



으름덩굴 추출물 처리에 의한 꿀벌 노제마병 감염 억제

송현찬, 김혜경¹, 김기영*

경희대학교 생명공학대학원, ¹한국농수산대학 산업곤충학과

Prevention of *Nosema* Infection in *Trichoplusia ni* Cell Line Using *Akebia quinata* Extract

Hyunchan Song, Hye-kyung Kim¹ and Ki-Young Kim*

Graduate School of Biotechnology, Kyung Hee University, Yongin-si, Gyeonggi-do 17104, Republic of Korea
¹Department of Industrial Entomology, Korea National College of Agriculture and Fisheries, Jeonju-si, Jeollabuk-do 54874, Republic of Korea

Abstract

Nosemosis is a honeybee (*Apis mellifera*) disease resulting from the intake of *Nosema ceranae*, which recently became a major threat to honeybees. *N. ceranae* is a microsporidian, which acts like a parasite and remains as a spore until the infection, resulting in high management difficulty. Until today, cure and preventative candidates are barely established. In this study, the preventive activity of *Akebia quinata* extract against nosemosis was done using *Trichoplusia ni* cell line, BTI-TN5B1-4, as a substitute for the honey bee cell line. Normal *T. ni* cells exhibited a normal size with round shape. However, after *N. ceranae* were treated, some cells were abnormally enlarged due to *N. ceranae* infection. Also, a nucleus of those cells was barely observable under microscope. When *A. quinata* extract was treated with *N. ceranae*, those cells did not show such symptoms and most *N. ceranae* spores were observed outside of the cells. For practical use of *A. quinata* for nosemosis, an adequate concentration range to prevent nosemosis infection was determined. The lowest concentration where *A. quinata* had preventative effect was set as a minimum concentration and the concentration which *A. quinata* extracts had cytotoxicity in the insect cells was set as maximum concentration.

Keywords

Nosemosis, *Nosema ceranae*, *Apis mellifera*, Infection, *A. quinata*

서론

꿀벌(*Apis mellifera*)은 농업 및 과수업에 필수적인 뿐만 아니라 생태계 전체의 수분 매개자로서 매우 중요하다(Papa *et al.*, 2022). 생태계에서의 기여도를 고려할 때 그들의 경제적 가치는 2000년에는 146억 달러로 추정되었고(Morse and Calderone, 2000), 이후로도 꾸준히 증가하고 있는 추세이다(Khalifa *et al.*, 2021). 그러나 이 꿀벌은 현재 많은 병원체에 노출되었고 이로 인한 개체수의 감소

도 동시에 많이 일어나고 있다(Schatz *et al.*, 2021). 최근에는 그들의 군집이 사라지는 꿀벌군집붕괴현상(CCD)이 빈번하게 일어나고 있으며 이에 대한 연구가 활발히 진행 중이다(Evans *et al.*, 2009; Al-Solami *et al.*, 2022). CCD의 근본적인 원인은 아직 정확하게 알려지지 않았지만 노제마병이 여러가지 주요 원인 중 하나로 예상되고 이에 따라 연구되고 있다(Ellis *et al.*, 2010).

*Nosema ceranae*는 미포자충의 일종으로 노제마병을 유발하는 포자형성균이다(Fries, 2010). *N. ceranae*를 꿀벌이

섭취하게 되면 꿀벌의 중장 세포에 감염된다. 이후 숙주 내에서 완전히 성장할 때까지 증식하는데, 이로 인해 꿀벌의 대사가 급격히 변화하고(Mayack and Naug, 2009) 면역관련 유전자의 발현량이 증가한다(Marín-García *et al.*, 2022). 이 곰팡이는 꿀벌의 내장 세포에서 완전히 자라는데 약 5일이 소요되며, 15일이 지나면 꿀벌은 질병으로 인해 죽기 시작한다.

노제마병의 치료제나 예방법을 찾기 위해 많은 시도가 있었지만 현재까지도 그 결과물은 많지는 않다. Fumagillin의 경우 한때 노제마병을 방제하는 약으로 여겨졌으나, 최근 연구에 따르면 fumagillin은 *N. ceranae* 방제에 효과가 적을 수도 있으며 fumagillin 저항성이 증가된 *N. ceranae*가 보고되기도 하여 방제하기가 더 어려워졌다고 할 수 있다(Fenoy *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2013). 또한 fumagillin은 인간을 포함한 포유류에서 독성을 보이기 때문에 실사용에는 문제가 있을 수 있다(Van den Heever *et al.*, 2014). 이후 타임(*Thymus vulgaris*) 오일(Porrini *et al.*, 2017), 월계수(*Laurus nobilis*) 오일, 오레가노(*Origanum vulgare*) 오일 및 유칼립투스(*Eucalyptus* spp.) 오일 등에 대해서도 노제마병 방제 효능이 보고되기도 하였으나 아직까지도 그 수는 한정되어 있는 상황이다(Porrini *et al.*, 2011).

