

Research Article



CrossMark

Open Access

농약 혼용에 따른 꿀벌유충 독성의 상승 및 상쇄 영향

백민경^{1*}, 임정택¹, 전경미¹, 박경훈¹, 최용수², 이명렬², 배철한³, 김진호³, 문병철¹

¹농촌진흥청 국립농업과학원 농산물안전성부 화학물질안전과, ²농촌진흥청 국립농업과학원 농업생물부 잠사양봉소재과, ³(주)한국삼공 농업연구소

Synergistic and Antagonistic Interactions for Pesticide mixtures to Honeybee Larvae Toxicity

Min Kyoung Paik^{1*}, Jeong Taek Im¹, Kyongmi Chon¹, Kyung-Hun Park¹, Yong-Soo Choi², Myeong-Lyeol Lee², Chul-Han Bae³, Jin-Ho Kim³ and Byeong Chul Moon¹ (¹Chemical Safety Division, Department of Agro-Food Safety and Crop Protection, National Institute of Agricultural Sciences, Rural Development Administration, Wanju 55365, Korea, ²Sericultural & Apicultural Materials Division, Department of Agricultural Biology, National Institute of Agricultural Sciences, Rural Development Administration, Wanju 55365, Korea, ³Agricultural Research Center, Hankooksamgong co., Ltd., Gimje 54338, Korea)

Received: 21 June 2016 / Revised: 2 October 2016 / Accepted: 25 October 2016

Copyright © 2016 The Korean Society of Environmental Agriculture

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ORCID

Min Kyoung Paik

<http://orcid.org/0000-0001-6002-6358>

Abstract

BACKGROUND: Recently, the widespread distribution of pesticides in the hive has been of concern about pesticide exposure on honeybee (*Apis mellifera* L.) health. Larval toxicity was adapted to assess the synergistic and antagonistic interaction of cumulative mortality to the honeybee larvae of the four most common pesticides detected in pollen.

METHODS AND RESULTS: Acetamiprid(3.0 µl/L), chlorothalonil (803.0 µl/L), coumaphos (128.0 µl/L), and tau-fluvalinate (123.0 µl/L) were tested in combination; binary, ternary and four component mixture. Larvae were exposed to four pesticides mixed in diet at the average levels detected in pollen. As a result, synthetic toxicity was observed in the binary mixture of acetamiprid with coumaphos. The binary and ternary component mixtures of tested pesticides have mostly demonstrated additive effect

in larval bees. The significant antagonistic effects were found in four pairings of mixtures including chlorothalonil added to acetamiprid/tau-fluvalinate or acetamiprid/coumaphos/tau-fluvalinate, and tau-fluvalinate added to acetamiprid/chlorothalonil or acetamiprid/coumaphos/chlorothalonil.

CONCLUSION: Interactions between combinations of four pesticides showed mostly additive or antagonistic effects in larval bees. Therefore, predicting the larval mortality of pesticides mixtures on the basis of the results of single pesticide may actually overestimate the risk. We suggest that pesticide mixture in pollen be evaluated by adding their toxicity together for complete data on interactions.

Key words: Antagonistic interaction, Honeybee larvae toxicity, Pesticide mixture, Synergistic interactions

서론

최근 neonicotinoid 농약 중 하나인 thiamethoxam 사용이 꿀벌(*Apis mellifera*) 집단을 붕괴시킬 수 있다는 예측(Henry *et al.*, 2012)과 함께 꿀벌의 치사 속도 계산에 문제

*Corresponding author: Min Kyoung Paik
Phone: +82-63-238-3253; Fax: +82-63-238-3238;
E-mail: mink1114@korea.kr

가 있었기 때문에 실제 꿀벌 집단을 붕괴시킬 정도는 아니라는 연구결과(Cresswell and Thompson, 2012)가 보고되는 등 농약 사용이 꿀벌에 미치는 영향에 대한 다수의 의견들이 제시되고 있다. 하지만 neonicotinoid 농약이 꿀벌에 무해하지는 않다는 것이 공통적인 의견으로, Cresswell and Thompson (2012)은 꿀벌과 neonicotinoid 농약의 연관성에 대한 증거가 불충분하기 때문에 해당 농약 사용에 대한 정책 변화에는 신중해야 한다고 주장하였다.

