

Evaluating Plant Uptake of Veterinary Antibiotics with Hydroponic Method

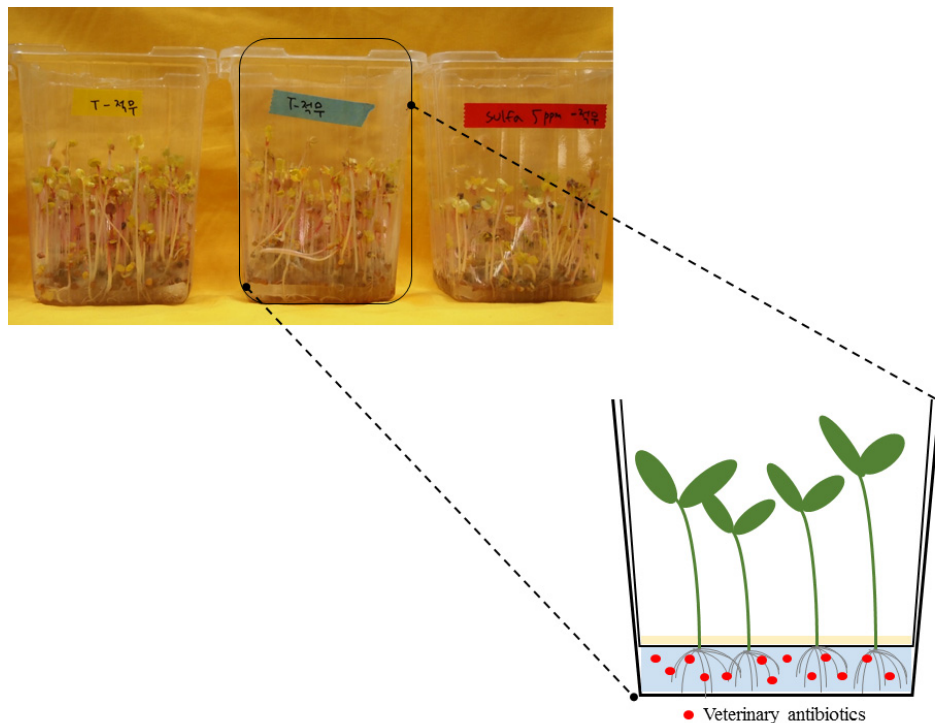
Saet Byel Park, Sun Ju Kim, and Sung Chul Kim*

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

(Received: April 26 2016, Revised: May 29 2016, Accepted: May 31 2016)

Veterinary antibiotics (VAs) has been used to treat animal disease and to increase animal weight as growth promoter. However, abused usage of VAs can cause production of antibiotic resistance genes (ARGs) in the environment and additionally, residual of VAs in soil can be transferred into crops. Therefore, main objective of this research was to examine bioaccumulation of VAs in sprouts (red cabbage, *Brassica Olearacea L. var. Capitata f. rubra* and red radish, *Raphanus sativus*) with hydroponic method. Total of 7 VAs in 2 different classes of VAs (tetracyclines: tetracycline, oxytetracycline, chlortetracycline, sulfonamides: sulfamethoxazole, sulfamethazine, sulfamethiazole, macrolides: tylosin) were evaluated and experiment was conducted with solid phase extraction (SPE)/ high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (HPLC/MS/MS). Initial spiked concentration of 7 VAs was 5 mg L⁻¹ and cultivation period was 8 days. Result showed that growth of sprouts was inhibited about 23-27% when VAs was introduced. Amount of bioaccumulated VAs was also differed depending on class of VAs. The highest amount of bioaccumulated VAs was tetracycline and sulfamethoxazole in each class with a concentration of 4.05, 7.73 mg kg⁻¹ respectively. Calculated transfer ratio of VAs into crops was also ranged 0.38-54.27%. Overall, bioaccumulation of VAs in crops can be varied depending on crop species and class of VAs. However, further research should be conducted to verify bioaccumulation of VAs in crops in the soil environment.

Key words: Veterinary antibiotics, Hydroponic cultivation, Sprouts, Bioaccumulation, Worst case scenario



Picture of hydroponic experiment for uptake of veterinary antibiotics with seedlings.

*Corresponding author: Phone: +82428216737, Fax: +82428216731, E-mail: sckim@cnu.ac.kr

§Acknowledgement: This study was financially supported by research fund of Chungnam National University in 2014.

Introduction

항생제는 가축의 질병을 예방하거나 치료의 목적으로 사용되지만 이러한 항생제가 환경에 유입되면서 항생제 저항 박테리아 (ARGs, Antibiotic resistance genes) 생성이라는 문제점을 발생시킬 수 있다 (Kemper, 2008).

가축용 항생제는 우리나라의 경우 2005년부터 지속해온 농림축산식품부의 배합사료제조용 항생제 감축 정책으로 가축용 항생제 사용량이 지속적으로 감소하여 2013년 기준 약 820톤가량 사용 되고 있다. 그러나 가축의 사육두수는 지난 10년에 비해 점차 증가하고 있다 (KOSIS, 2014). 가축용 항생제는 섭취 후 체내에서 약 10~70%정도 흡수되고 분이나 뇨의 형태로 30~90% 정도 환경 내로 배출된다 (Hu et al., 2010). 환경으로 배출된 항생제는 분뇨 혹은 퇴비의 형태로 유입되며, 강우에 의해서 지하수 또는 지표수로 유입되어 환경에 잔류하게 된다 (Herberer, 2002; Kemper, 2008; Sarmah et al., 2006).

항생제의 환경 내 잔류 농도를 살펴보면 국외의 경우 소, 돼지, 가금류의 분뇨와 퇴비더미를 쌓아 놓은 곳에 인접한 토양 또는 돼지축산폐수와 연결된 강의 침전물 등을 시료로 하여 분석한 결과 항생제의 검출 범위가 약 16.65~66.58 mg kg⁻¹인 것으로 조사되었다 (Ji et al., 2012). 또한 돼지의 분뇨에 잔류하는 Tetracyclines의 총 농도가 약 117.1~1,264.0 µg kg⁻¹의 범위로 검출되었으며 퇴비화 과정을 통해서 약 88.3~850.8 µg kg⁻¹으로 감소하는 것으로 조사 되었다 (Qiao et al., 2012). 국내의 경우 우분 퇴비 공장에 인접한 농업용 수로에서 채취한 시료의 분석결과 TCs계열의 총합은 0.88~1.43 µg L⁻¹, SAs계열의 총합은 0.66~1.67 µg L⁻¹로 조사되었다 (Lim et al., 2009).

