

高溫緊迫對文蛤血淋巴液中血糖與免疫因子的影響

許晉榮¹·謝淑秋²·黃文彬^{3*}

¹行政院農業委員會水產試驗所水產養殖組

²行政院農業委員會水產試驗所海水繁養殖研究中心

³國立東華大學自然資源與環境學系

摘要

溫度變動所造成的環境緊迫經常是造成文蛤 (*Meretrix lusoria*) 大量死亡的重要因子，本研究主在調查高溫緊迫對文蛤血淋巴液中生理與免疫因子的影響。在高溫緊迫中，文蛤由 29 °C 常溫海水中改置 36 °C 一天後，再改置 40 °C 一天，之後再回復到 29 °C 常溫。我們在文蛤蓄養於常溫、36 °C、40 °C 及恢復常溫各一天後採樣。結果顯示，文蛤總血球數及血淋巴液中的蛋白質、血糖與酸性磷酸酶活性都會隨著溫度上升而升高，但都在恢復常溫後逐漸下降，接近起始值；持續一天的 40 °C 高溫，會造成文蛤死亡。總結上述，我們認為短期的高溫可能會誘導文蛤的緊迫反應及促進免疫力上升，但文蛤無法忍受 40 °C 以上的高溫，這樣的緊迫可能因破壞文蛤體內的平衡而造成其死亡。

關鍵詞：文蛤、緊迫、免疫

前言

文蛤 (*Meretrix lusoria*) 在臺灣是很重要的雙殼貝養殖物種 (Chen, 1984)，牠是沙岸的底棲生物，棲息區域由潮間帶到水深 20 m，適合棲息環境的含沙率為 50 - 90%，又以 60 - 80% 最適 (巫與劉, 1989)。文蛤是廣鹽、溫性貝類，成長之鹽度範圍在 10 - 45 ppt，以 25 ppt 較佳；溫度則可在 3 - 39 °C，但在 25 - 32 °C 的成長速率較快 (Jeng and Tyan, 1982; Chen, 1984; 何, 2001)。牠的養殖方式分半淡鹹水與純海水養殖兩種，北從淡水河口，南至台南，目前以雲林、台南、嘉義、彰化四縣產量較大。

臺灣西南沿海自民國 58 年以來，文蛤養殖就經常發生大量異常死亡現象，特別是 3、6、9 月份 (何, 2005)。其原因據推測與養殖環境溫、鹽度異常、水質及底棲環境惡劣、疾病、養殖密度過高、生殖週期、廢排水汙染等有關 (巫與劉, 1989; 何,

2001, 2005; 黃等, 2004; 周及葉, 2013)。目前學者們多半同意，造成死亡原因往往不是單一因子所造成，而是多因子共同作用所致，例如重金屬汙染及溫度改變就會影響病毒對文蛤的免疫力與抵抗力 (Chou *et al.*, 1994, 1998; Liao *et al.*, 2006; 王等, 2010)，也會影響牠在不同鹽度下的存活率 (Chin and Chen, 1993)；或者因為生殖過後，身體虛弱，免疫力下降，也容易受到病菌的感染 (何, 2005; 宋等, 2007)。由此看來，環境緊迫與生理狀況的改變都可能降低文蛤的免疫力，進而影響牠的成長與存活。

文蛤是軟體動物 (mollusk)，並沒有真正的抗體及特異性免疫系統，但是經由非特異性免疫系統的作用，牠仍有能力產生抗病力去對抗外來病菌或原生動物的入侵 (Bachère *et al.*, 1995; Söderhäll and Cerenius, 1998; 劉及麥, 2003; 劉等, 2003; 吳等, 2016)。文蛤的非特異性免疫系統包括細胞免疫及體液免疫兩部份：細胞免疫指的是血淋巴細胞 (hemocyte)，在文蛤，目前利用光學、電子顯微鏡、染色及流式細胞儀 (flow-cytometry) 等方法，大體上仍可分為顆粒細胞 (granulocyte)

*通訊作者 / 花蓮縣壽豐鄉志學村大學路二段 1 號, TEL: (03) 8635191; E-mail: bruce@mail.ndhu.edu.tw

及透明細胞 (hyalinocyte) 兩大類, 之後可因大小及染色差異再細分不同亞群 (Chang *et al.*, 2005; Tu *et al.*, 2007; 洪等, 2011; 張等, 2016)。血淋巴細胞參與了貝類體內的傷口修復、吞噬、呼吸爆發、炎症等反應。體液免疫則指經由刺激血細胞產生種種水解酶 (hydrolase)、抗菌肽 (antimicrobial peptide)、凝集素 (agglutinin) 等所產生的各種抗病效果, 其中很多是由血淋巴細胞所產生釋放的, 所以其產生的免疫防禦也是與細胞免疫彼此聯繫的 (Bachère *et al.*, 1995; 孫與李, 2001; 劉等, 2003; 劉與麥, 2003; 吳等, 2016)。因此總血球數 (total hemocyte count, THC) 的多寡經常被用來顯示貝類的免疫力與健康狀況 (Bachère *et al.*, 1995; 劉與麥, 2003; Hooper *et al.*, 2007; 張等, 2016)。而一些水解酶, 例如酸性 (acid phosphatase, ACP)、鹼性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP), 不僅可在血球細胞的溶小體內水解物質, 也可以釋放到血漿中, 在細胞吞噬外來物前就將其部分水解 (劉等, 2003)。超氧歧化酶 (superoxide dimutase, SOD) 則除了做為活性氧清除劑參與清除體內自由基 O_2 和 H_2O_2 , 以消除 O_2 等的中間產物對細胞的危害, 也能增強吞噬細胞的防禦能力和機體的免疫功能 (劉等, 2003)。

