



در

امور دام و آبیان شماره ۸۱ زمستان ۱۳۸۷

پژوهش‌های ساززندگ

مطالعه میزان دفع آمونیاک از مرحله لقاح تا تفریح تخم ماهی قزل آلالی رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

- غلامرضا رفیعی، عضو هیات علمی دانشگاه تهران
 - علیرضا میرواقفی، عضو هیات علمی دانشگاه تهران
 - کامران رضایی توابع، عضو هیات علمی دانشگاه تهران
 - باقر مجازی امیری، عضو هیات علمی دانشگاه تهران
 - حسین عبدالحی، موسسه تحقیقات شیلات
 - لیلا طاهری آزاد، دانشگاه تربیت مدرس
- تاریخ دریافت مقاله: دی ماه ۱۳۸۶ تاریخ پذیرش: تیر ماه ۱۳۸۷
Email: krtavabe@ut.ac.ir

چکیده

این مطالعه با هدف بررسی میزان دفع آمونیاک توسط تخم ماهی قزل آلالی رنگین کمان به آب خروجی از تفریح‌گاه در طول یک دوره تفریح تخم انجام گردید. برای انجام این کار، در زمستان سال ۱۳۸۴ در مرکز ماهی سرای نمرود دو تفریح‌گاه تخم ماهی قزل آلالی رنگین کمان با شرایط یکسان انتخاب گردید؛ در یکی از تفریح‌گاه‌ها حدود ۶۰۰۰۰ تخم لقاح‌یافته وارد شد و تفریح‌گاه دیگر خالی و بدون تخم در نظر گرفته شد. سپس به صورت هفتگی از تخم‌های داخل تفریح‌گاه و آب ورودی و خروجی هر دو تفریح‌گاه نمونه‌برداری انجام شد. در طول دوره تفریح هم‌زمان با نمونه‌برداری از آب و تخم، فاکتورهای فیزیکی-شیمیایی آب که بر تعادل بین آمونیاک و آمونیوم تأثیر دارند نظیر pH، درجه حرارت و میزان املاح محلول با دستگاه دیجیتال دقیق اندازه‌گیری و ثبت شدند. میزان آمونیاک در آب با دستگاه فیلتر فتومتری پالین تست و نیترژن کل بافت تخم با روش کج‌لدال اندازه‌گیری شد. میزان دفع آمونیاک به وسیله توده تخم در هفته‌های نمونه‌برداری اول تا پنجم (در طول یک دوره تفریح تخم) به ترتیب 0.0012 ± 0.0003 ، 0.0019 ± 0.0005 ، 0.0088 ± 0.0009 ، 0.0089 ± 0.0013 و 0.0082 ± 0.0011 میلی گرم بر لیتر اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که هم‌زمان با افزایش روند دفع آمونیاک در طول دوره تفریح، میزان نیترژن کل در بافت توده تخم با یک روند کاهشی تفاوت معنی‌داری ($p < 0.05$) را در طول این دوره نشان می‌دهد که نشان‌دهنده دفع آمونیاک از فعالیت‌های متابولیکی ترکیبات آلی زرده تخم می‌باشد.

کلمات کلیدی: ماهی قزل آلالی رنگین کمان، نمرود، تفریح‌گاه، دوره جنینی، آمونیاک

Pajouhesh & Sazandegi No 81 pp: 94-98

Study of ammonia excretion value by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) eggs from fertilization until hatch stage

By: K. Rezaei Tavabe; Research Expert of Tehran University, A.R. Mirvaghefi, Gh.R. Rafiee and B. Mojazi. Amiri; Tehran University, Natural Resources Faculty, H. Abdolhai; Iranian Fisheries Research Institute, L. Taheriazad; Natural Resources Faculty of Tarbiat Modarres University

The main objective of the present study was to determine ammonia excretion by rainbow trout eggs at different stages of incubation period. The research was carried out at Namroud rainbow trout hatchery center in winter 2005. For this purpose, two incubators with same condition as experiment unit were selected which one of them as experimental incubator with approximately 60000 eggs and another one without any eggs. Water and egg sampling during incubation period was conducted weekly. Synchronously with the egg and water sampling, water physico-chemical factors which affect to ammonia-unionized ammonia balance such as pH, Temperatures and soluble materials by digital sensitive apparatus were measured. Afterwards ammonia in water samples were measured by filter-photometry Palin test apparatus and total nitrogen in sampled eggs were determined by Kejlatic method. Ammonia excretion value during incubation period stages from fertilization until hatch was 0.0012 ± 0.0003 , 0.0019 ± 0.0005 , 0.0088 ± 0.0009 , 0.0089 ± 0.0013 and 0.0082 ± 0.0011 ppm respectively. The results showed with ammonia excretion increasing during incubation period total nitrogen at egg texture with decreasing trend had significant differences ($P < 0.05$) during this period that indicates ammonia excretion is resulted from organic component of yolk metabolism activities.