현재 우리나라의 경우 매년 가축분뇨의 발생량은 증가하는 추세이며, 2013년을 기준으로 배출량이 약 177,105 m³d⁻¹로 조사되었다. 이처럼 배출된 분뇨는 약 92%가 자원화 (퇴비 또는 액비화)되어 처리하고 있는 실정이다 (KOSIS, 2014).

선행연구에서는 분뇨에 대사물질의 형태로 배출되는 항생제에 대하여 내성균이 있을 것이라 판단하였으며, 항생제

내성률을 검사한 결과 1종이상의 항생제에 내성을 보이는 균주가 약 83.6%로 매우 높게 나타났다 (Kwon et al., 2012). 따라서 동물용 항생물질의 환경 내 잔류와 그에 따른 항생제 내성 박테리아의 생성은 농업환경과 인간의 건강에 악영향을 미칠 수 있다 (TOLLS, 2001).

Seo et al. (2007)이 연구한 결과에서, 한국에서의 항생제 소비량 및 잠재적으로 배출 가능성이 큰 물질들을 선별하여 높음, 중간, 낮음으로 분류하였고, 그 중 8개의 항생제 즉 amoxicillin, carbadox, chlortetracycline, neomycin, oxytetracycline, sulfamethazine, sulfathiazole, tylosin의 경우 환경에 위해를 미칠 가능성이 높은 집단으로 분류하였다.

이에 따라 본 연구에서는 가축용 항생제의 환경 유입 시 인간의 건강에 악영향을 미칠 수 있는 항생제의 작물 전이를 평가하기 위해 수경 재배법을 사용하여 동물용 항생제의 작물전이 가능성을 평가하였다.

Materials and Methods

시약 및 재료 본 연구에서는 총 2개월 7종류의 동물용 항생물질, Tetracyclines (Chlortetracycline, Oxytetracycline, Tetracycline), Sulfonamides (Sulfamethazine, Sulfamethoxazole, Sulfathiazole), Macrolides (Tylosin)를 사용하였으며 Sulfathiazole (72-14-0, ≥98%), Sulfamethoxazole (723-46-6 ≥97%)은 FLUKA (USA)사의 제품을 사용하였고, Sulfamethazine (57-68-1, ≥99%), Tetracycline Hydrochloride (64-75-5, ≥95%), Chlortetracycline hydrochloride (64-72-2, ≥97%), Oxytetracycline hydrochloride (2058-46-0, ≥95%)는 Sigma Aldrich (USA)사의 제품을 구매하여 사용하였다 (Table 1, Fig. 1). 시료의 추출용매 (Methanol, Acetonitrile)는 대정 화금(주)의 HPLC급을 사용하였다. 고형상 추출법에 사용된 카트리지는 Oasis HLB Catridge (3 cc, 60 mg)이며 Waters 사의 제품을 사용하였다. 내부 표준물질으로는 Accustandard 사의 Simeton (673-04-1, 100 µg mL⁻¹, USA)을 사용하였다. 실험에 사용된 증류수는 Fisher 사의 HPLC급을 사용하였다.

작물체 내 잔류항생제 분석을 위해 사용된 시약 중

Table 1. Selected Chemical properties of veterinary antibiotics used in this study (Tolls et al., 2001; Thiele-Bruhn et al. 2005).

Chemical groups	Compound	CAS number	M.W	Log K _{ow}
Tetracyclines	Tetracycline(TC)	64-75-5	444.44	-1.19
	Oxytetracycline(OTC)	2058-46-0	460.44	-0.9
	Chlortetracycline(CTC)	64-72-2	478.89	-0.62
Sulfonamides	Sulfamethazine(SMT)	57-68-1	278.33	0.89
	Sulfamethoxazole(SMX)	723-46-6	253.27	0.89
	Sulfathiazole(STZ)	72-14-0	255.32	0.05
Macrolides	Tylosin(TYL)	69-53-4	915.45	3.5

