

# Charakterystyka biochemiczna, patogenność i genotypowanie *Paenibacillus larvae*, patogenu pszczoły miodnej

KRZYSZTOF BUCZEK

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

Buczek K.

## Biochemical properties, pathogenicity and genotyping of *Paenibacillus larvae*, a pathogen of the honey bee, *Apis mellifera* L.

### Summary

A characteristic of *Paenibacillus larvae* with a special reference to the current view on the systematics of this pathogen of the honey bee (*Apis mellifera* L.) was presented. A great differentiation of the phenotypic and biochemical properties of the isolates often lead to errors in the diagnostics of AFB. The currently used methods of controlling AFB not only cannot eliminate the pathogen from AFB-affected colonies, but actually promote the selection of strains of higher pathogenicity to the honey bee larvae. The behavior of worker bees that quickly remove dead larvae from the sick colony may mask the symptoms of AFB. The genotyping of *P. larvae* should introduce PCR as a precise method for the diagnostics of AFB as soon as possible.

**Keywords:** *Paenibacillus larvae*, pathogen characteristic, American foulbrood (AFB)

Spośród wielu przedstawicieli rodziny *Paenibacillaceae*, rodzaj *Paenibacillus* jest reprezentowany przez bogaty zbiór rozmaitych gatunków *Paenibacillus sp.*, których identyfikacja i klasyfikacja występujących w przyrodzie szczepów nie została jeszcze zakończona (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Ostatnio wyosobniono z wody, gleby i ryzosfery liczne nowe gatunki zaliczone do rodzaju *Paenibacillus* (20, 28, 38, 42). Występują one w wielu produktach spożywczych, a także w kale krów i ściekach komunalnych (1, 9, 36, 41). Drobnoustroje z rodzaju *Paenibacillus sp.* ze względu na różnorodność produkowanych enzymów, zdolność wiązania azotu, działanie antagonistyczne w stosunku do fitopatogennych bakterii są znaczącym składnikiem środowiska przyrodniczego (1, 32, 35, 43).

W obrębie rodziny *Paenibacillus* utworzono w 1993 r. nowy gatunek *P. larvae* (6), z dwoma podgatunkami *P. larvae* subsp. *larvae* oraz *P. larvae* subsp. *pulvifaciens* (26), obejmującymi bezwzględnie patogeny czerwia pszczoły miodnej – *Apis mellifera* L. i innych gatunków rodzaju *Apis*, zaliczanymi wcześniej do odrębnych gatunków, a mianowicie *Bacillus larvae* i *Bacillus pulvifaciens*.

### Charakterystyka biochemiczna

Właściwości fenotypowe szczepów obu podgatunków *P. larvae* różnią się jedynie w 4 na 21 oznacza-

nych wskaźników biochemicznych, takich jak: wykrzystanie tiaminy, hydroliza eskuliny, rozkład mannitolu i salicyny.

W 2006 r. Genersch i wsp. (22) zaproponowali reklasyfikację gatunku *P. larvae* prowadzącą do wyeliminowania podziału na podgatunki, ponieważ nie wykazali istotnych różnic pomiędzy nimi, w oparciu o analizę rozkładu niektórych substratów oraz porównanie profili elektroforetycznych białek komórkowych. Wprawdzie obserwowane różnice fenotypowe pozwalają na identyfikację szczepów, jednak ich zakres jest niewystarczający na wydzielenie podgatunków. Natomiast pierwszorzędowa struktura DNA pozwala na wyodrębnienie 4 genotypów ERIC I-ERIC IV w obrębie dawnych podgatunków (7, 21, 22, 29).

Pod względem morfologicznym *P. larvae* jest Gram-dodatnią cylindryczną, prostą, niekiedy lekko zakrzywioną o zaokrąglonych końcach laseczką, o wymiarach:  $0,5 \times 1,5-6,0 \mu\text{m}$ . W obrazie mikroskopowym zarazek występuje w postaci pojedynczych komórek, łańcuszków, nici, a niektóre szczepy posiadają rzęski. Zarazek tworzy owalne endospory o wielkości  $0,5 \times 1,2 \mu\text{m}$ , ułożone centralnie lub subterminalnie, deformujące lub nie deformujące komórkę. Często w sporangium brak endospory, niektóre szczepy w warunkach *in vitro* zarodnikują słabo, a dodatek do podłoża siarczanu manganu wzmacnia sporulację (26).