Keywords: Rainbow trout; Namroud; Incubator; Embryonic; Ammonia

مقدمه

امروزه در اکثر مراکز تکثیر ماهی قزل‌آلای رنگین کمان در کشور، از آب خروجی تفریخ‌گاه‌های تخم، برای پرورش لارو تا مرحله انگشت قد استفاده می‌شود؛ در حالی که کیفیت آب خروجی از این تفریخ‌گاه‌ها در اثر ورود متابولیت‌های سمی تخم و جنین داخل تخم نظیر آمونیاک غیر یونیزه (NH_3) کاهش یافته است و این میزان آمونیاک در آب ورودی به استخرهای پرورش لارو، باعث پائین آمدن کیفیت لارو (۱، ۶)، استرس محیطی و کاهش ایمنی زیستی لارو (۴) می‌شود. هدف اصلی این تحقیق بررسی میزان دفع آمونیاک توسط تخم ماهی قزل‌آلا به آب خروجی از تفریخ‌گاه در مراحل مختلف دوره تفریخ می‌باشد. جنین ماهی در دوره تفریخ تخم، مانند هر ارگانسیم زنده دارای فعالیت‌های متابولیسمی جهت سوخت و ساز پروتئین، اسیدهای آمینه و اسیدهای چرب موجود در زرده تخم می‌باشد (۱۰). مطالعات متابولیسمی و متابولیت‌های دوره جنینی تخم ماهیان قزل‌آلای خال قرمز (۷)، قزل‌آلای رنگین کمان (۵) نشان داده است که مواد دفعی و متابولیت جنین ماهی فقط به صورت آمونیاک یا آمونیوم غیر یونیزه می‌باشد. این ترکیب برای تخم و لارو ماهی سمی و مضر بوده و در صورتی که غلظت آن در آب مرکز تکثیر و تفریخ‌گاه‌های ماهی قزل‌آلای رنگین کمان از حد آستانه فراتر رود باعث تلفات بالای تخم و لارو (۲) شده یا بر کیفیت تخم (۷) و درصد لقاح یا بازماندگی بعد از لقاح تخم (۱، ۹) تأثیر منفی می‌گذارد. بنابراین غلظت آمونیاک در آب مراکز تکثیر به عنوان یکی از فاکتورهای کیفی آب تلقی می‌شود که میزان آن در آب

مراکز تکثیر بر مراحل مختلف تکامل جنین و لارو تأثیر می‌گذارد. از آنجائی که شرایط محیطی آب در دوره تفریخ تخم بر درصد تفریخ آن و بازماندگی لارو بعد از تفریخ تأثیرگذار است (۴)، بنابراین تأمین آب با کیفیت مناسب برای مراکز تکثیر یک اقدام مدیریتی بسیار مهم و ضروری تلقی می‌شود. امروزه غلظت آمونیاک در آب ورودی به مراکز تکثیر و تفریخ‌گاه‌های تخم ماهی قزل‌آلا به عنوان یکی از عوامل پیراسنجه‌های کیفی آب در نظر گرفته می‌شود؛ اما متأسفانه کیفیت آب خروجی از تفریخ‌گاه‌ها که به استخرهای لارو و بچه ماهی انگشت وارد می‌شود، مورد توجه قرار نمی‌گیرد. تأمین آب با کیفیت مناسب برای لارو ماهی قزل‌آلای رنگین کمان و شناخت دقیق ترکیبات نیتروژنی سمی موجود در آب و تغییرات میزان این مواد در طول دوره تفریخ در توده تخم به عنوان یک اقدام مدیریتی لازم و ضروری است. در این تحقیق میزان دفع آمونیاک توسط توده تخم ماهی قزل‌آلای رنگین کمان از لقاح تخم تا تفریخ آن در آب خروجی از تفریخ‌گاه مورد بررسی قرار گرفت. برای این کار در مراحل مختلف دوره تفریخ، تغییرات آمونیاک در آب خروجی از تفریخ‌گاه نسبت به ورودی آن اندازه‌گیری شد؛ هم‌زمان نیز بافت تخم هضم و تغییرات میزان نیتروژن کل آن در مراحل مختلف دوره تفریخ مورد مطالعه و بررسی قرار گرفت.

