

Research Article



CrossMark

Open Access

돈분 액비의 아산화질소 발생 저감 효과 검증

이평호^{1†}, 백지현^{2†}, 구연종^{2*}

¹농촌진흥청 국립원예특작과학원 원예특작환경과, ²전남대학교 농화학과

Verification of the Effect of Liquefied Pig Manure on Reducing Nitrous Oxide Generation

Pyeong Ho Lee^{1†}, Ji Hyeon Baek^{2†} and Yeonjong Koo^{2*} (¹Horticultural and Herbal Crop Environment Division, National Institute of Horticultural and Herbal Science, Rural Development Administration, Wanju 55365, Korea, ²Department of Agricultural Chemistry, Chonnam National University, Gwangju 61186, Korea)

Received: 14 December 2023/ Revised: 19 December 2023/ Accepted: 20 December 2023

Copyright © 2023 The Korean Society of Environmental Agriculture

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.

ORCID

Pyeong Ho Lee
<https://orcid.org/0000-0002-9444-3085>

Ji Hyeon Baek
<https://orcid.org/0009-0004-9690-908X>

Yeonjong Koo
<https://orcid.org/0000-0002-0147-1758>

Abstract

This study focused on nitrous oxide, a major greenhouse gas produced in agricultural settings through bacterial nitrogen oxidation in aerobic soil. Nitrogen fertilizer in farmland is identified as a primary source of nitrous oxide. The importance of reducing excess nitrogen in soil to mitigate nitrous oxide production is well-known. The study investigated the use of liquefied pig manure as an alternative to urea fertilizer in conventional agriculture. Results showed a more than two-fold reduction in nitrous oxide emissions in pepper cultivation areas with liquefied pig manure compared to that with urea fertilizer. The population of *Nitrosospira*, a nitrous oxide-producing bacterium, decreased by over 10% with liquefied pig manure. Additionally, *nirK* and *nosZ*, which are related to the denitrification process, significantly increased in the urea fertilizer group, whereas levels in the liquefied pig man-

ure group resembled those with no nitrogen treatment. In conclusion, the experiment confirmed that liquefied pig manure can serve as an eco-friendly nitrogen fertilizer, significantly reducing nitrous oxide production, a major contributor to the atmospheric greenhouse effect.

Key words: Denitrification, Fertilizer, Liquefied pig manure, Nitrous oxide, Pepper

서론

아산화질소는 주요한 온실가스로 100년 기준 지구온난화지수(Global warming potential, GWP)가 이산화탄소 대비 약 300배 높은 기체로, 기후와 농업환경을 변화시키는 주요 요인이다[1-4]. 아산화질소는 자체적으로 온실효과를 발생시키면서 성층권에서는 UV에 의해 산화질소(nitric oxide, NO)로 전환되어 오존을 산소로 전환시키는 역할을 하여 오존층을 파괴함으로써 온실효과를 가속화하는 것으로 알려져 있다[5, 6]. 아산화질소는 21세기 동안 22%가 증가하였으며 마지막 30년 동안 가장 큰 증가율을 나타내어 오존을 파괴하는 주요 기체로 보고되고 있다[7,8].

[†]These authors equally contributed to this work.

* Corresponding author: Yeonjong Koo
Phone: +82-62-530-2133; Fax: +82-62-530-2139;
E-mail: yeonjong@jnu.ac.kr

토양에서 유래되는 아산화질소는 다양한 경로로 발생되는데, 대기로 방출되는 아산화질소의 약 57%가 농업환경에서 발생하고 있으며 농경지뿐만 아니라 농장형 입업환경에서도 대량으로 발생한다[9-11]. 아산화질소는 토양의 질산화 및 탈질화 과정에서 생성되며 질소비료, 토양 산성도, 수분, 그리고 기온이 질산화 및 탈질화 과정에 주요하게 영향을 미치게 된다[3,12-15]. 특히 농업환경에서 과도하게 사용되는 질소비료는 아산화질소를 대량으로 생성시키는 요인이 되고 있다[9,13]. 또한 질소간섭(N deposition)에 의해 대기 중의 질소화합물이 지표면으로 강하게 침전되면서 발생량이 증가하며 질소간섭으로 유입되는 질소화합물의 양이 때로는 80-100 kg N ha⁻¹ 수준에 이르기까지 한다[16-18].

아산화질소는 주로 토양 미생물에 의해 질산염이 탈질반응을 통한 질소가스 발생 과정(Denitrification)과 이화적 질산염환원(Dissimilatory nitrate reduction to ammonium, DNRA)을 통한 암모니아 생성 과정에서 발생하는 것으로 알려져 있다[19,20]. 두 경로 모두 질산염이 환원되는 과정으로 토양의 미생물 군집과, 산소, 수분, 질산염의 농도, 탄소 농도 및 토양 산성도 등 다양한 토양 환경 요소들이 영향을 미친다[20]. 탈질반응은 질산염(nitrate, NO₃⁻)이 아질산염(NO₂⁻)을 거쳐 질소가스(N₂)로 환원시키는 혐기성 반응으로 산소가 제한된 조건에서 산화질소(NO)와 아산화질소 가스의 환원도 포함하는 경로이다[21,22]. 탈질반응 각 단계에 관여하는 유전자로 *narG*, *nirS*/*nirK*, *norB* 및 *nosZ* 등이 알려져 있으며 각각 질산염환원효소(nitrate reductase), 아질산염환원효소(nitrite reductase), 산화질소환원효소(nitric oxide reductase), 그리고 아산화질소환원효소(nitrous oxide reductase)를 코딩한다. 아산화질소를 포함한 중간물질의 축적은 토양 미생물들의 탈질반응 관련 기능성 유전자의 존재 유무[23]와 이들의 발현 차이[24,25], 발현된 효소들의 활성 차이[26,27], 각 단계 효소의 활성을 방해하는 환경적 요인[28-30]들이 있다. 탈질과정에서 nitrous oxide reductase의 활성이 억제되면 아산화질소의 발생이 촉진된다. DNRA 과정에서 아산화질소는 환원공정에서 부산물로 발생된다. 두 단계로 이뤄진 이 경로에서 첫 번째 단계는 질산염환원효소에 의한 아질산염의 생성이고, 두 번째 단계는 시토크롬 c 아질산염환원효소(Cytochrome c nitrite reductase, ccNiR)에 의한 암모니아로의 전환이다. 이 단계는 특정 박테리아가 혐기성 조건에서 산소를 대신해 아질산염을 말단 전자 수용체로 사용하게 되는 반응이다. DNRA 과정은 토양에서 이동성인 질산염들을 양전하를 가진 암모늄 이온으로 전환함으로써 토양이 질소를 보유하도록 돕는 역할을 하여 자연계의 식물들의 질소 흡수를 증대할 수 있는 중요한 기능을 한다[31-33]. 예를 들어 칠레 온대 우림 토양에서 DNRA는 거의 모든 질산염을 암모니아로 전환하여 질소를 토양에 보존하는 역할을 한다[34,35].

