

زیست‌نشان‌گرهای آنزیمی پروانه برگ‌خوار توت، *Glyphodes pyloalis* Walker، در تماس با برخی نانومواد مورد کاربرد در فرمولاسیون‌های نوین آفت‌کشی

نرگس معماری‌زاده^{۱*} و محبوبه شریفی^۲

۱- بخش تحقیقات آفت‌کش‌ها، موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران، ۲- بخش تحقیقات گیاه‌پزشکی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی گلستان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، گرگان، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۳/۲۵

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۲/۱۹

چکیده

فعالیت استرازهای عمومی (ESTs)، کاتالاز (CAT) و گلوکاتایون‌اس-ترانسفراز (GST) پروانه برگ‌خوار توت (*Glyphodes pyloalis* Walker) برای بررسی واکنش داخل بدن (*in vivo*) حشره به نانولوله‌های کربنی (CNT) خالص و نانوذرات حاصل از اتصال نانولوله‌های کربنی به دی‌اکسید تیتانیوم (CNTs/TiO₂-NPs) مورد ارزیابی قرار گرفت. این بررسی‌های بیوشیمیایی طی سه زمان مواجهه (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) با غلظت‌های مختلف این نانوذرات (۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) انجام شد. نتایج نشان داد با به‌کارگیری آلفا-نفتیل استات (α -NA) به‌عنوان سوسترا، افزایش غلظت‌های هر دو تیمار (یعنی CNT و CNTs/TiO₂-NPs) باعث مختل شدن برگشت‌ناپذیر فعالیت استرازهای عمومی لاروهای سن پنجم این آفت می‌شود. این درحالی است که ارزیابی فعالیت آنزیم با به‌کارگیری بتا-نفتیل استات (β -NA) به‌عنوان سوسترا نشان‌دهنده تاثیر مهارکنندگی شدیدتر این نانوذرات بر فعالیت آنزیم استراز بود. نتایج هم‌چنین نشان داد که بازدارندگی فعالیت آنزیم GST ناشی از CNT و CNTs/TiO₂-NPs وابسته به غلظت تیمارها است. ارزیابی آنزیم CAT نشان داد که افزایش غلظت CNT در طول مدت زمان تماس، باعث افزایش فعالیت این آنزیم در *G. pyloalis* می‌شود. به رویه مشابه با CNT، افزایش زمان مواجهه و غلظت نانوذرات CNTs/TiO₂-NPs باعث افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز شد. بنابراین می‌توان نتیجه‌گیری کرد که آنزیم‌های مورد آزمون، شاخص‌های بیوشیمیایی مناسبی به‌منظور پیش‌بینی و مدیریت اثرات مخرب CNT خالص و CNTs/TiO₂-NPs روی حشرات هستند.

واژه‌های کلیدی: ارزیابی ریسک، نانوذرات، CNTs/TiO₂-NPs، زیست‌نشان‌گرهای بیوشیمیایی

مقدمه

انواع مختلفی از فرمولاسیون‌های جدید به منظور تولید نانو مواد معدنی و آلی با کمک این فناوری در نقاط مختلف جهان معرفی شده‌اند (Key and Maass, 2008; Gottschalk and Nowack, 2011; Kah et al., 2016; Adana et al., 2018). به منظور رسانش هدف‌مند مواد موثر آفت‌کشی و کنترل رهایش سموم دفع آفات با کاربرد نانوفرمولاسیون‌ها و نانومواد مختلف، این نانومواد به‌طورخواسته یا ناخواسته وارد محیط‌زیست می‌شوند (Monica and Cremonini, 2009). بنابراین، امروزه هم‌راستا با توسعه نانوفناوری در علوم مختلف، لزوم توجه هرچه بیشتر به بررسی خطر زیست‌محیطی نانوذررات فلزی و غیر فلزی و به‌طور کلی نانوفرمولاسیون‌ها بیش از پیش احساس می‌شود (Kah et al., 2016).

نانولوله‌های کربنی^۱ (CNTs) ساختارهای لوله‌ای شکل ساخته شده از کربن هستند و قطر آن‌ها از کم‌تر از ۱ نانومتر تا ۱۰ نانومتر متغیر است. CNTها نه تنها سطح تماس وسیعی برای کاتالیست‌ها فراهم می‌کنند، بلکه قادر به تثبیت بار سطحی و جلوگیری از هدررفت آن‌ها نیز هستند (Wang et al., 2005). بررسی‌های اخیر نشان داده است که CNTها می‌توانند واکنش الکتروشیمیایی زیست‌مولکول‌های^۲ مهم (مثل نوکلئیک اسید^۳ها) را نیز افزایش دهند (Zhao et al., 2002; Wang et al., 2002). برای بهره‌گیری از ویژگی‌های قابل توجه CNTها، این نانومواد بی‌نظیر باید به‌طور صحیح طراحی و مورد استفاده قرار گیرند (Wang et al., 2005). سرلک و همکاران (Sarlak et al., 2014) از اتصال CNT و سیتریک اسید، پلیمری برای تولید نانوکپسول‌های مانکوزب^۴ فراهم کردند و نتایج این تحقیق بیان‌گر افزایش کارایی نانوفرمولاسیون نسبت به فرمولاسیون تجاری معمول (WP^۵) بوده است. به‌طور کلی، تغییرات سطح CNTها که در اثر

اکسیداسیون یا مواجهه با سورفاکتانت‌ها به دلیل تسهیل انحلال‌پذیری آن‌ها ایجاد می‌شود، از معضلات محیط‌زیستی احتمالی این نانوذررات است (Venkataraman et al., 2019). در محیط‌زیست، برخی از پوشش‌های طبیعی ایجاد شده روی این مواد، می‌توانند به‌صورت مشابه و با پوشاندن سطح آب‌گریز، پراکندگی CNTها را در محلول‌های آبی افزایش دهند (Jackson et al., 2013). پراکندگی بیش‌تر CNTها علاوه بر افزایش تحرک آن‌ها، باعث دوام بیش‌تر آن‌ها بدون واکنش‌پذیری در آب می‌شود و از این‌رو موجودات و محیط‌زیست با احتمال بیش‌تری در معرض سمیت آن‌ها قرار می‌گیرند (Hyung et al. 2007; Kennedy et al., 2011; Zhang et al., 2009).

دی‌اکسید تیتانیوم^۶ (TiO₂) یکی از مهم‌ترین اکسیدهای فلزات واسطه با کاربردهای فراوان است. نانوذررات TiO₂ به عنوان یک کاتالیزور مهم برای اصلاح محیط‌زیست و تصفیه آب به حساب می‌آیند (Yanagida et al., 2013). در برخی پژوهش‌ها به‌منظور تولید فرمولاسیون‌های آفت‌کش با ویژگی نورتخریب‌پذیری، از نانوذررات TiO₂ به‌عنوان فتوکاتالیست^۸ استفاده شده است (Jianhui et al., 2005; Guan et al., 2014c; Memarizadeh et al., 2011). نانولوله‌های کربنی (CNTs) می‌توانند برای بهبود عمل‌کرد نانوذررات TiO₂ مورد استفاده قرار گیرند. بنابراین، نانوکامپوزیت CNTs/TiO₂ فعالیت فتوکاتالیستی بالاتری در مقایسه با نانوذررات TiO₂ خالص نشان می‌دهند (Nguyen et al., 2014).

سمیت نانوذررات شامل سازوکارهایی مانند اختلال در غشاها، اکسیداسیون پروتئین‌ها، جهش‌های ژنی، اختلال در انتقال انرژی، تشکیل فرم‌های واکنش‌پذیر اکسیژن و آزادشدن اجزای سمی است. گزارش‌ها حاکی از کاهش مدت زمان

1. Carbon Nanotubes

2. Biomolecules

3. Nucleic acids

4. Mancozeb

5. Wettable Powder

6. Surfactant

7. Titanium dioxide

8. Photocatalyst

فیزیولوژی حشرات، از GST، EST و CAT به عنوان معتبرترین نشان‌گرهای زیستی^۴ به منظور کمی نمودن اثرات مضر زیست‌محیطی نانومواد مهندسی شده و بررسی پتانسیل سمیت آن‌ها بر طیف گسترده‌ای از موجودات استفاده می‌شود (Wheelock et al., 2005; Smirle et al., 2010; Ezemonye and Tongo, 2010; Koodalingam et al., 2011; Tarigan et al., 2016).

