

ФУНГЦИДНА ДІЯ ЦИКЛІЧНИХ ПЕРОКСИДІВ НА РІСТ ЕНТОМОПАТОГЕННОГО ГРИБА *ASCOSPHERA APIS*

Кісиль Дмитро Олександрович

доктор філософії, викладач

Сумський національний аграрний університет, м. Суми, Україна

ORCID: 0000-0003-3088-951X

dima_kisill@meta.ua

За останні роки кількість комах-запилювачів у світі значно скоротилася. Можливою причиною цього є токсична дія агрохімікатів, що знижує імунітет комах, що призводить до їх підвищеної чутливості до патогенів. *Ascospheera apis* – небезпечний ентомопатогенний гриб, що вражає як медоносних, так і джмелів. *Ascospheera apis* викликає хворобу названого в народі як «крейдовий розплід» у бджіл і загрожує бджільництву в усьому світі.

Усі ідентифіковані види грибів, що належать до роду *Ascospheera* (*Ascomycota: Plectomycetes, Ascospheerales*), були виявлені при ураженні бджіл. Гриб *Ascospheera apis* (*Maassen ex Claussen*) є етіологічним збудником інвазійного мікозу медоносних бджіл під назвою крейдовий розплід. Це гетероталічний організм, який утворює спори, коли міцелії двох різних штамів протилежної статі торкаються один одного і утворюються плодові тіла. Передача захворювання відбувається через ковтання спор із зараженої їжі молодими личинками бджіл. Після зараження личинки швидко скорочують споживання їжі, поки зовсім не перестануть їсти. Найбільш чутливі до хвороби личинки бджіл у п'ятиденному віці, оскільки вони мають сприятливі умови внутрішнього середовища кишечника для проростання спор. Потрапляючи в кишечник личинки, спори активуються CO_2 , отриманим із клітин. Потім вони можуть проростати в просвіт, утворюючи міцелій, який проколює кутикулу личинки. У цій фазі личинки виглядають як крихітні шматочки крейди або «мумії», що дає назву хворобі крейдового розпліду. У міру прогресування хвороби личинки муміфікуються, змінюючи колір від білого до темно-сірого або чорного через наявність спор на кутикулі личинки.

Ми досліджували фунгіцидну активність циклічних пероксидів на основі атамарного кисню проти *A. apis*, виділеного з медоносної бджоли (*A. mellifera*). Пероксиди демонстрували високе пригнічення росту міцелію *A. apis* до 92–100 % при концентрації 10 мл/л. Для найбільш активних пероксидів визначено значення EC_{50} (напівмаксимальна ефективна концентрація). Два дослідні пероксиди показали вищу протигрибкову активність проти *A. apis*, ніж комерційний фунгіцид перекис водню 30%. Досліджувані пероксиди не знижували здатність бджіл до польоту і не призводили їх до загибелі. Відкрито нову область застосування пероксидів у бджільницькій діяльності.

Ключеві слова: Пероксиди, ВетОкс-1000, Бровадез Плюс, SELMI, *A. mellifera*, *Ascospheera apis*, бджола.

DOI <https://doi.org/10.32782/bsnau.vet.2023.4.10>

Вступ. Запилення рослин комахами відіграє вирішальну роль у підтримці біорізноманіття. Є багато доказів нещодавнього зниження чисельності як диких, так і домашніх комах запилювачів. Зменшення чисельності джмелів і медоносних бджіл вже стало питанням продовольчої безпеки, оскільки запилення комахами є обов'язковим для отримання врожаю ентомофільних культур, які споживає людина. Однією з можливих причин цього є токсична дія агрохімікатів. Актуальним є пошук фунгіцидів, які могли б ефективно знищувати різноманітні грибові патогени, не завдаючи шкоди таким корисним комахам, як медоносна бджола та джмелі. Органічні пероксиди можуть бути цільовими кандидатами на цю роль (Aufauvre et al., 2012).

