

느타리버섯 균상재배 중 배지내 미생물상의 변화 및 분포양상

이찬중* · 윤형식 · 전창성 · 정종천 · 한혜수

농촌진흥청 국립원예특작과학원 버섯과

Changes and Distributional Pattern of Microflora in Cotton Waste Media of Oyster Mushroom Cultivation

Chan-Jung Lee*, Hyung-Sik Yu, Chang-Sung Jhune, Jong-Chun Cheong and Hye-Su Han

Mushroom Research Division, National Institute of Horticultural & Herbal Science, RDA, Suwon 441-707, Korea

(Received September 30, 2009. Accepted December 28, 2009)

ABSTRACT: The diversity of microflora according to growth stage of *Pleurotus ostreatus* and the correlation between microbe and medium fermentation were investigated. In farmhouse I, the aerobic bacteria and fungi as longer of growing period were increased. And, thermophilic bacteria and fluorescent *Pseudomonas* sp. showed high density at the early stage of spawn inoculation. The thermophilic actinomycetes were distributed evenly during all the growing period, but mesophilic actinomycetes were not observed. In farmhouse II, thermophilic actinomycetes were not observed in fermented medium and density of fungi were suddenly increased at 60 days after spawn inoculation. And also, mushrooms can hardly be harvested due to *Penicillium* spp. After medium fermentation, density of aerobic bacteria, thermophilic bacteria, and fluorescent *Pseudomonas* sp. was higher at farmhouse I than those of farmhouse II. In farmhouse I, *Bacillus* sp. and *Pseudomonas* sp. dominated at early stage of mushroom growth but as time goes by, density of *Bacillus* sp. was higher than the others. And also, the kind of microbe showed a few at early stage of mushroom growth but increased as time goes by. In farmhouse II, *Bacillus* sp. was dominated at early stage of mushroom growth. And the growth of *Bacillus* sp. and *Pseudomonas* sp. showed intersect aspect each other in the farmhouse I but *Bacillus* sp. dominated during all growth periods in the farmhouse II.

KEYWORDS : *Pleurotus ostreatus*, cotton waste media, microflora, *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp.

우리나라 재배 버섯류는 느타리, 팽이, 표고, 큰느타리(새송이), 양송이가 거의 95% 이상을 차지하며 이중 느타리버섯이 총생산량의 35.1%를 점유하여 재배면적과 생산량이 가장 많은 실정이다. 느타리버섯(*Pleurotus ostreatus*)의 경우 2004년 595 ha에서 2005년에 555 ha로 재배면적이 약간 감소하였고, 단위면적당 수확량은 '91년 41 kg에서 '04년에는 29 kg/3.3 m²으로 대폭 감소하였다 (MFAFF, 2006). 이것은 배지 제조과정의 불안정, 병해충 발생에 의한 생산성의 불안정, 그리고 국내가격의 하락에 의한 농가수입 감소로 재배기피 현상이 발생하였기 때문이다. 느타리버섯은 배지의 살균 및 발효, 균사생육, 버섯의 생육 및 수확 등 여러 과정을 거쳐 생산되고 있다. 고품질의 기질을 생산하는 배지의 살균 및 발효 과정은 버섯 생산을 위한 가장 중요한 단계이며, 수분, 온도 및 산소 농도의 제어를 통해 일련의 유용한 미생물상이 형성된다. 기질의 발효는 이들 미생물이 분비하는 다양한 생리활성 물질에 의해 물리, 화학적 변화를 거치게 되고 버섯생육에 적합한 기질로 전환되는 과정이다(Randle and Flegg, 1978; Miller

and Macauley, 1988). 정상적인 살균 및 발효과정을 거친 배지는 잡균이 쉽게 이용할 수 있는 가용성 양분이 분해되면, 영양적인 면과 미생물적인 측면에서 볼 때 버섯 생육에 적합한 형태로 전환된다(Stölzer and Grabbe, 1991). 또한 60°C 이상의 고온 발효와 항미생물제에 의해서 유해 잡균이 사멸될 수 있는 것으로 알려져 있다 (Ross and Harris, 1983). 그러나 느타리버섯 재배 중 잘못된 살균·발효과정이나 균사배양 중 재배관리 부실 또는 오염된 균주의 사용으로 유해균류가 발생하여 재배에 실패하는 경우가 많다.

