

네오니코티노이드계 농약의 사용방법에 따른 꿀벌엽상잔류 독성 평가

김진호^{1,3,*} · 배철한⁴ · 김창열^{2,†}

¹대구가톨릭대학교 일반대학원 독성학과, 대학원생

²대구가톨릭대학교 일반대학원 독성학과, 교수

³경북테크노파크 메디컬융합소재실용화센터, 연구원

⁴한국삼공, 팀장

(2024년 3월 19일 접수: 2024년 3월 27일 수정: 2024년 4월 4일 채택)

Evaluation of Neonicotinoid Pesticides' Residual Toxicity to Honeybees Following or Foliage Treatment

Jin Ho Kim^{1,3,*} · Chul-Han Bae⁴ · ChangYul Kim^{2,†}

¹Department of Toxicology, Daegu Catholic University, Gyeongsan, 38430, Republic of Korea

²Department of Toxicology, Daegu Catholic University, Gyeongsan, 38430, Republic of Korea

³Medical Convergence Material Commercialization Center, Gyeongbuk Technopark,
Gyeongsan, 38408, Republic of Korea

⁴Hankooksamgong Co. Ltd., Gimje, 54338, Republic of Korea

(Received February 28, 2024; Revised April 27, 2024; Accepted April 29, 2024)

요약 : 네오니코티노이드계 농약은 전세계적으로 사용되는 강력한 살충제이지만 환경, 생물에 잔류하여 악영향을 미치고 있다. 이에 본 연구는 네오니코티노이드계 농약인 imidacloprid와 clothianidin이 공시작물인 알팔파와 적용작물로 고추와 오이를 선정하여 토양처리 및 경엽처리에 따른 꿀벌 독성과 엽상 잔류량을 비교하여 기존 엽상잔류독성시험법의 문제점을 확인하고자 하였다. Imidacloprid와 clothianidin을 작물 또는 토양에 권장량 및 배수로 처리하고 시간에 따른 꿀벌의 치사율에 대한 RT₂₅를 확인하고 잎의 잔류농약을 HPLC로 측정하였다. 그 결과 경엽처리하였을 때 imidacloprid는 공시작물 RT₂₅가 1일 이하, 잔류량은 1.07 ~ 19.27 mg/kg이나 적용작물은 RT₂₅가 9일 이하, 잔류량은 1.00 ~ 45.10 mg/kg 수준이었다. clothianidin은 공시작물 RT₂₅가 10일 이하, 잔류량은 0.61 ~ 2.57 mg/kg이나 적용작물은 RT₂₅가 28일 이하, 잔류량은 0.13 ~ 2.85 mg/kg 수준이었다. 토양처리했을 때 imidacloprid와 clothianidin은 공시작물에서는 꿀벌에 영향을 미치지 않았으며 잔류량은 0.05 ~ 0.37 mg/kg 수준이었으나, 적용작물에서는 imidacloprid는 RT₂₅가 28일 이하였고 잔류량은 4.47 ~ 130.43 mg/kg 수준이었고, clothianidin은 RT₂₅가 35일 이하였고, 잔류량은 5.96 ~ 42.32 mg/kg 수준이었다. 결론적으로 꿀벌 독성과 엽상 잔류량을 작물간

†Corresponding author

(E-mail:cykim0813@cu.ac.kr)

* This article is a revision of the first author's master's thesis from University.

비교하였을 때 공시작물 보다 적용작물이 꿀벌의 치사율에 많은 영향을 미치고 잔류량도 높게 나타났고, 처리방법에 따라 비교하였을 때 적용작물에 대한 토양처리가 경엽처리에 비해 높은 RT_{25} 와 잔류량이 나타났다. 따라서 농약안전성 확보를 위해 제시된 시험법이 실제 적용작물과 농약 처리방법에 따라 차이가 있을 수 있어 imidacloprid와 clothianidin의 안전성 평가를 위하여 다양한 경로의 연구가 필요하다.

주제어 : 클로티아니딘, 이미다클로프리트, 네오니코티노이드, 살충제, 독성

Abstract : Neonicotinoid pesticides, widely used worldwide as potent insecticides, have been found to have detrimental effects on the environment and living organisms due to their persistent residues. This study aimed to investigate the neonicotinoid pesticides, imidacloprid, and clothianidin, focusing on their impact on honey bee toxicity and foliar residue levels. Alfalfa was selected as control crop while bell peppers, and cucumbers were chosen as representative application crops, respectively. The investigation involved comparing the toxicity and foliar residue levels resulting from soil and foliar treatments, with a focus on identifying potential shortcomings in conventional foliar residue toxicity testing methods. Imidacloprid and clothianidin were applied to crops or soil at recommended rates and through irrigation. The honey bee mortality rate (RT_{25}) over time was determined, and pesticide residues on leaves were quantified using High-Performance Liquid Chromatography (HPLC). The results revealed that foliar treatment with imidacloprid on alfalfa resulted in an RT_{25} of less than 1 day, with residues ranging from 1.07 to 19.27 mg/kg. In contrast, application on bell peppers showed RT_{25} within 9 days, with residues ranging from 1.00 to 45.10 mg/kg. Clothianidin foliar treatment displayed RT_{25} within 10 days on alfalfa, with residues between 0.61 and 2.57 mg/kg. On bell peppers, RT_{25} was within 28 days, with residues ranging from 0.13 to 2.85 mg/kg. Soil treatment with imidacloprid and clothianidin in alfalfa exhibited minimal impact on honey bees and residues of 0.05 to 0.37 mg/kg. However, in applied crops, imidacloprid showed RT_{25} within 28 days and residues ranging from 4.47 to 130.43 mg/kg, while clothianidin exhibited RT_{25} within 35 days and residues between 5.96 and 42.32 mg/kg. In conclusion, when comparing honey bee toxicity and foliar residues among crops, application crops had a more significant impact on honey bee mortality and higher residue levels compared to control crops. Moreover, soil treatment for application crops resulted in higher RT_{25} and residue levels compared to foliar treatment. Therefore, to ensure pesticide safety and environmental sustainability, diverse research approaches considering different crops and application methods are necessary for the safety assessment of imidacloprid and clothianidin.