일반적으로 농경지에서는 작물 재배를 위해 과도하게 질소비료가 공급되고, 작물이 사용하고 남은 여분의 질소들은 질산염, 아질산염, 아산화질소, 질소가스 등 다양한 질소형태로 전환되어 토양 밖 환경으로 유출된다. 농경지에서 발생하는 아산

화질소는 전체 아산화질소의 약 60%에 해당하는 주요한 발생원으로 측정되고 있으며[36], 따라서, 밭 토양 농경지에서 지속적인 질소 투입으로 인한 N₂O 발생량을 측정하는 연구 결과는 밭 토양에서 N₂O 발생을 줄이는 방법에 대한 고찰을 할 수 있게 한다. 이 논문에서는 액비를 도입해 질소 투입원에 따른 아산화질소 발생량을 살펴보았으며 이러한 형태의 질소 비료가 작물 생육에 도움을 줄 뿐만 아니라 아산화질소 발생 억제에 탁월한 효과가 있음을 입증하였다.

재료 및 방법

고추 재배 및 시비 방법

관행비료 처리구 질소원으로 요소를 처리하였고 5월 15일 기비 처리 및 6월 19일, 7월 10일, 8월 23일 등 3회로 나누어 추비를 시비하였다. 무처리구의 경우 요소비료를 제외한 주요 비료를 요소비료 처리구와 같이 기비와 추비로 나누어 처리하였다. 돈분 액비의 경우 화학성분 분석결과에 따라 요소비료 처리구에 처리되는 질소성분량에 해당하는 액비량을 5월 15일 기비 처리를 시작으로 전량 관비 형태로 처리하였다. 시비 후 3일 간 암모니아 가스 제거 기간을 두고, 발아 후 3주된 고추 모종(칼탄패스, 농우바이오)을 정식하였다.

액비 준비 및 액비 성분 분석

돈분뇨를 호기적 조건에서 발효시킨 후 120 mesh 여과기로 걸러서 부유 유기물을 제거한 형태로 제조된 관비용 돈분 여과액비를 사용하였다. 준비된 액비의 성분 분석은 기축분뇨 발효액 분석 방법인 농촌진흥청 고시 제2022-28호(2022. 9. 30) 비료의 품질검사방법 및 시료채취기준에 준하여 분석하였다. 질소전량은 황산법으로 일정량의 시료를 취하여 Kjeldahl로 분해한 후 증류하여 적정하였고 인산과 칼리 전량은 염산과 질산 혼합액으로 습식분해하였으며, 중금속은 과염소산과 질산혼합액으로 분해하여 유도결합 플라즈마 발광분광법 ICP (Perkin Elmer 7300dv, USA)로 분석하였다.

토양 화학성분 분석

토양 화학성분 분석은 농촌진흥청의 토양 및 식물체 화학성 분석법에 준하였다(RDA, 2000). 토양 시료는 경운 작업 후 비료 처리 전과 고추 정식 후 근권부 표토를 채취하여 음지에서 풍건한 후 2 mm 체로 쳐서 분석하였다. 토양의 pH와 전기전도도(EC)의 경우 pH는 토양 5 g에 증류수 25mL로 희석하여 (1:5법) 이온전극법(ORION VersaStar Meter, Thermo, USA)으로, EC는 EC meter (CM-30R, TODKK, Japan)로 측정하였다. 유기물 함량은 Tyurin법, 암모니아태·질산태 질소는 Kjeldahl 증류법, 유효 인산은 Lancaster법, 치환성 양이온 칼륨, 칼슘, 마그네슘은 1N 아세트산암모늄(CH₃COONH₄, pH 7.0) 원충용액으로 침출하여 유도결합플라즈마 분광분석기(Integra, GBC Scientific Equipments, Australia)를 사용하여 측정하였다.

시비량 설정

시험 전 토양분석결과를 농촌진흥청 작물별시비처방 프로그램인 흙도람에 입력하여 토양검정시비량을 산출하였다. 관행처리구는 요소를 기비로 처리하였고 추비량을 3회 처리하였다. 산출된 질소요구량과 액비 성분 분석결과를 이용하여 액비 필요량을 산출하였다. 액비는 정식 직후부터 2주 간격으로 8회로 분시하였다.

아산화질소 포집 및 측정

아산화질소 포집을 위하여 고추 밭 이랑에 직경 40 cm, 높이 30 cm의 투명 아크릴로 제작된 원통형 포집기를 설치하고 포집 전 1시간 이상 통기 후 30분간 뚜껑을 닫아 토양 가스를 포집하고 50 mL 용량의 주사기를 사용해 포집기 내부 공기를 채집하였다. 관행 비료처리구는 요소비료 기비처리(질소 55%) 하였고 액비는 전체 질소요구량의 1/8을 처리한 직후 1일 간격으로 2주 후부터 1주 간격으로 아산화질소를 포집하여 정량하였다. 포집된 가스는 GC-ECD (Perkin Elmer, Clarus 680)로 분석하였다. 컬럼은 HayeSep Q이 사용되었고 주입구, 컬럼, 검출기 온도는 각각 150°C, 50°C, 300°C로 설정되었다. 기체이동상으로는 수소를 연소가스로는 에어를 사용하였다.

고추 생육, 고추 과실 생산량 및 양분 흡수량 비교

고추의 초장, 경경, 주경장은 고추의 영양생장이 마무리된 9월 1일에 측정되었다. 고추의 수확량은 1차(8월 7일), 2차(8월 31일), 3차(10월 4일) 등 3회 수확을 마무리한 후 전체 수확량을 비교하였다.