이와 맞물려 미국 환경청에서는 sulfoxaflor 농약에 대해서 벌과 다른 꽃가루 매개자에 유해하다는 우려 때문에 2015년 11월 판매 및 유통을 금지시켰으며, 우리나라에서도 sulfoxaflor 함유 농약에 대해 신규 및 변경 등록을 금지하고 기등록된 품목에 대해서 출하가 금지되었다. 또한, EU에서는 neonicotinoid 농약 3종(imidacloprid, clothianidine, thiacloprid)에 대해 꿀벌에 위해성이 있다는 이유로 최근 2년간 한시적으로 사용을 금지하고 있고, 우리나라에서도 현재 등록되어 사용되고 있는 44품목의 해당 농약에 대한 꿀벌의 안전성을 검토하고 있다.

꿀벌의 안전성을 확인하는 시험법으로 OECD는 유충단계의 안전성을 확인하는 꿀벌 유충 독성시험법(OECD, 2013)과 상위단계로서 semi-field 시험법(OECD, 2007) 등을 채택하고 있다. 우리나라는 접촉과 섭식을 통한 급성독성시험과 연상잔류독성시험이 있으며, 상위단계인 야외포장시험에 대해서는 그 규정이 명확하지 않은 상황으로(농촌진흥청 고시 제 2014-36호, 농약 및 원제의 등록기준), 꿀벌의 안전성을 확인하기 위한 과학적인 시험법 개발과 검증이 어느 때 보다 필요한 실정이다.

꿀벌과 꿀벌 유충은 벌통에 저장된 화분(pollen)과 화밀(nectar)을 섭취하는데, 특히 유충의 경우 유충먹이를 섭취하는 동시에 접촉이 이루어져 성충에 비해 먹이의 잔류물질에 대한 독성영향이 더 큰 것으로 보고되고 있다(Rortais et al., 2005; Zhu et al., 2014). 또한, 유충 단계의 영향은 시간이 흘러 전체 꿀벌 집단을 약화시킬 수 있다고 보고되고 있어 (Godfray et al., 2014), 유충단계의 안전성 시험은 전체 꿀벌 집단의 안전성을 예측하는 중요한 잣대가 될 수 있다.

선행연구에 따르면, 유럽과 아메리카, 아시아의 화분(pollen) 중에서 coumaphos (32.6%), tau-fluvalinate (32.2%), chlorothalonil (26.7%), acetamiprid (24.1%) 등의 성분이 다빈도로 검출되는 것으로 나타났다(Sanchez-Bayo and Goka, 2014). 이들 성분 중 coumaphos와 tau-fluvalinate는 꿀벌에 기생하는 응애를 방제하는 약제로서 우리나라에서 벌꿀에 각각 0.1 와 0.05 mg/kg으로 잔류허용기준이 설정되어 관리되고 있다(식품의약품안전처 고시 제2013-204호).

본 연구에서는 꿀벌 유충에 농약 2종(acetamiprid, chlorothalonil)과 응애방제제 2종(coumaphos, tau-fluvalinate)이 처리된 화분을 먹이로 단회 처리하되, 현실적인 노출조건을 감안하여 이들 성분을 2종, 3종, 4종으로 각각 혼합 처리하여 유충의 치사율을 확인하였으며, 이 혼합처리의 결과를

각각 단일 성분이 처리된 선행연구(in press)의 결과와 비교함으로써 성분의 혼용 급여로 인한 상승 및 상쇄 작용 등에 대해 살펴보았다.

재료 및 방법

유충 준비

실험에 사용된 꿀벌의 유충은 전라북도 국립농업과학원 농업생물부 참사양봉소재과 양봉장에 위치한 5개의 벌통에서 무작위 선별하여 사용하였다. 유충은 벌통 내 산란이 끝난 소비(comb)에서 1일령 유충을 선별하는 방법으로 진행하였다.

시약

시험에 사용된 농약 2종인 acetamiprid, chlorothalonil, 응애방제제 2종인 coumaphos, tau-fluvalinat, 그리고 양성대조물질인 dimethoate는 Dr. Ehrenstorfer(Augsburg, Germany)로 부터 구입하여 사용하였다. 습도 유지에 사용된 potassium sulfate와 sodium chloride는 각각 Junsei (Japan)와 Sigma-Aldrich (USA) 제품을 사용하였다.

