

발 간 등 록 번 호

11-1541000-001357-01

무공해 양봉 생산 시스템을 위한 꿀벌
프로바이오틱스 미생물 제제 개발
(Commercial bee-probiotics microorganisms for
sustainable beekeeping production systems)

영남대학교

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “무공해 양봉 생산 시스템을 위한 꿀벌 프로바이오틱스 미생물 제제 개발”
과제의 보고서로 제출합니다.

2012년 04월 09일

주관연구기관명 : 영남대학교 산학협력단

주관연구책임자 : 박 용 하

세부연구책임자 : 박 용 하

연 구 원 : 강 국 희

연 구 원 : 임 정 희

연 구 원 : 서 병 주

연 구 원 : 라더 이르판 아흐마드

연 구 원 : 최 옥 한

연 구 원 : 장 윤 정

연 구 원 : 최 광 호

연 구 원 : 유 미 선

연 구 원 : 노 지 나

연 구 원 : 원 반 푸

협동연구기관명 : 경기대학교 산학협력단

협동연구책임자 : 윤 병 수

요 약 문

I. 제 목

무공해 양봉 생산 시스템을 위한 꿀벌 프로바이오틱스 미생물 제제 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구개발의 목적

다양한 미생물자원으로부터 꿀벌 주요 질병을 유발하는 병원균에 대하여 항균 활성 갖는 항생제 대체 미생물 소재를 확보하고, 현장 평가를 통한 꿀벌 주요 질병 예방 과 치료 효과를 확인하여 항생제 대체 친환경 bee-probiotics를 개발하고 산업화함

2. 연구개발의 필요성

- 최근 양봉산물의 국제 안전성 기준이 강화되고 국내 식품 안전성문제가 대두되고 있으며, 미국부저병(american foulbrood) 및 노제마병(*Nosema* disease)에 대한 대처법이 절실히 요구됨
- 국제수의검역국(OIE)에서는 유럽부저병(EFB)과 미국부저병(AFB)을 검역조건으로 지정하였으며, 국내에서는 현재 법률 제8852호에 의거 제3종 가축전염병으로 분류되어 있어 꿀벌의 질병 중 가장 심각한 피해 일으킴
- 미국부저병(AFB)은 *Paenibacillus larvae*가 원인균인 세균성 질병으로써, 열이나 화학적 소독제에 매우 높은 저항성을 나타내며 벌집(소비) 속에서 35년의 저항성을 나타냄
- 현재까지 미국 부저병을 방제 할 수 있는 방법은 존재 하지 않아 대부분의 농가들이 항생제를 사용하고 있는 실정이며, 따라서 항생제 꿀 혼용이 우려되어 해결책이 되지 못함
- 노제마와 부저병은 응애와 더불어 봉군 붕괴(30~50%의 꿀벌 사멸, 때로는 90%사멸)의 원인이 되고 있지만 아직도 구체적인 해결책이 없는 실정임
- 기존에는 노제마병 치료제로서 노제마크나 치메로살 등이 있지만, 수은제이기 때문에 WHO에서 사용을 금지함
- 따라서, 양봉농가의 피해가 심한 미국부저병과 노제마병에 대해 특이적으로 높은 항균력을 나타내는 기능성 유산균을 개발하여 친환경적인 꿀벌 질병 방제 및 치료가 절실히 필요함

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

1. 연구개발 내용 및 범위

- 가. 꿀벌 질병 원인균에 대한 항균력이 우수한 미생물 자원 확보
 - (가) 미국 부저병 원인균에 대한 항균력이 우수한 미생물 자원 확보
 - (나) 노제마 원인균에 대한 항균력이 우수한 미생물 자원 확보
- 나. 후보균주의 생물학적 및 이화학적 특성 분석
 - (1) 항균활성 우수 균주 동정
 - (2) 항균활성 우수 균주의 성장 특성
 - (3) 후보균주 배양 상등액에 대한 미국 부저병 원인균 성장 억제 조사
- 다. 항생기능을 갖는 물질 분석 및 특성 연구
 - (1) Probiotics 물질 추출 및 정제
 - (2) Probiotics 물질의 특성
 - (3) 타 약제와 연계 또는 혼합사용 가능성
- 라. 1차 후보균주를 이용한 in vivo 실험 적용
 - (1) Bee egg 및 Bee larvae에 의한 probiotics후보의 저항성 test의 설계 및 적용
 - (2) 1차 선발된 probiotics 후보의 *Nosema* 감염봉군 적용 및 수밀력, 월동력 검사
 - (3) 1차 선발된 probiotics후보의 봉군 적용 및 자연 수밀력, 산란력 검사
 - (4) 봉군 단위 예방효과검증을 위한 저·고준위 경쟁 감염실험(AFB, *Nosema*)
 - (5) Probiotics 처리군에 대한 월동력, 수밀력, 산란력 측정
- 마. 선발된 Probiotics 후보의 예방 및 치료약제 현장 적용을 위한 용법 실험
 - (1) AFB, *Nosema*의 예방제 및 치료제로 새로운 probiotics 후보의 신규 적용
 - (2) AFB, *Nosema*의 예방제 및 치료제로 선발된 probiotics의 용량-효과 관계 확립
- 사. 대량 생산 시스템의 확립 및 시제품 제작
 - (1) 액상 발효조를 이용한 대량 생산 시스템 확립
 - (2) 시제품 개발

IV. 연구개발결과

1. 미생물 자원 확보

가. 꿀벌 질병 원인균에 대한 항균력이 우수한 미생물 자원 확보

- (1) 미국 부저병 원인균인 *Paenibacillus larvae* subsP. *larvae* KCTC 3744에 대한 항균 활성이 우수한 15종의 균주를 확보함
- (2) 15종의 항균활성 우수 균주 중 가장 활성이 우수한 4종의 미생물 자원 확보
- (3) 항균력이 우수한 4종의 미생물 자원을 이용한 노제마병에 대한 항균활성 확인

2. 후보균주의 생물학적 및 이화학적 특성 분석

가. 항균 활성 우수 균주의 동정

- (1) 항균 활성 가장 우수한 균주 3종을 최종 선발하여 분류학적 위치 확인
- (2) *Lactobacillus plantarum* YML001, *Lactobacillus plantarum* YML004, *Leuconostoc citreum* KM20으로 명명함

나. 항균 활성 우수 균주의 성장 특성 분석

- (1) 선발된 3종의 균주 모두 21시간 배양된 상등 농축액에서 최대 항균활성을 나타냄
- (2) 항생제인 테트라사이클린과 선발된 3종의 균주의 항균활성을 비교한 결과, 항균력이 우수하거나 유사함

다. 후보균주 배양 상등액에 대한 미국 부저병 원인균 성장 억제 조사

- (1) 선발된 3종의 균주 배양 상등액을 처리한 시험구는 처리하지 않은 시험구보다 미국 부저병원인균의 성장을 억제시켰으며, 특히 *L. plantarum* YML004는 70% 정도의 성장을 억제시킴

3. 항생기능을 갖는 물질 분석 및 특성 연구

가. Probiotics 물질의 추출 및 정제

- (1) 확보된 선발 균주의 배양 상등액에 0.1M NaOH로 중화시킨 결과, 10배 농축 상등액보다 *L. plantarum* YML001은 활성이 28%, *L. plantarum* YML004은 20%, *Leu. citreum* KM20은 16% 감소
- (2) *L. plantarum* YML001 생리활성 물질을 분리 및 정제하였으며, NMR 분석을 통하여 꿀벌 질병 원인균에 항균력을 가진 물질은 lactic acid와 유사한 물질로 판단

- (3) *L. plantarum* YML004 생리활성 물질을 분리 및 정제하였으며, HPLC 분석에서 단일 peak의 물질을 확보함. 정밀한 물질 분석을 위해 MALDI-TOF를 분석 한 결과, 2가지 물질의 peak가 나타남. 그중 6656.648 m/z의 분자량을 가진 물질은 lactic acid로 판명되었으며, 5043.464 m/z의 분자량을 가진 물질은 명확한 물질의 종류는 알 수 없었으나, 유기산이 아닌 다른 물질이 포함되어 있음

나. Probiotics 물질의 특성

- (1) 선발된 물질의 위치가 endocellular 또는 exocellular 인지 확인하기 위하여 유산균주의 배양액을 원심분리하여 상등액과 균체를 분리하였음. 그 결과, 상등액에서 항균활성능을 확인할 수 있었으므로 선발된 물질은 exocellular substance 로 밝혀짐. 따라서 후보물질을 획득하기 위한 cell 파쇄에 따른 불필요한 공정 없이 배양액만으로도 물질 추출이 용이하여 물질 회수에 따른 편리가 있을 것으로 확인
- (2) 선발된 물질은 열처리, pH 조정을 하여도 항균 활성능이 유지되는 것을 확인함
- (3) Protease K, Lipase, Trypsin, Pepsin, α -amylase를 처리하여 3 hr동안 반응시킨 후 100 °C에서 10min간 불활성화하여 항균력을 조사한 결과, 선발된 물질은 위 5종의 효소에 대해 감수성이 매우 적음을 확인함
- (4) 선발된 균주 모두 Tetracycline에는 내성이 있었기 때문에 대량 배양에 이용 시, 배지에 Tetracycline은 함께 섞어 배양하는 것이 공정상에 있어서 편리함
- (5) 20 ppm Tetracycline과 상등액의 혼합 비율을 설정하여 실험한 결과, 상등액의 비율이 높아질수록 억제환의 크기가 대체적으로 증가하였지만, 일정 혼합 비율 이상에서는 더 이상 환의 크기가 커지지 않음. 따라서 효율적인 혼합비율은 50 : 50 (v/v)이라 사료 됨

4. 1차 후보균주를 이용한 in vivo 실험 적용

가. Bee egg 및 Bee larvae에 의한 probiotics후보의 저항성 test의 설계 및 적용(AFB, *Nosema*)

- (1) 꿀벌의 발생과정에서 변태의 특성에 착안하여 이를 약물선발, 독성판별의 다목적 test로 활용할 수 있는 새로운 실험방법을 개발함. 이를 변태독성실험법으로 명명함. 변태독성실험법을 미국부저병과 노제마 질병에 저항성이 있는 probiotics 선발에 적용하도록 설계 함

나. 1차 선발된 probiotics 후보의 *Nosema* 감염봉균 적용 및 수밀력, 월동력 검사

- (1) AFB-specific Real-Time quantitative PCR법을 신규 개발함
- (2) Probiotics extract와 Probiotics boiled의 치료효과는 단정 할 수 없으며, 보다 우수한 probiotics의 개발에 전력함

- (3) 월동 포장에서 강균들은 월동자격균으로 충분하였으나, 기타 모든 약균 및 다수의 중균들은 월동자격균이 되지 못하여 월동 여부가 의심됨

다. 1차 선발된 probiotics 후보의 봉균 적용 및 자연 수밀력, 산란력 검사

- (1) *Nosema*-specific Real-Time quantitative PCR법을 신규 개발함

- (2) 소비의 무게 및 벌통 무게의 변화 결과는 고농도 probiotics를 처리한 봉균에서 무게가 증가함

라. 봉균 단위 예방효과검증을 위한 저·고준위 경쟁 감염실험(*AFB*, *Nosema*)

- (1) 1차 선발된 probiotics를 당액과 고농도 또는 저농도로 혼합시켜 꿀벌에게 공급하였고, 대조군을 포함한 3개 실험군에 *AFB*를 인위 감염시켜 발병 및 확산의 정도를 측정함. 전체 실험봉균에서 꿀벌시료를 채취하여 정기적으로 9종의 질병 검사를 실시하였으며, 자연 감염된 타 병원체의 증감정도도 실측함

- (2) 1차 선발된 probiotics를 당액과 당액과 고농도 또는 저농도로 혼합시켜 꿀벌에게 공급하였고, 대조군을 포함한 3개 실험군을 이 과정에서 노제마 포자로 인위 감염시키는 실험을 실시

마. Probiotics 처리군에 대한 월동력, 수밀력, 산란력 측정

- (1) Probiotics를 처리한 각 봉균들은 대조군의 봉균들과 함께 월동포장을 하고 월동력에 차이가 있는 지를 조사

5. 선발된 Probiotics 후보의 예방 및 치료약제 현장 적용을 위한 용법 실험

가. *AFB*, *Nosema*의 예방제 및 치료제로 새로운 probiotics 후보의 신규 적용 및 선발된 probiotics의 용량-효과 관계 확립

- (1) 시제품으로 개발된 probiotics의 생균제를 이용한 화분떡 발효

- (2) *AFB*-probiotics 함유 또는 *Nosema*-probiotics 함유 화분떡 제조 (저, 중, 고, 초고농도의 화분떡을 제조)

- (3) *AFB*-probiotics 또는 *Nosema*-probiotics의 과다 투여는 꿀벌의 이상 비행 활동 및 이상 행동을 야기 하지 않음

- (4) *AFB*-probiotics 화분떡 처리한 전체 봉균 중 저농도군 및 중농도군의 평균 총 사체수가 낮음. 대조군의 경우 실험 후기부터 말기까지 사체수가 계속 증가됨

- (5) *Nosema*-probiotics 화분떡 처리한 전체 봉균 중 저농도군 및 중농도군의 평균 총 사체수가 낮음

- (6) 실험 봉균에서 꿀벌 사체수의 증가는 probiotics 화분떡의 과다 투여에 의해 야기된 것으로 보기는 어려우며, probiotics 농도에 따른 용량-반응 관계는 입증되기 어려운 것으로 사료됨
- (7) AFB-probiotics 화분떡은 AFB 감염 봉균의 회복에 유의미한 것으로 판단
- (8) *Nosema*-probiotics 화분떡을 처리한 각 실험군의 봉세는 초고농도 및 고농도 실험군에서 대조군을 크게 앞서는 봉세 성장을 보여 주어 *Nosema*-probiotics가 긍정적 성장 촉진하는 것으로 확인됨
- (9) Probiotics는 해당 두 꿀벌 질병에 의한 피해를 극복하였다 판단되며, 각 probiotics의 농도는 해당 봉균의 육아권 별집수와 용량-반응관계가 있는 것으로 사료됨

6. 대량 생산 시스템의 확립 및 시제품 제작

가. 액상 발효조를 이용한 대량 생산 시스템 확립

- (1) 탄소원으로는 glucose와 saccharose를 이용하였을 때 선발된 probiotics의 성장률이 가장 우수하였음
- (2) 질소원으로는 tryptone과 malt extract를 이용하였을 때 선발된 probiotics의 성장률이 가장 우수하였음
- (3) 선발된 탄소원과 질소원을 그룹지어 성장률을 조사한 결과 탄소원으로는 glucose, 질소원으로는 tryptone으로 이용한 대량 배지 조건에서 최대 성장률을 나타냄
- (4) 질소원인 tryptone을 이용한 결과 probiotics의 성장 유도기가 단축되어 생장이 촉진되는 것을 확인함
- (5) 미량원소를 조사한 결과 Polysorbate 80, Sodium Acetate, Ammonium Citrate, MgSO₄, MnSO₄, Dipotassium phosphate의 최적 비율을 선별함
- (6) 기 선발된 최적 배지 조성을 기반으로 하여 7 L, 30 L 발효조로 scale up하였으며, probiotics의 최적 배지인 MRS에 비해 10배 이상의 성장을 확인함

나. 시제품 개발

- (1) Probiotics의 최적 성장 조건에 따라 배양 하여 제조함
- (2) 항균 활성이 가장 우수했던 생육 조건인 1×10^9 CFU/ml 이상이 되도록 배양하여 생균제로 제조함
- (3) 개발된 시제품은 화분떡 발효에 이용되어 현장 평가 실시함

V. 연구성과 및 성과활용 계획

1. 연구 성과

가. 교육 및 지도 활용 (1건)

- (1) 양봉산업발전 심포지엄(2011. 11. 30)에서 “국내 꿀벌질병과 그에 대한 진단 및 처방법”의 주제로 농가 및 공무원 대상으로 교육 실시

나. 특허 출원 (4건)

- (1) 미국부저병의 원인균에 대한 항균활성을 가지는 락토바실러스 플란타룸 YML001, 상기 미생물을 함유하는 항균성 미생물 제제 및 상기 미생물을 이용한 방제 방법, 출원 번호 : 10-2010-0011690
- (2) 미국부저병의 원인균에 대한 항균활성을 가지는 페디오코커스 파버러스 YML002, 상기 미생물을 함유하는 항균성 미생물 제제 및 상기 미생물을 이용한 방제 방법, 출원 번호 : 10-2010-0011691
- (3) 꿀벌 병해충 방제용 조성물, 출원 번호 : 10-2012-0001617
- (4) 유산균이 함유된 양봉 사료 및 이의 제조방법, 출원 번호 : 10-2012-0022467

다. 논문

(1) 국내 (14편)

- ▶ 유미선, 윤병수. 2009년 국내 꿀벌 질병의 발생 빈도. Korean J. Apiculture, 24(4), 273-278, 2009
- ▶ 유미선, 최용수, 박용하, 윤병수. Chronic Bee Paralysis Virus의 진단을 위한 Real-Time PCR 진단법의 개발. Korean J. Apiculture, 25(1), 31-37, 2010
- ▶ Phu Van Nguyen, Ji-Na No, Sang-Hoon Han, Sun-Hwan Kwon, Yong-Ha Park, Byoung-Su Yoon. Development of Sacbrood Virus-specific PCR detection based on stable Capside Protein Sequence. Korean J. Apiculture, 25(2), 115-122, 2010
- ▶ Kim Cuc Thi Nguyen, Mi-Sun Yoo, Sang-Hoon Han, Sun-Hwan Kwon, Yong-Ha Park, Byoung-Su Yoon. Generation of Specific Monoclonal Antibod against Recombinant Major Royal Jelly Pretein 1 (MRJP1) from Honeybee (Apis mellifera). Korean J. Apiculture, 25(2), 129-135, 2010
- ▶ Phu Van Nguyen, Ji-Na No, Mi-Sun Yoo, Yong-Ha Park, Byoung-Su Yoon. Over-expression of Major Royal Jelly Protein 3 from Apis mellifera in E. coli. Korean J. Apiculture. 25(3), 163-171, 2010

- ▶ Mi-Sun Yoo, Ji-Na No, Van Phu Nguyen, Yong Soo Choi, Yong-Ha Park, Byoung-Su Yoon. Development of Ultra-rapid Real-Time PCR Method for the detection of Chronic Bee Paralysis Virus. Korean J. Apiculture, 25(3), 193-199, 2010
- ▶ Ji-Na No, Nguyen Van Phu, Mi-Sun Yoo, Yong-Ha Park, Byoung-Su Yoon. Simple and Rapid Method for Detection of Deformed Wing Virus (DWW) by Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP). Korean J. Apiculture, 25(3), 211-216, 2010
- ▶ 이보람, 노지나, Nguyen Van Phu, 유미선, 박용하, 윤병수. Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) 법을 이용한 *Nosema Ceranae* 검출법 개발. Korean J. Apiculture, 25(4), 267-274, 2010
- ▶ Mi-Sun Yoo, Van Phu Nguyen, Ji-Na No, Bo-Ram Lee, Yong-Ha Park, Byoung-Su Yoon. Development of Ultra-Rapid Real-Time PCR Method for the Detection of *Nosema*. Korean J. Apiculture, 26(1), 21-27, 2011
- ▶ Phu Van Nguyen, Ji-Na No, Bo-Ram Lee, Mi-Sun Yoo, Byoung-Su Yoon. Detection and Quantification of Major Royal Jelly Protein 1 in Honeybees by ELISA using a Monoclonal Antibody. Korean J. Apiculture, 26(1), 71-77, 2011
- ▶ 유미선, 이보람, 김재수, 윤병수. 국내 꿀벌의 장내 미생물 군집 조사. Korean J. Apiculture, 26(2), 87-92, 2011
- ▶ Mi-Sun Yoo, Sang-Hoon Han, Byoung-Su Yoon. Development of Ultra-Rapid Real-Time PCR Method for Detection of Black Queen Cell Virus. Korean J. Apiculture, 26(3), 203-208, 2011
- ▶ Phu Van Nguyen, Sang-Hoon Han, Byoung-Su Yoon. Development of a Metalloproteinase Gene Based Loop Mediated Isothermal Amplification Assay for Detection of *Paenibacillus* larvae. Korean J. Apiculture, 26(3), 213-220, 2011
- ▶ 유미선, 이보람, 노지나, Nguyen Van Phu, 윤병수. Black Queen Cell Virus 재조합 단백질의 발현. Korean J. Apiculture, 26(4), 275-282, 2011

(2) 국외 (2편)

- ▶ Mi-Sun Yoo, Kim Cuc Nguyen Thi, Phu Van Nguyen, Sang-Hoon Han, Soon-Hwan Kwon, Byoung-Su Yoon. Rapid detection of sacbrood virus in honeybee using ultra-rapid real-time polymerase chain reaction. Journal of Virological Methods, 179(1), 195-200, 2011
- ▶ Min-Hee Kang, Il-Wook Kim, Dong-Woo Lee, Mi-Sun Yoo, Sang-Hoon Han, Byoung-Su Yoon. Development of a rapid detection method to detect tdh gene in *Vibrio parahaemolyticus* using 2-step ultrarapid real-time polymerase chain reaction.

라. 국내 및 국제 학술회의

(1) 국내 학술회의 (11회)

- ▶ Nguyen Van Phu. Generating of specific monoclonal antibody against recombinant virion protein 1 for development of immunoassay kit for the detection of sacbrood virus. 제26차 한국양봉학회, 2011
- ▶ Mi-Sun Yoo. Application of ultra-rapid real-time PCR method for honeybee viral disease detection. 제26차 한국양봉학회, 2011
- ▶ Bo-Ram Lee. Trend of honey bee diseases detection method in Korea. 제26차 한국양봉학회, 2011
- ▶ Ji-Na No. Development of detect to honeybee diseases take advantage of loop-mediated isothermal amplification (LAMP). 제26차 한국양봉학회, 2011
- ▶ Byoungjoo Seo. 꿀벌 부저병 및 노제마 병원균의 생육을 억제하는 프로바이오틱스. 제26차 한국양봉학회, 2011
- ▶ Bo-Ram Lee. Detection of ascospaera apis causing chalkbrood disease by using loop-mediated isothermal amplification (LAMP). 제26차 한국양봉학회, 2011
- ▶ Ji-Na No. Development of RT-LAMP (reverse transcription loop-mediated isothermal amplification) for detection of capsid protein in IAPV (israel acute paralysis. 제26차 한국양봉학회, 2011
- ▶ Mi-Sun Yoo. Development of ultra-rapid real-time PCR method for the detection of *Nosema ceranae*. 제26차 한국양봉학회, 2011
- ▶ Nguyen Van Phu. Quantification of major royal jelly protein 1 in honeybee by ELISA based on monoclonal antibody. 제26차 한국양봉학회, 2011
- ▶ Yoon Jeong Jang. Novel Probiotic Strains for American Foulbrood and Nosemosis of Honeybee. 2011 International Symposium & Annual Meeting Translational Research in Microbiology and Biotechnology, 2011
- ▶ 윤병수. 국내 꿀벌 질병과 진단 현황. 수의과학연구소 추계심포지움, 2011

(2) 국제 학술회의 (3회)

- ▶ Yoon Jeong Jang. Novel Probiotic Strains for American Foulbrood and Nosemosis of Honeybee. IUMS 2011 Sapporo XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology, 2011

- ▶ Ji-Na No. Easy Detection of the honeybee disease using loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP). 42nd international apicultural congress, 2011
- ▶ Byoung Su Yoon. Aplicacion de un metodo de PCR Real-Time para Deteccion de enfermedades virales en abejas. 42nd international apicultural congress, 2011

2. 성과 활용 계획

가. 참여기업을 통한 제품화 실시할 계획

나. 제품화 실시 후 홍보를 위하여 바이오산업 전시회 등을 통하여 관련 산업 전문인은 물론 일반인을 대상으로 한 적극적인 홍보를 실시할 계획임

다. 본 연구결과를 바탕으로 무공해 양봉 생산을 위한 추가연구를 추진 계획 중임

라. 국내 특허 등록 및 국제 특허 출원 준비 중임

SUMMARY

American Foulbrood (AFB) of honeybees (*Apis mellifera*), caused by a Gram-positive bacterium *Paenibacillus larva* is one of the most serious diseases affecting the larval and pupal stages of honeybees. Nosemosis, a disease caused by a microsporidian infection, is one of the most frequently observed parasitic pathologies affecting adult honeybees. Presently, *Nosema ceranae* and *Nosema apis* seems to be the main microsporidian infection in honeybees. The aim of this study is to evaluate lactic acid (LAB) strains isolated from Kimchi and to study its inhibitory effects against *Paenibacillus larvae* subsP. *larvae* KCTC 3744 and *Nosema trichoplusiae* ATCC 30702. In all, 3,500 strains of lactic acid bacteria isolated from 200 types of Korean traditional kimchi were screened and three highly active bacteria were selected and were identified as *Lactobacillus plantarum* YML001, *L. plantarum* YML004 and *Leuconostoc citreum* KM20. The highest antimicrobial activity was achieved after culturing the three strains for 21-24 hours. In addition, temperature and pH stability assays confirms that the antimicrobial activity decreases at temperature above 50°C, however the antimicrobial activity remains un-effected after treatment with Protease K, Lipase, Trypsin, Pepsin, α -amylase 5. The optical density of *P. larvae* KCTC3744 with selected strains at OD_{600nm} showed drastic decrease in cell growth as compared to control. Three groups of honey bees(N=25) were given *Nosema* Spores at a concentration of 10,000 spores per ml with addition of 1% of supernatant of three strains. The bees were incubated at 37°C for seven days after infection, and the amount of spores in the mid gut was counted. We found that the three strains inhibited the growth of *P. larvae* KCTC3744 and *N. trichoplusiae* ATCC30702 and provided new perspective for probiotics of honeybees. Further studies were conducted to know the nature of antimicrobial substance. The NMR analysis of *Lactobacillus plantarum* YML001 shows that the agent with high antimicrobial activity is lactic acid or similar substances. Secondly, *Lactobacillus plantarum* YML004 was assayed to study the nature of antimicrobial compound. A single activity peak was obtained by HPLC analysis and accurate molecular weight determination was carried out by Matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALD-TOF) confirmed as 5043.464m/z. The optimizations of strains were done in different culture medium samples in order to select the most suitable medium composition for mass culture production. The most prominent culture medium composition was found to be carbon source glucose, nitrogen sources of trace elements were selected tryptone Tween 80 and Sodium acetate, Ammonium citrate, MgSO₄, MnSO₄, Dipotassium Phosphate was selected by examining the ratio of (20g Glucose, 5g Yeast Extract, 20g tryptone, 2g Polysorbate 80, 10g Sodium Acetate, 4g Ammonium Citrate, 0.05g MgSO₄, 0.025g MnSO₄, 1g Dipotassium phosphate / L).

For on-site assessment of Bee eggs and Bee larvae, candidate probiotics were applied to design and test the resistance of Bees against infection. This method was performed with

a conventional unit of the bee hive with thousands of cells in each group. The responses to novel probiotic were very effective with high sensitivity. It adds an advantage against other drugs with high toxicity. The primary effect of colony infection of the candidates fed with probiotics and control bees were analyzed by real-time PCR for *Nosema* specific quantitative PCR and real-time PCR for quantification of Paenibacillus larvae in infected colonies. Therefore, the average number of infected bees were accurately counted and diagnosed. Furthermore, Bees after winter were provided with bee bread containing AFB-probiotics and *Nosema*-probiotics, infected *Nosema* apis colonies were medicated by AFB-probiotics, AFB-pathogen, *Nosema*-probiotics and how it affects the growth of every group of bees was inspected quantitatively.

This study has been conducted in various kinds of bees, under different seasons, environmental conditions and colony health. So, this is very important research to follow and will be the leading edge of bee research and would certainly help quantify what many of us have observed. In addition, probiotic supplementations include better bee survival. The results demonstrate that these LAB probiotics plays an important role not only in the *Nosema* or AFB tolerance, but also in the resistance to other diseases. Therefore, development of Bee probiotic would be novel application in Bee culture industry.

CONTENTS

Chapter 1. Summary of research	-----	19
Section 1. Aim and objective of the research	-----	19
Section 2. The importance of research	-----	19
Section 3. Research contents and scope	-----	23
Chapter 2. Technical development on domestic and International research	-----	24
Section 1. Technical development of our study on domestic and international research	-----	24
Section 2. Present situation of our study on domestic and international research	-----	24
Chapter 3. Contents and results of research	-----	26
Section 1. Screening of functional Bee probiotics	-----	26
Section 2. Biological and physicochemical characteristics of the candidate Bee probiotics	-----	33
Section 3. Analysis and characterization of functional Bee probiotic compound	-----	39
Section 4. In vivo test of primary candidate probiotics	-----	52
Section 5. Prevention, treatment and applications in field usage test of selected candidate probiotics	-----	92
Section 6. The establishment of mass production systems and prototyping	-----	114
Chapter 4. Achievement of study and contribution	-----	128
Section 1. Achievement of study	-----	128
Section 2. Application Plan of Research Results	-----	129
Chapter 5. Application plan of research results	-----	130
Section 1. The application of research results	-----	130
Section 2. The plan and focus of research results	-----	133
Chapter 6. Information of foreign scientific techniques	-----	134
Chapter 7. References	-----	135

목 차

요 약 문	2
I. 제 목	2
II. 연구개발의 목적 및 필요성	2
1. 연구개발의 목적	2
2. 연구개발의 필요성	2
III. 연구개발 내용 및 범위	3
1. 연구개발 내용 및 범위	3
IV. 연구개발결과	4
1. 미생물 자원 확보	4
2. 후보균주의 생물학적 및 이화학적 특성 분석	4
3. 항생기능을 갖는 물질 분석 및 특성 연구	4
4. 1차 후보균주를 이용한 in vivo 실험 적용	5
5. 선발된 Probiotics 후보의 예방 및 치료약제 현장 적용을 위한 용법 실험	6
6. 대량 생산 시스템의 확립 및 시제품 제작	8
V. 연구성과 및 성과활용 계획	9
1. 연구 성과	9
2. 성과 활용 계획	12
SUMMARY	13
제 1 장 연구개발과제의 개요	19
제 1 절 연구개발의 목적	19
제 2 절 연구개발의 필요성	19
제 3 절 연구개발의 범위	23
1. 꿀벌 질병 원인균에 대한 항균력이 우수한 미생물 자원 확보	23
2. 후보균주의 생물학적 및 이화학적 특성 분석	23
3. 항생기능을 갖는 물질 분석 및 특성 연구	23
4. 기확보균주를 이용한 in vivo 실험 적용	23
5. 봉군에 대한 Probiotics 균주 적용 및 치료 효과	23
6. 대량 생산 시스템의 확립 및 시제품 제작	23

제 2 장 국내외 기술개발 현황	24
제 1 절 국내외 기술 개발 현황	24
제 2 절 국내외 기술 개발 현황에서 차지하는 위치	24
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	26
제 1 절 미생물 자원 확보	26
1. <i>Paenibacillus larvae</i> subs <i>P. larvae</i> KCTC 3744에 대한 항균활성 우수 균주의 탐색	26
2. <i>Nosema trichoplusiae</i> ATCC 30702에 대한 항균활성 우수 균주의 탐색	27
제 2 절 후보균주의 생물학적 및 이화학적 특성	33
1. 항균활성 우수 균주 동정	33
2. 항균활성 우수균주의 성장특성	34
3. 후보균주 배양 상등액에 대한 미국 부저병 원인균의 생장억제 조사	38
제 3 절 기 확보된 후보균주로부터 항생 기능을 갖는 물질 분석 및 특성 연구	39
1. Probiotics 물질의 추출 및 정제	39
2. Probiotics 물질의 특성	47
제 4 절 1차 후보균주를 이용한 in vivo 실험 적용	52
1. Bee egg 및 Bee larvae에 의한 probiotics후보의 저항성 test의 설계 및 적용(AFB)	52
2. Bee egg 및 Bee larvae에 의한 probiotics후보의 저항성 test의 설계 및 적용(<i>Nosema</i>)	56
3. 1차 선발된 probiotics후보의 <i>Nosema</i> 감염봉군 적용 및 수밀력, 월동력 검사	57
4. 1차 선발된 probiotics후보의 봉군 적용 및 자연 수밀력, 산란력 검사	63
5. 봉군 단위 예방효과검증을 위한 저·고준위 경쟁 감염실험(AFB)	68
6. 봉군 단위 예방효과검증을 위한 저·고준위 경쟁 감염실험(<i>Nosema</i>)	87
7. probiotics 처리군에 대한 월동력, 수밀력, 산란력 측정	91
제 5 절 선발된 Probiotics 후보의 예방 및 치료약제 현장 적용을 위한 용법 실험	92
1. 실험목적	92
2. 실험실시의 기간 및 장소	92
3. 실험방법 및 실험 내용	92
4. 실험 결과 및 분석	101
5. 꿀벌의 장내 미생물 군집 조사	110

제 6 절 대량 생산 시스템의 확립 및 시제품 제작	114
1. 액상 발효조를 이용한 대량 생산 시스템 확립	114
2. 시제품개발	127
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	128
제 1 절 연구개발목표달성도	128
제 2 절 관련분야에의 기여도	129
1. 기술적 측면	129
2. 경제적, 산업적 측면	129
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획	130
제 1 절. 연구 성과	130
제 2 절. 성과 활용 계획	133
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술 정보	135
제 1 절 프로바이오틱스를 이용한 꿀벌 면역 증진 효과 연구	135
제 7 장 참고문헌	136

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적

다양한 미생물자원으로부터 꿀벌 주요 질병을 유발하는 병원균에 대하여 항균 활성 갖는 항생제 대체 미생물 소재를 확보하고, 꿀벌 주요 질병 예방 과 치료 효과가 탁월한 항생제 대체 친환경 bee-probiotics를 개발하고 산업화

제 2 절 연구개발의 필요성

1. 최근 양봉산물의 국제 안전성 기준이 강화되고 국내 식품 안전성문제가 대두되고 있으며, 미국부저병(american foulbrood) 및 노제마병(*Nosema* disease)에 대한 대처법이 절실히 요구됨
2. 국제수의검역국(OIE)에서는 유럽부저병(EPB)과 미국부저병(afb)을 검역조건으로 지정하였으며, 국내에서는 현재 법률 제8852호에 의거 제3종 가축전염병으로 분류되어있어 꿀벌의 질병 중 가장 심각한 피해 일으킴[1]
3. 미국부저병(afb)은 *Paenibacillus larvae*가 원인균인 세균성 질병으로써, 열이나 화학적 소독제에 매우 높은 저항성을 나타내며 벌집(소비) 속에서 35년의 저항성을 나타냄
4. 현재까지 미국 부저병을 방제 할 수 있는 방법은 존재 하지 않아 대부분의 농가들이 항생제를 사용하고 있는 실정이며, 따라서 항생제 꿀 혼용이 우려되어 해결책이 되지 못함
5. 노제마와 부저병은 응애와 더불어 봉군 붕괴(30~50%의 꿀벌 사멸, 때로는 90%사멸)의 원인이 되고 있지만 아직도 구체적인 해결책이 없는 실정임
6. 기존에는 노제마병 치료제로서 노제마크나 치메로살 등이 있지만, 수은제이기 때문에 WHO에서 사용을 금지함
7. 꿀벌 질병에 대한 종합적인 인식과 효과적인 방제제 개발은 양봉농가의 소득 향상에 도움이 될 뿐만 아니라 부저병과 노제마 병 관리에 따른 국가 예산의 불필요한 낭비를 막고 2천억(2008년) 규모의 양봉 시장을 1조원 규모로 양성하여 세계수준의 시장으로서의 경쟁력을 갖출 수 있을 것임

가. 꿀벌 사육 가구 수 감소, 소비율 증가에 따른 대규모화와 높은 수율

- (1) 꿀벌 사육 가구 수는 4만~4만 5,000 가구수준을 유지하여 왔으나 2002년 이후 약간 감소하여 2008년에는 3만 4,102가구였음 (그림 1-2-1)
- (2) 사육 군수는 1994년 60만 군수에서 2004년 201만 군수로 증가, 2008년 185만 가구를 유지하여 사육규모는 대규모화 되고 있음 (표 1-2-1)

- (3) 사육 가구 수는 감소한데 반해 사육 군수는 증가하여, 한 봉군에서 질병이 발생하면 질병 병원체의 감염이 가속화되어 피해의 위험성이 높아질 것임[2]

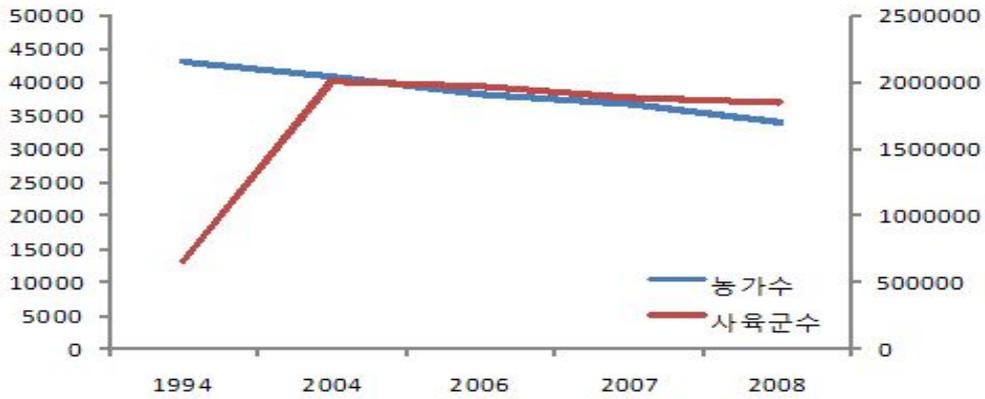


그림 1-2-1. 꿀벌 사육 군수 및 사육가구 수의 변화

자료 : 토종꿀벌(한봉)업계의 현실과 발전 방향 2010, 김병진

표 1-2-1. 꿀벌 사육 군수 및 사육가구 수의 변화

구분	1928	1994	2004	2006	2007	2008	비고
농가수(한봉)		28,490	16,885	16,955	16,455	13,883	
농가수(양봉)		14,835	24,294	21,342	20,269	20,219	
계(호)		43,325	41,179	38,297	36,724	34,102	
사육군수(한봉)	143,304	336,207	308,214	404,495	339,694	314,511	
사육군수(양봉)	27,401	326,471	1,704,520	1,571,626	1,549,820	1,544,063	
계(군)	170,705	662,678	2,012,734	1,976,121	1,889,514	1,858,574	
비고	84:16	51:49	16:84			20:80	비율(한봉:양봉)

(출처: 토종꿀벌(한봉)업계의 현실과 발전 방향 2010, 김병진)

나. 양봉산업 관련 특정 질병

- (1) 우리나라 양봉업의 기반이 되고 있는 아카시아 꽃이 기후의 변동으로 더워지는 기후에 꽃은 피는데 꿀 생성량이 감소함에 따라서 이것을 보충하려고 업자들이 설탕을 대량으로 급여하고 있고 이에 따라서 벌의 건강상태가 허약해져 질병에 쉽게 노출됨. 뿐만 아니라, 봉군의 질병 발병률과 질병 원인체의 항생제 내성이 증가하고 있으나 뚜렷한 대책이 없는 상태임

- (2) 양봉산물인 꿀, 프로폴리스 등은 최근 항산화 능력 등 다양한 생리 활성 기능들이 밝혀짐에 따라서 그 가치가 매우 높게 평가 받고 있어 향후 수요량이 급증할 것으로 전망됨. 따라서 벌의 먹이 관리에 농약, 항생제, 살충제의 사용을 규제하고 인체에 무해한 친환경 항생제, 살충제개발이 필요함
- (3) 양봉 강국인 중국은 중국농업과학원 산하 양봉연구소, 강서성, 길림성, 감숙성 양봉연구소 등 4개 연구소에서 항병원균 실험을 진행하고 있는 반면, 국내에서는 대규모의 곤충분야 연구소가 독립적으로 설립되어 있지 않아 양봉농가에 신기술을 보급하거나 일괄적으로 질병을 관리하지 못하는 등 양봉 관련 질병에 과학적으로 대처하지 못하고 있음(표 1-2-2)

표 1-2-2. 중국 양봉 연구소 현황 (2008)

연구소명	설립연도	인원수	특 성
중국 농업과학원	1958	98(130)	·6개 실험분장 ·가공시험장 ·봉약장 ·700군
강서성 양봉연구소	1950	67(401)	·종봉장, 봉구장 ·봉산품제조장 ·검사소 1,100군사양 ·여왕벌 양성(년1,000마리) ·기술훈련실시(28기)
길림성 양봉연구소	1983	46(92)	·5개 육종장 및 시험장(여왕벌생산) ·봉산품시험가공장 ·각종양봉기구개발보급
감숙성 양봉연구소	1979	35(50)	·품종개량 ·밀원식물; 봉산품 ·봉기구 ·기술훈련(36기)
계		246(673)	

- (4) 2009년 국내 양봉 산업 관련 특정 질병 발병 빈도는 (그림 1-2-2)과 같으며, 미국부저병(AFB; American Foulbrood)과 노제마병이 가장 큰 비율을 차지하고 있음[3]. 따라서 본 연구에서는 양봉농가의 피해가 큰 미국부저병과 노제마병에 대해 특이적으로 높은 항균력을 나타내는 항생 물질을 개발하고자 함

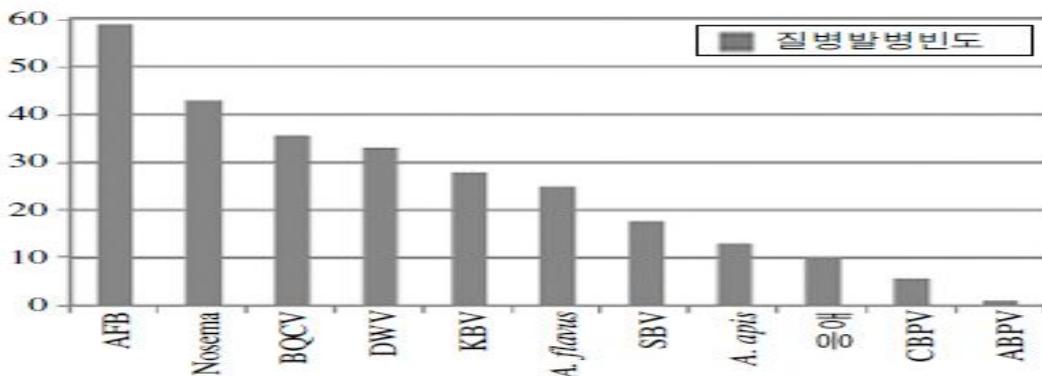


그림 1-2-2. 2009 양봉 관련 주요 질병 발병 빈도

자료 : 한국양봉학회지 제 24권제 4호 (2009), 윤병수

- (5) 꿀벌 주요 질병인 미국부저병과 노제마병의 방제를 목적으로 한 제품의 이용 빈도는 (표 1-2-3, 그림1-2-3)과 같음[4]. 미국부저병의 방제에 가장 많이 이용되는 제품은 항생제인 옥시테트라사이클린이며, 옥시테트라사이클린에 내성을 가지는 부저병균의 출현과 벌꿀 제품에서의 항생제 잔류가 문제시되고 있어 이를 대체할만한 친환경적 꿀벌 질병치료제 개발이 필요함

표 1-2-3. 꿀벌 질병 및 발생 피해정도(2009)

병해충명	피해정도	방제약제	비 고
부저병	++	항생제	신약제개발 필요
노제마병	++	퓨미딜-비 등	
백묵병	++	차아염소산소다	약제효과 무
꿀벌응애	+++	아피톨, P2등	저항성유발 대두
중국가시응애	++	아피톨, P2등	
작은꿀벌응애	+	아피톨, P2등	
장수말벌	+++	-	특효법 없음

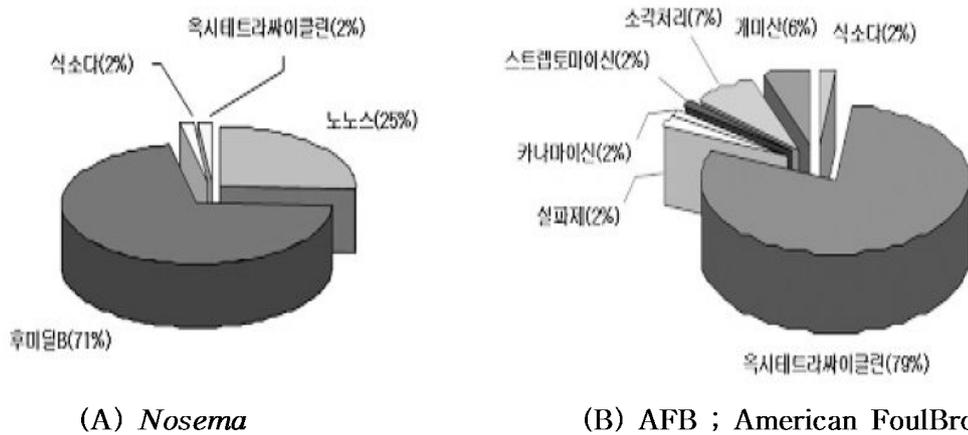


그림 1-2-3. 2008 꿀벌 질병 방제 약제의 사용빈도

자료 : 한국양봉학회지 제 23권 제 2호 (2008), 최용수

다. 항생제의 오남용과 잔류성 문제

- (1) 현재 시판되고 있는 꿀 23개 제품 중 모두 13개 제품 (56.5 %)에서 한 가지 이상의 항생제가 검출되어 양봉 시장에 큰 문제가 있음. 그중 8개 제품에서 식품 중에 잔류해서는 안 되는 항생제인 클로람페니콜이 검출됨. 이러한 사실이 언론매체에 보도되어 소비자들로 하여금 신뢰성을 잃음. 또한 화학성 항생제의 잔류는 꿀의 상업적 가치를 떨어뜨릴 뿐 아니라, 꿀벌 봉군의 손실을 가져와 양봉농가에 큰 피해를 입힘. 위의 상황을 종합적으로 생각하면 친환경적인 질병치료제 개발이 시급한 실정임

제 3 절 연구개발의 범위

1. 꿀벌 질병 원인균에 대한 항균력이 우수한 미생물 자원 확보

- 가. 미국 부저병 원인균에 대한 항균력이 우수한 미생물 자원 확보
- 나. 노제마 원인균에 대한 항균력이 우수한 미생물 자원 확보

2. 후보균주의 생물학적 및 이화학적 특성 분석

- 가. 항균활성 우수 균주 동정
- 나. 항균활성 우수 균주의 생장 특성 분석
- 다. 후보균주 배양 상등액에 대한 미국 부저병 원인균 생장 억제 조사

3. 항생기능을 갖는 물질 분석 및 특성 연구

- 가. Probiotics 물질 추출 및 정제
- 나. Probiotics 물질의 특성
- 다. 타 약제와 연계 또는 혼합사용 가능성

4. 기확보균주를 이용한 in vivo 실험 적용

- 가. Bee egg 및 Bee larvae에 의한 probiotics후보의 저항성 test의 설계 및 적용(AFB, *Nosema*)
- 나. 1차 선발된 probiotics 후보의 *Nosema* 감염봉군 적용 및 수밀력, 월동력 검사
- 다. 1차 선발된 probiotics후보의 봉군 적용 및 자연 수밀력, 산란력 검사
- 라. 봉군 단위 예방효과검증을 위한 저·고준위 경쟁 감염실험(AFB, *Nosema*)
- 마. Probiotics 처리군에 대한 월동력, 수밀력, 산란력 측정

5. 봉군에 대한 Probiotics 균주 적용 및 치료 효과

6. 대량 생산 시스템의 확립 및 시제품 제작

- 가. 액상 발효조를 이용한 대량 생산 시스템 확립
- 나. 시제품 개발 및 안정성 검사

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내외 기술 개발 현황

- 가. 국내외적으로 항생제 내성 부저병 균주의 출현과 꿀벌 제품에서의 항생제 잔류 문제를 해결하기 위하여 시나몬 정유를 이용한 미국부저병 방제[5]와 방향 식물로부터 추출한 정유를 이용한 미국부저병 방제[6], 꿀벌 프로폴리스의 미국부저병 방제[7]등 국내외에서 식물과 프로폴리스를 이용한 친환경적인 항생제 대체 꿀벌 질병 방제의 연구 및 개발이 진행되고 있음
- 나. 꿀벌 장내로부터 분리된 *Bacillus sp.*의 미국부저병 방제[8], 신규 젖산생성균의 미국부저병 방제[9]등의 세균의 미국부저병의 방제에 관한 연구가 선행되었으나, 항균 물질이 정의되지 않았고 꿀벌의 *in vivo* assay가 진행되지 않았으므로 그에 관한 연구가 필요하며 꿀벌의 노제마병에 대한 무항생제 노제마병 질병 방제제에 대한 연구 성과가 없으므로 친환경적인 노제마병 방제제에 대한 연구 및 개발이 필요함
- 다. 최근 CCD에 대한 연구가 세계적으로 확산되면서 중국의 경우 동양종 꿀벌의 바이러스 진단 및 치료를 위한 기술 개발 중
- 라. 국내에서도 꿀벌에서 노제마 진단 관찰 및 병원체 분리 기술은 미국 및 선진 국가와 대등한 기술 보유하고 있으나, 질병 억제에 대한 연구는 미비한 실정임
- 마. 현재 꿀벌 질병의 친환경적 종합 방제 연구를 저항성 계통 육종과 병행하여 추진하고 있으며, 꿀벌이 수행하는 화분매개 기능의 중요성을 확인하고 꿀벌의 생존이 인류의 생존에 미치는 영향과 연계하여 연구가 진행되고 있으며, 꿀벌 응애를 비롯한 매개충의 방제 등 다각도의 예방법이 연구되고 있음

제 2 절 국내외 기술 개발 현황에서 차지하는 위치

- 가. 각종 바이러스, 미생물, 원생생물 및 해충에 대한 양봉농가의 방제 방법은 농가마다 각기 독특한 방법으로서의 방제가 이루어지고 있으며 이런 이유로 올바르게 못한 방법으로서의 방제가 이루어지면서 꿀을 포함한 양봉산물에의 항생제 잔류와 같은 문제점이 일어남
- 나. 본 연구에서는 항생기능이 우수하고 친환경적인 bee-probiotics 개발로 감염성 질병의 피해를 최소화하여 양봉가의 이윤을 극대화 하고, 항생제 잔류문제와 내성균주의 출현에 대한 발생 원인을 근본적으로 차단하기 위해 연구를 진행함

- 다. 기존의 화학합성 항생제를 대체할 수 있는 프로바이오틱스를 산업화하여 보급함으로써 현재 문제가 되어 있는 항생제 잔류 문제를 해결하고 항생제 내성에 관한 근본적인 차단효과를 통한 고품질의 봉산물 브랜드를 확립하여 소비자들의 신뢰도를 높임으로서 양봉산업의 활성화에 도움이 될 수 있음

- 마. 건강한 꿀벌들을 확보해 품질 좋은 벌꿀과 안정적인 봉산물을 생산, 농가소득 향상에 기여할 것으로 전망됨. 꿀벌은 양봉산물 생산 뿐 아니라 농작물 화분매개와 식물 생태계 보전 등 국내농업에 큰 도움을 줄 것으로 사료됨

- 라. 친환경적인 천연항생소재개발로 봉군의 손실이 감소하며, 봉산물의 생산량의 증가 및 품질향상을 통한 국내시장의 활성화 및 국제시장에서의 국산 제품의 경쟁적 우위를 확보가 기대됨

- 바. 국내 생산 양봉산물의 항생제 및 기타 유해약제의 잔류성을 최소화 하여 식품의 안전성을 높이고 동시에 품질을 향상시켜, 중국산 등의 저가, 저 위생품질의 수입 양봉산물과 질적 차별화를 추구함으로써 국내의 시장을 견고히 보호하고 또한 국내 양봉의 국제화(수출)에 크게 기여할 수 있음

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 미생물 자원 확보

1. *Paenibacillus larvae* subsP. *larvae* KCTC 3744에 대한 항균활성 우수 균주의 탐색

김치로부터 *Paenibacillus larvae* subsP. *larvae* KCTC 3744에 대한 항균활성이 우수한 균주를 확보하기 위하여 200종 이상의 김치를 대구, 경북, 경기도, 전라도 일대의 67여 곳에서 수집했다. 김치로부터 산 생성 균주를 분리하기 위하여 김치를 십진 희석한 후 산 생성 선별배지인 BCP agar와 유산균 선택 배지인 MRS agar를 사용한 분리 실험 결과 3,500 여종의 유산균을 분리했다. 이 중에서 미국 부저병의 원인균인 *Paenibacillus larvae* subs. *larvae* KCTC 3744에 대해 paper disc assay를 시행하여 항균활성 능력을 검사했다. positive control로 항생제 tetracycline(100ppm)을 비교 사용하였으며, 항균능이 tetracycline보다 강하면 grade A(+++), 유사하면 grade B(++), 약하면 grade C(+)를 부여하여 항균력이 우수한 15종의 균주를 확보하였다(표3-1-1).

표. 3-1-1 *Paenibacillus larvae* subsP. *larvae* KCTC 3744에 대해 항균활성을 가지는 유산균(15종)

No.	strain designatoin	media & culture condition	source & geographical origin	antibiotic activity
1	YML004	MRS-37℃	Kimchi	+++
2	KM20	MRS-37℃	Kimchi	+++
3	PX342	MRS-37℃	Kimchi	++
4	PX310	MRS-37℃	Kimchi	++
5	PX358	MRS-37℃	Kimchi	++
6	PX236	MRS-37℃	Kimchi	+
7	PX239	MRS-37℃	pig feces	+
8	PX243	MRS-37℃	Kimchi	+
9	PX264	MRS-37℃	Kimchi	+
10	PX269	MRS-37℃	Kimchi	+
11	PX270	MRS-37℃	Kimchi	+
13	PX277	MRS-37℃	Kimchi	+
14	PX306	MRS-37℃	Kimchi	+
15	PX308	MRS-37℃	Kimchi	+

표.3-1-2 *Paenibacillus larvae* subsP. *larvae* KCTC 3744에 대해 항균활성을 가지는 우수 유산균(4종)

No.	species	strain designatoin	media & culture condition	source & geographical origin
1	<i>Lactobacillus plantarum</i>	YML004	MRS-37℃	Kimchi
2	<i>Leuconostoc citreum</i>	KM20	MRS-37℃	Kimchi
3*	<i>Lactobacillus plantarum</i>	YML001	MRS-37℃	Kimchi
4	<i>Pediococcus parvulus</i>	YML002	MRS-37℃	Kimchi

1~2 년차 분리 선별 결과 최종 25종의 항균 우수균주를 선별 할 수 있었으며, 그 중 항균능력이 가장 우수한 grade A의 균주 4종이 최종 선별되었다(표 3-1-2). 선별되어진 4종 : *Lactobacillus plantarum* YML001, *Pediococcus parvulus* YML002, *Lactobacillus plantarum* YML004과 *Leuconostoc citreum* KM20은 특히 출원을 진행했다. 항균활성이 가장 뛰어난 균주인 *Lactobacillus plantarum* YML001, *Lactobacillus plantarum* YML004는 그 균주의 특성과 생리활성 물질을 정제하여 최종단계인 제품을 개발을 위한 실험을 실시했다.

