

큰느타리 재배사에서 헤파필터 교체 이후 기간에 따른 미생물상 변화

박혜성^{1,2*} · 민경진¹ · 이은지¹ · 이찬중¹

¹농촌진흥청 국립원예특작과학원 인삼특작부 버섯과

²단국대학교 자연과학대학 미생물학과

Changes in microbial phase by period after hepa filter replacement in King oyster(*Pleurotus eryngii*) mushroom cultivation

Hye-Sung Park*, Gyong-Jin Min, Eun-Ji Lee, and Chan-Jung Lee

¹Mushroom Research Division, NIHHS, RDA, Eumseong 27709, Korea

²Department of Microbiology College of Natural Science, Dankook University, Cheonan, 31116, Korea

ABSTRACT: This study was conducted to set up a proper replacement cycle of High Efficiency Particulate Air (HEPA) filters by observing the microbial populations in the air of the cultivation house of *Pleurotus eryngii*, before and after HEPA filter replacement at different periods. The density of bacteria and fungi in the air during each cultivation stage was measured using a sampler before the replacement of the HEPA filter. The results showed that airborne microorganisms had the highest density in the mushroom medium preparation room, with 169.7 CFU/m³ of bacteria and 570 CFU/m³ of fungi, and the removed old spawn had 126.3 CFU/m³ of bacteria and 560 CFU/m³ of fungi. The density of bacteria and fungi in the air at each cultivation stage before the replacement of the HEPA filter was 169.7 CFU/m³ and 570 CFU/m³, and 126.3 CFU/m³ and 560 CFU/m³, during the medium production and harvesting processes, respectively. After the replacement of the HEPA filter, the bacterial density was the lowest in the incubation room and the fungal density was the lowest in the cooling room. The microbial populations isolated at each period consisted of seven genera and seven species before the replacement, including *Cladosporium* sp., six genera and six species after 1 month of replacement, including *Penicillium* sp., 5 genera and 7 species after 3 months of replacement, including *Mucor plumbeus*, and 5 genera and 12 species, 5 genera and 10 species, and 5 genera and 10 species, 4, 5, and 6 months after the replacement, respectively, including *Penicillium brevicompactum*. During the period after replacement, the species were diversified and their number increased. The density of airborne microorganisms decreased drastically after the replacement of the HEPA filter. Its lowest value was recorded after 2 months of replacement, and it increased gradually afterwards, reaching a level similar to or higher than that of the pre-replacement period. Therefore, it was concluded that replacing the HEPA filter every 6 months is effective for reducing contamination.

J. Mushrooms 2020 September, 18(4):398-402
<http://dx.doi.org/10.14480/JM.2020.18.4.398>
 Print ISSN 1738-0294, Online ISSN 2288-8853
 © The Korean Society of Mushroom Science

Hye-Sung Park(Researcher), Gyong-Jin Min(Postdoctoral researcher),
 Eun-Ji Lee(Researcher), Chan-Jung Lee(Senior researcher)

*Corresponding author

E-mail : hyesung2@korea.kr

Tel : +82-43-871-5722, Fax : +82-43-871-5702

Received December 2, 2020

Revised December 14, 2020

Accepted December 22, 2020

KEYWORDS: Cultivation house, HEPA filter, King oyster mushroom

큰느타리버섯(*Pleurotus eryngii* (DC.:Fr.) Quel)은 우리나라 버섯생산량 178,346톤 중 46,816톤으로 26.25%를 차지하고 있고, 재배면적 또한 488ha중 123ha로 25.20%의 비중을 차지하는 버섯품목이다(특용작물생산실적, 2019). 큰느타리버섯 재배과정에서는 *Cladobotryum mycophilum*에 의한 cob web병, *Pantoea* sp.에 의한 무름병(soft rot), *Cladobotryum varium*에 의한 흰곰팡이병(white mold)이 주요 병해로 알려져 있고 그 외 양송이에서 *Verticillium fungicola*에 의해서 유발되는 거품마름병(dry bubble)병,

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.