Keywords : Clothianidin, Imidacloprid, Neonicotinoid, Pesticides, Toxicity

1. 서론

생태계에서 꿀벌은 식량 안보와 영양 보장 및 생물 다양성 측면에서 식물의 화분 매개자로 매우 중요한 역할을 담당하고 있다[1]. 국제연합식량농업기구(FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations)에서는 전 세계적으로 농작물의 75%는 곤충의 꽃가루받이에 의한 수분에 의존하고 그 중 꿀벌이 80%를 담당하고 있으며, 세계 식량의 90%를 차지하는

100대 주요작물 중 71종의 수분작용을 돕는데[2] 그 가치는 2,350~5,770억 달러로 추정된다[3]. 국내의 경우 한국농촌경제연구원은 2021년 양봉산업의 생산액은 축산업의 3.3%로 6,600억원이며 화분매개에 의존하는 농작물의 생산량은 약 270만톤으로 전체 농작물 생산량의 약 17.8%를 차지하고 있으며 채소와 과수 등 작목에 사용하고 있다[4]. 꿀벌은 생산성 및 품질향상, 노동력 절감 등의 이유로 식량생산의 안정성 측면에서 꿀벌은 중요한 위치를 가지나[5] 현재 전세계적

으로 집약적인 농업 관행, 토지 이용 및 경관 구조의 변화, 단일 재배 및 살충제, 외래 침입종, 질병, 해충 및 기후 변화로 인한 수분 매개자의 개체수가 지속적으로 감소 추세를 보이고 있다 [6]. 대부분의 곤충 수분 매개자 중 특히 꿀벌과 나비의 약 36%가 높은 수준으로 전 세계적으로 멸종 위기에 처해 있는데 인간의 영향으로 인해 현재 종의 멸종률이 정상보다 100에서 1,000배 높다. 특히 농약에 대한 위협성은 2006년 미국과 영국에서 꿀벌 군집 붕괴 현상(colony collapse disorder, CCD)이 보고된 이후 아시아 및 전세계에서도 보고됨에 따라 그 원인을 밝히기 위한 다양한 연구가 진행되고 있고 [7] 우리나라의 경우 2022년부터 전국적으로 CCD가 관측되고 있다 [8].

Neonicotinoid계 농약은 1990년대에 등장한 니코틴계 신경자극성 살충제로 독성과 침투이행성이 강해 다양한 해충에 효과적으로 사용되고 있다. 일반적으로 살포부위에만 효과를 발휘하는 농약과는 달리 잎이나 뿌리에 흡수되어 식물의 체관 및 수관을 타고 식물전체에 효과를 발휘하며 식물체 내부에 장기간 약효를 지속하는 특징을 지녀 약효가 길고 효과가 좋아 현재까지 농약 시장에서 큰 부분을 차지하고 주로 토양처리용으로 치료와 예방의 목적으로 사용되고 있다. 그 중 imidacloprid와 clothianidin은 thiamethoxam와 함께 꿀벌과 다른 화분 매개자에게 위험을 미칠 가능성이 있어 유럽연합 집행위원회(European commission)에 의해 일시적으로 사용 금지된 약물이다 [9]. Neonicotinoid계 농약은 꿀벌과 서양 뿔벌에서 대부분 높은 급성독성과 잔류독성을 나타냈고, 물과 토양 뿐만 아니라 과일과 채소에도 잔류하여 생식, 발달, 대사, 신경 등 건강에 악영향을 미친다 [10].

농촌진흥청에서는 농약안전성 확보를 위해 등록 신청한 농약 원제 및 품목에 대해 농약평가를 수행하는데 그 중 환경생물독성시험성적서에는 꿀벌의 안전성 확보를 위해 꿀벌에 한하여 농약 원제에 꿀벌 급성으로 직접적인 섭식과 접촉시험을 수행해야하고 품목에 대하여 작물에 농약 살포 후 나타나는 꿀벌 영향을 확인하는 꿀벌 엽상잔류독성시험과 야외 시험을 진행하여 독성결과에 따른 평가를 받게 된다 [11]. 이 중 엽상잔류독성시험의 경우 시험작물이 알팔파로 공시되어 있어 생육특성이 다른 실제 적용작물에 처리시 꿀

벌에 대한 영향이 상이하게 나올 수 있고 토양처리 물질의 경우에는 실제처리방법에 따라 처리하도록 명시되어 있으며 이는 엽상살포방법과 달리 작물 간 처리방법이 달라질 수 있기 때문에 꿀벌에 대한 영향이 다르게 나타날 수 있다. 그리고 토양 처리방법의 경우 꿀벌 접촉 가능성이 낮아 꿀벌영향이 저 평가될 가능성이 있으며, 침투이행성 농약의 경우 흡수이행 특성을 가지고 있어 꿀벌과 직접 접촉 가능성이 낮은 토양처리를 하더라도 뿌리로부터 흡수되어 줄기, 잎 등으로 이동 후 밖으로 침투 이행되어 표면에서의 영향이 나타날 수 있고 이행으로 인한 약효 발현까지의 기간이 있어 단시간 평가시 독성 영향이 저평가될 우려가 있다. 따라서 꿀벌에 직접 노출되어 단시간에 나타나는 영향을 평가하는 엽상잔류독성시험 방법은 농약의 특성과 처리방법이 다를 경우 즉 실제처리방법이 다양한 토양처리 물질이나 침투이행성으로 작물에 흡수되는 특성을 가진 농약에 의한 영향은 파악하기 어렵다. 꿀벌 감소 현상의 원인 중 하나로 지목된 neonicotinoid계열의 농약은 급성 접촉독성이 강하여 작물에 직접 살포하였을 경우 꿀벌에 크게 영향을 미치는 것으로 잘 알려져 있다 [12,13]. 하지만 입제 형태로 사용될 경우 직접 접촉 가능성은 낮더라도 침투이행성 특징을 가지고 있어 뿌리를 통해 흡수된 농약이 체내이동 기간과 잔류기간에 따라 활동 중인 꿀벌에 어떠한 영향을 미치는지에 대한 연구 자료는 부족한 현실이다. 또한 미국 환경보호청(Environmental protection agency, EPA) guideline과 국내 농촌진흥청의 환경독성시험기준과 방법에 제시된 엽상잔류독성시험법의 경우 시험작물이 알팔파로 한정되어 있어, 실제 적용작물과 살포방법에 차이가 있을 수 있고 작물체간에서도 생육특성이 달라 꿀벌에 대한 독성영향이 다르게 평가될 수 있다.

본 연구는 neonicotinoid계열의 농약인 imidacloprid와 clothianidin을 대상으로 엽상살포용 액상수화제와 토양처리용 입제 제형을 사용하여 공시작물과 실제 적용작물에 처리 후 기존의 엽상잔류독성시험법의 문제점을 확인하고 침투이행성 농약에 대한 꿀벌 위협성과 식물 잎에 흡수된 농약 잔류량과 꿀벌 독성과의 경향성 파악 등 꿀벌에 대한 안전성 평가를 위한 다양한 경로의 연구 필요성을 제안하기 위하여 수행하였다.