由以往的研究看來, 對於環境緊迫對本土文蛤生理、免疫影響較多集中在重金屬方面 (e.g., Chou *et al.*, 1994, 1998; Chen, 1995; Chang *et al.*, 2007), 其他的環境因子所造成的研究相對地較少。這幾年由於極端氣候的頻繁發生, 水質酸化的問題也開始被注意, 因此生態環境的變化對於貝類的生理、免疫影響近來一直都是被探討的問題 (Byrne, 2011; 許等, 2012; Matozzo, 2016)。據何 (2001) 的研究顯示, 文蛤在面對高溫降至低溫或高鹽降至低鹽時, 較易適應; 但在相反的溫、鹽變化, 或反覆變化, 則較易使文蛤死亡。因此本研究擬以夏天產生的高溫緊迫對文蛤存活狀況及血淋巴液中的生理與免疫因子之變動進行研究, 藉以提供相關資訊, 以供學、業界參考。

材料與方法

實驗文蛤共 36 個, 體重 36.25 ± 1.22 g (Mean \pm

SEM)。文蛤先培養於室外池, 正常餵食, 實驗前文蛤由室外移入室內養殖池禁食 2 天, 水溫 $28.5 - 29.5^\circ\text{C}$, 鹽度 28 psu。實驗開始時將 12 個文蛤分別放入 25 L 小水桶內, 共三重覆 (區集 I、II、III), 再將 3 個小水桶置於一 150 L 大水桶內, 桶內放加熱棒一支, 進行溫度調控, 小水桶內有進行打氣。採樣分四個溫度處理點, 每個溫度點分別自 3 個小水桶 (I、II、III) 中隨機取樣 3 個文蛤。溫度處理方法分為: (1) 常溫處理組 (C): 文蛤放入小水桶後, 在常溫狀態下 (29°C) 蓄養 1 天後取樣, 取樣完後將溫度加熱至 36°C (約 1 hr); (2) 36°C 處理組 (36C): 蓄養在 36°C 1 天後取樣, 取樣完後再加熱至 40°C (約 1 hr); (3) 40°C 處理組 (40C): 蓄養在 40°C 1 天後取樣, 取樣完後即停止加熱, 使其自然回復至室溫; (4) 回復處理組 (Rec): 蓄養在停止加熱之水桶中 1 天後 (水溫約 29°C) 採樣。為避免小水桶內水質被文蛤新陳代謝所產生之代謝物質污染, 每次取樣完後, 會以同水溫之乾淨海水置換掉約一半之桶內水, 置換時緩慢進行, 以避免對桶內文蛤造成干擾。

血淋巴液抽取後, 先測定總血球數, 每個文蛤均採血, 取 0.2 ml 血淋巴液 + 0.8 ml 福馬林固定液保存及測量總血球數。總血球數於顯微鏡 (200 \times) 下使用血球計數盤計算, 雙重覆, 然後換算為 1 ml 血淋巴液的總血球數。剩下之血淋巴液在 4°C 下以 5,000 g, 離心 15 min 後, 取上清液, 冷凍於 -85°C 中, 待日後進行蛋白質、血糖、酸性磷酸酶、鹼性磷酸酶及超氧歧化酶活性的分析。

血淋巴中蛋白質是以蛋白質折射器 (Hand refractometer, Atago, Japan) 直接測定。血糖則是利用 oxidase method 分析, 抽取 15 μl 血淋巴液加入 glucose reagent 185 μl 均勻混合, 使其於 37°C 下作用 15 min 後, 使用分光光度計以波長 500 nm 測量其吸光值, 並與葡萄糖標準液所測量之值比對以推算血糖含量 (Randox, U.K.)。酸性、鹼性磷酸酶 (Human Gesellschaft für Biochemica und Diagnostica mbH, Germany) 及超氧歧化酶活性 (Randox, U.K.) 都是以商用測試套組測之。酸性磷酸酶是以 1-naphthyl phosphate 為受質, 水解生成之 1-naphthol 再與 4-chloro-2-methylphenyl diazonium salt 反應, 轉成 azo dye, 在 405 nm 下讀取, 測定其活性, 單位為 U/L。鹼性磷酸酶則利用 *p*-nitrophenylphosphate 當受質, 在 405 nm 下測