따라서 본 시험은 정상적으로 버섯재배를 한 농가(농가I)와 버섯재배에 실패한 농가(농가II)를 선정하여 균상내 미생물상의 다양성을 구명하고 이들 미생물과 배지발효와의 연관관계를 구명하고자 수행하였다.

재료 및 방법

공시재료

시험재료는 균상 느타리버섯(*Pleurotus ostreatus*)을 배하는 농가 중 버섯을 정상적으로 재배한 농가(농가I)와 버

*Corresponding author <E-mail: lchanj@korea.kr>

섯재배에 실패한 농가(농가II)로부터 버섯생육시기별 균상내 배지를 채취하여 실험에 이용하였다.

결과 및 고찰

미생물 밀도조사

느타리버섯 균상배지내 미생물의 밀도는 희석평판법으로 조사하였다(RDA, 2000). 시료 10 g을 멸균수 90 ml에 첨가하여 진탕배양기에서 200 rpm으로 30분간 진탕한 후 10²~10⁷ 배가 되도록 희석액을 만들어 이를 미생물수 측정에 사용하였다. 호기성 세균은 R2A agar(Kim and Whang, 2002), 사상균은 Streptomycin-rose bengal agar (Martin, 1950), 중온성 방선균은 Starch casein agar (Küster and Williams, 1966)을 사용하였고, 고온성 방선균은 1/2 Nutrient agar배지(1/2 NA, 0.2% casein, 10 g agar)를 사용하였다. *Pseudomonas* 속은 P-1 agar(Kato and Itho, 1983)를 각각 선택배지로 사용하였다. *Bacillus*속 검출을 위해서는 희석액을 80°C 열수에서 10분간 처리 후 Yeast glucose agar배지(James, 1958)에 접종하여 배양하였다. 폐상퇴비내 존재하는 미생물수는 3개의 평판배지에 나타난 colony를 계수한 후 평균값을 콜로니형성단위(colony forming unit, cfu)로 표시하였다. 배양은 세균과 곰팡이는 28°C항온기에서 2~7일간 배양하면서 계수하였고, 방선균의 경우 중온성(28°C)과 고온성(45°C)으로 나누어 항온기에서 7일간 배양하면서 계수하였다.

미생물의 분리 및 동정

미생물의 분리는 세균계수가 완료된 R2A배지 중 50~60개의 colony를 형성한 plate로부터 독립적으로 분리하였다. 순수 분리한 미생물은 R2A배지에서 2일 동안 배양한 후 균체를 모아서 20%(v/v) 글리세롤을 포함하는 -70°C에 보존하면서 검정용 시료로 사용하였다. 세균의 동정을 위해서는 16S rRNA 유전자 염기서열분석을 이용하였다 (Lane, 1991). 16S rRNA 유전자는 범용적인 프라이머 fD1과 rP2 (William *et al.*, 1991)를 이용하여 증폭하였다.