2. 실험

2.1. 시험생물

본 시험의 농약에 대한 독성을 조사하기 위해 사용된 생물은 국내 양봉업에 주로 이용되고 있는 서양종 꿀벌인 이탈리아벌(*Apis mellifera ligustica*)을 사용하였다. 시험에 사용된 꿀벌은 국내 양봉업체인 허니테크(Gyeonggi-do, Korea)로부터 분양받았으며, 시험 사용 전까지 야외 사육시설에서 순화 관리하였다. 사육시설은 태양광을 고려하여 야외의 평지에 설치하였으며, 강우를 대비한 비 가림과 직사광선을 차단 할 수 있는 그물 가림막을 설치하였다. 급여는 꿀벌의 활동에 의해 자연적으로 공급 되도록 하였으며, 우기 등의 기후조건에 의해 먹이가 충분히 공급되지 않을 경우 50%(w/v) 자당용액을 조제하여 봉군에 직접 급여하였다. 시험생물의 채집은 한 봉군 내의 건강하고 균일한 개체를 채집하여 CO₂를 이용하여 마취 후 출생 1~7일 연령의 어린 개체를 선별하여 사용하였다.

2.2. 시험작물

본 시험에 사용된 작물은 적용작물로는 오이(*Cucumis sativus*)와 고추(*Capsicum annuum*)를 사용하였으며 공시작물로는 알팔파(*Medicago sativa*)를 사용하였다. 적용작물은 실내온실에서 파종하여 5~6주간 성장 시킨 모종을 비가림 시설이 설치된 야외포장에 정식하였으며 입제처리구의 경우 정식과 동시에 토양 파구처리방법으로 시험농약을 처리하여 처리량에 따라 구분하였다. 작물의 관리는 점적호스를 이용하여 주 1~2회 관수하였으며 관행재배 방법으로 재배하였다. 공시작물인 알팔파는 비가림 시설이 설치된 야외포장에 직접 파종하여 재배하였으며 작물의 관리는 스프링 쿨러를 이용하여 관수하였다.

2.3. 시험물질

본 시험에 사용된 농약은 neonicotinoid 계열의 약제로 imidacloprid 8% 액상수화제(suspension concentrate, SC)와 2% 입제(granule, GR) 그리고 clothianidin 8% SC와 1.8% GR로 전북 김제의 농약사에서 실제 판매되는 제품을 구입하여 작물별로 비교하였다.

2.4. 시험물질 처리방법

시험물질의 처리는 행정규칙인 농약 및 원제의 등록기준의 제5조제1항제4호 관련인 환경생물 독성 시험기준과 방법의 꿀벌엽상잔류독성시험법에 따라 처리하였다. 액상수화제의 경우 모든 작물에 동일하게 CO₂ 스프레이를 이용하여 작물에 약액이 균일하게 묻도록 골고루 1회 직접 살포하였다. 살포량은 농약사용지침서에 제시된 사용농도 중 최대농도로 하였고 단위 면적당 살포 물량은 EPA의 standard spray volume의 4500 L·ha⁻¹를 기준으로 10 m² 당 4.5 L가 되도록 계산하여 imidacloprid와 clothianidin 모두 추천사용량 0.18 a.i./m²과 배량 0.36 a.i./m²으로 살포하였다. 입제 농약의 경우 적용작물인 고추와 오이에는 시험작물 모종의 정식과 동시에 토양 파구처리하였고, 공시작물인 알팔파의 경우에는 토양 혼합처리하였다. 처리량은 농약사용지침서의 약제별 사용방법 및 최대사용량을 기준으로 결정하였으며, imidacloprid의 경우에는 추천사용량 0.06 a.i./m²과 배량 0.12 a.i./m², clothianidin의 경우에는 추천사용량 0.018 a.i./m²과 배량 0.036 a.i./m²으로 처리하였다(Table 1).

2.5. 꿀벌 엽상잔류독성시험

본 시험에서 사용된 꿀벌 엽상잔류독성시험법은 미국 EPA의 Ecological Effects Test Guidelines [14]와 농촌진흥청의 농약 및 원제의 등록기준, 환경생물 독성 시험기준과 방법, “꿀벌 엽상잔류독성시험법”(농촌진흥청고시 제2015-4호)에 따라 수행하였다. 시험방법은 한 벌통에서 생산된 건강하고 활동성이 좋은 1~7일령 어린 일벌(*Apis mellifera* L.)을 사용하여 채취한 작물의 잎을 세절하여 골고루 섞은 후 시험용기 당 15 g씩 넣은 다음 CO₂ 가스로 마취시킨 꿀벌을 25마리씩 4반복으로 노출시켰다. 꿀벌을 잎에 노출시킨 후 24시간 치사 및 이상증상을 관찰하였다. 작물의 채집은 약제 살포 후 4시간과 이후 1~7일 간격으로 채집하였으며, 처리구별 3개 그루 이상의 잎을 상, 중, 하로 골고루 채집하여 전단의 처리방법과 동일하게 적용하였다. 시험의 결과는 25% 이하의 치사 및 무기력, 보행장애 등의 이상증상이 나타날 때까지 반복 수행하여 노출 후 꿀벌에 대한 치사율이 25% 미만으로 나타나는 시간인

Table 1. Dose of pesticides applied on the testing crops

Pesticide	Crop	Application rate Applied dose (a.i.)	
Imidacloprid 8% SC* (10 mL/20 L)	Alfalfa	2.25 mL/4.5 L/10 m ² (0.18 a.i./m ²)	4.5 mL/4.5 L/10 m ² (0.36 a.i./m ²)
	Cucumber		
	Pepper		
Clothianidin 8% SC (10 mL/20 L)	Alfalfa	2.25 mL/4.5 L/10 m ² (0.18 a.i./m ²)	4.5 mL/4.5 L/10 m ² (0.36 a.i./m ²)
	Cucumber		
	Pepper		
Imidacloprid 2% GR** (3 g/m ²), (3 g/tree)	Alfalfa	30 g/10 m ² (0.06 a.i./m ²)	60 g/10 m ² (0.12 a.i./m ²)
	Cucumber	3 g/tree (0.06 a.i./tree)	6 g/tree (0.12 a.i./tree)
	Pepper		
Clothianidin 1.8% GR (3 g/m ²), (1 g/tree)	Alfalfa	30 g/10 m ² (0.018 a.i./m ²)	60 g/10 m ² (0.036 a.i./m ²)
	Cucumber	1 g/tree (0.018 a.i./tree)	2 g/tree (0.036 a.i./tree)
	Pepper		

* SC : Suspension concentrate

** GR : Granule

RT(Residual toxicity)₂₅를 구하였다. 시험용기는 스테인리스 철망을 이용하여 직경 15 cm, 높이 5 cm의 원통형으로 덮개는 아크릴판으로 제작하여 시계를 확보한 케이스를 사용하였으며, 매일 50%(w/v) 자당용액을 급여하였다. 시험환경은 온도 25~35°C, 상대습도 50~80%가 유지되는 암실에서 수행하였으며 관찰시간 이외는 조명을 사용하지 않았다.

