

Spektrum wrażliwości *Paenibacillus larvae* na działanie związków antybakteryjnych

KRZYSZTOF BUCZEK

Katedra Epizootologii i Klinika Chorób Zakaźnych Zwierząt Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UP,
ul. Głęboka 30, 20-612 Lublin

Buczek K.

Range of susceptibility of *Paenibacillus larvae* to antibacterial compounds

Summary

The honey bee disease American foulbrood (AFB) is a serious problem since its causative agent (*Paenibacillus larvae*) has become increasingly resistant to conventional antibiotics. From the year 2000 the number of isolates of *P. larvae* resistant against oxytetracycline (OTC) has increased. Therefore, since 2000 many antibiotics, chemotherapeutic propolis and plant extracts were tested in vitro and in vivo against *P. larvae*. The most active in the in vitro tests appeared to be deoxycycline, minocycline, rifampicin and lincomycin. Among the 35 examined antibacterial compounds active against *P. larvae* were narasin, salinomycin and tylosine. In many countries tylosine, tilomycosis have been recommended for the control of AFB, while microsamycin was recommended in Japan. The studies with plain essential oils did not succeed. The propolis extracts from the various parts of the world showed significant inhibition of *P. larvae*. Due to the evolution of the resistance of *P. larvae* to conventional antibiotic treatments, the research on normal bee microflora (*Bacillus*, *Paenibacillus*, and *Brevibacillus*) is an important step in identifying possible new active tools to treat AFB in honey bee colonies.

Keywords: *Paenibacillus larvae*, antibacterial drugs, control of AFB

Paenibacillus larvae, Gram-dodatnia bakteria kształtu cylindrycznego jest zarazkiem o niebywalej patogenności dla czerwiu rodzin pszczelich i wyjątkowej ekspansji epidemiologicznej. Z uwagi na tworzenie opornych na zniszczenie endospor bakteria ta przez długie lata zakaża środowisko i jest przyczyną stałej obecności zgnilca amerykańskiego (American foulbrood – AFB) w pasiekach (10). Straty ekonomiczne dotyczące pasiek spowodowały, że kontrola zakażeń czerwiu pszczoły miodnej i zgnilca amerykańskiego znajduje odzwierciedlenie w ustawach oraz zaleceniach sanitarnych i epidemiologicznych. W wielu krajach obowiązuje zniszczenie zakażonych rodzin przez wysiarkowanie i spalanie zabitych pszczoł wraz z zawartością ula, nieraz towarzyszącego sprzętu lub po zniszczeniu pszczoł termiczne odkażenie ula, opalenie sprzętu, o ile nie został spalony (22, 29, 30, 35).

Totalne niszczenie zakażonych pasiek i sprzętu jest z pewnością najbardziej skuteczną metodą walki z tym wyjątkowo groźnym – przynoszącym olbrzymie straty ekonomiczne patogenem. Metoda ta, możliwa do zaakceptowania w przypadku niewielkiej liczby zakażonych pni, jest trudna do realizacji, gdy zasięg infekcji obejmuje niemal całą pasiekę, co wiąże się z jej likwidacją. Zniszczenie pasiek w rejonach zakażonych, poza zdecydowanym sprzeciwem pszczelarzy, miałoby ogrom-

ny, negatywny wpływ na plony roślin owadopylnych. Niebagatelne są także koszty ekonomiczne takiego postępowania. W Polsce zgnilec amerykański jest chorobą podlegającą obowiązkowi zwalczania. (Dziennik Ustaw z 2005 r. nr 187 poz. 1574, paragraf 4.1. „Powiatowy lek. wet. ... w punkcie 2.a. nakazuje odpowiednie postępowanie z: chorymi rodzinami pszczelimi w szczególności ich leczenie albo zniszczenie”) (6). W wielu krajach Europy stosowanie antybiotyków u pszczoł jest zabronione lub ściśle nadzorowane (21, 36, 37).

Alternatywą walki z AFB jest leczenie zakażonych rodzin przy użyciu preparatów przeciwbakteryjnych, jak antybiotyki i chemioterapeutyki, o wyborze ograniczonym (przez ustawy). Od lat czterdziestych ubiegłego wieku dopuszczono do użycia sulfamid (sulfatiazol, polisulfamid) wycofane (w niektórych krajach) w latach 70. ze względu na trwałe skażenie miodu. W 10 lat po wprowadzeniu sulfamidów do leczenia AFB zaakceptowano terramycynę w postaci oksytetracykliny (OTC), stosowaną w wielu krajach, w tym w Polsce, obok polisulfamidu (21, 26, 29, 30, 36).

