University of Guilan with collaboration of Iranian Aquaculture Society

Aquatic Animals Nutrition

Vol. 11, No. 4, 2026, pages: 33-46
DOI: 10.22124/janb.2026.34138.1312

RESEARCH PAPER **OPEN ACCESS**

Effects of dietary malic acid and ginger powder on growth performance, immune response, antioxidant status, and intestinal digestive enzyme activities in juvenile grass carp, *Ctenopharyngodon idella*

Seyyed Ehsan Saberi[1], Afshin Ghelichi[2*], Reza Akrami[2], Fariborz Ghojoghi[2], Sara Jorjani[2]
1- Department of Fisheries, Young Researchers and Elite Club, Azadshahr Branch, Islamic Azad University, Azadshahr, Golestan, Iran
2- Department of Fisheries, Azadshahr Branch, Islamic Azad University, Azadshahr, Golestan, Iran

Received 11 November 2025 Revised 17 December 2025 Accepted 18 December 2025 Published online 14 September 2026

KEYWORDS

Antioxidative status
Ctenopharyngodon idella
Growth
Zingiber officinale
Malic acid
Nonspecific immunity

ABSTRACT

Introduction: The aquaculture industry, a fundamental pillar of food security and a means of meeting the ever-growing nutritional demands of human populations, holds a strategic position. However, the sustainable development of this industry faces numerous obstacles, including a wide range of bacterial diseases, such that grass carp, *Ctenopharyngodon idella* farms in Iran are currently grappling with complex biological, managerial, and health challenges. In this context, the novel approach of using phytogenic supplements and organic acids as a safe and sustainable alternative to antibiotics, due to the detrimental consequences of indiscriminate antimicrobial use in culture systems, has emerged as a key and increasingly adopted global strategy. Among natural compounds, ginger, *Zingiber officinale*, owing to its bioactive constituents such as gingerol, shogaol, and zingerone, exhibits remarkable anti-inflammatory, antioxidant, and antimicrobial properties. Furthermore, malic acid (MA), as an organic acid, can effectively improve digestion and nutrient absorption, particularly under high stocking densities, by reducing gastrointestinal pH and inhibiting pathogenic bacterial populations within the intestinal tract.

Materials and Methods: In the present study, a total of 240 juvenile grass carp with an average initial weight of 4.4 ± 0.01 g were fed for 58 days under a completely randomized design with four dietary treatments. The experimental treatments included T_0: control group (without any supplement), T_1: diet containing 0.25% MA, T_2: diet containing 0.2% ginger, and T_3: diet containing a synergistic combination of both supplements (0.25% MA + 0.2% GP). The evaluated parameters comprised growth performance (WG, FCR, SGR, PER,

and FE), digestive enzyme activities (protease, lipase and amylase), non-specific immune components (Ig, total IgG and lysozyme activity), and antioxidant defense indices (GPx, SOD and CAT). Statistical analyses were performed using SPSS (v.22) at a 95% confidence level ($P<0.05$).

Results: Quantitative findings from the measurements demonstrated significant increases in WG, SGR, and PER in all supplemented treatments (T_1, T_2 and T_3) compared to the control group. Concurrently, these treatments led to a marked and significant reduction in FCR ($P< 0.05$). Moreover, digestive enzyme activities (particularly protease and lipase), Ig levels and lysozyme activity, as well as antioxidant enzyme efficiencies (GPx, SOD and CAT), were significantly elevated in the supplemented groups relative to the control. Among these, the combined treatment (T_3) exhibited the most pronounced and statistically significant positive effects across all measured parameters compared to the other treatments.

Discussion: The results of this study clearly indicate the positive and substantial impact of GP and MA supplements, particularly in their synergistic combination, on the physiological and immunological parameters of grass carp. It appears that GP, by stimulating the secretion of digestive enzymes such as amylase and protease, facilitates the efficient digestion of carbohydrates and proteins, and through appetite enhancement and improvement of beneficial intestinal microbial populations, lays the groundwork for optimal growth. On the other hand, MA, by lowering intestinal pH, creates an unfavorable environment for pathogenic bacteria and contributes significantly to the balance of gut microflora. While both supplements exhibited relatively similar potency in stimulating antibody secretion and disrupting the membranes of invading bacteria, GP demonstrated superior efficacy in the context of antioxidant defense, particularly in decomposing hydrogen peroxide and scavenging reactive oxygen species. Overall, the synergy of these two nutritional agents (T_3), through their concurrent influence on growth, immunity, and antioxidant axes, delivered a performance far beyond their individual applications, thereby strengthening their scientific and practical recommendation.

Conclusion: In general, the present study demonstrated that dietary supplements derived from plant sources and organic acids possess the potential to serve as more sustainable and effective alternatives to conventional antibiotics in aquaculture systems. The synergistic combination of GP and MA, compared to each compound alone, exhibited considerably higher efficacy in improving growth performance indices, enhancing the immune defense system, and boosting antioxidant capacity. Moreover, while promoting overall fish health and mitigating adverse environmental impacts, this combination can be recommended as a practical and effective strategy to improve the productivity of grass carp farming operations in the country.

*Corresponding author: afshin.ghelichi@iau.ac.ir

CC BY NC

دانشگاه گیلان با مشارکت انجمن آبزی‌پروری ایران

تغذیه آبزیان

سال یازدهم، شماره چهارم، دی ۱۴۰۴، صفحات ۴۶-۳۳

DOI: 10.22124/janb.2026.34138.1312

"مقاله پژوهشی"

تأثیر جیره حاوی اسید مالیک و پودر زنجبیل بر عملکرد رشد، ایمنی، وضعیت ضد اکسایشی و فعالیت آنزیم‌های گوارشی روده بچه ماهیان کپور علفخوار (*Ctenopharyngodon idella*)

سید احسان صابری[۱]، افشین قلیچی[۲*]، رضا اکرمی[۲]، فریبرز قجقی[۲]، سارا جرجانی[۲]

۱- گروه شیلات، دانش‌آموخته دکتری تخصصی شیلات، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد آزادشهر ، دانشگاه آزاد اسلامی، آزادشهر، گلستان

۲- گروه شیلات، واحد آزادشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، آزادشهر، گلستان

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۸/۲۰ تاریخ بازنگری: ۱۴۰۴/۰۹/۲۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۹/۲۷ تاریخ انتشار: ۱۴۰۵/۰۶/۲۳

چکیده

شیوع بیماری‌های باکتریایی مهم‌ترین مانع در مسیر توسعه پایدار صنعت آبزی‌پروری محسوب می‌شود. در این راستا، زنجبیل (*Zingiber officinale*) به‌عنوان یک محرک رشد و تقویت‌کننده دستگاه ایمنی آبزیان شناخته شده و اسید مالیک نیز با کاهش pH محتویات دستگاه گوارش، از رشد و تکثیر عوامل بیماری‌زای میکروبی (باکتری‌ها و قارچ‌ها) جلوگیری می‌کند. این دو افزودنی غذایی، با بهبود عملکرد هضم و جذب مواد مغذی، قابلیت جایگزینی آنتی‌بیوتیک‌ها را به‌ویژه در شرایط تراکم‌های بالای ذخیره‌سازی و سامانه‌های پرورشی متراکم دارند. مطالعه حاضر با هدف ارزیابی اثرات مکمل‌سازی جداگانه و ترکیبی اسید مالیک و پودر زنجبیل بر عملکرد رشد و شاخص‌های سلامت بچه‌ماهیان کپور علفخوار با میانگین وزن اولیه ۰/۰۱ ± ۴/۴ گرم طی دوره‌ای ۸ هفته‌ای طراحی شد. برای این منظور، چهار تیمار آزمایشی شامل: شاهد T_0، (فاقد هرگونه مکمل)، T_1 حاوی ۰/۲۵٪ اسید مالیک، T_2 حاوی ۰/۲٪ پودر زنجبیل و T_3 حاوی ترکیب هم‌افزایی ۰/۲۵٪ اسید مالیک و ۰/۲٪ پودر زنجبیل در نظر گرفته شدند. یافته‌ها نشان‌دهنده افزایش معنی‌دار در مؤلفه‌های عملکرد وزنی نهایی، سطوح ایمونوگلوبولین و فعالیت لایزوزیم، کارایی پروتئاز و لیپاز و نیز فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز بودند. علاوه‌براین، این تیمارها به کاهش معنی‌دار ضریب تبدیل غذایی انجامیدند ($P<0/05$). به‌طور کلی، چنین نتایجی مبین تأثیری بنیادین در ارتقای سامانه دفاعی و افزایش تاب‌آوری موجودات زنده در برابر تنش‌های اکسایشی محسوب می‌شود. مکمل هم‌افزایی T_3 در مقایسه با دیگر تیمارهای مطالعه‌شده، از کارآیی به‌مراتب برجسته‌تر و معنادارتری در محورهای سه‌گانه تقویت دستگاه ایمنی، بهبود شاخص‌های رشد و افزایش توان ضداکسایشی برخوردار است؛ به این ترتیب، به‌کارگیری این ترکیب، با پشتوانه داده‌های عملکردی، قابل توصیه در ماهی کپور علفخوار می‌باشد.

