

Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society

Vol 52, No 4 (2001)



Culture and sporulation of *Paenibacillus* larvae (White) in not specific culture media

A. FYLAKTOU (Α. ΦΥΛΑΚΤΟΥ), B. LIAKOS (Β. ΛΙΑΚΟΣ), N. ILIADIS (Ν. ΗΛΙΑΔΗΣ)

doi: [10.12681/jhvms.15462](https://doi.org/10.12681/jhvms.15462)

Copyright © 2018, A FYLAKTOU, B LIAKOS, N ILIADIS



This work is licensed under a [Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

To cite this article:

FYLAKTOU (Α. ΦΥΛΑΚΤΟΥ) Α., LIAKOS (Β. ΛΙΑΚΟΣ) Β., & ILIADIS (Ν. ΗΛΙΑΔΗΣ) Ν. (2018). Culture and sporulation of *Paenibacillus* larvae (White) in not specific culture media. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 52(4), 303–307. <https://doi.org/10.12681/jhvms.15462>

Καλλιέργεια και σπορογονία του *Paenibacillus larvae larvae* σε μη ειδικά θρεπτικά υποστρώματα

Α. Φυλακτού¹, Β. Λιάκος², Ν. Ηλιάδης³

ΠΕΡΙΛΗΨΗ. Ερευνήθηκε η δυνατότητα καλλιέργειας και η ικανότητα σπορογονίας του *Paenibacillus larvae larvae* σε απλά και σύνθετα υποστρώματα σε αερόβιο και αναερόβιο περιβάλλον καθώς και σε ατμόσφαιρα CO₂ 5-10%. Διαπιστώθηκε ότι το *P. l. larvae* μπορεί να καλλιεργηθεί και σε κοινά υποστρώματα σε αερόβιες ή αναερόβιες συνθήκες. Η ανάπτυξη του όμως καθυστερεί σημαντικά και οι αποικίες του γίνονται ευκρινείς μετά από επώαση 48-72 ωρών. Αναπτύσσεται ταχύτερα, σπορογονεί περισσότερο και διακρίνεται ευκολότερα στα ειδικά υποστρώματα σε ατμόσφαιρα CO₂ 5-10%. Από τα υποστρώματα που ερευνήθηκαν διαπιστώθηκε ότι τα καταλληλότερα ήταν το Brucella agar, και το αιματούχο άγαρ. Το Brucella agar, το οποίο χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά στην καλλιέργεια του *P. l. larvae*, υπερτερεί του αιματούχου τόσο στην ανάπτυξη του βακίλου όσο και στη σπορογονία.

Λέξεις ευρετηρίασης: *Paenibacillus larvae larvae*, θρεπτικά υποστρώματα, καλλιέργεια, σπορογονία, απομόνωση.

ABSTRACT. Fylaktou A., Liakos B., Iliadis N. Culture and sporulation of *Paenibacillus larvae larvae* (White) in not specific culture media. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society* 2001, 52(4):303-307. **In this experimental**