식물체 무기성분 분석

식물체 시료는 70°C 오븐에서 72시간 건조 후 성분 분석에 사용하였다. 전질소는 분말상태의 시료 0.5 g을 평량하여 CN 원소분석기(Primacs SNC-100, Skalar, Netherlands)를 활용 900°C에서 열분해 분석하였고, 나머지 성분은 식물체 분해액(HNO₃:HClO₄ = 85:15)으로 습식 분해 후 분석하였다. 인산은 Vanadate법으로 분석하였고, 치환성 양이온 칼륨을 유도결합플라즈마 분광분석기(Integra, GBC Scientific Equipments, Australia)를 사용하여 측정하였다.

박테리아 군집분석

박테리아 군집분석을 위한 토양으로 아산화질소 포집기 내 토양을 비료 시비 3일 후 표토를 채집하였다. 약 500 mg의 토양에서 NucleoSpin® soil kit (740780.50, Macherey-Nagel, DE)을 사용하여 DNA를 추출하였다. 추출된 DNA를 주형으로 하여 16S rDNA 유전자를 primer 16S V3-V4 forward (5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3')와 16S V3-V4 reverse(5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3')로 증폭하였다. 증폭된 PCR 산물은 경북대학교 차세대 시퀀싱 연구센터에서 Bacterial 16S V4 gene amplicon sequencing 서비스를 통해 분석하였다. 분석된 시퀀스 정보는 인터넷 기반 Qiime 프로그램을 통해 분석하였다.

박테리아 메타지노믹스

앞서 토양 시료에서 추출된 DNA를 주형으로 하여 아산화질소 생성 및 대사에 관여하는 유전자 *nirS* (*nirS_cd3A* 5'-AACGYSAAGGARACSGG-3', *nirS_R3cd* 5'-GASTTCG GRTGSGTCTTGA-3'), *nirK* (*nirK1040* 5'-GCCTCGATC AGRTRTRGGTT-3', *F1aCu* 5'-ATCATGGTCTGCCGCG-3'), 그리고 *nosZ* (*NosZ-II-F_CladeII* 5'-CTIGGICCIY TKCAYAC-3', *NosZ-II-R_CladeII* 5'-GCIGARCARAATCBGTRC-3') 유전자를 해당 특이 프라이머를 이용하여 PCR 증폭하였고 DNA 전기영동을 통해 결과를 확인하였다.

결과 및 고찰

액비를 사용한 고추 밭에서 화학성분 분석

질소비료 무처리구(무처리구), 화학비료 관행 처리구(요소 비료 처리구), 돈분여과액비 처리구(액비 처리구)에서 비료 처리 전 후 시기에 토양 화학성분을 조사하였다(Table 1). 요소 비료 처리구는 통상 고추 재배에 시비되는 관행 시비법에 따라 기비 1회, 추비 3회로 시비하였다. 액비 처리구의 경우 질소비료 기비를 실시하지 않고 전량 추비로 8회에 나눠 시비함으로써 아산화질소 저감과 고추 생육 증가를 함께 확보하고자 하였다. 질소 성분 분석 결과에 의하면 비료 처리 전 암모니아태 질소는 2.04±2.62 mg/kg, 질산태 질소는 12.71±4.53 mg/kg 등으로 분석되었다. 토양 화학성분 자료를 바탕으로 토양

Table 1. Analysis of soil chemical elements and factors

		pH (1:5)	EC (dS/m)	OM (%)	P ₂ O ₅ (mg/kg)	Ex Cation (cmol ⁺ /kg)				NH ₄ ⁺ -N (mg/kg)	NO ₃ ⁻ -N (mg/kg)
						K	Na	Mg	Ca		
Before treat	Avg	5.48±0.30	0.45±0.13	1.41±0.29	56.08±23.8	0.59±0.10	0.21±0.06	2.64±0.56	4.01±1.21	2.04±2.62	12.71±4.53
	No N	6.19±0.46	0.25±0.09	1.56±0.47	80.09±23.7	0.30±0.10	0.06±0.03	2.00±0.15	3.14±0.98	8.85±5.94	3.29±2.16
After treat	Urea	5.59±0.53	0.78±0.81	1.73±0.82	79.71±45.0	0.38±0.26	0.08±0.04	2.16±0.61	3.46±1.34	5.65±3.72	36.32±28.1
	LC	5.51±0.55	0.61±0.13	1.50±0.08	78.15±17.3	0.42±0.22	0.14±0.03	1.86±0.66	2.79±1.06	6.06±5.51	13.24±9.18

Each elements were tested before and after the treatment of fertilizers. The values of before treatment is the average of all testing soils. The variation of each values indicate the standard deviation(±SD). No N, Urea, and LC indicate no nitrogen treatment, urea treatment as nitrogen fertilizer, and liquefied pig manure treatment, respectively.

Table 2. Analysis of soil fertilization amount

	Nitrogen (kg/10a)	Phosphate (kg/10a)	Potassium (kg/10a)
Fertilizer application before planting	10.5	24.3	11.9
Fertilizer application after planting	8.6	0.0	7.9
Total amount	19.1	24.3	19.8

Soil fertilization amount was calculated based on the soil chemical composition before fertilization shown in Table 1.

검정 시비량을 산출하였고, 질소 19.1 kg/10 a, 인산 24.3 kg/10 a, 칼리 19.8 kg/10 a 등으로 산출되었다(Table 2). 무처리구에서는 암모니아태 질소와 질산태 질소가 각각 8.85 ± 5.94 mg/kg, 3.29 ± 2.16 mg/kg로 분석되어 고추에 의해 토양의 질소가 흡수되어 크게 감소한 것으로 나타났다. 요소 비료 처리구에서는 암모니아태 질소와 질산태 질소가 각각 5.65 ± 3.72 mg/kg, 36.32 ± 28.1 mg/kg으로 나타나 비료 처리 전에 비해 각각 2배, 3배 증가한 것으로 나타났다. 액비 처리구에서는 암모니아태 질소와 질산태 질소가 각각 6.06 ± 5.51 mg/kg, 13.24 ± 9.18 mg/kg으로 나타나 요소비료 처리구에 비해 암모니아태 질소는 더 많이 축적된 반면 질산태 질소는 약 35% 수준인 것으로 나타났다. 이는 질소비료를 처리하기 전의 토양에서 측정된 질산태 질소량과 비슷한 수준이다. 이러한 결과는 돈분여과 액비를 2주 간격으로 8회에 나누어 관비로 처리함으로써 질산태 질소로의 전환이 억제된 결과로 생각된다.