유충먹이 준비

유충먹이에 사용된 로얄젤리는 허니테크(수원, 한국)에서 구입하여 사용하였으며, 유충먹이는 기본구성에 yeast extract (Bacto, Sparks, USA)와 dextrose (Difco, Sparks, USA), D-fructose (JUNSEI, Japan)를 혼합사용하였다. 유충먹이는 A, B, C의 총 3가지 타입으로 각각의 구성은 OECD의 꿀벌 유충 단회 독성시험법(OECD, 2013)에서 제안한 비율에 따랐다. 각각 시험 1일차와 시험 3일차에 각각 유충먹이 A와 B를 20 µl씩, 시험 4일차부터 6일차까지 매일 유충먹이 C를 30~50 µl 제공하였으며, 시험성분은 시험 4일차에 유충먹이 30 µl에 혼합하여 처리하였다.

시험성분 처리

시험성분의 처리농도는 선행연구결과(Sanchez-Bayo and Goka, 2014)에서 화분 중 다빈도로 검출된 2종 농약과 2종 응애방제제의 평균 검출량으로 acetamiprid 3.0 µl/L, chlorothalonil 803.0 µl/L, coumaphos 128.0 µl/L, tau-fluvalinate 123.0 µl/L 가 되게 유충먹이에 혼합하였다. 시험군은 성분 2종 혼합 처리군 (6군), 3종 혼합 처리군(4군), 4종 혼합 처리군(1군)으로 구성하였다. 각 군별 시험은 48 well plate 에 유충 12마리를 사용하여 3반복 시행하였다.

본 시험에서는 음성대조군으로 증류수를, 양성대조물질로 유충독성이 확인된 dimethoate 3.0 µg/larvae를 동일한 조건으로 처리하였다. 시험결과 유충단계(시험 7일차까지)에서 음성대조군의 누적치사율이 3%, 양성대조군의 누적치사율이 83%로 나타나 OECD에서 제시한 음성대조군 '15% 이하', 양성대조군 '50% 이상'의 조건을 충족하였기에 본 실험실에서 진행된 시험결과와 신뢰도가 높은 것으로 판단되어 본 시험을 진행하였다.

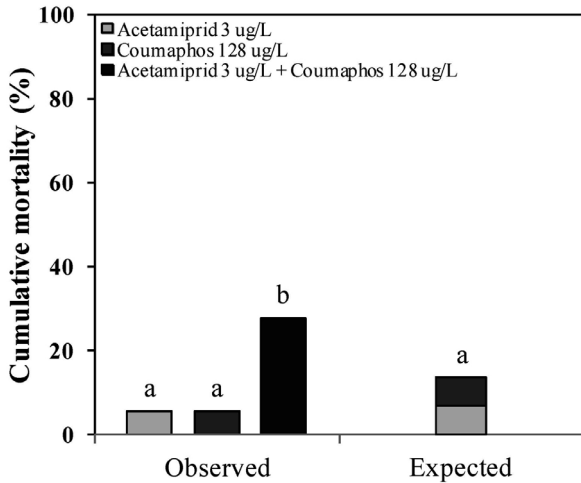


Fig. 1. Synergistic interaction for pesticide mixtures on larval and pupal cumulative mortality (%) through 12-d development.

Asterisks denotes significant difference among the observed groups and the expected group.

유충사육 및 치사율 확인

시험용 plate를 34~35°C로 유지되는 암조건의 배양기 내 밀폐형 desiccator cabinet (NALGENE, USA)에 넣어 온도를 유지하였다. 습도는 유충단계에서 potassium sulfate 포화용액을 이용하여 95%±5% RH로 유지하였으며, 용단계 (pupal stage)에서 sodium chloride 포화용액으로 80%±5% RH를 유지하였다.

시험 1일차에 grafting cell (NICOTPLAST Society, France)이 장착된 well plate에 유충먹이를 처리 한 후 그 위에 1일령 유충을 이충하였다. 시험기간 동안 유충의 일령에 맞게 유충먹이를 제공하였으며, 시험 4일차에 시험성분을 유충먹이에 처리하였다. 시험기간 중 치사개체 수의 확인은 시험 5일차부터 12일차인 유충단계와 용단계까지 확인하였다.

통계처리

자료에 대한 통계분석은 SPSS (Statistics 17.0 Professional Pack)을 사용하였다. 집단간 유의성 검증을 위해 일원배치 분산분석(One-way ANOVA)을 하였으며 사후검정을 위해 유의차 0.05 수준에서 Duncan's multiple range test를 시행하였다.

