

The effect of short-term exposure to water extract of phycobiliproteins on adult Pacific oysters (*Magallana gigas*)

Original Article

LIMNOLOGY
FRESHWATER
BIOLOGY

Podolskaya M.S.^{1*}, Tkachuk A.A.¹, Parfenov V.V.², Kukhareva T.A.¹,
Borovkov A.B.³, Andreyeva A.Yu.¹

¹Laboratory of Ecological Immunology of Aquatic Organisms, A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS, Moscow, 119991, Russia

²Information Technology and Information Security Department, A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS, Moscow, 119991, Russia

³Department of Biotechnology and Phytoresources, A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS, Moscow, 119991, Russia

ABSTRACT. In the context of the rapid development of Russian aquaculture for bivalve mollusks in the 21st century, it has become crucial to develop technologies that aim to minimize stress levels and enhance the resistance of oysters against diseases and parasitic infections in hatcheries. This research investigated the effect of an aqueous extract of phycobiliproteins (CBP), derived from the blue-green alga *Spirulina platensis*, at concentrations ranging from 2 to 200 µg/mL on adult Pacific oysters (*Magallana gigas*) for 24-48 hours. Using flow cytometry, we assessed the cellular composition of oyster hemolymph, apoptosis induction in hemocytes, and their metabolic activity. Furthermore, oyster mortality and respiratory activity have been evaluated throughout the experiment. The findings revealed that the highest extract concentration (200 µg/ml) decreased hemocyte metabolic activity and reduced the relative proportion of granulocytes within the oyster hemolymph. At the same time, there was no significant difference in the proportion of apoptotic hemocytes between the experimental and control groups. The survival rate of mollusks in the experiment was 100%, indicating that the extract may be relatively safe for these organisms. These findings suggest that the extract could be used as a basis for the development of functional feeds based on spirulina derivatives, which could increase resistance and reduce stress in oysters during cultivation in aquaculture nurseries.

Keywords: phycobiliproteins, Pacific oyster, hemocytes, respiratory rate, metabolic activity, apoptosis

For citation: Podolskaya M.S., Tkachuk A.A., Parfenov V.V., Kukhareva T.A., Borovkov A.B., Andreyeva A.Yu. The effect of short-term exposure to water extract of phycobiliproteins on adult Pacific oysters (*Magallana gigas*) // Limnology and Freshwater Biology. 2025. - № 4. - P. 713-728. DOI: 10.31951/2658-3518-2025-A-4-713

1. Introduction

Global and Russian aquaculture have demonstrated rapid growth in the 21st century (FAO, 2024). Given that Russian territory is surrounded by 13 seas and encompasses approximately 523 000 km of rivers and over 170 000 hectares of marine and freshwater lakes, aquaculture is essential component of sustainable development and a key element of food security (Kolonchin et al., 2023). Between 2002 and 2021, the total annual growth rate of fish and shellfish production in Russia was 58.2% (Kolonchin et al., 2023). The Pacific oyster (*Magallana gigas* (Thunberg, 1793)), a commercially important bivalve species, has been intro-

duced into the Black Sea for farming purposes (FAO, 2020; Lisitskaya and Shchurov, 2024). However, local production of oyster spat in Russia remains limited and largely dependent on imports. With the emphasis on the development of bivalve aquaculture, it is crucial to optimize broodstock conditioning techniques in hatcheries in order to address significant issues related to health, survival, disease vulnerability, and reproductive performance.

Efforts to improve bivalve breeding and spawning in hatcheries typically involve the implementation of feeding and conditioning strategies (Citarasu, 2010; Ringø, 2020; Elumalai et al., 2020). Current trends in health-promoting tools for aquaculture focus on envi-

*Corresponding author.

E-mail address: podolskaya_m99@bk.ru (M.S. Podolskaya)

Received: July 30, 2025; **Accepted:** August 20, 2025;

Available online: August 31, 2025

© Author(s) 2025. This work is distributed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.



ronmentally friendly alternatives to traditional antibacterial and antifungal chemicals (Vijayaram et al., 2022; Ahmed et al., 2025). Microalgae are a significant source of biologically active substances that are extensively used in fish and shellfish farming. The inclusion of microalgae-derived products as feed additives has been shown to exhibit antimicrobial activity, enhance antioxidant and immune system functions in commercially valuable species (Vijayaram et al., 2022). Phycobiliproteins (CBPs) extracted from the cyanobacterium *spirulina* (*Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* Gomont, 1892) exhibit a wide range of health-promoting characteristics and has significantly contributed to the development of the aquaculture feed industry (Chen et al., 2014; Finamore et al., 2017; Cardoso et al., 2022; Prates, 2025). Biabani Asrami et al. (2019) demonstrated that the addition of 0.15% phycocyanin to the diet improved the growth rate, weight, and length of the guppy (*Poecilia reticulata* Peters, 1859). The addition of phycocyanin at a concentration of 150 mg/kg was found to enhance the survival and non-specific immune response of carp (*Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758) infected with *Aeromonas hydrophila* (Chester, 1901) Stanier, 1943 (Mughtar et al., 2019; Yusoff et al., 2020). Similarly, phycocyanin has been shown to improve the immune and antioxidant response of whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931)), demonstrating its potential to regenerate tissues and reduce mortality caused by disease (Ahmed et al., 2025). Considering the bivalves, biologically active compounds derived from spirulina have been tested successfully in laboratory settings and seem to be an attractive option for preventing disease outbreaks and improving the health on farms (Arney et al., 2015; Willer et al., 2020). However, further research is needed to determine the potential and explore toxic effects of bioactive compounds derived from spirulina including CPBs on commercially important bivalve species. Therefore, the purpose of this research was to assess the functional responses of adult Pacific oysters (*M. gigas*), when exposed to a potential feed additive – aqueous extract of phycobiliproteins derived from *A. platensis*.

2. Material and methods

2.1. Test substance

Aqueous extract of CBP was prepared from biomass of *A. platensis*. Spirulina was cultivated on Zarukk medium in open tanks. To rapidly extract pigments, distilled water was added to the biomass and the freezing-thawing cycle was repeated twice. The pigments were then extracted in cold distilled water (5°C) for 24 h. The extract was separated from the biomass by centrifugation (Eppendorf 5430R, Germany, at 6000 rpm for 10 min) and stored at -18°C in the dark. The concentration of pigments in the extract was determined spectrophotometrically (UV-2600i spectrophotometer, Shimadzu Corporation, Japan) at wavelengths 400-800 nm. Optical density was measured at the absorption maxima of R-phycocyanin (615 nm), C-phycocyanin (620 nm) and allophycocyanin (650 nm), and at 750 nm for estimating nonspecific absorption of the solu-

tion. The concentration of the pigments was calculated using the following formula (Stadnichuk, 1990):

$$C\text{-CBP} = 0.166 \times D_{620} - 0.091 \times D_{650},$$

where D is the optical density values for the corresponding wavelengths.

The concentration range of CBPs in the extract was 4000 to 4500 µg/mL.

2.2. Animals

For the acute toxicity study, adult Pacific oysters *M. gigas* (5 years old, weighing 72.1 ± 6.2 g, with shell lengths of 10.8 ± 1.9 cm, $n = 140$), obtained from a commercial shellfish farm located near Sevastopol (44.616014, 33.502248), were used. The oysters were kept in 50-70 L plastic tanks at a temperature of 18-20 °C, pH 8.2, oxygen concentration 7-8 mg/L, salinity 17-18 psu and 12 h light/dark cycle. The oysters were fed with microalgae feed daily (*Tetraselmis viridis* Rouchijajnen, R.E. Norris, Hori, and Chihara (1980), strain IBSS-25, which was provided with the Biotechnology and Phytoresource Department at the Federal Research Center IBSS). The feed was offered in equal proportions (10^9 microalgae cells per day per animal). The oysters were acclimated for one week prior to the start of experiments. Throughout the acclimation period and experimental stages, two-thirds of the water in the tanks was refreshed daily to ensure complete metabolic waste removal.

2.3. Treatment

In an experiment to determine the safe range of concentrations for CBPs, aqueous extract was added to tanks containing oysters ($n=70$). The final concentrations of the extract used were 2 µg/mL, 20 µg/mL, and 200 µg/mL. The range of concentrations used in this experiment was based on previous studies that did not find any adverse effects from the extract up to a concentration of 200 000 ppm (Soni et al., 2010). Oysters were observed for signs of death for 24-48 h, and their functional parameters were also assessed. A control group was maintained in a tank without any extract.

2.4. Parameters investigated

Oysters were observed twice daily for mortality during the course of the experiment. At the end of the 24-h and 48-h periods, respiratory rate, hemocyte parameters, and cellular composition of hemolymph were assessed for each experimental group. Hemocyte suspensions were prepared using the method described previously by Andreyeva et al. (2021a). Approximately 1.0-2.0 mL of hemolymph was collected from each oyster's cardiac sinus using a sterile syringe. Two oysters' hemolymph samples were pooled, resulting in a total of 10 samples, which were centrifuged at $500 \times g$ for 5 min at (+10 °C). The resulting cell pellets were resuspended in sterilized filtered seawater to obtain a hemocyte concentration between $2-4 \times 10^7$ cells/mL. As hemocytes are adhesive cells (Chen and Bayne, 1995), the samples were kept at +4°C to prevent clumping

before analysis. Microscopic observations of the hemocytes were performed using a light microscope Olympus CX-43 (Japan).

2.4.1. Flow cytometry

The functional characteristics of hemocytes and the cellular composition of hemolymph were evaluated using flow cytometry. The measurements were carried out using a MACS Quant flow cytometer (Miltenyi Biotech, Germany), and the data were processed using the manufacturer's proprietary software, MACSQuantify™. For each sample, a total of 10 000 events were analyzed, and all measurements were repeated three times.

The cellular composition of hemolymph was determined using SYBR Green I, a membrane-permeable fluorescent dye that binds to double-stranded DNA. A volume of 500 µL of hemocyte suspension was incubated with a solution of SYBR Green I at a final concentration of 0.01 M for 30 min in the dark at 4 °C before flow cytometric analysis. After staining, the hemocytes were directly analyzed using a flow cytometer. Intact hemocytes that had been stained with SYBR Green I and exhibited high green fluorescence were distinguished from cell debris with lower fluorescence (see Fig. 1a). Two-parameter cytograms were created based on the forward scatter (FSC) and side scatter (SSC) characteristics of SYBR Green I-positive cells. The results were presented as the relative proportion of granulocytes, agranulocytes, and hyalinocytes compared to the total number of cells (see Fig. 1b).

The metabolic activity of hemocytes was assessed by measuring the activity of non-specific esterases using the lipophilic substrate fluorescein diacetate (FDA), as described by Xian et al. (2021). Hemocyte suspensions were incubated with 5 µM FDA for 15 min at room temperature in the dark. After incubation, the fluorescence of cells was measured using the FL1 channel of a flow cytometer and expressed as the average fluorescence intensity of FDA in arbitrary units (A.U.) to determine metabolic activity.