Pojawienie się szczepów opornych *P. larvae* na OTC, co stwierdzono w 2000 r. (3, 31), zwróciło uwagę na poszukiwanie innych, możliwych do zaakceptowania substancji leczniczych. Badania ukierunkowano na nowe grupy antybiotyków i chemioterapeutyków oraz na sub-

stancje produkowane przez rośliny, a także pszczoły (propolis). Idealem byłby preparat aktywny wobec patogenu, nietoksyczny dla pszczół we wszystkich stadiach rozwoju i nie powodujący skażenia produktów pszczelich.

Inny problem wynikający z powstawania opornych na OTC szczepów *P. larvae* (MIC szczepów wrażliwych na OTC < 1,00 µg/ml, opornych > 32,00 µg/ml) (22), stanowią badania mechanizmów oporności zarazka w stosunku do skutecznego przez lata antybiotyku. Poznanie tych mechanizmów i przygotowanie alternatywnych preparatów umożliwiających kontrolę AFB stanowi wyzwanie dla współczesnej nauki i praktyki dotyczącej hodowli pszczoły miodnej. Znaczenie pszczół dla gospodarki tylko jako „zapylacza” roślin uprawnych, oszacowano w USA na miliardy dolarów (4, 5, 14, 18, 26, 27).

Poszukując nowych, możliwych do zastosowania w praktyce preparatów Kochansky i wsp. (26, 27) przebadali ogółem 62 antybiotyki i chemioterapeutyki z 19 grup. Badania wykonano przy pomocy testów laboratoryjnych *in vitro* oraz *in vivo* w kontrolowanych próbach terenowych. Badania przydatności do terapii AFB 27 antybiotyków przeprowadzono w stosunku do szczepu opornego i wrażliwego na OTC. Jak wynika z danych autorów (26), spośród 6 antybiotyków z grupy tetracyklin najbardziej aktywna w stosunku do szczepu wrażliwego okazała się demeklocyklina (Demeclocycline), w przypadku której strefa zahamowania występowała wokół krążka zawierającego 0,012 µg antybiotyku. W stosunku do szczepu opornego na OTC strefę hamowania obserwowano przy 10-krotnie większym stężeniu (0,12 µg). Najbardziej efektywne okazały się jednak deoksycyklina i minocyklina (Deoxycycline, Minocycline) wyznaczające strefę zahamowania wzrostu obu szczepów przy zawartości 0,04 µg preparatu w krążku. Z pozostałych 21 badanych antybiotyków najbardziej aktywna w stosunku do obu szczepów okazała się rifampicina (Rifampicin) – strefa zahamowania wzrostu występowała nawet przy ilości 0,0012 µg preparatu na krążku, a MIC = 1,8 µg/l. Antybiotyk ten nie jest jednak dopuszczony do użytku weterynaryjnego. Najbardziej aktywne OTC, tylozyna, erytromycyna, linkomycyna, dawały widoczny efekt hamowania w stosunku do szczepu wrażliwego i opornego na OTC przy ilości 0,06 µg substancji na krążku (26). Celowość i możliwość użycia linkomycyny do kontroli AFB potwierdzają badania Feldlaufera i wsp. (15).

Spośród 35. badanych związków najbardziej efektywnymi okazały się narasina i salinomycyna, preparaty należące do grupy antybiotyków jonoforowych (0,04–0,012 µg/krążek), a z grupy makrolidów – tylozyna. Ten ostatni antybiotyk był testowany w stosunku do patogenu przez wielu autorów (5, 34). Efekt hamowania wzrostu szczepów *P. larvae* przez pozostałe 33 preparaty następował przy dziesięciokrotnie większej koncentracji. Badania terenowe wprawdzie nie wykazały efektu toksycznego badanych antybiotyków w stosunku do larw, ale okazały się także nieskuteczne w doświadczalnych badaniach *in vivo*. Tak więc wprowadzone do te-

rapii AFB sulfamidy i tetracykliny, pomimo powstania pewnej puli szczepów opornych, pozostają nadal w wielu krajach preparatami z wyboru.