کلمات کلیدی

آنتی‌اکسیدان

ایمنی

اسید مالیک

رشد

زنجبیل

کپور علفخوار

نویسنده مسئول: afshin.ghelichi@iau.ac.ir

مقدمه

صنعت آبزی‌پروری در راستای تأمین نیازهای تغذیه‌ای جهان نقش مهمی در تولید غذای با کیفیت ایفا، و همزمان با سوءتغذیه جهانی نیز مبارزه میکند (Paolucci, 2023). در بین گونه‌های پرورشی آب شیرین، ماهی کپور علفخوار (*Ctenopharyngodon idella*) با سهمی بیش از ۱۰٪ تولیدات جهانی جایگاه مهمی در این صنعت آبزی‌پروری برخوردار است (FAO, 2018). پرورش ماهی کپور علفخوار در ایران، هم‌اکنون با طیفی از چالش‌های زیستی و مدیریتی دست‌وپنجه نرم می‌کند. در بُعد بیماری‌ها، عوامل عفونی متنوعی از جمله انگل‌های ترماتود مونوژن [1]، باکتری *Aeromonas hydrophila* (عامل آنتروباکتریوز) و ویرمی بهاره کپور [2] از عوامل ویروسی تهدیدی جدی برای این گونه پرورشی به شمار می‌روند. این معضلات، همراه با مشکلات کیفی آب و افزایش چشمگیر هزینه‌های تولید، خسارات اقتصادی سنگینی به فعالان این حوزه تحمیل کرده است. در این میان، رویکرد نوین استفاده از مکمل‌های گیاهی به‌عنوان جایگزینی ایمن، برای آنتی‌بیوتیک‌ها به‌عنوان یک راهبرد کلیدی و رو به رشد در جهان مطرح شده است (Dalimi et al. 2020). ضرورت این تغییر رویکرد، ریشه در پیامدهای ناگوار مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها در مزارع پرورشی دارد که نه‌تنها به گسترش سویه‌های مقاوم به دارو دامن می‌زند، بلکه باقی‌مانده این ترکیبات در بافت ماهی و دفع آنها به محیط‌زیست، مخاطرات جبران‌ناپذیری را به همراه دارد. در مقابل، مکمل‌های گیاهی با دارا بودن ترکیبات زیست‌فعالی همچون آلکالوئیدها، فلاونوئیدها و ترکیبات فنولی، گزینه‌هایی طبیعی، مؤثر و فاقد عوارض جانبی مضر برای جایگزینی آنتی‌بیوتیک‌های شیمیایی محسوب می‌شوند (Yao et al. 2025).

طی سال‌های اخیر مطالعات متعددی به ارزیابی اثرات عصاره‌ها و ترکیبات مختلف گیاهی بر روی این گونه ماهی پرداخته‌اند. از جمله این پژوهش‌های انجام شده بر روی ماهی کپور علفخوار می‌توان به تأثیر پلی‌فنول‌های چای (Yao et al. 2025)، عصاره برگ نخل مازاری (*Nannorrhops ritchiana*) (Shohreh et al. 2025) و اثرات پروآنتوسیانیدین‌ها و بربرین هیدروکلراید مشتق از دانه انگور [3] (Penghui et al. 2024) اشاره کرد. یافته‌های این تحقیقات همگی مؤید افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم‌های ضد اکسایشی، تعدیل پاسخ‌های التهابی و ارتقای عملکرد دستگاه گوارش ماهی کپور علفخوار دارد. پژوهش‌های گسترده‌ای که بر روی این ترکیبات فعال زیستی انجام شده، نویدبخش افق‌های روشنی در عرصه آبزی‌پروری پایدار است؛ رویکردی که در آن می‌توان ضمن تأمین سلامت آبزیان و کاهش تلفات، گامی مؤثر در جهت تولید غذای سالم‌تر، حفظ کیفی محیط‌زیست و جلوگیری از بروز خسارت‌های مالی برداشت. توجه و سرمایه‌گذاری بیشتر بر این راهبرد سبز، نه‌تنها به ارتقای صنعت پرورش ماهی کمک می‌کند، بلکه تضمین‌کننده سلامت زنجیره غذایی و پایداری زیست‌بوم‌های آبی نیز خواهد بود. محققان توجه فزآینده‌ای به جایگزینی آنتی‌بیوتیک‌ها با محرک‌های ایمنی، پروبیوتیک‌ها، پری‌بیوتیک‌ها و عصاره‌های گیاهی دارند تا سلامت و عملکرد ماهیان پرورشی را بهبود ببخشند (Ng and Koh, 2017)، به طوری‌که به گیاهان دارویی به واسطه تقویت دستگاه ایمنی و بهبود سلامتی آبزیان توجه شده است.

گیاه زنجبیل (*Zingiber officinale*) به واسطه ترکیبات زیست‌فعالی [4] مانند جینجرول، شوگائول و زینجرون، اثرات مثبتی بر روی عملکرد رشد و تقویت دستگاه ایمنی ماهیان دارند (Mohammadi et al. 2020)، به طوری که این اثرات به خواص ضدالتهابی، ضداکسایشی و ضدمیکروبی زنجبیل نسبت داده شده که با تقویت آنزیم‌های گوارشی سبب بهبود عملکرد رشد و مقاومت آنان در برابر بیماری‌ها می‌شوند (Vahedi et al. 2017). محققان در سال‌های اخیر مطالعات گوناگونی در زمینه اثرات زنجبیل بر روی گونه‌هایی مانند فیل‌ماهی (*Huso huso*)، گورخرماهی (*Danio rerio*) و کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) منتشر کردند (Vahedi et al. 2017; Ahmadifaret al. 2019; Mohammadi et al. 2020; Ashry et al. 2023).

