



دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گیلان

بهره‌برداری و پرورش آبزیان

جلد چهارم، شماره دوم، تابستان ۱۳۹۴

<http://japu.gau.ac.ir>

بررسی اثرات نانو اکسید روی بر بافت آبشش ماهی گلدفیش (*Carassius auratus*)

* محسن خلیلی^۱، محمد هرسیج^۲، حامد کلنگی^۳ و حجت‌اله جعفریان^۴

^۱ دانشجوی کارشناسی ارشد شیلات، دانشگاه گنبدکاووس، گنبد، ایران، آستادیار گروه شیلات، دانشگاه گنبدکاووس،

گنبد، ایران، آستادیار گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران،

^۴ دانشیار گروه شیلات، دانشگاه گنبدکاووس، گنبد، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۶/۴؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۷/۱۳

چکیده

با گسترش نانو تکنولوژی و مهندسی مواد، نانو ذرات مختلفی با خصوصیات تازه و نو ظهور ساخته شده اما اثرات سمی این نانو ذرات جدید در بسیاری از مواد ناشناخته است. نانو ذرات اکسید فلزی در حال حاضر در مقیاس بزرگ برای استفاده صنعتی و خانگی تولید می‌گردد. در این تحقیق از ماهی گلدفیش استفاده گردید. ماهیان دارای میانگین وزنی 3 ± 0.5 گرم و طول 7 ± 0.5 سانتی‌متر بودند و در چهار تیمار و سه تکرار (شاهد، ۵، ۲۰ و ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر) از نانو اکسید روی به مدت ۱۴ روز تحت تیمار قرار گرفته شدند. از ماهیان هر تکرار در روزهای ۱، ۳، ۷ و ۱۴ نمونه‌برداری انجام گردید. نتایج بررسی بافت‌ها نشان‌دهنده وجود موکوس، کوتاه شدن لاملاهای ثانویه، نکروز، تخریب ساختار لاملاهای ثانویه، اتساع مویرگ‌های خونی، اتصال تیغه‌های ثانویه مجاور، برآمدگی اپی‌تلیوم تیغه ثانویه و هایپرپلازی بود. نتیجه کلی این پژوهش نشان داد که با افزایش میزان نانو اکسید روی و مدت در معرض قرارگیری میزان آسیب‌های وارده نیز افزایش یافت.

واژه‌های کلیدی: آسیب‌شناسی، بافت‌شناسی، سم‌شناسی، نانو اکسید روی، نانو ذرات

*مسئول مکاتبه: Mohsen.khalili369@gmail.com

مقدمه

تلاش علم نانو به درک مواد در سطح نانو (۱/۱ تا ۱۰۰ نانومتر) و فناوری نانو به دنبال سنتز، تغییر و دستکاری مواد در این مقیاس می‌باشد. با پیشرفت‌های سریع نانو تکنولوژی یا فناوری نانو استفاده از این فناوری و ریز مواد در تکنولوژی‌های مدرن افزایش یافته و این‌که این محصولات وارد آب‌ها نشود امری اجتناب‌ناپذیر است (هاوارد، ۲۰۰۴). با گسترش نانو تکنولوژی و مهندسی مواد، نانو ذرات مختلفی با خصوصیات تازه و نو ظهور ساخته شده و علی‌رغم این‌که اثرات سمی این نانو ذرات جدید در بسیاری از موارد ناشناخته است (باکنده و فرشاد، ۲۰۰۷). نانو مواد به ناگزیر در طول ساخت، استفاده و دفع منتشر خواهد شد و وارد محیط‌زیست می‌شود، در نتیجه نگرانی‌های زیادی مربوط به سلامت پیش‌بینی نشده و خطرات زیست‌محیطی نانو مواد مطرح می‌شود. تحقیقات نشان می‌دهد که اندازه نانو مواد، شکل، شیمی سطح و سطح نقش تعیین‌کننده‌ای در سمیت نانو مواد در سیستم‌های بیولوژیکی و زیست‌محیطی را بازی می‌کنند (ژو و همکاران، ۲۰۱۰).