study the culture possibility and the sporulation ability of *Paenibacillus larvae larvae* (White), in simple and compound not specific culture media, in aerobic and anaerobic conditions and in an atmosphere of 5-10% CO₂ in air, were investigated. The results indicated that *P. l. larvae* could be cultured in normal culture media, in aerobic or anaerobic conditions. However its growth is significantly delayed and only after 48-72 h incubation, its demonstration becomes evident. In specific culture media like blood agar and Brucella agar and atmosphere of 5-10% CO₂ in air, it can be developed faster, sporulated more and demonstrated easier. Development and sporulation of *P. l. larvae* was better in Brucella agar than in blood agar.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η αμερικανική σηψιγονία είναι το σημαντικότερο νόσημα των προνυμφών της μέλισσας (*Apis mellifera*). Οφείλεται στο σπορογόνο, μικροαερόφιλο βακτήριο *Paenibacillus larvae subsp. larvae*, (πρώην *Bacillus larvae* και *Paenibacillus larvae*)^{1,2}. Η ανάγκη απομόνωσης και ταυτοποίησης του αιτιολογικού παράγοντα της αμερικανικής σηψιγονίας γίνεται συνεχώς συχνότερη την τελευταία δεκαετία, τόσο για την επιβεβαίωση της κλινικής διάγνωσης του νοσήματος, όσο και της παρουσίας σπόρων του βακτηρίου στα προϊόντα του μελισσιού και στα υλικά της κυψέλης^{3,4,5,6}. Παρ' όλα αυτά, η απομόνωση του μικροοργανισμού εξακολουθεί να παρουσιάζει δυσκολίες στα μη ειδικά μικροβιολογικά εργαστήρια. Οι δυσκολίες αυτές αποδίδονται κυρίως στο ότι: α) είναι απαραίτητη ειδική θερμοκή ή φαρμακευτική επεξεργασία του προς εξέταση υλικού, β) στην αναγκαιότητα χρησιμοποίησης ειδικών θρεπτικών υποστρωμάτων και γ) στη λανθασμένη εντύπωση ότι για την απομόνωση του *P. l. larvae* είναι απαραίτητες ειδικές τεχνικές.

Βασική επιδίωξη αυτής της εργασίας ήταν η εξεύρεση απλών υποστρωμάτων και τεχνικών, ευνοϊκών για την καλλιέργεια και τη σπορογονία του *P. l. larvae*, ώστε να είναι δυνατή η απομόνωσή του και από μη ειδικά μικροβιολογικά εργαστήρια.

¹ Κτηνιατρικές Υπηρεσίες Κύπρου

² Εργαστήριο Μελισσοκομίας-Μελισσοπαθολογίας, Τμήμα Κτηνιατρικής Α.Π.Θ.

³ Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Λοιμωδών νοσημάτων, Τμήμα Κτηνιατρικής Α.Π.Θ.

¹ Veterinary Services of Cyprus

² Laboratory of Apiculture and Bee Diseases

³ Laboratory of Microbiology and infectious diseases, Faculty of Veterinary Medicine, Aristotle University of Thessaloniki

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Στελέχη του *P.l. larvae*

Καλλιεργήθηκαν συνολικά δώδεκα στελέχη. Δύο στελέχη αναφοράς τα NRLL-B- 2605 και NRLL-B-2610 και δέκα προερχόμενα από μολυσμένες κηρήθρες ισάριθμων μελισσοκομείων, από την Κύπρο και την Ελλάδα.

2. Θρεπτικά υποστρώματα

A. Υπόστρωμα απομόνωσης

A1. Κοινός θρεπτικός ζωμός (nutrient broth)

Peptone	15 g
Beef extract	6 "
NaCl	5 "
H ₂ O (dist) Q.S.	1000 ml

Διάλυση των συστατικών στο νερό με θέρμανση. Ρύθμιση του pH στο 7.6 Διανομή σε σωλήνες 16x160 mm. Αποστείρωση στους 120 °C επί 15 min.

B. Υποστρώματα ανάπτυξης

B1. Υπόστρωμα Yeast Extract, Soluble Starch (YESS)⁷

Yeast extract	10 g
Soluble starch	10 "
Agar	15 "
H ₂ O (dist) Q.S.	1000 ml

Διάλυση των συστατικών στο νερό με προοδευτική θέρμανση και βρασμό επί 1-2 min. Ρύθμιση του pH στο 7. Αποστείρωση στους 120 °C επί 15 min. Διανομή σε γυάλινα τρυβλία Petri.

B.2. Ζωμός J broth⁸

Tryptone	5 g
Yeast Extract	5 "
K ₂ HPO ₄	3 "
H ₂ O (dist) Q.S.	1000 ml

Διάλυση των συστατικών στο νερό με προοδευτική θέρμανση και βρασμό επί 1-2 min. Ρύθμιση του pH στο 7. Διανομή ανά 8 ml σε σωλήνες 16x160 mm. Αποστείρωση στους 120 °C επί 15 min.