اسیدهای آلی به عنوان یک مکمل غذایی نقش مهمی در بهبود عملکرد رشد، پاسخ ایمنی و جلوگیری از عوامل

[1] Dactylogyridae
[2] *Sprivivirus cyprinus*
[3] Grape seed proanthocyanidins and berberine hydrochloride
[4] Bioactive compounds

بیماری‌زای ماهیان دارند (Zhang et al. 2020). به طوری‌که اسید مالیک به عنوان یک عامل ضدمیکروبی نقش مهمی در تنظیم عملکرد pH و تعادل بافت میکروبی روده ماهیان داشته (Ricke, 2003) و با تعدیل میکروبیوتای روده و تکثیر باکتری‌های مفید علاوه بر حفظ سلامت ماهیان سبب افزایش کارایی دستگاه گوارشی، فعالیت ضداکسایشی و تقویت مقاومت در برابر تنش اکسایشی و شرایط محیطی می‌شوند (Hassaan et al. 2020). از این منظر، محققان مختلف در سال‌های اخیر مطالعاتی در زمینه اثرات اسید مالیک بر روی گونه‌های مانند تاسماهی سیبری (*Acipenser baerii*) (Alizadeh et al. 2019)، کپور معمولی (Safari et al. 2021) و ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) (Yousefi et al. 2023) انجام و منتشر کردند. اگرچه شواهدی در مورد اثرات مجزای پودر زنجبیل و اسید مالیک وجود دارد، اما تاکنون مطالعه‌ای در باره بررسی اثرات ترکیبی آن‌ها بر عملکرد رشد و ایمنی ماهیان انجام نشده است، به طوری‌که پودر زنجبیل با تقویت عملکرد رشد، دستگاه ایمنی و اسید مالیک نیز با تقویت عملکرد رشد و سلامت میکروبی به عنوان یک عامل طعم‌دهنده غذایی موجب بهبود طعم تند زنجبیل و حفظ خواص زیست‌فعال آن می‌شوند. به همین دلیل، هم‌افزایی پیشنهادی بین این دو ترکیب می‌تواند قدرت دستگاه ایمنی و رشد کلی را بهبود داده و شانس عفونت‌های باکتریایی را کاهش دهد (Hassaan et al. 2020). بنابراین، در این مطالعه به منظور بررسی چگونگی تأثیر ترکیب این دو مکمل در جیره غذایی بچه‌ماهیان کپور علفخوار بر روی عملکرد رشد، پاسخ ایمنی و ضداکسایشی بررسی و تحلیل گردید.

مواد و روش‌ها

طراحی آزمایش و شرایط پرورش

در این پژوهش، جیره‌های آزمایشی بر پایه جیره غذایی تهیه شده از شرکت خوارک دام و طیور مازندران (جدول ۱) تنظیم شدند. به این منظور، این جیره‌ها برای چهار گروه تیماری شامل: گروه شاهد T_0، تیمار حاوی ۰/۲۵٪ اسید مالیک T_1، تیمار حاوی ۰/۲٪ پودر زنجبیل T_2 و تیمار ترکیبی هم‌افزای حاوی ۰/۲۵٪ اسید مالیک به همراه ۰/۲٪ پودر زنجبیل T_3 در نظر گرفته شد. هر یک از این جیره‌ها در چهار بستهٔ جداگانه ۱۰۰۰ گرمی تهیه و مواد افزودنی با دقت کامل با جیره پایه مخلوط شدند (Mohammadi et al. 2020; Zhang et al. 2020). برای آماده‌سازی نهایی، مخلوط خوراک از چرخ گوشت عبور داده شده و به صورت پلت درآمدند. این پلت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق خشک، سپس با استفاده از آسیاب مناسب پودر، و تا زمان مصرف در دمای $-20\ ^{\circ}C$ نگهداری شدند.

بچه ماهیان کپور علفخوار مورد نیاز از یک مرکز تکثیر خصوصی در استان گلستان تهیه و به آزمایشگاه آبزی‌پروری مرکز فنی و حرفه‌ای شهر گرگان منتقل شدند. برای سازگاری با شرایط جدید، ماهیان به مدت ۱۴ روز در مخازن ۱۰۰۰ لیتری نگهداری، و با جیره پایه (جدول ۱) به میزان ۴٪ وزن بدن طی دو نوبت در روز تغذیه شدند. پس از پایان دوره سازگاری، تعداد ۲۴۰ عدد بچه ماهی با میانگین وزنی ۰/۰۱ ± ۴/۴ گرم به‌طور تصادفی در دوازده مخزن ۱۵۰ لیتری (تراکم ۲۰ عدد در هر مخزن) منطبق بر چهار تیمار و هرکدام با سه تکرار توزیع شدند. دوره پرورش به مدت ۸ هفته ادامه یافت و ماهیان روزانه سه نوبت (ساعات ۷:۳۰، ۱۲:۳۰ و ۱۷:۳۰) با نسبت غذادهی ۴۰-۳۰-۳۰٪ وزن بدن تغذیه شدند (Qin et al. 2017). در طی آزمایش، کیفیت آب مخازن با سیفون روزانه برای حذف مواد زائد و تعویض ۲۵٪ از حجم کل آب، پیش از اولین وعده غذایی، کنترل شد. فراسنجه‌های فیزیکوشیمیایی آب شامل اکسیژن محلول ۰/۲۱ ± ۷/۱۳ mg/L، دما ۲/۱ ± ۲۷/۶ °C، اسیدیته آب ۰/۰۵ ± ۶/۹۹ و سرعت جریان آب ۰/۸ L/S در طی آزمایش با استفاده از منبع آب چاه در محدوده مطلوب حفظ و پایش تلفات به‌صورت روزانه و مداوم انجام شدند. برای تخمین شاخص‌های رشد (افزایش وزن، ضریب تبدیل غذایی، کارایی تبدیل خوراک و نرخ رشد ویژه)، نمونه‌برداری به‌صورت هفتگی و تصادفی از هر مخزن انجام شد (Zhang et al. 2020; Chekani et al. 2021; Yousefi et al. 2023).

خون‌گیری و بررسی آنزیم‌های گوارشی

پس از ۲۴ ساعت قطع غذادهی، از هر تیمار تعداد ۹ عدد بچه‌ماهی (۳ ماهی از هر تکرار) به‌طور تصادفی انتخاب و با استفاده از ۵۰ mg/L ماده بیهوشی MS-۲۲۲ خون‌گیری از ساقه دمی انجام شد. سپس، دستگاه گوارش تخلیه شده

و برای نگهداری در محلول بافر سرد با دمای ۸۰- °C قرار گرفت.

فعالیت آنزیم پروتئاز در دمای ۲۵ °C و در بافر فسفات (Walter, 1984)، آنزیم آمیلاز به روش Bradford (۱۹۷۶) و آنزیم لیپاز در دمای ۳۰ °C به مدت ۱۵ دقیقه با استفاده از سوبسترای نیتروفنیل میریستات ۰/۲۵ میلی‌مولار (pH=۹) به روش (Worthington, 2006) در آزمایشگاه ژنتیک و بیوتکنولوژی آبزیان دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان اندازه‌گیری و نرمال‌سازی شدند (Najdegerami et al. 2015). ایمونوگلوبولین کل[1] با روش رسوب‌دهی با پلی‌اتیلن گلیکول (Siwicki et al. 1994)، و فعالیت لایزوزیم به روش کدورت‌سنجی (Saurabh and Sahoo, 2008) سنجش شد.

همچنین، غلظت آنزیم‌های ضداکسایش شامل گلوتاتیون پراکسیداز[2]، سوپراکسید دیسموتاز[3] و کاتالاز[4] با استفاده از کیت‌های تجاری شرکت ZelBio (آلمان) اندازه‌گیری شد.

آنالیز آماری

سنجش آماری داده‌ها با نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ و در سطح اطمینان ۹۵٪ انجام شد. به این ترتیب که نرمال بودن توزیع داده‌ها با آزمون کولموگروف-اسمیرنوف و همگنی واریانس‌ها با آزمون لوون بررسی شد. برای تعیین تفاوت‌های معنی‌دار بین تیمارها از آزمون واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و برای مقایسه میانگین گروه‌ها از آزمون دامنه‌ی چندگانه دانکن استفاده شد.

جدول ۱ مواد تشکیل دهنده، فرمولاسیون و ترکیب تقریبی خوراک پایه (٪ ماده خشک) (Adineh et al. 2021)

Table 1 Ingredients and proximate compositions (g/kg diet) of the fish experimental diets (Adineh et al. 2021)

Ingredients	g/kg diet
Fish meal[1]	120
Soybean protein	90
Casein	170
Gelatin	80
Corn starch	50
Wheat flour	150
Fish oil	20
Soybean oil	20
Vitamin premix[2]	10
Mineral premix[3]	20
Cellulose	59.5
α-starch	180
Monocalcium phosphate	20
Choline chloride (50%)	10
Ethoxyquin (30%)	0.5

Proximate composition[4]	%
Dry matter	90.13
Crude protein	33.36
Crude lipid	5.82
Ash	5.20
Energy (kcal/kg)	4044.21
Carbohydrate	45.47

[1] Pars kilka Co., Mazandaran, Iran (Kilka powder analysis; Protein: 70-72%, Fat: 8-11%, Ash: 11.6%, Moisture: 7-9%).