본 실험에서는 으름덩굴(*Akebia quinata*) 추출물의 노제마병 방제 효능을 확인하였다. 실험에는 꿀벌 세포주가 아직 발견되지 않았기 때문에 꿀벌의 대안으로 곤충 세포 중 하나인 *Trichoplusia ni* 세포주인 BTI-TN5B1-4를 사용하였다(Fries, 1988; Song *et al.*, 2019). *A. quinata*를 처리한 세포는 *N. ceranae*를 함께 처리했음에도 불구하고 nosemosis 증상을 보이지 않았다. 추가적으로, *A. quinata* 추출물 처리 시 세포 독성이 없고 방제 효능을 잃지 않는 범위를 확인하였다.

재료 및 방법

1. 시료 준비

A. quinata (제주, 대한민국)는 증류수를 이용하여 3회 세척하였으며 동결 건조하였다. 그중 100 g을 실온에서 1 L의 80% 에탄올에 24시간 동안 추출을 진행하였다. 용매는 50°C에서 저온 항온 순환 수조(Jeio Tech, Korea)에

연결된 회전 농축기(EYELA, Japan)를 사용하여 농축을 진행하였고 이후 농축액은 다시 동결건조하여 시료를 준비하였다. 또한 시료는 DMSO에 10 mg/mL로 녹여져 실험에 사용되었다.

2. *Nosema ceranae* 포자 준비

실험에 사용된 병원균인 *N. ceranae*는 한국 농촌진흥청에서 노제마병 감염 꿀벌로 전달받았다. 감염된 꿀벌의 내장 조직을 200 µL의 증류수에서 균질화하였고 초기 *N. ceranae* 포자 현탁액을 얻었다. 포자의 정제를 위하여 25%, 50%, 75%, 90% Percoll을 사용하여 정제했다(Ge healthcare, USA) (Kim *et al.*, 2017). 포자 농도는 혈구 세포계를 사용하여 계산되었으며, 이후 50% 설탕용액과 포자를 혼합하여 20,000개의 spores/µL의 포자용액을 만들었다.

신생 꿀벌에 *N. ceranae* 포자를 주입하고(Milbrath *et al.*, 2013), 꿀벌이 태어난 후 2시간 동안 단식시킨 다음 3 µL *N. ceranae* 포자용액을 제공하였다(Malone and Stefanovic, 1999). 꿀벌들은 25°C, 24시간 중 명조건 16시간, 암조건 8시간을 유지하며 사육했다. 14일간 사육 후 꿀벌들은 추후 포자를 다시 얻을 때까지 -70°C에 보관하였다.

3. *Trichoplusia ni* 세포 준비

실험에 사용한 세포는 *Trichoplusia ni*인 BTI-Tn-5B1-4를 사용하였다. 이는 *N. ceranae*에 감염될 수 있다고 알려져 있다(Gisder *et al.*, 2010). 이 곤충 세포는 27°C, Glutamine (Gibco, USA)가 포함된 Express Five™ SFM (Gibco, USA)에서 키웠다.

4. 포자 처리 및 효능 확인

6-well plate에 2 mL씩 하루 동안 키운 BTI-Tn-5B1-4 세포에 10⁴ *N. ceranae* spores/mL가 되도록 처리를 하였고 *A. quinata* 추출물을 100 µg/mL의 농도로 처리하여 그 효능을 확인하였다. 대조군으로는 포자를 처리하지 않은 세포와 물질을 처리하지 않고 포자만을 처리한 세포를 사용하였다. 그리고 감염을 확인하기 쉽도록 처리를 한 지 5일 후에 관찰을 하였다. 각 well에 있는 모든 세포들 중 감염이 되었다고 확인된 세포들의 수를 확인하였다.