با وجود پژوهش‌های فراوان انجام شده روی موجودات آبی، به جز مطالعه معماری زاده و همکاران در مورد اثرات زیرکشنده‌ی نانوذرات TiO₂ بر نشان‌گرهای زیستی لارو سن ۵ پروانه‌ی برگ‌خوار توت (شامل پراکسیداز^۵ (POD)، EST و GST) (Memarizadeh et al., 2014a) و تخصیص انرژی سلولی^۶ (CEA) (Memarizadeh et al., 2014b)، مطالعه نانو بوم-سم‌شناسی^۷ دیگری در مورد تاثیر نانوذرات بر حشرات آفت، به عنوان مدل، گزارش نشده است. بنابراین، با توجه به پتانسیل کاربرد نانوذرات CNT/TiO₂-NPs و CNT در فرموله کردن آفت‌کش‌ها (Guan et al., 2011; Memarizadeh et al., 2014c; Sarlak et al., 2014)، هدف اصلی این مطالعه، بررسی بوم-سم‌شناسی این نانوذرات است. به این ترتیب، در این مطالعه فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و سم‌زدای لاروهای سن ۵ پروانه برگ‌خوار توت (*Glyphodes pyloalis* (Lepidoptera: Pyralidae))، به عنوان نشان‌گرهای بیوشیمیایی این موجود زنده به منظور ارزیابی خطر نانوذرات مذکور قبل از کاربرد آن‌ها در محیط-زیست مورد پایش قرار می‌گیرد.

مواد و روش‌ها

پرورش آزمایشگاهی حشرات

دسته تخم‌های آفت *G. pyloalis* از درختان توت آلوده در مرکز تحقیقات کرم ابریشم واقع در پسیخان جمع‌آوری

لازم برای رشد و پوست‌اندازی پروانه کرم ابریشم *Bombyx mori* Linnaeus (Lepidoptera: Bombycidae) تحت تاثیر نانوذرات TiO₂ بوده است (Li et al., 2014). نانوذرات نقره (Ag-NPs) ممکن است بر نفوذپذیری و تنفس سلولی تاثیر بگذارند (Morones et al., 2005). هم‌چنین مشخص شده است که Ag-NPها تنش اکسیداتیو را در بافت‌های بندپایان تحریک می‌کنند (Foldbjerg et al., 2015; Mao et al., 2018). نایر و همکاران (Nair et al., 2011) تاثیر نانوذرات نقره تجاری بر بیان ژن‌های گلوکوتایون‌اس-ترانسفراز^۱ (GST) را بررسی کرده و نشان دادند که این نانوذرات منجر به وقوع تنش اکسیداتیو در *Chironomus riparius* Meigen (Diptera: Chironomidae) شده است.

بررسی‌های انجام شده روی حشرات نشان داده است که فعالیت آنزیم‌های محافظتی مانند کاتالاز^۲ (CAT) با مقاومت و پاسخ به تنش ناشی از محیط ارتباط دارد. CAT از انواع آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت است و تجزیه H₂O₂ به آب و اکسیژن را کاتالیز می‌کند (Switala and Loewen, 2002). این آنزیم از سلول‌ها در برابر تنش اکسیداتیو، آسیب‌های ناشی از اثرات محیطی نامطلوب و رادیکال‌های آزاد محافظت می‌کند و طول عمر حشرات را افزایش می‌دهد (Dubovskiy et al., 2011; Aslanturk et al., 2010; Bi et al., 2008). استرازاها^۳ (ESTs)، آنزیم‌هایی سم‌زدا هستند که در فیزیولوژی حشرات و متابولیسم و سم‌زدایی ترکیبات بیگانه درگیر می‌باشند (Ishaaya, 1993). گلوکوتایون‌اس-ترانسفرازها، آنزیم‌های چندکاره در فاز دوم متابولیسم آفت‌کش‌ها هستند (Ezemonye and Tongo, 2010). حشرات با تغییر در فعالیت آنزیم‌های سم‌زدا قادر به سازگاری با عامل ایجادکننده تنش هستند (Bolter and Chefurka, 1989; Zhou et al., 2019). به‌طور کلی، با توجه به اهمیت این آنزیم‌ها در

⁴. Biochemical Biomarkers

⁵. Peroxidase

⁶. Cellular Energy Allocation

⁷. Nano-Ecotoxicology

¹. Glutathione S-Transferase

². Catalase

³. Esterases

در $12000 \times g$ در ۴ درجه سلسیوس برای ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شده و محلول رویی (سوپرناتانت) به عنوان منبع آنزیمی استفاده شد.

برای اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم‌های گلوکاتایون‌اس-ترنسفرز، آماده‌سازی نمونه‌ها مشابه آنزیم‌های استراز انجام شد. با این تفاوت که از بافر فسفات فاقد تراپتون X-100 استفاده شد.

برای اندازه‌گیری آنزیم CAT، هر لارو در بافر فسفات (۰/۰۲۵ مولار، pH ۷ و حاوی ۰/۱ میلی‌مولار EDTA^۴) روی یخ هم‌وزن‌نیز شد و سپس در $14000 \times g$ و ۴ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شده و محلول رویی به عنوان منبع آنزیمی مورد استفاده قرار گرفت.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های استراز

فعالیت استراز بر اساس روش ون اسپرن (van Asperen, 1962) اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم استراز، از دو سوبسترای آلفا- نفتیل استات^۵ (α -NA) و بتا- نفتیل استات^۶ (β -NA) استفاده شد و جذب آلفا- نفتول^۷ و بتا- نفتول^۸ تولید شده، به ترتیب در ۴۵۰ و ۵۴۰ نانومتر به وسیله میکروپلیت ریدر (Awareness Technology Inc., Florida, USA) خوانده شد. منحنی‌های استاندارد رسم شده با استفاده از غلظت‌های مختلف آلفا- نفتول و بتا- نفتول، برای تبدیل کمپلکس آلفا- نفتول- و بتا- نفتول- فاست بلو آر آر^۹ به فعالیت ویژه استرازی مورد استفاده قرار گرفت (Miller and Karn, 1980). فعالیت آنزیم‌های استراز به-صورت $nmol \cdot min^{-1} \cdot mg \text{ protein}^{-1}$ ارائه شد.

اندازه‌گیری فعالیت گلوکاتایون‌اس-ترنسفرز

برآورد میزان فعالیت آنزیم گلوکاتایون‌اس-ترنسفرز مطابق با روش هبیگ و همکاران (Habig et al., 1974) و با

شدند و در شرایط آزمایشگاهی در اتاقک رشد با دمای ± 2 ۲۵ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی 10 ± 75 درصد و دوره نوری ۸:۱۶ ساعت (تاریکی: روشنایی)، طی حداقل ۲ نسل روی برگ‌های توت وارپته شین‌ایچی‌نوسه^۱ پرورش داده شدند. لاروهای سن ۵ تازه پوست‌اندازی کرده *G. pyloalis* به‌منظور ارزیابی ریسک نانوذرات CNTs و CNTs/TiO₂ مورد استفاده قرار گرفتند.

سنتز نانوذرات CNTs/TiO₂

نانوذرات TiO₂ طبق روش ترانگ و همکاران (Trung et al., 2003) و مطابق با پژوهش‌های قبلی (Memarizadeh et al., 2014c) با هیدرولیز شدن تیتانیوم ایزوپروپوکساید^۲ (Ti(i-Pro)₄) سنتز شد. نانوکامپوزیت CNTs/TiO₂ نیز بر اساس روش لی و همکاران (Li et al., 2011) با به‌کارگیری سدیم دودسیل‌بنزن‌سولفونات^۳ (NaDDBS) به عنوان فاکتور عامل‌دار کننده سطح نانولوله‌های کربنی سنتز شد.

تهیه نمونه‌ها برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌ها

بررسی نانوذرات CNT و CNTs/TiO₂ روی لاروهای *G. pyloalis*، به روش غوطه‌وری دیسک برگگی (برگ توت وارپته شین‌ایچی‌نوسه) انجام شد (Memarizadeh et al., 2011). لاروهای سن پنجم *G. pyloalis* با غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر از هر نانوذره، تهیه شده در اتانول و رقیق شده در آب مقطر، تیمار شدند و در طول سه روز بعد از تیمار، نمونه‌برداری روزانه برای هر غلظت، از لاروهای زنده مانده به‌طور تصادفی انجام شد و نمونه‌های جمع‌آوری شده تا زمان انجام آزمایش‌های بیوشیمیایی، داخل فریزر ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند. به عنوان تیمار شاهد، لاروها با آب حاوی اتانول تیمار شدند.

