

느타리 배지 및 자실체 미생물 군집 변화

박태민¹ · 유동렬¹ · 오태석¹ · 박윤진² · 장명준^{1,*}

¹공주대학교 식물자원학과, ²두과녹비자원연구센터

Changes in the microbial community of substrate and fruit body of *Pleurotus ostreatus*

Tae-Min Park¹, Dong-Ryeol Yoo¹, Tae-Seok Oh¹, Youn-Jin Park², and Myoung-Jun Jang^{1,*}

¹Department of Plant Resources, Kongju National University, Yesan 32439, Korea

²Kongju National University Legumes Green Manure Resource Center, Yesan 32439, Korea

ABSTRACT: In this study, we investigated the microbial community of oyster mushrooms at different growth stages at the species level. Gram-positive bacteria were predominant in the presterilized medium. On the other hand, Gram-negative bacteria were predominant in the culture-completed medium, post-harvest medium, and fruiting bodies. In addition, *Pseudomonas tolaasii*, which is known to cause disease in mushrooms, was confirmed in the cultured medium, post-harvest medium, and fruiting bodies, and it was determined that the mycelium culture stage was contaminated, and the reason why no disease occurred was *Sphingobacterium psychroaquaticum*. It was confirmed that this was because the growth of *Pseudomonas tolaasii* was suppressed by producing a component called tolocin. As a result of confirming the diversity of microorganisms, it was confirmed that the pre-sterilization medium contains a variety of microorganisms compared to other growth stages, and the diversity decreases in the order of culture completion medium, fruiting body, and post-harvest medium. showed a trend. As a result of microbial similarity analysis, it was confirmed that the cultured medium and the post-harvest medium showed similar microbial communities, and in the case of fruiting bodies, there were some similarities but overall differences.

KEYWORDS: Microbiome, *Pleurotus ostreatus*, Substrate

서론

버섯의 생활사는 광합성을 통해 유기물을 생산하는 고등식물과는 다르게 효소를 통해 목질과 같은 물질을 분해하여 영양분을 흡수하고 산소로 호흡하는 특성을 가지고 있으며, 영양생장 단계인 균사체와 번식생장 단계인 자실체로 나뉘어

진다(Yoo *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2007). 이러한 버섯 중 식용버섯은 질감과 풍미뿐 아니라 여러 영양소를 고루 함유하고 있다(Breene., 1990; Latiff *et al.*, 1996). 그 중 느타리는 맛과 향기가 뛰어나며 영양가가 높은 식용버섯이다(Song *et al.*, 1996).

Singer(1962)의 보고에 의하면 느타리는 주름버섯목 중에서 대표적인 속이며, 전 세계적으로 가장 많은 소비를 하였다(Jang *et al.*, 2008). 이러한 느타리의 인공재배 기술은 빠르게 발전 하였는데, 원목을 이용한 재배법(Chang and Miles., 1989), 볏짚, 밀짚 및 보리짚을 재료로 하여 재배하는 방법(Chung *et al.*, 1981; Chung and Tan., 1989), 배지를 발효시켜서 재배하는 균상재배(Lee *et al.*, 2010), 그리고 현재는 박 등(1995)이 개발한 톱밥배지를 이용한 병재배법으로 발전하였다. 이렇게 재배법이 발전하면서 버섯의 품질과 수량성을 높이기 위한 혼합배지의 연구가 진행되어왔다(Royse *et al.*, 2007; Gal *et al.*, 2002).

혼합배지를 이용한 병재배과정에서 미생물에 의한 피해가 발생하는데(Baek *et al.*, 2015). 그중 가장 큰 피해를 주는 원인균은 푸른곰팡이류인 *Trichoderma* sp, *Aspergillus* sp, *Penicillium* sp, *Glioladium* sp. 가 존재한다(Raper and Thom,

J. Mushrooms 2024 June, 22(2):67-72
<http://dx.doi.org/10.14480/JM.2024.22.2.67>
 Print ISSN 1738-0294, Online ISSN 2288-8853

© The Korean Society of Mushroom Science
 Tae-min Park(Student), Dong-ryeol Yoo(Student), Tae-seok Oh(Professor),
 Youn-jin Park(Research professor), Myoung-jun Jang (Professor)

*Corresponding author
 E-mail : plant119@kongju.ac.kr
 Tel : +82-41-330-1204, Fax : +82-41-330-1209

Received June 17, 2024
 Revised June 24, 2024
 Accepted June 25, 2024

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.