2.6. 작물 잎에서의 시험물질 잔류량 분석

작물의 잎에 잔존하는 시험물질량에 따른 시험생물의 영향을 알아보기로 하여 꿀벌 엽상잔류독성시험 수행시 사용된 동일한 작물의 잎에 대하여 엽상잔류분석을 실시하였다. 대상 작물의 잎은 꿀벌 엽상잔류독성시험에서 시험생물 노출 전 세절하여 골고루 섞은 잎에서 5 g씩 3회 분취하여 시험물질 분석에 이용하였다. 작물의 잎 각 5 g에 acetone 80 mL을 첨가하여 10,000 rpm에서 5분간 마쇄 추출하여 추출물을 흡입여과 하고 1,000

mL 분액깔대기에 옮긴 후 포화식염수 20 mL와 증류수 80 mL을 차례로 넣어 dichloromethane 100 mL로 분배 후 다시 50 mL을 첨가하여 2회 분배 추출하여 무수황산나트륨으로 수분을 제거한 후 35°C에서 감압 농축하였다.

Imidacloprid의 잔류분석은 clean up 과정으로 농축잔사를 ethyl acetate:hexane(50:50, v/v) 5 mL로 재용해 한 후 hexane 5 mL로 활성화시킨 silica SPE cartridge에 전개시키고 ethyl acetate:hexane(50:50, v/v) 15 mL로 세정한 후 ethyl acetate 15 mL로 용출하여 감압농축을 실시하고 완전히 건조 시킨 후 acetonitrile 4 mL로 정용하였다. 기기의 분석조건은 Table 2와 같다.

Clothianidin의 잔류분석은 clean up 과정으로 농축잔사를 hexane 5 mL로 재용해 한 후 hexane 5 mL로 활성화시킨 florisil SPE cartridge에 전개시키고 hexane 5 mL과 acetone:hexane(90:10) 5 mL에 차례로 세정한 후 acetone:hexane(60:40) 10 mL로 용출하여 감압농축을 실시하고 완전히

Table 2. Condition for the analysis of imidacloprid

Instrument	HPLC (Allience e2695)
Detector	UVD (Waters 2489 UVD)
Column	C18, 250x4.60 mm, 4 u
Column Temp.	40°C
Mobile phase	ACN:Water=40:60 (v/v)
Flow rate	1 mL/min
Wavelength	270 nm
Injection volume	10 μ L
Retention time	3.5 min

Table 3. Condition for the analysis of clothianidin

Instrument	HPLC (Allience e2695)
Detector	UVD (Waters 2489 UVD)
Column	C18, 250x4.60 mm, 4 u
Column Temp.	30°C
Mobile phase	ACN:Water=50:50 (v/v)
Flow rate	1 mL/min
Wavelength	270 nm
Injection volume	10 μ L
Retention time	3.4 min

건조 시킨 후 acetonitrile 4 mL로 정용하여 HPLC/ UVD로 분석하였다. 기기의 분석조건은 Table 3과 같다.

3. 결과 및 고찰

3.1. Imidacloprid 경엽 처리구의 꿀벌독성과 엽상 잔류량

Imidacloprid은 neonicotinoid계 농약으로 섭식 독성(48hr, LD₅₀)이 각각 0.0037 μ g/bee, 접촉독성(48hr, LD₅₀)이 0.041 μ g/bee로 급성독성이 강한 물질이고[15] 시험에 사용한 작물은 꿀벌을 화분 매개충으로 이용하는 대표적 시설 작물 중 생육 특성이 다른 가지과인 고추와 박과인 오이를 선택하였고 국내 시험기준과 방법에 공시된 시험작물인 알팔파와 비교하였다. 그 결과

imidacloprid 액상수화제 처리구에서 알팔파에서는 0.18 g a.i./m²인 기준량에서 0일차에 48%의 치사율로 가장 높은 독성을 보였으며, 1일차에서 8%의 치사율이 관찰되어 RT₂₅값은 1일 이하로 나타났다. 0.36 g a.i./m²인 배량에서 역시 0일차에 68%의 치사율로 가장 높은 독성을 보였으며 1일차에서 16%의 치사가 관찰되어 RT₂₅값이 1일 이하로 나타났다. 실제 농약이 사용되는 적용작물의 시험 결과 오이에서는 기준량에서 0일차에 71%의 치사율로 가장 높은 독성을 보였으며 1일차에서 치사율이 24%로 관찰되어 RT₂₅값이 1일 이하로 나타났으며, 배량에서는 0일차에 82%의 치사율로 가장 높은 독성을 보였고, 2일차에서의 치사율이 23%로 관찰되어, RT₂₅값이 2일 이하로 나타났다. 적용작물 고추의 경우 기준량에서 0일차에 43%의 치사율로 가장 높은 독성을 보였으며, 시간이 지날수록 치사율이 감소하여

Table 4. Foliage residual toxicity of imidacloprid SC (8%) to honeybee

Pesticide	Crop	Dose	Mortality (%)									RT ₂₅ *
			0 d	1 d	2 d	3 d	4 d	6 d	9 d	12 d		
Imidacloprid 8% SC	Alfalfa	0.18 g a.i./m ²	48	8	0	0	0	-**	-	-	1	
		0.36 g a.i./m ²	68	16	11	0	0	-	-	-	1	
	Cucumber	0.18 g a.i./m ²	71	24	2	0	0	-	-	-	1	
		0.36 g a.i./m ²	82	54	23	1	0	-	-	-	2	
	Pepper	0.18 g a.i./m ²	43	39	28	27	19	5	1	0	4	
		0.36 g a.i./m ²	60	51	35	37	30	28	20	0	9	

* The time to be less than 25% of honey bee's mortality

** Did not observe

Table 5. Residue in leaves after application of imidacloprid SC (8%)

Pesticide	Crop	Dose	Concentration (mg/kg)								
			0 d	1 d	2 d	3 d	4 d	6 d	9 d	12 d	
Imidacloprid 8% SC	Alfalfa	0.18 g a.i./m ²	8.10	6.01	3.81	1.07	N.D.*	-**	-	-	
		0.36 g a.i./m ²	19.27	9.13	7.17	4.94	2.25	-	-	-	
	Cucumber	0.18 g a.i./m ²	23.26	17.32	5.13	1.00	N.D.	-	-	-	
		0.36 g a.i./m ²	45.10	20.07	14.59	4.72	N.D.	-	-	-	
	Pepper	0.18 g a.i./m ²	18.20	-	-	8.98	-	3.87	4.73	2.26	
		0.36 g a.i./m ²	28.51	-	-	18.64	-	11.75	8.02	3.59	

* Not detected

** Did not observe

4일차에서 19%로 관찰되어 RT₂₅값이 4일 이하로 나타났으며, 배양에서는 0일차에 60%의 치사율로 가장 높은 독성을 보였고, 시간이 지날수록 치사율이 감소하여 9일차에서 20%로 관찰되어 RT₂₅값이 9일 이하로 나타났다(Table 4).

