

유기농업용 목초액에 대한 비료적 가치 평가 연구

김민균 · 박현준 · 임선욱

(서울대학교 농생명공학부)

Study on the Value of Pyroligneous Acids as Organic Fertilizer

Min-kyun Kim · Hyun-Jun Park · Sun-Uk Lim

School of Agricultural Biotechnology
Seoul National University

적 요

화학비료, 특히 요소나 유안 같은 질소질 비료는 토양에서 암모늄화, 질산화, 탈질작용과 같은 질소순환 과정을 거치면서 쉽게 손실된다. 이는 비단 질소질 비료의 손실에 그치지 않고 질소질비료의 과다사용에 따른 부영양화, 청색증, 산성비, 온난화 현상, 오존층 파괴 등 많은 환경문제를 야기하므로 근래에 들어 환경친화적 농업(sustainable agriculture)을 목적으로 화학비료를 절감 또는 대체하려는 노력이 진행되고 있다.

본 연구는 국내에서 생산·시판되고 있는 목초액의 물리·화학적 성질을 알아봄과 아울러, 목초액의 요소분해 및 질산화 과정 억제효과여부를 규명하여 질소질화학비료의 비효를 증진시킴과 동시에 그 양을 절감하여 친환경적인 농업을 하는 데 있어 화학비료의 단점을 보완하고자 수행되었다.

그 결과 목초액의 전질소함량은 2.50%였고, 그 중 암모니움태 질소의 농도는 473ppm이었다. 목초액의 pH는 3.3으로 낮은 산도를 나타내었으며, 목초액 종류잔사물의 농도는 18.93mg/ml이었다. 한편, 목초액에 포함되어 있는 중금속(비소, 카드뮴, 수은, 납, 크롬, 구리)의 함량을 정량한 결과, 이들은 최대 0.3ppm 이하의 수준으로 함유되어 있었다.

한편, 목초액은 토양 중 요소분해작용을 억제하였고 식물 urease와 미생물 urease 활성저해효과뿐만 아니라 다양한 urease가 존재하는 토양 urease에도 저해효과를 보였다. 목초액은 또한 토양 중 질산화 과정에 관여하는 암모니움 산화균의 활성을 저해하였으나 아질산 산화균의 활성을 증진하는 효과를 보였고, 전체적으로는 토양 중 질산화 작용을 저해하는 효과를 나타내었다. 이러한 결과를 토대로 요소분해 및 질산화 작용 억제효과를 보이는 목초액 성분을 탐색하기 위하여 목초액을 극성별로 분획(CHCl_3 , $\text{CHCl}_3\text{-MeOH}$, 수용액층)하여 각각에 대한 저해효과를 비교하였다. 그 결과 요소분해저해는 CHCl_3 추출층에 의하여 현저히 나타난 반면, 질산화 작용 억제 효과는 수용액층에서 나타났다.

이상의 연구결과는 천연물질에서 요소분해 및 질산화 작용 억제물질을 찾아 질소질비료의 비효증진을 통한 친환경농업에 기여가 가능한 한편, 목초액 내 특정 화학물질이 어떠한 메커니즘으로 요소분해와 질산화 작용을 억제하는가에 관한 기초적 연구의 토대가 될 것이라고 판단된다.

1. 서론

우리 나라는 농경지 면적에 비해 인구가 많은 관

계로 농경지의 회소가치가 세계적으로 높은 곳이다. 또한 경지면적의 감소와 농업인구 비율의 감소, 농업인구의 고령화로 인하여 우리 나라의 안정적인 식량수급은 크게 위협받고 있다. 따라서 우리 나라에서는

제한된 농경지 면적에서 높은 생산성을 올리려는 자본·기술 집약적 농업을 할 수밖에 없었다(홍병희, 1998). 따라서 안정적인 식량수급을 위하여서는 비료의 사용은 필수 불가결하며 비료소비량이 증가하면 단위 면적당 식량생산량이 늘었다는 많은 연구결과에서 그것을 알 수 있다. 전 세계적으로 단위 면적당 식량생산량을 늘리기 위해 1980년대까지 비료생산량 및 소비량은 증가하였다. 즉, 식량 생산성 증대를 목적으로 고투입 농업정책을 수행하였음을 알 수가 있다. 하지만 환경을 고려하지 않고 농약, 비료를 필요 이상으로 투입한 결과 환경오염이라는 심각한 현상을 야기하였다(이호진 등, 1998).

화학비료는 적절하게 관리되고 사용되면 환경농업의 목표달성을 위해 필수적인 농자재이다. 하지만 최근 '환경농업'은 마치 화학비료를 사용하지 않는 대신 유기성 부산물 비료에 의존하는 것으로 잘못 인식되고 있는 실정이다. 농경지에 유기성 부산물 비료가 필요이상 과대투입되면, 작물의 수량감소와 이에 따른 경제성 문제, 토양의 질 변화, 불량한 비료에 의한 토양오염 및 농산물의 안전성 위해, 그리고 나아가 외인성 잡초 및 병원균의 도래 등이 뒤따르게 된다. 따라서 환경친화적 농업을 위해서는 토양별·작물생육별 최적, 최소의 화학비료 사용이 요구되며, 한편으로는 친환경적인 비료의 개발이 요구된다.

식물이 필요로 하는 많은 영양분 중 특히 질소는 식물이 생육하는데 있어서 필수적으로 요구되는 성분으로 모든 작물재배시 일정량을 시용 하여야 목표하는 생산량을 얻을 수 있다. 따라서 농업활동에 있어서 질소비료 사용량은 수량 증가와 직접적으로 연결되기 때문에 오랜 기간 동안 사용되어온 농업자재이다. 질소질 비료 중 요소비료는 세계적으로 뿐만 아니라 우리나라에서 가장 많이 사용되는 질소질 단비 또는 복합비료의 원료비료이다. 요소비료는 각종 농작물의 기비 및 추비로 사용되며 각종 식물 및 토양미생물에서 분비되는 요소 가수분해 효소인 urease에 의해 가수분해되어 탄산암모늄을 거쳐 이산화탄소와 암모니아로 분해된다. 그 결과 생성된 암모니아는 1) 식물체나 토양미생물에 흡수, 이용되며 2) 규산염 광물과 유기물 등 토양입자에 흡착, 고정되고

3) pH가 높아짐에 따라 NH_3 로 대기에 휘산되며 4) 질산화과정을 거치면서 질산화균에 의해 아질산 및 질산으로 산화되며 5) 탈질작용과 같은 질소순환 과정을 거치면서 쉽게 손실된다(Brady, 1990).

사용된 요소태 질소중 50% 이상이 암모니아의 휘산화에 의하여 소실되며(Freney et al., 1992; 1990; Bacon et al., 1986; Keller and Mengel, 1996; Bundy and Oberle, 1998; Back et al., 1989). 요소태 질소의 분해 결과 일어나는 토양 pH의 상승과 암모니아 방출은 작물의 발아와 유효의 성장에 대하여 저해 작용을 유발하며 아질산태와 암모니아에 의한 독성을 나타내게 된다(Filley and Vlek, 1986; Freney et al., 1983; Denmead et al., 1982; Harper et al., 1983). 이는 비단 질소질 비료의 손실에 그치지 않고 질소질비료의 과다사용에 따른 부영양화, 청색증, 산성비, 온난화 현상, 오존층 파괴(NRC, 1992) 등 많은 환경문제를 야기하므로(Bouwnan, 1990, Duxbury, 1993) 근래에 들어 환경친화적인 농업(sustainable agriculture)을 하고자 화학비료를 절감 또는 대체하려는 시도를 많이 하고 있다(Bouwnan, 1990).

요소시비와 관련하여 발생하는 여러 불리한 문제들을 감소시키기 위한 방법들 중 한 방법으로 urease의 활성을 억제시킬 수 있는 화합물을 개발하여 요소와 함께 토양에 시용하였을 때 요소의 가수분해 속도를 지연시키는 것이다(임선욱 외 3인, 1998; Fernando, 1976; Freney et al., 1992). 현재까지 개발되어 널리 시험되고 있는 urease 활성 저해제로는 p-benzoquinone 류, hydroxyquinone, heterocyclic sulfur 화합물류, substituted urea herbicide 류, phosphoroamide 류, phenylphosphorodiamidate(PPD), tri-Cl-ethyl-phosphorodiamidate(TPD), sarsaponin 등이 있다.