2. *Nosema trichoplusiae* ATCC 30702에 대한 항균활성 우수 균주의 탐색

Paenibacillus larvae subs. *larvae* KCTC3744에 대한 항균활성이 우수한 유산균을 이용하여, *Nosema trichoplusiae* ATCC 30702에 대한 항균활성을 실시했다. *Nosema apis*는 분양과 인공 배양이 불가하므로 유연관계가 가깝고 분양이 가능한 *Nosema trichoplusiae* ATCC 30702와 ATCC CCL-80 (Antheraea cells, Ovrian tissue, Moth, Antheraea eucalypti)을 분양 받아 실시하였다(그림 3-1-1).

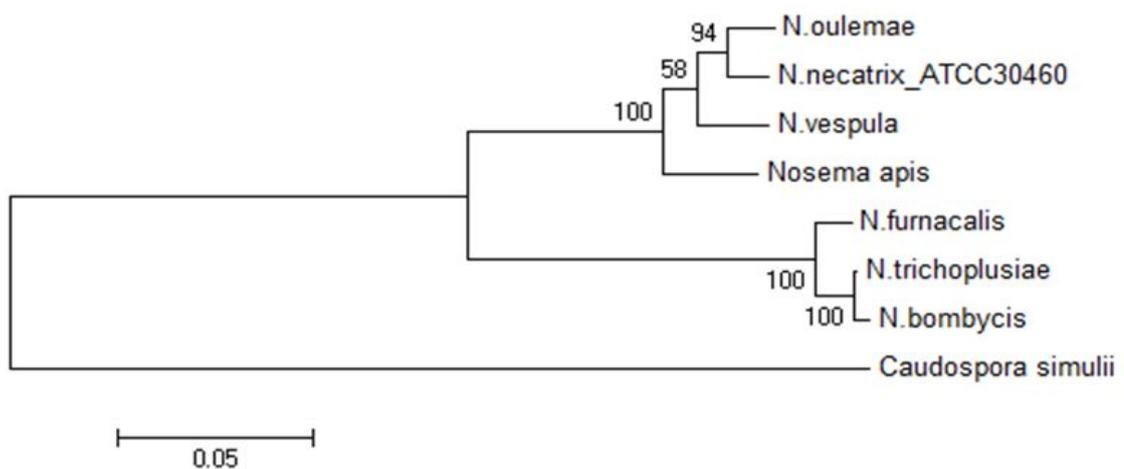


그림 3-1-1. *Nosema trichoplusiae* ATCC 30702의 계통 분류학적 위치

실험을 실시한 결과 *Nosema trichoplusiae* ATCC 30702는 *Nosema apis*에 감염된 꿀벌에서 일어나는 병증을 나타내었다. ATCC CCL-80은 culture medium (Grace's insect medium, 79%; heat-inactivated fetal bovin serum, 10%; whole egg ultrafiltrate, 10%; bovine plasma

albumin, 1%)를 사용하여 24℃로 CO₂ incubator에서 cell culture했다. 96well에 ATCC CCL-80을 1 × 10⁵ cell/ml을 분주하고 발아된 *Nosema trichoplusiae* ATCC 30702를 감염시켜 35℃에서 3일 동안 배양한 후, 유산균의 상등액 50μl을 분주하여 억제 양상을 살펴보았으나 포자의 발아를 측정 할 수 없었다(그림 3-1-2).

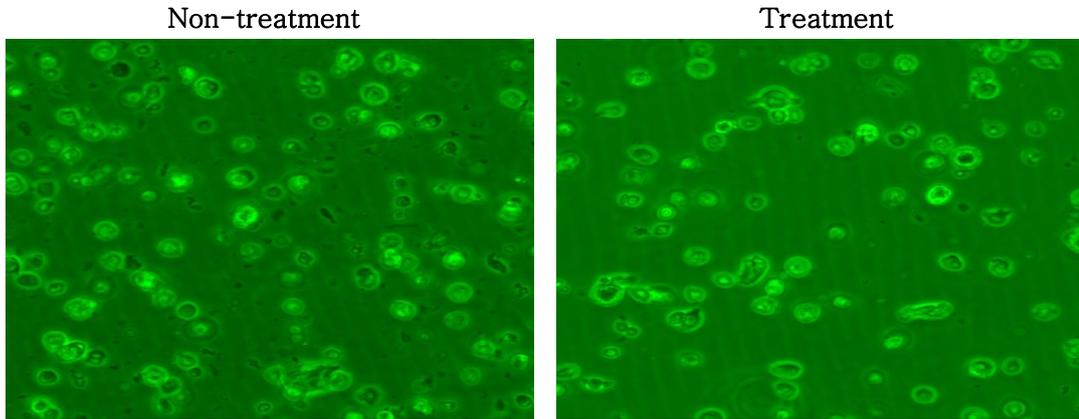


그림 3-1-2. ATCC CCL-80 cell line에 *Nosema trichoplusiae* ATCC 30702의 감염 실험

Nosema trichoplusiae ATCC 30702의 항균활성을 확인하기 위하여 누에를 사용한 직접 감염 법[10, 11]을 모색했다. 누에 egg 20,000개를 25℃/ 7day 배양하여 누에가 5cm 이상 자랄 때까지 배양했다. 성충 누에 사료(누에인공사료 / 에누에용인공사료 / 잠업진흥원)에 *Nosema trichoplusiae* ATCC 30702의 포자(1.5 × 10⁴ spores/ml)를 혼합시켜 먹인 후 27℃, 3일간 *Nosema trichoplusiae* ATCC 30702를 누에 체내에서 배양 했다. 그 결과 누에의 감염된 *Nosema trichoplusiae* ATCC 30702의 포자는 발아하지 못하였으며 실질적인 포자의 감소도 일어나지 않았다(그림 3-1-3).

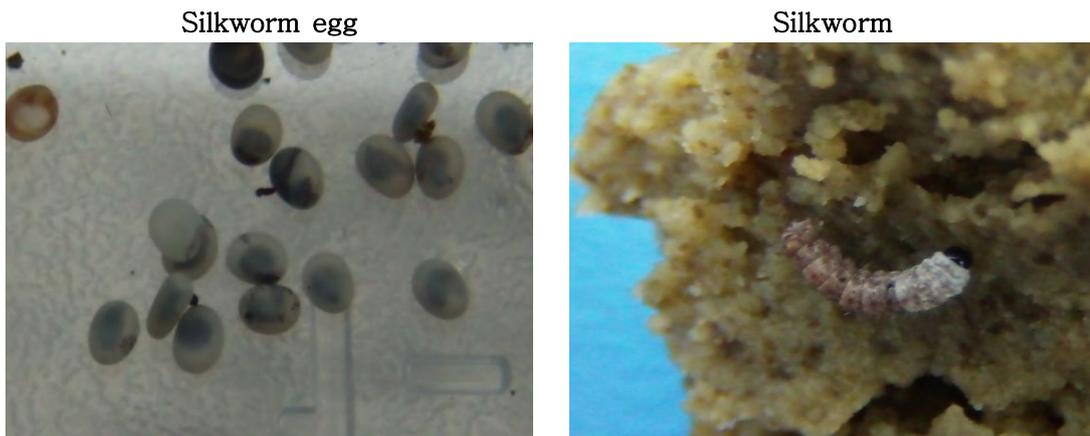


그림 3-1-3. Silkworm에 *Nosema trichoplusiae* ATCC 30702의 감염 실험

Nosema trichoplusiae ATCC 30702의 항균활성을 확인하기 위하여 협동기관인 경기대학교에서 분양 받은 꿀벌을 사용했다. *Nosema trichoplusiae* ATCC 30702의 포자 발아를 유도하기 위해 꿀벌 사료인 설탕물(Sugar solution)에 *Nosema trichoplusiae* ATCC 30702의 포자(1.5 × 10⁴ spores/ml)를 혼합 후 접종했다. 5개의 시험군으로 나누어 실험을 실시하였다(표 1-2-1). 5개의 시험군을 7일간 배양한 후 꿀벌 장내에서 *Nosema trichoplusiae* ATCC 30702의

포자수를 측정하였으며, 꿀벌의 몸통 부분을 갈아 증류수에 희석한 후 10 ul를 취하여 hemocytometer의 V-모양의 홈에 loading하여 현미경(X100)으로 관찰하였다(표 3-1-3, 그림 3-1-4).

표 3-1-3. 꿀벌에 대한 *Nosema trichoplusiae* ATCC 30702의 항균활성

Group	Treatment
양봉군	None
Positive control	설탕물 (Sugar solution, 5ml)
Negative control	설탕물 + <i>N. trichoplusiae</i> (1.5×10^4 spores/ml)
<i>L. plantarum</i> YML004	설탕물 + <i>N. trichoplusiae</i> + <i>L. plantarum</i> YML004의 상등액 500ul(0.1%)
<i>Leu. citreum</i> KM20	설탕물 + <i>N. trichoplusiae</i> + <i>Leu. citreum</i> KM20의 상등액 500ul(0.1%)
<i>L. plantarum</i> YML001	설탕물 + <i>N. trichoplusiae</i> + <i>L. plantarum</i> YML001의 상등액 500ul(0.1%)

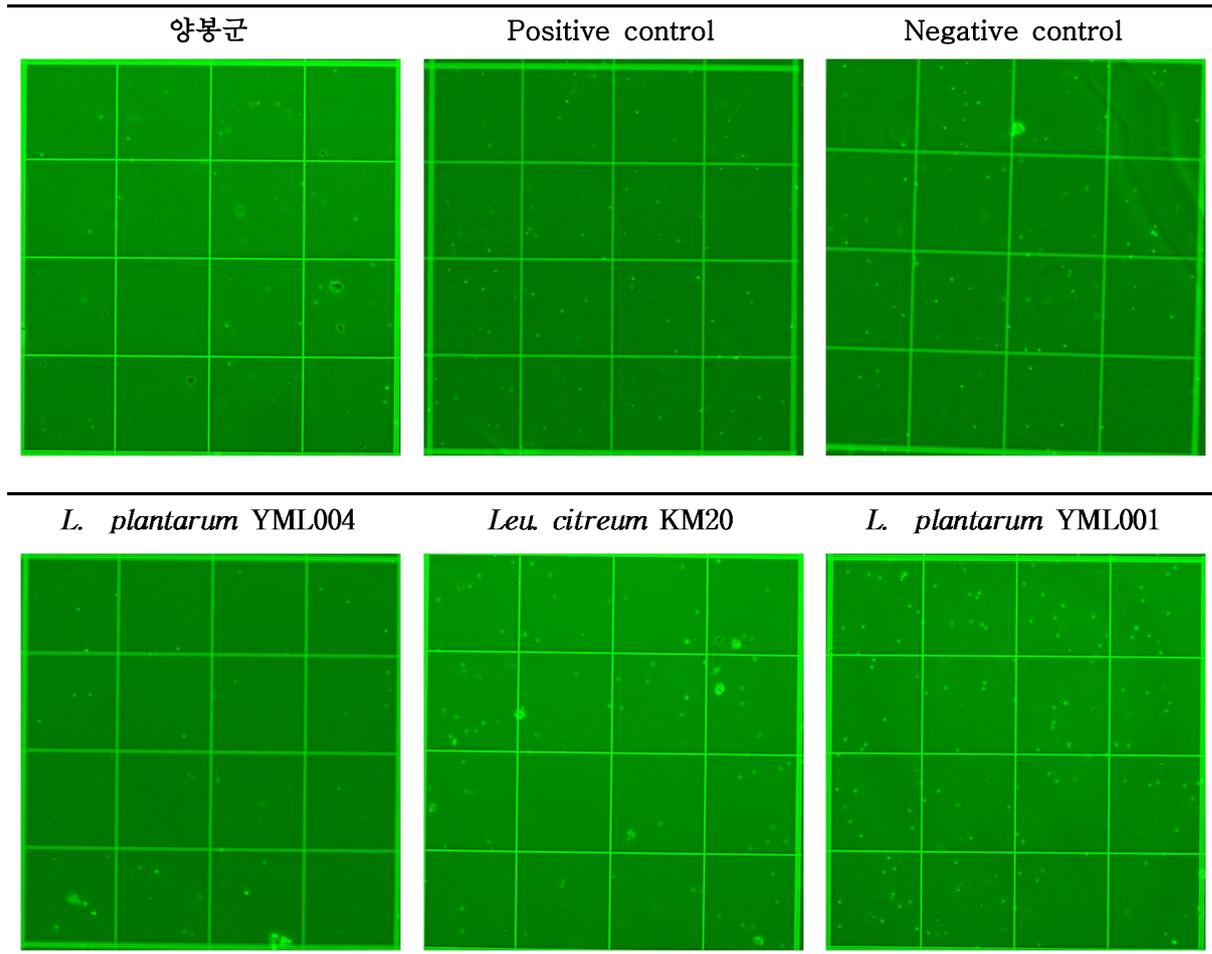


그림 3-1-4. Hemocytometer를 이용한 *Nosema trichoplusiae* ATCC 30702의 포자 확인 (현미경, X100)

꿀벌에서 7일간 배양된 *Nosema trichoplusia* ATCC 30702의 포자수를 측정된 결과 *L. plantarum* YML004을 투여한 시험군에서 *Nosema trichoplusia* ATCC 30702 만 배양된 시험군 보다 약 100배의 포자 발아가 억제됨을 확인 할 수 있었으며, *Leu. citreum* KM20 과 *L. plantarum* YML001도 비슷한 결과를 확인 할 수 있었다(그림 3-1-5).

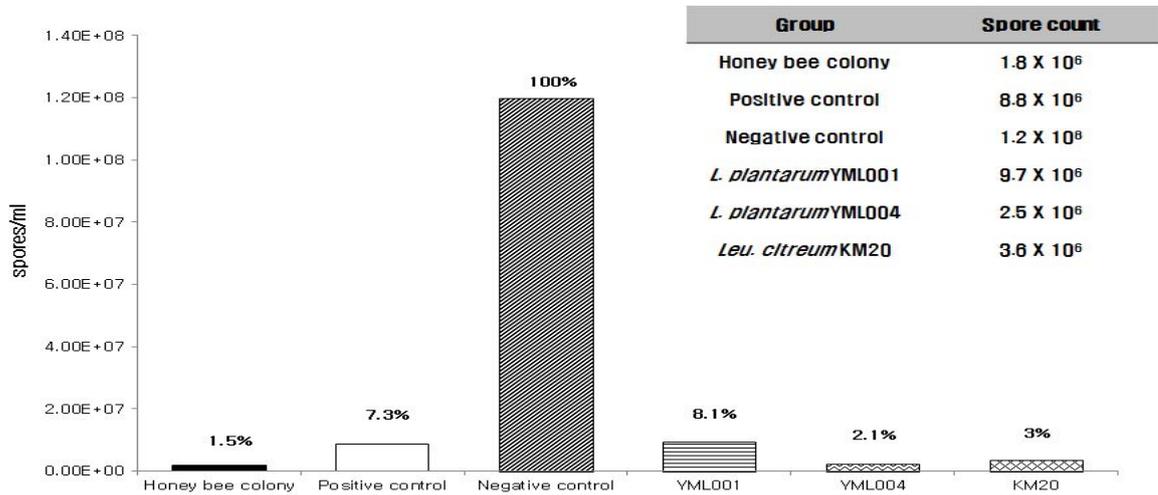


그림 3-1-5. Hemocytometer를 이용한 *Nosema trichoplusia* ATCC 30702의 포자발아 측정

꿀벌 실험을 통하여 2차년도에서 *Paenibacillus larvae* subs. *larvae* KCTC 3744에 대한 항균 활성 우수균주로 선발된 *L. plantarum* YML004이 *Nosema trichoplusia* ATCC 30702의 감염을 억제 시킬 수 있는 결과를 확인 했다. *L. plantarum* YML004의 처리 전후의 꿀벌 내에서의 *Nosema* 유전자량을 PCR을 통하여 비교하기에 앞서 먼저 control과 *Nosema* 처리 시료, *L. plantarum* YML004 +*Nosema* 처리시료의 12종의 꿀벌 질병에 대한 감염 여부를 PCR을 이용하여 검사하였다(그림 3-1-6).

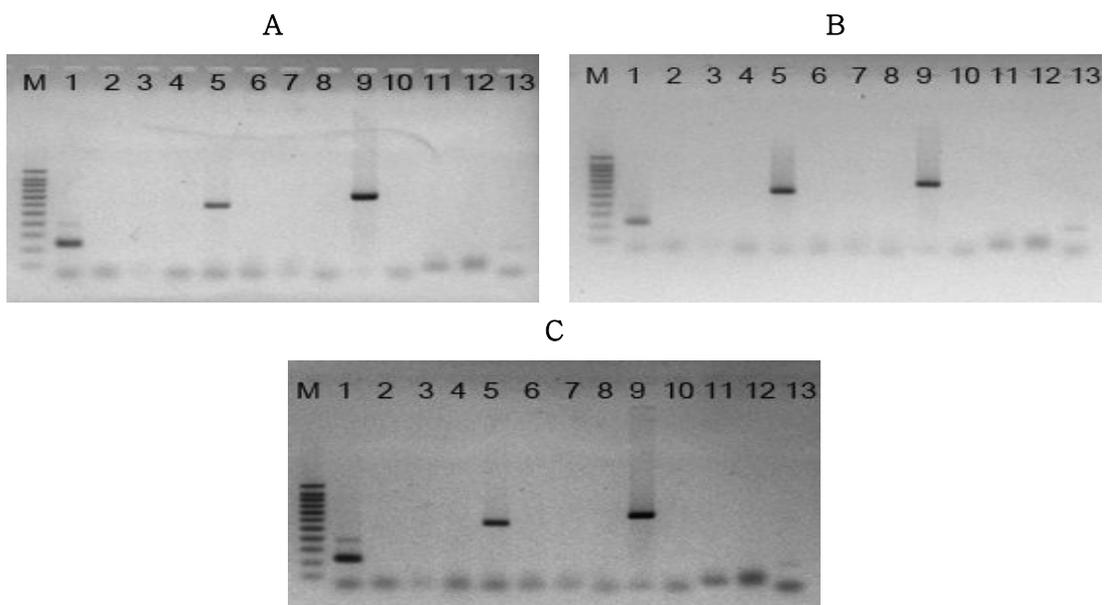


그림 3-1-6.. 병원균 및 바이러스성 질병에 대한 특이 PCR 진단 결과

각 시료의 12종의 꿀벌질병에 대한 감염여부를 PCR을 이용하여 진단했다. PCR 증폭산물은 1.5%의 agarose gel 상에서 100V로 전기영동하여 EtBr로 염색후 UV상에서 관찰되었다. A는 control, B는 *L. plantarum* YML004 + *Nosema* 처리시료 C는 *Nosema* 처리시료의 진단 결과를 나타내며, lane 별로 AFB(1), EFB(2), 백묵병(3), 석고병(4), *Nosema*(5), SBV(6), ABPV(7), DWV(8), BQCV(9), KBV(10), CBPV(11), IAPV(12)의 진단 결과를 나타내고, lane 13은 bee beta-actin을 나타낸다. 시료 모두에서 AFB와 *Nosema* BQCV의 특이 유전자가 증폭되었음을 확인했다. 본 실험은 각기 다른 gel 이므로 동일한 gel 상에서의 증폭 비교가 필요할 것으로 판단되어 동일한 PCR 증폭산물을 같은 gel 상에서 다시 전기영동 하였다(그림3-1-7).

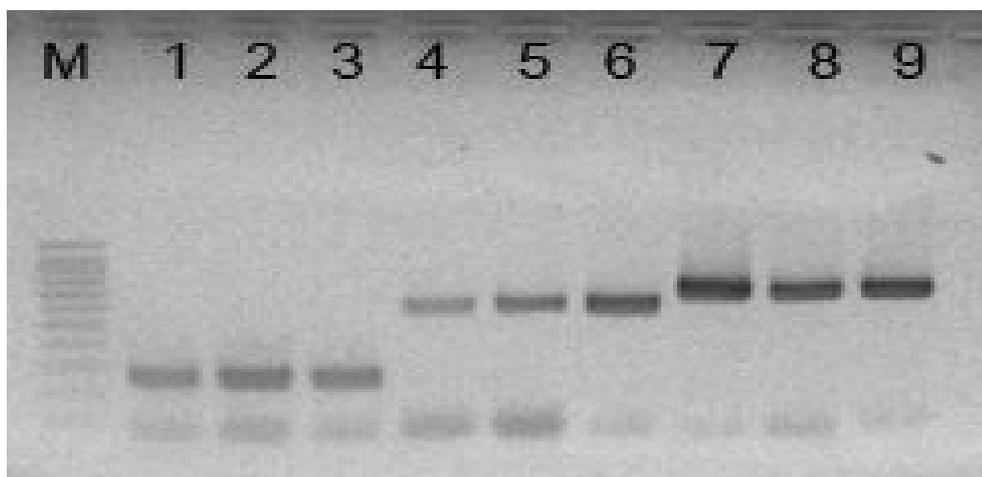


그림 3-1-7. 질병별 시료에 따른 증폭 비교

진단 결과에서 증폭이 확인된 AFB, *Nosema*, BQCV에 대한 PCR 증폭산물을 동일한 gel 상에서 동량을 전기영동하여 그 증폭 정도를 비교했다. Lane 1-3은 AFB, lane 4-6은 *Nosema*, lane 7-9는 BQCV에 대한 진단결과를 각각 나타내며, 질병별로 control, *L. plantarum* YML004 + *Nosema* 처리 시료, *Nosema* 처리 시료의 순으로 나타내었다. 전기영동 결과는 image analysing system(Syngene, UK)을 이용하여 수치화하였다(표 3-1-4, 그림 3-1-8).

표 3-1-4. 질병별 시료에 따른 증폭 정도 비교

	AFB	<i>Nosema</i>	BQCV
Control	7848	5645	17626
<i>L. plantarum</i> YML004 + <i>Nosema</i>	10678	9125	13571
<i>Nosema</i>	9293	14270	14617

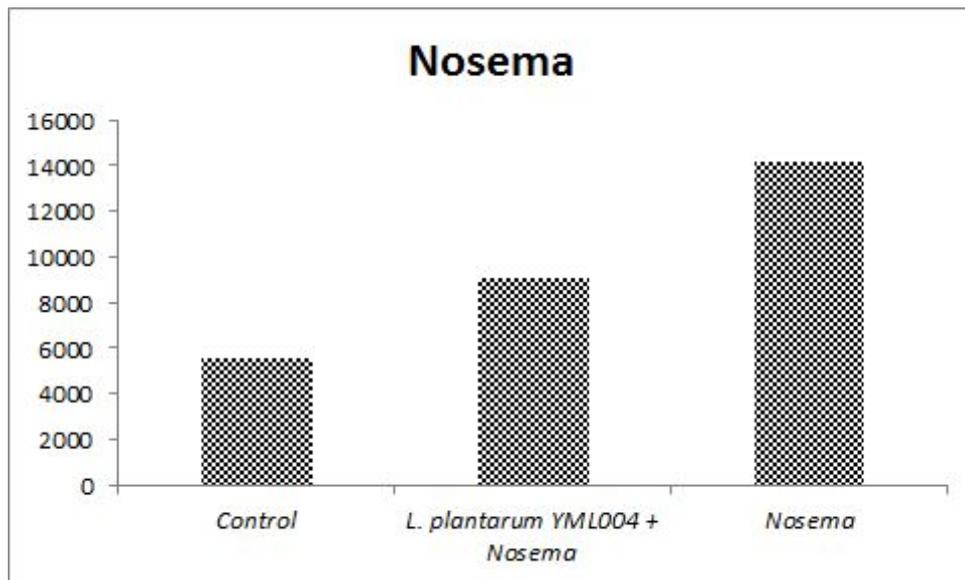


그림 3-1-8.. 시료별 *Nosema* 유전자 검출량 비교

전기영동 결과를 분석한 결과, AFB와 BQCV에서는 처리 전후를 비교 했을 때, *L. plantarum* YML004에 의해 영향을 받았다고 보기 미미한 변화를 나타내었다. 단, *Nosema*의 경우 control과 비교 했을 때, 두 종류의 처리 시료 모두에서 *Nosema* 유전자 검출이 증가됨을 확인하였고, *L. plantarum* YML004 + *Nosema* 처리 시료가 *Nosema* 만 처리한 시료에 비해 증폭 정도가 낮음을 확인했다. 이 결과는 *L. plantarum* YML004를 함께 처리한 시료에서의 *Nosema*의 양이 *Nosema*만 처리한 시료에 비해 적다는 것을 의미한다.

제 2 절 후보균주의 생물학적 및 이화학적 특성

1. 항균활성 우수 균주 동정

Paenibacillus larvae subs. *larvae* KCTC 3744에 강한 항균작용을 나타내며 동시에 *Nosema*에 강한 억제능력을 가지는 우수한 3균주를 선정하여 16S ribosomal DNA sequence를 이용한 분자계통분류학적 동정을 실시했다. 항균활성 균주의 16S rDNA 서열의 상동성을 확인하기 위하여 미국 국립정보센터(NCBI : National Centre for Biotechnology Information)의 BLAST를 사용하여 실시하였다 (ClustalW programme of the BioEdit software (Ibis Therapeutics, Carlsbad,CA)(그림 3-2-1). 선별 항균활성 우수 균주 중 *Leu. citreum* KM20은 full genome sequence가 되어있는 균주[12]로 분자계통분류학적 동정 결과를 참고하였다(그림 3-2-2).

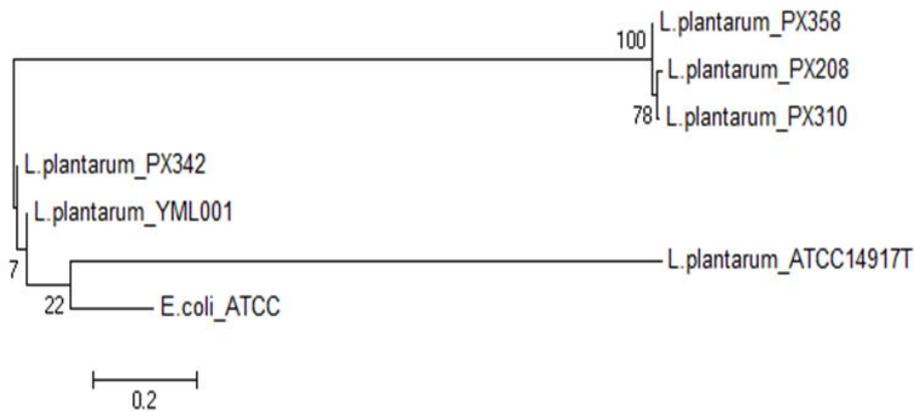


그림 3-2-1. 항균우수 균주의 계통분류학적 위치

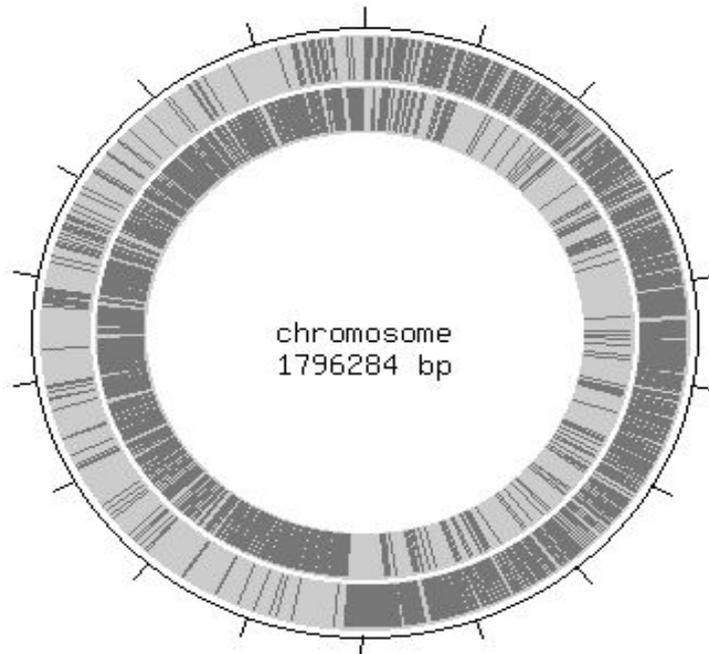


그림 3-2-2. *Leuconostoc citreum* KM20의 full genome

16S rDNA PCR을 통한 동정은 전 배양된 균체를 BioDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kits을 이용하여 상법에 따라 선발균주의 total DNA를 분리 하여 TE buffer에 희석 시킨 후 PCR 반응을 했다. PCR반응은 10X EF-Taq buffer 2.5 μ l, 10mM sNTP (T) 0.5 μ l, primer (F-10p) 1.0 μ l, 0.5 μ l, primer (R-10p) 1.0 μ l, EF-Taq (2.5U) 0.25 μ l, Template 1.0 μ l, DW 25 μ l를 첨가하여 반응했다. 증폭은 프로그래밍 된 DNA mini cycler(Veriti[™] 96-Well Thermal Cycler, Applied Biosystems)에서 수행했다. PCR 반응 조건은 먼저 95 $^{\circ}$ C에서 15분간 denaturation하고, 30주기 동안 95 $^{\circ}$ C에서 20초간 denaturation, 50 $^{\circ}$ C에서 40초간 annealing, 72 $^{\circ}$ C에서 1분 30초간 extension하여 마지막으로 72 $^{\circ}$ C에서 5분간 extension을 수행하였다(표 3-2-1).

표 3-2-1. 16S rDNA 서열분석을 통한 상동성 확인

strain	Genus species	Homology
YML001	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99%
YML004	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99%
KM20	<i>Leuconostoc citreum</i>	100%

2. 향균활성 우수균주의 성장특성

Paenibacillus larvae subs. *larvae* KCTC3744와 *Nosema trichoplusiae* ATCC 30702에 우수한 향균능력을 가진 균주의 성장 특성 및 성장 시간에 따른 향균능력을 측정했다. 각 균주를 121 $^{\circ}$ C에서 15 min동안 멸균한 뒤 pH 6.5로 조정된 MRS broth에 1 %접종하여, 3시간 간격으로 sampling을 실시했다. 각 시간별 sample은 유산균의 생균 OD_{600nm}와 생균수, 배양액의 pH, 향균활성 측정을 위해 paper disc assay를 실시했다.

표 3-2-2. 시간 별 *Lactobacillus plantarum* YML001의 특성

시간 (hrs)	OD _{600nm}	생균수	pH	<i>P. larvae</i> subs. <i>P. larvae</i> 의 OD _{600nm} (감소량)	향균활성(mm)
0	0.077	9.80E+05	6.1	1.353	-
3	0.089	2.30E+06	6.0	1.202	-
6	0.191	1.70E+07	5.4	1.162	-
9	1.234	2.90E+08	4.6	1.023	-
12	2.126	3.20E+09	4.2	0.939	-
15	2.195	4.10E+09	4.3	0.142	16
18	2.381	5.60E+09	4.1	0.150	16
21	2.427	6.20E+09	4.1	0.135	22
24	2.447	6.50E+09	4.1	0.165	17
30	2.427	6.10E+09	3.9	0.158	18
36	2.536	6.90E+09	3.9	0.398	19

Tetracycline (100ppm) 주입시 *P. larvae* subs. *larvae*의 OD_{600nm} : 0.136

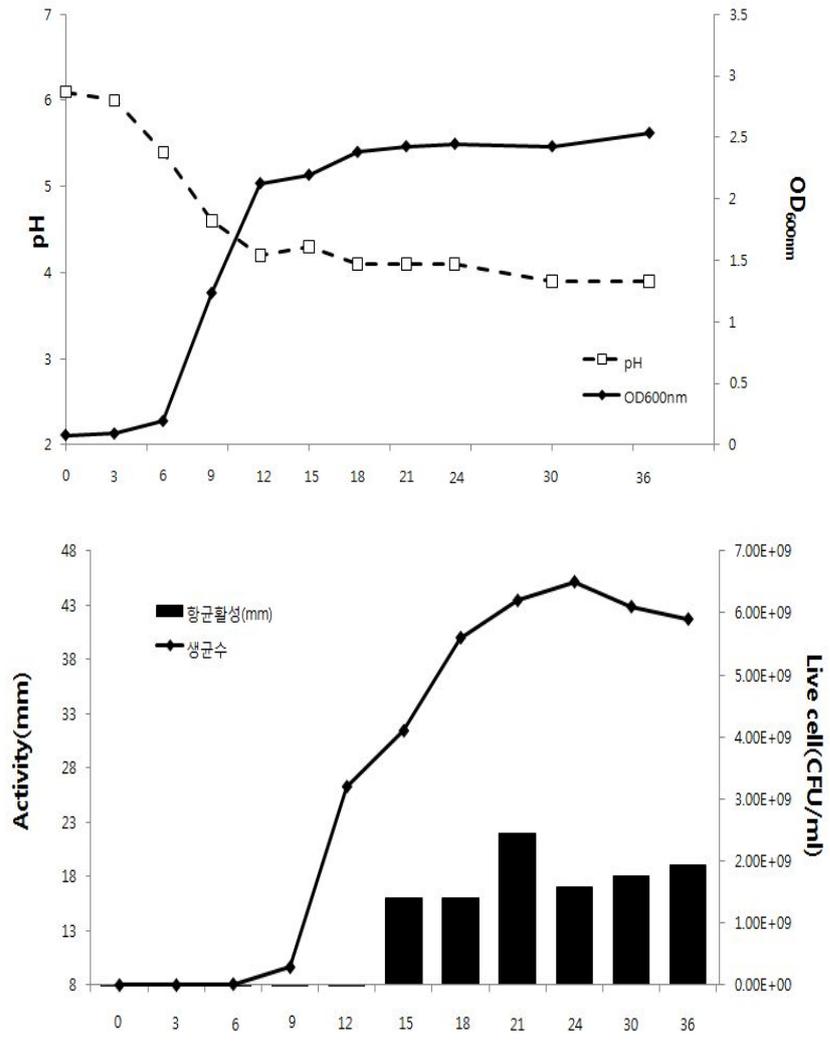


표 3-2-3. 시간 별 *Lactobacillus plantarum* YML004 의 특성

시간 (hrs)	OD _{600nm}	생균수	pH	<i>P. larvae</i> subs $P. larvae$ 의 OD _{600nm} (감소량)	항균활성(mm)
0	0.068	2.30E+06	6.0	1.028	-
3	0.094	3.30E+06	6.0	1.230	-
6	0.153	8.60E+07	6.0	1.217	-
9	0.729	1.70E+07	5.6	0.923	-
12	2.071	1.29E+08	4.4	0.745	-
15	2.458	2.00E+09	3.9	0.221	18
18	2.680	3.40E+09	3.8	0.174	19
21	2.710	5.70E+09	3.8	0.154	25
24	2.902	6.00E+09	3.7	0.167	24
30	2.742	6.02E+09	3.6	0.203	22
36	2.856	6.00E+09	3.6	0.193	22

Tetracycline (100ppm) 주입시 *P. larvae* subs. *larvae*의 OD_{600nm} : 0.146

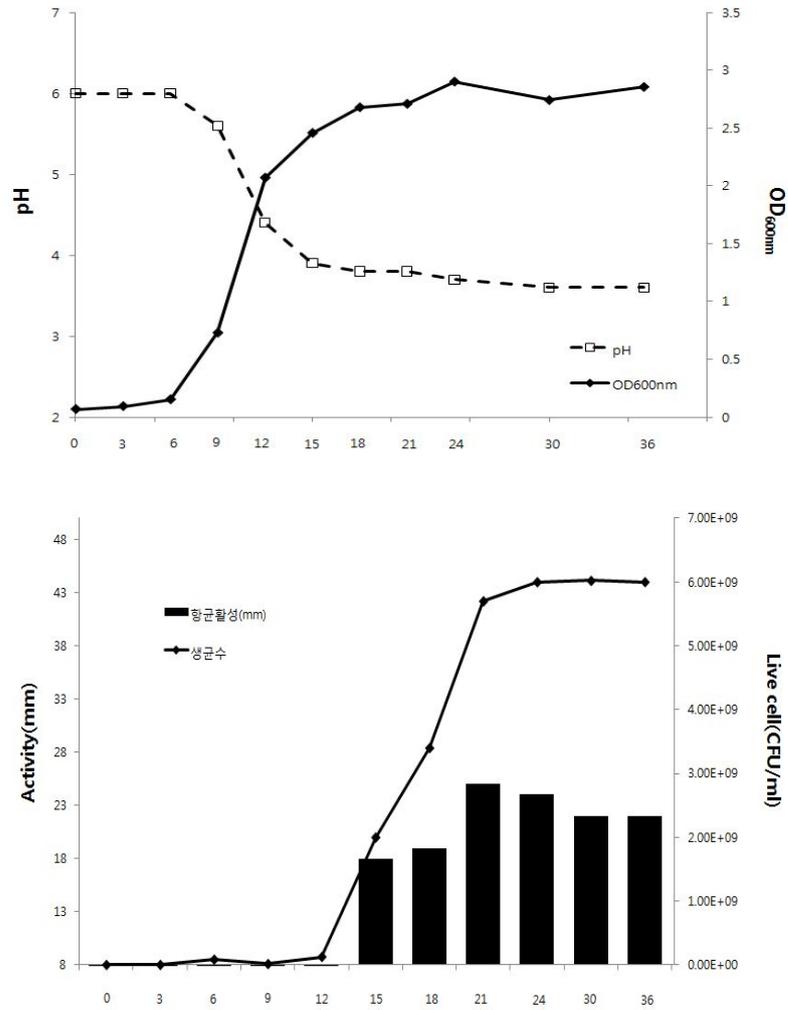
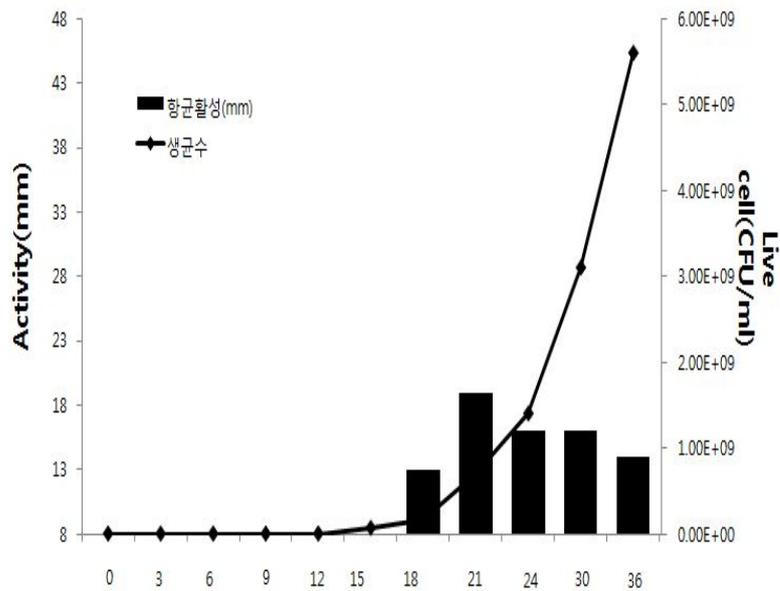
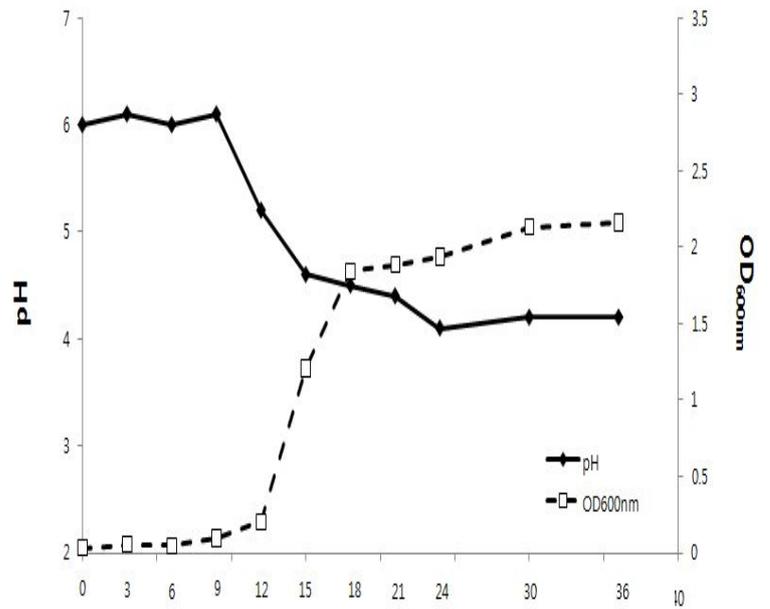


표 3-2-4. 시간 별 *Leuconostoc citreum* KM20의 특성

시간 (hrs)	OD _{600nm}	생균수	pH	<i>P. larvae</i> subs. <i>larvae</i> 의 OD 600nm(감소량)	항균활성(mm)
0	0.030	5.20E+05	6.0	1.133	-
3	0.054	6.30E+05	6.1	1.085	-
6	0.045	8.00E+05	6.0	1.143	-
9	0.095	1.20E+06	6.1	1.081	-
12	0.204	1.78E+06	5.2	0.633	-
15	1.208	6.80E+07	4.6	0.180	-
18	1.842	1.70E+08	4.5	0.170	13
21	1.882	6.90E+08	4.4	0.157	19
24	1.936	1.40E+09	4.1	0.176	16
30	2.131	3.10E+09	4.2	0.200	16
36	2.159	5.60E+09	4.2	0.224	14

Tetracycline (100ppm) 주입시 *P. larvae* subs. *larvae*의 OD_{600nm} : 0.146



항균활성은 선발된 균주 3종 모두 21시간 배양된 상등 농축액에서 *L. plantarum* YML001은 22mm, *L. plantarum* YML004은 25mm, *Leu. citreum* KM20은 19 mm로 clear zone diameter 가 측정되어 최대 항균활성을 나타내었다. 선발된 균주가 *Paenibacillus larvae* subs. *larvae* KCTC3744에 항균력을 가장 강하게 나타낸 배양 시간이 21시간이었으므로, *Paenibacillus larvae* subs. *larvae* KCTC3744 생장률 억제 실험에 선발 균주 상등액의 harvest time을 21시간 배양으로 적용했다(표 3-2-2, 표 3-2-3, 표 3-2-4). 또한 항생제인 테트라사이클린과 선발된 우수 균주의 항균활성을 비교한 결과, 선발 균주 상등 농축액의 항균력이 우수하거나 유사했다(표 3-2-5).

표 3-2-5. 테트라사이클린과 선발된 우수 균주의 항균활성 비교

<i>L. plantarum</i> YML001 상등 농축액		<i>L. plantarum</i> YML004 상등 농축액		<i>Leu. citreum</i> KM20 상등 농축액	
Loading (농축배수)	Clear zone (mm)	Loading (농축배수)	Clear zone (mm)	Loading (농축배수)	Clear zone (mm)
50ul (×1)	0	50ul (×1)	0	50ul (×1)	0
100ul (×2)	15	100ul (×2)	15	100ul (×2)	0
500ul (×10)	22	500ul (×10)	25	500ul (×10)	19
100 ppm tetracycline			20		

3. 후보균주 배양 상등액에 대한 미국 부저병 원인균의 생장억제 조사

Paenibacillus larvae subs. *larvae* KCTC3744의 배양 조건 상태에서 선별된 항균 우수균주의 작용을 알아보기 위하여 항균활성 우수 균주 3종의 상등액을 첨가하여 성장물의 변화를 관찰했다. *Paenibacillus larvae* subs. *larvae* KCTC3744를 3% 접종하였으며, 배양 조건은 100ml, 37°C이다.

Paenibacillus larvae subs. *larvae* KCTC3744의 배양시작 후 11시간째에 선발된 유산균 3종의 항균활성이 가장 우수한 21시간 배양 상등액을 병원균 배양액의 10%, 20% 첨가하여 OD_{600nm} 흡광도를 측정했다.

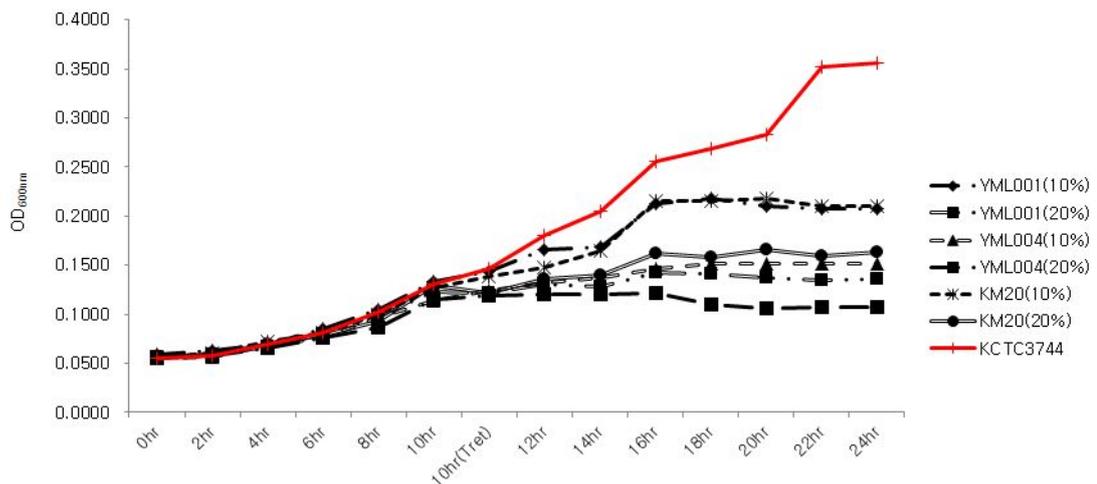


그림 3-2-3. *Paenibacillus larvae* subs. *larvae* KCTC3744 성장 그래프

선별된 유산균이 처리한 시험구는 유산균을 처리하지 않은 시험구보다 *Paenibacillus larvae* subs. *larvae* KCTC3744의 성장(■)을 억제시켰으며, 특히 *L. plantarum* YML004 (20% 처리구, ■)는 약 70% 정도의 성장을 억제시켰다(그림 3-2-3).

제 3 절 기 확보된 후보균주로부터 항생 기능을 갖는 물질 분석 및 특성 연구

1. Probiotics 물질의 추출 및 정제

항균활성 최우수균주로 선발된 *L. plantarum* YML001, *L. plantarum* YML004, *Leu. citreum* KM20를 각각 1L MRS 액체배지에서 37 °C, 정치조건으로 21시간 배양 했다. 배양된 각 우수균주의 배양액을 6,000rpm, 4 °C, 15분 원심분리 하여 상등액과 균체를 분리 후 사용했다. 농축한 상등액에 0.1M NaOH를 처리 pH를 6.3 ~ 6.8로 조정하여 중화한 후 paper disk assay를 시행하였다(표 3-3-1).

표 3-3-1. 상등 농축액과 0.1M NaOH로 중화한 상등 농축액의 항균력 차이

<i>L. plantarum</i> YML001 clear zone diameter(mm)		<i>L. plantarum</i> YML004 clear zone diameter(mm)		<i>Leu. citreum</i> KM20 clear zone diameter(mm)	
×10 농축 상등액	0.1M NaOH 처리	×10 농축 상등액	0.1M NaOH 처리	×10 농축 상등액	0.1M NaOH 처리
22	16	25	20	19	16

농축한 상등액에 0.1M NaOH를 처리 결과, 10배 농축 상등액보다 *L. plantarum* YML001은 활성이 28%, *L. plantarum* YML004은 20%, *Leu. citreum* KM20은 16% 감소하는 것으로 나타났다. 또한 항균물질이 peptide성 물질인지 확인하기 위하여 bradford assay를 통한 총단백질량을 측정된 결과, 항균활성능이 가장 우수한 배양 시간 구간의 상등액에 포함된 단백질 총량은 초기 접종시 단백질 총량과 비슷하였다(그림 3-3-1).

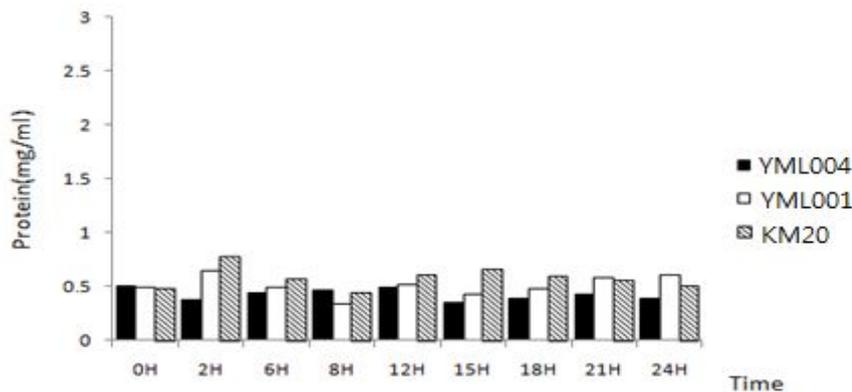


그림 3-3-1. bradford assay를 이용한 단백질 총량 분석 (YML004)

상등액의 활성물질을 추출하기 위해 hexan, chloroform, ethyl acetate, butanol을 용매로 하여 분리 하였으며(그림 3-2-2), 분리 된 층은 감압농축 후 paper disc assay (50µl, 37 °C, 24h)로 활성도를 측정했다.

가. *Lactobacillus plantarum* YML001 생리활성 물질 분리 및 정제

항균활성 최 우수균주로 선발된 *L. plantarum* YML 001을 1L MRS 액체배지에서 37 °C, 정치조건으로 24 시간 배양 했다. 배양된 *L. plantarum* YML 001을 6,000rpm, 4 °C, 15 분 원심분리 하여 상등액과 균체를 분리 후 사용했다. 상등액의 활성물질을 추출하기 위해 hexan, chloroform, ethyl acetate, butanol을 용매로 하여 분리 하였으며, 분리 된 층은 감압농축 후 paper disc assay (50 μ l, 37 °C, 24h)로 활성도를 측정했다. 회수된 상등액은 선택 용매인 ethyl acetate로 2회 반복 추출 후 감압농축을 실시했다. 이 추출물을 소량의 ethyl acetate에 녹인 후 ethyl acetate-methanol (1 : 1), ethyl acetate를 전개 용매로 하여 preparative TLC (thin layer chromatography, Merck, silica gel 60F254)를 이용한 활성물질의 확인을 실시했다. 활성물질은 존재는 UV detector 및 12-Molybdo phosphoric acid n-hydrate 발색시약으로 측정했다. 항균물질의 정제를 위하여 1g의 추출물을 사용하여 silica gel column chromatography를 실시했다. 이때, ethyl acetate-hexan을 용매계로 하여 단계적으로 극성용매의 비율을 높이면서 (1 : 5 \rightarrow 40 : 1) column chromatography (\varnothing 2 \times 20cm)를 실행했다. 획득한 분획은 TLC를 이용하여 물질의 존재를 확인한 후 각 분획을 활성검사를 실시했다. 활성검사는 BHI soft agar (0.75% agar)에 *Paenibacillus larvae* subsP. *larvae* 5% 접종한 배지를 사용하여 paper disc assay 실시했으며 이때 생성되는 억제정도를 측정하여 활성 분획을 판단했다. 활성물질의 물리 화학적 특성 조사와 구조 동정을 실시하기 위하여 활성이 나타나는 분획을 감압농축 후 nuclear magnetic resonance (NMR) spectrum을 측정했다. 이때, 활성물질을 CDCl₃ 녹인 후 tetramethyl silane (TMS)을 내부표준물질로 하여 Bruker NMR spectrometer (400 MHz)로 측정을 실시했다. *L. plantarum* YML 001에서 분리한 항균물질은 노란색의 액상 물질이었으며, ethyl acetate, butanol 에는 가용성이나 hexan에서는 불용성인 것으로 나타났다.

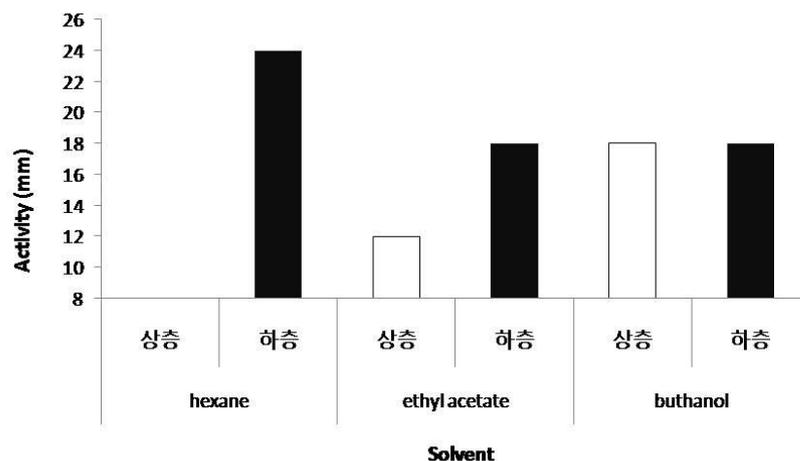


그림 3-3-2. 항균물질 추출을 위한 용매의 선택

항균물질의 추출용매로는 *Paenibacillus larvae* subs. *larvae*에 감수성이 없는 hexan, ethyl acetate, chloroform 중에서 항균물질을 추출 할 수 있는 ethyl acetate가 선택되었다(그림 3-3-3).

항균물질의 정제를 위하여 먼저 1L 배양액에 ethyl acetate를 가하여 1차 추출을 시도 하여 EtOAc : MeOH= 1 : 1를 전개 용매로 실행한 결과 2개의 Spot을 확인 하였으며 ethyl acetate 사용하여 2회 반복 추출 후, 잔류 항균물질의 추출을 위하여 butanol을 용매 로 사용하여 추출을 시도했다. 추출된 물질의 존재는 TLC를 실행하여 확인한 결과 ethyl acetate only에서 2개의 spot을 확인 할 수 있었다.