엽상 잔류량의 경우 알팔파에서는 기준량에서 0일차에 평균 8.10 mg/kg으로 가장 높게 나타났고, 4일차에서는 검출되지 않았으며, 배양에서는 0일차에 평균 19.27 mg/kg으로 가장 높게 나타났고, 4일차 시점에서는 2.25 mg/kg으로 나타났다. 적용 작물 오이에서는 기준량과 배양에서 0일차에 각각 평균 23.26 mg/kg, 45.10 mg/kg으

로 가장 높게 나타났으며, 4일차에서는 검출되지 않았다. 고추의 경우 기준량과 배양에서 0일차에 각각 평균 18.20 mg/kg, 28.51 mg/kg으로 가장 높게 나타났으며, 12일차에서 각각 평균 2.26 mg/kg, 3.59 mg/kg으로 나타났다(Table 5).

Imidacloprid는 경엽 처리시 꿀벌에 대한 영향은 알팔파와 오이 처리구에서는 RT₂₅값이 2일 이하로 비교적 낮아 잎 안으로 흡수 이행되어 대개 빠르게 감소하는 것으로 나타났으나 고추 처리구의 결과에서 9일까지 비교적 길게 영향이 지속되어 농약 잔류량에 따라 치사율의 경향성이 유사하게 나타나는 것을 확인하였다. 이러한 잔류농약

Table 6. Foliage residual toxicity of clothianidin SC (8%) to honeybee

Pesticide	Crop	Dose	Mortality (%)									RT ₂₅ *
			0 d	2 d	4 d	8 d	10 d	14 d	21 d	28 d		
Clothianidin 8% SC	Alfalfa	0.18 g a.i./m ²	100	94	49	7	0	-**	-	-	8	
		0.36 g a.i./m ²	100	100	88	47	0	-	-	-	10	
	Cucumber	0.18 g a.i./m ²	100	23	15	0	0	-	-	-	2	
		0.36 g a.i./m ²	100	100	75	15	0	-	-	-	8	
	Pepper	0.18 g a.i./m ²	100	100	100	92	90	82	24	0	21	
		0.36 g a.i./m ²	100	100	100	100	95	73	50	0	28	

* The time to be less than 25% of honey bee's mortality

** Did not observe

의 차이는 작물의 특성 및 생장 등에 따라 다르게 나타나는데[16] 시험작물인 알팔파의 경우 재배 유지 중인 대상을 사용하여 시험기간 동안 작물의 생장이 크게 증가하지 않으나 적용작물인 오이와 고추는 정식 후 14~28일 이후 전체적으로 생육이 급격히 증가하고[17] 특히 오이의 경우 두 작물과 비교하여 잎의 생장이 급격히 증가한다. 이러한 잎의 특성과 생육의 증가가 농약이 흡수되거나 희석되는 속도에 영향을 미쳐 꿀벌 노출 영향과 그에 따른 독성 영향이 다르게 난 것으로 생각된다.

3.2. Clothianidin 경엽 처리구의 꿀벌독성과 엽상 잔류량

Clothianidin은 neonicotinoid계 농약으로 섭식 독성(48hr, LD₅₀)이 각각 0.0038 μ g/bee, 접촉독성(48hr, LD₅₀)이 0.044 μ g/bee로 급성독성이 강하고[15] 수용해도가 높으며, 침투이행성 특성을 지닌 약제로 Clothianidin 액상수화제 처리구에서의 꿀벌엽상잔류독성시험 결과 공시작물인 알팔파에서는 0.18 g a.i./m²를 처리한 기준량에서 0일차에 100%의 치사율로 가장 높은 독성을 보였고, 8일차에서의 치사율은 7%로 관찰되어 RT₂₅값이 8일 이하로 나타났으며, 0.36 g a.i./m²를 처리한 배량에서는 2일차까지 100%의 치사율을 보였고, 8일차에서 47%, 10일차에서는 영향이 관찰되지 않아 RT₂₅값이 10일 이하로 나타났다. 적용 작물에서의 시험결과 오이에서는 기준량

에서 0일차에 100%의 치사율로 가장 높은 독성을 보였고, 2일차에서 치사율이 23%로 관찰되어 RT₂₅값이 2일 이하로 나타났으며, 배량에서는 2일차까지 100%의 치사율을 보였고, 8일차에서의 치사율이 15%로 관찰되어 RT₂₅값은 8일 이하로 나타났다. 고추의 경우, 기준량에서 4일차까지 100%의 치사율을 보였고, 21일차에서의 치사율이 24%로 관찰되어 RT₂₅값이 21일 이하로 나타났으며, 배량에서는 8일차까지 100%의 치사율을 보였고, 21일차에서 50%, 28일차에서는 영향이 관찰되지 않아, RT₂₅값은 28일 이하로 나타났다 (Table 6).

엽상 잔류량의 경우 알팔파에서는 기준량에서 0일차에 평균 1.28 mg/kg으로 가장 높게 나타났고, 8일차에서는 검출되지 않았으며, 배량에서는 0일차에 평균 2.57 mg/kg으로 가장 높게 나타났고, 10일차에서는 검출되지 않았다. 적용 작물 오이에서는 기준량에서 0일차에 평균 1.95 mg/kg으로 가장 높게 나타났고, 10일차에서는 검출되지 않았으며, 배량에서는 0일차에 평균 2.34 mg/kg으로 가장 높게 나타났고, 10일차에서는 0.16 mg/kg으로 나타났다. 고추의 경우, 기준량에서 0일차에 평균 1.69 mg/kg으로 가장 높게 나타났고, 21일차에서는 검출되지 않았으며, 배량에서는 0일차에 평균 2.85 mg/kg으로 가장 높게 나타났고, 28일차에서는 검출되지 않았다 (Table 7).

Table 7. Residue in leaves after application of clothianidin SC (8%)

Pesticide	Crop	Dose	Concentration (mg/kg)							
			0 d	2 d	4 d	8 d	10 d	14 d	21 d	28 d
Clothianidin 8% SC	Alfalfa	0.18 g a.i./m ²	1.28	0.94	0.63	N.D.*	N.D.	-**	-	-
		0.36 g a.i./m ²	2.57	1.55	1.19	0.61	N.D.	-	-	-
	Cucumber	0.18 g a.i./m ²	1.95	0.53	0.43	0.16	N.D.	-	-	-
		0.36 g a.i./m ²	2.34	1.11	1.13	0.32	0.16	-	-	-
	Pepper	0.18 g a.i./m ²	1.69	-	-	0.48	-	0.21	N.D.	N.D.
		0.36 g a.i./m ²	2.85	-	-	0.61	-	0.28	0.13	N.D.

