

Article Info

Corresponding Author e-mail:
sinemozturk@stu.comu.edu.tr

Institution: ¹ Çanakkale Onsekiz
Mart Üniversitesi, Lisansüstü
Eğitim Enstitüsü, Biyoloji
Anabilim Dalı, Çanakkale,
Türkiye

Article history

Received: 14/04/2025

Accepted: February 4/05/2025

Available online: 05/05/2025

Keywords:

Benalaxyl-M, honey bees,
ecotoxicology, in silico
modeling, QSAR, BeeToxAI

Anahtar Kelimeler:

Benalaxyl-M, bal arıları,
ekotoksikoloji, in silico
modelleme, QSAR, BeeToxAI

How to Cite: S. Öztürk, M.
Ömeroğlu

" Benalaxyl-M maddesinin arılar
üzerindeki toksik etkilerinin in
silico değerlendirilmesi",
*Environmental Toxicology and
Ecology*, c. 5, sayı. 1, ss. 51-59,
2025.

DOI:10.59838/etoxec.1674950

Benalaxyl-M maddesinin arılar üzerindeki toksik etkilerinin *in silico* değerlendirilmesi

Sinem Öztürk¹ , Murat Ömeroğlu¹ 

ÖZET

Bu çalışmada, fenilamid grubuna ait sistemik bir fungusit olan ve tarımda özellikle *Phytophthora*, *Pythium* ve *Peronospora* gibi oomycete mantarlarının neden olduğu hastalıklara karşı kullanılan Benalaxyl-M maddesinin bal arıları (*Apis mellifera*) üzerindeki akut toksik etkileri, makine öğrenimi tabanlı bir QSAR (Kantitatif Yapı-Aktivite İlişkisi) aracı olan BeeToxAI kullanılarak *in silico* yöntemlerle değerlendirilmiştir. Analiz sonuçları, Benalaxyl-M'nin bal arıları için akut oral ve kontakt toksisite açısından toksik olmadığını (%83-86 güvenilirlik) göstermiştir. Uygulanabilirlik Alanı analizi, tahminlerin güvenilir olduğunu doğrularken, katkı haritaları moleküldeki toksisiteye katkı yapan fonksiyonel grupları belirlemede kullanılmıştır. Elde edilen bulgular, Benalaxyl-M'nin bal arıları üzerindeki düşük akut riskini ortaya koysa da, sonuçların deneysel çalışmalarla desteklenmesi önerilmektedir. Bu çalışma, pestisitlerin ekotoksikolojik risk değerlendirmelerinde yapay zekâ tabanlı araçların potansiyelini vurgulamaktadır.

In silico evaluation of toxic effects of Benalaxyl-M on bees

ABSTRACT

This study evaluated the acute toxic effects of Benalaxyl-M on honey bees (*Apis mellifera*) using BeeToxAI, a machine learning-based QSAR (Quantitative Structure-Activity Relationship) tool, through *in silico* methods. The analysis results indicated that Benalaxyl-M is non-toxic in terms of acute oral and contact toxicity for honey bees (83-86% reliability). The Applicability Domain analysis confirmed the reliability of the predictions, while contribution maps identified functional groups contributing to toxicity. Although the findings suggest a low acute risk of Benalaxyl-M to honey bees, experimental validation is recommended. This study highlights the potential of AI-based tools in the ecotoxicological risk assessment of pesticides.

1. GİRİŞ

Pestisitler, tarımsal üretimde verim kayıplarını önlemek amacıyla yaygın kullanılsa da, kontrolsüz kullanımları ekosistemlerde kalıcı kirliliğe yol açmaktadır. Özellikle fungusitler, hedef dışı organizmalar üzerinde toksik etkileri nedeniyle biyoçeşitlilik kaybı ve gıda zincirinde birikim gibi sorunlara neden olur [1], [2].

Pestisitlerin %95'inden fazlası hedef dışı alanlara yayılarak su, toprak ve havada birikir. Örneğin, DDT gibi organoklorlu bileşikler, onlarca yıl çevrede kalabilir ve besin zincirinde birikerek yüksek trofik seviyelerdeki canlıları etkiler [1], [4]. Benalaxyl-M'in yüksek stabilitesi, sucul ekosistemlerde uzun süreli kalıntılara ve biyoakümülyasyona yol açabilir [3].

Pestisit kalıntıları, gıda ve su yoluyla insan vücuduna girerek akut zehirlenmeler, kanser, nörolojik bozukluklar ve üreme sorunlarına yol açabilir [3], [5]. Özellikle tarım işçileri ve kırsal kesimde yaşayanlar, yüksek maruziyet riski altındadır [6], [5]. Son çalışmalar, pestisitlerin bilişsel fonksiyonlarda azalmaya ve uyku bozukluklarına neden olduğunu ortaya koymuştur [6].