액비를 사용한 고추 밭에서 아산화질소 발생량 감소

질소비료 무처리구, 요소비료 처리구, 액비 처리구에서 아산화질소 발생을 비교하였다(Fig. 1). 비료 처리 후 강우 시 아산화질소 발생량이 크게 증가하는 것으로 측정되었다. 특히 요소비료 처리구에서는 5월 30일 기준 아산화질소가 약 5,000 ppb 수준으로 증가하였지만 같은 시기 액비를 처리한 처리구에서는 약 600 ppb (5월 30일) 정도만 측정되어 요소비료 처리구 대비 20%의 발생량만 검출되었다. 이후 7월 9일 전 후 강우가 집중된 시기에 다시 한 번 요소비료 처리구에서는 약 3,500 ppb 수준으로 아산화질소가 발생하였으나 액비가 처리된 처리구에서는 약 1,500 ppb (7월 20일, 28일) 수준으로만 발생하여 요소비료 처리구 대비 약 40% 수준의 아산화질소만 검출되었다. 이러한 결과는 액비를 관비로 분시하는 비료처리 방식이 아산화질소 발생을 저감하는데 탁월한 효과가 있는 것을 보여준다. 이는 화학적 처리인 요소비료와 달리 액비는 다양한 유기물 형태의 질소를 포함하고 있어 무기질 형태인 암모니아태 질소 또는 질산태 질소로 전환하는데 시간이 소요되고, 8회에 나누어 분시를 함으로써 요소비료 처리구에 비해 탈질화 박테리아가 이용할 수 있는 잉여 무기 질소가 상대적으로 많지 않은 것이 원인으로 해석된다.

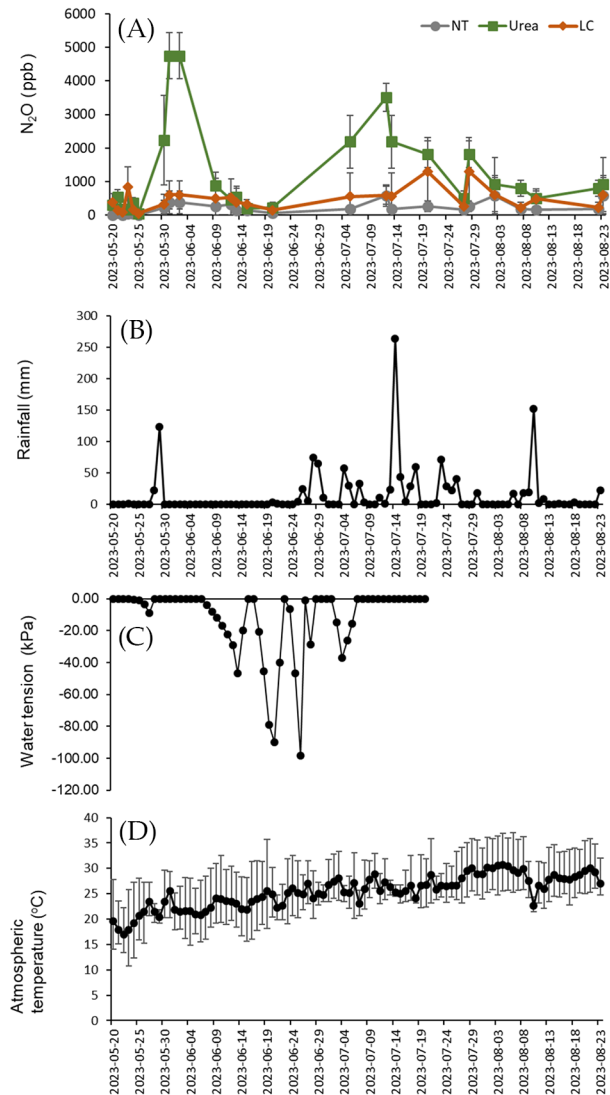


Fig. 1. Nitrous oxide gas determination. (a) The amount of nitrous oxide gas generated was observed periodically. (b-d) Rainfall, soil water tension, and atmospheric temperature were measured and displayed during the relevant period. The displayed error bar indicates the standard deviation (SD) of three measurements for nitrous oxide and soil water tension, and the highest and lowest temperatures of the day for atmospheric temperature. No N, Urea, and LC indicate no nitrogen treatment, urea treatment as nitrogen fertilizer, and liquefied pig manure treatment, respectively.

액비 사용 고추의 생장을 증대

무처리, 요소비료, 그리고 액비를 사용한 고추의 성장량을 비교하였다(Fig. 2). 각각 초장, 경경, 주경장을 측정된 결과 요소비료 처리구에서는 무처리구 대비 매우 유의한 수준으로 초장과 경경이 각각 10.1%, 10.4% 증가한 것으로 나타났고, 주경장도 유의한 수준으로 5.7% 증가했다. 액비 처리구도 초장, 경경, 주경장이 각각 13%, 9.4%, 4.1% 증가한 것으로 나타났다(Fig. 2a-c). 질소 무처리구 대비 질소비료의 추가로 유의한 수준의 고추 성장량이 관찰되었으며 특히 주경장 대비

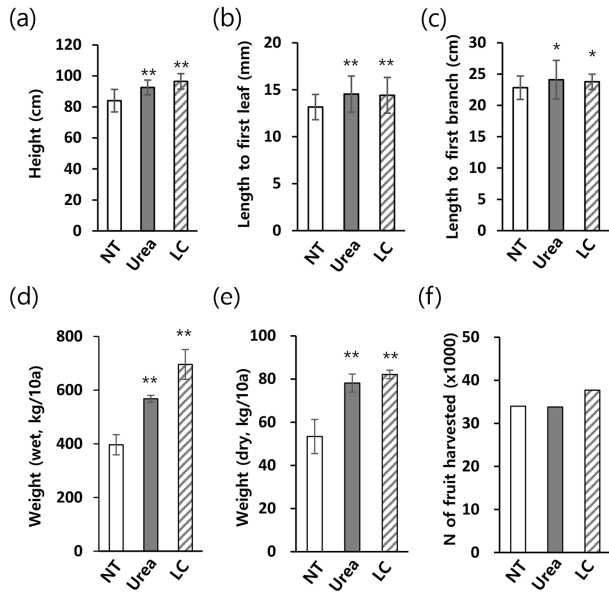


Fig. 2. Comparison of vegetative growth and pepper fruits harvested. The vegetative growth of peppers treated with no fertilizer (NT), urea fertilizer (Urea), and liquified pig manure (LC) was compared. (a-c) To compare the vegetative growth of peppers, the plant height (a), stem length to the first leaf (b), and stem length to the first branch (c) of peppers were measured and compared. The wet weight (d) and dry weight (e) of the harvested pepper fruits were measured, and the total number of harvested fruits was counted (f). All measurements were performed on at least 10 peppers in each 3 replicates, and the average was calculated. Error bars represent standard deviations (SD), and significant differences were indicated through t-test statistical processing (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$). No N, Urea, and LC indicate no nitrogen treatment, urea treatment as nitrogen fertilizer, and liquified pig manure treatment, respectively.

