



루틴의 처리에 의한 꿀벌 노제마병 방제 효능

송현찬, 김혜경¹, 김기영*

경희대학교 생명공학대학원, ¹한국농수산대학 산업곤충학과

The Use of Rutin Extract as a Nosemosis Prevention Caused by *Nosema ceranae*

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

Nosema ceranae is a causative agent of nosemosis. It has been considered as a great threat to honeybees for some decade. We performed an experiment on antiparasitic activity of rutin using *Trichoplusia ni* cell line, BTI-TN5B1-4, which was used as a substitute for stable honeybee cell line. Without addition of any parasite, BTI-TN5B1-4 cells had consistent size with round shape. However, when spores of *N. ceranae* were treated on BTI-TN5B1-4, some cells exhibited its nosemosis with abnormally enlarged size and some spores were found inside or around the cells. When rutin was treated on BTI-TN5B1-4 cells, cells did not show those symptoms with or without spores. Even compared to normal BTI-TN5B1-4 cells, there was no big difference. Most *N. ceranae* spores were found outside of the cells. Concentration ranges with efficient antiparasitic activity of rutin were measured. The lowest concentration at which no symptoms of nosemosis were observed was 12.5 µg/mL. At lower concentrations, visibly enlarged cells were began to appear. Since all concentrations higher than 12.5 µg/mL had great antiparasitic activity, the highest concentration was determined with the objective of ensuring safe use of rutin. Concentrations below 100 µg/mL did not show any toxicity on BTI-TN5B1-4 cells, while concentrations over 200 µg/mL had a negative effect on the cells.

Keywords

Nosemosis, *Nosema ceranae*, *Apis mellifera*, Infection, Rutin

서론

꿀벌(*Apis mellifera*)은 농업, 과수업뿐만이 아니라 생태계 전체에서 꼭 필요한 존재이다. 작물들의 수분에 큰 기여를 하기 때문에 그 중요성은 계속 강조되었고 그 가치도 증가해왔다(Papa *et al.*, 2022). 또한 꿀벌을 통해 얻는 경제적 이익은 2000년도에는 146억 달러로 추정되었고(Morse and Calderone, 2000) 현재까지도 꾸준히 증가하고 있다(Khalifa *et al.*, 2021). 하지만 벌들은 지속적으로

여러 가지 병원체에 노출되었고 그로 인해 꿀벌 개체수는 급격히 감소했다(Schatz *et al.*, 2021). 병원체의 경우에도 항생제 내성균이 증가하면서 벌들이 받는 위협은 크게 증가했다(Fenoy, 2009; Huang *et al.*, 2013). 이로 인하여 그와 관련된 산업들이 큰 타격을 받았고 생태계에도 많은 문제가 야기되고 있다. 꿀벌과 관련된 병원체의 예로는 꿀벌 성충에서 노제마병을 일으키는 *Nosema ceranae*나, 꿀벌 유충에서 미국부저병을 일으키는 *Paenibacillus larvae* (Ebeling *et al.*, 2016), 백묵병을 일으키는 *Ascospaera*

apis (Gilliam, 1990) 등이 있다.

그중 *N. ceranae*는 미포자충목에 속했으며, 꿀벌에서 노제마병을 일으키는 원인균이다(Fries, 2010). *N. ceranae*는 꿀벌의 먹이과정에서 꿀벌 성충내부로 들어와 소화기 및 부속기에 감염되어 기생한다. 장에 들어온 *N. ceranae*의 포자가 발아하면 노제마병이 감염된다(Mayack and Naug, 2009; Marín-García *et al.*, 2022). 발아한 지 4~5일이 지나면 포자가 다시 나와 주변 세포를 감염시킨다. 이 과정이 반복되면 꿀벌의 소화기는 제 기능을 하지 못하게 되고, 이로 인해 결국 꿀벌은 죽게 된다.