Pozytywne wyniki odnośnie do efektywności tylozyny w kontroli AFB w badaniach doświadczalnych *in vitro* i *in vivo* w stosunku do *Apis mellifera ligustica* L., uzyskał zespół Alippi i wsp. (5). Autorzy zwracają uwagę na konieczność rozszerzenia badań w doświadczeniach terenowych. Szczegółne znaczenie ma fakt, że w procesie degradacji tylozyna ulega przemianie w desmykozynę (desomycosin) która pozostaje w miodzie ponad 9 miesięcy (24, 25). Fakt ten nakazuje szczególne zwrócenie uwagi na dawkę preparatu, okres stosowania i sposób podania leku zakażonej rodzinie (5). W 2005 r. firma Elanco Animal Health, na podstawie własnych badań, rekomendowała tylozynę (preparat Tylan) do zwalczania AFB (dawka 200 mg/ul, w 20 g cukru – syrop, raz w tygodniu przez 3 tygodnie). (Supplemental New Animal Drug Application NADA 013-076).

Innym antybiotykiem, dopuszczonym do praktyki weterynaryjnej, w wielu krajach przetestowanym w badaniach *in vitro* i *in vivo* w stosunku do AFB jest tylomykozyna (tilomicosin) (37). Tylomykozyna – półsyntetyczny antybiotyk z grupy makrolidów uzyskiwany jest poprzez chemiczną modyfikację tylozyny. Związek ten okazał się aktywny w stosunku do opornych i wrażliwych szczepów *P. larvae*. W badaniach wykonanych na 23 szczepach, w tym trzech opornych na OTC, MIC tego antybiotyku kształtowała się w przedziale 0,5 do 0,0625 µg/ml. Podana *per os* tylomykozyna okazała się nietoksyczna dla pszczół dorosłych, wyliczone LD₅₀ w ciągu 24 godz. osiągnęto przy ilości 10478,438 µg antybiotyku/pszczołę. Śmiertelność czerwii wynosiła 13-14% i nie odbiegała od wartości notowanej dla czerwii kontrolnego. Przeprowadzona w okresie jesiennym próba terenowa z dawką 1000 mg substancji czynnej/ul przyniosła pozytywny efekt. Autorzy postulują dalsze badania nad określeniem optymalnej dawki leczniczej tego antybiotyku, formy podania oraz stopnia skażenia miodu. W konkluzji wyrażają optymizm dotyczący możliwości wdrożenia tylomykozyny do praktyki w kontroli AFB.

Badania autorów japońskich (32) skoncentrowano na mikrosamycynie (MRM) antybiotyku z grupy makrolidów. W Japoni OTC nie jest dopuszczona do kontroli AFB. Antybiotyk ten stosowany w Japonii do leczenia zwierząt okazał się także skuteczny w zwalczaniu AFB. Podany z pyłkiem w ilości 200 mg/rój/tydzień, jest efektywnie przekazywany larwom wraz z mleczkiem pszczół karmicielek i osiąga dużą koncentrację w larwach. Wysoki minimalny efekt hamowania (MIC₉₀ = 0,05 µg/ml) i efekt bakteriobójczy (MBC₉₀ = 6,25 µg/ml) w stosunku do *P. larvae* oraz względnie niewielkie skażenie miodu stawia MRM w rzędzie skutecznego preparatu w kontroli AFB w Japonii.

Poszukując nowych preparatów umożliwiających skuteczną kontrolę AFB i nie powodujących skażenia produktów pszczelich, przede wszystkim miodu, podjęto wiele badań zmierzających do wykorzystania bakterio- statycznych i bakteriobójczych związków produkowa-

nych przez rośliny. Floris i wsp. (16) badali olejki eteryczne 20 roślin i wykazali w badaniach *in vitro* ich działanie bakteriobójcze w dawce od 50 do 400 mg/kg. Najbardziej efektywny okazał się olejek cynamonu – MIC i MBC 50 i 100 mg/kg. W olejku tym zidentyfikowano 24 związki chemiczne, występujące w różnych ilościach; największą frakcję (79,3%) stanowił aldehyd cynamonowy. Preparat ten okazał się aktywny w doświadczeniach *in vivo* w okresie jesieni i zimy. Praktyczne użycie olejku cynamonu w terapii AFB wymaga jeszcze wielu badań w tym toksykologicznych (16).

