

中華民國國家標準	深層海水檢驗法－總細菌數 之測定 (DAPI 染色法)	總號	15091-18
CNS		類號	N7001-18

Method of test for deep sea water – Determination of bacteria abundance
(DAPI)

1. 適用範圍：本標準規定深層海水中總細菌數之檢驗。
2. 檢驗方法：海水中總細菌數之檢驗方法一般均以染色體染色法來進行，樣本於現場取得後隨即以 glutaraldehyde 溶液固定，回實驗室後取適量體積的樣本染色並過濾於孔徑 0.2 μm 的濾紙上，然後在螢光顯微鏡下以紫外光激發進行計數。
3. 器材及儀器
 - 3.1 採樣及樣本分裝容器：50 mL、5 mL 無菌有蓋之塑膠製離心試管。
 - 3.2 1 mL、2 mL 的自動滴管。
 - 3.3 濾膜：直徑 25 mm，孔徑 0.2 μm Polycarbonate 材質，黑色之 Nuclepore 濾膜。
 - 3.4 過濾幫浦、過濾器材、載玻片、蓋玻片。
 - 3.5 螢光顯微鏡(含有 $\times 1000$ 物鏡)。
 - 3.6 鏡油(immersion oil)：一般市售無色指甲油(密封用)。
4. 試劑與配製
 - 4.1 固定液（戊二醛）：glutaraldehyde solution 25%。
 - 4.2 染色劑：濃度 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 DAPI (4'6-diamidino-2-phenylindole)。
5. 採樣及分析步驟
 - 5.1 以無菌之離心試管收取 50 mL 之樣本，隨即加入 5 mL 之固定液，然後將樣本保存於 4 $^{\circ}\text{C}$ 的冰箱中。
 - 5.2 取 2 mL 樣本分裝至 5 mL 無菌試管中，然後加入 1 mL 之 DAPI 染色劑染色至少 3 分鐘。
 - 5.3 將染色後之樣本過濾於直徑 25 mm、孔徑 0.2 μm 之濾膜上。過濾壓力應小於 100 mmHg。
 - 5.4 將已過濾於濾膜上之樣本放置於載玻片上，加上鏡油蓋上蓋玻片，再以指甲油密封固定。
 - 5.5 將製好之玻片置於螢光顯微鏡(10 \times 100)倍下，以 UV 光投射樣本。
 - 5.6 細菌在 UV 光的投射之下會激發出藍色光點，此藍色光點（顯微鏡的目尺下直徑在 1 μm 以內）即被視為細菌。
 - 5.7 隨機計數 10 個視野下的細菌數量，並逐一記錄之。
6. 總細菌數量(Bacteria Biomass)計算公式：

(共 2 頁)

公布日期 96 年 6 月 26 日	經濟部標準檢驗局印行	修訂公布日期 年 月 日
-----------------------	-------------------	-----------------

$$\text{總細菌數 (Bacteria Abundance) (cells mL}^{-1}\text{)} = \frac{n \times \frac{A}{a}}{V} \times \frac{55}{50}$$

n : 平均每個視野之細胞數量

A : 濾紙有效面積 (cm²)

a : 視野面積 (cm²)

V : 過濾樣本體積 (mL) : 2 mL

7. 當細菌密度 < 1.4 × 10³ mL⁻¹ 時將無法測出。

備考：深層海水泛指位於海平面 200 公尺以下之海水。圖 1 為在台灣東部深水海域以本方法實測之海水總細菌數(Bacteria)隨深度之變化情形。

圖 1 台灣東岸台東知本深層海水總細菌數(Bacteria)隨深度變化之檢驗實例 (現場採樣日期、位置與海底深度：2006 年 10 月 12 日、121.0633°E；22.6437°N、650 m)