مواد و روش کار

مکان و زمان تحقیق

اجرای این تحقیق در زمستان سال ۱۳۸۴ در مرکز ماهی سرای

مورد بررسی قرار گرفت. سپس برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از آنالیز تجزیه واریانس یک طرفه و آزمون دانکن با سطح اعتماد ۵ درصد اسنفاده شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS - ۱۲ انجام گردید. نمودارهای مربوطه نیز با استفاده از نرم افزار Excel رسم شد.

نتایج

اندازه‌گیری تغییرات پیراسنجه‌های محیطی آب ورودی به تفریخ‌گاه (درجه حرارت، pH، DO، و آمونیاک غیر یونیزه) در طول تحقیق تفاوت معنی‌داری را نشان نداد ($p > 0.05$). میزان درجه حرارت 10.7 ± 1.3 درجه سانتیگراد، اکسیژن محلول 7.10 ± 0.30 میلی گرم در لیتر، pH 7.4 ± 0.2 و آمونیاک غیر یونیزه 0.43 ± 0.09 میلی گرم در لیتر ثبت شد. نتایج بدست آمده از این مطالعه نشان داد که هم زمان با افزایش روند دفع آمونیاک در طول دوره تفریخ (نمودار ۱) میزان نیترژن کل در بافت توده تخم، با یک روند کاهشی تفاوت معنی‌داری ($p < 0.05$) را در طول این دوره نشان می‌دهد (نمودار ۲) که نشان‌دهنده دفع آمونیاک از فعالیت‌های متابولیسمی ترکیبات آلی فوق می‌باشد. از آنجائی که احتمال این وجود داشت که فعالیت میکروارگانیسم‌های درون آب تفریخ‌گاه بر میزان آمونیاک آب خروجی از تفریخ‌گاه تأثیر گذار باشد، به همین دلیل در این تحقیق یک تفریخ‌گاه با شرایط مشابه تفریخ‌گاه مورد مطالعه و در کنار هم ولی بدون تخم جهت کنترل فعالیت میکروارگانیسم‌ها در نظر گرفته شد. نتایج بررسی تغییرات آمونیاک در آب خروجی تفریخ‌گاه شاهد بدون تخم تفاوت معنی‌داری با آب ورودی آن نشان نداد ($p > 0.05$) اما این مقایسه در تفریخ‌گاه حاوی تخم در تمام مراحل نمونه برداری معنی‌دار ($p < 0.05$) و میزان آمونیاک افزایش یافته است. این مطلب بیان‌گر این موضوع می‌باشد که میکروارگانیسم‌های درون تفریخ‌گاه تأثیری بر جذب یا دفع آمونیاک ندارند و افزایش مربوط به آمونیاک در آب خروجی تفریخ‌گاه حاوی تخم (نمودار ۱)، مربوط به تخم‌های درون تفریخ‌گاه می‌باشد. در حقیقت نتایج نمودار ۲ تأیید کننده نتایج نمودار ۱ می‌باشد.

