

Evaluation of the appropriateness of pesticide administration concentrations in long-term field experiments and modest proposal

長期野外実験における農薬投与濃度の妥当性評価と控えめな提案

山田敏郎（金沢大学名誉教授）

原文：<https://biorxiv.org/cgi/content/short/2023.08.25.554728v1>

ABSTRACT

養蜂場のミツバチコロニーに対する農薬の影響を調べるためには、実際の養蜂場に近いオープン環境での長期野外実験が有効です。オープン環境での長期野外実験では、様々な実験条件が不確実です。実験で投与された食物や農薬の摂取は、必ずしもミツバチのコロニーの総摂取量ではなく、自然からの摂取量もあると考えるのが自然です。そのため、長期の野外実験では、ミツバチのコロニーへの農薬の投与濃度を設定することは非常に難しい作業の一つです。

本論文では、日本中西部と米国マウイ島で実施された5回の長期野外実験のデータを用いて、以下のミツバチのコロニーに投与された農薬濃度の妥当性を検討した。ミツバチのコロニーまたは1匹のミツバチが摂取した食物(糖液、花粉ペースト)と農薬の平均総摂取量。1匹のミツバチが摂取する食物と農薬の1日平均摂取量。これらの新たに算出したデータから、ミツバチの1日平均摂取量 (P_{BD})とミツバチコロニーへの農薬投与濃度(C_P)の関係を明らかにし、 $P_{BD}/C_P \approx 0.01$ で表しました。

野外実験におけるミツバチ1匹の農薬の摂取時間がミツバチのLD50の測定時間と同等であると仮定すれば、平均農薬摂取量がLD50値よりも低いことがその関係から判明した。例えば、1匹のミツバチが2日間(48時間)に摂取した平均農薬摂取量は、LD50値(48時間)よりも低かった。この事実は、長期の野外実験における農薬の濃度が高すぎるという一部の研究者の批判が間違っていることを示しています。

さらに、解析の結果、以下のことが明らかになった。1匹のミツバチが摂取する1日の平均農薬摂取量は、長期の野外実験で投与される農薬の濃度が高くなるほど増加します。しかし、農薬投与期間中に1匹のミツバチが摂取する平均総摂取量は、濃度が高いほどコロニーの絶滅が早くなり、農薬投与期間が短くなるため、農薬投与期間以降の農薬投与濃度に関係なくほぼ一定であります。

農薬投与期間中、農薬含有糖液の1日当たりの平均摂取量は、約3~4mg/bee/日です。データはばらつくけれども、1匹のミツバチが摂取する農薬含有食料の平均摂取量は、投与された農薬の濃度とほぼ無関係であり、ほぼ一定であり、無農薬食料の摂取量とほぼ同じです。

1匹のミツバチが花粉ペーストを介して摂取する農薬の1日の平均摂取量は、糖液を介して摂取する農薬よりも少なくなります。投与期間中に1匹のミツバチが摂取した糖液と花粉ペーストの平均総摂取量は、それぞれ約0.45g/beeと0.048g/beeになります。さらに、最大で約1.4g/bee、0.11g/bee

になります。

ミツバチが自由に動き回れる開放的な環境での長期野外実験における糖液や花粉ペーストの摂取は、LD₅₀ 測定時のような閉鎖的な環境で強制的に摂取させる室内実験とは大きく異なると考えられています。本論文は、種々の条件下での長期野外実験データの解析結果に基づき、閉鎖環境下での測定結果から開放環境の条件設定のような、長期野外実験における農薬投与濃度を決定する上で有意義な情報を提供する可能性があります。

キーワード : long-term, field experiment, LD₅₀, pesticide administration concentration, bee colony, neonicotinoid, sugar syrup, pollen paste, intake, appropriateness

INTRODUCTION

はじめに近年、長期残留作用、毒性および透過性神経毒性を示すネオニコチノイド系農薬(以下、ネオニコチノイド系農薬)の生態系へのリスクが指摘されています(Tirado *et al.*, 2013; Goulson, 2013; Wood & Goulson, 2017)。特に、ネオニコチノイドがミツバチに与える悪影響が懸念されています。ネオニコチノイドがミツバチに及ぼす影響を調べるために行われてきたミツバチへのネオニコチノイドの長期野外投与実験では、蜂群に投与する農薬の濃度が実際に適切かどうか、しばしば議論されてきました。ミツバチの致死量の中央値(LD₅₀)は、農薬投与濃度が適切かどうかを評価する指標としてたびたび使用されてきました。

ミツバチの社会では、産卵、繁殖、子育ての3つの役割をそれぞれ女王蜂、ドローン、働き蜂が分担しています。働き蜂に世話をされながら、女王蜂は交尾後も一生産卵を続け、ドローンは交尾を唯一の仕事として一生を過ごします。働き蜂は、採餌や幼虫の飼育など、他のほとんどすべてのタスクを担当しています。

働き蜂ではさらに分業が細分化され、巣箱内の掃除や飼育を担う自家巣と、巣の外で花粉や花蜜を集める採餌蜂に大別されます。羽化した働き蜂は、巣の中で室内蜂として働き、老齢になると巣の外で採餌蜂として採餌します。

この分業の順番は、コロニーの状態やコロニーが置かれている周囲の環境、季節などによって変化します。しかし、コロニーの勢いが強く、周囲の花粉や蜜源が豊富で、採餌活動が活発な場合、分業の変化は日齢の進行に対応する(Watanabe, H. and Watanabe, T., 1974)。

このようなカースト制度と分業からなる複雑な社会構造からなるミツバチのコロニーの特殊性に加えて、実際の養蜂場に近い環境での長期野外実験と実験室でのLD₅₀の測定(室内実験)は、表1に示すように大きく異なります。この表は、ミツバチの致死量の中央値(LD₅₀)を測定する際の室内実験の特性と、ミツバチのコロニーの長期野外実験の特性の違いをまとめたものです。両者の主な

違いは、長期の野外実験では、実際の養蜂場に近しい実験環境を再現することが容易であるのに対し、 LD_{50} 測定に用いる室内実験では、実際の養蜂場の実験環境を再現することは極めて困難です。一方、閉鎖系で行われる室内実験では実験環境の制御は容易ですが、開放系で行われる長期野外実験では実験環境の制御が非常に困難です。

例えば、長期の野外実験は自由度の高い開放的な自然環境で行われますが、 LD_{50} の測定などの室内実験は自由度の狭い閉鎖的な環境で行われます。つまり、 LD_{50} 測定時には、ミツバチの生態環境を制御し、ミツバチによる農薬含有食料の摂取量やタイミングを正確に制御・測定し、実験で投与した農薬含有食料以外の食料を摂取しない。

一方、長期野外実験では、ミツバチのコロニーは、実際の養蜂場とほぼ同じようにカースト制度や分業制を維持する社会構造で構成されており、実験は養蜂場と同じ自然環境下で行われ、農薬含有食料の摂取量や投与時期は制御されず、自由であります。また、消費された農薬含有食料は、自然界から採取して巣箱に貯蔵した食料と混合されることが多く、そのような貯蔵食料のタイミングや摂取はミツバチの意思で自由に行われ、管理されていません。

実験環境のコントロールが困難な開放系での野外実験では、実験環境の影響を極力減らすため、以下のような努力をした(詳細は [Yamada et al., 2018a, b, c, d, 2020a, 2020b](#) 参照)；(1)実験場内に無農薬の水飲み場を設置し、ミツバチが実験以外の農薬を摂取しないように、無農薬の植物や花木を植えました；(2)対照コロニーと実験コロニーを交互に配置して、ミツバチの巣箱の位置が実験結果に与える影響を減らしました；(3)糖液と花粉ペーストの摂取量の誤差を減らし、巣箱内の成虫蜂数と蓋をされた幼虫の数(封蓋蜂児数)と巣箱内およびその周辺の死んだミツバチの数の測定誤差を減らすために、ミツバチが採餌活動を開始する前の夜明け直後に、糖液または花粉ペーストの残量を測定し、そして、これらの写真に付属する新開発のカウントソフトウェアを使用して、すべての巣碑枠と巣箱の5つの壁の写真を撮り(繰り返し確認できます)、これらの写真から成虫蜂数と封蓋蜂児数を計算しました。そして、巣箱の中や周りのミツバチの死骸を1匹ずつ数え、その数を記録しました。ダニの影響を受けたミツバチを、巣箱の巣碑枠と4つの壁と底の写真を拡大しながら、数えました。

ところで、ミツバチの嗜好の違いが、投与された農薬含有食料(糖液、花粉ペースト)と自然界から採取された食料(花蜜、ハチパン)とでは、見かけの摂取量(蓄えられた食料を含む)とミツバチの農薬含有食料の真の摂取量に差があり、真の農薬摂取量が不正確である可能性があります。(注：ハチパンとは、ミツバチが花粉を少量のハチミツと混ぜて作った発酵食品)このように、長期野外実験におけるミツバチのコロニーは、カースト制度と分業からなる複雑な社会構造を構成し、制御されない開放的な自然環境の中で自由に活動しています。一方、室内実験における LD_{50} の測定環境においては、ミツバチのコロニーはカーストや分業を持たない少数の働きバチのみで構成されており、高度に管理された環境で制約された活動に従事しています。

このように、カースト制度と分業をほぼ完全な真社会性昆虫として維持するミツバチのコロニーが、投与先の農薬含有食料以外から自由に摂取できる開放的な生態環境における長期野外実験における農薬の投与濃度の妥当性は、少数のミツバチと制御された閉鎖的な生態環境からなる非常に不完全な社会構造で測定された LD_{50} から、[Nakamura et al. \(2014\)](#) のように、評価するのは無謀に思えます。

例えば、 LD_{50} 値から判断すると、長期の野外実験でミツバチに高すぎると思われる農薬濃度の食料(糖液、花粉ペースト)をミツバチに投与しても、野外実験ではミツバチの行動は自由であるため、ミツバチが投与された農薬含有食料をほとんど摂取せず、野外から調達した食料を優先的に摂取します。あるいは、ミツバチの実際の農薬摂取量が LD_{50} 値よりも低いことも起こり得ます。すなわち、摂取した全ての食料に農薬が含まれている閉鎖的な測定環境における LD_{50} 値から、ミツバチが自由に移動できる野外実験における農薬投与濃度は、ミツバチが自由に移動できる野外実験における農薬投与濃度とは有意に異なることが予想されます。同様に、野外実験では、摂取したと思われる農薬を含む食料が細胞内に保管されることがよくあります。貯蔵された農薬をいつ、どれだけ摂取するかはミツバチに委ねられているため、実際の摂取量はさらに不確実です。

そこで、これまで行ってきた長期野外実験では、各コロニーにおける農薬含有食料の総量(摂取量)と成虫蜂の総数(初期数+新たに羽化した成蜂数)から、農薬投与期間中のミツバチ 1 匹当たりの農薬摂取量を推定しました([Yamada et al., 2018a, 2018b](#))。

本論文では、長期野外実験において、農薬投与期間中に 1 日当たり 1 匹のミツバチが摂取した農薬の平均量を推定し、 LD_{50} 値と同期間のミツバチ 1 匹当たりの農薬摂取量を比較し、 LD_{50} 値から長期野外実験における農薬投与濃度を推定・評価できるかを検討した。また、これまでの長期野外実験における農薬投与濃度の妥当性についても評価します。

METHODS

Yamada らは、[表 2](#) に示す 6 つの長期野外実験を行い、ミツバチ(*Apis mellifera*)のコロニーに対するネオニコの効果を調べた([Yamada et al., 2012; 2018a; 2018b; 2018c; 2018d; 2020a, 2020b](#))。これら 6 つの長期野外実験(2010-実験、2011/2012-実験、2012/2013-実験、2013/2014-実験、2014/2015-実験、2018-実験)は、以下の調査を行うために実施した。「2011/2012-実験」(268 日)/ミツバチのコロニーが食物からネオニコチノイド系農薬を摂取した場合、糖液(蜂蜜)と花粉ペースト(花粉)に違いはあるか?; "2012/2013-Experiment" (393 日)/ネオニコチノイド系と有機リン酸塩がミツバチのコロニーに及ぼす影響に違いはあるか?; 「2013/2014-実験」(199 日)/ミツバチのコロニーは低濃度のネオニコチノイド系農薬でも CCD を引き起こすか?; 「2014/2015-実験」(271 日)/ダニも季節もないハワイ・マウイ島での長期野外実験は、日本の滋賀での長期野外実験の成果を再現できるか?; 「2018-

実験」(180日)/ダニのいるミツバチのコロニーにネオニコチノイド系農薬を投与した場合、ダニは時間とともにどのように変化するのか?