그림 3-3-3. 유기용매에 대한 *Paenibacillus larvae* subsP. *larvae*의 감수성

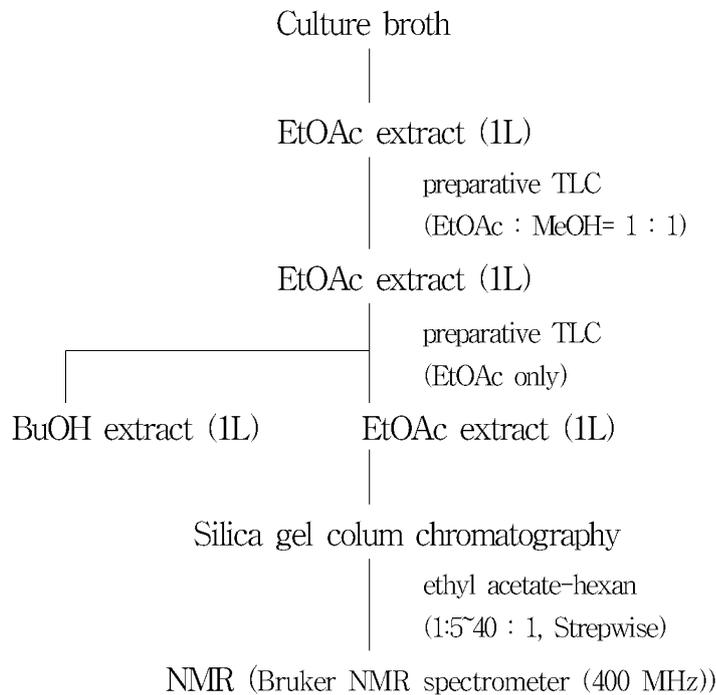


그림 3-3-4. Isoation procedure for *Lactobacillus plantarum* YML001

배양 상등액으로부터 추출한 항균물질의 UV-visible 흡수는 256nm에서 최대를 나타냈으며, ninhydrin, molybden등의 발색 시약에서 양성 반응을 나타내었다(표 3-3-2).

표 3-3-2. Physico-chemical properties of *Lactobacillus plantarum* YML 001

Analysis	Properties
Appearance	Yellow
UV λ_{max} nm	256
Colour reaction	
ninhydrin	positive
molybden	positive
Solubility	
soluble	Butanol, CHCl ₃ , EtOAc
insoluble	hexan

1g의 추출물질을 silica gel chromatography(open column)로 정제를 시도한 결과 10~16번 분획에서 물질이 분리 되었으며 paper disc assay결과 항균활성을 나타내었다. *Paenibacillus larvae* subs. *larvae*에 대하여 항균력을 가지는 분획을 TLC 실시하여 항균 물질을 제외한 다른 물질에 대한 분리를 시도한 결과 10과 11번 분획에서 2개 이상의 spot이 발견되었다. NMR 분석은 위하여 다른 물질이 혼합된 10, 11 분획을 제외한 12~16 분획에 한하여 실행되었다. 활성물질의 구조는 proton-NMR spectra의 spectrum 해석에 의하여 수행되었다. proton-NMR spectra의 해석 결과, 4ppm 부근의 alcohol기와 1ppm 부근에 methy기를 관측할 수 있었고 4ppm과 1ppm의 비율은 1:3으로 나타났다(그림 3-3-5).

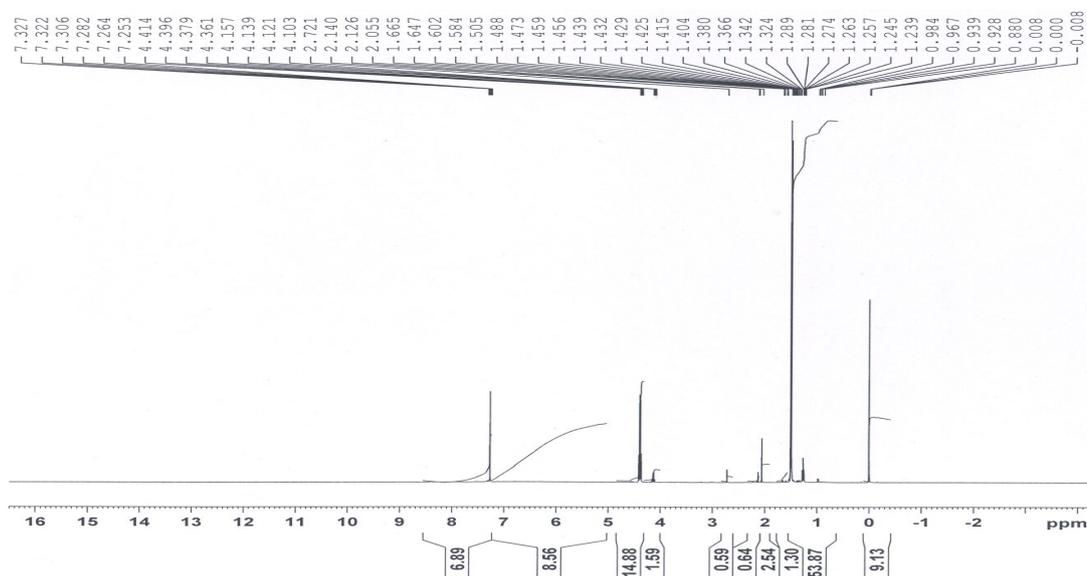


그림 3-3-5. proton NMR spectrum

활성물질을 다시 CDCl₃ 녹인 후 carbon NMR을 실행 한 결과 20ppm, 60ppm, 180ppm에서 peak를 관측 할 수 있었다 (그림 3-3-6). Proton / carbon NMR을 수행하여 물질의 구조 분석한 결과 *Paenibacillus larvae* subs. *larvae*에 대하여 항균력을 가지는 *Lactobacillus plantarum* YML001 생성 물질은 lactic acid와 유사한 물질로 판단된다.

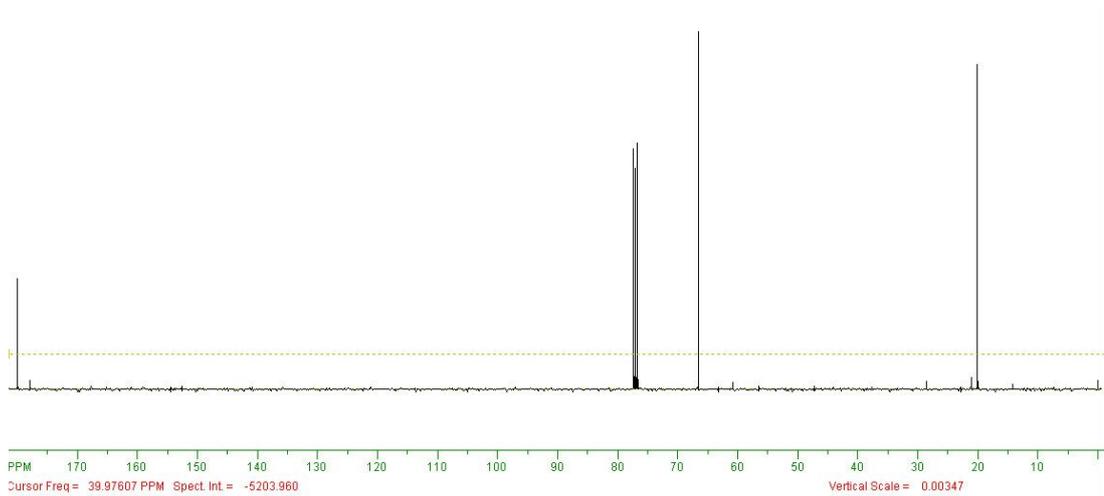


그림 3-3-6. carbon NMR spectrum

나. *Lactobacillus plantarum* YML004 생리활성 물질 분리 및 정제

항균활성 최 우수균주로 선발된 *L. plantarum* YML004을 *L. plantarum* YML001과 동일한 조건(1L MRS 액체배지에서 37 °C, 정치조건)으로 24시간 배양 했다. 배양된 *L. plantarum* YML 004을 6,000 rpm, 4 °C, 15 분 원심분리 하여 상등액과 균체를 분리 후 사용했다. 상등액의 활성물질을 추출하기 위해 hexan, chloroform, ethyl acetate, butanol을 용매로 하여 분리 하였으며, 분리 된 층은 감압농축 후 paper disc assay (50 μ l, 37 °C, 24h)로 활성도를 측정했다. 추출물의 항균활성은 BuOH에서 최대치를 보였으며 EtOAc 구획에서도 다소 활성이 나타나는 것으로 확인 되었다(그림 3-3-7).

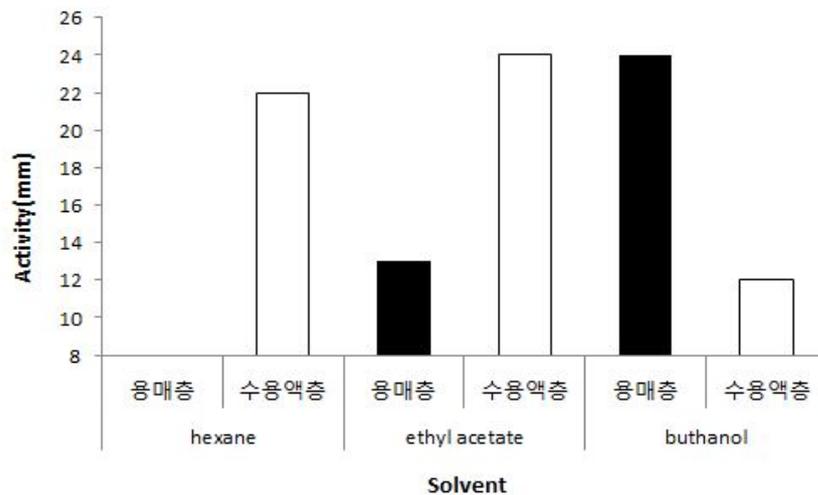


그림 3-3-7. 항균물질 추출을 위한 용매의 선택

회수된 상등액은 높은 순도의 추출물을 얻기 위하여 ethyl acetate로 2회 반복 추출후 수용액 층을 다시 BuOH/1L를 사용하여 추출 후 감압농축을 실시했다.

이 추출물을 2ml의 MeOH에 녹인 후 ethyl acetate-methanol (3 : 1)를 전개 용매로 하여 TLC (thin layer chromatography, Merck, silica gel 60F254)를 이용한 활성물질의 확인을 실시했다. 활성물질은 존재는 UV detector 및 12-Molybdo phosphoric acid n-hydrate 발색시약으로 측정하였다(그림 3-3-8).

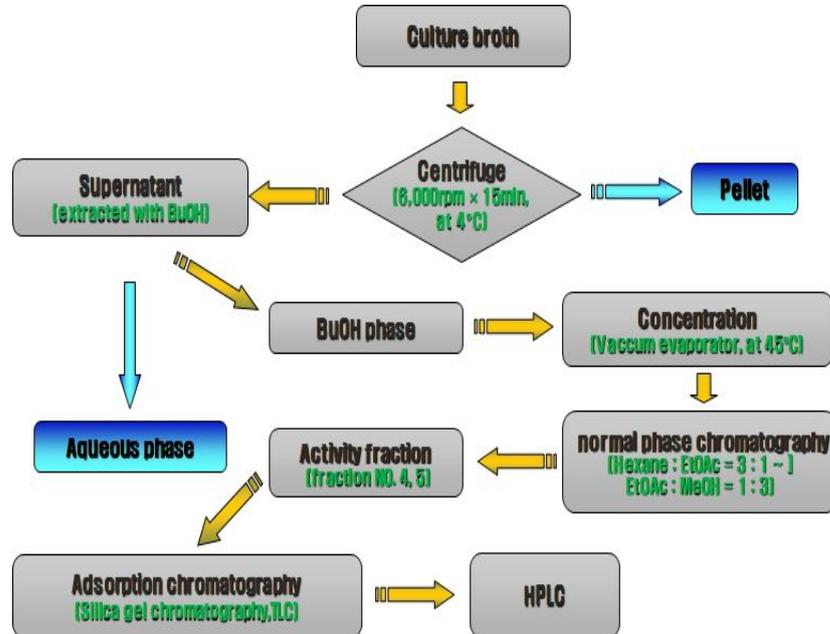


그림 3-3-8. 항균물질 추출 및 정제 모식도

배양 상등액으로부터 추출한 항균물질의 UV-visible 흡수는 256nm에서 최대를 나타냈으며, ninhydrin, molybden, Bromocresol purple의 발색 시약에서 양성 반응을 나타내었다 (표 3-3-3).

표 3-3-3. Physico-chemical properties of *Lactobacillus plantarum* YML004

Analysis	Properties
Appearance	Yellow
UV λ_{max} nm	256
Colour reaction	
ninhydrin	positive
molybden	positive
bromocresol purple	positive
Solubility	
soluble	Butanol, CHCl ₃ , EtOAc
insoluble	hexan

항균물질의 정제를 위하여 1g의 추출물을 사용하여 silica gel column chromatography를 실시했다. 이때, ethyl acetate-hexane을 용매계로 하여 단계적으로 이동상의 극성용매의 비율을 높이면서 (3 : 1 → 1 : 3) normal phase column chromatography (Ø2 × 20cm)를 실행하였다(표 3-1-3). 획득한 분획은 TLC를 이용하여 물질의 존재를 확인한 후 각 분획을 활성검사를 실시했다. 활성검사는 BHI soft agar (0.75% agar)에 *Paenibacillus larvae* subs. *larvae* 5% 접종한 배지를 사용하여 paper disc assay 실시했으며 이때 생성되는 억제환의 크기를 측정하여 활성 분획을 판단했다(표 3-3-4).

표 3-3-4. 이동상의 혼합비

Fraction no.	solvent	혼합비	억제환(mm)
1	Hexane : EtOAc	3 : 1	-
2	Hexane : EtOAc	2 : 1	-
3	Hexane : EtOAc	1 : 1	-
4	EtOAc	Only	+++
5	EtOAc : MeOH	3 : 1	++
6	EtOAc : MeOH	2 : 1	-
7	EtOAc : MeOH	1 : 1	-
8	EtOAc : MeOH	1 : 2	-
9	EtOAc : MeOH	1 : 3	-

각각의 fraction의 억제환을 관찰한 결과 EtOAc only와 EtOAc : MeOH = 3 : 1 fraction에서(no 4, 5)에서 22, 18mm의 억제환이 생성되었다(그림 3-3-9).

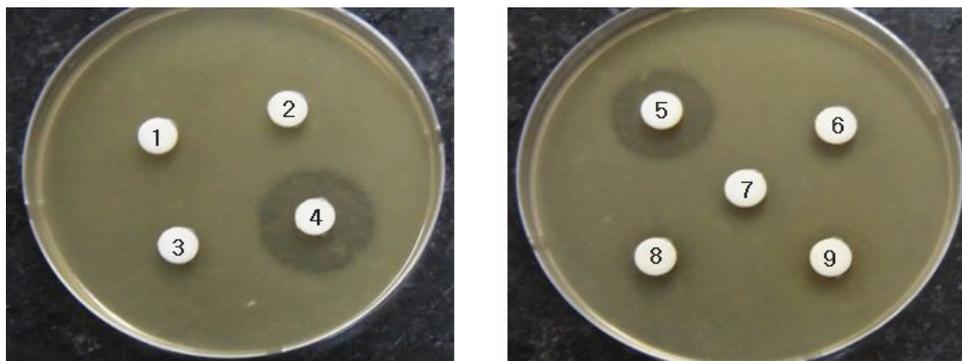


그림 3-3-9. fraction별 억제환

활성물질의 물리 화학적 특성 조사와 구조 동정을 실시하기 위하여 활성이 나타나는 분획을 감압농축 후 HPLC 분석을 실시했다. 이동상은 DW : acetonitrile(50% + 1%formic acid)를 사용하였으며, varian C18 column(250X4.6)/ flow rate 1.0 ml/min, UV 240nm에서 측정을 실시한 결과 3.78min에서 단일 peak가 측정되었다(그림 3-3-10).

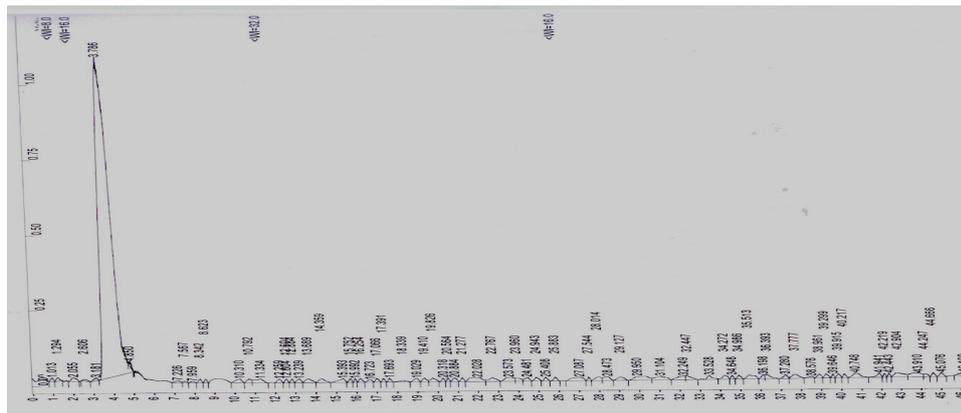


그림 3-3-10. HPLC 분석 결과

HPLC 분석에서 획득한 단일 peak의 물질을 MBL01로 명명했다. 항균활성 물질인 MBL01의 정밀한 물질 분석을 위해 MALDI-TOF(Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight) 분석을 실시했다. Matrix속에 원하는 단백질을 가두어 둔 상태에서 laser를 때려서 matrix를 이루는 물질을 ionization시키는 원리로, 여기서 이온화된 matrix가 전하를 원하는 샘플로 전이시켜 샘플의 이온화를 촉진한다. 이 분자이온들(M+, MH+, M-Na+ 등)이 전기장이 걸린 공간(flight tube)을 이동하면서 각각의 m/z 비율에 따라 이동하는 거리가 달라지므로, 결국 detector에 도달하는 시간들이 달라지며, 이 시간을 time of flight라고 하고 약자로 TOF라고 한다. National Sun Yet Shun University (NSYSU, Kaohsiung, Taiwan)에 분석 의뢰를 하였다.

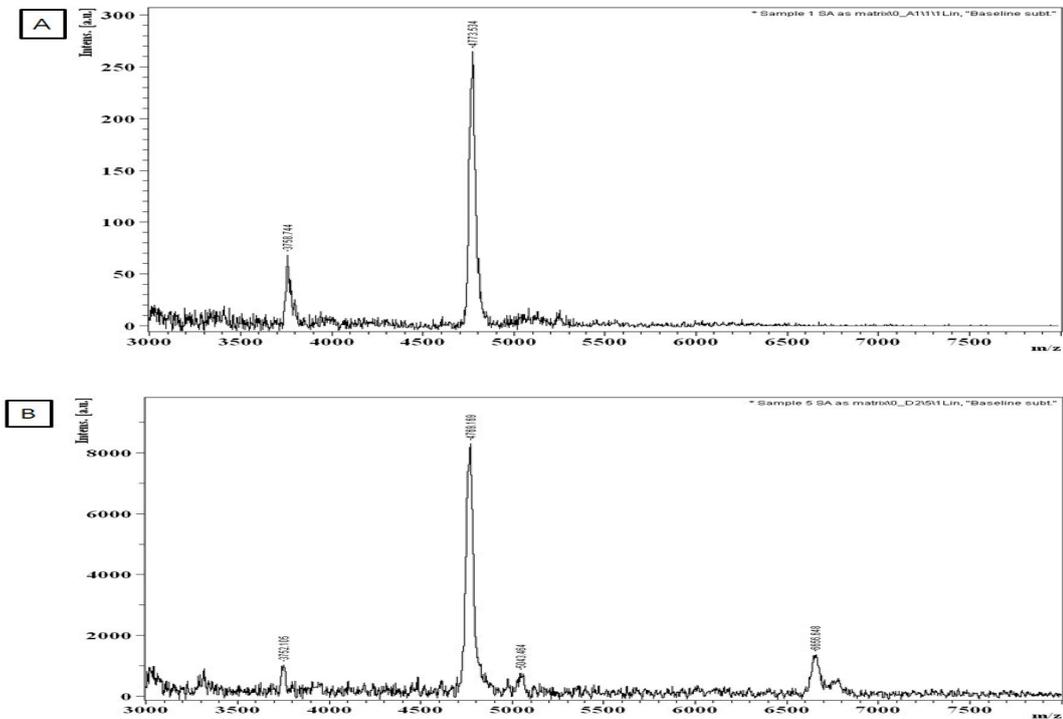


그림 3-3-11. MALDI-TOF 분석 결과

A : MRS(Difco, USA) medium peak, B : *L. plantarum* YML004 배양 상등액 peak

항균활성 물질인 MBL01의 MALDI-TOF 분석 결과, 유산균 증식 배지인 MRS와 동일한 분자량을 가진 두 곳의 peak 이외 다른 분자량을 가진 2가지 물질의 peak가 나타났다. 그 중 6656.648 m/z의 분자량을 가진 물질은 lactic acid이며, 5043.464 m/z의 분자량을 가진 물질을 확인 할 수 있었다(그림 3-3-11). 명확한 물질의 종류는 알 수 없었으나, 배지 및 유기산과 다른 물질이 포함되어 있음을 알 수 있었다. 따라서 선별되어진 *L. plantarum* YML001 보다 *L. plantarum* YML004이 더 잠재적 가치가 있다고 사료되어 진다.

2. Probiotics 물질의 특성

가. bee-probiotics의 활성 위치 탐색

선발된 물질의 위치가 endocellular 또는 exocellular 인지 확인하기 위하여 유산균주의 배양액을 원심분리하여 상등액과 균체를 분리했다. 상등액은 filtration한 뒤 50배 농축하여 준비하였고 균체는 배양액과 같은 pH4.5 0.2M potassium phosphate beffer와 혼합하한 뒤 초음파로 cell을 파쇄하여 10배 농축했다. 농축된 시료는 paper disc assay를 시행하여 항균력을 측정 한 결과, 상등액에서만 항균활성능이 있었으므로 선발된 물질은 exocellular substance 로 밝혀졌다. 따라서 후보물질을 획득하기 위한 cell 파쇄에 따른 불필요한 공정 없이 배양액만으로도 물질 추출이 용이하여 물질 회수에 따른 편리가 있을 것으로 사료된다.

나. Thermostability, pH stability

50배 농축된 상등액을 50 °C, 70 °C, 100 °C의 각 온도에서 10min, 20min, 30min, 60min / 121 °C에서 15min동안 열처리를 하여 paper disc assay를 했다. 또한, pH조정은 각 pH에 해당하는 buffer를 0.2M로 조정해 농축된 상등액에 처리하여 24hr동안 반응 후 pH 6.5로 조정하여 paper disc assay를 시행했다.

표 3-3-5. 온도 / 시간별 열처리에 따른 항균활성능 비교

처리 온도 / 처리 시간	<i>L. plantarum</i> YML001 억제환 지름(mm)	<i>L. plantarum</i> YML004 억제환 지름(mm)
50°C / 10min	16	17
50°C / 20min	17	17
50°C / 30min	17	17
50°C / 60min	17	18
70°C / 10min	19	20
70°C / 20min	18	18
70°C / 30min	17	17
70°C / 60min	18	18
100°C / 10min	17	18
100°C / 20min	17	18
100°C / 30min	17	17
100°C / 60min	17	17
121°C / 15min	17	17
Tetracycline (100ppm)	17	17

결과로 선발된 물질은 열처리, pH 조정을 하여도 항균 활성능이 유지되는 것을 확인하였으며 후보 물질이 양봉 사료(pH 3.2~4.5)[13]에 사용될 것을 감안하였을 때 pH stability spectrum이 broad하므로 외부 자극에 안정한 본 연구의 물질이 사료첨가제로 적합하다 사료 된다 (표 3-3-5, 표, 3-3-6) (그림 3-3-12).

표 3-3-6. pH 변화에 따른 항균활성능 비교

pH(buffer)	<i>L. plantarum</i> YML001	<i>L. plantarum</i> YML004
	억제환 지름(mm)	억제환 지름(mm)
2 (0.2M citrate buffer)	15	15
3 (0.2M citrate buffer)	15	15
5 (0.2M acetate buffer)	15	15
7 (0.2M phosphate buffer)	15	14
9 (0.2M tris-HCl buffer)	15	15
11(0.2M sodium carbonate buffer)	13	14
상등액 pH (pH 4.6)	16	16
Tetracycline (100ppm)	16	16

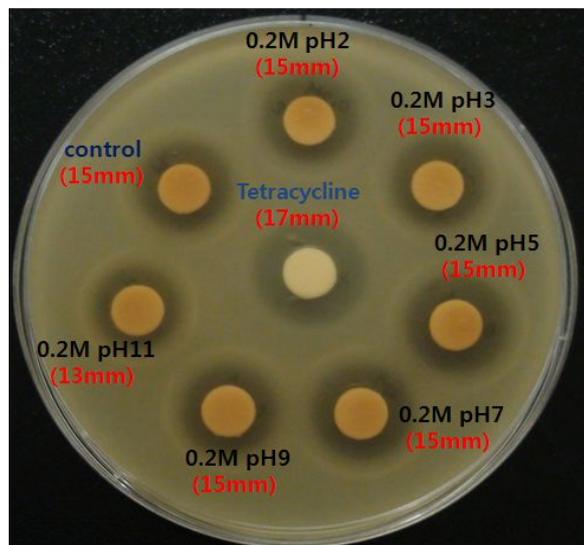


그림 3-3-12. pH 변화에 따른 항균활성능 비교

다. Enzyme stability

50배 농축된 상등액에 Protease K, Lipase, Trypsin, Pepsin, α -amylase를 처리하여 3 hr동안 반응시킨 후 100 °C에서 10min 간 효소 불활성화한 뒤 paper disc assay를 시행하였다 (표 3-3-7). 그 결과, 선발된 물질은 위 5종의 효소에 대해 감수성이 매우 적음을 확인하였다 (표 3-3-8, 그림 3-3-12).

표 3-3-7. 5종의 효소 반응 조건

Enzyme	Activity temperature	Activity time
Protease K	45~49℃	3hr
Lipase	37℃	3hr
Trypsin	37℃	3hr
Pepsin	37℃	3hr
α-amylase	37℃	3hr

표 3-3-8. 5종 효소와 후보물질 반응에 따른 항균활성 비교

시험구	억제환 지름(mm)
Protease K + YML001 상등액	17
Lipase + YML001 상등액	16
Trypsin + YML001 상등액	17
Pepsin + YML001 상등액	17
α-amylase + YML001 상등액	18
YML 001 상등액	17
Protease K + YML004 상등액	16
Lipase + YML004 상등액	16
Trypsin + YML004 상등액	16
Pepsin + YML004 상등액	17
α-amylase + YML004 상등액	19
YML004 상등액	18
Tetracycline (100ppm)	16

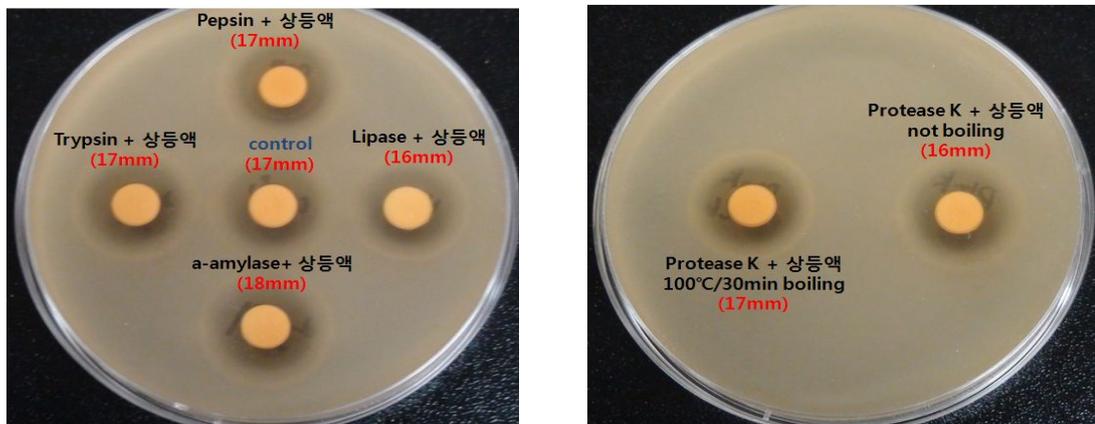


그림 3-3-12. 후보물질과 5종 효소의 작용에 따른 안정성 확인

라. 타 약제와 연계 또는 혼합사용 가능성

후보물질의 타 약제와 연계 또는 혼합사용이 시너지 작용을 조사하기 위하여 기존에 사용되는 항생제인 Tetracycline을 후보 균주의 상등액에 일정 비율로 혼합하여 항균활성 시험을 했다.

(1) 선발균과 병원균의 연계·혼합 약제에 대한 감수성 시험

선발균 *L. plantarum* YML001, YML004과 병원균 *Paenibacillus larvae* subsp. *laevae* KCTC3744가 Tetracycline에 대한 감수성 유무를 확인하고, 최소저해농도를 알기 위하여 Minimal inhibitory concentration법을 시행했다. Tetracycline은 1.0×10^6 ppm, 1.0×10^5 ppm, 1.0×10^4 ppm, 5,000ppm, 1000ppm, 500ppm, 250ppm, 100ppm, 50ppm, 40ppm, 30ppm, 20ppm, 10ppm, 5ppm 단위로 설정했다. 각 균의 선택배지로 soft agar(0.75%)를 5%접종한 후, 각 농도별 약제를 paper disc에 흡수시켜 assay를 하였고 억제환의 크기로 감수성을 확인했다. 그 결과, 선발균 *L. plantarum* YML001, YML004은 Tetracycline에 대해 내성을 가지는 것으로 나타났다. 병원균 *Paenibacillus larvae* subsp. *laevae* KCTC3744은 Tetracycline 20ppm의 농도부터 clear zone이 형성되어 이를 최소 농도로 정립하고 약제 혼합 실험에 사용했다. 선발균 *L. plantarum* YML001, YML004 두 균주 모두 Tetracycline에는 내성이 있었기 때문에 대량 배양에 이용할 시, 배지에 Tetracycline은 함께 섞어 배양하는 것이 공정상에 있어서 편리가 있을 것으로 보인다.

(2) 연계·혼합 약제와 Probiotics의 혼합 비율에 따른 항균활성 능력 확인

선발균의 50배 농축한 상등액과 최소억제농도의 Tetracycline을 비율에 따라 혼합하여 병원균에 대한 paper disc assay를 시행했다. 억제환의 크기로 항균활성능을 비교하였다(표 3-3-9).

표 3-3-9. Tetracycline과 *Lactobacillus plantarum* YML001의 혼합 비율

시험구	Tetracycline (20ppm) concentration	YML001의 상등액 concentration	YML001의 상등액 concentration
A	0	100	100
B	10	90	90
C	20	80	80
D	30	70	70
E	40	60	60
F	50	50	50
G	60	40	40
H	70	30	30
I	80	20	20
J	90	10	10
K	100	0	0

표 3-3-10. Tetracycline 혼합사용에 따른 항균 활성능 변화

시험구	조성 및 비율 (tetracycline:상등액)	<i>L. plantarum</i> YML001 억제환 지름(mm)	<i>L. plantarum</i> YML004 억제환 지름(mm)
A	0 : 100	16	15
B	10 : 90	16	16
C	20 : 80	15	15
D	30 : 70	15	15
E	40 : 60	14	16
F	50 : 50	15	15
G	60 : 40	14	14
H	70 : 30	13	14
I	80 : 20	12	13
J	90 : 10	12	12
K	100 : 0	11	12

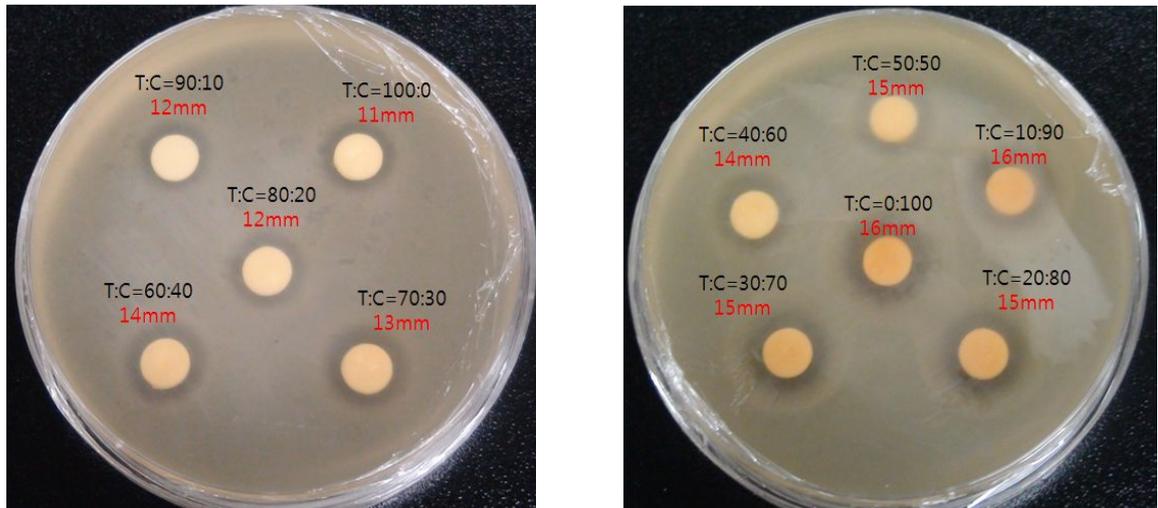


그림 3-3-13. Tetracycline 혼합사용에 따른 최적 활성 비율

20ppm Tetracycline과 상등액의 혼합 비율에 따라 실험한 결과, 상등액의 비율이 높아질수록 억제환의 크기가 대체적으로 증가하였지만, 일정 혼합 비율 이상에서는 더 이상 환의 크기가 커지지 않았다. 따라서 효율적인 혼합비율은 50 : 50 (v/v)이라 사료 된다(표 3-3-10 그림 3-3-13). 선별되어진 두 균주의 물질 특성은 거의 유사한 것으로 나타났으며 효소와 열안정성에서 *L. plantarum* YML004이 조금 뛰어난 것으로 나타났다.

제 4 절 1차 후보군주를 이용한 in vivo 실험 적용

1. Bee egg 및 Bee larvae에 의한 probiotics후보의 저항성 test의 설계 및 적용(AFB)

Bee pathogens에 대한 우수한 probiotics의 선발을 위하여 새로이 bee hive를 직접 이용하는 새로운 실험방법의 개발을 추구했다. 이 방법은 종래의 벌통 단위로 수행하던 1개 실험군을 bee hive내의 수천 cell의 각 개체 (individual)로 대치할 수 있는 것으로, 각 실험에서 3만 개체의 1개 벌통에서 보여줄 수 있는 1개 실험결과를, 1개 벌통에서 수천개 수준의 실험결과를 도출할 수 있는 가능성을 보여 주었다.

즉, 종래의 급성 또는 만성 toxicity test들은 1개 벌통을 최소단위로 chemical 또는 drug를 처리하며, 1개 벌통단위로 죽은 성체, larvae, egg등의 수를 계수하며, 벌통 내부의 무게, 성체 벌 전체의 무게 등을 측정했다. 이는 1개 chemical 또는 drug의 LD50을 측정하기 위하여도 수개 이상의 벌통이 소요되었으며, 수십 또는 수백의 후보약제 중 우수한 것을 선별하기 위하여는 수십 또는 수백 통의 벌통이 소요되어 그 실험규모를 감당하기 어려웠었다[14]

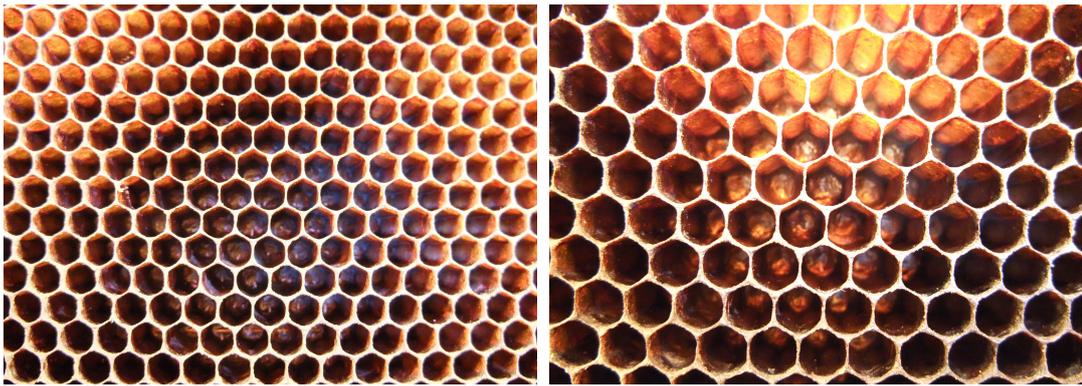


그림 3-4-1. Hive내 각 cell에 산란된 egg와 larvae

사진의 좌측은 산란 직후의 egg를 볼수 있으며, 각 egg들은 바닥면에 수직으로 서있기에 산란 후 수시간이내의 상태임을 보여준다. 한편 우측사진은 larvae로 발생된 것임

본 과제에서 고안하고 개발한 실험법은 꿀벌의 발생시간과 여왕벌이 알을 낳는 생태에 기반을 둔 것으로, 간단히, 왕성한 산란력을 보이는 여왕벌은 1개 hive의 1면에 짧은 시간대에 모든 cell에 알을 낳고 이는 인위적으로 넣어준 빈 hive에서도 같은 행태가 일어난다는 데 착안한 것이다. 이런 동시(synchronized) 산란은 산란전, 산란직후, larvae 직후 및 pupae 직적 약물의 처리가 가능하였다(그림 3-4-1).

개발이 진행됨에 따라 각 hive는 sector로 나누어 반복실험을 수행하는 것이 유리함을 알게 되었고, 이 sector들은 개체단위 및 개체수의 합 (sector당), 그리고 sector의 합으로 통계처리에 유리함을 보여 주었다. 그림 3-4-2는 sector의 분할 및 처치 과정을 보여준 것이다.

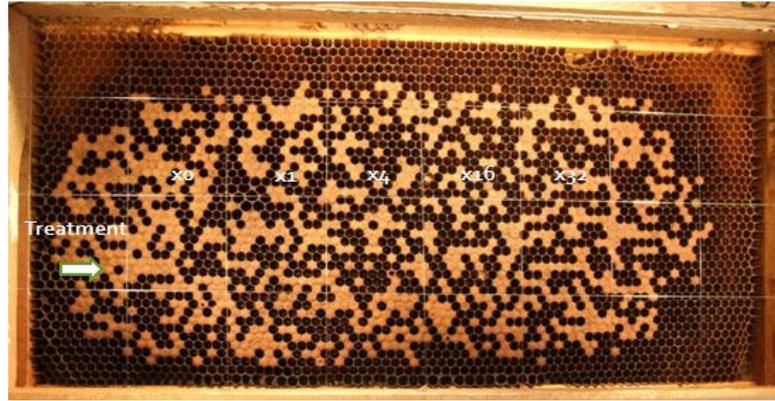


그림 3-4-2. 전체 hive를 사용한 4x8 sector

위의 사진은 4x8 sector를 사용한 것이며, hatching rate 측정시에 촬영된 것이다. cell이 어두운 부분은 그 시기에 따라 larvae상태에서 발생이 지연 또는 정지되어 capping을 하지 않은 것 또는 성공적인 발생이 진행되어 이미 hatch한 것들 2가지 경우에서 나타남

4x8 sector는 중국 길림성 양봉연구소에서 확립된 방법으로 각 5cm변의 정사각형으로 그 위치가 지정되어 꿀벌의 capping 및 hatching의 계수에 유리한 면이 있으나, hive의 상하에 따라 발생빈도가 달라지는 벌의 생태 때문에 일률적인 조건을 요구하는 drug test에는 불리한 점이 있었다. 따라서 본 과제에서는 새로로 산란면 전체를 커버할 수 있는 새로운 sector를 설정하였고, 이에 따른 전용 커버를 고안하여 이후의 실험에 사용했다.

1x9 sector는 가로로 3개의 cell이 들어갈 수 있도록 하였으며 세로로 16개의 cell이 포함되도록 했다. 또한 경계에 겹쳐진 cell은 계수에서 제외하였으며, 40개의 cell만을 계수 대상으로 하였다 (그림 3-4-3).

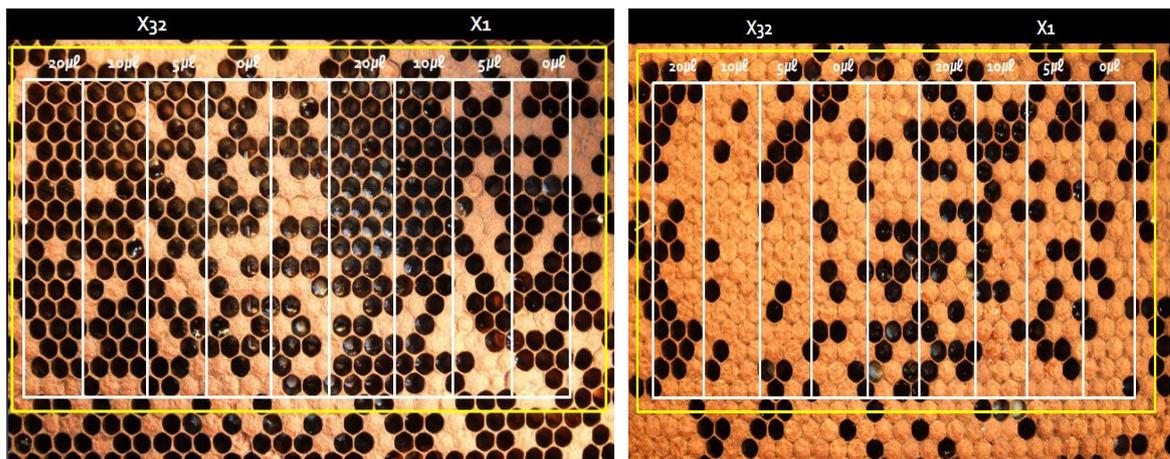


그림 3-4-3. 1x9 sector를 이용한 Capping rate의 측정

이들은 모두 1x9 sector를 사용한 것이며, 모두 capping rate를 측정시에 촬영된 것이다. 위의 사진에서 cell이 어두운 부분은 larvae상태에서 발생이 지연 또는 정지되어 capping을 하지 않은 것을 보여주며, 특히 20ul의 고용량 약제의 처리에서 capping이 지연되는 효과가 두드러짐을 보여 주었다. 또한 cell의 일부에서는 larvae가 생존하고 있는 것을 볼 수 있으며, 일부의 cell에서는 larvae가 치사되어 제거된 모양을 보여 줌

약제의 처리는 산란 전, 산란 직후, 산란 3일 후 및 pupae직전까지 수행하였으며, 이 중 산란 전은 Nurse 일벌들의 산란용 cell의 청소활동에 의하여 처리된 약제가 대부분 제거되는 현상이 발견되어 일반 약제의 처리에서는 제외했다.

그러나 새로이 발견된 Nurse 일벌들의 청소활동, 즉 처리된 약제용액의 제거는, Nurse 일벌 (초기 성충)에 대한 급성 약물 효과의 측정에 매우 유리한 조건을 가진 것으로 판단되며, 이는 새로운 급성독성 또는 급성효과를 test할 수 있는 방법의 개발을 위한 중요한 단서를 제기한 것이었다. 그 이유는 벌통 전체에 대한 사양액 중 약물의 투여는 저장된 벌꿀의 소모와 연계되어 그 효과를 측정하기에 시기적으로 너무 완만했을 뿐 아니라, 봉군 전체에 그 효과가 과급되어 결과 판정이 애매해 지는 경향이 있었기 때문이다. Nurse 일벌에 대한 약제투여는 한 세대에 대한 단기 효과로써 그 측정이 가능하기에 본 과제에서는 이 단서를 새로운 과제로써 추구해 보고자 한다.

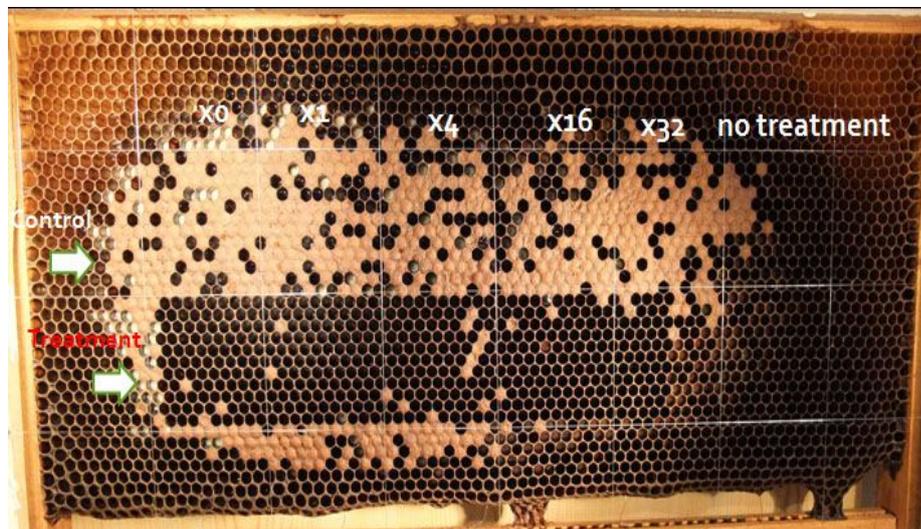


그림 3-4-4. Egg에 대한 약제 처리에서 실험의 민감도

Bee egg에 대한 약제의 처리는 매우 적은 양에 대하여도 민감한 용량-반응의 효과를 보여 준다. 사진의 하단은 미세한 약제처리에도 모든 egg 또는 larvae 단계에서 치사되었음을 그리고 이들은 모두 제거되어 거의 capping이 일어나지 않았음을 보여준다.

한편, 약제 처리의 양과 방법은 반복실험을 거쳐, 산란 직후에는 5 ul/cell 이하의 양으로, 약제를 함유한 수용액의 처리가 가능함을 알 수 있었고, 이를 투여된 Royal jelly에 적당히 혼합시키면 더욱 효과적인 것으로 확인되었다. 또한 산란 3일후부터 pupae 직전까지는 벌꿀에 혼합시킨 약제를 바로 투여하는 것이 가능하였으며, 그 양도 20 ul/cell이내가 적당한 것으로 나타났다. 약제처리에 의한 효과의 측정은 capping rate와 hatch rate 측정이 가장 쉬운 방법이었으며, 각 sector에서 발생된 성체들의 개별적 관찰도 가능했다.

약제 처리에 대한 반응효과의 민감도는 예상을 뛰어 넘을 정도로 민감한 것으로 나타났으며, 이는 bee egg의 체중이 극히 미세하며, 또한 larvae로 pupae로 그리고 adult bee로 여러번의 변태과정을 거치는 정교한 발생조절 장치를 교란시키기 때문으로 해석된다. 이런 민감도는 산업곤충인 꿀벌을 이용한 독성 실험이 매우 우수할 수 있음을 보여주는 것으로, 수많은 독성실험

험의 수요에서 가장 저렴한 비용과 많은 개체수를 처리할 수 있는 장점을 보여준다 하겠다(그림 3-4-4).

본 실험방법의 개발은 본 과제의 목적, 즉 꿀벌질병에 대한 우수한 probiotics의 개발에 큰 역할을 할 수 있을 뿐 아니라, 이후의 다목적 독성 및 약물관련 실험에서 그 민감성, 대용량 생체수의 간편한 사용, 저렴한 비용 등으로 다양한 적용이 가능할 것으로 기대한다.

이상의 실험으로 정리한 AFB (American Foul Brood)에 대한 egg 및 larvae를 이용한 probiotics저항성 test의 결과를 나타내었다(표 3-4-1).

표 3-4-1. AFB에 대한 Egg와 larvae를 이용한 probiotics 2종의 효과

	Probiotics extract*	Probiotic boiled**	AFB spore* ³	DW** ⁴
AFB spore 처리량	1 ul	1 ul	1 ul	0 ul
처리된 cell 수	400	400	400	400
capping된 cell 수	64	109	128	352
capping rate	16.0%	27.3%	32.0%	88.0%
hatching된 cell 수	8	11	35	313
hatching rate	12.5%	10.1%	27.3%	88.9%
Survival rate	2.0%	2.8%	8.8%	78.2%

* AFB spore 1 ul 수용액과 Probiotics extract 9 ul를 각 cell에 투여

** AFB spore 1 ul 수용액과 Probiotics boiled 9 ul를 각 cell에 투여

*³ AFB spore 1 ul 수용액과 증류수 9 ul를 각 cell에 투여

*⁴ Distilled water 9 ul를 각 cell에 투여

상기의 실험결과는 실험방법의 개발과정을 거쳐 개선된 실험법을 적용한 것으로, 산란 후 3일 이내에 AFB spore의 처리는 자주 전 실험군의 몰사로 나타났다. AFB spore 처리에 의한 대조군의 생존율을 50% 수준으로 맞추는 데 상당한 노력이 요구되었으며, 제조한 AFB spore의 농도 (colony forming unit)를 정확히 측정하는 실험방법이 새로이 요구되었다.

AFB의 감염은 larvae의 일령이 어릴수록 높으며, 일정 일령을 지나면 감염율이 상당히 낮아지는 것으로 알려져 있다. 상기의 실험결과는 산란후 3일차에 시행한 것으로 현재의 결과에서는 probiotics 2종이 AFB에 대한 감염예방효과 또는 치료효과의 근거를 발견할 수 없었다. 확립된 실험방법에 의한 새로운 probiotics에 대한 선별실험을 계속 진행했다.

2. Bee egg 및 Bee larvae에 의한 probiotics 후보의 저항성 test의 설계 및 적용(Nosema)

Nosema 감염에 대한 probiotics 후보의 저항성 test를 bee egg 및 bee larvae에 대한 변태독성 실험으로 측정하고자 했다. 본 실험법은 새로이 고안된 연구방법으로, 꿀벌의 알->유충->번데기->성충에 이르는 복잡한 변태과정을 이용하여, 한번의 약제 투여와 간단한 측정으로 그 약제에 의한 종합적 유전독성, 기형독성 등을 쉽게 알아내고자 한 것이다(표 3-4-2). 이 실험법의 이름은 꿀벌에 의한 변태독성실험이라 명명하였으며, 차후 이 이름으로 기재한다.

표 3-4-2. 꿀벌 중 일벌의 일반적 변태일정 및 변태독성실험의 처치

Time (lapsed)	stage	Treatment
0		Insertion of new comb
1-	Oviposition (Egg)	Take picture & counting
3-	Larvae	Take picture & counting
5-	Larvae	Treatment of drug
6-	Larvae	Take picture & counting
9-	Capping (pupae)	Take picture & capping rate*
21	Hatching (adult bee)	Collection of individual**
	Nurse bee, worker bee	Take picture & hatching rate***

* capping rate는 예정 capping일인 9일차가 아닌 10일차에 계수하고 계산함.

** 각 개체의 채집을 위하여 개별 포집망을 설치함

*** hatching rate는 예정 hatching일인 21일차가 아닌 20일차에 계수하여 사체번데기가 제거된 hatching을 확인하고, 22일차에 자발적 hatching된 cell수를 계수한 후 계산함

Nosema 감염증(*Nosemiasis*, *Nosema apis*)에 대한 egg 및 larvae를 이용한 probiotics 저항성 test의 결과를 나타내었다(표 3-4-3). 이 실험은 표 3-4-2의 시간표에 따라 계수, 계산한 것이며 probiotics 2종에 대한 효과를 검정한 것이다.

표 3-4-3. *Nosemiasis*에 대한 Egg와 larvae를 이용한 probiotics 2종의 효과

	Probiotics extract*	Probiotic boiled**	<i>Nosema</i> spore* ³	DW* ⁴
<i>Nosema</i> spore 처리량	1 ul	1 ul	1 ul	0 ul
처리된 cell 수	400	400	400	400
capping된 cell 수	297	325	318	342
capping rate	74.3%	81.3%	79.5%	85.5%
hatching된 cell 수	236	282	276	309
hatching rate	79.5%	86.8%	86.8%	90.4%
Survival rate	59.0%	70.5%	69.0%	77.3%

* *Nosema* spore 1 ul 수용액과 Probiotics extract 9 ul를 각 cell에 투여. *Nosema* spore 용액은 76 spore/ul로 계측됨.

** *Nosema* spore 1 ul 수용액과 Probiotics boiled 9 ul를 각 cell에 투여

*3 *Nosema* spore 1 ul 수용액과 증류수 9 ul를 각 cell에 투여

*4 Distilled water 9 ul를 각 cell에 투여

*Nosemasis*에 대한 probiotics 2종의 효과는 Probiotics boiled에서 미세한 우세를 나타내었으나, 통계적으로 유의미하다고 판단할 수 없었다. 또한 *Nosema* spore만의 투여에서도 감염에 의한 변태독성의 정도는 10%이내의 감소로 측정되어 *Nosema* 감염에 의한 변태저해의 효과 자체도 의문시 되었다. 이는 *Nosema apis*의 감염이 adult bee에 대한 만성적 질병으로, 유충에 있어 강력한 치사유도나 변태저해로 나타나지 않는 것을 보여주는 것으로 해석된다. *Nosemasis*에 대하여 새로이 개발된 다종의 probiotics의 선발을 본격적으로 실시했다.

3. 1차 선발된 probiotics 후보의 *Nosema* 감염봉군 적용 및 수밀력, 월동력 검사

본 연구에서는 꿀벌에 감염된 *Nosema*의 정확한 개체수 측정을 위하여 새로운 real-time PCR 방법을 적용했다. 이는 본 과제에서 가장 중점이 되는 probiotics에 의한 예방 및 치료효과를 정량적으로 증명할 수 있는 척도가 될 것이며, 그 용량 및 용법을 규정할 수 있는 정확한 측정도구가 될 수 있을 것이기 때문이다. 결과로써 개발된 노제마 특이 정량 PCR법은 봉군 내 감염된 꿀벌 당 평균 감염 노제마의 수치를 정확하게 측정할 수 있게 되었으며, 이 개발된 정량법을 이 후 probiotics의 치료효과 측정 등에 충분히 활용할 수 있게 했다.

본 연구에서 사용된 꿀벌 시료는 국내 양봉농가에서 노제마 감염의 증상을 나타내는 성충 및 유충의 시료와 경기대학교 양봉장에서 사육되고 있는 꿀벌들을 사용했다. 이 시료들은 양봉장에 도착한 즉시 외형 관찰과 해부검사 및 현미경 검사를 수행 하였으며, 가급적 즉시 DNA의 순수분리에 사용하였으며, 불가피할 경우 -70℃에서 보관 후 실험을 수행했다.

꿀벌성체의 chromosomal DNA 추출은, 개체의 경우 MagNa Lyser (Roche)를 사용하여 분쇄 시키고, 집단의 경우 액체질소로 동결후 분쇄하는 방법을 사용하고, Genomic DNA Isolation Kit (Bioneer Inc., Korea)를 사용하여 DNA를 순수분리했다. *Nosema*를 검출하기 위한 PCR에 사용된 primer 쌍은 NCBI에 등록되어있는 *Nosema ceranae* small subunit ribosomal RNA gene sequence (Accession no. DQ486027)를 기본으로, 최 등(2003)에 의해 제작된 sense: 5'-CTGCCTGACGTAGACGCTAT-3' 와 antisense를 변형시켜 설계하였고, oligonucleotide의 제작은 (주)바이오닉스(Bionics, Korea)에 의뢰했다. *Nosema* 검출에 사용한 primer는 *Nosema-F*와 *Nosema-R*로, real-time PCR에 사용한 primer는 *Nosema-RT-F*와 *Nosema-RT-R*로 각각 명명하였으며, 염기서열을 나타내었다(표 3-4-4).