Badacze argentyńscy (17, 19) poszukując skutecznych preparatów, możliwych do stosowania w profilaktyce i terapii AFB, przetestowali olejki eteryczne krajowych dzikich roślin, otrzymane metodą destylacji wodnej. Spośród 5 badanych *in vitro* olejków roślinnych silną aktywność bakteriobójczą w stosunku do *P. larvae* wykazywał olejek ekstrahowany z tymianku pospolitego (*Thymus vulgaris*) zawierający 39,9% tymolu. Właściwości bakteriobójcze tymolu wykazano także w stosunku do innych patogenów pszczoły miodnej, jak np. *Ascosphaera apis* (12). Nie przeprowadzono jednak badań terenowych. Wyniki badań *in vitro* nie zawsze pokrywają się z próbami *in vivo*. Kontrola efektywności leku w warunkach terenowych w stosunku do AFB zależy od wielu dodatkowych czynników, takich jak dawka czy sposób podania.

W doświadczeniach terenowych destylatów pochodzących z 5 roślin – *Thymus vulgaris* – tymianek pospolity, *Cymbopogon citratus* – palczatka cytrynowa, *Organum vulgare* – lebiodka pospolita, *Ocimum basilicum* – bazylia pospolita, *Satureja hortensis* – cząber ogrodowy aktywnych *in vitro* w stosunku do *P. larvae* nie osiągnięto efektu leczniczego. Przeciwnie, w koloniach leczonych tymi preparatami obserwowano silniejszy stopień infekcji w stosunku do kontroli. Wynik ten autorzy tłumaczą pewnym stopniem toksyczności badanych preparatów wywieranym na czerw i imago (1).

W 2008 r. Fuselli i wsp. (18) przebadali bakteriobójcze właściwości olejków eterycznych otrzymanych z owoców drzew cytrusowych. Stwierdzili oni dużą aktywność terpenów z owocu grejpfruta (*Citrus paradisi*) dla których MIC osiągała wartość 385 mg/l, zaś efekt bakteriobójczy (MBC) 770 mg/l. Olejki uzyskane z pomarańczy (*Citrus sinensis*), mandarynek (*C. nobilis*) i cytryny (*C. limon*) okazały się mniej aktywne (MIC pomarańczy = 839,9, a MBC 2520,0 mg/l). Złożony skład chemiczny i zmienna koncentracja poszczególnych składników w owocach nie pozwoliły na wytypowanie związku najbardziej aktywnego. Wskazują na to także badania Belletti i wsp. (9) wykonane na drożdżach *Saccharomyces cerevisiae*. Badania wykazały, że pod względem aktywności do *P. larvae* terpeny i inne związki zawarte w olejku owoców grejpfruta tworzą oddzielną grupę wśród pozostałych preparatów użytych w doświadczeniu. Wstępny etap cytowanych badań nie przynosi rozstrzygnięć praktycznych (18).

Próby użycia propolisu do kontroli AFB pochodzą z późnych lat 60. ubiegłego wieku (28), chociaż w medycynie ludzkiej propolis był stosowany od niepamięt-