この6回の長期野外実験のうち、「2010年実験」の野外実験開始時には、成虫蜂数と封蓋蜂児数を正確に数えるためのソフトウェアが開発されていなかったため、すべての写真画像から目視で成虫蜂数と封蓋蜂児数を大まかに推定し、正確に測定したサンプル画像と比較しました。「2011/2012年実験」以降の5回の野外実験(「2011/2012年実験」、「2012/2013年実験」、「2013/2014年実験」、「2014/2015年実験」、「2018年実験」)では、すべての巣碑の表面とすべての巣箱の内壁の写真から、新しく開発されたソフトウェアの助けを借りて、成虫蜂数と封蓋蜂児数をかなり正確に数えました。そこで本論文では、「2011/2012年実験」以降の実験結果を用いてミツバチの農薬摂取量を推定し、成虫蜂数と封蓋蜂児数を正確に数えました。すなわち、ミツバチ1匹当たりの平均農薬摂取量は、農薬投与期間中のミツバチコロニーの農薬消費量の総消費量と、その期間中の成虫蜂の総数から算出されます。

我々は、ネオニコチノイド系農薬(ネオニコチノイド系農薬)がミツバチのコロニーに及ぼす影響を調べるために、表2に示す6つの長期野外実験を行った(Yamada et al.; 2012; 2018a; 2018b; 2018c; 2018d; 2019; 2020a; 2020b)。これらの論文では、ミツバチ1匹あたりの平均農薬摂取量は、農薬投与期間中のミツバチコロニーの総農薬消費量と、その期間中の成虫蜂の総数から計算されています。ただし、これらの論文では、測定された農薬の総消費量がミツバチのコロニーの農薬の総摂取量と同じであると仮定しています。

これらの長期野外実験では、巣房に貯蔵し、実験終了時に巣箱に残した農薬含有蜂蜜とハチパンの量は測定されませんでした。したがって、実際の農薬総摂取量は、農薬総消費量よりも少ないようです。測定はされていませんが、実験コロニーの多くは、実験の最後に、巣箱に少量の農薬含有食料しか残っていなかったことを覚えています(写真で定性的に確認可能)。つまり、本論文で算出した成虫1匹の1日当たりの平均摂取農薬量は、真の摂取量の平均値よりわずかに少ないと推察できます。

ミツバチ1匹当たりの1日当たりの平均農薬摂取量(P_{BD})は式(1)で算出し、式(1)の P_B 以外の値(P_T , B_T , D_T)は Yamada et al. (2018a; 2018b; 2020b)の論文で報告されています。

$$P_{BD} = P_T / B_T / D_T \quad (1).$$

P_{BD} = ミツバチ1匹あたりの農薬の1日の平均摂取量。

P_T = コロニーあたりの農薬投与期間中の農薬の総摂取量で、実験で測定された期間中の農薬消費量に等しい。

B_T = コロニーあたりの農薬投与期間中のミツバチの総数で、最初の成虫蜂数と封蓋蜂児から新

しく羽化して成虫蜂となった数との総数から計算されます。

D_T = コロニーへの農薬投与期間中の総日数で、農薬投与開始から投与停止までの総日数

〔 B_T の推定手順〕

一定期間の成虫蜂の総数を推定する手順は、以下のとおりであります。1回目の測定時(農薬散布開始時)の成虫蜂数を B_0 とすると、 k 回目の測定で1日から12日齢の分布が同じである封蓋蜂児数を CB_k 、 k 回目の測定から $(k+1)$ 回目の測定までの日数を D_k 、総観測値は N であり、 B_T は大まかに以下の式から求めることができる(詳細は Yamada et al., 2018a & 2018b を参照のこと)。ここで、投与期間の終わりに存在する封蓋蜂児数(CB_N)は、すでに食物および農薬を摂取していると仮定します。

$$B_T = B_0 + \sum CB_k * (D_k / 12) + CB_N, \text{ where } k = 1, 2, 3, \dots, (N-1) \quad (2)$$

RESULTS AND DISCUSSION

Yamada et al. (2012; 2018a, 2018a, b, c, d, e; 2018) が実施した6回の長期野外実験では、表2に示すように、食料(糖液、花粉ペースト)を介してミツバチのコロニーに農薬を投与した。2010-Experiment では、ジノテフランまたはクロチアニジンのいずれかが、糖液と花粉ペーストの両方を介してミツバチのコロニーに投与されました。2010年実験以外の5回の長期野外実験(2011/2012-実験、2012/2013-実験、2013/2014-実験、2014/2015-実験、2018-実験)では、1種類の農薬を糖液または花粉ペーストを介してミツバチのコロニーに投与しました。

本論文では、ミツバチのコロニーにおける農薬、糖液、花粉ペーストの総摂取量を、これら5回の長期野外実験における投与期間中の成虫蜂の総数および/または投与日数で割って得られたさまざまな摂取量を評価した。表3に5回の長期野外実験の実験条件を示し、各農薬投与期間における1コロニーの成虫ミツバチの総数とコロニー当たりの糖液、花粉ペースト、農薬の総摂取量、ミツバチ1匹当たりの平均総摂取量、1匹当たりの1日平均摂取量を示した。表3は、長期野外実験の原データを精査し、再計算し、修正を加えて作成したものです。

ミツバチのコロニーへの農薬投与中に1匹のミツバチが摂取した農薬の1日の平均摂取量 (P_{BD})

表3に示す1匹のミツバチが1日に摂取した農薬の平均量(P_{BD})を、ミツバチに投与した農薬濃度の P_T 、 A_T 、 D_T の値から推定した。表3に、5回の長期野外実験における実験条件、ミツバチの総数、ミツバチのコロニー当たりの食料(糖液、花粉ペースト)と農薬の摂取量、ミツバチ1匹当たりの摂取量、ミツバチ1匹当たりの投与期間中の1日当たりの摂取量を示したものです。図1は、これま

での 5 回の長期野外実験で報告したすべてのデータについて、ミツバチのコロニー(C_P)に投与された農薬濃度[ng(農薬)/g(農薬含有ビヒクル)]とミツバチ 1 日あたりの平均農薬摂取量(P_{BD})[ng/bee/day] の関係を、横軸に C_P 、縦軸に P_{BD} とした対数プロットです。図 1 より、 C_P と P_{BD} は大まかに次式で表されることがわかります。

$$\log(P_{BD}) \cong \log(C_P) - 2.4 \quad (3)$$

すなわち、

$$P_{BD}/C_P = 10^{-2.4} \cong 0.004 \text{ [g(pesticide-containig vehicle)/(bee·day)]} \quad (4)$$

式(3)と平行して、 P_{BD} の最大データを取る対数線は以下のようになります。

$$\log(P_{BD}) \cong \log(C_P) - 2.0 \quad (5)$$

すなわち、

$$P_{BD}/C_P = 10^{-2.0} \cong 0.01 \text{ [g(pesticide-containig vehicle)/(bee·day)]} \quad (6)$$

図 1 は、5 回の長期野外実験(2011/2012-実験、2012/2013-実験、2013/2014-実験、2014/2015-実験、2018-実験)から算出した、1 日 1 匹のミツバチが摂取する平均農薬摂取量(P_{BD})とミツバチ群における農薬投与濃度(C_P)の関係を示したものです。

表 3、図 1、式(3)~(6)から、以下のことが推測できます。

大まかに言えば、投与する農薬の種類に関係なく、投与する濃度が高いほど、ミツバチ 1 匹あたりの 1 日あたりの平均農薬摂取量が多くなります。花粉ペーストを介して農薬を投与する P_{BD} は、糖液を介して農薬を投与する P_{BD} よりも低い傾向があります。 P_{BD} と C_P の関係は、投与する農薬の種類や実験の時期や場所に関係なく、大まかに式(3)で表されます。 P_{BD} は式(5)以下であることが分かります。

式(4)から、1 日 1 匹のミツバチがミツバチのコロニーに摂取する平均農薬摂取量(P_{BD})は、農薬投与濃度(C_P)の約 1/250 であり、式(6)から、 P_{BD} は C_P の 1/100 程度であることがわかります。このことは、ミツバチのコロニーの長期野外実験において、ミツバチのコロニーに投与される農薬の濃度を決定する際には、野外実験と閉鎖実験室実験の環境の違いを考慮する必要がありますことを示唆しています。

表 3、図 1、式(3)~(4)から、以下のことが推測できます。

1) 成虫蜂の農薬含有食料の1日の平均摂取量は、農薬濃度に関係なくほぼ同じです。1匹の成蜂は、長期の野外実験で1日あたり約0.004gの農薬含有食料(ビヒクル)を摂取します。この知見は、農薬投与濃度を決定するための指標となる可能性があります。

2) ビークルの違いによって、ミツバチ1匹当たりの1日当たりの農薬摂取量は異なる傾向にあります。ビヒクル(農薬投与のための媒介物)が「花粉ペースト」の場合、ミツバチ1匹当たりの1日当たりの平均農薬摂取量は「糖液」の場合よりも少なくなります。

ミツバチコロニーへの農薬投与中に1匹のミツバチが摂取した農薬の平均摂取量、 P_B

図2は、ミツバチのコロニーに投与された農薬の濃度(C_P)とミツバチあたりの平均農薬摂取量(P_B)の関係を示しています。 P_B は、農薬投与期間中に1つのミツバチコロニーが消費した農薬含有食料(ビヒクル)の量から得られる農薬総摂取量を、期間中に存在する成虫ミツバチの総数で割ったもので、農薬投与期間中に1匹のミツバチが摂取したコロニー内の平均総農薬摂取量です。

図2と表3から、ミツバチコロニーに投与する農薬濃度(C_P)の増加に伴って、ミツバチ1匹当たりの平均農薬摂取量(P_B)はわずかに増加しているように見えるが、大まかに言えば、 C_P とはほぼ無関係で一定であるといえます。ネオニコチノイド系農薬で処理したミツバチのコロニーでは、農薬投与の終了はコロニーの絶滅の時期であり、コロニーの絶滅までの1匹のミツバチの平均総農薬摂取量は、農薬投与濃度(C_P)とは無関係にほぼ一定であることを示唆しています。すなわち、これらの摂取量は、ネオニコチノイド系農薬を慢性毒性として継続的に摂取した場合、ミツバチのコロニーが絶滅するまでの農薬の総摂取量とほぼ同じであることを意味していると推察されます。

ここで、農薬の種類および農薬を投与するビヒクル別の P_B の平均値は、以下の通りである：糖液(SS)を介したジノテフラン(DF)の P_B の平均値=154.4ng/bee：花粉ペースト(PP)を介したジノテフラン(DF)の P_B の平均値=33.4 ng / bee：糖液(SS)を介したクロチアニジン(CN)の P_B の平均値=50.6 ng / bee：糖液(SS)によるフェントロチオンの P_B の平均値=636.8 ng / bee：糖液(SS)によるマラチオンの P_B の平均値=429.3ng/bee。

ミツバチ1匹当たりの2日あたりの平均農薬摂取量(P_{BD})とミツバチの致死量の中央値(LD_{50})の比較

ミツバチのコロニーの長期野外実験における農薬投与濃度の適正度を算出・評価する場合、野外実験における1匹のミツバチの農薬摂取時間はミツバチの LD_{50} の測定時間と同等であると仮定し、ミツバチの致死量中央値(LD_{50})での評価を試みます。

本論文では、長期野外実験で用いた農薬のミツバチの平均 LD_{50} 値と、長期野外実験における各種農薬投与濃度の P_{BD} 値と、試験期間を48時間とした場合の LD_{50} 値を比較した。 LD_{50} (試験期間:48

時間)の長期野外実験における農薬濃度推定の妥当性を評価するために、 P_{BD} 値を 2 倍にして、1 匹の蜂が 2 日間 (48 時間) 農薬を摂取した場合の $P_{BD} \times 2$ と LD_{50} (48 時間) の摂取量を比較しました。

表 4 は、ジノテフラン、クロチアニジン、フェニトロチオン、マラチオンの中央致死量 (LD_{50}) の文献値と、これらの LD_{50} データのさまざまな平均値を示しています。急性経口毒性に対する農薬の平均 LD_{50} 値 (48 時間) と長期野外実験で得られた P_{BD} 値を用いて、長期野外実験におけるミツバチコロニーの農薬投与濃度の妥当性を評価した。

図 3 は、ミツバチ 1 匹当たりの 2 日 (48 時間) あたりの平均農薬摂取量と、48 時間後の急性経口毒性に対するミツバチの平均致死量の中央値 (AOT- LD_{50} -48h) を比較したものです。

図 3 より、長期野外実験でミツバチのコロニーに投与した農薬の濃度 (C_P) を花粉ペーストで 5650ppb、糖液で 10000ppb とすると、ミツバチ 1 匹当たりの 2 日あたりの平均農薬摂取量 ($P_{BD} \times 2$) は LD_{50} 値以上になります。このことは、これらの高濃度の農薬を投与すると、ミツバチのコロニーが短期間で絶滅したという事実を裏付けています (Yamada et al., 2010)。

一方、これらの高濃度を下回ると、 $P_{BD} \times 2$ 値は LD_{50} 値を下回ります。このことは、長期の野外実験において、これらの高濃度よりも低い濃度の農薬を投与した場合、ミツバチのコロニーが短期間で絶滅したのではなく、慢性毒性によるものと考えられる CCD の出現を示した後に絶滅したという事実を裏付けています。

表 4 に示すように、24 時間、48 時間、72 時間などの試験期間における急性経口毒性の LD_{50} の全体的な平均値は、ジノテフランで 28.2 ng/bee、クロチアニジンで 54.0 ng/bee、フェニトロチオンで 203.3 g/bee、マラチオンで 385.0 ng/bee です。 P_{BD} の 2 倍値は、これらの総括平均 LD_{50} 値よりも低かった。この事実は、5 回の長期野外実験における農薬投与濃度が高すぎず、むしろ妥当な農薬投与濃度であったことを認めているように思われ、Nakamura et al. (2014) の批判に反しています。