برای تعیین فعالیت آنزیم‌های استراز، هر لارو در بافر فسفات (۰/۱ مولار، pH ۷ و حاوی ۰/۰۵٪ (v/v) تراپتون X-100) روی یخ هم‌وزن‌نیز شد. بعد از هم‌وزن‌نیز کردن، نمونه‌ها

4. Ethylenediamine Tetraacetic Acid

5. α -Naphthyl Acetate

6. β -Naphthyl Acetate

7. α -Naphthol

8. β -Naphthol

9. Fast blue RR

1. Shin Ichinose

2. Titanium iso Propoxide

3. Sodium Dodecylbenzenesulfonate

استفاده از α -NA به عنوان سوبسترا نشان داد که اختلاف معنی داری بین فعالیت این آنزیم در شاهد و لاروهای تیمار شده با غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر از CNT وجود ندارد (شکل ۱). مقدار فعالیت آنزیم استراز به طور معنی داری بعد از ۴۸ ساعت تماس با غلظت‌های ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی گرم بر لیتر از CNT کاهش نشان داد. این درحالی است که کاهش فعالیت این آنزیم تحت تاثیر غلظت‌های مزبور، بعد از ۷۲ ساعت جبران شد. همان طور که در شکل ۱ نشان داده شده است، ۴۰۰ میلی گرم بر لیتر از CNT منجر به کاهش معنی دار فعالیت آنزیم، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تیمار می شود. این درحالی است که بیشترین تاثیر CNT در کاهش فعالیت آنزیم استراز مربوط به غلظت ۵۰۰ میلی گرم بر لیتر و در طول هر سه نقطه زمانی مورد آزمایش با این نانوذرات است. بررسی تاثیر تیمارهای CNTs/TiO₂-NPs بر فعالیت استراز با به کارگیری α -NA به عنوان سوبسترا نشان داد که غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر در طول سه زمان مورد بررسی بر فعالیت این آنزیم بی تاثیر است (شکل ۲). این درحالی است که فعالیت آنزیم پس از ۷۲ ساعت تیمار با غلظت ۲۰۰ میلی گرم بر لیتر از CNTs/TiO₂-NPs به طور معنی داری کاسته می شود (شکل ۲). فعالیت آنزیم استراز با غلظت ۳۰۰ میلی گرم بر لیتر نیز بعد از ۲۴ و ۴۸ ساعت مهار می شود، اما این کاهش فعالیت بعد از گذشت ۷۲ ساعت از تیمار جبران می شود (شکل ۲). در مورد تیمارهای CNTs/TiO₂-NPs بیشترین تاثیر بر فعالیت آنزیم استراز مربوط به غلظت‌های ۴۰۰ و ۵۰۰ میلی گرم بر لیتر است (شکل ۲). از این رو، این غلظت‌ها به طور چشم گیری در هر سه بازه زمانی مورد بررسی، باعث کاهش فعالیت آنزیم استراز می-شوند.

استفاده از سوبسترای ۱-کلرو-۲،۴-دی نیتروبنزن^۱ (CDNB)، انجام شد. میزان جذب در ۳۴۰ نانومتر به وسیله‌ی میکروپلیت ریدر به صورت سینتیک (هر ۲۰ ثانیه) خوانده شد. فعالیت GST به صورت $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg protein}^{-1}$ محاسبه شد.

اندازه گیری فعالیت کاتالاز

سنجش فعالیت کاهشی آنزیم کاتالاز از طریق اندازه گیری تجزیه آب اکسیژنه در طول موج ۲۴۰ نانومتر برای مدت زمان یک دقیقه و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر (Cary 3) انجام شد. ضریب خاموشی (جذب مولی) پراکسید هیدروژن در ۲۴۰ نانومتر $M^{-1}\text{cm}^{-1}$ ۴۳/۶ است (Aebi, 1984). فعالیت CAT به صورت $\text{mmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg protein}^{-1}$ تخمین زده شد.

اندازه گیری غلظت پروتئین

غلظت پروتئین منبع آنزیمی مورد استفاده در آزمون‌های بیوشیمیایی به روش بردفورد (Bradford, 1976) تعیین شد. برای اندازه گیری میزان پروتئین از منحنی استاندارد با استفاده از غلظت‌های مختلف و مشخص آلومین سرم گاوی^۲ (BSA) به عنوان استاندارد استفاده شد و جذب آن‌ها در ۶۳۰ نانومتر خوانده شد.

تجزیه و تحلیل آماری

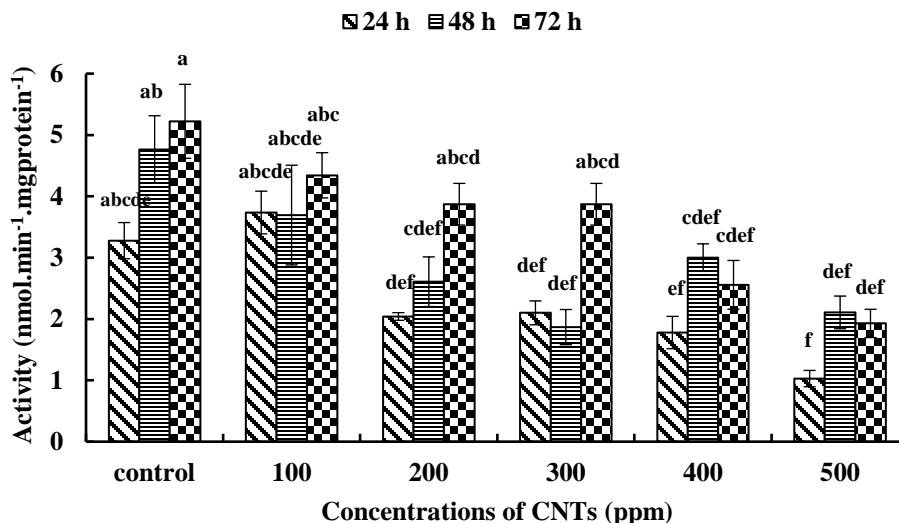
تمام آزمایش‌های بیوشیمیایی در ۳ تکرار انجام شد. داده‌ها تجزیه واریانس (ANOVA) شده و مقایسه میانگین‌ها با طرح اسپیلت پلات در زمان (آنالیز ترکیبی) انجام شد. تجزیه و تحلیل‌های آماری در سطح احتمال $p = 0.05$ با استفاده از آزمون توکی و با کمک نرم افزار SAS v. 9 انجام شد.

نتایج

در این مطالعه، تاثیر CNT خالص و تاثیر CNTs/TiO₂-NPs بر زیست‌نشان‌گرهای بیوشیمیایی *G. pyloalis* مورد بررسی قرار گرفت. تجزیه و تحلیل نتایج آنزیم استراز با

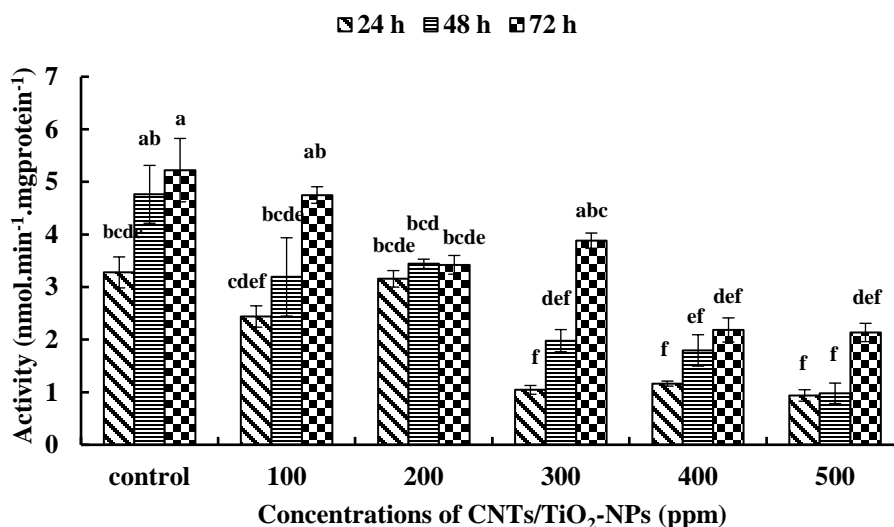
¹. 1-chloro-2,4-dinitrobenzene

². Bovine Serum Albumin



شکل ۱- مقایسه میانگین (\pm خطای معیار) فعالیت استرازی (*Glyphodes pyloalis* (EST) در تماس با غلظت‌های مختلف CNT در طول سه روز، با به‌کارگیری سوبسترای α -NA. میانگین‌هایی که با حروف مشابه نشان داده شده‌اند، بر اساس آزمون توکی دارای اختلاف معنی‌دار نیستند ($p < 0.05$).

Figure 1. Comparison of mean (\pm SE) of esterase (EST) activity in *Glyphodes pyloalis* exposure to different concentrations of CNTs over 3 days, using α -NA as a substrate. Means followed by similar letters showed no significantly difference from each other by Tukey's test ($p < 0.05$).