Benalaxyl-M, phenylamide grubuna ait bir fungusit olup, suda yüksek çözünürlüğü ve toprakta uzun yarılanma ömrü (~60 gün) nedeniyle yeraltı sularına sızma riski taşır [7]. EFSA (2010), Benalaxyl-M'in ADI (Kabul Edilebilir Günlük Alım) değerini 0.07 mg/kg vücut ağırlığı olarak belirlemiştir, ancak metaboliti olan benalaxyl asidin toksisitesi henüz tam olarak karakterize edilmemiştir [8]. Laboratuvar çalışmaları, bu fungusitin sucul organizmalarda endokrin sistem bozukluklarına neden olduğunu göstermektedir [3], [6]. Benalaxyl-M gibi sistemik fungusitlerin, sucul organizmalar üzerindeki ekotoksikolojik etkileri laboratuvar çalışmalarıyla belirlenmiş olsa da bal arıları gibi hedef dışı türlerdeki akut toksik etkileri hakkında sınırlı veri bulunmaktadır [9]. Özellikle bal arıları (*Apis mellifera*), polen taşıyıcılık rolleri nedeniyle ekosistem sürdürülebilirliği için hayati öneme sahip olmalarına rağmen, pestisit maruziyetine bağlı akut toksisite ve popülasyon kayıplarıyla karşı karşıyadır [10]. FAO (2021) verilerine göre, pestisitlerin kontrolsüz kullanımı, arı kolonilerinde %30-40'a varan azalmaya yol açmıştır. Bu durum, insan sağlığı ve gıda güvenliği açısından da küresel bir tehdit oluşturmaktadır [11]. Bal arıları, pestisitlerin sinir sistemi üzerinde inhibitör etki gösteren neonikotinoidler ve organofosfatlar gibi bileşiklere karşı özellikle savunmasızdır. Örneğin, imidacloprid gibi neonikotinoid pestisitlerin, arılarda yalnızca birkaç nanogramlık dozlarda bile (örneğin 3.7 ng/birey) ölümcül toksisiteye yol açtığı gösterilmiştir [12]. Arıların pestisitlere duyarlılığı, metabolizmalarının hızlı olması ve koloni dinamiklerinin karmaşıklığı nedeniyle deneysel çalışmalarla değerlendirilmesi zorlu bir süreçtir. Bu noktada, Niceliksel Yapı-Aktivite İlişkisi (QSAR) gibi *in silico* yöntemler, akut toksisite parametrelerinin hızlı ve düşük maliyetli tahmini için kritik bir rol oynamaktadır [13].

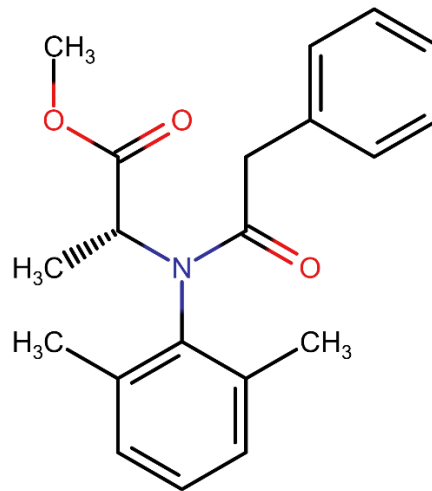
QSAR modelleri, kimyasal yapı ile toksisite arasındaki ilişkileri istatistiksel olarak analiz eder. Örneğin, OECD tarafından validasyonu yapılan modeller, Benalaxyl-M'in logP (oktanol-su dağılım katsayısı) değerini 3.2 olarak tahmin etmiş ve bu da biyoakümülyasyon potansiyelini desteklemiştir [14]. Bununla birlikte, Benalaxyl-M'in bal arıları üzerindeki toksik etkilerine yönelik çalışmalar sınırlı sayıdadır ve bu tür organizmalarla laboratuvar çalışmaları, koloni davranışları ve çevresel değişkenler gibi etmenler nedeniyle oldukça karmaşıktır aynı zamanda oldukça maliyetlidir. Bu durum *in silico* çalışmaların pestisit toksisite değerlendirilmesinde önemini artırmaktadır.

Bu çalışma, Benalaxyl-M'in bal arıları üzerindeki akut toksik etkilerinin QSAR tabanlı modellemelerle değerlendirilmesini amaçlamaktadır.