Table 1. Location of sampling in mushroom cultivation house

Name	Sampling location
Site 1	Mushroom substrate preparation room
Site 2	Cooling room
Site 3	Inoculation room
Site 4	Incubation room
Site 5	Room of removing the old spawn
Site 6	Growth room
Site 7	Harvesting and packing room

*Ewingella americana*에 의한 대속괴사병(internal stipe necrosis) 등이 보고 되었고(Kim *et al.*, 2007, Kim *et al.*, 1998, Gea *et al.*, 2003, Inglis and Burden, 1996), 팽이버섯에서는 *Erwinia carotovorasub*에 의한 무름병(soft rot) 병, 표고에서는 *Cladobotryum sp.*에 의한 cob web병 등이 보고되었다(Okamoto *et al.*, 1999, Sharma *et al.*, 2016). 버섯 재배사 중 냉각실과 접종실, 배양실은 외부 공기중 미생물에 의한 피해를 최소화하기 위해 헤파필터를 설치하고 분기별 교체를 권장하지만, 농가에서는 경제적인 부담으로 연 1회정도 교체하는 실정이다. 이에 헤파

필터를 교체한 후 6개월간 버섯재배 단계별로 부유균을 수집하여 밀도변화를 측정하여 헤파필터 적정 사용기간을 제안하기 위해 연구를 수행하게 되었다. 경남 함양군 큰느타리버섯 농가 공조실에서 헤파필터(610 × 610 × 150)와 부직포(20T)로 된 프리필터를 4월에 교체 후 10월까지 6개월간 재배단계별 공기 샘플링을 실시하였다(Table 1). 재배사 내 부유균 밀도 측정은 Mas-100 Eco Airsampler for food industry(Merck, Germany)로 1,000 L/m³ 유량을 포집하여 측정하였고, 재배단계별 일정한 위치를 설정하여 3회 측정하였다. 진균수집배지는 세균의 증식 억제를 위해 Streptomycin을 첨가한 PDA 배지를 사용하였고, 세균수집배지는 진균의 증식 억제를 위해 benomyl을 첨가한 R2A배지를 사용하였다. 포집기로 부유균을 수집하나 배지는 3~7일간 25°C에서 배양하였다. 배양된 배지에서 자란 세균과 진균의 콜로니 수를 계수하여 부유균 밀도를 계산하였으며, 배양 후 자라난 세균 및 진균의 형태적 특성을 육안으로 관찰하여 다른 형태를 띠는 콜로니를 채취하였고, 새로운 배지에 3차례 옮기어 균을 순수분리 하였다. 순수분리된 균의 정확한 종 동정을 위해 세균은 16s rDNA sequence를 이용하여 분자적 동정을 실시하였고, 16s rDNA 증폭을 위해서 universal primer인 27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')와 1491R(5'-ACGG

Table 2. Changes in microorganisms by mushroom cultivation house(bacteria)

	Before replacement (Apr)	1 month later (May)	2 month later (Jun)	3 month later (Jul)	4 month later (Aug)	5 month later (Sept)	6 month later (Oct)
Site 1	169.7±15.4	16±1.5	2.3±0.2	7.0±0.6	43.3±3.9	157.3±14.3	7.0±0.6
Site 2	10.3±0.9	9.6±0.9	1.0±0.1	10.0±0.9	5.7±0.5	2.7±0.2	9.7±0.9
Site 3	12.3±1.1	4.3±0.4	4.7±0.4	12.3±1.1	208.7±19.0	7.3±0.7	6.7±0.6
Site 4	3.0±0.3	0.8±0.1	0.2±0.0	1.0±0.1	2.5±0.2	2.7±0.2	5.2±0.5
Site 5	126.3±11.5	6.3±0.6	3.0±0.3	7.0±0.6	5.7±0.5	125.3±11.4	7.0±0.6
Site 6	4.0±0.4	1.6±0.1	0.7±0.1	4.0±0.4	17.3±1.6	13.3±1.2	7.9±0.7
Site 7	45.0±4.1	5.3±0.5	2.0±0.2	9.3±0.8	205.7±18.7	56.3±5.1	28.7±2.6

* Site 1 : Mushroom medium preparation room, Site 2 : Cooling room, Site 3 : Inoculation room, Site 4 : Incubation room, Site 5 : Removing the old spawn, Site 6 : Growth room, Site 7 : Harvesting and packing room

Table 3. Changes in microorganisms by mushroom cultivation house(fungi)