ミツバチのコロニーに投与された農薬の濃度 (C_P) に対する、農薬投与期間中のミツバチ 1 匹あたりの農薬の 1 日平均摂取量 (P_{BD}) の比率

図 4 は、ミツバチのコロニーに投与された農薬濃度 (C_P) に対する、ミツバチ 1 匹当たりの農薬の 1 日平均摂取量 (P_{BD}) の比率を示しています。図 4 及び表 3 より、農薬投与濃度によらず、農薬の種類によらず、 P_{BD}/C_P 値はほぼ一定であることが分かるが、ここで、全ての P_{BD}/C_P 値の算術平均値は 2.94mg/bee/日 (図中の横の点線) であり、ほぼ 3mg/bee/日です。 P_{BD}/C_P 値 [mg(農薬含有ビヒクル)/ミツバチ/日] は、1 匹のミツバチが 1 日に消費する糖液や花粉ペーストの量であるため、 LD_{50} 値から長期野外実験で投与される農薬の適正濃度を推定できる可能性があります。例えば、 LD_{50} 値 (24 時間) が 9ng/bee (24 時間) の農薬を投与する場合、長期野外実験における最大農薬投与濃度 (P) は次のように推定できます。

$P \times 3\text{mg/bee/day} = 9\text{ng/bee/day}$ という関係が成り立つので、 $P = 9 \times 10^{-9}\text{g/bee/day} / 3 \times 10^{-3}\text{g/bee/day} = 3 \times 10^{-6} = 3\text{ppm}$ となります。すなわち、この場合、農薬濃度 3ppm は急性毒性として作用するため、長期の野外実験においては、この値を基準として農薬投与濃度を設定してもよい。従来、長期野外実験では適切な農薬投与濃度がわからず、農薬投与濃度が高すぎたり低すぎたりすることがあったが、本稿で記載した方法は、長期野外実験において適切な農薬濃度を設定するための大まかな目安となります。

投与期間中に 1 匹のミツバチが摂取した食料 (糖液、花粉ペースト) の平均総摂取量、 FD_B

図 5 は、ミツバチのコロニーへの農薬の投与濃度 C_P と、投与期間中のミツバチ 1 匹当たりの平均総食料(糖液、花粉ペースト)の総摂取量 FD_B との関係を示しています。野外実験では、糖液と花粉ペーストを食料として、またはミツバチのコロニーに農薬を投与するための媒体としてミツバチのコロニーに与えます。ここでは、投与期間中に 1 匹のミツバチが摂取する食料(糖液、花粉ペースト)の量、投与した農薬の濃度によってミツバチの食料摂取量に影響が出ないか、特に無農薬食料の摂取量と農薬含有食料の摂取量に差がありますかを調べます。ここで、農薬濃度が 0 (ゼロ) の場合を対数グラフにプロットすることはできないので、無農薬データを対数グラフにプロットするために、無農薬濃度 (C_P) を 0.01ppb と等価と仮定しています。

図 5 と表 3 から、次のことがわかります。データにばらつきはあるものの、農薬含有食料と無農薬食料の蜂 1 匹当たりの平均総摂取量にはほとんど差がない。投与期間中に 1 匹のミツバチが摂取した花粉ペーストの平均総摂取量は、糖液の摂取量よりも少ないことに注意する必要があります。

1 匹のミツバチの食料(糖液または花粉ペースト)の摂取量は、ミツバチのコロニー(C_P)に投与された農薬の濃度に関係なく、ばらつきはあるものの、ほぼ一定であるように見えます。すなわち、投与期間中に 1 匹のミツバチが摂取した糖液と花粉ペーストの平均総摂取量は、それぞれ約 0.45g/bee と 0.048g/bee です。また、投与期間中に 1 匹のミツバチが摂取した糖液と花粉ペーストの最大総摂取量は、それぞれ約 1.4g/bee と 0.11g/bee です。

投与期間中に 1 匹のミツバチが摂取した食料 (糖液、花粉ペースト) の 1 日平均摂取量、 FD_{BD}

図 6 は、ミツバチのコロニーへの農薬の投与濃度と、投与期間中のミツバチ 1 匹当たりの食料(糖液、花粉ペースト)の 1 日平均摂取量との関係を示しています。

図 6 と表 3 から以下がわかります。データにばらつきはあるものの、農薬含有食料の 1 蜂 1 匹当たりの平均摂取量と無農薬食料の平均摂取量にはほとんど差がない。1 匹のミツバチが摂取する花粉ペーストの 1 日の平均摂取量は、糖液の摂取量よりも少ない。1 匹のミツバチの 1 日の食料(糖液

または花粉ペースト)の摂取量は、ミツバチのコロニーに投与された農薬の濃度(C_P)に関係なく、ばらつきはあるものの、ほぼ一定であるように見えます。つまり、1匹のミツバチが摂取する糖液の1日の平均摂取量は約2.9757mg/bee/日であり、1匹のミツバチが摂取する花粉ペーストの1日の平均摂取量は約0.7997mg/bee/日です。つまり、1匹のミツバチが摂取する糖液と花粉ペーストの1日の平均摂取量は、それぞれ約3.0mg/bee/日と0.80mg/bee/日です。

1匹のミツバチが摂取する糖液の1日の平均摂取量である3.0mg/bee/日の値は、[図4](#)に示すすべての P_{BD}/C_P [mg(農薬含有ビヒクル)/bee/日]値の算術平均値とほぼ等しくなります。3.0mg/bee/日という値を用いると、前述したように、長期野外実験における農薬投与濃度を推定できるようです。また、1匹のミツバチが摂取する糖液と花粉ペーストの1日の最大摂取量は、それぞれ約8.3mg/bee/日と4.3mg/bee/日です。

CONCLUSION

個々のミツバチに対する農薬の影響を調べるためには、実験環境をコントロールしやすい密室実験が適していますが、養蜂場のこれらのミツバチコロニーへの影響を調べるためには、実際の養蜂場環境に近く、実験環境の制御が非常に難しいオープンな長期野外実験、が適しています。長期の野外実験では、室内実験で測定したLD50値を指標として、農薬の投与濃度が実際に適切かどうかを議論することが多かった。

本論文では、長期野外実験における農薬投与濃度と、農薬投与期間中の1日1匹のミツバチの平均農薬摂取量との関係を明らかにし、1日当たりの平均農薬摂取量とLD50値を比較し、5回の長期野外実験における農薬投与濃度の妥当性を評価した。本論文では、以下の点について検討した。1) 5回の長期野外実験から算出した、1日1匹のミツバチが摂取する平均農薬摂取量(P_{BD})とミツバチ群における農薬投与濃度(C_P)との関係。2) ミツバチコロニーに投与された農薬濃度(C_P)とミツバチあたりの平均農薬摂取量(P_B)との関係。3) ミツバチ1匹当たりの2日(48時間)あたりの平均農薬摂取量と48時間後の急性経口毒性の平均致死量中央値(AOT-LD50-48h)との比較。4) ミツバチのコロニーに投与された農薬濃度(C_P)に対するミツバチ1匹当たりの農薬(P_{BD})の1日平均摂取量の比率。5) ミツバチコロニーへの農薬投与濃度 C_P と投与期間中のミツバチ1匹当たりの平均総食料摂取量(糖液、花粉ペースト) FD_B との関係。6) ミツバチのコロニーへの農薬投与濃度と投与期間中のミツバチ1匹当たりの食糧(糖液、花粉ペースト)の1日平均摂取量との関係。

長期の野外実験は、異なった実験場所(Shiga in Japan, Maui in USA)や様々な実験時期(2011-2012, 2012-2013, 2013-2014, 2014-2015, 2018)で実施されたにもかかわらず、実験場所や時間に関係なく、以下の点が明らかになりました。1) 5回の長期野外実験の結果から算出した、殺虫剤投与期間中に1匹のミツバチが2日間に摂取した平均農薬摂取量は、[表4](#)に示す以前に発表されたLD50値(48時間)の平均値よりも低い。2) 1匹のミツバチが摂取する1日の平均農薬摂取量は、長期の野外実験で投与される農薬の濃度が高くなるほど増加します。3) 農薬投与期間中に1匹のミ

ツバチが摂取する平均総摂取量は、農薬投与濃度に関係なくほぼ一定です：糖液中のジノテフランの場合は 154.4 ng/bee；花粉ペースト中のジノテフランの場合は 33.4 ng/bee；糖液中のクロチアニジンの場合は 50.6 ng/bee；糖液中のフェニトロチオンの場合は 636.8 ng/bee；糖液中のマラチオンの場合は 429.3 ng/bee。4) 農薬投与期間中、1日あたりの1蜂あたりの平均農薬含有糖液の摂取量は約 3~4mg/bee/日です。5) データにばらつきはあるものの、1匹のミツバチが摂取する農薬含有食品の平均摂取量は、投与された農薬濃度とほぼ無関係であり、ほぼ一定であり、無農薬食品の摂取量とほぼ同じです。6) 1匹のミツバチが花粉ペーストを介して摂取する農薬の1日の平均摂取量は、糖液を介して摂取する農薬よりも少ない。7) 1日1匹のミツバチが摂取する花粉ペーストの平均摂取量は、糖液の摂取量よりも少ない。8) 投与期間中に1匹のミツバチが摂取した糖液と花粉ペーストの平均総摂取量は、それぞれ約 0.45g/bee と 0.048g/bee です。さらに、最大で約

以上の結果から、以下の結論が得られます。Nakamura et al. (2014)は、長期野外実験でミツバチのコロニーに投与した農薬の濃度が高すぎると批判しているが、文献から得られた各種 LD_{50} (48時間)のほとんどが、ミツバチ1匹あたりの2日当たりの平均農薬摂取量よりも高いことから判断すると、長期野外実験でミツバチのコロニーに投与された農薬の濃度は妥当と思われます。本論文で明らかになった、1匹のミツバチが摂取する食料や農薬の1日摂取量と、ミツバチのコロニーに投与する農薬濃度の関係や、対象農薬の LD_{50} 文献値を用いて、新たな長期野外実験に適した農薬濃度を設定することが可能となります。この濃度の適切さは、新しい野外実験から1匹のミツバチの毎日の農薬摂取量によって判断できます。

ミツバチが長期野外実験で摂取する糖液や花粉ペーストを好むか、自然界から採取した花蜜や花粉を好むかによって、長期野外実験での糖液や花粉ペーストの摂取量は異なる場合があります。異なる環境、すなわち異なる地域(日本の志賀町、ハワイのマウイ島)の異なる時期における実験データをもとに解析した結果、長期野外実験の開放環境における農薬投与濃度とミツバチ摂取量の間関係を、大まかにではあるが、明らかにすることができ、長期野外実験における農薬投与濃度を決定するための、ささやかながらも、ある程度意味のある指針を提供することができます。私はそれがこの論文で与えられたと信じています。

REFERENCES

Goulson D. (2013). REVIEW: An overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides. *Journal Applied Ecology*, **50**(4): 977-987.

<https://besjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/1365-2664.12111>

Nakamura J, Kimura K, Takahashi J, Sasaki M, Manabe N. (2014, January). About the issues on Yamada's paper on neonicotinoid pesticides. *Chemistry Today (Gendai Kagaku in Japanese)* No.514: 67–68.

<https://www.molcom.jp/products/detail/81236/>

Tirado R, Simon G and Johnston P. (2013). Bee in decline: A review of factors that put pollinators and agriculture in Europe at risk. *Greenpeace Research Laboratories Technical Report (Review)*. Published April 2013, Greenpeace International, Amsterdam, 01/2013

<https://www.greenpeace.org/international/publication/6839/bees-in-decline/>

<https://www.greenpeace.org/static/planet4-international-stateless/2013/04/66f3eb6b-beesindecline.pdf>

Watanabe H and Watanabe T. (1974). *Modern Beekeeping (Kindai Yohou in Japanese)*. Japan Beekeeping Promotion Society (Nihon Yohou Shinkoukai in Japanese), Gifu, pp.736.

<https://iss.ndl.go.jp/books/R100000001-I076998577-00>

Wood TJ, Goulson D. (2017). The environmental risks of neonicotinoid pesticides: a review of the evidence post 2013. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, **24**:17285–17325.

<https://doi.org/10.1007/s11356-017-9240-x>

<https://link.springer.com/article/10.1007/s11356-017-9240-x#citeas>

Yamada T, Yamada K and Wada N. (2012). Influence of dinotefuran and clothianidin on a bee colony, *Japanese Journal of Clinical Ecology* **21**(1): 10-23.

https://scholar.google.co.jp/scholar?hl=ja&as_sdt=0%2C5&q=Influence+of+dinotefuran+and+clothianidin+on+a+bee+colony&btnG=

Yamada Y, Yamada K and Yamada Y. (2018a). A clear difference in the impact on (*Apis mellifera*) colony between the two vehicles of sugar syrup and pollen paste. *Journal Biological Series* **1**(3): 084-107.

<https://www.academiapublishing.org/journals/jbs/abstract/2018/Jul/Toshiro%20et%20al.htm>

<https://www.academiapublishing.org/journals/jbs/pdf/2018/Jul/Toshiro%20et%20al.pdf>

Yamada T, Yamada Y and Yamada K. (2018b). Difference between the impact of the neonicotinoid dinotefuran and organophosphate fenitrothion on a bee colony in a long-term field experiment: An evidence. *Journal Biological Series* **1**(3): 108-137..