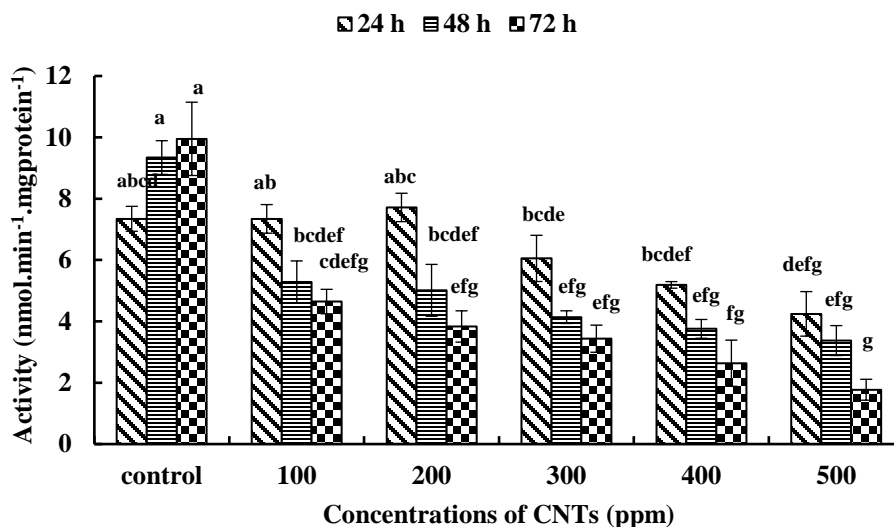


شکل ۲- مقایسه میانگین (\pm خطای معیار) فعالیت استرازی (*Glyphodes pyloalis* (EST) در تماس با غلظت‌های مختلف CNTs/TiO₂-NPs در طول سه روز، با به‌کارگیری سوبسترای α -NA. میانگین‌هایی که با حروف مشابه نشان داده شده‌اند، بر اساس آزمون توکی ($p < 0.05$) دارای اختلاف معنی‌دار نیستند ($p < 0.05$).

Figure 2. Comparison of mean (\pm SE) of esterase (EST) activity in *Glyphodes pyloalis* exposure to different concentrations of CNTs/TiO₂-NPs over 3 days, using α -NA as a substrate. Means followed by similar letters showed no significantly difference from each other by Tukey's test ($p < 0.05$).

غلظت‌های مختلف هر کدام از تیمارها بر فعالیت آنزیم مستقل از مدت زمان مواجهه با تیمارهاست، ولی وابسته به نوع تیمار است. همین‌طور نتایج مقایسه فعالیت آنزیم استراز تحت تاثیر CNT و CNTs/TiO₂-NPs در لاروهای سن ۵ تازه پوست-اندازی کرده *G. pyloalis*، مبین تاثیر بیش‌تر تیمارهای CNTs/TiO₂-NPs نسبت به CNT است.

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که فعالیت آنزیم استراز لاروهای تیمار شده با CNT و CNTs/TiO₂-NPs، با به-کارگیری α -NA به‌عنوان سوبسترا، به‌طور معنی‌دار وابسته به (۱) نوع تیمار، (۲) غلظت تیمارها و (۳) مدت زمان مواجهه است و این درحالی است که اثرات متقابل این فاکتورها جز در مورد اثر متقابل نوع تیمار در غلظت تیمار، بر فعالیت آنزیم استراز تفاوت معنی‌داری ایجاد نمی‌کند. و این بدین معناست که اثر



شکل ۳- مقایسه میانگین (\pm خطای معیار) فعالیت استرازی (EST) *Glyphodes pyloalis* در تماس با غلظت‌های مختلف CNT در طول سه روز، با به کارگیری سوبسترای β -NA. میانگین‌هایی که با حروف مشابه نشان داده شده‌اند، بر اساس آزمون توکی دارای اختلاف معنی‌دار نیستند ($p < 0.05$).

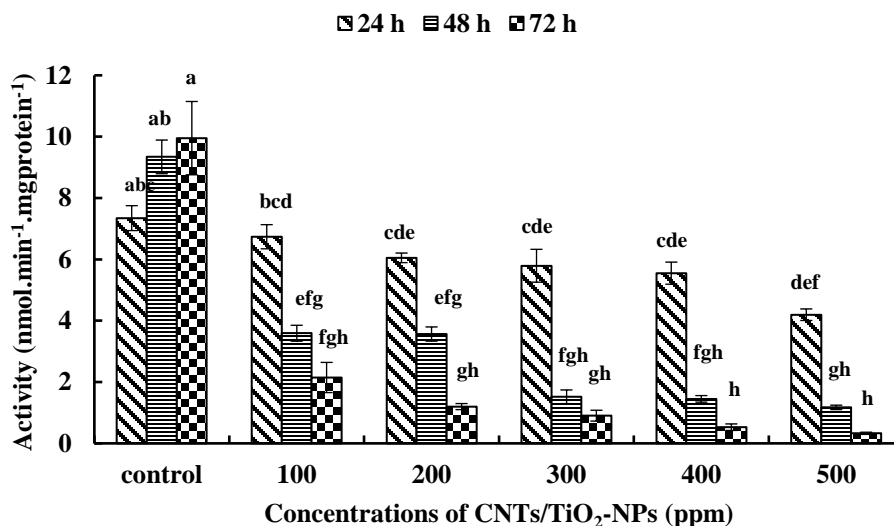
Figure 3. Comparison of mean (\pm SE) of esterase (EST) activity in *Glyphodes pyloalis* exposure to different concentrations of CNTs over 3 days, using β -NA as a substrate. Means followed by similar letters showed no significantly difference from each other by Tukey's test ($p < 0.05$).

از این‌رو با افزایش زمان مواجهه با تمام غلظت‌های مورد آزمایش CNT، به‌طور معنی‌داری از فعالیت آنزیم استراز کاسته می‌شود (شکل ۳).

نتایج بررسی تاثیر تیمارهای CNT بر فعالیت استراز لاروهای سن ۵ تازه پوست‌اندازی کرده *G. pyloalis*، با به-کارگیری β -NA به‌عنوان سوبسترا، در شکل ۳ ارائه شده است. این نتایج نشان‌دهنده رفتار متفاوت آنزیم استراز در لاروهای شاهد نسبت به لاروهای تیمار شده با غلظت‌های مختلف (۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) CNT است (شکل ۳).

زمان مواجهه با تمام غلظت‌های به کار برده شده‌ی این آفت، با به کارگیری سوبسترای β -NA، نیز مشابه با اثر CNT ارزیابی شد. به طوری که برعکس شاهد، با افزایش مدت

تأثیر CNTs/TiO₂-NPs بر فعالیت آنزیم استراز لاروهای این آفت، با به کارگیری سوبسترای β -NA، نیز مشابه با اثر CNT ارزیابی شد. به طوری که برعکس شاهد، با افزایش مدت

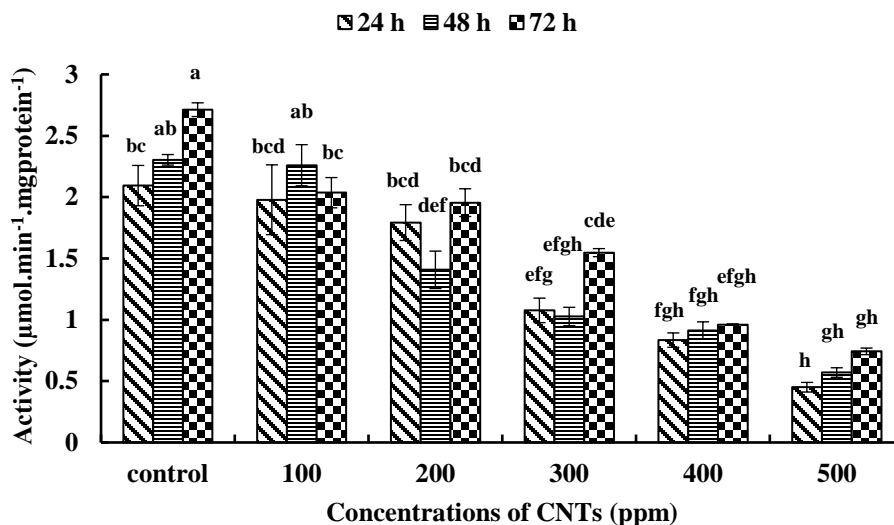


شکل ۴- مقایسه میانگین (\pm خطای معیار) فعالیت استرازی (*Glyphodes pyloalis* (EST) در تماس با غلظت‌های مختلف CNTs/TiO₂-NPs در طول سه روز، با به کارگیری سوبسترای β -NA. میانگین‌هایی که با حروف مشابه نشان داده شده‌اند، بر اساس آزمون توکی دارای اختلاف معنی‌دار نیستند ($p < 0.05$).

Figure 4. Comparison of mean (\pm SE) of esterase (EST) activity in *Glyphodes pyloalis* exposure to different concentrations of CNTs/TiO₂-NPs over 3 days, using β -NA as a substrate. Means followed by similar letters showed no significantly difference from each other by Tukey's test ($p < 0.05$).

فعالیت GST لارو سن پنج و تازه پوست اندازی کرده *G. pyloalis* پس از گذشت ۳ روز از تیمار با غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر از CNTs به طور معنی‌داری کاهش نشان داد. کاهش فعالیت این آنزیم با افزایش غلظت تیمار به ۲۰۰ میلی-گرم بر لیتر، سریع‌تر از تیمار قبلی ظاهر شد (شکل ۵). این درحالی است که غلظت‌های دیگر CNTs (۳۰۰، ۴۰۰ و ۵۰۰ میلی گرم بر لیتر) فعالیت GST را حتی سریع‌تر از غلظت ۲۰۰ میلی گرم بر لیتر کاهش دادند و بیش‌ترین کاهش فعالیت تحت تأثیر غلظت‌های ۴۰۰ و ۵۰۰ میلی گرم بر لیتر بروز یافت (شکل ۵).