The apoptosis of hemocytes was analyzed using the Annexin V-FITC/PI apoptosis detection kit (Invitrogen) as previously described by Xian et al.

(2021). Briefly, hemocyte suspensions were prepared and incubated in Annexin V binding buffer. Then, 500 µL of the suspension was stained with 5 µL of Annexin V-FITC and 10 µL of a 50 µg/mL PI working solution for 15 min in the dark. Following this, Annexin binding buffer was added to each sample, and cells were immediately analyzed using flow cytometry. Hemocytes that stained positively for Annexin V but negatively for PI were considered undergoing apoptosis. Cells positive for both Annexin and PI were at the final stages of apoptosis or had undergone necrosis. Cells negative for both probes were classified as alive.

2.4.2. Respiratory rate

Respiratory rate (RR) measurements were conducted using acrylic chambers (1 L each), into which one oyster was placed. Each chamber was fitted with a pump and oxygen sensor (MARK-302Oximeter, Russia), which monitored oxygen concentration within the chamber. The pump operated continuously to ensure homogeneity of water within the chamber and near the oxygen sensor. The chambers were gradually and completely filled with water from designated tanks, ensuring that bubbles were avoided. Oysters used in the study (n=10) were carefully transferred into the chambers. All measurements were taken 1 h after transferring the oysters into the respiration chambers, and were repeated three times. Oxygen concentrations were monitored over a 1-hour period. Control measurements without the presence of mollusks were conducted at the beginning and end of each series of RR measurements. RR was calculated using equation and were expressed as mg O₂ g dry weight⁻¹ h⁻¹:

$$RR = (C_2 - C_1) \cdot V / t / W_{dw}$$

where, C₁ and C₂ - initial and final oxygen concentration in the chamber (mg/L); V - chamber volume (L), t - period of measurement (h), W_{dw} - dry tissue weight (g)

2.5. Statistical analysis

Statistical analysis was performed in GraphPad Prism version 9 (GraphPad Software, USA). All the data were expressed as mean ± S.E. (n = 10) unless other is stated. The homogeneity of variances was checked with

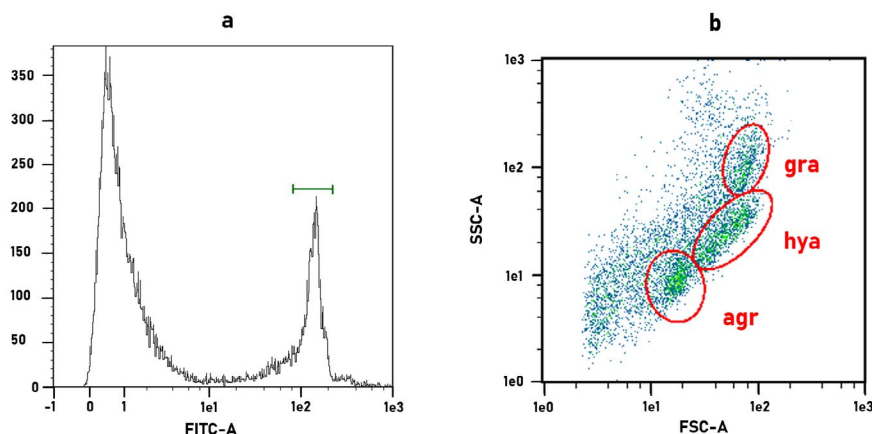


Fig.1. Hemolymph cellular composition of the Pacific oyster *M. gigas*: a – Distinguishing hemocytes from cell debris based on DNA-content. b – FSC-SSC dot plot of hemocytes: agranulocytes, hyalinocytes, granulocytes.

Levene's test and the significant differences among the control and experimental groups were subjected to two-way analysis of variance (two-way ANOVA) followed by Dunnet multiple range test. Statistically significant difference was designated at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Survival and Respiratory rate

The survival rate of oysters in the experiment was 100 %.

There were treatment-related changes in respiration in adult oysters exposed to aqueous extract of CBP (Fig. 2). Statistically significant increases in RRs were observed when comparing the control group and the treated group. Oxygen consumption showed a dose- and time-dependent response during the experiment, as indicated by a two-way analysis of variance (ANOVA) test. Mean RR increased by 227% and 182%, respectively, in oysters treated with 2 $\mu\text{g/mL}$ and 20 $\mu\text{g/mL}$ extracts after 24 h and 48 h of exposure. Additionally, a further increase of 275% and 262%, respectively, was observed at 48-hour incubation periods with 200 $\mu\text{g/mL}$. The highest level of RR was found in oysters exposed to the highest concentration of extract (200 $\mu\text{g/mL}$) for 24 h.

3.2. Hemolymph cellular composition

Three distinct morphological populations (agranulocytes, hyalinocytes, and granulocytes) were identified based on their relative size (forward scatter (FSC) values) and granularity (side scatter (SSC) values) (Andreyeva et al., 2021a) (Fig. 1). Granulocytes constituted the majority of hemocytes in oyster hemolymph, accounting for 50–65% of the total cell count. Hyalinocytes and agranular cells represented 18–33% and 16–18%, respectively, of circulating hemocytes. The relative abundance of granulocytes in oysters decreased after exposure to 20 $\mu\text{g/mL}$ of CBP extract for 48 h (Fig. 3c). Concomitantly, there was a signif-

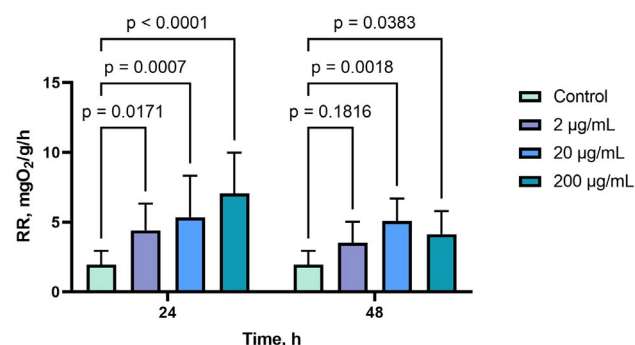


Fig.2. Respiration rates (in $\text{mg O}_2 \text{ g dry weight}^{-1} \text{ h}^{-1}$) of *M. gigas* upon exposure to different concentrations of aqueous extract of CBP. Bars represent standard errors of the mean of 10 individuals. Brackets represent differences among hemocyte subpopulations within each column (two-way ANOVA, $p < 0.05$).

icant increase in the relative number of hyalinocytes (Fig. 3b). A high concentration of the extract caused a reduction in granulocyte numbers and an increase in both agranular cell types (agranulocytes and hyalinocytes) in hemolymph.

3.3. Metabolic activity

The metabolic activity of hemocytes in oysters was significantly lower after exposure to high concentrations (200 $\mu\text{g/mL}$) of CBP extract for 24–48 h compared to control groups. Also, significantly lower levels of FDA fluorescence were observed after 48 hours of exposure to 20 $\mu\text{g/mL}$ of the extract ($p < 0.05$) (Fig 4).

3.4. Apoptosis

In the control group of oysters, *M. gigas*, the percentage of apoptosis-induced hemocytes was less than 5%. No significant effects of the CBP extract on the number of apoptosis cells in the hemolymph of the oysters was observed (Fig. 5).

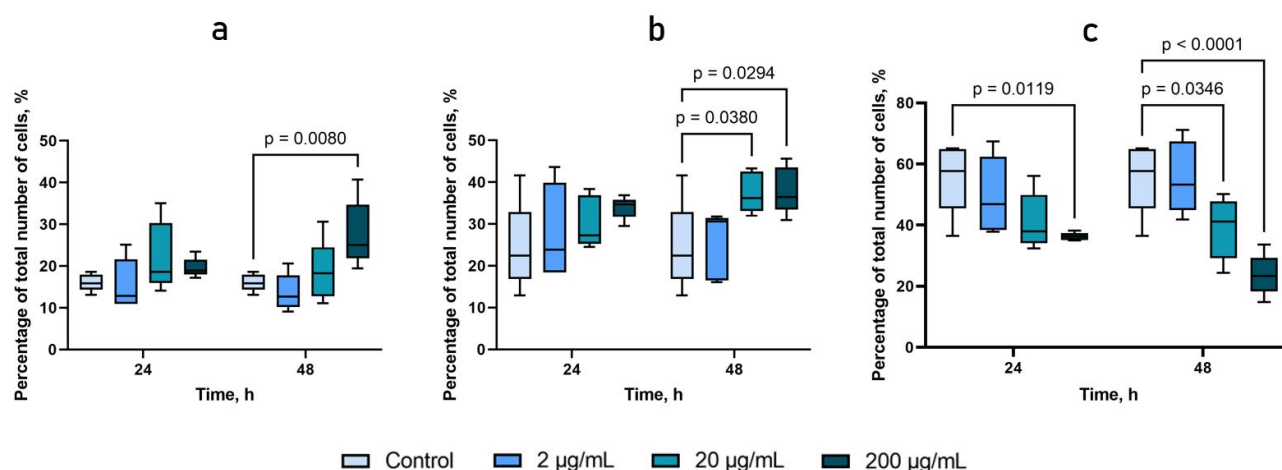


Fig.3. Percentage of agranulocytes (a), hyalinocytes (b) and granulocytes (c) (mean $\pm$ S.E.) in hemolymph of *M. gigas* exposed to different concentrations of aqueous extract of CBP. Brackets represent differences among hemocyte subpopulations within each column (two-way ANOVA, $p < 0.05$, $n = 10$).

4. Discussion

The results of the current study indicate a relatively low level of acute toxicity of the aqueous extract of CBP in adult Pacific oyster populations. Specifically, there was no mortality observed in any of the experimental groups throughout the duration of the study. Additionally, the average respiratory rate (RR) of oysters increased across all concentrations tested, and a clear dose- and time-response relationship was observed. In previous studies, it has been established that the respiratory rate in oysters is linked to their feeding activity and metabolic processes due to their filter-feeding behavior (Sobral and Widdows, 1997). Furthermore, the addition of feeding supplements to the diet has been shown to influence the oxygen consumption rate of aquatic organisms (Bayne and Newell, 1983; Dawood et al., 2018; Shi et al., 2023). Although we did not evaluate filtration activity of oysters in the present experiment, we may suppose that increased RR observed in all experimental groups are in line with these studies and indicate intensive consumption of the extract by oysters. While *A. platensis* may not be a natural food source for oysters, it is widely used as a feed additive or main component in feeds for various aquatic organisms, including invertebrates (Ragaza et al., 2020; Alagawany et al., 2021). Furthermore, microscopic examination of hemocytes from oysters exposed to various concentrations of the extract revealed that hemocytes actively engulfed particles of the extract (Fig. 6). In addition to their involvement in the immune system, bivalve hemocytes also play a role in feeding and nutrient transfer within organisms (Huiping, 2021; De la Ballina et al., 2022).

On the other hand, an increased oxygen uptake rate may also be linked to stress caused by toxic exposure (Sokolova, 2004; Kamermans and Saure, 2022). However, 100% survival of oysters during the experiment suggests that increased RR in the current study was a sign of increased intake of the extract by oysters. Therefore, based on these results and the presence of CBPs in hemocytes, it can be concluded that rapid increase in RR after exposure to the aqueous extract occurred due to enhanced filtration activity of the oysters. The last one has increased due to the presence of suspended organic matter in the water.