[2] Vitamin premix (per kg of diet): vitamin A: 2000 IU; vitamin B_1 (thiamin): 5 mg; vitamin B_2 (riboflavin): 5 mg; vitamin B_6: 5 mg; vitamin B_{12}: 0.025 mg; vitamin D_3: 1200 IU; vitamin E: 63 mg; vitamin K_3: 2.5 mg; folic acid: 1.3 mg; biotin: 0.05 mg; pantothenic acid calcium: 20 mg; inositol: 60 mg; ascorbic acid (35%): 110 mg; niacinamide: 25 mg.

[3] Mineral premix (per kg of diet): $MnSO_4$: 10 mg; $MgSO_4$: 10 mg; KCl: 95 mg; NaCl: 165 mg; $ZnSO_4$: 20 mg; KI: 1 mg; $CuSO_4$: 12.5 mg; $FeSO_4$: 105 mg; Co: 1.5 mg.

[4] Assessed based on AOAC

[1] Immunoglobulin

[2] Glutathione peroxidase enzyme

[3] Superoxide dismutase enzyme

[4] Catalase enzyme

نتایج

بررسی اثرات سه تیمار آزمایشی بر شاخص‌های رشد بچه‌ماهیان کپور علفخوار (جدول ۲) نشان داد که تمامی تیمارها شامل پودر زنجبیل و اسید مالیک، سبب افزایش معنی‌دار در وزن نهایی، افزایش وزن، ضریب تبدیل غذایی، نرخ رشد ویژه، نسبت بازده پروتئین و درصد کارایی غذا در مقایسه با گروه شاهد شدند. به‌گونه‌ای که وزن نهایی در تیمارهای T_2 و T_3 به‌طور معنی‌دار بیش از تیمار شاهد T. بود ($P<0/05$). هرچند که بین این دو تیمار تفاوت آماری معنی‌داری مشاهده نشد ($P>0/05$). بهترین ضریب تبدیل غذایی مربوط به تیمار T_3 بود که نسبت به تیمارهای شاهد و T_1 عملکرد برتری داشت ($P<0/05$)، ولی بین تیمارهای T_2 و T_3 اختلاف معنی‌دار وجود نداشت ($P>0/05$). همچنین نرخ رشد ویژه در تیمارهای T_2 و T_3 نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌دار نشان داد ($P<0/05$)، در حالی که میزان بقا در میان تمامی گروه‌های آزمایشی فاقد اختلاف معنی‌دار آماری بود ($P>0/05$).

نتایج حاصل از سنجش آنزیم‌های گوارشی (جدول ۳) حاکی از تأثیر مثبت جیره‌های حاوی مکمل‌های یاد شده بر فعالیت پروتئازی بود. بیشترین فعالیت پروتئاز در تیمار T_3 ثبت شد که با دیگر تیمارها اختلاف معنی‌دار داشت ($P<0/05$). فعالیت این آنزیم در تیمارهای T_2 و T_3 نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌دار یافت ($P<0/05$) با وجود این، بین تیمارهای T_3 و T_1 اختلاف آماری مشاهده نشد ($P>0/05$) ولی هر دو تیمار مذکور در مقایسه با گروه شاهد افزایش معنی‌دار نشان دادند ($P<0/05$). در خصوص فعالیت آمیلاز، بیشترین و کمترین میزان به ترتیب در تیمارهای T_3 و T. مشاهده شد که این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار بود ($P<0/05$). اگرچه بین تیمارهای T_3 و T_1 تفاوت معنی‌داری در فعالیت آمیلاز وجود نداشت ($P>0/05$)، اما هر دو تیمار مذکور نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌دار داشتند ($P<0/05$). در نهایت، فعالیت لیپاز در بین گروه‌های آزمایشی اختلاف معنی‌دار نشان نداد ($P>0/05$)، هرچند که بالاترین میزان عملکرد مربوط به تیمار T_3 بود.

نتایج مربوط به فراسنجه‌های ایمنی غیراختصاصی بچه-ماهیان کپور علفخوار تحت تأثیر جیره‌های غذایی مختلف، در شکل ۱ ارائه شده است. بر اساس یافته‌ها، فعالیت آنزیم لایزوزیم در تیمار هم‌افزایی T_3 افزایش معنی‌دار نسبت به گروه شاهد نشان داد ($P<0/05$)، با وجود این، بین تیمارهای T_1 و T_2 با گروه شاهد اختلاف معنی‌دار مشاهده نشد ($P>0/05$). در خصوص غلظت ایمونوگلوبولین کل، تیمارهای T_2 و T_3 در مقایسه با گروه شاهد افزایش معنی‌دار داشتند ($P<0/05$)، در حالی که تیمار T_1 تفاوت معنی‌دار با گروه شاهد نشان نداد ($P>0/05$). لازم به ذکر است که بین تیمارهای T_2 و T_3 از نظر میزان ایمونوگلوبولین کل، اختلاف معنی‌دار وجود نداشت ($P>0/05$)، که بیان‌گر اثر تقویتی مشابه پودر زنجبیل و ترکیب آن با اسید مالیک در تحریک پاسخ‌های ایمنی هومورال (ترشح پادتن) در بچه ماهیان کپور علفخوار است. همچنین، بیشینه غلظت ایمونوگلوبولین کل نیز در تیمارهای حاوی زنجبیل T_2 و T_3 به ثبت رسید.

جدول ۲ نتایج عملکرد شاخص‌های رشد بچه ماهیان کپور علفخوار در گروهای شاهد، اسید مالیک، پودر زنجبیل و گروه هم افزایی ترکیبی

Table 2 Comparative assessments of growth performance indices in juvenile grass carp subjected to dietary supplementation with malic acid, ginger powder, and their synergistic combination, relative to the control group

	T_0	T_1	T_2	T_3
Initial weight (g)	4.44 ± 0.12	4.40 ± 0.09	4.37 ± 0.08	4.43 ± 0.11
FW (g)	7.62 ± 0.11^a	8.18 ± 0.13^b	8.38 ± 0.10^c	8.49 ± 0.13^c
WG (g)	3.18 ± 0.20^a	3.78 ± 0.22^b	4.01 ± 0.15^c	4.06 ± 0.21^c
FCR	3.80 ± 0.24^a	3.19 ± 0.18^b	3.00 ± 0.11^c	2.97 ± 015^c
SGR (%/day)	0.96 ± 0.06^a	1.11 ± 0.06^b	1.16 ± 0.05^b	1.16 ± 0.06^b
S.R (%)	100	100	100	100
PER	0.79 ± 0.09^a	0.94 ± 0.05^b	1.00 ± 0.02^b	1.01 ± 0.03^b
FE (%)	26.3^a	31.3^b	33.3^b	33.6^b