Пестициди, які не є інсектицидами (фунгіциди, гербіциди тощо), також можуть негативно впливати на комах. Значно менше уваги приділяється токсичному впливу цих сполук на фізіологічні показники медоносних бджіл, джмелів та інших корисних комах. Відзначено, що фунгіциди мають синергічний ефект, коли вони діють одночасно з неонікотинаїдами. Значна кореляція була виявлена між впливом фунгіцидів і токсичною смертністю бджолоїної сім'ї. У медоносних бджіл, які піддаються впливу фунгіцидів, синтез мітохондріального АТФ (Аде-

нозинтрифосфат) значно знижується. Використовуючи високоєфективне секвенування, було показано, що можливим механізмом негативного впливу фунгіцидів на бджіл є їхній вплив на патогенну мікрофлору збудників хвороб медоносних бджіл. Під дією фунгіцидів відбувається значна зміна кількісного та видового складу бактерій у кишечнику бджіл. Раніше було доведено, що фунгіциди були здатні пригнічувати мітохондріальну активність, яка впливала на функціональний стан м'язів комах під час польоту (Bailey et al., 2005).

Нещодавно було висловлено припущення, що синергічний ефект пестицидів і хвороб, які впливають на комах-запилювачів, сприяє різкому скороченню їх популяції. Пестициди знижують загальний імунітет комах, що призводить до їх підвищеної сприйнятливості до різного роду патогенів. Серед збудників найважливіших запилювачів виділяють грибові збудники, одним з яких є *Ascospheera apis* (*Maassen ex Claussen*) – збудник аскосферозу. Захворювання, викликане цим збудником, є заразним і згубним для медоносних бджіл. *A. apis* спричиняє втрати як популяції бджіл, так і їх продуктивності, що відповідно зменшує рентабельність бджолоїної сім'ї загалом. Личинки медоносних бджіл в основному заражаються цим збудником при попаданні всередину ста-

тевих спор *A. apis*. Після цього спори проростають у просвіті кишечника. Крім того, цей збудник був виявлений також і у джмелів. Попередньо передбачалось, що джмелі є лише переносниками цього збудника. Проте нещодавно було встановлено, що *A. apis* може викликати хворобу і у джмелів (Maxfield-Taylor et al., 2015).

Розробка фунгіцидів проти *A. apis*, ефективних і нетоксичних для запилювачів, людини та навколишнього середовища, є складним завданням. Беручи до уваги ці вимоги, пошук фунгіцидів проти *A. apis* базувався переважно на натуральних продуктах. Встановлено, що 4-гідроксидеррицин – один із фітохімічних компонентів рослини *Angelica keiskei* та ацетилшиконін, що міститься в коренях *Lithospermum erythrorhizon* – активний проти *A. apis* (6,25 та 12,5 мг/л). Пінобанксин-3-гексаноат, виділений з прополісу, продемонстрував IC_{50} (концентрація напівмаксимального інгібування) = 23 ± 2 мкм. Однак застосування природних сполук характеризується такими недоліками, як низька доступність і висока вартість. Розробка ефективних синтетичних фунгіцидів проти *A. apis* може вирішити ці проблеми (Yagmenko et al., 2012).

Матеріали і методи досліджень. Об'єктами дослідження були районовані дорослі бджоли породи «Українська степова», покоління F1, F2 (понад 3 доби після виходу з комірок), а також личинки бджіл (5-6-денного віку). Пероксиди досліджували ВетОкс-1000, та Бровадез Плюс від ТОВ «Бровафарма». Склад пероксиду ВетОкс-1000: натрію гіпохлорит – $1,2 \pm 0,1$ мг, та Бровадез Плюс: дидецилдиметиламонію хлорид – 50 мг, алкілдиметилбензиламонію хлорид – 100 мг. Як контрольний фунгіцидний засіб використовували 30 % Перекис водню, який широко використовувався в бджільницькій діяльності для весняної дезінфекції корпусних вуликів від мацерації в стінках дерев'яного корпусу патогенної мікрофлори.