* Not detected

** Did not observe

Clothianidin 역시 경엽 처리시 시험작물을 포함한 모든 작물이 빠르게 잎 안으로 흡수 이행되어 0일차에서 꿀벌의 영향과 잔류량이 가장 높고 시간 경과에 따라 독성이 서서히 감소하는 경향을 보였고 오이에서 가장 적은 RT₂₅값과 잔류량을 나타냈는데 다른 작물에 비하여 잎의 크기가 급격히 커지는 생육특성으로 잎에서의 농약 잔류량이 많이 희석되었을 것으로 판단된다. 고시에 명시된 공시작물인 알팔파를 적용작물 2종인 오이와 고추를 선택하여 비교 시험을 수행한 결과 공시작물과 적용작물, 적용작물 간에도 결과가 다르게 나타나 작물의 생육특성에 따라 약제의 영향이 다르게 나타나는 것을 확인하였다. 따라서, 공시작물인 알팔파를 이용하여 꿀벌독성을 평가할 경우 실제 살포되는 작물에서 미칠 수 있는 꿀벌의 영향을 정확히 판단할 수 없다고 판단된다. 급성독성 영향이 비슷한 clothianidin과 imidacloprid에 대한 꿀벌엽상잔류독성을 비교한 결과 꿀벌에 대한 영향은 clothianidin이 imidacloprid 보다 더 큰 영향을 보였으나 엽상 잔류량은 clothianidin이 imidacloprid 보다 크게 낮았다. 또한 작물 잎의 잔류량과 꿀벌의 영향에 대한 경향성은 비교적 유사하게 나타났으나 기준량과 배량을 비교하였을 경우 잔류량에 따른 꿀벌 독성이 정확히 일치하지는 않아 잔류량과 독성에 대한 상관관계는 정확히 판별할 수 없었다.

이는 물질의 분배계수, 수용해도 등의 물리화학적 특성과 잎의 형태 및 왁스층의 작용 등 작물의 생육특성에 따라 흡수량에 영향을 나타냄으로 [18] 보다 자세한 결과를 위해서는 추가적인 연구가 필요하다.

3.3. Imidacloprid 토양 처리구의 꿀벌독성과 엽상 잔류량

Imidacloprid 입제 처리구에서의 꿀벌엽상잔류 독성시험 결과 공시작물인 혼화처리한 알팔파에서는 기준량인 0.06 g a.i./m²과 배량인 0.12 g a.i./m² 모두에서 꿀벌의 영향은 관찰되지 않았다. 파구처리한 적용작물의 시험 결과 오이에서는 기준량에서 14일차에 28%의 치사율로 가장 높은 독성을 보였고, 21일차에서의 치사율은 8%로 관찰되어 RT₂₅값이 21일 이하로 나타났으며, 배량에서도 14일차에 48%의 치사율로 가장 높은 독성을 보였고, 21일차에서의 치사율이 22%로 관찰되어 RT₂₅값은 21일 이하로 나타났다. 고추의 경우 기준량에서 7일차에 33%의 치사율로 가장 높은 독성을 보였고 21일차에서의 치사율이 13%로 관찰되어 RT₂₅값이 21일 이하로 나타났으며, 배량에서는 14일차에 51%의 치사율로 가장 높은 독성을 보였고, 21일차에서 30%, 28일차에서는 8%의 치사율이 관찰되어 RT₂₅값을 28일 이하로 나타내었다(Table 8).

Table 8. Foliage residual toxicity of imidacloprid GR (2%) to honeybee

Pesticide	Crop	Dose	Mortality (%)									RT ₂₅ *
			0 d	2 d	4 d	7 d	14 d	21 d	28 d	35 d		
Imidacloprid 2% GR	Alfalfa	0.06 g a.i./m ²	0	1	0	0	0	-**	-	-	0	
		0.12 g a.i./m ²	0	0	0	0	0	-	-	-	0	
	Cucumber	0.06 g a.i./m ²	0	-	-	27	28	8	8	0	21	
		0.12 g a.i./m ²	0	-	-	44	48	22	10	5	21	
	Pepper	0.06 g a.i./m ²	0	-	-	33	28	13	5	0	21	
		0.12 g a.i./m ²	0	-	-	48	51	30	8	0	28	

* The time to be less than 25% of honey bee's mortality

** Did not observe

Table 9. Residue in leaves after application of imidacloprid GR (2%)

Pesticide	Crop	Dose	Concentration (mg/kg)								
			0 d	2 d	4 d	7 d	14 d	21 d	28 d	35 d	
Imidacloprid 2% GR	Alfalfa	0.06 g a.i./m ²	N.D.*	0.13	0.08	0.05	0.11	-**	-	-	
		0.12 g a.i./m ²	N.D.	0.15	0.12	0.37	0.16	-	-	-	
	Cucumber	0.06 g a.i./tree	N.D.	-	-	41.75	80.77	30.27	6.27	4.47	
		0.12 g a.i./tree	N.D.	-	-	114.81	110.84	41.27	7.56	8.00	
	Pepper	0.06 g a.i./tree	N.D.	-	-	80.51	67.33	32.16	30.11	6.54	
		0.12 g a.i./tree	N.D.	-	-	130.43	112.38	59.55	29.22	9.11	

* Not detected

** Did not observe

엽상 잔류량의 경우 알팔파에서는 기준량에서 2 일차에 평균 0.13 mg/kg으로 가장 높게 나타났고, 14일차에서는 0.11 mg/kg으로 나타났으며, 배량에서는 7일차에 평균 0.37 mg/kg으로 가장 높게 나타났고, 14일차에서는 0.16 mg/kg으로 나타났다. 적용 작물 오이에서는 기준량에서 14 일차에 평균 80.77 mg/kg으로 가장 높게 나타났고, 35일차에서는 4.47 mg/kg으로 나타났으며, 배량에서는 7일차에 평균 114.81 mg/kg으로 가장 높게 나타났고, 35일차에서는 8.00 mg/kg으로

로 나타났다. 고추의 경우, 기준량에서 7일차에 평균 80.51 mg/kg으로 가장 높게 나타났고, 35 일차에서 6.54 mg/kg으로 나타났으며, 배량에서는 7일차에 평균 130.43 mg/kg으로 가장 높게 나타났고, 35일차에서는 9.11 mg/kg으로 나타났다(Table 9).

실제 처리방법에 따라 혼화처리를 실시한 알팔 파의 기준량 및 배량에서는 꿀벌의 영향이 관찰 되지 않았으나 파구처리한 적용작물에서 꿀벌의 영향이 서서히 증가하여 14일 이후로 감소되어

Table 10. Foliage residual toxicity of clothianidin GR (1.8%) to honeybee

Pesticide	Crop	Dose	Mortality (%)								RT ₂₅ *
			0 d	2 d	4 d	7 d	14 d	21 d	28 d	35 d	
Clothianidin 1.8% GR	Alfalfa	0.018 g a.i./m ²	0	0	0	1	-**	-	-	-	0
		0.036 g a.i./m ²	1	0	0	0	-	-	-	-	0
	Cucumber	0.018 g a.i./tree	1	-	-	67	88	75	22	0	28
		0.036 g a.i./tree	0	-	-	77	100	92	24	1	28
	Pepper	0.018 g a.i./tree	2	-	-	82	70	46	2	0	28
		0.036 g a.i./tree	0	-	-	98	81	95	48	0	35