농가별 균상 배지내 미생물상 변화

느타리버섯 균상재배시 농가마다 살균 및 발효, 재배사의 환경조건 등 다양한 문제 때문에 수확량에 있어 많은 차이를 보이고 있다. 따라서 본 시험은 정상적으로 수확을 하는 농가(농가I)와 수확을 거의 하지 못하는 농가(농가II)를 선택하여 이들 농가의 재배과정 중 균상내 미생물상의 변화와 분리 미생물의 특성을 조사함으로써 버섯 발이와 생육의 문제점을 밝히고자 실험을 수행하였다. 농가I의 경우 균상내 배지의 미생물상은 생육기간이 길어질수록 호기세균 및 사상균의 수가 증가하였고, 내열성세균 및 형광성 *Pseudomonas* 속은 중균 집중 초기에 높은 밀도를 보였다. 고온성 방선균은 전 생육기간 고른 분포를 보였지만 중온성 방선균은 재배과정 중 존재하지 않았다 (Table 1). 그러나 농가II의 경우 발효 후 고온성 방선균은 거의 없었고, 중균 집중 60일 후 사상균의 밀도가 급격히 급증하였으며, 특히 푸른곰팡이 병의 발생에 의해 버섯 수확을 거의 할 수 없었다 (Table 2). 배지 발효 후 두 농가의 재배배지에서 호기성세균, 고온성세균, 형광성 *Pseudomonas*속의 밀도는 농가II에서보다 농가I에서 훨씬 높았다. 이는 배지가 고온발효과정을 거치면서 유해 미생물이 사멸하고 고온성세균인 *Bacillus*속 등이 우점하게 되었을 것으로 판단되며, *Bacillus*속과 형광성 *Pseudomonas* 속은 식물병원균의 길항균이나 식물의 생장촉진 미생물로 많이 사용되고 있으므로 이들 미생물의 밀도가 높다는 것은 버섯병원균의 억제 및 버섯의 생육에 많은 영향을 줄 것으로 판단된다. 부숙되지 않은 퇴비에서 방선균의 증식속도는 세균이나 균류보다 느리며 중온성 방선균의 수는 퇴비화 과정에서 일정한 경향을 보이지 않고 퇴비더미의 바깥층에 존재하기 때문에 산소공급이 충분치 않거나 잦은 뒤집기로 바깥층이 불안정하면 증식이 억제된다고 하였다(Finstein and Morris, 1975). Stanek(1972)는 양송이 퇴비배지에 발생하는 고온성 세균 및 방선균은 유해균의 생장을 억제하고

Table 1. Change of microflora in cotton waste medium during different growth stages of oyster mushroom at the farmhouse I.

Division	Aerobic bacteria (10 ⁷ /g)		<i>Bacillus</i> sp. (10 ⁵ /g)		Fluorescent <i>Pseudomonas</i> sp. (10 ⁴ /g)		Fungi (10 ³ /g)		Actinomycetes (10 ⁴ /g)			
									mesophile		thermophilic	
	upper	under	upper	under	upper	under	upper	under	upper	under	upper	under
Before fermentation	405		178		182		180		ND			1
After fermentation	51		177		1.7		ND		ND			4
Inoculation 5 days	27	5	85	65	105	18	ND	ND	ND	ND	4	1
Inoculation 12 days	5	1	68	3	40	ND	ND	ND	ND	ND	1	8
Inoculation 30 days	8	3	4	2	8	0.3	12	ND	ND	ND	1	3
Inoculation 46 days	4	3	1	2	0.6	ND	1	ND	ND	ND	1	5
Inoculation 78 days	80	3	36	20	13	53	91	18	ND	ND	2	2
Inoculation 96 days	143	3	7	25	67	43	120	9	ND	ND	2	2

ND, not detected.

Table 2. Change of microflora in cotton waste medium during different growth stages of oyster mushroom at the farmhouse II.

Division	Aerobic bacteria (10 ⁷ /g)		<i>Bacillus</i> sp. (10 ⁵ /g)		Fluorescent <i>Pseudomonas</i> sp. (10 ⁴ /g)		Fungi (10 ³ /g)		Actinomycetes (10 ³ /g)			
									mesophile		thermophilic	
	upper	under	upper	under	upper	under	upper	under	upper	under	upper	under
Before fermentation	448		13		13		270		ND		0.3	
After fermentation	3		17		ND		ND		ND		ND	
Inoculation 17 days	4	2	30	34	0.3	ND	3	2	ND	ND	ND	ND
Inoculation 30 days	24	2	10	10	4	0.7	8	2	ND	ND	0.6	ND
Inoculation 60 days	42	29	19	71	29	26	2,000	4,350	ND	ND	ND	ND

ND, not detected.

