Korean Journal of Microbiology (2015) Vol. 51, No. 3, pp. 221-230
DOI http://dx.doi.org/10.7845/kjm.2015.5039
Copyright ⓒ 2015, The Microbiological Society of Korea
pISSN 0440-2413
eISSN 2383-9902

보 문

참나무 톱밥을 이용한 표고 지면재배 과정의 주요 미생물 군집 분석

신지혜[1] · 윤서연[1] · 남지현[2] · 구창덕[3] · 이동훈[1]*

[1]충북대학교 미생물학과, [2]명지대학교 환경에너지공학과, [3]충북대학교 산림학과

Microbial community structures in the ground bed cultivation of *Lentinula edodes* using oak sawdust

Ji-Hye Shin[1], Seo-Yeon Yun[1], Ji-Hyun Nam[2], Chang-Duck Koo[3], and Dong-Hun Lee[1]*

[1]*Department of Microbiology, Chungbuk National University, Cheongju 28644, Republic of Korea*
[2]*Department of Environmental Engineering and Energy, Myongji University, Yongin 17058, Republic of Korea*
[3]*Department of Forest Science, Chungbuk National University, Cheongju 28644, Republic of Korea*

(Received August 25, 2015; Accepted September 22, 2015)

ABSTRACT: Ground bed cultivation method for shiitake mushroom (Phogo; *Lentinula edodes*) has been advanced to use the oak-sawdust composted by microorganisms. This method has some advantages in saving the labors and improving productivity. The aim of this study is to analyze microbial community in oak sawdust and to provide the information for efficient cultivation of shiitake mushroom. In process of composting, the proportions of thermophiles increased from 10% to 80%. This results show the microbial community succession from mesophilic bacteria to thermophilic bacteria. T-RFLP analysis and nucleotide sequencing of 16S rRNA gene demonstrated that the change of dominant bacteria coupled with shifts in each stages. The family of *Enterobacteriaceae* as a mesophilic bacteria were dominant (100%) in oak sawdust sample, but *Amycolatopsis* (49.0%) and *Saccharopolyspora* (26.5%) as a thermophilic *Actinomycetes* were dominant in the last day of composting. In hyphal growth stage, *Leuconostoc* (psychrophilic bacteria) was dominant (75.0%). The composting process of sawdust is very important for growth of mushroom mycelium. Therefore, there is need for the further study for the *Amycolatopsis* as thermophilic *Actinomycetes*.

Key words: *Amycolatopsis*, *Lentinula edodes*, composting, oak sawdust, shiitake mushroom

표고버섯(*Lentinula edodes*)은 활엽수에 기생하는 담자균류의 주름버섯목 절편버섯과 표고속에 속하는 버섯으로 독특한 맛과 향을 지녀, 오래전부터 식용 및 약용으로 이용되고 있다(Hong, 1980; Park and Lee, 1997). 세계적으로 표고버섯은 동아시아 지역을 중심으로 생산, 소비되고 있으며, 우리나라에서도 매년 생산과 소비가 증가하고 있어(연간생산액: 2,220억원; Korea Forest Service, 2012) 경제적인 가치가 매우 높은 임산물이라고 할 수 있다(Sánchez, 2004).

효소시장을 제외하면 버섯의 배양은 세계에서 가장 큰 잠재력을 가진 식품생명공학 산업이다(Moore and Chiu, 2001). 표고버섯 재배 방식은 전통적으로 참나무류를 이용한 노지재배에 기반을 두고 있었으나, 불규칙한 날씨변화, 곰팡이 등의 잡균 오염 문제로 인해 시설 원목재배가 증가되어 왔다(Lee *et al.*, 2007). 그러나 시설 원목재배는 중국산 표고버섯의 수입증가에 따른 수익성 악화, 원목가격의 상승에 따른 농가부담, 노동력의 부족과 고령화 등을 이유로 톱밥배지를 이용하는 시설 톱밥재배 방식으로 전환되고 있다. 톱밥재배를 이용하여 표고를 생산하는 비율은 우리나라의 경우 약 15% 수준이지만 일본과 중국에서는 각각 60%, 100%에 달한다(Park *et al.*, 2008).

톱밥배지에 표고를 재배하는 방식은 원목재배 방식에는 없었던 톱밥의 발효과정을 거치게 된다. 이 방식은 발효를 통해 톱밥배지를 생산하는 과정(단계 I)과 발효가 끝난 톱밥배지를 살균하고 균사를 접종하여 자실체를 형성하는 과정(단계 II)의 두 단계로 나뉜다(Moore and Chiu, 2001). 단계 I은 톱밥이나 쌀겨와 같은 성분을 발효시켜 배지를 만들어 주는 과정을

***For correspondence.** E-mail: donghun@chungbuk.ac.kr;
Tel.: +82-43-261-3261; Fax: +82-43-264-9600

말한다. 표고버섯 배지의 발효에 이용되는 재료로는 밀짚, 닭분뇨, 석고, 톱밥 등이 포함되며 이들 재료를 혼합하여 사용하는 경우도 있다(Straatsma *et al.*, 1995; Moore and Chiu, 2001). 발효과정은 토착미생물 군집에 의한 자체 발열과정이며, 미생물은 기질분해에 필요한 효소를 만들어 원료에 포함된 유기물을 분해시킨다(Ryckeboer *et al.*, 2003a). Iiyama 등(1997)은 글루코오스와 자일로오스 같은 간단한 화합물의 경우 발효 초기에 세균에 의해 빠르게 분해되고, 후기에는 분해하기 어려운 리그닌, 셀룰로오즈 등의 복잡한 화합물들만이 남는다고 보고하였다. 중온성 세균과 내열성 곰팡이는 발효초기에 우점하며 유기물 분해에 기여한다(Ryckeboer *et al.*, 2003b). 발효가 진행되며 미생물이 방출하는 대사열로 인해 톱밥의 온도는 점점 높아지고 이로 인해 내부의 미생물은 한계상황을 맞게 된다. 따라서 중온성 미생물은 사멸하고 최적생장온도가 높은 방선균과 같은 고온성 세균으로의 천이가 일어나게 되며(Finstein *et al.*, 1983), 중온성 세균과 곰팡이에 의해 분해되지 못한 복잡한 구조의 천연고분자 등이 분해된다(Ryckeboer *et al.*, 2003a). 방선균의 효소는 나무 줄기나 껍질과 같은 거친 잔해도 쉽게 분해할 수 있기 때문에 발효과정의 난분해성 물질 분해에 매우 중요한 역할을 한다. 또한 발효 단계를 거친 톱밥 배지에 표고버섯을 재배하는 방법은 다른 재배방법에 비해 작물 수확주기가 짧아지고 높은 수확을 거둘 수 있다는 장점이 있다(Sánchez, 2004).