На початку було визначена молекулярна ідентифікація мікроорганізмів у кишковому вмісті бджіл. Вміст кишечника личинок бджіл посівали на середовище Сабуро № 2 ГРМ, склад якого: панкреатичний гідролізат рибного борошна – 10 г/л; панкреатичний гідролізат казеїну – 10 г/л; дріжджовий екстракт – 2 г/л; NaH_2PO_4 – 2 г/л;

D-глюкоза – 40 г/л; агар мікробіологічний – 10 г/л; рН 6,0. Для придушення росту нецільової мікрофлори в середовище додавали 10 мл 1% розчину левоміцетину на 1 л середовища (рис.1).

Після чого виділяли ДНК методом ПЛР. ДНК із вирощених колоній на середовищі Сабуро виділяли за допомогою комерційного набору «Bioscore® ДНК-преп (Bioscore technology)» відповідно до рекомендаційних вказівок виробника. Полімеразну ланцюгову реакцію проводили за допомогою циклера ампліфікатора Eppendorf MasterCycler Personal. Кожна реакційна суміш для ПЛР у 0,25 мл пробірці містила 5 мкл 5X реакційного буфера, 1 мкл 5 мкМ прямого праймера, 1 мкл 5 мкМ зворотного праймера, 2 мкл матричної ДНК та деіонізовану воду (до 25 мкл). Режим ПЛР включав початкову денатурацію при 94 °C протягом 3 хв, 35 циклів денатурації при 94 °C протягом 30 с, відпал при 54 °C протягом 30 с, елонгацію при 72 °C протягом 45 с, кінцеву елонгацію при 72 °C протягом 10 хв. Були використані такі праймери: прямий ITS1, зворотний ITS4. Продукти ПЛР інтеркаляційним агентом, фарбником нуклеїнових кислот – бромістим етидієм і візуалізували при 312 нм транслюмінатором TCO-20LM після електрофорезу на 2% агарозному гелі. Продукти RCR екстрагували з гелю та очищали за допомогою комерційно доступного набору Cleanup Standard і секвенували за допомогою автоматичного секвенатора Applied Biosystems 3500 з використанням BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) та Праймери ITS1/ITS4.

Після чого проводили оцінку фунгіцидної активності пероксидів. Фунгіцидну активність перевіряли за загальноприйнятою методикою з *Ascosphaera apis*. Сполуки розчиняли в ацетоні, щоб отримати вихідний розчин 3 мг/мл. Потім аліквоти (точно виміряна кількість гомогенного матеріалу) вихідного розчину розбавляли ацетоном, отримуючи серію розчинів з концентрацією 0,03–3 мг/мл. Після цього аліквоти досліджуваної сполуки змішували з картопляно-сахарозним агаром при 50 °C до отримання концентрації сполуки 0,3–30 мкг/мл. Кінцева концентрація ацетону як у дослідних фунгіцид-вмісних, так і в контрольному зразку становила 10 мл/л. Чашки Петрі, що містять 15 мл агаризованого середовища, засі-

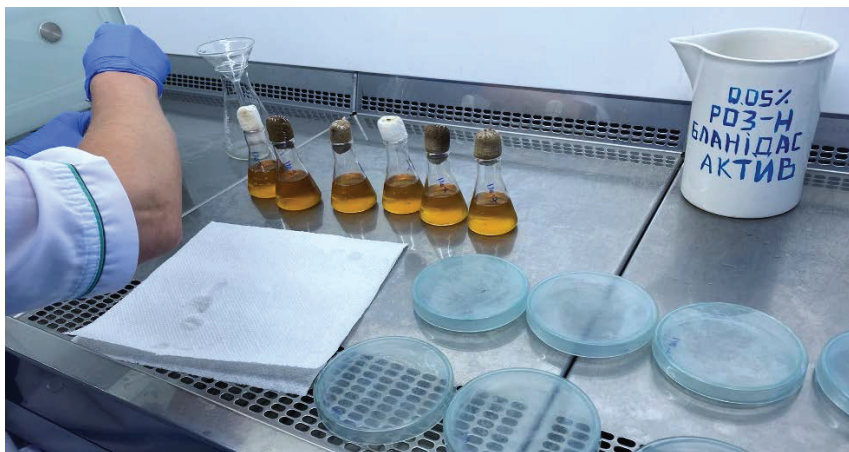


Рис. 1. Підготовка поживного середовища агар Сабуро №2

вали шляхом розміщення 2-мм дисків з міцеліального агару на поверхні агару. Петрі інкубували при 25 °С протягом 72 годин. Змішане середовище без зразка використовували як порожній контроль. Після інкубації вимірювали діаметр росту міцелію (мм) посівів грибів. Було проведено три повтори кожного тесту.