버섯균의 생장은 촉진된다고 하였다. 일반적으로 균상 배지가 정상적으로 발효가 되었는지를 방선균의 밀도로 판단하는 경우가 많으며, 농가II의 경우에 고온성 방선균이 거의 존재하지 않은 것으로 보아 고온성발효가 거의 되지 않았을 것으로 판단된다. 또한 농가I의 경우와 달리 농가II의 경우 배지내 곰팡이의 밀도가 급격히 증가하는데 이것은 배지가 정상적인 고온성발효가 이루어지지 않아 배지내 유해 곰팡이가 사멸되지 않고 밀도가 급격히 증가함으로 버섯균의 생육과 버섯의 발생을 억제하였을 것으로 판단된다. 그러나 Fermor and Grant(1985a)는 고온성 사상균이 배지의 질에 상당한 영향을 끼치며 버섯의 선택적인 생육에 도움을 주고 암모니아 농도를 낮추고, 양분을 부동화시킨다고 하였지만 본

시험에서는 살균 후 사상균의 수는 오히려 급격하게 줄어드는 경향을 보였다. 따라서 배지의 발효가 정상적으로 이루어졌는지 판단기준은 고온성 방선균과 곰팡이의 밀도 변화를 조사하면 될 것으로 생각된다.

농가별 분리 미생물의 동정

정상적인 재배농가(농가I)의 경우 생육초기에는 배지내 *Bacillus*속과 *Pseudomonas*속이 우점하였지만 후기로 갈수록 *Bacillus*속의 분포비율이 다른 균에 비해 높아졌다. 또한 미생물의 종류도 초기에는 단순한 양상을 보였지만 후기로 갈수록 균의 종류가 많아졌다. 그러나 실패한 농가(농가II)의 경우 생육초기에 *Pseudomonas*속은 거의 없었고, 대

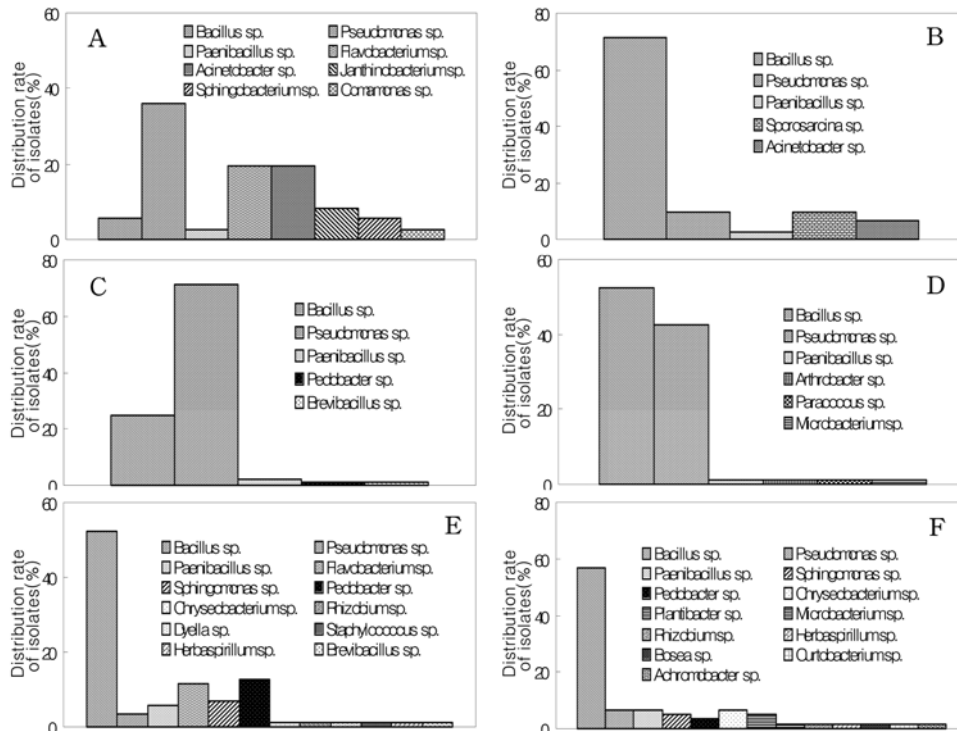


Fig. 1. Identification of dominant bacteria isolated from cotton waste medium during different growth stages of oyster mushroom at the farmhouse I. A, before fermentation; B, after fermentation; C, inoculation 5 days; D, inoculation 12 days; E, inoculation 30 days; F, inoculation 46 days.