*P. larvae* należy do bakterii względnie beztlenowych. Izolowany bezpośrednio z materiału rośnie lepiej w atmosferze 5-10% CO<sub>2</sub>, w zakresie temperatur 20-40°C (optimum 35-37°C). Szczepy laboratoryjne rosną dobrze w warunkach tlenowych. Zarazek wymaga podłoża wzbogaconych dodatkiem 5% krwi konia lub owcy (Columbia blood agar, Blood agar base, J-medium). Opracowane przez Schuch i wsp. (37) podłoże PLA (*Paenibacillus larvae* agar – PLA) pozwala na izolację *P. larvae* bezpośrednio z badanego materiału bez potrzeby inkubacji w atmosferze CO<sub>2</sub>. Dodatek do podłoża antybiotyków syntetycznych, takich jak kwas naldyksowy lub kwas pipemidowy, hamuje wzrost saprofitycznych bakterii obecnych zwykle w każdej rodzinie pszczołej (3, 14, 27, 27, 30, 37).

Na podłożu stałym z dodatkiem krwi widoczny wzrost w postaci kolonii następuje po 2-4 dniach inkubacji. Zarazki te tworzą małe kolonie około 1-3 mm średnicy, regularne, gładkie, błyszczące, konsystencji masłowej do śluzowej, bezbarwne, niekiedy przezroczyste, białawe lub szare (26).

Neundorf i wsp. (29), charakteryzując różne genotypy *P. larvae* na podstawie cech biochemicznych, opisali po raz pierwszy małe kolonie zabarwione jednolicie na kolor czerwono-brązowy, biały oraz kolonie większe z koncentrycznymi brązowymi i białymi pierścieniami, przy czym pierścień ułożony zewnętrznie był zawsze pomarańczowo-brązowy. Ten typ kolonii występował tylko u szczepów identyfikowanych jako genotyp AB. Autorzy dochodzą do wniosku, że różnicowanie kolonii pod względem zabarwienia można uznać za cechę charakterystyczną dla genetycznej podgrupy AB *P. larvae*. Zwracają także uwagę, że morfologia kolonii niektórych szczepów *P. larvae* odbiega od klasycznego opisu, potwierdzają to wyniki badań Genersch, Otten (23) oraz wcześniejsze badania Drobniková i wsp. (17), jak również Heyndrickx i wsp. (26).

Fenotypowe różnicowanie kolonii *P. larvae* ma duże znaczenie praktyczne we wstępnej identyfikacji zarazka, niemniej jednak pewne rozpoznanie wymaga wykonania badań biochemicznych i genetycznych (23, 30).

Rutynowe badania *P. larvae* wskazują, że zarazki te nie produkują katalazy, rozpuszczają żelatynę, hydrolizują kazeinę, nie hydrolizują skrobi, z reguły redukują azotany do azotynów. Charakterystyczną cechą morfologiczną tych bakterii jest tworzenie zdeformowanych komórek, w postaci spiralnie zwiniętych długich lasek (giant chip). Ich tworzenie można wykazać w hodowli prowadzonej w warunkach mikroaerofilnych, według procedury opracowanej przez Plagemann (33).

Wiarygodną identyfikację (wg wcześniejszej nomenklatury gatunku) *Bacillus larvae* w obrębie rodzaju *Bacillus* można uzyskać, stosując jeden z najprostszych i najczęściej używanych testów API 50 CHB. Brak rozkładu fruktozy i eskuliny, rozkładanie D-tagatoza są najbardziej charakterystycznymi cechami dla *B. larvae* w opisywanym teście (13, 16).

Profil biochemiczny *P. larvae* i *P. pulvificiens* pozwala na ich różnicowanie i odróżnienie od innych gatunków *Paenibacillus*. Heyndrickx i wsp. (26) oceniając wyniki analizy statystycznej, wykonane metodą niehierarchiczną (principal-coordinate) i hierarchiczną (analiza klastrów), wykazała wysoki – 95% i 94% podobieństwa w obrębie grup, pozwalając na ich odróżnienie od innych gatunków *Paenibacillus*.