<https://www.academiapublishing.org/journals/jbs/abstract/2018/Jul/Yamada%20et%20al.htm>.

<https://www.academiapublishing.org/journals/jbs/pdf/2018/Jul/Yamada%20et%20al.pdf>.

Yamada T, Yamada Y and Yamada K. (2018c). Comparison of the influence of a pesticide at an environmentally realistic concentration level in Japan on a honeybee colony between neonicotinoids (dinotefuran, clothianidin) and organophosphates (fenitrothion, malathion). *Journal Biological Series* **1**(4): 187-207.

<https://www.academiapublishing.org/journals/jbs/abstract/2018/Oct/Yamada%20et%20al.htm>.

<https://www.academiapublishing.org/journals/jbs/pdf/2018/Oct/Yamada%20et%20al.pdf>.

Yamada T, Yamada K and Apao P. (2018d). Comparison of the long-term influence of a pesticide on a bee colony between neonicotinoids (dinotefuran, clothianidin) and organophosphate (fenitrothion) in Maui where there are neither harmful mites nor cold winter. *Journal Biological Series* **1**(4): 156-186.

<https://www.academiapublishing.org/journals/jbs/abstract/2018/Oct/Yamada%20et%20al.htm>.

<https://www.academiapublishing.org/journals/jbs/pdf/2018/Oct/Yamada%20et%20al.pdf>.

Yamada Y, Yamada T and Yamada T. (2019). A mathematical model to estimate the seasonal change in apparent longevity of bee colony. *Scientific Reports* **9**, Article number: 4102.

<https://www.nature.com/articles/s41598-019-40725-0>.

<https://www.nature.com/articles/s41598-019-40725-0.pdf>.

Yamada T and Yamada K. (2020a). Comparison of long-term changes in size and longevity of bee colonies in mid-west Japan and Maui with and without exposure to pesticide, cold winters, and mites. *PeerJ* **8**: e9505.

<https://peerj.com/articles/9505>.

Yamada T. (2020b). Seasonal Changes in the Size and Mite-Prevalence of A Bee Colony Exposed to Dinotefuran via Pollen Paste and Damaged by Varroa Mites. *Enliven: Journal of Dietetics Research and Nutrition* **7**(1): 002.

<http://www.enlivenarchive.org/articles/seasonal-changes-in-the-size-and-miteprevalence-of-a-bee-colony-exposed-to-dinotefuran-via-pollen-paste-and-damaged-by-varroa-mite.pdf>.

Titles and Captions of Figures and Tables

Figure 1. Relationship between the concentration of pesticide administered to the bee colony (C_P) and the average intake of pesticide per bee per day (P_{BD}).

DF: Dinotefuran, **CN:** Clothianidin, **FT:** Fenitrothion, **MT:** Malathion.

P_{BD}: Average daily intake of a pesticide ingested by one bee during the administration period.

P_{BD-DF}: Average daily intake of dinotefuran ingested by one bee during the administration period.

P_{BD-CN}: Average daily intake of clothianidin ingested by one bee during the administration period.

P_{BD-FT}: Average daily intake of fenitrothion ingested by one bee during the administration period.

P_{BD-MT}: Average daily intake of dinotefuran ingested by one bee during the administration period.

The data surrounded by a dotted line in the upper rectangle labeled pollen paste in the figure shows the daily intake of pesticides by one bee when "pollen paste" containing pesticides is administered to a bee colony as a vehicle. All other data show the daily intake of pesticides per bee when pesticides are administered using sugar syrup as the vehicle.

Figure 2. Relationship between concentration of pesticide administered to the bee colony (C_P) and average intake of pesticide per bee (P_B).

P_B: Intake of a pesticide ingested by one bee during the administration period.

P_{B-DF}: Intake of dinotefuran ingested by one bee during the administration period.

P_{B-CN}: Intake of clothianidin ingested by one bee during the administration period.

P_{B-FT}: Intake of fenitrothion ingested by one bee during the administration period.

P_{B-MT}: Intake of malathion ingested by one bee during the administration period.

The data surrounded by a dotted square is the P_B value where the pesticide was administered to the bee colony via pollen paste, and the rest is the P_B value where the pesticide was administered via sugar syrup.

Figure 3. Comparison between average intake of pesticide per bee per two days (P_{BD}) and median lethal dose of the bee (LD_{50}).

Dotted lines are the LD_{50} values. "LD50-DF/48h", "LD50-CN/48h", "LD50-FT/48h" and "LD50-MT/48h" denote the LD_{50} values of dinotefuran, clothianidin, fenitrothion and malathion for honeybee with measurement time 48 hours, respectively.

Figure 4. Ratio of the average daily intake of pesticide per bee (P_{BD}) during the pesticide administration period to the concentration of pesticide administered to the bee colony (C_P).

In the figure, the data surrounded by a dotted square is the P_{BD}/C_P value where the pesticide was administered to the bee colony via pollen paste, and the rest is the P_{BD}/C_P value where the pesticide was administered via sugar syrup. The data surrounded by a dotted line in the upper rectangle labeled pollen paste in the figure shows the daily intake of pesticides by one bee when "pollen paste" containing pesticides is administered to a bee colony as a vehicle. All other data show the daily intake of pesticides per bee when pesticides are administered using sugar syrup as the vehicle.

Figure 5. Relationship between the administration concentration of pesticide to the bee colony and the average total intake of food (sugar syrup, pollen paste) per bee during the administration period

SS: sugar syrup, **PP:** pollen paste, **FD:** food (sugar syrup, pollen paste).

FD_{B-FR-SS}: Average total intake of pesticide-free sugar syrup per bee during the administration period.

FD_{B-DF-SS}: Average total intake of sugar syrup containing dinotefuran per bee during the administration period.

FD_{B-CN-SS}: Average total intake of sugar syrup containing clothianidin per bee during the administration period.

FD_{B-FT-SS}: Average total intake of sugar syrup containing fenitrothion per bee during the administration period.

FD_{B-FT-SS}: Average total intake of sugar syrup containing malathion per bee during the administration period.

FD_{B-FR-PP}: Average total intake of pesticide-free pollen paste per bee during the administration period.

FD_{B-DF-SS}: Average total intake of pollen paste containing dinotefuran per bee during the administration period.

Figure 6. Relationship between the administration concentration of pesticide to the bee colony and the average daily intake of food (sugar syrup, pollen paste) per bee during the administration period.

SS: sugar syrup, **PP:** pollen paste, **FD:** food (sugar syrup, pollen paste)

FD_{BD-FR-SS}: Average daily intake of pesticide-free sugar syrup per bee

FD_{BD-DF-SS}: Average daily intake of sugar syrup containing dinotefuran per bee.

FD_{BD-CN-SS}: Average daily intake of sugar syrup containing clothianidin per bee.

FD_{BD-FT-SS}: Average daily intake of sugar syrup containing fenitrothion per bee.

FD_{BD-FT-SS}: Average daily intake of sugar syrup containing malathion per bee.

FD_{BD-FR-PP}: Average daily intake of pesticide-free pollen paste per bee.

FD_{BD-DF-SS}: Average daily intake of pollen paste containing dinotefuran per bee.

Average intake of sugar syrup per bee per day = 2.9757 mg/bee/day; Average intake of pollen paste per bee per day = 0.7997 mg/bee/day.

Table 1. Comparison between long-term field experiments and LD_{50} measurement experiments in the investigation of the effects of pesticides on bees.

Table 2. Experimental conditions of six long-term field experiments for honeybee colonies.

Table 3. Intakes of sugar syrup, pollen paste and pesticide during the administration period to a bee colony in five long-term field experiments.

Table 4. Literature values of median lethal doses (LD_{50}) for the honeybee and various average values of the LD_{50} data for dinotefuran, clothianidin, fenitrothion and malathion.

- 1) Average of all LD_{50} data on acute oral toxicity of dinotefuran ($\langle D F- Oral- LD_{50} \rangle$).
- 2) Average of all LD_{50} data on acute contact toxicity of dinotefuran ($\langle D F- CTC- LD_{50} \rangle$).
- 3) Average of all LD_{50} data on acute oral and contact toxicities of dinotefuran ($\langle DF- LD_{50} \rangle$)
- 4) Average of all LD_{50} data on acute oral toxicity of clothianidin ($\langle CN-Oral-LD_{50} \rangle$).
- 5) Average of all LD_{50} data on acute contact toxicity of clothianidin ($\langle CN - CTC -LD_{50} \rangle$).
- 6) Average of all LD_{50} data on acute oral and contact toxicities of clothianidin ($\langle CN - LD_{50} \rangle$)
- 7) Average of all LD_{50} data on acute oral toxicity of fenitrothion ($\langle FT-Oral-LD_{50} \rangle$).
- 8) Average of all LD_{50} data on acute contact toxicity of fenitrothion (FT - CTC -LD50).
- 9) Average of all LD_{50} data on acute oral and contact toxicities of fenitrothion ($\langle FT - LD_{50} \rangle$)
- 10) Average of all LD_{50} data on acute oral toxicity of malathion ($\langle MT-Oral-LD_{50} \rangle$).
- 11) Average of all LD_{50} data on acute contact toxicity of malathion ($\langle MT - CTC -LD_{50} \rangle$).
- 12) Average of all LD_{50} data on acute oral and contact toxicities of malathion ($\langle MT - LD_{50} \rangle$)

The list of literatures cited is shown in Table 4a.

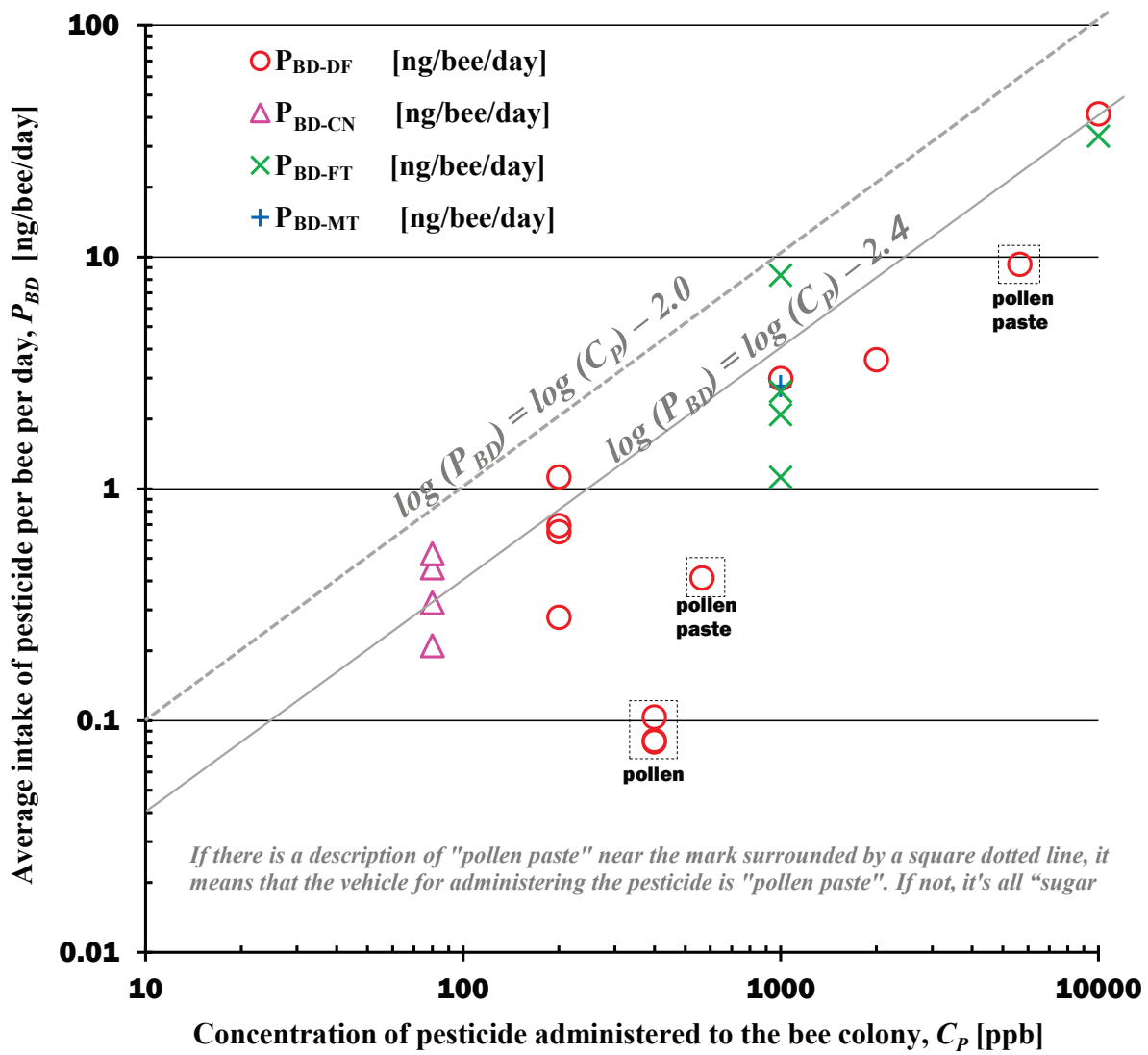


Figure 1. Relationship between the concentration of pesticide administered to the bee colony (C_p) and the average intake of pesticide per bee per day (P_{BD})