B.3. Υπόστρωμα J Agar⁸

Tryptone	5 g.
Yeast Extract	5 "
K ₂ HPO ₄	3 "
Agar	20 "

Διάλυση των συστατικών στο νερό με προοδευτική θέρμανση και βρασμό επί 1-2 min. Αποστείρωση στους 120 °C επί 15 min. Διανομή σε γυάλινα τρυβλία Petri.

B.4. Brain Heart Infusion broth

Για την παρασκευή του υποστρώματος χρησιμοποιήθηκε το αφυδατωμένο σκεύασμα του οίκου Pasteur, η α-

νασύσταση του οποίου έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες της παρασκευάστριας εταιρείας.

B.5. Αιματούχο άγαρο (Blood agar)

Για την παρασκευή του υποστρώματος αυτού χρησιμοποιήθηκε το Blood agar Base του οίκου BBL (Baltimore Biological Laboratories), η ανασύσταση του οποίου έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες της παρασκευάστριας εταιρείας. Αποστείρωση στους 120 °C επί 15 min. Προσθήκη 5% απινιδωμένου αίματος προβάτου. Διανομή σε γυάλινα τρυβλία Petri.

B.6. Υπόστρωμα Brucella agar.

Χρησιμοποιήθηκε το αφυδατωμένο σκεύασμα του οίκου B.B.L. η ανασύσταση του οποίου έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες της παρασκευάστριας εταιρείας. Αποστείρωση στους 120 °C επί 15 min. Διανομή σε γυάλινα τρυβλία Petri.

B.7. Υπόστρωμα Mueller Hinton agar.

Χρησιμοποιήθηκε το αφυδατωμένο σκεύασμα του οίκου Pasteur η ανασύσταση του οποίου έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες της παρασκευάστριας εταιρείας. Αποστείρωση στους 120 °C επί 15 min. Διανομή σε γυάλινα τρυβλία Petri.

3. Παθολογικό υλικό

Η λήψη του παθολογικού υλικού γινόταν:

α) Από προνύμφες που βρίσκονταν στο στάδιο ιστόλυσης (κολλώδης ελαστική μάζα), οι οποίες προέρχονταν από άθικτα σφραγισμένα κελιά και από κελιά με ρωγμές στα σφραγίσματα.

β) Από σηψιγονικά λέπια (προνύμφες αποξηραμένες) που βρίσκονταν σε άθικτα σφραγισμένα κελιά, σε κελιά με ρωγμές στα σφραγίσματα και σε αποσφραγισμένα κελιά.

Σπορά του προς εξέταση υλικού

Από τα άθικτα σφραγισμένα κελιά με προνύμφες σε κατάσταση ιστόλυσης, λαμβανόταν άσηπτα υλικό και σπερνόταν στην επιφάνεια στερεού θρεπτικού υποστρώματος.

Ιστολυμένες προνύμφες ή σηψιγονικά λέπια, που προέρχονταν από κελιά με ρωγμές στα σφραγίσματα ή από αποσφραγισμένα κελιά, ενοφθαλμίζονταν σε κοινό θρεπτικό ζωμό και επωάζονταν στους 37 °C επί 12 ώρες. Στη συνέχεια υποβάλλονταν σε θερμοκή επεξεργασία (τυνταλισμός) σύμφωνα με τη μέθοδο Rose (1969) και σπέρνονταν σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα.

Από κάθε στέλεχος ενοφθαλμίζονταν αρχικά δύο τρυβλία Petri με J agar. Το ένα επωαζόταν στους 37 °C και το άλλο στους 65 °C, μέχρι να αναπτυχθούν οι αποικίες του *P. l. larvae*. Η επώαση συνήθως διαρκούσε 48-72 ώρες. Από τις αποικίες γίνονταν επιχρίσματα που χρωματίζονταν κατά Gram. Ακολουθούσε η δοκιμή της καταλάσης και εξετάζονταν η υδρόλυση της καζεΐνης και της ζελατίνης. Η ταυτοποίηση του *P. l. larvae* βασιζόταν στους καλλιεργητικούς χαρακτήρες, στη μορφολογία του βακίλου