نمرد واقع در کیلومتر ۱۱۰ جاده فیروزکوه در شمال شرقی شهرستان تهران انجام شد. در این مطالعه جهت تکثیر از ۲۵ قطعه مولد ماده سه ساله و ۱۰ قطعه مولد نر دو ساله استفاده شد. واحد آزمایش شامل یک تفریخ‌گاه (تراف) کالیفرنایی بود که چهار سینی در آن قرار داشت و در هر سینی حدود ۱۵۰۰۰ تخم لقاح یافته (حدود ۶۰۰۰۰ تخم لقاح یافته در چهار سینی تراف) وارد شد. البته متوسط معمول میزان تخم وارد شده به هر سینی ۸۰۰ گرم (حدود ۱۱۰۰۰ تخم در هر سینی و ۴۴۰۰۰ تخم در هر تراف) می‌باشد (۴)؛ ولی در این تحقیق برای بررسی دقیق‌تر تغییرات آمونیاک در آب خروجی از تفریخ‌گاه نسبت به آب ورودی آن در چهار سینی تراف ۶۰۰۰۰ تخم معرفی شد. در تمام مدت طول تحقیق اقدامات مدیریتی نظیر جداسازی تخم‌های لقاح نیافته، تنظیم آب ورودی به تفریخ‌گاه و اندازه‌گیری تغییرات پیراسنجه‌های محیطی آب تفریخ‌گاه (درجه حرارت، میزان اکسیژن محلول در آب و pH) به صورت هفتگی با استفاده از دستگاه دیجیتالی مدل Germany/۳-Multiline- F/SET انجام می‌شد. برای کم کردن خطا و احتمال فعالیت میکروارگانیسم‌ها در داخل تفریخ‌گاه اصلی حاوی تخم، یک تفریخ‌گاه با همان شرایط تفریخ‌گاه اصلی و در کنار هم ولی فاقد تخم، به عنوان تفریخ‌گاه شاهد در نظر گرفته شد. دبی آب ورودی به هر دو تفریخ‌گاه از یک منبع آبی و برابر ۴ لیتر در دقیقه برای هر سینی و ۱۶ لیتر در دقیقه برای چهار تا سینی تفریخ‌گاه تنظیم شد.

نمونه‌برداری از آب و اندازه‌گیری آمونیاک

نمونه‌برداری و اندازه‌گیری آب به صورت هفتگی از آب ورودی و خروجی هر دو تفریخ‌گاه انجام می‌شد. اندازه‌گیری غلظت آمونیاک غیر یونیزه در نمونه‌های آب با استفاده از دستگاه فیلتر-فتومتر پالین تست مدل England/۸۰۰۰-PT انجام شد (۳). عمل کرد این دستگاه بر اساس طیف نوری در دامنه طول موج ۴۰۰ تا ۷۰۰ نانومتر بوده که برای اندازه‌گیری آمونیاک غیر یونیزه (NH_3) از طیف با طول موج ۶۴۰ نانومتر استفاده می‌شود.

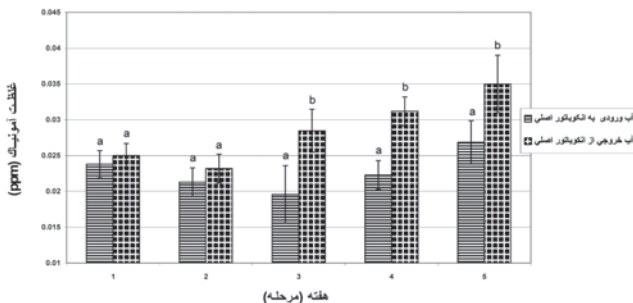
نمونه‌برداری از تخم‌های درون تفریخ‌گاه و اندازه‌گیری نیترژن کل

بافت تخم

بعد از قرار دادن تخم‌های لقاح یافته به داخل تفریخ‌گاه، در هر مرحله نمونه‌برداری (هر هفته) حدود ۱۰۰ عدد تخم از قسمت‌های مختلف تفریخ‌گاه نمونه‌برداری شدند. تخم‌های نمونه‌برداری شده در ظروف پلاستیکی به آزمایشگاه انتقال و تا زمان انجام عملیات آزمایشگاهی در فریزر (دمای ۱۸ درجه سانتیگراد) قرار داده شدند. سپس اندازه‌گیری میزان نیترژن کل در یک گرم تخم با استفاده از روش کج‌لدال (۸) انجام شد.

طرح آزمایش و تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

طرح آزمایش بکاررفته در این تحقیق، طرح نمونه‌برداری کاملاً تصادفی (SRS) بود. برای نمونه‌برداری از آب، از دو محل نمونه‌برداری (ورودی و خروجی تفریخ‌گاه) با سه تکرار، نمونه‌برداری بصورت کاملاً تصادفی در هر محل نمونه‌برداری برای بررسی تغییرات آمونیاک در آب انجام شد. در این تحقیق نرمال بودن داده‌های بدست آمده با آزمون Shapiro-Wilk



نمودار ۱- تغییرات غلظت آمونیاک ($mean \pm S.D$) آب ورودی و خروجی تفریخ‌گاه اصلی در طول دوره جنینی (مقایسه درون گروهی می‌باشد و حروف لاتین مشابه نشان‌دهنده عدم تفاوت معنی‌دار و حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار با سطح اعتماد ۵ درصد می‌باشد)