결과 및 고찰

상승작용(Synergistic Interactions)

2종 농약과 2종의 응애방제제가 각각 2가지, 3가지, 4가지로 혼합되어 유충먹이에 잔류하는 경우 꿀벌 유충의 치사율에 미치는 영향을 살펴 본 결과 상승작용은 Fig. 1과 같이, acetamiprid (3 µl/L)와 coumaphos (128 µl/L)을 혼합 처리한 군에서 나타났다. 실제 acetamiprid (3 µl/L)와 coumaphos (128 µl/L)이 단일물질로 처리된 유충먹이에

노출된 유충의 치사율은 각각 5.6%로 나타나 두 물질을 혼합 처리 한 경우에 예측되는 치사율은 11.2%였다. 그러나, 이 두 물질을 실제 유충먹이에 혼합하여 처리한 군의 치사율은 27.8%로, 각각 두 물질을 단일 처리한 군의 치사율보다 유의적으로 증가하였다($p < 0.05$). 따라서, acetamiprid (3 µl/L)와 coumaphos (128 µl/L)가 혼합 노출된 먹이에 노출된 꿀벌 유충은 각각의 단일성분에 노출된 유충에 비해 치사율에 미치는 독성영향이 상승하는 것을 알 수 있었다.

시험성분 2종(coumaphos 8 mg/L, chlorothalonil 34 mg/L)을 유충먹이에 혼합하여 6일 연속 처리한 선행연구 (Zhu *et al.*, 2014)에서 그 성분 혼합 처리시 각각 성분의 단일노출에 의한 치사율의 합보다 유의적으로 높게 나타났다. 이 선행연구는 coumaphos와 다른 성분과의 혼합노출에 대한 유충의 영향에 대해 보고된 유일한 연구로, 본 연구는 coumaphos에 단위 노출된 유충의 치사율이 6%였던 반면 선행연구는 coumaphos 농도가 본 연구에 비해 약 63배 높고 노출기간도 6일로 길었으며 유충의 사망률이 53.7%로 높았기에 coumaphos 농약이 다른 농약과 혼합 노출되었을 때 유충의 치사율에 미치는 영향에 대해 직접적인 비교는 어려울 것으로 생각된다. 또한, 유기인계 농약인 coumaphos나 pyrethroid계 농약인 tau-fluvalinate는 꿀벌 성체에 저농도 노출에 대한 연구에서 각각의 성분이 cytochrome P450 monooxygenase (P450s)와 carboxylesterase, glutathion S-transferases (GSTs)에 의해 무독화가 진행되지만 두 성분의 혼합 노출 시에는 독성작용이 증가하였는데, 이는 이들 성분이 무독화에 작용하는 P450s와 상호 경쟁적으로 결합작용을 하여 무독화를 저해하기 때문인 것으로 보고되었다 (Johnson *et al.*, 2006; 2009).

첨가효과(Additive Interactions)

시험성분이 2가지 이상 혼합되어 유충먹이에 잔류하는 경우 대부분의 처리군에서 꿀벌 유충의 치사율이 합해진 첨가효과를 보였다. Fig. 2의 (A)와 (B), (C)에 나타나 듯이, acetamiprid (3 µl/L)는 chlorothalonil (803 µl/L)이나 tau-fluvalinate (123 µl/L)에 첨가한 경우 실제 유충에 미치는 치사율이 예상된 치사율과 유의적인 차이가 없었으며 ($p < 0.05$), 이는 coumaphos (128 µl/L)를 tau-fluvalinate (123 µl/L)에 첨가한 경우에서도 비슷한 경향을 보였다.

선행연구에서 coumaphos와 tau-fluvalinate의 농도가 각각 8 mg/L와 3 mg/L로 본 연구에 비해 각각 63배와 25배 높은 수준으로 유충에 장기간 노출된 경우에도 두 농약의 혼합처리시 단일성분 처리시 유충의 치사율을 합한 값과 유의적인 차이가 없어 본 연구결과와 유사하였다(Zhu *et al.*, 2014). 따라서 coumaphos와 tau-fluvalinate는 두 성분의 혼합처리시 노출되는 농도나 노출기간에 상관없이 유충의 치사율에 농약간의 상호작용이 나타나지 않음을 알 수 있었다.