경경의 생장 촉진이 두드러진 것으로 보아 초기 고추 생장에 영향이 큰 것으로 보인다. 고추를 수확한 후 고추의 수확량을 생체중(wet weight)(Fig. 2d), 건중량(dry weight)(Fig. 2e), 그리고 수확된 고추 개수(Fig. 2f)로 측정된 결과 돈분 액비 처리구에서 수확된 고추량은 무처리구에 비해 유의한 수준으로 증가했으며 요소비료 처리구와 큰 차이를 보이지 않았다. 생체중 측정에서는 오히려 요소비료 처리구에 비해 유의한 수준으로 증가된 수치를 보였는데 이는 열매의 개수가 증가한 결과로 보여진다(Fig. 2d and f). 고추로 흡수된 영양성분을 잎, 줄기, 뿌리, 열매에서 각각 측정된 결과 요소비료 처리구와 액비 처리구에서는 무처리구에 비해 작물 개체당 더 많은 질소, 인, 칼륨이 측정되었고, 특히 잎과 줄기에서 크게 증가하여 앞선 경경, 주경장 크기 비교에서 확인했던 비료의 초기 영양 성장 촉진 효과를 확인하였다(Fig. 2a-c and Fig. 3). 액비 처리구에서는 요소비료 처리구 대비 청색과 붉은색 고추 열매에서 질소, 인산, 칼륨 세 가지 원소가 모두 높게 측정되어 액비 처리구의 열매 수확량 증대 효과를 다시 한 번 확인할 수 있었다(Fig. 2d, 2f and Fig. 3). 전적으로 돈분 액비는 고추의 영양성장과 생식성장을 충분히 촉진하여 관행 화학비료 처리

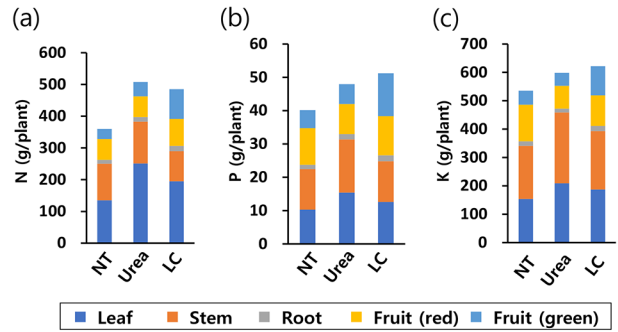


Fig. 3. Comparison of nutrient absorption by peppers. The amounts of nitrogen (N), phosphoric acid (P), and potassium (K) absorbed by pepper were measured in pepper leaves, stems, roots, ripened red fruits, and pre-ripened green fruits, respectively. No N, Urea, and LC indicate no nitrogen treatment, urea treatment as nitrogen fertilizer, and liquified pig manure treatment, respectively.

구와 유사하거나 증진된 수확량을 나타내었다. 이는 돈분 액비가 포함하고 있는 유기태 질소들이 무기태로 전환되고 다시 질산화되는 시간이 요소비료가 암모니아를 거쳐 질산화되는 시간보다 상대적으로 길어 고추가 지속적으로 무기태 질소를 흡수 이용하게 되어 고추의 생장이 촉진되었고, 또한 분시 회수가 많아진 만큼 질산태에서 탈질화되는 잉여 무기 질소가 줄어들어 탈질화로 유출되는 토양 질소량이 상대적으로 줄어들면서 아산화질소의 생성량도 감소한 것으로 생각된다.

액비 사용 고추 밭에서 박테리아 군집 분석

무처리, 요소비료, 그리고 액비 처리구에서 박테리아 군집의 변화를 관찰하였다(Fig. 4). 16S rDNA 염기서열 분석을 통한 군집분석 결과, 시험 포장에서 발견되는 가장 많은 토양 박테리아는 *Bacillus*, *Staphylococcus*, 그리고 *JG30-KG-CM45* 속으로 분석되었다. 하지만 이들 주요 박테리아들은 요소비료 또는 돈분 액비 처리시 군집 내 상대적인 점유율에서 큰 차이를 나타내지 않았다. 16S rDNA 유전자 개수를 기준으로 1000-10000번 사이로 검출된 박테리아를 색소 타입형식으로 나타내었고(Fig. 4a), 이들 중 10% 이상 차이를 나타내는 박테리아 속을 따로 분류하여 표시했다(Fig. 4b-e). 화학비료 형태인 요소비료 처리시 증가한 박테리아는 *Haliangium*, *Cutibacterium*, BC2-11_terrestrial, *Gitt-GS-136*, *TRA3-20*, *Stenotrophomonas*, *Nitrosospira*로 나타났으며, 10% 이상 감소한 박테리아는 *Pseudomonas*, *CCD24*, *Pseudonocardia*, *Agromyces*로 나타났었다(Fig. 4b and c). 한편 돈분 액비를 처리한 구에서만 증가한 박테리아는 *KD4-96*, *JG30-KF-CM66*, *Vicinamibacteraceae*, *RBG-13-54-9*, *Solirubrobacteraceae*, *Planifilum*이었으며, 10% 이상 감소한 박테리아는 *Steroidobacter*, *JTB23*, *Acidibacter*, *WD2101_soil*, *Allokutzneria*, *Hamadaea*로 분석되었다(Fig. 4d and e). 이들 중 *Nitrosospira* 속은 암모니아 산화균으로 알려져 있으며 아산화질소를 생성하는 탈질화 과정에 관여하는 박테리아로 알려져 있다. 요소비료를 처리한 구에서 *Nitrosospira*가