2. METOD

2.1. Benalaxyl-M maddesinin kimyasal yapısı

Benalaxyl-M için SMILES (Basitleştirilmiş Moleküler Giriş Satırı Giriş Spesifikasyonu) kodu Pubchem'den elde edildi. SMILES kodu CC1=C(C(=CC=C1)C)N([C@H](C)C(=O)OC)C(=O)CC2=CC=CC=C2'tür [15]. (Şekil 1)



Şekil 1. Benalaxyl-M maddesinin kimyasal yapısı

2.2. BeeToxAI

Bu çalışmada, kimyasalların bal arıları üzerindeki akut toksisitesini değerlendirmek için makine öğrenimi tabanlı, açık kaynaklı ve ücretsiz bir QSAR (Kantitatif Yapı-Aktivite İlişkisi) yapay zeka aracı olan BeeToxAI kullanılmıştır. Program, bal arılarında akut kontakt ve oral toksisitenin tahmini için, sıkı tahmin modelleme uygulamaları ve OECD yönergeleriyle tam uyumlu ilk web uygulamasıdır. Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Örgütü (OECD) ilkelerine ve Kimyasalların Kaydı, Değerlendirilmesi, İzni ve Kısıtlanması (REACH) düzenlemelerinin gerektirdiği testler listesine uygunluk göstermektedir. Bu özellikleri sayesinde, BeeToxAI regülasyonlara uygun ve güvenilir bir toksisite değerlendirmesi sağlamaktadır [16]. Ayrıca, QSAR modelleri tarafından üretilen katkı haritaları sayesinde, kimyasalların akut temas ve oral toksisitelerine katkıda bulunan atomlar ve fragmanlar belirlenebilmektedir. Bu yöntem, tahmin edilen sonuçların mekanistik yorumlanmasını kolaylaştırmakta ve kimyasalların toksisite potansiyelini azaltmak için yapısal modifikasyon önerileri geliştirilmesine yardımcı olmaktadır [17], [18]. BeeToxAI, yüksek tahmin gücüne sahip olup, doğruluk, hassasiyet ve özgüllük gibi sağlam validasyon metrikleri ile %83 ila %96 arasında başarı oranlarına ulaşmaktadır [19].

Akut oral toksisite için Random Forest algoritması (MACCS tanımlayıcıları ile), akut temas toksisitesi için ise Destek Vektör Makineleri (Support Vector Machine, SVM) algoritması (FeatMorgan FCFP2 tanımlayıcıları ile) uygulanmıştır.

Analizler, kullanıcı dostu arayüzü sayesinde üç basit adımda gerçekleştirilmiştir:

a) SMILES Girişi veya Moleküler Çizim

Kimyasalın SMILES gösterimi doğrudan ilgili alana yapıştırılabilir ya da modele entegre "Molecular Editor" (Moleküler Düzenleyici) aracı kullanılarak yapı çizilebilir.

b) Tahmin Süreci

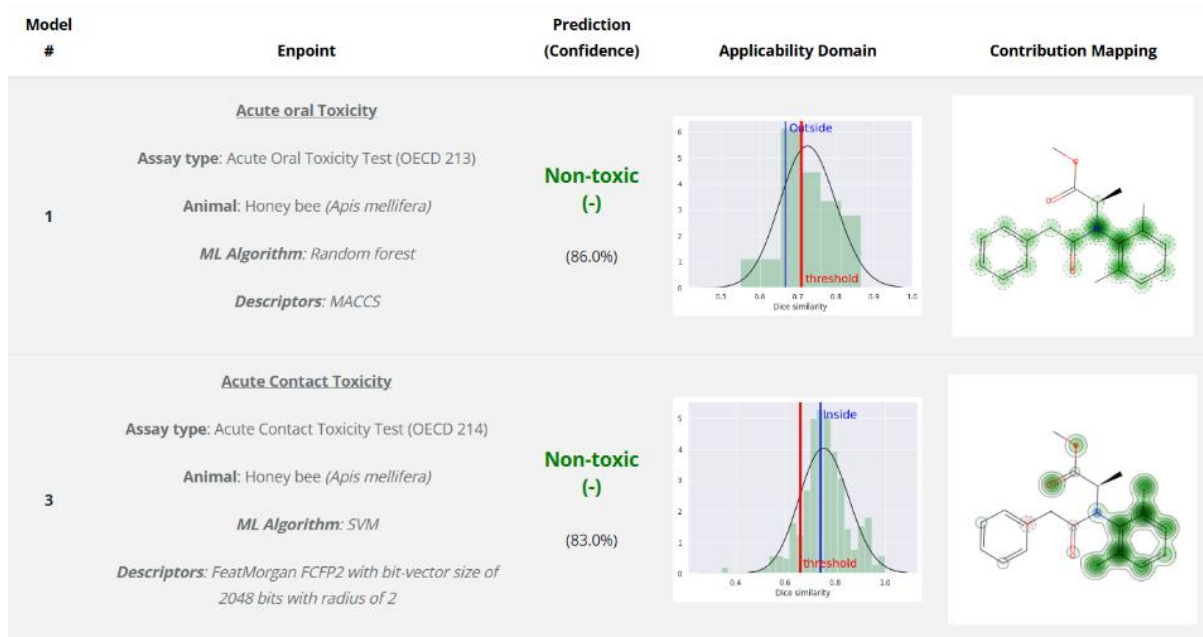
"Submit analysis" (Analiz Gönder) butonuna tıklanarak model tetiklenir. Tahminler, saniyeler içinde ekranda görüntülenir.