첨가효과는 시험성분을 3가지 혼합한 경우에서도 나타났는데, Fig. 2의 (D)와 (E)에서 나타나 듯이 acetamiprid (3 µl/L)와 coumaphos (128 µl/L)의 혼합물에 chlorothalonil (803 µl/L)을 추가한 군과, chlorothalonil (803 µl/L)과

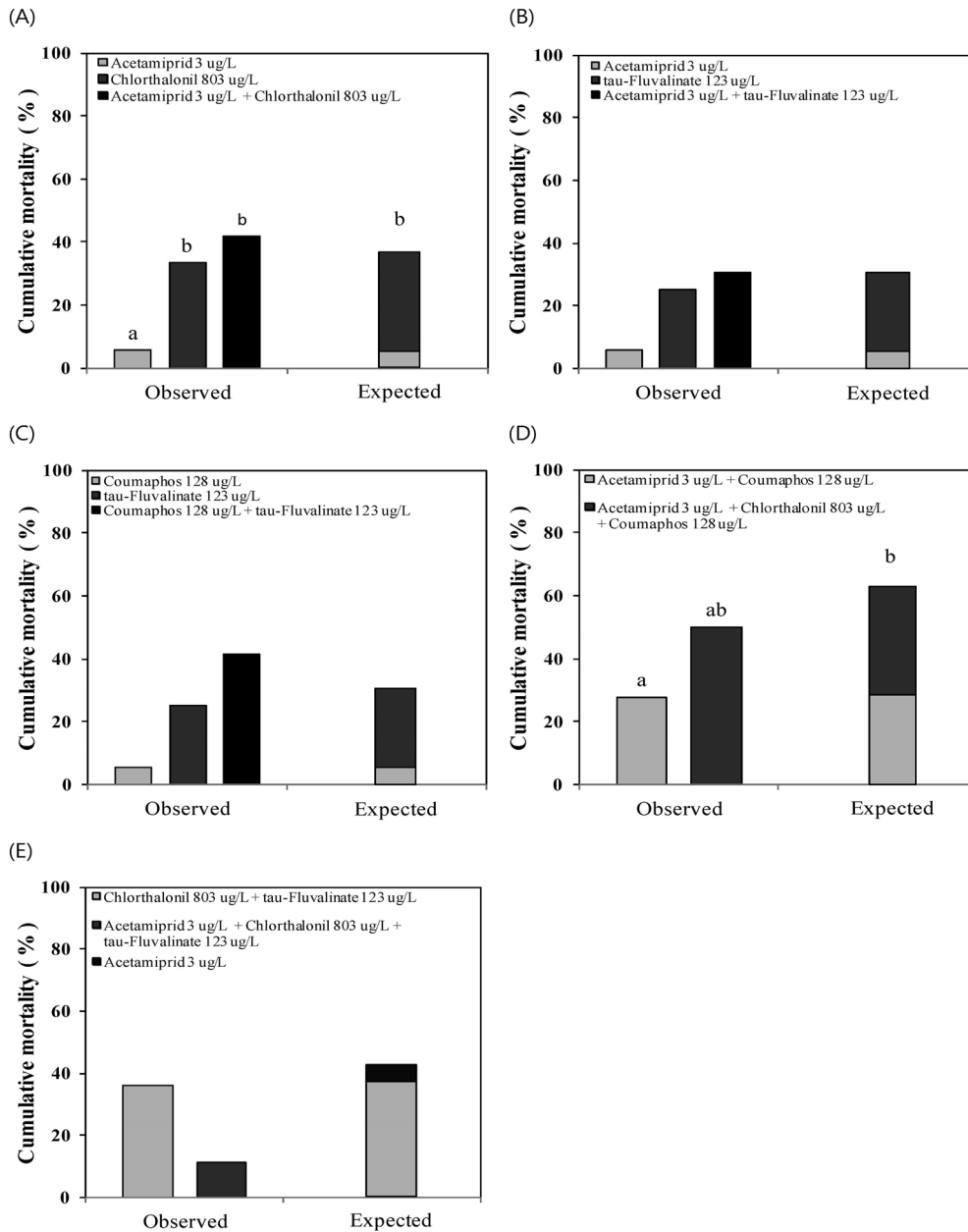


Fig. 2. Additive effects for five pairs of pesticide mixtures on larval and pupal cumulative mortality (%) through 12-d development. Asterisks denotes significant difference among the observed groups and the expected group.

tau-fluvalinate (123 μ l/L)이 혼합물에 acetamiprid (3 μ l/L)를 추가한 군의 실제 치사율이 각각 예상 치사율과 유사한 수준이었다.