한편, 사용된 요소가 분해되어 암모니아가 된 후 질산화 작용을 받게 되면(Tate, 1995; Jordan et al., 1967) 용탈, 탈질되기 쉬우므로 이로써 생성되는 질소 손실을 방지하거나 지하수 오염을 예방할 필요가 있다(Gopal, 1987). 이러한 질소의 손실이나 질산태 질소의 용탈로 인한 지하수 오염(Jones, 1993)을 막기 위하여 질산화작용을 선택적으로 저해하여 흡착성이 큰 암모니아로 토양에 머물게 하여 질소의 비효를

높이기 위하여 비료에 혼합하는 약제를 질산화작용 억제제라 한다(Hauck, 1983; 1984). 이러한 약제는 질산화균의 활동을 선택적으로 억제하게 되며 작물과 다른 토양생물에 대하여는 독성이 없어야 하는데 현재까지 알려진 질산화 작용 억제제로는 thiourea, 2-Cl-6(tri-chloromethyl) pyridine(N-serve), 2-amino-4-chloro-6-methyl pyrimidine(AM), dicyanamide, 2-sulfamil-amidothiazole(ST) 등이 있다.

이상에서 본 바와 같이 여러 가지 화학약품의 개발에 의한 요소 비료의 효율을 증진시키고자 하는 연구가 현재 활발하게 진행되고 있으나 현재로는 저렴하고 무독성의 실용화 될 수 있는 물질이 극히 제한되어 있거나 없는 실정이다. 환경농업을 위한 유기 재료로서 근래 많이 사용되고 있는 목초액은 목탄(木炭)의 제조과정 중 고열에 의하여 건류(乾溜)되는 부분을 공기냉각으로 응축하여 수집한 액체이며, 이를 그대로 또는 자연 숙성시켜 높은 배율로 희석한 것을 각종작물 또는 토양에 살포하여 효과를 얻게 된다. 이는 우리 나라에서만 아니라 일본에서도 1970년대 이후 널리 사용되고 있으며 그 용도는 작물 재배 이외에도 다양하게 응용되고 있다. 현재 우리나라에서 이 목초액의 연간생산량은 정확한 통계가 없으나 연간 총 거래액은 수천억원대로 추정하고 있으니 농업생산 자재로서 그 기반이 큰 규모임을 짐작케 한다. 그러나 목초액에 대한 정확한 화학적 조성이나 성질, 사용효과의 발현기작, 나아가 제품으로의 규격이나 사용방법이 정확히 과학적으로 구명되어 있지 않은 상태에서 광범위하게 실용되고 있으므로 경우에 따라서는 해로운 부작용이나 무효과의 결과를 거두게 되기도 한다.

본 연구는 국내에서 생산·시판되고 있는 목초액의 물리·화학적 성질을 알아봄과 아울러 목초액의 요소분해 및 질산화과정 억제효과여부를 규명함으로써, 질소질 화학비료의 비효를 증진시킴과 동시에 그 양을 절감하여 친환경적인 농업을 하는데 있어 화학비료의 단점을 보완하고자 수행되었다. 앞서 언급한 것처럼 기존에 수많은 요소분해, 질산화작용 합성억제제들이 개발되어 왔으나, 고가격, 효과의 비특이성, 환경문제에 의해 그 사용이 제한되고 있는 실정이다.

따라서 본 연구에서는 합성 요소억제제나 질산화 억제제와는 달리 천연물질인 목초액의 토양 중 요소분해와 질산화작용 및 요소분해효소(urease), 질산화균에 대한 저해효과를 알아보았고 더 나아가 목초액 성분중 요소분해, 질산화작용 억제물질을 찾을 목적으로 시도하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재료 및 시약

목초액은 원주 숲공장에서 직접 채취하였으며 냉장보관(0°C)하였다. 토양은 서울대학교 부속농장 밭 토양을 표토를 살짝 제거한 후 깊이 0~15cm인 층을 채취하였으며 5°C에서 냉장보관(2주일 한도)하였고 사용하기 전 25°C에서 1일 동안 배양 후 사용하였다. urease는 Jack bean urease(440,000 unit/g, sigma)와 *Bacillus pasteurii*(220,000 unit/g, sigma)를 사용하였고, urea는 ultrapure(Amresco)급을 사용하였으며 유안도 ultra pure(amresco)급을 사용하였다. 나머지 분획용 유기용매 및 기타 시약은 EP급을 사용하였다.

2. 방법

가. 목초액의 물리·화학적 성질

목초액의 pH는 pH meter(Fisher)로 측정하였고, 증류잔사물은 일정량(10, 20, 30ml)을 취한 후 냉동건조하여 남은 무게로 측정하였다. 전질소함량은 Kjeldahl digestion-steam distillation법으로 측정하였고, 암모늄태 질소와 질산태 질소는 MgO 2.0g 첨가 후 Kjeldahl steam distillation법으로 측정하였다.

나. 토양의 물리·화학적 성질

토양의 pH는 토양 10g에 증류수(1:10)를 넣어 30분간 방치한 후 pH meter(Fisher)로 측정하였고(McLean, 1982), CEC는 ammonium acetate 법(Rhoades, 1982)으로 측정하였다. 유기물 함량은 회화법으로 측정하였으며, 유효인산은 Bray No.1 법(Bray, 1945)으로 측정하였다. 총질소는 Kjeldahl digestion법

의 변법으로 Salicylic acid-thiosulfate 황산법(Bremner, 1996)으로 분해 정량하였고, 암모늄태 질소와 질산태 질소는 2M KCl 추출후 Kjeldahl 증류법으로(Bremner, and Keeney, 1965) 측정하였다. EC는 1N ammonium acetate로 추출 후 AA(Pye Unicam SP 9)로 측정하였고(Barshad, 1954), 토성분석은 피켓법(Green, 1981)으로 측정하였다.

다. 각종 urease활성의 측정

1mM EDTA와 20% glycerol이 첨가된 0.05M Tris-H₂SO₄ buffer(pH 7.0)에 2가지 정제된 요소가수분해 효소(Jack bean urease, Bacillus urease)를 녹여 효소액(20unit)을 준비하였고 0.05M Tris-H₂SO₄ buffer 7.9ml에 urease 1ml와 20mM urea 1m, 그리고 목초액 회석액 혹은 그 분획물 0.1ml를 넣고 생성된 암모니아를 Kjeldahl 증류법으로 정량하였다. 0.05M Tris buffer의 pH는 Jack bean urease의 경우 7.0로, *Bacillus pasteurii* urease는 8로 맞추었으며, 배양온도는 37°C로 맞추었고 10, 20, 30분간 효소활성을 측정하였다.

한편, 토양 urease 활성 측정은 신선한 토양 5g에 toluene 0.2ml 첨가후 0.05M Tris-H₂SO₄ buffer(pH 9.0) 9.0ml를 더하여 효소액을 준비하였으며 요소농도와 배양온도는 위와 같은 조건이고 배양시간은 2, 4, 6시간으로 하여 실험하였다. 반응액을 2.5M KCl로 추출하여 생성된 암모니아를 Kjeldahl 증류법으로 정량하였다. Stop reagent는 Ag₂SO₄ (3mg/ml)를 1ml 첨가하여 반응을 종결시켰다.

라. 요소가수분해 미생물의 개수

신선한 토양 20g을 180ml 살균수가 든 500ml 삼각 flask에 취하여 15분간 진탕한 후 정치하였다. 상등액 2ml를 취하여 십진법으로 10⁵까지 희석하였다. 2% urea-Christensen agar 배지(표1)에 적당히 희석한(10⁻¹, 10⁻⁵) 토양용액의 상등액 2ml를 취하고, 목초회석액(100, 500배) 2ml를 더하여 30°C 항온 배양기에서 4, 8, 12일간 배양하여 색변화(황색→적색)를 띠는 colony중 외관상 세균으로 판단되는 colony를 colony counter로 그 개수를 측정하였다.