De Graaf i wsp. (14), analizując wyniki doświadczeń dotyczących rozkładu substratów przez szczepy wzorcowe i terenowe w teście API, podkreślają, że najbardziej powtarzalne wyniki badań można uzyskać, stosując do testu gęste zawiesiny bakterii i odczyt po 48 godz. inkubacji. W tych warunkach wszystkie badane szczepy rozkładały N-acetylglukozamię, nie rozkładały 35 substratów, a w stosunku do pozostałych 13 reakcje były różnicowane. Wyniki uzyskanych badań nie pozwoliły na jednoznaczne różnicowanie podgatunków *P. larvae* subsp. *larvae* od *P. larvae* subsp. *pulvificiens* (14).

Neundorf i wsp. (29) dokonali charakterystyki fenotypowej 4 genotypów *P. larvae*, stosując test identyfikacji biochemicznej, zawierający aż 95 substratów (Biolog system), byli w stanie dokonać identyfikacji *P. larvae* w obrębie rodziny *Bacillus*. Uzyskane wyniki przedstawione metodą skupienia parami średnich połączeń (UPGMA) wskazują na bardzo bliskie podobieństwo genotypów Ab, ab, aβ i pewną odmienność genotypu AB od opracowanego standardu Biolog. Szczepy te tworzą jednak zwartą grupę i różnią się zdecydowanie od wielu gatunków rodzaju *Bacillus*. Tak więc system ten pozwala nie tylko na identyfikację *P. larvae*, lecz także na różnicowanie korespondujące z genotypami.

Skład estrów metylowych kwasów tłuszczowych komórek *P. larvae* i *P. pulvificiens* wskazuje na niewielkie różnicowanie i potwierdza ich przynależność do jednego gatunku (17, 26). Podobnie skład białek badanych szczepów określony metodą SDS-PAGE wykazuje wysoki, bo sięgający 90% stopień podobieństwa pomiędzy *P. larvae* i *P. pulvificiens*. Jednak różnicowane warunki hodowli, wynikające z różnych wymagań poszczególnych szczepów sprawiają, że wartość diagnostyczna tych badań ma ograniczone znaczenie (26).

Użyteczną metodą uzupełniającą w identyfikacji *P. larvae* jest typowanie szczepów przy pomocy bakteriofagów (2, 39). Jak wynika z badań Stahly i wsp. (39), szczególnie przydatny jest zjadliwy bakteriofag – mutant PPL1c. Prace De Graaf i wsp. (14) potwierdzają te obserwacje.

Badania mikrobiologiczne stosowane w identyfikacji bakterii z wykorzystaniem testów fenotypowych nie pozwalają na pewne rozróżnienie drobnoustrojów zaliczanych kiedyś do odrębnych gatunków.

### Patogenność

Wykazano, że endospory *P. larvae* indukują proces chorobowy wyłącznie u niezasklepionego czerwia pszczoły miodnej. Larwa jest wrażliwa na zakażenie

w krótkim (12 do 53 godzin) okresie rozwoju. Najbardziej wrażliwe na zakażenie są larwy w 12.-36. godzinie, średnia dawka  $ID_{50}$  dla larw w wieku 24-48 godzin wynosi tylko około 10 (średnio 8,49) endospor. Zakażenie następuje drogą pokarmową za pośrednictwem pszczoł karmicielek przynoszących zakażony endosporami pokarm lub za pośrednictwem endospor obecnych w komórce plastra. W zasklepionej, obumarłej larwie w końcowym okresie choroby powstaje około miliarda endospor, bardzo opornych na temperaturę, środki chemiczne, zachowujących zakaźność przez około 35 lat (11, 21, 25).

Genersch i wsp. (21) w doświadczeniu laboratoryjnym porównali zjadliwość dla czerwia trzech zidentyfikowanych genotypów *B. larvae* (ab, Ab, AB oraz szczep kontrolny ATCC 9545 – genotyp  $\alpha\beta$ ). Biorąc pod uwagę wielkość dawki  $LC_{50}$  i  $LT_{100}$  (Lethal Concentration i Lethal Time) wykazali zróżnicowaną zjadliwość poszczególnych genotypów. Najbardziej zjadliwy okazał się szczep 04-309 genotypu AB zabijający w dawce  $LC_{50} < 100$  CFU  $ml^{-1}$ , 100% czerwia w czasie 6-7 dni po zakażeniu, podczas gdy pozostałe szczepy genotypu AB zabijały larwy w ciągu 6-10 dni.