The results of the current study also demonstrated low cytotoxicity of the aqueous extract of CBP on hemolymph cells in oysters. The cellular composition of hemolymph was significantly altered after

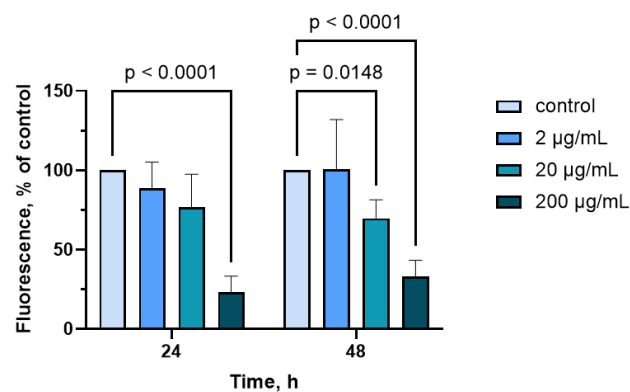


Fig.4. Effect of aqueous extract of CBP on metabolic activity of hemocytes in oysters *M.gigas*. Bars represent standard errors of the mean of 10 individuals. Brackets represent differences among hemocyte subpopulations within each column (two-way ANOVA, $p < 0.05$, $n = 10$).

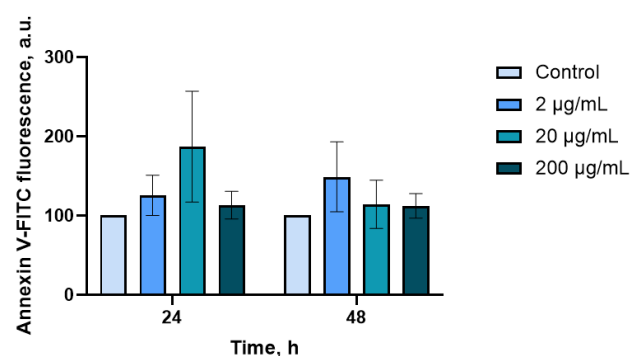


Fig.5. Level of apoptosis in hemocytes of *M.gigas* oysters during incubation with an aqueous extract of CBP. Bars represent standard errors of the mean of 10 individuals.

exposure of the oysters to medium and high concentrations of CBP extract (20-200 µg/mL) for 48 h. A reduction in the percentage of granulocytes was associated with an increase in the relative number of agranulocytes and hyalinocytes. Environmental stress often results in significant shifts in the cellular composition of the hemolymph in bivalve mollusks (Matozzo and Marin, 2011; Andreyeva et al., 2021a; Andreyeva et al., 2021b; Andreyeva et al., 2024). Fluctuations in the ratio of subpopulations of hemocytes within the hemolymph of bivalve species may occur due to alterations in hematopoietic activity, death of hemocytes resulting from general intoxication, and migration of hemocytes to tissues (Song et al., 2010). The duration of the



Fig.6. *M. gigas* hemocytes phagocytize particles of the CBP extract suspension. Arrows show particles of the extract.

experimental period (24-48 hours) was not sufficient to observe changes in hemopoiesis in oysters (Jemaà et al., 2014). Therefore, an increase in granulocyte percentage in oyster hemolymph after 48 h of exposure to CBP extract is unlikely to be due to hemocyte proliferation. Similarly, hemocyte death can be excluded since we did not observe significant changes in the percentage of dead hemocytes (as determined by the protocol for detection of apoptosis, data not shown) in the samples. The lower percentage of granulocytes in the hemolymph may be due to their migration to tissues, resulting in a decrease in their number in circulating hemolymph. Recent studies have shown that hemocytes migrate to tissues to carry out immune and detoxification functions, and granulocytes, as the main immune effector cells, are more capable of migration compared to agranular hemocytes (Huang et al., 2018; Gerdol et al., 2018). With regard to the decrease in granulocyte percentage in the hemolymph of oysters exposed to high concentrations of the extract (200 µg/mL), it is likely that excessive concentrations of CBPs have enhanced filter-feeding and hemocyte migration to the mantle and gills due to the accumulation of microparticles of spirulina in these areas.

In this study, the metabolic activity of hemocytes was observed to decrease with the administration of high concentrations of the extract, as shown in Fig. 4. Significant loss of FDA fluorescence was observed after 24 h of exposure to 200 µg/mL of the extract, and following 48 h of exposure at concentrations ranging from 20 to 200 µg/mL. Cytoplasmic non-specific esterases play a role in the process of intracellular killing of foreign agents by hemocytes (Beckmann et al., 1992; Renault, 2015). Therefore, it could be hypothesized that the excessive administration of CBP aqueous extract decreased the levels of hemocyte metabolic activity due to the inhibition of these cellular immune mechanisms. The decrease in FDA fluorescence in hemocytes exposed to higher concentrations of the extract may be linked to a general inhibition of pathogen killing and suppression of cellular immunity in these cells. Similar disruptions in hemocyte function, including a decrease in their metabolic activity and an accumulation of markers of cellular damage (apoptosis), were observed in *M. gigas* hemocytes after exposure to various organic pollutants (insecticides, polycyclic aromatic hydrocarbons, etc.) (Gagnaire et al., 2006; Chong, 2022; Alesci et al., 2023). Comparing these results with those obtained in this study, we can conclude that high concentrations of the aqueous extract of CBP (200 µg/mL) did not induce apoptosis in oyster hemocytes. Therefore, we may conclude that the aqueous extract of CBP demonstrates relatively low cytotoxicity towards oyster hemocytes, however high concentrations (200 µg/mL) are excessive and may decrease general health-promoting effects for oysters while used in hatcheries.

In conclusion, the findings of this study indicate that the aqueous extract of CBP is safe for adult oysters as no signs of apoptosis were observed in the hemolymph of all experimental groups, and total survival was maintained for a 48-hour period. Respiratory rates in the oysters increased as CBP concentration increased in the water. However, high concentrations

of the extract (200 µg/mL) suppressed the metabolic activity of oyster hemocytes and decreased the percentage of granulocytes, the major immune effector cells, in the hemolymph after a 24-48 hour exposure period. Therefore, it is recommended that the extract be used at concentrations below 200 µg/mL in future studies to avoid adverse effects on the oyster organism. This preliminary study is the first of its kind and provides a new perspective on the potential use of CBP aqueous extract from *A. platensis* as a dietary supplement for enhancing the disease resistance and overall health of oysters. Further evaluation of the direct effects of the extract on oysters is needed to significantly improve the efficacy of oyster conditioning in hatcheries and its use in aquaculture.

Acknowledgements

The present study was funded by grant RSF № 24-16-00245 "Evaluation of the immunomodulatory and antioxidant properties of an aqueous extract of phycobiliproteins (C-phyocyanin, B-phycoerythrin), a promising feed additive for the Pacific oyster *Magallana gigas*".

The work was carried out at the Center for Collective Use "Spectrometry and Chromatography" IBSS of RAS.

Conflict of interest

The authors declare no conflicts of interest.

References

- Ahmed R.A., Jastaniah S.D., Alaidaroos B.A. et al. 2025. Effects of dietary *Spirulina platensis* supplementation on growth performance, whole body composition, antioxidant activity, histological alterations, and resistance to *Vibrio parahaemolyticus* in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture Reports 40: 102606. DOI: [10.1016/j.aqrep.2024.102606](https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2024.102606)
- Alagawany M., Taha A.E., Noreldin A. et al. 2021. Nutritional applications of species of *Spirulina* and *Chlorella* in farmed fish: A review. Aquaculture 542: 736841. DOI: [10.1016/j.aquaculture.2021.736841](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736841)
- Alesci A., Di Paola D., Fumia A. et al. 2023. Internal defense system of *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819): Ecological Role of Hemocytes as Biomarkers for Thiacloprid and Benzo[a]Pyrene Pollution. Toxics 11(9): 731. DOI: [10.3390/toxics11090731](https://doi.org/10.3390/toxics11090731)
- Andreyeva A.Y., Kladchenko E.S., Vyalova O.Y. et al. 2021. Functional characterization of the Pacific Oyster, *Crassostrea gigas* (Bivalvia: Ostreidae), hemocytes under normoxia and short-term hypoxia. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 21(3): 125-133. DOI: [10.4194/1303-2712-v21_3_03](https://doi.org/10.4194/1303-2712-v21_3_03)
- Andreyeva A.Y., Kladchenko E.S., Kukhareva T.A. 2021. Shift in functional and morphological parameters of the Pacific oyster hemocytes after exposure to hypoxia. Regional Studies in Marine Science 48: 102062. DOI: [10.1016/j.rsma.2021.102062](https://doi.org/10.1016/j.rsma.2021.102062)
- Andreyeva A.Y., Kukhareva T.A., Gostyukhina O.L. et al. 2024. Impacts of ocean acidification and hypoxia on cellular immunity, oxygen consumption and antioxidant status in Mediterranean mussel. Fish & Shellfish Immunology 154: 109932. DOI: [10.1016/j.fsi.2024.109932](https://doi.org/10.1016/j.fsi.2024.109932)