نانو ذرات اکسید فلزی در حال حاضر به میزان زیادی برای استفاده صنعتی و خانگی تولید می‌گردد (پوپو و همکاران، ۲۰۰۵). یکی از نانو ذرات اکسید فلزی سمی که به‌طور گسترده استفاده می‌گردد نانو اکسید روی می‌باشد. نانو اکسید روی با خواص منحصر به فرد خود به‌طور گسترده در صنعت الکترونیک، لوازم آرایشی، کاتالیزورها، سرامیک، صنعت رنگ و ... مورد استفاده قرار می‌گیرد (وانگ، ۲۰۰۴). در بین نانو ذرات اکسید فلزی، نانو اکسید روی در حال حاضر در تناژ بالا تولید می‌گردد. حضور و افزایش نانو اکسید روی در محصولات تجاری باعث نگرانی‌های روز افزون در مورد اثرات سم‌شناسی و زیست‌محیطی این ماده می‌گردد. مطالعات اخیر سمیت نانو اکسید روی را بر روی برخی موجودات زنده مانند گیاهان عالی (لین و ژینگ، ۲۰۰۷)، جلبک (فرانکلین و همکاران، ۲۰۰۷)، باکتری‌ها (ژانگ و همکاران، ۲۰۰۷)، دافنی (ژوا و همکاران، ۲۰۱۰) نشان می‌دهد. با این حال هنوز هم به‌طور جامع اثرات سمیت نانو اکسید روی مورد بررسی قرار نگرفته است. نظر به این‌که آبشش‌ها از اندام اصلی و حیاتی سیستم تنفسی ماهیان می‌باشد و ارگان اصلی دخیل در تنظیم اسمزی به‌شمار می‌آید تأثیر غلظت‌های مختلف نانو اکسید روی که به میزان زیادی وارد منابع آبی می‌شود را بر بافت آبشش ماهی گلدفیش مورد بررسی قرار دادیم.

روش کار: در این تحقیق از ماهی گلدفیش به عنوان یک مدل آزمایشگاهی برای بررسی سم‌شناسی استفاده گردید. ماهی‌ها از مرکز تکثیر و پرورش ماهیان گرم‌آبی واقع در استان گیلان تهیه گردیدند. ماهیان دارای میانگین وزنی 3 ± 0.5 گرم و طول 7 ± 0.5 سانتی‌متر بودند و به مدت ۲ هفته قبل از شروع آزمایش با شرایط آزمایشگاهی سازگار شدند و روزانه دوبر مورد تغذیه قرار گرفتند. برای مطالعه سمیت ماهیان از آکواریوم‌های شیشه‌ای حاوی ۲۰ لیتر آب بدون کلر و هواده استفاده شد. آب مورد استفاده دارای pH بین ۷ تا ۷/۵، غلظت اکسیژن محلول به صورت اشباع، دمای آب ۲۰ تا ۲۲ درجه سانتی‌گراد و میزان روشنایی برای تمامی تیمارها ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت خاموشی بود.

نانو اکسید روی (ذرات با اندازه ۱۰ تا ۳۰ نانومتر، مساحت سطح ویژه $60 \text{ m}^2/\text{gr}$ و با خلوص ۹۹/۹۹ درصد) از شرکت پیشگامان نانو مواد ایران تهیه گردید. برای تهیه محلول نانو اکسید روی از ۱۰ گرم پودر خشک نانو اکسید روی استفاده گردید با دستگاه آلتراسونیک برای مدت ۳۰ دقیقه به صورت یک محلول کاملاً همگن در آورده شد و بعد از تهیه استوک برای هر بار استفاده از استوک اولیه، مجدداً ۱۰ دقیقه آلتراسونیک انجام داده شد.