이상과 같이 시험성분의 혼합노출 시 첨가작용을 보이는 것을 다음과 같은 영향인 것으로 생각된다. 첫째, 혼합 처리된 시험성분들 중 각각의 성분들의 작용기전(mode of action)이 독립적이기 때문이다(Johnson *et al.*, 2013). 꿀벌에 노출되었을 때 chlorothalonil은 multi-site contact 활성을, coumaphos와 tau-fluvalinte 는 각각 acetylcholinesterase 저해작용과 세포 내 sodium channel modulator로 작용하며,

acetamiprid는 꿀벌 머리의 nicotinic acetylcholine receptors 에 작용해서 signaling을 저해하는 등 다른 작용기전을 가지는 것으로 알려져 있다(Johnson *et al.*, 2013; Christen *et al.*, 2016).

둘째, 혼합된 시험성분 중 각각의 성분이 유사한 작용기전을 가지더라도, 꿀벌 유충에 나타나는 활성의 발현시기가 다르기 때문이다. 예를 들면, 혼합 노출되는 경우 독성영향이 상승하는 것으로 보고되고 있지만, 같은 작용기전이 같은 성분에 두개 이상 노출되었다라도 해당성분의 활성이 같은 시기에 발현되는 경우 성분간 상승작용을 보이지만 성분간 독

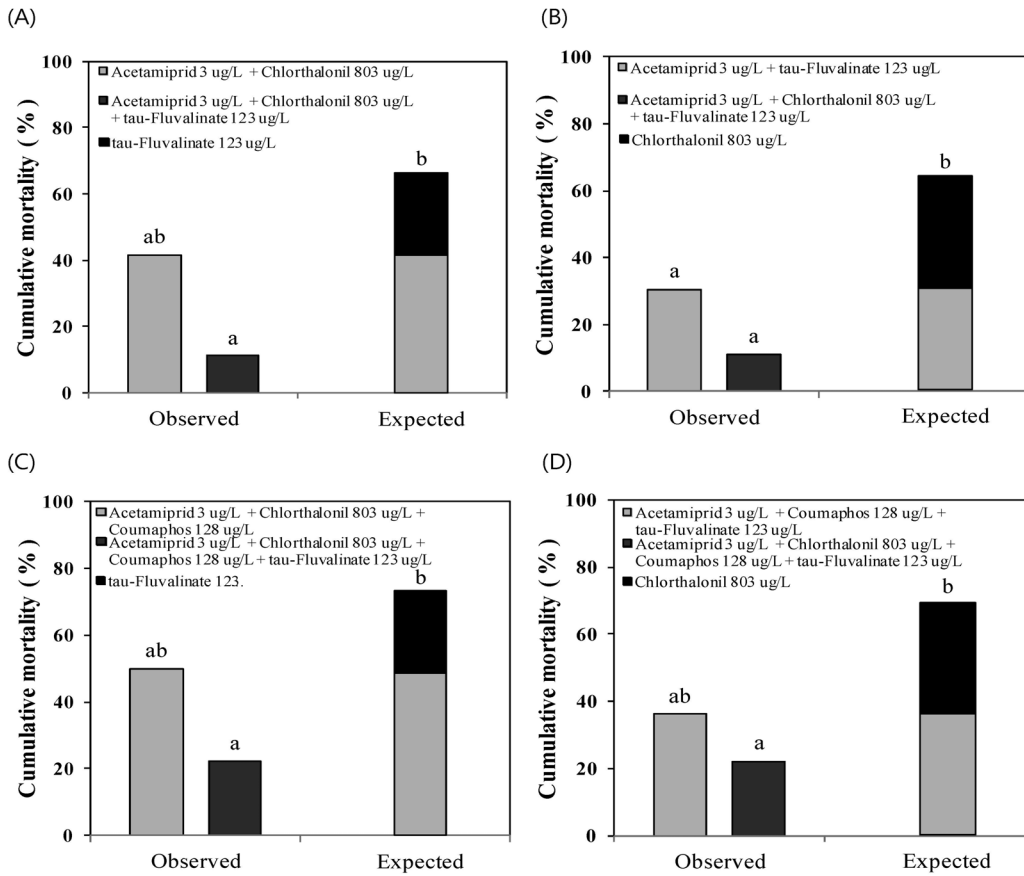


Fig. 3. Antagonistic interactions for four pairs of pesticide mixtures on larval and pupal cumulative mortality (%) through 12-d development. Asterisks denotes significant difference among the observed groups and the expected group.

