer. 2019. A review of threats to groundwater quality in the anthropocene. *Sci. Total Environ*. 684:136-154.
- Chitescu, C.L., E. Oosterink, J. De Jong, and A.A.M. Stolker. 2012. Accurate mass screening of pharmaceuticals and fungicides in water by U-HPLC-Exactive Orbitrap MS. *Anal. Bioanal. Chem*. 403:2997-3011.
- Hannappel, S., F. Balzer, J. Groeneweg, S. Zuhlke, and D. Schulz. 2014. Incidence of veterinary drugs in near-surface groundwater below sites with high livestock density in Germany. *Hydrol. Wasserbewirtsch*. 58:208-220.
- Kemper, N. 2008. Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. *Ecol. Indicat*. 8:1-13.
- Kim, H.J., S.H. Lee, Y.K. Hong, and S.C. Kim. 2018. Effect of veterinary antibiotics on the growth of lettuce. *Korean J. Soil Sci. Fert.*, 51:119-127.
- Kivits, T., H.P. Broers, H. Beeltje, M. van Vliet, and J. Griffioen. 2018. Presence and fate of veterinary antibiotics in age-dated groundwater in areas with intensive livestock farming. *Environ. Pollu*. 241:988-998.
- Kumar, K., S.C. Gupta, Y. Chander, and A.K. Singh. 2005. Antibiotic use in agriculture and its impact on the terrestrial environment. *Adv. Agron*. 87:1-54.
- Lee, H.J., K.Y. Kim, S.Y. Hamm, M.S. Kim, H.K. Kim, and J.E. Oh. 2019. Occurrence and distribution of pharmaceutical and personal care products, artificial sweeteners, and pesticides in groundwater from an agricultural area in Korea. *Sci. Total Environ*. 659:168-176.
- Masse, D.I., N.M.C. Saady, and Y. Gilbert. 2014. Potential of biological processes to eliminate antibiotics in livestock manure: A Overview. *Anim. An Open Access J from MPDI*. 4:146-163.
- Sacher, F., F.T. Lange, H.J. Brauch, and I. Blankenhorn. 2001. Pharmaceuticals in groundwaters: analytical methods and results of a monitoring program in Baden-Wurttemberg, Germany. *J. Chromatogr. A*. 938:199-210.
- Seo, Y.H., S.J. Lim, S.C. Choi, S.J. Heo, B.S. Yoon, Y.H. Park, and D.K. Hong. 2018. Aeration effect on degradation of veterinary antibiotics in swine slurry. *Korean J. Soil Sci. Fert.*, 51:8-15.
- Spielmeier, A., H. Hoper, and G. Hamscher. 2017. Long-term monitoring of sulfonamide leaching from manure amended soil into groundwater. *Chemosphere*. 177:232-238.
- Watanabe, N., B.A. Bergamaschi, K.A. Loftin, M.T. Meyer, and T. Harter. 2010. Use and environmental occurrence of antibiotics in freestall dairy farms with manured forage fields. *Environ. Sci. Technol*. 44:6591-6600.