표 3-4-4. *Nosema* PCR detection 및 *Nosema* 실시간 정량 PCR에 사용된 Primer들

Oligo name	Sequence(5'→3')	nt*	Reference
<i>Nosema-F</i>	CTGCCTGACGTAGACGCTAT	20	최 등, 2003
<i>Nosema-R</i>	CTTCGCTCCTCCAGCTTACG	20	
Oligo name	Sequence(5'→3')	nt*	Reference
<i>Nosema-RT-F</i>	ATTGGAGGGCAAATCAAGTG	20	
<i>Nosema-RT-R</i>	AGCTTTCGCTTCTGTTCGTC	20	

*nt: nucleotides

본 실험에서는 Exicycler™ Quantitative Thermal Block (Bioneer, Korea)을 사용하였으며, 증폭된 산물의 정량은 SYBR Green을 사용하여 측정했다. *Nosema* real-time PCR을 위한 최적 primer annealing 온도의 확립을 위하여 temperature gradient PCR도 수행했다.

본 real-time PCR은 반응액 총량을 20 μ l로 하여 2 \times Prime Q-Master mix, 각 10pmole primer로 조성하였으며, DQ486027 (*Nosema ceranae* small subunit ribosomal RNA gene sequence) 14nt-603nt(590bp)를 pBX vector에 cloning 시킨 재조합 pBX-*Nosema* 10⁵ copies를 주형으로 사용했다. 반응조건은 94 $^{\circ}$ C에서 10분간 pre-denaturation 시킨 후, denaturation 94 $^{\circ}$ C 15초, primer annealing 50-65 $^{\circ}$ C 15초, DNA extension 72 $^{\circ}$ C 15초를 45cycles 수행하였으며, 이후 melting temperature analysis을 50 $^{\circ}$ C-94 $^{\circ}$ C에서 수행하였다(1 $^{\circ}$ C/sec).

Nosema real-time quantitative PCR의 검출 한계를 측정하기 위하여, pBX-*Nosema*의 plasmid DNA를 10⁸-1 copies까지 1/10배씩 단계적으로 희석한 후, 이를 주형으로 사용하여 real-time PCR을 수행했다. 10⁸-10¹ copies의 주형 농도 범위에서 기질의 양과 C_T값이 정확한 상관관계를 가지는 것을 확인하였다(그림 3-4-5). 또한, 생성된 PCR product들은 melting point analysis를 통해 동일한 T_m 값을 가지는 것을 확인하였다(그림 3-4-5).

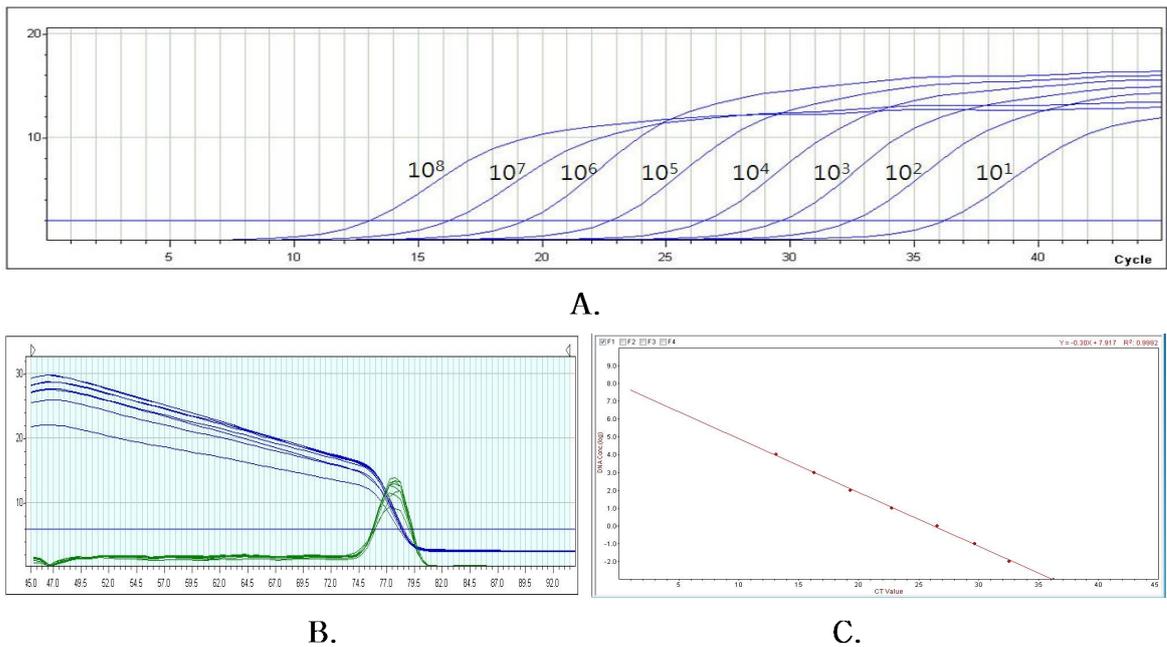
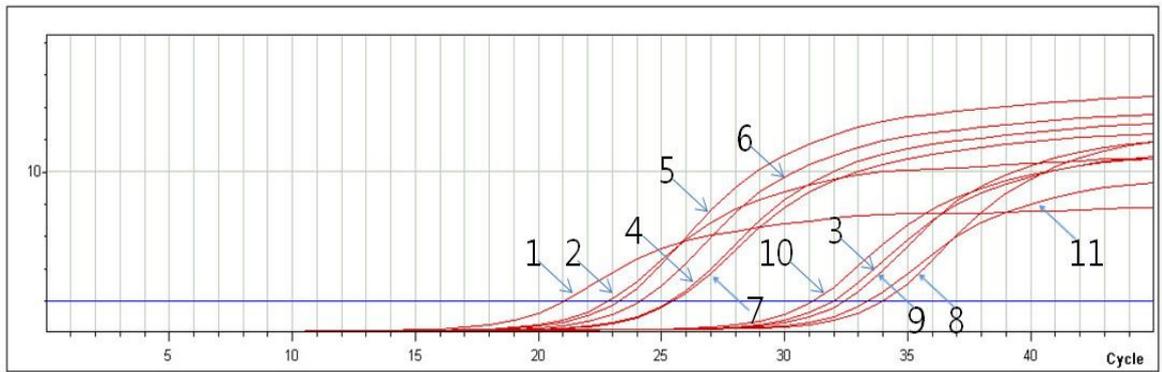


그림 3-4-5. *Nosema* real-time quantitative PCR의 검출 한계

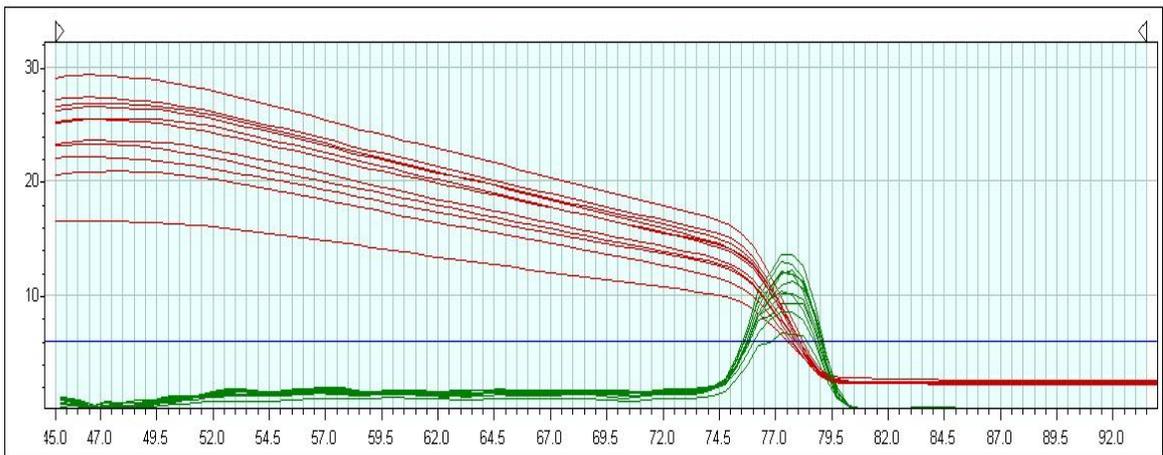
Panel A 는 기질의 초기 기질량을 가지고 수행한 fluorescence intensity curves의 그래프이며, Panel B는 50-94 $^{\circ}$ C에서 수행한 melting temperature analysis의 결과이다. 모든 PCR product들은 동일한 것으로 나타났으며, temperature of mid point (T_m)는 모두 77.73-78.07 $^{\circ}$ C의 범위에 있었다. Panel C는 regression analysis의 결과이며, initial templates의 양과 C_T values 간의 관계는 Regression equation $Y = -0.30X + 7.917$, Regression coefficient $R^2 = 0.9992$ 로 나타남

확립된 *Nosema* 검출을 위한 real-time qPCR 방법을 사용하여 실제 노제마 감염이 확인된 시료에서 *Nosema*의 감염수준을 정량적으로 측정했다. 확립된 real-time qPCR의 범위 내에서

모든 시료가 진단 가능하였으며, 다른 질병과 혼합 감염된 시료에서도 노제마의 특이적 검출이 가능하였다(그림 3-4-6).



A.



B.

그림 3-4-6. 꿀벌 시료에 대한 *Nosema* real-time quantitative PCR 측정

Panel A 는 꿀벌시료에 대한 *Nosema* 정량 PCR의 형광커브이며, 이로써 Ct값을 측정하여 시료에 포함된 노제마 포자의 수를 측정했다. Panel B는 상기시료에서 생성된 PCR product들에 대한 용점분석의 결과이다.

본 연구에서 사용된 꿀벌 시료(봉군)는 국내 양봉농가에서 노제마 감염의 증상을 나타내는 봉군을 구입하여 사용하였으며, 이들을 경기대학교 양봉장에서 사육된 봉군들과 함께 무작위 배열했다. 군세를 균등화시킨 실험봉군들 중 노제마의 감염이 확인된 봉군을 18봉군 선별하였으며, 노제마감염이 발견되지 않는 봉군도 2봉군 배치했다.

노제마에 감염된 봉군들은 6개 봉군을 일개 실험군으로 하여, 2개의 정상 봉군(미감염군)외에 1) Probiotics extract 처리 실험군, 2) Probiotics boiled 처리 실험군, 3) 약제 비처리실험군 등 3개 실험군으로 분류하였으며(총 18개 봉군) 이들을 각기 또는 집단으로 정상봉군(2군)과 비교했다. 본 야외 실험의 시기는 2009년 9월~10월이었다.

각 봉군의 노제마 감염수준에 따라 감염수준 상, 중, 하로 나누었으며, 또한 봉세에 따라 90% 이상 벌이 붙은 소비가 4매 소비 이상의 봉군은 강, 3매 소비의 봉군은 중, 2매 이하 소비의 봉군은 약군으로 분류하였다(표 3-4-5).

표 3-4-5. 각 실험군의 봉세 및 질병의 종류에 따른 구성

실험군	봉군수	봉세*			노제마 감염수준**			Virus감염***		
		강	중	약	상	중	하	KBV	BQCV	DW
정상군	2	1	1		-	-	-	1	1	1
P-extract 처리군	6	2	2	2	2	2	2	2	3	2
P-boiled 처리군	6	2	2	2	2	2	2	2	4	1
약 비처리군	6	2	2	2	1	2	3	3	4	1

* 도입된 봉군은 모두 소비 8매군 이상이였으나, 소비의 목적판정으로 100% 벌이 부착된 소비를 기준으로 강, 중, 약을 판단함. 강은 90%양면에 벌이 붙은 소비를 기준으로 5매이상일 경우 판정하였으며, 중은 4매, 약은 3매 이하로 판정함.

** 노제마 감염수준의 평가는 성봉 10개체를 조사하여 중장관내 노제마 포자가 발견된 개체의 수로 판별하였으며, 해부현미경을 통한 중장관의 해부검사에서 5개체 이상에서 포자가 발견되면 감염수준 상으로, 3 또는 4 개체에서 포자가 발견되면, 감염수준 중으로, 2 또는 1 개체에서 포자가 발견되면, 감염수준 하로 판정함. 이 판정기준은 1차 감염질병검사의 결과로 재조정하였으며, 이후 정량 실시간 PCR법을 적용하여 새로이 보완했다.

*** 바이러스 질병은 KBV, BQCV, DWV의 발견여부를 표시한 것으로 1개 봉군당 1개 이상의 바이러스가 감염 확인되었을 경우 이를 중복 계산함.

약제의 처리군과 비처리군은 각기 감염수준을 동등하게 조정하였으며, 가급적 각 실험군당 감염수준 상은 2개 봉군, 중은 2개 봉군, 하는 2개 봉군으로 했다. 감염수준의 평가는 성봉 10개체를 조사하여 1개체 당 중장관내 노제마 포자의 수로 판별하였으며, 해부현미경을 통한 중장관의 해부검사에서 5개체 이상에서 포자가 발견되면 감염수준 상으로, 3 또는 4 개체에서 포자가 발견되면, 감염수준 중으로, 2 또는 1 개체에서 포자가 발견되면, 감염수준 하로 판정했다. 그러나 이 판정기준은 1차 질병감염검사의 수준에서 재조정하였으며, 이후 정량 실시간 PCR법을 적용하여 새로이 보완했다.

본 과제 of 우선적 목적은 노제마병 치료제로써 Probiotics의 치료효과를 정량적으로 측정하여 선별하는 것이다. 그러나 본 연구를 위하여 수집된 봉군들을 대상으로 한 1차 질병 감염검사에서 노제마병만 검색된 봉군은 거의 없었으며, 많은 경우 다수의 감염체에 의한 중복 감염이 되어 있는 것을 발견할 수 있었다.

봉군에 대한 1차 질병검사는 본 연구진에 의하여 개발된 각 봉군들에 대한 일반적 질병검사로써, 총 11개 질병에 대한 유전자 진단검사를 수행했다. 각 질병검사는 각기 다른 총 11가지 primer set을 사용하여 각각의 질병에 대한 특이PCR detection을 수행했다.

검사된 질병의 종류는 1. AFB (미국부저병); 2. EFB (유럽부저병); 3. 백목병; 4. 석고병; 5. *Nosema*; 6. SBV (Sacbrood Virus); 7. ABPV (Acute Bee Paralysis Virus); 8. DWV (Deformed Wing Virus); 9 : BQCV (Black Queen Cell Virus); 10. KBV (Kashimir Bee Virus); 11. CBPV (Cronic Bee paralysis Virus)이며, 그 중복감염의 수준은 Table 5에 나타내었다. 각 봉군들은 노제마의 감염이 없는 정상봉군과 노제마의 감염이 확인된 실험용 봉군으로

나뉘었으며, 노제마 감염이 확인된 실험용 봉군은 Probiotics extract 처리군, Probiotics boiled 처리군, 약제 무처리군으로 나누어 약제처리 전후의 노제마 감염수준을 측정했다. 개체 당 감염수준의 측정은 전술한 노제마 특이 정량 PCR법으로 수행하였으며, 봉판에 붙은 성체 10마리를 무작위 채집하여 유전자원으로 사용했다.

한편, 노제마 유전체에 대한 정량측정의 시기와 채집방법에 대하여 예비실험을 수행하였으며, 이 예비실험의 결과로써, 처치 1일전(초기감염), 처리 7일후, 및 처리 30일 후의 측정으로 충분히 약제 감수성을 모니터링할 수 있다는 결론과, 정량의 정확성을 기하기 위한 표본 수집의 방법도 봉판에 붙어있는 꿀벌로써 성체 10-30마리수준이면 봉군을 대표할 수 있다는 결론을 얻었다.

각 개별 봉군에 대한 노제마의 감염수준의 변화를 나타내었으며(표 3-4-6), 이 결과에 의존하여 다음과 같이 분석할 수 있었다.

표 3-4-6. 각 실험봉군에서 qPCR에 의한 감염 노제마 개체수의 변화

봉군*	봉세**	초기감염***	처리 7일후	처리 30일후
정1	강	nd ⁴	nd	nd
정2	중	nd	nd	nd
PE1	강	3.2x10 ²	5.3x10 ²	2.2x10 ²
PE2	강	6.4x10 ³	8.4x10 ²	5.6x10 ²
PE3	중	3.2x10 ³	4.5x10 ³	2.8x10 ³
PE4	중	2.2x10 ⁵	3.9x10 ⁵	3.62x10 ⁴
PE5	약	4.8x10 ⁵	6.4x10 ⁵	9.1x10 ⁵
PE6	약	5.9x10 ⁵	3.8x10 ⁵	6.5x10 ⁵
PB1	강	7.3x10 ³	6.4x10 ³	5.7x10 ²
PB2	강	5.8x10 ²	3.9x10 ²	2.2x10 ²
PB3	중	4.1x10 ⁴	5.4x10 ⁴	8.3x10 ⁴
PB4	중	9.3x10 ⁴	7.4x10 ⁴	2.9x10 ⁴
PB5	약	7.9x10 ⁵	5.8x10 ⁵	6.6x10 ⁵
PB6	약	8.3x10 ⁴	4.8x10 ⁴	1.8x10 ⁵
미1	강	6.2x10 ³	7.9x10 ³	2.5x10 ²
미2	강	5.1x10 ⁴	7.6x10 ⁴	6.8x10 ³
미3	중	7.8x10 ³	8.8x10 ⁴	2.3x10 ³
미4	중	3.1x10 ²	5.6x10 ²	2.8x10 ⁴
미5	약	7.4x10 ⁴	6.9x10 ⁴	6.2x10 ⁴
미6	약	3.8x10 ⁵	8.4x10 ⁵	2.6x10 ⁶

* 봉군번호 정1, 2는 노제마의 감염이 없는 정상봉군 1, 2를 나타내며, PE1, 2는 노제마의 감염이 확인된 봉군으로 Probiotics extract를 처리한 봉군 1, 2를 나타내고, PB1, 2는 노제마의 감염이 확인된 봉군으로 Probiotics boiled를 처리한 봉군 1, 2를 나타냄. 한편, 미1, 2는 노제마의 감염이 확인된 봉군으로 약제처리를 아니한 봉군 1, 2를 나타냄.

** 도입된 봉군은 모두 소비 8매군 이상이었으나, 소비의 목적관정으로 100% 벌이 부착된 소비를 기준으로 강, 중, 약을 판단함. 강은

90%양면에 별이 붙은 소비를 기준으로 5매이상일 경우 판정하였으며, 중은 4매, 약은 3매 이하로 판정함.

** 도입된 봉군은 모두 소비 8매군이었으나, 소비의 목적판정으로 100% 별이 부착된 소비를 기준으로 강, 중, 약을 판단함. 강은 100%양면에 붙은 소비를 기준으로 5매이상일 경우 판정하였으며, 중은 4매, 약은 3매 이하로 판정함.

*** 초기감염은 PCR검사으로써 노제마의 감염이 확인된 봉군의 정량PCR의 결과로써, 약제처리 1일전 시료에서 실시함.

*4 nd: not detected

먼저 정상봉군(노제마에 감염되지 않음)은 봉세가 각기 강과 중인 2개의 봉군을 사용하였으며, 실험의 시작 전에 발견되지 않았던 노제마의 감염은 실험의 종료(처리 후 30일)시점까지 발견되지 않았다는 것이다. 이는 같은 봉장내의 일부 봉군에서 노제마의 발병이 봉장내 급속도로 퍼지지는 않는다는 것을 보여주는 것으로, 이는 몇 가지 사양관리상의 주의에서 기인하였다고 판단된다. 즉, 실험용 봉군과 정상군은 모두 충분한 개별 급여 및 급수를 하였고, 이 이유로 도봉이 발생되지 않았다는 것이 노제마감염 등으로 약화된 약봉군에 의해 잔재 봉장의 감염 위험을 줄일 수 있었다는 것이다.

한편 실험봉군(노제마 감염이 확인된 봉군)은 모두 18봉군이었으며, 이를 6봉군씩 나누어 Probiotics extract처리군, Probiotics boiled 처리군 그리고 무처리군으로 나누어 시험했다. 각 처리군은 또한 봉세가 강, 중, 약인 2개 봉군씩으로 편성하였으나, 전체적으로 노제마의 감염수준과 봉세와의 상관관계는 최소한 강 및 중의 봉세를 가진 봉군에서는 찾아보기 어려웠다. 그러나 봉세가 약으로 판정된 봉군들은 모두 처리전 노제마의 감염수준이 7.4×10^4 이상으로 나타나, 이들은 상당히 진행된 노제마 감염에 의하여 약군으로 전락되었다고 해석되었다.

Probiotics extract처리군에 속한 모든 봉군은 강, 중, 약의 봉세에 관계없이 감염 노제마의 개체수 감소를 분명하게 보여 주지는 못하였으며, 강군의 경우 2개 봉군 모두 처리 후 감소추세를 보여주었으나, 무처리봉군에서 나타나는 감소 추세를 뛰어넘는 것은 아니었다.

한편, 약제 처리의 효과가 예상보다 늦게 나타날 수도 있는 것으로, 이는 약제의 처리에서 약제의 전달과정의 문제로 해석되며, 급이의 방법으로 약제를 공급하는 것은 전 봉군에 그 약제의 전달이 예상보다 빠르지 않은 것으로 추측되었다.

또한 Probiotics boiled 처리군에 속한 봉군들도 강, 중, 약의 봉세에 관계없이 분명한 감염 노제마의 감소를 보여 주지는 못하였으나, 강군의 경우에서 2개 봉군의 노제마의 개체수 감소가 인정되었다. 이 경우 두 개의 봉군에서 노제마의 개체수 감소의 폭은 상이하여 약제효과의 표현인지가 의심되었다. 30일 측정에서 크게 감소되는 PBI군의 경우도 역시 처리 7일후의 측정에서는 그 개체수 감소가 인지되지 아니하였으며, 이는 약제의 전달방법에 의한 지연으로 해석되었다. 따라서 본 실험결과에 의한 Probiotics extract와 Probiotics boiled의 치료효과(정확히, 노제마의 개체수 감소)는 현재 단정할 수 없으며, 보다 우수한 probiotics의 개발에 전력했다. 한편, 실험군(노제마 감염군) 중 미처리군의 결과에서는, 노제마의 감염수준이 전 미처리군의 봉군에서 처리 후 30일의 시점에서 특히 중 및 약군의 경우 크게 증가됨이 특기했다.

본 실험에 사용되었던 20개 봉군 모두는 봉군 축소과정을 거쳐 11월 하순 월동포장에 들어 갔다. 월동 포장에서 강군들은 월동자격군으로 충분하였으나, 기타 모든 약군 및 다수의 중군들은 경험상의 월동자격군이 되지 못하여 과연 월동할 수 있을지 여부가 의심되었다.

본 실험은 월동이후 같은 방법으로 측정이 계속될 것이며, 이는 처리하였던 probiotic들의 성적을 추론하는 데 가장 확실한 자료가 될 것이다.

4. 1차 선발된 probiotics후보의 봉군 적용 및 자연 수밀력, 산란력 검사

가. 봉군에 대한 Probiotics 처리 및 야외실험에 의한 실측

주관기관으로부터 probiotics후보로 1차 선발된 *Lactobacillus* sp 분쇄 현탁액을 꿀벌에게 공급하기 위하여 먼저 당액에 의한 직접적인 사양공급방법을 선택했다. 사양을 위한 당액은 저밀용 당액(설탕 3kg + 물 2L)을 사용하였으며, 고농도 probiotics는 당액에 2% (v/v) *Lactobacillus* sp 분쇄 현탁액을 혼합하여 만들었으며, 저농도 probiotics는 당액에 0.5% (v/v) *Lactobacillus* sp 분쇄 현탁액을 혼합했다. Probiotics를 포함한 당액의 공급은 봉군 당 주 2회, 투입량은 첫 번째는 200ml, 두 번째 이후는 400 ml씩을 공급했다. 공급기간은 2010년 7월 1일부터 9월 7일까지 이었으며, 봉군의 정치는 6월 중순 도입하여, 균세를 봉군당 4매 소비를 기준으로 균등화한 후 실시 했다. 실험봉군 들은 2011년 2월 현재 월동상태에 있으며, 2월 말 월동 성적을 측정할 수 있을 것이다.

나. Probiotics 처리 실험봉군에 대한 주요 실험일지 및 기재사항

본 실험은 야외실험인 이유로 돌발 변수에 대한 고려가 필수적일 것이다. 본 실험의 주요 실험일지 및 실제 처리 일자는 다음과 같다.

6/29 : 대조군, 고농도군, 저농도군 의 3개 실험군의 각 봉군별 개별 소비 무게 측정

6/30 : 각 봉군에서 꿀벌 시료를 채취 후 1차 질병검사

7/1 : 사전 사양액투입 (사양액만,봉군당 각 200ml)

7/2 : 사양액의 잔류 확인: 모든 봉군에서 공급량 모두 소비로 이전 됨

7/5 : 1차 사양액투입(대조군1,2,3:0%,고농도1,2,3:2%,저농도1,2:0.5%,각200ml)

7/6 : 사양액 잔류 확인: 전부 소화 됨

7/8 : 2차 사양액투입(대조군1,2,3:0%,고농도1,2,3:2%,저농도1,2:0.5%,각400ml)

2차 질병검사 의뢰 부저병 감염선행 실험 봉군 설치: 2군/각3매 , 설치 위치 :C3R

7/9 : 사양액 잔류 확인: 전부 소화 됨

7/13 : 3차 사양액투입(대조군1,2,3:0%,고농도1,2,3:2%,저농도1,2:0.5%,각400ml)

7/14 : 사양액 잔류 확인:#78 만 일부 잔류

2차 봉군별 소비 무게 측정

7/15 : 4차 사양액투입(대조군1,2,3:0%,고농도1,2,3:2%,저농도1,2:0.5%,각400ml)
3차 질병검사 의뢰

7/20 : 5차 사양액투입(대조군1,2,3:0%,고농도1,2,3:2%,저농도1,2:0.5%,각400ml)

7/21 : 사양액 잔류 확인:#78 만 일부 잔류

7/22 : 6차 사양액투입(대조군1,2,3:0%,고농도1,2,3:2%,저농도1,2:0.5%,각400ml)
4차 질병검사 의뢰

7/23 : 사양액 잔류 확인:전부 소화 됨

7/27 : 7차 사양액투입(대조군1,2,3:0%,고농도1,2,3:2%,저농도1,2:0.5%,각400ml)
3차 봉군별 소비 무게 측정

7/28 : 사양액 잔류 확인:전부 소화 됨

7/29 : 8차 사양액투입(대조군1,2,3:0%,고농도1,2,3:2%,저농도1,2:0.5%,각400ml)
5차 질병검사 의뢰

7/30 : 사양액 잔류 확인:전부 소화 됨

8/3 : 9차 사양액투입(대조군1,2,3:0%,고농도1,2,3:2%,저농도1,2:0.5%,각400ml)
1차 봉군별 별통 무게 측정(소문급수기,별통뚜껑 제외)

8/5 : 10차 사양액투입(대조군1,2,3:0%,고농도1,2,3:2%,저농도1,2:0.5%,각400ml)
6차 질병검사 의뢰

8/6 : 사양액 잔류 확인:전부 소화 됨

8/10 : 11차 사양액투입(대조군1,2,3:0%,고농도1,2,3:2%,저농도1,2:0.5%,각400ml)
2차 봉군별 별통 무게 측정(소문급수기,별통뚜껑 제외)

8/11 : 사양액 잔류 확인:#75만 일부 잔류(말벌 피해) 응애 방제(65% 개미산 처리:20ml/군)

8/12 : 12차 사양액투입(대조군1,2,3:0%,고농도1,2,3:2%,저농도1,2:0.5%,각400ml) 7차 질병검사 의뢰

8/13 : 사양액 잔류 확인:#71만 일부 잔류(말벌 피해)

8/17 : 13차 사양액투입(대조군1,2,3:0%,고농도1,2,3:2%,저농도1,2:0.5%,각400ml)

3차 봉군별 벌통 무게 측정(소문급수기,벌통뚜껑 제외) 통같이

응제 방제(개미산 처리)결과 확인 (시트지 규격 :15cm * 30cm) #71/#77 만 2마리 나머지는 0

8/18 : 사양액 잔류 확인:전부 소화 됨

8/19 : 14차 사양액투입(대조군1,2,3:0%,고농도1,2,3:2%,저농도1,2:0.5%,각400ml) 8차 질병검사 의뢰

8/24 : 15차 사양액투입(대조군1,2,3:0%,고농도1,2,3:2%,저농도1,2:0.5%,각400ml)

8/25 : 사양액 잔류 확인:전부 소화 됨

8/26 : 16차 사양액투입(대조군1,2,3:0%,고농도1,2,3:2%,저농도1,2:0.5%,각400ml)

9차 질병검사 의뢰

4차 봉군별 벌통 무게 측정(소문급수기,벌통뚜껑 제외,통같이 후 첫 번째)

8/31 : 17차 사양액투입(대조군1,2,3:0%,고농도1,2,3:2%,저농도1,2:0.5%,각400ml)

5차 봉군별 벌통 무게 측정(소문급수기,벌통뚜껑 제외,통같이 후 두 번째)

9/1 : 사양액 잔류 확인:전부 소화 됨

9/2 : 18차 사양액투입(대조군1,2,3:0%,고농도1,2,3:2%,저농도1,2:0.5%,각400ml)

10차 질병검사 의뢰

9/3 : 사양액 잔류 확인:전부 소화 됨

9/7 : 19차 사양액투입(대조군1,2,3:0%,고농도1,2,3:2%,저농도1,2:0.5%,각400ml)

6차 봉군별 벌통 무게 측정(소문급수기,벌통뚜껑 제외,통같이 후 세 번째)

다. Probiotics 처리 실험봉군의 소비 무게 변화 (2010. 6. 29. -7.27)

Probiotics 처리 실험군들과 대조군의 각 봉군내 소비 총무게는 다음의 그래프와 표로 정리했다. 총 소비의 무게는 오후 3시이후 봉군의 꿀벌들이 귀가한 이후 측정된 것으로 봉군의 성장을 가장 대표할 수 있는 수치의 하나일 것이다. 측정된 대조군의 1, 2, 3 중 2개 봉군은

증가세가 인정되나, 1개 봉군은 감소한 반면, 고농도 probiotics를 처리한 봉군은 3개 봉군 모두에서 증가세가 인정되어 probiotics 함유 당액은 꿀벌의 성장에 도움을 주는 것으로 1차 인정될 수 있었다. 한편 저농도 처리군에 있어서 증가세는 인정하기 힘든 수준이었다. 본 실험은 각 실험군 당 강, 중, 약의 3개 봉군으로 구성되어 실험된 것으로, 고농도 처리군의 경우, 강, 중, 약 군 모두에서 높은 성장세를 보인 것은 일차 고무적인 것이라 하겠다. 반면, 대조군의 경우 강, 중, 2개군은 그 성장세가 인정되나, 고농도 처리군의 그것에 약간 미달하는 수준이었고, 특히 대조군의 약군은 강한 사양에서도 증가세를 보이지 못한 것은 주목된다(그림 3-4-7, 표3-4-7).

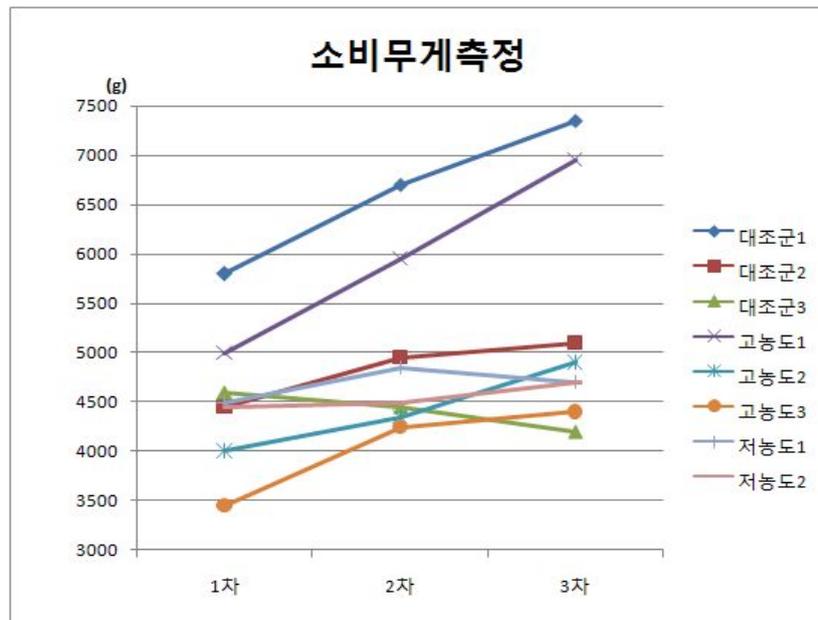


그림 3-4-7. 소비 무게 측정 변화

표 3-4-7. 소비 무게 측정

(단위:g)

구분	1차(6/29)	2차(7/14)	3차(7/27)
대조군1	5800	6700	7350
대조군2	4450	4950	5100
고농도1	5000	5950	6950
대조군3	4600	4450	4200
고농도2	4000	4350	4900
고농도3	3450	4250	4400
저농도1	4500	4850	4700
저농도2	4450	4500	4700

라. Probiotics 처리 실험봉군의 전체 벌통 무게 변화 (측정기간: 2010.8.3. - 9.7)

Probiotics 처리 실험군들과 대조군의 각 봉군의 벌통무게는 다음의 그래프와 표로 정리했다. 총 벌통의 무게는 오후 3시이후 봉군의 꿀벌들이 귀가한 이후 측정된 것으로 봉군의 성장을 대표할 수 있는 수치의 하나일 것이다. 이 측정에서도 측정된 대조군의 1, 2, 3 중 2개 봉군은 증가세가 인정되나, 1개 봉군은 감소한 반면, 고농도 probiotics를 처리한 봉군은 3개 봉군 모두에서 증가세가 인정되어 probiotics 함유 당액은 꿀벌의 성장에 도움을 주는 것으로 1차 인정될 수 있었다. 한편 저농도 처리군에 있어서 증가세는 인정하기 힘든 수준이었다. 본 실험도 각 실험군 당 강, 중, 약의 3개 봉군으로 구성하여 실험된 것으로, 고농도 처리군의 경우, 강, 중, 약 군 모두에서 높은 성장세를 보인 것은 일차 고무적인 것이라 하겠다. 반면, 대조군의 경우 강, 중, 2개군은 그 성장세가 인정되나, 고농도 처리군의 그 것에 약간 미달하는 수준이었고, 특히 대조군의 약한 봉군은 동등하게 처리한 강한 사양에서도 증가세를 보이지 못한 점이 주목된다(그림 3-4-8, 표 3-4-8, 표 3-4-9).

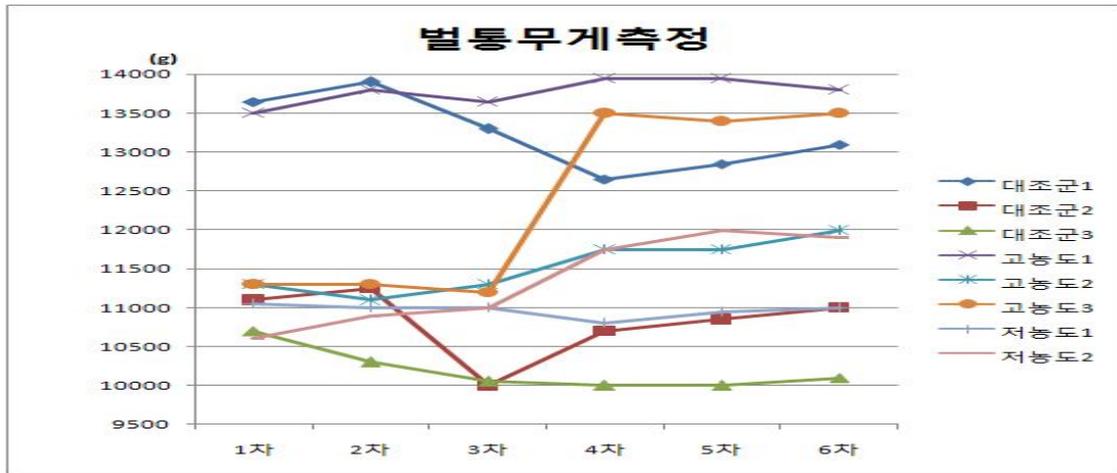


그림 3-4-8. 벌통 무게 측정 변화

표 3-4-8. 벌통무게 측정

(단위:g)

벌통무게(net)	구분	1차(8/3)	2차(8/10)	3차(8/17)
5550	대조군1	13650	13900	13300
5100	대조군2	11100	11250	10000
5600	고농도1	13500	13800	13650
5600	대조군3	10700	10300	10050
5700	고농도2	11300	11100	11300
5400	고농도3	11300	11300	11200
5500	저농도1	11050	11000	11000
5000	저농도2	10600	10900	11000

표 3-4-9. 통갈이 후 벌통무게 측정

(단위:g)

벌통무게(net)	구분	4차(8/26)	5차(8/31)	6차(9/7)
4500	대조군1	12650	12850	13100
5500	대조군2	10700	10850	11000
6200	고농도1	13950	13950	13800
5450	대조군3	10000	10000	10100
6100	고농도2	11750	11750	12000
7600	고농도3	13500	13400	13500
5200	저농도1	10800	10950	11000
5800	저농도2	11750	12000	11900

5. 봉군 단위 예방효과검증을 위한 저·고준위 경쟁 감염실험(afb)

가. 봉군에 대한 Probiotics 처리 및 야외실험에 의한 실측

주관기관으로부터 probiotics 후보로 1차 후보로 선발된 *Lactobacillus* sp 분쇄 현탁액을 꿀벌에게 당액에 의한 직접적인 사양공급방법을 사용하여 공급했다. 사양을 위한 당액은 저밀용 당액(설탕 3kg + 물 2L)을 사용하였으며, 고농도 probiotics는 당액에 2% (v/v) *Lactobacillus* sp 분쇄 현탁액을 혼합하여 만들었으며, 저농도 probiotics는 당액에 0.5% (v/v) *Lactobacillus* sp 분쇄 현탁액을 혼합했다. Probiotics를 포함한 당액의 공급은 봉군 당 주 2회, 투입량은 400 ml씩을 공급했다. 공급기간은 2010년 7월 1일부터 9월 7일까지 이었으며, 꿀벌 시료의 채취는 실험기간 내 2주 간격으로, 대조군 (무처리군, 71, 72, 73), 고농도 처리군 (74, 75, 76), 저농도 처리군 (77, 78)에서 각 10마리 수준의 성봉을 채집하여 유전자 검사에 의한 정량 및 정성 검사를 실시했다.

나. Paenibacillus larvae의 정량을 위한 실시간 PCR법의 확립.

*P. larvae sub. larvae*의 Real-Time PCR 검출법 개발을 위한 표준 균주로서 *P. larvae sub. larvae* strain ATCC9545 균주를 사용하였으며, 인위적인 오염봉군의 재현과 Real-Time PCR 진단법의 특이성을 측정하기 위하여 *Paenibacillus larvae* *sups. alvei*, *Bacillus subtilis*들을 사용했다. 이들 균주들은 BHI (Brain Heart Infusion) 배지에서 증식시켰으며 단백질 분해효소의 존재에 의해 *P. larvae sub. larvae*를 순수분리하기 위해 Skim milk plate (5% Skim milk, 10% agar, BHI 고체배지)를 사용했다. 평판배지의 배양조건은 25°C 또는 37°C를 사용하였으며, 액체 배양의 경우 180 rpm, 37°C로 진탕배양 했다. 본 연구에서는 (주)Bioneer (Korea)의 Excyler™ Quantitative Thermal Block (이하 Excyler™)을 사용하여 특이성, 정확성, 재현성, 민감도 등을 측

정하였으며, 진단 방법으로서의 Real-Time PCR 방법을 검증했다. 증폭산물의 정량 측정을 위한 filter set은 형광시약으로 사용되는 SYBR Green을 측정하기 위해 각 PCR cycle마다 excitation 490nm, emission 530nm로 하여 700msec동안 형광값을 측정하였으며, 측정된 형광값은 실시간으로 모니터상에 그래프로 나타나게 했다. Threshold Cycles (C_T) 값은 3-10 cycles간에 나타난 형광값의 표준편차의 10배 값(Threshold value)에 도달하는 각 PCR의 cycles수를 기준으로 하였으나, 정량을 위한 표준직선에서 기지의 초기 template의 양들 (pg 또는 fg)에 대한 C_T 값들이 회귀(regression)직선에서 1에 가장 근접한 것($R^2=1$)을 구하여 C_T 값을 보정하기도 했다. *P. larvae sub. larvae*의 Real-Time PCR detection을 위한 특이 염기 서열은 16s rDNA 유전자(Yoon 등, 1997; 양 등, 2001; GenBank U85263; U86605; U86606)의 염기서열을 이용하여 design 했다. *P. larvae sub. larvae*의 16s rRNA의 특이 서열 검출을 위한 primer 쌍은 Primer3 program (www.cgi v 0.1 beta 1a)을 이용하여 선별하였으며, 16sNF (5'-GTGTTTCCTTCGGGAGACG-3')와 16sNR (5'-CTCTAGGTTCGGCTACGC ATC-3')로 명명하고 제작하였다(표 3-4-10).

표 3-4-10. *P. larvae subs. larvae* 의 Real-Time PCR을 위해 선별된 primer들의 염기서열

Primer	Sequence(5' to 3')	Origin	Nucleotide position	Product length (bp)
16sNF	GTG TTT CCT TCG GGA GAC G	16s rDNA	65-83	233
16sNR	CTC TAG GTC GGC TAC GCA TC	16s rDNA	278-297	

본 연구의 결과에서 16sNF/16sNR primer를 사용한 *P. larvae sub. larvae* specific Real-Time PCR의 표준조건은 다음과 같이 정리되었다. 즉, 16sNF/16sNR primer 각 20 pmole, MgCl₂ 1.5mM, dNTP 0.25mM, 10×SYBR 2 μ l, Taq polymerase (GeneClone Co., Korea) 5 units를 총량 20 μ l의 반응액으로 조성하여, 94 $^{\circ}$ C 15분의 pre-denaturation 후 94 $^{\circ}$ C 30초, 60.9 $^{\circ}$ C 30초, 72 $^{\circ}$ C 1분으로 40cycle로 증폭을 시킨 후 72 $^{\circ}$ C 5분의 post-polymerization으로 PCR을 수행하였을 경우 최적의 검출능력을 보인 것으로 나타났으며, 이 반응조건은 ExcylerTM (Bioneer Co., Korea)를 사용하였을 때 얻어진 것이다. *P. larvae sub. larvae*의 Real-Time PCR detection의 민감도 (sensitivity)를 측정하기 위하여 *P. larvae sub. larvae* 16s clone plasmid DNA를 1ng 부터 10⁻³fg까지 연속 희석한 후 이를 template로 하여 위에서 확립된 PCR조건으로 Real-Time PCR (ExcylerTM, Bioneer, Korea)을 수행 했다. Amplification curve의 분석을 통하여 1ng의 template를 사용한 PCR에서 C_T 값은 10.3 cycle로, 1x10⁻³fg의 sample에서의 C_T 값은 30.5 cycle로 나타났으며, 1ng - 1fg의 범위에서는 기질의 양과 C_T 값은 정확한 상관관계가 있는 것으로, 또한 0.1 fg - 1x10⁻³fg의 범위에서는 상관관계 및 정량이 불가능한 것으로 나타났다(Figure 3A). 이 모든 범위의 PCR에서 생성된 PCR product들은 같은 PCR product들을 가지고 수행된 melting curve 분석에서 -(dF/dT)의 curve 형태의 동일함이 인정되었고, 또한 88.1 $^{\circ}$ C의 동일한 melting

temperature가 확인됨으로써 모두 동일한 product만이 생성됨을 확인할 수 있었다 (Figure 3B). Real-Time PCR에서의 결과를 비교하기 위한 동일한 PCR 산물의 전기영동 결과도 정확한 233bp의 product가 10^{-3} fg까지 확인되었다(그림 3-4-9).

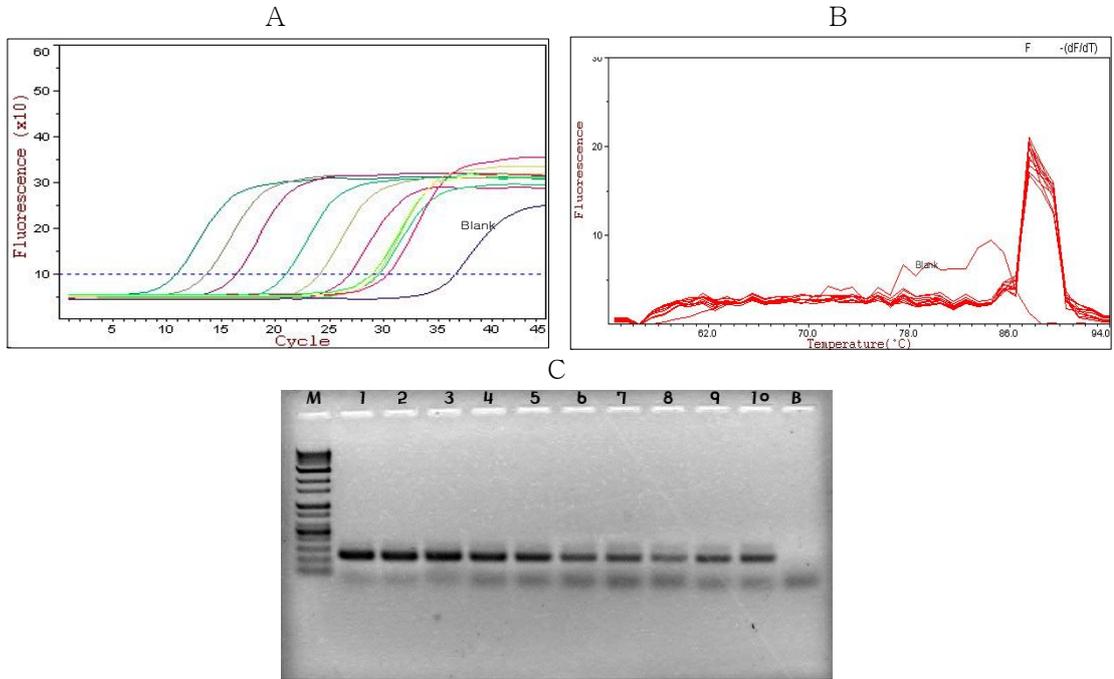


그림 3-4-9. *P. larvae subs. larvae* 검출을 위한 Real-Time PCR의 민감도 확인

초기 기질의 양을 계산하기 위하여 DNA의 양과 C_T 값과의 회귀직선을 구하였으며, 이는 $Y = -0.30X + 7.741$, $R^2 = 0.9978$ 과 같이 계산되었다. (Figure 4). 또한 Melting curve analysis에서 0.1 fg이상의 template로 수행한 PCR product는 정상적 T_m 값 (88.1°C)을 나타내었으나, 0.01 fg (10 attogram)에서 10^{-7} fg (0.0001 ag)의 범위에서 생성된 PCR product는 76°C-82°C에 이르는 비정상적 T_m 값을 나타내었으며, 전기영동에 의한 확인에서 전자는 233 bp의 정확한 PCR product의 band를 보여주었으나, 후자의 경우 PCR band를 전혀 확인할 수 없었다(그림 3-4-10).

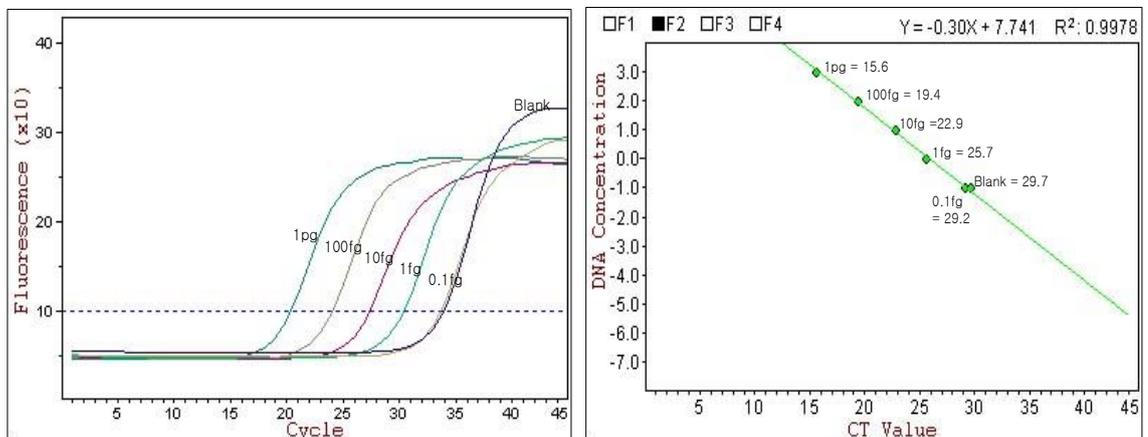


그림 3-4-10. Real-Time PCR을 통한 초기 기질 양 확인

다. 각 봉군별 감염된 병원체의 유전자적 정성분석

각 봉군별 자연감염된 병원체들 그리고 인공 감염된 *P. larvae* (AFB)의 정성 검사의 요약은 아래의 표에 요약했다(표 3-4-11, 표 3-4-12, 표 3-4-13, 표 3-4-14). 본 검사의 실험적 방법은 전 보고서에서 상술하였기에, 본 보고에서는 생략한다.

표 3-4-11. Probiotics 처리 전

	71	72	73	74	75	76	77	78
AFB	0	0	0	0	0	0	0	0
EFB								
백목병								
석고병								
노제마	0			0				
SBV								
ABPV								
DWV								
BQCV	0	0	0	0	0	0	0	0
KBV								
CBPV								
IAPV								

표 3-4-11. 1차 처리 후

	71	72	73	74	75	76	77	78
AFB	0	0	0	0	0	0	0	0
EFB								
백목병								
석고병								
노제마				0	0	0		0
SBV								
ABPV								
DWV								
BQCV	0	0	0	0	0	0	0	0
KBV								
CBPV								
IAPV								

표 3-4-12. 2차처리 후

	71	72	73	74	75	76	77	78
AFB	0	0	0	0	0	0	0	0
EFB								
백목병								
석고병								
노제마		0	0	0			0	0
SBV								
ABPV								
DWV								
BQCV	0	0	0	0			0	
KBV								
CBPV								
IAPV								

표 3-4-13. 3차 처리 후

	71	72	73	74	75	76	77	78
AFB	0	0	0	0	0	0	0	0
EFB								
백목병								
석고병								0
노제마	0	0		0		0		
SBV								
ABPV								
DWV								
BQCV						0		
KBV								
CBPV								
IAPV					0	0	0	

표 3-4-14. 4차 처리 후

	71	72	73	74	75	76	77	78
AFB	0	0	0	0	0	0	0	0
EFB								
백목병								
석고병								
노제마					0		0	
SBV								
ABPV								
DWV								
BQCV								
KBV								
CBPV								
IAPV								

다음은 각 봉군별 자연 감염된 병원체들 그리고 인공 감염된 *P. larvae* (AFB)의 정성 검사 결과사진이다. 본 검사의 실험적 방법은 생략한다.

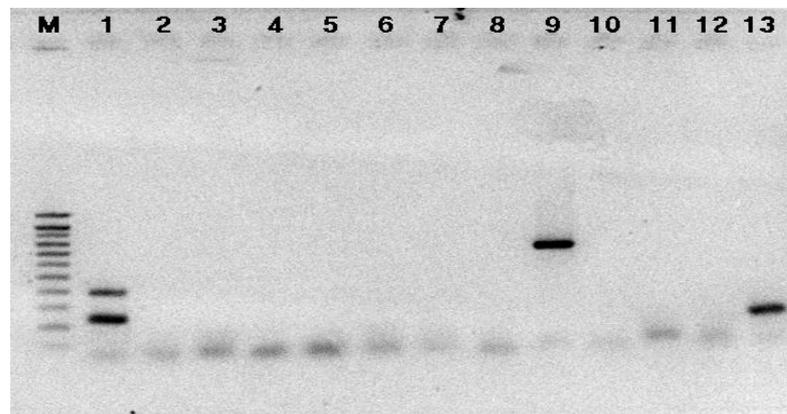


그림 3-4-11. 시료번호 71 (2010. 6. 30)의 PCR 진단 결과

- Lane M : 1kb marker
- Lane 1 : AFB16S F/R primer를 사용한 미국부저병의 PCR진단결과
- Lane 2 : EFB-NS F/R primer를 사용한 유럽부저병의 PCR진단결과
- Lane 3 : A.apis QP F/R primer를 사용한 백목병의 PCR진단결과
- Lane 4 : A.flaws F/R primer를 사용한 석고병의 PCR진단결과
- Lane 5 : *Nosema* F/R primer를 사용한 노제마병의 PCR진단결과
- Lane 6 : SBV F/R primer를 사용한 낭충봉아부패병의 PCR진단결과
- Lane 7 : ABPV F/R primer를 사용한 급성꿀벌마비병의 PCR진단결과
- Lane 8 : DWV F/R primer를 사용한 날개불구병의 PCR진단결과
- Lane 9 : BQCV F/R primer를 사용한 Black Queen Cell Virus의 PCR진단결과
- Lane 10 : KBV F/R primer를 사용한 Kashmir Bee Virus의 PCR진단결과
- Lane 11 : CBPV F/R primer를 사용한 만성꿀벌마비병의 PCR진단결과
- Lane 12 : IAPV F/R primer를 사용한 Israel Acute Paralysis Virus의 PCR진단결과
- Lane 13 : β -actin (positive control)

Lane 1,9 에서 각각 특이적인 band가 관찰되었다. 이 결과는 시료에서 미국부저병, Black Queen Cell Virus(BQCV)의 특이 유전자가 검출되었음을 나타낸다(그림 3-4-11).

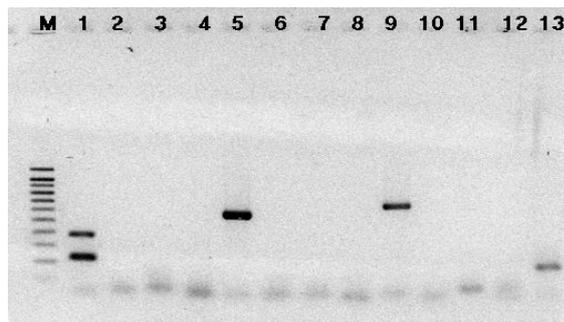


그림 3-4-12. 시료번호 72(2010. 6. 30)의 PCR 진단 결과

Lane 설명은 그림 3-4-11과 동일하다.