c) Sonuçların Yorumlanması

Model çıktıları, toksisite sınıflandırması, tahmin güvenilirliği, uygulanabilirlik alanı (AD) ve yapısal katkı haritalarını içermektedir. Katkı haritaları (contribution maps) aracılığıyla, moleküldeki toksisiteye katkı yapan atom/fragmanlar renk kodlu olarak vurgulanır. Bu haritalar, toksik etkiyi azaltacak yapısal modifikasyon önerileri için kullanılır.

3. SONUÇLAR

Benalaxyl-M maddesinin bal arıları (*Apis mellifera*) üzerindeki akut toksik etkileri, BeeToxAI platformu kullanılarak değerlendirilmiştir (Şekil 2). Programın sınıflandırma modellerine göre maddenin; akut oral toksisite açısından toksik olmadığı (%86 güvenilirlik), ve akut kontakt toksisite açısından da toksik olmadığı (%83 güvenilirlik) belirlenmiştir.



Şekil 2. BeeToxAI web sitesinden elde edilen analiz sonuçları

Uygulanabilirlik Alanı (Applicability Domain) analizi, maddenin modelin kimyasal uzayı içinde yer aldığını (Dice benzerlik skoru > eşik değeri) ve tahminlerin güvenilir olduğunu göstermiştir. Katkı Haritaları (Contribution Maps) ise molekülün toksisiteye katkı yapan fonksiyonel gruplarını mekanistik olarak yorumlamaya olanak sağlamıştır. Akut oral ve kontakt toksisite açısından, toksisiteye katkı sağlayan belirgin bir yapısal motif tespit edilmemiştir.

Bu sonuçlar, Benalaxyl-M'in bal arıları için akut toksik risk oluşturmadığını göstermektedir.

4. TARTIŞMA ve ÖNERİLER

Pestisitler tarımda çok yaygın olarak kullanılan, çeşitli bitki hastalıklarını önlemek ve zararlı organizmalarla mücadele etmek amacıyla kimi zaman çiftçiler tarafından yanlış ve gereğinden fazla uygulanan kimyasal ajanlardır. Pestisitlerin toksik yapıları sebebiyle insanlar da dahil olmak üzere hedef olmayan organizmalar ve çevre üzerinde zararlı etkiler gösterebilir [20]. 2022 yılında Türkiye'de toplam tarım ilacı kullanımı, bir önceki yıla göre %4,5 artış göstererek 55.374 tona ulaşmıştır. Bu miktarın %35,1'i fungusitlerden, %26,3'ü herbisitlerden (yabancı ot öldürücüler), %22,0'si insektisitlerden (böcek öldürücüler), %4,5'i akarisitlerden (akar öldürücüler), %0,5'i

rodentisitlerden (kemirgen öldürücüler) ve %11,6'sı ise bitki aktivatörleri, gelişim düzenleyiciler, cezbediciler, fumigantlar, nematositler, kükürt ve madeni yağlar gibi diğer ürünlerden oluşmaktadır [21]. Pestisitlerin bir alt grubu olan fungusitler, tarımda ürün hasarına sebep olan funguslarla (mantarlar) mücadele atma amacıyla kullanılır. Fungusitlerin bazıları çok toksiktir ve zehirlenmelere yol açabilir [22].

Pestisitlerin geniş çapta kullanımı, böcek ve özellikle arı popülasyonlarının ve biyoçeşitliliğin önemli ölçüde azalmasına yol açmıştır. Avrupa ülkelerinde böcek biyokütlesinde %70, tarım alanlarındaki kuş sayısında ise %50 oranında azalma bildirilmiştir [23]. Benzer şekilde, Avrupa, Avustralya ve Kuzey Amerika'da tür zenginliğinde %42'lik bir düşüş gözlemlenmiştir [24]. Pestisitlerin, özellikle neonicotinoid türlerinin, arı popülasyonları üzerinde doğrudan bir azaltıcı etkisi olduğu belirtilmektedir [25]. Araştırmalar, arıların yaşam döngüsündeki bozulmaların yanı sıra, beslenme ve üreme gibi önemli davranışlarını da olumsuz etkilediğini göstermektedir [26], [27].