Wartość  $LT_{100}$  dla pozostałych genotypów była istotnie wyższa i wynosiła od 10 do 13 dni. Biorąc pod uwagę fizjologię rodziny pszczelej, spostrzeżenie to ma istotne znaczenie praktyczne. Zjadliwe szczepy *P. larvae* są groźniejsze dla pojedynczej larwy aniżeli dla rodziny, ponieważ larwy, które giną przed zasklepieniem komórki (około 94% w przypadku genotypu AB) są usuwane z plastra wraz z patogenem przez pszczoły robotnice. Tak więc wrodzone zachowanie młodych pszczoł polegające na utrzymaniu w rodzinie odpowiedniego poziomu higieny przez usuwanie z plastrów martwego czerwia chroni rodzinę przed jej całkowitym zniszczeniem. Natomiast w przypadku szczepów mniej zjadliwych ponad 20% zasklepionego martwego czerwia, wraz z powstałymi endosporami zarazka, nie jest usuwane z plastrów i stanowi stałe zagrożenie dla rodziny.

Obowiązujące w wielu krajach przepisy zwalczania zgnilca amerykańskiego (American Foulbrood – AFB), prowadzące do niszczenia zakażonych kolonii wykazujących objawy choroby, sprzyjają rozprzestrzenianiu się szczepów bardziej zjadliwych. Pomimo dużych ubytków czerwia niezasklepionego spowodowanych przez zjadliwe szczepy choroba często nie jest wykrywana. W tych rodzinach nosicielem zarazki są pszczoły robotnice, które podczas rójki przenoszą wystarczającą ilość zarazki do zakażenia nowych rodzin. W tych przypadkach droga pionowa przenoszenia patogenu w nowych rodzinach, obok drogi horyzontalnej, odgrywa coraz większą rolę (7, 15, 19, 21, 31).

### Genotypowanie *Paenibacillus*

Pomimo licznych osiągnięć w ostatnim dziesięcioleciu dotyczących charakterystyki molekularnej *P. larvae* i patogeny AFB wiele problemów nie zostało dostatecznie wyjaśnionych.

Opracowano i wdrożono do diagnostyki test PCR pozwalający na szybkie wykrycie zarazki. W tym celu opracowano startery na postawie genomowego 16S rRNA, najbardziej stałej cechy w ewolucyjnym rozwoju bakterii. Wykazano, że niewielkie różnice w sekwencji nukleotydów 16S rRNA w obrębie gatunku pozwalają na pewną identyfikację zarazki (8). Użyte w badaniach Gowan i wsp. (24) dwa startery z regionu 16S rRNA *P. larvae* wykazywały 100% homologii tylko w stosunku do *P. larvae*. Porównane do sekwencji nukleotydów pokrewnych gatunków rodzaju *Bacillus* oraz *P. alvei* i *P. polymyxa*, zarazków często występujących w ulu jako saprofity lub bakterie wklajające choroby, wykazały od 66% do 88% podobieństwa. Test PCR, wg tych autorów, spełnia wszelkie wymogi testu diagnostycznego do wykrywania zgnilca złośliwego. Podobne wyniki, wskazujące na możliwość uzyskania szybkiego rozpoznania AFB za pomocą identyfikacji metodą PCR genomowego 16S rRNA uzyskali Dobbelaere i wsp. (16). Badania wykonane na bakteriach występujących w rodzinie pszczelej, w tym 382 szczepach *P. larvae* pochodzących z różnych krajów i kontynentów, metodą ERIC-PCR, (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus), pozwalały na pewną identyfikację wszystkich szczepów *P. larvae*. Zastosowane startery, KAT 1 i KAT 2 ograniczające fragment o długości 970 nukleotydów, wykorzystano z powodzeniem także do identyfikacji zarazki bezpośrednio w organizmie larw oraz w miodzie (2).