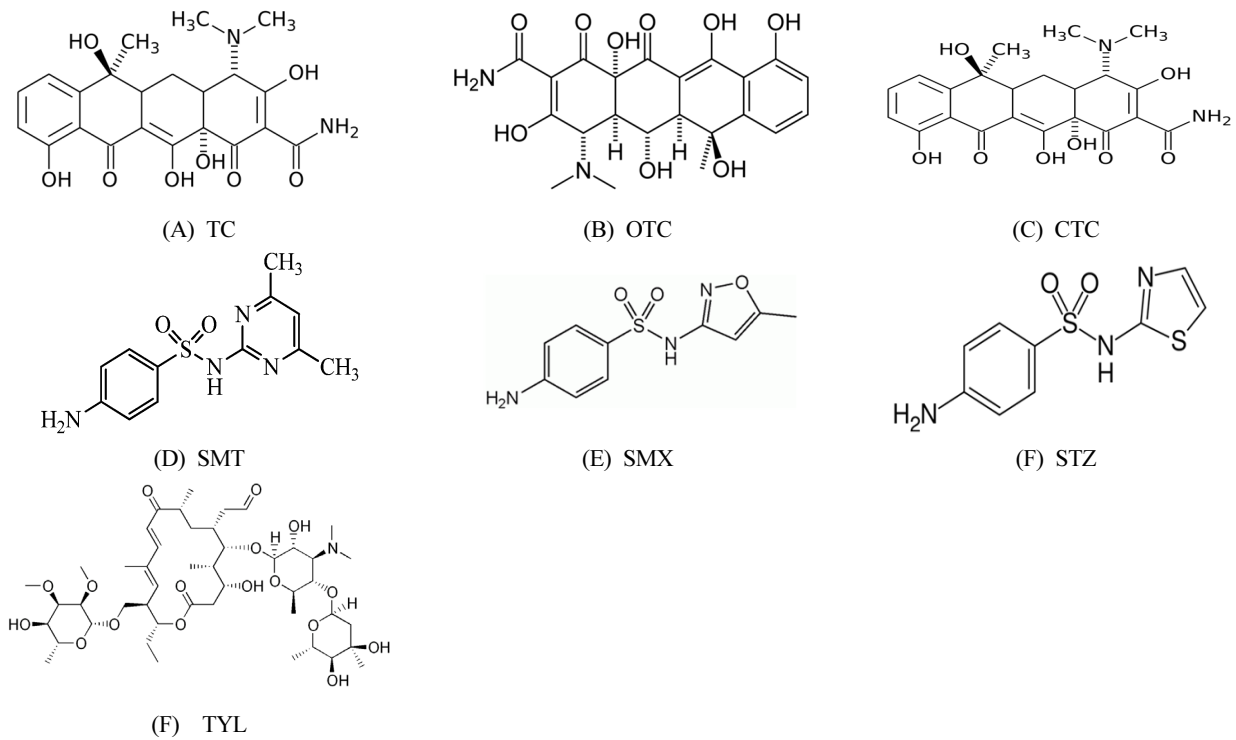


Fig. 1. Chemical structure of 7 veterinary antibiotics used in the experiment.

Phosphate buffer는 19.3 g sodium phosphate monohydrate와 85% H_3PO_4 10 mL을 넣고 증류수로 총 1 L로 한 용액을 사용하였으며, 제조 후 상온보관 하였으며 7일 이내에 사용하였다.

내부표준물질인 Simeton은 표준용액 (100 mg L^{-1})을 HPLC 급 증류수를 이용하여 10 mg L^{-1} 으로 희석하여 냉장보관 하였으며, 표준용액 제조시에는 1 mg L^{-1} , 실험에는 0.24 mg L^{-1} 의 용액으로 제조하여 사용하였다.

표준용액의 제조 항생물질의 표준원액은 항생제 7종을 10 mg 씩 정밀히 칭량 (AS200S, OHAUS)하고, 100 mL 부피플라스크에 메탄올을 이용하여 제조한 것을 사용하였으며, 4°C 에서 냉장 보관 후 3일 이내의 것만 사용하였다. 혼합표준용액은 100 mg L^{-1} 의 표준원액을 10 mg L^{-1} 로 Fisher사 (USA)의 HPLC 급의 증류수로 희석하여 사용하였다. 검량선을 작성 할 때에는 모든 표준용액에 내부표준물질인 simeton을 100 mg L^{-1} 을 첨가하여 기기의 감응을 확인하였다. 표준용액은 분석 직전 최종 0.01 , 0.05 , 0.1 , 0.5 , 1 mg L^{-1} 농도가 되도록 증류수로 희석하여 검량선 작성에 사용하였다. 각 항생물질에 대한 특성은 Table 1에 정리하였다.

새싹채소 재배 및 작물 흡수 시험 본 시험에 사용된 새싹채소는 현재 우리나라에서 많이 재배되는 적양배추 (red cabbage, *Brassica oleracea L. var. capitata f. rubra*)와 적무 (red radish, *Raphanus sativus*)를 사용하였으며

재배시험은 식물 생장시설 (growth chamber, Sejing scientific co. SJ-530PL)에서 수경재배로 실시하였다. 적양배추와 적무 종자는 각각 2 g 씩 칭량하여 초순수 증류수에 30분간 침종시킨 후 소형 플라스틱 재배 용기 ($7 \times 7 \times 12 \text{ cm}$)를 이용하여 발아시켰다. 식물 생장시설 내 시험 조건은 온도를 $22\text{--}23^\circ\text{C}$ 로 유지하였으며 습도는 $45\text{--}60\%$ 로 유지하였다. 재배 시험은 총 8일간 실시하였으며, 처음 3일동안 암조건을 유지하여 발아시킨 후, 3일이 지난 4일에서 8일 동안은 광조건과 암조건을 각각 16시간, 8시간으로 교대하여 재배하였다.

항생물질의 적무, 적양배추에 대한 작물 흡수시험을 위해 계열별 혼합용액을 5 mg L^{-1} 로 조제한 후 재배용기에 용액을 만들어 4°C 에서 냉장 보관한 용액을 사용하였다. 재배 기간 동안 동일한 농도를 유지하기 위하여 매일 오전 10시에 각 처리구 별로 $5\text{--}10 \text{ mL}$ 보충하였다. 처리구의 설치 방법은 대조구의 경우 항생물질을 첨가하지 않은 초순수를 이용하여 재배하였으며, 각 처리구는 항생제 계열 (TCs, SAs, MLs)별로 제조한 용액을 사용하여 각각 3개의 반복구를 설치하였다.

작물체 내 잔류 항생제 분석을 위한 각 작물체의 시료는 총 8일 동안의 재배 후, 뿌리를 제외한 가식부분을 수확 하여 증류수로 3회 세척하였으며, 가식부의 수분을 페이퍼 타월로 제거한 후, 각 처리구의 작물체를 10개 씩 선정하여 가식부의 길이와 생중량을 측정하여 작물의 생육을 조사하였다. 생육 조사 후, 수확한 작물체는 잔류 항생제 분석을 위

하여 -80°C에서 약 1일간 동결 후 3일간 동결 건조 (SFDSF12, SAMWON) 하였다. 동결건조 한 시료는 즉시 건조기 (FO-600M, JEIO TECH)에 넣고 30°C에서 3시간 건조시킨 후, 막자사발을 이용하여 분말로 만들어 항생제 분석에 사용하였다.