마. 토양내 요소가수분해의 정량

신선한 토양 20g에 urea 100mg과 목초액 회석액, 분획 1ml를 첨가한 후 30°C 항온 배양기에서 1, 2일 동안 항온 배양하였다. 이때 토양의 수분함량은 미생물의 최적 수분함량인 WFPS(Water Filled Pore Space) 60%로 맞추었다(Harris, 1980). 배양후 20g 토양중 10g을 2M KCl 100ml(1:10)로 추출한 후 추출액 50ml중 암모니움태 질소 농도를 Kjeldahl 증류법으로 정량한 후 요소가수분해 정도로 나타내었다(임선옥, 1998; Keeney, 1966; 1967).

바. 토양내 질산화균의 개수

토양내 질산화균의 개수는 MPN(most probable number)법으로 측정하였다(Belser, 1994). 신선한 토양 10g을 1mM potassium phosphate buffer 95ml가 든 200ml 삼각 flask에 취하여 15분간 진탕한 후 정치하였다. 상등액 10ml를 취하여 십진법으로 10⁶까지 희석하였다. 각 회석액 1ml를 다섯 개의 배양 tube에 옮기고 30°C 항온 수조에서 빛을 차단하고 약 4주간 배양하였다. 배양 tube내 질산화균 배지의 조성은 표 2와 같다. 질산화균의 생성여부는 다음과 같은 원리에 의해 알 수 있다. 암모니움 산화균은 배양 tube내의 아질산태 질소의 생성으로, 아질산 산화균은 배양 tube내의 아질산태 질소의 소실로서 각각 균의 존재 여부를 알 수 있다. 일정기간 배양 후 배양 tube내의 아질산태 질소의 측정은 Griess-Ilosvay법(Mulvaney, 1996)으로 측정하며 배양 tube의 배양액 0.1에 diazotizing 시약(sulfanilamide)과 coupling 시약(N-(1-naphthyl)-ethylenediamine hydrochloride)을 한 방울씩 첨가한 후 암모니움 산화균의 배양 tube에서 분홍색을 띄면 아질산태 질소의 생성 즉 암모니움 산화균의 존재를 알 수 있고, 아질산 산화균의 배양 tube에서 분홍색을 띄지 않으면 아질산태 질소의 소실 즉 아질산 산화균의 존재를 알 수 있다. 이것을 MPN법을 이용하여 질산화균을 통계적(Woerner, 1994)으로 개수하였다.

사. 토양내 질산화정도의 정량

신선한 토양 20g에 유안 200ppm과 목초액 회석액

혹은 그 분획물 2ml를 첨가한 후 30°C 항온 배양기에 서 5, 10, 15, 20일 동안 항온 배양하였다. 이때 토양의 수분함량은 미생물의 최적 수분함량인 WFPS (Water Filled Pore Space) 60%로 맞추었다. 배양 후 20g 토양 중 10g을 2M KCl 100ml(1:10)로 추출한 후 추출액 50ml중 암모니움태 질소, 질산태 질소 농도를 Kjeldahl 증류법으로 정량하였다. 나머지 10g은 각각 5g은 수분함량 측정에 이용되었으며 5g은 pH 측정에 사용되었다.

아. 목초액의 유기용매 극성별 분획

목초액 성분중 어떤 물질이 요소분해, 질산화작용 억제 효과를 나타내는지 규명하기 위해 유기용매 극성별로 목초액을 분획하였다(Harbone, 1984). 먼저 목초액 500ml를 evaporation 하여서 약 1/10정도의 부피로 한 후, 분획갈매기에 넣고 CHCl₃로 3번에 걸쳐 분획을 하여 그 CHCl₃층을 F1이라 명명하였다. 그리고 남은 수용층을 CHCl₃:MeOH(3:1)으로 2번 분획하고 한번은 CHCl₃으로 분획하여 그 층을 F2라 하였다. 나머지 수용층은 F3로 하여 목초원액을 유기용매 극성별로 3군 즉 F1, F2, F3로 나누었다.

III. 결과 및 고찰

1. 목초액의 물리·화학적 성질

Table 1에서 보는 바와 같이 본 실험에 사용된 목초원액의 평균 pH는 3.3으로 낮은 산도를 나타내었다. 희석액 또한 100배 희석액이 pH 3.5, 1000배 희석액이 pH 4.2로 희석을 해도 낮은 산도를 유지하는 특징을 보였다. 목초액의 증류잔사물은 동결건조 방법으로 측정했으며 목초원액 1 l 당 18.93g의 증류잔사물을 함유하고 있었다. 한편, 목초액은 평균 2.50%의 전질소를 함유하고 있었고, 암모니움태 질소(NH₄⁺-N) 농도는 평균 473ppm이었고 질산태 질소(NO₃⁻-N)의 농도는 거의 검출되지 않았다.

이상의 결과에서 목초액은 pH가 낮은 경향을 보였으며 이는 목초액내 평균 10%정도로 존재하는 acetic acid의 영향인 듯 싶다. 목초액내 전질소 함량은 토양 평균 전질소함량보다는 높은 수준이었다. 그리고 목초액내 전질소 중 암모니움태 질소와 질산태 질소가 차지하는 양이 극히 적은 것으로 미루어 보아 유기태로 존재하는 질소가 목초액의 전질소의 대부분을 차지하는 것으로 판단된다. 한편, 목초액에 포함되어

Table 1. Physico-chemical properties of pyroligneous acids

	pH	solid content(mg/ml)	Total nitrogen(%)	NH ₄ ⁺ -N(μg/g)	NO ₃ ⁻ -N(μg/g)
목초원액	3.3	18,93	2.50	473	ND ^b
F1 ^a	3.7	·	0.18	46	ND
F2	4.6	·	0.05	11	ND
F3	6.9	·	1.31	557	ND

a: 목초원액의 유기용매 분획층으로 F1은 CHCl₃, F2는 CHCl₃:MeOH(3:1), F3는 수용층이다.
b: ppm 단위에서는 거의 검출되지 않았음.

Table 2. Heavy metal contents in pyroligneous acids

Heavy Metal	비소(As)	카드뮴(Cd)	수은(Hg)	납(Pb)	크롬(Cr)	구리(Cu)
ppm	0	0.06	0.3	0.17	0.1	0.03

있는 중금속(비소, 카드뮴, 수은, 납, 크롬, 구리)의 함량을 정량한 결과, 이들은 최대 0.3ppm이하의 수준으로 함유되어 있었으며(Table 2), 따라서 목초액내 함유된 중금속의 수준은 농업용 재료로서 사용하기에 우려할 만한 정도가 아닌 것으로 판단되었다.

2. 공시토양의 물리·화학적 성질

본 연구에 사용한 밭 토양의 몇가지 물리화학적 성질을 조사한 결과는 Table 3과 같다.

3. 목초액이 요소가수분해에 미치는 영향

토양내 질소순환과 관련되어 요소태 질소질 비료를 토양에 시비하였을 때 일어나는 요소가수분해에 미치는 목초액과 목초액 유기용매분획물질의 영향을 각각 살펴보았다. 토양내 요소가수분해는 토양내 urease와 ureolytic bacteria에 의해 일어나며 토양내 urease는 ureolytic bacteria가 분비하는 미생물 urease, 식물이 분비하는 식물 urease가 토양내에 존재하는 유기물 및 clay와 복합적으로 결합하고 있어 안정된 형태로 존재하고 있다. 따라서 본 연구에서는 목초액이 요소가수분해에 미치는 영향을 규명하기 위해 urease, ureolytic bacteria, 토양내 urea hydrolysis에 미치는 영향을 각각으로 실험하였다. urease에 미치는 목초액의 영향은 토양내 urease의 원류인 식물과 미생물 urease 중 정제된 요소가수분해효소인 Jack bean urease와 *Bacillus pasteurii* urease를 선택하여 요소가수분해활성과 직접 토양내 urease의 활성을 측정하였다.

3-1. urease activity에 미치는 영향

3-1-1. Jack bean urease activity

그림 1에서 보는 바와 같이 목초액을 처리하였을 때 목초액을 처리하지 않은 control에 비해 식물 urease 중 하나인 Jack bean urease에 의한 요소 가수분해활성에 저해효과가 나타났다. 원액의 경우 요소 가수분해는 거의 일어나지 않았으며 10배 희석액과 100배 희석액도 무처리에 비해 약 58%와 19% 정도의 저해효과를 보였으며 1000배 희석액은 요소분해 억제효과를 보이지 않았다.