	Before replacement (Apr)	1 month later (May)	2 month later (Jun)	3 month later (Jul)	4 month later (Aug)	5 month later (Sept)	6 month later (Oct)
Site 1	570.0±51.8	400.0±36.4	402.7±36.6	336.7±30.6	436.7±39.7	446.0±40.5	354.7±32.2
Site 2	2.0±0.2	0.7±0.1	0.0±0.0	0.3±0.0	0.0±0.0	2.0±0.2	2.3±0.2
Site 3	6.3±0.6	3.0±0.3	0.3±0.0	0.3±0.0	1.3±0.1	4.0±0.4	7.0±0.6
Site 4	65.0±5.9	7.5±0.7	6.5±0.6	9.3±0.8	10.3±0.9	130.8±11.9	181.5±16.5
Site 5	560.0±45.9	400.0±36.4	77.7±7.1	143.3±13.0	400.0±36.4	369.0±33.5	404.7±36.8
Site 6	560.0±39.0	19.3±1.8	380.7±34.6	373.3±33.9	29.7±2.7	391.3±35.6	407.3±37
Site 7	564.6±51.3	392.3±35.7	401.7±36.5	397.7±36.2	194.3±17.7	405.3±36.8	397.3±36.1

* Site 1 : Mushroom medium preparation room, Site 2 : Cooling room, Site 3 : Inoculation room, Site 4 : Incubation room, Site 5 : Removing the old spawn, Site 6 : Growth room, Site 7 : Harvesting and packing room

CTACCTTGTTACGACTT-3')(Lane, 1991)을 사용하였다. PCR 반응은 pre-denaturation(95°C, 5 min), denaturation(95°C, 1 min), annealing(55°C, 1 min), extension(72°C, 1 2 min) 과정을 35회 실시하고, 최종적으로 72°C, 5 min 동안 반응시간을 주어 16s rDNA 영역을 증폭하였다. 증폭된 PCR산물은 Qiagen PCR Purification Kit를 사용하여 정제하였고 정제된 산물을 Genotech(Daejeon, Korea)에 의뢰하여 nucleotide sequence를 분석하였다. 순수분리된 진균은 Internal Transcribed Spacer(ITS) 염기서열을 이용하여 분자적 동정을 실시하였고 ITS 영역의 증폭은 ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')과 ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') primer를 사용하였다. PCR 반응은 pre-denaturation(95°C, 5 min), denaturation(94°C, 1 min), annealing(58°C, 1 min), extension(72°C, 1 min 30 sec) 과정을 35회 실시하고, 최종적으로 72°C, 10 min 동안 반응시간을 주어 rDNA-ITS 영역을 증폭하였다. 증폭된 PCR산물은 Qiagen PCR Purification Kit를 사용하여 정제한 후에 정제된 산물을 Genotech(Daejeon, Korea)에 의뢰하여 nucleotide sequence를 분석하였다. 분석된 염기서열의 동정을 위하여 National Center for Biotechnology Information(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)의 Blast 검색 프로그램을 이용하여 Genbank 데이터베이스와 상동성이 높은 근연종들과 비교분석을 하였다. 헤파 필터 교체 전 재배단계별 재배사내 부유균 밀도 측정결과 세균은 배양실과 생육실에서 3.0 cfu/m³, 4.0 cfu/m³로 가장 낮은 밀도를 보였고, 외부와 개방되어있는 입병실과 균균기실의 밀도가 169.7 cfu/m³, 126.3 cfu/m³로 실내에서 진행되는 다른 단계에 비해 3.8~56.6배 이상 월등히

높았다. 진균은 냉각실에서 2.0 cfu/m³, 접종실에서 6.3 cfu/m³로 가장 낮았고, 그 외에 다른 단계에서는 두 단계에 비해 훨씬 높은 진균 밀도를 보였다(Table 2, 3). 분리된 종으로는 *Cladosporium cladosporioides*, *Mucor plumbeus*, *Penicillium brevicompactum* 등 7속 7종이 확인되었다(Table 4, 5). 헤파필터 교체 후에는 외부로 개방되어 있는 입병실과 균균기실을 제외하고는 모두 부유균의 밀도가 급격히 감소되는 것을 확인할 수 있었다. 세균의 밀도는 입병실과 균균기실에서도 급격히 감소하였는데 송화가루로 인한 피해가 줄어들면서 부유세균의 밀도도 같이 감소한 것으로 확인되었다. 헤파필터 교체 1개월 후에는 배양실과 생육실이 각각 0.8 cfu/m³, 1.6 cfu/m³로 가장 낮은 부유세균 밀도를 보였고, 냉각실과 접종실이 교체전과 마찬가지로 가장 낮은 진균 밀도를 보이는 것을 확인하였다. 1개월 후에 포집된 미생물은 *Cladosporium tenuissimum*, *C. caldosporioides*, *Cryptococcus magnus*, *Pantoea* sp. 등 6속 6종이 수집되었다. 교체 2개월 후에는 모든 재배단계별 부유세균의 밀도가 가장 낮았고, 부유진균의 밀도도 냉각실과, 접종실, 배양실 등 헤파필터 교체에 영향을 받는 재배사 실내공간에서 가장 낮아지는 것을 확인하였다. 분리된 미생물은 *Cladosporium tenuissimum*, *C. anthropophilum*, *C. cladosporioides* 등 4속 7종이 수집되었다. 3개월부터는 재배단계별 부유균의 밀도가 차츰 증가하여 *Cladosporium cladosporioides*, *C. perangustum*, *C. ramotenellum*, *Penicillium brevicompactum* 등 5속 7종이 수집되었다. 4개월부터 6개월까지는 *Penicillium brevicompactum*, *P. fellutanum*, *P. polonicum* 등 5속 10여종 이상이 수집되었다. 6개월부터는 헤파필터 교체 전