Πίνακας I. Μορφολογία, καλλιέργεια και βιοχημικές ιδιότητες του *P.l. larvae*.**Table I.** Morphology, arrangement, culture and biochemical properties of *P. l. larvae*

Μορφολογία Διάταξη	Καλλιέργεια	Δοκιμές
Βλαστικές μορφές Βακτηρίδια Gram θετικά σε αλυσίδες	Ατμόσφαιρα Αναερόβια, Μικροαερόφιλη Αερόβια	Κατάλαση - Υδρολύση Καζεΐνης + Ζελατίνης +
Σπόροι Ωοειδείς, παράμορφωτικοί κεντρικοί ή παραπολικοί	Ανάπτυξη Βραδεία	

και των σπόρων, καθώς και στις βιοχημικές του ιδιότητες σύμφωνα με τον πίνακα 1.

Όλα τα στελέχη που απομονώθηκαν, συντηρούνταν σε ζωμό BHI broth στους -20°C .

Οι καλλιέργειες σε στερεά υποστρώματα επωάζονταν στους 37°C για τέσσερις ημέρες, αερόβια, αναερόβια καθώς και σε ατμόσφαιρα CO_2 (Gas Pack) 5-10%.

Οι θρεπτικοί ζωμοί ενοφθαλμιζόνταν με μεγάλη ποσότητα αποικιών επειδή διαπιστώθηκε ότι για την ανάπτυξη του *P. l. larvae* απαιτείται σημαντική ποσότητα ενοφθαλμίσματος. Μετά την επώαση γίνονταν επιχρίσματα από το βακτηριακό εναιώρημα και χρωματίζονταν κατά Gram, για την παρατήρηση της μορφολογίας του βακίλου και τη διαπίστωση της καθαρότητας της καλλιέργειας.

Η πορεία της σπορογονίας ελεγχόταν καθημερινά με επιχρίσματα Gram χρώσεων, από αποικίες στερεών υποστρωμάτων και από καλλιέργειες του βακίλου σε θρεπτικό ζωμό. Ο προσδιορισμός του ποσοστού σπορογονίας και της αναλογίας των βλαστικών μορφών προς τους σπόρους του *P. l. larvae* γίνονταν σύμφωνα με τη μέθοδο των Azuma and Kitaoka (1965)⁹. Ο υπολογισμός του ποσοστού σπορογονίας σε κάθε επίχρισμα γινόταν με την αρίθμηση πέντε οπτικών πεδίων στο μικροσκόπιο.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τις πρώτες 24 ώρες της επώασης, η ανάπτυξη του *P. l. larvae* ήταν πολύ φτωχή σ' όλα τα θρεπτικά υποστρώματα. Παρ' όλα αυτά, στο αιματούχο και στο Brucella agar παρατηρήθηκε καλύτερη ανάπτυξη. Η παρουσία των αποικιών γινόταν αισθητή μετά από επώαση 24 ωρών, οι οποίες έφταναν στην πλήρη ανάπτυξή τους μετά από 48-72 ώρες. Ήταν στρογγυλές, λευκόφαιες ημιδιαφανείς, με ανοικτόχρωμη περιφέρεια και κοκκώδη επιφάνεια. Στο αιματούχο άγαρ, στο Brucella agar και στο J agar, η παρουσία των α-

ποικιών γινόταν ευκολότερα αντιληπτή, λόγω της αντίθεσης των χρωμάτων μεταξύ υποστρώματος και αποικιών.

Στο YESS και Mueller Hinton agar η ανάπτυξη ήταν πλούσια, οι αποικίες όμως διακρίνονταν δύσκολα, λόγω της ομοιότητας του χρωματισμού τους με αυτόν του υποστρώματος. Για να καταστεί δυνατή η παρατήρηση των αποικιών ήταν αναγκαία η χρήση πλαγίως προσπίπτοντος φωτός.