Рівень пригнічення росту міцелію (ПР) розраховували за такою формулою:

$$\text{Пр} = \frac{[\text{Кд} - \text{Дг}]}{\text{Кд}} \times 100\%$$

Де Кд – контрольний діаметр осідання (мм),

Дг – діаметр осідання грибів групи обробки (мм).

Комерційно доступний фунгіцид – 30% перекис водню використовували як позитивний контроль. EC_{50} значень розраховували за допомогою нелінійної регресії з використанням рівняння для сигмоїдальної кривої доза-відповідь зі змінним нахилом (програма забезпечення Excel, Word, Редмонде, штат Вашингтон, США).

Далі була проведена характеристика *Ascosphaera apis* за допомогою растрового електронного мікроскопу SELMI. Цільовий підхід був використаний для оптимізації аналітичних вимірювань. Перед вимірюваннями зразки наносили на 15-25-мм металеву пластинку дослідний зразок. Попередньо фіксували та центрифугували з 2,5% Глютар альдегід, буферним розчином (NaH_2PO_4) та спиртовими концентратами від 30% до абсолютного спирту (100%) який отримували методом випалюванням мідного купоросу який в свою чергу адсорбував H_2O і залишався 100% спирт. Покриття зразків тонкою плівкою (10 нм) срібла було виконано за допомогою методу магнетронного розпилення. Спостереження проводили за допомогою скануючого електронного мікроскопа SELMI PEM-106 I. Під час спостережень застосовувалося підсумовування сигналів (вторинні електрони (SE) + зворотно розсіяні електрони (BSE)).

Результати досліджень. Після проведення пошуку еукаріотичних патогенних мікроорганізмів у кишечнику комах, які засівали на середовищі Сабуро були виділені в окремі чашки Петрі колонії які виростили протягом 2 діб.

Далі екстраговану ДНК з вирощених колоній мікроорганізмів після секвенування специфіч-

ними праймерами для грибів. Послідовності було порівняно з тими, що вже є в базах даних NCBI GenBank (загальнодоступна база даних нуклеотидних послідовностей). В результаті в кишечнику бджіл виявлено наступні еукаріотичні мікроорганізми: *Lachancea thermotolerans* (99,8% ідентичності в NCBI GenBank), *Mucor racemosus* (99,8% ідентичності в GenBank), *Naganishia adeliensis* (99,2% ідентичності в GenBank), *Penicillium commune* (97,3% ідентичності в GenBank), *Rhodotorula mucilaginosa* (100,00% ідентичності в GenBank), *Ascosphaera apis* (99,3% ідентичності в GenBank) (рис. 2).

Найнебезпечнішим ідентифікованим мікроорганізмом для бджіл є *Ascosphaera apis*. Даний мікроорганізм виділили в окремі чашки Петрі.

Усі пероксиди: ВетОкс-1000 та Бровадез Плюс були відібрані та високо оцінені щодо інгібування радіального росту міцелію *Ascosphaera apis* на картопляно-сахарозному агарі. Перекис водню 30% відібраний як контрольний перексид. Вони широко використовуються у ветеринарії як фунгіцид, вірулоцид, бактерецид широкого спектра дії (табл. 1).

Перекис водню продемонстрував високий рівень пригнічення росту міцелію 92% *Ascosphaera apis* з урахуванням апроксимації. В той час як Бровадез Плюс та ВетОкс 1000 результат був дуже вражаючим. Інгібування росту гіфів міцелію *Ascosphaera apis* становило фактично 100%. Після чого ріст гіфів гриба аскосфеозу не відмічалось. Далі, для найбільш активних пероксидів та еталонних сполук визначили EC_{50} (при дослідженні агоністів) проти *Ascosphaera apis*. Результати показали що пероксиди дослідної групи були більш сильними, ніж в контрольній. Незважаючи на те, що IC_{50} (при дослідженні антагоністів) була низькою, Перекис водню не повністю інгібував ріст міцелію *A. apis*.