1948). 유해균이 유입되는 원인으로 잘못된 살균·발효과정, 균사배양 중 관리부실, 오염된 균주 사용으로 알려져 있다(Lee *et al.*, 2009). 오염이 발생하는 정확한 시기와 유입경로를 확인 및 버섯균과 미생물의 상호작용을 확인하기 위해 양송이버섯의 균상재배시의 미생물 군집을 분석하였으며, 미생물군집이 생육단계별로 다르며, 우점종과의 상호작용이 이루어 진다는 연구결과가 보고되었다(Carrasco and Preston, 2020).

본 연구는 우리나라에서 생산비중이 가장 높은 느타리 병재 배의 배지(살균전·후, 폐배지)와 자실체의 미생물 군집을 분석하여 우점종과 느타리의 상호작용 및 유해균의 유입경로를 추정하여 오염발생 저감에 활용하고자 수행하였다.

재료 및 방법

병재배양 느타리 배지제조 및 배양

느타리 생육용 배지조성은 포플러톱밥, 비트펠프 그리고 면실박 (5:3:2, v/v)을 사용하였으며, 수분함량은 65% 내외로 조절하여 배지를 혼합하였다. 배지 혼합이 끝난 다음 850 mL의 내열성 플라스틱 (Polypropylene)에 채워 넣고 고압멸균기에서 121°C, 90분 동안 살균한 다음 무균 작업대에서 멸균상태로 만들기 위해 UV광을 쬐이고 냉각하였다. 냉각 후 종균을 접종하여 배양실에서 25°C에서 30일간 암배양하였다. 시험품종은 흑타리이며, 배양 완료 후 자실체 생육 조건으로 온도는 15±1°C, 상대습도는 90±5%, CO₂농도는 1,300±100 ppm로 설정하였고, 광량은 60lux 내외로 조절하였다.

DNA추출 및 metagenome sequencing

DNA추출은 qiagen genomic DNA Isolation Kit (Qiagen, Germantown, Maryland, USA)의 프로토콜에 따라 추출을 진행하였다. 각 sequencing된 샘플은 Illumina 16S metagenomic sequencing library 프로토콜에 따라 준비하였고, DNA의 정량과 품질은 picogreen 및 nanodrop으로 측정하였다. 16S rRNA 유전자는 16S V3-V4 프라이머를 사용하여 증폭하였다. 입력 gDNA는 16S V3-V4 프라이머로 증폭하고 후속제한 주기 증폭 단계는 다중화 지수 및 Illumina sequencing 어댑터를 추가하기 위해 수행하였다. 최종 제품은 picogreen을 사용하여 정규화 및 플링되며 tapestation DNA 스크린 테이프 D1000 (Agilent)을 사용하여 라이브러리 크기를 확인하였다. 또한 Miseq™ 플랫폼 (Illumina, CA, USA)을 사용하여 Sequencing (2×300)했다.

미생물 동정

Fastaq data의 데이터 품질을 확인하기 위해 genome sequence를 EZbiocloud (CJ Bioscience, Seoul, Korea)에 업로드하였다. EZbiocloud의 염기서열 범위는 100 bp 또는 2,000 bp이며, 평균 Q 값은 <25로 낮은 품질의 sequence를 필터링하는데 사용하였다. Chimera는 UCHIME를 사용하여 제거하였으며, OTUclustering은 97%의 sequence 유사성으로 진행하였다.

Metagenome data

Pie chart 및 Bar chart는 미생물의 풍부도와 발현 수준을 판단하기 활용하였으며, species 수준에서 미생물의 발현 동향을 확인하였다. Alpha diversity는 chao1, shannon, simpson 지표를 사용하여 종 다양성을 측정하였다. chao1은 미발견종을 포함하여 종의 풍부도를 추측하였고, shannon과 simpson은 종의 집중도와 다양성을 나타냈다. Rarefaction curve를 통해 미생물 종의 다양성을 평가하였으며, beta diversity를 통해 종의 유사도를 평가하였다.