Η ανάπτυξη του *P. l. larvae* ήταν ικανοποιητική τόσο σε αερόβιο όσο και σε αναερόβιο περιβάλλον. Ήταν όμως πλουσιότερη σε ατμόσφαιρα CO_2 5-10%, όπου οι αποικίες ήταν πιο ευδιάκριτες και είχαν μεγαλύτερη διάμετρο.

Στους θρεπτικούς ζωμούς, η πρώτη έντονη ανάπτυξη εμφανιζόταν μετά από 20-30 ώρες επώασης, ενώ η δεύτερη γύρω στις 80-100 ώρες.

Η σταδιακή διαύγαση του ζωμού και ο σχηματισμός του γκριζόλευκου ιζήματος άρχιζε 48 ώρες μετά τη δεύτερη ανάπτυξη της καλλιέργειας (έντονη θόλωση του ζωμού) και συμπληρωνόταν σε 8 ημέρες.

Στα επιχρίσματα από καλλιέργειες του βακίλου σε θρεπτικό ζωμό 24ωρης επώασης, διαπιστώνονταν νηματοειδείς μορφές και αλυσίδες βλαστικών μορφών του *P. l. larvae*. Αντίθετα, στα επιχρίσματα από καλλιέργειες σε θρεπτικό ζωμό 50-70 ωρών επώασης, διαπιστώνονταν βραχείες αλυσίδες των 4-5 βακτηριακών κυττάρων. Σε επιχρίσματα από το στάδιο διαύγασης παρατηρούνταν ελάχιστες μεμονωμένες βλαστικές μορφές και πολυάριθμα υπολείμματα βακτηριακών κυττάρων, ενώ στο ιζήμα κυριαρχούσαν οι σπόροι.

Από τις πολυάριθμες μικροσκοπικές παρατηρήσεις επιχρισμάτων διαπιστώθηκε ότι η σπορογονία άρχιζε από την 39η ώρα. Με την πάροδο του χρόνου η παρουσία ελεύθερων σπόρων γινόταν εντονότερη και έφθανε στο μεγαλύτερο αριθμό την ένατη με δέκατη ημέρα, χρονική περίοδο που συμπίπτει με τη σπορογονία *in vivo*¹⁰.

Διαπιστώθηκε επίσης ότι οι βλαστικές μορφές, οι βάκιλοι σε κατάσταση σπορογονίας και οι ελεύθεροι σπόροι βρίσκονται σε διαφορετικές αναλογίες, οι οποίες επηρεάζονται από το είδος του υποστρώματος, την ηλικία της καλλιέργειας, το στέλεχος του *P. l. larvae* και τον αριθμό των ανακαλλιιεργειών, διότι παρατηρήθηκε ότι τα πέντε από τα δέκα στελέχη, μετά από επανειλημμένες ανακαλλιέργειες, παρουσίαζαν μειωμένη ανάπτυξη και αργό ρυθμό σπορογονίας, ακόμη και μετά επώαση 15 ημερών.

Από τα υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν, το Brucella agar και το αιματούχο άγαρ αποδείχθηκαν τα πιο κατάλληλα για την *in vitro* σπορογονία του *P.l. larvae*. Στα υποστρώματα αυτά το ποσοστό σπορογονίας κυμάνθηκε από 20-80%. Όπως φαίνεται στον πίνακα 2 το ποσοστό σπορογονίας όλων των στελεχών ήταν μεγαλύτερο στο Brucella agar. Ειδικότερα στα στελέχη No.1 και No.6 στα οποία ενώ στο αιματούχο άγαρ ήταν 20% και 28% αντίστοιχα, στο Brucella agar ανήλθε στο 40%.

Πίνακας II. Ποσοστό σπορογονίας στελεχών του *P. l. larvae* στο Αιματούχο και *Brucella* agar.**Table II.** Percentage of sporogonie of *P. l. larvae* strains on Blood and *Brucella* agar.