Lane 1, 5, 9에서 각각 특이적인 band가 관찰되었다. 이 결과는 시료에서 미국부저병, 노제마병(*Nosema*), Black Queen Cell Virus(BQCV)의 특이 유전자가 검출되었음을 나타낸다(그림 3-4-12).

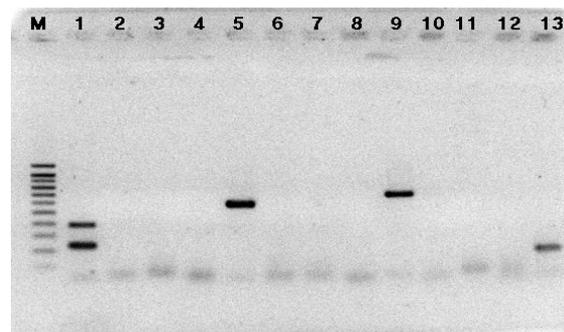


그림 3-4-13. 시료번호 73(2010. 6. 30)의 PCR 진단 결과

Lane 설명은 그림 3-4-11과 동일하다.

Lane 1, 5, 9에서 각각 특이적인 band가 관찰되었다. 이 결과는 시료에서 미국부저병, 노제마병(*Nosema*), Black Queen Cell Virus(BQCV)의 특이 유전자가 검출되었음을 나타낸다(그림 3-4-13).

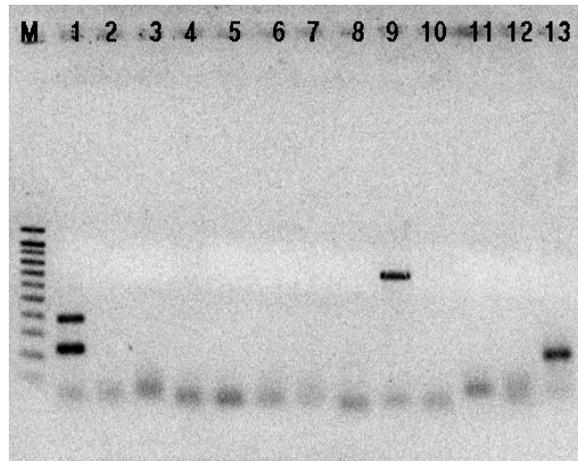


그림 3-4-14. 시료번호 74(2010. 6. 30)의 PCR 진단 결과

Lane 설명은 그림 3-4-11과 동일하다.

Lane 1, 9에서 각각 특이적인 band가 관찰되었다. 이 결과는 시료에서 미국부저병, Black Queen Cell Virus(BQCV)의 특이 유전자가 검출되었음을 나타낸다(그림 3-4-14).

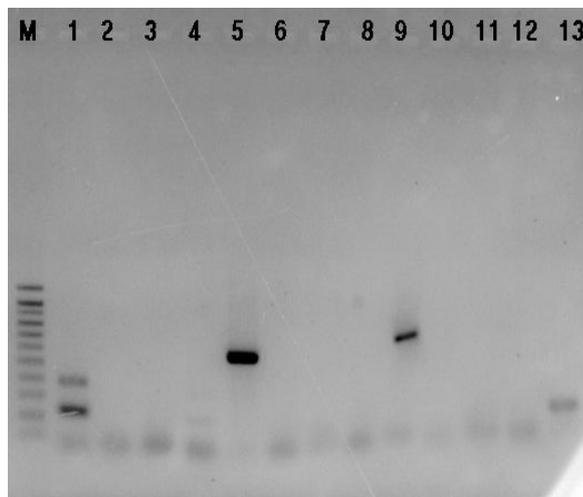


그림 3-4-15. 시료번호 75(2010. 6. 30)의 PCR 진단 결과

Lane 설명은 그림 3-4-11과 동일하다.

Lane 1, 5, 9에서 각각 특이적인 band가 관찰되었다. 이 결과는 시료에서 미국부저병, 노제마병(*Nosema*), Black Queen Cell Virus(BQCV)의 특이 유전자가 검출되었음을 나타낸다(그림 3-4-15).

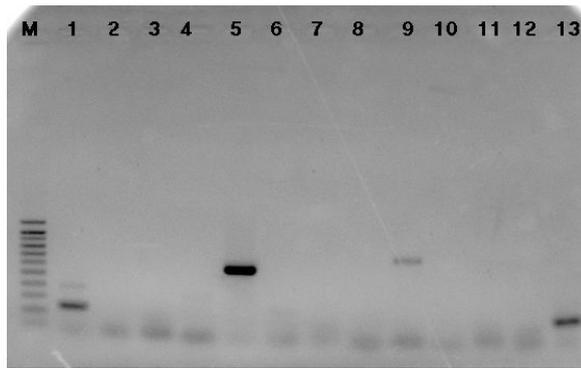


그림 3-4-16. 시료번호 76(2010. 6. 30)의 PCR 진단 결과

Lane 설명은 그림 3-4-11과 동일하다.

Lane 1, 5, 9에서 각각 특이적인 band가 관찰되었다. 이 결과는 시료에서 미국부저병, 노제마병(*Nosema*), Black Queen Cell Virus(BQCV)의 특이 유전자가 검출되었음을 나타낸다(그림 3-4-16).

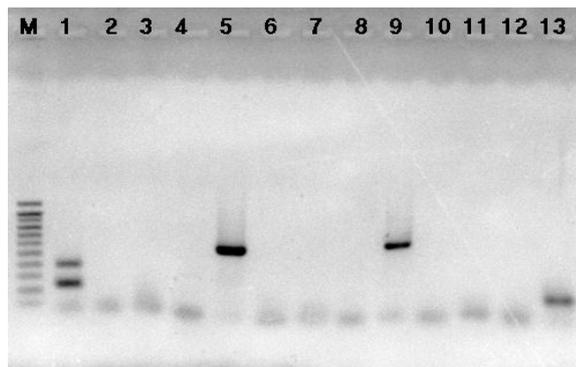


그림 3-4-17. 시료번호 77(2010. 6. 30)의 PCR 진단 결과

Lane 설명은 그림 3-4-11과 동일하다.

Lane 1, 5, 9에서 각각 특이적인 band가 관찰되었다. 이 결과는 시료에서 미국부저병, 노제마병(*Nosema*), Black Queen Cell Virus(BQCV)의 특이 유전자가 검출되었음을 나타낸다(그림 3-4-17).

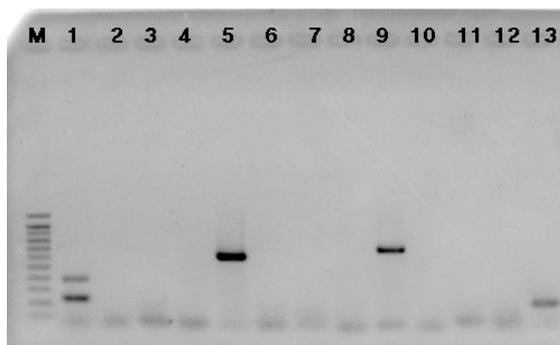


그림 3-4-18. 시료번호 78(2010. 6. 30)의 PCR 진단 결과

Lane 설명은 그림 3-4-11과 동일하다.

Lane 1, 5, 9에서 각각 특이적인 band가 관찰되었다. 이 결과는 시료에서 미국부저병, 노제마병(*Nosema*), Black Queen Cell Virus(BQCV)의 특이 유전자가 검출되었음을 나타낸다(그림 3-4-18).

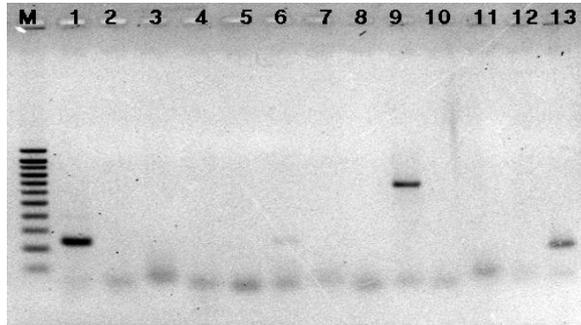


그림 3-4-19. 시료번호 71 (2010. 7. 8)의 PCR 진단 결과

Lane 설명은 그림 3-4-11과 동일하다.

Lane 1, 9 에서 각각 특이적인 band가 관찰되었다. 이 결과는 시료에서 미국부저병, Black Queen Cell Virus(BQCV)의 특이 유전자가 검출되었음을 나타낸다(그림 3-4-19).

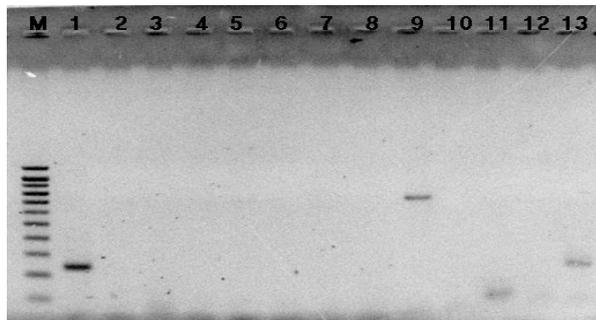


그림 3-4-20. 시료번호 72(2010. 7. 8)의 PCR 진단 결과

Lane 설명은 그림 3-4-11과 동일하다.

Lane 1, 9에서 각각 특이적인 band가 관찰되었다. 이 결과는 시료에서 미국부저병, Black Queen Cell Virus(BQCV)의 특이 유전자가 검출되었음을 나타낸다(그림 3-4-21).

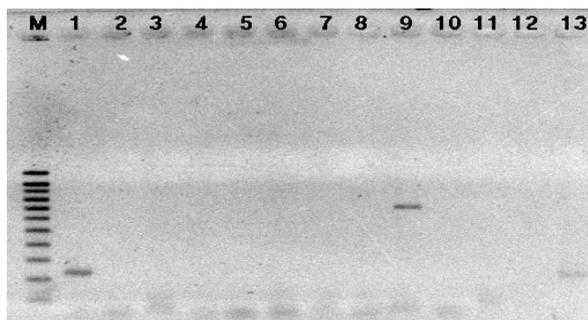


그림 3-4-21. 시료번호 73(2010. 7. 8)의 PCR 진단 결과

Lane 설명은 그림 3-4-11과 동일하다.

Lane 1, 9에서 각각 특이적인 band가 관찰되었다. 이 결과는 시료에서 미국부저병, Black Queen Cell Virus(BQCV)의 특이 유전자가 검출되었음을 나타낸다(그림 3-4-21).

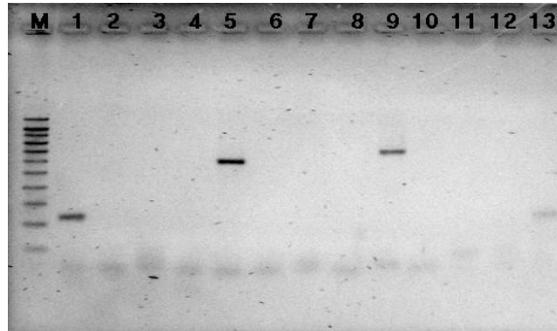


그림 3-4-22. 시료번호 74(2010. 7. 8)의 PCR 진단 결과

Lane 설명은 그림 3-4-11과 동일하다.

Lane 1, 5, 9에서 각각 특이적인 band가 관찰되었다. 이 결과는 시료에서 미국부저병, 노제마병(*Nosema*), Black Queen Cell Virus(BQCV)의 특이 유전자가 검출되었음을 나타낸다(그림 3-4-22).

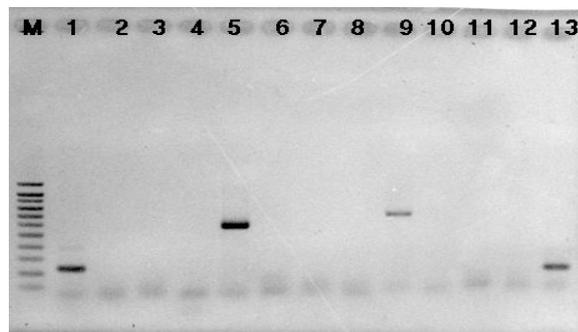


그림 3-4-23. 시료번호 75(2010. 7. 8)의 PCR 진단 결과

Lane 설명은 그림 3-4-11과 동일하다.

Lane 1, 5, 9에서 각각 특이적인 band가 관찰되었다. 이 결과는 시료에서 미국부저병, 노제마병(*Nosema*), Black Queen Cell Virus(BQCV)의 특이 유전자가 검출되었음을 나타낸다(그림 3-4-23).

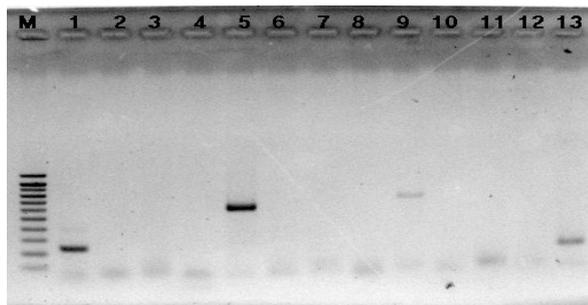


그림 3-4-24. 시료번호 76(2010. 7. 8)의 PCR 진단 결과

Lane 설명은 그림 3-4-11과 동일하다.

Lane 1, 5, 9에서 각각 특이적인 band가 관찰되었다. 이 결과는 시료에서 미국부저병, 노제마병(*Nosema*), Black Queen Cell Virus(BQCV)의 특이 유전자가 검출되었음을 나타낸다(그림 3-4-24).

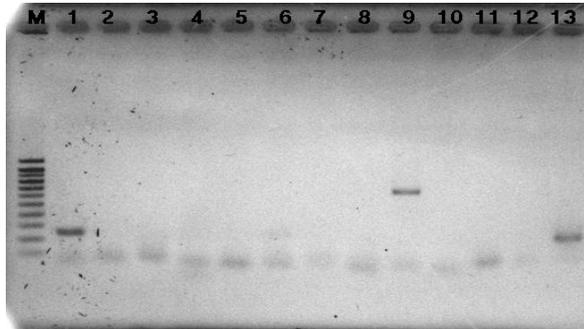


그림 3-4-25. 시료번호 77(2010. 7. 8)의 PCR 진단 결과

Lane 설명은 그림 3-4-11과 동일하다.

Lane 1, 9에서 각각 특이적인 band가 관찰되었다. 이 결과는 시료에서 미국부저병, Black Queen Cell Virus(BQCV)의 특이 유전자가 검출되었음을 나타낸다(그림 3-4-25).

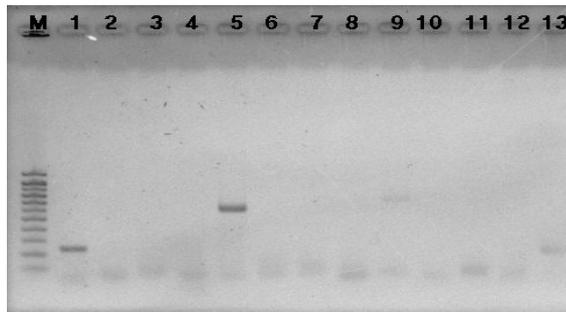


그림 3-4-26. 시료번호 78(2010. 7. 8)의 PCR 진단 결과

Lane 설명은 그림 3-4-11과 동일하다.

Lane 1, 5, 9에서 각각 특이적인 band가 관찰되었다. 이 결과는 시료에서 미국부저병, 노제마병(*Nosema*), Black Queen Cell Virus(BQCV)의 특이 유전자가 검출되었음을 나타낸다(그림 3-4-26).

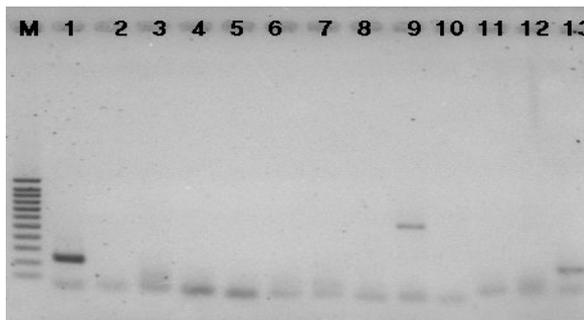


그림 3-4-27. 시료번호 71(2010. 7. 15)의 PCR 진단 결과

Lane 설명은 그림 3-4-11과 동일하다.

Lane 1,9 에서 각각 특이적인 band가 관찰되었다. 이 결과는 시료에서 미국부저병, Black Queen Cell Virus(BQCV)의 특이 유전자가 검출되었음을 나타낸다(그림 3-4-27).

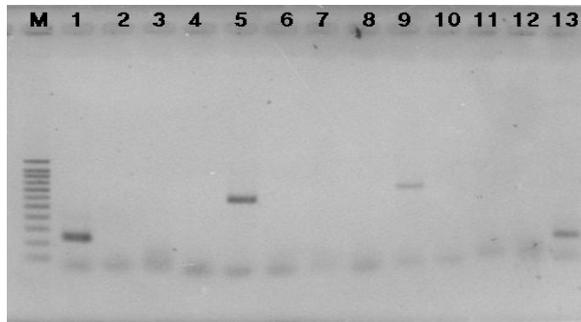


그림 3-4-28. 시료번호 72(2010. 7. 15)의 PCR 진단 결과

Lane 설명은 그림 3-4-11과 동일하다.

Lane 1, 5, 9에서 각각 특이적인 band가 관찰되었다. 이 결과는 시료에서 미국부저병, 노제마병(*Nosema*), Black Queen Cell Virus(BQCV)의 특이 유전자가 검출되었음을 나타낸다(그림 3-4-28).

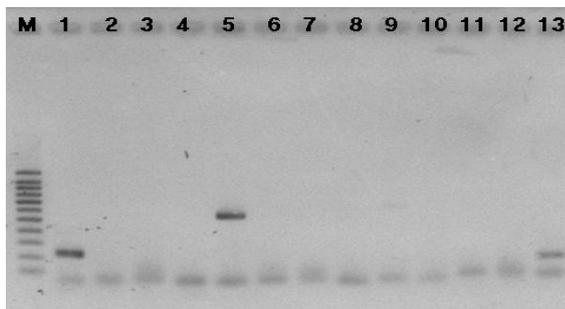


그림 3-4-29. 시료번호 73(2010. 7. 15)의 PCR 진단 결과

Lane 설명은 그림 3-4-11과 동일하다.

Lane 1, 5, 9에서 각각 특이적인 band가 관찰되었다. 이 결과는 시료에서 미국부저병, 노제마병(*Nosema*), Black Queen Cell Virus(BQCV)의 특이 유전자가 검출되었음을 나타낸다(그림 3-4-29).

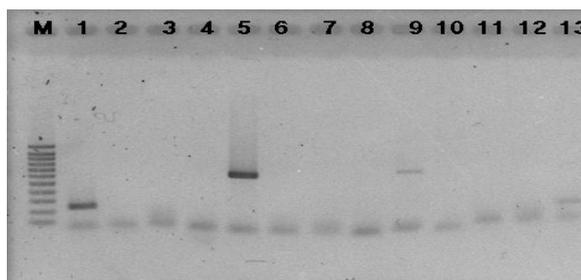


그림 3-4-30. 시료번호 74(2010. 7. 15)의 PCR 진단 결과

Lane 설명은 그림 3-4-11과 동일하다.

Lane 1, 5, 9에서 각각 특이적인 band가 관찰되었다. 이 결과는 시료에서 미국부저병, 노제마병(*Nosema*), Black Queen Cell Virus(BQCV)의 특이 유전자가 검출되었음을 나타낸다(그림 3-4-30).

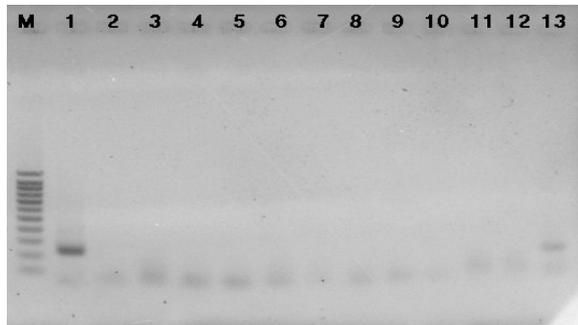


그림 3-4-31. 시료번호 75(2010. 7. 15)의 PCR 진단 결과

Lane 설명은 그림 3-4-11과 동일하다.

Lane 1에서 각각 특이적인 band가 관찰되었다. 이 결과는 시료에서 미국부저병의 특이 유전자가 검출되었음을 나타낸다(그림 3-4-31).

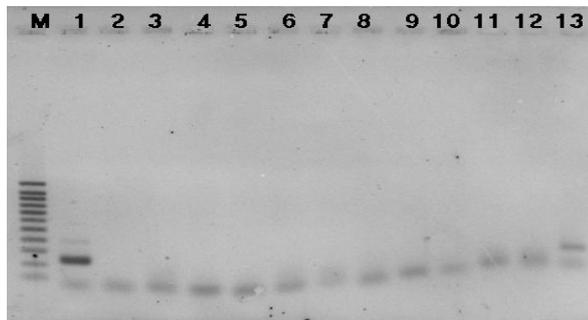


그림 3-4-32. 시료번호 76(2010. 7. 15)의 PCR 진단 결과

Lane 설명은 그림 3-4-11과 동일하다.

Lane 1에서 각각 특이적인 band가 관찰되었다. 이 결과는 시료에서 미국부저병의 특이 유전자가 검출되었음을 나타낸다(그림 3-4-32).

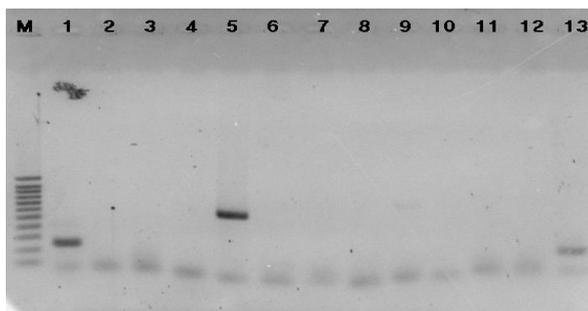


그림 3-4-33. 시료번호 77(2010. 7. 15)의 PCR 진단 결과

Lane 설명은 그림 3-4-11과 동일하다.

Lane 1, 5, 9에서 각각 특이적인 band가 관찰되었다. 이 결과는 시료에서 미국부저병, 노제마병(*Nosema*), Black Queen Cell Virus(BQCV)의 특이 유전자가 검출되었음을 나타낸다(그림 3-4-33).

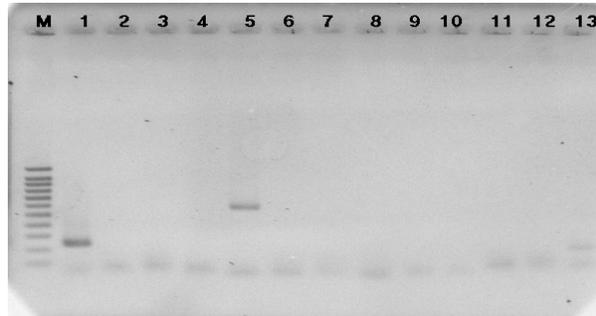


그림 3-4-34. 시료번호 78(2010. 7. 15)의 PCR 진단 결과

Lane 설명은 그림 3-4-11과 동일하다.

Lane 1, 5에서 각각 특이적인 band가 관찰되었다. 이 결과는 시료에서 미국부저병, 노제마병(*Nosema*)의 특이 유전자가 검출되었음을 나타낸다(그림 3-4-34).

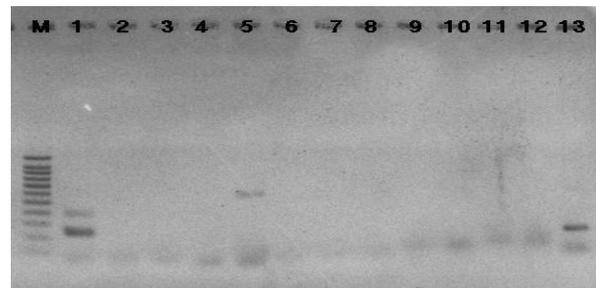


그림 3-4-35. 시료번호 71(2010. 7. 22)의 PCR 진단 결과

Lane 설명은 그림 3-4-11과 동일하다.

Lane 1,5 에서 각각 특이적인 band가 관찰되었다. 이 결과는 시료에서 미국부저병, 노제마병(*Nosema*)의 특이 유전자가 검출되었음을 나타낸다(그림 3-4-35).

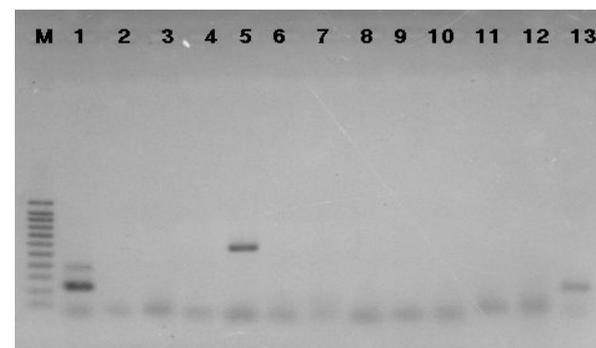


그림 3-4-36. 시료번호 72(2010. 7. 22)의 PCR 진단 결과

Lane 설명은 그림 3-4-11과 동일하다.

Lane 1, 5에서 각각 특이적인 band가 관찰되었다. 이 결과는 시료에서 미국부저병, 노제마병(*Nosema*)의 특이 유전자가 검출되었음을 나타낸다(그림 3-4-36).

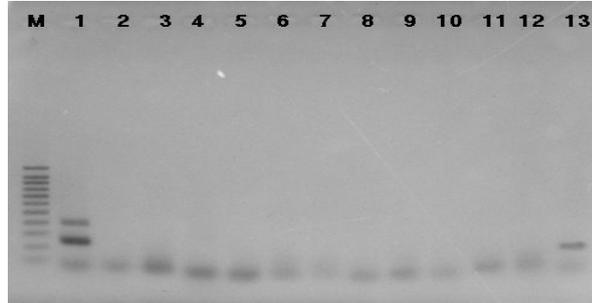


그림 3-4-37. 시료번호 73(2010. 7. 22)의 PCR 진단 결과

Lane 설명은 그림 3-4-11과 동일하다.

Lane 1에서 각각 특이적인 band가 관찰되었다. 이 결과는 시료에서 미국부저병의 특이 유전자가 검출되었음을 나타낸다(그림 3-4-37).

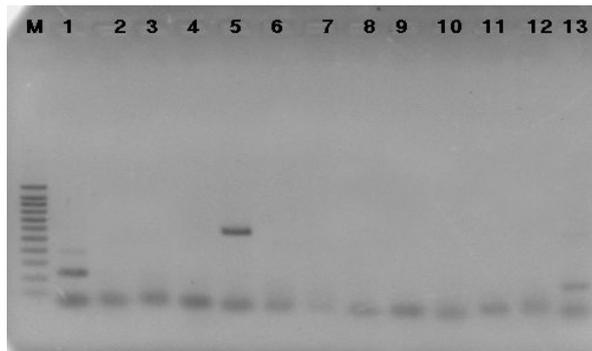


그림 3-4-38. 시료번호 74(2010. 7. 22)의 PCR 진단 결과

Lane 설명은 그림 3-4-11과 동일하다.

Lane 1, 5에서 각각 특이적인 band가 관찰되었다. 이 결과는 시료에서 미국부저병, 노제마병(*Nosema*)의 특이 유전자가 검출되었음을 나타낸다(그림 3-4-38).

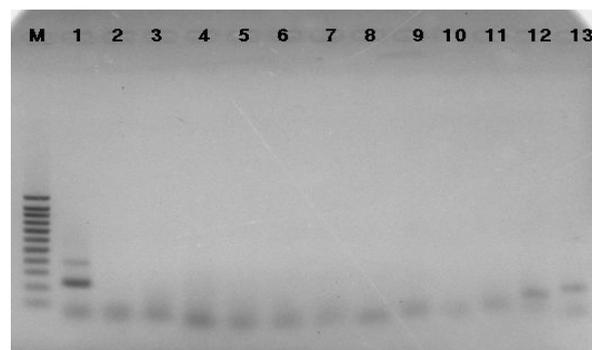


그림 3-4-39. 시료번호 75(2010. 7. 22)의 PCR 진단 결과

Lane 설명은 그림 3-4-11과 동일하다.

Lane 1, 12에서 각각 특이적인 band가 관찰되었다. 이 결과는 시료에서 미국부저병, Israeli acute paralysis virus(IAPV)의 특이 유전자가 검출되었음을 나타낸다(그림 3-4-39).

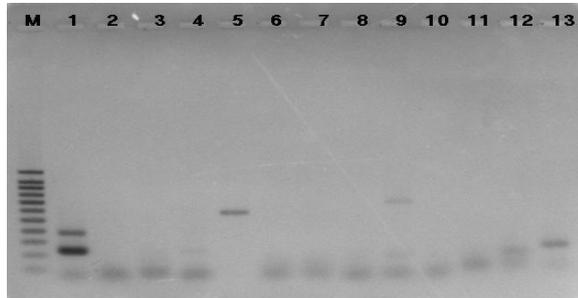


그림 3-4-40. 시료번호 76(2010. 7. 22)의 PCR 진단 결과

Lane 설명은 그림 3-4-11과 동일하다.

Lane 1, 5, 9, 12에서 각각 특이적인 band가 관찰되었다. 이 결과는 시료에서 미국부저병, 노제마병(*Nosema*), Black Queen Cell Virus(BQCV), Israeli acute paralysis virus(IAPV)의 특이 유전자가 검출되었음을 나타낸다(그림 3-4-40).

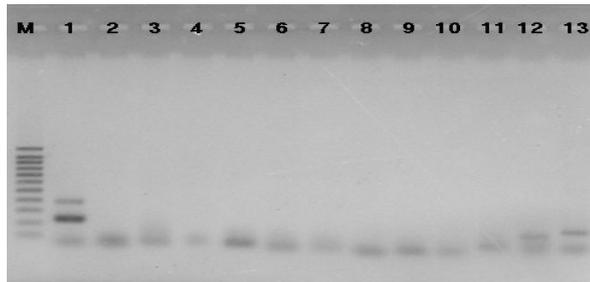


그림 3-4-41. 시료번호 77(2010. 7. 22)의 PCR 진단 결과

Lane 설명은 그림 3-4-11과 동일하다.

Lane 1, 12에서 각각 특이적인 band가 관찰되었다. 이 결과는 시료에서 미국부저병, Israeli acute paralysis virus(IAPV)의 특이 유전자가 검출되었음을 나타낸다(그림 3-4-41).

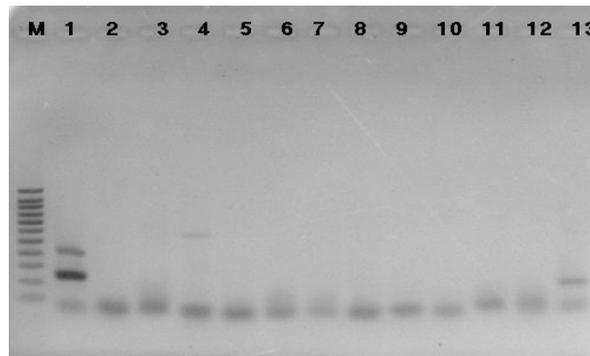


그림 3-4-42. 시료번호 78(2010. 7. 22)의 PCR 진단 결과

Lane 설명은 그림 3-4-11과 동일하다.

Lane 1, 4에서 각각 특이적인 band가 관찰되었다. 이 결과는 시료에서 미국부저병, 석고병의 특이 유전자가 검출되었음을 나타낸다(그림 3-4-42).

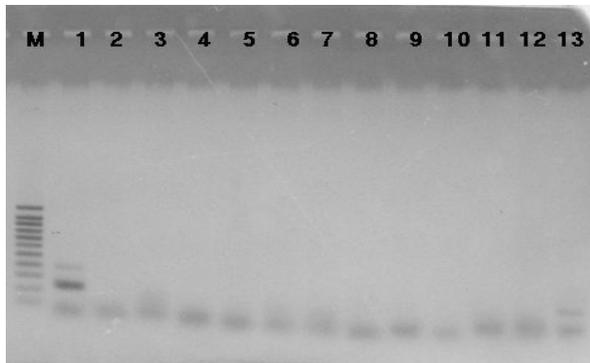


그림 3-4-43. 시료번호 71(2010. 7. 29)의 PCR 진단 결과

Lane 설명은 그림 3-4-11과 동일하다.

Lane 1에서 각각 특이적인 band가 관찰되었다. 이 결과는 시료에서 미국부저병의 특이 유전자가 검출되었음을 나타낸다(그림 3-4-43).

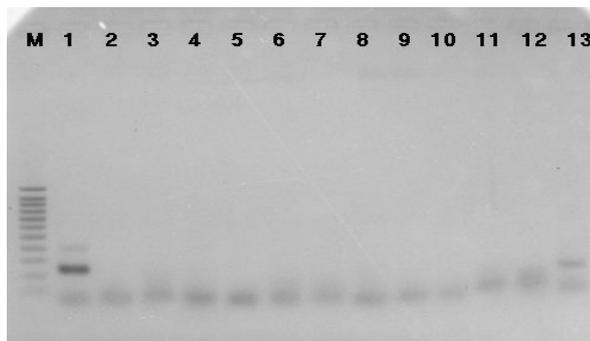


그림 3-4-44. 시료번호 72(2010. 7. 29)의 PCR 진단 결과

Lane 설명은 그림 3-4-11과 동일하다.

Lane 1에서 각각 특이적인 band가 관찰되었다. 이 결과는 시료에서 미국부저병의 특이 유전자가 검출되었음을 나타낸다(그림 3-4-44).

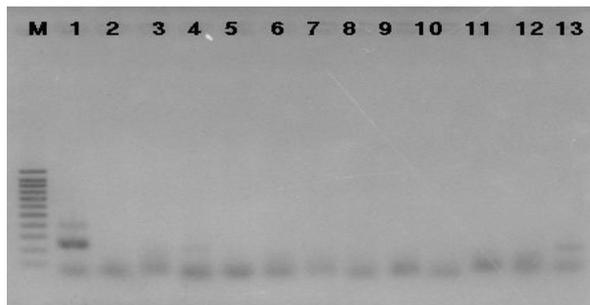


그림 3-4-45. 시료번호 73(2010. 7. 29) PCR 진단 결과

Lane 설명은 그림 3-4-11과 동일하다.

Lane 1에서 각각 특이적인 band가 관찰되었다. 이 결과는 시료에서 미국부저병의 특이 유전자가 검출되었음을 나타낸다(그림 3-4-45).

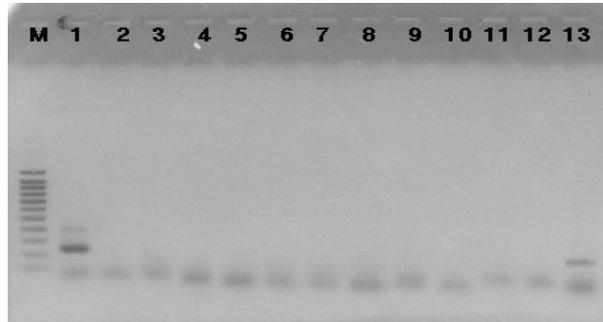


그림 3-4-46. 시료번호 74(2010. 7. 29)의 PCR 진단 결과

Lane 설명은 그림 3-4-11과 동일하다.

Lane 1에서 각각 특이적인 band가 관찰되었다. 이 결과는 시료에서 미국부저병의 특이 유전자가 검출되었음을 나타낸다(그림 3-4-46).

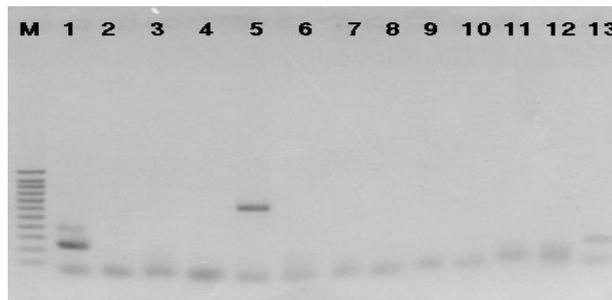


그림 3-4-47. 시료번호 75(2010. 7. 29)의 PCR 진단 결과

Lane 설명은 그림 3-4-11과 동일하다.

Lane 1, 5에서 각각 특이적인 band가 관찰되었다. 이 결과는 시료에서 미국부저병, 노제마(*Nosema*)의 특이 유전자가 검출되었음을 나타낸다(그림 3-4-47).

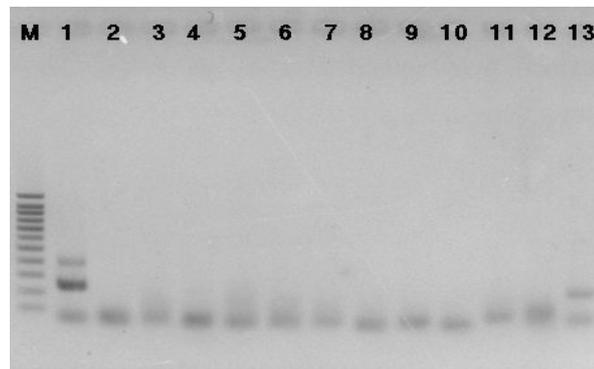


그림 3-4-48. 시료번호 76(2010. 7. 29)의 PCR 진단 결과

Lane 설명은 그림 3-4-11과 동일하다.

Lane 1에서 각각 특이적인 band가 관찰되었다. 이 결과는 시료에서 미국부저병의 특이 유전자가 검출되었음을 나타낸다(그림 3-4-48).

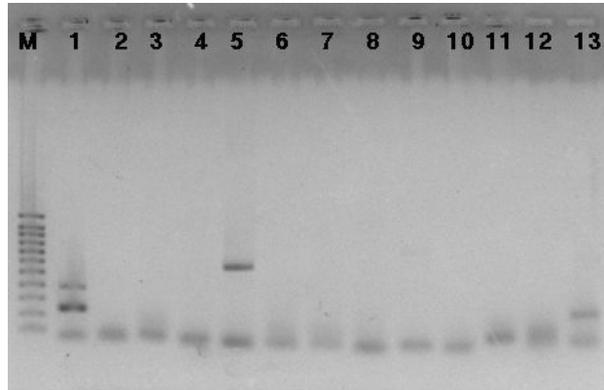


그림 3-4-49. 시료번호 77(2010. 7. 29)의 PCR 진단 결과

Lane 설명은 그림 3-4-11과 동일하다.

Lane 1, 5에서 각각 특이적인 band가 관찰되었다. 이 결과는 시료에서 미국부저병, 노제마(*Nosema*)의 특이 유전자가 검출되었음을 나타낸다(그림 3-4-49).

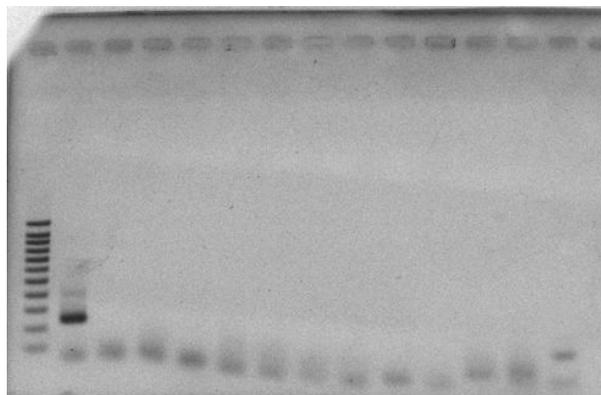


그림 3-4-50. 시료번호 78의 PCR 진단 결과

Lane 설명은 그림 3-4-11과 동일하다.

Lane 1에서 각각 특이적인 band가 관찰되었다. 이 결과는 시료에서 미국부저병의 특이 유전자가 검출되었음을 나타낸다(그림 3-4-50).

6. 봉군 단위 예방효과검증을 위한 저·고준위 경쟁 감염실험(*Nosema*)

가. 봉군에 대한 Probiotics 처리 및 야외실험에 의한 실측

주관기관으로부터 probiotics 후보로 1차 후보로 선발된 *Lactobacillus* sp 분쇄 현탁액을 꿀벌에게 당액에 의한 직접적인 사육공급방법을 사용하여 공급했다. 사양을 위한 당액은 저밀용 당액(설탕 3kg + 물 2L)을 사용하였으며, 고농도 probiotics는 당액에 2% (v/v) *Lactobacillus* sp 분쇄 현탁액을 혼합하여 만들었으며, 저농도 probiotics는 당액에 0.5% (v/v) *Lactobacillus* sp 분쇄 현탁액을 혼합했다.

나. *Nosema ceranae* 검출을 위한 새로운 검사법의 개발

N. ceranae-specific LAMP에 사용된 primer는 Table 1에 나타내었다. Forward inner primer인 *Nosema*-FIP는 *N. ceranae* anti-sense sequence의 상보적인 염기서열(F2)과 TTTT linker 그리고 loop를 형성하는 염기서열(F1c) 부분을 합한 것으로 45nt의 long-nucleotide로 제작되었다. Reverse inner primer인 *Nosema*-BIP은 *N. ceranae* anti-sense sequence의 상보적인 염기서열(B2)과 TTTT linker, loop를 형성하는 염기서열(B1c) 부분을 합한 것으로 48nt의 long-nucleotide로 제작되었다. 또한 *Nosema*-F3와 *Nosema*-B3는 inner primer들의 바깥쪽에 위치하도록 설계하였으며 각각 25nt, 19nt의 크기로 제작했다. 이 primer들은 Bionics 사(Korea)에 의뢰하여 제작하였으며 inner primer들의 경우에는 PAGE 정제 후 사용했다(표 3-4-15, 그림 3-4-51).

표 3-4-15. *N. ceranae* 특이 LAMP를 위한 primer들의 염기서열

Oligo	Sequence (5'→3')	Length(mer)
<i>Nosema</i> -F3	CTACGTTAAAGTG TAGATAAGATGT	25
<i>Nosema</i> -B3	TCCCATAACTGCCTCAGAT	19
<i>Nosema</i> -FIP ¹	ACCCGTCACAGCCTTGTTAA-TTTT-GTAAGAGTGAGACC TATCAGC	45
<i>Nosema</i> -BIP ²	ACTTTGTAATATTCCGGAGAAGGAG-TTTT-CCATAGGTC AAGTTTCGCC	48

1) FIP : combine by F1c and F2

2) BIP : combine by B1c and B2

```

5'-TAGACGCTATTCCTAAGATTAACCCATGCATGTTTTTGACATTTGAAAAATGGA
CTGCTCAGTAATACTCACTTTATTTTATGTAAATTTTAAATTAACTACGTTAAAGTG
TAGATAAGATGTTTACAGTAAGAGTGAGACC TATCAGCTAGTTGTTAAGGTAATGGC
TAAACAAGGCTGTGACGGGTAACGGTATTACTTTGTAATATTCCGGAGAAGGAGCCT
GAGAGACGGCTACTAAGTCTAAGGATTGCAGCAGGGGCGAACTTGACCTATGGATT
TTATCTGAGGCAGTTATGGGAAGTAATATTATATTGTTTTCATATTTTAAAAGTATAT
GAGGTGATTAATTGGAGGGCAAATCAAGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACTTGTTTC-3'
    
```

그림 3-4-51. *N. ceranae* 염기서열 내에서의 primer 위치

최적 등은 온도를 측정하기 위하여 52.5℃, 54.2℃, 56.4℃, 58.9℃, 61.0℃ 에서 1시간 동안 각기 등은조건하에서 *N. ceranae*-specific LAMP를 진행하였으며, 각 LAMP 반응이 끝난 후 전기영동으로 확인했다. 52.5-61.0℃ 의 범위에서 *N. ceranae*-specific DNA가 무난히 신장되는 것을 확인하였으며, 신장된 DNA는 추론된 100bp의 산물부터 loading well까지 다양한 크기로 나타났다. *N. ceranae*-specific LAMP에 최적의 온도 범위는 반복실험을 통하여 56.4℃ 로 측정되었으며, 이후의 실험은 측정된 온도인 56.4℃에서 수행했다(그림 3-4-52).

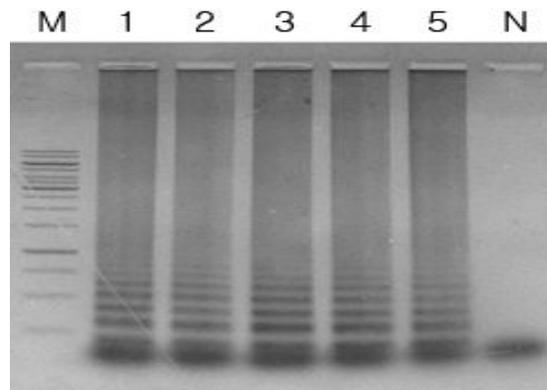


그림 3-4-52. *N. ceranae* 특이 LAMP의 최적 온도 확인

최적 등은 온도를 측정하기 위하여 gradient PCR을 수행했다. Lane 1부터 5는 각각 52.5℃, 54.2℃, 56.4℃, 58.9℃, 61.0℃에서 실험을 수행한 결과를 나타내며 lane 3에서 증폭이 가장 잘 이루어진 것으로 판단되어 최적 온도는 56.4℃로 측정되었다.

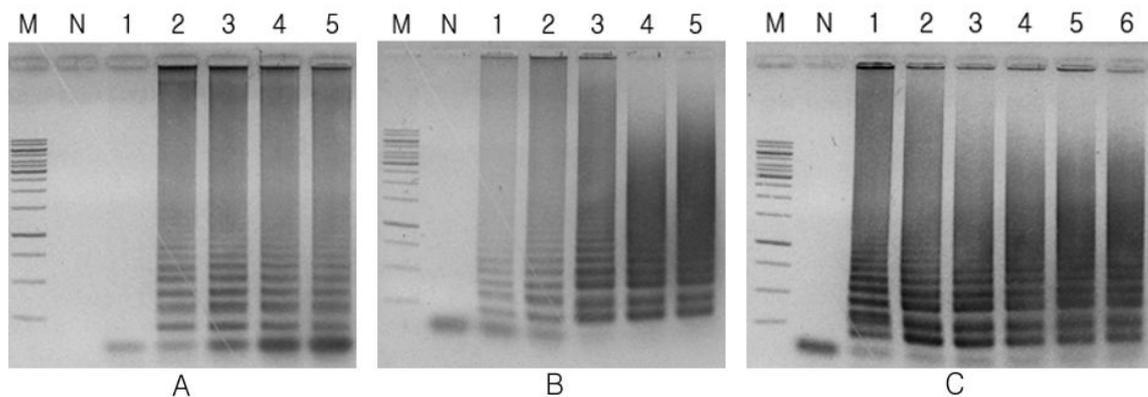


그림 3-4-53. *N. ceranae* 특이 LAMP법의 최적 조건 확립

Panel A. primer의 최적 농도 확인을 위하여 inner와 outer의 primer 농도에 변화를 주어 실험을 수행했다. Lane 1은 5pmole와 1.25pmole, Lane 2는 10pmole과 2.5pmole, Lane 3는 20pmole과 5pmole, Lane 4는 40pmole과 10pmole, Lane 5는 60pmole과 15pmole의 *Nosema*-FIP/BIP와 *Nosema*-F3/B3를 각각 사용했다. **Panel B.** dNTP의 최적 농도 확인. Lane M은 1Kb ladder marker (Fermentas)이다. Lane N은 negative control이다. Lane 1부터 5는 LAMP 산물로 차례대로 1.25mM, 2.5mM, 5mM, 7.5mM,

10mM의 dNTP를 사용했다. dNTP의 최적 농도는 5mM로 확인되었다. **Panel C.** *Bst* DNA polymerase의 최적 농도 확인. Lane M은 1Kb ladder marker (Fermentas)이다. Lane N은 negative control이다. Lane 1 부터 6는 LAMP 산물로 차례대로 4U, 8U, 16U, 24U, 32U, 40U의 *Bst* DNA polymerase를 사용했다. *Bst* DNA polymerase의 최적 농도는 4U로 확인되었다.

N. ceranae-specific LAMP에서 primer 의 검출한계

*N. ceranae*에 대한 *N. ceranae*-specific LAMP의 검출한계를 특정하기 위하여 pBX-*Nosema* plasmid를 1×10^8 copies부터 1×10^0 copy까지 1/100 씩 단계별로 희석한 후 주형으로 사용했다. 검출한계 측정 결과 1×10^2 copies의 pBX-*Nosema* plasmid를 사용한 LAMP까지 전기영동으로 확인할 수 있었다(그림 3-4-53).

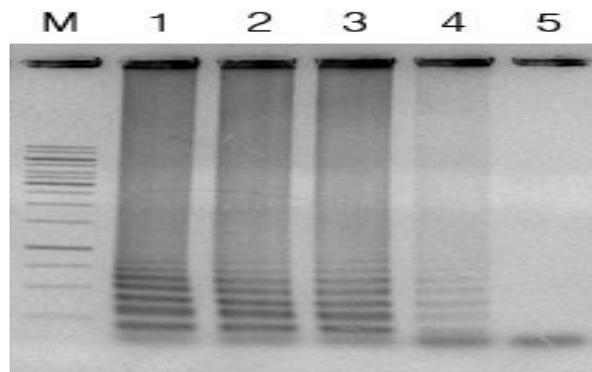


그림 3-4-54. *N. ceranae* 특이 LAMP의 민감도 측정

N. ceranae 특이 LAMP법의 한계를 측정했다. pBX-*Nosema* 용액을 1×10^8 copeis/ μ l부터 1/100씩 단계 희석하여 주형으로 사용했다. Lane M은 1Kb ladder marker (Fermentas)이다. Lane 1은 주형으로 1×10^8 copeis/ μ l의 pBX-*Nosema*를 사용했다. Lane 2는 주형으로 1×10^6 copeis/ μ l의 pBX-*Nosema*를 사용했다. Lane 3는 주형으로 1×10^4 copeis/ μ l의 pBX-*Nosema*를 사용하였다 Lane 4는 주형으로 1×10^2 copeis/ μ l의 pBX-*Nosema*를 사용했다. Lane 5는 주형으로 1×10^0 copy/ μ l의 pBX-*Nosema*를 사용했다(그림 3-4-54).

꿀벌시료에서 *N. ceranae*-specific LAMP에 의한 *N. ceranae*의 검출

N. ceranae-specific LAMP가 실제 *N. ceranae*감염 꿀벌시료에 대하여 적용 가능한지를 알아보기 위하여 *Nosema* 특이 real-time PCR에 의하여 감염이 확인된 꿀벌과 감염되지 않은 꿀벌을 대상으로 검사를 수행했다. 대조군으로는 pBX-*Nosema* plasmid (1×10^8 copies)를 사용했다. 실제 *N. ceranae*에 감염된 꿀벌시료에서는 *N. ceranae*-specific LAMP에 의하여 pBX-*Nosema* plasmid의 경우와 같이 특징적인 LAMP 생성물이 형성되는 것을 확인할 수 있었으며, *N. ceranae*에 감염되지 않은 꿀벌시료를 사용한 *N. ceranae*-specific LAMP에서는 LAMP 생성물이 형성되지 않았다. 본 실험은 실제 감염된 꿀벌 시료에 대하여 검출 가능성을 보여주었다.

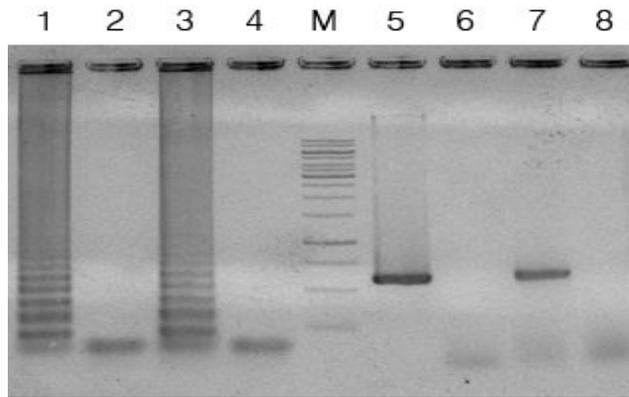


그림 3-4-55. 감염된 꿀벌에서의 *N. ceranae*-특이 LAMP 적용

Lane M은 1Kb ladder marker (Fermentas)이다. Lane 1과 5는 pBX-*Nosema* plasmid 1ng을 사용했다. Lane 2와 6은 주형을 첨가하지 않았다. Lane 3과 7은 노제마에 감염된 꿀벌샘플을 사용했다. Lane 4와 8은 노제마에 감염되지 않은 꿀벌샘플을 사용했다. Lane 1-4 는 *N. ceranae*-특이 LAMP법의 반응물이다. Lane 5-8은 *N. ceranae*-특이 real-time PCR의 반응물이다(그림 3-4-55).

신장된 *N. ceranae*-specific LAMP 생성물에 1×SybrGreen를 첨가시킨 뒤, 이 혼합물을 ultraviolet trans illuminator 상에서 관찰하여 녹색형광을 확인했다. 대조군에서도 녹색형광이 나타나긴 하였으나 그 정도가 LAMP 생성물에 비하여 약한 것을 확인할 수 있었다. SybrGreen을 이용한 *N. ceranae*-specific LAMP의 생성물 확인은 대조군과 함께 관찰했을 때 확인가능하다(그림 3-4-56).

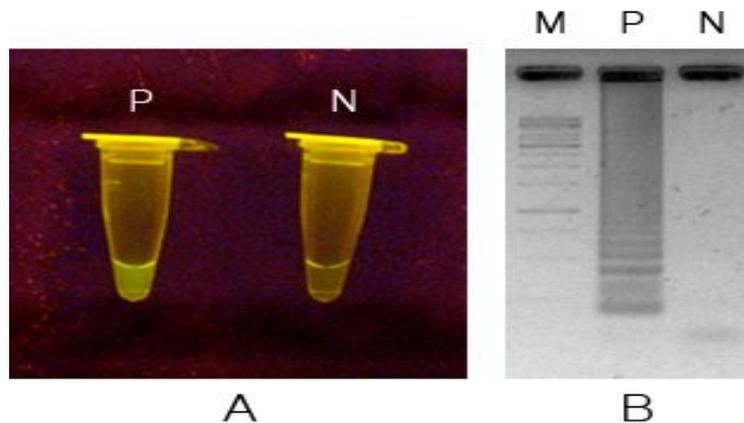


그림 3-4-56. *N. ceranae*-특이 LAMP의 SybrGreen 검사

Panel A. LAMP 산물인 (P) 와 negative control인 (N) 을 SybrGreen으로 염색했다. 각각의 산물을UV상에서 관찰했다. **Panel B.** 각각의 산물을 전기영동을 통하여 확인했다. Lane M은 1Kb ladder marker (Fermentas)를 사용했다. Lane P는 LAMP 산물로 pBX-*Nosema* plasmid를 주형으로 사용했다. Lane N은 negative control이다.