작물체 내 잔류 항생물질 추출 작물체 내 잔류 항생물질의 분석을 위한 추출 방법은 미국 환경청 (US Environment Protection Agency, EPA)에서 제시한 “Method 1694: Pharmaceuticals and Personal Care Products in Water, Soil, Sediment and Biosolids by HPLC/MS/MS”을 참조하여 수정 후 사용하였다. 분석 방법은 다음과 같다. 분말 한 작물체 시료 0.1 g을 정확히 칭량하여 50 mL Polypropylene tube에 담은 후 15 mL phosphate buffer를 넣고, HCl로 pH를 2.0으로 조절 하였다. 그 후 20 mL Acetonitrile (ACN)을 넣은 후 30분간 초음파 분해 (Power sonic 420, 화신테크) 하였으며, 원심분리기 (MF80, 한일)를 이용하여 3,000 rpm으로 5분간 원심분리 하였다. 원심분리 한 상등액은 Whatman GF/C filter paper로 감압 여과한 후 250 mL 삼각플라스크에 넣었다. 상등액을 분리하고 남은 침전물은 위의 추출 방법을 이용하여 한 번 더 추출 한 후, 원심분리와 감압여과를 실시하여 동일한 삼각플라스크에 넣었다. 그 후 남은 침전물은 15 mL ACN으로 한 번 더 추출하여 원심분리와 감압여과를 실시하였다. 총 3회 추출한 여과액의 부피가 85 mL이 되도록 하여 250 mL 둥근바닥 플라스크에 옮겼으

며, 삼각플라스크의 기벽에 남아 있는 여과액은 ACN을 이용하여 회수하였다. 여과액이 담긴 둥근바닥 플라스크를 감압식 회전 증류기 (BICHI R-124)를 이용하여 50°C에서 15 - 20 mL가 남도록 농축 한 후 5% Na₂-EDTA 500 µL를 둥근바닥 플라스크에 넣어 총 부피가 120 mL가 되게 초순수를 사용하여 조절한 후 2 - 3회 정도 흔들어주었다. 최종적으로 0.2 µm Cellulose Acetate membrane filter를 이용하여 감압여과 한 여과액은 고형상 추출을 실시하였다 (Fig. 2).

고형상 추출방법 (Solid Phase Extraction, SPE) 작물체 내 항생물질 분석을 위해 사용한 고형상 추출방법 (Solid Phase Extraction, SPE)은 Kim and Calson (2007)의 논문을 참고하였다. 항생물질 포집은 OASIS® HLB Extraction Cartridge (3 cc, 60 mg, WAT094226, Waters, USA)를 사용하였다. 펌프 (DOA-P704-AC, GAST)의 압력은 40 psi 아래로 유지하며, 카트리지가 마르지 않도록 Methanol 3 mL, 0.5 N HCl 3 mL, 초순수 3 mL를 순차적으로 통과시켜 활성화 하였다. 이 후 카트리지와 전처리가 끝난 시료를 Teflon tube을 이용하여 연결 한 후, 감압펌프를 사용하여 압력과 유속이 각각 40 psi, 2 mL min⁻¹가 되도록 설정하였다. 전처리 시료를 포집한 후 Teflon tube를 제거하고, 초순수로 3 mL씩 3회 (총 9 mL) 세척하였다. 세척 후 항생물질을 추출하기 위해 15 mL Cornical bottom Centrifuge tube를 이용하였으며, 이 때 내부표준물질인 simeton을 0.24 mg L⁻¹ 50 µL씩 tube에 넣고 같은 tube를 Rack에 꽂아 Vaccum manifold (AHO-6023, Phemenex, USA) 안에

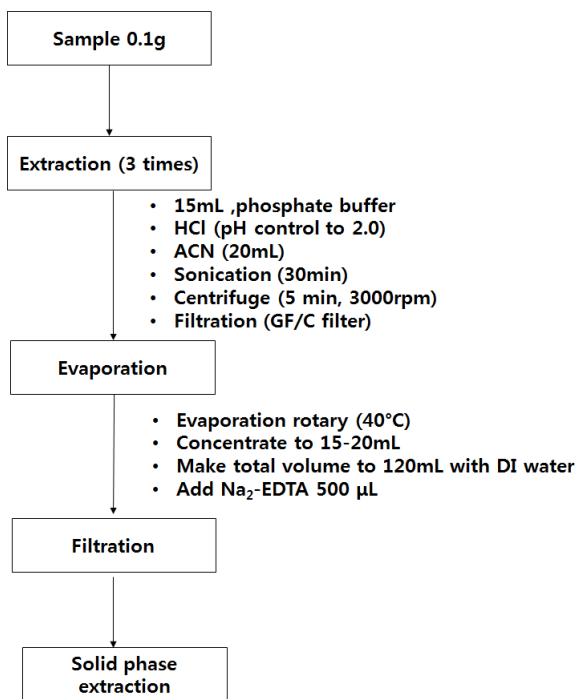


Fig. 2. Schematic diagram of extraction for veterinary antibiotics in crops.

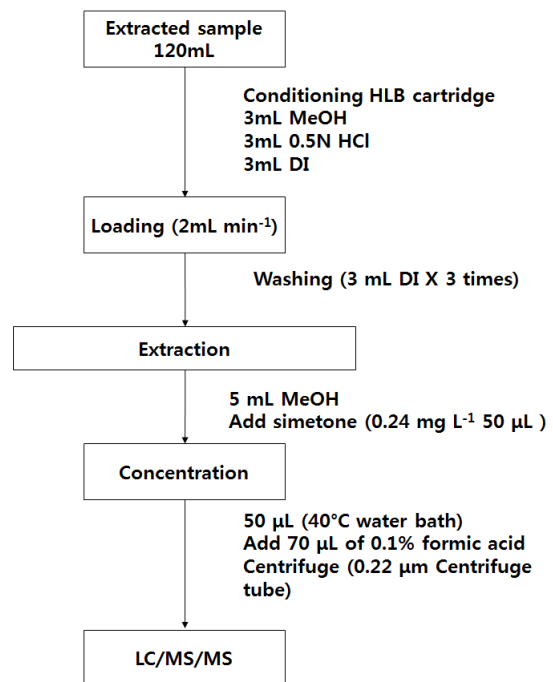


Fig. 3. Schematic diagram of solid phase extraction (SPE) for veterinary antibiotics in crops.

Table 2. Parameters of high performance liquid chromatography for quantification of veterinary antibiotics in crops.