Υπόστρωμα	Αριθμός στελέχους											
	2605	2610	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Αιματούχο	60	70	20	49	84	50	66	28	59	51	60	70
άγαρ	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
<i>Brucella</i>	70	80	40	55	80	60	75	40	60	65	65	75
agar	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Για μεγάλο χρονικό διάστημα επικρατούσε η γνώμη ότι η καλλιέργεια του *P. l. larvae* είναι δύσκολη και ότι πρέπει να γίνεται σε εξειδικευμένα εργαστήρια. Σ' αυτό συνετέλεσε η αντίληψη ότι για την απομόνωσή του απαιτούνται ειδικά θρεπτικά υποστρώματα, εμπλουτισμένα με θειαμίνη και διάφορα άλλα αμινοξέα ή εμπλουτιστικές ουσίες καθώς και ειδικές τεχνικές^{11,12,13,14,15,16,17}.

Το πρώτο θετικό βήμα για την απλούστευση της καλλιέργειας και την απομόνωση του *P. l. larvae* ήταν η θερμοκή επεξεργασία του παθολογικού υλικού (τυνταλισμός)¹⁸, που διασφάλισε τις καλλιέργειες από τις επιμολύνσεις. Η καλλιέργεια σε αερόβιο περιβάλλον¹⁰ και η διαπίστωση ότι το αιματούχο άγαρ είναι άριστο υπόστρωμα για την ανάπτυξη του *P. l. larvae*¹⁹ στη συνέχεια, κατέστησαν την καλλιέργεια και την απομόνωσή του δυνατή στα περισσότερα μικροβιολογικά εργαστήρια. Παρ' όλα αυτά σε ορισμένα εργαστήρια^{20,21}, μέχρι και πρόσφατα, χρησιμοποιούνται για την καλλιέργεια του *P. l. larvae* ειδικά θρεπτικά υποστρώματα εμπλουτισμένα με θειαμίνη και διάφορα άλλα αμινοξέα.

Η βραδύτερη ανάπτυξη του *P. l. larvae* πέραν των 48 ωρών, έναντι των 12-16 ωρών άλλων σπορογόνων βακίλλων⁸, είναι πιθανότατα η αιτία που δημιούργησε την εντύπωση της ανάγκης χρησιμοποίησης ειδικών θρεπτικών υποστρωμάτων για την καλλιέργειά του. Η καλή αν και βραδεία ανάπτυξή του, σ' όλα τα χρησιμοποιηθέντα από εμάς υποστρώματα σε αναερόβιο αλλά και αερόβιο περιβάλλον, μαρτυρεί ότι η καλλιέργειά του είναι σχετικά εύκολη, αφού έχει την ικανότητα να αναπτύσσεται τόσο σε αερόβιες όσο και αναερόβιες συνθήκες και σε κοινά υποστρώματα.

Η ταχύτερη ανάπτυξή του στο αιματούχο και το *Brucella* agar, καθώς και η υψηλή σπορογονία στα υποστρώματα αυτά φανερώνει τις ιδιαίτερες διατροφικές του απαιτήσεις. Τα υποστρώματα αυτά ικανοποιώντας τις διατροφικές απαιτήσεις του βακίλλου ευνοούν στη συνέχεια τη σπορογονία του.

Επιπλέον η ανάπτυξη του *P. l. larvae* σε στερεά υποστρώματα επιτρέπει την καλύτερη εκτέλεση των δοκιμών της καταλάσης, υδρόλυσης της καζεΐνης και της ζελατίνης, που είναι απαραίτητες για την ταυτοποίησή του^{21,22}.

Ανακεφαλαιώνοντας τα αποτελέσματα της εργασίας αυτής συμπεραίνεται ότι για την απομόνωση και ταυτοποίηση του *P. l. larvae* δεν απαιτούνται ούτε πολυσύνθετα θρεπτικά υποστρώματα ούτε ιδιαίτερες τεχνικές.