부분 *Bacillus*속이 우점하였으며, 후기로 갈수록 *Dyella*속과 *Chitinophaga*속 등이 우점하였다. 미생물의 종류도 농가I과 달리 생육초기부터 다양한 종류의 균이 분포하였다. 이와 같이 고온성발효과정을 정상적으로 거친 농가I의 경우 유해미생물과 저온성균의 일부가 사멸함으로써 고온성균이 우점하게 되어 미생물의 종류가 단순하였지만, 농가II와 같이 고온성발효가 정상적으로 이루어지지 않았을 경우 이들 미생물들이 사멸하지 않고 배지내에서 생육함으로써 많은 종류의 균이 분포하는 것으로 생각된다. 현재까지 폐면 발효에 관여하는 미생물에 대한 보고는 없으나 양송이버섯의 경우 *Bacillus coagulans*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis* 등의 세균과 *Thermoactinomyces vulgaris*, *Thermomonospora* spp., *Actinobifida chromogena* 등의 방선균이 우점하는 것으로 알려져 있다(Fermor et al., 1985b). 이와 같이 배지내에 존재하는 다양한 미생물의 분류 동정과 버섯균과의 상호작용 등 면밀한 연구가 이루어진다면 버섯재배의 실패원인을 밝힐 수 있는 방법이 될 수 있을 것으로 생각된다.

생육시기별 우점 미생물의 분포변화

정상적인 재배농가의 경우 배지내 우점하는 세균의 분포가 *Bacillus*속과 *Pseudomonas*속이 서로 교차하는 양상을 보였지만 실패한 농가의 경우 전체적으로 *Bacillus*속이 우점하였다(Fig. 5, 6). 그러나 *Paenibacillus*속은 분포양상에 있어 특

별한 경향을 보이지 않았으며, 버섯의 발이와 생육에 미치는 영향에 대해서는 세밀한 조사가 필요할 것으로 생각된다. *Bacillus*속과 *Pseudomonas*속의 경우 식물병원성균에 대한 길항균이나 생육촉진 미생물로 많이 사용되고 있고, 특히 내열성균인 *Bacillus*속은 버섯균의 생육을 강하게 억제하

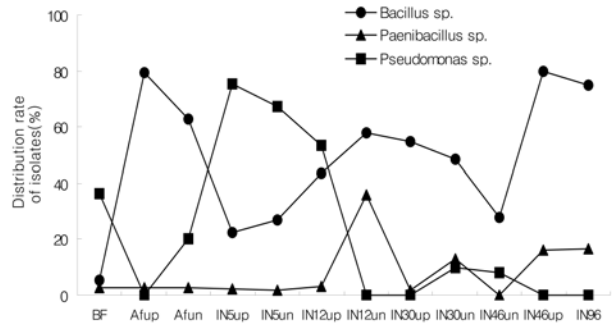


Fig. 3. Distribution of the dominant bacteria(*Bacillus* sp., *Paenibacillus* sp., *Pseudomonas* sp.) isolated from cotton waste medium during different growth stages of oyster mushroom at the farmhouse I. BF, before fermentation; Afup, after fermentation upper; Afun, after fermentation under; IN5up; inoculation 5 days upper; IN5un, inoculation 5 days under; IN12up, inoculation 12 days upper; IN12un, inoculation 12 days under; IN30up, inoculation 30 days upper; IN30un, inoculation 30 days under; IN46un, inoculation 46 days upper; IN46up, inoculation 46 days under; IN96, inoculation 96 days.