노제마병을 방제를 하기 위한 연구자들의 노력은 많았으나, 그 노력에 비해 효능이 있는 화학물질의 수는 한정적이다. Fumagillin은 현재까지 몇 안되는 노제마병 방제 화학물로 알려져 있었다(Katznelson and Jamieson, 1952). 하지만 시간이 지나면서 fumagillin에 저항성을 갖는 *N. ceranae*가 나타나 방제하기 어려워졌다(Fenoy *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2013). 또한 노제마병을 방제할 수 있는 물질들이 적어 여러 물질들의 시너지 효과를 확인하기도 어려운 상황이다(Azevedo *et al.*, 2015). 만약 여러 화학물질들을 섞어 시너지 효과를 볼 수 있다면 물질에 저항성을 갖는 포자들에게도 효과적으로 적용할 수 있다(Azevedo *et al.*, 2015).

루틴은 여러 식물에서 발견되는 물질이다(Hosseinzadeh and Nassiri-Asl, 2014). 이는 많은 식물의 대사 경로 중 페닐알라닌에서 4-coumaroyl-CoA로 변환될 때의 결과물로 생산되기 때문에 쉽게 얻을 수 있다(Li *et al.*, 2014). 이미 루틴은 항산화물질로, 여러 질병에 도움이 된다고 알려져 있다(Sharma *et al.*, 2013). 본 실험에서는 루틴의 노제마병 방제 효능을 확인하였다. 제외 실험을 위해 *N. ceranae*에 감염되는 *Trichoplusia ni* 세포주인 BTI-TN5B1-4를 사용하였다(Fries, 1988; Song *et al.*, 2019). 루틴을 처리한 세포는 *N. ceranae* 포자 처리와는 별개로 같은 모양을 하고 있었으며 노제마병의 증상을 보이지 않았다. 또한 세포 독성이 없고 방제 효능을 잃지 않는 범위를 확인하였다.

재료 및 방법

1. 시료 준비

루틴 (ChemFaces, China, CAS: 153-18-4) (Fig. 1a)을 DMSO에 10 mg/mL의 농도로 용해시켰다. 이는 사용 전까

지 -20°C 에서 보관하였다.

2. *Nosema ceranae* 포자 준비

실험에서 사용된 *N. ceranae*는 한국 농촌진흥청으로부터 감염 꿀벌 형태로 위탁된 것으로, 노제마병에 걸린 지 14일 된 꿀벌 성충을 받아 사용하였다.

정제된 *N. ceranae*를 얻기 위하여 감염 꿀벌 성충의 장을 뽑아 증류수를 사용하여 섞어주었다. 충분히 깨질 수 있도록 균질화하였고, 이후 5분간 400r pm으로 원심분리를 하고 상층액을 버려 큰 불순물들을 제거하여 초기 *N. ceranae* 포자 현탁액을 얻었다. 얻은 *N. ceranae* 포자는 500 μL 의 증류수에 섞어주었다. 포자의 정제를 위하여 25%, 50%, 75%, 90%의 불연속으로 쌓인 Percoll (Cytiva, USA) (Kim *et al.*, 2017) 위에 초기 *N. ceranae* 포자 현탁액을 올려 15,000 $\times g$ 로 30분간 원심분리하였다. 포자 농도는 혈구 세포계를 사용하여 계산되었으며, 이후 50% 설탕용액과 포자를 섞어 20,000개의 spores/ μL 의 포자용액을 만들었다.

꿀벌이 태어난 후 2시간 동안 단식시킨 다음 3 μL *N. ceranae* 포자용액을 제공하였다 (Malone and Stefanovic, 1999; Milbrath *et al.*, 2013) 꿀벌들은 25°C , 24시간 중 명 조건 16시간, 암조건 8시간을 유지하며 사육했다. 14일간 사육 후 꿀벌들은 추후 포자를 다시 얻을 때까지 -70°C 에 보관하였다. 이후 실험을 해당 꿀벌들로부터 같은 *N. ceranae* 포자를 얻어 사용하였다.