Η δυνατότητα καλής και σχετικά ταχείας ανάπτυξής του βακίλλου, όχι μόνο σε αναερόβιες, αλλά και σε αερόβιες και μικροαερόφιλες συνθήκες, η εύκολη διάκριση των αποικιών και η ιδιαίτερα καλή σπορογονία του στο *Brucella* agar, το οποίο χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά από εμάς για την καλλιέργεια και απομόνωση του *P. l. larvae*, το καθιστούν υπόστρωμα επιλογής για το συγκεκριμένο βακτήριο.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. 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 of the creation of a new genus *Paenibacillus larvae*. Antonie Van Leeuwenhoek 1993,
2. Heyndrickh M, Vandemeulebroecke K, Hoste B, Janssen P, Kersters K, De Vois P, Logan N A, Ali N, Berkeley RCV. Reclassification of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *pulvifaciens* (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 amended description of *P. larvae* as *P. larvae* subsp. *larvae* and *P. larvae* subsp. *pulvifaciens*. International Journal of Systematic Bacteriology 1996, 46:270-279.
3. Hansen H. Methods for determining the presence of the foulbrood bacterium, *Bacillus larvae*, in honey. Dn J Plant Soil Sci 1984, 88:325-328
4. Hornitzky M A Z, Karlovskis S. A culture technique for the detection of *Bacillus larvae* in honeybees. J. Apic. Res. 1989, 28:118-120.
5. Hornitzky M A Z, Clark S. Culture of *Bacillus larvae* from bulk honey samples for the detection of American foulbrood. J Apic. Res. 1991, 30:13-16.
6. Goodwin R M, Perry J H, Haine H M. A study on the presence of *Bacillus larvae* spores carried by adult honey bees to identify colonies with clinical symptoms of American foulbrood disease. Journal of Apicultural Research 1996, 35:118-120.
7. Foster J W, Hardwick W A, Guirard B. Antisporulation factors in complex organic media. I Growth and sporulation studies on *B. larvae*. J. Bacteriol. 1950, 59: 463-470.

8. Gordon R E, Haynes W G, Pang C H N. The genus Bacillus. Agri Handbook No. 427, 1973. Agricultural Research Service, U.S. Dept. of Agriculture, Washington, D.C.
9. Azuma R, Kitaoka S. Cultivation and properties of B. larvae and decrease of its proteolytic activity on glucose media. Nat. Inst. of Animal Health Quart. 1965, 5: 138-145.
10. Gochnauer T A. Growth, protease formation and sporulation of B. larvae in aerated broth culture. J. Invertebr. Pathol. 1973, 22:251- 257.
11. White G F. American Foulbrood U.S.D.A. Bull. 801, 1920.
12. Tarr H L A. Studies on AFB of Bees II The germination of the endospores of B. larvae in media containing embryonic tissues. Ann. appl. biol. 1937, XXV (3):633-643.
13. Holst EC, Sturtevant P. Relation of proteolytic enzymes to phase of life cycle of B. larvae and two new culture media for this organism. J. Bacteriol 1940, 40:723-731.
14. Bailey L, Lee DC. Bacillus larvae its cultivation in vitro and its growth in vivo. J. Gen. Microbiol. 1962, 29:711-717.
15. Bailey L. Honey bee pathology. Academic press, London, 1981, p.
16. Bisping W, Amtsberg G. Colour Atlas for the Diagnosis of Bacterial Pathogens in Animals. Paul Parey Scientific Publishers, Berlin and Hanburg 1988, p 77.
17. Shimanuki H, Hartman P A, Rothenbuhler W C. In vitro growth studies of Bacillus larvae White. J. Invertebr. Pathol. 1965, 7:437-441.
18. Rose R I. Bacillus larvae isolation, culturing and vegetative thermal death point. J. Invertebr. Pathol. 1969, 14: 411-414.
19. Lloyd J M. Simplified laboratory diagnosis of AFB disease. J. Apic. Res. 1986, 25(1): 55-57.
20. Caprana 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.
21. Goodwin R M, Perry J H, Haine H M. A study on the presence of Bacillus larvae spores carried by adult honey bees to identify colonies with clinical symptoms of American foulbrood disease. Journal of apicultural Research 1996, 35:118-120.
22. Drobnicova V, Richter V, Hausler J, Pytelova I. Characterization of Bacillus larvae and related bacilli by chromatography of cell fatty acids. Journal of Apicultural Research 1994, 33:69-74.