- Arney B., Liu W., Forster I.P. et al. 2015. Feasibility of dietary substitution of live microalgae with spray-dried *Schizochytrium* sp. or *Spirulina* in the hatchery culture of juveniles of the Pacific geoduck clam (*Panopea generosa*). *Aquaculture* 444: 117-133. DOI: [10.1016/j.aquaculture.2015.02.014](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.02.014)
- Asrami M., Sudagar M., Shahraki N. et al. 2019. Effect of extracted phycocyanin from *Spirulina platensis* on growth parameters, colorations, digestive enzymes and body chemical compositions of Guppy fish (*Poecilia reticulata*). *Journal of Survey in Fisheries Sciences* 6: 21-34. DOI: [10.18331/SFS2019.6.1.1](https://doi.org/10.18331/SFS2019.6.1.1)
- Bayne B.L., Newell R.C. 1983. Physiological energetics of marine molluscs. *The Mollusca* 4: 407-515. DOI: [10.1016/B978-0-12-751404-8.50017-7](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-751404-8.50017-7)
- Beckmann N., Morse M.P., Moore C.M. 1992. Comparative study of phagocytosis in normal and diseased hemocytes of the bivalve mollusc *Mya arenaria*. *Journal of Invertebrate Pathology* 59(2): 124-132. DOI: [10.1016/0022-2011\(92\)90022-V](https://doi.org/10.1016/0022-2011(92)90022-V)
- Cardoso L.G., Lemos P.V.F., de Souza C.O. et al. 2022. Current advances in phytoremediation and biochemical composition of *Arthrospira* (*Spirulina*) grown in aquaculture wastewater. *Aquaculture Research* 53(14): 4931-4943. DOI: [10.1111/are.15996](https://doi.org/10.1111/are.15996)
- Chen J.H., Bayne C.J. 1995. Bivalve mollusc hemocyte behaviors: characterization of hemocyte aggregation and adhesion and their inhibition in the California mussel (*Mytilus californianus*). *The Biological Bulletin* 188(3): 255-266. DOI: [10.2307/1542303](https://doi.org/10.2307/1542303)
- Chen H.W., Yang T.S., Chen M.J. et al. 2014. Purification and immunomodulating activity of C-phycocyanin from *Spirulina platensis* cultured using power plant flue gas. *Process Biochemistry* 49(8): 1337-1344. DOI: [10.1016/j.procbio.2014.05.006](https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.05.006)
- Chong R.S.M. 2022. Molluscan immunology. *Aquaculture Pathophysiology* 57: 383-392. DOI: [10.1016/B978-0-323-95434-1.00057-7](https://doi.org/10.1016/B978-0-323-95434-1.00057-7)
- Citarasu T. 2010. Herbal biomedicines: a new opportunity for aquaculture industry. *Aquaculture International* 18(3): 403-414. DOI: [10.1007/s10499-009-9253-7](https://doi.org/10.1007/s10499-009-9253-7)
- Dawood M.A., Koshio S., Esteban M.A. 2018. Beneficial roles of feed additives as immunostimulants in aquaculture: a review. *Reviews in Aquaculture* 10(4): 950-974. DOI: [10.1111/raq.12209](https://doi.org/10.1111/raq.12209)
- De la Ballina N.R., Maresca F., Cao A. et al. 2022. Bivalve haemocyte subpopulations: a review. *Frontiers in Immunology* 13: 826255. DOI: [10.3389/fimmu.2022.826255](https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.826255)
- Elumalai P., Kurian A., Lakshmi S. et al. 2020. Herbal immunomodulators in aquaculture. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture* 29(1): 33-57. DOI: [10.1080/23308249.2020.1779651](https://doi.org/10.1080/23308249.2020.1779651)
- Finamore A., Palmery M., Bensehaila S. et al. 2017. Antioxidant, immunomodulating, and microbial-modulating activities of the sustainable and ecofriendly spirulina. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2017(1): 3247528. DOI: [10.1155/2017/3247528](https://doi.org/10.1155/2017/3247528)
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2020. The state of world fisheries and aquaculture 2020: Sustainability in action. Rome: FAO.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2024. The state of world fisheries and aquaculture 2024: Blue transformation in action. Rome: FAO.
- Gagnaire B., Thomas-Guyon H., Burgeot T. et al. 2006. Pollutant effects on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), hemocytes: screening of 23 molecules using flow cytometry. *Cell biology and toxicology* 22(1): 1-14. DOI: [10.1007/s10565-006-0011-6](https://doi.org/10.1007/s10565-006-0011-6)
- Gerdol M., Gomez-Chiarri M., Castillo M.G. et al. 2018. Immunity in molluscs: recognition and effector mechanisms, with a focus on bivalvia. In: Edwin L.(Ed.), *Advances in Comparative Immunology*. Springer Cham, pp. 225-341. DOI: [10.1007/978-3-319-76768-0_11](https://doi.org/10.1007/978-3-319-76768-0_11)
- Huang J., Li S., Liu Y. et al. 2018. Hemocytes in the extrapallial space of *Pinctada fucata* are involved in immunity and biomineralization. *Scientific Reports* 8(1): 4657. DOI: [10.1038/s41598-018-22961-y](https://doi.org/10.1038/s41598-018-22961-y)
- Huiping Y. 2021. Immunological assays of hemocytes in molluscan bivalves as biomarkers to evaluate stresses for aquaculture. In: *Proceedings of the 47th UJNR. Bulletin of Japan Fisheries Research and Education Agency*, pp. 31-45.
- Jemaà M., Morin N., Cavelier P. et al. 2014. Adult somatic progenitor cells and hematopoiesis in oysters. *Journal of Experimental Biology* 217(17): 3067-3077. DOI: [10.1242/jeb.106575](https://doi.org/10.1242/jeb.106575)
- Kamermans P., Saure C. 2022. Interacting climate change effects on mussels (*Mytilus edulis* and *M. galloprovincialis*) and oysters (*Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis*): experiments for bivalve individual growth models. *Aquatic Living Resources* 35: 1. DOI: [10.1051/alr/2022001](https://doi.org/10.1051/alr/2022001)
- Kolonchin K.V., Truba M.A., Kuzicheva N.Y. 2023. Trends in the development of aquaculture in Russia: prospects for qualitative improvement of food security and sustainable growth of the industry's economic potential. *Food policy and security* 10(3): 533-546. DOI: [10.18334/ppib.10.3.118265](https://doi.org/10.18334/ppib.10.3.118265)
- Lisitskaya E.V., Shchurov S.V. 2024. The first record of larval *Crassostrea gigas* (Thunberg 1793) (Bivalvia, Ostreidae) from the Black Sea. *Biology Bulletin* 51(9): 2688-2692. DOI: [10.1134/S1062359024701516](https://doi.org/10.1134/S1062359024701516)
- Matozzo V., Marin M.G. 2011. Bivalve immune responses and climate changes: is there a relationship?. *Invertebrate Survival Journal* 8(1): 70-77.
- Muchtar M., Sukenda S., Nuryati S. et al. 2019. The use of immunostimulant from phycocyanin of *Spirulina platensis* to control motile aeromonad septicemia (MAS) disease in common carp *Cyprinus carpio*. *Jurnal Akuakultur Indonesia* 18(1): 101-109. DOI: [10.19027/jai.18.1.101-109](https://doi.org/10.19027/jai.18.1.101-109)
- Prates J.A. 2025. Applications of Bioactive Compounds from Marine Microalgae in Health, Cosmetics, and Functional Foods. *Applied Sciences* 15(11): 6144. DOI: [10.3390/app15116144](https://doi.org/10.3390/app15116144)
- Ragaza J.A., Hossain M.S., Meiler K.A. et al. 2020. A review on *Spirulina*: alternative media for cultivation and nutritive value as an aquafeed. *Reviews in Aquaculture* 12(4): 2371-2395. DOI: [10.1111/raq.12439](https://doi.org/10.1111/raq.12439)
- Renault T. 2015. Immunotoxicological effects of environmental contaminants on marine bivalves. *Fish & Shellfish Immunology* 46(1): 88-93. DOI: [10.1016/j.fsi.2015.04.011](https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.04.011)
- Ringø E. 2020. Probiotics in shellfish aquaculture. *Aquaculture and Fisheries* 5(1): 1-27. DOI: [10.1016/j.aaf.2019.12.001](https://doi.org/10.1016/j.aaf.2019.12.001)
- Shi X., Jia Y., Zhang Z. et al. 2023. The effects of Chinese herbal feed additives on physiological health and detoxification ability in the red claw crayfish, *Cherax quadricarinatus*, and evaluation of their safety. *Aquaculture* 569: 739394. DOI: [10.1016/j.aquaculture.2023.739394](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2023.739394)
- Sobral P., Widdows J. 1997. Influence of hypoxia and anoxia on the physiological responses of the clam *Ruditapes decussatus* from southern Portugal. *Marine Biology* 127: 455-461. DOI: [10.1007/s002270050033](https://doi.org/10.1007/s002270050033)
- Sokolova I.M. 2004. Cadmium effects on mitochondrial function are enhanced by elevated temperatures in a marine poikilotherm, *Crassostrea virginica* Gmelin (Bivalvia: Ostreidae). *Journal of Experimental Biology* 207(15): 2639-2648. DOI: [10.1242/jeb.01054](https://doi.org/10.1242/jeb.01054)
- Song L., Wang L., Qiu L. et al. 2010. Bivalve immunity. *Advances in experimental medicine and biology* 708: 44-65. DOI: [10.1007/978-1-4419-8059-5_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-8059-5_3)

Soni B., Visavadiya N.P., Dalwadi N. et al. 2010. Purified c-phycoerythrin: safety studies in rats and protective role against permanganate-mediated fibroblast-DNA damage. Journal of Applied Toxicology 30: 542-550. DOI: [10.1002/jat.1524](https://doi.org/10.1002/jat.1524)

Stadnichuk I.N. 1990. Phycobiliproteins. Moscow: Mir Publ.

Vijayaram S., Sun Y.Z., Zuorro A. et al. 2022. Bioactive immunostimulants as health-promoting feed additives in aquaculture: A review. Fish & Shellfish Immunology 130: 294-308. DOI: [10.1016/j.fsi.2022.09.011](https://doi.org/10.1016/j.fsi.2022.09.011)

Willer D.F., Furse S., Aldridge D.C. 2020. Microencapsulated algal feeds as a sustainable replacement diet for broodstock in commercial bivalve aquaculture. Scientific Reports 10(1): 12577. DOI: [10.1038/s41598-020-69645-0](https://doi.org/10.1038/s41598-020-69645-0)

Xian J.A., Zheng P.H., Lu Y.P. et al. 2021. Flow cytometric analysis of morphologic and immunological characterisation of the tiger shrimp *Penaeus monodon* haemocytes. Aquaculture Reports 20: 100748. DOI: [10.1016/j.aqrep.2021.100748](https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2021.100748)

Yusoff F.M., Banerjee S., Nagao N. et al. 2020. Use of microalgae pigments in aquaculture. In: Jacob-Lopes E. et al. (Eds.), Pigments from Microalgae Handbook. Springer Cham, pp. 471-513. DOI: [10.1007/978-3-030-50971-2_19](https://doi.org/10.1007/978-3-030-50971-2_19)

Влияние кратковременного воздействия водного экстракта фикобилипротеинов на гигантских устриц (*Magallana gigas*)



Подольская М.С.^{1*}, Ткачук А.А.¹, Парфенов В.В.², Кухарева Т.А.¹,
Боровков А.Б.³, Андреева А.Ю.¹

¹Лаборатория экологической иммунологии гидробионтов, Институт биологии южных морей имени А. О. Ковалевского РАН, Москва, 119991, Россия

²Отдел информационных технологий и информационной безопасности, Институт биологии южных морей имени А. О. Ковалевского РАН, Москва, 119991, Россия

³Отдел биотехнологии и фиторесурсов, Институт биологии южных морей имени А. О. Ковалевского РАН, Москва, 119991, Россия

АННОТАЦИЯ. В условиях активного развития аквакультурной отрасли в России и мире возрастает потребность в технологиях, которые помогают снизить стресс у устриц и повысить их устойчивость к болезням и паразитам в условиях выращивания в питомниках. В настоящем исследовании изучалось влияние водного экстракта фикобилипротеинов (ФБП) из спироулины *A. platensis* в концентрациях от 2 до 200 мкг/мл на физиологическое состояние взрослых гигантских устриц (*Magallana gigas*) в течение 24–48 часов. С помощью проточной цитометрии анализировали клеточный состав гемолимфы, уровень апоптоза и метаболическую активность гемоцитов. Результаты показали, что максимальная концентрация экстракта (200 мкг/мл) снижала метаболическую активность гемоцитов и уменьшала относительную долю гранулоцитов в гемолимфе устриц. При этом доля гемоцитов в состоянии апоптоза достоверно не отличалась между опытной и контрольной группами, а выживаемость моллюсков в эксперименте составила 100%. Результаты настоящей работы являются основой для разработки функциональных кормов на основе производных спироулины, направленных на повышение резистентности и снижение стрессовой нагрузки у производителей молоди устриц в условиях аквакультуры.