결과 및 고찰

느타리 배지 및 자실체의 미생물 분포

느타리의 생육용 톱밥배지를 살균전, 배양완료, 수확 후 배지 그리고 자실체의 미생물 군집을 Taxonomic composition을 사용하여 비교하였으며, Taxonomic rank는 species 수준이며, 0.5%미만으로 확인된 미생물은 ETC로 표현한 결과는 Fig. 1과 같다. 살균전 배지는 *Amycolatopsis sacchari* group 25.9%, *Streptomyces scabiei* group 13.2%, *Streptomyces tremellae* group 5.1% 순서로 우점하였다. 배양완료 배지의 경우 *Sphingobacterium psychroaquaticum* 11.7%, *Sphingobacterium multivorum* group 10.9%, *Pseudomonas tolaasii* group 9.4% 순으로 우점하고 있었다. 수확 후 배지는 *Pseudomonas tolaasii* group 18.7%, *Stenotrophomonas maltophilia* group 13.8%, *Sphingobacterium zeae* 7.2% 순으로 확인 되었으며, 자실체의 결과는 *Sphingobacterium psychroaquaticum* 26.9%, *Pedobacter seoulensis* group 11.7%, *Pedobacter caeni* group 9.0% 순으로 우점하고 있는 것을 확인하였다.

느타리 배지와 자실체에서 분리된 미생물은 ETC를 포함하여 총 46종이며 이 중에서 살균전 배지에서 제외된 배양완료, 수확 후 배지 그리고 자실체에서 공통적인 미생물이 9종으로 나타났다. 살균전 배지는 방선균, 배양완료 배지, 수확 후 배지, 자실체는 그람음성균이 우점하여 미생물 군집이 배지환경 및 생육단계에 따라 변화가 일어나고 있음을 알 수 있었다.

Tsukamoto의 연구에 따르면 *Pedobacter*와 *Sphingobacterium*은 톱라신 해독과 관련이 있다(2002). 이를 통해 *Pseudomonas tolaasii*가 존재하고 있으나 세균갈반병의 병징이 발현되지 않은 것으로 *Pedobacter*와 *Sphingobacterium*이 톱라신을 해독한 것이거나, *Pseudomonas tolaasii* 밀도가 병징을 나타낼 수 있는 밀도보다 낮은 것의 영향으로 추측된다.

느타리 생육단계별 미생물 종 다양성

미생물군집의 다양성을 확인하기 위해 alpha diversity 분석을 chao1, shannon, simpson 방법으로 분석한 결과는 Fig. 2와 같다. chao1의 경우 살균 전 배지의 경우 1,001, 배양완료 배지 478, 수확 후 배지 236 그리고 자실체의 경우 284이었다. shannon의 경우 살균전배지가 3.85, 배양완료 3.79, 수확 후 배지 3.09, 자실체가 3.08인 것을 확인하였다. simpson의 경우 살균전 배