定 *p*-nitrophenol 的生成，酵素活性單位同樣為 U/L。超氧歧化酶的測試套組混合液 (mixed substrate) 中含有 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenol)-5-phenyltetrazolium chloride (INT) 及 xanthine，其中 xanthine 在加入 xanthine oxidase 作用後會產生超氧陰離子 (superoxide radical, O_2^-)，它會與 INT 快速生成 formazan dye，而超氧歧化酶則會與 INT 競爭超氧陰離子而抑制染劑的產生，經由分光光度計在 505 nm 下讀取此抑制反應程度，可測定酵素活性，活性單位為 U/mL。

為降低實驗各水桶水質差異 (區集) 可能會影響溫度緊迫對文蛤血淋巴生理及免疫因子的影響，並且考量回溫處理組中有一組死亡而無數據，因此本實驗採用不平衡資料之隨機完全區集設計 (randomized complete block design, RCBD)，並使用泛線性模式 (generalized linear model) 及 type III 變方分析表，來檢測處理組間之各指標差異。若達顯著水準 ($p < 0.05$)，則再以最小顯著差異測驗法 (least significant difference test, LSD) 進行多重差距檢定 (沈, 1995)。

結 果

在高溫實驗中，文蛤由常溫快速 (1 hr) 升到 36 °C，一天內並沒有任何文蛤死亡；但溫度上升到 40 °C 一天後，在回復至正常溫度 (29 °C) 過程中，三重覆中有一桶文蛤死亡，顯然在水溫 40 °C 的環境下，一天已足以危害文蛤的生存。

文蛤血淋巴液各項指標變動 Fig. 1、2 所示。在本實驗中，總血球數、血淋巴液中蛋白質與血糖含量及酸性磷酸酶活性都隨溫度上升而升高，特別是在 40 °C 時最高，經變方分析結果顯示，40 °C 處理組的數值均顯著 ($p < 0.05$) 高於 29 °C 常溫組，但這些免疫及緊迫指標都在回溫後逐漸下降，除血淋巴蛋白質仍高於常溫組外，其餘數值均接近起始常溫水平。超氧歧化酶與鹼性酸磷脂酶活性，在各組間均無顯著差異 ($p > 0.05$)。

討 論

本實驗結果顯示，40 °C 水溫對文蛤具有危害性，不僅可能造成血淋巴液指標，包括血糖與各種

免疫指標上升，可能會造成文蛤死亡。Chen (1984) 認為文蛤頗能耐高溫，至少到 37 °C 是沒有問題的。楊 (1981) 則是進行了更仔細的高溫實驗，他將文蛤置於不同溫度的水缸中 1 hr，再置回鋪有細沙的桶中，觀察其潛沙行為與存活狀態。他發現文蛤對 40 °C 以上的高溫相當敏感，在 44 °C 以上，處理 1 小時後即全部死亡，因此得出結論：39.3 °C 及 44.9 °C 之間對於文蛤是危害溫度，此與本研究結果相符。本實驗的文蛤持續處於 40 °C 高溫一天，即使回到正常溫度，仍然有出現死亡現象。文蛤一般是潛沙，水溫即使高達 40 °C 時，底棲沙溫可能還是略低，但若池水淺，沙溫在夏天中午時也會升高，40 °C 顯然是一個需要注意的極限溫度值。

高溫造成文蛤血淋巴液中蛋白質及血糖濃度的上升。蛋白質除了與能量代謝及儲存有關外，在某些染病的貝類血淋巴液中濃度經常會較高，此可能與貝類需要合成較高量的抗菌蛋白有關 (Ordás *et al.*, 2000)。在腹足類，如九孔，血淋巴液中蛋白質的升高主要是來自血青素 (hemocyanin) 的生成 (許, 2010)。血青素在甲殼類及貝類體內，除了與輸送氧氣、能量儲存、滲透壓維持有關外，最近被發現具有酚氧化酶活性和抗菌功能，也是重要的免疫因子 (Decker and Jaenicke, 2004; Siddiqui *et al.*, 2006; 彭與王, 2011)。不過血青素在雙殼類目前僅被發現在前鰓亞綱 (Subclass Protobrancia) (Mangum *et al.*, 1987; Lieb and Todt, 2008)，文蛤屬於異齒亞綱 (subclass Heterodonta)，這類的雙殼貝，尚未被發現具有血青素。本實驗中的文蛤蛋白質濃度也低於腹足類的九孔，約低 2 - 3 g/dL (許, 2010)。我們推測，在高溫時文蛤血淋巴液內的蛋白質濃度增高，除了可能與體內代謝失衡外，部分原因可能也是與免疫力有關。溫度升高會造成文蛤屬包括文蛤、皺勒文蛤 (*M. lyrata*) 及臺灣文蛤 (*M. meretrix*) 耗氧、排氨等代謝率的提高 (Lee *et al.*, 2005; Zhuang and Liu, 2006; 栗等, 2011)，因此血糖的升高可能是提供這些代謝所需的能量。而血糖的升高可能是因為高溫緊迫造成貝類體內生物胺 (biogenic amine) 含量升高，進而促進肝醣分解所致 (Malham *et al.*, 2003; Hopper *et al.*, 2007)。