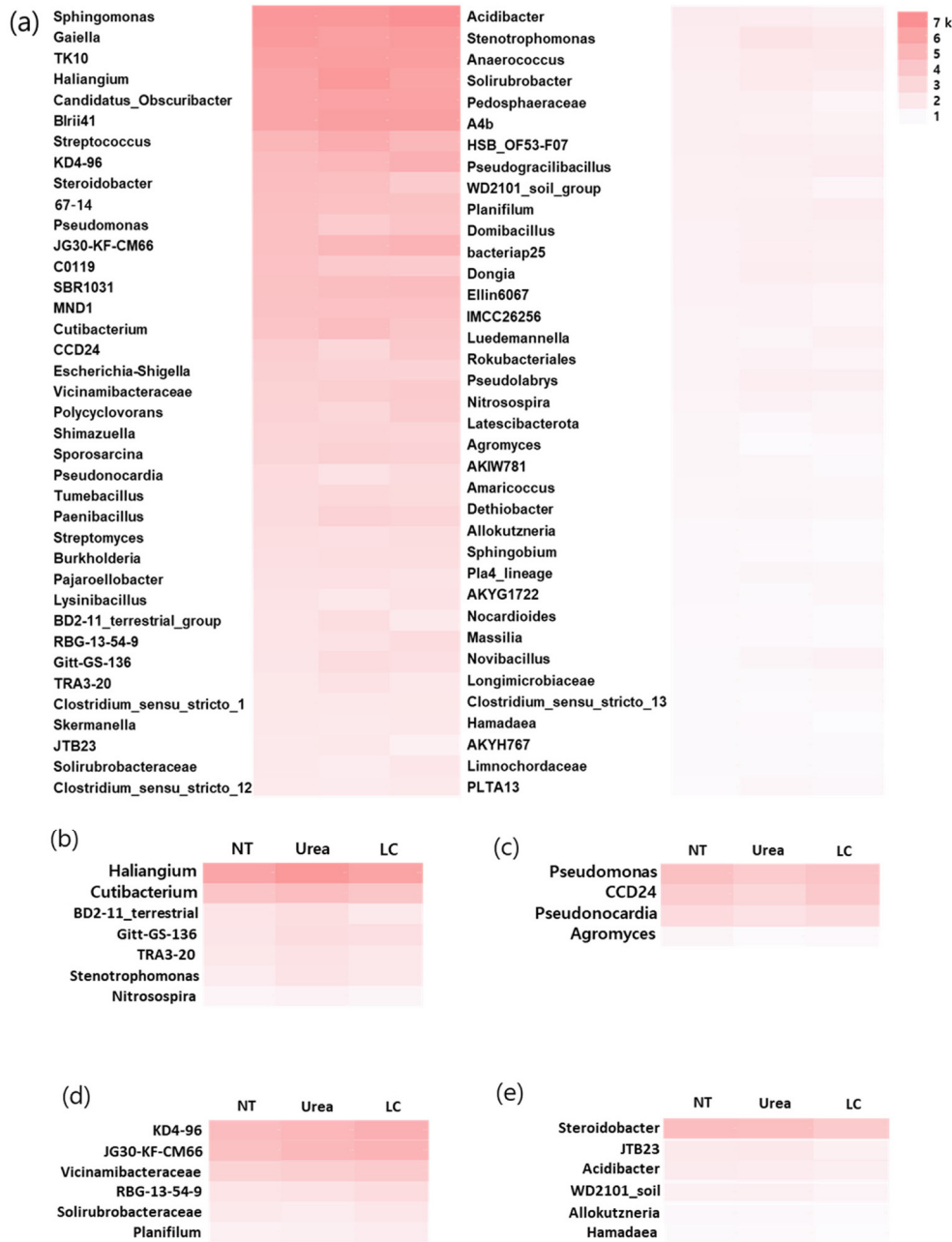


Fig. 4. Analysis of changes in bacterial communities according to fertilizer treatment in pepper cultivation soil. Changes in bacterial communities were observed through 16S rDNA analysis 3 days after fertilizer treatment in the non-treatment of nitrogen fertilizer (NT), urea fertilizer (Urea), and liquefied pig manure treatment (LC) groups. (a) Bacteria discovered 1000 to 10000 times through 16S rDNA gene analysis were arranged in order of dominance. (b-c) Bacteria that increased (b) or decreased (c) by more than 10% when treated with urea fertilizer are indicated. (d-e) Bacteria that increased (d) or decreased (e) by more than 10% when liquefied pig manure was treated are indicated. No N, Urea, and LC indicate no nitrogen treatment, urea treatment as nitrogen fertilizer, and liquefied pig manure treatment, respectively.

상대적으로 증가한 결과는 해당 처리구에서 아산화질소가 크게 증가한 것을 잘 설명해준다[37](Fig. 1a, 4b). 돈분 액비 처리구에서는 *Nitrospira* 속의 양이 무처리구와 유사한 수준인 것으로 분석되었으며 이는 돈분 액비 처리방법이 요소비료와 달리 토양 질소 탈질화 박테리아의 성장을 촉진하지 않는다는 것을 보여주며 돈분 액비 처리에서 아산화질소 발생량이 매우 억제된 결과를 잘 설명한다.

탈질화 과정 관련 유전자 분석

비록 군집분석을 통해 탈질화 박테리아인 *Nitrospira*를 검출하였으나 밝혀지지 않은 탈질화 박테리아들의 전체적인 성장 촉진을 측정하기 위하여 탈질화 관련 유전자를 분석하였다(Fig. 5). 이러한 메타지노믹 방법은 *Nitrospira*를 포함하여 다양한 탈질화 박테리아들의 성장량을 반영하는 것으로 탈질화 유전자의 증가는 탈질화에 관여하는 박테리아의 수가

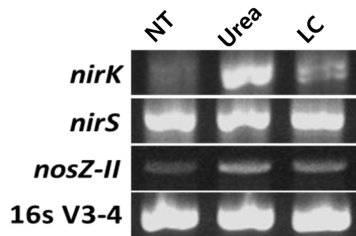


Fig. 5. Analysis of denitrifying related genes. Changes in denitrifying genes were observed by amplifying *nirK*, *nirS*, and *nosZ* genes in the non-treatment of nitrogen fertilizer (NT), urea fertilizer (Urea), and liquified pig manure treatment (LC) groups. The amplification of 16S V3-V4 gene was shown as a control gene for equal DNA amount used for gene amplification. No N, Urea, and LC indicate no nitrogen treatment, urea treatment as nitrogen fertilizer, and liquified pig manure treatment, respectively.