Metody badań molekularnych zastosowano także do zróżnicowania szczepów w obrębie gatunku. Mając na uwadze występowanie, jak sądzono, dwu podgatunków *P. larvae* subsp., *larvae* i *P. larvae* subsp. *pulvificiens*, rozpoznanych metodami mikrobiologii klasycznej, podjęto próby porównania ich pierwszorzędowej struktury genotypowej. Analiza fragmentów restrykcyjnych amplifikowanego genu 16S rRNA pozwoliła na pewne różnicowanie bliskich gatunków rodzaju *Paenibacillus*, *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Virgibacillus* oraz wykazała 90% podobieństwo pomiędzy podgatunkami *P. larvae* (26). Nie wykryto także istotnych różnic wśród 32 szczepów podgatunku *P. larvae* subsp. *larvae* pochodzących z różnych rejonów geograficznych (5).

Przy użyciu metody PCR wykazano, że wśród 99 szczepów *P. larvae* pochodzących z różnych rejonów geograficznych występuje 18 odmian polimorficznych. Porównując wyniki badań fenotypowych i genotypowych izolowanych szczepów, stwierdzono brak korelacji pomiędzy tymi cechami. Nie można było jednoznacznie przyporządkować jednego fenotypu do określonego genotypu. Tym niemniej metoda PCR pozwala na identyfikację szczepów *P. larvae* występujących w środowisku (4).

Okazało się, że określone genotypy cechują się różnym stopniem zjadliwości dla czerwia (21).

Wielu autorów (7, 18, 23, 29) zwraca uwagę na konieczność poznania molekularnych uwarunkowań patogenności *P. larvae*, roli plazmidów oraz toksyn, obec-

nych u niektórych szczepów, a także pojawiające się mechanizmy oporności na antybiotyki.

Aktualnie prowadzone badania nad dokładną charakterystyką genomu *P. larvae* oraz gromadzenie danych w banku genów (genbank [www.hgsc.bcm.tmc.edu/projects/microbial](http://www.hgsc.bcm.tmc.edu/projects/microbial)) (34) ułatwią szerszą aplikację metod biologii molekularnej do opisu poszczególnych szczepów tych bakterii. Badania genetyczne bakterii zmierzają nie tylko do określenia gatunku, lecz także poprzez identyfikację tożsamości szczepów umożliwiają analizę epidemiologiczną oraz dróg rozprzestrzeniania się chorób, a także charakterystykę markerów zjadliwości szczepu (10, 12, 21, 40). Zastosowanie zgromadzonych danych w diagnostyce AFB przyczyni się do skuteczniejszego zwalczania tej choroby u pszczół.