* The time to be less than 25% of honey bee's mortality

** Did not observe

입제 처리구가 경엽 처리구 보다 꿀벌의 영향이 길게 지속되는 것을 관찰하였다. 이는 침투이행성 특성에 의한 것으로 토양으로부터 흡수 이행된 농약이 잎까지 도달하여 꿀벌에 영향을 미치고 있음을 보여준다. 입제 처리구의 잔류량은 알팔파에서 0.05~0.37 mg/kg으로 낮게 나타났으며, 오이에서는 4.47~114.81 mg/kg, 고추에서는 6.54~130.43 mg/kg으로 높게 나타났다. 토양처리 결과를 바탕으로 추측해 보았을 때 토양 혼화처리는 뿌리에 직접 흡수되는 파구처리에 비하여 작물체내 흡수량이 많지 않을 것이라고 생각된다. 잔류량과 치사율의 경향은 경엽 처리와 유사하게 나타났으며, 최대 잔류량은 고추 배량 7일 차에서 130.43 mg/kg이며, 최대 치사율은 고추 배량 14일차에 51%로 나타났다. 입제 처리구의 경우 경엽 처리구와 비교하여 잎에서의 농약 잔류량에 비해 치사율이 그리 높지 않았다. 이는 작물의 특성 잎의 두께, 왁스층 여부, 기공의 수, 방향 등 잎의 특성과 관련하여 잎 표면에 배출되는 양과 관련이 있을 거라고 생각되고 침투이행성이 강한 약제의 토양처리시 뿌리를 통한 흡수이행으로 작물체 내에서 꿀벌에 영향이 미칠 수 있다는 것을 확인하였다.

3.4. Clothianidin 토양 처리구의 꿀벌독성과 엽상 잔류량

Clothianidin 입제 처리구에서의 꿀벌엽상잔류 독성시험 결과, 공시작물인 알팔파에서는 기준량

인 0.018 g a.i./m²과 배량인 0.036 g a.i./m² 모두에서 꿀벌의 영향은 관찰되지 않았다. 적용작물에서의 시험결과, 오이에서는 기준량에서 14일차에 88%의 치사율로 가장 높은 독성을 보였고, 28일차에서의 치사율은 22%로 관찰되어 RT₂₅값이 28일 이하로 나타났으며, 배량에서는 14일차에 100%의 치사율로 가장 높은 독성을 보였고, 28일차에서의 치사율이 24%로 관찰되어 RT₂₅값은 28일 이하로 나타났다. 고추의 경우, 기준량에서 7일차에 82%의 치사율로 가장 높은 독성을 보였고, 21일차에서 46%, 28일차에서 2%의 치사율이 관찰되어 RT₂₅값이 28일 이하로 나타났으며, 배량에서는 7일차에 98%의 치사율로 가장 높은 독성을 보였고, 28일차에서 48%, 35일차에서 치사율이 관찰되지 않아 RT₂₅값을 35일 이하로 나타냈다(Table 10).

엽상 잔류량의 경우 알팔파에서는 기준량에서 4일차에 평균 0.12 mg/kg으로 가장 높게 나타났고, 14일차에서는 검출되지 않으며, 배량에서는 4일차에 평균 0.19 mg/kg으로 가장 높게 나타났고, 14일차에서는 0.08 mg/kg으로 나타났다. 적용 작물 오이에서는 기준량에서 14일차에 평균 35.48 mg/kg으로 가장 높게 나타났고, 35일차에서는 5.96 mg/kg으로 나타났으며, 배량에서는 14일차에 평균 42.32 mg/kg으로 가장 높게 나타났고, 35일차에서는 6.88 mg/kg으로 나타났다. 고추의 경우, 기준량에서 7일차에 평균 30.13 mg/kg으로 가장 높게 나타났고, 35일차에서 8.30

Table 11. Residue in leaves after application of clothianidin GR (1.8%)

Pesticide	Crop	Dose	Concentration (mg/kg)								
			0 d	2 d	4 d	7 d	14 d	21 d	28 d	35 d	
	Alfalfa	0.018 g a.i./m ²	N.D.*	0.06	0.12	0.07	N.D.	-**	-	-	
		0.036 g a.i./m ²	N.D.	0.14	0.19	0.10	0.08	-	-	-	
Clothianidin 1.8% GR	Cucumber	0.018 g a.i./tree	N.D.	-	-	32.13	35.48	23.61	12.11	5.96	
		0.036 g a.i./tree	N.D.	-	-	40.31	42.32	40.87	12.54	6.88	
	Pepper	0.018 g a.i./tree	N.D.	-	-	30.13	21.13	16.11	9.01	8.30	
		0.036 g a.i./tree	N.D.	-	-	38.21	32.45	30.28	12.87	8.23	

* Not detected

** Did not observe

mg/kg으로 나타났으며, 배양에서는 7일차에 평균 38.21 mg/kg으로 가장 높게 나타났고, 35일차에서는 8.23 mg/kg으로 나타났다(Table 11).

Clothianidin의 입제처리구 결과도 마찬가지로 토양 혼화처리된 알팔파와 파구처리된 적용작물간에 꿀벌의 영향 및 잔류량의 차이가 나타났다. 천천히 독성을 나타내어 토양 혼화처리된 적용작물 알팔파에서는 처리 후 2주까지 꿀벌의 영향을 관찰할 수 없었으나, 파구처리된 적용작물의 RT₂₅값은 오이 28일, 고추 28~35일로 장시간 영향을 보였다. 입제처리구의 잔류량은 알팔파에서는 0.06~0.19 mg/kg으로 낮게 나타났으며, 오이에서는 5.96~42.32 mg/kg, 고추에서는 8.23~38.21 mg/kg으로 높게 나타났다. 최대 잔류량은 오이 배양 14일차에서 42.32 mg/kg으로 나타났으며 독성 또한 100% 치사율을 보여 가장 높게 나타났다. 시간 경과에 따른 잔류량과 치사율의 경향은 유사하게 나타났다. 이는 토양 혼화처리를 한 알팔파에서는 꿀벌의 영향이 나타나지 않았고 잔류량이 낮게 나타나 뿌리가 직접 닿아있는 파구처리방법에 비해 작물의 약제 흡수율이 적다고 생각된다. 따라서, 작물별 현행처리방법을 적용할 경우 처리방법이 달라 정확한 영향을 판단하기 어려워 작물별 토양 처리방법에 따라 약제에 대한 독성이 저평가될 수 있다고 판단된다.

침투이행성 특성이 강한 neonicotinoid계 농약을 사용하여 토양처리를 실시할 경우 흡수이행을 통

해 독성이 서서히 나타나 장시간 꿀벌에 영향을 끼칠 수 있어 이와 같은 특성을 가진 농약에 대하여 단기간의 시험결과 보다 장기적인 영향에 대한 검토가 이루어져야 할 것이며, 현행 시험법의 공시작물만으로는 엽상잔류독성 시험에서의 꿀벌의 영향을 정확히 평가할 수 없어 실제 농약을 등록하려는 작물에 적용하여 실험을 하거나 국내 특색에 맞는 적용작물을 선별하여 평가를 진행할 필요가 있다고 판단된다.