文蛤的血淋巴球目前大體上仍是分為顆粒細胞及透明細胞兩大類 (Chang *et al.*, 2005; Tu *et al.*, 2007; 洪等, 2011; 張等, 2016)，Chang *et al.*

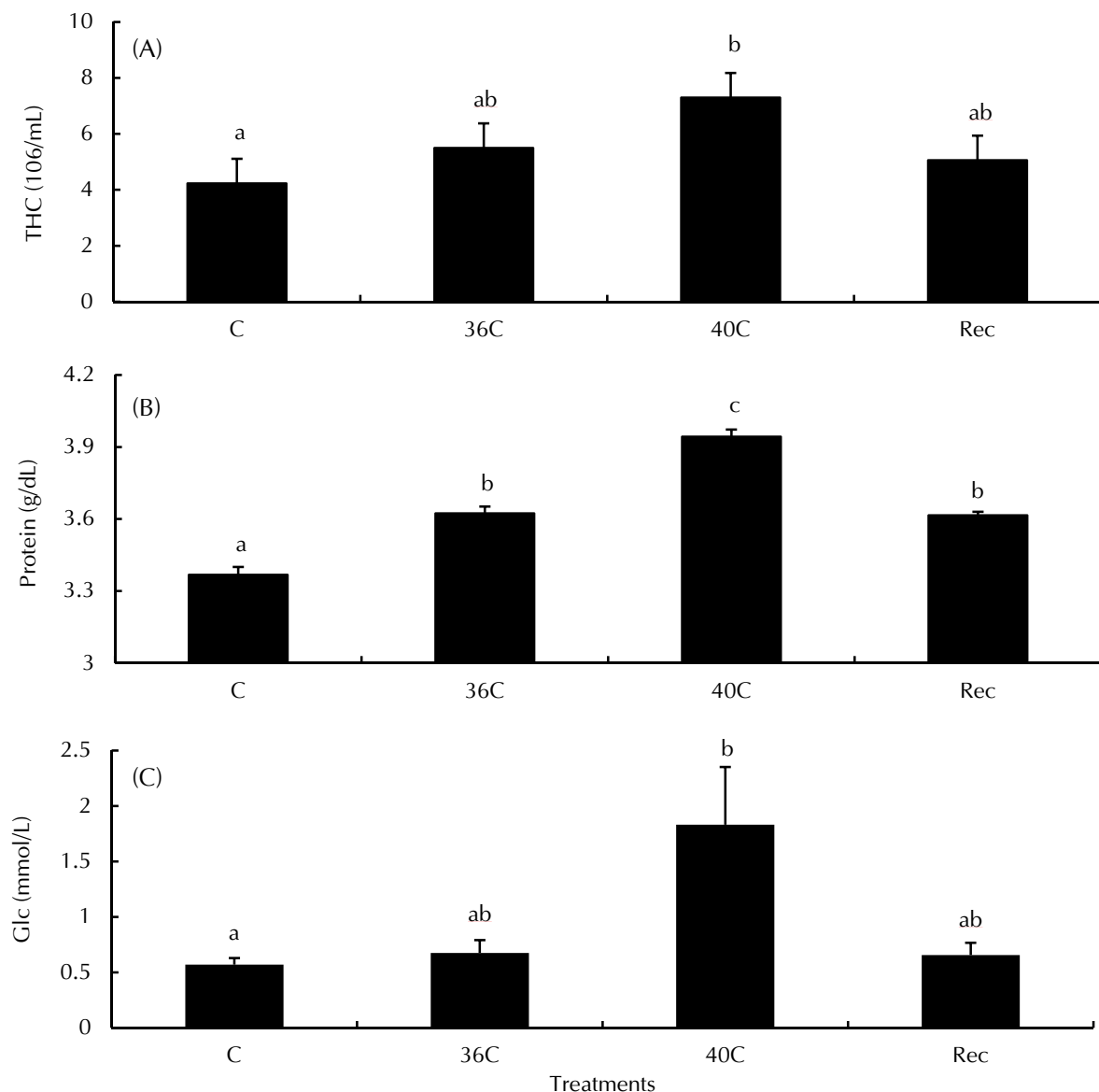


Fig. 1 Total hemocyte count (THC) (A) and concentrations of protein (B) and glucose (GLC) (C) in hemolymph of the hard clam (*Meretrix lusoria*) at different temperatures of sea water. C: control (29°C); 36°C: clams were exposed to water with a temperature of 36°C for 1 day; 40°C: clams were exposed to water with a temperature of 40°C for 1 day; Rec: clams were exposed to water with a temperature of 29°C for 1 day to recover from the exposure to the 40°C water. The values (mean \pm SEM) with different letters indicate significant differences ($p < 0.05$) among the treatments.