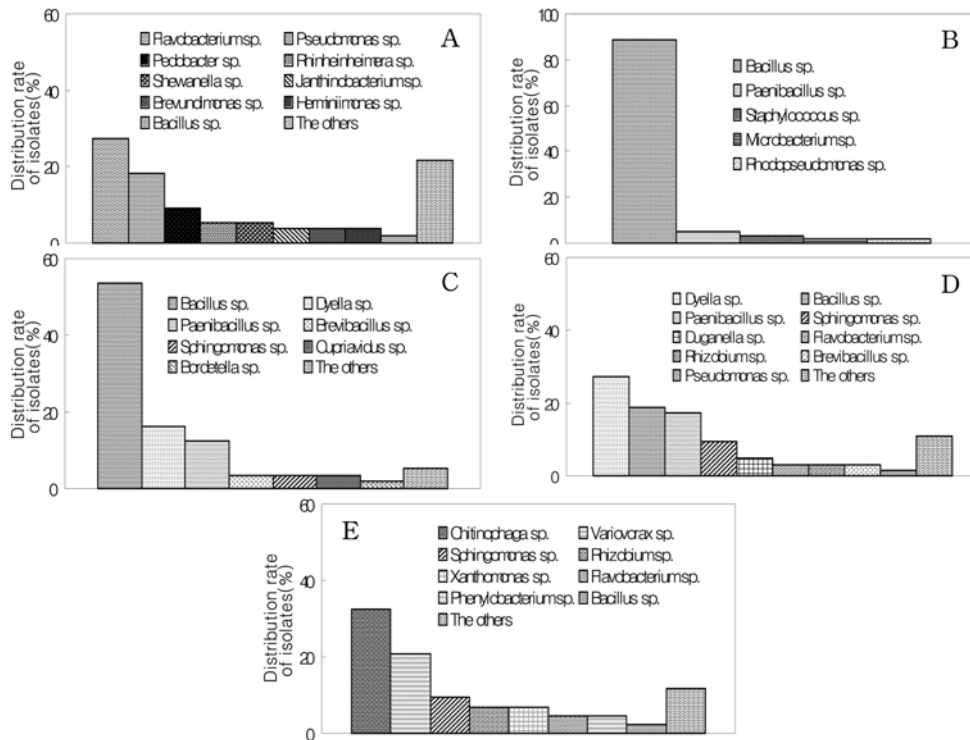


Fig. 2. Identification of dominant bacteria isolated from cotton waste medium during different growth stages of oyster mushroom at the farmhouseII. A, before fermentation; B, after fermentation; C, inoculation 17 days; D, inoculation 30 days; E, inoculation 60 days.

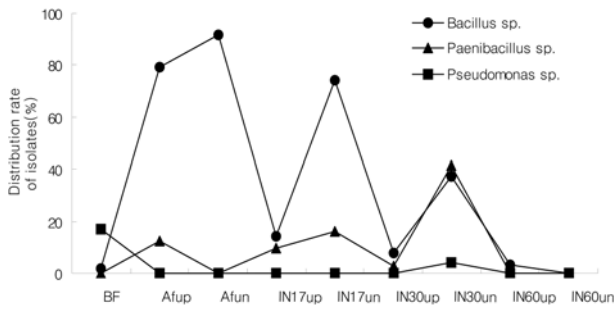


Fig. 4. Distribution of the dominant bacteria(*Bacillus* sp., *Paenibacillus* sp., *Pseudomonas* sp.) isolated from cotton waste medium during different growth stages of oyster mushroom at the farmhouse . BF, before fermentation; Afup, after fermentation upper; Afun, after fermentation under; IN17up, inoculation 17 days upper; IN17un, inoculation 17 days under; IN30up, inoculation 30 days upper; IN30un, inoculation 30 days under; IN60up, inoculation 60 days upper; IN60un, inoculation 60 days under.

형적인 분포가 버섯균의 생육과 발이에 많은 영향을 미칠 것으로 판단되며, 모든 생육 주기 동안 *Bacillus*속이 우점하였을 경우에는 버섯균이 심한 저해를 받아 균사의 활력이 떨어져 병원균의 침입에 의한 버섯 발이와 생육의 저해로 버섯수확을 거의 하지 못할 것으로 생각된다.