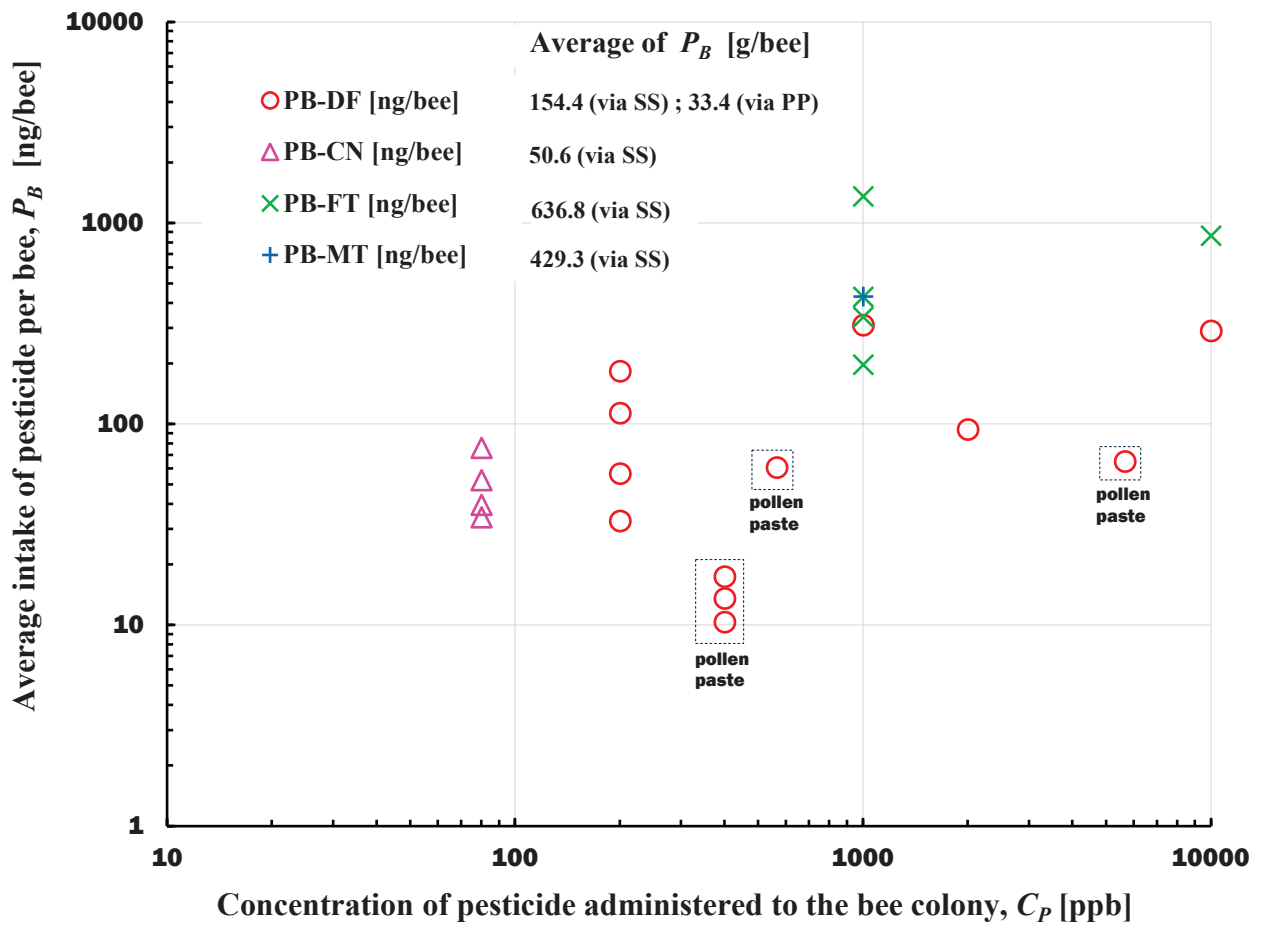


Figure 2. Relationship between concentration of pesticide administered to the bee colony (C_P) and average intake of pesticide per bee (P_B)

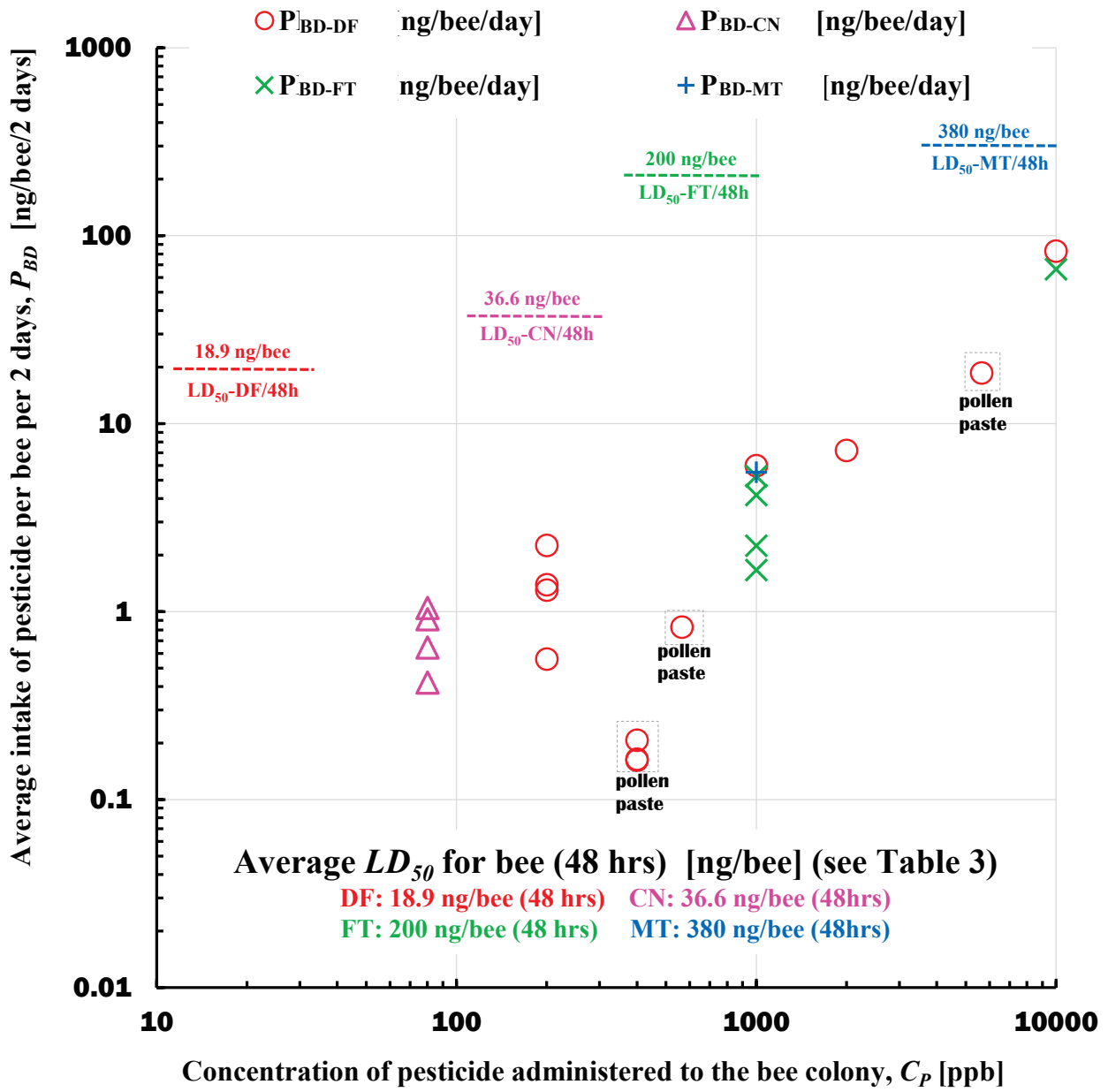


Figure 3. Comparison between average intake of pesticide per bee per two days (P_{BD}) and median lethal dose of the bee (LD_{50})

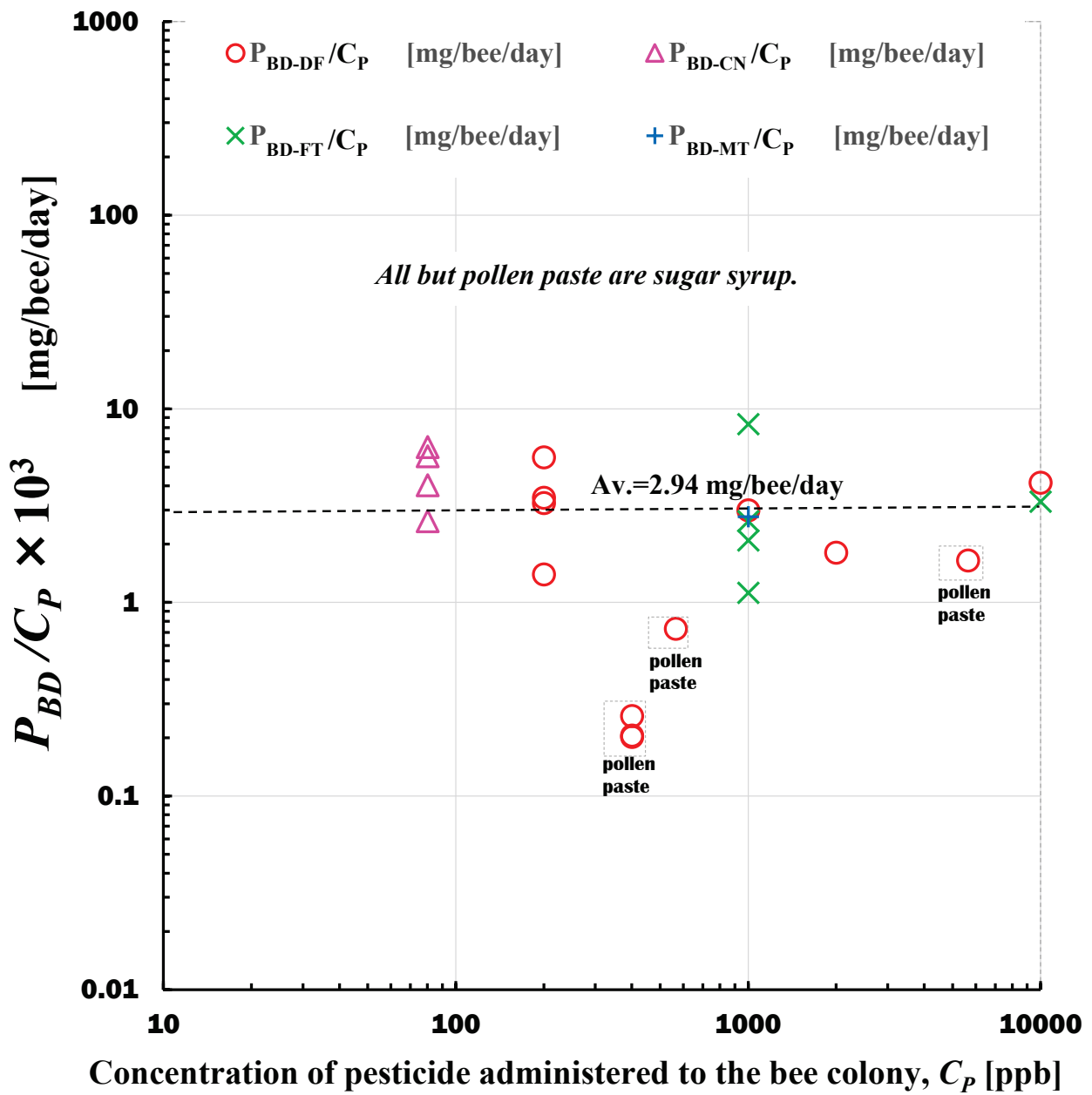


Figure 4. Ratio of the average daily intake of pesticide per bee (P_{BD}) during the pesticide administration period to the concentration of pesticide administered to the bee colony (C_P).