بر اساس نتایج تجزیه واریانس، فعالیت آنزیم استراز با سوبسترای β -NA و در مواجهه با CNT و CNTs/TiO₂-NPs، به طور معنی‌دار وابسته به (۱) نوع تیمار و (۲) غلظت تیمارها است. به این ترتیب بر خلاف فعالیت آنزیم استراز با سوبسترای α -NA، مدت زمان مواجهه حشره با غلظت‌های مختلف CNTs/TiO₂-NPs به تنهایی عامل تعیین‌کننده‌ای نیست. این درحالی است که اثر متقابل غلظت در زمان و اثر متقابل غلظت در نوع تیمار بر فعالیت آنزیم استراز با استفاده از سوبسترای β -NA معنی‌دار است. بنابراین، عامل تعیین‌کننده‌ی غلظت‌های مختلف تیمارها برای ایجاد تفاوت معنی‌دار در میزان فعالیت آنزیم استراز با کاربرد سوبسترای β -NA وابسته به زمان مواجهه با تیمار و نوع تیمار است.

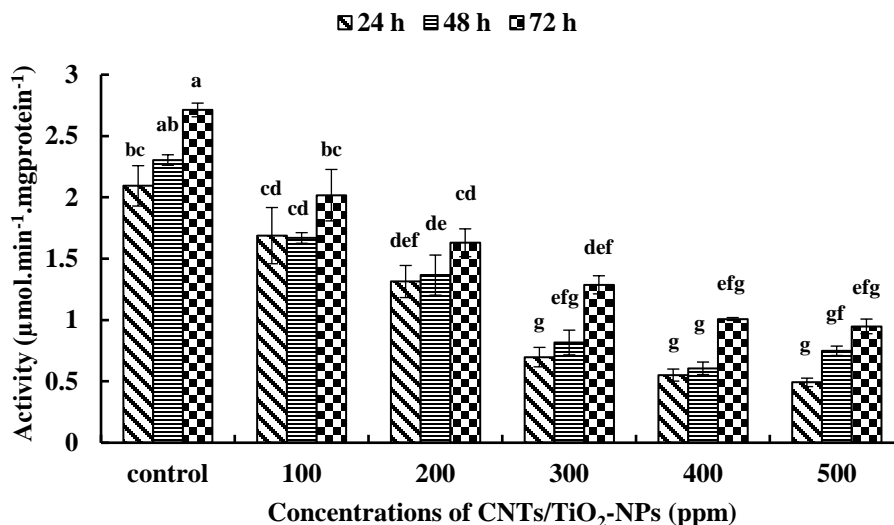


شکل ۵- مقایسه میانگین (± خطای معیار) فعالیت گلو تاتیون اس- ترنسفرز (GST) در *Glyphodes pyloalis* در تماس با غلظت‌های مختلف CNT در طول سه روز. میانگین‌هایی که با حروف مشابه نشان داده شده‌اند، بر اساس آزمون توکی دارای اختلاف معنی‌دار نیستند ($p < 0.05$).

Figure 5. Comparison of mean (±SE) of glutathione S-transferase (GST) activity in *Glyphodes pyloalis* exposure to different concentrations of CNTs over 3 days. Means followed by similar letters showed no significantly difference from each other by Tukey's test ($p < 0.05$).

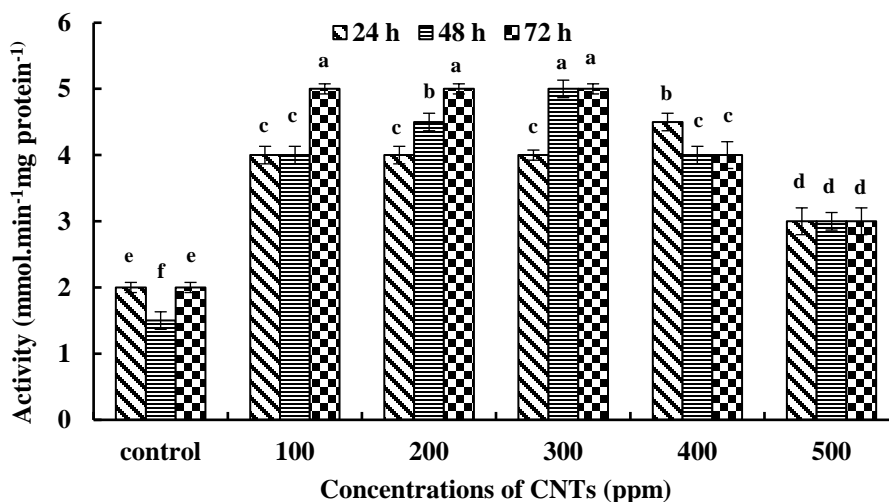
وابسته‌اند، در حالی که تاثیر این فاکتورها بر فعالیت آنزیم GST مستقل از مدت زمان مواجهه با تیمارها است. نتایج ارزیابی فعالیت آنزیم کاتالاز نشان داد که تمام غلظت‌های CNT آزمایش شده، به‌طور معنی‌دار باعث افزایش فعالیت این آنزیم در هر سه زمان مورد آزمایش می‌شوند (شکل ۷). بیش‌ترین افزایش در فعالیت این آنزیم مربوط به غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر از این تیمار است (شکل ۷).

فعالیت آنزیم GST لاروهای تیمار شده با غلظت‌های مختلف CNTs/TiO₂-NPs در شکل ۶ نشان داده شده است. به غیر از غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر این نانوذرات که بعد از گذشت ۲ روز از زمان تیمار، باعث کاهش فعالیت این آنزیم شدند، دیگر غلظت‌های بررسی شده در طول هر سه زمان مورد آزمایش، فعالیت این آنزیم را کاهش دادند (شکل ۶). از این‌رو، غلظت ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر و غلظت‌های بالاتر تاثیر زیاد و سریع بر فعالیت آنزیم GST داشتند. تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که فعالیت آنزیم GST لاروهای تیمار شده با CNT و CNTs/TiO₂-NPs، به‌طور معنی‌دار وابسته به (۱) نوع تیمار و (۲) غلظت تیمارها است و این در حالی است که اثرات متقابل این دو فاکتور بر فعالیت آنزیم سم‌زدای GST نیز معنی‌دار است و بدین ترتیب اثر نوع تیمار و غلظت‌های مختلف برای ایجاد اختلاف معنی‌دار در فعالیت آنزیم به هم



شکل ۶- مقایسه میانگین (± خطای معیار) فعالیت گلو تاتیون اس-ترنسفرز (*Glyphodes pyloalis* (GST) در تماس با غلظت‌های مختلف CNTs/TiO₂-NPs در طول سه روز. میانگین‌هایی که با حروف مشابه نشان داده شده‌اند، بر اساس آزمون توکی دارای اختلاف معنی‌دار نیستند ($p < 0.05$).

Figure 6. Comparison of mean (±SE) of glutathione S-transferase (GST) activity in *Glyphodes pyloalis* exposure to different concentrations of CNTs/TiO₂-NPs over 3 days, using CDNB as a substrate. Means followed by similar letters showed no significantly difference from each other by Tukey's test ($p < 0.05$).

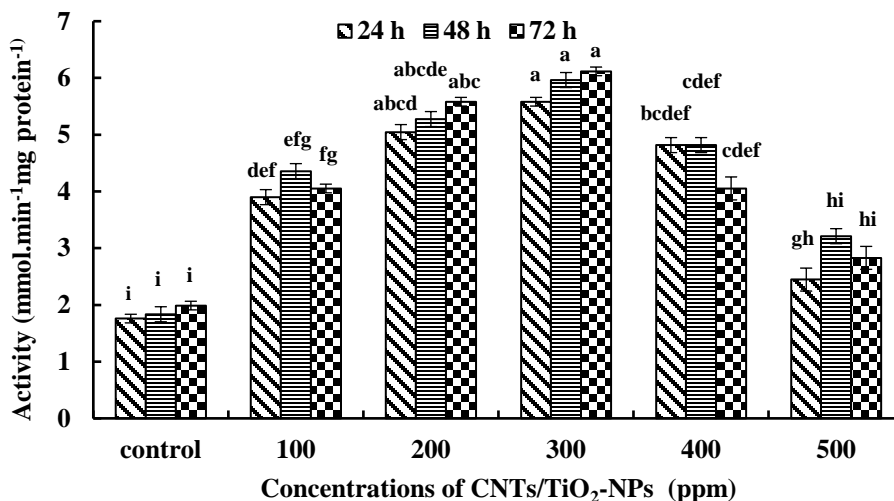


شکل ۷- مقایسه میانگین (± خطای معیار) فعالیت کاتالاز (*Glyphodes pyloalis* (CAT) در تماس با غلظت‌های مختلف CNT در طول سه روز. میانگین‌هایی که با حروف مشابه نشان داده شده‌اند، بر اساس آزمون توکی دارای اختلاف معنی‌دار نیستند ($p < 0.05$).