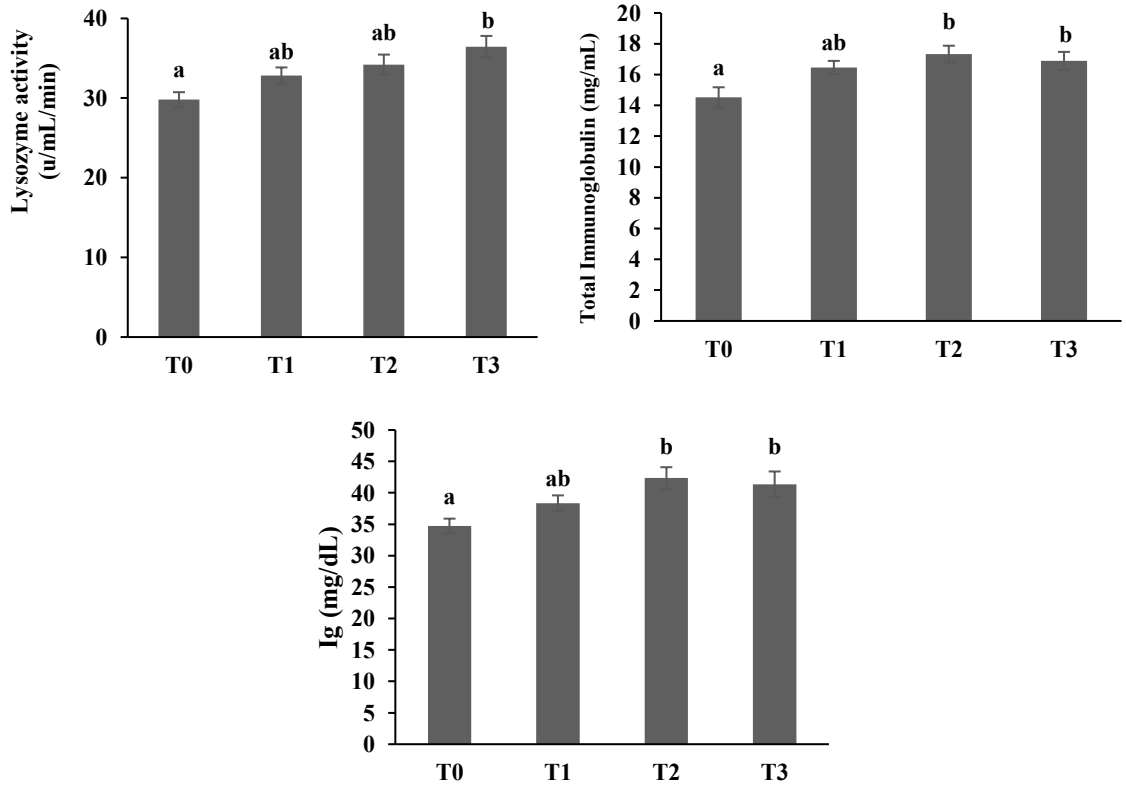
FW: finial weight; WG: weight gain; FCR: food conversion ratio; SGR: specific growth rate; SR: survival rate; PER: protein efficiency ratio; FE: feed efficiency
Values in row assigned with different letters denote significant difference (P<0.05). Data are presented as mean ± SD.
Control group (T_0), 0.25% malic acid (T_1) and 0.2% ginger powder (T_2) in separate and in combination (T_3)

جدول ۳ نتایج عملکرد آنزیم‌های گوارشی بچه ماهیان کپور علفخوار در گروهای شاهد، اسید مالیک، پودر زنجبیل و گروه هم افزایی ترکیبی

Table 3 Comparative evaluation of digestive enzyme performance in juvenile grass carp across the control, malic acid-supplemented, ginger powder-supplemented, and combined synergistic treatment groups.

Enzyme*	T_0	T_1	T_2	T_3
Total protease	79.1 ± 9.1^{a}	95.1 ± 7.1^{ab}	101.8 ± 3.3^{b}	109.7 ± 2.7^{c}
Amylase	7.3 ± 0.29^{a}	7.7 ± 0.28^{b}	7.9 ± 0.37^{b}	8.22 ± 0.35^{c}
Lipase	2.09 ± 0.17^{a}	2.04 ± 0.18^{a}	2.17 ± 0.26^{b}	2.2 ± 0.15^{b}

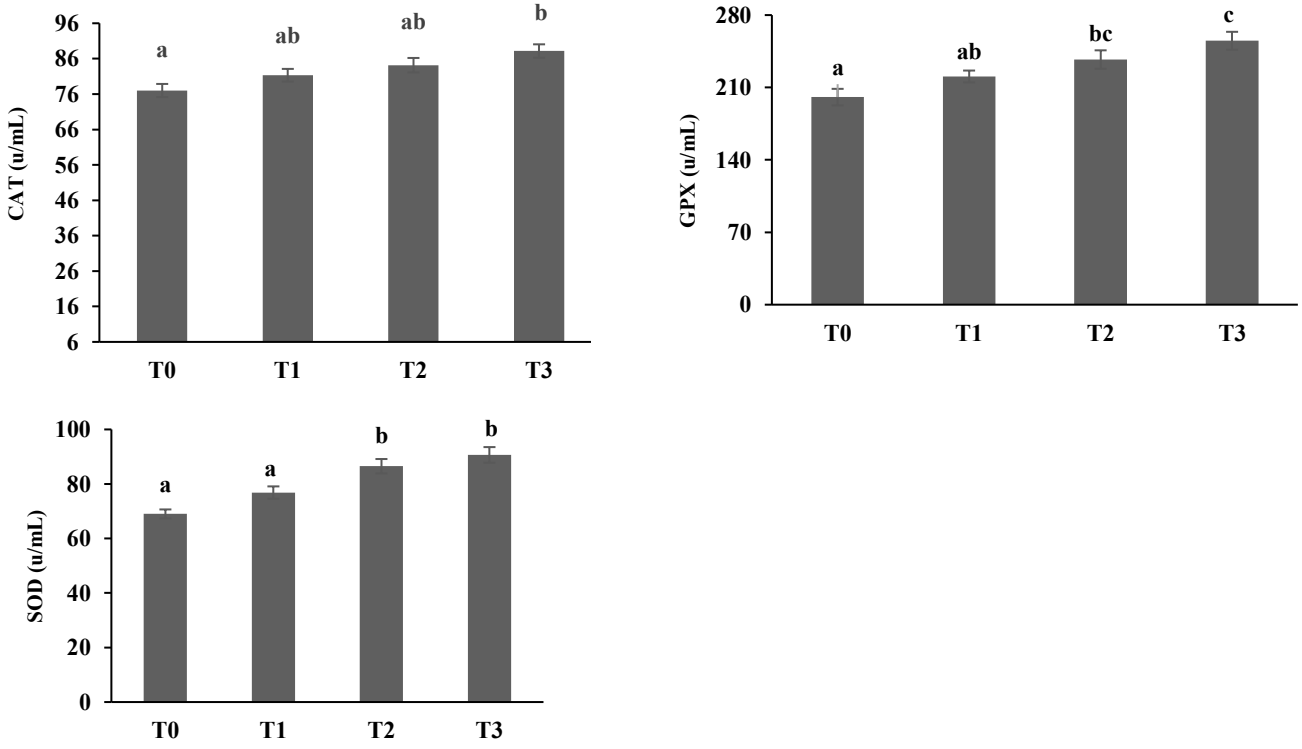
*Activities are expressed as follows: Total protease as mmol of tyrosine released min/mg/protein; Amylase activity as mg starch hydrolyzed min/mg/protein; Lipase activity as mmol of substrate hydrolyzed min/mg/protein; Values are averages ± SEM, n = 3.
Different letters within a row denote significant differences (P<0.05). Control group (T_0), 0.25% malic acid (T_1) and 0.2% ginger powder (T_2) in separate and in combination (T_3).



شکل ۱ نتایج عملکرد فاکتورهای ایمنی بچه ماهیان کپور علفخوار در گروه‌های شاهد، اسید مالیک، پودر زنجبیل و گروه هم افزایی ترکیبی.

Figure 1 Performance indices of immune factors in grass carp juveniles across control, malic acid, ginger powder, and combined synergy group.
Control group (T_0), 0.25% malic acid (T_1), 0.2% ginger powder (T_2) separately and in combination (T_3).