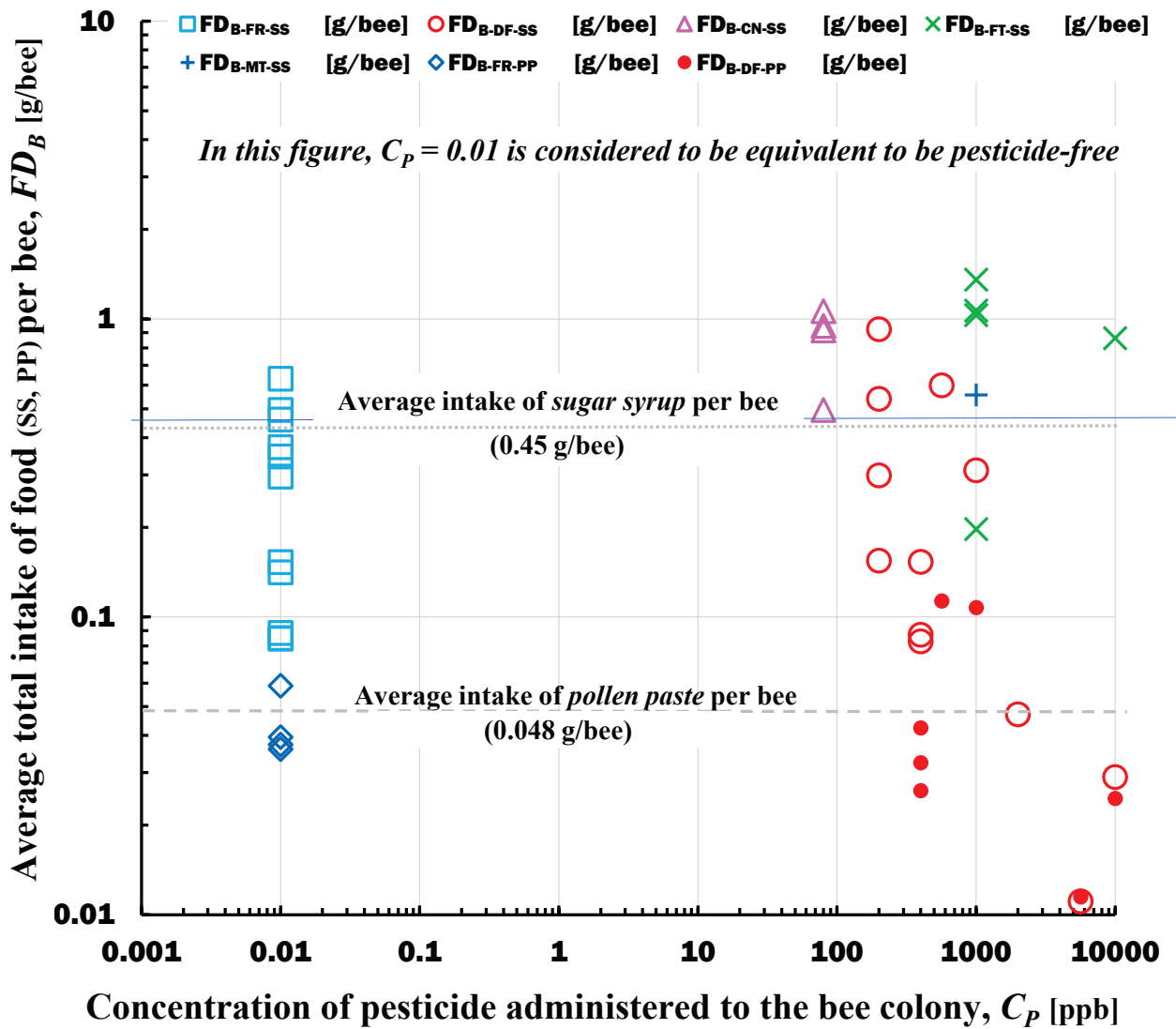


Figure 5. Relationship between the administration concentration of pesticide to the bee colony and the average total intake of food (sugar syrup, pollen paste) per bee during the administration period

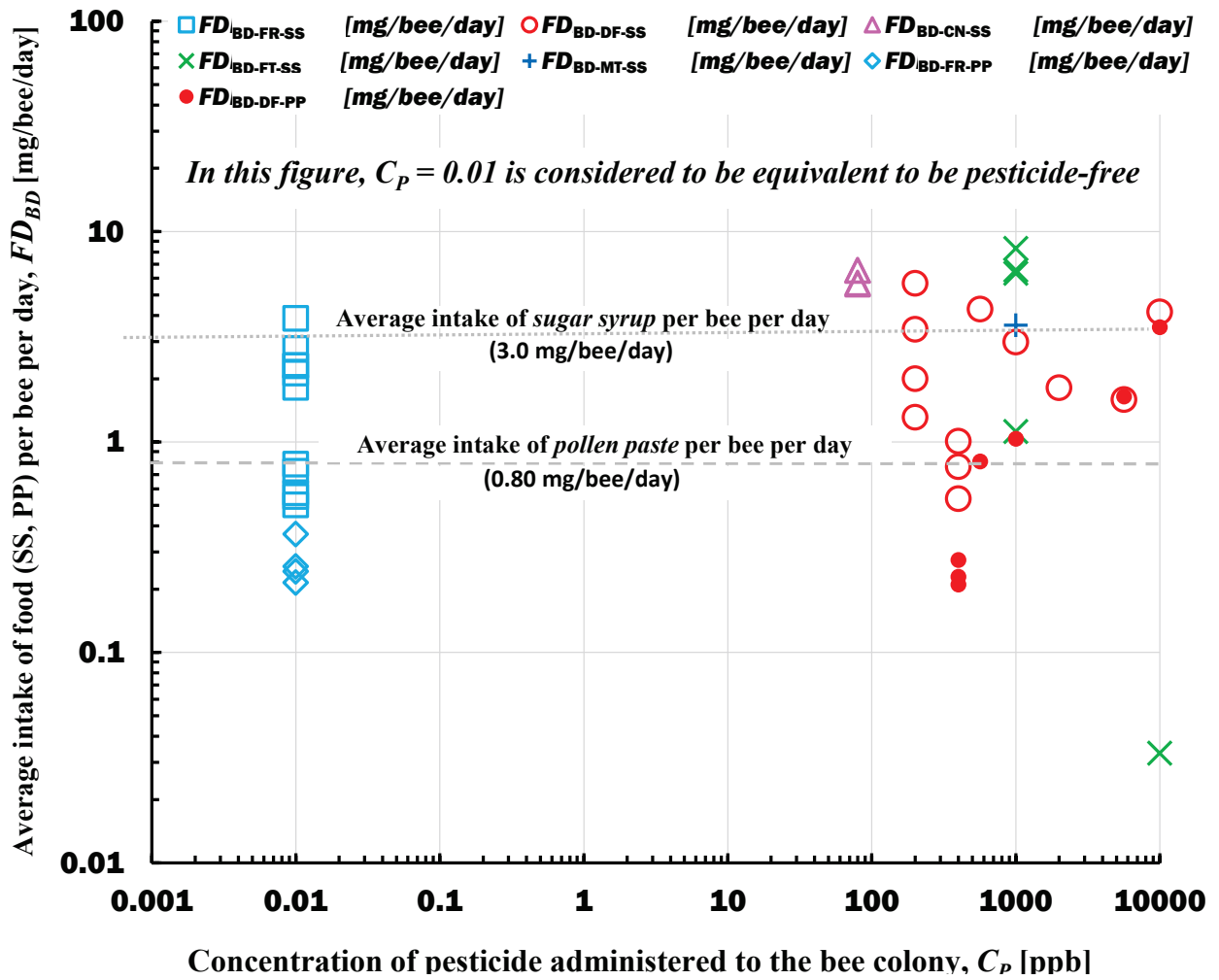


Figure 6. Relationship between the administration concentration of pesticide to the bee colony and the average daily intake of food (sugar syrup, pollen paste) per bee during the administration period

Table 1. Comparison between long-term field experiments and LD_{50} measurement experiments in the investigation of the effects of pesticides on bees

Item	Long-term field experiment	LD_{50} measurement experiment
Experimental method	Field experiment	Lab experiment
Differences from real phenomena in apiaries	Small	Large
Experimental object	An almost complete bee colonies close to an actual apiary that satisfies the hierarchical social structure (polyethism) with a division of labor as a social insect (composed of queens, numerous worker bees, male bees, eggs, larvae, pupa, etc.)	Extremely incomplete bee colonies consisting of only a single few worker bees
Experimental environment	(1) Open system / difficult to control (2) Environments close to real apiaries can be reproduced	(1) Closed system / easy to control (2) An artificial environment far from reality
Weather (temperature, humidity, wind speed, etc.) management	Unmanageable	Manageable
Ecological adequacy	High	Low
Bee behavior management	Unmanageable	Manageable
Foraging status of food containing pesticides	Since it is uncontrolled and can be ingested freely or not, it is difficult to grasp the exact amount of intake	No ingestion from outside the controlled laboratory (management of intake, place of ingestion, etc.)
Intake of food, water, etc.	Food can be freely and selectively taken from the open air without restrictions	No ingestion from outside the controlled laboratory (management of intake, place of ingestion, etc.)
Controlling Variables	Many confounding variables and difficulty in controlling	Easy to control
Repeated measurements	Difficult	Easy
Physiological behavior of bees (mating, rearing)	Maintenance of sound activity as a eusocial insect	Inability to maintain behavior as eusocial insects

Table 2. Experimental conditions of six long-term field experiments for bee colonies

Experiment name	2010-Experiment	2011/2012-Experiment	2012/2013-Experiment	2013/2014-Experiment	2014/2015-Experiment	2018-Experiment
Experimental period (Experiment days)	July 18 to November 21, 2010 (126 days)	From July 9, 2011 to April 2, 2012 (268 days)	From June 28, 2012 to July 26, 2013 (393 days)	From August 13, 2013 to February 28, 2014 (199 days)	From October 22, 2014 to July 20, 2015 (271 days)	From Jul. 19, 2018 to Dec. 16, 2018 (180 days)
Experimental site (latitude and longitude)	Shika (mid-west Japan) (37°13'N, 136°46'14" E, 43m above sea level)	Same as on the left	Same as on the left	Same as on the left	Maui (Hawaii) (20°55'00.2" N, 156°30'39.2" W)	Shika (mid-west Japan) (37° 2' 25" N, 136° 45' 28" E, 70m above sea level)
Object of Study	To investigate the possibility for a neonicotinoid of causing a CCD	To investigate the difference in the long-term influence on a bee colony between toxic sugar syrup (honey) as an energy source and toxic pollen paste (bee bread) as a protein source which are exposed to a neonicotinoid	To investigate the difference in the long-term influence on a bee colony between a neonicotinoid and a organophosphate which are administered through sugar syrup	To investigate the difference in the long-term influence on a bee colony between a neonicotinoid and a organophosphate which are administered through sugar syrup under lower concentrations than in the previous work	To compare the long-term changes in colony size and apparent longevity between Shika (mid-west Japan) with mites and cold winter and Maui (Hawaii) without both	To investigate the seasonal changes in colony size and mite-prevalence in a honeybee colony exposed to dinotefuran via pollen paste and infested with Varroa mites
Circumstances around Experimental Site						
Limitation of honeybee activities	Honeybees can freely forage about for food in a hive or in fields	Same as on the left	Same as on the left	Same as on the left	Same as on the left	Same as on the left
Impact of other pesticide than the administered one on the environment	A pesticide-free watering place & a pesticide-free field of flowers in the apiary	Same as on the left	Same as on the left	Same as on the left	Experimental site is located in organically-grown macadamia trees	A pesticide-free watering place & a pesticide-free field of flowers in the apiary
Aerial-crop-dusting farmland near expit. Site	Nothing	Nothing	Nothing	Nothing	Nothing	Nothing
Seasonal changes	Distinct	Distinct	Distinct	Distinct	Indistinct (without cold winter)	Distinct
Experimental Conditions						
Initial numbers of apiaries, colonies and combs (frames)	1 apiary (private), 8 colonies per apiary, 6 combs per colony	1 apiary (private), 5 colonies per apiary, 3 combs per colony	1 apiary (private), 4 colonies per apiary, 3 combs per colony	1 apiary (private), 6 colonies per apiary, 3 combs per colony	1 apiary (private), 6 colonies per apiary, 3 combs per colony	1 apiary (private), 6 colonies per apiary, 3 combs per colony
Initial number of bees per colony	9000 to 12000 bees (accurately counted on photos)	1700 to 3400 bees (accurately counted on photos)	5600 to 7100 bees (accurately counted on photos)	5400 to 7600 bees (accurately counted on photos)	5400 to 7600 bees (accurately counted on photos)	7000 to 9000 bees (accurately counted on photos)
Initial number of capped brood per colony	1.5 to 7 full-surfaces on comb converted from the sum total of every area occupied by capped (obtained from photos)	2600 to 6100 capped brood (accurately counted from photos)	4000 to 5700 capped brood (accurately counted from photos)	4200 to 7600 capped brood (accurately counted from photos)	4200 to 7600 capped brood (accurately counted from photos)	3100 to 6900 capped brood (accurately counted from photos)
Kind of pesticide	Dinotefuran, Clothianidin	Dinotefuran	Dinotefuran, Fenitrothion	Dinotefuran, Clothianidin, fenitrothion, Malathion	Dinotefuran, Clothianidin, fenitrothion	Dinotefuran
Concentration of pesticide	Dinotefuran: 1, 2, 10 ppm, Clothianidin: 0.4, 2, 4 ppm	Dinotefuran: 1 & 10 ppm in sugar syrup, 0.565 & 5.65 in pollen paste	Dinotefuran: 2 ppm in sugar syrup, Fenitrothion: 10 ppm in sugar syrup	Dinotefuran: 0.2 ppm in sugar syrup, Clothianidin: 0.08 ppm in sugar syrup, Fenitrothion & Malathion: 1 ppm in sugar syrup	Dinotefuran: 0.2 ppm in sugar syrup, Clothianidin: 0.08 ppm in sugar syrup, Fenitrothion 1 ppm in sugar syrup (Same as 2013/2014 experiment in Shika)	Dinotefuran: 0.4 ppm in pollen paste
Origin of a queen	Unknown in detail (<i>Apis mellifera</i>) Bee colonies purchased from a bee farm	Same as on the left	Same as on the left	Same as on the left	Sister relationship among queens	Sister relationship among queens
Experimental Methods						
Interval of experiment	About one-week interval	About one-week interval	About one-week or two-weeks interval	Same as on the left	About two-weeks or more interval	About two-weeks
Administration period of pesticide	Till colony extinction or from July 18, 2010 to November 21 (126 days)	Till colony extinction or from July 9, 2011 to December 3 (147 days)	Till colony extinction or from July 21, 2012 to August 16 (26 days)	Till colony extinction or from September 5, 2013 to December 1 (87 days)	Till colony extinction or from October 23, 2014 to April 4, 2015 (163 days)	From July 1, 2018 to the colony extinction
Starting time of each observation	Just after dawn if possible (before bees go out to forage)	Same as on the left	Same as on the left	Same as on the left	Same as on the left	Same as on the left
Vehicle to administer a pesticide	Both sugar syrup and pollen paste	Either sugar Syrup or pollen paste	Sugar syrup	Sugar syrup	Sugar syrup	Pollen paste
Administration method of pesticide (sugar syrup and pollen paste were fed as food)	A pesticide was dissolved in sugar syrup and pollen paste was made after pollen was kneaded with toxic sugar syrup containing the pesticide. Both toxic sugar syrup and toxic pollen paste were fed into a hive.	A pesticide was dissolved in sugar syrup or pollen paste was made after pollen was kneaded with toxic sugar syrup containing the pesticide. Either toxic sugar syrup or toxic pollen paste was fed into a hive to administer a pesticide.	A pesticide was dissolved in sugar syrup. Only toxic sugar syrup was fed into a hive to administer a pesticide. Pollen paste is pesticide-free.	A pesticide was dissolved in sugar syrup. Only toxic sugar syrup was continuously fed into a hive with an auto-feeding system composed of 10 L (14 kg syrup) container. Pollen paste is pesticide-free.	Same as on the left	Pollen paste was made after pollen was kneaded with toxic sugar syrup containing the pesticide. Sugar syrup is pesticide-free.
Counting method of the number of adult bees	Roughly counted from photos of combs with bees and bees left in a hive after every comb was removed from it	Directly counted with accuracy from photos of combs with bees and bees left in a hive after every comb was removed from the hive with the help of a automatic counting software.	Same as on the left	Same as on the left	Same as on the left	Same as on the left
Counting method of the number of capped brood	Expressed by the number of surfaces on combs (frames) which are entirely occupied by capped brood using the photos of combs	Accurately counted from photos of combs without bees after shaking the bees off each comb with the help of a automatic counting software.	Same as on the left	Same as on the left	Same as on the left	Same as on the left
Total intake of pesticide per colony	Calculated from sugar syrup & pollen paste with pesticide consumed by honeybees	Calculated from sugar syrup or pollen paste with pesticide consumed by honeybees	Calculated from sugar syrup with pesticide consumed by honeybees	Same as on the left	Same as on the left	Calculated from pollen paste with pesticide consumed by honeybees
Estimation of the intake of pesticide per bee	Unestimated	Estimated from dividing the total intake of pesticide per colony by the total number of initial & newly-emerged honeybees	Same as on the left	Same as on the left	Same as on the left	Same as on the left
Counting method of number of dead bees	Dead bees were accurately counted one by one inside and outside a hive which was placed on a large tray	Same as on the left	Same as on the left	Same as on the left	Same as on the left	Same as on the left
Confirmation and record methods of a queen	A photographic record of the existence of a queen in each colony	Same as on the left	Same as on the left	Same as on the left	Same as on the left	Same as on the left
Publication						
Experimental Results	T. Yamada et al. (2012). <i>Jpn. J. Clin. Ecol.</i> 21(1): 10-23.	T. Yamada et al. (2018a). <i>J. Biol. Ser.</i> 1(3): 084-107.	Yamada et al. (2018b). <i>J. Biol. Ser.</i> 1(3): 108-137	T. Yamada et al. (2018d). <i>J. Biol. Ser.</i> 1(4): 187-207.	T. Yamada et al. (2018c). <i>J. Biol. Ser.</i> 1(4): 156-186.	Toshiro Yamada (2020). <i>Eatlive: Journal of Dietetics Research and Nutrition</i> 7(1): 002.
Apparent longevity		Y. Yamada et al. (2019). <i>Scientific Reports</i> 9: 4102.			T. Yamada T and K. Yamada. (2020). <i>PeerJ</i> , 8:e9505	