적정 농도를 확인하기 위해 *A. quinata* 추출물을 800 µg/

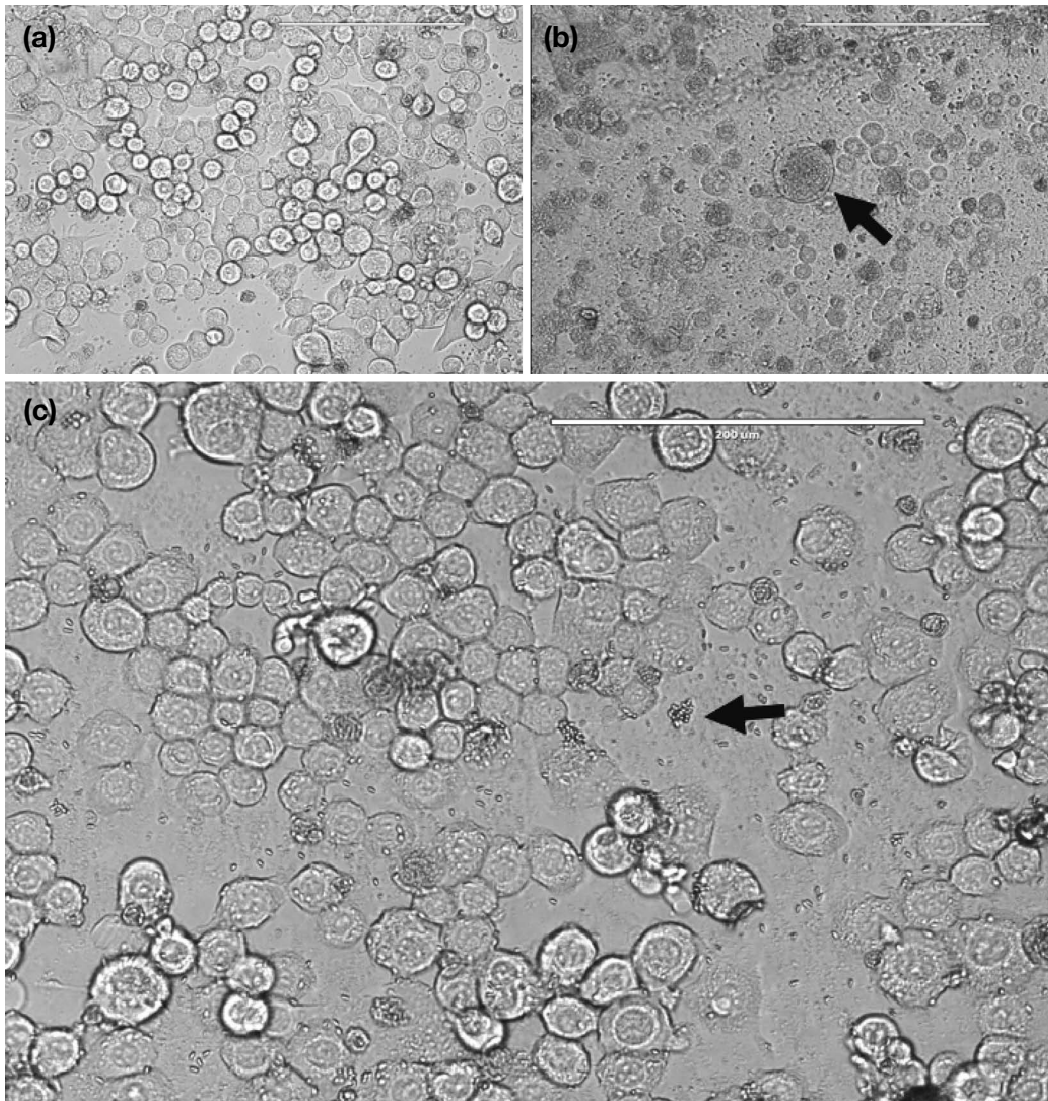


Fig. 1. Microscopic image of BTI-TN5B1-4 cells without any treatment. (a) Microscopic image of BTI-TN5B1-4 cells without any treatment. Cells were circular and had similar size with the exception of few cells. (b) Microscopic image of BTI-TN5B1-4 cells treated only with *N. ceranae*. Cells were shrunken and some cells were enlarged abnormally compared to normal cells. The arrow indicates the abnormal cells. (c) Microscopic image of BTI-TN5B1-4 cells treated with *N. ceranae* and *A. quinata*. *A. quinata* extract were treated at concentration of 100 µg/mL and most of the cells remained uninfected and normal. The arrow indicates the spore of *N. ceranae*.

mL부터 2배씩 감소시키며 물질을 처리하였다. 5일 후 현미경을 이용하여 감염 여부를 확인하였고 그 특징을 기준으로 추출물의 세포 독성과 효능을 확인하였다.