(2005) 與 Tu *et al.* (2007) 又依細胞大小，將顆粒細胞區分為大、小顆粒細胞。由 Tu *et al.* (2007) 及張等 (2016) 之研究顯示，顆粒細胞及透明細胞兩種細胞對弧菌或螢光乳球 (fluorescent latex bead) 與 zymosan 的吞噬力不同，其中均以顆粒細胞的吞噬力較強，顯示這兩種細胞在噬菌力上有所差異。本研究之血淋巴球是利用固定液固定，亦未染色，所以只計算總血球數。之前在多種貝類的實驗中都顯示溫度會影響總血球數的變化

(Cheng *et al.*, 2004; Yu *et al.*, 2009; 許, 2010; 許等, 2012; 吳等, 2016)，總血球數增減在貝類也經常被用來顯示免疫力的變化 (Bachère *et al.*, 1995; 劉與麥, 2003; Hooper *et al.*, 2007; 張等, 2016) 在本研究中，高溫緊迫會誘導文蛤的總血球數上升，一旦回溫，血球數隨即下降，此顯示高溫應該具有促進文蛤免疫力的效果。不過 Yu *et al.* (2009) 發現方形馬珂蛤 (*Macra veneriformis*) 暴露在高溫時，總血球數雖然會上升，但血球的噬菌力卻