Ключевые слова: фикобилипротеины, гигантская устрица, гемоциты, интенсивность дыхания, метаболическая активность, апоптоз

Для цитирования: Подольская М.С., Ткачук А.А., Парфенов В.В., Кухарева Т.А., Боровков А.Б., Андреева А.Ю. Влияние кратковременного воздействия водного экстракта фикобилипротеинов на гигантских устриц (*Magallana gigas*) // Limnology and Freshwater Biology. 2025. - № 4. - С. 713-728. DOI: 10.31951/2658-3518-2025-A-4-713

1. Введение

Современное состояние рыболовства и аквакультуры в России и мире характеризуется высокими темпами роста (FAO, 2024). Россия, омываемая 13 морями, имеющая общую протяженность 523 тыс. км рек и более 170 тыс. га зеркал озер, водохранилищ и прудов, обладает высоким потенциалом развития морской и пресноводной аквакультуры (Kolonchin et al., 2023). Согласно опубликованным данным, объемы производства рыбы и других промысловых видов гидробионтов в России в 2002–2021 годах возросли на 58,2% (Kolonchin et al., 2023). Гигантская устрица (*Magallana gigas* (Thunberg, 1793)), была завезена в Черное море и

является важным промысловым видом (FAO, 2020; Lisitskaya and Shchurov, 2024). При этом местное производство спата устриц в России остается ограниченным и в значительной степени зависит от импорта. В связи с развитием аквакультуры двустворчатых моллюсков особое значение приобретает совершенствование методов подготовки спата в питомниках, что позволит повысить их здоровье, выживаемость, устойчивость к заболеваниям и репродуктивную способность.

Для повышения эффективности выращивания двустворчатых моллюсков применяют оптимизацию условий содержания, а также различные кормовые добавки (Citarasu, 2010; Ringø, 2020; Elumalai et al., 2020). Современные исследования подчер-

*Автор для переписки.

Адрес e-mail: podolskaya_m99@bk.ru (М.С. Подольская)

Поступила: 30 июля 2025; **Принята:** 20 августа 2025;

Опубликована online: 31 августа 2025

© Автор(ы) 2025. Эта работа распространяется под международной лицензией Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0.



кивают необходимость использования безопасных, экологически чистых и экономически эффективных технологий вместо традиционных антибактериальных и противогрибковых препаратов (Vijayaram et al., 2022; Ahmed et al., 2025). Микроводоросли являются важным источником биологически активных веществ, которые широко применяются в аквакультуре. Включение продуктов, полученных из микроводорослей, в состав кормовых добавок приводит к повышению антимикробной активности, а также способствует усилению антиоксидантной защиты и функций иммунной системы у коммерчески ценных видов (Vijayaram et al., 2022).

Фикобилипротеины (ФБП), выделенные из спироулины (*Arthrospira (Spirulina) platensis* Gomont, 1892), характеризуются широким спектром биологически активных свойств, которые оказывают положительное влияние на здоровье гидробионтов и внесли значительный вклад в развитие индустрии кормов для аквакультуры (Chen et al., 2014; Finamore et al., 2017; Cardoso et al., 2022; Prates, 2025). Biabani Asrami et al. (2019) в своем исследовании сообщили, что диета с добавлением 0,15% фикоцианина, полученного из *Spirulina platensis* значительно увеличила конечный вес, длину, скорость роста у гуппи (*Poecilia reticulata*) (Asrami et al., 2019). Было выявлено, что добавление фикоцианина в количестве 150 мг/кг корма, улучшило выживаемость и неспецифический иммунный ответ карпа *Cyprinus carpio* при заражении *Aeromonas hydrophila* (Muchtart et al., 2019; Yusoff et al., 2020). У белоногой креветки (*Litopenaeus vannamei*) фикоцианин усиливал иммунную защиту и антиоксидантные реакции, способствуя восстановлению тканей и снижению смертности от инфекций (Ahmed et al., 2025). В отношении двусторчатых моллюсков биологически активные соединения, полученные из спироулины, успешно протестированы в лабораторных условиях и представляются перспективным вариантом для предотвращения вспышек заболеваний и улучшения здоровья в условиях аквакультуры (Arney et al., 2015; Willer et al., 2020).

Однако требуются дополнительные исследования для оценки и изучения возможного токсического действия биоактивных компонентов спироулины, включая ФБП, на коммерчески значимые виды двусторчатых моллюсков. Целью данного исследования являлась оценка функциональных реакций взрослых особей гигантской устрицы (*M. gigas*) при воздействии потенциальной кормовой добавки – водного экстракта фикобилипротеинов, полученных из *A. platensis*.

2. Материалы и методы

2.1. Исследуемое вещество

Водный экстракт ФБП был получен из биомассы цианобактерии *A. platensis*. Микроводоросль выращивали на среде Заррука в открытых бассейнах. Биомассу заливали небольшим количеством воды, после чего дважды повторяли цикл “замораживания-размораживания” для разрушения клеточ-

ных мембран, ускоряя, таким образом, экстракцию ФБП. Пигменты экстрагировали холодной дистиллированной водой (5 °C) в течение 24 ч. Экстракт отделяли от биомассы путем центрифугирования (центрифуга Eppendorf 5430R, Германия, 6000 об/мин, 10 мин) и хранили в темноте при -18 °C. Концентрацию пигментов в экстракте контролировали спектрофотометрически (спектрофотометр UV-2600i, Shimadzu Corporation, Япония) в диапазоне длин волн 400–800 нм. Оптическую плотность измеряли при максимумах поглощения для R-фикоцианина (615 нм), C-фикоцианина (620 нм) и аллофикоцианина (650 нм), а также при 750 нм для оценки неспецифического поглощения раствора. Концентрацию пигментов рассчитывали по формуле (Стадничук, 1990):

$$C\text{-CBP} = 0.166 \times D_{620} - 0.091 \times D_{650},$$

где D — значения оптической плотности для соответствующих длин волн.

Концентрация ФБП в экстракте составляла от 4000 до 4500 мкг/мл.

2.2. Моллюски

Для эксперимента были отобраны взрослые устрицы *Magallana gigas* (5 лет, вес 72.1 ± 6.2 г, длина раковины 10.8 ± 1.9 см, $n = 140$) на марикультурной ферме в районе г. Севастополя (44.616014, 33.502248). В период акклиматизации к лабораторным условиям моллюсков размещали в аэрируемых аквариумах объемом 50-70 л. В течение 7 дней устрицы находились в условиях, приближенных к естественной среде со следующими параметрами: концентрация кислорода 7-8 мг·л⁻¹, pH = 8.2, температура 18-20 °C, соленость 17-18 ‰ и 12-часовой цикл свет/темнота. Моллюсков ежедневно кормили смесью микроводорослей *Tetraselmis viridis* (R.E. Norris, Hori & Chihara, 1980) (штамм IBSS-25 из коллекции отдела биотехнологии и фиторесурсов ФИЦ ИнБЮМ). Корм добавляли в равных пропорциях (10⁹ клеток микроводорослей в день на одну особь). Перед началом экспериментов устрицы прошли недельную акклиматизацию. Для удаления продуктов метаболизма устриц проводили ежедневную замену не менее 1/3 воды в аквариумах.

2.3. Экспериментальный протокол воздействия

В эксперименте по определению безопасного диапазона концентраций ФБП (фикобилипротеинов) водный экстракт добавляли в резервуары с устрицами ($n = 70$). Финальная концентрация экстракта ФБП: 2 мкг/мл, 20 мкг/мл и 200 мкг/мл. Устриц подвергали воздействию экстракта в течение 24 ч и 48 ч. Диапазон концентраций, использованных в данном эксперименте, был основан на предыдущих исследованиях, в которых не обнаружено побочных эффектов экстракта вплоть до концентрации 200 000 ppm (Soni et al., 2010). Контрольную группу содержали в резервуаре без экстракта.

2.4. Исследуемые параметры

В ходе эксперимента устриц осматривали дважды в сутки для регистрации смертности. По истечении 24- и 48-часового периодов для каждой экспериментальной группы оценивали: интенсивность дыхания, параметры гемоцитов, клеточный состав гемолимфы. Суспензии гемоцитов готовили по методу, описанному ранее Andreyeva et al. (2021a). Забор гемолимфы (1.0-2.0 мл) проводили в стерильных условиях из сердечного синуса. Пробы гемолимфы объединяли от трех особей. Гемоциты трижды отмывали от плазмы в стерильной морской воде на центрифуге Eppendorf 5430R (500 g, 5 мин, при + 10 °C), а затем ресуспендировали в стерильной морской воде (концентрация клеток 2–4·10⁷ кл·мл⁻¹). Поскольку гемоциты являются адгезивными клетками (Chen and Bayne, 1995), перед анализом пробы хранили при + 4 °C для предотвращения агрегации. Исследование гемоцитов проводили с использованием светового микроскопа Olympus CX-43 (Япония).

2.4.1. Проточная цитометрия

Для проведения цитометрических исследований показателей клеток использовали проточный цитометр MACSQuant (Miltenyi Biotec, Германия), а данные обрабатывали с использованием программного обеспечения MACSQuantify™. Для каждого образца анализировали 10 000 событий, все измерения повторяли трижды. Клеточный состав гемолимфы определяли методом проточной цитометрии на суспензиях гемоцитов, окрашенных витальным ДНК-красителем SYBR Green I. Образец суспензии гемоцитов объемом 500 мкл инкубировали с раствором SYBR Green I (конечная концентрация 0,01 M) в течение 30 мин в темноте при +4°C. После окрашивания гемоциты анализировали на проточном цитометре. Гемоциты, окрашенные SYBR Green I и демонстрирующие высокий уровень флуоресценции в зеленой области спектра, отделяли от клеточного дебриса с низкой флуоресценцией (Рис. 1а). Далее, частицы, входящие в пик флуоресценции красителя распределяли на двухпа-

раметрических цитограммах с учетом их условного диаметра (FSC - Forward Scatter) и гранулярности (SSC - Side Scatter). Результаты представлены в виде относительной доли гранулоцитов, агранулоцитов и гиалиноцитов от общего числа клеток (Рис. 1б).

Метаболическую активность гемоцитов оценивали путем измерения активности неспецифических эстераз с использованием липофильного субстрата диацетата флуоресцеина (FDA) в соответствии с методикой Xian et al. (2021). Суспензии гемоцитов инкубировали с 5 мкМ FDA в течение 15 мин в темноте при комнатной температуре. После инкубации флуоресценцию клеток измеряли в канале FL1 проточного цитометра и выражали как среднюю интенсивность флуоресценции FDA в условных единицах (у. е.) для определения метаболической активности.