nych czasów (7). W pracy przeglądowej dotyczącej składu chemicznego i zbiorowisk roślin produkujących substancje zbierane przez pszczoły do w produkcji propolisu Bankowa i wsp. (7) zwracają uwagę na różnicowanie składu chemicznego i aktywności mikroobójczej preparatów z różnych – bliskich i dalekich geograficznie środowisk. Wskazują na konieczność zintensyfikowania badań zmierzających do wyodrębnienia substancji biologicznie czynnych i standaryzacji preparatu, co stanowi warunek rekomendacji do praktyki medycznej. Antybakteryjna aktywność propolisu pochodzącego z różnych rejonów Brazylii oraz z USA (stan Minnesota), ukierunkowana na *P. larvae* była przedmiotem badań Bastos i wsp. (8). Autorzy wykazali różną aktywność hamowania wzrostu *P. larvae* przez wyciągi alkoholowe 32 próbek propolisu występującego w 4 kolorach: czerwonym, zielonym, brązowym i czarnym. Wszystkie badane próbki, w tym z USA, były aktywne w stosunku do tego patogenu. Porównując ich aktywność w stosunku do antybiotyków kontrolnych, wankomycyny i tetracykliny, autorzy spekulują, że wprawdzie średnice zahamowania wzrostu dookoła krążków z antybiotykami były istotnie większe, ale substancja czynna znajdowała się tylko w standardowej ilości 30,0 µg. Przygotowane wyciągi zawierały od 2,70 do 12,60 mg propolisu, w którym nie oznaczono ilości substancji czynnej, co może wskazywać, iż występuje ona w mniejszej ilości niż antybiotyk. Silny efekt hamowania wzrostu *P. larvae* przez aktywne związki zawarte w propolisie stanowi zachętę do badań zmierzających do ich identyfikacji. Ma to szczególne znaczenie, gdyż propolis z regionów o umiarkowanym klimacie jest często identyfikowany jako typ propolis-topoli, niezależnie od gatunku drzewa, co sprawia, że zawarte w nim związki chemiczne są podobne. Badań wymaga także mechanizm działania związków aktywnych na komórkę bakterijną oraz, co jest niezmiernie ważne z punktu widzenia praktyki, sposób, ilość i okres stosowania. Niezmiernie istotne jest oznaczenie poziomu tych związków w produktach pszczelich, ich znaczenie dla organizmu wszystkich form rozwoju owada, a także dla człowieka.

W ostatnich latach duże zainteresowanie wzbudzają badania wpływu mikroflory bakteryjnej na rodzinę pszczelą. Badania dotyczą roli mikroorganizmów niepatogennych, rezydujących w ulu jako saprofity i współżyjących z owadem, ciągle obecnych w produktach pszczelich. Poznanie znaczenia tych mikroorganizmów dla wzrostu aktywności pszczoły np. w zapylaniu roślin jest przedmiotem oddzielnych badań (20). Zainteresowanie budzą także bakterie i ich produkty możliwe do wykorzystania w profilaktyce i terapii AFB. Badania Evansa i Armstronga (13) wykazały, że spośród 19 różnych bakterii wyosobnionych z ula cztery: *Acinetobacter* sp., *Bacillus fusiformis*, *Brevibacillus formosus*, *Stenotrophomonas maltophilia* wykazywały największy wpływ hamujący wzrost *P. larvae*. Interakcja pomiędzy gatunkami zasiedlającymi ul może być ważnym czynnikiem w utrzymaniu zdrowia rodziny pszczelej. Wskazują na to spostrzeżenia, że obecność w ulu flory chorobotwórczej nie zawsze prowadzi do wystąpienia obja-

wów chorobowych. Być może następuje to w wyniku interakcji pomiędzy bakteriami lub jest wynikiem odpowiedzi immunologicznej występującej u owadów, w tym u larw pszczoły. Przegląd mechanizmów obronnych pszczoły w stosunku do *P. larvae* przedstawiono w oddzielnym opracowaniu (11).

Spostrzeżenie, że bakterie rodzaju *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Brevibacillus* to stali mieszkańcy ula (20) skłoniło Alippi i Reynaldi (5) do podjęcia badań nad ich znaczeniem jako efektywnych czynników w biokontroli AFB. Bakterie tych rodzajów to producenci antybiotyków, związków antybiotykopodobnych, bakteriocyn i metabolitów przeciwrzybowych (23, 33).

W badaniach Alippi i Reynaldi (5) wykazali, że spośród 242 izolowanych szczepów bakterii zasiedlających ule 26 (11%) bardzo efektywnie hamowało wzrost *P. larvae* (ATCC 9545). Wybrane z pośród 26 (drogą losową) 10 szczepów przetestowano w stosunku do 16 szczepów *P. larvae* pochodzących z różnych krajów. Wszystkie wybrane izolaty, jakkolwiek w różnym stopniu, hamowały wzrost testowych szczepów tego patogenu. Okazało się, że czynniki hamujące produkowane przez wybrane szczepy nie są jednorodne. W ich skład wchodzi zarówno związki peptydowe, rozkładane przez trypsynę, częściowo inaktywowane trypsyną, co wskazuje, że zawierają peptyd połączony ze związkiem antybiotykopodobnym, jak i całkowicie niewrażliwe na trypsynę, a więc nie mające charakteru białkowego. Wyniki tych badań zachęcają do bliższego poznania mechanizmów antagonizmu tych grup bakterii, być może możliwych do wdrożenia w kontroli AFB. Gwałtowne narastanie populacji *P. larvae* odpornej na OTC wymusza poszukiwanie nowych związków o działaniu bakteriostatycznym i bakteriobójczym oraz nowych, bardziej skutecznych metod zwalczania choroby. Współcześnie rozwój badań molekularnych ukierunkowanych na poznanie mechanizmów oporności bakterii i ich zróżnicowanie genetyczne można wykorzystać do badań nad opracowaniem leku skutecznego także dla kontroli AFB. Zagadnienia te stanowią temat innego opracowania (11).