۱۵ عدد ماهی در چهار تیمار به صورت تصادفی در چهار غلظت (شاهد، ۵، ۲۰ و ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر) از نانو اکسید روی به مدت ۱۴ روز تحت تیمار قرار گرفته شدند. این غلظت‌ها بر اساس پژوهش‌ها و چن (هاو و چن، ۲۰۱۲) انتخاب گردید. جهت حفظ غلظت نانو اکسید روی در آب روزانه تعویض آب حاوی نانو اکسید روی صورت می‌گرفت. از ماهیان هر تکرار در روزهای ۱، ۳، ۷ و ۱۴ نمونه‌برداری به صورت تصادفی از هر ماهی (بافت آبشش) انجام گردید. برای نمونه‌برداری ابتدا ماهی با عصاره گل میخک بیهوش شدند سپس از بافت‌های آبشش (کمان دوم) نمونه‌برداری صورت گرفت. نمونه‌ها در محلول فیکس کننده بوئن به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت تثبیت گردید و سپس به درون اتانول ۷۰ درصد انتقال داده شدند. تهیه اسلاید و برش به وسیله میکروتوم و برش‌هایی با مقطع ۵ تا ۷ میکرون تهیه گردید سپس رنگ‌آمیزی به روش هماتوکسیلین-ائوزین صورت گرفت. پس از تهیه لام‌های هیستوپاتولوژی به وسیله میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی $\times 100$ و $\times 400$ در نهایت داده‌ها به صورت توصیفی ارائه شدند.

نتایج

علائم پاتولوژی آبشش در جدول ۱ و تصاویر آبشش‌ها در شکل ۱ ارائه شده است. ماهیان گلدفیشی که در معرض ۵ میلی‌گرم بر لیتر نانو اکسید روی قرار گرفتند در کل دوره مواجهه با نانو اکسید روی تغییرات آسیب‌شناسی مشاهده شده چندان چشم‌گیر نبود و گذشت زمان در شدت آسیب‌ها وارد افزایش

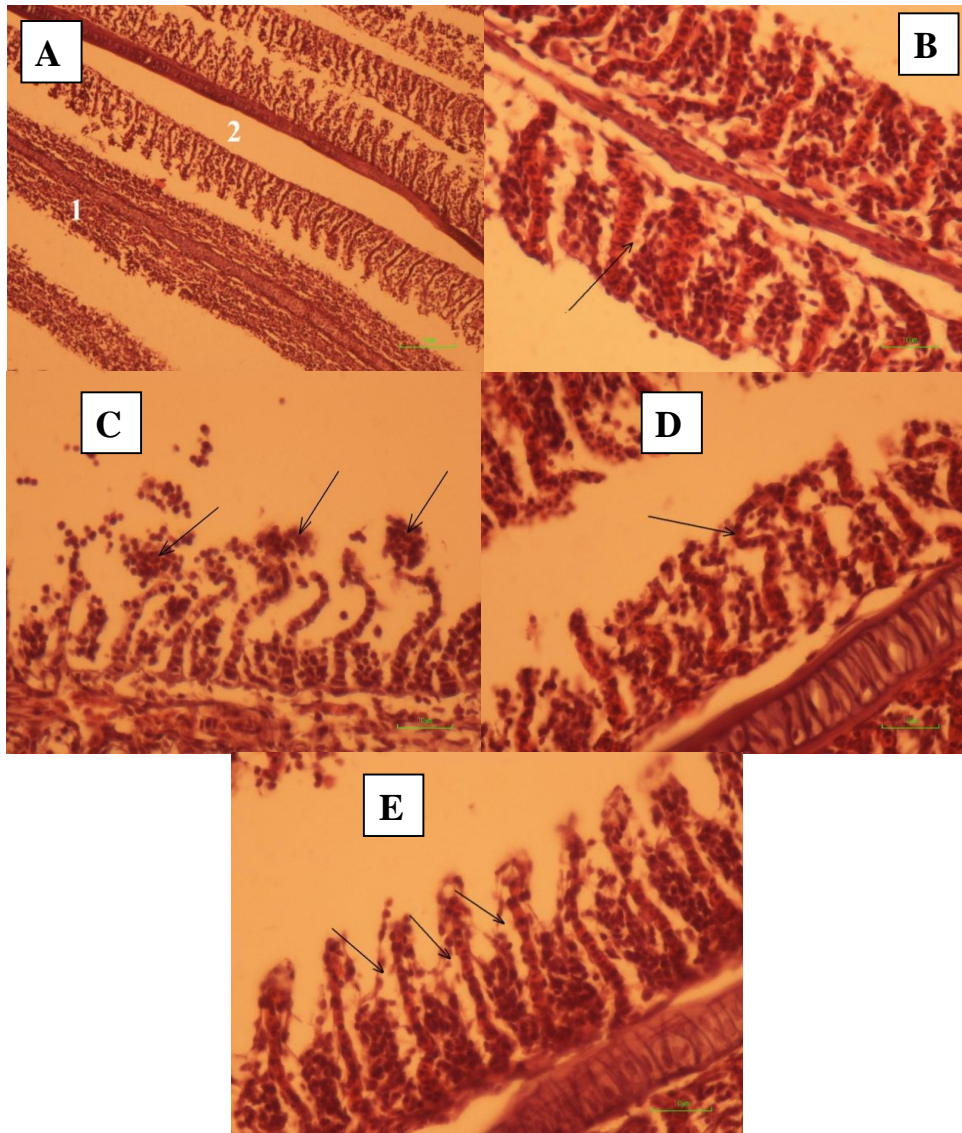
بهره‌برداری و پرورش آبزیان (۴)، شماره (۲) تابستان ۱۳۹۴