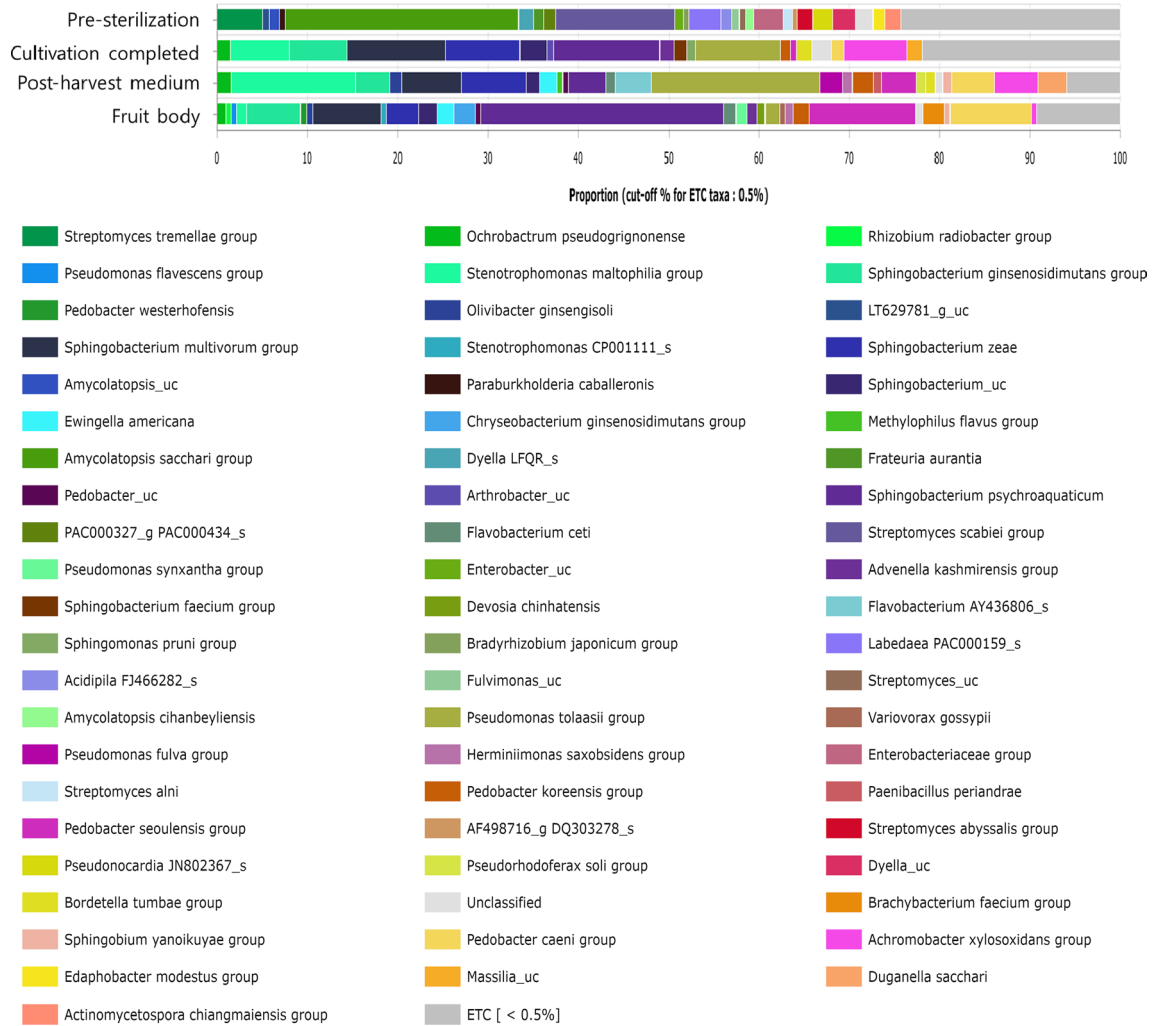


Fig. 1. Microbial community classification chart by growth stage with cut-off 0.5%