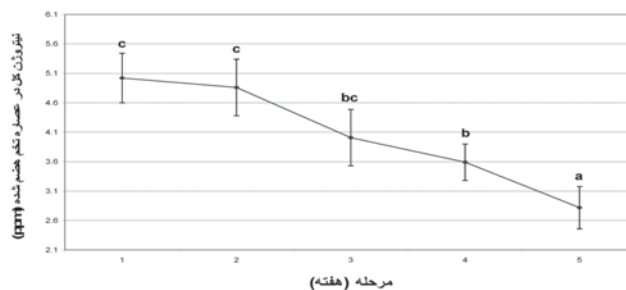
بیشتر می‌باشد. علت این موضوع به خاطر درجه حرارت بالای محیط تفریخ‌گاه در تخم ماهی کپور معمولی می‌باشد (۱۱). مطالعات نشان داده است که ترکیبات نیتروژنی در زرده تخم ماهی به صورت اسیدهای آمینه، پروتئین یا اسیدهای چرب می‌باشد که در هنگام متابولیسم جنین، بصورت آمونیاک دفع می‌گردد (۵). در این تحقیق نتایج بررسی تغییرات آمونیاک در آب خروجی تفریخ‌گاه شاهد بدون تخم تفاوت معنی‌داری با آب ورودی آن نشان نداد ($p > 0.05$) اما این مقایسه در تفریخ‌گاه حاوی تخم در تمام مراحل نمونه‌برداری معنی‌دار ($p < 0.05$) و میزان آمونیاک افزایش یافته است (نمودار ۱) که این میزان افزایش مربوط به دفع آن توسط تخم‌های درون تفریخ‌گاه می‌باشد. یعنی کاهش غلظت نیتروژن کل در بافت تخم (نمودار ۲)، بر اثر فعالیت‌های متابولیسمی جنین بصورت آمونیاک در طول دوره تفریخ دفع می‌شود. بنابراین پیشنهاد می‌شود تا حد امکان از آب خروجی از تفریخ‌گاه تخم برای پرورش لارو و بچه ماهی استفاده نشود؛ ولی در مراکزی که از نظر میزان آب در مزیقه هستند حتماً اقدامات مدیریت بهداشتی جهت کاهش غلظت آمونیاک در آب خروجی از تفریخ‌گاه تخم برای پرورش لارو ضروری است.

تشکر و قدردانی

از جناب آقای مهندس جذبی زاده و پرسنل محترم مرکز ماهی‌سرای نمرود جهت راهنمایی‌های ارزنده در اجرای طرح و از آقایان مهندس نظرزاده، مهندس عاشوری و مهندس اسداللهی کارشناسان آزمایشگاه منابع طبیعی دانشگاه تهران و از سرکار خانم خوشوقتی کارشناس آزمایشگاه دانشکده علوم زراعی و دامی پردیس کشاورزی دانشگاه تهران، جهت همکاری در اندازه‌گیری‌های آزمایشگاهی صمیمانه تشکر و قدردانی می‌شود. همچنین از معاونت محترم پژوهشی دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران جهت تأمین منابع مالی طرح تشکر و قدردانی بعمل می‌آید.

منابع مورد استفاده

- 1- Depeche, J., Billard, R., 1994. Embryology in fish a review. Society France Ichthyology, Paris, 123 pp.
- 2- De, J.F., Solbe, L.G., Shurben, D.G., 1989. Toxicity of ammonia to early life stages of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Water Research, 23:127-129.
- 3- Harwize, W. (2004). Official methods of analysis of AOAC international, 17th edition, Maryland, USA, 4200 pp.
- 4- Poxton, M.G., 1991. Incubation of salmon eggs and rearing of alevins: Natural temperature fluctuations and their influence on hatchery requirement. Aquaculture Engineering, 1:31-35.
- 5- Rahaman, E., Donell, M., Pilley, C.M., 1996. Excretion and distribution of ammonia and the influence of boundary layer acidification in embryonic Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). The Journal of Experimental Biology, 199:2713-2723.
- 6- Shingles, A., McKenzie, D.J., Taylor, E.w., Butler, P.J., Cerandini, S., 2001. Effects of sublethal ammonia exposure on



نمودار ۲- تغییرات نیتروژن کل ($\text{mean} \pm \text{S.D}$) در یک گرم تخم ماهی قزل‌آلای رنگین کمان در طول دوره جنینی (حروف لاتین مشابه نشان‌دهنده عدم تفاوت معنی‌دار و حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین مراحل نمونه‌برداری با سطح اعتماد ۵ درصد می‌باشد).