3-1-2. *Bacillus pasteurii* urease activity

Bacillus pasteurii urease 또한 목초액을 처리하였을 때 그림 2에서 보는 바와 같이 요소가수분해 활성이 저해되는 효과를 보였으며, 원액의 경우 무처리에 비해 약 99%정도의 저해효과를 보였으며 10배 희석액과 100배 희석액의 경우 무처리에 비해 약 67%와 41% 정도의 저해효과를 보였으나 1000배 희석액은 요소분해 억제효과를 보이지 않았다. 그리고 그 경향은 Jack bean urease activity에 미치는 효과와 비슷한 양상을 보였다.

3-1-3. Soil urease activity

목초원액을 토양에서 추출한 urease에 처리하였을 때 무처리 control에 비해 약 82% 정도의 저해효과를 보였으며 목초액 10배 희석액과 100배 희석액의 처리는 무처리 control에 비해 각각 약 68%와 33% 정도의 저해효과를 보였으나 1000배 희석액의 경우 저해효과를 보이지 않았다. 그리고 목초액의 희석 정도

Table 3. Physicochemical properties of the upland soil

pH (KCl.1:10)	Organic matter (%)	Total nitrogen (mg/g)	NH ₄ -N (μg/g)	NO ₃ -N (μg/g)	C/N ratio	Available P ₂ O ₅ (ppm)
6.0	1.70	1.03	22.67	60.66	9.57	69.24
CEC (cmol/kg)	EC (cmol/kg)				Soil texture	
	Ca	Mg	K	Na		
9.57	6.38	2.43	0.36	0.28	sandy loam	

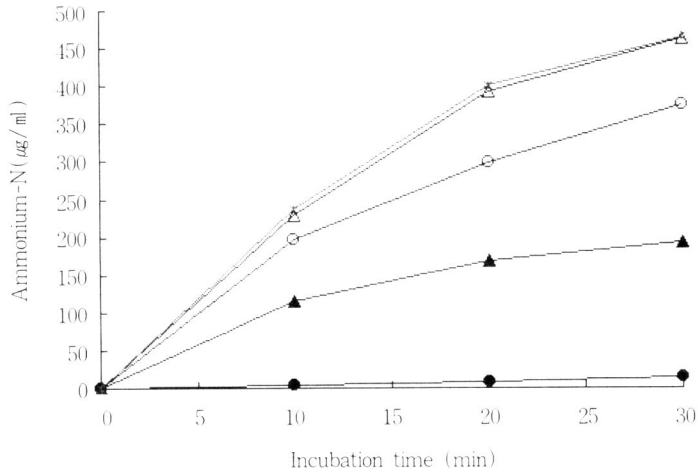


Figure 1. Effects of pyroligneous acids on Jack bean urease activity. nontreatment (×); pyroligneous acids (●); 10 fold dilution of pyroligneous acids (▲); 100 fold dilution of pyroligneous acids (○); 1000 fold dilution of pyroligneous acids (Δ)

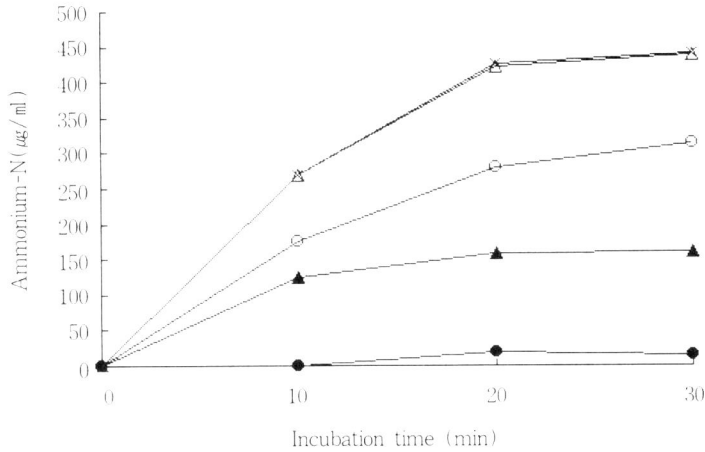


Figure 2. Effects of pyroligneous acids on *Bacillus pasteurii* urease activity. nontreatment (×); pyroligneous acids (●); 10 fold dilution of pyroligneous acids (▲); 100 fold dilution of pyroligneous acids (○); 1000 fold dilution of pyroligneous acids (Δ)

증가에 따른 토양 추출 urease 활성의 저해 감소는 목초액의 희석에 따른 Jack bean urease와 *Bacillus pasteurii* urease의 활성 저해 정도 감소와 유사한 경향을 나타내었다(그림 3).

종합적으로 볼 때 목초액은 식물 urease와 미생물 urease 활성 저해효과뿐만 아니라 다양한 urease complex가 존재하는 토양 urease에도 저해효과를 보였으므로 거의 모든 종류의 urease에 저해효과를 보

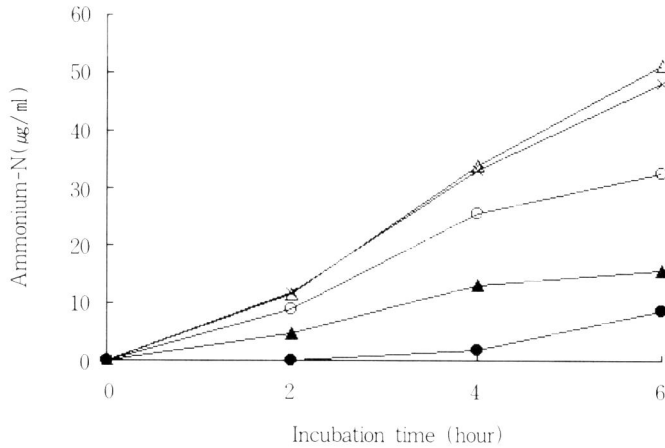


Figure 3. Effects of pyroligneous acids on soil urease activity. nontreatment (x); pyroligneous acids (●); 10 fold dilution of pyroligneous acids (▲); 100 fold dilution of pyroligneous acids (○); 1000 fold dilution of pyroligneous acids (◐)

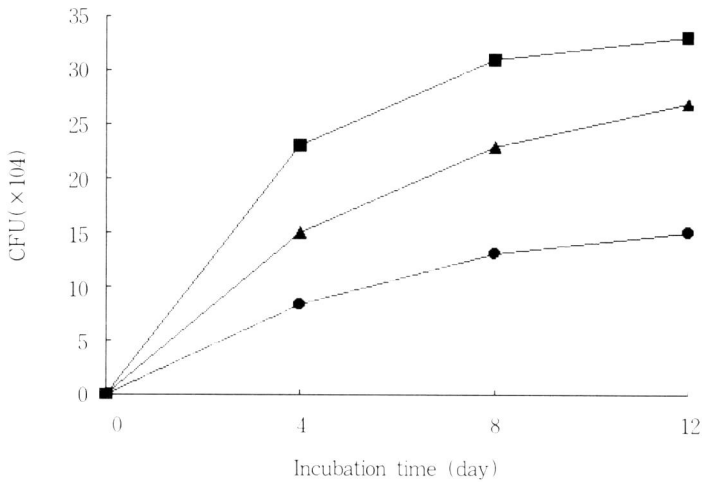


Figure 4. Effects of pyroligneous acids on soil ureolytic bacteria activity. nontreatment (■); 100 fold dilution of pyroligneous acids (●); 500 fold dilution of pyroligneous acids (▲)

인다는 결론을 내릴 수 있었다.