Pestisit kalıntıları arılar üzerinde zararlı etkiler yaratmakta, bu da onların ekosisteme sağladığı hizmetlerin azalmasına neden olmaktadır. Birleşmiş Milletler 2016 yılında, özellikle arılar ve kelebekler gibi omurgasız tozlayıcıların %40'ının yok olma riskiyle karşı karşıya olduğu konusunda uyarıda bulunmuştur [28]. Ayrıca, Amerika ve Avrupa'da bal arısı popülasyonunda pestisitlerin yoğun kullanımı nedeniyle yaklaşık %30 oranında azalma yaşandığı rapor edilmiştir [11].

Pestisitlerin arılar üzerindeki etkilerini öngörmek ve araştırmak, tarımın sürdürülebilirliği ve ekosistem hizmetlerinin devamlılığı açısından hayati öneme sahiptir. Arılar, tozlaşma aracılığıyla bitki üretkenliğini artıran temel tozlayıcılardır ve ekosistemde vazgeçilmez bir rol oynarlar. Pestisit kaynaklı popülasyon azalmaları, sadece arıların biyolojik çeşitliliğini tehdit etmekle kalmaz, aynı zamanda meyve, sebze ve yağlı tohum üretimi gibi doğrudan ekonomik çıktılara da zarar verir. Bu nedenle, pestisitlerin arılar üzerindeki akut ve kronik toksik etkilerinin, davranışsal bozulmaların ve koloniler üzerindeki uzun vadeli sonuçlarının detaylı biçimde araştırılması gerekmektedir. Bu tür çalışmalar, çevre dostu pestisitlerin geliştirilmesi ve mevcut tarım uygulamalarının daha güvenli hâle getirilmesi için bilimsel bir zemin oluşturur. Ayrıca, yöneticilerin ve pestisit üreticilerinin daha etkili düzenlemeler oluşturabilmeleri açısından da bu araştırmalar yol gösterici niteliktedir.

US EPA'nın 2024 verilerine göre, pestisit kaydı için gerekli çalışmalardan bal arısı akut toksisite testlerinin maliyeti 9.500 dolar ile 26.300 dolar arasında değişmektedir. Polinatörler için yarı-saha çalışmalarının maliyeti ise 118.200 dolar ile 330.100 dolar aralığındadır. Bu maliyetler, bal arısı temas toksisitesi (9.500 dolar), yetişkin oral toksisite (26.300 dolar), koloni besleme çalışması (118.200 dolar) ve tünel çalışması (330.100 dolar) gibi testleri kapsamaktadır [29]. Yüksek test maliyetleri, hayvan deneylerindeki etik kaygılar ve zaman alıcı deneysel süreçler gibi kısıtlamalar, *in silico* test yöntemlerinin son yıllarda hızla gelişmesinin temel nedenlerini oluşturmaktadır. Ayrıca *in silico* hesaplamalı yöntemler, hayvan deneylerinde etik yaklaşımın temelini oluşturan 3R ilkesine ('değiştirme, azaltma, iyileştirme') uyum sağlamaktadır.

Bu çalışmada, Benalaxyl-M fungusitinin bal arısı (*Apis mellifera*) üzerindeki potansiyel akut toksik etkileri BeeToxAI platformu aracılığıyla *in silico* olarak değerlendirilmiştir. BeeToxAI'nin sınıflandırma algoritmaları, hem akut oral (OECD 213) hem de akut kontakt toksisite (OECD 214) testleri açısından maddenin toksik olmadığını öngörmüştür. Bu sonuçlar sırasıyla %86 ve %83 güven düzeyleriyle desteklenmiştir.

ABD Çevre Koruma Ajansı (U.S. EPA) tarafından geliştirilen bal arısı toksisite test kılavuzlarına göre, bir pestisit aktif bileşeni 11 µg/bee eşliğinin altında LD₅₀ değerine sahipse "yüksek ya da orta derecede toksik" olarak sınıflandırılmakta ve ek toksisite testlerine ihtiyaç duyulmaktadır [30]. BeeToxAI platformu da bu eşik değerini temel alarak bileşikler toksik (≤11 µg/bee) ve toksik olmayan (>11 µg/bee) olarak kategorize etmektedir. Bu bağlamda, Benalaxyl-M'nin hem oral hem de kontakt yoldan uygulanmasında eşik değerinin üzerinde bir güvenli aralıkta yer alması, bu maddenin akut toksisite açısından düşük riskli olduğunu göstermektedir.