Крім того, була проведена SELMI характеристика контрольної культури міцелію *A. Apis*, до застосування перексиду та після 7 днів інкубації. Спостереження проводили при x 200 збільшенні (200 мкм). Зображення отримували в режимі уповільнення при посадковій напрузі

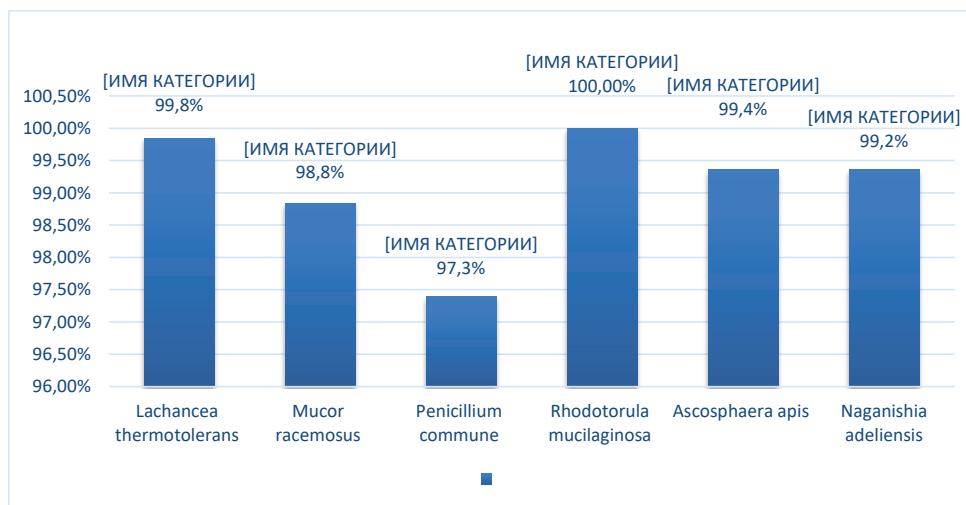


Рис. 2. Результати секвенування специфічними праймерами для грибів

20,00 kv. В контрольній культурі реєструвались кулясті спороцисти на гіфах міцелію *A. apis*, а в дослідній культурі із застосуванням пероксидів ВетОкс-1000 та Брова-

дес Плюс, фактично не реєструвались спороцисти міцелію. Згідно спостережень висновки показали, що дослідні препарати зупиняли ріст грибка. Зображено на рис. 3.

Таблиця 1

Результати інгібування росту гіфів міцелію

Дослідні засоби		Порода та покоління бджіл	% пригнічення росту міцелію
Контрольна група	Перекис водню 30%	Українська степова, F1	92%
Дослідна група	Бровадес Плюс	Українська степова, F2	100%
Дослідна група	ВетОкс 1000	Українська степова, F1	100%

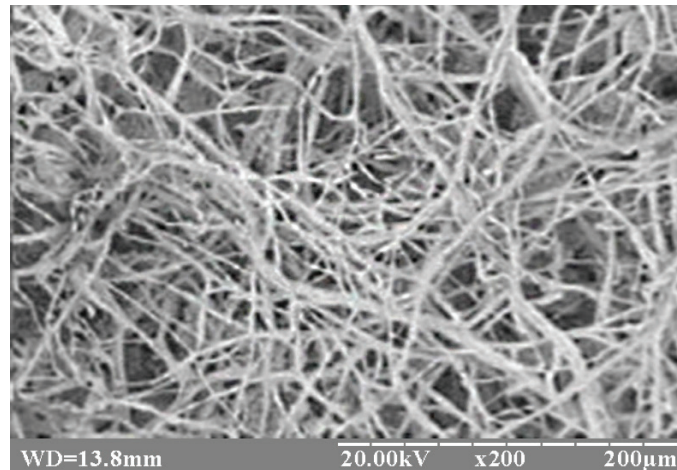


Рис. 3. Гіфи міцелію *A. apis* з відсутніми спороцистами

Обговорення. Встановлено, що синтетичні циклічні пероксиди мають фунгіцидну дію щодо патогенного для медоносних бджіл мікроорганізму *Ascosphaera apis*.