Piśmiennictwo

- Albo G. N., Henning C. P., Ringuet J. A., Reynaldi F. J., De Giusti M. R., Alippi A. M.: Evaluation of some essential oils for the control and prevention of American Foulbrood disease in honey bees. *Apidologie* 2003, 34, 417-427.
- Alippi A. M.: Is Terramycin® losing its effectiveness against AFH? *Bee Biz* 2000, 11, 27-29.
- Alippi A. M., Albo G. N., Reynaldi F. J., De Giusti M. R.: In vitro and in vivo susceptibility of the honeybee bacterial pathogen *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* to the antibiotic tylosin. *Vet. Microbiol.* 2005, 109, 47-55.
- Alippi A. M., Lopez A. C., Reynaldi F. J., Grasso D. H., Aguilar O. M.: Evidence for plasmid-mediated tetracycline resistance in *Paenibacillus larvae*, the causal agent of American Foulbrood (AFB) disease in honeybees. *Vet. Microbiol.* 2007, 125, 290-303.
- Alippi A. M., Reynaldi F. J.: Inhibition of the growth of *Paenibacillus larvae*, the causal agent of American foulbrood of honeybees, by selected strains of aerobic spore-forming bacteria isolated from apiarian sources. *J. Invertebr. Pathol.* 2006, 91, 141-146.
- Anon.: Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 14 września 2005 r. w sprawie zwalczania zgnilca amerykańskiego pszczoł. *Dz. U.* 2005, nr 187 poz. 1574.
- Bankova V. S., De Castro S. L., Marcucci M. C.: Propolis; recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie* 2000, 31, 3-15.
- Bastos F. M., Simone M., Jorge D. M., Soares A. E., Spivak M.: In vitro study of the antimicrobial activity of Brazilian propolis against *Paenibacillus larvae*. *J. Invertebr. Pathol.* 2008, 28, 273-281.
- Belletti N., Ndagijimana M., Sisto C., Guerzoni M. E., Lanciotti R., Gardini F.: Evaluation of the chemical composition of citrus essences on *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Agr. Food Chem.* 2004, 52, 6932-6939.
- Buczek K.: Charakterystyka biochemiczna, patogenność i genotypowanie *Paenibacillus larvae*, patogenu pszczoły miodnej. *Medycyna Wet.* 2008, 64, 1287-1290.
- Buczek K.: Odpowiedź pszczoły na infekcję powodowaną przez *Paenibacillus larvae*. *Medycyna Wet.* 2009, 65, 73-144.
- Colin M. E., Ducos de Lahitte L., Larribau E., Bouc T.: Activité des huiles essentielles de Labilées sur *Ascosphaera apis* et traitement d'un rucher. *Apidologie* 1989, 20, 221-228.
- Evans J. D.: Diverse origins of tetracycline resistance in the honey bee bacterial pathogen *Paenibacillus larvae*. *J. Invertebr. Pathol.* 2003, 83, 46-50.
- Evans J. D., Armstrong T. N.: Inhibition of the American foulbrood bacterium, *Paenibacillus larvae larvae*, by bacteria isolated from honey bees. *J. Apicult. Res.* 2005, 44, 168-171.
- Feldlaufer M. F., Pettis J. S., Kochansky J., Stiles G.: Lincomycin hydrochloride for the control of American foulbrood disease of honey bees. *Apidologie* 2001, 32, 547-554.
- Floris L., Carta C., Moretti M.: Activités in vitro de plusieurs huiles essentielles sur *Bacillus larvae* White et essai au rucher. *Apidologie* 1996, 27, 111-119.
- Fuselli S. R., Gende L. B., Gracia de la Rosa S. B., Eguaras M. J., Fritz R.: Short communication. Inhibition of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* by the essential oils of two wild plants and their emulsifying agents. *Spanish J. Agric. Res.* 2005, 3, 220-224.