Figure 7. Comparison of mean (±SE) of Catalase (CAT) activity in *Glyphodes pyloalis* exposed to different concentrations of CNTs over 3 days. Means followed by similar letters showed no significantly difference from each other by Tukey's test ($p < 0.05$).

تیمارها، ۳) اثر متقابل نوع تیمار در غلظت تیمار و ۴) اثر متقابل غلظت و زمان مواجهه با تیمار وابسته است. بنابراین، در مورد هر دو تیمار یعنی CNT خالص و CNT متصل شده به نانوذرات TiO_2 ، تاثیر غلظت‌های این نانوذرات بر فعالیت آنزیم کاتالاز، مستقل از مدت زمان مواجهه و نوع تیمار نیست.

فعالیت آنزیم کاتالاز در لاروهای تیمار شده با $CNTs/TiO_2$ -NPs، همانند CNT به‌طور معنی‌داری نسبت به شاهد افزایش یافت و این افزایش به‌طور ویژه در مورد غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر از $CNTs/TiO_2$ -NPs دیده شد (شکل ۸). تجزیه واریانس داده‌های آنزیم کاتالاز نشان داد که فعالیت آنزیم به‌طور معنی‌دار به (۱) نوع تیمار، (۲) غلظت



شکل ۸- مقایسه میانگین (\pm خطای معیار) فعالیت کاتالاز ($Glyphodes pyloalis$ (CAT) در تماس با غلظت‌های مختلف $CNTs/TiO_2$ -NPs در طول سه روز. میانگین‌هایی که با حروف مشابه نشان داده شده‌اند، بر اساس آزمون توکی دارای اختلاف معنی‌دار نیستند ($p < 0.05$).

Figure 8. Comparison of mean (\pm SE) of Catalase (CAT) activity in *Glyphodes pyloalis* exposed to different concentrations of $CNTs/TiO_2$ -NPs over 3 days. Means followed by similar letters showed no significantly difference from each other by Tukey's test ($p < 0.05$).

بحث

در دنیای امروز پیرو رشد چشم‌گیر فناوری نانو در زمینه‌های مختلف، به‌ویژه در زمینه‌های وابسته به تولید غذای انسان، ارزیابی ریسک این فناوری کاربردی و جذاب ضروری است (Venkataraman et al., 2019). در این مطالعه، فعالیت سه نوع آنزیم مهم (استراز، گلوکاتایوناس-ترانسفراز و کاتالاز) به‌عنوان زیست‌نشان‌گرهای سریع و مناسب برای ارزیابی تعادل متابولیکی لارو سن ۵ حشره آفت *G. pyloalis* تحت تاثیر CNT و CNTs/TiO₂-NPs مورد ارزیابی قرار گرفت. ترکیب، هندسه و عامل‌داری^۱ سطح نانولوله‌های کربنی سمیت آن‌را مشخص می‌کند. دز متوسط CNT بدون عامل‌دار شدن، به‌شدت روی لاین‌های سلولی حیوانی و انسانی سمیت نشان داده است (Garnica-Gutiérrez et al., 2018). همان‌طور که در نتایج ارزیابی آنزیم استراز نشان داده شده است، با استفاده از سوبسترای α -NA، ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر از CNT قادر به اختلال در فعالیت طبیعی آنزیم استراز به‌صورت برگشت‌پذیر است. در حالی که در تیمار با غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر از این نانوذره، این اختلال در فعالیت طبیعی آنزیم به‌صورت برگشت‌ناپذیر در می‌آید. هم‌چنین، در مورد تیمار با نانوذرات CNTs/TiO₂ بیش‌ترین تاثیر بر فعالیت استراز با کاربرد غلظت‌های ۴۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر حاصل شد که این تاثیر برخلاف غلظت‌های کم‌تر، سریع و برگشت‌ناپذیر بوده است. با کاربرد سوبسترای β -NA، تاثیر بازدارنده هر دو تیمار CNT و CNTs/TiO₂ بر فعالیت آنزیم استراز شدیدتر از ارزیابی آنزیم با کاربرد سوبسترای α -NA بروز کرد. این نتیجه به دلیل تاثیر نانولوله‌های کربنی است؛ به‌طوری که تمام غلظت‌های مورد آزمون CNT باعث کاهش فعالیت آنزیم استراز از روز اول تا روز سوم پس از تیمار می‌شوند. بنابراین نتایج ارزیابی آنزیم استراز نشان‌دهنده این است که نانوذرات مورد بررسی روی فعالیت این گروه از آنزیم‌های سم‌زدا به‌طور معنی‌دار تاثیرگذار است و کاهش فعالیت این آنزیم‌ها در

شرایط آزمایش نیز گواه بر صرف هزینه توسط موجود زنده در مواجهه با این عوامل تنش‌زای خارجی است. فوآد و همکاران (Fouad et al., 2018) گزارش کردند که سطح پروتئین و فعالیت استیل‌کولین‌استراز^۲ در پشه‌های *Aedes albopictus* Skuse و *Culex pipiens* Linnaeus در تماس با نانوذرات نقره به‌طور معنی‌دار کاهش می‌یابد. بررسی تاثیر نانوذره دی‌اکسید تیتانیوم بر فعالیت آنزیم استراز در *G. pyloalis* نشان‌دهنده اهمیت مدت زمان مواجهه حشره با این نانوذره است (Memarizadeh et al., 2014a). تلس و همکاران (Teles et al., 2016) گزارش کردند که فعالیت استراز در ماهی سرطلا، *Sparus aurata* Linnaeus، در تماس با نانوذرات طلا تغییر نمی‌کند و بررسی‌های فرانکو و همکاران (Franco et al., 2015) روی صدف *Mytilus galloprovincialis* Lamarck در تماس با فلزات سنگین هم نتیجه مشابه با تحقیق تلس و همکاران (Teles et al., 2016) را نشان داد.

نتایج تجزیه و تحلیل نشان داد که اثرات ناشی از CNT خالص و CNTs/TiO₂-NPs بر آنزیم GST وابسته به اثر متقابل غلظت و نوع تیمارها است. بنابراین، بازدارندگی آنزیم گلوکاتایوناس-ترانسفراز با افزایش غلظت تیمارها افزایش می‌یابد. GST به‌عنوان یکی از مهم‌ترین آنزیم‌های سم‌زدا نقشی کلیدی در متابولیسم گسترده وسیعی از ترکیبات درونی و بیگانه دارند و در جهت سازگاری با عوامل خارجی تحت تاثیر مستقیم قرار می‌گیرند (Ezemonye and Tongo, 2010). از این‌رو تغییرات مشاهده شده در فعالیت این آنزیم در مواجهه با نانوذرات مورد بررسی، نشان‌دهنده تنش‌زا بودن این ترکیبات برای موجود است. افزایش در فراوانی mRNA و بیان بیش از حد ژن آنزیم گلوکاتایوناس-ترانسفراز در کبد *S. aurata* پس از ۹۶ ساعت تیمار با غلظت‌های کم و متوسط نانوذرات طلا توسط تلس و همکاران (Teles et al., 2016) دیده شده است. این نتیجه درحالی گزارش شده است که

². Acetylcholinesterase

¹. Functionalization

به طور کلی، توجه بیش تر به بررسی اثرات مضر احتمالی نانوذرات بر گونه های حشرات ضروری است. نتایج ارزیابی های آنزیمی در این تحقیق نشان داد که تیمارهای CNT و CNTs/TiO₂-NPs بر فعالیت آنزیم های استراز، گلوکاتایون-اس-ترنسفرآز و کاتالاز حشره اثر می گذارند و این تاثیر وابسته به غلظت های مورد آزمون و مدت زمان مواجهه با آنها است. از آنجا که آنزیم های مذکور در حفاظت از اثرات اکسیداتیو در موجودات دخالت دارند، بنابراین اختلال های ایجاد شده در فعالیت طبیعی آنها، نشان دهنده پتانسیل سمیت این نانومواد مهندسی شده و تحمیل تنش به واسطه آنها بر حشره مدل مورد بررسی است. از طرف دیگر، نتایج این تحقیق بیان گر امکان به کارگیری زیست نشان گرهای آنزیمی برای ارزیابی ریسک نانوذرات مورد کاربرد در مصارف کشاورزی به منظور پیش بینی اثرات فیزیولوژیک و سمیت های بالقوه آنها در محیط زیست است.

سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله از موسسه تحقیقات گیاه پزشکی کشور در جهت مساعدت های صورت گرفته برای انجام این پروژه کمال قدردانی را دارند.

نانوذرات طلا سیترات شده هیچ تاثیری بر این آنزیم نداشتند. در حالی که نانوذرات نقره تجاری شده منجر به بیان بیش تر ژن گلوکاتایون-اس-ترنسفرآز در *C. riparius* شد (Nair et al., 2011; Franco et al., 2015; Teles et al., 2016).