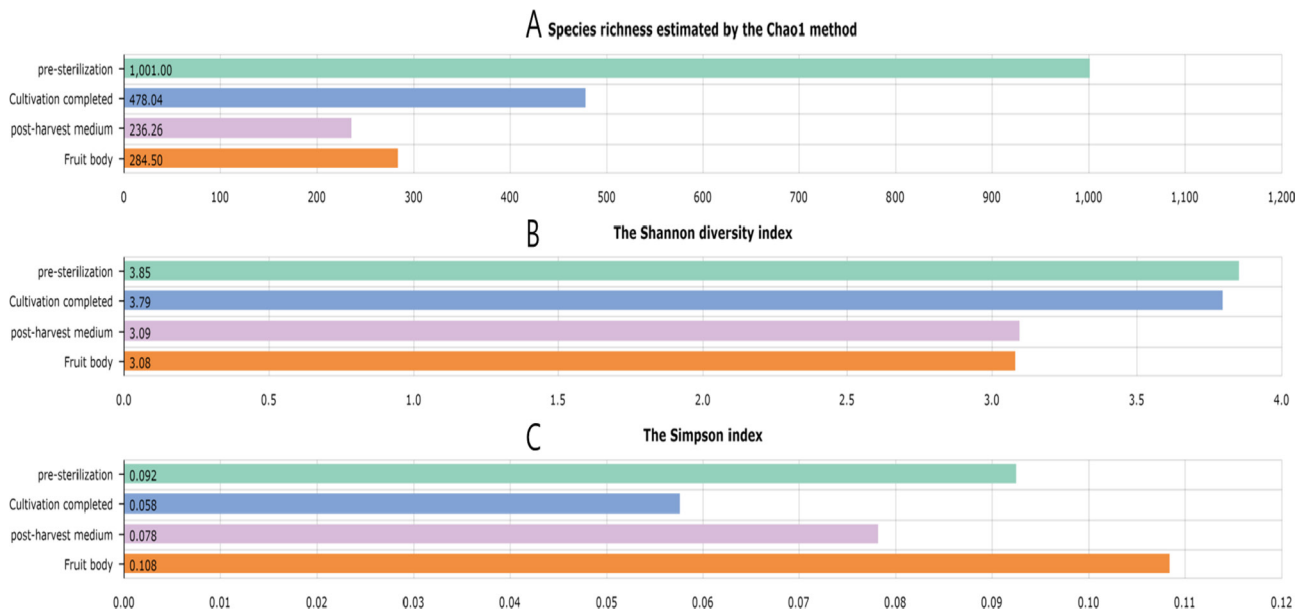


Fig. 2. Alpha diversity by mushroom growth stage. A, chao1; B, shannon; C, simpson