بحث و نتیجه‌گیری

آمونیاک عمده‌ترین و مهم‌ترین ماده دفعی فعالیت‌های متابولیسمی آبزیان می‌باشد (۷) که به صورت تعادلی و به دو حالت یونیزه و غیر یونیزه در آب وجود دارد، این تعادل تحت تأثیر برخی خصوصیات فیزیکی-شیمیایی آب می‌باشد (۵). آمونیاک غیر یونیزه (NH_3) برای تمام مراحل زیست آبزیان سمی بوده و در صورت بالا رفتن غلظت آن از حد مجاز، ابتدا برای آبی ایجاد استرس نموده و با تداوم آن باعث تلفات سنگینی در مراکز تکثیر و پرورش آبزیان می‌شود (۶). علاوه بر ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (۲، ۹)، دفع آمونیاک غیر یونیزه توسط جنین ماهی قزل‌آلای خال قرمز (۷)، ماهی آزاد (*Salmo salar*) (۴) و کپور معمولی (۱۱) نشان داده شده است؛ ولی میزان دفع آمونیاک در مراحل مختلف جنینی این ماهیان بیان نشده است. بر اساس نمودار ۱ جنین ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در دو هفته اول دوره تفریخ، آمونیاک قابل توجهی دفع نمی‌کند؛ اما با یک روند افزایشی، از هفته سوم تا انتهای دوره تفریخ، غلظت آمونیاک در آب خروجی از تفریخ‌گاه حاوی تخم نسبت به آب ورودی آن تفاوت معنی‌داری نشان می‌دهد ($p < 0.05$) که نشان‌دهنده دفع آمونیاک توسط تخم‌های درون تفریخ‌گاه می‌باشد. Ornella و Wicorta (۱۱) میزان دفع آمونیاک توسط ۶۰۰۰۰ عدد تخم ماهی کپور معمولی را در مرحله تفریخ ۰/۰۱۶۳ میلی‌گرم بر لیتر بدست آورد، در حالی که در این تحقیق، میزان دفع آمونیاک توسط ۶۰۰۰۰ عدد تخم در حال تفریخ ماهی قزل‌آلا (مرحله پنجم نمونه برداری) ۰/۰۰۸۲ میلی‌گرم بر لیتر محاسبه شد (نمودار ۱). البته از آنجائی که اندازه تخم و قطر تخم این دو ماهی متفاوت است، میزان زرده و اندوخته غذایی داخل تخم آنها نیز تفاوت قابل ملاحظه‌ای دارد. بنابراین با تعداد مساوی تخم این دو ماهی نمی‌توان شدت میزان دفع آمونیاک توسط تخم را در آنها مقایسه کرد ولی با یک تناسب ساده از نظر حجم توده تخم تا حدودی می‌توان بیان کرد که مقدار دفع آمونیاک با حجم مساوی (یک گرم تخم)، در مرحله تفریخ تخم ماهی کپور معمولی نسبت به ماهی قزل‌آلا با شدت بیشتری انجام می‌گیرد؛ یعنی در یک مرحله مشابه فعالیت متابولیسمی تخم ماهی کپور معمولی نسبت به ماهی قزل‌آلا

lethal ammonia exposure on the swimming performance of coho salmon and the acute toxicity of ammonia in swimming and resting rainbow trout. *Aquatic Toxicology*, 59:55-69.

10- Wright, P.A., Fyhan, H.J., 2001. Ontogeny of nitrogen metabolism and excretion. *Fish Physiology*, 20:189-200.

11- Wicotra, A., Ornella, S., 1989. Some characteristics of mitochondrial monoamine oxidase activity in eggs of carp (*Cyprinus carpio*) and rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 92:401-404.

swimming performance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *The Journal of Experimental Biology*, 204:2691-2698.

7- Till, L., Ferling, H., Maike, G., Rolf, N., Rita, T., 2003. Development and subcellular effects of chronic exposure to sub-lethal concentration of ammonia in brown trout (*Salmo trutta fario*) early life stages. *Aquatic Toxicology*, 65:39-54.

8- Tripathi, R.D., 1989. *Methods of Analysis*. Wiley Eastern Limited, New Delhi, 244 pp.

9- Wicks, B.J., Joensen, R., Tang, Q., Randall, D.J., 2002. Swimming and ammonia toxicity in salmonids: The effect of sub