- Fuselli S. R., Gracia de la Rosa S. B., Eguaras M. J., Fritz R.: Chemical composition and antimicrobial activity of Citrus essences on honeybee bacterial pathogen *Paenibacillus larvae*, the causal agent of American foulbrood. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2008, 24, 2067-2072.
- Fuselli S. R., Gracia de la Rosa S. B., Gende L. B., Eguaras M. J., Fritz R.: Antimicrobial activity of some Argentinian wild plant essential oils against *Paenibacillus larvae larvae*, causal agent of American foulbrood (AFB). *J. Apic. Res.* 2006, 45, 2-7.
- Gilliam M.: Identification and roles of non-pathogenic microflora associated with honey bee. *FEMS Microbiol. Lett.* 1997, 155, 1-10.
- Gliniski Z.: Choroby bakteryjne czerwia i pszczoł. *Pasieka* 2004, 3, 60-63.
- Hornitzky M.: Oxytetracycline sensitivity of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* isolates. *RIRDC Publication No 05/021*, 1-5, 2005.
- Jack R. W., Tagg J. R., Ray B.: Bacteriocins from Gram-positive bacteria. *Microbiol. Rev.* 1995, 59, 171-200.
- Kochansky J.: Degradation of tylosin residues in honey. *J. Apic. Res.* 2004, 43, 65-68.
- Kochansky J.: Evaluation of purification schemes in the determination of tylosin in honey using high performance liquid chromatography. *J. Apic. Res.* 2004, 43, 60-64.
- Kochansky J., Knox D. A., Feldlaufer M., Pettis J.: Screening alternative antibiotics against oxytetracycline-susceptible and -resistant *Paenibacillus larvae*. *Apidologie* 2001, 32, 215-222.
- Kochansky J., Pettis J.: Screening additional antibiotics for efficacy against American foulbrood. *J. Apic. Res.* 2005, 44, 24-28.
- Lindenfelser L. A.: In vitro activity of propolis against *Bacillus larvae*. *J. Invertebr. Pathol.* 1968, 12, 129-131.
- Matheson A., Reid M.: Strategies for the prevention and control of American foulbrood. Part I. *Am. Bee J.* 1992, 132, 399-402.
- Matheson A., Reid M.: Strategies for the prevention and control of American foulbrood. Part II. *Am. Bee J.* 1992, 133, 417-475.
- Miyagi T., Peng C. Y. S., Chuang R. Y., Mussen E. C., Spivak M. S., Doi R. H.: Verification of oxytetracycline-resistant American foulbrood pathogen *Paenibacillus larvae* in the United States. *J. Invertebr. Pathol.* 2000, 75, 95-96.
- Nakajima C., Sakogawa T., Okayama A., Nakamura A., Hayama T.: Disposition of microsamycin in honeybee hives. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 1998, 21, 269-273.
- Nielsen P., Sorensen J.: Multi-target and medium independent fungal antagonism by hydrolytic enzymes in *Paenibacillus polymyxa* and *Bacillus pumilus* strains from barley rhizosphere. *FEMS Microbiol. Ecol.* 1997, 22, 183-192.
- Peng Y. S., Mussen E., Fong A., Cheng P., Wong G., Montague M. A.: Laboratory and field studies on the antibiotic tylosin on honey bee *Apis mellifera* L. (Hymenoptera Apidae). Development and prevention of American Foulbrood disease. *J. Invertebr. Pathol.* 1996, 67, 65-71.
- Ratnieks F. L. W.: American foulbrood: the spread and control of an important disease of the honey bee. *Bee World* 1992, 73, 177-191.
- Rendall G. F.: The threat to the European Honeybee (*Apis mellifera*) and the importance of a sound veterinary approach. *Vet. J.* 2000, 160, 6-9.
- Reynaldi F. J., Albo G. N., Alippi A. M.: Effectiveness of timicosin against *Paenibacillus larvae*, the causal agent of American Foulbrood disease of honeybees. *Vet. Microbiol.* 2008, 132, 119-128.

Adres autora: dr Krzysztof Buczek, ul. Głęboka 30, 20-612 Lublin;
e-mail: kabaczek@o2.pl