Equipment	Agilent 1200 High performance Liquid Chromatograph API 4000 Liquid chromatogra Tandem Mass spectrometry	
	Column	XTerra C18 2.5 μm
	Guard Column	Security Guard cartridges Kit
	Column temperature	25°C
LC condition	Mobile phase	A : 99.9% D.I water + 0.1% Formic acid (v/v) B : 99.9% ACN + 0.1% Formic acid (v/v)
	Flow rate	0.3 mL min ⁻¹
	Gradient condition	0 min : A : 96% + B : 4% 19 min : A : 70% + B : 4% 20 min : A : 96% + B : 4% 30 min : A : 96% + B : 4%
MS/MS Condition	Mode	Electronic Spray Ionization (ESI)
	Drying gas and Nebulizer gas	Nitrogen gas
	Drying gas flow	10.0 L min ⁻¹
	Drying gas temperature	350°C
	Nebulizer pressure	25 psig
	Capillary Voltage	3500 V

넣는다. 그 후 카트리지에 Methanol 2.5 mL씩 2회 (총 5 mL) 용리 (Elution)하였다. 용리된 항생물질은 질소농축기(N-EVAP-11, OASYS)를 사용하여 항온수조 50°C에서 50 μL 까지 농축 후 70 μL 의 Mobile phase A (0.1% formic acid + 99.9% 초순수 증류수)를 넣고 진동혼합 후 기기분석에 사용하였다. (Fig. 3)

항생제 기기분석 (HPLC/MS/MS) 항생물질의 분석에 사용된 기기는 충남대학교 공동실험실습관의 High Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometer (HPLC/MS/MS, 4000 Q TRAP, ABSCIEX, Canada)를 사용하였으며, 이동상 (Mobile phase) A는 99.9% 초순수 증류수 + 0.1% formic acid, B는 99.9% acetonitrile + 0.1% formic acid를 사용 하였다.

분석에 사용된 컬럼은 pore size가 2.5 μm 이며, 내경이 2.1 mm인 XTerra® MS C18 역상컬럼 (Waters, USA)을 사용하였다. 항생제 분석을 위한 HPLC/MS/MS의 조건은 Table 2와 같다.

잔류 항생물질 분석의 효율을 극대화하기 위하여 compound optimization을 실시하였다. 항생제 종류별로 1 mg L⁻¹의 표준용액을 조제하여 사용하였으며, 항생물질의 분자식을 입력하여 분자량을 측정하였다. 그 후 선구이온 (precursor ion)에 따른 생성이온 (product ion)을 확인하였고, Collision energy (CE)와 Deculstering Potential (DP)에 변화를 주어 각 항생물질의 생성이온의 감도를 증가시켜 분석효율을 증가 시켜 최적 조건을 확립하였다. 결과는 Table 3과 같다.

각 항생물질의 검량곡선을 작성한 결과 항생물질 7종 모

Table 3. Fragmented ions of 7 veterinary antibiotics depending on collision energy and declustering energy.

Compound	Precursor ion [M+H] ⁺ (m/z)	Product ion (m/z)	CE ¹⁾ (V)	DP ²⁾ (V)
Simeton	198	409	29	
		410	29	31
Tetracycline	445	428	23	
		153	41	
		444	35	41
Chlortetracycline	479	463	27	
		425	29	
Oxytetracycline	461	426	31	56
		442	21	
		156	65	
Sulfathiazole	256	92	39	41
		64	21	
		65	79	
Sulfamethazine	279	92	45	66
		124	33	
		65	71	
Sulfamethoxazole	254	92	41	46
		156	23	
		83	113	
Tylosin	916	101	75	66
		174	63	

¹⁾CE: Collision energy, ²⁾DP: Declustering Potential Bold product ion was used for quantification

두 상관계수 0.995이상으로 나타났다.

회수율과 방법검출한계 작물체 내 항생물질의 분석을 위하여 회수율 검정 시험을 실시하였다. 회수율 검정을 위해 대조구 (항생물질을 처리하지 않은 새싹채소)를 동결 건조한 후 항생제를 인위적으로 투여하는 시점을 각각 SPE 전과 SPE 후로 달리하여 항생제 추출을 시행하였다. 작물체 내 항생제 검출의 회수율은 Eq. 1을 사용하여 계산하였다.

회수율에는 항생제 7종의 표준용액을 합하여 희석한 0.1 mg L⁻¹ 1 mL를 주입하여 실시하였다.

$$\text{회수율(\%)} = \frac{\text{SPE 전 시료에 spiking}}{\text{SPE 후 Me OH에 spiking}} \quad (\text{Eq. 1})$$

항생제 분석에 대한 방법검출 한계 (MDL : Method Detection limit) 및 정량한계 (LOQ : Limit of Quantitation)의 경우 검정곡선의 2번째 농도에 해당하는 0.05 mg L⁻¹을 대조구 시료에 주입하여 7반복으로 시험을 수행하였다.

방법 검출 한계는 7반복의 시료값에 대하여 평균과 표준편차를 구하고, 98% 신뢰도에 따라 표준편차에 3.143을 곱하여 방법검출한계를 산출하였고, 표준편차에 10을 곱한 값을 정량한계로 산출하였다.

데이터분석 실험결과는 3반복 평균과, 표준편차를 구하여 나타내었고, 유의성 분석은 IBM SPSS Statistics 22 프로그램을 사용하여 실시하였다. 통계적 유의성을 나타내는 ANOVA 테스트는 p < 0.05 (95% 신뢰수준)으로 검증하였으며, Duncan으로 사후분석을 실시하였다.

Results and Discussion

회수율과 방법검출한계 작물체 내 항생제 분석을 위한 회수율과 방법검출 한계, 그리고 정량한계는 Table 4에 정리하였다.

Tetracycline 계열의 항생제에 대한 작물체 내 회수율은

34-54%의 범위였으며 sulfonamides 계열의 항생제 회수율은 약 30-57% 수준이었다. 본 연구에서 수행한 작물체 내 항생제의 회수율은 선행 연구에 비해 낮은 수준이었다. 고압용매추출법 (pressurized liquid extraction)을 사용하여 항생제를 추출한 선행연구에서는 작물체 내 항생제의 회수율이 약 46-139%의 범위를 나타내었다 (Herklotz et al., 2010). 작물체와 같이 매체가 복잡한 경우에는 추출방법에 따라 LC/MS에서의 신호가 저하(ion suppression) 또는 증감 (enhancement) 됨에 따라 이에 대한 보정이 필요하다. 이를 위해서는 표준물질 첨가법 (standard additon)을 사용할 수 있으며 또한 완충용액 (buffer solution)을 이용하여 회수율을 향상 시킬 수 있다 (Herklotz et al., 2010).