Table 3. Intakes of sugar syrup, pollen paste and pesticide during the administration period to a bee colony in five long-term field experiments

Period & Site	Colony Name	Experimental Conditions				Per Colony					Per Bee			Per Bee Per Day			Mite Infection	Ref.
		Admin. Period	D _p ¹⁾	Pesticide	Vehicle ²⁾	C _p ³⁾	B _t ⁴⁾	SS _t ⁵⁾	PP _t ⁶⁾	P _t ⁷⁾	SS _b ⁸⁾	PP _b ⁹⁾	P _b ¹⁰⁾	SS _{bd} ¹¹⁾	PP _{bd} ¹²⁾	P _{bd} ¹³⁾		
		From	To	Day		ppm	head	g	g	mg	g/bee	g/bee	ng/bee	ng/bee/day	ng/bee/day	ng/bee/day		
9-Jul-2011 to 2-Apr-2012; Shika, Jpn	2011-CR-1	9-Jul-11	17-Dec-11	161	free	—	0	72273.2	26830.0	4243.0	0.0000	0.3712	0.0587	0.00	2.3058	0.3646	0.0000	
	2011-DF-1	9-Jul-11	21-Oct-11	104	DF	SS	1	13542.4	4208.0	1459.0	4.2080	0.3107	0.1077	310.73	2.9878	1.0359	2.9878	
	2011-DF-2	9-Jul-11	26-Nov-11	140	DF	PP	0.565	30282.3	18152.0	3430.0	1.8692	0.5994	0.1133	61.73	4.2816	0.8091	0.4409	
	2011-DF-3	9-Jul-11	16-Jul-11	7	DF	SS	10	6544.3	190.0	161.0	1.9000	0.0290	0.0246	290.33	4.1476	3.5145	41.4756	
	2011-DF-4	9-Jul-11	16-Jul-11	7	DF	PP	5.65	8078.3	90.0	93.0	0.5257	0.0111	0.0115	65.08	1.5916	1.6446	9.2965	
28-Jun-2012 to 26-Jul-2012; Shika, Jpn	2012-CR-1	21-Jul-12	1-Feb-13	195	free	—	0	88336.3	13500.0	0.0000	0.1528	0.00	0.7837	0.0000	0.0000	0.0000		
	2012-CR-2	21-Jul-12	1-Feb-13	195	free	—	0	95536.6	13500.0	0.0000	0.1413	0.00	0.7247	0.0000	0.0000			
	2012-DF-1	21-Jul-12	16-Aug-12	26	DF	SS	2	16478.1	776.0	1.5520	0.0471	94.19	1.8113	3.6225				
	2012-FT-1	21-Jul-12	16-Aug-12	26	FT	SS	10	19792.4	1707.0	17.0700	0.0863	862.45	3.3171	33.1712				
13-Aug-2013 to 28-Feb-2014; Shika, Jpn	2013-CR-1	13-Aug-13	7-Feb-14	178	free	—	0	23921.8	11840.0	0.0000	0.4949	0.00	2.7806	0.0000				
	2013-CR-2	13-Aug-13	28-Feb-14	199	free	—	0	18695.1	8590.0	0.0000	0.4595	0.00	2.3089	0.0000				
	2013-DF-1	5-Sep-13	1-Dec-13	87	DF	SS	0.2	8611.8	2570.0	0.5140	0.2984	59.69	3.4302	0.6860				
	2013-CN-1	5-Sep-13	1-Dec-13	87	CN	SS	0.08	10130.3	5020.0	0.4016	0.4955	39.64	5.6959	0.4557				
	2013-FT-1	5-Sep-13	1-Dec-13	87	FT	SS	1	19585.3	3860.0	3.8600	0.1971	197.09	1.1198	1.1198				
	2013-MT-1	5-Sep-13	1-Dec-13	87	MT	SS	1	15723.5	6750.0	6.7500	0.4293	429.29	4.9344	4.9344				
22-Oct-2014 to 26-Jul-2015; Maui, USA	2014-CR-1	23-Oct-14	4-Apr-15	163	free	—	0	39119.9	11570.0	0.0000	0.2958	0.00	1.8145	0.0000				
	2014-CR-2	23-Oct-14	4-Apr-15	163	free	—	0	18722.8	11795.0	0.0000	0.6300	0.00	3.8649	0.0000				
	2014-CR-3	23-Oct-14	4-Apr-15	163	free	—	0	34679.7	12000.0	0.0000	0.3460	0.00	2.1228	0.0000				
	2014-DF-1	23-Oct-14	18-Feb-15	118	DF	SS	0.2	8910.1	1377.0	0.2754	0.1545	30.91	1.3097	0.2619				
	2014-DF-2	23-Oct-14	4-Apr-15	163	DF	SS	0.2	12866.0	11905.0	2.3810	0.9253	185.06	5.6767	1.1353				
	2014-DF-3	23-Oct-14	4-Apr-15	163	DF	SS	0.2	83219.7	44924.0	8.9848	0.5398	136.94	1.9993	0.5072				
	2014-CN-1	23-Oct-14	4-Apr-15	163	CN	SS	0.08	24651.4	26213.0	2.0970	1.0633	85.07	6.5236	0.5219				
	2014-CN-2	23-Oct-14	4-Apr-15	163	CN	SS	0.08	20245.8	18531.0	1.4825	0.9153	73.23	5.6153	0.4492				
	2014-CN-3	23-Oct-14	17-Mar-15	145	CN	SS	0.08	18511.4	17573.0	1.4058	0.9493	75.94	6.5469	0.5237				
	2014-FT-1	23-Oct-14	4-Apr-15	163	FT	SS	1	20039.8	27180.0	27.1800	1.3563	1356.30	8.3209	8.3209				
	2014-FT-2	23-Oct-14	4-Apr-15	163	FT	SS	1	26299.8	28080.0	28.0800	1.0677	1067.69	6.5502	6.5502				
	2014-FT-3	23-Oct-14	4-Apr-15	163	FT	SS	1	44940.2	46338.0	46.3380	1.0311	1031.10	6.3258	6.3258				
19-Jun-2018 to 14-Dec-2018; Shika, Jpn	2018-CR-1	1-Jul-18	16-Dec-18	168	free	—	0	67063.2	5664.1	2415.9	0.0000	0.0845	0.0360	0.00	0.5027	0.2143	0.0000	
	2018-CR-2	1-Jul-18	2-Dec-18	154	free	—	0	79002.3	6973.1	3118.5	0.0000	0.0883	0.0395	0.00	0.5731	0.2565	0.0000	
	2018-CR-3	1-Jul-18	2-Dec-18	154	free	—	0	74800.7	6349.4	2789.1	0.0000	0.0849	0.0373	0.00	0.5512	0.2422	0.0000	
	2018-DF-1	1-Jul-18	2-Dec-18	154	DF	PP	0.4	42272.4	6474.9	1793.2	0.8173	0.1532	0.0424	19.33	1.0078	0.2753	0.1255	
	2018-DF-2	1-Jul-18	2-Dec-18	154	DF	PP	0.4	81915.2	6782.6	2653.9	1.1586	0.0828	0.0324	14.14	0.5377	0.2104	0.0918	
	2018-DF-3	1-Jul-18	23-Oct-18	114	DF	PP	0.4	55166.7	4800.4	1440.3	0.6195	0.0870	0.0261	11.23	0.7632	0.2289	0.0985	

Note (1): Each intake is recalculated under the assumption that each total amount of honey, pollen and pesticide is taken by bees during the period of its administration.

Note (2): Since the figures in the table have been newly recalculated, they may differ slightly from the published figures. If there is no published data, leave it blank.

Note (3): "free" = pesticide free, "DF" = dinotofuran, "CN" = clothianidin, "FT" = fenitrothion, "MT" = malathion.

1) D_p denotes the number of days during pesticide administration.

2) "Vehicle" means food for administering the pesticide to colonies, SS and PP indicate sugar syrup and pollen paste, respectively.

3) C_p denotes the concentration of the pesticide administered to the colony.

4) B_t denotes the total number of bees that would have ingested pesticides in the colony during pesticide administration to the bee colony (D_p).

5) SS_t denotes the total intake of sugar syrup ingested by the colony during pesticide administration to the bee colony.

6) PP_t denotes the total intake of pollen paste ingested by the colony during pesticide administration to the bee colony.

7) P_t denotes the total intake of the pesticide ingested by the colony during pesticide administration to the bee colony.

8) SS_b denotes the total intake of sugar syrup ingested by one bee during pesticide administration to the bee colony, SS_b = SS_t/B_t.

9) PP_b denotes the total intake of pollen paste ingested by one bee during pesticide administration to the bee colony, PP_b = PP_t/B_t.

10) P_b denotes the total intake of the pesticide ingested by one bee during pesticide administration to the bee colony, P_b = P_t/B_t.

11) SS_{bd} denotes the average daily intake of sugar syrup ingested by one bee during pesticide administration to the bee colony, SS_{bd} = SS_t/B_t/D_p.

12) PP_{bd} denotes the average daily intake of pollen paste ingested by one bee during pesticide administration to the bee colony, PP_{bd} = PP_t/B_t/D_p.