چندانی نشان نداد. در ماهیانی که در معرض ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو اکسید روی تیمار گشتند در روز اول و سوم نمونه‌برداری آسیب‌های وارده به آبشش ماهی گلدفیش بسیار کم بوده اما با گذشت زمان در روز هفتم و در فاز آخر نمونه‌برداری روز چهاردهم تغییرات آسیب‌شناسی وارده به آبشش افزایش یافت و همچنین قرار گرفتن در معرض ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو اکسید روی که بیشترین میزان دوز مورده استفاده از نانو اکسید روی در این پژوهش بود در روز اول نمونه‌برداری تغییرات آسیب‌شناسی چشم‌گیر نبود اما با افزایش زمان میزان آسیب‌های وارده به آبشش نیز افزایش یافت.

جدول ۱- عوارض بافتی آبشش ماهی گلدفیش (*Carassius auratus*) در مواجهه ۱۴ روزه با نانو اکسید روی.

پارامترها	کوتاه شدن لاملاهای ثانویه	نکروز	تخریب ساختار لاملاهای ثانویه	آنروسیسم	اتصال تیغه‌های ثانویه مجاور	برآمدگی ابری تلیوم تیغه ثانویه	هایپرپلازی
شاهد	-	-	-	-	-	-	-
۵ میلی‌گرم بر لیتر	-	-	-	-	-	-	-
۲۰ میلی‌گرم بر لیتر	-	-	-	-	-	-	-
۵۰ میلی‌گرم بر لیتر	-	-	-	-	-	-	-
شاهد	-	-	-	-	-	-	-
۵ میلی‌گرم بر لیتر	-	-	-	-	-	-	-
۲۰ میلی‌گرم بر لیتر	+	-	+	+	-	+	-
۵۰ میلی‌گرم بر لیتر	+	+	+	-	+	+	+
شاهد	-	-	-	-	-	-	-
۵ میلی‌گرم بر لیتر	-	-	-	-	-	-	-
۲۰ میلی‌گرم بر لیتر	+	+	+	+	+	+	+
۵۰ میلی‌گرم بر لیتر	+	+	++	++	+	+	+
شاهد	-	-	-	-	-	-	-
۵ میلی‌گرم بر لیتر	+	+	+	+	+	+	+
۲۰ میلی‌گرم بر لیتر	+	++	++	++	++	+++	++
۵۰ میلی‌گرم بر لیتر	+++	++	++	++	+	+++	++
شاهد	-	-	-	-	-	-	-
۵ میلی‌گرم بر لیتر	+	+	++	+	+	++	+
۲۰ میلی‌گرم بر لیتر	+	++	+++	++	++	+++	++
۵۰ میلی‌گرم بر لیتر	+++	++	++	++	++	+++	++

عدم مشاهده عارضه (-)، خفیف ۱ تا ۳ عدد در تیمار (+) متوسط ۳ تا ۶ عدد در تیمار (++)، شدید بالای ۶ عدد در تیمار (+++)



شکل ۱- (A) اتصال تیغه‌های ثانویه مجاور (B) کوتاه شدن لاملاهای ثانویه (C) چخماقی شدن (D) هایپرپلازی (E) برآمدگی اپی‌تلیوم تیغه ثانویه.