본 연구에서 개발된 *N. ceranae*-specific LAMP는 *N. ceranae*의 16S small subunit (SSU) rRNA (GenBank, DQ486027)를 target으로 하여 설계되었다. *N. ceranae*-specific LAMP를 위한 최적 반응액의 조성은 총 25 μ l를 기준으로, 각각 20pmole의 inner primer, 각각 5pmole의 outer primer, 5mM dNTP, 10 \times Reaction buffer, 4U *Bst* DNA polymerase (NEB, U.S.A)이며, 56.4 $^{\circ}$ C의 등온조건에서 60분간 *N. ceranae*-specific DNA를 선택적으로 신장시킨다. 또한 *N. ceranae*-specific LAMP는 1 \times 10²copies까지 검출이 가능하며 높은 특이성을 가지고 다른 바이러스에 반응하지 않음을 보여주었다. 또한 고가의 장비인 thermocycler없이 항온기만으로도 실험수행이 가능하고 SybrGreen 시약을 이용하여 ultraviolet trans illuminator 상에서 맨눈으로 DNA 신장 확인여부를 확인할 수 있어 현장에서 바로 적용가능하기 때문에 매우 유용할 것으로 생각된다.

7. probiotics 처리군에 대한 월동력, 수밀력, 산란력 측정

가. Probiotics 처리 봉군 및 대조 봉군의 월동 처리

Probiotics 처리 봉군 및 대조 봉군들 총 총 30개 봉군은 2010년 11월 중순 하기와 같이 월동 처리하여 월동에 들어갔다. 2010년-2011년의 겨울은 특히 추위가 심하였고, 폭설이 자주 온 관계로 월동 결과는 매우 주목되며, 예년에 비하여 월동 성적이 저조할 것으로 예상하고 있다. 2011년 2월 중순 현재 수원지방의 온도는 최고기온이 영상 5도를 넘지 못하는 이유로, 월동포장의 해체 및 월동 성공여부의 판단은 조금 미루고 있으나, 2월 하순 당일 최고기온이 영상 5도이상인 3일간 지속될 경우 월동 포장을 조금씩 개방하여 그 결과를 보고자 한다.

나. Probiotics 처리 봉군 및 대조 봉군의 월동 포장

월동을 위하여 9월 중순부터 사양액 (3kg 설탕 + 2l 물)을 4차에 나누어 봉군 당 총 6 liter 씩을 월동식량으로 공급하였으며, 충분한 저밀이 이루어지도록 노력했다. 월동 봉군은 사양액 공급과 함께 순차적으로 소비축소를 시행하여 최종 4매-5매 소비로 한 봉군을 이루게 했다. 월동포장에 벌통들은 두께 10cm (90 x 180 cm)의 스티로폼 당 3 봉군씩을 기준으로 가로 일렬로 배치하였으며, 내부포장은 소문 좌우끝에 보온판 각 1매씩을 배치하고, 벌들이 붙어 있는 소비는 한쪽으로 붙여 배치하였으며 한쪽 끝에 사양통을 붙여주고, 이는 한 쪽 보온판과 약간의 사이가 떨어지게 했다. 소비의 윗면은 1차 개포로 덮은 후, 3겹의 보온포로 소비 상부를 차단하되, 보온포의 한쪽을 한번 7cm의 삼각형으로 접어 공기의 통로로 했다. 벌통의 상부는 합4겹의 보온포가 전면부와 후면부는 2겹의 보온포가 가리게 하였으며, 후면은 공기의 유통을 완전히 차단하고, 전면부는 소문의 앞쪽에 약간의 사이를 띄워 공기의 유통이 가능하도록 했다. 눈비의 차단을 위하여 벌통의 상부는 방수포로 처리하였으며, 전면부의 과도한 공기유통을 차단하기 위하여 보온포고정용 철재봉을 사용했다. 월동 중 폭설시에는 제설작업을 시행하여, 소문 앞을 반드시 개방하여 주었으며, 과도한 충격, 야생동물의 침입을 항상 감시했다.

제 5 절 선발된 Probiotics 후보의 예방 및 치료약제 현장 적용을 위한 용법 실험

1. 실험목적

본 실험은 AFB-probiotics와 *Nosema*-probiotics가 함유된 화분떡을 월동 후 꿀벌에 공급하여, 투여된 AFB-probiotics가 AFB-pathogen (*Paenibacillus larvae*)이 감염된 봉군에, 또한 *Nosema*-probiotics가 *Nosema apis*에 의해 감염된 봉군에 각각 꿀벌 집단의 성장에 어떠한 영향을 주는지, 이를 정량적으로 검증하는데 그 목적이 있었다.

2. 실험실시의 기간 및 장소

실험실시의 기간은, 1차로 화분떡을 probiotics의 전달체로 사용한 기간이 2011년 2월 8일 부터 2011년 5월 1일까지이며, 이 시기 이후에는 외부의 화분이 왕성히 공급되어 화분떡에 의한 약물전달이 효과적이지 아니하였기에, 2차의 실험으로 별도 진행하였다.

봉군의 1차 야외실험은 2월 8일 실험봉군 총 30군을 경기대학교 양봉장에 정치하여 시작되었고, 실제로 봉군에 AFB-probiotics와 *Nosema*-probiotics가 함유된 화분떡을 투여한 시기는 2011년 2월 17일부터 2011년 4월17일까지 약 60일간 이었다.

현장실험 실시의 장소는 경기도 수원시 영통구 이의동 소재 경기대학교 양봉장이었으며, 실험 준비 및 자료의 분석은 경기대학교 생명과학과 분자생물학연구실에서 수행했다.

3. 실험방법 및 실험 내용

가. 공시 봉군 및 공시 재료:

(1) 공시 봉군의 품종, 규모 및 관리

공시 봉군은 경기대학교 인근의 양봉장(광고 양봉원)에서 수년간 계속 육종되어온 꿀벌로써, 이 지역에 잘 적응된 양질의 이탈리아계통의 품종이며, 총 30봉군을 선발하여 실험했다.

이들은 봉세 조사, 질병 조사 등 사전 검증을 수행하여, 적합한 30군을 선발한 후, 경기대학교 양봉장으로 이동하여 정치했다. 실험봉군들은 모두 경기대 양봉장B의 평지에 남향으로 배치하였으며, 전체적으로는 2열 횡대의 대형이며, 세부 지형에 따라 1열은 좌9군, 우6군으로 합 15군을 배치하였고, 2열은 우6군, 좌 9군으로 합 15군, 총30군을 각각 설치했다. (경기대 양봉장에서 보유 중인 2개 봉군이 대조군으로 참여하였으며, 별도 배치하였다).

각 봉군은 모두 두께 10cm의 스티로폼판 상에 소상을 위치하게 하였고, 새로이 개포 밑에 보온포 1매를 내부포장으로 보강하였으며, 외부포장으로는 상부에 보온포 4매가 덮고, 후방부와 전방부는 각 2매씩의 보온포를 덮었다. 도입 당시(2월 8일)는 월동이 계속되는 기간이라 일출 후 9-10시경에 전방부의 보온포는 소문위 10cm 위에 고정되게 하였으며,

일몰 전 5시경에 고정핀을 제거하여 전방부(소문)도 완전히 보온포로 덮어 야간의 추위를 막아주었다.

각 봉군들은 2011년 2월 8일 도입 당시 5매군이었으나, 봉세조사를 거쳐 2월 15일 모두 3매군으로 축소시키고 강, 중, 약의 봉세에 따라 각 실험군별로 균등하게 새로이 봉군을 배치했다.

봉군의 관리는 일반적인 보온과 급이, 급수를 실시하였으며, 내부 보온재(우드락 등)의 추가 투입, 보다 큰 비닐개포의 사용, 벌통간 외부포장재 보완 등이 추가되었다. 일반적으로 3월 중순까지 보온위주로 관리하였으나, 특히 과보온에 유의하여, 이후 전반적 관리에서 과보온에 의한 피해가 발생 되지 않도록 주의했다.

(2) 공시 봉군의 질병 감염 검색

본 실험은 월동봉군에 대한 AFB-probiotics와 *Nosema*-probiotics가 함유된 화분떡의 영향을 검증하는 것이기에, 공시 봉군은 월동기간인 중 감염된 질병에 대한 검색을 실시하고, 그 결과를 바탕으로 선발하여 경기대 양봉장에 도입했다. 영하의 기온에서 월동 중 봉군을 내검하는 것은 봉군의 건강에 매우 위험한 시도이었기에 각 봉군에서 10여마리의 성충을 채집하고, 이를 시료로 12개 주요 꿀벌질병에 대한 검색을 실시했다. 질병의 검색 방법은 본 연구실에서 개발하고, 시행하고 있는 병원체 특이 유전자 검출에 의한 유전자 진단방법을 실시하였으며, 그 방법을 약술하면 아래와 같다.

먼저, 꿀벌 시료를 분쇄하여, DNA 및 RNA를 추출한 후, RNA를 기질로 하여 역전사 반응(Reverse transcription)을 수행하여 cDNA를 확보했다. 추출된 DNA에 대하여 각 DNA 병원체에 대한 특이 PCR반응을 수행하며, cDNA에 대하여 각 RNA 병원체에 대한 특이 PCR반응을 수행했다. DNA병원체 및 RNA병원체에 대한 검출용 특이 프라이머의 쌍은 다음과 같다(표 3-5-1, 표 3-5-2).

질병 검색의 결과는, 각 봉군이 전체적으로 상당히 다양한 질병의 병원체를 보유하고 있는 것으로 나타났으며, 모든 봉군은 검사된 12종의 병원체 중 최소 1종이상의 병원체를 각기 보유하고 있는 것으로 나타났다(표 3-5-3).

이는 월동 중 또는 월동 직후 꿀벌의 보건위생의 수준이 연중 최악의 상황에 도달됨을 보여주는 것으로, 현재 국내 꿀벌의 월동 후 상황을 정확히 보여준 사례 중 하나라 할 것이다.

이와 같이 다양한 병원체에 감염되어 있는 봉군들이 과연 본 실험에서 공시 곤충으로 적합한가하는 하는 것은 큰 문제이었으나, 현재 국내 꿀벌의 질병 감염수준이 매우 심각한 수준임을 고려하고, 또한 국내 봉군에서 조금 더 보건 수준이 높은 봉군을 구할 수 있는 현실적인 점, 그리고 본 실험의 목적 상 국내 일반 꿀벌을 사용하여야만 한다는 것 등의 고려되어 여러 바이러스에 의한 감염은 참고 사항으로 하고, 미국 부저병 및 노제마에 감염된 봉군들을 우선으로 이들 봉군을 그대로 공시봉군으로 사용하기로 결론을 내리게 되었다.

따라서 바이러스의 존재를 무시하고, AFB의 원인균만 발견된 봉군의 수는 6봉군이며, *Nosema apis*만이 발견된 봉군수도 6봉군이며, 양자가 모두 발견된 봉군수는 14봉군이였다. 따라서 AFB의 원인균이 발견된 봉군의 수는 20봉군이며(*Nosema* 동시 발견 포함), *Nosema apis*가 발견된 봉군수도 20봉군이였다(*P. larvae* 동시 발견 포함).

각 봉군에서 AFB의 원인균 및 *Nosema apis*가 발견되지 아니한 2개 봉군(13번과 14번)과 함께, 별도의 2개 봉군을 각각 합하여 AFB-대조군 및 *Nosema*-대조군으로 하였으며, 이로써 대조군은 2개 봉군씩 2개 실험군, 즉 4개 봉군을 사용했다.

AFB-probiotics에 대한 실험은 AFB의 원인균만 발견된 6개군과 AFB의 원인균 및 *Nosema apis*가 동시 발견된 14개 봉군 중 AFB발병이 우세한 7개군을 합하여 총 13개 봉군을 대상으로 했다. 13개의 실험봉군은 저농도, 중농도, 고농도, 초고농도군의 4개 실험군으로 나누었으며, 각 실험군 당 봉군수는 각 3개 봉군이었고, 초고농도군의 경우에만 4개 봉군을 사용했다.

한편 *Nosema*-probiotics에 대한 실험은 *Nosema apis*만 발견된 6개군과 AFB의 원인균 및 *Nosema apis*가 동시 발견된 14개 봉군 중 *Nosema*발병이 우세한 7개군을 합하여 총 13개 봉군을 대상으로 했다. *Nosema*-probiotics의 13개 실험봉군도 저농도, 중농도, 고농도, 초고농도군의 4개 실험군으로 나누었으며, 각 실험군 당 봉군수도 위의 AFB 경우와 같이 각 3개 봉군이었고, 초고농도군의 경우에만 4개 봉군을 사용했다.

표 3-5-1. 본 실험에서 사용된 DNA기반 풀벌 병원체 검색용 primer들

병원체	질병명 (유전자명)	primer이름	primer서열(5'→3')	PCR (bp)
세균성	미국부저병 (16s)	AFB16sNF	GTG TTT CCT TCG GGA GAC G	233
		AFB16sNR	CTC TAG GTC GGC TAC GCA TC	
	유럽부저병	EFB-NSF	AAG AGT AAC TGT TTT CCT CG	564
		EFB-NSR	ACG CCT TAG AGA TAA GGT TT	
진균성	백목병	QP-Asco F	TTA GAG GGA CTA TCG GTT CT	148
		QP-Asco R	TAA CAA GAT TAC CCA GAC CT	
	석고병	Asp 18S-F	ATC GGG CGG TGT TTC TAT G	312
		Asp 18S-R	ACC GGG CTA TTT AAG GGC CG	
원생 동물성	노제마	<i>Nosema</i> -F	CTG CCT GAC GTA GAC GCT AT	592
		<i>Nosema</i> -R	CTT CGA TCC TCT AGC TTA CG	

표 3-5-2. 본 실험에서 사용된 꿀벌 병원체 중 RNA Virus 검색용 primer들

Sacbrood virus	SBV-F	ACC AAC CGA TTC CTC AGT AG	258
	SBV-R2	TCT TCG TCC ACT CTC ATC AC	
Acute Bee paralysis virus	ABPV-PF	TTA TGT GTC CAG AGA CTG TAT CCA	901
	ABPV-PR	GCT CCT ATT GCT CGG TTT TTC GGT	
Deformed Wing virus	DWV-F	TCA TCT TCA ACT CGG CTT TCT ACG	479
	DWV-R	CGA ATC ATT TTC ACG GGA CG	
Black Queen Cell Virus	BQCV-F	TGG TCA GCT CCC ACT ACC TTA AAC	700
	BQCV-R	GCA ACA AGA AGA AAC GTA AAC CAC	
Kashmir Bee Virus	KBV-F	GAT GAA CGT CGA CCT ATT GA	441
	KBV-R	CAG TTA AGG GGT GTT GTT GC	
Chronic bee paralysis virus	CBPV-F	AGT TGT CAT GGT TAA CAG GAT ACG AG	455
	CBPV-R	TCT AAT CTT AGC ACG AAA GCC GAG	
Israel Acute Bee paralysis virus	IAPV-162PF	AAC GAC CCG AAC AAA AAC AC	162
	IAPV-162PR	CGC AGG CAT CAT ACA CAA CT	

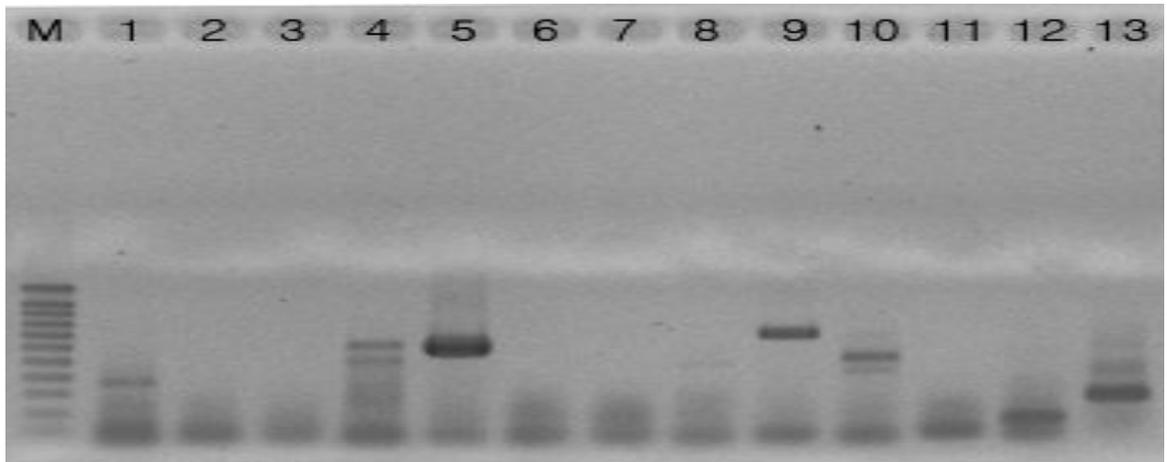


그림 3-5-1. 봉군 1에 대한 12종의 꿀벌 병원체에 대한 PCR 진단(예)

봉군1의 시료로 부터 12종의 꿀벌 병원체에 대한 PCR 검사 결과이다. 꿀벌시료는 먼저 분쇄되었고, 여기에서 각기 DNA와 RNA를 추출하였으며, DNA병원체에 대하여는 특이 PCR검사법을, RNA병원체 (Virus)에 대하여는 역전사 반응 후 특이 PCR을 수행했다. 전기영동된 특이 유전자 증폭산물은 각기 고유의 크기로써 확인되었다.

- Lane 1 : 미국부저병(AFB)의 PCR detection(양성)
- Lane 2 : 유럽부저병(EFB)의 PCR detection(음성)
- Lane 3 : 백묵병(Chalkbrood, A.apis)의 PCR detection(음성)
- Lane 4 : 석고병(Stonebrood, A.flavus)의 PCR detection(양성)
- Lane 5 : 노제마(Nosema)의 PCR detection(양성)
- Lane 6 : 낭충봉아부패병(SBV)의 PCR detection(음성)
- Lane 7 : 급성마비병(ABPV)의 PCR detection(음성)
- Lane 8 : 날개불구병(DWV)의 PCR detection(양성)
- Lane 9 : Black Queen Cell Virus(BQCV)의 PCR detection(양성)

Lane 10 : Kashmir Bee Virus(KV)의 PCR detection(양성)

Lane 11 : Chronic bee paralysis virus (CBPV)의 PCR detection(음성)

Lane 12 : Israel Acute Bee paralysis virus (IAPV)의 PCR detection(양성)

Lane 13 : Positive Control (β -actin)(양성)

Lane M은 DNA molecular weight marker이며, 상기의 결과로써 봉군 1에는 세균성 미국 부저병균, 진균성 석고병균, 원생동물성 노제마, 바이러스성 DWV와 Black Queen Cell Virus, KBV, IAPV의 병원체가 존재함이 확인되었다(표 3-5-3).

표 3-5-3. 본 실험에서 사용된 공시봉군들에 대한 병원체 감염 현황

	AFB	EFB	chalk brood	stone brood	<i>Nosem a</i>	SBV	ABPV	DWV	BQCV	KBV	CBPV	IAPV
1	●			●	●			●	●	●		●
2	●				●				●	●		●
3	●											
4	●							●	●	●		●
5	●				●	●			●	●		
6	●				●					●		●
7	●				●					●		
8	●				●				●	●		●
9	●				●					●		
10	●							●	●	●		
11	●			●					●	●		●
12					●			●				
13								●	●			
14								●	●			
15	●											
16	●			●	●				●			●
17	●				●			●				
18								●				
19	●				●			●	●	●		
20	●				●				●			
21	●				●			●	●			
22	●			●	●				●			
23	●											
24	●				●							
25					●							
26								●				
27					●				●			
28					●			●	●			
29					●			●				
30					●			●				
31								●				
32												●

(3) AFB-probiotics 함유 또는 *Nosema*-probiotics 함유 화분떡의 제조

(가) Probiotics 함유 화분떡의 종류 및 분석

각 실험군에 투여된 probiotics 함유 화분떡들은 아래와 같은 함량이 되도록 선별된 probiotics를 사용하여 각기 제조했다. 실험설계에서 제조하고자 한 화분떡의 함량 및 실험군들은 아래와 같았다.

- ① probiotics 불포함 화분떡 (무처리군)
- ② probiotics 0.5 wt%함유 화분떡 (0.5처리군): 저농도군
- ③ probiotics 1.0 wt%함유 화분떡 (1.0처리군): 중농도군
- ④ probiotics 2.0 wt%함유 화분떡 (2.0처리군): 고농도군
- ⑤ probiotics 4.0 wt%함유 화분떡 (0.5처리군): 초고농도군

(나) Probiotics 함유 화분떡의 제법

Probiotics 함유 화분떡은 일반적인 화분떡 제조법에 따라 제조하였으며, 그 개요는 다음과 같았다.

- ① 화분 4kg, 설탕 3kg을 교반하고 완전 혼합하고,
- ② 1 liter의 물로 위의 성분을 천천히 혼합하여 반죽하고, 직육면체로 성형.
- ③ 성형된 화분떡을 30℃ 조건에서 3-7일간 발효하고, 각 제품으로 포장함.

따라서 본 실험은 이 제법에 따라 상기와 같이 5종(무함유, 0.5%, 1.0%, 2.0%, 4.0% Probiotics 함유)의 화분떡을 제조하였으며, 이를 약술하면;

- ① 한번의 제조공정에서 8kg의 화분떡을 제조하였으며,
- ② 면제 40 mesh로 곱게 분쇄한 화분을 준비하고,
- ③ 역시 재분쇄과정을 통하여 곱게 분쇄된 설탕을 준비하고,
- ④ 화분 4kg, 설탕 3kg을 정량하여 합하고, 믹서기를 사용하여 충분히 혼합시킴.
- ⑤ 각 함량에 따라 probiotics 원액을 멸균증류수에 혼합시켜 1 liter로 한후,
- ⑥ 1 liter의 용액을 혼합된 화분/설탕의 분말에 천천히 가하며 반죽하고,
- ⑦ 분쇄기(Chopper)를 사용하여 압축하였고, 1kg기준으로 식용비닐봉지에 담아,
- ⑧ 직육면체로 성형하고, 25℃ 조건에서 3일간 발효시켰다.

* 사용된 화분은 중국산 유채꽃화분(code No. 1009; 수입원: 야생양봉원)을 사용하였으며, 이는 2011년 1월 21일 감마선으로 소독처리된 것임.

(다) Probiotics 화분떡의 투여

Probiotics 함유 화분떡은 모두 제조후 숙성과정에서 0.5%이하의 중량감소가 있었으나, 모두 발효된 화분떡의 질감과 향기를 내고 있었으며, Probiotics 함유량에 따른차이는 발견되지 않았다.

화분떡의 투입은 2011년 2월 17일부터 시작하였으며, 차가운 화분떡의 투입이 봉군 내 온도 강하를 야기할 수도 있기에 미리 30℃의 오븐으로 따뜻하게 한 1kg의 화

분떡들을 각 실험군에 1개씩 화분떡 받침이 설치된 개포아래, 소비상부 중앙에 투입했다.

나. 조사 방법 및 내용

(1) 활동성 평가

공시 봉군들은 probiotics 화분떡이 투여된 2월 17일을 투여 0일로 하고, 꿀벌 활동의 이상 유무를 매일 육안 관찰하고 이상이 있을 시 그 벌통번호 및 이상현상을 기록했다. 기록된 양봉일지는 주별로 종합하여, probiotics 함량에 따른 각 실험군 간 차이를 분석했다.

(2) 각 봉군의 소문 앞 사체수의 계수

공시 봉군들은 probiotics 화분떡이 투여된 2월 17일을 투여 0일로 하고, 각 봉군의 소문앞에 사체계수판을 설치하여, 소문에서 배출된 사체의 종류를 성봉과 유봉으로 구분하여 사체수를 계수했다. 측정된 사체수는 기간 별, AFB- 및 *Nosema* Probiotics 함량에 따른 각 실험군간으로 구분하고 각기 합산하여 분석했다.

(3) 각 봉군 및 실험군간 Probiotics 함유 화분떡의 섭식량 조사

공시 봉군들은 Probiotics 화분떡이 투여된 2월 17일이후, 주 1회의 간격으로 투입된 화분떡의 무게를 측정하여 소비된 화분떡의 무게를 계산하여 섭식량을 조사했다. 화분떡의 공급은 실험이 완료된 4월 19일까지 소비된 양의 수준으로 계속 공급하였으며, 각 기간별 소비된 량, 즉 섭식량은 봉군간, 실험군간의 통계로써 분석했다.

(4) 각 봉군 및 실험군간 낙하 응애 및 잔류 응애의 측정

국내 양봉의 봉군들은 봉군에 따라 전년의 월동과정에서 꿀벌응애가 잔류되어 있을 수 있으며, 이 잔류 꿀벌응애의 다소는 월동이후 각 봉군의 성장에 큰 영향을 미치게 된다.

따라서 월동이후 꿀벌응애의 퇴치는 양봉가의 일반 관리에 속하며, 보통 꿀벌응애 퇴치용 약제(프루발리네이트류 등)를 사용하여 잔류 꿀벌응애의 수를 최소화시키는 작업이 추천된다. 그러나 상기의 약제들도 꿀벌의 성장에 있어 다소간 영향을 미치게 되기에, 약제 종류의 선택, 그 용량 및 용법은 매우 민감하다 할 것이다.

본 실험에서는 각 봉군 당 꿀벌응애의 낙하수를 계측하여, 봉군내 꿀벌응애의 다소를 파악하고, 또한 실험의 종료 후에 프루발리네이트 약제를 강하게 처리하여, 실험종료 시점까지 잔류된 꿀벌응애의 수를 계측하여, 꿀벌응애에 의한 피해봉군을 파악하고자 했다.

그 방법은 다음과 같았다. 우선, 2주간격으로 벌통의 바닥에 시트지를 설치하고, 자

연 낙하된 꿀벌응애의 수를 계측하였으며, 실험 종료 전 설치된 시트지를 회수하고, 다시 최종 시트지를 설치한 후, 꿀벌응애제거제인 플루발리네이트를 강하게 처리하여, 3일 후 낙하된 꿀벌응애를 시트지에 포집하여 계수했다.

(5) 각 봉군 및 실험군간 봉세의 계측

공시 봉군들을 Probiotics 화분떡이 투여된 2월 17일 이후, 주 1회의 간격으로 내검하여 봉세를 육안 판정했다. 그 방법은 벌통 전체의 무게 측정, 각 소비의 무게 측정, 각 소비에 부착된 내역봉들의 무게 측정 및 육안에 의한 소비면 별 내역봉들의 점유면적 등 이었다. 측정된 자료들은 각 봉군별, 실험군별로 합산, 정리하였으며, 이로써 probiotics의 투여량별 영향을 판단하고자 했다.

(6). 각 봉군 및 실험군간 육아권의 크기 및 변화

공시 봉군들은 probiotics 화분떡이 투여된 2월 17일 이후, 기간별 내검하여 각 소비별 양면의 육아권을 사진 촬영하여 그 영상을 바탕으로 육아권의 크기를 측정하고, 육아권내의 소방수를 계산했다.

그 방법을 보다 상세히 기술하면;

우선, 본 실험에 사용된 소비의 내면(소방이 지어지는 부분)을 실측하였고, 그 평균은 가로x세로가 420.34 mm x 200.30 mm이며 (각 오차는 0.5mm 이내), 이로써 그 넓이는 84,173.68 mm²로 계산했다. 또한, 단위 면적당 벌집의 수 및 1개 벌집(소방)의 평균 넓이는 아래의 사진과 같이 벌집을 실측하여 면적당 벌집의 수를 계산하였으며, 이로써 벌집 당 평균 넓이를 계산하였다(그림 3-5-2).

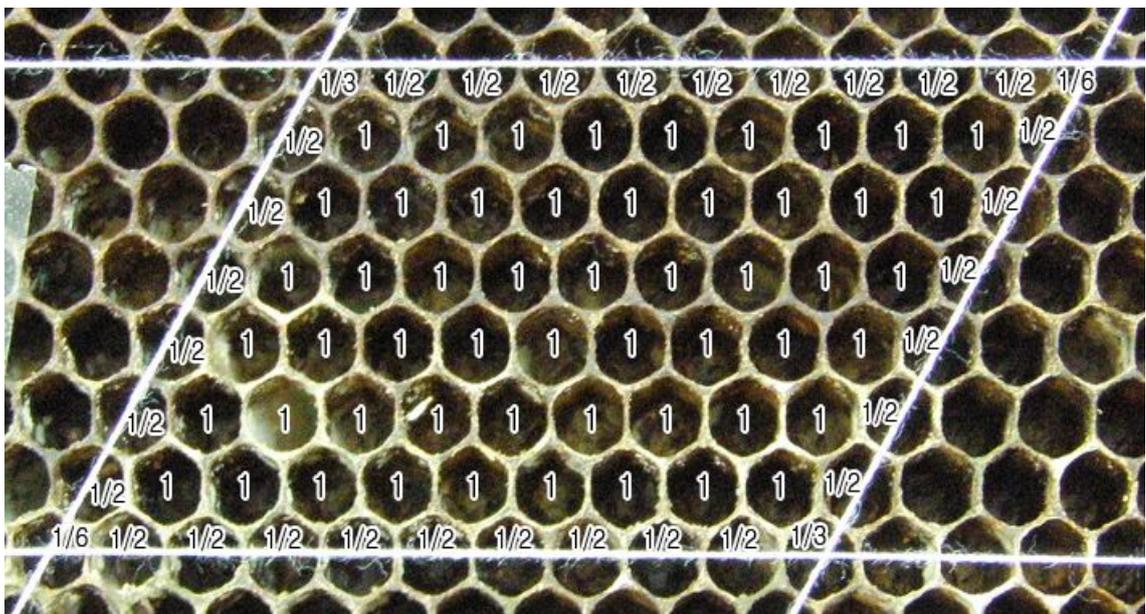


그림 3-5-2. 1개 벌집(소방)의 평균 넓이의 측정

이 평행사변형의 밑변의 길이는 53.5 mm이었으며, 높이는 31.5mm이었다. 그 넓이

는 1,685.25 mm²로 계산되었고, 벌집의 수는 정확히 70.0개 이었다. 따라서 벌집 1개의 넓이는 24.0750 mm²로 계산되었으나, 다수의 동일 방법에 의한 측정결과를 평균하여 벌집 1개의 넓이는 최종 24.5400 mm²로 확정했다.

이 측정은 다른 소비를 사용하여 3차에 걸쳐 측정 및 계산을 수행하였고, 평균값을 구하여 최종 벌집 1개의 넓이를 24.5400 mm²로 확립하고, 이후의 계산에 활용하였다(표 3-5-4).

표 3-5-4. 1개 벌집(소방)의 평균 넓이의 측정.

	밑변의 길이	높이	넓이	벌집수	벌집 1개의 넓이
1	53.5 mm	31.5 mm	1,685.25 mm ²	70 개	24.0750 mm ²
2	64.0 mm	41.5 mm	2,656.00 mm ²	108 개	24.5926 mm ²
3	59.5 mm	41.5 mm	2,469.25 mm ²	99 개	24.9419 mm ²
평균	59.00 mm	38.17 mm	2,270.17 mm ²	92.33 개	24.5400 mm ²

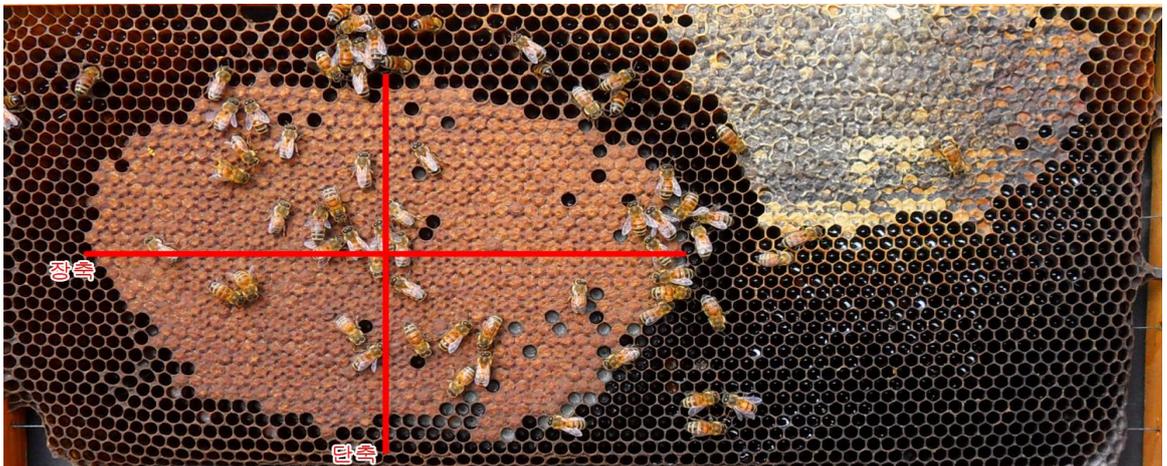


그림 3-5-3. 육아권의 넓이 측정 및 육아권내 벌집(소방)수의 계산(예)

타원형인 육아권의 장축의 길이는 220.0 mm이었으며, 단축의 길이는 140.0mm이었다. 그 넓이는 “ $\pi \times (\text{장축의 길이}/2) \times (\text{단축의 길이}/2)$ ”의 식에 따라, “ $3.14159 \times (220/2) \times (140/2)$ ” = 24,190.24 mm²으로 계산되었고, 그 넓이를 벌집 1개당 평균 넓이인 24.5400 mm²으로 나누면 벌집의 수는 985.75개로 계산된다. 육아권의 벌집수의 계산은, 먼저 육아권의 장축과 단축을 mm단위로 측정하여 그 넓이(mm²)를 구하고, 이를 벌집 1개당 평균 넓이인 24.5400mm²으로 나누어 해당 소비면에서 육아권 벌집수를 계산하는 방식으로 진행하였다(사진 3). 일반적으로 타원형인 육아권의 넓이는 타원형의 넓이를 구하는 일반공식인 “ $\pi \times (\text{장축의 길이}/2) \times (\text{단축의 길이}/2)$ ”; 단, π 는 3.14159”의 식을 사용하였으며, 그 면적은 mm²으로 구했다.

실제의 측정은, 각 봉군의 각 소비면들을 각기 촬영한 영상들을 사용하였으며, 화면상에서 육아권의 장축의 길이 및 단축의 길이를 측정하였고, 이의 실제 길이는 소비 내면의 실제 가로길이 (59.00mm)와 해당 화면상의 가로길이의 비를 기준으로 하여 재계산했다.

모든 실험 봉군 내 각 소비의 양면은 2주 간격으로 사진 촬영하였으며, 이 영상을 근거로 각 소비면별, 각 봉군별, 각 실험군별 육아권의 소방수를 통계처리 했다. 또한 이는 probiotics 화분떡 투여일을 기준으로 그 증감의 변이 및 각 실험군간 차이로 분석하였고, 이로써 probiotics의 투여량별 꿀벌들의 영향을 판단하고자 했다.

4. 실험 결과 및 분석

가. 꿀벌의 활동성, 이상비행활동 및 이상행동조사

Probiotics 화분떡이 투여된 2월 17일 이후 공시 봉군들의 꿀벌 활동에서 이상 유무를 육안 관찰했다.

관찰 결과에서 3월 이후 기온이 상승함에 따라 꿀벌들의 활동은 정상적으로 활발하여졌으며, 개별 봉군에 따라 두드러진 봉세의 확장을 보이며, 집단적으로 보다 활발한 활동을 하는 봉군 등이 관찰되기도 하였으나, 실험군간 유의한 차이가 나는 이상비행활동 및 행동은 발견되지 아니했다.

본 항의 결론은 AFB- 및 *Nosema*-Probiotics 의 과다투여는 꿀벌의 이상비행활동 및 이상행동을 야기하지 않았다는 것이다.

나. 각 봉군의 소문 앞 사체수의 계수

공시 봉군들은 Probiotics 화분떡이 투여된 2월 17일을 투여 0일로 하고, 각 봉군의 소문앞에 사체계수판을 설치하고, 소문에서 배출된 사체의 종류를 성봉과 유봉으로 구분하여 사체수를 계수했다.

측정된 사체수는 기간 별, Probiotics 함량에 따른 각 실험군간으로 구분하고 합산하여 분석하였다(그림 3-5-4).



그림 3-5-4. 농도별 AFB-probiotics 화분떡을 처리한 각 실험군의 봉군 당 배출된 평균 사체수의 변화.

봉군 당 사체의 수는 각 봉군 별로 1주일간 축적된 배출 사체의 수를, 실험군별로 집계하여 봉군수대로 나눈 것이다. 따라서 그림의 사체수는 해당 실험군에 속하는 1봉군당 1일 배출된 사체수를 나타낸다.

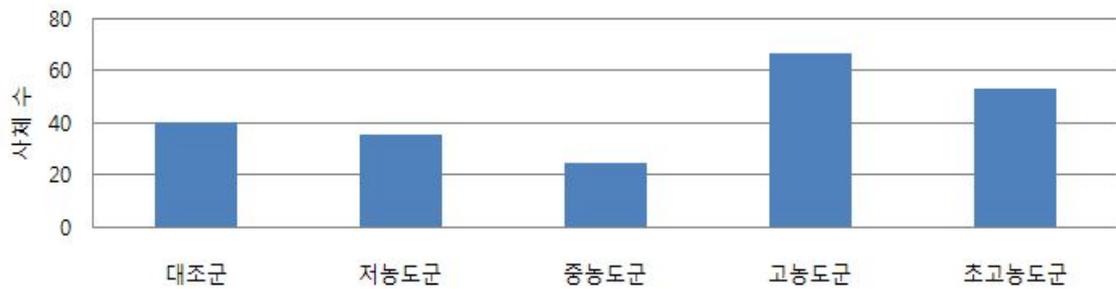


그림 3-5-5. 농도별 AFB-probiotics 화분떡을 처리한 각 실험군의 봉군 당 배출된 평균 총 사체수.

봉군 당 총 사체의 수는 2월 24일부터 4월 4일까지 집계된 총 사체수를 실험군별로 집계하고 이를 봉군수로 나눈 것이다. 따라서 그림의 사체수는 해당 실험군에 속하는 1개 봉군당 배출된 총사체수를 나타낸다. 본 항에서는 꿀벌의 사체수 집계를 농도별 AFB-probiotics 화분떡을 처리한 각 실험군을 대상으로 하여, 측정된 1주 간격으로 봉군 당 평균사체를 비교하여 그 증감의 추이를 살펴보았고(그림 3-5-4), 또한 실험군 별 집계된 총 사체수를 각 실험군 별로 살펴보았다(그림 3-5-5).

AFB-probiotics 화분떡을 처리한 전체 봉군을 대상으로 한 결과는, 고농도군 및 초고농도군이 Probiotics 화분떡 투여 후 전 기간에 걸쳐 많은 사체를 배출하는 것이 관찰되었으며, 또한 별도로 약간의 유충사체들을 배출하는 것이 확인되었다. 한편, 대조군에서 비정상적인 사체수의 증가가 실험 후기, 즉 3월 15일 이후부터 실험의 말기까지 관찰되었고, 이는 계속 증가되는 것으로 집계되었다.

한편, *Nosema*-probiotics 화분떡을 처리한 실험군의 사체수 집계결과는, 측정된 1주 간격으로 봉군 당 평균사체를 비교하여 그 증감의 추이를 살펴보았고(그림 3-5-6), 또한 각 실험군 별 집계된 총 사체수를 각 실험군 별로 살펴보았다(그림 3-5-7).

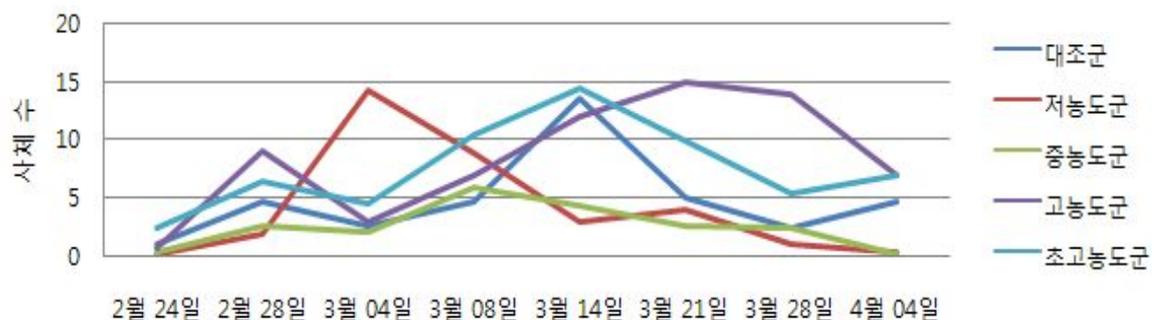


그림 3-5-6. 농도별 *Nosema*-probiotics 화분떡을 처리한 각 실험군의 봉군 당 배출된 평균 사체수의 변화.

봉군 당 사체의 수는 각 봉군 별로 1주일간 축적된 배출 사체의 수를, 실험군별로 집계하여 봉군수대로 나눈 것이다. 따라서 그림의 사체수는 해당 실험군에 속하는 1봉군 당 1일 배출된 사체수를 나타낸다.

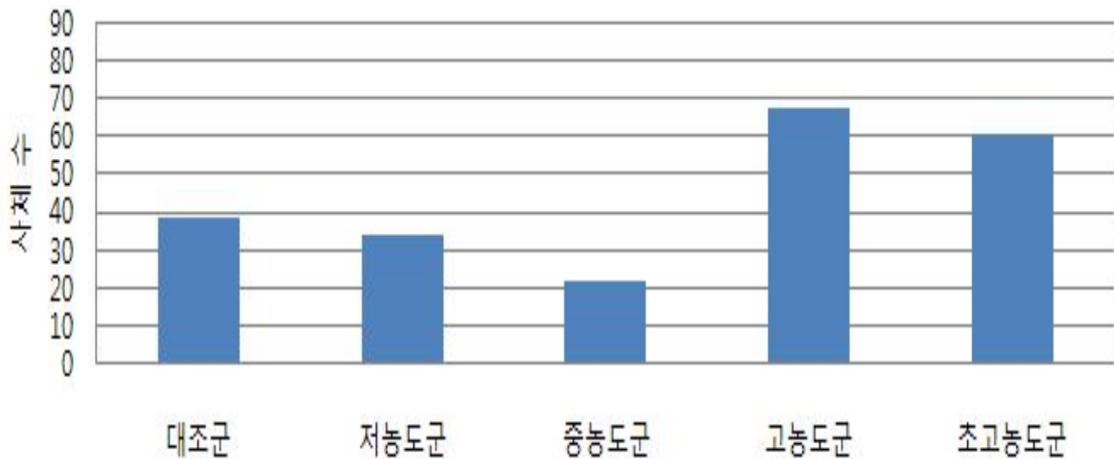


그림 3-5-7. 농도별 *Nosema*-probiotics 화분떡을 처리한 각 실험군의 봉군 당 배출된 평균 총 사체수.

봉군 당 총 사체의 수는 2월 24일부터 4월 4일까지 집계된 총 사체수를 실험군별로 집계하고 이를 봉군수로 나눈 것이다. 따라서 그림의 사체수는 해당 실험군에 속하는 1개 봉군당 배출된 총사체수를 나타낸다.

Nosema-probiotics 화분떡을 처리한 실험군의 사체수 집계결과는, 전기한 AFB-Probiotics의 결과와 유사한 양상을 보였으며, 대조군에서 비정상적인 사체수의 증가가 많이 완화된 것을 볼 수 있었다. 이러한 대조군에서의 사체수 증가는 차후 꿀벌응애에 의한 피해로 해석되었다.

본 항의 결론은, 실험 봉군에서 꿀벌 사체수의 증가는 probiotics 화분떡의 과다투여에 의하여 야기된 것으로 보기는 어렵고, 더욱이 probiotics 농도에 따른 용량-반응 관계가 입증되기에 어렵기에 통계적 유의성을 찾기에는 무리가 있다.

다. 각 봉군 및 실험군간 probiotics 함유 화분떡의 섭취량 조사

공시 봉군들은 Probiotics 함유 화분떡이 투입된 2월 17일 이후, 주 1회의 간격으로 투입된 화분떡의 무게를 측정하여 소비된 화분떡의 무게를 계산함으로써 섭취량을 조사했다. 화분떡의 공급은 실험이 완료된 4월 19일까지 소비된 양의 수준으로 계속 공급하였으며, 각 기간 별 소비된 량, 즉 섭취량은 봉군간, 실험군간의 통계로써 분석했다.

섭식량의 조사결과는 일반적으로 실험군간 차이가 일부 관찰되었으나, 또한 같은 실험군내의 봉군간에도 상당한 차이가 있는 것으로 관찰되었다. 이는 AFB- 및 *Nosema*-probiotics 함유 화분떡이 일반 꿀벌에서 큰 선호도 또는 기피도를 나타내지 않는 것으로 판단되었다.

한편, AFB-probiotics 함유 화분떡을 처리한 실험군의 섭취량을 실험군별로 집계하여 실험군별 평균 1일 섭취량을 계산하였다(그림 3-5-8).

또한, *Nosema*-probiotics 함유 화분떡을 처리한 실험군의 섭취량을 각 실험군별로 집계하여 실험군간 평균 1일 섭취량을 계산하는 방법으로 분석하였다(그림 3-5-9).

각 봉군별 화분떡 섭취량을 일별로 나타낸 것이다. 1주 간격으로 조사된 섭취량을 7일로 나누어 1일 평균의 섭취량으로 계산했다. 각 봉군별 화분떡의 섭취량은 실험군간 보다 봉군간에서 상대적으로 큰 차이를 보였다. 01봉군은 대조군 1번 봉군이며, 02는 대조군 2번 봉군, 03은 저농도군 1번 봉군, 04는 저농도군 2번 봉군, 05는 저농도군 3번 봉군, 06은 중농도군 1번 봉군, 07은 고농도군 1번 봉군, 08은 초고농도군 1번 봉군이다. 봉군간의 차이가 실험군간의 차이보다 크게 나타나는 것을 볼 수 있다.

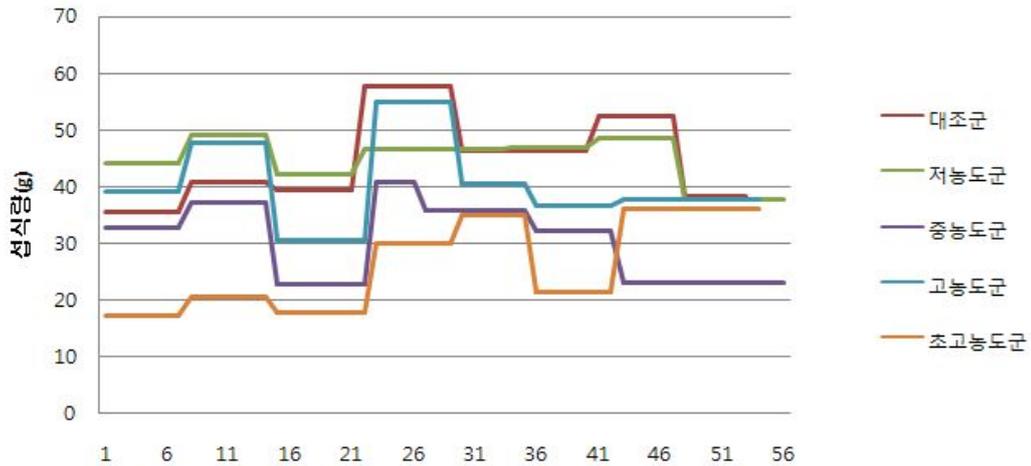


그림 3-5-8. 농도별 AFB-probiotics 함유 화분떡을 처리한 각 실험군별 화분떡 섭취량의 변화

각 실험군별 1일 섭취량을 해당 봉군수로 나누어 봉군당 1일 화분떡 섭취량의 평균을 나타낸 것이다.

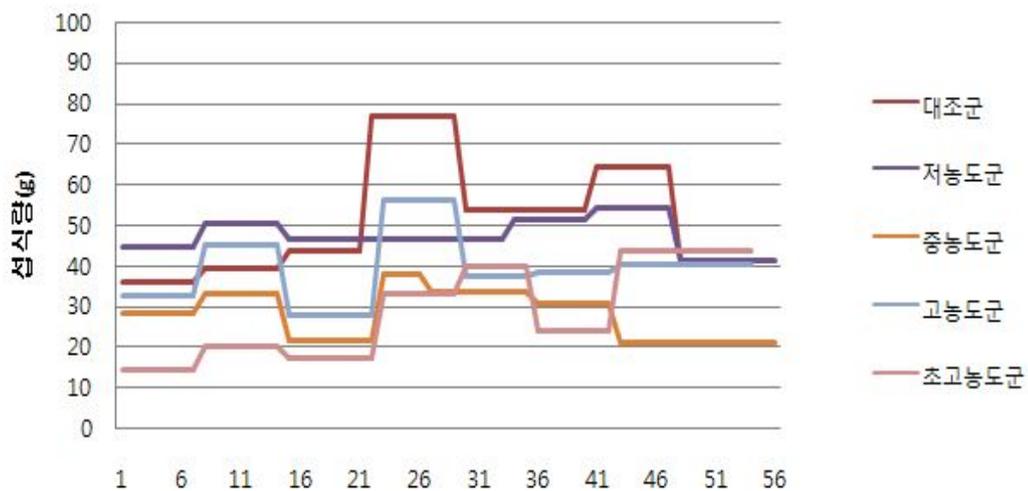


그림 3-5-9. 농도별 *Nosema*-probiotics 함유 화분떡을 처리한 각 실험군별 화분떡 섭취량의 변화

각 실험군별 1일 섭취량을 해당 봉군수로 나누어 봉군당 1일 화분떡 섭취량의 평균을 나타낸 것이다.

AFB-probiotics 함유 화분떡 및 *Nosema*-probiotics 함유 화분떡을 투여한 각 실험군간의 섭취량의 변화는 각 probiotics에 대하여 특이성 또는 일관성을 찾아볼 수 없었으며, 다만, 일기 및 기온에 따라 크게 변화함이 확인되었다. 한편, 실험시작 50일 이후 AFB-probiotics 및 *Nosema*-probiotics 실험 모두에서 화분떡의 섭취량은 감소하는 것은 외부의 화분이 다량 공급됨에 따라 주어진 화분떡에 대한 선호도가 떨어지는 것으로 판단되었다.

라. 각 봉군 및 실험군간 봉세의 계측

공시 봉군들은 화분떡이 투여된 2월 17일 이후, 주 1회의 간격으로 내검하여 봉세를 육안 판정했다. 그 방법은 벌통 전체의 무게 측정, 각 소비의 무게 측정, 각 소비에 부착된 내역봉들의 무게 측정 및 육안에 의한 소비면 별 내역봉들의 점유면적 등 이었다. 측정된 자료들은 각 봉군별 및 실험군별로 합산, 정리하였으며, 이로써 화분떡의 투여량별 영향을 판단하고자 했다.

먼저, 벌통 전체의 무게 측정, 각 소비의 무게 측정, 각 소비에 부착된 내역봉들의 무게 측정 등의 결과들은. 실험군내 봉군간. 실험군간, 그리고 대표군간의 모든 통계에서 일관성을 발견할 수 없었으며, 통계적 유의성을 찾기에는 큰 무리가 따른다고 판단되었다.

한편, 꿀벌봉세의 판정은 실험자 목측에 의한 각 소비에 착봉된 봉군들의 면적백분율을 합산한 것이기에, 이 역시 객관적 수치라 주장하기에는 무리가 따른다. 그러나 현존하는 성봉들의 개체수를 대표할 수 있는 유일한 수치이기에 이를 통계처리 하였고, 분석을 거쳐 도식화하였다.

먼저 AFB-probiotics 함유 화분떡을 처리한 각 실험군의 봉세를 비교하면 중농도실험군의 봉세가 실험초기부터 상대적으로 약세임이 관찰되었고, 실험40일을 전후하여 대조군 및 저농도실험군도 봉세의 증가가 크게 저하 또는 감소함이 관찰되었다. 그러나 초고농도군 및 고농도군에서 급격한 성장이 각각 관찰됨에 따라, AFB-probiotics 함유 화분떡은 AFB 감염봉군의 회복에 유의미한 것으로 판단되었다(그림 3-5-10).

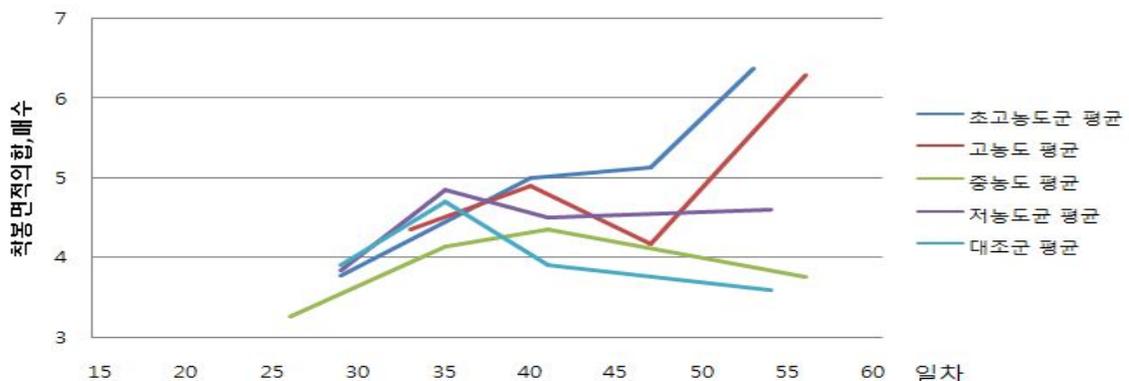


그림 3-5-10. AFB-probiotics 함유 화분떡을 처리한 각 실험군별 평균 봉군의 착봉 봉세 판정의 변화(종합)

봉세의 판정은 내검하여 각 봉군의 각 소비양면을 육안으로 판정하여, 소비면 대 착봉면적을 %로 기록하고 집계한 것이다. 육안판정이기에 객관성을 담보할 수는 없을 것임.

또한 *Nosema*-probiotics 함유 화분떡을 처리한 각 실험군의 봉세는 초고농도 및 고농도 실험군에서 대조군을 크게 앞서는 봉세 성장을 보여주어 *Nosema*-probiotics 가 긍정적 성장촉진을 하였음을 보여주었다.