성 발현 시기가 다른 경우 꿀벌에 미치는 영향이 상쇄되어 나타나다고 보고되고 있다(Zhu *et al.*, 2014; Johnson *et al.*, 2013). 예를 들어, 해당 성분에 노출되더라도 생체내 축적 (bioaccumulation)에 시간이 필요한 경우 꿀벌의 치사도 늦게 발생할 수 있으며, 특히 지용성 성분인 tau-fluvalinate나 coumaphos의 경우 더욱 그렇다고 보고되었다(Zhu *et al.*, 2014). 또한, neonicotinoid계 농약인 imidacloprid는 저농도로 꿀벌 성체에 노출되었을 때 노출 72시간이 지난 후에야 치사가 발생하였다(Suchail *et al.*, 2001).

상쇄작용(Antagonistic Interactions)

Fig. 3의 (A)와 (B)와 같이, tau-fluvalinate (123 μl/L)를 acetamidrid (3 μl/L)와 chlorothalonil (803 μl/L)의 2개 성분의 혼합물에 추가되었을 때 예상된 치사율보다 실제 유충에 미치는 치사율이 유의적으로 감소하였다($p < 0.05$). 또한, tau-fluvalinate (123 μl/L)는 acetamidrid (3 μl/L), chlorothalonil (803 μl/L) 및 coumaphos (128 μl/L)의 3개 성분의 혼합물에 추가되었을 때에도 유사한 경향을 보여, 예상된 치사율보다 실제 유충의 치사율이 유의적으로 감소하는 경향을 보였다($p < 0.05$).

Fig. 3의 (C)와 (D)와 같이, chlorothalonil (803 μl/L)

을 acetamidrid (3 μl/L)와 tau-fluvalinate (123 μl/L)의 2개 성분의 혼합물에 추가되었을 때 예상된 치사율보다 실제 유충에 미치는 치사율이 유의적으로 감소하였다($p < 0.05$). 또한, chlorothalonil (803 μl/L)이 acetamidrid (3 μl/L), tau-fluvalinate (123 μl/L) 및 coumaphos (128 μl/L)의 3개 성분의 혼합물에 추가되었을 때에도 유사한 경향을 보여, 예상된 치사율보다 유충의 치사율이 유의적으로 감소하는 경향을 보였다($p < 0.05$).

Suchail *et al.*(2001)의 연구에 따르면, imidacloprid가 저농도로 꿀벌 성체에 노출되었을 때 노출 72시간이 지난 후에야 치사가 발생하였지만, 고농도로 노출된 경우에는 즉각적인 치사가 발생하였다. 즉, 시험성분의 혼합노출 시 꿀벌 유충에 미치는 치사율은 노출되는 성분의 농도에 영향을 받는 것으로 생각된다. 농약의 독성 영향 뿐만 아니라 무독화 반응도 해당 독성 기관(target tissue)에 유효할 수 있는 농도수준에서 발현된다. 이는 무독화 작용이 급성이라도 유효성분(active substance)으로 꿀벌의 민감성(susceptibility)을 유도할 만큼 고농도로 노출될 때 발생함을 의미한다(Zhu *et al.*, 2014).

본 연구에서는 chlorothalonil과 tau-fluvalinate를 유충 먹이에 혼합처리한 경우 첨가효과를 보였지만, Zhu *et al.*

(2014)의 연구에서 chlorothalonil과 tau-fluvalinate를 꿀벌 유충먹이에 각각 34 ppm과 3 ppm으로 혼합하여 처리했을 때 유충의 치사율에 상승작용이 나타났으며 1/10 수준인 각각 3.4 ppm과 0.3 ppm으로 처리했을 때에는 상승작용이 나타났다. 이는 고농도의 pyrethroid농약이 단독 또는 혼합 처리되면 P450s와 같은 무독화 효소를 경쟁적으로 저해하기 때문에 상승작용이 나타나지만, 이보다 저농도로 노출되는 경우는 미생물적인 무독화과정 같은 다른 대체기전이 작용하기 때문으로 추측되었다. 즉 고농도와 저농도의 농약에서 독성증상이 다른 이상성 반응(biphasic response)이 나타났는데, 이는 노출되는 물질에 따라 작용하는 부위마다 민감도(sensitivity)가 매우 다르며 노출되는 농도에 따라 발현되는 무독화 경로가 다양하기 때문으로 생각된다.