단계 II는 발효과정을 거친 톱밥을 살균하고, 버섯균사를 접종하여 생장시키는 단계로 균사체의 성장에 적합한 선택적 톱밥 배지를 생산하는 과정이라고 할 수 있다(Jess *et al.*, 2007). 살균과정의 경우 고온(100°C 이상) 또는 저온(약 60°C)을 일정시간 동안 가하여 해충 및 병원균을 사멸시키고 배지의 양분을 버섯균이 이용하기 쉬운 형태로 변화시킨다(Koo *et al.*, 2012). 따라서 살균은 표고 톱밥재배 과정에서 중요한 작업이라고 할 수 있다. 100°C 이상의 고온살균은 오염의 우려는 적지만 살균시설과 에너지 유지 비용이 많이 들어 농가에 부담이 될 수 있다. 그러나 저온살균의 경우 살균은 충분하지 않지만 설비비용이 저렴하고 잔류 세균으로 인해 표고와 경쟁하는 잡균의 오염을 방지할 수 있다. 하지만 표고 균사생장시기의 온도가 30°C 이상이 되거나 균사 접종 밀도가 25% 이하일 경우 오염률이 크게 증가하여 균사생장에 저해가 될 수 있는 단점이 있다. 톱밥 배지를 이용하는 표고버섯 재배방법으로 균상재배, 봉지재배, 지면재배가 활용되고 있다. 균상재배는 톱밥 배지를 내열성 비닐봉지에 넣어 살균하고 표고균을 접종하여 수확하는 방식인데 잡균 오염확률이 높고 많은 노동력과 시간이 요구된다는 단점이 있다. 균상재배를 개선한 방식인 봉지재배는 살균 후 표고를 접종한 뒤 봉지의 상면만 개방하여 버섯을 발생시키는 것으로 수확은 수월하지만 봉지의 측면에서 버섯이 발생할 수 있고, 상면이 오염되면 회복이 매우 어렵다는 단점이 있다. 지면재배 방식은 봉지재배의 단점을 개선하여 살균된 배지를 바닥에 입상시키기 때문에 버섯이 모두 상부로 발생하여 관리와 수확이 수월하다는 장점이 있어 최근 이용되고 있는 방식이다(Koo *et al.*, 2013).

톱밥의 발효로 생산된 배지의 밀도는 버섯의 생산량과 양의 상관관계를 가지기 때문에(Straatsma *et al.*, 1989) 단계 I에서의 미생물 제어는 버섯의 생산량과 직접적인 연관이 있다고 할 수 있다. 그러나 현재 표고 지면재배과정 동안 나타나는 세균 군집에 관한 연구는 미흡한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 저온살균을 적용한 표고 버섯의 지면재배 과정 각 단계의 주요 세균 군집을 추적하기 위하여 16S rRNA 유전자 분석을 수행하였다. 또한, 총세균 및 고온미생물 분포를 조사하여 성공적인 표고재배를 위한 참나무 톱밥 배지 발효과정에 대한 정보를 제공하고자 한다.

재료 및 방법

시료 채취

발효를 위해 벌채 후 6개월 이상 야적된 참나무를 이용해 만든 톱밥 11 ton을 비닐하우스 내부에 야적(2 m × 5 m × 2 m)하고 인위적인 산소 공급 및 온도 조절은 하지 않았다. 발효는 40일 동안 진행하였으며 발효가 종료된 톱밥은 교반하였다(단계 I). 교반한 톱밥에 물(충북대학교 농과대학 수돗물)을 혼합한 후 4시간동안 저온살균(65°C) 하였다. 저온살균한 톱밥배지에 표고 종균을 첨가하여 혼합하고 18°C에 배양하여 균사를 생장시켰다(단계 II).

참나무 톱밥 원료와 2일, 9일, 16일, 23일, 30일, 37일의 표면과 내부(50 cm, 1 m), 교반된 40일 시료를 채취하였다. 또한, 저온살균에 사용된 혼합수와 41일(저온살균 직후, 표고 종균 접종 직후), 균사생장시기(48일, 76일, 104일)의 시료를 채취하였다. 각 시료는 10 g 이상 채취하였고 온도, pH, 함수율을 측정하였다.

총세균수 측정

시료 1 g을 100 ml의 인산완충용액(KH_2PO_4 0.03 g/L, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.04 g/L, pH 7.4)에 현탁한 후, sonicator를 사용하여 톱밥으로부터 미생물을 분리시켰다. 미생물이 현탁된 시료 1 ml을 취하여 polycarbonate membrane filter (pore size 0.2 μm,

Milipore)로 여과하고, acridine orange (1 mg/ml)를 이용하여 염색하였다. 형광현미경(Excitation; 500 nm, Emission; 520 nm, Nikon)을 이용하여 15 X 100배의 배율로 적색과 녹색으로 염색된 총세균수를 계수하였다. 각 시료는 2회 반복하여 조사하였으며, 30 검경단위(field)를 무작위로 선정하여 계수하였다.

고온미생물수 측정

총세균수 측정 방법과 동일하게 미생물이 포함된 완충용액 시료를 준비하고 70°C 항온수조에서 1시간 동안 고온 처리한 후에 Live/Dead BacLight™ bacterial viability kit (Invitrogen)를 이용하여 세균을 염색하였다. 염색된 시료 1 ml을 polycarbonate membrane filter (pore size 0.2 μm)로 여과하였고, 형광현미경(Excitation; 470 nm, Emission; 540 nm, Nikon)을 이용하여 15 X 100배의 배율로 녹색의 생존 균수를 계수하였다. 각 시료는 2회 반복하여 조사하였으며, 30 검경단위를 무작위로 선정하여 계수하였다.

분자생물학적 세균군집 분석

T-RFLP 분석: 발효 전 참나무 톱밥, 9일과 23일의 표면 및 50 cm 내부, 40일, 41일의 저온살균 직후 및 표고 균사 접종 시료, 48일, 76일, 104일의 시료 0.2 g에서 핵산을 직접 추출하기 위하여 Miller 등(1999)의 bead beating 방법을 이용하였다. 추출된 핵산은 QIAamp DNA Micro kit (Qiagen)로 정제하였다. Eubacterial primer인 27F에 형광물질인 FAM을 표식시킨 27F (*E. coli* numbering 8-27: 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3')와 785R (*E. coli* numbering 785-804: 5'-ACTACCRGGG TATCTAATCC-3')로 증폭하였다(Lane, 1991). PCR 반응물은 1X 반응용액(100 mM Tris-HCl, 400 mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$, BSA 500 μg/ml, pH 8.3), 160 μM dNTPs, 0.5 μM primer, 정제된 DNA (10–15 ng/μl)와 1 unit의 Taq polymerase (Genenmed)를 첨가하여 총 50 μl의 혼합물로 조성하였다. PCR 반응조건은 95°C에서 3분간 초기 열처리한 후, 95°C에서 30초, 58°C에서 30초, 72°C에서 1분씩 40회 반복하고, 마지막에는 72°C에서 10분 반응시켰다. PCR 산물은 GENEALL™ PCR SV Mini kit (GeneAll Biosystem)로 정제한 후에 제한효소 *Hpa*II 5 unit을 첨가하여 37°C에서 5시간 이상 반응시켰다. 제한효소에 의해 절단된 DNA는 ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)를 이용하여 FAM이 표식된 말단의 단편만을 확인하여 T-RF profile을 얻었다. GelCompar II 프로그램(Applied Maths)을 이용하여 각 시료에서 확인된 T-RF profile의 상관관계(Pearson-correlation)를 분석하고, UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean) 방법으로 집괴분석(cluster analysis)을 수행하였다.