بحث

بررسی‌های آسیب‌شناسی بافتی پارامتری جامع می‌باشد که می‌توان وضعیت سلامت ماهی را ارزیابی کرد (وندر است و همکاران، ۲۰۰۳) آبشش‌ها از اندام اصلی و حیاتی سیستم تنفسی ماهیان می‌باشند ارگان اصلی دخیل در تنظیم اسمزی و حفظ تعادل هیدرومینرال در محیط‌های هیپواسموتیک و هیپواسموتیک به‌شمار می‌آید (مروتی و همکاران، ۲۰۱۲) و ارتباط نزدیکی بین مورفولوژی آبشش و استرس در ماهیان وجود دارد (سابر، ۲۰۱۱) در مواجهه‌های کوتاه‌مدت ماهیان در برابر فلزات سنگین بیشترین تجمع فلزات سنگین در بافت آبشش می‌باشد و کمترین تجمع فلزات سنگین عمدتاً در بافت‌های عضلانی است که می‌توان دلیل این امر را به‌خاطر فعالیت متابولیکی بیشتر آبشش‌ها نسبت به بافت‌های عضلانی دانست (بهشتی و همکاران، ۲۰۱۰). در بررسی بافت‌شناسی آسیب‌های مشاهده شده شامل موکوس، کوتاه شدن لاملاهای ثانویه، نکروز، تخریب ساختار لاملاهای ثانویه، اتساع مویرگ‌های خونی، اتصال تیغه‌های ثانویه مجاور، برآمدگی اپی‌تلیوم تیغه ثانویه و هایپرپلازی بود که با دیگر مطالعات که بر روی آلاینده‌ها انجام گرفت اثرات مشابه‌ای از آسیب‌های بافتی را گزارش کردند (ولمرگان و همکاران، ۲۰۰۷؛ شریفیان و همکاران، ۲۰۱۳؛ ژینگ و همکاران، ۲۰۱۲). ایرکمن و همکاران (۲۰۰۰) نکروز، کوتاه شدگی لاملاها و جدا شدگی اپیتلیوم را در ماهی گویی (*Lebistes reticulatus*) در معرض سم سیفونترین و همچنین ایلدریم و همکاران (۲۰۰۶) با بررسی اثر دلتامترین بر روی آبشش تیلایپی نیل آسیب‌های بافتی هیپریمیا و بهم چسبندگی لاملاها را گزارش کردند. ولمرگان و همکاران (ولمرگانو همکاران، ۲۰۰۷) هایپرپلازی، آنروسیسم و برآمدگی تیغه‌های ثانویه را در ماهی که در معرض لامبدا-سیالوتترین قرار داشت را مشاهده نمودند.

با افزایش غلظت نانوآکسید روی میزان افزایش موکوس در بافت آبشش مشاهده شد که این میزان نسبت به تیمار شاهد افزایش چشمگیری نشان داده بود. افزایش موکوس در تیغه‌های آبششی مشاهده گردید که به‌عنوان حفاظتی در محدود کردن دسترسی به سطح آبششی صورت می‌گیرد ولی افزایش آن ممکن است با مسدود کردن تبادل گازهای تنفسی منجر به خفگی گردد (پوستی و صدیق مروستی، ۲۰۰۰). شاهسونی و همکاران (۲۰۰۷) افزایش موکوس را در ماهی گلدفیش (*Carassius auratus*) در تیمارهای حاوی فنی‌توئیدین سدیم را گزارش کردند. محمدزاده و همکاران (۲۰۱۱) با بررسی فلز سنگین سرب بر روی ماهی کلمه (*Rutilus rutilus caspius*) افزایش ترشح موکوس را در تیمارهای آزمایشی خود مشاهده کردند.