시험 결과, 농약 및 응애방제제 성분이 유충먹이에 평균 수준으로 잔류되는 경우 acetamiprid와 coumaphos의 두 물질이 혼합된 경우를 제외하고는 모두 첨가효과 또는 상승효과가 나타났다. 따라서, 본 시험과 같이 유충먹이에 잔류되는 성분에 대한 치사율을 확인하는 시험을 단일물질로만 시험한 후 치사율을 합하여 예측하는 것은 유충의 독성영향을 과다하게 평가하는 방법이 될 수 있다. 따라서, 꿀벌 유충의 안전성을 확인하기 위한 유충독성시험은 반드시 단일 물질이 아닌 복합물질에 의한 독성시험이 함께 고려되어야 할 것이다.

또한 꿀벌 유충의 경우, 유충단계부터 태변(meconium)을 배설한 이후인 번데기 탈피(pupal molt) 기간 내내 모든 대사성 노폐물을 체내에 보유하고 있다. 따라서 유충의 체내 조직에 시험성분과 그 대사물질의 농도는 만성적으로 꿀벌 성체에 대한 해당 성분의 독성작용으로 발현될 수 있다(Zhu et al., 2014). 그러나, 농약 등이 꿀벌 성체 및 유충에 노출되었을 때 체내 대사 및 분포에 대한 연구가 매우 미진한 상황이다. 따라서, 꿀벌 및 꿀벌유충에 대한 시험성분의 노출 영향은 모화합물 뿐 아니라 그 대사체의 잔류량 연구, 다른 일령의 기간에 대한 연구들에 대한 추가 진행이 필요할 것으로 생각된다.

Acknowledgement

This work was supported by the Rural Development Administration, Republic of Korea (Project No. PJ01092204).

References

Christen, V., Mittner, F., & Fent, K. (2016). Molecular effects of neonicotinoids in honey bees (*Apis mellifera*). *Environmental Science & Technology*, 50(7), 4071-4081.

- Cresswell, J. E., & Thompson, H. M. (2012). Comment on "A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees". *Science*, 337(6101), 1453-1453.
- Godfray, H. C. J., Blacquière, T., Field, L. M., Hails, R. S., Petrokofsky, G., Potts, S. G., Raine, N. E., Vanbergen, A. J., & McLean, A. R. (2014). A restatement of the natural science evidence base concerning neonicotinoid insecticides and insect pollinators. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 281(1786), 558-566, doi:10.1098/rspb.2014.0558.
- Henry, M., Béguin, M., Requier, F., Rollin, O., Odoux, J. F., Aupinel, P., Aptel, J., Tchamitchian, S., & Decourtye, A. (2012) A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees. *Science*, 336(6079), 348-350.
- Johnson, R. M., Dahlgren, L., Siegfried, B. D., & Ellis, M. D. (2013) Acaricide, Fungicide and drug interactions in honey bees (*Apis mellifera*). *PLoS One*, 8(1), e54092.
- Johnson, R. M., Pollock, H. S., & Berenbaum, M. R. (2009). Synergistic interactions between in-hive miticides in *Apis mellifera*. *Journal of Economic Entomology*, 102(2), 474-479.
- Johnson, R. M., Wen, Z., Schuler, M. A., & Berenbaum, M. R. (2006). Mediation of pyrethroid insecticide toxicity to honey bees (Hymenoptera: Apidae) by cytochrome P450 monooxygenases. *Journal of Economic Entomology*, 99(4), 1046-1050.
- Rortais, A., Arnold, G., Halm, M. P., & Touffet-Briens, F. (2005). Modes of honeybees exposure to systemic insecticides: estimated amounts of contaminated pollen and nectar consumed by different categories of bees. *Apidologie*, 36(1), 71-83.
- Sanchez-Bayo, F., & Goka, K. (2014). Pesticide residues and bees—a risk assessment. *PLoS One*, 9(4), e94482.
- Suchail, S., Guez, D., & Belzunces, L. P. (2001). Discrepancy between acute and chronic toxicity induced by imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20(11), 2482-2486.
- Zhu, W., Schmehl, D. R., Mullin, C. A., & Frazier, J. L. (2014). Four common pesticides, their mixtures and a formulation solvent in the hive environment have high oral toxicity to honey bee larvae. *PloS one*, 9(1), e77547.