### Piśmiennictwo

- Aguilera M., Monteoliva-Sanchez M., Suarez A., Guerra V., Lizama C., Ben-nasar A., Ramos-Cormenzana A.: *Paenibacillus jamilae* sp. nov., an exopolysaccharide-producing bacterium able to grow in olive-mill wastewater. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2001, 51, 1687-1692.
- Alippi A. M.: Detection of *Bacillus larvae* spores in Argentinian honeys by using a semi-selective medium. *Microbiologia* 1995, 11, 343-350.
- Alippi A. M., Aguilar M.: Characterization of isolates of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* from diverse geographical origin by the polymerase chain reaction and BOX primers. *J. Invert. Path.* 1998, 72, 21-27.
- Alippi A. M., López A. C., Aguilar O. M.: A PCR-based method that permits specific detection of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*, the cause of American Foulbrood of honey bees, at the subspecies level. *Letters Appl. Microbiol.* 2004, 39, 25-33.
- Alippi A. M., López A. C., Aguilar O. M.: Differentiation of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*, the cause of American Foulbrood of honeybees, by using PCR and restriction fragment analysis genes encoding 16S rRNA. *Applied Environment. Microbiol.* 2002, 68, 3655-3660.
- Ash C., Priest F. G., Collins M. D.: Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test. Proposal for the creation of a new genus *Paenibacillus*. *Antonie Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol.* 1993, 64, 253-260.
- Ashiralieva A., Genersch E.: Reclassification, genotypes and virulence of *Paenibacillus larvae*, the etiological agent of American foulbrood in honeybees – a review. *Apidologie* 2006, 37, 411-420.
- Avaniss-Aghjani K., Jones K., Chapman D., Brunk C.: A molecular technique for identification of bacteria using small subunit rRNA sequences. *BioTechniques* 1994, 17, 253-260.
- Berge O., Guinebretiere M. H., Achouak W., Normand P., Heulin T.: *Paenibacillus graminis* sp. nov. and *Paenibacillus odorifer* sp. nov., isolated from plant roots, soil and food. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2002, 52, 607-616.
- Bes M., Slim L. S., Becharina F., Meugnier H., Vandenesch F., Etienne J., Ferney J.: Population diversity of *Staphylococcus intermedius* isolates from various host species: Typing by 16S-23S intergenic ribosomal DNA spacer polymorphism analysis. *J. Clin. Microbiol.* 2002, 40, 2275-2277.
- Brodsgaard C. J., Ritter W., Hanse H.: Response of in vitro reared honey bee larvae to various doses of *Paenibacillus larvae* spores. *Apidologie* 1998, 29, 569-578.
- Carles-Nurit M. J., Christophe B., Broche S., Gouby A., Bouziges N., Ramuz M.: DNA polymorphism in methicillin-susceptible and methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 1992, 30, 2092-2096.
- Carpana E., Marocchi L., Gelmini L.: Evaluation of the API 50CHB system for the identification and biochemical characterization of *Bacillus larvae*. *Apidologie* 1995, 26, 11-16.
- De Graaf D. C., De Vos P., Heyndrickx M., Van Trappen S., Peiren N., Jacobs F. J.: Identification of *Paenibacillus larvae* to the subspecies level: An obstacle for AFB diagnosis. *J. Invert. Pathol.* 2006, 91, 115-123.
- Delaplane K. S.: American foulbrood. *Am. Bee J.* 1991, 131, 700-702.
- Dobbelaere W., de Graaf D. C., Peters J. E., Jacobs F. J.: Comparison of two commercial kits for the biochemical characterization of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* in the diagnosis of AFB. *J. Apic. Res.* 2001, 40, 37-40.
- Drobniková V., Richter V., Häusler J., Pytelová I.: Characterization of *Bacillus larvae* and related bacilli by chromatography of cell fatty acids. *J. Apic. Res.* 1994, 33, 69-74.
- Evans J. D.: Diverse origins of tetracycline resistance in the honey bee bacterial pathogen *Paenibacillus larvae*. *J. Invertebr. Pathol.* 2003, 83, 46-50.
- Fries I., Lindström A., Korpela S.: Vertical transmission of American foulbrood in honey bee (*Apis mellifera*). *Vet. Mikrobiol.* 2006, 114, 269-274.
- Garbeva P., van Overbeek L. S., van Vuurde J. W. L., van Elsas J. D.: Analysis of endophytic bacterial communities of potato by planting and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of 16S rDNA based PCR fragments. *Microb. Ecol.* 2001, 41, 369-383.
- Genersch E., Ashiralieva A., Fries I.: Strain- and genotype-specific differences in virulence of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*, a bacterial pathogen causing american foulbrood disease in honeybees. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005, 71, 7551-7555.
- Genersch E., Forsgren E., Pentikainen J., Ashiralieva A., Rauch S., Kliwinski J., Freis L.: Reclassification of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* as *Paenibacillus larvae* without subspecies differentiation. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2006, 56, 501-511.