اتصال تیغه‌های ثانویه مجاور با افزایش میزان دوز نانو اکسید روی و همچنین با گذشت زمان افزایش پیدا کرد به طوری که در روز چهاردهم نمونه برداری در تیمارهای ۲۰ و ۵۰ میلی گرم بر لیتر میزان مشاهده‌ای آسیب از تیمارهای دیگر در زمان‌های مختلف بیشتر بوده. گابر (گابر و همکاران، ۲۰۰۷) با بررسی فلزات سنگین سرب، مس، کادمیوم و روی بر روی ماهی تیلایا نیل اتصال تیغه‌های ثانویه مجاور را در تیمارهای آزمایشی خود گزارش کرد همچنین بر اساس مقایسه با نتایج حاصل از این تحقیق به نظر می‌رسد نانو اکسید روی نسبت به فلزات سنگین از سمیت کمتری برخوردار است. اتصال تیغه‌های ثانویه مجاور در ماهی *Prochilodus lineatus* در مجاورت با فاضلاب‌های شهری نیز گزارش شده است (کامارگو و مارتینز، ۲۰۰۷). همچنین سنتامیسولان و همکاران (۲۰۱۱) اتصال تیغه‌های ثانویه مجاور را در ماهی *Lates calcarifer* در مجاورت با نیکل و جیوه مشاهده کردند. برآمدگی اپی‌تلیوم تیغه ثانویه در تمام تیمارهای نانو اکسید روی مشاهده شد، در روزهای هفت و چهاردهم نمونه برداری میزان این عارضه افزایش یافت به طوری که در دوزهای ۲۰ و ۵۰ میلی گرم بر لیتر نانو اکسید روی بیشترین میزان این آسیب مشاهده شد. برآمدگی اپی‌تلیوم تیغه ثانویه در اثر ترکیبات PAH بر روی کفشک ماهی نیز به وجود می‌آید (خان و همکاران، ۲۰۰۳) و همچنین الورین و همکاران (الورین و همکاران، ۲۰۰۶) برآمدگی اپی‌تلیوم تیغه ثانویه را در ماهی *Clarias gariepinus* در مجاورت حشره‌کش‌هایی مانند گلی فسفات و مواد شیمیایی مانند لامبدا-سیالوترین و فنی‌توئیدین سدیم گزارش کردند.

هایپرپلازی با شدت کمتری نسبت به برآمدگی اپی‌تلیوم تیغه ثانویه گسترش یافت و احتمالاً نسبت به برآمدگی اپی‌تلیوم تیغه ثانویه با تأخیر بیشتری ظاهر خواهد شد. هایپرپلازی پاسخ دراز مدت سلول‌های سنگفرشی می‌باشد که در مقدار کم آلاینده‌ها ایجاد می‌شود (رابرتس، ۲۰۰۱ و علیایی و همکاران، ۲۰۱۴) هایپرپلازی بر تبادل گاز و تنفس تأثیر گذاشته و در حالات شدیدتر می‌تواند منجر به اتصال تیغه‌های مجاور به یکدیگر و جلوگیری از تبادل گاز شود (هدایتی و همکاران، ۲۰۱۳). بنایی و همکاران (۲۰۱۳)، خان و همکاران (۲۰۰۳) و همچنین علیایی و همکاران (۲۰۱۴) در پژوهشی که انجام دادن هایپرپلازی را در تیمارهای خود مشاهده کردند. نظر به کاربرد وسیع نانوذرات در صنایع به خصوص نانو اکسید روی که نهایتاً به اکوسیستم‌های آبی راه می‌یابد این نانوذره تأثیرات نامطلوبی بر ماهیان دارد. این تأثیرات در درجه اول بر آبشش ماهی تأثیرگذار است که آسیب‌های همچون ترشح موکوس، کوتاه شدن لاملاهای ثانویه، نکروز، تخریب ساختار لاملاهای ثانویه، اتساع مویرگ‌های