3. *Trichoplusia ni* 세포 준비

T. ni 세포주 BTI-Tn-5B1-4를 사용하였고, 이는 *N. ceranae*에 감염될 수 있다고 알려져 있다(Gisder *et al.*, 2010). 해당 세포는 27°C 에서 Glutamine (Gibco, USA)가 포함된 Express FiveTM SFM (Gibco, USA)을 사용하여 키웠다.

4. 포자 처리 및 효능 확인

BTI-Tn-5B1-4 세포는 6-well plate에서 하루 동안 키운 다음 루틴을 처리하였다. 아무것도 처리하지 않는 대조군을 제외한 나머지 세포에 10^4 *N. ceranae* spores/mL가 되도록 처리를 하였고 루틴을 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리를 하였다. 결과 확인을 위하여 루틴을 처리하지 않은 대조군과 루틴과 *N. ceranae* 모두 처리하지 않은 대조군을 사용하였다. 노제마병의 발병을 확인하기 쉽도록 처리를 한 지 5일

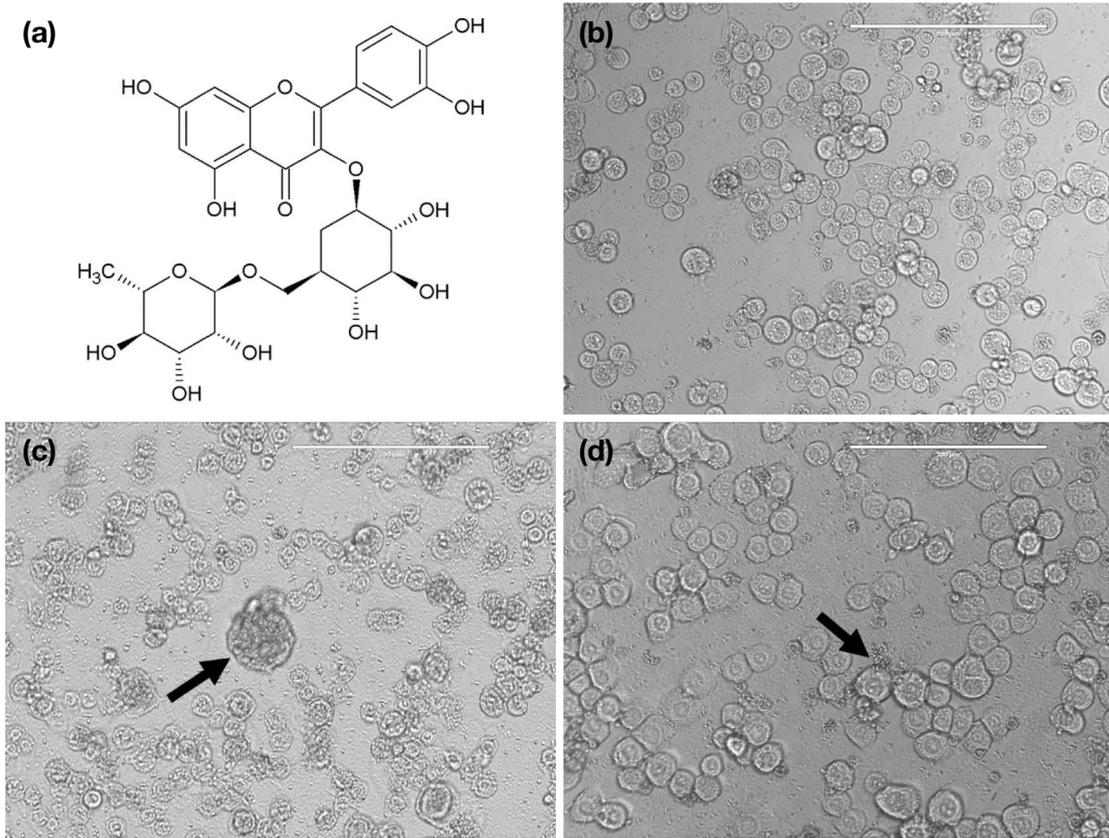


Fig. 1. The use of rutin as a preventive nosemosis compound. (a) Chemical structure of rutin. (b) Microscopic image of BTI-TN5B1-4 cells without any treatment. Most of the cells had usual shape and size. (c) Microscopic image of BTI-TN5B1-4 cells treated only with *N. ceranae*. Some cells were enlarged abnormally compared to normal cells and the spores were observed inside the cells. The arrow indicates an abnormal cell caused by nosemosis. (d) Microscopic image of BTI-TN5B1-4 cells treated with *N. ceranae* and rutin. Rutin was treated at concentration of 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and most of the cells remained uninfected and normal. The arrow indicates the spore which could not enter the cells.