نتایج حاصل از سنجش فراسنجه های دفاع ضد اکسایشی در گروه‌های آزمایشی مختلف (شکل ۲) حاکی از الگوهای پاسخ آنزیمی متمایزی است. بر اساس یافته‌ها، فعالیت آنزیم کاتالاز در گروه T_3 در مقایسه با هر سه گروه .T، T_1 و T_2 افزایش معنی‌دار نشان داد ($P<0/05$). با وجود این، بین گروه‌های T_1 و T_2 با گروه شاهد اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($P>0/05$). این الگو بیانگر آن است که کاربرد هم‌زمان مکمل‌ها (تیمار هم‌افزایی) نسبت به مصرف مجزای آنها، کارآیی بیشتری در تجزیه پراکسید هیدروژن دارد. در خصوص آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز، اگرچه اختلاف معنی‌دار بین سه گروه تیماری T_1، T_2 و T_3 وجود نداشت ($P>0/05$)، ولی فعالیت این آنزیم در هر سه تیمار مذکور در مقایسه با گروه شاهد .T به‌طور معنی‌دار افزایش یافت ($P<0/05$). به‌گونه‌ای که بیشترین و کمترین میزان فعالیت آنزیم به‌ترتیب در تیمارهای T_3 و T. ثبت شد. هرچند که این اختلاف میانگین‌ها از لحاظ آماری معنی‌دار نبود، اما روند صعودی آن نشان‌دهنده برتری نسبی پودر زنجبیل (به‌ویژه در ترکیب با اسید مالیک) در کاتالیز پراکسیدها و حفاظت از ساختارهای یاخته‌ای در برابر تنش اکسایشی است. همچنین، فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در گروه‌های T_2 و T_3 در مقایسه با گروه‌های T. و T_1 افزایش معنی‌دار داشت ($P<0/05$)، در حالی که تفاوت معنی‌دار نه‌تنها بین دو گروه T. و T_1 بلکه بین دو گروه T_2 و T_3 نیز مشاهده نشد ($P>0/05$). این نتایج حاکی از قدرت بالاتر پودر زنجبیل (چه به‌تنهایی و چه در ترکیب با اسید مالیک) در فرآیند دیسموتاسیون آنیون سوپراکسید و در نتیجه، کاهش مؤثر آسیب‌های اکسایشی وارده به اجزای یاخته‌ای است.



شکل ۲ نتایج عملکرد آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی بچه ماهیان کپور علفخوار در گروه‌های شاهد، اسید مالیک، پودر زنجبیل و گروه هم افزایی ترکیبی.

Figure 2 Performance indices of antioxidant enzymes in grass carp juveniles across the control, malic acid, ginger powder, and combined synergy group.

Control group (T_0), 0.25% malic acid (T_1), 0.2% ginger powder (T_2) in separate and in combination (T_3).

بحث

هدف اصلی صنعت آبزی‌پروری، دستیابی به بیشینه راندمان رشد و تولید آبزیان باکیفیت، به‌ویژه در مواجهه با شرایط نامطلوب محیطی و تنش‌زاست (Balcazar et al. 2006). مطالعه حاضر با هدف بررسی تأثیر مکمل‌های غذایی پودر زنجبیل، اسید مالیک و ترکیب هم‌افزای آن‌ها بر عملکرد رشد، فعالیت آنزیم‌های گوارشی، پاسخ‌های ایمنی و وضعیت ضداکسایشی بچه‌ماهیان کپور علفخوار انجام شد.

یافته‌ها حاکی از آن است که هر دو مکمل، به‌ویژه اثر ترکیبی آن‌ها، تأثیری مثبت و چشم‌گیر بر فراسنجه‌های فیزیولوژیک و ایمنی دارد. به نظر می‌رسد که اسید مالیک از طریق کاهش pH دستگاه گوارش، قابلیت هضم مواد غذایی را تسهیل می‌کند و با بهینه‌سازی فعالیت آنزیم‌های گوارشی (Lückstädt, 2008) و سرکوب باکتری‌های بیماری‌زای روده، محیط میکروبی سالمی برای رشد و بهبود سلامت آبزی فراهم می‌آورد (Ricke, 2003). از سوی دیگر، پودر زنجبیل به واسطه ترکیبات زیست‌فعال مانند جینجرول و شوگائول، موجب تحریک اشتها، افزایش مصرف خوراک و بهبود راندمان رشد می‌شود (Mohammadi et al. 2020). همچنین، خواص ضدالتهابی و ضداکسایشی این ترکیبات، با کاهش اثرات تنش اکسایشی، به ارتقای شرایط رشد و سلامت عمومی آبزی کمک می‌کند (Mao et al. 2019).

در پژوهش حـاضر، ماهیان تیمار T۳ (ترکیب هم‌افزایی دو مکمل) بهترین عملکرد را از نظر رشد، ضریب تبدیل غذایی، نرخ رشد ویژه و فعالیت آنزیم‌های گوارشی در مقایسه با دیگر تیمارها به ثبت رساندند. این برتری را می‌توان به اثر هم‌افزایی اسید مالیک در جذب مواد مغذی و سلامت روده، و نیز نقش زنجبیل در بهبود طعم و پذیرش خوراک نسبت داد. نتایج مشابهی در مطالعات پیشین گزارش شده است؛ به گونه‌ای که اسید مالیک عملکرد رشد ماهی تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) (Hassaan et al. 2020) و پودر زنجبیل عملکرد رشد قزل‌آلای رنگین‌کمان را بهبود بخشیده است (Bakhtiari Aqmasjed et al. 2023).

آنزیم‌های گوارشی مانند آمیلاز و پروتئاز که به‌ترتیب وظیفه هضم کربوهیدرات‌ها و پروتئین‌ها را بر عهده دارند، نقش کلیدی در جذب مواد مغذی و رشد ایفا می‌کنند؛ به‌طوری‌که بهبود عملکرد رشد با افزایش فعالیت این آنزیم‌ها در جیره ارتباط مستقیم دارد (Chong et al. 2002). به‌طورکلی، مکمل‌های گیاهی با تحریک ترشحات صفرا و فعالیت آنزیم‌های لوزالمعدی، فرایند هضم را بهبود می‌بخشند (Platel et al. 2002; Naumann et al. 2020). از این رو، تغییرات جیره‌ای از طریق مکمل‌سازی، تأثیری شگرف بر تولید آنزیم‌های درون‌زا گذاشته و به‌نوبه‌ی خود، افزون بر بهبود مستقیم رشد و افزایش اشتها، به‌صورت غیرمستقیم موجب ارتقای عملکرد روده، تعادل جمعیت‌های میکروبی مفید، و هضم و جذب کارآمد مواد مغذی می‌شود (Ariyanto and Anika, 2024; Riaz et al. 2024; Naeem and Bourassa, 2025).

بهبود فراسنجه‌های ایمنی از طریق مکمل‌های غذایی در جیره آبزیان، نقشی محوری در ارتقای صنعت آبزی‌پروری ایفا می‌کند. آنزیم ایمنی لایزوزیم، به‌عنوان خط نخست دفاع در برابر عوامل بیماری‌زا، با آسیب به دیواره یاخته‌ای باکتری‌ها عمل می‌کند. در بررسی حاضر، تیمار T۳ افزایش معنی‌داری در شاخص‌های ایمنی هومورال نسبت به دیگر تیمارها نشان داد، به‌گونه‌ای که پودر زنجبیل در اختلال در غشای باکتری‌های مهاجم، قدرت بیشتری نسبت به اسید مالیک داشت. گزارش‌های مشابهی با یافته‌های تحقیق حاضر در خصوص عملکرد اسید مالیک بر روی ماهی کپور و باس دریایی (*Dicentrarchus labrax*) (Ahmadifar et al. 2019; Busti et al. 2020) و نیز تأثیر عصاره زنجبیل بر روی ماهی تیلاپیای نیل و قزل‌آلای رنگین‌کمان (Ahmed et al. 2023; Bakhtiari et al. 2023) هم‌خوانی دارد. فراسنجه‌های دفاع ضداکسایشی در تیمار T۳ نسبت به دیگر گروه‌ها افزایش معنی‌داری داشت که این ارتقا را می‌توان به ترکیبات زیست‌فعال و ضداکسایشی قوی موجود در زنجبیل و نیز حضور گروه‌های هیدروکسیل در اسید مالیک نسبت داد (Yu et al. 2017). این ترکیبات با کاهش تنش اکسایشی ناشی از تراکم‌های بالای ذخیره‌سازی و مواجهه با عوامل بیماری‌زا (Martínez-Álvarez et al. 2005) نقش محافظتی مؤثری ایفا می‌کنند. افزایش غلظت ضداکسایش‌هایی مانند کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز در روده‌ی بچه‌ماهیان، به‌ویژه در تیمار T۳، نشان‌دهنده القای دفاع ضداکسایشی درون‌زای قوی توسط این دو مکمل