خونی، اتصال تیغه‌های ثانویه مجاور، برآمدگی اپی‌تلیوم تیغه ثانویه و هایپرپلازی را در پی دارد. این مطالعه ارتباط مستقیم آسیب بافتی آبشش، میزان دوز نانوآکسید روی و مدت زمان قرار گرفتن در معرض نانوآکسید روی را نشان می‌دهد به‌عنوان مثال با افزایش غلظت نانوآکسید روی و مدت زمان قرار گرفتن در معرض آن باعث افزایش آسیب‌های بافتی می‌شود. بدیهی است که این عوارض بر جامعه آبزیان و در نهایت بر اکوسیستم و انسان‌ها نیز اثرات منفی خواهد گذاشت.

سپاس‌گزاری

در پایان از تمام کسانی که در این پژوهش ما را یاری نموده‌اند نهایت سپاس را داریم به ویژه از همکاری دانشگاه گنبد کاووس تقدیر و تشکر می‌شود. از جناب آقای حسین صادقی و سرکار خانم عامریان به‌خاطر راهنمایی و کمک در این پروژه تشکر و قدردانی می‌کنیم.

منابع

1. Bakand, S., and Farshad, A. 2007. A review of nanotechnology and nanotoxicology (Editorial). *Iran Occupational Health Journal*. 4: 1.1-3.
2. Banaee, M., Sureda, A., Mirvagefei, A.R., and Ahmadi, K. 2013. Histopathological Alterations Induced by Diazinon in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *International Journal of Environmental Research*. 7: 3. 735-744.
3. Beheshti, M., Askari Sari, I., Khodadadi, M., and Velaiat-Zadeh, M. 2010. Measured concentrations of heavy metals (Cu, Fe, Zn, Mn) in different organs of Liza abu in the Dez River, Khuzestan Province. *Journal of wetlands, Islamic Azad University, Ahvaz*. 6: 79-71.
4. Camargo, M.M.P., and Martinez, C.B.R. 2007. Histopathology of gills, kidney and liver of a Neotropical fish caged in an urban stream. *Neotropical Ichthyology*. 5: 3. 327-336.
5. Erkmen, B., Caliskan, M., and Yerli, S.V. 2000. Histopathological effects cyphenothrin gills of *Lepistes reticulatus*. *Veterinary and Human Toxicology*. 42: 5-7.
6. Franklin, N.M., Rogers, N.J., Apte, S.C., Batley, G.E., Gadd, G.E., and Casey, P.S. 2007. Comparative toxicity of nanoparticulate ZnO, bulk ZnO, and ZnCl₂ to a freshwater microalga (*Pseudokirchneriella subcapitata*): the importance of particle solubility. *Environmental Science and Technology*. 41: 8484-8490.