본 연구에서 산정된 MDL과 LOQ는 선행 연구에 비해 더 낮은 수준으로 산출되었다. Sulfamethoxazole의 경우 선행 연구의 MDL은 당근과 배추에서 각각 7.07과 1.75 µg kg⁻¹인 반면 본 연구에서는 0.02 µg kg⁻¹으로 방법검출한계는 선행연구보다 낮게 산출되었다 (Herklotz et al., 2010).

작물의 생육 작물의 생육 조사 결과, 작물의 생장 길이는 적양 배추와 적무 모두 대조구와 시험구가 차이를 보였다 (Fig. 4). Tetracyclines 계열을 처리한 시험구의 작물 길이는 4.76-5.32 cm의 범위를 나타냈으며 평균 4.99 cm의 길이를 보였다. Sulfonamides를 처리한 시험구는 4.88-5.28 cm 평균 5.08 cm의 길이를 나타내었다. 대조구의 평균길이인 6.38 cm (Tetracyclines)과 6.5 cm (sulfonamides)와 비교하면 처리구는 대조구에 비해 평균 23.42% 생육이 저해되었다. 적양배추의 경우 tetracyclines을 처리한 시험구는 2.1-2.3 cm로 시험구의 평균길이는 2.14 cm 였으며 sulfonamides를 처리한 시험구는 2.04-2.1 cm로 시험구의 평균길이는 2.06 cm였다. 대조구의 평균길이인 2.88 cm와 비교하면 시험구의 생장 길이는 대조구에 비해 약 25.69% 저하되었다.

작물의 생중량은 적무에서는 tetracyclines을 제외한 시험구에서는 12.38~14.89 g plot⁻¹으로 대조구의 17.72 g plot⁻¹보다 무게가 적고, tetracyclines 시험구의 경우 18.52 g plot⁻¹으로 대조구 보다 무게가 높았다. 적양배추의 경우

Table 4. Summary of recovery, method detection limit (MDL), and limit of quantification (LOQ) for extraction method of veterinary antibiotics in seedlings.

	Recovery	MDL	LOQ	RSD
	----- % -----	----- µg kg ⁻¹ -----	----- % -----	
TC	38	0.52	1.40	9.1
CTC	54	0.19	0.50	3.1
OTC	34	0.24	0.24	4.5
SMX	57	0.02	0.03	3.9
SMZ	30	0.15	0.04	9.8
SMT	30	0.07	0.18	8.7

항생제 처리구에서 5.1~6.2 g plot⁻¹으로 대조구 6.75 g plot⁻¹에 비해 낮은 것으로 조사되었다. 실험결과 두 종의 작물체 모두 항생제로 인하여 생장에 저해 받은 것을 확인하였다 (Fig. 4).

양배추와 위스콘신 속성 식물 (Wisconsin fast plants)을 이용하여 수경재배를 통해 항생제의 흡수 시험을 한 선행연구에서는 항생제의 흡수에 따라 양배추의 경우 오히려 생중량은 늘어난 반면 생장 길이는 감소하였다. 반면 위스콘신 속성 식물의 경우 생중량과 생장 길이가 모두 감소하는 결과를 나타내었다 (Herklotz et al., 2010). 따라서 작물의 생장은 항생제의 노출과는 직접적인 영향이 아닌 것으로 결론을 도출하였다. 하지만 본 연구에서는 두 종류의 새싹채소 모두 항생제에 의해 생장이 저해되는 결과를 나타내었다.

두 시험의 차이는 인위적으로 투여 (spiking)한 항생제의 농도가 선행연구의 경우 비교적 낮은 232.5 µg L⁻¹인 반면 본 연구에서는 비교적 높은 5 mg L⁻¹를 주입하였다. 따라서 비교적 높은 농도의 항생제에 노출된 새싹채소의 생장이 선행연구의 낮은 농도에 비해 저해가 높았던 것으로 사료된다. 항생제의 작물 생장에 대한 영향은 주로 식물 세포 내 세포 보호를 위한 효소와 단백질에 영향을 미치는데 낮은 농도의 항생제에 노출될 경우 작물의 생장에 영향이 적은 반면 높은 농도의 항생제에 노출될 경우 작물의 생장에 악영향을 미칠 수 있다 (Pan and Chu, 2016).