Ayrıca, Uygulanabilirlik Alanı (Applicability Domain) analizleri, modelin verdiği tahminlerin kimyasal uzay açısından güvenilir olduğunu ortaya koymuştur. Dice benzerlik skorunun eşik değerin üzerinde olması, analizlerin Benalaxyl-M'ye benzer yapısal özellikler taşıyan bileşiklere dayandığını ve bu nedenle tahminlerin geçerli olduğunu göstermektedir. Molekülün toksisiteye katkı yapan ya da nötral kalan bölgelerini gösteren Katkı Haritaları (Contribution Maps), maddenin toksikolojik profiline dair mekanistik öngörüler sunarak hem risk değerlendirmesini derinleştirmiş hem de ileri çalışmalar için potansiyel modifikasyon alanlarını ortaya koymuştur.

Benalaxyl-M, fenilamid grubuna ait sistemik bir fungusit olup, Benalaxyl racematının saf R(-)-enantiomeridir (SMILES: CC1=C(C(=CC=C1)C)N([C@H](C)C(=O)OC)C(=O)CC2=CC=CC=C2) [15]. Enantiyomerik saflaştırma, bileşiğin biyolojik aktivite ve toksisite profilini belirgin şekilde değiştirmektedir [32].

Kâğıt teması metoduyla gerçekleştirilen çalışmalar, 48 saatlik maruziyette R(-)-benalaxyl'in LC₅₀ değerini 4,99 µg/cm², rasemat için 5,08 µg/cm² ve S(+)-enantiomer için 6,66 µg/cm² olarak tespit etmiştir. Maruziyet süresi 72 saate uzatıldığında ise sırasıyla 1,23 µg/cm², 1,73 µg/cm² ve 2,45 µg/cm² değerleri bulunmuştur [31]. Bu veriler, saf R(-)-formun hem rasemat hem de S(+)-formdan anlamlı derecede daha yüksek akut toksisite sergilediğini göstermektedir [31], [32].

96 saatlik EC₅₀ testlerinde, rasemik karışım için 2,893 mg/L, R(-)-enantiomer için 3,867 mg/L ve S(+)-enantiomer için 8,441 mg/L değerleri belirlenmiştir. Bu sıralama (rasemat < R(-) < S(+)), R(-)-benalaxyl'in su algilerinde de rasemattan daha yüksek toksisiteye sahip olduğunu ortaya koymaktadır [32].

Hem toprak solucanı hem de su algisi modellerinde saf R(-)-benalaxyl'in, rasemik ve S(+)-formlara kıyasla artmış toksisite göstermesi, ekotoksikolojik risk değerlendirmelerinde enantiyomerik dağılımın göz önünde bulundurulmasının gerekliliğini vurgular [31], [32]. Stereoseçim mekanizmaları, maruziyet senaryoları ve metabolit birikimi bakımından yapılacak ayrıntılı çalışmalar, gerçek dünya koşullarında risk analizi doğruluğunu artıracaktır.

Sonuç olarak, Benalaxyl-M maddesinin bal arıları üzerindeki akut toksik etkilerinin mevcut *in silico* modellemelerle toksik olmayan bir profil sergilediği görülmektedir. Ancak, maddenin enantiyomerik yapısı, çevresel koşullar, metabolit etkileri ve birikimli toksisite gibi parametreler göz önünde bulundurularak *in vivo* testlerle desteklenmesi, toksikolojik değerlendirmenin bütüncüllüğü açısından önem arz etmektedir. Ayrıca *in silico* yöntemlerin geliştirilmesi ve gelecekte daha yaygın kullanımı için veri bankası oluşturmak için önem arz etmektedir. Bu bulgular, pestisitlerin ekotoksikolojik risk değerlendirmelerinde yapay zekâ tabanlı araçların destekleyici rolünü göz önüne sermektedir.

Finansman

Yazarlar bu çalışmanın araştırılması, yazarlığı veya yayınlanması için herhangi bir maddi destek almamıştır.

Çıkar Çatışması/Ortak Çıkar Beyanı

Yazarlar tarafından herhangi bir çıkar çatışması veya ortak çıkar beyan edilmemiştir.

Yazarların Katkısı

Yazarlar çalışmaya eşit katkıda bulunmuştur.

Etik Kurul Onayı

Bu çalışma etik kurul izni veya herhangi bir özel izin gerektirmez.