질소질 비료 중 요소를 토양에 시비하였을 때는 요소의 가수분해가 빠르게 일어나 암모니아로 휘산되어 손실되는 양이 많고 또한 식물에게 일시에 과

량의 암모니아를 공급하므로써 해를 미치는 문제점이 있었다. 따라서 목초액의 urease activity 저해효과는 urease inhibitor로 토양내 요소분해를 억제함으로써 요소비료를 토양에 시비했을 때 발생하는 문제점

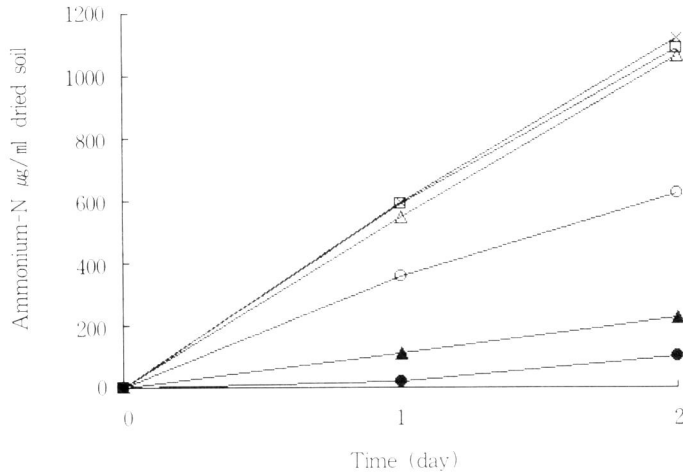


Figure 5. Effects of pyroligneous acids on soil urea hydrolysis.

nontreatment (×); pyroligneous acids (●); 2 fold dilution of pyroligneous acids (▲); 4 fold dilution of pyroligneous acids (○); 6 fold dilution of pyroligneous acids (△), 8 fold dilution of pyroligneous acids (□)

을 해결할 수 있을 뿐만 아니라 요소비료와 목초액을 같이 첨가하였을 때 작물에 일시에 많은 영양분을 주는 것을 막아 시비의 효율을 높일 수 있는 완효성 비료의 개발 가능성을 보였다.

3-2. 목초액이 ureolytic bacteria의 활성화에 미치는 영향
토양내 요소분해 미생물의 개수는 약 3.3×10^5 정도 이었고 이것은 일반 토양에 보통 존재하는 수준으로 판단된다. 목초액을 처리하였을 때 요소분해 미생물의 개수는 줄었으며 그 정도를 볼 때 목초 희석 100배의 경우 약 55% 감소하였고 목초 희석 500배의 경우 약 18% 정도 감소하였다. 이는 배지농도에 비해 각각 고형물 기준 2.3ppm과 0.45ppm 수준의 목초액을 처리해준 것이었다. 이로써 목초액은 urease 활성 억제뿐만 아니라 토양내 요소분해 미생물의 생육에 직접 저해 효과를 보인다는 결론을 내릴 수 있다(그림 4).

3-3. 목초액이 토양내 요소 가수분해에 미치는 영향
목초액을 토양내 직접 처리하였을 때 토양 요소가수분해는 저해를 받았다. 즉, 목초액을 4배까지 희석

한 용액을 처리했을 경우 약 44% 정도까지의 요소가수분해 저해효과를 보였으나 6배 희석 이상일 경우 요소가수분해 저해효과는 매우 미약하였다. 이로써 목초액의 증류잔사물 질량을 기준으로 하였을 때, 토양 1g당 425µg, 즉 425ppm 정도의 목초액을 처리하였을 때 44%의 요소가수분해 저해효과를 보인다는 결론을 내릴 수 있다(그림 5).

이상의 결과들을 종합하여 볼 때, 목초액은 토양내 존재하는 urease와 ureolytic bacteria에 모두 저해효과를 보였고 토양에 직접 처리하였을 때도 요소가수분해 저해효과를 보였다. 이는 목초액이 urease와 ureolytic bacteria에 직접 저해 작용을 하며 토양에서 적어도 몇 일 동안 안정적인 형태를 유지하면서 요소가수분해를 저해한다는 결론을 내릴 수 있다.

4. 목초액이 질산화작용(Nitrification)에 미치는 영향

토양내 질산화작용은 암모니움 산화균과 아질산균 산화균(예, *Nitrosomonas*, *Nitrobacter*)에 의해 각각 암모니움태 질소가 아질산태 질소로 바뀌고 아질산태

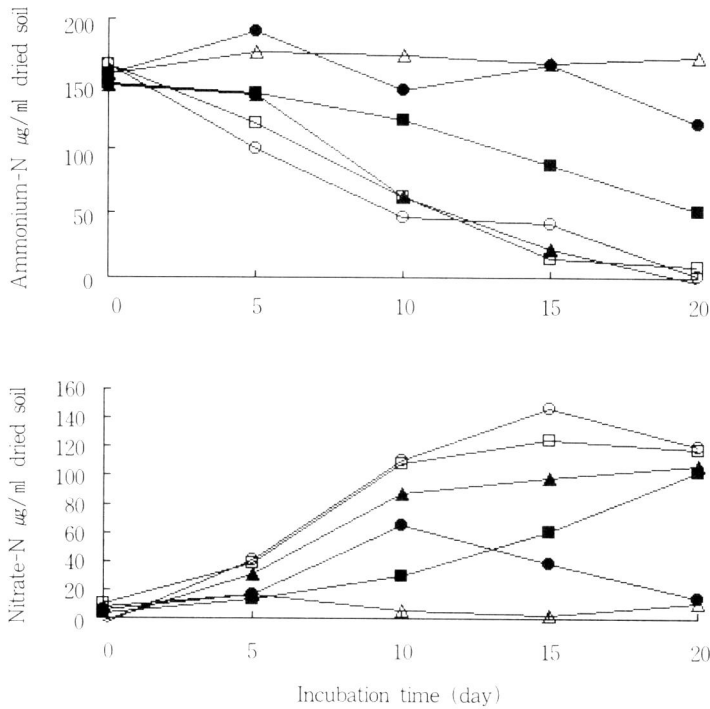


Figure 6. Effects of pyroligneous acids on soil nitrification.

nontreatment (□); pyroligneous acids (●); 10 fold dilution of pyroligneous acids (■); 100 fold dilution of pyroligneous acids (▲); 1000 fold dilution of pyroligneous acids (○); sterilized (△)

질소가 질산태 질소로 바뀌는 과정을 말한다. 질산화 작용에 의해 암모늄태 질소가 질산태 질소로 바뀌게 되면 식물이 선호하는 질소형태이기 때문에 긍정적인 효과도 있지만 과량 존재하게 되면 토양내에서 용탈이 쉽게 일어나 지하수와 호소 오염의 주원인이 된다. 따라서 질소순환에서 중요한 위치를 차지하는 질산화작용에 미치는 목초액의 영향을 질산화균의 개수와 토양내 질산화정도를 비교함으로써 그 효과를 알아보았다.

4-1. Nitrifying bacteria의 활성에 미치는 영향

목초액이 질산화균에 미치는 영향을 알아보기 위해서 MPN(most probable number) 방법을 이용하여 암모늄 산화균과 아질산산화균에 대하여 목초액 처리구와 무처리구로 나누어서 그 효과를 검정하였

다. 암모늄 산화균의 경우 목초액을 처리했을 때 (목초액 처리농도는 배지의 0.1%(wt/v) 농도로 처리), 무처리구는 토양 1g 당 2.7×10^4 개 정도의 암모늄 산화균이 있었고 목초액 처리구는 토양 1g당 1.6×10^3 개 정도의 암모늄 산화균이 있는 것으로 보아 목초액에 의해 암모늄 산화균이 약 20배 정도 생육저해를 받는 것으로 보였다. 한편, 아질산산화균의 경우 무처리구는 토양 1g 당 3.2×10^4 개 정도가 있었고, 목초액 처리구는 토양 1g 당 7.8×10^5 개 정도 존재하는 것으로 보아 목초액에 의해 아질산산화균이 약 20배 정도 생육활성효과를 보였다. 결과적으로 목초액에 의하여 암모늄 산화균은 저해를 받았고 아질산산화균은 활성효과를 보였지만 전체적으로 토양내 질산화작용은 억제되는 결과를 보였다.