작물별 항생제 전이농도 - 적양배추, 적무 동물용 항생제의 작물전이를 평가한 결과 적양배추에서 tylosin이

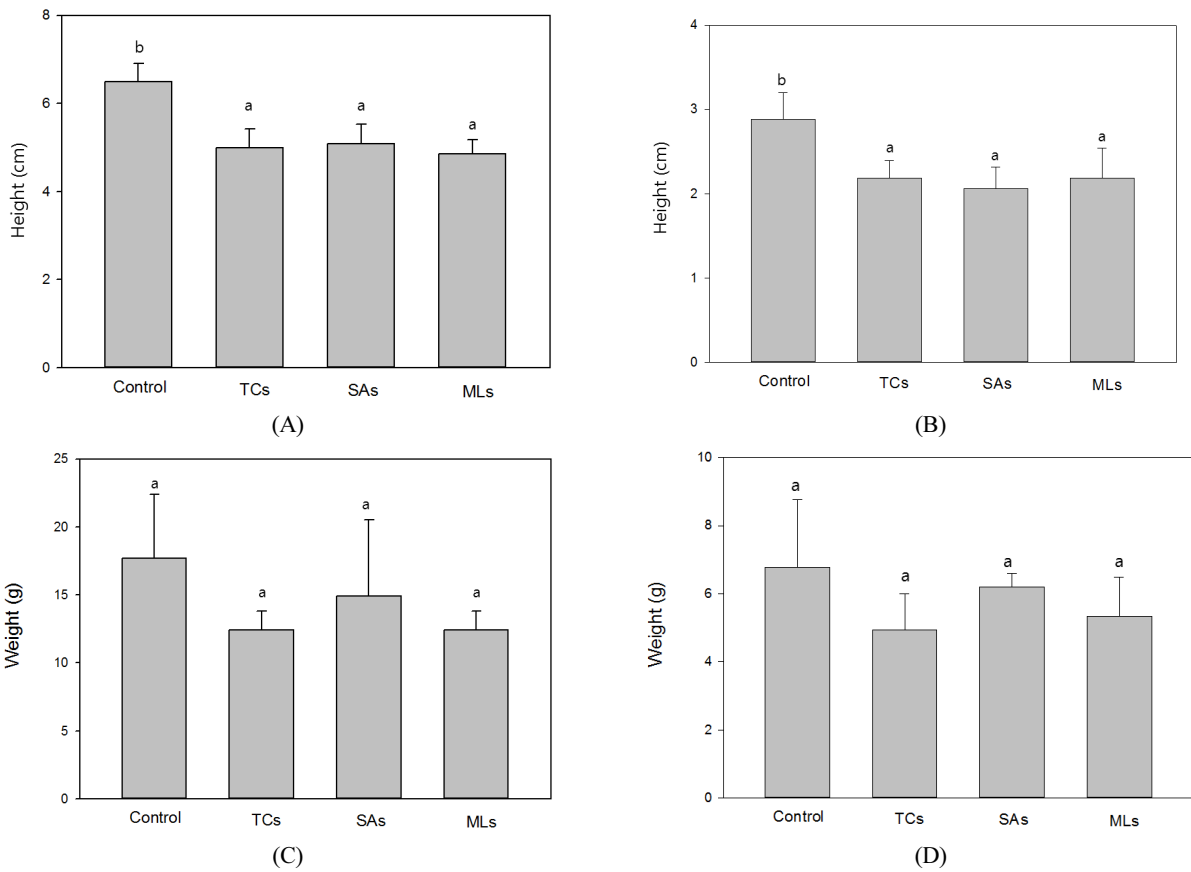


Fig. 4. Result of crop height and weight depending on veterinary antibiotics (A) height of red cabbage, (B) height of red radish, (C) weight of red cabbage, (D) weight of red radish.

Table 5. Concentration of veterinary antibiotics in crops.

	TCs			SAs			MLs
	TC	CTC	OTC	STZ	SMX	SMT	TYL
	mg kg ⁻¹						
Red radish	0.48	0.64	0.55	0.04	0.08	BLD	13.15
Red cabbage	4.05	3.05	1.91	0.43	0.72	7.73	8.30

BLD: Below detection limit

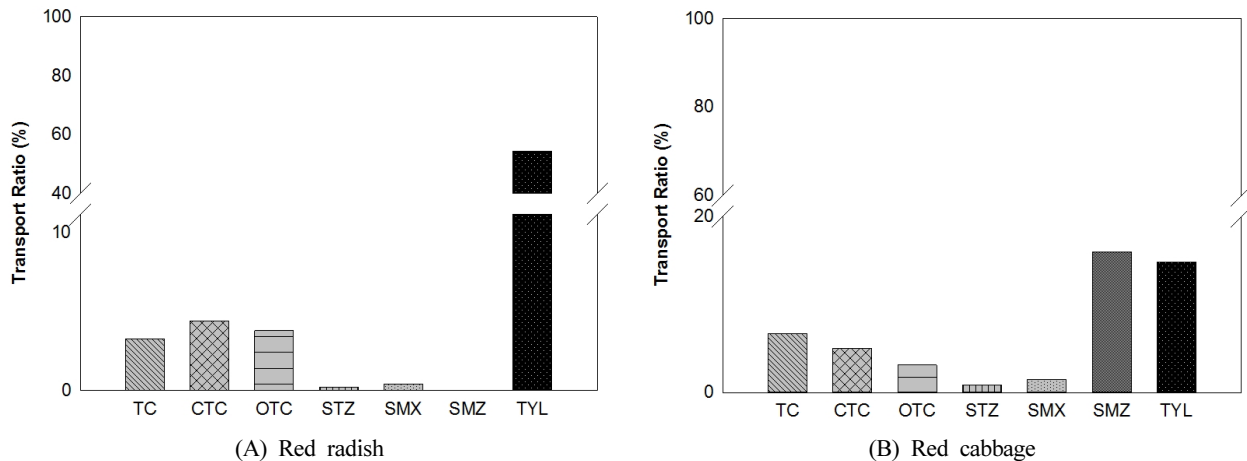


Fig. 5. Transport ratio of veterinary antibiotics from solution to crops.

8.29 mg kg⁻¹으로 가장 많이 흡수되었으며, 계열 별로는 MLs > TCs > SAs 순으로 확인되었다. 적무에서도 TYL이 13.14 mg kg⁻¹으로 가장 많이 흡수되었으며, 적양배추와 동일하게 MLs > TCs > SAs 순으로 작물에 전이되었다. 두 작물을 비교하였을 때 적양배추의 총 항생제 전이농도는 53.08 mg kg⁻¹, 적무의 총 항생제 농도는 26.18 mg kg⁻¹로 적양배추가 더 많이 흡수하는 것으로 나타났다 (Table 5).

동물용 항생제의 작물전이를 평가하기 위해서 각 실험구의 생중량의 평균값과 검출농도를 곱한 값을 항생제 투여 농도인 5 mg L⁻¹과 5일간 투여한 항생제 용액의 부피를 곱하여 나눠 준 값으로 계산하였다. 그 결과 tetracycline계열의 경우 3가지 종이 3.14 - 6.67%로 비슷한 전이율을 보이는 반면 sulfonamide계열 중 sulfamethoxazol의 경우 적무와 적양에서 각각의 전이율이 15.98%, 0%로 작물에 따라 차이가 있음을 알 수 있었다. 실험에 사용한 총 7종의 항생제 중에서는 Tylosin이 적양배추 14.78%, 적무 54.27%로 가장 많은 전이율을 보였다 (Fig. 5).

항생제 별로 비교하였을 경우 두 작물 모두 TYL이 가장 많이 흡수되는 경향을 보였다. 선행연구와 비교하여 Tylosin의 경우 pKa 값이 7.5/9.0으로 일반적 환경에서 중성의 특성을 나타내며 중성의 조건은 이온화된 분자에 비해 세포벽의 투과율이 높기 때문이다 (Babic et al., 2007). 또한 확산과 Log Kow값은 작물의 흡수에 영향을 주는 인자로, log Kow 값이 1.0 - 3.5인 경우 소수성과 친수성의 균형으로 인하여 물질의 작물흡수가 증가하는 경향이 있다. TYL의 경우 Log Kow 값이 3.5이기 때문에 항생제 시용 용액 중 가장 많은 양이 흡수된 것으로 사료 된다 (Dodgen et al., 2013).