후에 관찰을 하였다.

루틴이 세포 독성을 띠지 않고 *N. ceranae* 방제에 효과적인 때의 농도를 찾았다. 세포 독성을 보이기 시작하는 농도를 찾기 위하여 96-well plate에서 본래의 농도인 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 부터 두 배씩 늘려가며 확인하였다. 또한 *N. ceranae* 방제에 효과적인 최소 농도의 범위를 확인하기 위해 96-well plate에서 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 보다 두 배 높은 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 부터 절반씩 줄여가며 확인하였다. 이후 plate의 각 well에 있는 전체 세포 모양과 크기를 확인하여 일정 기준을 벗어난 세포들의 수를 측정하였다.

결 과

1. 루틴의 노제마병 방제 효능 확인

아무것도 처리하지 않은 세포, *N. ceranae*만 처리한 세

포를 두 대조군으로 두었고 루틴과 *N. ceranae*를 함께 처리한 세포를 비교하였다. 먼저 아무것도 처리하지 않은 정상 BTI-TN5B1-4 세포의 경우 극히 일부를 제외하고는 크기가 서로 다르지 않고 원형의 모양을 보였다(Fig. 1b). 이에 해당하지 않는 일부 세포는 특이적으로 길어진 세포들이 있었으나 이 경우는 5일 동안 배양을 하여 생긴 것으로 어느 세포에서나 발견될 수 있는 모습이었다. 나머지 대조군인 *N. ceranae*만 처리한 BTI-TN5B1-4 세포의 경우 아무것도 처리하지 않은 대조군에 비해 세포의 크기들이 비정상적으로 커지거나, 반대로 세포에 문제가 생겨 수축된 모습도 있었다(Fig. 1c). 정상적인 모습에 비해 비정상적인 모습이 많은 것은 해당 대조군의 특징이었으며 추가적으로 세포의 핵이 명확하지 않다는 특징도 있었다. 또한 일부 세포에서는 세포 외부가 아닌 세포 내부에서도 *N. ceranae*의 포자를 확인할 수 있었다. 마지막으로, *N. ceranae* 포자와 루틴을 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 를 처리한 BTI-TN5B1-4

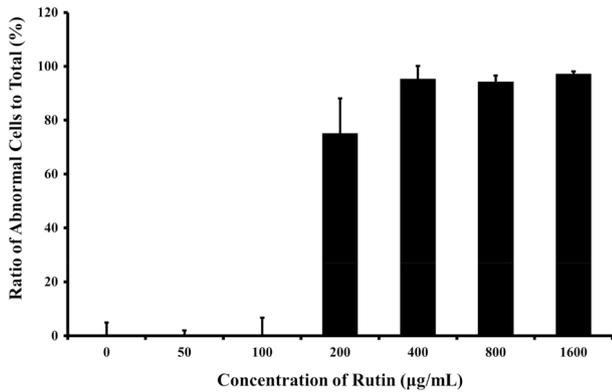


Fig. 2. High rutin treatment abnormally altered phenotypes of BTI-TN5B1-4 cells. Various concentration of rutin were treated on BTI-TN5B1-4 cells. Concentrations over 200 µg/mL showed abnormally shrunk BTI-TN5B1-4 cells.

세포는 아무것도 처리하지 않은 첫 번째 대조군과 유사한 세포 모양과 크기였다(Fig. 1d). 이들은 전체적으로 일반 세포와 큰 차이가 없었고 *N. ceranae* 포자는 세포 내부에 없고 외부에서만 확인되었다.