Детекцию апоптотических гемоцитов в гемолимфе определяли при помощи окрашивания суспензий клеток флуоресцентным красителем Annexin-V-FITC (Annexin V-FITC/PI (Invitrogen) по методу Xian et al. (2021). Суспензии гемоцитов готовили и инкубировали в буфере для связывания Annexin V. Затем 500 мкл суспензии окрашивали 5 мкл Annexin V-FITC и 10 мкл рабочего раствора йодистого пропидия (PI) концентрацией 50 мкг/мл в течение 15 мин в темноте. После этого в каждую пробу добавляли буфер для связывания Annexin и немедленно анализировали клетки на проточном цитометре. Клетки, позитивные по Annexin V и негативные по PI, классифицировали как находящиеся в апоптозе. Клетки, позитивные по обоим маркерам, относили к поздней стадии апоптоза или некрозу. Клетки, негативные по обоим маркерам, считали жизнеспособными.

2.4.2. Интенсивность дыхания

Интенсивность дыхания устриц измеряли в двух герметичных камерах объемом 1.0 л, в каждую из которых помещали по одной особи. Камеры были оснащены насосом и кислородным датчиком (оксиметр MARK-302M, Россия), для контроля уровня растворенного кислорода. Для равномерного распределения кислорода вокруг датчика воду

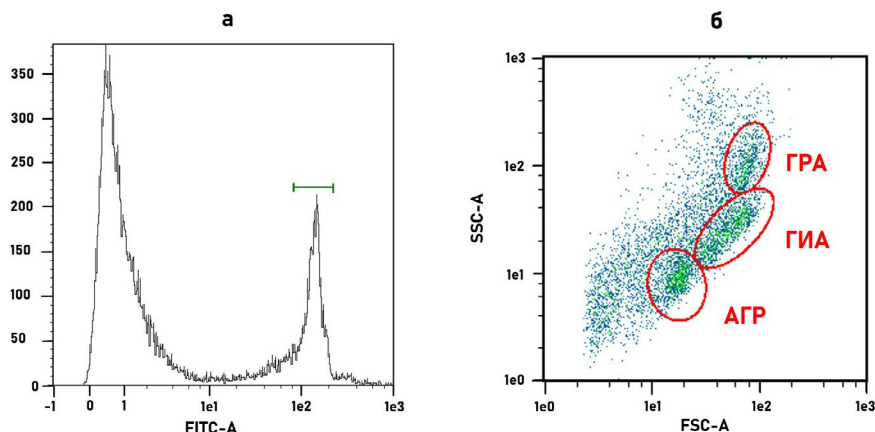


Рис.1. а – гистограмма распределения содержания ДНК в суспензиях гемоцитов. Пик содержания ДНК, соответствующий гемоцитам, выделен зеленым отрезком; б – Распределение гемоцитов устриц по условному диаметру и уровню гранулярности. Субпопуляции гемоцитов выделены красными овалами.

постоянное перемешивали при помощи перистальтического насоса. Камеры заполняли водой из экспериментальных резервуаров, избегая образования пузырьков воздуха. Устриц ($n=10$) аккуратно помещали в камеры, после чего выдерживали 1 час для адаптации перед началом измерений. Каждое измерение длилось 1 час и повторялось три раза для каждой группы устриц; проводили две последовательные серии оценок RR. Контрольные замеры концентрации растворенного кислорода в камерах с водой (без устриц) выполняли в начале и конце каждой серии. RR рассчитывали по формуле (1) в мг O_2 на грамм сухого веса ткани в час (мг O_2 г $^{-1}$ DW ч $^{-1}$):

$$RR = (C_2 - C_1) \cdot V / t \cdot W_{dw}$$

где, C_1 , C_2 – начальная и конечная концентрация кислорода (мг/л); V – объём камеры (л); t – время измерения (ч); W_{dw} – сухой вес ткани (г).

2.5. Статистический анализ

Для статистической обработки полученных данных использовалось специализированное программное обеспечение GraphPad Prism version 9 (GraphPad Software, USA). Количественные данные в работе представлены как среднее арифметическое значение $\pm$ стандартная ошибка среднего. Гомогенность (однородность) дисперсий между группами оценивалась с помощью критерия Левена. В случае соответствия данных критериям нормальности и гомогенности дисперсий, для выявления статистически значимых различий применялся двухфакторный дисперсионный анализ (two-way ANOVA). Для определения значимости различий между конкретными экспериментальными группами и контрольной группой (post-hoc анализ) использовался критерий Даннета. Различия между группами считались статистически значимыми при уровне значимости $p < 0.05$.

3. Результаты

3.1. Выживаемость и интенсивность дыхания

Выживаемость устриц в эксперименте составила 100%.

Воздействие водного экстракта ФБП вызвало дозозависимые изменения частоты дыхания (RR) у взрослых особей (Рис. 2). При сравнении контрольной и опытных групп зафиксировано статистически значимое увеличение RR. Потребление кислорода демонстрировало зависимость от дозы и времени экспозиции (двухфакторный дисперсионный анализ, ANOVA).

После 24 ч воздействия средние значения RR при концентрациях 2 мкг/мл и 20 мкг/мл увеличились на 227% и 182% соответственно, после 48 ч — на 275% и 262% для 200 мкг/мл. Максимальные значения RR зафиксированы у устриц, инкубируемых в течение 24 ч к экстракту в концентрации 200 мкг/мл.

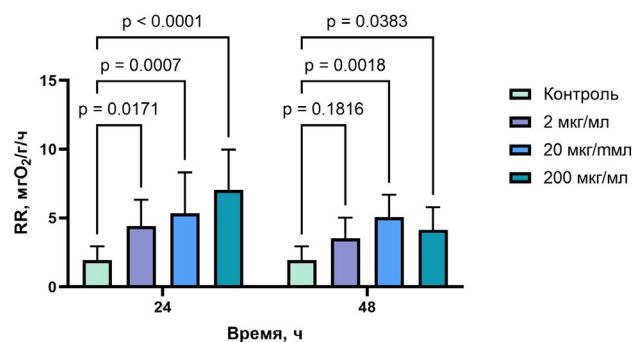


Рис.2. Интенсивность дыхания (мг O_2 /г/ч) устриц *M. gigas* при воздействии различных концентраций водного экстракта ФБП. Скобки указывают достоверные различия между группами. Столбцы показывают стандартные ошибки среднего для 10 особей. (двухфакторный ANOVA, $p < 0,05$).

3.2. Клеточный состав гемолимфы

На основе относительного размера (прямое светорассеяние (FSC) и гранулярность (прямое светорассеяние (FSC)) было идентифицировано три морфологически различные популяции клеток (агранулоциты, гиалиноциты и гранулоциты) (Andreyeva et al., 2021a, Рис. 1). Гранулоциты составляли основную долю гемоцитов в гемолимфе устриц — 50–65% от общего количества клеток. Гиалиноциты и агранулоциты представляли 18–33% и 16–18% циркулирующих гемоцитов соответственно. После 48-часовой экспозиции с экстрактом ФБП (20 мкг/мл) относительное содержание гранулоцитов у устриц снизилось (Рис. 3в). Одновременно наблюдалось значительное увеличение доли гиалиноцитов (Рис. 3б). Высокая концентрация экстракта вызвала уменьшение количества гранулоцитов и увеличение обеих агранулярных форм (агранулоцитов и гиалиноцитов) в гемолимфе.

3.3. Метаболическая активность

Метаболическая активность гемоцитов устриц достоверно снижалась после воздействия высоких концентраций экстракта ФБП (200 мкг/мл) в течение 24-48 часов по сравнению с контрольной группой. Также через 48 часов экспозиции с экстрактом в концентрации 20 мкг/мл наблюдалось статистически значимое снижение флуоресценции FDA ($p < 0,05$, Рис. 4).

3.4. Апоптоз

Согласно полученным данным, присутствие экстракта ФБП в воде в течение 24-48 ч не приводило к индукции апоптоза в гемоцитах устриц. Различия в интенсивности флуоресценции клеток между контрольной и опытной группами были недостоверны и носили характер тенденции (Рис. 5).

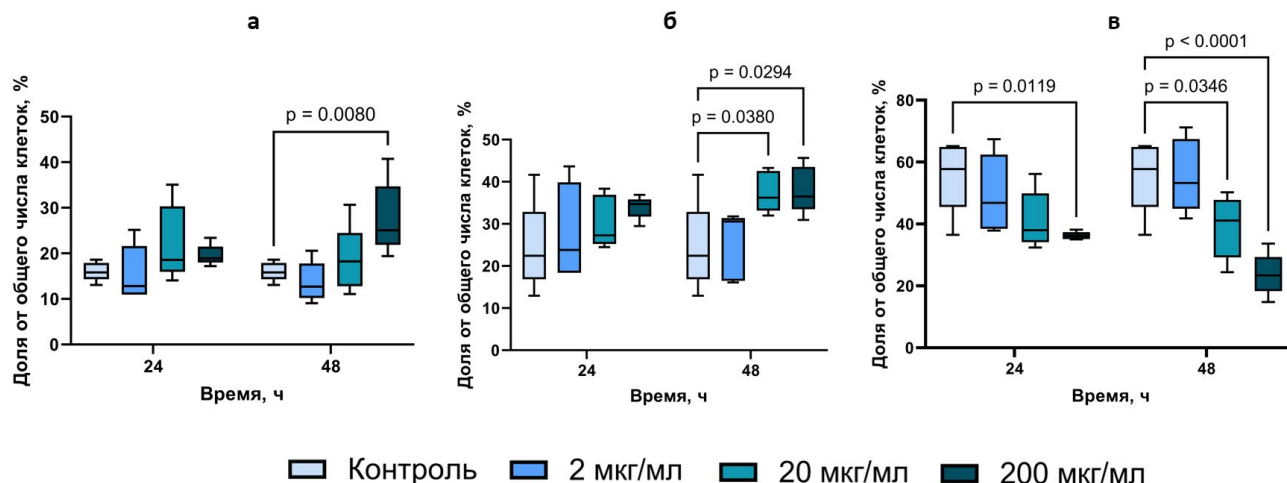


Рис.3. Процент агранулоцитов (а), гиалиноцитов (б) и гранулоцитов (в) (среднее $\pm$ S.E.) в гемолимфе *M. gigas* при воздействии различных концентраций водного экстракта ФБП. Скобки показывают различия между субпопуляциями гемоцитов внутри каждого столбца (двухфакторный дисперсионный анализ, $p < 0,05$, $n = 10$).