결 과

1. *A. quinata* 추출물의 노제마병 방제 효능 확인

대조군으로 사용한 세포 중 어떠한 처리도 하지 않은 BTI-TN5B1-4 세포의 경우 전체적으로 원형의 모양을 보

였다(Fig. 1a). 비정상적으로 커지는 세포는 없었고 일관성 있는 세포의 크기를 보였다. 그리고 대부분의 세포핵이 선명하게 보였다. 일부 세포에서만 특이적으로 길어진 모양을 보이는 경우도 있었지만 이는 5일 동안 배양을 하여 생긴 것으로 본래의 모양이나 크기는 아니었다. 다른 대조군인 *N. ceranae*만 처리한 BTI-TN5B1-4 세포에서는 정상 세포에 비해 수축된 세포 모양을 보였고 일부는 비정상적으로 비대해졌다(Fig. 1b). 이러한 현상은 아무것도 처리하지 않은 세포에 비해 그 수가 많았으며 일반 세포에 비해 비대해진 세포는 핵이 명확하지 않고 세포 내부에서도

*N. ceranae*의 포자가 많이 발견된다. 한편, *N. ceranae* 및 *A. quinata* 추출물 100 µg/mL를 처리한 BTI-TN5B1-4 세포는 아무것도 처리하지 않은 대조군과 유사한 세포 모양과 크기, 또 그러한 경향이 보였다(Fig. 1c). 전체적으로 일반 세포와 비슷한 경향을 보였고 대부분의 *N. ceranae* 포자는 세포 외부에서만 발견되었다.

2. *A. quinata* 추출물의 처리 적정 농도

A. quinata 추출물의 적정 농도의 범위를 찾기 위해 초기 처리 농도인 100 µg/mL보다 낮추거나 높여 효능을 확인하였다(Fig. 2). 100 µg/mL와 그 이상의 농도에서는 *A. quinata* 추출물이 BTI-TN5B1-4에서 *N. ceranae* 방제 효능을 보였다. 하지만 그 이하의 농도에서는 감염된 세포들이 관찰되었으며 50 µg/mL의 경우 감염된 세포의 수는 감소

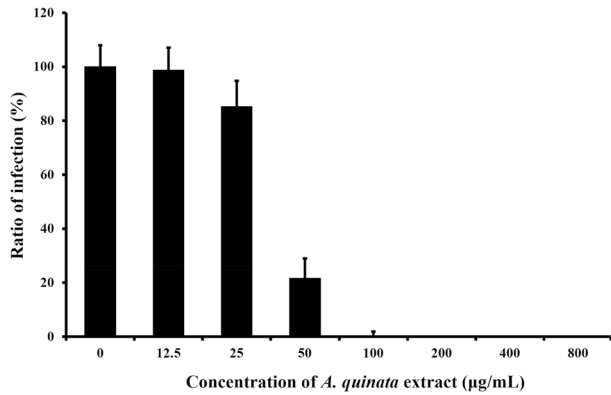


Fig. 2. Infection rate of samples to control. Control indicates BTI-TN5B1-4 cells with *N. ceranae* treatment and without *A. quinata* extract treatment. Infection rate of the control were set as 100%.

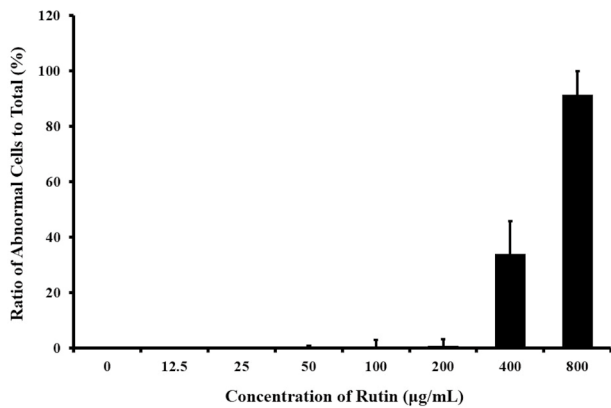


Fig. 3. Cytotoxicity of the extract on BTI-TN5B1-4 cells. Control indicates BTI-TN5B1-4 cells with without any treatment.

하였으나 뚜렷한 방제 효능보다는 미세한 억제 효능만 있었다. 또한 50 µg/mL 미만의 농도에서는 추출물을 처리하지 않는 세포들과 비슷하게 방제 효능이 전혀 보이지 않았다. 이를 통해 100 µg/mL 이상의 농도에서만 추출물의 노제마병 방제 효과가 있었으며 그 이하에서는 노제마병에는 효과가 없음을 확인하였다.