2. 루틴의 노제마병 방제 처리 적정 농도 확인

루틴의 노제마병에 효능을 확인 후 루틴이 세포 독성을 띠지 않고 *N. ceranae* 방제에 효과적일 때의 농도를 확인하였다. 세포 독성을 보이기 시작하는 농도를 찾기 위하여 본래의 농도인 50 µg/mL에서 두 배씩 늘려가며 확인한 결과 100 µg/mL까지는 세포 독성을 보이지 않았다. 하지만 200 µg/mL보다 높은 경우 반 이상의 세포가 죽거나 세포의 모양이 비정상적으로 변하기 시작하였다. 특히 400 µg/mL 이상에서는 거의 모든 세포에 대해 루틴이 세포 독성을 보였다. 또한 200 µg/mL 이상의 농도에서는 세포 수도 줄어드는 것을 확인하였다(Fig. 2).

*N. ceranae*에 감염되지 않는 최소 농도를 확인하기 위해 50 µg/mL에서 절반씩 줄여가며 확인하였다. 12.5 µg/mL까지 줄였을 때는 효능이 유지되었고 세포의 모양도 일정하게 정상적인 모양을 보였다. 하지만 6.25 µg/mL보다 더 낮은 농도로 루틴을 처리한 경우 노제마병 방제 효능이 보이지 않았다. 대부분의 세포들은 감염되어 있는 세포들이 많이 관찰되었으며 루틴을 처리하지 않은 모습과 비슷하였다(Fig. 3).

그러므로 노제마병을 방제하기 위한 루틴의 적정 농도는 12.5~100 µg/mL라 할 수 있다.

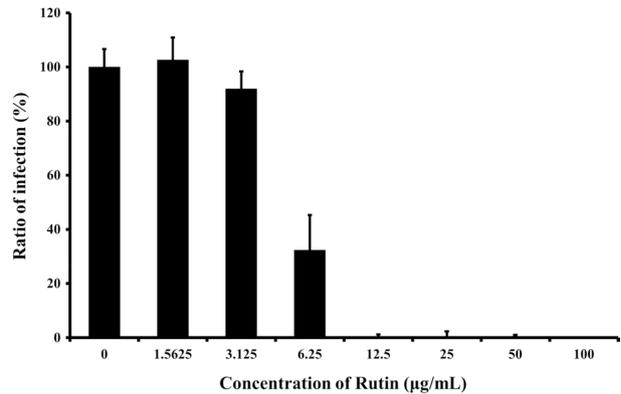


Fig. 3. Rutin effectively prevented the infection of nosemosis even at 12.5 µg/mL. The percentage of infected BTI-TN5B1-4 cells was determined at different concentrations of rutin. Rutin effectively prevented *N. ceranae* infection up to a concentration of 12.5 µg/mL. The infection rate of the control was set at 100%.

고 찰

본 연구에서는 식물에서 쉽게 찾을 수 있고 항산화물질로 알려진 루틴을 노제마병 방제에 사용할 수 있음을 제시하였다. 루틴은 *N. ceranae*의 감염을 막는 것을 확인하였다.

N. ceranae 포자에 의해 노제마병에 걸린 세포들의 경우 일반 세포와는 달리 세포 내부에 포자가 관측되었고 세포의 모양과 크기도 정상적인 세포와는 달랐다. 하지만 루틴의 노제마병 방제 효능을 확인한 결과 적당한 농도에서 세포들이 감염이 되지 않았다. 특히 포자가 내부에 침입하지 못한다는 특징과 정상세포와 비슷한 모습을 유지하고 있었다. 이는 루틴은 노제마병 방제약으로서의 유용함을 확인한 것이다.