13) P_{bd} denotes the average daily intake of the pesticide ingested by one bee during pesticide administration to the bee colony, P_{bd} = P_t/B_t/D_p.

Table 4. Literature values of median lethal Doses (LD_{50}) for the honeybee and various average values of the LD_{50} data for dinotefuran, clothianidin, fenitrothion and malathion

Pesticide	Literature values of Median Lethal Dose (LD_{50}) [ng/bee]							
	Acute oral toxicity (AOT)				Acute contact toxicity (ACT)			
	LD50 Test Duration (LD50-TD)				LD50 Test Duration (LD50-TD)			
	24 h (24h-LD50)	48 h (48h-LD50)	72 h (72h-LD50)	Unknown (UKN-LD50)	24 h (24h-LD50)	48 h (48h-LD50)	72 h (72h-LD50)	Unknown (UKN-LD50)
Dinotefuran (DT)	0.6 ^{a)}	7.6 ^{g)}		23 ^{o)}		24 ^{g)}		24 ^{o)}
	75 ^{b)}	22.3 ^{h)}		26.8 ^{p)}		56 ^{h)}		30 ^{o)}
		26.8 ^{q)}		32 ^{o)}				47 ^{o)}
				40 ^{q)}				61 ^{o)}
Averages of LD_{50} for DF	37.8 <i>(DF-Oral-24h-LD50)</i>	18.9 <i>(DF-Oral-48h-LD50)</i>		30.5 <i>(DF-Oral-UNK-LD50)</i>		40.0 <i>(DF-CTC-48h-LD50)</i>		40.5 <i>(DF-CTC-UKN-LD50)</i>
	28.2 ¹⁾				40.3 ²⁾			
	33.1 ³⁾							
Clothianidin (CN)	3.53 ^{c)}	3.35 ^{c)}	3.28 ^{c)}	7.9 ^{q)}		27.5 ⁱ⁾		41 ^{q)}
	21.8 ^{b)}	3.68 ⁱ⁾	18.0 ^{j)}	26.8 ^{p)}		44 ^{i,k)}		
	25.4 ^{d)}	3.8 ^{j,k)}	130 ^{e)}	41 ^{q)}		47 ⁱ⁾		
	330 ^{e)}	23 ⁱ⁾						
		25.4 ^{d)}						
		26.9 ^{j)}						
Averages of LD_{50} for CN	95.2 <i>(CN-Oral-24h-LD50)</i>	36.6 <i>(CN-Oral-48h-LD50)</i>	50.4 <i>(CN-Oral-72h-LD50)</i>	25.2 <i>(CN-Oral-UNK-LD50)</i>		39.5 <i>(CN-CTC-48h-LD50)</i>		41.0 <i>(CN-CTC-UKN-LD50)</i>
	54.0 ⁴⁾				39.9 ⁵⁾			
	48.7 ⁶⁾							
Fenitrothion (FT)		200 ^{m)}		160 ^{r)}	171 ^{l)}	160 ^{m)}		20 ⁿ⁾
				250 ^{s3)}	130 ^{s1)}			380 ^{u)}
					30 ^{s2)}			1660 ^{v)}
								200 ^{r)}
Averages of LD_{50} for FT		200.0 <i>(FT-Oral-48h-LD50)</i>		205.0 <i>(FT-Oral-UNK-LD50)</i>	110.3 <i>(FT-CTC-48h-LD50)</i>	160.0 <i>(FT-CTC-48h-LD50)</i>		565.0 <i>(FT-CTC-UKN-LD50)</i>
	203.3 ⁷⁾				343.9 ⁸⁾			
	305.5 ⁹⁾							
Malathion (MT)	380 ^{h)}	380 ^{h)}	400 ⁿ⁾	380 ^{q)}	270 ^{h)}	270 ^{h)}	160 ⁿ⁾	210 ^{q)}
								710 ^{v)}
Averages of LD_{50} for MT	380.0 <i>(MT-Oral-24h-LD50)</i>	380.0 <i>(MT-Oral-48h-LD50)</i>	400.0 <i>(MT-Oral-72h-LD50)</i>	380.0 <i>(72Oral-UNK-LD50)</i>	270.0 <i>(M-CTC-48h-LD50)</i>	270.0 <i>(MT-CTC-48h-LD50)</i>	160.0 <i>(MT-CTC-72h-LD50)</i>	460.0 <i>(MT-CTC-UKN-LD50)</i>
	385.0 ¹⁰⁾				324.0 ¹¹⁾			
	351.1 ¹²⁾							

Table 4a. List of literatures cited in Table 4.

- a) **hal.Science** https://hal.science/hal-01284436/file/13592_2014_Article_315.pdf. Toxicity and biochemical changes in the honey bee *Apis mellifera* exposed to four insecticides under laboratory conditions. MEI Badawy, HM Nasr, EI Rabea - *Apidologie*, 2015 – Springer. *Apidologie* volume **46**, pages 177–193 (2015).
<https://link.springer.com/article/10.1007/s13592-014-0315-0>. <https://hal.science/hal-01284436>.
- b) **Iwasa, T., N. Motoyama, J. T. Ambrose, and R. M. Roe.** 2004. Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honey bee, *Apis mellifera*. *Crop Prot.* **23**: 371–378.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0261219403002308>
- c) **Daniela LAURINO, Aulo MANINO, Augusto PATETTA, Marco PORPORATO.** 2013. Toxicity of neonicotinoid insecticides on different honey bee genotypes. *Bulletin of Insectology* **66** (1): 119-126.
https://www.researchgate.net/publication/287567686_Toxicity_of_neonicotinoid_insecticides_on_different_honey_bee_genotypes.
<https://www.semanticscholar.org/paper/Toxicity-of-neonicotinoid-insecticides-on-different-Laurino-Manino/75099b4749771d187531949d30cb683a7b351758>.
https://iris.unito.it/retrieve/handle/2318/134738/74225/Bull.of%20Insect._Toxicity%20of%20neonicotinoid.%20...%202013.pdf.
- d) **Jianxiu Yao, Yu Cheng Zhu, John Adamczyk.** 2018. Responses of Honey Bees to Lethal and Sublethal Doses of Formulated Clothianidin Alone and Mixtures. *Journal of Economic Entomology*, Volume **111**, Issue 4, August 2018, Pages 1517–1525, <https://doi.org/10.1093/jee/toy140>
<https://academic.oup.com/jee/article/111/4/1517/5034723>
- e) **J. Plant Prot. and Path., Mansoura Univ., Vol.8 (6), 261 – 263, 2017.** Selective Toxicity of Neonicotinoids Compounds against *Apis mellifera* Workers. Shaker, N. ; H. A. Mesbah; A. M. Kordy; Gehan F. Aly and Soheir T. Zaky
<https://www.semanticscholar.org/paper/Selective-Toxicity-of-Neonicotinoids-Compounds-Apis-Shaker-Mesbah/1790076f7a623ce938d7845da8af93c427168d24>.
https://www.researchgate.net/publication/335837929_Selective_Toxicity_of_Neonicotinoids_Compounds_against_Apis_mellifera_Workers.
- f) **Material Safety Data Sheet** Universal Crop Protection Alliance (UCPA) LLC
Product Name: Malathion 5 EC Product No.: 024.
http://fsl.agrian.com/pdfs/Malathion-5_MSDS.pdf.
- g) **Codling G, Naggar YA, Giesy JP, Robertson AJ.** Neonicotinoid insecticides in pollen, honey and adult bees in colonies of the European honey bee (*Apis mellifera* L.) in Egypt. *Ecotoxicology* 2018;**27**:122-31. *Ecotoxicology* (2018) **27**:122–131 DOI 10.1007/s10646-017-1876-2.
https://www.researchgate.net/publication/321083756_Neonicotinoid_insecticides_in_pollen_honey_and_adult_bees_in_colonies_of_the_European_honey_bee_Apis_mellifera_L_in_Egypt.
- h) **FAO Dinotefuran 2013.** FAO SPECIFICATIONS AND EVALUATIONS FOR AGRICULTURAL PESTICIDES. DINOTEFURAN.
(EZ)-(RS)-1-methyl-2-nitro-3-(tetrahydro-3-furylmethyl)guanidine (EZ)-(RS)-1-methyl-2-nitro-3-(tetrahydro-3 Food and Agriculture Organization of the United Nations.
https://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/Specs/Dinotefuran_2013.pdf.
- i) **Pesticides & Bee Toxicity**, Minnesota Department of Agriculture (MDA),
<https://www.mda.state.mn.us/protecting/bmps/pollinators/beetoxicity>.
- j) **Regulation (EU) No 528/2012** concerning the making available on the market and use of biocidal products. Evaluation of active substances. Assessment Report. Clothianidin. Product-type 18 (Insecticides, Acaricides and Products to control other Arthropods). October 2014. German.
<https://echa.europa.eu/documents/10162/2d76b3b2-0909-8a0e-82ce-77e346a40683>.
- k) **Regulation (EU) No 528/2012** concerning the making available on the market and use of biocidal products. Evaluation of active substances. Assessment Report. Clothianidin. Product-type 18 (Insecticides, Acaricides and Products to control other Arthropods). October 2014 Germany.
<https://echa.europa.eu/documents/10162/6f1a5175-f1eb-4e6b-4b49-8cea13efcf5a>.

Table 4a. List of literatures cited in Table 4 (continued)

l) Alkassab, A. T., and W. H. Kirchner. 2016. Impacts of chronic sublethal exposure to clothianidin on winter honeybees. *Ecotoxicology*. 25: 1000–1010.

<https://link.springer.com/article/10.1007/s10646-016-1657-3>.

m) Fenitrothion specs eval WHO January 2010

WHO SPECIFICATIONS AND EVALUATIONS FOR PUBLIC HEALTH PESTICIDES FENITROTHION O,O-dimethyl O-4-nitro-m-tolyl phosphorothioate. World Health Organization

https://portal-uat.who.int/pqweb/sites/default/files/vcp-documents/WHOVC-SP_Fenitrothion_2010.pdf

n) Malathion (Ref: OMS 1) - University of Hertfordshire

PPDB: Pesticide Properties DataBase Malathion (Ref: OMS 1) (Also known as: carbophos; maldison; mercaptothion; carbofos; ENT 17034) Last updated: 18/01/2023. University of Hertfordshire

<https://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/Reports/421.htm>.

For contact acute LD₅₀ & oral acute LD₅₀, worst case from 24, 48 and 72 hour values is selected. Generally, as 72 h-LD₅₀ is apt to be worst, test durations both LD₅₀s are considered to be 72 hours.

o) Regulation US EPA - Dinotefuran 2004. US EPA - Pesticides - Fact Sheet for Dinotefuran. United States Environmental Protection Agency. Pesticide Fact Sheet. Name of Chemical: Dinotefuran. Reason for Issuance: Conditional Registration. Year Issued: September 2004.

https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/registration/fs_PC-044312_01-Sep-04.pdf

p) Abafe et al. *J Environ Expo Assess* 2021;1:3 DOI: 10.20517/jeea.2021.04. (*Journal of Environmental Exposure Assessment*). Determination and dietary risk assessment of neonicotinoid and insect growth regulators in honey.

<https://www.oaepublish.com/jeea/article/view/4445>.

q) S1 Appendix. Environmental half-lives and LD₅₀ values used in AITL assessment.

<https://pdfs.semanticscholar.org/d947/6f85e9b661ca3bd9b1549d4f76ac4a3c31d7.pdf>.

s) IPCS INCHEM INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY ENVIRONMENTAL HEALTH CRITERIA 133 FENITROTHION.

<https://inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc133.htm>.

Original papers are as follows:

s1) TAKEUCHI, K., HIGO, M., & SAKAI, T. (1980) Susceptibility of the honey bees to several insecticides.

Bull. Fac. Agric. Tamagawa Univ., 20: 40-46.

s2) OKADA, I. & HOSHIBA, H. (1970) A laboratory experiment on some insecticides to honeybee. *Bull. Fac. Agric.*, Tamagawa Univ., 10: 79-85.

s3) CLINCH, P.G. & ROSS, G.M. (1970) Laboratory assessment of the speed of action on honey bees of orally

dosed insecticides. *N.Z. J. agric. Res.*, 13: 717-725.

t) Pesticide Risk Tool (PRT) Acute Pollinator Risk Index White paper October 2014.

file:///C:/Users/Toshiro%20YAMADA/Downloads/Pesticide%20Risk%20Tool%20%20Acute%20Pollinator%20Risk%20Index%20%20White%20paper_%202014.pdf.

https://www.researchgate.net/publication/331558881_Pesticide_Risk_Tool_Acute_pollinator_index_Integrated_Pest_Management_Institute_IPMI_61_pp.

u) US-EPA (United States Environmental Protection Agency) Reregistration Eligibility Decision (RED) Fenitrothion. Office of Prevention, Pesticides And Toxic Substances (7508W) EPA 738-R-95-018 July 1995 ES-EPA Archive Document.

<https://archive.epa.gov/pesticides/reregistration/web/pdf/0445.pdf>.

(See sufficient information from MRIDs 05001991, 00036935)

v) Supplier: EFEKTO. Material Safety Data Sheet Malathion DP.

Date Issued: June 2014 and is valid for 3 years from this date. Revision No: 5 Print Date: 3/10/14.

https://efekto.co.za/wp-content/uploads/2017/08/Malathion-DP_2014.pdf.