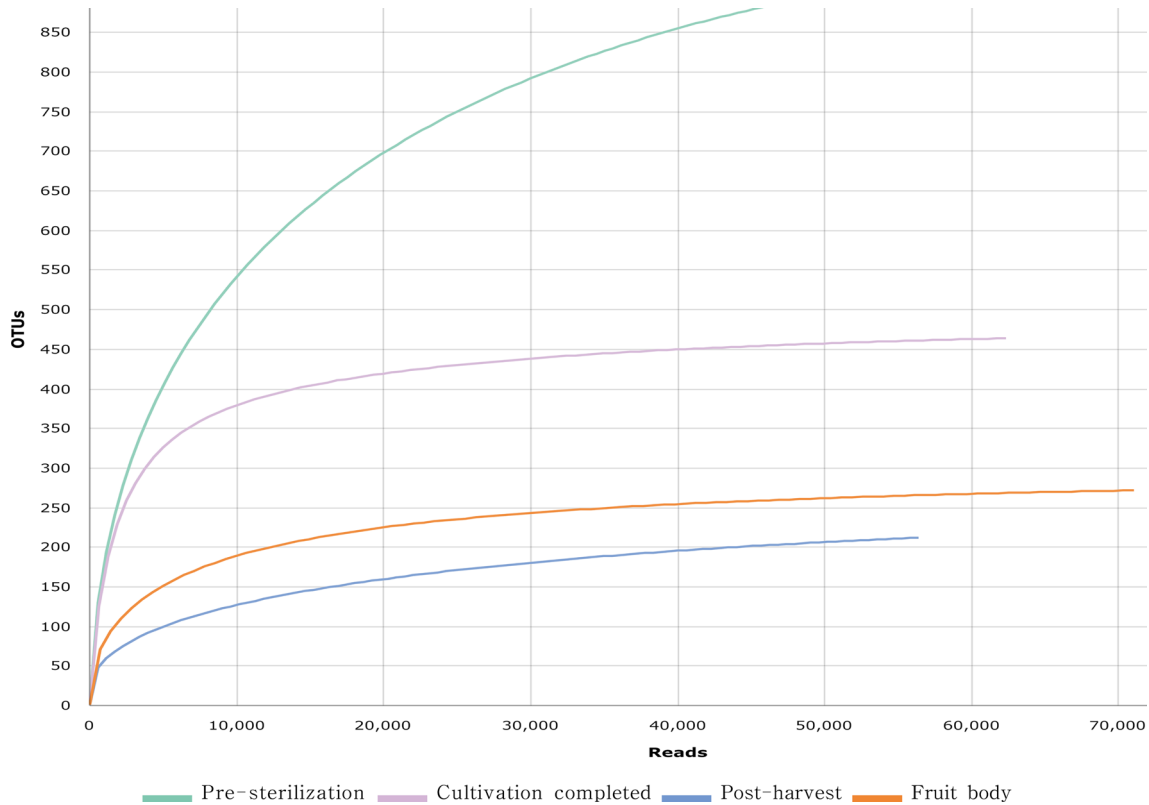


Fig. 3. Changes in species richness by mushroom cultivation stage evaluated using rarefaction curves

지가 0.092, 배양완료가 0.058, 수확 후 배지가 0.078, 자실체가 0.108이었다. 이를 토대로 미생물 다양성을 평가한 결과 살균 전 배지가 다른 생육단계에 비해 높았으며, 배양완료 배지, 자실체, 수확 후 배지 순인 것을 확인하였다. Liu 등의 연구에 의하면 alpha diversity는 표본 내 종의 다양성을 분석한 것이며, Chao1, Shannon, Simpson 중 Chao1은 OTU 수를 반영하였으며, Shannon과 Simpson은 종의 풍부도와 종의 균등성을 포함한 공동체 다양성에 반영하는데 사용된다고 밝혔고, Chao1과 Shannon은 지수가 클수록 Simpson은 지수가 작을수록 표본의 종 다양성이 높아진다고 보고하였다(2020). 위의 결과를 통해 느타리 생육단계별 종 다양성을 확인한 결과 Chao1과 Shannon을 확인하였을 때 살균 전 배지의 종 다양성이 높은 것을 확인할 수 있었으며, Simpson의 경우 지수가 가장 낮은 것은 수확 후 배지이지만 Fig. 1의 표를 통해 종의 균등성까지 고려해 보면 살균 전 배지의 종 다양성이 높은 것을 확인할 수 있었다.

느타리 생육단계별 미생물 군집 유사도

미생물 군집의 유사도를 확인하기 위해 beta diversity를 bray-curtis를 사용하여 분석하였으며, PCA(주좌표분석) 그래프로 표현한 결과 Fig. 4와 같다. 살균 전 배지의 1st PC값은 0.708, 2nd PC값은 0.002, 배양완료 배지의 경우 1st PC값은 -0.232, 2nd PC값은 0.164였다. 수확 후 배지의 1st PC값은 -0.248, 2nd PC값은 0.172이었으며, 자실체의 값은 1st PC값이 -0.226, 2nd PC값이 -0.339인 것을 확인하였다. 이를 통해 배양완료 배지와

수확 후 배지의 미생물 군집이 유사하며, 자실체의 미생물 군집의 경우 1st PC에서 배양완료배지와 수확 후 배지와 유사하지만, 2nd PC에서 유사도가 떨어지는 것으로 판단되었다. 살균 전 배지의 경우 모든 생육단계에서 미생물 군집이 유사하지 않은 것을 확인할 수 있었다. Martino 등의 연구에 의하면 미생물 군집의 유사도는 Bray-Curtis 대칭거리를 이용하여 유사성을 확인하는 방법이며, 사분위수를 사용하여 유사함을 분석하는 것을 말한다(2019). 따라서 본 시험에서는 배양완료배지와 수확후배지의 미생물 군집이 유사하다는 결과를 얻었다.

적 요

본 연구에서는 느타리버섯의 생육단계별 미생물 군집을 species 수준에서 조사하였다. 살균 전 배지에서는 그람 양성균이 우점하였다. 반면 배양완료 배지, 수확 후 배지, 그리고 자실체에서는 그람 음성균이 우점하였다. 미생물의 다양성을 확인한 결과 살균 전 배지가 다른 생육단계에 비해 다양한 미생물을 포함하고 있는 것을 확인하였으며, 배양완료배지, 자실체, 수확 후 배지의 순서로 다양성이 감소하는 경향을 보였다. 미생물의 유사도분석을 한 결과 배양완료배지와 수확 후 배지가 유사한 미생물군집을 보이는 것을 확인하였고, 자실체의 경우 일부 유사성을 보이지만 전반적으로는 차이를 나타내었다. 이러한 결과를 토대로 확인하였을 때 살균과정을 거치지 않은 살균 전 배지에서는 검출되지 않은 *Pseudomonas tolaasii*가 살균