증가한 것으로 해석할 수 있다. 탈질화 과정에 관여하는 유전자로는 암모니아 산화 유전자(ammonia monooxygenase, *amoA*), 탈질화 유전자(*nirK*, *nirS*, 그리고 *nosZ*)들이 알려져 있으며[37], 각각의 비료 처리구에서 비료 처리 3일 후 3종의 탈질화 유전자, *nirK*, *nirS*, 그리고 *nosZ* 유전자의 증감을 관찰하였다(Fig. 5). 결과 요소 비료를 처리한 시험구에서 *nirK*와 *nosZ* 유전자가 비료 무처리구에 비해 크게 증가한 것으로 나타났으며, 돈분 액비를 처리한 시험구에서는 상대적으로 크게 증가하지 않은 것으로 나타났다. 탈질화 관련 이러한 결과는 돈분 액비를 처리한 시험구에서 요소비료 처리구에 비해 낮은 아산화질소 생성량이 관찰되는 것을 잘 설명한다.

본 논문에서 얻은 결과들을 종합해 볼 때 실험에 사용된 돈분 액비는 고추의 성장량을 증가시키면서 대기 온실효과의 주요 가스인 아산화질소 생성량을 크게 감축시킬 수 있는 친환경적인 질소비료로 사용될 수 있음이 확인되었다. 돈분 액비가 아산화질소 생성량을 감축시킬 수 있는 요인으로 돈분 액비가 요소비료에 비해 상대적으로 유기태 질소를 많이 포함하고 있으며, 분시를 통해 토양에 무기태 질소 공급이 적절히 제어되었기 때문으로 생각된다. 이러한 요인들로 인해 탈질화에 사용되는 질산태 무기질소의 양이 감소되고 따라서 탈질화에 관여하는 박테리아의 생성이 관행 요소비료 사용에 비해 낮은 수준으로 유지되었다고 생각된다. 이와 같이 본 논문을 통해 돈분 액비를 통한 고추 생산량 증대와 심각한 온실가스인 아산화질소의 저감 방법을 도출하였다.

Note

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgement

YK received funding from Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture and Forestry (IPET) through Agriculture, Food

and Rural Affairs Convergence Technologies Program for Educating Creative Global Leader Program funded by Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (MAFRA) (no. 321001-03), and supported by "Regional Innovation Strategy (RIS)" through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of Education (MOE) (2021RIS-002). PHL received funding from Rural Development Administration of Republic of Korea (PJ01431804).

References

1. Manne AS, Richels RG (2001) An alternative approach to establishing trade-offs among greenhouse gases. *Nature*, 410(6829), 675-677. <https://doi.org/10.1038/35070541>.
2. Lawrence NC, Tenesaca CG, VanLoocke A, Hall SJ (2021) Nitrous oxide emissions from agricultural soils challenge climate sustainability in the US Corn Belt. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(46), e2112108118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2112108118>.
3. Mosier AR (1994) Nitrous oxide emissions from agricultural soils. *Fertilizer Research*, 37, 191-200. <https://doi.org/10.1007/BF00748937>.
4. Tian H, Xu R, Canadell JG, Thompson RL, Winiwarter W, Suntharalingam P, Davidson EA, Ciais P, Jackson RB et al. (2020) A comprehensive quantification of global nitrous oxide sources and sinks. *Nature*, 586(7828), 248-256. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2780-0>.
5. Cramer ES, Briggs MS, Liu N, Mailyan B, Dwyer JR, Rassoul HK (2017) The impact on the ozone layer from NO_x produced by terrestrial gamma ray flashes. *Geophysical Research Letters*, 44(10), 5240-5245. <https://doi.org/10.1002/2017GL073215>.
6. Crutzen PJ (1979) The role of NO and NO₂ in the chemistry of the troposphere and stratosphere. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*, 7(1), 443-472.
7. Tian H, Yang J, Xu , Lu C, Canadell JG, Davidson E, Jackson RB, Arneeth A, Chang JF et al. (2019) Global soil nitrous oxide emissions since the preindustrial era estimated by an ensemble of terrestrial biosphere models: Magnitude, attribution, and uncertainty. *Global Change Biology*, 25(2), 640-659. <https://doi.org/10.1111/gcb.14514>.
8. Ravishankara AR, Daniel JS, Portmann RW (2009) Nitrous oxide (N₂O): The dominant ozone-depleting sub-