Araştırma ve Yayın Etiği Bildirgesi

Yazarlar, makalenin tüm süreçlerinde Environmental Toxicology and Ecology Dergisinin bilimsel, etik ve alıntı kurallarına uyduklarını ve toplanan veriler üzerinde herhangi bir tahrifat yapmadıklarını beyan ederler. Ayrıca karşılaşılabilecek etik ihlallerden Environmental Toxicology and Ecology ve yayın kurulunun hiçbir sorumluluğu olmadığını ve bu çalışmanın Environmental Toxicology and Ecology dışında herhangi bir akademik yayın ortamında değerlendirilmediğini beyan ederler.

REFERANSLAR

- [1] M. Tudi, H. D. Ruan, L. Wang, J. Lyu, R. Sadler, D. Connell, C. Chu, and D. T. Phung, "Agriculture development, pesticide application and its impact on the environment," Int. J. Environ. Res. Public Health, vol. 18, no. 3, p. 1112, Jan. 2021, doi: 10.3390/ijerph18031112.
- [2] W. Zhou, M. Li, and V. Achal, "A comprehensive review on environmental and human health impacts of chemical pesticide usage," Emerging Contaminants, vol. 11, no. 1, p. 100410, 2025, doi: 10.1016/j.emcon.2024.100410.
- [3] M. F. Ahmad et al., "Pesticides impacts on human health and the environment with their mechanisms of action and possible countermeasures," Heliyon, vol. 10, no. 7, p. e29128, 2024, doi: 10.1016/j.heliyon.2024.e29128.
- [4] M. Lechenet, G. Py, F. Dessaint, and D. Makowski, "Reducing pesticide use while preserving crop productivity and profitability on arable farms," Nature Plants, vol. 3, Art. no. 17008, 2017, doi: 10.1038/nplants.2017.8.
- [5] C. Shekhar et al., "A systematic review of pesticide exposure, associated risks, and long-term human health impacts," Toxicol. Rep., vol. 13, p. 101840, 2024, doi: 10.1016/j.toxrep.2024.101840.
- [6] E. Hakme, M. Poulsen, and A. Lassen, "A Comprehensive Review on Pesticide Residues in Human Urine," Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2024. [Online]. Available: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.jafc.4c02705>.
- [7] R. M. González-Rodríguez, B. Cancho-Grande, and J. Simal-Gándara, "Decay of fungicide residues during vinification of white grapes harvested after the application of some new active substances against downy mildew," Food Chem., vol. 125, no. 2, pp. 549-560, Mar. 2011, doi: 10.1016/j.foodchem.2010.09.047.
- [8] European Food Safety Authority (EFSA) et al., "Review of the existing maximum residue levels for benalaxyl-M according to Article 12 of Regulation (EC) No 396/2005," EFSA J., vol. 17, no. 7, p. 5818, Jul. 2019, doi: 10.2903/j.efsa.2019.5818.
- [9] J. G. Zaller and C. A. Brühl, "Editorial: Non-target effects of pesticides on organisms inhabiting agroecosystems," Front. Environ. Sci., vol. 7, Art. no. 75, 2019, doi: 10.3389/fenvs.2019.00075.
- [10] J. Grassl et al., "Synergistic effects of pathogen and pesticide exposure on honey bee (*Apis mellifera*) survival and immunity," J. Invertebr. Pathol., vol. 159, pp. 78-86, 2018, doi: 10.1016/j.jip.2018.10.005.
- [11] F. Sanchez-Bayo and K. Goka, "Pesticide residues and bees- A risk assessment," PLoS ONE, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094482>.
- [12] M. Schott et al., "Temporal dynamics of whole body residues of the neonicotinoid insecticide imidacloprid in live or dead honeybees," Sci. Rep., vol. 7, p. 6288, 2017, doi: 10.1038/s41598-017-06259-z.