Виявлено, що циклічні синтетичні пероксиди ефективно пригнічують ріст збудника медоносних *A. apis*. Враховуючи недовговічні структури досліджуваних пероксидів, враховуючи їх специфіку розпаду за рахунок утворення атомарного кисню, вони не призведуть до забруднення навколишнього середовища і можуть бути використані для безпечної обробки комах.

Противіриковий механізм дії циклічних пероксидів, на відміну від H_2O_2 і гідропероксидів, ймовірно, не залежить від їх окисного потенціалу. У попередніх дослідженнях ми не спостерігали прямої кореляції між окисним потенціалом циклічного пероксиду та смертності комах. Було продемонстровано, що активність залежить від стереохімії у циклічних пероксидах. Протималарій-

ний ефект артемізиніну та споріднених пероксидів пов'язаний з гомолітичним розпадом з утворенням центрованих радикалів і їх подальшою трансформацією, дія яких визначає протималарійну активність. Подібний механізм противірикової дії пероксидів можна припустити і в нашому випадку.

Висновки. Таким чином, у даному дослідженні нами було чітко виявлено, що циклічні пероксиди виявили високу противірикову активність щодо ентомопатогенного гриба *Ascosphaera apis*. Кулясті спороцисти на міцелії *A. apis* під дією пероксидів практично були відсутні. Дослідні пероксиди ВетОкс-1000 та Бровадес Плюс були більш ефективними проти *A. apis*, ніж комерційний фунгіцид Перекис водню. Таким чином, циклічні пероксиди можна вважати ефективними засобами проти збудника медоносних бджіл – *A. apis*, які водночас безпечні для запилювачів.

Бібліографічні посилання:

1. Aufauvre, J., Biron, D. G., Vidau, C., Fontbonne, R., Roudel, M., Diogon, M., ... & Blot, N. (2012). Parasite-insecticide interactions: a case study of *Nosema ceranae* and fipronil synergy on honeybee. *Scientific reports*, 2(1), 1-7.
2. Bailey, L. (2005). Honey bee pathology. *Annual review of entomology*, 13(1), 191-212.
3. Belu, A., Schnitker, J., Bertazzo, S., Neumann, E., Mayer, D., Offenhäusser, A., & Santoro, F. (2016). Ultra-thin resin embedding method for scanning electron microscopy of individual cells on high and low aspect ratio 3D nanostructures. *Journal of microscopy*, 263(1), 78-86.
4. Boergens, K. M., & Denk, W. (2013). Controlling FIB-SBEM slice thickness by monitoring the transmitted ion beam. *Journal of microscopy*, 252(3), 258-262.
5. Bozzola, J. J., & Russell, L. D. (1999). *Electron microscopy: principles and techniques for biologists*. Jones & Bartlett Learning.