- stance emitted in the 21st century. *Science*, 326(5949), 123-125. <https://doi.org/10.1126/science.1176985>.
9. Yue Q, Wu H, Sun JF, Cheng K, Smith P, Hillier J, Xu XR, Pan GX(2019) Deriving emission factors and estimating direct nitrous oxide emissions for crop cultivation in China. *Environmental Science & Technology*, 53(17), 10246-10257. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b01285>.
 10. Thompson RL, Lassaletta L, Patra PK, Wilson C, Wells KC, Gressent A, Koffi EN, Chipperfield MP, Winiwarter W et al. (2019) Acceleration of global N₂O emissions seen from two decades of atmospheric inversion. *Nature Climate Change*, 9(12), 993-998. <https://doi.org/10.1038/s41558-019-0613-7>.
 11. Mosier AR, Duxbury JM, Freney JR, Heinemeyer O, Minami K(1996) Nitrous oxide emissions from agricultural fields: Assessment, measurement and mitigation. *Progress in Nitrogen Cycling Studies*, 589-602. https://doi.org/10.1007/978-94-011-5450-5_97.
 12. Janssens-Maenhout G, Crippa M, Guizzardi D, Muntean M, Schaaf E, Dentener F, Bergamaschi P, Pagliari V, Olivier JGJ et al. (2019) EDGAR v4.3.2 Global Atlas of the three major greenhouse gas emissions for the period 1970-2012. *Earth System Science Data*, 11(3), 959-1002. <https://doi.org/10.5194/essd-11-959-2019>.
 13. Zhao Z, Cao LK, Deng J, Sha ZM, Chu CB, Zhou DP, Wu SH, Lv WG (2020) Modeling CH₄ and N₂O emission patterns and mitigation potential from paddy fields in Shanghai, China with the DNDC model. *Agricultural Systems*, 178, 102743. <https://doi.org/10.1016/j.agsy.2019.102743>.
 14. Reay DS, Davidson EA, Smith KA, Smith P, Melillo JM, Dentener F, Crutzen PJ (2012) Global agriculture and nitrous oxide emissions. *Nature Climate Change*, 2(6), 410-416. <https://doi.org/10.1038/nclimate1458>.
 15. Beauchamp EG (1997) Nitrous oxide emission from agricultural soils. *Canadian Journal of Soil Science*, 77(2), 113-123. <https://doi.org/10.4141/S96-101>.
 16. Geddes JA, Martin RV(2017) Global deposition of total reactive nitrogen oxides from 1996 to 2014 constrained with satellite observations of NO₂ columns. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 17(16), 10071-10091. <https://doi.org/10.5194/acp-17-10071-2017>.
 17. Jia YL, Yu GR, Gao YN, He NP, Wang QF, Jiao CC, Zuo Y (2016) Global inorganic nitrogen dry deposition inferred from ground- and space-based measurements. *Scientific Reports*, 6(1), 19810. <https://doi.org/10.1038/srep19810>.
 18. Xu W, Luo XS, Pan YP, Zhang L, Tang AH, Shen JL, Zhang Y, Li KH, Wu QH et al. (2015) Quantifying atmospheric nitrogen deposition through a nationwide monitoring network across China. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 15(21), 12345-12360. <https://doi.org/10.5194/acp-15-12345-2015>.
 19. Stehfest E, Bouwman L (2006) NO and NO emission from agricultural fields and soils under natural vegetation: Summarizing available measurement data and modeling of global annual emissions. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 74, 207-228. <https://doi.org/10.1007/s10705-006-9000-7>.
 20. Giles M, Morley N, Baggs EM, Daniell TJ (2012) Soil nitrate reducing processes drivers, mechanisms for spatial variation, and significance for nitrous oxide production. *Frontiers in Microbiology*, 3, 407. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00407>.
 21. Robertson G (1987) Nitrous oxide sources in aerobic soils: Nitrification, denitrification and other biological processes. *Soil Biology and Biochemistry*, 19(2), 187-193. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(87\)90080-0](https://doi.org/10.1016/0038-0717(87)90080-0).
 22. Bremner JM (1997) Sources of nitrous oxide in soils. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 49, 7-16. <https://doi.org/10.1023/A:1009798022569>.
 23. Philippot L, Andert J, Jones CM, Bru D, Hallin S (2011) Importance of denitrifiers lacking the genes encoding the nitrous oxide reductase for N₂O emissions from soil. *Global Change Biology*, 17(3), 1497-1504. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2010.02334.x>.
 24. Bergaust L, Shapleigh J, Frostegård Å, Bakken L (2008) Transcription and activities of NO_x reductases in *Agrobacterium tumefaciens*: the influence of nitrate, nitrite and oxygen availability. *Environmental Microbiology*, 10(11), 3070-3081. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01557.x>.
 25. Bakken LR, Bergaust L, Liu B, Frostegård Å (2012) Regulation of denitrification at the cellular level: A clue to the understanding of N₂O emissions from soils. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 367(1593), 1226-1234. <https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0321>.
 26. Betlach MR, Tiedje JM (1981) Kinetic explanation for accumulation of nitrite, nitric oxide, and nitrous oxide during bacterial denitrification. *Applied and Environmental Microbiology*, 42(6), 1074-1084. <https://doi.org/10.1128/aem.426.1074-1084.1981>.
 27. Thomsen JK, Geest T, Cox RP (1994) Mass spectrometric studies of the effect of pH on the accumulation of intermediates in denitrification by *Paracoccus*

- denitrificans*. Applied and Environmental Microbiology, 60(2), 536-541.
<https://doi.org/10.1128/aem.60.2.536-541.1994>.
28. Burford J, Bremner J (1975) Relationships between the denitrification capacities of soils and total, water-soluble and readily decomposable soil organic matter. Soil Biology and Biochemistry, 7(6), 389-394.
[https://doi.org/10.1016/0038-0717\(75\)90055-3](https://doi.org/10.1016/0038-0717(75)90055-3).
29. Bateman E, Baggs E (2005) Contributions of nitrification and denitrification to N₂O emissions from soils at different water-filled pore space. Biology and Fertility of Soils, 41, 379-388.
<https://doi.org/10.1007/s00374-005-0858-3>.
30. Van den Heuvel R, Bakker S, Jetten M, Hefting M (2011) Decreased N₂O reduction by low soil pH causes high N₂O emissions in a riparian ecosystem. Geobiology, 9(3), 294-300.
<https://doi.org/10.1111/j.1472-4669.2011.00276.x>.
31. Cheng Y, Elrys AS, Merwad ARM, Zhang HM, Chen ZX, Zhang JB, Cai ZC, Müller C (2022) Global patterns and drivers of soil dissimilatory nitrate reduction to ammonium. Environmental Science & Technology, 56(6), 3791-3800.
<https://doi.org/10.1021/acs.est.1c07997>.
32. Pandey C, Kumar U, Kaviraj M, Minick KJ, Mishra AK, Singh JS (2020) DNRA: A short-circuit in biological N-cycling to conserve nitrogen in terrestrial ecosystems. Science of the Total Environment, 738, 139710.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139710>.
33. Lai TV, Ryder MH, Rathjen JR, Bolan NS, Croxford AE, Denton MD (2021) Dissimilatory nitrate reduction to ammonium increased with rising temperature. Biology and Fertility of Soils, 57, 363-372.
<https://doi.org/10.1007/s00374-020-01529-x>.
34. Huygens D, Rütting T, Boeckx P, Van Cleemput O, Godoy R, Müller C (2007) Soil nitrogen conservation mechanisms in a pristine south Chilean Nothofagus forest ecosystem. Soil Biology and Biochemistry, 39 (10), 2448-2458.
<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.04.013>.
35. Rütting T, Huygens D, Müller C, Van Cleemput O, Godoy R, Boeckx P (2008) Functional role of DNRA and nitrite reduction in a pristine south Chilean Nothofagus forest. Biogeochemistry, 90, 243-258.
<https://doi.org/10.1007/s10533-008-9250-3>.
36. Smith P, Martino D, Cai Z, Gwary D, Janzen H, Kumar P, McCarl B, Ogle S, O'Mara F, Rice C (2007) Agriculture, in: Contribution of Working Group Climate Change 2007: Mitigation of Climate Change: Working Group III Contribution to the Fourth Assessment Report of the IPCC. pp. 497-540, Cambridge University Press, UK.
37. Lourenço KS, Cassman NA, Pijl AS, Van Veen JA, Cantarella H, Kuramae EE (2018) *Nitrosospora* sp. govern nitrous oxide emissions in a tropical soil amended with residues of bioenergy crop. Frontiers in Microbiology, 9, 674.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00674>.