16S rRNA 유전자 염기서열 분석: 27F-1492R (*E. coli* numbering 1492-1510: 5'-GGCTACCTTGTTACGACTT-3') primer를 이용해 증폭한 16S rRNA PCR 산물을 pGEM-T vector (Promega)를 이용하여 *E. coli* DH10B에 형질전환 시킨 뒤 시료당 100개 이상의 재조합 클론을 선별하였다. 16S rRNA 유전자 증폭에 이용된 eubacterial primer 27F와 T-vector 삽입자리에 존재하는 염기서열에 상보적인 prGTr primer (5'-CTC AAGCTATGCATCCAACGC-3') (Chun *et al.*, 1999) 쌍을 사용하여 direct amplified PCR (Fode-vaughan *et al.*, 2001)을 수행하고, 전기영동으로 PCR 산물의 크기를 확인하여 5'에서 3' 방향으로 삽입된 재조합 클론을 2차 선별하였다. 선별된 재조합 클론들은 T7 primer (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3')를 이용하여 ABI 3730XL DNA Analyzer (Applied Biosystems)로 염기서열을 분석하였다.

16S rRNA 유전자 염기서열의 계통분류학적 분석: Ribosomal Database Project (RDP; http://rdp.cme.msu.edu)와 GenBank (http://ncbi.nlm.nih.gov)의 database로부터 확인된 염기서열을 16S rRNA 유전자 라이브러리 클론의 염기서열과 비교함으로써 세균 군집을 분류체계의 속 수준까지 추론하였다. 또한 Clustal W (Thompson *et al.*, 1994) 프로그램을 이용하여 참조균주와 라이브러리의 염기서열을 정렬하였으며, MEGA 6.0 (Tamura *et al.*, 2013)의 Neighbor-Joining 방법과 Jukes-Cantor 모델을 이용하여 진화적 거리와 계통도를 추론하였다. 또한, bootstrap값은 1,000회의 resampled data로부터 추론하였다.

결 과

물리 화학적 변화

발효가 시작되면서 참나무 톱밥 내부 50 cm의 온도는 45°C에서 최고 60°C까지 증가하였고, 1 m 깊이에서도 최고 60°C로 비슷한 양상을 보였다(Fig. 1). 표면의 온도는 38–43°C사이로 변화의 폭이 작았다. 발효 초반에는 표면, 50 cm, 1 m에서 30–31%의 비슷한 함수율을 보였으나, 표면의 경우 9일만에 4%로 급격히 감소하였고 50 cm와 1 m는 변화가 관찰되지 않았다. 발효 종료 시기인 37일에는 표면 함수율은 7.5%로 9일에 비해 소폭 상승하였고, 50 cm와 1 m는 각각 22%, 23.5%로 초반에 비해 감소하였다. 표면의 pH는 톱밥 발효기간 동안 큰

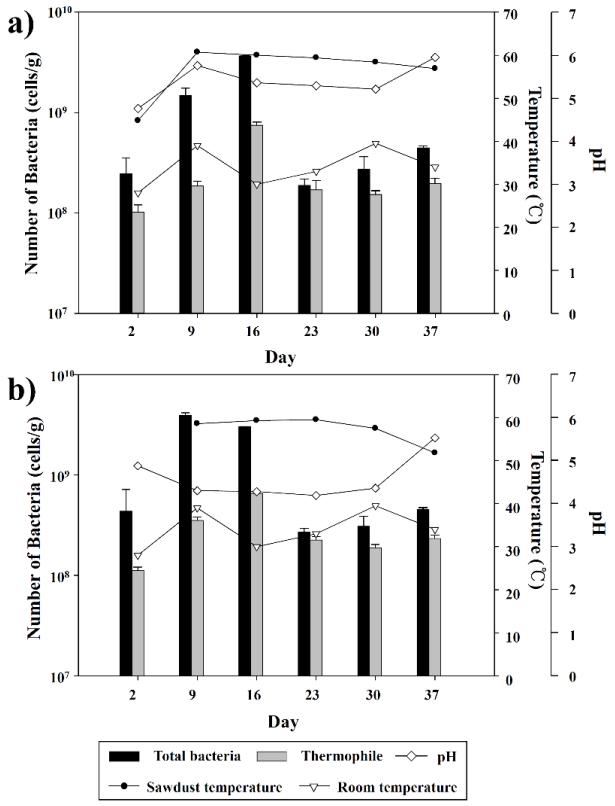

Fig. 1. Variation of temperature, pH and numbers of total bacteria and thermophile during Phase I. (A) 50 cm sample, (B) 1 m sample.

변화가 없었으나(pH 5.48–5.58) 37일에서는 pH 4.8로 약산성을 나타났다. 이와는 반대로 50 cm와 1 m 내부의 pH는 2일에 비해 상승하여 상대적으로 높은 pH 환경이 조성된 것을 확인하였다.

세균수 변화

참나무 톱밥 발효과정에 따른 미생물 수의 변화는 Fig. 1과 같다. 야적된 참나무를 이용해 만든 톱밥의 총세균수는 발효 시작단계인 2일부터 16일까지 증가하는 양상을 보였다. 50 cm 내부 시료의 총세균수는 2일 시료에 비해 약 10배 증가하였고, 고온미생물은 7배 증가하였다. 1 m 내부 시료의 경우도 총세균수와 고온미생물수가 각각 7배, 6배 증가하였다. 총세균수에 대한 고온미생물수의 비율은 23일 시료에서 가장 높았다(80% 이상). 저온살균 이후의 총세균수는 저온살균 전보다 8%가 감소하였으나 고온미생물의 숫자는 유지되어 총세균수에 대한 고온미생물수의 비율은 증가(53% → 58%)한 것을 확인하였다.

세균군집 분석

T-RFLP profile의 집괴분석: 단계 I의 경우 표층과 내부 모두 98% 이상 유사한 군집구조를 이루고 있다가 고온발효가 진행되는 23일 50 cm 깊이의 시료부터 군집구조가 변하였다(Fig. 2). 또한 적정 함수율을 위해 저온살균 전에 혼합수를 첨가한 이후의 군집구조가 매우 상이하였으며, 표고균사 생장시기의 세균군집 구조는 98% 이상으로 매우 유사하였다.

톱밥 발효 초기단계의 시료에서 493–495 bp, 84–88 bp의 T-RF가 우점하였으나, 고온미생물에 의해 발효가 진행되는 23일 50 cm 내부에서는 두 T-RF의 비율이 감소하고 160–165 bp와 60–65 bp의 T-RF가 증가하였다. 혼합수를 첨가한 저온살균 후에는 140–145 bp의 T-RF가 가장 우점하였고, 균사생장시기에서는 560–565 bp의 T-RF가 증가하였다.