또한 본 연구에서는 노제마병 방제에 사용 시 적정 농도를 확인하기 위해 각각 다른 농도에서 세포에 나타나는 세포 독성과 방제 효능을 확인하였다. 이는 노제마병으로 인한 꿀벌 개체수 감소를 방지하기 위해서 필수적이라고 할 수 있다. 그 결과 루틴은 200 µg/mL 이상의 농도에서는 세포 독성을 보였다. 이는 노제마병에 걸리지 않더라도 좋지 않은 영향을 미칠 수 있다는 것을 의미하며 노제마병 방제약으로 사용 시 높은 농도로 루틴을 처리하지 않는 것이 좋다는 것을 의미한다. 루틴의 농도가 너무 낮을 경우 방제 효과를 볼 수 없을 수 있어 농도를 줄여가며 확인한 결과 12.5 µg/mL 미만의 농도에서는 이전에 확인된 루틴의 효과가 없어졌음을 확인하였다. 이로써 노제마병 방제를

위해 루틴을 사용하는 경우 12.5 µg/mL부터 100 µg/mL 사이의 농도에서 사용해야 확실한 효과를 가질 수 있을 것으로 보인다.

루틴은 메밀, 차, 사과와 같은 식물에서 풍부하게 발견되어 쉽게 얻을 수 있다는 특징이 있다(Harborne, 1986). 이는 약으로 사용 시 경제적인 측면이나 그로 인한 희소성의 문제가 발생되지 않는다는 점이 루틴의 장점이라 할 수 있다(Ganeshpurkar and Saluja, 2017). 그러므로 루틴을 노제마병 방제약으로 사용 시 많은 양봉업계에서 꿀벌 병원체로 인해 발생하는 문제들을 해결할 수 있을 것으로 보인다.

감사의 글

위 연구는 농촌진흥청 PJ015763의 지원을 받아 진행되었다.

인용 문헌

- Azevedo, M. M., R. Teixeira-Santos, A. P. Silva, L. Cruz, E. Ricardo, C. Pina-Vaz and A. G. Rodrigues. 2015. The effect of antibacterial and non-antibacterial compounds alone or associated with antifungals upon fungi. *Front. Microbiol.* 6: 669.
- 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.
- Ebeling, J., H. Knispel, G. Hertlein, A. Fünfhaus and E. Genersch. 2016. Biology of *Paenibacillus larvae*, a deadly pathogen of honey bee larvae. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100: 7387-7395.
- 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.
- Ganeshpurkar, A. and A. K. Saluja. 2017. The pharmacological potential of rutin. *Saudi Pharm. J.* 25(2): 149-164.
- Gilliam, M. 1990. Chalkbrood disease of honey bees, *Apis mellifera*, caused by the fungus, *Ascosphaera apis*: A review of past and current research. pp. 398-402. in Proceedings and abstracts, Vth International Colloquium on Invertebrate Pathology and Microbial Control, Adelaide, Australia, 20-24 August 1990.
- Gisder, S., K. Hedtko, N. Möckel, 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.
- Harborne, J. B. 1986. Nature, distribution and function of plant flavonoids. *Prog. Clin. Biol. Res.* 213: 15-24.
- Hosseinzadeh, H. and M. Nassiri-Asl. 2014. Review of the protective effects of rutin on the metabolic function as an important dietary flavonoid. *J. Endocrinol. Invest.* 37: 783-788.
- 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.
- Katznelson, H. and C. A. Jamieson. 1952. Control of nosema disease of honeybees with fumagillin. *Science* 115(2977): 70-71.
- 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.
- Li, X., J. K. Kim, S. Y. Park, S. Zhao, Y. B. Kim, S. Lee and S. U. Park. 2014. Comparative analysis of flavonoids and polar metabolite profiling of tanno-original and tanno-high rutin buckwheat. *J. Agric. Food Chem.* 62(12): 2701-2708.
- 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. Garjijo 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. Pellecchia. 2022. The honey bee *Apis mellifera*: An insect at the interface between human and ecosystem health. *Biology* 11(2): 233.
- 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.
- Sharma, S., A. Ali, J. Ali, J. K. Sahni and S. Baboota. 2013. Rutin: therapeutic potential and recent advances in drug delivery. *Expert Opin. Investig. Drugs* 22(8): 1063-1079.
- 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.