세포 독성이 없는 최고 농도를 찾기 위해 추출물을 800 µg/mL로부터 12.5 µg/mL까지 절반씩 희석하였다(Fig. 3). 이러한 방법으로 추출물을 처리하였을 때, 200 µg/mL까지는 추출물이 노제마병 방제 효능을 보임과 동시에 어떠한 세포 독성도 나타내지 않았다. 하지만 200 µg/mL 이상의 농도에서는 *A. quinata* 추출물이 BTI-TN5B1-4 세포에 대해 세포 독성을 보였다. 이를 통해 *A. quinata* 추출물의 노제마병 방제약으로 사용 시 100 µg/mL에서 200 µg/mL 사이의 농도로 사용해야 함을 확인하였다. 그 범위보다 적을 경우 효능을 갖지 못하고 그 이상인 경우 추출물이 독성을 보이게 된다.

고 찰

본 연구를 통해 노제마병 방제에 도움이 될 수 있는 식물 추출물을 제시하였다. *A. quinata* 추출물이 *N. ceranae*의 감염 방제 효능을 가졌음을 확인하였다. *A. quinata* 추출물을 처리한 세포는 5일 후에도 *N. ceranae*에 감염되지 않는 것으로 나타났으며, 이는 세포에 추출물을 처리하였을 때 감염 없이 일반 세포와 같은 모습으로 포자에 대해 저항성을 갖는 것으로 보인다. 이로 인해 *N. ceranae* 포자는 세포 내에 침입하지 못하고 그 주위에서만 관찰되었다.

노제마병이 최근 지속적으로 꿀벌 개체수 감소의 원인으로 지목되는 만큼 *A. quinata* 추출물의 노제마 방제약으로서 적정 농도도 본 연구에서 확인하였다. 식물 추출물 처리시 적정 농도보다 낮은 경우 효능이 없다는 문제가 있으며 너무 높은 농도에서는 식물 추출물의 일부 물질들에 의해 동물세포에서 세포 독성을 갖게 되어 감염과는 별개로 세포에 악영향을 미친다. *A. quinata* 추출물의 경우 100 µg/mL 미만의 농도에서는 방제 효능이 없었다. 이는 해당 추출물을 실사용할 경우 100 µg/mL 근처의 농도로 사용해야 하며 너무 낮은 경우 효과를 볼 수 없다는 것을 의미한다. 반대로 200 µg/mL 초과인 농도로 추출물을 처리하였을 때 세포수준에서 세포 독성을 보여 실제로 적용 시 200

µg/mL 이하의 농도에서 처리하는 것이 꿀벌 개체에 문제 없이 방제 효능을 가질 수 있음을 의미한다.

*A. quinata*는 최근 미국을 포함한 많은 서방 국가에서 생태계 혼란종으로 간주되고 있고 동아시아에는 이미 풍부하게 존재한다(Brunel *et al.*, 2010). 이는 *A. quinata*를 노제마병 방제에 사용할 시, 서양에서는 토종 식물을 지킬 수 있다는 장점이 있고, 동아시아에서는 이미 풍부한 자원을 경제적인 이익을 창출 할 수 있어 효율적인 해결책으로 제시할 수 있다.

감사의 글

위 연구는 농촌진흥청 PJ015763의 지원을 받아 진행되었다.