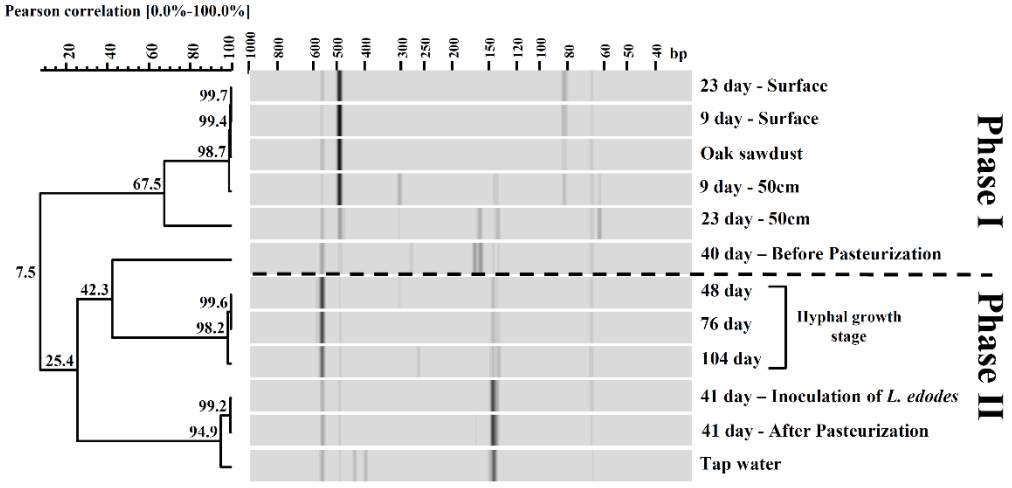

Fig. 2. Cluster analysis of *hpa* II T-RF profiles during Phase I and Phase II. The dendrogram was constructed by Pearson's correlation coefficient and UPGMA method. Numbers on the branch represent the similarity value of the samples belonging to the same cluster.

16S rRNA 유전자 군집분석: 발효 전 참나무 톱밥의 경우 확인된 염기서열 모두 *Gammaproteobacteria* 강에 포함되었고 속 수준에서는 *Erwinia*가 20.4%를 차지하며 가장 우점하였다 (Table 1). 발효단계 23일의 50 cm 내부의 경우 *Gammaproteobacteria* 강(40.9%)과 *Actinobacteria* 문(방선균; 40.9%)이 우점하였다. 속 수준에서는 *Klebsiella* 속이 40.9%, *Actinobacteria* 문의 *Amycolatopsis* 속이 36.4%를 차지하였으며, *Betaproteobacteria* 강의 *Burkholderia* 속은 18.2% 존재하는 것으로 나타났다. 1 m 내부 시료의 경우 *Proteobacteria* 문은 관찰되지 않았으며, 참나무 톱밥과 50 cm 내부에서 나타나지 않았던 *Firmicutes* 문이 87.1%를 차지하였다. 그 중 혐기성 세균으로 알려져 있는 *Clostridium* 속이 전체 염기서열의 80.6%로 가장 우점하였고, 50 cm 시료에서 우점한 *Actinobacteria* 문의 *Amycolatopsis* 속도 13.3% 존재하였다.

발효 40일후 교반한 시료에는 *Actinobacteria* 문이 89.8%를 차지하였으며, 그 중 *Amycolatopsis* 속과 *Saccharopolyspora* 속이 각각 49.0%와 26.5%를 차지하였다. 수돗물을 첨가한 뒤 65°C에서 4시간 저온살균한 시료(41일)의 미생물 군집은

Table 1. The variation of bacterial community during the Phase I and II of the shiitake cultivation (%)

Phylum		Genus	Oak Sawdust	Phase I			Phase II	
				23 day (50 cm)	23 day (1 m)	40 day (mix)	41 day (A.P*)	48 day (H.G.S+)
Actinobacteria		*Actinocatenispora*		4.5		8.2		
		Actinomadura				10.0		
		Amycolatopsis		36.4	12.9	49.0		
		Curtobacterium					2.7	
		Microlunatus				4.1		
		Propionibacterium						3.6
		Saccharopolyspora				26.5		3.6
Firmicutes		*Bacillus*			3.2		94.6	14.3
		Clostridium			80.6			
		Eubacterium				2.0		
		Leuconostoc					2.7	75.0
		Sporolactobacillus			3.2			
Proteobacteria	*Beta*	*Burkholderia*		18.2				3.6
	Gamma	*Acinetobacter*				2.0		
		Buttiauxella	2.0					
		Citrobacter	2.0					
		Cronobacter	2.0					
		Enterobacter	4.1					
		Erwinia	20.4			2.0		
		Hafnia	10.2					
		Klebsiella	6.1	40.9				
		Kosakonia	4.1			2.0		
		Leclercia	6.1					
		Pantoea	12.2					
		Rahnella	4.1					
		Raoultella	6.1					
		Salmonella	2.0					
		Serratia	10.2					
		Yersinia	8.2			2.0		
Total number of clones			49	22	31	49	37	28

* A.P, After pasteurization
+ H.G.S, Hyphal growth stage

살균전과 많은 차이를 보였다. 40일에 89.8%를 차지하던 *Actinobacteria* 문은 2.7%로 급격히 감소하였고 *Firmicutes* 문이 97.3%로 급격히 증가하였다. 속 수준에서는 *Bacillus* 속 94.9%, *Leuconostoc* 속 2.7%로 확인되었다.

표고 종균 접종 후 1주(48일)에는 저온살균 후와 마찬가지로 *Firmicutes* 문이 89.3%로 우점하였으나, 속 수준에서는 전체군집의 94.6%를 차지하던 *Bacillus* 속이 14.3%로 감소하고 작은 분포를 보이던 *Leuconostoc* 속이 75.0%로 우점하였다.

방선균의 계통분류학적 분석: 톱밥 발효시기(23일, 40일) 및 균사생장시기(48일)의 시료에서 확인된 방선균의 16S rRNA 유전자 염기서열을 GenBank와 RDP의 database의 서열과 비교 분석하여 계통을 추적하였다(Fig. 3). 시료에서 확인된 방선균 서열의 60%는 *Amycolatopsis*로 분석되었다. 발효 23일(50 cm, 1 m)에서 우점한 *Amycolatopsis* 속은 대부분이 *A. pigmentata* (AB327254)와 유사하였으나, 발효 마지막(40일) 시료의 경우 *Amycolatopsis* sp. OSD2 (KF218953)와 유사한 세균으로 군집이 변화한 것을 확인할 수 있었다. 이외에도 40일 시료에는 *Saccharopolyspora rosea* (AM99260), *Actinocatenispora thailandica* (AB107233), *Microlunatus panaciterrae* (AB271051) 유사세균 등 다양한 방선균이 확인되었다.