نتایج ارزیابی آنزیم کاتالاز نشان داد که با افزایش غلظت CNT و مدت زمان مواجهه با آن، فعالیت این آنزیم در لاروهای *G. pyloalis* افزایش می یابد. به شکل مشابه، تیمار با نانوذرات CNTs/TiO₂ می تواند در فعالیت آنزیم کاتالاز اختلال ایجاد کند. تحت تاثیر قرار گرفتن فعالیت این آنزیم محافظتی و آنتی اکسیدانت به واسطه نانوذرات مورد بررسی، نشان گر پاسخ کاتالاز به تنش وارد شده از محیط به منظور افزایش طول عمر حشره است (Switala and Loewen, 2002). بیان بیش از حد معمول این آنزیم در *S. aurata* نیز در مواجهه با تیمار نانوذرات طلا توسط تلس و همکاران (Teles et al., 2016) گزارش شده است. هم چنین نتایج دویکا و همکاران (Dziewięcka et al., 2016) نشان دهنده افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز در *Acheta domesticus* Linnaeus تیمار شده با اکسید گرافن است.

References

- Adana, A., Fen, B., Dergisi, B. and Tunçsoy, B. S. 2018. Toxicity of nanoparticles on insects: A review. *Environmental Science and Pollution Research* 1(2): 49–61.
- Aebi, H. 1984. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology* 105:121-126.
- Aslanturk, A., Kalender, S., Uzunhisarcikli, M. and Kalender, Y. 2011. Effects of methidathion on antioxidant enzyme activities and malonaldehyde level in midgut tissues of *Lymantria dispar* (Lepidoptera) larvae. *Journal of Entomological Research Society* 13:27–38.
- Bi, M. J., Xue, M., Li, Q. L., Wang, H. T. and Liu, A. H. 2010. Effects of feeding on tobacco plants preinfested by *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) B-biotype on activities of protective enzymes and digestive enzymes in *B. tabaci* and *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae). *Acta Entomology Science* 53: 139–146.
- Bolter, C. J. and Chefurka, W. 1989. The effect of phosphine treatment on superoxide dismutase, catalase, and peroxidase in the granary weevil, *Sitophilus granaries*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 36: 52-60.
- Dubovskiy, I. M., Martemyanov, V. V., Vorontsova, Y. L., Rantala, M. J., Gryzanova, E. V. and

- Glupov, V. V.** 2008. Effect of bacterial infection on antioxidant activity and lipid peroxidation in the midgut of *Galleria mellonella* L. larvae (Lepidoptera, Pyralidae). **Biochemistry and Physiology. C Toxicology and Pharmacology** 148: 1–5.
- Dziewięcka, M., Karpeta-Kaczmarek, J., Augustyniak, M., Majchrzycki, Ł. and Augustyniak-Jablokow, M. A.** 2016. Evaluation of in vivo graphene oxide toxicity for *Acheta domesticus* in relation to nanomaterial purity and time passed from the exposure. **Journal of Hazardous Materials** 305:30–40.
- Ezemonye, L. and Tongo, I.** 2010. Sublethal effects of endosulfan and diazinon pesticides on Glutathione-S-transferase (GST) in various tissue of adult amphibian (*Bufo gularis*). **Chemosphere** 81: 214–217.
- Foldbjerg, R., Jiang, X., Mičláš, T., Chunying, C., Autrup, H. and Beer, C.** 2015. Silver nanoparticles—wolves in sheep’s clothing? **Toxicological Research** 4: 563–575.
- Franco, L., Romero, D., García-Navarro, J. A., Teles, M. and Tvarijonavičiute, A.** 2016. Esterase activity (EA), total oxidant status (TOS) and total antioxidant capacity (TAC) in gills of *Mytilus galloprovincialis* exposed to pollutants: Analytical validation and effects evaluation by single and mixed heavy metal exposure. **Marine Pollution Bulletin** 102(1):30–5.
- Garnica-Gutiérrez, R. L., Lara-Martínez, L. A., Palacios, E. Masso F., Contreras, A., Hernández-Gutiérrez, S. and Cervantes-Sod, F.** 2018. Effect of functionalized carbon nanotubes and their citric acid polymerization on mesenchymal stem cells in vitro. **Journal of Nanomaterials** pp: 12.
- Gleiter, H.** 2000. Nanostructured materials, basic concepts and microstructure. **Acta Materialia** 48(1): 1–29.
- Gooding, J. J., Wibowo, R., Liu, J. Q., Yang, W., Losic, D., Orbons, S., Mearns, F. J., Shapter, J. G. and Hibbert, D. B.** 2003. Protein electrochemistry using aligned carbon nanotube arrays. **Journal of the American Chemical Society** 125: 9006–9017.
- Gottschalk, F. and Nowack, B.** 2011. The release of engineered nanomaterials to the environment. **Journal of Environmental Monitoring** 13(5): 1145–1155.
- Guan H, Chi D, Yu J, Zhang S. Y.** 2011. Novel photodegradable insecticide W/TiO₂/Avermectin nanocomposites obtained by polyelectrolytes assembly. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces** 83: 148–154.
- Habig, W. H., Pabst, M. J. and Jakoby, W. B.** 1974. Glutathione-S-transferase, the first step in mercapturic acid formation. **Journal of Biological Chemistry** 249, 7130–7139.
- Hyung, H., Fortner, J. D., Hughes, J. B. and Kim, J. H.** 2007. Natural organic matter stabilizes carbon nanotubes in the aqueous phase. **Environmental Science and Technology** 41(1): 179–184.
- Ishaaya, I.** 1993. Insect detoxifying enzymes: their importance in pesticide synergism and resistance. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology** 22: 263–276.
- Jackson P., Jacobsen N. R., Baun A., Birkedal R., Kühnel D., Jensen K. A. and Wallin, H.** 2013. Bioaccumulation and ecotoxicity of carbon nanotubes. **Chemistry Central Journal** 7(1): 1–21.
- Jianhui Y, Kelong H, Yuelong W, Suqin L.** 2005. Study on anti-pollution nanopreparation of dimethomorph and its performance. **Chinese Science Bulletin** 50: 108–112.
- Kah, M., Weniger, A. K. and Hofmann, T.** 2016. Impacts of (Nano)formulations on the fate of an insecticide in soil and consequences for environmental exposure assessment. **Environmental Science and Technology** 50(20): 10960–10967.
- Kaur, A., Sohal, S. K., Arora, S., Kaur, H. and Kaur, A. P.** 2014. Effect of plant extracts on biochemistry of *Bactrocera Cucurbitae* (Coquillett). **Journal of Entomology and Zoology Studies** 2(3): 86–92.
- Kennedy, A. J., Gunter, J. C., Chappell, M. A., Goss, J. D., Hull, M. S., Kirgan, R. A. and Steevens, J. A.** 2009. Influence of nanotube preparation in aquatic bioassays. **Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal** 28(9): 1930–1938.
- Key, F. and Maass, G. J.** 2008. Ions, atoms and charged particles. **Charged Colloids** 51(2):12–46.
- Koodalingam, A., Mullainadhan, P. and Arumugam, M.** 2011. Effects of extract of soapnut *Sapindus emarginatus* on esterases and phosphatases of the vector mosquito, *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae).