4. 결론

본 연구는 꿀벌 엽상잔류독성시험을 통해 침투이행성 특성을 가진 neonicotinoid계 농약인 imidacloprid와 clothianidin에 대한 독성을 공시작물과 적용작물간 차이를 조사하였으며, 제형별 특성에 따른 사용방법을 달리하여 노출경로에 따른 꿀벌의 영향을 조사하였고, 엽상 잔류분석을 통해 꿀벌 치사율과 농약 잔류량의 상관관계를 알아보았으며 이에 대한 결과는 다음과 같다.

1. 꿀벌엽상잔류독성시험 결과 엽상 및 토양 처리방법 모두에서 공시작물과 적용작물간 꿀벌의 영향이 다르게 나타났으며, 적용작물간에도 결과가 다르게 나타나 작물의 생육특성에 따라 약제의 영향이 다르게 나타나는 것을 확인하였다.

2. 현행처리 방법을 적용한 토양처리의 경우 토양 혼화처리를 한 알팔파에서는 적용작물의 파구처리방법에 비하여 꿀벌의 영향과 잔류량이 매우 낮게 나타났고, 작물별 현행처리방법을 적용할 경우 처리방법이 달라 정확한 영향을 판단하기 어렵다는 것을 확인하였다.

3. 잔류량과 꿀벌의 영향을 비교한 결과, 경영처리구에서의 독성과 잔류량은 처음 살포 이후 1월 안으로 흡수 이행되어 대개 빠르게 감소하는 반면 토양 처리구에서는 서서히 증가하여 장시간 지속됨을 관찰하였다.

4. 토양 파구처리에 대한 꿀벌엽상잔류독성시험 결과, 장시간 꿀벌에 대한 영향이 미치는 것이 관찰되어, 침투이행성이 강한 neonicotinoid계 농약이 뿌리로부터 흡수되어 잎 표면으로 침투이행하여 꿀벌에 영향을 끼치는 것을 확인하였으며, 동일 계통의 급성 영향이 비슷한 물질이라도 약제의 특성에 따라 엽상독성이 다르게 나타나는 것을 확인하였다.

따라서 정확한 위해성평가 및 꿀벌에 대한 안전성을 확보하기 위해서 물질의 특성 및 처리방법, 노출경로 등의 다양한 경로로 영향을 평가할 수 있는 연구 방법의 개발이 이루어져야 한다고 생각된다.

References

1. SG Potts, JC Biesmeijer, C Kremen, P Neumann, O Schweiger, WE Kunin, "Global pollinator declines: trends, impacts and drivers", *Trends Ecol. Evol.* Vol 25, No.6 pp. 345-353. (2010).
2. V Patel, N Pauli, E Biggs, L Barbour, B Boruff, "Why bees are critical for achieving sustainable development", *Ambio*, Vol 50, No.1 pp. 49-59, (2021).
3. SAM Khalifa, EH Elshafiey, AA. Shetaia, AAAEI-Wahed, AF Algethami, SG Musharraf, MF AlAjmi, C Zhao, SHD Masry, MMA-Daim, MF Halabi, G Kai, YA Nagggar, M Bishr, MAM Diab, HRE Seedi, "Overview of Bee Pollination and Its Economic Value for Crop Production", *Insects*, Vol 12, No.8 pp. 688. (2021).
4. HJ Yoon, KY Lee, YB Lee, MY Lee, K Sankar, JD Park, "Current Status of Insect Pollinators Use for Horticultural Crops in Korea", *Journal of Apiculture*, Vol 36, No.3, pp. 111-123, (2021).
5. SG Potts, VI Fonseca, HT Ngo, MA Aizen, JC Biesmeijer, TD Breeze, LV Dicks, LA Garibaldi, R Hill, J Settele, AJ Vanbergen, "Safeguarding pollinators and their values to human well-being", *Nature*, Vol 540, No. 7632, pp. 220-229, (2016).
6. R Brodschneider, K Crailsheim, "Nutrition and health in honey bees" *Apidologie*, Vol 41, pp. 278-294, (2010).
7. C Bae, K Cho, Y Kim, H Park, K Shin, Y Park, K Lee, "Honeybee Toxicity by Residues on Tomato Foliage of Systemic Insecticides Applied to the Soil", *Korean J. Pestic Sci.* Vol 17, No. 3, pp. 178-184, (2013).
8. Daejeon Regional Office of Meteorology, "e- whether you" Vol 28. (2022).
9. A Brandt, A Gorenflo, R Siede, M Meixner, R Buchler, "The neonicotinoids thiacloprid, imidacloprid, and clothianidin affect the immunocompetence of honey bees (*Apis mellifera* L.)", *J Insect Physiol*, Vol 86, pp. 40-47, (2016).
10. K Ahn, M Oh, H Ahn, C Yoon, G Kim, "Evaluation of Toxicity of Pesticides against Honeybee (*Apis mellifera*) and Bumblebee (*Bombus terrestris*)", *Korean J. Pestic Sci.* Vol 12, No.4, pp. 382-390, (2008).
11. Rural Development Administration. "Registration standards for pesticides and raw materials in law" (2022).
12. D Goulson, E Nicholls, C Botias, EL Rotheray. "Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers", *Science*, Vol 347 pp. 1255957, (2015).
13. GD Prisco, V Cavaliere, D Annoscia, P

- Varricchio, E Caprio, F Nazzi, G Gargiulo, F Pennacchio, "Neonicotinoid clothianidin adversely affects insect immunity and promotes replication of a viral pathogen in honey bees", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* Vol 110, pp. 18466-18471, (2013).
14. United States Environmental Protection Agency. "Ecological Effects Test Guidelines OPPTS 850.3030, Honey Bee Toxicity of Residues on Foliage", (2012).
15. Pesticide Properties Data Base, IUPAC agrochemical information, <http://agrochemicals.iupac.org>.(accessed 1. November 2020)
16. HY Kwon, TK Kim, SM Hong, CS Kim, MK Baek, DH Kim, KA, Son. "Removal of Pesticide Residues in Field-sprayed Leafy Vegetables by Different Washing Method", *Korean J. Pestic Sci.* Vol 17, No.4, pp. 237-243, (2013).
17. SK Min, CH Bae, YS Kim, CH Song, SB Koh, YK Park, "Foliage Residual Toxicity to Honeybee on Pepper and Cucumber Foliage of Systemic Insecticides by Root Uptake Into Crops", *Korean J. Pestic Sci.* Vol 23, No.1, pp. 8-16, (2019).
18. HW Jeon, SM Hong, JW Hyun, RY Hwang, HY Kwon, TK Kim, NJ Cho, "Deposit Amounts of Dithianone on Citrus leaves by Different Spray Methods" *Korean J. Pestic Sci.* Vol 20, No.1, pp. 1-6, (2016).