6. C Fisher, L., & AL Blackie, M. (2014). Tetraoxanes as antimalarials: Harnessing the endoperoxide. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 14(2), 123-135.
7. Cardona, A., Saalfeld, S., Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Preibisch, S., Longair, M., ... & Douglas, R. J. (2012). TrakEM2 software for neural circuit reconstruction. *PLoS one*, 7(6), e38011.
8. Dalmon, A., Peruzzi, M., Le Conte, Y., Alaux, C., & Pioz, M. (2019). Temperature-driven changes in viral loads in the honey bee *Apis mellifera*. *Journal of invertebrate pathology*, 160, 87-94.
9. DeGrandi-Hoffman, G., Corby-Harris, V., DeJong, E. W., Chambers, M., & Hidalgo, G. (2017). Honey bee gut microbial communities are robust to the fungicide Pristine® consumed in pollen. *Apidologie*, 48, 340-352.
10. Goggin, P., Ho, E. M. L., Gnaegi, H., Searle, S., Oreffo, R. O. C., & Schneider, P. (2020). Development of protocols for the first serial block-face scanning electron microscopy (SBF SEM) studies of bone tissue. *Bone*, 131, 115107.
11. Grassl, J., Holt, S., Cremen, N., Peso, M., Hahne, D., & Baer, B. (2018). Synergistic effects of pathogen and pesticide exposure on honey bee (*Apis mellifera*) survival and immunity. *Journal of Invertebrate Pathology*, 159, 78-86.
12. Hao, H. D., Wittlin, S., & Wu, Y. (2013). Potent Antimalarial 1, 2, 4-Trioxanes through Perhydrolysis of Epoxides. *Chemistry—A European Journal*, 19(23), 7605-7619.
13. Harwood, G. P., & Dolezal, A. G. (2020). Pesticide–virus interactions in honey bees: challenges and opportunities for understanding drivers of bee declines. *Viruses*, 12(5), 566.
14. Kakumanu, M. L., Reeves, A. M., Anderson, T. D., Rodrigues, R. R., & Williams, M. A. (2016). Honey bee gut microbiome is altered by in-hive pesticide exposures. *Frontiers in microbiology*, 7, 1255.
15. López, J. H., Krainer, S., Engert, A., Schuehly, W., Riessberger-Gallé, U., & Crailsheim, K. (2017). Sublethal pesticide doses negatively affect survival and the cellular responses in American foulbrood-infected honeybee larvae. *Scientific reports*, 7(1), 40853.
16. Luckner, M., & Wanner, G. (2018). From Light Microscopy to Analytical Scanning Electron Microscopy (SEM) and Focused Ion Beam (FIB)/SEM in Biology: Fixed Coordinates, Flat Embedding, Absolute References. *Microscopy and microanalysis: the official journal of Microscopy Society of America, Microbeam Analysis Society, Microscopical Society of Canada*, 24(5), 526–544.
17. Maxfield-Taylor, S. A., Mujic, A. B., & Rao, S. (2015). First detection of the larval chalkbrood disease pathogen *Ascosphaera apis* (Ascomycota: Eurotiomycetes: Ascosphaerales) in adult bumble bees. *PLoS one*, 10(4), e0124868.
18. McMenamin, A. J., Brutscher, L. M., Glenny, W., & Flenniken, M. L. (2016). Abiotic and biotic factors affecting the replication and pathogenicity of bee viruses. *Current Opinion in Insect Science*, 16, 14-21.
19. Pereira, K. D. S., Meeus, I., & Smaghe, G. (2019). Honey bee-collected pollen is a potential source of *Ascosphaera apis* infection in managed bumble bees. *Scientific Reports*, 9(1), 4241.
20. Pridal, P., Sedláček, L., & Marvanová, L. (1997). Microbiology of *Bombus terrestris* L. larvae (Hymenoptera: Apoidea) from laboratory rearing. *Acta univ agric et silvic Mendel Brun*, 8, 59-66.
21. Rhodes, C. J. (2018). Pollinator decline—an ecological calamity in the making? *Science progress*, 101(2), 121-160.
22. Sgolastra, F., Medrzycki, P., Bortolotti, L., Renzi, M. T., Tosi, S., Bogo, G., ... & Bosch, J. (2017). Synergistic mortality between a neonicotinoid insecticide and an ergosterol-biosynthesis-inhibiting fungicide in three bee species. *Pest Management Science*, 73(6), 1236-1243.
23. Spiltoir, C. F. (1955). Life cycle of *Ascosphaera apis* (*Pericystis apis*). *American Journal of Botany*, 501-508.
24. Steffan, S. A., Dharampal, P. S., Diaz-Garcia, L., Currie, C. R., Zalapa, J., & Hittinger, C. T. (2017). Empirical, metagenomic, and computational techniques illuminate the mechanisms by which fungicides compromise bee health. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (128), e54631.
25. Syromyatnikov, M. Y., Kokina, A. V., Lopatin, A. V., Starkov, A. A., & Popov, V. N. (2017). Evaluation of the toxicity of fungicides to flight muscle mitochondria of bumblebee (*Bombus terrestris* L.). *Pesticide biochemistry and physiology*, 135, 41-46.
26. W Jefford, C. (2012). Synthetic peroxides as potent antimalarials. News and views. *Current topics in medicinal chemistry*, 12(5), 373-399.
27. Xu, C. S., Hayworth, K. J., Lu, Z., Grob, P., Hassan, A. M., García-Cerdán, J. G., Niyogi, K. K., Nogales, E., Weinberg, R. J., & Hess, H. F. (2017). Enhanced FIB-SEM systems for large-volume 3D imaging. *eLife*, 6, e25916.
28. Yaremenko, I. A., Chernyshev, V., Dembitsky, V. M., & Nikishin, G. I. (2012). Selective Synthesis of Cyclic Peroxides from Triketones and H₂O₂. *Journal of organic chemistry*.
29. Zaghoul, O. A., Mourad, A. K., El Kady, M. B., Nemat, F. M., & Morsy, M. E. (2005). Assessment of losses in honey yield due to the chalkbrood disease, with reference to the determination of its economic injury levels in Egypt. *Communications in agricultural and applied biological sciences*, 70(4), 703-714.
30. Zhu, Y. C., Yao, J., Adamczyk, J., & Luttrell, R. (2017). Feeding toxicity and impact of imidacloprid formulation and mixtures with six representative pesticides at residue concentrations on honey bee physiology (*Apis mellifera*). *PLoS One*, 12(6), e0178421.