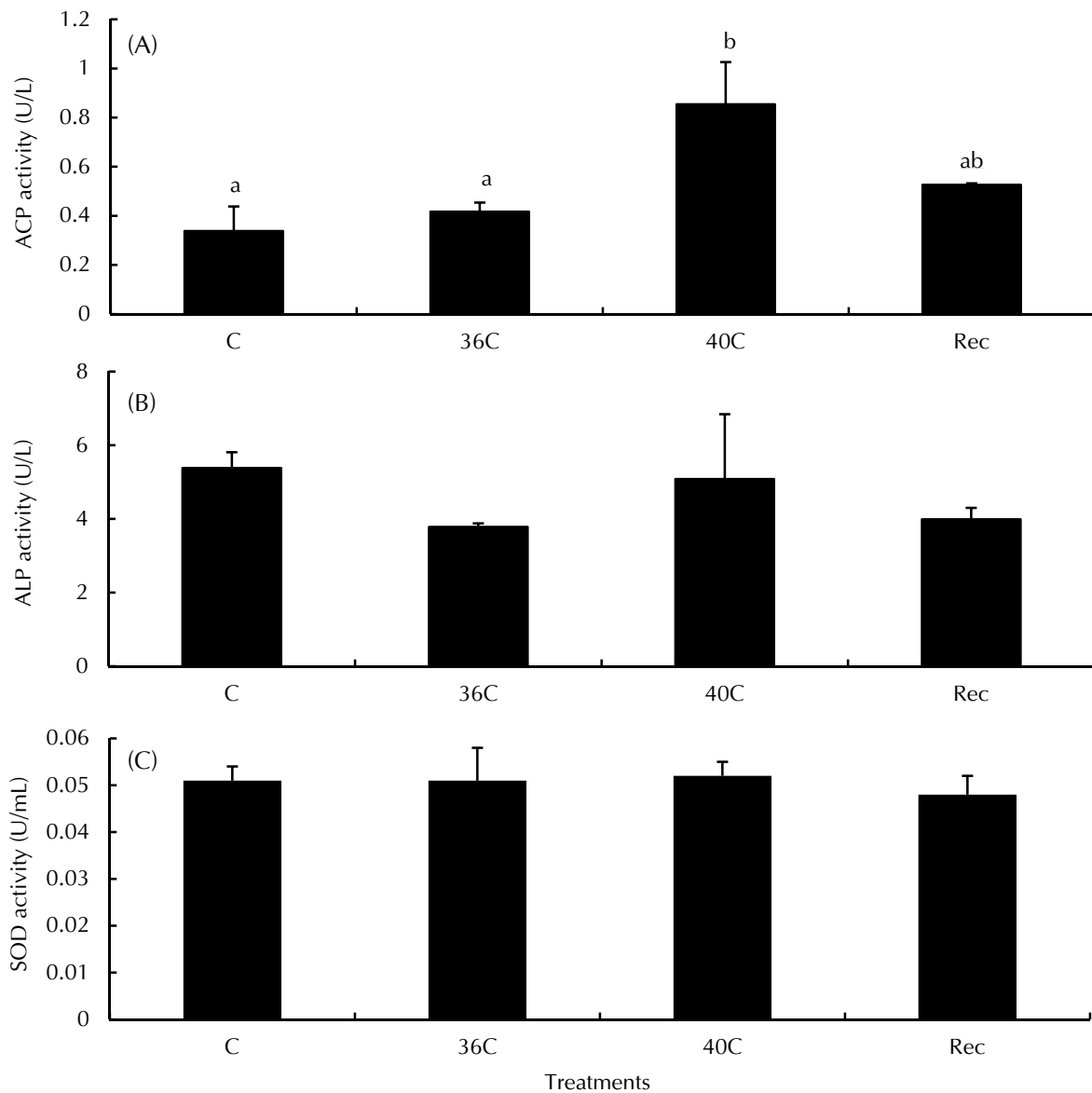


Fig. 2 Enzyme activities of acid phosphatase (ACP) (A), alkaline phosphatase (ALP) (B), and superoxide dismutase (SOD) (C) in the hemolymph of the hard clam in different temperatures of sea water. The treatments were the same as described in the Fig. 1 caption above. The values (mean \pm SEM) with different letters indicate significant differences ($p < 0.05$) among the treatments.

下降，免疫力並沒有因此上升。由於文蛤不同型態血球的免疫功能可能有所差異 (Chang *et al.*, 2005; Tu *et al.*, 2007; 張等, 2016)，因此我們也無法完全排除此一可能性。日後在研究文蛤在面臨不同形式的緊迫時，除了計數血球總數外，對於不同型態血球的分析、酚氧化酶 (phenoloxidase) 活性、血球細胞吞噬及清除能力等免疫因子應該也是必要的。

溫度變化也會影響貝類的體液免疫，造成血淋巴中水解酶或抗菌肽活性的變動 (孫與李,

2001; 劉等, 2003; 劉與麥, 2003; 吳等, 2016)。這些水解酶有些存在於貝類的血淋巴細胞的溶酶體 (lysosome) 中，但有些水解酶則不僅存在血淋巴細胞中，也存在血淋巴液內 (孫與李, 2001; 劉等, 2003)。文蛤的血淋巴球攜帶有多種酵素，包括酸性磷酸酶、過氧化物酶 (peroxidase) 等，但不含鹼性磷酸酶 (張等, 2016)。酸性磷酸酶是貝類溶酶體的標誌酶，在預防病原感染上相當重要 (劉等, 2003; 劉與麥, 2003)，它的活性顯然隨著溫度上升而升高，與總血球數的變動出現同樣的趨勢。

由於酸性磷酸酶不僅在文蛤血淋巴球中具有水解異物磷酸酯鍵的功能，也可以在血淋巴細胞進行吞噬作用時，協助分解病原，因此同樣有助於文蛤抵抗外來的病源。

由本實驗結果顯示，持續一天的高溫會提高文蛤的能量代謝，相對地也會促使免疫力增加，類似的短期高溫促進免疫力之情形也見於其他的雙殼貝 (Encomlo and Chu, 2007)。但過度的高溫，例如 40 °C 以上，只要一天就會造成文蛤死亡，何況是長期。過度高溫所造成的緊迫會使得生物體無法維持內部的平衡狀態，耗盡體內儲存的能量，如血糖與蛋白質，造成死亡 (Jobling, 1994)。Chou *et al.* (1994) 發現，將處於 25 °C 下的文蛤突然轉移到 32 °C 環境下兩天，會增加其感染病毒，繼而死亡的現象。因此，文蛤在面臨突然的溫度轉換，其生理的變化與免疫力的變動究竟為何？文蛤持續處於高溫多長的時間，會使其能量耗盡並影響其免疫力？這些可能都是後續尚待研究的課題。