7. Gaber, H.S. 2007. Impact of certain heavy metals on the gill and liver of the Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). Egypt Journal Aquaculture Biology. 11: 79-100.
8. Hao, L., and Chen, L. 2012. Oxidative stress responses in different organs of carp (*Cyprinus carpio*) with exposure to ZnO nanoparticles. Ecotoxicology and Environmental Safety. 80: 103–110.
9. Hedayati, S.A.A., Jahanbakhshi, A.R., Ghaderi Ramazi, F. 2013. Aquatic Toxicology. Gorgan University of Agricultural Sciences and Naural Resources. Pess, 210p.
10. Howard, C.V. 1997. Synergistic effects of chemical mixtures: can we rely on traditional toxicology. The Ecologist. 27: 192–5.
11. Khan, R.A. 2003. Health of flat fish from localities in Placentia Bay, Newfoundland, contaminated with petroleum and PCBs. Archives of Environmental Contamination and Toxicology. 44: 4. 485-492.
12. Lin, D., and Xing, B., Phytotoxicity of nanoparticles: Inhibition of seed germination and root growth. Environmental Pollution. 2: 243-250.
13. Mohamadzadeh, P., Jamil, Sh., Mashynchyan, A., Matinfar, A., and Rostami, M. 2011. Effects of metal lead on the liver and gill tissues Roach (*Rutilus rutilus caspius*). Journal of Environmental Zoology. 1: 7-14.
14. Morovvati, H., Zolgharnein, H., Noori Moghahi, M.H., Abdi, R., and Ghazilou, A. 2012. Alterations to chloride cells of the secondary lamella and gill branches of spotted scat (*Scatophagus argus* L.) in different salinities. J. Vet. Res. 67: 2. 109-117.
15. Olurin, K.B., Olojo, E.A.A., Mbaka, G.O., and Akindele, A.T. 2006. Histopathological responses of the gill and liver tissue of *Clarias gariepinus* fingerlings to the herbicide, glyphosate. African Journal of Biotechnology. 5: 2480-2487.
16. Olyaei, S.R., Sharifpour, I., and Bakhtiari, A.R. 2014. In vitro study of histopathological effects of Pyrene oil composition on some vital organs of carp (*Cyprinus carpio*). Fisheries Science and Technology. 3: 39-56.
17. Pousty, I., Seddiq Marvasti, S.A.H. 2000. An atlas of fish histology normal and pathological features. Tehran Univ. Press, 297p.
18. Roberts, R.J. 2001. Fish Pathology, 3rd ed. W.B. Saunders Co. Philadelphia, PA., USA. 472p.
19. Saber, T.H. 2011. Histological Adaptation to Thermal Changes in Gills of Common Carp Fishes (*Cyprinus carpio* L.). Jou. Raf. Sci. 22: 1. 46- 55.
20. Senthamilselvan, D., Chezhan, A., Kabilan, N., and Sureshkumar, T. 2011. Synergistic impact of heavy metals (Ni and Hg) and histopathological alterations in the organ (gill) of the fish, (*Lates calcarifer*). European Journal of Experimental Biology. 1: 198-205.

21. Shamsavani, D., Farhodi, M., Movassaghi, A.R., and Kiekha, F. 2007. Clinical and pathological study of effects of phenytoin sodium in gill, liver and kidney of gold fish (*Carassius auratus*). Pajouhesh and Sazandegi, 74: 150-155.
22. Sharifian, M., Khani, F., Khosravi, Kh., Khalili, M., and Hedayati, A. 2013. Sublethal effect of nanosilver on the structure of gill of Caspian roach (*Rutilus rutilus caspicus*) fingerlings. International Journal of Aquatic Biology. 1: 2. 55-60.
23. Van der Oost, R.J., Beyer, J.M., and Vermeulen, N. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. Environmental Toxicology and pharmacology, 13: 57-149.
24. Velmurugan, B., Selvanayagam, M., Cengiz, E.I., and Unlu, E. 2007. Histopathology of lambda-cyhalothrin on tissues (gill, kidney, liver and intestine) of *Cirrhinus mrigala*. Environmental Toxicology and Pharmacology. 24: 286-291.
25. Wang ZL. Nanostructures of zinc oxide. Materialstoday. 7: 6.26-33.
26. Xing, H., Li, S., Wang, Z., Gao, X., and Wang, X. 2012. Histopathological changes and antioxidant response in brain and kidney of Common carp exposed to atrazine and chlorpyrifos. Chemosphere. 88: 377-383.
27. Zhang, L., Jiang, Y., Ding, Y., Povey, M., and York, D. 2007. Investigation into the antibacterial behaviour of suspensions of ZnO nanoparticles (ZnO nanofluids). Journal of Nanoparticle Research. 9: 3. 479-489.
28. Zhu, Z.J., Carboni, R., Quercio, M., Yan, B., Miranda, O.R., Anderton, D.L., Arcaro, K.F., Rotello, V.M., and Vachet, R.W. 2010. Surface properties dictate uptake, distribution, excretion, and toxicity of nanoparticles in fish, Small. 6: 20. 2261-2265.
29. Zhua, X., Changb, Y., and Chen, Y. 2010. Toxicity and bioaccumulation of TiO₂ nanoparticle aggregates in *Daphnia magna*. Chemosphere. 78: 3. 209-215.