본항의 결론은, 다소 유보적이거나, 봉세의 대소는 probiotics 투여의 유무, 그리고 probiotics 함량의 고저에 따라 비례될 수도 있다는 것이다. 그러나, 본 실험은 성봉들 개체수의 다소를 봉세의 다소로 가정하고 측정한 실험이었으며, 각 실험군간 봉세의 다소 및 변화 정도만을 파악할 수 있었고, 특히, 목측으로 소비면에 착봉된 봉군의 대소를 백분율화 하여 측정한 주관적 실험방법이기 때문에, 경향 파악의 목적 외에 이 결과들은 주장할 수는 없을 것이다.

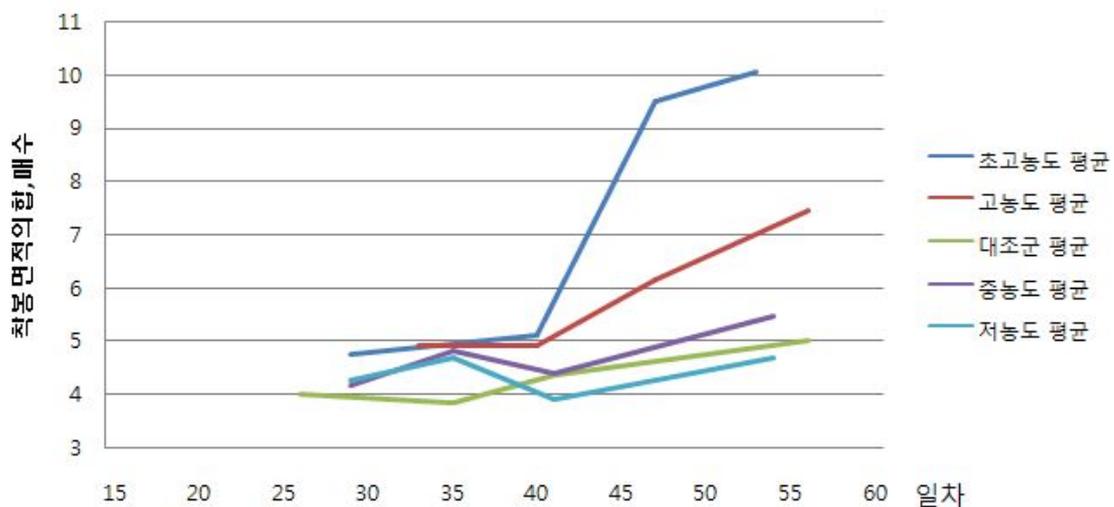


그림 3-5-11. *Nosema*-probiotics 함유 화분떡을 처리한 각 실험군별 평균 봉군의 착봉 봉세 판정의 변화(종합)

봉세의 판정은 내검하여 각 봉군의 각 소비양면을 육안으로 판정하여, 소비면 대 착봉면적을 %로 기록하고 집계한 것이다. 육안판정이기에 객관성을 담보할 수는 없을 것임.

마. 각 봉군 및 실험군간 육아권의 크기 및 변화

공시 봉군들은 probiotics 화분떡이 투여된 2월 17일 이후, 기간별 내검하여 각 소비별 양면의 육아권을 사진 촬영하여 그 영상을 바탕으로 육아권의 크기를 측정하고, 육아권내의 소방수를 계산했다. 모든 실험 봉군내 각 소비의 양면을 2주 간격으로 사진 촬영한 영상을 근거로 각 소비면 별, 각 봉군별, 각 실험군별 육아권의 소방수를 통계처리 하였으며, 또한 이를 probiotics 화분떡 투여일을 기준으로 그 증감의 변이 및 각 실험군간 차이를 분석하고, 이로써 probiotics의 투여량별 영향을 판단하고자 했다.

AFB-Probiotics 함유 화분떡이 투여된 실험군은, 투여일을 기준으로 60일간 각 농도별 실험군내 각 봉군 당 총 산란권별집수의 변화를 집계한 것으로, probiotics 투여에 의한 실험 봉군들의 성장 상황을 잘 보여 주고 있다고 하겠다.

초고농도군의 산란권 별집수 변화에서 45일경의 성장세 둔화(그래프의 꺾임)는 꿀벌응애의 피해가 반영된 것이라 해석되며, 한편, 이 시기를 전후하여 천연화분의 유입이 증가되었다고 판단된다(화분섭식량이 전반적으로 감소됨).

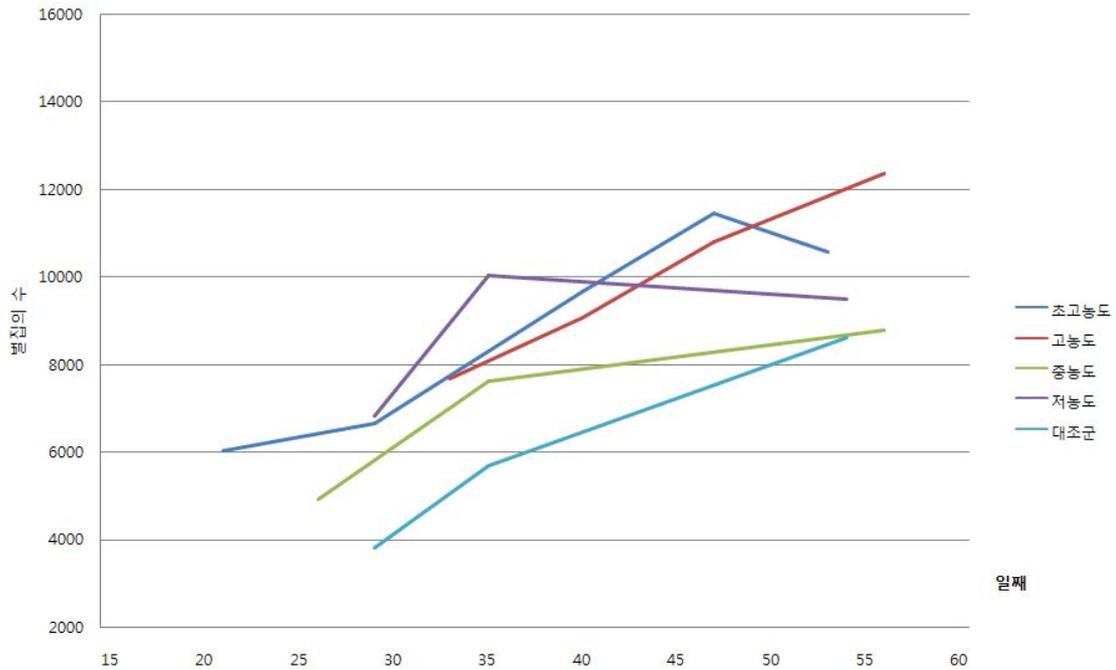


그림 3-5-12. AFB-probiotics 함유 화분떡을 처리한 각 실험군별 봉군 당 산란권내 평균 벌집수의 변화 (종합)

산란권벌집의 수는 봉세의 객관적 척도로써 가장 우수한 도구 중 하나이다. 본 실험의 각 실험군들은 AFB-probiotics 함량에 따른 조금씩 다른 성장 패턴을 보이고 있으며, 특히 고농도 및 초고농도의 AFB-probiotics 화분떡이 투여된 실험군들은 다른 실험군보다 높은 산란권 벌집수의 상승을 나타내고 있다. 초고농도군의 산란권벌집수 증가에서 45일이후 감소세로 돌아선 것은 꿀벌응애의 기생에 의한 피해로 해석됨(자료 미제시)

한편, Nosema-probiotics 함유 화분떡이 투여된 실험군은, 투여일을 기준으로 60일간 각 Nosema-probiotics 농도별 실험군내 각 봉군 당 총 산란권벌집수의 변화를 집계한 것으로, 역시 Nosema-probiotics 투여에 의한 각 실험봉군들의 성장 상황을 잘 보여 주고 있다고 하겠다.

이 결과는 농도별 Nosema-probiotics 함유 화분떡이 투여된 모든 실험군에서, Nosema-probiotics의 농도에 따른 산란권 벌집수가 각 시점마다 계산될 수 있으며, 이로써 양자는 용량-반응 관계 (dose-response relationship) 성립됨을 보여주고 있다.

한편, 초고농도군의 산란권 벌집수 변화에서 45일경의 성장세 둔화(그래프의 꺾임)된 것은 AFB 실험의 경우와 같이 꿀벌응애의 피해가 반영된 것이라 해석되며, 한편, 이 시기를 전후하여 천연화분의 유입이 증가되었다고 판단된다(화분섭식량이 전반적으로 감소됨).

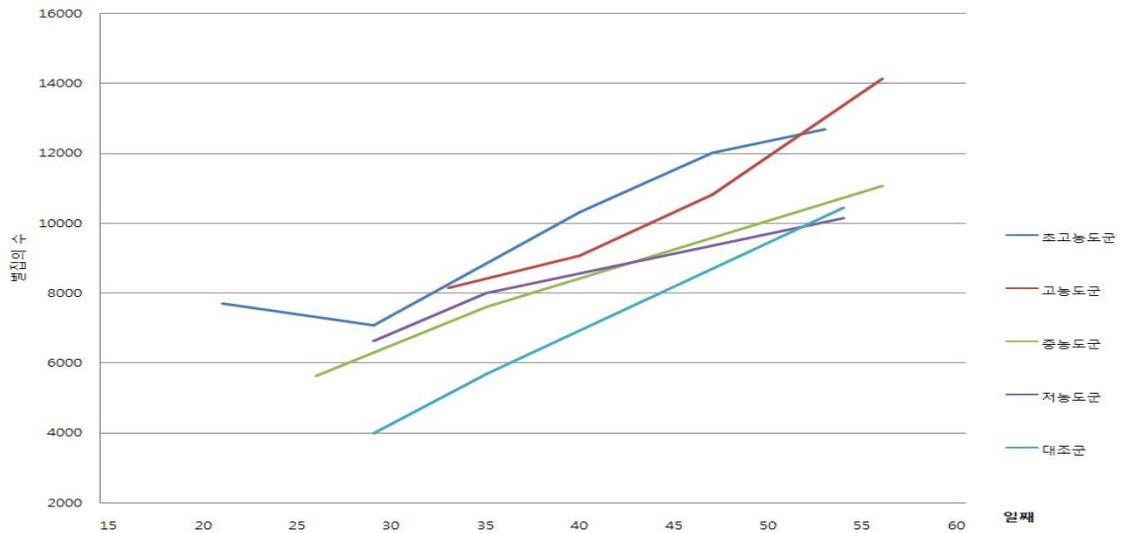


그림 3-5-13. *Nosema*-probiotics 함유 화분떡을 처리한 각 실험군별 봉군 당 산란권내 평균 벌집수의 변화 (종합)

산란권벌집의 수는 봉세의 객관적 척도로써 가장 우수한 도구 중 하나이다. 본 실험의 각 실험군들은 *Nosema*-probiotics 함량에 따른 조금씩 다른 성장 패턴을 보이고 있으며, 특히 고농도 및 초고농도의 *Nosema*-probiotics 화분떡이 투여된 실험군들은 다른 실험군보다 높은 산란권 벌집수의 상승을 나타내고 있다. 초고농도군의 산란권벌집수 증가에서 45일이 후 증가세가 약해진 것은 꿀벌응애의 기생에 의한 피해로 해석됨(자료 미제시)

본 실험의 목적은 AFB의 병원체 또는 *Nosema apis*에 감염된 꿀벌집단에 각각 AFB- 또는 *Nosema*- Probiotics 화분떡을 투여하여, 봉세의 회복 또는 해당 질병의 완화 여부를 판단하고자 하는 것이었다. 본 실험의 결과에 의하여 각 probiotics는 모두 해당 질병에 의한 피해를 극복하였다 판단되며, 양자 모두 각 probiotics의 농도는 해당 봉군의 육아권 벌집수와 용량-반응관계(Dose-response relationships)가 있는 것으로 판단된다.

바. 본 실험의 통계에 활용된 영상화일들

앞의 실험 결과들은 각 실험 봉군의 각 소비에 대한 영상화일을 작성하고, 그 영상을 수치화하여, 이를 분석함으로 이루어 졌다. 이하 그림은 본 실험에서 봉세 판정에 사용된 영상과 산란권 벌집수의 측정에 사용된 영상과 꿀벌응애수 측정에 사용된 영상의 예를 제시한 것이다. 영상화일은 총 600개를 초과하는 방대한 양이기에, 본 보고에서 수록하지 아니했다.



그림 3-5-14. AFB-probiotics 함유 화분떡을 처리한 실험군 중 고농도군 1번 벌통의 1번 소미 R면의 봉세 측정 영상(예)



그림 3-5-15. AFB-probiotics 함유 화분떡을 처리한 실험군 중 고농도군 1번 벌통의 1번 소미 R면의 산란권 벌집수 측정용 영상(예)

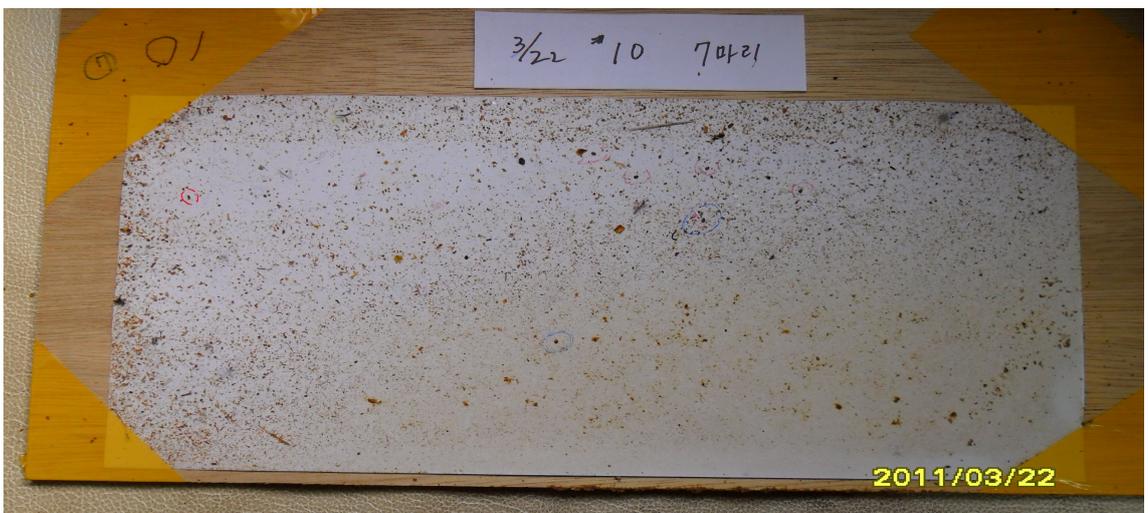


그림 3-5-16. AFB-probiotics 함유 화분떡을 처리한 실험군 중 초고농도군 벌통의 바닥에 설치한 시트지 영상(예). 이는 잔류 꿀벌응애의 계수에 사용되었음.

5. 꿀벌의 장내 미생물 군집 조사

가. 꿀벌 시료의 수집 및 시료의 준비

2011년 국내 양봉가와 경기대학교 양봉장에서 채집된 성충을 사용하여 수행했다. 꿀벌 시료의 내장기관은 흉부와 배를 양쪽 방향으로 분리하여 얻었으며, 장의 양쪽 끝을 잘라서 멸균된 증류수를 사용하여 씻어내어 장내의 세균을 확보했다.

나. Chromosomal DNA의 추출과 PCR

Chromosomal DNA 추출은 Genomic DNA Isolation Kit (Bioneer Inc., Korea)를 사용했다. 16S rDNA는 SSU-27f (5'-GAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') 과 SSU-518r (5'-WTTACCGCGGCTGCTCC-3')을 사용하여 증폭되었다.

PCR은 pre-denaturation은 94°C에서 5분간 수행하였고, 94°C 30초, 55°C 45초, 72°C 90초로 30 cycle을 수행했다. PCR 반응액의 조성은 primer 각 10 pmole, 1 ul dNTP(각 2.5mM, GeneClone, Korea), 10× Reaction buffer (with 15mM MgCl₂), 2.5 unit Taq polymerase(GeneClone, Korea)와 추출한 DNA 50ng을 DNA template로 사용하였으며 반응액의 총량은 50ul로 했다. PCR 결과는 1.5% agarose gel상에서 전기영동 한 후 UV하에서 관찰했다.

다. Pyrosequencing

Sequencing은 bacterial 16S rRNA의 Fusion Primers를 사용하여, 천연구소에서 수행되었다. PCR primer에 포함된 barcode별로 sequence를 나누고 길이가 짧거나 unambiguous base (N)이 발생한 sequence를 제거했다. Amplification에 사용된 Primer 제거는 pairwise alignment 알고리즘을 이용해서 인지하고 잘라내었다. Reads 가운데서 target gene (16S rRNA gene)이 아닌 reads를 제외 시켰으며 이는 BLASTN을 실행하여 Alignment Score(최소 100)와 E-Value(최대 1.0)기준을 만족 시키는 reads를 찾아내며 이 과정에서 사용되는 BLAST 데이터베이스는 EzTaxon-e를 이용했다. Assembly를 통해 100% 같은 sequence를 찾아 합치고 이로부터 consensus sequence를 얻는다. Assembly 과정에서 만들어진 contig sequence를 Similarity Search를 통해 분류학적인 동정을 수행했다. CLCommunity 프로그램으로 결과를 비교 분석했다.

[Simple identification scheme] x = sequence similarity to type strain species (x ≥ 97%), genus (97 > x ≥ 94%), family (94 > x ≥ 90%), order (90 > x ≥ 85%), class (85 > x ≥ 80%), and phylum (80 > x ≥ 75%).
--

라. 꿀벌의 장내 미생물 군집 조사 결과

본 연구는 국내 꿀벌의 장 내에 존재하고 있는 미생물 군집을 확인하기 위해 추출된 DNA 및 PCR product를 사용하여 pyrosequencing을 수행했다. 그 결과, 총 15270 unit의 장내세균이 확인되었으며, 4836 unit이 DNA, 10434 unit이 PCR product를 사용했을 때 확인되었다. 두 결과가 정확하게 일치하는 것은 아니지만 PCR product를 사용했을 때 더 많은 종을 확인할 수 있었다.

표 3-5-5. Phylogenetic classification found in intestine of Honeybee by Pyrosequencing

Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	<i>Escherichia</i>	<i>Escherichia coli</i> group <i>Escherichia fergusonii</i> <i>Escherichia_uc</i>
				<i>Enterobacteriaceae_uc</i> <i>Citrobacter</i> <i>Pantoea</i> <i>Yokenella</i> <i>Enterobacter</i>	<i>Enterobacteriaceae_uc_s</i> <i>Citrobacter_uc</i> <i>Pantoea_uc</i> <i>Yokenella_uc</i> <i>Enterobacter_uc</i>
				Enterobacteriales_uc	Enterobacteriales_uc_g
	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Bartonellaceae Rhizobiales_uc	<i>Bartonella</i> Rhizobiales_uc_g	AY370186_s Rhizobiales_uc_s
	Betaproteobacteria	Neisseriales	Neisseriaceae	AY370189_g	AY370189_s
Firmicutes	Bacilli Erysipelotrichi	Lactobacillales Erysipelotrichales	Lactobacillaceae Erysipelotrichales_uc	AY370183_g Erysipelotrichales_uc_g	AY370183_g_uc Erysipelotrichales_uc_s
Actinobacteria	Actinobacteria_c	Bifidobacteriales	Bifidobacteriaceae	<i>Bifidobacterium</i>	<i>Bifidobacterium asteroides</i>
Cyanobacteria	Chroobacteria	Oscillatoriales	Oscillatoriaceae	<i>Oscillatoriaceae_uc</i>	<i>Oscillatoriaceae_uc_s</i>
Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Bacteroidaceae	<i>Bacteroides</i>	DQ801198_s

Abbreviation: un (uncultivable), g (genus), and s (species)

표 3-5-16. Phylogenetic classification and relative distribution using template DNA

Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species
Proteobacteria (99.93993)	Gammaproteobacteria (99.19904)	Enterobacteriales (99.19904)	Enterobacteriaceae (99.19904)	<i>Escherichia</i> (99.11894)	<i>Escherichia coli</i> group (96.8362) <i>Escherichia fergusonii</i> (2.10252) <i>Escherichia_uc</i> (0.18022)
				<i>Enterobacteriaceae_uc</i> (0.06007)	<i>Enterobacteriaceae_uc_s</i> (0.06007)
				<i>Citrobacter</i> (0.02002)	<i>Citrobacter_uc</i> (0.02002)
	Alphaproteobacteria (0.72087)	Rhizobiales (0.72087)	Bartonellaceae (0.72087)	<i>Bartonella</i> (0.72087)	AY370186_s (0.72087)
	Betaproteobacteria (0.02002)	Neisseriales (0.02002)	Neisseriaceae (0.02002)	AY370189_g (0.02002)	AY370189_s (0.02002)
Firmicutes (0.04005)	Bacilli (0.04005)	Lactobacillales (0.04005)	Lactobacillaceae (0.04005)	AY370183_g (0.04005)	AY370183_g_uc (0.04005)
Cyanobacteria (0.02002)	Chroobacteria (0.02002)	Oscillatoriales (0.02002)	Oscillatoriaceae (0.02002)	<i>Oscillatoriaceae_uc</i> (0.02002)	<i>Oscillatoriaceae_uc_s</i> (0.02002)

The number in parenthesis indicates relative percent of each classified level identified in a community

표 3-5-7. Phylogenetic classification and relative distribution using PCR Product

1	Class	Order	Family	Genus	Species
teria 9)	Gammaproteobacteria (99.78666)	Enterobacteriaceae (99.78666)	Enterobacteriaceae (99.78611)	<i>Escherichia</i> (99.68463)	<i>Escherichia coli</i> group (96.78137) <i>Escherichia fergusonii</i> (2.71774) <i>Escherichia_uc</i> (0.18551)
				<i>Enterobacteriaceae_uc</i> (0.04638)	<i>Enterobacteriaceae_uc_s</i> (0.04638)
				<i>Citrobacter</i> (0.00928)	<i>Citrobacter_uc</i> (0.00928)
				<i>Pantoea</i> (0.00928)	<i>Pantoea_uc</i> (0.00928)
				<i>Yokenella</i> (0.00928)	<i>Yokenella_uc</i> (0.00928)
				<i>Enterobacter</i> (0.00928)	<i>Enterobacter_uc</i> (0.00928)
	<i>Enterobacteriaceae_uc_s</i> (0.01855)	<i>Enterobacteriales_uc_g</i> (0.01855)	<i>Enterobacteriales_uc_s</i> (0.01855)		
	Alpha proteobacteria (0.16696)	Rhizobiales (0.16696)	Bartonellaceae (0.15768) Rhizobiales_uc (0.00928)	<i>Bartonella</i> (0.15768)	AY370186_s(0.15768)
				<i>Rhizobiales_uc_g</i> (0.00928)	<i>Rhizobiales_uc_s</i> (0.00928)
Betaproteobacteria (0.00928)	Neisseriales (0.00928)	Neisseriaceae (0.00928)	AY370189_g (0.00928)	AY370189_s (0.00928)	
01855)	Erysipelotrichi (0.01855)	Erysipelotrichales (0.01855)	Erysipelotrichales_uc (0.01855)	<i>Erysipelotrichales_uc_g</i> (0.01855)	<i>Erysipelotrichales_uc_s</i> (0.01855)
0.00928)	Actinobacteria_c (0.00928)	Bifidobacteriales(0.00928)	Bifidobacteriaceae(0.00928)	<i>Bifidobacterium</i> (0.00928)	<i>Bifidobacterium asteroides</i> (0.00928)
0.00928)	Bacteroidia(0.00928)	Bacteroidales(0.00928)	Bacteroidaceae (0.00928)	<i>Bacteroides</i> (0.00928)	DQ801198_s(0.00928)

이는 PCR를 통해 증폭을 했기 때문에 검출된 unit 수도 약 2배 증가 했고 더 섬세하게 검출된 것으로 사료된다. 검출된 모든 종의 상대적 분포를 100%로 했을 때 DNA 추출 시료를 이용했을 때 96% 이상이 *Escherichia coli*로 확인되어 군집의 대부분을 차지하고 있었으며, *Escherichia fergusonii*가 2.1로 두 번째로 많고 나머지는 1% 미만으로, *Bartonella* sp., *Escherichia* sp., *Enterobacteriaceae* gen. sp., *Lactobacillaceae* gen. sp. 순으로 확인되었고 나머지 *Citrobacter* sp., *Neisserianaceae* gen. sp. 그리고 *Oscillatoriaceae* gen. sp.는 같은 비율로 가장 낮았다. 한편 PCR product를 사용한 경우 가장 우점하는 종과 두 번째, 다섯 번째 우점종은 같았으나 세 번째와 네 번째는 서로 바뀌었고 나머지는 두 종(*Citrobacter* sp., *Neisserianaceae* gen. sp.)이 같았고 두 종(*Lactobacillaceae* gen. sp., *Oscillatoriaceae* gen. sp.)이 사라지고 8종이 새롭게 확인되었다. 그 8종은 *Enterobacteriales* sp., *Erysipelotrichales* sp., *Bifidobacterium asteroides*, *Rhizobiales* fam. gen. sp., *Pantoea* sp., *Yokenella* sp., *Enterobacter* sp. 그리고 *Bacteriodes* sp. 이다.

꿀벌을 통째로 갈아서 DNA를 추출하여 분석한 Cox-Foster 등 (2007)의 결과에서 보여준 문(phylum) 수준의 Firmicutes와 강(class) 수준의 Actinobacteria, Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria 그리고 Gammaproteobacteria 모두 이 연구의 결과에서 확인되었으며, 속(species) 수준에서는 *Lastobacillus* sp., *Bifidobacterium* sp., *Bartonella* sp. 등이 확인되었으나 *Gluconacetobacter* sp.와 *Simonsiella* sp.는 확인되지 않았다.

Pyrosequencing이 아닌 T-RFLP 방법을 이용했지만 본 연구와 가장 유사하게 장내세균의 시료만을 이용한 Babendreier 등 (2007)의 결과와 비교했을 시에도 *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*가 모두 확인되었으며, 속 수준에서는 *Enterobacter*, *Bartonella*, *Bifidobacterium*와 종 수준에서는 *Escherichia coli*와 일치하였으나 많은 속과 종들이 일치하지는 않았다. 이는 지역적인 분리, 꿀벌 종의 균주(honeybee species strain), 분석 방법 등의 차이에 따른 것으로 사료되며 이는 추가적인 연구가 진행되어야 할 것이다.

이 연구를 통해 기존에 보고되지 않았던 문인 *Cyanobacteria*가 검출된 것이 특이하고 속 수준에서 *Citrobacter* sp., *Enterobacteriales* sp., *Erysipelotrichales* sp., *Pantoea* sp., *Yokenella* sp., 그리고 *Bacteriodes* sp. 등이 새롭게 발견됨으로 앞으로 이들 장내세균들의 기능을 좀 더 면밀히 살펴볼 필요가 있다고 사료된다.

제 6 절 대량 생산 시스템의 확립 및 시제품 제작

1. 액상 발효조를 이용한 대량 생산 시스템 확립

가. 대량 배양용 배지 개발을 위한 최적 탄소원 및 질소원 조사

본 연구에서 *Paenibacillus larvae* subs. *larvae* KCTC 3744와 *Nosema trichoplusiae* ATCC 30702 대한 항균활성능이 뛰어나다고 평가된 *L. plantarum* YML004의 산업화를 위하여 대량배양에 사용될 배지의 조건을 조사하다. 기초배지로서는 *Lactobacillus* medium 중 MRS 배지(10g Proteose peptone No.3, 10g Beef Extract, 5g Yeast Extract, 20g Dextrose, 5g Tween-80, 5g Sodium Acetate, 2g Ammonium Citrate, 0.1g MgSO₄, 0.05g MnSO₄, 2g Dipotassium Phosphate /L)를 이용했다. 최적의 탄소원 및 질소원의 modification의 경우, 기초배지인 MRS를 기본으로 하여 탄소원 8종 (Maltose, Galactose, Lactose, Saccharose, Soluble starch, Fructose, Glucose, Mannose)과 질소원 6종(Tryptone, Malt extract, Potassium nitrate, Ammonium sulfate, Ammonium nitrate, Casein)에 대한 균주 성장변화를 조사하다(표 3-6-1, 표 3-6-2). 30시간동안 3hr 간격으로 sampling하여 OD_{600nm}와 배양액의 pH측정하여 생육 효과를 비교하다.

표 3-6-1. 탄소원 변경

실험예	탄소원	비고
Control	Dextrose	Control(MRS 배지사용)
실험예 1	maltose	탄소원 1종 변경
실험예 2	galactose	탄소원 1종 변경
실험예 3	lactose	탄소원 1종 변경
실험예 4	saccharose	탄소원 1종 변경
실험예 5	Soluble starch	탄소원 1종 변경
실험예 6	fructose	탄소원 1종 변경
실험예 7	glucose	탄소원 1종 변경
실험예 8	mannose	탄소원 1종 변경

* Control은 MRS 배지를 사용하였고, 각각의 탄소원은 MRS의 배지조성의 Dextrose를 대신하여 첨가하였으며 이외의 배지성분은 MRS 기본성분비와 동일하게 제조하였다

표 3-6-2. 질소원 변경

실험예	질소원 A	질소원 B	질소원 C	질소원 D	비고
Control (MRS배지)	Yeast extract	Beef extract	Peptone	Ammonium citrate	
실험예 1	Tryptone	변경 없음	변경 없음	변경 없음	질소원 A 1종 변경
실험예 2	Malt extract				
실험예 3	Potassium nitrate				
실험예 4	Ammonium sulfate				
실험예 5	Ammonium nitrate				
실험예 6	Casein				

* Control은 MRS 배지를 사용하였고, 각각의 질소원은 MRS의 배지조성의 Yeast extract, Beef extract, Peptone, Ammonium citrate를 대신하여 첨가하였으며 이외의 배지성분은 MRS 기본성분비와 동일하게 제조했다.

* 위의 실험은 질소원 B, C, D에 대해서도 동일하게 진행했다

위의 각각의 탄소원과 타 배지조성을 넣은 배지를 30시간동안 3hr 간격으로 sampling 하여 OD_{600nm}와 배양액의 pH측정하여 생육 효과를 비교한 결과 탄소원 중에서 glucose와 saccharose가 생장률이 높다(그림 3-6-1, 그림 3-6-2).

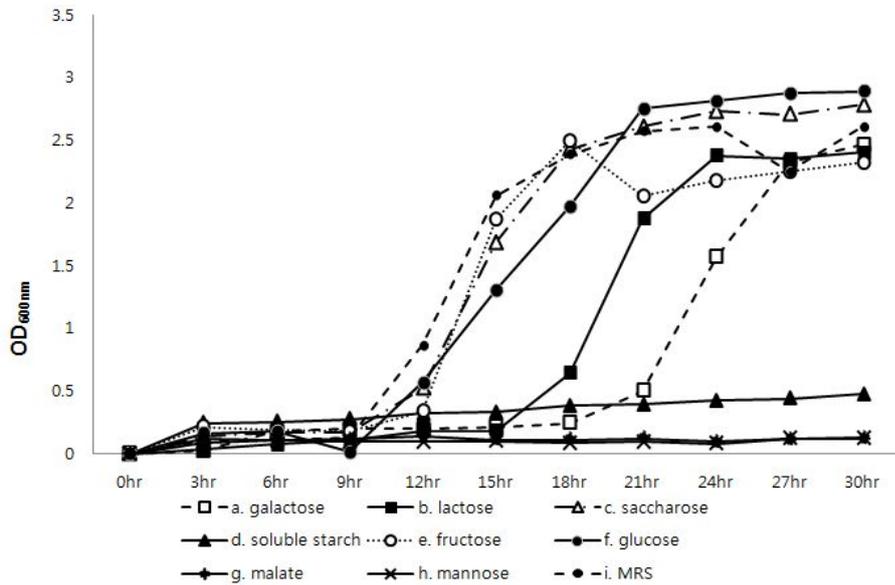


그림 3-6-1. 탄소원 종류에 따른 OD_{600nm}의 변화

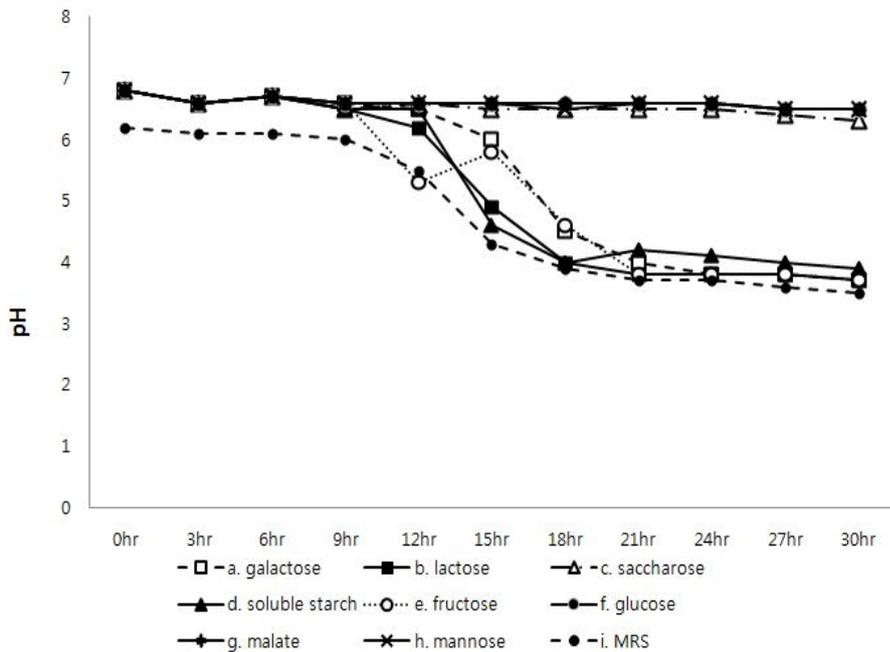


그림 3-6-2. 탄소원 종류에 따른 pH의 변화

위의 각각의 질소원과 타 배지조성을 넣은 배지를 30시간동안 3hr 간격으로 sampling 하여 OD_{600nm}와 배양액의 pH측정하여 생육 효과를 비교한 결과 질소원 중에서 Tryptone와 Malt extract가 생장률이 높다(그림 3-6-3, 그림 3-6-4). (Casein의 경우 요거트에서 생기는 curd가 생겨 생육 효과 측정이 불가능 했다.)

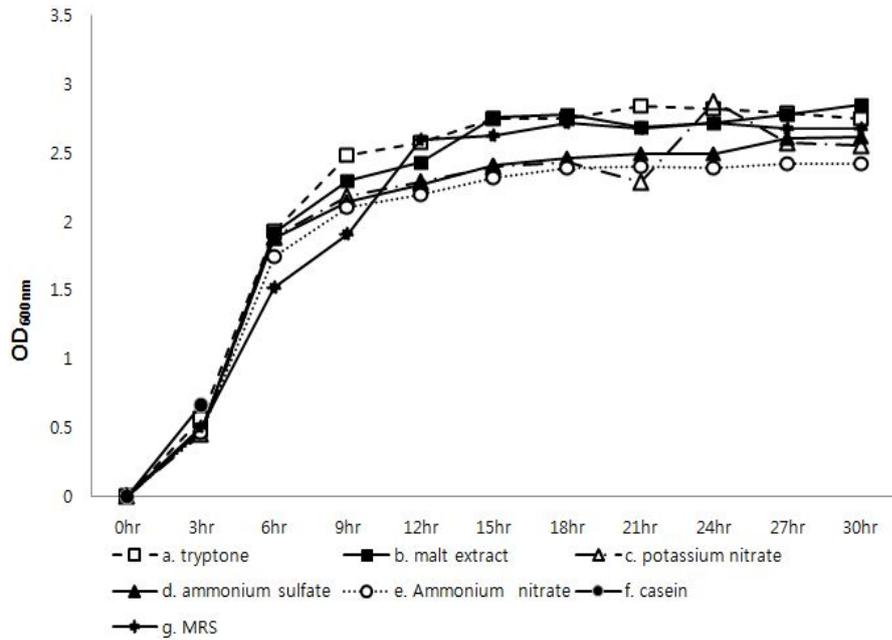


그림 3-6-3. 질소원 종류에 따른 OD_{600nm}의 변화

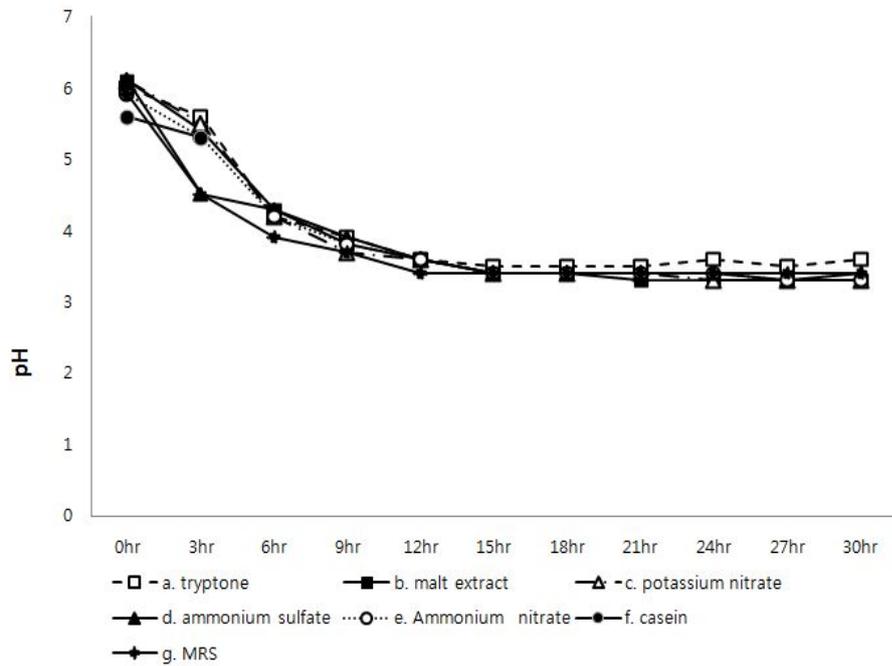


그림 3-6-4. 질소원 종류에 따른 pH의 변화

탄소원과 질소원 Top2를 경우의 수 4가지로 각각 혼합하여(표 3-6-4), *L. platarum* YML004이 가장 급속하게 자라는 12시간~24시간 사이 3시간 간격으로 sampling하여 OD_{600nm}, 생균 계수와 배양액의 pH측정, 병원균(*P. larvae* subsp. *laevae* KCTC3744.)에 대한 항균활성 시험을 시행했다. 항균활성 시험은 paper disk assay으로 측정 했다.

표 3-6-3. 탄소원과 질소원의 그룹

group	A	B	C	D
carbon source	glucose	glucose	saccharose	saccharose
nitrogen source	tryptone	malt extract	tryptone	malt extract

4개의 그룹 배지에서 *L. platarum* YML004의 OD_{600nm}, 생균 계수와 배양액의 pH를 조사한 결과(그림 3-6-5, 그림 3-6-6), 탄소원으로 Glucose를 사용하고 질소원으로 Tryptone을 사용한 배지에서 가장 높은 성장 효과를 보였다. 또한 질소원으로 tryptone을 사용함으로써 성장곡선에서 유도기를 단축시켜 생장이 촉진된 것을 확인했다.

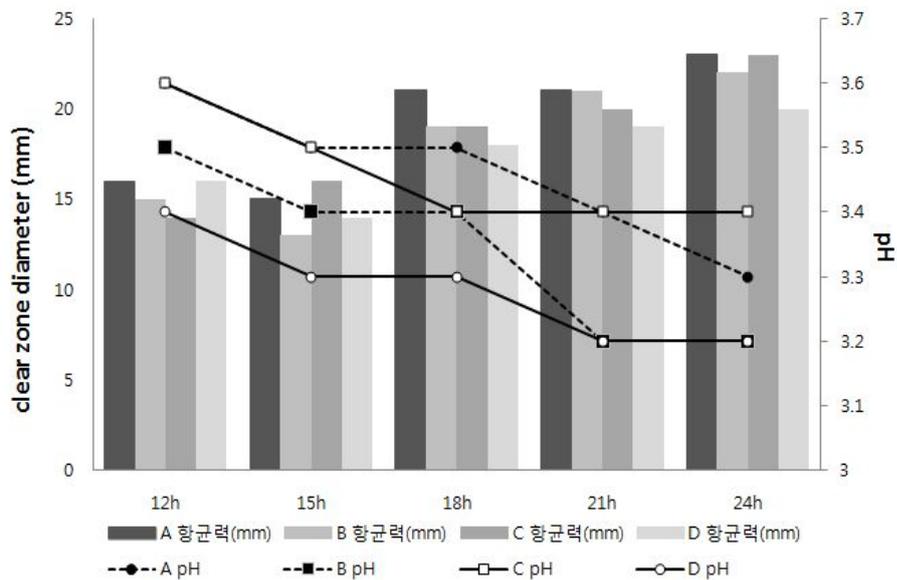


그림 3-6-5. 탄소원과 질소원 그룹의 항균력 및 pH

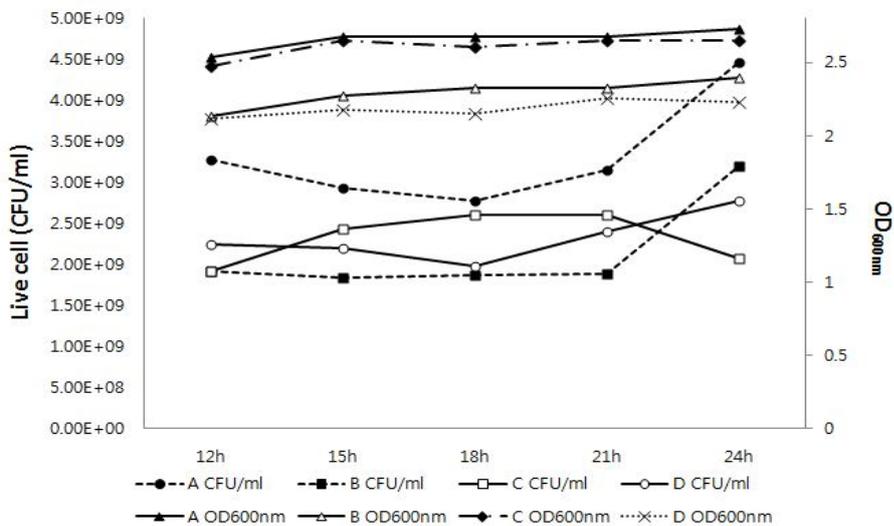
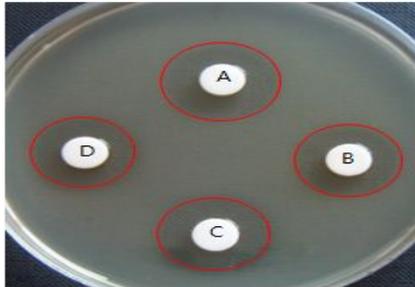


그림 3-6-6. 탄소원과 질소원 그룹의 생균수 및 OD_{600nm}

병원균(*P. larvae* subsp. *laevae* KCTC3744.)에 대한 항균활성 시험을 시행한 결과 탄소원으로 Glucose를 사용하고 질소원으로 Tryptone을 사용한 배지가 Clean zone diameter가 23mm으로 가장 항균활성이 우수했다(그림 3-6-7).



Group	C, N source	Clear zone diameter(mm)
A	glucose+tryptone	23
B	glucose+malt extract	22
C	saccharose+tryptone	22
D	saccharose+malt extract	20

그림 3-6-7. 탄소원과 질소원 그룹의 항균활성

나. 대량 배양용 배지 개발을 위한 미량원소 최적비율 조사

항균활성능이 뛰어난 균주(*L. plantarum* YML004)의 산업화를 위하여 대량배양에 사용될 배지의 조건을 조사했다. 기초배지로서는 *Lactobacillus* medium중 MRS 배지(10g Proteose peptone No.3, 10g Beef Extract, 5g Yeast Extract, 20g Dextrose, 5g Tween-80, 5g Sodium Acetate, 2g Ammonium Citrate, 0.1g MgSO₄, 0.05g MnSO₄, 2g Dipotassium Phosphate /L)를 이용했다. MRS의 미량원소(Polysorbate 80, Sodium Acetate, Ammonium Citrate, MgSO₄, MnSO₄, Dipotassium Phosphate) 함량을 기본으로 각각 양을 0%, 50%, 100%, 200%로 조정 한 뒤 OD_{600nm}, 생균 계수와 배양액의 pH측정하여 성장 효과를 조사했다(표 3-6-4).

표 3-6-4. 미량원소 함량 조절(g/L)

	TWEEN-80	sodium acetate	Ammonium citrate	MgSO ₄	MnSO ₄	Dipotassium Phosphate
A-1	0	5	2	0.1	0.05	2
A-2	0.5	5	2	0.1	0.05	2
A-3	2	5	2	0.1	0.05	2
B-1	1	0	2	0.1	0.05	2
B-2	1	2.5	2	0.1	0.05	2
B-3	1	10	2	0.1	0.05	2
C-1	1	5	0	0.1	0.05	2
C-2	1	5	1	0.1	0.05	2
C-3	1	5	4	0.1	0.05	2
D-1	1	5	2	0	0.05	2
D-2	1	5	2	0.05	0.05	2
D-3	1	5	2	0.2	0.05	2
E-1	1	5	2	0.1	0	2
E-2	1	5	2	0.1	0.025	2
E-3	1	5	2	0.1	0.1	2
F-1	1	5	2	0.1	0.05	0
F-2	1	5	2	0.1	0.05	1
F-3	1	5	2	0.1	0.05	4
Control	1	5	2	0.1	0.05	2
MRS	1	5	2	0.1	0.05	2

Tween-80의 경우 MRS 함량 대비 200%를 넣은 배지에서 4.7×10^9 CFU/ml로 성장률이 가장 높다. 함량이 적음에 따라 성장 효율이 낮아진다(그림 3-6-8, 그림 3-6-9).

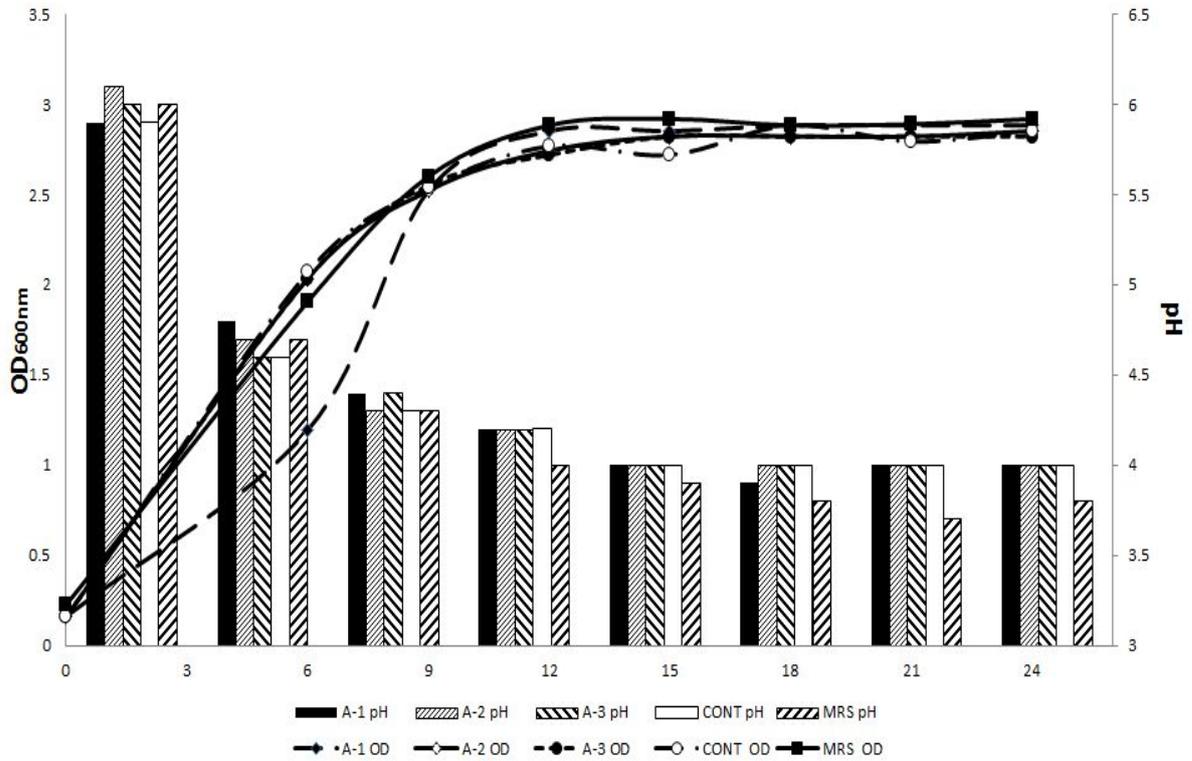


그림 3-6-8. Tween-80의 함량에 따른 pH 및 흡광도

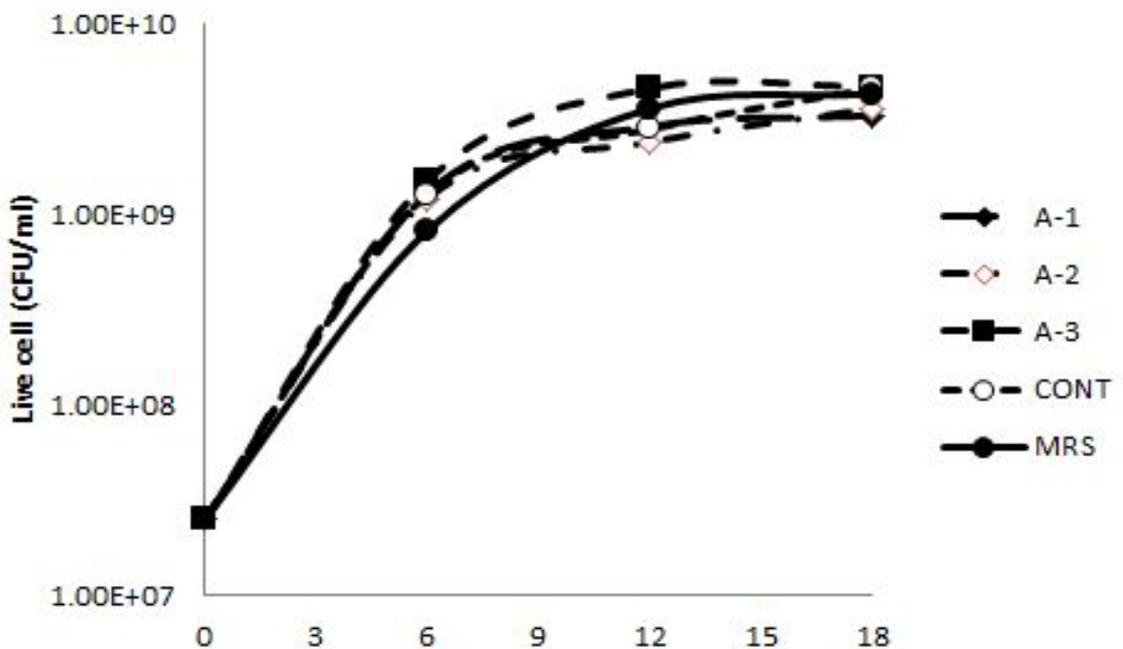


그림 3-6-9. Tween-80의 함량에 따른 생균수

Sodium acetate의 경우 MRS 함량 대비 200%를 넣은 배지에서 5.7×10^9 CFU/ml로 가장 높은 성장률을 보였으며(그림 3-6-10), MRS 함량 대비 0%를 넣은 배지의 경우 최저 pH수치가 3.5인데 반해 200%를 넣은 배지는 pH 수치가 4.4로 함량의 변화에 따라 pH 수치의 변화가 크다(그림 3-6-11).

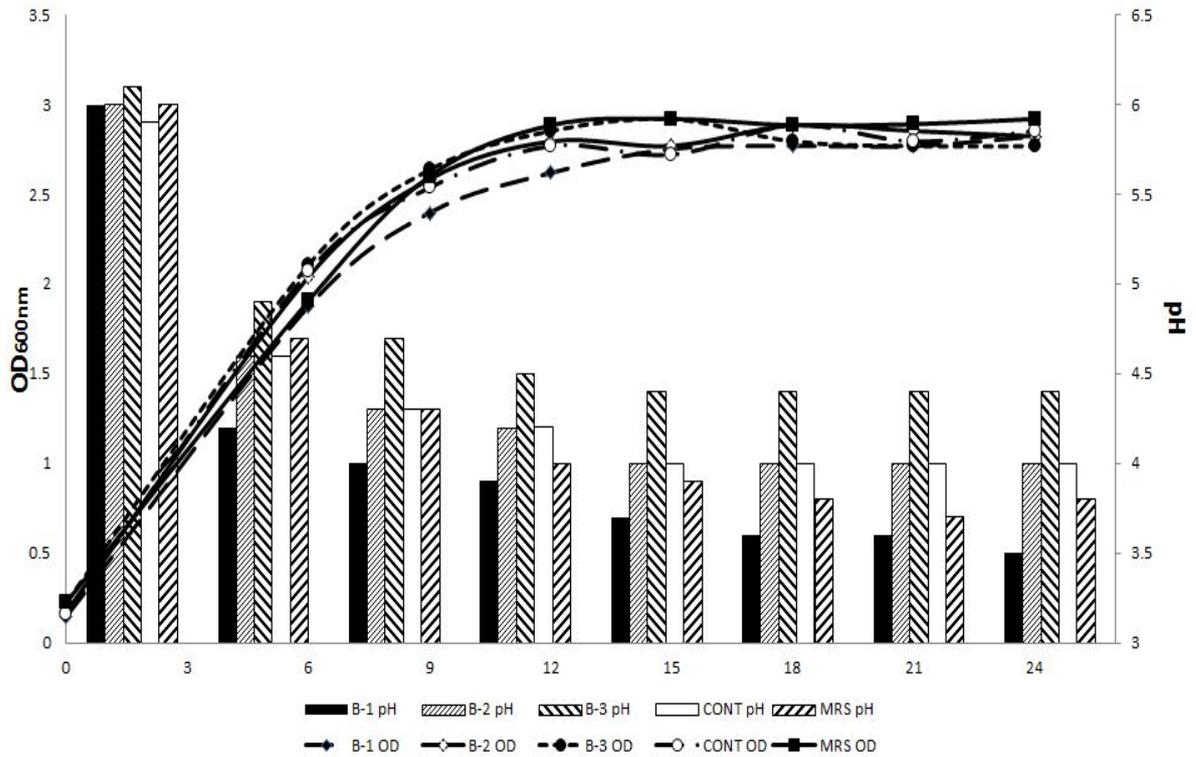


그림 3-6-10. Sodium acetate의 함량에 따른 pH 및 흡광도

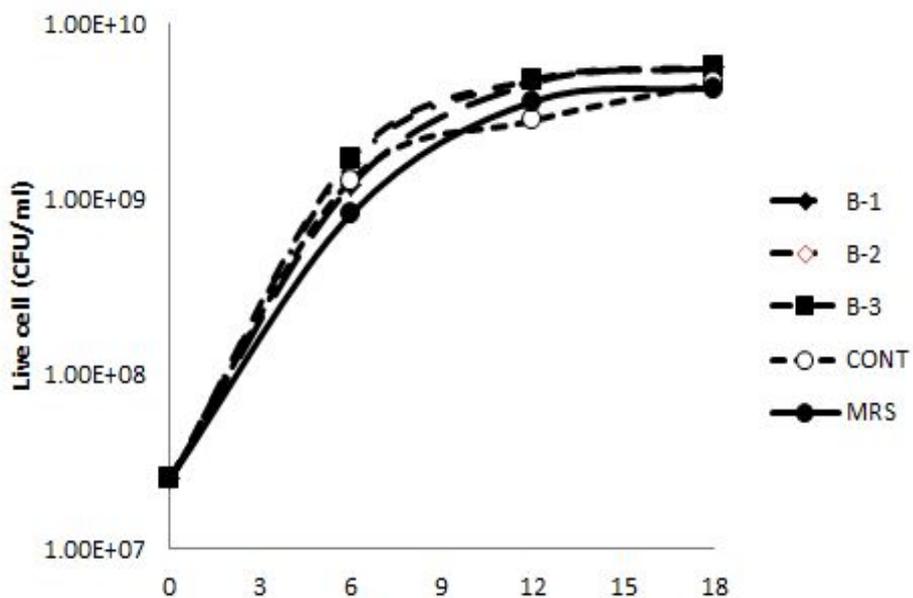


그림 3-6-11. Sodium acetate의 함량에 따른 생균수

Ammonium citrate의 경우 MRS 함량 대비 200%를 넣은 배지에서 6.6×10^9 CFU/ml로
 생장률이 가장 높다. 함량이 적음에 따라 성장 효율이 낮다(그림 3-6-12, 그림 3-6-13).