- [13] V. V. Kleandrova et al., "In silico assessment of the acute toxicity of chemicals: Recent advances and new model for multitasking prediction of toxic effect," *Mini Rev. Med. Chem.*, vol. 15, no. 8, pp. 677-686, 2015, doi: 10.2174/1389557515666150219143604.
- [14] R. M. González-Rodríguez, B. Cancho-Grande, and J. Simal-Gándara, "Multiresidue determination of 11 new fungicides in grapes and wines by liquid-liquid extraction/clean-up and programmable temperature vaporization injection with analyte protectants/gas chromatography/ion trap mass spectrometry," *J. Chromatogr. A*, vol. 1216, no. 32, pp. 6033-6042, Aug. 2009, doi: 10.1016/j.chroma.2009.06.046.
- [15] PubChem, "Benalaxyl-M," National Center for Biotechnology Information. [Online]. Available: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/176648>. [Accessed: May 2, 2025].
- [16] J. T. Moreira-Filho et al., "BeeToxAI: An artificial intelligence-based web app to assess acute toxicity of chemicals to honey bees," *Artif. Intell. Life Sci.*, vol. 1, Dec. 2021, doi: 10.1016/j.ailsci.2021.100013.
- [17] F. Wang et al., "Graph attention convolutional neural network model for chemical poisoning of honey bees' prediction," *Sci. Bull.*, vol. 65, no. 14, pp. 1184-1191, 2020, doi: 10.1016/j.scib.2020.04.006.
- [18] S. Riniker and G. A. Landrum, "Similarity maps-a visualization strategy for molecular fingerprints and machine-learning methods," *J. Cheminf.*, vol. 5, pp. 1-7, 2013, doi: 10.1186/1758-2946-5-43.
- [19] BeeToxAI. [Online]. Available: <http://beetoxai.labmol.com.br>. Accessed: Apr. 10, 2025.
- [20] S. A. Mansour, "Pesticide exposure-Egyptian scene," *Toxicology*, vol. 198, no. 1-3, pp. 91-115, 2004, <https://doi.org/10.1016/j.tox.2004.01.036>
- [21] Tarım İlacı (Pestisit) Kullanımı, Ankara, Turkey: Tarım ve Orman Bakanlığı, 2023. [Online]. Available: <https://cevreselgostergeler.csb.gov.tr/tarim-ilaci-pestisit-kullanimi-i-85834>. Accessed: Apr. 25, 2025.
- [22] N. Vural, *Toksikoloji*, Ankara, Turkey: Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, 2005, p. 659.
- [23] S. Ali et al., "Environmental and Health Effects of Pesticide Residues," in *Sustainable Agriculture Reviews* 48, I. Inamuddin, M. I. Ahamed, and E. Lichtfouse, Eds. Cham, Switzerland: Springer, 2021, ch. 8. [Online]. Available: https://doi.org/10.1007/978-3-030-54719-6_8.
- [24] M. A. Beketov, B. J. Kefford, R. B. Schäfer, and M. Liess, "Pesticides reduce regional biodiversity of stream invertebrates," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 110, no. 27, pp. 11039-11043, 2013, doi: 10.1073/pnas.1305618110.
- [25] G. L. Baron et al., "Pesticide reduces bumblebee colony initiation and increases probability of population extinction," *Nat. Ecol. Evol.*, vol. 1, pp. 1308-1316, 2017, doi: 10.1038/s41559-017-0260-1.
- [26] T. Haarmann, M. Spivak, D. Weaver, B. Weaver, and T. Glenn, "Effects of fluvalinate and coumaphos on queen honey bees (Hymenoptera: Apidae) in two commercial queen rearing operations," *Journal of Economic Entomology*, vol. 95, no. 1, pp. 28-35, Feb. 2002., <https://doi.org/10.1603/0022-0493-95.1.28>
- [27] S. Tosi, J. C. Nieh, F. Sgolastra, R. Cabbri, and P. Medrzycki, "Neonicotinoid pesticides and nutritional stress synergistically reduce survival in honey bees," *Proc. R. Soc. B*, vol. 284, no. 1869, p. 20171711, 2017. <http://doi.org/10.1098/rspb.2017.1711>
- [28] V. L. Imperatriz-Fonseca et al., *The Assessment Report of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services on Pollinators, Pollination and Food Production*. Bonn, Germany: Secretariat of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services, 2016.

- [29] Cost Estimates of Studies Required for Pesticide Registration, Washington, DC, USA: U.S. Environmental Protection Agency, May 13, 2024. [Online]. Available: <https://www.epa.gov/pesticide-registration/cost-estimates-studies-required-pesticide-registration>. Accessed: Apr. 25, 2025.
- [30] Ecological Effects Test Guidelines: Honey Bee Toxicity of Residues on Foliage (OCSPP 850.3030), Washington, DC, USA: U.S. Environmental Protection Agency, Jan. 2012. [Online]. Available: <https://www.regulations.gov/document/EPA-HQ-OPPT-2009-0154-0017>. Accessed: Apr. 25, 2025.
- [31] Xu P, Liu D, Diao J, Lu D, Zhou Z. Enantioselective acute toxicity and bioaccumulation of benalaxyl in earthworm (*Eisenia fetida*). J. Agric. Food Chem. 2009;57(18):8545-8549.
- [32] Huang L, Lu D, Diao J, Zhou Z. Enantioselective toxic effects and biodegradation of benalaxyl in *Scenedesmus obliquus*. Chemosphere. 2012;87(1):7-11.