Table 4. Detection of bacteria diversity in mushroom cultivation according to HEPA filter replacement

Bacteria	Period after replacement of HEPA filter(month)						
	before	1	2	3	4	5	6
<i>Bacillus aryabhatai</i>			Site 6				
<i>Bacillus megaterium</i>			Site 7				
<i>Bacillus safensis</i>			Site 2				
<i>Bacillus subtilis</i>			Site 4				
<i>Bacillus velezensis</i>					Site 3	Site 3	Site 3
<i>Pantoea</i> sp.	Site 7	Site 3					
<i>Pantoea agglomerans</i>			Site 5				
<i>Pseudomonas</i> sp.	Site 1		Site 1				
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Site 6			Site 7			
<i>Pseudomonas gessardii</i>		Site 7					
<i>Pseudomonas protegens</i>	Site 5						
<i>Staphylococcus epidermidis</i>			Site 6				
<i>Staphylococcus fleurettii</i>					Site 3		

* Site 1 : Mushroom medium preparation room, Site 2 : Cooling room, Site 3 : Inoculation room, Site 4 : Incubation room, Site 5 : Removing the spawn, Site 6 : Growth room, Site 7 : Harvesting and packing room

Table 5. Analysis of fungi diversity in mushroom cultivation according to HEPA filter replacement

Fungi	Period after replacement of HEPA filter(month)						
	before	1	2	3	4	5	6
<i>Cladosporium</i> sp.		Site 3 Site 4					
<i>Cladosporium anthropophilum</i>			Site 3				
<i>Cladosporium austroafricanum</i>					Site 1 Site 5	Site 1 Site 5	Site 1 Site 5
<i>Cladosporium cladosporioides</i>		Site 2 Site 6	Site 2 Site 5 Site 6 Site 7	Site 2	Site 4 Site 6 Site 7	Site 4 Site 5 Site 6 Site 7	Site 4 Site 6 Site 7
<i>Cladosporium perangustum</i>				Site 4			
<i>Cladosporium pseudocladosporioides</i>				Site 5			
<i>Cladosporium ramotenellum</i>				Site 3 Site 6 Site 7			
<i>Cladosporium tenuissimum</i>		Site 7	Site 4				
<i>Cryptococcus</i> sp.				Site 5			
<i>Cryptococcus magnus</i>		Site 6					
<i>Fusarium avenaceum</i>					Site 7		
<i>Mucor plumbeus</i>	Site 1 Site 4 Site 5 Site 6 Site 7	Site 1 Site 3 Site 7	Site 4				
<i>Penicillium</i> sp.		Site 1 Site 4					
<i>Penicillium brasilianum</i>					Site 2	Site 2	Site 2
<i>Penicillium brevicompactum</i>	Site 1 Site 3 Site 4 Site 5 Site 6 Site 7	Site 5 Site 6 Site 7	Site 1 Site 3	Site 1 Site 4 Site 5 Site 6	Site 6 Site 7	Site 6 Site 7	Site 6 Site 7
<i>Penicillium fellutanum</i>					Site 4	Site 4	Site 4
<i>Penicillium glabrum</i>	Site 7						
<i>Penicillium polonicum</i>				Site 3 Site 7	Site 1 Site 3 Site 5	Site 1 Site 3 Site 5	Site 1 Site 3 Site 7
<i>Penicillium raistrickii</i>					Site 1	Site 1	Site 1
<i>Penicillium sumatrense</i>			Site 4				
<i>Rhodotorula</i> sp.			Site 3				
<i>Staphylococcus epidermidis</i>			Site 6				
<i>Staphylococcus fleurettii</i>					Site 3		

* Site 1 : Mushroom medium preparation room, Site 2 : Cooling room, Site 3 : Inoculation room, Site 4 : Incubation room, Site 5 : Removing the old spawn, Site 6 : Growth room, Site 7 : Harvesting and packing room

수치보다 대부분 증가하였으며 그에 따른 배양중 오염도도 증가하였다. 양송이 재배사 공기중에 존재하는 세균의

농도는 3.84×10^3 cfu/m³이었는데(Kwon *et al.*, 2015) 큰노타리 재배사에 비해 100배이상 높은 밀도를 보였는데

이는 재배방식과 사용배지에 따른 밀도차이로 생각된다.