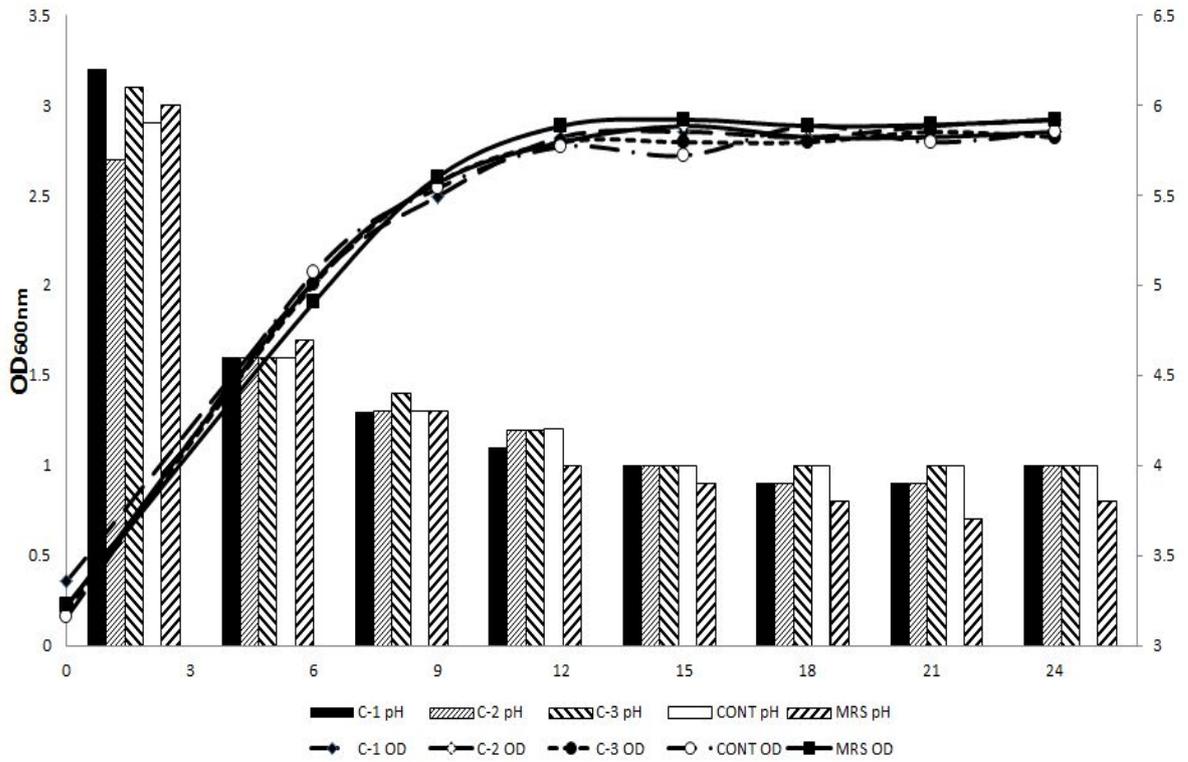


그림 3-6-12. Ammonium citrate의 함량에 따른 pH 및 흡광도

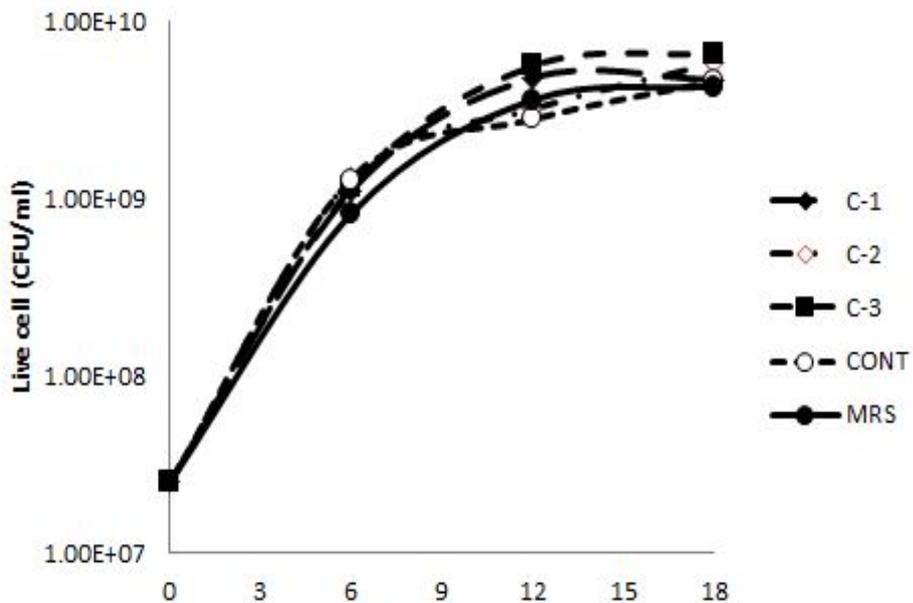


그림 3-6-13. Ammonium citrate의 함량에 따른 생균수

MgSO₄의 경우 MRS 함량 대비 200%를 넣은 배지와 50% 넣은 배지에서 4.9x10⁹ CFU/ml로 성장률이 가장 높다. MRS 함량 대비 0%를 넣은 배지에서는 3.9x10⁹ CFU/ml로 현격이 낮다(그림 3-6-14, 그림 3-6-15).

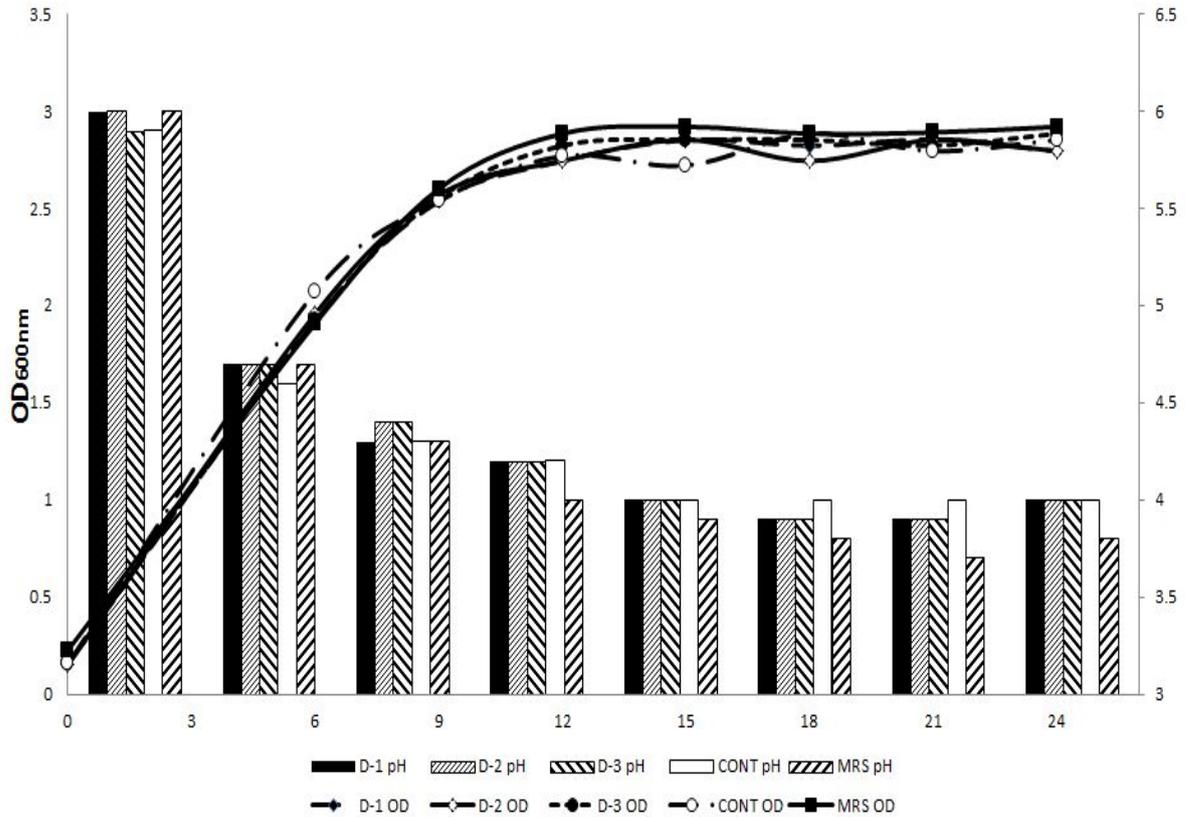


그림 3-6-14. MgSO₄ 함량에 따른 pH 및 흡광도

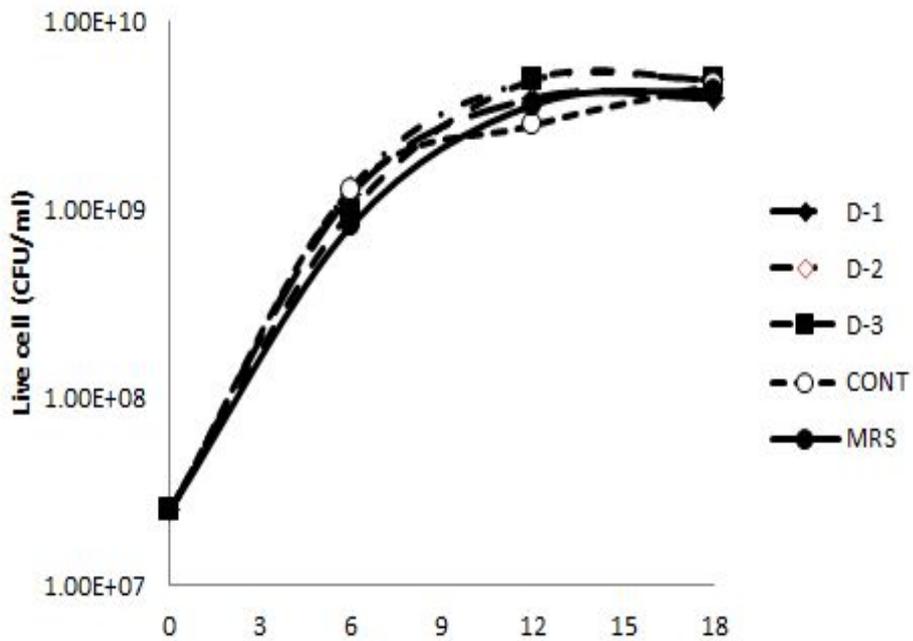


그림 3-6-15. MgSO₄의 함량에 따른 생균수

MnSO₄의 경우 MRS 함량 대비 50%를 넣은 배지에서 4.7x10⁹ CFU/ml로 성장률이 가장 높다. MRS 함량 대비 200%를 넣은 배지나 MRS 함량 대비 0%를 넣은 배지는 MRS 함량 대비 200%넣은 배지보다 성장률이 낮다. 함량이 적으면 pH 수치가 낮아지지만 MRS 함량 대비 0%는 50%에 비해 생균수가 낮아 50%가 최적 비율이다(그림 3-6-16, 그림 3-6-17).

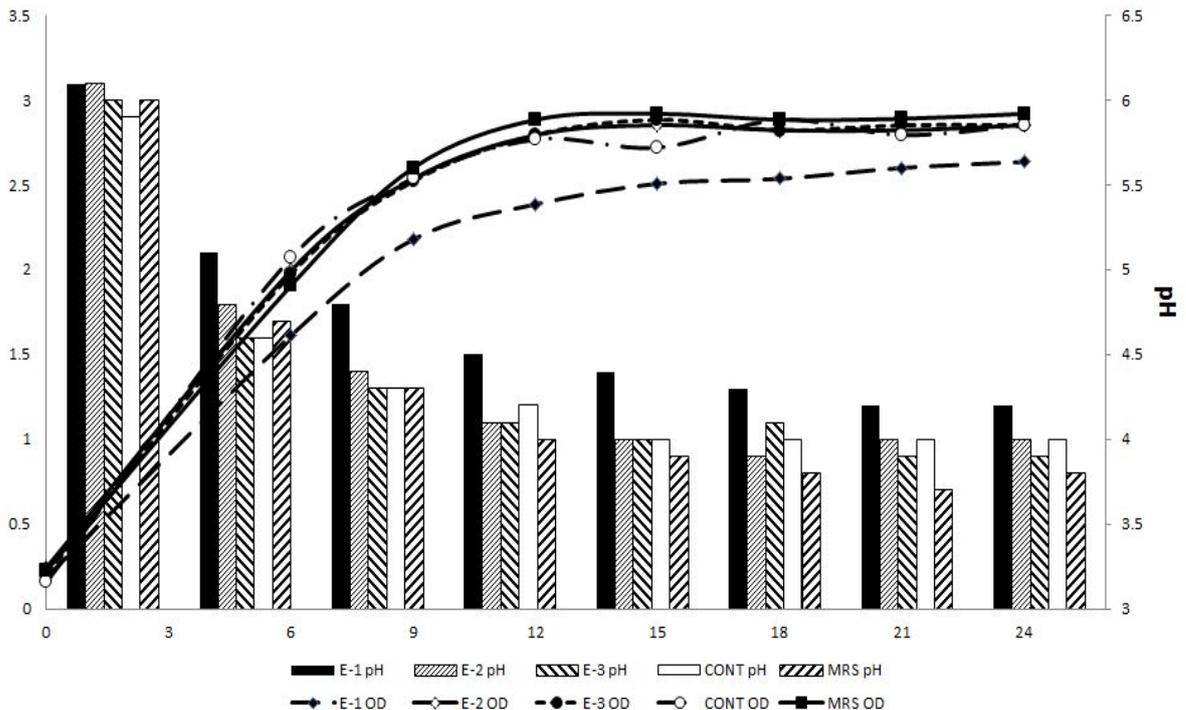


그림 3-6-16. MnSO₄ 함량에 따른 pH 및 흡광도

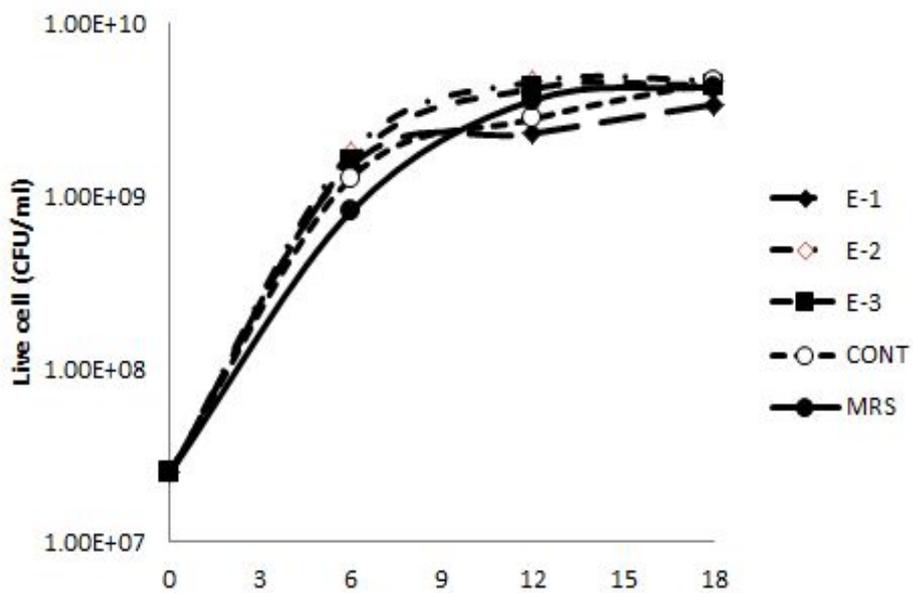


그림 3-6-17. MnSO₄ 함량에 따른 생균수

Dipotassium phosphate의 경우 MRS 함량 대비 0%를 넣은 배지에서 5.4×10^9 CFU/ml 로 가장 높은 성장률을 보였으나, 함량이 낮아짐에 따라 pH 수치가 낮아진다. Dipotassium phosphate의 경우 MRS 함량 대비 50% 함량으로 넣어주는 것이 최적비율 이다(그림 3-6-18, 그림 3-6-19).

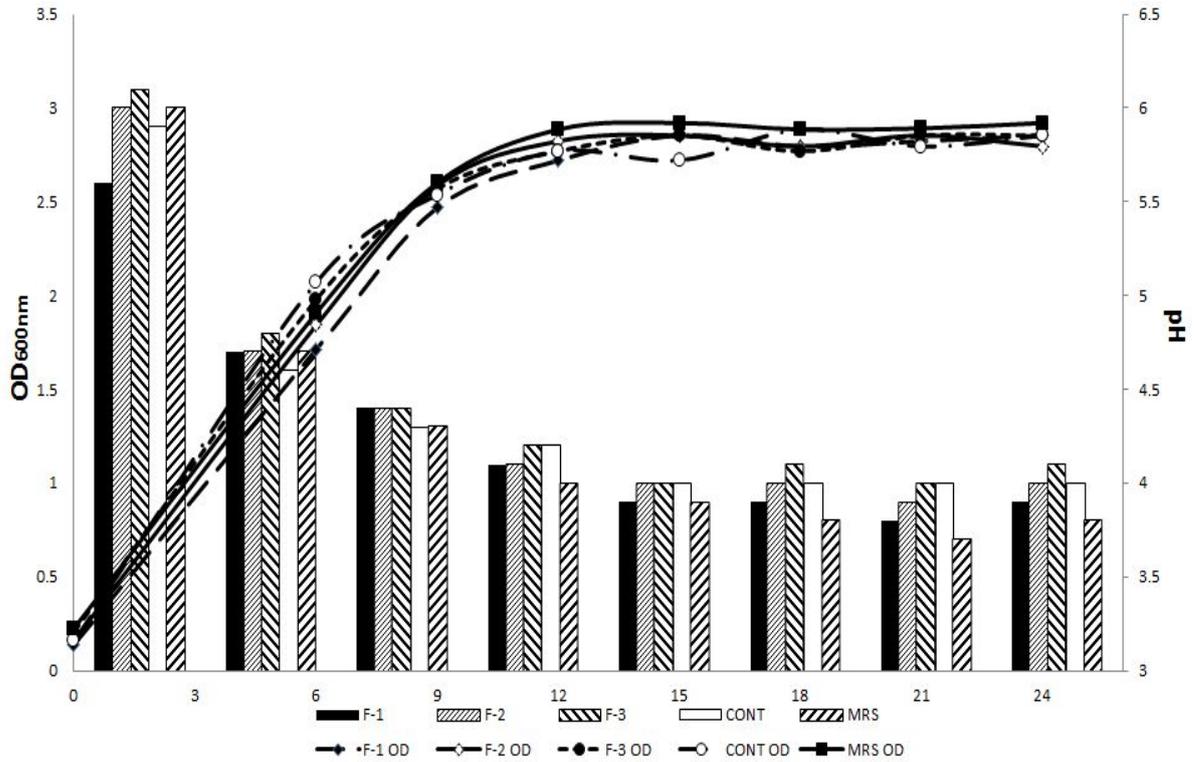


그림 3-6-18. Dipotassium phosphate 함량에 따른 pH 및 흡광도

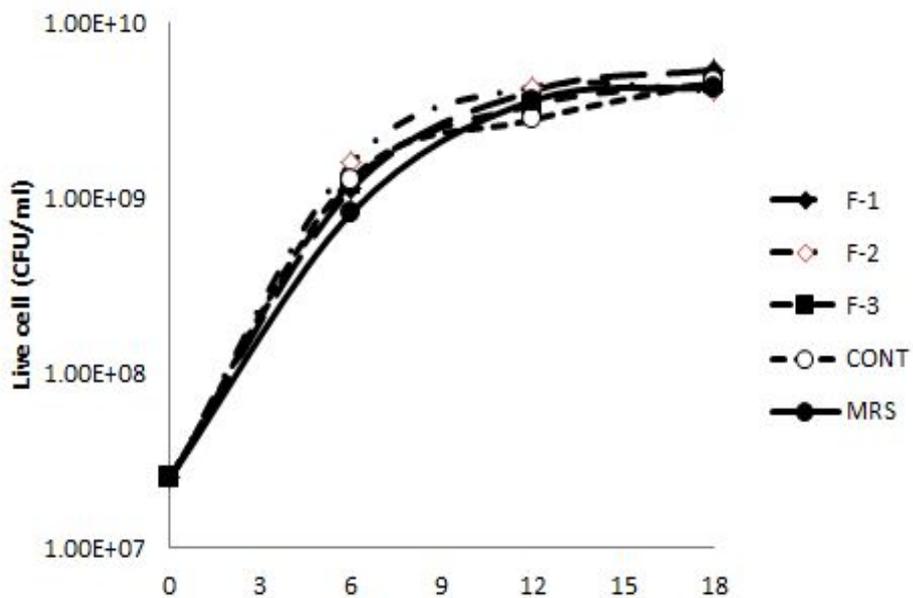


그림 3-6-19. Dipotassium phosphate 함량에 따른 생균수

다. 대량 배양용 배지 개발을 위한 Scale up

(1) 7L Fermenter를 이용한 배양

기 선별된 최적 배지 조성(20g Glucose, 5g Yeast Extract, 20g tryptone, 2g Polysorbate 80, 10g Sodium Acetate, 4g Ammonium Citrate, 0.05g MgSO₄, 0.025g MnSO₄, 1g Dipotassium phosphate /L)을 기반으로 7L fermenter (Kobiotec CO., LTD) 를 이용하여 24시간동안 2hour 간격으로 sample을 취하여 pH, CFU/ml, OD_{600nm} 를 측정했다(표 3-6-5, 그림 3-6-20, 그림 3-6-21).

표 3-6-5. 7L fermenter에 배양된 *L. plantarum* YML004의 특성

hours	OD	pH	CFU/ml
0	0.488	6.1	3.80E+07
2	0.532	6	3.90E+07
4	0.852	5.9	1.13E+08
6	1.967	5.3	5.90E+08
8	2.553	4.7	3.30E+09
10	2.721	4.2	5.60E+09
12	2.824	4.1	1.80E+10
14	2.824	4	2.70E+10
16	2.886	4	2.80E+10
18	2.824	4	8.70E+09
20	2.959	4	6.20E+09
22	2.886	4	4.90E+09
24	2.959	4	3.20E+09

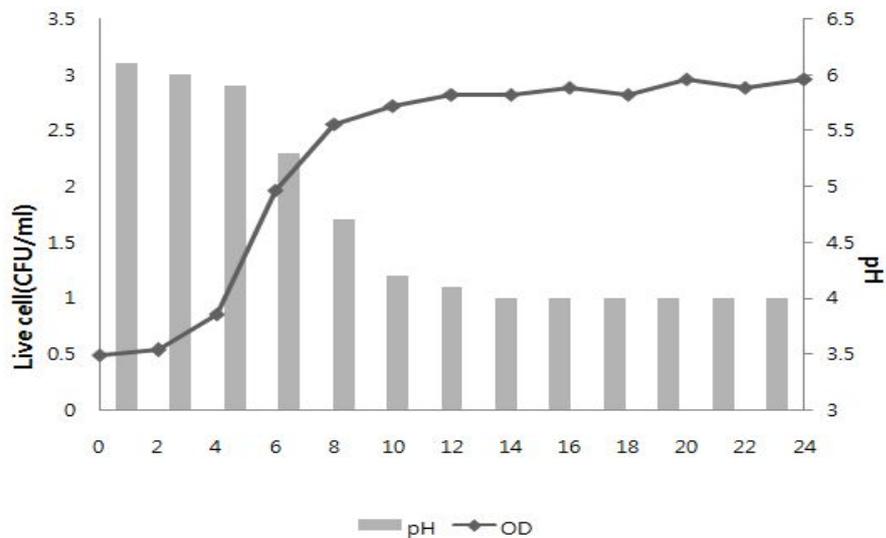


그림 3-6-20. 시간별 *L. plantarum* YML004의 pH 및 흡광도(7L fermenter)

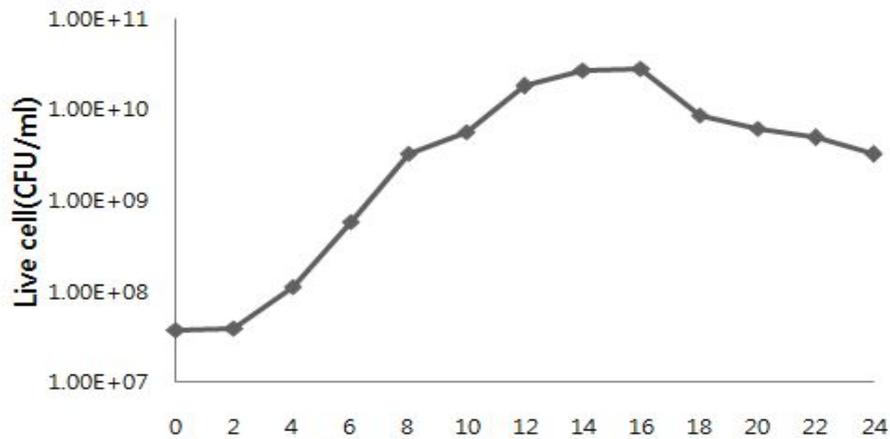


그림 3-6-21. 시간별 *L. plantarum* YML004의 생균수(7L fermenter)

기 선별된 최적 배지 조성을 기반으로 7L fermenter (Kobiotec CO., LTD) 를 이용하여 24시간동안 2hour 간격으로 sample을 취하여 pH, CFU/ml, OD_{600nm}를 측정했다. 최대 생균 수는 배양시작 16시간 후 2.8x10¹⁰ CFU/ml로 가장 많이 자랐으며, 배양시작 12시간부터 10¹⁰ CFU/ml이상 자랐다.

(2) 30L Fermenter를 이용한 배양

최종적으로 기 선별된 최적 배지 조성(20g Glucose, 5g Yeast Extract, 20g tryptone, 2g Polysorbate 80, 10g Sodium Acetate, 4g Ammonium Citrate, 0.05g MgSO₄, 0.025g MnSO₄, 1g Dipotassium phosphate /L)을 기반으로 30L fermenter(Kobiotec CO., LTD) 를 이용하여 24시간동안 2hr 간격으로 sample을 취하여 OD_{600nm}, 생균 계수와 배양액의 pH측정하여 성장 효과를 조사했다(표 3-6-6, 그림 3-6-22, 그림 3-6-23).

표 3-6-6. 30L fermenter에 배양된 *L. plantarum* YML004의 특성

hours	OD	pH	CFU/ml
0	0.249	6.1	4.10E+07
2	0.363	5.9	4.80E+07
4	0.995	5.5	2.63E+08
6	1.911	4.9	6.60E+08
8	2.684	4.5	4.58E+09
10	2.744	4.2	7.60E+09
12	2.824	4.1	1.53E+10
14	2.842	4	2.72E+10
16	2.859	4	3.60E+10
18	2.842	4	3.40E+10
20	2.959	4	1.39E+10
22	2.852	4	8.28E+09
24	2.886	4	6.29E+09

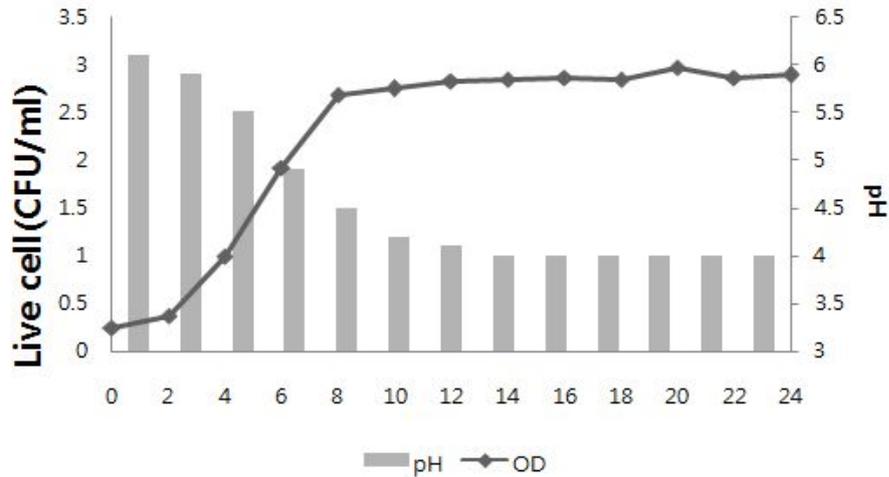


그림 3-6-22. 시간별 *L. plantarum* YML004의 pH 및 흡광도(30L fermenter)

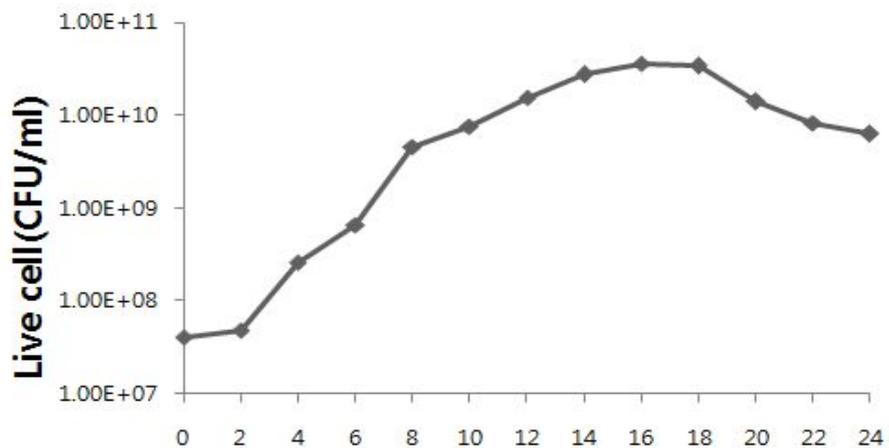


그림 3-6-23. 시간별 *L. plantarum* YML004의 생균수(30L fermenter)

최종적으로 30L fermenter(Kobiotec CO., LTD)를 이용하여 24시간동안 2hr 간격으로 sample을 취하여 pH, CFU/ml, OD_{600nm}를 측정했다. 최대 생균수는 배양 시작 16시간 후 3.6×10^{10} CFU/ml로 가장 많이 자랐으며, 7L와 마찬가지로 배양시작 12시간 이후부터 10^{10} CFU/ml 이상 자랐다.

2. 시제품개발

가. 시제품 개발 현황

- (1) 시제품 제작은 probiotics 미생물의 분리 조건에 따라 제조했다.
- (2) 시제품의 미생물 균수는 항균활성이 가장 우수했던 1×10^9 CFU/ml 이상이 되도록 배양 하여 생균제로 제조했다.
- (3) 개발된 시제품은 협동 연구기관인 경기대학교에서 화분떡으로 발효하여 현장 평가에 사용했다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연구개발목표달성도

연구 개발 목표	목표달성도 및 기여도
<ul style="list-style-type: none"> ▶ 미생물 자원 확보 <ul style="list-style-type: none"> - 꿀벌 질병 원인균에 대한 항균력이 우수한 미생물 자원 확보 ▶ 후보 균주의 생물학적 및 이화학적 특성 분석 <ul style="list-style-type: none"> - 항균 활성 우수 균주의 성장 특성 분석 	<ul style="list-style-type: none"> - 꿀벌 질병 원인균에 대한 항균 활성이 우수한 미생물 자원 확보(4종; <i>L. plantarum</i> YML001, <i>P. parvulus</i> YML002, <i>L. plantarum</i> YML004, <i>Leu. citreum</i> KM20) - 선발된 후보 균주 배양 상등액을 처리한 시험구는 미국 부저병원균의 성장을 억제시켰으며, 특히 <i>L. plantarum</i> YML004는 70% 정도의 성장을 억제시킴 - 꿀벌에 <i>Nosema</i> 포자를 투여한 후 선발된 후보 균주를 투여하여 포자 발아를 확인 한 결과 후보 균주를 투여하지 않은 시험구에 비해 약 100배의 포자 발아가 억제됨
<ul style="list-style-type: none"> ▶ 항생기능을 갖는 물질 분석 및 특성 연구 <ul style="list-style-type: none"> - Probiotics 물질 추출 및 정제 - Probiotics 물질의 특성 	<ul style="list-style-type: none"> - 확보된 선발 균주의 배양 상등액에 NaOH로 중화시킨 결과, 항균력은 감소된 결과를 나타냈으나 항균력을 상실하지 않음 - <i>L. plantarum</i> YML001의 물질 분석은 NMR을 실시하였으며, 꿀벌 질병 원인균에 항균력을 가진 물질은 lactic acid와 유사한 물질로 판단됨 - <i>L. plantarum</i> YML004의 물질 분석은 MALDI-TOF를 실시하였으며, 분석 결과 2가지 물질의 peak가 나타남. 6656.648 m/z의 분자량을 가진 물질은 lactic acid으로 판명되었으며, 추가적으로 5043.464 m/z의 분자량을 가진 물질을 확인 할 수 있었음. - 열처리, pH 변화, 효소 처리에도 의한 항균 활성능이 유지되어 산업적 활용에 적합함 - 항생제에 내성을 가지고 있어, 항생제와 혼합사용이 가능함
<ul style="list-style-type: none"> ▶ 1차 후보균주를 이용한 in vivo 실험 적용 <ul style="list-style-type: none"> - Bee egg 및 Bee larvae에 의한 probiotics후보의 저항성 test의 설계 및 적용(AFB, <i>Nosema</i>) 	<ul style="list-style-type: none"> - 꿀벌의 발생과정중 변태의 특성에 착안하여 약물선발, 독성판별의 다목적 test로 활용할 수 있는 새로운 실험방법을 개발함. 이를 변태독성실험법으로 명명함. 변태독성실험법을 미국부저병과 노제마 질병에 저항성이 있는 probiotics 선발에 적용하도록 설계 함 - AFB-specific Real-Time quantitative PCR법을 신규 개발함 - <i>Nosema</i>-specific Real-Time quantitative PCR법을 신규 개발함
<ul style="list-style-type: none"> ▶ AFB, <i>Nosema</i>의 예방제 및 치료제로 새로운 probiotics 후보의 신규 적용 및 선발된 probiotics의 용량-효과 관계 확립 	<ul style="list-style-type: none"> - 시제품으로 개발된 probiotics의 생균제를 이용한 AFB-probiotics 함유 또는 <i>Nosema</i>-probiotics 함유 화분떡 제조 - AFB-probiotics 또는 <i>Nosema</i>-probiotics의 과다 투여는 꿀벌의 이상 비행 활동 및 이상 행동을 야기 하지 않음 - AFB-probiotics 화분떡 처리한 전체 봉군 중 저농도군 및 중농도군의 평균 총 사체수가 적음. 대조군의 경우 실험 후기부터 말기까지 사체수가 계속 증가됨 - <i>Nosema</i>-probiotics 화분떡 처리한 전체 봉군 중 저농도군 및 중농도군의 평균 총 사체수가 적음 - <i>Nosema</i>-probiotics 화분떡을 처리한 각 실험군의 봉세는 초고농도 및 고농도 실험군에서 대조군을 크게 앞서는 봉세 성장을 보여 주어 <i>Nosema</i>-probiotics가 긍정적 성장 촉진을 하였음 - 이 연구에서 개발된 Probiotics는 해당 두 꿀벌 질병에 의한 피해를 극복하는 것으로 판단되며, 각 probiotics의 농도는 해당 봉군의 육아권 벌집 수와 용량-반응관계가 있는 것으로 판단됨
<ul style="list-style-type: none"> ▶ 대량 생산 시스템의 확립 및 시제품 제작 <ul style="list-style-type: none"> - 액상발효조를 이용한 대량 생산 시스템 확립 - 시제품 개발 	<ul style="list-style-type: none"> - 탄소원과 질소원을 그룹지어 성장물을 조사한 결과 glucose와 tryptone으로 이용한 대량 배양 배지 조건에서 최대 성장물을 나타냄 - 질소원으로 tryptone을 이용한 결과 probiotics의 성장 유도기가 단축되어 생장이 촉진되는 것을 확인하였으며, 산업적으로 이용이 용이함 - 기 선발된 최적 배지 조성을 기반으로 하여 7L, 30L 발효조로 scale up하였으며, probiotics의 최적 배지인 MRS에 비해 10배 이상의 성장을 확인함 - 균수가 1x10⁹ CFU/ml 이상이 되도록 배양하여 생균제로 제조함 - 개발된 시제품은 화분떡 발효에 이용되어 현장 평가 실시함

제 2 절 관련분야에의 기여도

1. 기술적 측면

- 가. 현재 대부분 시판되고 있는 항생제는 화학제품이어서 내성이나 잔류, 오염 등이 문제가 되고 있으나 대체 항생제는 아직 개발되지 않아 유일한 대체 항생제가 될 것임
- 나. 병원성 생물의 증식 억제 효과를 갖는 신기능 프로바이오틱스를 사용함으로써 항생제 내성균의 출현을 효율적으로 차단함
- 다. 본 연구를 통해 방제용 시제품 및 사료용 시제품 등 다양한 형태의 연계 개발이 가능함

2. 경제적, 산업적 측면

- 가. 환경 친화적인 생물 농약의 개발을 가속화 시킬 수 있으며, 현재 양봉사업을 위협하는 심각한 질병들을 퇴치함으로써, 양봉사업의 활성화에 도움이 되고 양봉산물의 생산성도 증진되어 자급률 뿐 아니라 수출량도 늘릴 수 있음
- 나. 친환경적인 생물농약을 확보함으로써 국민의 보건 및 건강증진에 기여
- 다. 현재 유일한 친환경 항생제로써 고부가가치산물로 경제적 활용성이 증대 되고 국제 시장에 제품을 판매함으로써 막대한 외화 획득이 가능
- 라. 세계시장에서의 우리나라의 점유율은 6위를 차지하고 있는 실정이며 연구 성과물은 국가 경쟁력을 증가시킬 것으로 사료됨

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1 절. 연구 성과

가. 교육 및 지도 활용 (1건)

- (1) 양봉산업발전 심포지엄(2011. 11. 30)에서 “국내 꿀벌질병과 그에 대한 진단 및 처방법”의 주제로 농가 및 공무원 대상으로 교육 실시

나. 특허 출원 (4건)

- (1) 미국부저병의 원인균에 대한 항균활성을 가지는 락토바실러스 플란타룸 YML001, 상기 미생물을 함유하는 항균성 미생물 제제 및 상기 미생물을 이용한 방제 방법, 출원 번호 : 10-2010-0011690
- (2) 미국부저병의 원인균에 대한 항균활성을 가지는 페디오코커스 파버러스 YML002, 상기 미생물을 함유하는 항균성 미생물 제제 및 상기 미생물을 이용한 방제 방법, 출원 번호 : 10-2010-0011691
- (3) 꿀벌 병해충 방제용 조성물, 출원 번호 : 10-2012-0001617
- (4) 유산균이 함유된 양봉 사료 및 이의 제조방법, 출원 번호 : 10-2012-0022467

다. 논문

(1) 국내 (14편)

- ▶ 유미선, 윤병수. 2009년 국내 꿀벌 질병의 발생 빈도. Korean J. Apiculture, 24(4), 273-278, 2009
- ▶ 유미선, 최용수, 박용하, 윤병수. Chronic Bee Paralysis Virus의 진단을 위한 Real-Time PCR 진단법의 개발. Korean J. Apiculture, 25(1), 31-37, 2010
- ▶ Phu Van Nguyen, Ji-Na No, Sang-Hoon Han, Sun-Hwan Kwon, Yong-Ha Park, Byoung-Su Yoon. Development of Sacbrood Virus-specific PCR detection based on stable Capside Protein Sequence. Korean J. Apiculture, 25(2), 115-122, 2010
- ▶ Kim Cuc Thi Nguyen, Mi-Sun Yoo, Sang-Hoon Han, Sun-Hwan Kwon, Yong-Ha Park, Byoung-Su Yoon. Generation of Specific Monoclonal Antibod against Recombinant Major Royal Jelly Pretein 1 (MRJP1) from Honeybee (Apis mellifera). Korean J. Apiculture, 25(2), 129-135, 2010
- ▶ Phu Van Nguyen, Ji-Na No, Mi-Sun Yoo, Yong-Ha Park, Byoung-Su Yoon. Over-expression of Major Royal Jelly Protein 3 from Apis mellifera in E. coli. Korean J. Apiculture. 25(3), 163-171, 2010

- ▶ Mi-Sun Yoo, Ji-Na No, Van Phu Nguyen, Yong Soo Choi, Yong-Ha Park, Byoung-Su Yoon. Development of Ultra-rapid Real-Time PCR Method for the detection of Chronic Bee Paralysis Virus. Korean J. Apiculture, 25(3), 193-199, 2010
- ▶ Ji-Na No, Nguyen Van Phu, Mi-Sun Yoo, Yong-Ha Park, Byoung-Su Yoon. Simple and Rapid Method for Detection of Deformed Wing Virus (DWV) by Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP). Korean J. Apiculture, 25(3), 211-216, 2010
- ▶ 이보람, 노지나, Nguyen Van Phu, 유미선, 박용하, 윤병수. Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) 법을 이용한 *Nosema Ceranae* 검출법 개발. Korean J. Apiculture, 25(4), 267-274, 2010
- ▶ Mi-Sun Yoo, Van Phu Nguyen, Ji-Na No, Bo-Ram Lee, Yong-Ha Park, Byoung-Su Yoon. Development of Ultra-Rapid Real-Time PCR Method for the Detection of *Nosema*. Korean J. Apiculture, 26(1), 21-27, 2011
- ▶ Phu Van Nguyen, Ji-Na No, Bo-Ram Lee, Mi-Sun Yoo, Byoung-Su Yoon. Detection and Quantification of Major Royal Jelly Protein 1 in Honeybees by ELISA using a Monoclonal Antibody. Korean J. Apiculture, 26(1), 71-77, 2011
- ▶ 유미선, 이보람, 김재수, 윤병수. 국내 꿀벌의 장내 미생물 군집 조사. Korean J. Apiculture, 26(2), 87-92, 2011
- ▶ Mi-Sun Yoo, Sang-Hoon Han, Byoung-Su Yoon. Development of Ultra-Rapid Real-Time PCR Method for Detection of Black Queen Cell Virus. Korean J. Apiculture, 26(3), 203-208, 2011
- ▶ Phu Van Nguyen, Sang-Hoon Han, Byoung-Su Yoon. Development of a Metalloproteinase Gene Based Loop Mediated Isothermal Amplification Assay for Detection of *Paenibacillus* larvae. Korean J. Apiculture, 26(3), 213-220, 2011
- ▶ 유미선, 이보람, 노지나, Nguyen Van Phu, 윤병수. Black Queen Cell Virus 재조합 단백질의 발현. Korean J. Apiculture, 26(4), 275-282, 2011

(2) 국외 (2편)

- ▶ Mi-Sun Yoo, Kim Cuc Nguyen Thi, Phu Van Nguyen, Sang-Hoon Han, Soon-Hwan Kwon, Byoung-Su Yoon. Rapid detection of sacbrood virus in honeybee using ultra-rapid real-time polymerase chain reaction. Journal of Virological Methods, 179(1), 195-200, 2011
- ▶ Min-Hee Kang, Il-Wook Kim, Dong-Woo Lee, Mi-Sun Yoo, Sang-Hoon Han, Byoung-Su Yoon. Development of a rapid detection method to detect tdh gene in *Vibrio parahaemolyticus* using 2-step ultrarapid real-time polymerase chain reaction. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 69(1), 21-29, 2011

라. 국내 및 국제 학술회의

(1) 국내 학술회의 (11회)

- ▶ Nguyen Van Phu. Generating of specific monoclonal antibody against recombinant virion protein 1 for development of immunoassay kit for the detection of sacbrood virus. 제26차 한국양봉학회, 2011
- ▶ Mi-Sun Yoo. Application of ultra-rapid real-time PCR method for honeybee viral disease detection. 제26차 한국양봉학회, 2011
- ▶ Bo-Ram Lee. Trend of honey bee diseases detection method in Korea. 제26차 한국양봉학회, 2011
- ▶ Ji-Na No. Development of detect to honeybee diseases take advantage of loop-mediated isothermal amplification (LAMP). 제26차 한국양봉학회, 2011
- ▶ Byoungjoo Seo. 꿀벌 부저병 및 노제마 병원균의 생육을 억제하는 프로바이오틱스. 제26차 한국양봉학회, 2011
- ▶ Bo-Ram Lee. Detection of ascospaera apis causing chalkbrood disease by using loop-mediated isothermal amplification (LAMP). 제26차 한국양봉학회, 2011
- ▶ Ji-Na No. Development of RT-LAMP (reverse transcription loop-mediated isothermal amplification) for detection of capsid protein in IAPV (israel acute paralysis. 제26차 한국양봉학회, 2011
- ▶ Mi-Sun Yoo. Development of ultra-rapid real-time PCR method for the detection of *Nosema ceranae*. 제26차 한국양봉학회, 2011
- ▶ Nguyen Van Phu. Quantification of major royal jelly protein 1 in honeybee by ELISA based on monoclonal antibody. 제26차 한국양봉학회, 2011
- ▶ Yoon Jeong Jang. Novel Probiotic Strains for American Foulbrood and Nosemosis of Honeybee. 2011 International Symposium & Annual Meeting Translational Research in Microbiology and Biotechnology, 2011
- ▶ 윤병수. 국내 꿀벌 질병과 진단 현황. 수의과학연구소 추계심포지움, 2011

(2) 국제 학술회의 (3회)

- ▶ Yoon Jeong Jang. Novel Probiotic Strains for American Foulbrood and Nosemosis of Honeybee. IUMS 2011 Sapporo XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology, 2011
- ▶ Ji-Na No. Easy Detection of the honeybee disease using loop-mediated

Isothermal Amplification (LAMP). 42nd international apicultural congress, 2011

- ▶ Byoung Su Yoon. Aplication de un metodo de PCR Real-Time para Deteccion de enfermedades virales en abejas. 42nd international apicultural congress, 2011

제 2 절. 성과 활용 계획

가. 산업화 계획 (참여기업을 통한 제품화 실시 계획)

(1) 우수제품 양산공정 확립

- ▶ 우수한 미생물발효 제품을 생산하기위한 스케일 확대 시험
- ▶ 원료의 검수, 확인, 배양배지 제작, 멸균, 종균접종, 배양, 균체회수, 동결건조, 분쇄, 혼합, 포장 등 생산 공정을 확립하며, 지속적으로 시험 생산함
- ▶ 생산 제품의 품질관리규정을 정하고 위해성 및 안전성을 최대한 확립함

(2) 품질관리 체계 확립 운영

- ▶ 품질관리부서는 생산부서와 독립적으로 운영
- ▶ 유해세균검사, 분자생물학적 검사를 이용한 오염여부검사, 이화학적인 검사체계 확립함
- ▶ 원료의 검수, 멸균, 종균접종, 배양, 균체회수, 동결건조, 분쇄, 혼합, 포장 등이 가능한 생산 공정을 확립하여 지속적인 시험 생산을 통하여 제품양산체계를 확립 운영함

나. 마케팅 및 판매 계획

(1) 기초조사로 관련제품의 국내외 시장조사 및 경쟁브랜드의 판로 및 마케팅현황을 종합 분석

- ▶ 기존 사용자 분석 및 시나리오 기법활용
- ▶ 유사제품군 및 자사제품 분석
- ▶ 유통경로 별 매출 현황 등을 분석

(2) 대표브랜드 개발하여 브랜드기반 마케팅을 전개함

- ▶ 확장 가능한 시스템을 갖춘 경쟁력 있는 대표브랜드를 개발함
- ▶ 유산균 및 발효라고 하는 전통적 이미지를 디지털 시대에 맞도록 새롭게 재해석 하여 건강한 라이프스타일과 함께하는 현명한 건강 카운슬러의 이미지를 확립함

- ▶ 대표브랜드의 아이덴티티를 적용하여 온라인 오프라인 프로모션 전략 수립
- ▶ 지속적인 연구개발 내용을 업데이트하여 지적인 브랜드 이미지를 구축해나가는 브랜드마케팅을 전개함

다. 본 연구결과를 바탕으로 무공해 양봉 생산을 위한 추가연구를 추진 계획 중임

라. 국내 특허 등록 및 국제 특허 출원 준비 중임

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술 정보

제 1 절 프로바이오틱스를 이용한 꿀벌 면역 증진 효과 연구

1. 최근 선진국을 중심으로 꽃가루(화분) 대체 천연물 및 기능성 probiotics을 이용한 꿀벌의 면역 증진을 위한 연구가 진행 중
2. 꿀벌의 장내 세균을 조사를 통한 꿀벌 면역 반응에 대한 연구가 진행 중이며 또한 꿀벌의 면역력을 향상시키기 위해 probiotics를 이용하는 연구가 진행 중 임[15]. 또한 병원성 미생물을 예방하기 위하여 기능성 probiotics를 활용하는 연구가 진행 중[16]
3. Probiotics를 이용한 꿀벌 사료 첨가제는 꿀벌의 생존율을 높이며 실험결과를 바탕으로 꿀벌의 건강에 대한 유익한 성질을 가진 것으로 보고되고 있음[9, 17]. 따라서 꿀벌에 대한 병원성 질병 원인균의 성장을 억제하고 면역 증진 효과를 가진 probiotics는 항생제 대체제로 사용할 수 있는 새로운 대안이라 판단됨

제 7 장 참고문헌

1. 최지영, 농촌진흥청 곤충산업과. “양봉농가 꿀칫거리 꿀벌 부저병, 한 번에 확~, - 유럽부저병(EFB)과 미국부저병(AFB) 동시진단 기술 개발 -”, 보도자료. 2008
2. 김병진, 마천 농협 가공사업소장. “토종꿀벌(한봉)업계의 현실과 발전 방향”. 2010 한국 토종꿀벌의 규격기준(안) '제시를 위한 학술 발표회. 2010
3. 윤병수, 유미선. Incidence of Honeybee Disease in Korea 2009. 한국양봉학회지. 24(4), 273-278. 2009
4. 최용수, 이명렬, 이만영, 이광길. 국내 꿀벌에서의 바이러스진단 및 질병발생 현황 조사. 한국양봉학회지 23(2). 153-159, 2008
5. Liesel Brenda GENDE, Matias Daniel MAGGI, Natalia DAMIANI, Rosalia FRITZ, Martin Javier, EGUARAS, Ignazio FLORIS. Advances in the apiary control of thehoneybee American Foulbrood with Cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) essential oil. Bulletin of Insectology. 62(1), 93-97, 2009
6. Adriana M. Alippi, Jorge A. Ringuelet, Elsa L. Cerimele, María S. Re and Cynthia P. Henning. Journal of Hebs, Spices and Medicinal Plants. 4(2), 9-16, 1996
7. Karina Antúnez, Jorge Harriet, Liesel Gende, Matías Maggi, Martin Eguaras and Pablo Zunino. Efficacy of natural propolis extract in the control of American Foulbrood. Veterinary Microbiology. 131, 324-331, 2008
8. Mikio Yoshiyama, Kiyoshi Kimura. Bacteria in the gut of Japanese honeybee, *Apis cerana japonica*, and their antagonistic effect against *Paenibacillus* larvae, the causal agent of American foulbrood. Journal of Invertebrate Pathology. 102(2), 91-96, 2009
9. Eva Forsgren, Tobias C. Olofsson, Alejandra Vásquez and Ingemar Fries. Novel lactic acid bacteria inhibiting *Paenibacillus* larvae in honey bee larvae. Apidologie. 41(1), 99-108, 2010
10. Yoshinori Hatakeyamaa, Shoji Hayasaka. A new method of pebrine inspection of silkworm egg using multiprimer PCR. Journal of Invertebrate Pathology. 82, 148-151, 2003

11. Chakrabarti, Satadal and Manna, Buddhadeb. Effect of microsporidian infection on reproductive potentiality on mulberry silkworm, *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae) in different seasons. *Int. J. Indust. Entomol.* 17(1), 157-163, 2008
12. Jihyun F. Kim¹, Haeyoung Jeong, Jung-Sook Lee, Sang-Haeng Choi, Misook Ha, Cheol-Goo Hur, Ji-Sun Kim, Soohyun Lee, Hong-Seog Park, Yong-Ha Park, and Tae Kwang Oh. Complete Genome Sequence of *Leuconostoc citreum* KM20. *Journal of Bacteriology.* 3093-3094, 2008
13. 순천대학교. 천연소재를 이용한 한봉 사료 개발에 관한 연구(최종보고서). 농림부. 2004
14. OECD/OCDE. OECD guidelines for testing of chemicals, Honeybee, Acute contact toxicity test. 1998
15. Evans JD, Lopez DL. Bacterial probiotics induce an immune response in the honey bee. [J Econ Entomol.](#) 97(3), 752-756, 2004
16. Honey bees stay healthy in probiotic hives. Posted on 2012.
(<http://www.futurity.org/top-stories/honey-bees-stay-healthy-in-probiotic-hives/>)
17. Adam Kaznowski, Bozena Szymas, Ewa Jazdzinska, Magdalena Kazmierczak, Halina Paetz and Joanna Mokracka. The effects of probiotic supplementation on the content of intestinal microflora and chemical composition of worker honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Apicultural Research.* 44(1), 10-14, 2005

주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.