است؛ به‌نحوی‌که فنول‌ها، فنولوئیدها و توکوفرول‌های موجود در زنجبیل، با تجزیه سریع پراکسید هیدروژن به آب و اکسیژن، اثرات مخرب آن را مهار می‌کنند (Goya and Bsak, 2010). از سوی دیگر، آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز با کاتالیز پراکسید هیدروژن به الکل و آب، در فرآیندهای فیزیولوژیک و آسیب‌شناختی بچه‌ماهیان کپور علفخوار، محافظت در برابر تنش اکسایشی را فراهم می‌آورد. اسید مالیک نیز با کاهش pH کبد و معده، جمعیت باکتری‌های مضر را کاهش داده و فلور میکروبی روده را متعادل می‌کند که نهایتاً به حذف گونه‌های فعال اکسیژن می‌انجامد (Imai and Nakagawz, 2003). در مجموع، بهبود وضعیت سلامت در گروه‌های تیمار، بیانگر برقراری هموستاز ایمنی است؛ تعادلی که بدون ایجاد التهاب بیش‌ازحد، مقاومت در برابر عوامل بیماری‌زا را تقویت می‌کند و نشانه‌ای مهم در ارتقای سلامت و کارایی زیستی بچه‌ماهیان مورد مطالعه محسوب می‌شود.

نتیجه‌گیری

نتیجه‌گیری نهایی پژوهش حاضر بر پایه واکاوی اثرات هم‌افزای اسید مالیک و پودر زنجبیل، به‌عنوان دو مکمل غذایی با ماهیت اسیدی و گیاهی، در بچه‌ماهیان کپور علفخوار استوار است. یافته‌های تجربی آشکار می‌کند که افزودن توأمان این ترکیبات به جیره غذایی، در مقایسه با کاربرد انفرادی آن‌ها، بهبودی چشمگیر و معنی‌دار در شاخص‌های ایمنی، رشد زیستی و ظرفیت ضد اکسایشی ماهیان ایجاد می‌کند. این دستاوردها، صحت فرضیه پژوهش را تأیید می‌کند که بر اساس آن، افزودنی‌های طبیعی با ارائه راهکاری پایدارتر و کارآمدتر در برابر آنتی‌بیوتیک‌های متداول در آبزی‌پروری، ضمن ارتقای سطح سلامت آبزیان، به‌طور مؤثری از آثار سوء زیست‌محیطی ناشی از ترکیبات شیمیایی می‌کاهند و چشم‌انداز امیدوارکننده‌ای برای پرورش مسئولانه و سبز پیش رو می‌نهند.

منابع

Adineh, H., Naderi, M., Nazer, A., Yousefi, M., Ahmadifar, E. 2021. Interactive effects of stocking density and dietary supplementation with nano-selenium and garlic extract on growth, feed utilization, digestive enzymes, stress responses, and antioxidant capacity of grass carp, *Ctenopharyngodon idella*. Journal of the World Aquaculture Society 52: 789-804. DOI: 10.1111/jwas.12747.

Ahmed, Sh.A.A., El-Murr, A., Elhakim, Y.A., Metwally, M.M., Gharib, A.A., Amer, Sh., Younis, E.M., Abdel-Warith, A.W., Davies, S.J., Khalil, E.N.M. 2023. Comparative study on ginger powder and ginger extract nanoparticles: Effects on growth, immune antioxidant status, tissue histoarchitecture, and resistance to *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas putida* infection in *Oreochromis niloticus*. Fishes 8: 259. DOI: 10.3390/fishes8050259.

Ahmadifar, E., Dawood, M.A., Moghadam, M.S., Sheikhzadeh, N., Hoseinifar, S.H., Musthafa, M.S. 2019. Modulation of immune parameters and antioxidant defense in zebrafish (*Danio rerio*) using dietary apple cider vinegar. Aquaculture 513. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2019.734412

Alizadeh, H., Ouraji, H., Falahatkar, B., Efatpanah, I. 2019. Effect of dietary Malic acid on growth performance and body composition of juvenile Siberian sturgeon (*Acipenser baerii* Brandt, 1869). Iranian Scientific Fisheries Journal 27: 1-12. DOI:10.22092/ISFJ.2019.118318. (In Persian)

AOAC. 1998. Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis of official analytical chemists international, 16th ed. Washington, DC.

Ariyanto, Y.S., Anika, M. 2024. Probiotics on Commercial Fish Growth: A Meta-Analysis. Jurnal Sumberdaya Hayati 10: 205-216. DOI: 10.29244/jsdh.10.4.205-216

Ashry, A.M., Habiba, M.M., El-Zayat, A.M., Badreldeen, A.H., Younis, N.A., Ahmed, H.A., El-Dakroury, M.F.,

Mervat, A.M. Ali, M., Dawood, A.O. 2023. Effects of ginger (*Zingiber officinale*) on the growth performance, digestive enzyme activity, antioxidative response, and antibacterial capacity of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) reared in outdoor conditions. Aquaculture Reports 33: 1-9. DOI: 10.1016/j.aqrep.2023.101760.

Balcazar, J.L., Blas, I., Zarzuela, I.R., Cunningham. D., Vendrell, D., Muzquiz, J.L. 2006. The role of probiotics in aquaculture. Veterinary Microbiology 114: 173-18. DOI: 10.1016/j.vetmic.2006.01.009

Bakhtiari Aqmasjed, Sh., Sajjadi, M.M., Falahatkar, B., Safari, R. 2023. Effects of dietary ginger (*Zingiber officinale*) extract and curcumin on growth, hematology, immunity, and antioxidant status in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture Reports 32: 1-9. DOI: 10.1016/j.aqrep.2023.101714.

Busti, S., Rossi, B., Volpe, E., Ciulli, S., Piva, A., D-Amico, F., Bonaldo, A. 2010. Effects of dietary organic acids and nature identical compounds on growth, immune parameters and gut microbiota of European sea bass. Scientific Reports 10: 21321. DOI: 10.1038/s41598-020-78441-9.

Bernfeld, P. 1955. Amylases α and β. In: Methods in enzymology. Colowick, P and Kaplan, N.O. (Eds). 1st ed. New York. Academic Press, 149-157.

Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254. DOI: 10.1016/0003-2697(76)90527-3

Chekani, R., Akrami, R., Ghiasvand, Z., Chitsaz, H., Jorjani, S. 2021. Effect of dietary dehydrated lemon peel (*Citrus limon*) supplementation on growth, hematological and immunological and antioxidant status of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) under exposure to crowding stress. Aquaculture 539. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2021.736597.

Chong, A.S., Hashim, R., Chow-Yang, L., Ali, A.B. 2002. Partial characterization and activities of proteases from the digestive tract of discus fish (*Symphysodon aequifasciata*). Aquaculture 203: 321-333. DOI: 10.1016/S0044-8486(01)00630-5

Dalimi, A., Daghigh Roohi, J., Ghasemi, M., Pourkazemi, M., Shamsi, S.H. 2020. Morphometric and molecular characterization of Dactylogyrus lamellatus isolated from farmed Grass carp, *Ctenopharyngodon idella* (Valenciennes, 1844), in Guilan province, Iran. Iranian Journal of Fisheries Sciences 19: 1051-1061. DOI: 20.1001.1.15622916.2020.19.3.31.7.