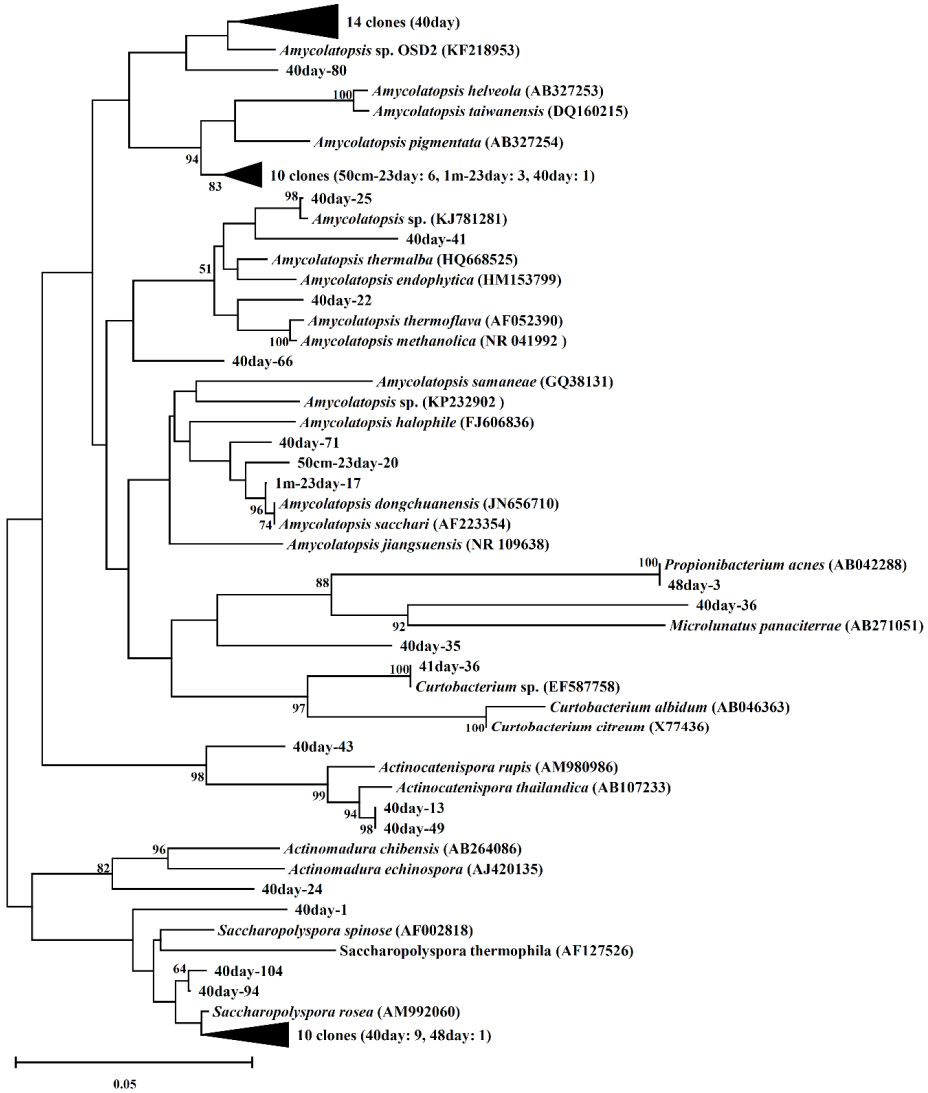

Fig. 3. Phylogenetic tree of actinobacterial 16S rRNA genes identified from the composting process. The tree was inferred by neighbor joining method and Jukes-Cantor model with 1,000 bootstrap replicates. Bootstrap values of <50% are not shown. The scale bar represents 5% sequence divergence. The 16S rRNA gene of *Methanothermobacter defluvii* (X99046) was used as an outgroup (data not shown). The numbers written in the front of the sample name refer to the date of sampling.

고 찰

폐기물 처리가 아닌 버섯 생산배지의 원료로 사용되는 기질을 준비하기 위한 톱밥 발효과정(단계 I)은 유기물을 무기화시키거나 상대적으로 안정한 유기물질로 재구축하기 위해 사용된다(Fergus, 1964). 참나무 톱밥 원료에는 *Enterobacteriaceae* 과에 속하는 그람 음성 세균인 *Erwinia*, *Pantoea*, *Serratia* 등의 중온성 세균이 많이 분포하였다. Prażmo 등(2000)은 소나무와 밤나무에서 *Enterobacter*와 *Rahnella* 등의 *Enterobacteriaceae* 과에 해당되는 그람 음성 세균을 확인한 바 있다. 본 연구에 사용된 참나무는 6개월간 야적되었기 때문에 주변 환경으로부터 *Enterobacteriaceae* 과의 세균이 오염되었을 가능성이 있다. 중온성 세균은 종이 다양하기 때문에 유기물을 분해할 때 사용할 수 있는 효소의 범위가 넓어 여러 종류 유기물의 효율적 분해가 가능하다. 따라서, 중온성 세균은 발효초기에 우점하여 초기 유기물 분해에 관여하고 발효물(톱밥)의 온도를 높이는데 기여를 한다(Ryckeboer *et al.*, 2003a).

50 cm 내부의 경우 발효가 진행되는 동안 세균수가 증가하였으며 동시에 톱밥 내부의 온도도 증가하는 것이 확인되었다(Fig. 1). 또한, 최고 온도(약 60°C)가 유지되는 16일에는 2일에 비해 세균수가 10배 이상 증가하였고 이후 세균수가 다시 감소하면서 톱밥 내부의 온도가 서서히 낮아지는 것이 관찰되었다. Finstein (1983)은 발효 초기 단계에서 간단한 기질을 이용하는 세균의 개체수가 증가하기 때문에 발효 더미의 온도가 상승하게 된다고 보고하였다. 또한, 발효더미의 온도가 45°C 이상이 되면 중온성 세균은 사멸하고 고온성 세균들이 우점하게 된다고 하였다. 본 연구 결과에서도 총세균수 대비 고온세균의 비율은 9일까지만해도 10%에 머물렀지만 23일이 되면서 80% 이상을 차지하였다. 이 결과로 발효과정이 진행되며 주로 중온성 미생물로 구성되었던 참나무 톱밥내 미생물 군집이 고온성 미생물로 천이가 일어났음을 알 수 있었다. 또한, 나무 제재에서 확인된 그람 음성세균에는 잠재적 병원균이 다수 포함되어 있어 벌목인부들의 호흡기 질병에 원인이 될 수도 있다(Prażmo *et al.*, 2000). 발효과정이 진행되고 온도가 가장 높게 올라간 23일 시료의 경우 그람 음성세균의 비율은 감소하고 방선균이 우점하는 결과를 고려하면 단계 I은 원료에 존재하는 유해세균 사멸의 역할도 한다고 볼 수 있다.