적요

본 시험은 느타리버섯 재배 농가의 균상내 미생물상의 다양성을 구명하고 이들 미생물과 배지발효와의 연관관계를 구명하고자 실시하였다. 정상적으로 수확하는 농가(농가I)의 경우 균상내 배지의 미생물상은 생육기간이 길어질수록 호기세균 및 사상균의 수가 증가하였고, 내열성세균 및 형광성 *Pseudomonas*속은 종균 접종 초기에 높은 밀도를 보였다. 고온성 방선균은 전 생육기간 고른 분포를 보였지만 중온성 방선균은 재배과정 중 존재하지 않았다. 그러나 수확을 거의 하지 못하는 농가(농가II)의 경우 발효 후 고온성 방선균은 거의 없었고, 종균 접종 60일 후 사상균의 밀도가 급격히 급증하였으며, 특히 푸른곰팡이 병의 발생에 의해 버섯 수확을 거의 할 수 없었다. 배지 발효 후 두 농가의 세균성 미생물인 호기성세균, 고온성세균, 형광성 *Pseudomonas*속의 밀도는 농가II에서보다 농가I에서 훨씬 높았다. 정상적인 재배농가의 경우 생육초기에는 배지내 *Bacillus*속과 *Pseudomonas*속이 우점하였지만 후기로 갈수록 *Bacillus*속의 분포비율이 다른 균에 비해 높았다. 또한 미생물의 종류도 초기에는 단순한 양상을 보였지만 후기로 갈수록 균의 종류가 많아졌다. 그러나

실패한 농가의 경우 생육초기에는 *Bacillus*속이 우점하였지만, 후기로 갈수록 *Dyella*속과 *Chitinophaga*속 등이 우점하였다. 미생물의 종류도 농가I과 달리 생육초기부터 다양한 종류의 균이 분포하였다. 정상적인 재배농가의 경우 배지내 우점하는 세균의 분포가 *Bacillus*속과 *Pseudomonas*속이 서로 교차하는 양상을 보였지만 실패한 농가의 경우 전체적으로 *Bacillus*속이 우점하였다.

참고문헌

Fermor, T. R. and Grant, W. D. 1985a. Degradation of fungal and actinomycete mycelia by *Agaricus bisporus*. *J. Gen. Microbiol.* 131:1729-1734.

Fermor, T. R., Randle, P. E. and Smith, J. E. 1985b. Compost as a substrate and its preparation. Pp. 81-109. *In: The biology and technology of the cultivated mushroom*. Eds. Spencer, D. M. and Wood, D. A. John Wiley & Sons Inc.UK.

Finstein, M. S. and Morris, M. L. 1975. Microbiology of municipal solid waste composting. *Adv. Appl. Microbiol.* 19:113-151.

James, N. 1958. Soil extract in soil microbiology. *Can. J. Microbiol.* 4:363-370.

Kato, K. and Itho K. 1983. New selective media for *Pseudomonas* strains producing fluorescent pigment. *Soil Sci. Plant Nitr.* 29:525-532.

Kim, I. G. and Whang, K. S. 2002. The observation and a quantitative evaluation of viable but non-culturable bacteria in potable groundwater using epifluorescence microscopy. *The Korean Journal of Microbiology.* 38:180-185.

Küster, E. and Williams, S. T. 1966. Selection of media for isolation of streptomycetes. *Nature(London)* 202:928-929.

Lane, D. J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. *In Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*, pp. 115-175. Edited by E. Stackebrandt & M. Goodfellow. Chichester: Wiley.

Martin, J. P. 1950. Use of acid. rose bengal and streptomycin in the plate method for estimating soil fungi. *Soil Sci.* 69:215-232.

MFAFF, 2006. Actual yield of industrial product.

Miller, F. C. and Macauley, B. J. 1988. Odours arising from mushroom composting: *Areview. Aust. J. Exp. Agric.* 28:553-560.

Randle, P. and Flegg, P. B. 1978. Oxygen measurements in a mushroom compost stack. *Sci. Hortic.* 19:315-323.

RDA. 2000. Methods for chemical analysis of soil and plant. National Institute of Agricultural Science and Technology, RDA, Suwon, Korea.

Ross, P. C. and Harris, P. J. 1983. An investigation into the selective nature of mushroom compost. *Sci. Hortic.* 17: 61-70.

Stanek, M. 1972. Micro-organisms inhabiting mushroom compost during fermentation. *Mushroom Sci.* 8: 797-811.

Stölzer, S. and Grabbe, K. 1991. Mechanisms of substrate selectivity in the cultivation of edible fungi. Pp. 141-146. *In: Maher, M. J. E. Science and Cultivation of edible fungi*. Ashgate Pub Co., Netherlands.

William, G W., Susan, M. B., Date, A. P. and David, J. L. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173: 697-703.