**堆積物サンプル中の全菌数測定マニュアル**

作成者　山口

2011年9月12日

2014年8月31日加筆

1．2 mlのサンプルにTween80を最終濃度1mg/ lとなるように加える。Tween80は界面活性剤であり、これによりバクテリアが粒子より離れやすくなる。

2．1分間よく混ぜる。

3．サンプルを超音波にかける（5秒x5回）。

4．1600 gで30秒遠心をかけ、上澄み液10 µlをエッペンに採取する。

5．エッペンに490 mlの濾過海水を加えて50倍希釈した後、DAPIを最終濃度5 µg/ mlとなるように加えて、室温・暗条件で30分間静置する。

6．エッペンから200 µlをとり、1.8 mlの濾過海水で10倍希釈し、ブラックフィルターにろ過する。

7．濾過したフィルターは、一滴オイルを垂らしたスライドガラスに静かに置く、さらにカバーガラス（サンプル面）にもオイルを1滴垂らしてフィルターに被せる。

8. 蛍光顕微鏡での観察の際は、フィルターはNo.4をセットを行い、1サンプルについて20枚程度写真を撮るようにする。

＊蛍光顕微鏡は光源が安定するまでに時間がかかるため、観察の20～30分前には電源を入れておく。

＊水銀ランプは、一度消灯すると冷えるまで再度電源を入れてはいけないので注意する。熱い間に再度電源を入れた場合、光源が壊れることに繋がる。