參考文獻

- 王清, 楊紅生, 王曉宇 (2010) 鎘與苯并芘脅迫對文蛤血細胞功能的影響. 海洋科學, 34 (9) : 82-86.
- 何雲達 (2001) 文蛤養殖. 雲嘉地區主要魚貝類繁養殖技術彙集 (劉富光主編), 行政院農業委員會水產試驗所, 基隆, 111-124.
- 何雲達 (2005) 文蛤. 臺灣農家要覽漁業篇 (蘇偉成, 胡興華, 江善宗, 黃聲威編), 財團法人豐年社, 台北, 313-318.
- 吳芳麗, 王月, 尚躍勇, 嚴桂珍, 孔輝, 胡夢紅, 呂為群, 王有基 (2016) 水生無脊椎動物血淋巴細胞分類及免疫研究進展. 大連海洋大學學報, 31 (6): 696-704.
- 宋曉村, 萬夕和, 姚國興, 陳愛華 (2007) 江蘇文蛤暴發病的發生機理與綜合防治對策分析. 水產養殖, 28 (3): 38-41.
- 巫文隆, 劉秀平 (1989) 文蛤資源研究 II. 本省文蛤研究的回顧與展望. 貝類學報, 14: 49-61.
- 沈明來 (1995) 隨機完全區及設計. 試驗設計學, 眾光文化事業有限公司, 臺北, 99-120.
- 周昱翰, 葉信利 (2013) 文蛤養殖池底的底土管理. 水試專訊, 43: 17-19.
- 洪紹文, 張永昌, 陳明輝, 鄭清福, 涂青宇, 林育興, 林荀龍, 劉邦成, 張鎮璿, 繆禮澤, 王渭賢 (2011) 二枚貝之血淋巴分類與形態觀察. 生物學報, 46 (1): 13-20.
- 孫虎山, 李光友 (2001) 雙殼貝類參與免疫防疫的體液因子. 海洋科學, 25 (4): 34-36.
- 栗志民, 劉志剛, 徐法軍, 何南新, 楊銳文 (2011) 體重、溫度和鹽度對皺勒文蛤耗氧率和排氨率的影響. 海洋科學進展, 29 (4): 512-520.
- 張素容, 陳鴻議, 周信佑 (2016) 文蛤血球的細胞化學特性與免疫功能評估. 水產研究, 24 (1): 51-61.
- 許友卿, 吳衛君, 蔣偉明, 丁兆坤 (2012) 溫度對貝類免疫系統的影響及其機理研究進展. 水產科學, 31 (3): 176-180.
- 許晉榮 (2010) 九孔種貝血淋巴免疫相關指標季節性之變化. 水產研究, 18 (2): 65-73.
- 彭文, 王江勇 (2011) 軟體動物血藍蛋白的結構和免疫功能的研究進展. 水產科學, 30 (3): 182-185.
- 黃麗月, 黃福銘, 郭仁杰, 丁雲源 (2004) 文蛤成長遲緩與大量死亡原因探討及因應對策. 水試專訊, 6: 6-9.
- 楊維德 (1981) 文蛤生理生態研究-文蛤形質測定和生態之生存界限及其數學模式. 臺灣省水產試驗所試驗報告, 33: 675-676.
- 劉世良, 麥康森 (2003) 貝類免疫系統和機理的研究進展. 海洋學報, 25: 95-105.
- 劉志鴻, 牟海津, 王清印 (2003) 軟體動物免疫相關酶研究進展. 海洋水產研究, 24: 86-90.
- Bachère, E., E. Mialhe, D. Noël, V. Boulo, A. Morvan and J. Rodriguez (1995) Knowledge and research prospects in marine mollusk and crustacean immunology. Aquaculture, 132: 17-32.
- Byrne, M. (2011) Impact of ocean warming and ocean acidification on marine invertebrate life history stages: Vulnerabilities and potential for persistence in a changing ocean. Oceanogra. Mar. Biol., 49: 1-42.
- Chang, S. J., S. M. Tseng and H. Y. Chou (2005) Morphological characterization via light and electron microscopy of the hemocytes of two cultured bivalves: A comparison study between the hard clam (*Meretrix lusoria*) and pacific oyster (*Crassostrea gigas*). Zool. Stud., 44: 144-153.
- Chang, Y. T., K. J. Jong, B. K. Liao and S. M. Wu (2007) Cloning and expression of metallothionein cDNA in the hard clam (*Meretrix lusoria*) upon cadmium exposure. Aquaculture, 262: 504-513.
- Chen, H. C. (1984) Recent innovations in cultivation of edible mollusks in Taiwan, with special reference to the small abalone *Haliotis diversicolor* and the hard clam *Meretrix lusoria*. Aquaculture, 39: 11-27.
- Chen, I. M. (1995) Comparison of the effects of copper on respiration and its accumulation in tissue in the hard clam *Meretrix lusoria*. Zool. Stud., 34: 235-240.