FAO. 2018. The State of World Fisheries and Aquaculture 2018 Meeting the sustainable development goals. Rome. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

Goya, M.M., Basak, A. 2010. Looking for complete identity. Protein Cell 1: 888-897. DOI: 10.1007/s13238-010-0113-z. Epub 2010 Nov 9.

Imai, H., Nakagawa, Y. 2003. Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PhGPx, GPx4) in mammalian cells. Free Radical Biology 34: 145-169. DOI: 10.1016/s0891-5849(02)01197-8.

Hassaan, M.S., Mohammady, E.Y., Adnan, A.M., Abd Elnabi, H.E., Ayman, M.F., Soltan, M.A., El-Haroun, E.R. 2020. Effect of dietary protease at different levels of malic acid on growth, digestive enzymes and haemato-immunological responses of Nile tilapia, fed fish meal-free diets. Aquaculture 522. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2020.735124.

Lückstädt, C. 2008. The use of acidifiers in fish nutrition. CABI Reviews 8 DOI: 10.1079/PAVSNNR20083044

Mao, Q.Q., Xu, X.Y., Cao, S.Y., Gan, R.Y., Corke, H., Beta, T., Li, H.B. 2019. Bioactive compounds and bioactivities of ginger (*Zingiber officinale Roscoe*).

Foods 8: 185. DOI: 10.3390/foods8060185

Martínez-Álvarez, R.M., Morales, A.E., Sanz, A. 2005. Antioxidant defenses in fish: biotic and abiotic factors. Reviews in Fish Biology and Fisheries 15: 75-88. DOI: 10.1007/s11160-005-7846-4.

Mohammadi, G., Rashidian, G., Hoseinifar, S.H., Naserabad, S.S., Van Doan, H. 2020. Ginger (*Zingiber officinale*) extract affects growth performance, body composition, haematology, serum and mucosal immune parameters in common carp (*Cyprinus carpio*). Fish and Shellfish Immunology 99: 267-273. DOI: 10.1016/j.fsi.2020.01.032

Naeem, M., Bourassa, D. 2025. Probiotics in poultry: Unlocking productivity through microbiome modulation and gut health. Microorganisms 13: 257. DOI: 10.3390/microorganisms13020257

Najdegerami, E.H., Baruah, K., Shiri, A., Rekecki, A., Van den Broeck, W., Sorgeloos, P., De Schryver, P. 2015. Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) larvae fed Artemia nauplii enriched with poly-β-hydroxybutyrate (PHB): effect on growth performance, body composition, digestive enzymes, gut microbial community, gut histology and stress tests. Aquaculture Research 46: 801-812. DOI: 10.1111/are.12231.

Naumann, S., Haller, D., Eisner, P., Schweiggert-Weisz, U. 2020. Mechanisms of interactions between bile acids and plant compounds: a review-International Journal of Molecular Sciences 21: 6495. DOI: 10.3390/ijms21186495.

Ng, W.K., Koh, C.B. 2017. The utilization and mode of action of organic acids in the feeds of cultured aquatic animals. Reviews in Aquaculture 9: 342-368. DOI: 10.1111/raq.12141.

Paolucci, M. 2023. Fish nutrition and feed technology. Fishes 8: 146. DOI: 10.3390/fishes8030146.

Platel, K., Rao, A., Saraswathi, G., Srinivasan, K. 2002. Digestive stimulant action of three Indian spice mixes in experimental rats. Food/Nahrung 46: 394-398. DOI: 10.1002/1521-3803(20021101)46:6,<394: AID-FOOD 394>3.0.CO;2-D.

Penghui, Yu., Mengzhen, F., Jianguo, Su., Gailing, Y. 2024. Hepcidin agonist's grape seed proanthocyanidins and berberine hydrochloride improve immunity and prevention against bacterial infection in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). Comparative Immunology Reports 7: 200184. DOI: 10.1016/j.cirep.2024.200184.

Qin, C., Gong, Q., Wen, Z., Yuan, D., Shao, T., Wang, J., Li, H. 2017. Transcriptome analysis of the spleen of the darkbarbel catfish (*Pelteobagrus vachellii*) in response to *Aeromonas hydrophila* infection. Fish and Shellfish Immunology 70: 498-506. DOI:10.1016/j.fsi.2017.09.042.

Riaz, D., Hussain, S.M., Hussain, M., Arsalan, M.Z., Naeem, E. 2024. Probiotics supplementation for improving growth performance, nutrient digestibility and hematology of *Catla catla* fingerlings fed sunflower meal-based diet. Pakistan Journal of Zoology 56: 1369-1377. DOI: 10.17582/journal.pjz/20221010111027

Ricke, S. 2003. Perspectives on the use of organic acids and short chain fatty acids as antimicrobials. Poultry Science 82: 632-639. DOI: 10.1093/ps/82.4.632.

Safari, R., Hoseinifar, S.H., Dadar, M., Van Doan, H. 2021. Enrichment of common carp (*Cyprinus carpio*) diet with malic acid: Effects on skin mucosal immunity, antioxidant defense and growth performance. Annals of Animal Science 21: 561-573. DOI: 10.2478/aoas-2020-0092.

Saurabh, S., Sahoo, P. 2008. Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. Aquaculture Research, 39: 223-239. DOI: 10.1111/j.1365-2109.2007.01883.x.

Shohreh, P., Mousavi, Sh., Khoshbakht, R., Ahmadi, S., Valizadeh, M., Azimi, M.,

Hijaei, N., Abdel-Tawwab, M. 2025. Immunostimulatory effects of Mazari palm (*Nannorrhops ritchiana*) leaves extract on the performance, anti-inflammation genes, and resistance of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) juveniles to *Aeromonas hydrophila* infection. Animal Feed Science and Technology 319: 116189. DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2024.116189.

Siwicki, A.K., Anderson, D.P., Rumsey, G.L. 1994. Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis. Veterinary Immunology and Immunopathology 41: 125-139. DOI: 10.1016/0165-2427(94)90062-0.

Vahedi, A., Hasanpour, M., Akrami, R., Chitsaz, H. 2017. Effect of dietary supplementation with ginger (*Zingiber officinale*) extract on growth, biochemical and hematological parameters in juvenile beluga (*Huso huso*). Sustainable Aquaculture and Health Management Journal 3: 26-46. DOI: 10.18869/acadpub.ijaah.3.1.26.

Walter H.E. 1984. Proteinases: methods with hemoglobin, casein and azocoll as substrates. In: Methods of Enzymatic Analysis. Bergmeyer, H.U. (ed.). Verlag Chemie, Weinheim, 270-277.

Yao, B.M., Xiao, Q.Z., Wei, D.J., Pei, W., Yang, L., Hong, M.R., Xiao, W.J., Lin, F. 2025. Tea polyphenols: A promising alternative to antibiotics for preventing bacterial enteritis in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). Food Research International 213: 116575. DOI: 10.1016/j.foodres.2025.116575.

Yousefi, M., Ghafarifarsani, H., Raissy, M., Yilmaz, S., Vatnikov, Y.A., Kulikov, E.V. 2023. Effects of dietary malic acid supplementation on growth performance, antioxidant and immunological parameters, and intestinal gene expressions in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Aquaculture 563. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2022.738864.

Yu, H., Yang, G., Sato, M., Yamaguchi, T., Nakano, T., Xi, Y. 2017. Antioxidant activities of aqueous extract from *Stevia rebaudiana* stem waste to inhibit fish oil oxidation and identification of its phenolic compounds. Food Chemistry 232: 379-386. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.04.004

Zhang, L., Zhang, P., Xia, C., Cheng, Y., Guo, X., Li, Y. 2020. Effects of malic acid and citric acid on growth performance, antioxidant capacity, haematology and immune response of C*arassius auratus gibelio*. Aquaculture Research 51: 2766-2776. DOI: 10.1111/are.14616.