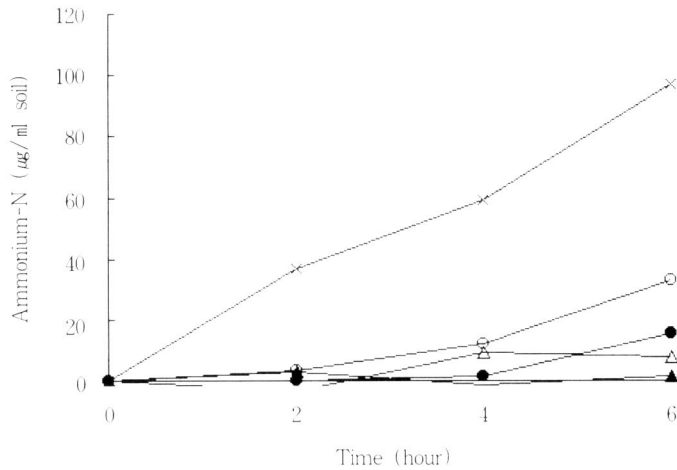


Figure 7. Effects of organic fractions of pyroli-gneous acids on soil urease activity. nontreatment (×); 100 fold dilution of pyroligneous acids (●); F1 fraction of pyroligneous acids (▲); F2 fraction of pyroligneous acids (○); F3 fraction of pyroligneous acids (△)

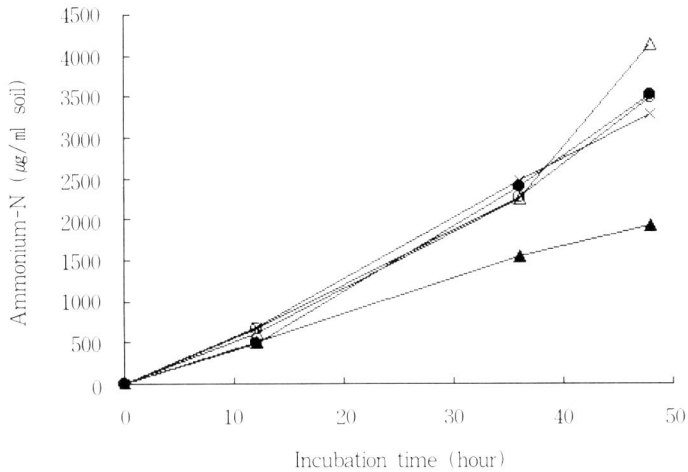


Figure 8. Effects of organic fractions of pyroli-gneous acids on urea hydrolysis in soil. nontreatment (×); 100 fold dilution of pyroligneous acids (●); F1 fraction of pyroligneous acids (▲); F2 fraction of pyroligneous acids (○); F3 fraction of pyroligneous acids (△)

4-2. 토양내 질산화작용에 미치는 영향

그림 6에서 배양일수가 늘어남에 따라 무처리(증류수)구에서는 처리해준 암모늄태 질소가 줄어들었으며 질산태 질소는 증가하는 경향을 보였다. 즉

질산화작용이 약 10µg nitrate-N/g dried soil · day 정도로 일어나고 있었다. 그리고 목초액 처리구에서는 암모늄태 질소가 무처리구에 비해 감소하는 양이 줄어들었으며 질산태 질소가 증가하는 양도 줄어들

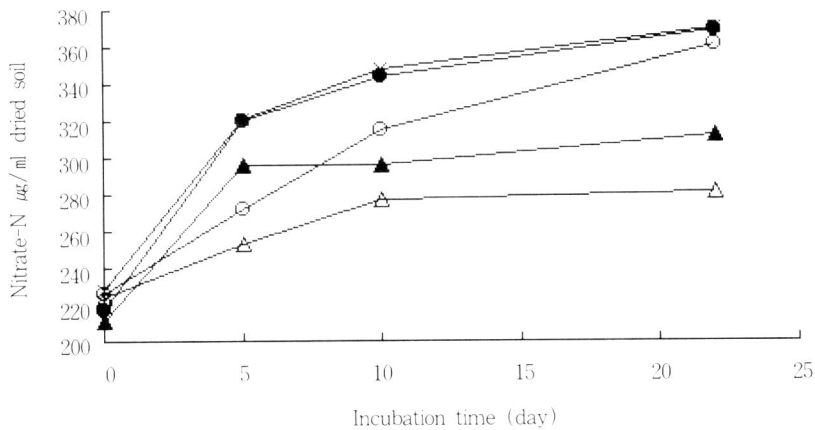


Figure 9. Effects of organic fractions of pyrroli-gneous acids on nitrification in soil. nontreatment (×); 100 fold dilution of pyrroli-gneous acids (●); F1 fraction of pyrroli-gneous acids (▲); F2 fraction of pyrroli-gneous acids (○); F3 fraction of pyrroli-gneous acids (△)

었다. 즉 목초액 원액의 경우 80%, 10배 희석액과 100배 희석액의 경우 각각 약 60%와 15%정도의 저해효과를 보였다.

5. 목초액의 분획물이 요소분해에 미치는 영향

목초액에 의한 요소분해와 질산화 작용에 저해효과 결과를 토대로 목초원액중 저해물질을 탐색하기 위해서 목초액을 유기용매의 극성별로 분획(F1, F2, F3)을 하였으며 우선 그 분획이 토양중 요소분해 효소의 활성과 요소분해정도에 미치는 영향을 살펴보았다.

5-1. soil urease 활성에 미치는 영향

목초 유기용매 분획을 처리하여 토양에 존재하는 urease 활성을 측정한 결과는 그림 7과 같았다. 즉, 목초원액, F1, F2, F3를 약 3mg/g soil의 농도로 처리하였을 때 무처리에 비해 목초원액, F1, F2, F3는 각각 41.7%, 98.6%, 66.2%, 91.8% 정도의 저해효과를 보였다. 따라서 목초원액 유기용매 분획중 F1 즉 CHCl₃으로 분획한 층에서 가장 저해효과가 뛰어났다.

5-2. 토양내 요소가수분해에 미치는 영향

이상에서 목초 유기용매 분획이 urease 활성에 미치는 영향을 살펴본 결과 F1이 저해효과 물질을 함유하고 있음을 알 수 있었고, 과연 그 물질이 토양에 직접 처리하였을 때 요소가수분해를 직접 저해하는지를 살펴보기 위해 목초 유기용매 분획을 약 0.3mg/g soil의 농도로 처리 후 토양의 요소가수분해 정도를 측정해 보았다. 그 결과, 무처리에 비해 F2, F3는 거의 저해효과를 보이지 않았으며 F3는 오히려 요소가수분해를 증가시키는 결과를 보인 반면, F1은 약 40.9%의 요소가수분해 저해를 보였다(그림 8). 이상의 결과를 볼 때 목초원액중 저해물질은 CHCl₃으로 분획이 가능하다는 것을 알 수 있었으며, 향후 화학분석방법에 의하여 그 구조를 밝혀냄으로써 요소분해 억제제로서 개발이 가능하리라 생각된다.

6. 목초액 분획물이 토양내 질산화 과정에 미치는 영향

앞서 언급한 것처럼 목초원액은 토양내 질산화작용에 저해효과를 보였으며(그림 6) 그 중 암모니움 산화균에 저해효과를 보였다. 만일 암모니움 산화균

이 아닌 아질산 산화균에 저해효과를 보았다면 토양 내 아질산태 질소가 축적되고 그 결과 식물에 악영향을 미칠 것이다. 따라서 목초원액은 질산화 억제제가 갖추어야 할 조건에 부합하며 이러한 긍정적인 결과를 토대로 목초원액을 유기용매 극성별로 분획하여 분획별로 0.15mg/g soil 농도로 토양에 처리하여 질산화 작용 억제 실험을 하였으며 그 결과는 그림 9와 같다. 즉, 목초원액은 무처리와 별 차이가 없었으며 분획중 F2는 초기에는 어느 정도의 저해효과를 보였으나 20일 후에는 거의 저해효과를 보이지 않았으며 F1은 15.8%, F3는 24.3%의 저해효과를 보여 목초분획 중 F3가 가장 뛰어난 질산화억제효과를 보였다. 한편 이상의 결과들을 종합하여 볼 때 F1은 요소 가수분해 억제제로서뿐만 아니라 질산화과정 억제제로서도 그 가능성을 엿볼 수 있었다.