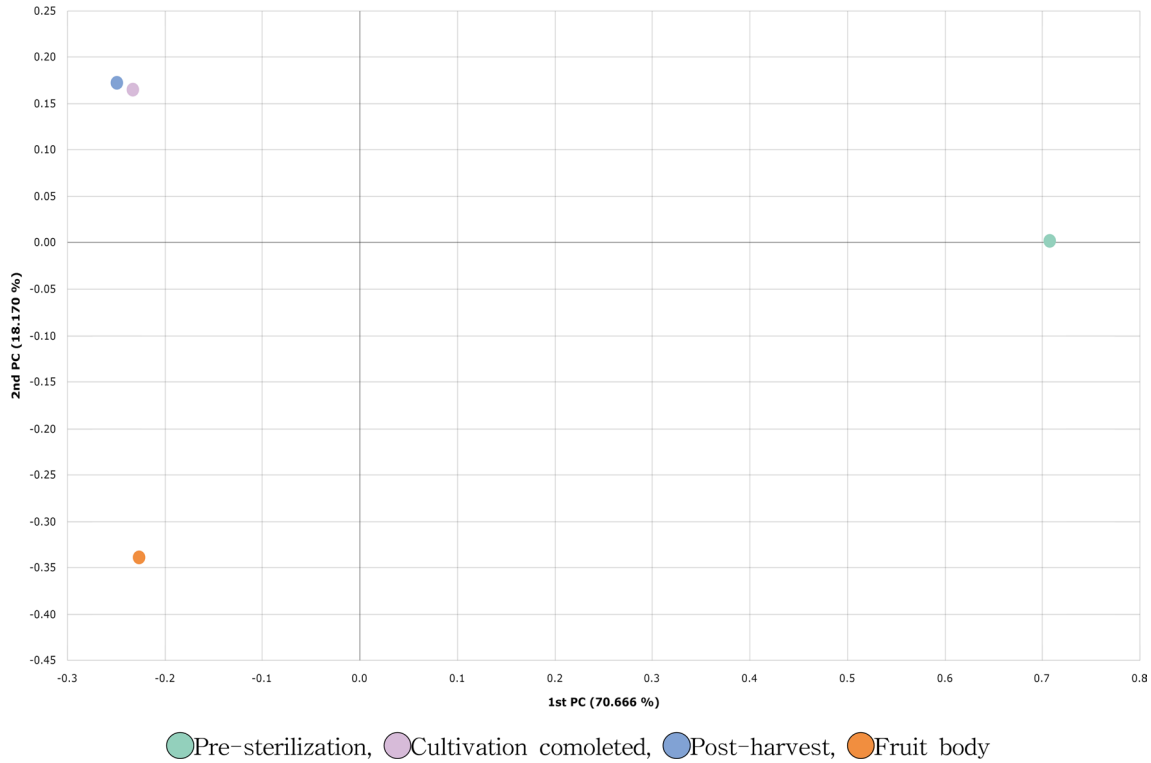


Fig. 4. Microbial species multiformity by mushroom growth stage confirmed beta diversity

과정을 거친 배양완료배지, 수확후 배지에서 검출된 것으로 보아 살균 이후 접종 혹은 배양하는 과정에서 미생물이 유입하였을 것으로 추정된다. 또한 유해균이 유입되었지만 병징이 나타나지 않은 것은 유해균을 억제하는 유익균의 존재와 병징을 일으키는 농도보다 낮은 것의 영향으로 추정된다. 앞으로, 유해균이 유입되었지만 병징이 나타나지 않은 원인과 기작에 대한 연구가 필요하다.

감사의 글

2023년 한국연구재단 병재배 버섯류의 병발생 기작 규명(과제번호 : RS-2023-0025145430782064780002)의 지원에 의해 수행된 결과입니다.