- Acta Tropica** 118: 27–36.
- Li, F., Gu, Z., Wang, B., Xie, Y., Ma, L., Xu, K., Ni, M., Zhang, H., Shen, W. and Li, B. 2014. Effects of the biosynthesis and signaling pathway of ecdysterone on silkworm (*Bombyx mori*) following exposure to titanium dioxide nanoparticles. **Journal of Chemical Ecology** 40:913–922.
- Li, L., Xu, Z., Kah, M., Lin, D. and Filser, J. 2019. Nanopesticides: a comprehensive assessment of environmental risk is needed before widespread agricultural application. **Environmental Science and Technology** 53(14): 7923–24.
- Li, M., Czymmekb, K. J. and Huanga, C. P. 2011. Responses of *Ceriodaphnia dubia* to TiO₂ and Al₂O₃ nanoparticles: a dynamic nano-toxicity assessment of energy budget distribution. **Journal of Hazardous Materials** 187: 502–508.
- Li, Z., Gao, B., Chen, G. Z., Mokaya, R., Sotiropoulos, S. and Puma, G. L. 2011. Carbon Nanotube/titanium Dioxide (CNT/TiO₂) Core-Shell Nanocomposites with Tailored Shell Thickness, CNT Content and Photocatalytic/photoelectrocatalytic Properties. **Applied Catalysis B: Environmental** 110:50–57.
- Łukasik, I., Golawska, S., and Wójcicka, A. 2009. Antioxidant defense mechanisms of cereal aphids based on ascorbate and ascorbate peroxidase. **Biologia** 64: 994–998.
- Mao, B. H., Chen, Z. Y., Wang, Y. J. and Yan, S. J. 2018. Silver nanoparticles have lethal and sub lethal adverse effects on development and longevity by inducing ROS-mediated stress responses. **Scientific Reports** 8(1): 2445-2453.
- Memarizadeh, N., Ghadamyari, M., Adeli, M. and Talebi, K. 2014a. Biochemical biomarkers of *Glyphodes Pyloalis* Walker (Lepidoptera: Pyralidae) in exposure to TiO₂ nanoparticles. **Invertebrate Survival Journal (ISJ)** 12: 47–53.
- Memarizadeh, N., Ghadamyari, M., Adeli, M. and Talebi, K. 2014b. Cellular energy allocation of *Glyphodes pyloalis* Walker (Lepidoptera: Pyralidae): changes related to exposure to TiO₂ nanoparticles. **Journal of Entomological Society of Iran** 33(4): 1-12.
- Memarizadeh, N., Ghadamyari, M., Adeli, M. and Talebi, K. 2014c. Linear-dendritic copolymers/indoxacarb supramolecular systems: biodegradable and efficient nano-pesticides. **Environmental Sciences: Process & Impacts** 16(10): 2380-2389.
- Memarizadeh, N., Ghadamyari, M., Sajedi, R. H. and Jalali, J. 2011. Characterization of esterases from abamectin-resistant and susceptible strains of *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). **International Journal of Acarology** 37(4): 271-281.
- Monica, R. C. and Cremonini, R. 2009. Nanoparticles and higher plants. **Caryologia** 62(2): 161-165.
- Morones, J. R., Elechiguerra, J. L., Camacho, A., Holt, K., Kouri, J. B., Ramírez, J. T., Musameh, M., Wang, J., Merkoci, A. and Lin, Y. 2002. Low-potential stable naddetection at carbon-nanotube-modified glassy carbon electrodes. **Electrochemistry Communications** 4: 743-746.
- Mudasir, Y., Wibowo, M. and Pranowo, H. D. 2013. Design of new potent insecticides of organophosphate derivatives based on QSAR analysis, **Indonesian Journal of Chemistry** 13: 86-93.
- Sarlak, N., Taherifar, A. and Salehi, F. 2014. Synthesis of nanopesticides by encapsulating pesticide nanoparticles using functionalized carbon nanotubes and application of new nanocomposite for plant disease treatment. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 62: 4833-4838.
- Nguyen, M. T., Nguyen, C. K., Phuong, T. M., Duong, Q. V., Pham, T. L. and Nguyen, T. C. 2014. A study on carbon nanotube titanium dioxide hybrids: experiment and calculation, **Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology** 5: 45018-45025.
- Prakash, N., Gopalakrishnan, M., Park, S. Y. and Choi, J. 2011. Expression of catalase and glutathione S-transferase genes in *Chironomus riparius* on exposure to cadmium and nonylphenol. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology** 154(4): 399–408.
- Rufingier, C., Pasteur, N., Lagnel, J., Martin, C. and Navajas, M. 1999. Mechanisms of insect resistance in the aphid, *Nasonovia ribisnigri* (Mosley) (Homoptera: Aphididae), from France. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** 29: 385–391.
- SAS Institute (2002), SAS/GRAPH Software: Reference Volume 2 Version 8, Cary, NC: SAS.

- Sharifi, M., Ghadamyari, M., Sajedi, R. H. and Mahmoodi, N. O.** 2015. Effects of 4-hexylresorcinol on the phenoloxidase from *Hyphantria cunea* (Drury) (Lepidoptera: Arctiidae): in vivo and in vitro studies. **Insect Science** 10:1-12.
- Smirle, M. J., Zurowski, C. L., Lowery, D. T., and Footitt, R. G.** 2010. Relationship of insecticide tolerance to esterase enzyme activity in *Aphis pomi* and *Aphis spiraecola*. **Journal of Economic Entomology** 103: 374–378.
- Switala, J. and Loewen, P. C.** 2002. Diversity of properties among catalases. **Archives of Biochemistry and Biophysics** 401: 145-154.
- Tarigan, S., Dadang, I., and Harahap, S. I.** 2016. Toxicological and physiological effects of essential oils against *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) and *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). **Journal of Biopesticides** 9(2): 135–147.
- Teles, M., Fierro-Castroa, C., Na-Phatthalung, P., Tvarijonaviciutec, A., Trindadee, T., Soares, A. M. V. M., Tort, L. and Oliveira, M.** 2016. Assessment of gold nanoparticle effects in a marine teleost (*Sparus aurata*) using molecular and biochemical biomarkers. **Aquatic Toxicology** 177: 125–35.
- Trung, T., Cho, W. J. and Chang S. H.** 2003. Preparation of TiO₂ Nanoparticles in glycerol-containing solutions. **Materials Letters** 57(18):2746-50.
- Venkataraman, A., Amadi, E. V., Chen, Y. and Papadopoulos, C.** 2019. Carbon nanotube assembly and integration for applications. **Nanoscale Research Letters** 14(1): 1–47.
- Wang W, Serp P, Kalck P and Faria J.** 2005. Visible light photodegradation of phenol on MWNT-TiO₂ composite catalysts prepared by a modified Sol-Gel method. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical** 235: 194-199.
- Wang, J.** 2005. Carbon-nanotube based electrochemical biosensors: a review. **Electroanalysis** 17: 7-14.
- Wang, J. Kawde, A. and Mustafa, M.** 2003a. Carbon nanotubes modified glassy carbon electrodes for amplified detection of DNA hybridization. **Analyst** 128: 912-918.
- Wang, J. Musameh, M. and Lin, Y.** 2003b, Solubilization of carbon nanotubes by Nafion toward the preparation of amperometric biosensors. **Journal of the American Chemical Society** 125: 2408-2418.
- Wheelock, C. E., Shan, G. and Ottea, J.** 2005. Overview of carboxylesterase and their role in the metabolism of insecticides. **Journal of Pest Science** 30: 75–83.
- Yacaman, J. M.** 2005. The bactericidal effect of silver nanoparticles. **Nanotechnology** 16: 2346–2353.
- Yanagida, M., Numata, Y., Yoshimatsu, K., Satoh, S. and Han, L.** 2013. Effective charge collection in dye-sensitized nanocrystalline TiO₂. **Nanoscience Nanotechnology** 4: 1-9.
- Zhang, L., Petersen, E. J. and Huang, Q.** 2011. Phase distribution of ¹⁴C-labeled multi walled carbon nanotubes in aqueous systems containing model solids: Peat. **Environmental Science and Technology** 45(4): 1356–1362.
- Zhao, Q. Gan, Z. and Zhuang, Q.** 2002. Electrochemical sensors based on carbon nanotubes. **Electroanalysis** 14: 1609-1618.
- Zhou, C., Yang, H., Wang, Z., Long, G. Y. and Jin, D. C.** 2019. Protective and detoxifying enzyme activity and ABCG subfamily gene expression in *Sogatella furcifera* under insecticide stress. **Frontiers in Physiology** 9:1-12.

Biochemical biomarkers of lesser mulberry pyralid, *Glyphodes pyloalis* Walker, in the exposure to some applied nanomaterials in novel pesticide formulations

N. Memarizadeh^{1*} and M. Sharifi²

1. Department of Pesticides Researches, Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran, 2. Plant Protection Research Department, Golestan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Gorgan, Iran

(Received: March 9, 2020- Accepted: June 14, 2020)

Abstract

The activity of general esterases (ESTs), catalase (CAT) and glutathione S-transferase (GST) were used to survey the *in vivo* responses of *Glyphodes pyloalis* Walker to bare carbon nanotubes (CNTs) and synthesized carbon nanotubes/titanium dioxide nanoparticles (CNTs/TiO₂-NPs). These biochemical tests were performed in the three time points of exposure (i.e. 24, 48 and 72 h) and to five concentrations (i.e. 100, 200, 300, 400 and 500 ppm). Results showed that the enhancement of treated concentrations of both CNTs and CNTs/TiO₂-NPs irreversibly impaired ESTs activities when α -naphthyl acetate (α -NA) used as a substrate. Using β -naphthyl acetate (β -NA) as a substrate, inhibitory effect of both CNTs and CNTs/TiO₂-NPs on ESTs activities was more intense than that of α -NA. Results also demonstrated that inhibition of GST activities generating by bare CNTs and also by CNTs/TiO₂-NPs was dependent to the concentrations of treatments. CAT assays showed that the increasing CNTs concentrations over exposure time could be affected by enhancement of the CAT activities in *G. pyloalis*. In the similar manner to bare CNTs, the increasing CNTs when coupled to TiO₂-NPs (CNTs/TiO₂-NPs) over exposure time could be interfered to the CAT activities. It can be concluded that these tested enzymes are good early biochemical indicators in order to prediction and management of adverse effects of bare CNTs and also CNTs when coupled to TiO₂-NPs on insects.

Key words: Risk assessment, nanomaterials, CNTs/TiO₂-NPs, biochemical biomarker

*Corresponding Author: memarizadeh@iripp.ir, nmemarizadeh@yahoo.com