Kisil D. O., PhD, Sumy National Agrarian University, Sumy, Ukraine

Fungicidal effect of cyclic peroxides on the growth of the entomopathogenic fungus *ascosphaera apis*

*In recent years, the number of pollinating insects in the world has decreased significantly. A possible reason for this is the toxic effect of agrochemicals, which reduces the immunity of insects, which leads to their increased sensitivity to pathogens. *Ascosphaera apis* is a dangerous entomopathogenic fungus that affects both honeybees and bumblebees. *Ascosphaera apis* causes the disease popularly known as "chalk brood" in bees and threatens beekeeping all over the world.*

All the identified species of fungi belonging to the genus *Ascosphaera* (Ascomycota: Plectomycetes, Ascosphaerales) were found when bees were affected. The fungus *Ascosphaera apis* (Maassen ex Claussen) is the etiological agent of invasive mycosis of honey bees called chalk brood. It is a heterothallic organism that forms spores when the mycelia of two different strains of the opposite sex touch each other and fruiting bodies are formed. The disease is transmitted through ingestion of spores from contaminated food by young bee larvae. After infection, the larvae quickly reduce their food intake until they stop eating altogether. Five-day-old bee larvae are most susceptible to the disease, as they have favorable conditions in the internal environment of the intestine for spore germination. Once in the gut of the larva, the spores are activated by CO₂ obtained from the cells. They can then germinate into the lumen, forming a mycelium that pierces the cuticle of the larva. In this phase, the larvae look like tiny pieces of chalk or "mummies," which gives the chalk brood disease its name. As the disease progresses, the larvae mummify, changing color from white to dark gray or black due to the presence of spores on the larval cuticle.

We investigated the fungicidal activity of cyclic peroxides based on atamoxifen against *A. apis* isolated from the honey bee (*A. mellifera*). Peroxides showed a high inhibition of mycelial growth of *A. apis* up to 92–100% at a concentration of 10 mg/ml. For the most active peroxides, the EC 50 value (half-maximum effective concentration) is determined. Two experimental peroxides showed higher antifungal activity against *A. apis* than the commercial fungicide hydrogen peroxide 30%. The studied peroxides did not reduce the ability of bees to fly and did not lead to their death. A new field of application of peroxides in beekeeping has been opened.

Key words: Peroxides, VetOks-1000, Brovadez Plus, SELMI, *A. mellifera*, *Ascosphaera apis*, bee.