4. Обсуждение

В результате экспериментов установлено, что экстракт ФБП оказывает влияние на функциональное состояние организма взрослых устриц *M. gigas*. При этом ни одна из выбранных концентраций экстракта не приводила к гибели взрослых устриц в течение всего периода эксперимента. Согласно полученным данным, интенсивность дыхания устриц возрастала при инкубации с водным экстрактом ФБП. Учитывая особенности типа питания, интенсивность дыхания двустворчатых моллюсков пропорциональна их фильтрационной активности (Sobral and Widdows, 1997). Показано, что различные типы кормовых добавок могут влиять на уровень потребления кислорода морскими организмами (Bayne and Newell, 1983; Dawood et al., 2018; Shi et al., 2023). Хотя в данном эксперименте мы не оценивали фильтрационную активность устриц, можно предположить, что наблюдаемое увеличение интенсивности дыхания (RR) во всех опытных группах согласуется с этими исследованиями и свидетельствует об активном потреблении экстракта устрицами. Хотя спирулина не является пищевым объектом для гигантской устрицы, данная цианобактерия широко применяется в качестве кормовой добавки или основы кормовых смесей для многих видов гидробионтов, включая промысловые виды беспозвоночных животных (Ragaza et al., 2020; Alagawany et al., 2021). Кроме того, микроскопическое исследование гемоцитов устриц, подвергшихся воздействию различных концентраций экстракта, показало, что гемоциты активно поглощали частицы экстракта (Рис. 6). Помимо участия в иммунной системе, гемоциты двустворчатых моллюсков также играют важную роль в процессе питания и переносе питательных веществ в организме (Huiping, 2021; De la Ballina et al., 2022).

С другой стороны, ряд исследователей рассматривает повышение потребления кислорода как маркер стрессового состояния при воздействии экотоксикантов (Sokolova, 2004; Kamermans and Saure,

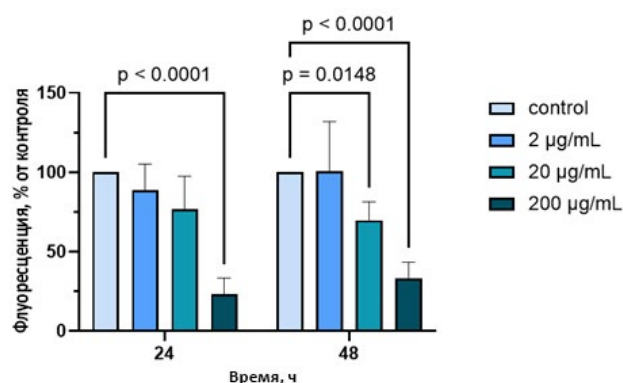


Рис.4. Влияние водного экстракта ФБП на метаболическую активность гемоцитов устриц *M. gigas*. Столбцы представляют стандартные ошибки среднего значения для 10 особей. Скобки показывают различия между субпопуляциями гемоцитов внутри каждого столбца (двухфакторный дисперсионный анализ, $p < 0,05$, $n = 10$).

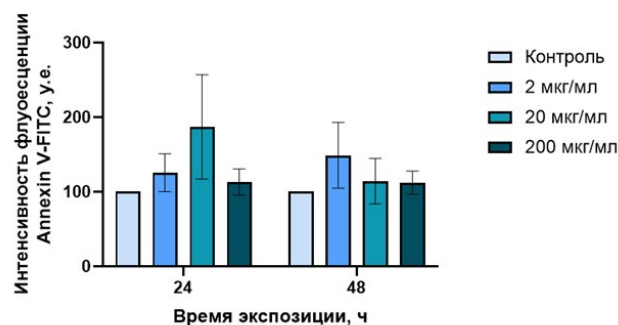


Рис.5. Уровень апоптоза в гемоцитах устриц *M. gigas* при инкубации с водным экстрактом ФБП.



Рис.6. Гемоциты *M.gigas* фагоцитируют частицы взвеси экстракта ФБП. Стрелки показывают частицы экстракта.

2022). Однако 100%-ная выживаемость устриц в ходе эксперимента позволяет предположить, что наблюдаемое увеличение частоты дыхания (RR) свидетельствует об усиленном потреблении экстракта. Таким образом, на основании полученных результатов и обнаружения ФБП в гемоцитах можно сделать вывод, что резкое увеличение RR после воздействия водного экстракта связано с активизацией фильтрационной активности устриц. Данная активизация произошла вследствие наличия взвешенных органических частиц в воде.

Результаты настоящего исследования также продемонстрировали низкую цитотоксичность водного экстракта ФБП в отношении клеток гемолимфы устриц. При этом экспозиция со средними и высокими концентрациями экстракта (20-200 мкг/мл) в течение 48 часов вызывала значительные изменения клеточного состава гемолимфы. Уменьшение доли гранулоцитов сопровождалось увеличением относительного количества агранулоцитов и гиалиноцитов. Известно, что колебания условий внешней среды могут приводить к существенным изменениям клеточного состава гемолимфы двустворчатых моллюсков (Matozzo and Marin, 2011; Andreyeva et al., 2021a; 2021b; 2024). Колебания клеточного состава гемолимфы моллюсков под действием факторов среды различной природы могут возникать вследствие изменения гемопоэтической активности в кроветворных органах, увеличения смертности отдельных типов гемоцитов, или общей смертности клеток вследствие интоксикации, миграции гемоцитов из гемолимфы в ткани (Song et al., 2010). Учитывая непродолжительность эксперимента (24-48 часов), наблюдаемые изменения вряд ли связаны с гемопоэзом (Jemaà et al., 2014). Гибель клеток также маловероятна, так как не было зафиксировано значительного увеличения доли апоптотических гемоцитов. Скорее всего, снижение количества гранулоцитов в гемолимфе объясняется их миграцией в ткани, что согласуется с современными представлениями об их высокой мобильности как основных иммунных эффекторных клеток (Huang et al., 2018; Gerdol et al., 2018). В отношении снижения процента гранулоцитов в гемолимфе устриц, подвергшихся воздействию высоких концентраций экстракта (200 мкг/мл), вероятно, что чрезмерные концентрации ФБП усилили фильтрационное питание и миграцию гемоцитов в мантию и жабры из-за накопления микрочастиц спироурины в этих областях.

В данном исследовании было установлено, что метаболическая активность гемоцитов снижается при введении высоких концентраций экстракта, что показано на Рис. 4. Значительная потеря флуоресценции FDA наблюдалась спустя 24 часа воздействия 200 мкг/мл экстракта, а также после 48 часов воздействия в диапазоне концентраций от 20 до 200 мкг/мл. Цитоплазматические неспецифические эстеразы играют роль в процессе внутриклеточного уничтожения чужеродных агентов гемоцитами (Beckmann et al., 1992; Renault, 2015). Таким образом, можно предположить, что избыточное количество водного экстракта ФБП снижало уровень метаболической активности гемоцитов за счет подавления этих клеточных иммунных механизмов. Снижение флуоресценции FDA в гемоцитах, подвергшихся воздействию более высоких концентраций экстракта, может быть связано с общей блокировкой уничтожения патогенов и подавлением клеточного иммунитета у этих клеток. Аналогичные нарушения в функции гемоцитов, включая снижение их метаболической активности и накопление маркеров клеточного повреждения (апоптоза), наблюдались в гемоцитах *M. gigas* после воздействия различных органических загрязнителей (инсектициды, полициклические ароматические углеводороды et al.) (Gagnaire et al., 2006; Chong, 2022; Alesci et al., 2023). Сопоставив эти результаты с полученными в настоящем исследовании, можно заключить, что высокие концентрации водного экстракта ФБП (200 мкг/мл) не вызывали апоптоз в гемоцитах устриц. Таким образом, можно сделать вывод, что водный экстракт ФБП обладает относительно низкой цитотоксичностью по отношению к гемоцитам устриц, однако высокие концентрации (200 мкг/мл) являются избыточными и могут снижать общий оздоровительный эффект при использовании в условиях устричных питомников.

Таким образом, результаты данного исследования показывают, что водный экстракт ФБП безопасен для взрослых устриц, так как признаки апоптоза в гемолимфе всех экспериментальных групп не выявлены, а общая выживаемость сохранялась на протяжении 48 часов. Скорость дыхания у устриц увеличивалась по мере роста концентрации ФБП в воде. Однако высокие концентрации экстракта (200 мкг/мл) подавляли метаболическую активность гемоцитов устриц и снижали процент гранулоцитов — основных иммунных эффекторных клеток — в гемолимфе после 24–48 часов воздействия. Поэтому

в будущих исследованиях рекомендуется использовать концентрации ниже 200 мкг/мл, чтобы избежать неблагоприятного воздействия на организм устриц. Это предварительное исследование является первым в своём роде и открывает новую перспективу потенциального применения водного экстракта ФБП из *A. platensis* в качестве пищевой добавки для повышения устойчивости устриц к заболеваниям и улучшения их общего состояния. Необходима дальнейшая оценка прямого воздействия экстракта на устриц для существенного повышения эффективности подготовки устриц в инкубаторах и его применения в аквакультуре.

Благодарности

Настоящее исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РНФ № 24-16-00245 «Оценка иммуномодулирующих и антиоксидантных свойств водного экстракта фикобилипротеинов (С-фикоцианин, В-фикоэритрин) — перспективной кормовой добавки для гигантской устрицы *Magallana gigas*».

Работа проведена в Центре коллективного пользования «Спектрометрия и хроматография» ФИЦ ИнБЮМ.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

Стадничук И.Н. 1990. Фикобилипротеины. Москва: Мир.

Ahmed R.A., Jastaniah S.D., Alaidaroos B.A. et al. 2025. Effects of dietary *Spirulina platensis* supplementation on growth performance, whole body composition, antioxidant activity, histological alterations, and resistance to *Vibrio parahaemolyticus* in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Reports* 40: 102606. DOI: [10.1016/j.aqrep.2024.102606](https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2024.102606)

Alagawany M., Taha A.E., Noreldin A. et al. 2021. Nutritional applications of species of *Spirulina* and *Chlorella* in farmed fish: A review. *Aquaculture* 542: 736841. DOI: [10.1016/j.aquaculture.2021.736841](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736841)

Alesci A., Di Paola D., Fumia A. et al. 2023. Internal defense system of *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819): Ecological Role of Hemocytes as Biomarkers for Thiacloprid and Benzo[a]Pyrene Pollution. *Toxics* 11(9): 731. DOI: [10.3390/toxics11090731](https://doi.org/10.3390/toxics11090731)

Andreyeva A.Y., Kladchenko E.S., Vyalova O.Y. et al. 2021. Functional characterization of the Pacific Oyster, *Crassostrea gigas* (Bivalvia: Ostreidae), hemocytes under normoxia and short-term hypoxia. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 21(3): 125-133. DOI: [10.4194/1303-2712-v21_3_03](https://doi.org/10.4194/1303-2712-v21_3_03)

Andreyeva A.Y., Kladchenko E.S., Kukhareva T.A. 2021. Shift in functional and morphological parameters of the Pacific oyster hemocytes after exposure to hypoxia. *Regional Studies in Marine Science* 48: 102062. DOI: [10.1016/j.rsma.2021.102062](https://doi.org/10.1016/j.rsma.2021.102062)

Andreyeva A.Y., Kukhareva T.A., Gostyukhina O.L. et al. 2024. Impacts of ocean acidification and hypoxia on cellular immunity, oxygen consumption and antioxidant status

in Mediterranean mussel. *Fish & Shellfish Immunology* 154: 109932. DOI: [10.1016/j.fsi.2024.109932](https://doi.org/10.1016/j.fsi.2024.109932)