항생제를 비롯한 유기물질의 작물체 내 흡수 메커니즘은 용존된 형태로 작물체에 이동되는 경우와 극성 물질의 경우 소수분배 결합 (hydrophobic partitioning), 이온결합, 그리고 뿌리 근처의 화학적 특성 변화 등에 따라 달라질 수 있다 (Miller et al., 2015). 본 연구에서는 항생제의 작물 전이에

대한 정확한 메커니즘은 규명하지 못하였으나 추후 이에 대한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

Conclusions

동물용 항생의 대부분은 체내로 배출되며, 이에 따라 분뇨, 퇴비 형태로 농업환경에 직 간접적으로 유입된다. 이로 인하여 항생물질 내성박테리아 생성의 문제를 일으킬 수 있다. 그러나, 현재 우리나라의 경우 동물용 항생물질 환경유출 및 작물로의 전이에 대한 연구는 부족한 실정이다. 이에 본 연구는 환경 내 잔류가능성이 높은 tetracycline 계열 3종, sulfonamide계열 3종, macrolide계열 1종에 대하여 작물의 흡수량을 평가하였다. 실험 작물은 적무와 적양배추를 사용하였다. 실험결과 작물에 7종류의 항생제가 대부분 흡수되었으며, TYL의 경우 적무에서 13.149 mg kg⁻¹ 적양배추에서 8.299 mg kg⁻¹ 전이되었다. 작물의 흡수율을 평가한 결과 적무에서 54.27%, 적무에서 14.78%가 흡수되었다. 본 연구결과 작물체로 항생제가 흡수됨을 확인하였고, 이는 동물용 항생제가 농업 환경뿐만 아니라 인간에게도 영향을 끼칠 수 있음을 시사한다. 따라서 국내에 사용되는 항생제에 대하여 환경 거동 평가를 위한 기초자료로 사용될 수 있을 것이라 사료되며, 항생제 시용량의 다양한 설정과, 장기적으로 재배하는 작물에 대한 지속적인 모니터링이 필요할 것으로 사료된다.

References

- Babic, S., A. J. Horvat, D. M. Pavlović and M. Kaštelan-Macan. 2007. Determination of pK a values of active pharmaceutical ingredients. *TrAC-Trend. Anal. Chem.* 26(11):1043-1061.
- Dodgen, L. K., J. Li, D. Parker, and J. J. Gan. 2013. Uptake and accumulation of four PPCP/EDCs in two leafy vegetables. *Environmen. Poll.* 182:150-156.

- Heberer, T. 2002. Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. *Toxicol. lett.* 131(1):5-17.
- Herklotz, P. A., P. Gurung, B. V. Heuvel and C. A. Kinney. 2010. Uptake of human pharmaceuticals by plants grown under hydroponic conditions. *Chemosphere* 78(11):1416-1421.
- Hu, X., Zhou, Q. and Y. Luo, 2010. Occurrence and source analysis of typical veterinary antibiotics in manure, soil, vegetables and groundwater from organic vegetable bases, northern China. *Environ. Poll.* 158(9):2992-2998.
- Ji, X., Q. Shen, F. Liu, J. Ma, G. Xu, Y. Wang and M. Wu, 2012. Antibiotic resistance gene abundances associated with antibiotics and heavy metals in animal manures and agricultural soils adjacent to feedlots in Shanghai; China *J. hazard. mater.* 235: 178-185.
- Kemper, N. 2008. Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. *Ecolog. indicators*, 8(1):1-13.
- Kim, K. R., G. Owens, S. I. Kwon, K. H. So, D. B. Lee and Y. S. Ok., 2011. Occurrence and environmental fate of veterinary antibiotics in the terrestrial environment. *Water Air soil Pollut.* 214(1-4):163-174.
- Kim, S.C., K. Carlson. 2007. Quantification of human and veterinary antibiotics in water and sediment using SPE/LC/MS/MS. *Anal. Bioanal. Chem.* 387(4):1301-1315.
- Lee, H. Y., J. E. Lim, S. C. Kim, K. R. Kim, S. S. Lee, O. K. Kwon, J. E. Yang, Y. S. Ok. 2010. Environmental Monitoring of Selected Veterinary Antibiotics in Soils, Sediments and Water Adjacent to a Poultry Manure Composting Facility in Gangwon Province, Korea. *Korean Soc. Environ. Eng.* 32(3):278-286.
- Lim, J.E, S. C. Kim, H. Y. Lee, O. K. Kwon, J.E Yang, Y. S. Ok. 2009. Occurrence and Distribution of Selected Veterinary Antibiotics in Soils, Sediments and Water Adjacent to a Cattle Manure Composting Facility in Korea. *Korean Soc. Environ. Eng.* 31(10):845-854.
- Miller, E.L., S.L. Nason, K.G. Karthikeyan, and J.A. Pederson., 2015. Root uptake of pharmaceuticals and personal care product ingredients. *Environ. Sci, Technol.* 50:525-541.
- Pan, M. and L. M. Chu. 2016. Phytotoxicity of veterinary antibiotics to seed germination and root elongation of crops. *Ecotox. Environ. Safe.* 126:228-237.
- Sarmah, A. K., M. T. Meyer and A. B. Boxall. 2006. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosphere*, 65(5):725-759.
- Seo, Y. H., J. K. Choi, S. K. Kim, H. K. Min. and Y. S. Jung. 2007. Prioritizing environmental risks of veterinary antibiotics based on the use and the potential to reach environment. *Korean J. Soil Sci. Fert.* 40(1):43-50.
- Thiele-Bruhn, S. and I. C. Beck. 2005. Effects of sulfonamide and tetracycline antibiotics on soil microbial activity and microbial biomass. *Chemosphere*, 59(4):457-465.
- Tolls, J. 2001. Sorption of veterinary pharmaceuticals in soils: a review. *Environ. Sci. Technol.* 35(17):3397-3406.
- US EPA. 2007. Method 1694 Pharmaceuticals and Personal Care Products in Water, Soil, Sediment, and Biosolids by HPLC/MS/MS.