VI. 결론

1. 목초액의 전질소함량은 2.50%이었고, 그 중 암모니움태 질소의 농도는 473ppm이었다. 목초액 내 전질소 중 암모니움태 질소와 질산태 질소가 차지하는 양이 극히 작은 것으로 미루어 보아 유기태로 존재하는 질소가 목초액의 전질소의 대부분을 차지하는 것으로 판단된다.
2. 목초액의 pH는 3.3으로 낮은 산도를 나타내었으며, 목초액 증류잔사물의 농도는 18.93mg/ml이었다. 한편, 목초액에 포함되어 있는 중금속(비소, 카드뮴, 수은, 납, 크롬, 구리)의 함량을 정량한 결과, 이들은 최대 0.3ppm이하의 수준으로 함유되어 있었다. 따라서 목초액내 함유된 중금속의 수준은 농업용 재료로서 사용하기에 우려할 만한 정도가 아닌 것으로 판단되었다.
3. 목초액은 토양중 요소분해작용을 억제하였으며, 그 억제정도는 목초액의 증류잔사물 질량을 기준으로 하였을 때, 토양 1g당 425 μ g, 즉 425ppm 정도의 목초액을 처리하였을 때 44%의 요소가 수분해 저해효과를 보이는 것으로 밝혀졌다.
4. 목초액은 식물 urease와 미생물 urease 활성을 저해하였으며, 또한 다양한 urease가 존재하는 토양 urease에도 저해효과를 보여, 거의 모든 종류의 urease에 저해효과를 보이는 듯하다. 한편 목초액은 ureolytic bacteria의 활성 또한 저해하는 것으로 밝혀졌다. 따라서 목초액에 의한 토양중 요소분해작용의 억제효과는 토양의 urease활성저해와 아울러 그에 따른 ureolytic bacteria의 활성저해에 기인하는 것으로 판단된다.
5. 목초액의 urease활성저해효과는 토양내 요소분해를 억제함으로써 요소비료를 토양에 시비했을 때 발생될 수 있는 암모니아 휘산으로 인한 비료의 손실, 혹은 식물에게 일시에 과량의 암모니아를 공급함으로써 미치는 해와 같은 문제점을 해결할 수 있을 것으로 기대된다. 따라서, 요소비료와 목초액 혹은 목초액내 존재하는 요소분해효소 저해성분을 같이 첨가함으로써 작물에 일시에 많은 영양분을 주는 것을 막아 시비의 효율을 높일 수 있는 완효성 비료의 개발 가능성을 보였다.
6. 목초액은 토양중 질산화과정에 관여하는 암모니움 산화균의 활성을 저해하였으나 아질산 산화균의 활성을 증진하는 효과를 보였고, 전체적으로는 토양중 질산화작용을 저해하는 효과를 나타내었다. 따라서 추후 목초액에 존재하는 질산화억제 성분을 구명함으로써 질산화 억제제의 개발이 가능하리라 생각된다.
7. 요소분해 및 질산화작용 억제효과를 보이는 목초액 성분을 탐색하기 위하여 목초액을 극성별로 분획(CHCl₃, CHCl₃-MeOH, 수용액층)하여 각각에 대한 저해효과를 비교하였다. 그 결과 요소분해저해는 CHCl₃ 추출층에 의하여 현저히 나타난 반면, 질산화작용억제는 수용액층에서 나타났.
8. 이상의 연구결과는 천연물질에서 요소분해 및 질산화작용 억제물질을 찾아 질소질비료의 비효 증진을 통한 친환경농업에 기여가 가능한 한편, 목초액내 특정 화학물질이 어떠한 메카니즘으로 요소분해와 질산화작용을 억제하는가에 관한 기초적 연구의 토대가 될 것이라고 판단된다.

참고 문헌

1. 박래경(1998), 2030년대 우리나라 농수산과학의 전망과 연구방향, 한국과학기술한림원, 한림심포지움 논문집 2: 75~81.
2. 박상우(1998), 농업정책과 구조조정, 농업과학 심포지움, p. 48~75.
3. 신명호, 임선옥(1998), 결명, 쑥, 목재타르 추출물에 의한 밭토양중 요소분해와 질산화작용 억제효과, 서울대학교 농과대학 석사논문.
4. 신제성(1995), 토양이 보전관리, 농업과학학술토론회, p. 25~38.
5. 양재의, 엄기철, 정광용, 원순강(1999), 환경농업과 비료, p. 51~92.
6. 오성호(1995), 환경을 생각하는 농업: 전망과 정책과제, 농업과학 심포지움, p. 108~128.
7. 이호진, 정영상(1993), 지속적 작물생산과 환경관리, 지속적 농업과 환경보전 국제심포지움.
8. 임선옥(1989), 요소분해효소 urease 억제제의 선별, 효과 및 화학합성, 서울대학교 농과대학.
9. 임선옥, 신명호, 박현준, 김민균(1998), 쑥추출물의 밭토양 중 요소분해, 질산화작용 억제효과, 한국토비학회, 31: 392~399.
10. 홍병희(1998), 세계속의 한국식량농업, 농업과학 심포지움, p. 76~110.
11. Back, A. S., R. R. Sherlock, N. P. Smith, and K. C. Cameron(1989), Ammonia volatilization from urea broadcast in spring onto autumn-sown wheat, N. Z. J. Crop Hort. Sci, 14: 175~182.
12. Bacon, P. E., E. H. Hault, and J. W. McGarity(1986), Ammonia volatilization from fertilizers applied to irrigated wheat soils, Fert. Res, 10: 27~42.
13. Barshad, I.(1954), Cation exchange in micaceous minerals: II. Replaceability of ammonium and potassium from vermiculite, biotite and montmorillonite, Soil Sci, 78: 57~76.
14. Belser, L. W., and E. L. Schmit(1982), Nitrifying bacteria(Methods of soil analysis, part 2, chemical and microbial properties, 2th Ed., Page, A. L., R. H. Miller, and D. R. Keeney, eds.), ASA-SSSA, Madison, p. 1027~1042.
15. Bouwman, A. F.(1990), Exchange of greenhouse gases between terrestrial ecosystems and the atmosphere In A. F. Bouwman, (ed.) Soils and the greenhouse effect, John Wiley & Sons, Chichester, England, p. 61~127.
16. Brady N. C.(1990), The nature and properties of soils, 10th edition, Macmillan pub. company, p. 315~324.
17. Bray, R. H., and L. T. Kurtz(1945), Determination of total, organic, and available forms of phosphorus in soils, Soil Sci, 59: 39~45.
18. Bremner, J. M and G. W. McCarty(1988), Effects of terpenoids on nitrification in soil, Soil Science Society of American Journal 52: 1630~1633.
19. Bremner, J. M., and R. L. Mulvaney(1978), Urease activity in soils, In R. G. Burns, (ed.), Soil enzymes, Academic Press, New York.
20. Bremner, J. M.(1960), Determination of nitrogen in soil by the Kjeldahl method, J. Agric. Sci, 55: 11~33.
21. Bremner, J. M.(1965), Inorganic forms of nitrogen In A. L. Page et al.(ed.) Methods of soil analysis, Part2, Chemical and microbiological properties, Second edition, Agronomy 9: 199~209, ASA, Inc, Madison, Wis.
22. Bremner, J. M. and C. S. Mulvaney(1965), Nitrogen-Total In A. L. Page et al.(ed.) Methods of soil analysis, Part2, Chemical and microbiological properties, Second edition, Agronomy 9: 199~209, ASA, Inc, Madison, Wis.
23. Bremner, J. M., and D. R. Keeney(1965), Steam distillation methods for determination of ammonium, nitrate and nitrite, Anal. Chim. Acta 32: 485~495.
24. Bundy, L. G. and J. M. Bremner(1973),