- Genersch E., Otten C.: The use of repetitive element PCR fingerprinting (rep-PCR) for genetic subtyping of German field isolates of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*. *Larvae. Apidologie* 2003, 34, 195-206.
- Gowan V. A., Allsopp M. H., Davison S.: A PCR detection method for rapid identification of *Paenibacillus larvae*. *Appl. and Envir. Microbiol.* 1999, 65, 2243-2245.
- Haseman L.: How long can spores of American foulbrood live? *Amer. Bee. J.* 1961, 101, 298-299.
- Heyndrickx M., Vandemeulebroecke K., Hoste B., Janssen P., Kersters K., De Vos P., Logan N. A., Ali N., Berkeley R. C.: Reclassification of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *pulvificiens* (Nakamura 1984) Ash et al. 1994, a later subjective synonym of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *larvae* (White 1906) Ash et al. 1994, as a subspecies of *P. larvae*, with emended descriptions of *P. larvae* as *P. larvae* subsp. *larvae* and *P. larvae* subsp. *pulvificiens*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1996, 46, 270-279.
- Hornitzky M. A. Z., Nicholas P. J.: J-medim is superior to sheep blood agar and brain heart infusion agar for the isolation of *Bacillus larvae* from honey samples. *J. Apic. Res.* 1993, 32, 51-52.
- Mansfeld-Giese K., Larsen J., Brødker L.: Bacterial populations associated with mycelium of arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2002, 41, 133-140.
- Neundorff S., Hedtke K., Tangen G., Genersch E.: Biochemical characterization of different genotypes of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*, a honey bee bacterial pathogen. *Microbiology* 2004, 150, 2381-2390.
- Ordström S., Forsgren E., Fries I.: Comparative diagnosis of american foulbrood using samples of adult honey bees and honey. *J. Api. Science* 2002, 2, 5-12.
- Peters M., Kilwinski J., Beringhoff A., Reckling D., Genersch E.: American foulbrood of the honey bee: Occurrence and distribution of different genotypes of *Paenibacillus larvae* in the administrative district of Arnsberg (North Rhine-Westphalia). *J. Vet. Med.* 2006, B53, 100-104.
- Piuri M., Sanchez-Rivas C., Ruzal S. M.: A novel antimicrobial activity of a *Paenibacillus polymyxa* strain isolated from regional fermented sausages. *Lett. Appl. Microbiol.* 1998, 27, 9-13.
- Plagemann O.: Eine einfache Kulturmethode zur bakteriologischen Identifizierung von *Bacillus larvae* mit Columbia-Blut-Schrägagar. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* 1985, 98, 61-62.
- Quin X., Evans J. D., Aronstein K. A., Murray K. D., Weistock G. M.: Genome sequences of honey bee pathogens *Paenibacillus larvae* and *Ascosphaera apis*. *Insect Mol. Biology* 2006, 15, 715-718.
- Reynaldi F. J., De Giusti M. R., Alippi A. M.: Inhibition of the growth of *Ascosphaera apis* by *Bacillus* and *Paenibacillus* strains isolated from honey. *Rev. Argent. Microbiol.* 2004, 36, 52-55.
- Scheldeman P., Goossens K., Rodriguez-Diaz M., Pil A., Goris J., Herman L., De Vos P., Logan N. A., Heyndrickx M.: *Paenibacillus lactis* sp. nov., isolated from raw and heat-treated milk. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2004, 54, 885-891.
- Schuch D. M. T., Madden R. H., Sattler A.: An improved method for the detection and presumptive identification of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* spores in honey. *J. Apic. Res.* 2001, 40, 59-64.
- Seldin L., Rosado A. S., Cruz D. W., Noberga A., van Elsas J. D., Paiza E.: Comparison of *Paenibacillus azotofixans* strain isolated from rhizosphere, rhizosphere and non-rhizosphere soil from maize/planted in two different Brazilian soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 1998, 64, 3860-3868.
- Stahly D. P., Alippi A. M., Bakhiat N., Campana C. F., Novak C. C., Cox R.: PPL1c, a virulent mutant bacteriophage useful for identification of *Paenibacillus larvae* subspecies *larvae*. *J. Invertebr. Pathol.* 1999, 74, 295-296.
- Tanner M. A., Everett Ch. L., Youvan D. C.: Molecular phylogenetic evidence for noninvasive zoonotic transmission of *Staphylococcus intermedius* from a canine pet to a human. *J. Clin. Microbiol.* 2000, 38, 1628-1631.
- Velazquez E., de Miguel T., Poza M., Rivas R., Rossello-Mora R., Villa T. G.: *Paenibacillus favisporus* sp. nov., a xylanolytic bacterium isolated from cow faeces. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2004, 54, 59-64.
- Von der Weid I., Duarte G. F., van Elsas J. D., Seldin L.: *Paenibacillus brasiliensis* sp. nov., a novel nitrogen-fixing species isolated from the maize rhizosphere in Brazil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2002, 52, 2147-2153.
- Walker R., Powell A. A., Seddon B.: *Bacillus* isolates from the spermosphere of peas and dwarf french beans with antifungal activity against *Botrytis cinerea* and *Pythium* species. *J. Appl. Microbiol.* 1998, 84, 791-801.