발효가 진행되면서 나타나는 미생물 군집의 천이는 T-RF profile과 16S rRNA 유전자 염기서열 결과를 함께 비교하면 알 수 있다. 단계 I에서 관찰된 493–495 bp의 T-RF는 *Erwinia* 속으로 예상된다. 중온성 세균인 *Erwinia*는 발효과정을 거치며 우점하다 23일 50 cm 내부부터 서서히 사멸하는 것으로 보인다. 이와 반대로 160–165 bp는 23일 50 cm 시료에서 나타나 저온살균 전(40일) 시료에서 우점하였는데, 이는 *Amycolatopsis*의 T-RF로 예상되며 발효과정이 진행되면서 중온성 미생물에서 방선균으로 미생물 군집의 천이가 일어나는 것을 확인할 수 있다. 퇴비화 과정이 진행되면서 방선균은 중온성 세균을 대체하며 유기물을 분해하는데 중요한 역할을 한다(Allgaier *et al.*, 2010). 특히 셀룰로오즈, 헤미셀룰로오즈, 리그닌 등의 고분자 물질을 분해하는 능력이 탁월하다(Lacey, 1973; Ryckeboer *et al.*, 2003b; Tang *et al.*, 2007). 염기서열 분석결과, 방선균은 발효 전 참나무 톱밥에서는 발견되지 않았으나 발효 23일 50 cm 깊이의 톱밥 시료에서 40.9%, 1 m 깊이에서 12.9%를 차지하였고, 발효 마지막인 40일에서 분석된 염기서열의 89.8%로 가장 우점하였다. 발효과정에서 나타난 방선균 중 가장 우점한 세균은 *Amycolatopsis* 속에 포함되는 것으로 확인되었다. *Amycolatopsis* 속은 23일 50 cm 시료에서 36.4%, 저온살균전 시료(40일)에서 49.0%를 차지하며 우점하였다. *Amycolatopsis* 속은 호기성 세균으로 토양, 자연동굴, 해양 퇴적토, 식물, 의료용품 등의 다양한 환경에서 분리되었으며, 항생제와 같은 생활성 물질을 생산하는 산업활용 잠재력이 높은 세균 및 폴리에스터의 일종인 polylactide를 생분해하는 세균도 포함된다(Pranamuda *et al.*, 1997; Bala *et al.*, 2004). *Amycolatopsis* 속의 균주는 중온성 방선균과 고온성 방선균으로 구분되는데, 중온성의 경우 45°C 이상에서, 고온성의 경우 65°C 이상의 온도에서는 생장하지 못하는 특성을 갖고 있다(Goodfellow *et al.*, 2001). 발효 23일 시료에서 관찰된 *Amycolatopsis*의 대부분은 *A. pigmentata* (AB327254)와 유사한 세균으로 확인되었다. *A. pigmentata*는 토양에서 분리되었으며, 수용성 염료를 생산하는 특징을 갖는다. 25°C–37°C에서 성장하는 중온성 방선균으로 셀로바이오즈를 탄소원으로 이용할 수 있어 톱밥 배지에 포함된 난분해성 물질인 셀룰로오즈의 분해가 가능하여 톱밥 배지재료를 연화시킬 가능성이 있다(Tamura *et al.*, 2010). 23일에는 60°C에 가까운 온도가 유지되던 시점으로, 본 연구에서 확인된 *A. pigmentata* 유사세균은 보고된 세균과는 약간 다른 생장 특성을 가질 것이라고 생각된다. 40일에 우점한 *Amycolatopsis*는 본 연구를 통해 분리, 배양된 *Amycolatopsis* sp. OSD2와 가장 유사한 것으로 나타났다. *Amycolatopsis* sp. OSD2는 최적 생장온도가 40°C인 고온성 방선균이다. Yu 등(2007)은 쌀겨를 이용한 농업 폐기물 발효과정의 미생물 군집 변화를 quinone profile을 통해 관찰하였으며, 이때 리그닌을 분해하는 주요 미생물은 Q-9 (H2)을 주요 quinone 성분으로 하는 고온 방선균임을 보고하였다. 이와 같이 고온 방선균은 호기적 조건 및 높은 온도에서도 유기물을

분해할 수 있는, 퇴비화 과정에서 필요한 미생물 군집이다(Unaogu *et al.*, 1994; Lacey, 1997). *Amycolatopsis* sp. OSD2는 *A. pigmentata*에 비해 최적생장온도가 10°C 이상 높아 고온으로 유지되는 발효과정 동안에 참나무 톱밥 내부에서 생존이 가능하여 발효 마지막까지 관찰되었던 것으로 생각된다. *Amycolatopsis* 속은 퇴비화 과정에서 자주 보고되는 주요한 세균은 아니었지만, 고분자 물질 분해와 이차 대사물질(항생물질)을 생산하는 등의 특징을 고려하면, 본 연구에서 진행된 참나무 톱밥 배지의 발효에서 중요한 역할을 담당했을 것이라 생각된다. 고온 방선균에 포함되는 *Saccharopolyspora* 속은 40일 시료에서 26.5%를 차지하며 두번째로 우점하였다. 이 속은 곡물, 볏짚 등을 분해하는 능력은 탁월하나, 일부 종의 경우 폐 질환을 일으킬 수 있다는 단점이 있다(Duchaine *et al.*, 1999). 본 연구에서 우점한 *Saccharopolyspora rosea* (AM992060)의 경우도 기관지 암을 앓는 환자에서 분리된 바 있으므로(Yassin, 2009), 톱밥 발효과정의 주요 균주임에도 불구하고 실제 활용 가능성은 매우 낮다고 볼 수 있다.

발효 23일의 1 m 시료에서는 *Clostridium* 속이 군집의 80.6%를 차지하며 우점하였다. *Clostridium* 속은 내생포자를 갖는 그람 양성 절대 혐기성 세균으로 1 m 깊이의 경우 산소 농도가 낮아져 자연스럽게 혐기성 미생물인 *Clostridium*이 우점하게 된 것으로 생각된다. 일반적으로 셀룰로오즈나 리그닌과 같은 상대적으로 분해가 어려운 물질들을 이용하여 물질대사를 할 수 있는 것으로 알려져 있으므로(Partanen *et al.*, 2010) 참나무 톱밥의 혐기적 발효와 깊은 관련이 있는 세균으로 생각된다.

저온살균과 균사생장시기를 포함하는 단계 II는 병원균을 경쟁에서 도태되게 하고 퇴비의 분해를 촉진하면서 버섯의 균사와 공생할 수 있는 미생물을 허용하는 역할을 한다(Fergus, 1964). 톱밥 배지의 살균은 버섯 균사의 생장에 해를 입힐 수 있는 내부의 세균을 제거하고 배지를 연화시켜 균사가 잘 자라도록 하는데 그 목적이 있다(Koo *et al.*, 2012). 40일 시료와 저온살균 후(41일)의 세균군집 다양성 지수(H; Shannon-Weiner diversity index)와 우점도(D; Simpson dominance index)를 계산하였을 때 40일에서는 H=2.16, D=0.323였으나, 41일 시료에서는 H=0.37, D=0.904로 다양성 지수는 낮아지고 우점도 지수는 높아지는 것으로 나타났다. 이 결과는 저온살균의 효과를 간접적으로 증명할 수 있는 수치로, 65°C 저온살균을 거치며 방선균을 포함한 많은 미생물이 사멸되어 특정 군집만이 생존하였다는 것을 의미한다. 저온살균 후 나타난 T-RF 단편의 profile 중 140–145 bp는 *Bacillus*에서 유래된 것으로 예상되는데(Fig. 2), 이 단편은 혼합수에서도 관찰되었으며, 저온살균 후 시료의 16S rRNA 유전자 염기서열 분석결과 65°C에서도 성장이 가능하다고 알려진 *B. smithii* (Z26935) 유사 세균인 것으로 확인되었다. 내열성이고 포자를 형성하는 특징을 지닌 *Bacillus* 속(Nakamura *et al.*, 1988)의 경우는 저온살균의 영향을 받지 않은 것으로 생각된다. 따라서 저온살균을 통한 효율적인 톱밥 배지를 생산하기 위해서는 혼합수의 품질관리가 선행되어야 할 것이다.