REFERENCES

Baek IS, Chi JH, Jeong YK, Kim JH, Lim JW. 2015. Effects of sterilization conditions and UV-C irradiation on reducing contamination rate in oyster mushroom bottle culture. *Korean Journal of Mycology*, 13: 256-261.

Breene WM. 1990. Nutritional and medicinal value of specialty mushrooms. *Journal of food protection*. 53: 883-894.

Carrasco J, Preston GM. 2020. Growing edible mushrooms: a conversation between bacteria and fungi. *Environmental microbiology*, 22: 858-872.

Chang ST, Miles PG. 1989. Edible mushrooms and their cultivation. CRC press.

Chung HC, Park YH, Kim YS. 1981. Basic information on the

characteristics of strains of oyster mushroom. *The Korean Journal of Mycology*, 9: 129-132.

Gal SW Lee SW. 2002. Development of optimal culture media for the stable production of mushroom. *J. Korean Soc. Agri. Chem. Biotechnol.* 45: 71-76.

Jang GY, Jeon CS, Gong WS, Yu YB, Kim GH, Seong JM. 2008. The beginning and history of *Pleurotus* spp. *Cultivation. Journal of Mushroom*, 6: 103-110.

Kim YI, Bae JS, Heo JW, Kwak WS. 2007. Monitoring nutrient composition, toxic heavy metals, and pesticide residues in mushroom substrate in different cultivation stages for bag and bottle cultivation. *Korean Journal of Animal Resources and Science*, 49: 67-78.

Latiff LA, Daran ABM, Mohamed AB. 1996. Relative distribution of minerals in the pileus and stalk of some selected edible mushrooms. *Food Chemistry*. 56: 115-121.

Lee CJ, Jeon CS, Jeong JC, Yoon HS, Oh SJ, Cho WD. 2008. Characteristics of bacteria isolated from the spawn of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*). *Korean Journal of Mycology*, 6: 94.

Lee CJ, Yoon HS, Jeon CS, Jeong JC, Han HS 2009. Changes and distributional pattern of microflora in cotton waste media of oyster mushroom cultivation. *Korean Journal of Mycology*, 37: 150-154.

Liu W, Zhang R, Shu R, Yu J, Li H, Long H, Jin S, Li S, Hu Q, Yao F, Zhou C, Huang Q, Hu X, Chen M, Hu W, Wang Q, Fang S, Wu, Q. 2020. Study of the relationship between microbiome and colorectal cancer susceptibility using 16SrRNA sequencing. *BioMed research international*, 2020: 7828392.

Martino C, Morton JT, Marotz CA, Thompson LR, Tripathi A, Knight R, Zengler K. 2019. A novel sparse compositional

- technique reveals microbial perturbations. *MSystems*, 4, 10-1128.
- Park WG, Kim YH, Son SG. 1995. Research on stable production of high-quality bottle mushrooms throughout the year: Test of *Pleurotus ostreatus* cultivation using beet pulp and cottonseed meal. Gyeonggi-do Agricultural Research and Extension Services Research Report, pp. 657-662.
- Raper KB, Thom C. 1949. A manual of the Penicillia.
- Royse DJ, Sanchez JE. 2007. Ground wheat straw as a substitute for portions of oak wood chips used in shitake (*Lentinula edodes*) substrate formulae. *Bioresource Technology* 98: 2137-2141.
- Song YJ, Jeong MJ, Kim BG, Rho YD, Ryu JC, Yoo YB. 1996. Genetic variability of *Pleurotus ostreatus* monospore isolates by random amplified polymorphic DNA analysis. *The Korean Journal of Mycology*, 24: 186-205.
- Tsukamoto T, Hitoshi M, Akira S. 2002. Identification of non pseudomonad bacteria from fruit bodies of wild agaricales fungi that detoxify tolaasin produced by *Pseudomonas tolaasii*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 66: 2201-2208.
- Yoo YB, Kong WS, Oh SJ, Cheong JC, Jang KY, Jhune CS. 2005. Trends of mushroom science and mushroom industry. *Journal of Mushroom*. 3: 1-23.