- Inhibition of nitrification in soils, Soil Sci. Soc. Am. Proc. 37: 396~398.
25. Bundy, L. G., and S. L. Oberle(1988), Evaluation of methods for control of ammonia volatilization from surface-applied urea-containing fertilizers, J. Fert. Issue 5: 24~30.
 26. Christensen, W. B.(1946), J. Bacteriol. 52: 461-466.
 27. Denmead, O. T., J. R. Freney, and J. R. Simpson(1982), Dynamics of ammonia volatilization during furrow irrigation of maize, Soil Sci. Soc. Am. J. 46: 149~155.
 28. Duxbury, J. M. and A. R. Moiser(1993), Status and issue concerning agricultural emissions of greenhouse gases(Agricultural dimensions of global climate change. H. M. Kaiser and T. Drennem, eds.), p. 229~258. St. Lucie Press. Delray Beach, Florida.
 29. Fernando, V. and G. Roberts(1976), The partial inhibition of soil urease by naturally occurring polyphenols, Plant and Soil 44: 81~86.
 30. Fillery, I. R. P., and P. L. G. Vlek(1986), Reappraisal of the significance of ammonia volatilization as a N loss mechanism in flooded rice fields, Fert. Res. 9: 79~98.
 31. Freney, J. R., A. C. F. Trevitt, S. K. De Datta, W. N. Obcemea, and J. G. Real(1990), The interdependence of ammonia volatilization and denitrification as nitrogen loss processes in flooded rice fields in the Phillipines, Biol. Fert. Soils 9: 31~36.
 32. Freney, J. R., and J. R. Simpson, and O. T. Denmead(1983), Volatilization of ammonia, gaseous loss of nitrogen from plant-soil systems (J. R. Freney, and J. R. Simpson, eds.), p. 1~32, Martinus Nijhoff/Dr W. Junk Publishers, The Hague.
 33. Freney, J. R., O. T. Denmead, A. W. Wood, P. G. Saffigna, L. S. Chapman, G. J. Ham, A. P. Hurney, and R. L. Stewart(1992), Factors controlling ammonia loss from trash covered sugarcane fields fertilized with urea, Fert. Res. 31: 341~349.
 34. Gonzalez, A. Z., J. B. Barrera, B. B. Davila, E. Valencia, and X. A. Dominguez(1992), Anthraquinones from *Cassia greggi*, Phytochemistry 31: 255~258.
 35. Gopal, B. K.(1987), Investigation of nitrate contamination in shallow groundwaters near Woodward, Oldahoma, gound water quality and agricultural practices(D. M. Fairchild, ed.), Lewis Publisher, Boca Raton, FL, p. 247~264.
 36. Goring, C. A. I.(1962), Control of nitrification by 2-chloro-6-(trichloromethyl)-pyridine, Soil Sci. 93: 211~218.
 37. Green, A. J.(1981), Particle-size analysis (Manual on soil sampling and method of analysis, J. A. Mckeague et al., eds.), p. 545~567, Canadian Society of Soil Science, Ottawa.
 38. Harborne, J. B.(1984), Methods of plant analysis (Phytochemical methods: a guide to modern techniques of plant analysis, 2nd Ed., Harborne, J. B., ed.), p. 1~36, Chapman and Hall, USA.
 39. Harper, L. A., V. R. Catchpoole, and I. Vallis, (1983), Ammonia loss from fertilizer applied to tropical pastures, gaseous loss of nitrogen from plant-soil systems(J. R. Freney, and J. R. Simpson, eds.), p. 195~214, Martinus Nijhoff/Dr W. Junk Publishers, The Hague.
 40. Harris, R. F.(1980), Effect of water potential on microbial growth and activity, SSSA, Madison.
 41. Hauck, R. D.(1983, Agronomic and Technological approaches to minimizing gaseous nitrogen losses from croplands(Gaseous loss of nitrogen from plant-soil systems, J. R. Freney and J. R. Simpson, eds.), p. 285~312, Martinus Nijhoff/Dr W. Junk Publishers, The Hague.
 42. Jones, R. D., and A. P. Schwab(1993), Nitrate leaching and nitrite occurrence in a fine-textured

- soil, Soil Sci. 155: 272~282.
43. Keeney, D. R., and J. M. Bremner(1967), Determination and isotope-ratio analysis of different forms of nitrogen in soils: 7. Urea, Soil Sci. Am. Proc. 31: 317~321.
 44. Keller, G. D. and Mengel, D. B.(1986), Ammonia volatilization from fertilizers surface applied tonotill corn, Soil Sci. Soc. Am. J. 50: 1060~1063.
 45. Lodhi, M. A.(1977), The influence and comparison of individual forest trees on soil properties and possible inhibition of nitrification due to intact vegetation, Am. J. Bot. 64: p.260~264.
 46. Lodhi, M. A. K. and K. T. Killingbeck(1980), Allelopathic inhibition of nitrification and nitrifying bacteria in a Ponderosa pine(*Pinus ponderosa* Dougl.) community, Am. J. Bot. 67: 1423~1429.
 47. McCarthy G. W. and J. M. Bremner(1986), Effects of phenolic compounds on nitrification in soil, Soil Sci. Society of America Journal 50: 920~923.
 48. McClung, G., and W. T. Frankenberger, Jr.(1985), Soil nitrogen transformations as affected by salinity, Soil Sci. 139: 405~411.
 49. Minami, K.(1994), Effect of nitrification inhibitors and slow-release fertilizers on emission of nitrous oxide from fertilized soils(CH_4 and H_2O : Global emissions and controls from rice fields and other agricultural and industrial sources, Minami, K., A. Moiser, and R. Sass, eds.), 187~196, Yokendo Publishers, Tokyo.
 50. Mobley, H. L., and R. P. Hausinger(1989), Microbial urease: significance, regulation and molecular characterization, Microbiological Reviews, 53: 85~108
 51. Munro P. E.(1966), Inhibition of nitrite oxidizers by roots of grasses, J. Applied, Ecol. 3: 227~229.
 52. Reithel, F. J.(1971), Urease, In P. D. Boyer (ed.), The enzymes, 4: 1~21, Academic Press, New York.
 53. Rice, E. L. and S. K. Pancholy(1973), Inhibition of nitrification by climax ecosystems. III. Inhibitors other than tannins, Am. J. Bot. 60: 691~702.
 54. Rice, E. L. and S. K. Pancholy(1974), Inhibition of nitrification by climax ecosystems, Am. J. Bot. 61: 1095~1103.
 55. Rice, E. L. and S. K. Pancholy(1972), Inhibition of nitrification by climax ecosystems, Am. J. Bot. 59: 1033~1040.
 56. Schmidt, E. L., and L. W. Belser(1994), Autotrophic nitrifying bacteria In Weaver et al.(ed.) Methods of soil analysis, Part 2, microbiological and biochemical properties, SSSA 5: 159~177, Madison, Wis.
 57. Tabatabai, M. A. and J. M. Bremner(1972), Assay of urease activity in soils, Soil. Biol. Biochem. 4: 479~487
 58. Tabatabai, M. A.(1994), Soil enzymes, In Weaver et al.(ed.) Methods of soil analysis, Part 2, microbiological and biochemical properties, SSSA 5: 775~833, Madison, Wis.
 59. Tate, R. L.(1995), Soil Biology, John Wiley & Sons, Inc.
 - Theron J. J.(1951), The influence of plants on the mineralization of nitrogen and the maintenance of organic matter in soil, J. Agri. Sci. Cambridge 41: 289~296.
 60. Vitousek, D. M., and P. A. Matson(1985), Causes of delayed nitrate production in 2 Indiana USA forests, Fer. Sci. 31: 122~131.
 61. White, C. S.(1986a), Effects of prescribed fire on rates of decomposition and nitrogen mineralization in a Ponderosa pine ecosystem, Biology and Fertility of Soils 2: 97~104.
 62. White, C. S.(1986b), Volatile and water-soluble inhibitors of nitrogen mineralization in a Ponderosa pine ecosystem, Biology and Fertility

- of Soils 2: 7~104.
63. Woormer, P. L.(1994). Most probable Number counts, In Weaver et al,(ed.), Methods of soil analysis, Part 2, microbiological and biochemical properties, SSSA 5: 59~79, Madison, Wis.
64. Zibilske, L. M,(1994). Carbon mineralzation, In Weaver et al,(ed.), Methods of soil analysis, Part 2, microbiological and biochemical properties, SSSA 5: 835~863, Madison, Wis.
65. Zuberer, D. A.(1994). Recovery and enumeration of viable bacteria, In R. W. Weaver et al,(ed.), Methods of soil analysis, Part 2, Microbiological and biochemical properties, 5: 119~144, SSSA, Inc, Madison, Wis.