인용 문헌

- Al-Solami, H. M., N. A. Alkenani, A. G. Alghamdi, M. M. M. Ahmed, K. Javeed and S.A. Dar. 2022. Influence and Management of Colony Collapse Disorder (CCD) Damaging European Honeybee *Apis mellifera*. *Spec. Ugdym*. 2(43): 3117-3130.
- Brunel, S., G. Schrader, G. Brundu and G. Fried. 2010. Emerging invasive alien plants for the Mediterranean Basin. *EPPPO Bulletin* 40(2): 219-238.
- Ellis, J. D., J. D. Evans and J. Pettis. 2010. Colony losses, managed colony population decline, and Colony Collapse Disorder in the United States. *J. Apic. Res.* 49(1): 134-136.
- Evans, J. D., C. Saegerman, C. Mullin, E. Haubruge, B. K. Nguyen, M. Frazier, J. Frazier, D. Cox-Foster, Y. Chen, R. Underwood, D. R. Tarpy and J. S. Pettis. 2009. Colony collapse disorder: a descriptive study. *PLoS One* 4(8): e6481.
- Fenoy, S., C. Rueda, M. Higes, R. Martín-Hernández and C. Del Aguila. 2009. High-level resistance of *Nosema ceranae*, a parasite of the honeybee, to temperature and desiccation. *Appl. Environ. Microbiol.* 75(21): 6886-6889.
- Fries, I. 2010. *Nosema ceranae* in European honey bees (*Apis mellifera*). *J. Invertebr. Pathol.* 103: S73-S79.
- Fries, I. 1988. Infectivity and multiplication of *Nosema apis* Z. in the ventriculus of the honey bee. *Apidologie* 19(3): 319-328.
- Gisder, S., K. Hedtke, N. Moöckel, M. C. Frielitz, A. Linde and E. Genersch. 2010. Five-year cohort study of *Nosema* spp. in Germany: does climate shape virulence and assertiveness of *Nosema ceranae*?. *Appl. Environ. Microbiol.* 76(9): 3032-3038.
- Huang, W. F., L. F. Solter, P. M. Yau and B. S. Imai. 2013. *Nosema ceranae* escapes fumagillin control in honey bees. *PLoS Pathog.* 9(3): e1003185.
- Khalifa, S. A., E. H. Elshafiey, A. A. Shetaia, A. A. A. El-Wahed, A. F. Algethami, S. G. Musharraf, M. F. AlAjmi, C. Zhao, S. H. Masry, M. M. Abdel-Daim and M. F. Halabi. 2021. Overview of bee pollination and its economic value for crop production. *Insects* 12(8): 688.
- Kim, D. J., H. G. Yun, I. H. Kim, W. S. Gwak and S. D. Woo. 2017. Efficient Method for the Rapid Purification of *Nosema ceranae* Spores. *Mycobiology* 45(3): 204-208.
- Malone, L. A. and D. Stefanovic. 1999. Comparison of the responses of two races of honeybees to infection with *Nosema apis* Zander. *Apidologie* 30(5): 375-382.
- Marín-García, P. J., Y. Peyre, A. E. Ahuir-Baraja, M. M. Garrigo and L. Llobat. 2022. The role of *Nosema ceranae* (Microsporidia: Nosematidae) in honey bee colony losses and current insights on treatment. *Vet. Sci.* 9(3): 130.
- Mayack, C. and D. Naug. 2009. Energetic stress in the honeybee *Apis mellifera* from *Nosema ceranae* infection. *J. Invertebr. Pathol.* 100(3): 185-188.
- Milbrath, M. O., X. Xie and Z. Y. Huang. 2013. *Nosema ceranae* induced mortality in honey bees (*Apis mellifera*) depends on infection methods. *J. Invertebr. Pathol.* 114(1): 42-44.
- Morse, R. A. and N. W. Calderone. 2000. The value of honey bees as pollinators of US crops in 2000. *Bee Culture* 128(3): 1-15.
- Papa, G., R. Maier, A. Durazzo, M. Lucarini, I. K. Karabagias, M. Plutino, E. Bianchetto, R. Aromolo, G. Pignatti, A. Ambrogio and M. Pellicchia. 2022. The honey bee *Apis mellifera*: An insect at the interface between human and ecosystem health. *Biology* 11(2): 233.
- Porrini, M. P., N. J. Fernández, P. M. Garrido, L. B. Gende, S. K. Medici and M. J. Eguaras. 2011. In vivo evaluation of antiparasitic activity of plant extracts on *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Apidologie* 42: 700-707.
- Porrini, M. P., P. M. Garrido, L. B. Gende, C. Rossini, L. Hermida, J. A. Marcángeli and M. J. Eguaras. 2017. Oral administration of essential oils and main components: Study on honey bee survival and *Nosema ceranae* development. *J. Apic. Res.* 56(5): 616-624.
- Schatz, B., D. Maxime, H. Mickael, G. Benoît, A. Fabrice, S. Colette, G. Maxence and M. Denis. 2021. Pollinator conservation in the context of global changes with a focus on France and Belgium. *Acta Oecol.* 112: 103765.
- Song, H., H. Kim and K. Y. Kim. 2019. Anti-Parasitic Activity of *Lespedeza cuneata* Extract on Causative Agent of Nosemosis Type C, *Nosema ceranae*. *J. Apic.* 34(2): 137-140.
- Van den Heever, J. P., T. S. Thompson, J. M. Curtis, A. Ibrahim and S. F. Pernal. 2014. Fumagillin: An overview of recent scientific advances and their significance for apiculture. *J. Agric. Food Chem.* 62(13): 2728-2737.