Arney B., Liu W., Forster I.P. et al. 2015. Feasibility of dietary substitution of live microalgae with spray-dried *Schizochytrium* sp. or *Spirulina* in the hatchery culture of juveniles of the Pacific geoduck clam (*Panopea generosa*). *Aquaculture* 444: 117-133. DOI: [10.1016/j.aquaculture.2015.02.014](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.02.014)

Asrami M., Sudagar M., Shahraki N. et al. 2019. Effect of extracted phycocyanin from *Spirulina platensis* on growth parameters, colorations, digestive enzymes and body chemical compositions of Guppy fish (*Poecilia reticulata*). *Journal of Survey in Fisheries Sciences* 6: 21-34. DOI: [10.18331/SFS2019.6.1.1](https://doi.org/10.18331/SFS2019.6.1.1)

Bayne B.L., Newell R.C. 1983. Physiological energetics of marine molluscs. *The Mollusca* 4: 407-515. DOI: [10.1016/B978-0-12-751404-8.50017-7](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-751404-8.50017-7)

Beckmann N., Morse M.P., Moore C.M. 1992. Comparative study of phagocytosis in normal and diseased hemocytes of the bivalve mollusc *Mya arenaria*. *Journal of Invertebrate Pathology* 59(2): 124-132. DOI: [10.1016/0022-2011\(92\)90022-V](https://doi.org/10.1016/0022-2011(92)90022-V)

Cardoso L.G., Lemos P.V.F., de Souza C.O. et al. 2022. Current advances in phytoremediation and biochemical composition of *Arthrospira* (*Spirulina*) grown in aquaculture wastewater. *Aquaculture Research* 53(14): 4931-4943. DOI: [10.1111/are.15996](https://doi.org/10.1111/are.15996)

Chen J.H., Bayne C.J. 1995. Bivalve mollusc hemocyte behaviors: characterization of hemocyte aggregation and adhesion and their inhibition in the California mussel (*Mytilus californianus*). *The Biological Bulletin* 188(3): 255-266. DOI: [10.2307/1542303](https://doi.org/10.2307/1542303)

Chen H.W., Yang T.S., Chen M.J. et al. 2014. Purification and immunomodulating activity of C-phycocyanin from *Spirulina platensis* cultured using power plant flue gas. *Process Biochemistry* 49(8): 1337-1344. DOI: [10.1016/j.procbio.2014.05.006](https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.05.006)

Chong R.S.M. 2022. Molluscan immunology. *Aquaculture Pathophysiology* 57: 383-392. DOI: [10.1016/B978-0-323-95434-1.00057-7](https://doi.org/10.1016/B978-0-323-95434-1.00057-7)

Citarasu T. 2010. Herbal biomedicines: a new opportunity for aquaculture industry. *Aquaculture International* 18(3): 403-414. DOI: [10.1007/s10499-009-9253-7](https://doi.org/10.1007/s10499-009-9253-7)

Dawood M.A., Koshio S., Esteban M.A. 2018. Beneficial roles of feed additives as immunostimulants in aquaculture: a review. *Reviews in Aquaculture* 10(4): 950-974. DOI: [10.1111/raq.12209](https://doi.org/10.1111/raq.12209)

De la Ballina N.R., Maresca F., Cao A. et al. 2022. Bivalve haemocyte subpopulations: a review. *Frontiers in immunology* 13: 826255. DOI: [10.3389/fimmu.2022.826255](https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.826255)

Elumalai P., Kurian A., Lakshmi S. et al. 2020. Herbal immunomodulators in aquaculture. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture* 29(1): 33-57. DOI: [10.1080/23308249.2020.1779651](https://doi.org/10.1080/23308249.2020.1779651)

Finamore A., Palmery M., Bensehaila S. et al. 2017. Antioxidant, immunomodulating, and microbial-modulating activities of the sustainable and ecofriendly spirulina. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2017(1): 3247528. DOI: [10.1155/2017/3247528](https://doi.org/10.1155/2017/3247528)

Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2020. The state of world fisheries and aquaculture 2020: Sustainability in action. Rome: FAO.

Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2024. The state of world fisheries and aquaculture 2024: Blue transformation in action. Rome: FAO.

Gagnaire B., Thomas-Guyon H., Burgeot T. et al. 2006. Pollutant effects on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), hemocytes: screening of 23 molecules using flow cytometry. *Cell biology and toxicology* 22(1): 1-14. DOI: [10.1007/s10565-006-0011-6](https://doi.org/10.1007/s10565-006-0011-6)

- Gerdol M., Gomez-Chiarri M., Castillo M.G. et al. 2018. Immunity in molluscs: recognition and effector mechanisms, with a focus on bivalvia. In: Edwin L.(Ed.), *Advances in Comparative Immunology*. Springer Cham, pp. 225-341. DOI: [10.1007/978-3-319-76768-0_11](https://doi.org/10.1007/978-3-319-76768-0_11)
- Huang J., Li S., Liu Y. et al. 2018. Hemocytes in the extrapallial space of *Pinctada fucata* are involved in immunity and biomineralization. *Scientific Reports* 8(1): 4657. DOI: [10.1038/s41598-018-22961-y](https://doi.org/10.1038/s41598-018-22961-y)
- Huiping Y. 2021. Immunological assays of hemocytes in molluscan bivalves as biomarkers to evaluate stresses for aquaculture. In: *Proceedings of the 47th UJNR. Bulletin of Japan Fisheries Research and Education Agency*, pp. 31-45.
- Jemaà M., Morin N., Cavelier P. et al. 2014. Adult somatic progenitor cells and hematopoiesis in oysters. *Journal of Experimental Biology* 217(17): 3067-3077. DOI: [10.1242/jeb.106575](https://doi.org/10.1242/jeb.106575)
- Kamermans P., Saure C. 2022. Interacting climate change effects on mussels (*Mytilus edulis* and *M. galloprovincialis*) and oysters (*Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis*): experiments for bivalve individual growth models. *Aquatic Living Resources* 35: 1. DOI: [10.1051/alr/2022001](https://doi.org/10.1051/alr/2022001)
- Kolonchin K.V., Truba M.A., Kuzicheva N.Y. 2023. Trends in the development of aquaculture in Russia: prospects for qualitative improvement of food security and sustainable growth of the industry's economic potential. *Food policy and security* 10(3): 533-546. DOI: [10.18334/ppib.10.3.118265](https://doi.org/10.18334/ppib.10.3.118265)
- Lisitskaya E.V., Shchurov S.V. 2024. The first record of larval *Crassostrea gigas* (Thunberg 1793) (Bivalvia, Ostreidae) from the Black Sea. *Biology Bulletin* 51(9): 2688-2692. DOI: [10.1134/S1062359024701516](https://doi.org/10.1134/S1062359024701516)
- Matozzo V., Marin M.G. 2011. Bivalve immune responses and climate changes: is there a relationship?. *Invertebrate Survival Journal* 8(1): 70-77.
- Muchtar M., Sukenda S., Nuryati S. et al. 2019. The use of immunostimulant from phycocyanin of *Spirulina platensis* to control motile aeromonad septicaemia (MAS) disease in common carp *Cyprinus carpio*. *Jurnal Akuakultur Indonesia* 18(1): 101-109. DOI: [10.19027/jai.18.1.101-109](https://doi.org/10.19027/jai.18.1.101-109)
- Prates J.A. 2025. Applications of Bioactive Compounds from Marine Microalgae in Health, Cosmetics, and Functional Foods. *Applied Sciences* 15(11): 6144. DOI: [10.3390/app15116144](https://doi.org/10.3390/app15116144)
- Ragaza J.A., Hossain M.S., Meiler K.A. et al. 2020. A review on *Spirulina*: alternative media for cultivation and nutritive value as an aquafeed. *Reviews in Aquaculture* 12(4): 2371-2395. DOI: [10.1111/raq.12439](https://doi.org/10.1111/raq.12439)
- Renault T. 2015. Immunotoxicological effects of environmental contaminants on marine bivalves. *Fish & Shellfish Immunology* 46(1): 88-93. DOI: [10.1016/j.fsi.2015.04.011](https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.04.011)
- Ringø E. 2020. Probiotics in shellfish aquaculture. *Aquaculture and Fisheries* 5(1): 1-27. DOI: [10.1016/j.aaf.2019.12.001](https://doi.org/10.1016/j.aaf.2019.12.001)
- Shi X., Jia Y., Zhang Z. et al. 2023. The effects of Chinese herbal feed additives on physiological health and detoxification ability in the red claw crayfish, *Cherax quadricarinatus*, and evaluation of their safety. *Aquaculture* 569: 739394. DOI: [10.1016/j.aquaculture.2023.739394](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2023.739394)
- Sobral P., Widdows J. 1997. Influence of hypoxia and anoxia on the physiological responses of the clam *Ruditapes decussatus* from southern Portugal. *Marine Biology* 127: 455-461. DOI: [10.1007/s002270050033](https://doi.org/10.1007/s002270050033)
- Sokolova I.M. 2004. Cadmium effects on mitochondrial function are enhanced by elevated temperatures in a marine poikilotherm, *Crassostrea virginica* Gmelin (Bivalvia: Ostreidae). *Journal of Experimental Biology* 207(15): 2639-2648. DOI: [10.1242/jeb.01054](https://doi.org/10.1242/jeb.01054)
- Song L., Wang L., Qiu L. et al. 2010. Bivalve immunity. *Advances in experimental medicine and biology* 708: 44-65. DOI: [10.1007/978-1-4419-8059-5_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-8059-5_3)
- Soni B., Visavadiya N.P., Dalwadi N. et al. 2010. Purified c-phycoerythrin: safety studies in rats and protective role against permanganate-mediated fibroblast-DNA damage. *Journal of Applied Toxicology* 30: 542-550. DOI: [10.1002/jat.1524](https://doi.org/10.1002/jat.1524)
- Vijayaram S., Sun Y.Z., Zuurro A. et al. 2022. Bioactive immunostimulants as health-promoting feed additives in aquaculture: A review. *Fish & Shellfish Immunology* 130: 294-308. DOI: [10.1016/j.fsi.2022.09.011](https://doi.org/10.1016/j.fsi.2022.09.011)
- Willerd.F., Furse.S., Aldridge.D.C. 2020. Microencapsulated algal feeds as a sustainable replacement diet for broodstock in commercial bivalve aquaculture. *Scientific Reports* 10(1): 12577. DOI: [10.1038/s41598-020-69645-0](https://doi.org/10.1038/s41598-020-69645-0)
- Xian J.A., Zheng P.H., Lu Y.P. et al. 2021. Flow cytometric analysis of morphologic and immunological characterisation of the tiger shrimp *Penaeus monodon* haemocytes. *Aquaculture Reports* 20: 100748. DOI: [10.1016/j.aqrep.2021.100748](https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2021.100748)
- Yusoff F.M., Banerjee S., Nagao N. et al. 2020. Use of microalgae pigments in aquaculture. In: Jacob-Lopes E. et al. (Eds.), *Pigments from Microalgae Handbook*. Springer Cham, pp. 471-513. DOI: [10.1007/978-3-030-50971-2_19](https://doi.org/10.1007/978-3-030-50971-2_19)