저온살균 된 배지에 표고버섯 균사를 접종하고 성장시키는 균사성장시기에서 가장 중요한 것은 *Trichoderma* 등으로 인한 곰팡이 오염의 위험이 있다는 것이다(Badham, 1991). *Trichoderma* 속의 일부는 푸른곰팡이병을 유발하며 일반적으로 표고버섯 균사의 생장을 저해하고 자실체에 손상을 입힌다고 알려져 있다(Tokimoto and Komatsu, 1979). 따라서 유해균류에 의한 오염을 방지하는 길항작용의 효과를 갖는 세균에 관한 연구가 필요하다. 본 연구의 균사생장시기에서 가장 우점한 세균은 *Leuconostoc* 속이다. *Leuconostoc* 속은 통성혐기성이며 젖산발효균 혹은 김치발효균으로 널리 알려져 있고 포도당을 젖산이나 에탄올 등으로 발효할 수 있다. 특히, *Leuconostoc* 속의 일부 종은 식물 재료의 발효에 매우 중요한 역할을 한다고 보고되었으며, 5–37°C에서 생장이 가능하다(Kim *et al.*, 2000). 저온(18°C) 환경을 유지하는 표고균사 생장단계에서 톱밥배지는 *Leuconostoc* 속이 생장하기에 유리한 환경이라고 생각되며, 앞으로 *Leuconostoc* 속이 표고 균사생장시기에 기여하는 점에 대한 연구가 필요할 것이다.

Steger 등(2007)에 의하면 방선균 군집은 퇴비화의 마지막 단계에 존재하는 미생물 군집의 대부분을 구성하는 경우가 많아 퇴비의 성숙도를 결정하는 지표로서의 잠재력을 가지고 있다고 한다. 본 연구의 발효 마지막 단계에서도 미생물 군집의 약 90%가 방선균으로 이루어져 있었으며, 이로써 톱밥발효가 성공적으로 진행됐다는 것을 추측할 수 있었다. 그 중 *Amycolatopsis* 속의 경우 본 연구 이후에 진행된 2차 참나무 톱밥발효 실험에서도 가장 우점한 미생물 군집이었다(결과 미제시). 따라서 현재까지는 정확하게 알려진 바 없지만 참나무 톱밥 발효에 중요한 역할을 하는 세균임을 예상할 수 있다. 특히 발효 마지막(40일) 시료에서 *Amycolatopsis* 속과 유연관계가 있다고 확인된 염기서열은 본 연구에서 분리된 *Amycolatopsis* sp. OSD2와 가장 유사하였으므로 이 세균의 특성을 조사하여 발효과정에 이용한다면 효율적으로 참나무 톱밥발효를 통한 버섯 재배가 가능해질 것이라고 생각된다.

T-RFLP 방법은 저비용으로 많은 시료를 비교·분석할 수 있는 장점이 있지만 절편의 크기만으로 군집을 해석하는 한계점이 있기 때문에 본 연구에서는 16S rRNA 유전자 클론 라이

브러리의 염기서열을 추가로 분석하였다. 그러나 이 방식은 염기서열 분석에 소요되는 비용 때문에 클론의 수가 매우 제한적이라는 단점이 있다. 따라서 차후 연구에서는 톱밥 발효 과정의 미생물 군집 분석에 차세대 염기서열 분석방법을 적용하는 것이 바람직할 것으로 생각된다.

적 요

톱밥발효를 이용한 표고버섯의 지면재배방법은 적은 노동력을 소요하고 표고의 생산력을 증대시킬 수 있는 방법이다. 이 방법은 미생물에 의한 참나무 톱밥의 발효과정과 표고균사를 접종하고 생장시키는 과정의 두 단계로 나누어진다. 본 연구에서는 참나무 톱밥을 이용한 표고 지면재배과정의 각 단계에서 우점하는 주요 미생물을 확인하고 효율적인 표고버섯 재배를 위한 정보를 제공하고자 하였다. 발효과정이 진행되며 온도가 상승함에 따라 톱밥의 고온 세균의 비율은 10%에서 80%까지 증가하여 중온성 세균에서 고온성 세균으로 군집의 천이가 확인되었다. 16S rRNA 유전자를 이용한 T-RFLP 방법과 염기서열 분석 방법으로 참나무 톱밥 지면재배과정의 단계별 미생물 군집의 변화를 확인했다. 발효 전 참나무 톱밥 시료에서는 중온성 세균인 *Enterobacteriaceae* 과의 세균이 우점(100%)하였고, 발효가 진행되며 *Amycolatopsis* (49.0%), *Saccharopolyspora* (26.5%) 등의 고온성 방선균으로 미생물 군집의 천이가 발생되었다. 특히, *Amycolatopsis* 속이 최고온도가 유지되는 발효과정 중에도 항상 우점한 결과를 고려하면 발효를 주도하는 미생물이라고 생각된다. 균사생장시기에서는 저온성 세균인 *Leuconostoc*이 우점(75.0%)하였다. 표고 균사의 활발한 성장을 위해서는 참나무 톱밥의 발효과정이 매우 중요하기 때문에 발효과정에서 우점한 고온성 방선균인 *Amycolatopsis* 속에 관한 다양한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

감사의 말

본 연구는 2013년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비 지원에 의해 수행되었습니다.

References

Allgaier, M., Reddy, A., Park, J.I., Ivanova, N., D'Haeseleer, P., Lowry, S., Sapra, R., Hazen, T.C., Simmons, B.A., Vander Gheynst, J.S., *et al.* 2010. Targeted discovery of glycoside hydrolases from a switchgrass-adapted compost community. *PLoS One* **5**, 1-9.

Badham, E.R. 1991. Growth and competition between *Lentinus edodes* and *Trichoderma harzianum* on sawdust substrates. *Mycologia* **83**, 455-463.

Bala, S., Khanna, R., Dadhwal, M., Prabagaran, S.R., Shivaji, S., Cullum, J., and Lal, R. 2004. Reclassification of *Amycolatopsis mediterranei* DSM 46095 as *Amycolatopsis rifamycinica* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**, 1145-1149.

Chun, J., Huq, A., and Colwell, R.R. 1999. Analysis of 16S-23S rRNA intergenic spacer regions of *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 2202-2208.

Duchaine, C., Mériaux, A., Brochu, G., Bernard, K., and Cormier, Y. 1999. *Saccharopolyspora rectivirgula* from Quebec dairy barns: Application of simplified criteria for the identification of an agent responsible for farmer's lung disease. *J. Med. Microbiol.* **48**, 173-180.

Fergus, C.L. 1964. Thermophilic and thermotolerant molds and actinomycetes of mushrom compost during peak heating. *Mycol. Soc. Am.* **56**, 267-284.

Finstein, M.S., Miller, F.C., Strom, P.F., MacGregor, S.T., and Psarianos, K.M. 1983. Composting ecosystem management for waste treatment. *Bio. Technol.* **1**, 347-353.