- Cheng, W., I. S. Hsiao, C. H. Hu and J. C. Chen (2004) Change in water temperature on the immune response of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus*. *Fish Shellfish Immunol.*, 17: 235-243.
- Chin, T. S. and H. C. Chen (1993) Toxic effects of mercury on the hard clam, *Meretrix lusoria*, in various salinities. *Comp. Biochem. Physiol.*, 105C: 501-507.
- Chou, H. Y., H. J. Liu and C. F. Lo (1994) Pathogenicity of a birnavirus to hard clam (*Meretrix lusoria*) and effect of temperature stress on its virulence. *Fish Pathol.*, 29: 171-175.
- Chou, H. Y., S. J. Chang, H. Y. Lee and Y. C. Chiou (1998) Preliminary evidence for the effect of heavy metal cations on the susceptibility of hard clam (*Meretrix lusoria*) to clam birnavirus infection. *Fish Pathol.*, 33: 213-219.
- Decker, H. and E. Jaenicke (2004) Recent findings on phenoloxidase activity and antimicrobial activity of hemocyanins. *Dev. Comp. Immunol.*, 28: 673-687.
- Encomlo, V. G. and F. L. E. Chu (2007) Heat shock protein (hsp70) expression and thermal tolerance in sublethally heat-shock eastern oyster *Crassostrea virginica* infected with the parasite *Perkinsus marinus*. *Dis Aquat. Org.*, 76: 251-260.
- Hooper, C., R. Day, R. Slocombe, J. Handler and K. Benkendorff (2007) Stress and immune response in abalone: Limitations in current knowledge and investigative methods based on other models. *Fish Shellfish Immunol.*, 22 (4): 363-379.
- Jeng, S. S. and Y. M. Tyan (1982) Growth of the hard clam *Meretrix lusoria* in Taiwan. *Aquaculture*, 27: 19-28.
- Jobling, M. (1994) Environmental stressors. *In* Fish Bioenergetics, Chapman & Hall, London, 285-290.
- Lee, A. C., M. C. Lee, S. M. Chen and T. S. Chin (2005) Temperature, pH, Mg²⁺ and aerial exposure time affect the oxygen consumption of hard clam (*Meretrix lusoria*). *J. Fish. Soc. Taiwan*, 32: 301-309.
- Liao, C. M., C. F. Chang, C. H. Yeh, S. C. Chen, K. C. Chiang, C. P. Chio, B. Y. H. Chou, L. J. Jou, G. W. Lien, C. M. Lin, H. H. Shen and G. D. Wu (2006) Metal stresses affect the population dynamics of disease transmission in aquaculture species. *Aquaculture*, 257: 321-332.
- Lieb, B. and C. Todt (2008) Hemocyanin in mollusks-A molecular survey and new data on hemocyanin genes in Solenogastres and Caudofoveata. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 49: 382-385.
- Malham, S. K., A. Lacoste, F. Célévart, a. Cueff and S. A. Poulet (2003) Evidence for a direct link between stress and immunity in the mollusk *Haliotis tuberculata*. *J. Exp. Zool.*, 295A: 136-144.
- Mangum, C. P., K. I. Miller, J. L. Scott, K. E. Von Holde and M. P. Morse (1987) Bivalve hemocyanin: structural, functional, and phylogenetic relationships. *Boil. Bull.*, 173: 205-221.
- Matozzo, V. (2016) Aspects of eco-immunology in molluscs. *Invert. Surv. J.*, 13: 116-121.
- Ordás, M. C., A. Ordás, C. Beloso and A. Figueras (2000) Immune parameters in carpet shell clams naturally infected with *Perkinsus atlanticus*. *Fish Shellfish Immunol.*, 10: 597-609.
- Siddiqui, N. I., R. F. Akosung and C. Gielens (2006) Location of intrinsic and inducible phenoloxidase activity in molluscan hemocyanin. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 348: 1138-1144.
- Söderhäll, K. and L. Cerenius (1998) Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Curr. Opin. Immunol.*, 10: 23-28.
- Tu, C. Y., S. W. Hung, L. T. Tsou, Y. C. Chang and W. S. Wang (2007) Simultaneous flow cytometric assessment for cellular types and phagocytic abilities of the haemocytes of hard clam, *Meretrix lusoria*. *Fish Shellfish Immunol.*, 23: 16-23.
- Yu, J. H., J. H. Song, M. C. Choi and S. W. Park (2009) Effects of water temperature changes on immune function in surf clams, *Macrta verneiformis* (Bivalvia: Mactridae). *J. Invert. Pathol.*, 102: 30-35.
- Zhuang, S. and X. Liu (2006) The influence of fresh weight and water temperature on metabolic rates and the energy budget of *Meretrix meretrix* Linnaeus. *Mar. Biol.*, 150: 242-252.

Effects of High Temperature on Glucose and Immune Parameters in Hemolymph of Hard Clam, *Meretrix lusoria*

Jinn-Rong Hseu¹, Shu-Chiu Hsieh² and Wen-Bin Huang^{3*}

¹Aquaculture Division, Fisheries Research Institute

²Mariculture Research Center, Fisheries Research Institute

³Department of Natural Resource and Environmental Studies, National Dong Hwa University

ABSTRACT

Stressors caused by temperature fluctuations usually play a major role in the high mortality of the hard clam (*Meretrix lusoria*). The present study investigated the effects of hyperthermal stress on the hemolymph glucose and immune responses of the clam. In an experiment, clams were transferred from 29 °C to 36 °C of sea water, and then to 40 °C, with a period of 1 day spent in the water of each temperature. Finally, the clams were transferred back to sea water of 29 °C for a 1-day recovery period. Hemolymph of the clams were sampled on the 29 °C, 36 °C, 40 °C, and recovery for 1 day. The results showed that mortality of clams was observed after exposure to the 40 °C of sea water for 1 day. The total hemocyte count, concentrations of protein and glucose, and acid phosphatase activity in the hemolymph were significantly increased as the temperature was raised, but then recovered to their initial values after the temperature was returned to 29 °C for 1 day. To summarize, short-term high temperature exposure induced stress responses and stimulated immunity in the hard clams, but the clams were not able to withstand water temperatures higher than 40°C. Under this condition, clam mortality was observed.

Key words: *Meretrix lusoria*, stress, immunity

*Correspondence: Department of Natural Resource and Environmental Studies, National Dong Hwa University, Hualien, Taiwan. TEL: (03) 8635191; E-mail: bruce@mail.ndhu.edu.tw