이상의 결과로 헤파필터의 적정 사용기간은 6개월이며, 앞으로 지속적으로 조사자료를 누적하여 큰느타리버섯 재배사내 오염원 발생양상을 기반으로 오염방지 관리를 위한 기초자료로 활용할 수 있을 것이다.

적 요

버섯은 대부분 시설에서 재배되기 때문에 안전하게 고품질의 버섯 생산을 위해서는 재배사 내 환경에 대한 정보가 필요하다. 따라서 본 연구에서는 헤파필터 교체에 따른 큰느타리 재배사 대기중 미생물상 변화를 분석하여 헤파필터 적정 교체기간을 설정하고자 연구를 수행하였다. 헤파필터 교체 전 재배단계별 대기중 세균 및 진균 밀도는 배지제조과정에서 세균 169.7 cfu/m³, 진균 570 cfu/m³, 균 굵기과정에서 세균 126.3 cfu/m³, 진균 560cfu/m³로 부유균의 밀도가 가장 높았다. 헤파필터 교체 후 세균의 밀도는 배양실에서 가장 낮아졌고, 진균의 밀도는 냉각실에서 가장 낮게 나타났다. 헤파필터 교체전 *Cladosporium* sp. 등 7속 7종이었고, 교체 후 1개월은 *Penicillium* sp. 등 6속 6종, 2개월은 *Cladosporium cladosporioides* 등 4속 7종, 3개월차는 *Mucor plumbeus* 등 5속 7종, 4개월에서 6개월까지는 *Penicillium brevicompactum* 등 각각 5속 12종, 5속 10종, 5속 10종으로 교체 후 시간이 지날수록 종이 다양해지고 증가하였다. 부유균의 밀도는 헤파필터 교체 후 2개월 후 가장 낮았고 차츰 증가하다가 6개월에는 교체전 밀도와 비슷해지거나 높아지는 것을 확인하였다. 따라서 헤파필터는 6개월마다 교체하는 것이 오염저감을 위해 효율적인 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 공동연구과제(PJ013536022020)에서 수행한 연구결과로 연구비 지원에 감사드립니다.

REFERENCES

- 농림축산식품부. 2020. 2019 특용작물 생산실적. 101-109.
- Gea FJ, Tello JC, Navarro MJ. 2003. Occurrence of *Verticillium fungicola* var. *fungicola* on *Agaricus bitorquis* mushroom crops in Spain. *J Phytopathol* 151: 98-100.
- Inglis PW, Burden JF. 1996. Evidence for the association of the enteric bacterium *Ewingella americana* with internal stipe necrosis of *Agaricus bisporus*. *Microbiology* 142: 3253-3260.
- Kim MK, Ryu JS, Lee YH, Yun HD. 2007. First report of *Pantoea* sp. induced soft rot disease of *Pleurotus eryngii* in Korea. *Plant Dis* 91: 109.
- Kim, TS, Lee, HW, Song, GW, Shin, WG. 1998. King oyster mushroom (*Pleurotus eryngii*) white mold disease caused by *Cladobotryum varium*. *KSM News Lett* 11:46.
- Kwon HW, Choi MA, Oh YL, Kong WS, Kim SH. 2015. Investigation of bacteria in indoor air of a greenhouse for button mushroom cultivation. *J. mushroom.* 13(1): 26-29.
- Lane DJ. 1991. 16S/23S rRNA sequencing, In stackebrandt E, Goodfellow (ed.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. New York, NY: John Wiley and Sons Press. United Kingdom. 115-175.
- Okamoto H, Sato M, Isaka M. 1999. Bacterial soft rot of winter mushroom and oyster mushroom caused by *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Ann Phytopathol Soc Japan* 65: 460-464.
- Sharma VP, Sharma S, Kumar S, Gupta M, Kamal S. 2016. Cob web and dry bubble diseases in *Lentinula edodes* cultivation- A new report. *International Society for Mushroom Science* 2016. 130-134.