Fode-vaughan, K.A., Wimpee, C.F., Remsen, C., and Lynne, M. 2001. Detection of bacteria in environmental samples by direct PCR without DNA extraction research report. *Biotechniques* **31**, 598-607.

Goodfellow, M., Kim, S.B., Minnikin, D.E., Whitehead, D., Zhou, Z.H., and Mattinson-Rose, A.D. 2001. *Amycolatopsis sacchari* sp. nov., a moderately thermophilic actinomycete isolated from vegetable matter. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**, 187-193.

Hong, J.S. 1980. Nutrition value and medicine efficacy of mushroom. *Food Ind.* **53**, 79-83.

Iiyama, K., Stone, B.A., and Macauley, B.J. 1994. Compositional changes in compost during composting and growth of *Agaricus bisporus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 1538-1546.

Jess, S., Murchie, A.K., and Bingham, J.F.W. 2007. Potential sources of sciarid and phorid infestations and implications for centralised phases I and II mushroom compost production. *Crop. Prot.* **26**, 455-464.

Kim, J., Chun, J., and Han, H.U. 2000. *Leuconostoc kimchii* sp. nov., a new species from kimchi. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**, 1915-1919.

Koo, C.D., Lee, H.Y., and Lee, G.Y. 2012. Effects of sterilization and cultivation temperatures of oak sawdust medium on *Lentinula edodes* hyphal growth. *J. Korean For. Soc.* **101**, 77-82.

Koo, C.D., Lee, S.J., and Lee, H.Y. 2013. Morphological characteristics of decomposition and browning of oak sawdust medium for ground bed cultivation of *Lentinula edodes*. *Korean J. Mycol.* **41**, 85-90.

Korea Forest Service. 2012. Statistical yearbook of forestry. **40**, 1−494.

Lacey, J. 1973. Actinomycetales: characteristics and practical Importance. pp. 231−251. *In* Sykes, G. and Skinner, F. (eds.), Academic Press, New York, USA.

Lacey, J. 1997. Actinomycetes in composts. *Ann. Agric. Environ. Med.* **4**, 113−121.

Lane, D.J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing, pp. 115−175. *In* Stackebrandt, E. and Goodfellow, M. (eds.), Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics. John Wiley & Sons, Chichester, England.

Lee, B., Bak, W., Ka, K., Yoon, K., and Ryu, S. 2007. Harmful microorganisms occurred on the bed-logs of several *Quercus* spp. for shiitake cultivation. *Korean J. Mycol.* **35**, 33−36.

Miller, D.N., Bryant, J.E., Madsen, E.L., and Ghiorse, W.C. 1999. Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 4715−4724.

Moore, D. and Chiu, S.W. 2001. Fungal products as food, pp. 1−17. *In* Pointing, S. and Hyde, K. (eds.), Bio-exploitation of filamentous fungi. Fungal Diversity press. Hong Kong, China.

Nakamura, L.K., Blumenstock, I., and Claus, D. 1988. Taxonomic study of *Bacillus coagulans* hammer 1915 with a proposal for *Bacillus smithii* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **38**, 63−73.

Park, K.S. and Lee, B.L. 1997. Extraction and separation of protein-bound polysaccharide by *Lentinus edodes*. *Korean J. Food Nutr*. **10**, 503−508.

Park, W.C., Yoon, G.H., Kim, S.C., and Hong, G.S. 2008. New cultivation technology for sustainable production of *Lentinula edodes*. pp. 307. National Forest Research Institute. Seoul, Korea.

Partanen, P., Hultman, J., Paulin, L., Auvinen, P., and Romantschuk, M. 2010. Bacterial diversity at different stages of the composting process. *BMC Microbiol.* **10**, 94.

Pranamuda, H., Tokiwa, Y., and Tanaka, H. 1997. Polylactide degradation by an *Amycolatopsis* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 1637−1640.

Prażmo, Z., Dutkiewicz, J., and Cholewa, G. 2000. Gram-negative bacteria associated with timber as a potential respiratory hazard for woodworkers. *Aerobiologia* **16**, 275−279.

Ryckeboer, J., Mergaert, J., Vaes, K., Klammer, S., Clercq, D., Coosemans, J., Insam, H., and Swings, J. 2003a. A survey of bacteria and fungi occurring during composting and self-heating processes. *Ann. Microbiol.* **53**, 349−410.

Ryckeboer, J., Mergaert, J., Coosemans, J., Deprins, K., and Swings, J. 2003b. Microbiological aspects of biowaste during composting in a monitored compost bin. *J. Appl. Microbiol.* **94**, 127−137.

Sánchez, C. 2004. Modern aspects of mushroom culture technology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **64**, 756−762.

Steger, K., Jarvis, Å., Vasara, T., Romantschuk, M., and Sundh, I. 2007. Effects of differing temperature management on development of Actinobacteria populations during composting. *Res. Microbiol.* **158**, 617−624.

Straatsma, G., Gerrits, J.P.G., Augustijn, M.P.A.M., Op Den Camp, H.J.M., Vogels, G.D., and Van Griensven, L.J.L.D. 1989. Population dynamics of *Scytalidium thermophilum* in Mushroom compost and stimulatory effects on growth rate and yield of *Agaricus bisporus*. *Microbiology* **135**, 751−759.

Straatsma, G., Olijnsma, T.W., Gerrits, J.P.G., Griensven, L.J.L.D., Samson, R.A., and Op Den Camp, H.J.M. 1995. Bioconversion of cereal straw into mushroom compost. *Can. J. Bot.* **73**, 1019−1024.

Tamura, T., Ishida, Y., Otoguro, M., and Suzuki, K.I. 2010. *Amycolatopsis helveola* sp. nov. and *Amycolatopsis pigmentata* sp. nov., isolated from soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **60**, 2629−2633.

Tamura, K., Stecher, G., Paterson, D., Filipski, A., and Kumar, S. 2013. Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* **30**, 2725−2729.

Tang, J.C., Shibata, A., Zhou, Q., and Katayama, A. 2007. Effect of temperature on reaction rate and microbial community in composting of cattle manure with rice straw. *J. Biosci. Bioeng.* **104**, 321−328.

Thompson, J.D., Higgins, D.G., and Gibson, T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**, 4673−4680.

Tokimoto, K. and Komatsu, M. 1979. Effect of carbon and nitrogen sources in media on the hyphal interference between *Lentinus edodes* and some species of *Trichoderma*. *Japanese J. Phytopathol.* **45**, 261−264.

Unaogu, I.C., Gugnani, H.C., and Lacey, J. 1994. Occurrence of thermophilic actinomycetes in natural substrates in Nigeria. *Antonie van Leeuwenhoek.* **65**, 1−5.

Yassin, A.F. 2009. *Saccharopolyspora rosea* sp. nov., isolated from a patient with bronchial carcinoma. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **59**, 1148−1152.

Yu, H., Zeng, G., Huang, H., Xi, X., Wang, R., Huang, D., Huang, G., and Li, J. 2007. Microbial community succession and lignocellulose degradation during agricultural waste composting. *Biodegradation* **18**, 793−802.