

第二章 研究材料與方法

2.1 研究區域、時間與採樣

本研究主要利用海研二號 (OR-II) 於東海南部海域進行採樣與調查研究，研究時間涵蓋完整一年的時序變化，共計包含五個航次：OR2-CR1135 (2003 年 9 月；代表夏季)、OR2-CR1157 (2003 年 11 月；代表秋季)、OR2-CR1170 (2004 年 1 月；代表冬季)、OR2-CR1187 (2004 年 5 月；代表春季)、OR2-CR1213 (2004 年 8 月；代表夏季)。為充分了解大陸沿岸水、台灣海峽水、和黑潮水等三水團對東海南部海域浮游生物群聚呼吸率的影響，以及釐清環境因子如何影響群聚呼吸率的時空變異，本研究共計在東海南部海域設置 14 個固定測站進行採樣研究 (圖 1)。採樣作業進行時，先以衛星定位儀 (DGPS) 定位，到達定位點後再以溫、鹽探測儀 (Seabird CTD-General Oceanic Rosette) 進行測量，同時紀錄溫度、鹽度、穿透度 (transmissance ; Sea Tech Inc.)、葉綠素螢光值 (fluorescence ; Sea Tech Inc.)、水下光合作用有效光量 (PAR ; QSP200L , Biospheric Inc. USA) 等連續深度剖面資料 (profile)。

水樣的採集主要利用加掛在溫、鹽探測儀上的採水瓶 (10L, Go-Flo ; General Oceanic Inc. USA) 進行採樣，水樣採集主要依據各測站的水深，進行 3 ~ 6 個深度的水樣採集。樣水收集後，分別保存

或過濾，便於攜回實驗室後進行下述各項參數的分析，包括：無機營養鹽 (NO_3^- 、 PO_4^{3-} 、 SiO_4^{2-})、顆粒性有機碳 (Particulate Organic Carbon ; POC)、葉綠素 *a* (Chlorophyll *a* ; Chl *a*)、和異營細菌生物量 (Bacterial Biomass ; BB)；部份水樣則進行包括異營性細菌生產力 (Bacteria Production ; BP) 和群聚呼吸率 (Planktonic community respiration ; PCR) 的培養。

為進一步探討各參數的空間變異情形，本研究主要依據溫、鹽散佈圖 (T-S diagram) 的結果，將 14 個測站區分並隸屬於三個水團 (圖 1, 2)，包括大陸沿岸水 (測站 1 ~ 4)、台灣海峽水 (測站 5 ~ 9)、和黑潮水 (測站 10 ~ 14)，藉以瞭解影響群聚呼吸率空間變異的主要因素。

2.2 無機營養鹽 (NO_3^- 、 PO_4^{3-} 、 SiO_2)

無機營養鹽的樣品主要將取得的水樣置入 100 ml 之 polyethylene 瓶內，以液態氮急速冷凍，並保存於 -20 冰箱。樣品攜回實驗室後，用三同步流動式分析注入法 (Flow Injection Analysis) 進行分析。硝酸鹽、矽酸鹽及磷酸鹽分別以 cadmium、ascorbic acid/oxalate、及 ascorbic acid 還原比色法測定濃度 (Parson et al., 1984)。(數據來源：中央研究院環境變遷研究中心夏復國老師實驗室)

2.3 顆粒性有機碳 (Particulate Organic Carbon ; POC)

顆粒性有機碳樣品主要將取得的水樣以 550 預熱過之石英纖維濾紙過濾，過濾後濾紙置於培養皿中，並且冷凍於 -5 冰箱保存。攜回實驗室後，以冷凍乾燥去除水分，用 CHN 元素分析儀 (FISON) 分析 (HORIBA EMIA-510 analyzer)，分析前滴加 1N HCl 於濾紙上，以去除無機碳。上述方法的靈敏度為 0.1M，並以多點線性方式校正。(數據來源：中央研究院環境變遷研究中心夏復國老師實驗室)

2.4 葉綠素 *a* 濃度 (Chlorophyll *a* ; Chl *a*)

葉綠素樣品主要將取得的水樣置入 2000 ml 之 polyethylene 瓶內，現場用玻璃纖維濾紙 (GF/F) 過濾，收集留在 GF/F 濾紙上之樣品，冷凍於 -5 冰箱中。攜回實驗室後，樣品濾紙用丙酮萃取法萃取葉綠素 *a* (95 % 丙酮於暗處，4 下粹取 24 小時)，粹取液以 Turner 螢光儀 (model 10-AU-005) 測定葉綠素濃度 (Strickland and Parsons, 1972)，此值為葉綠素 *a* 手測值濃度。本論文中，所使用的葉綠素 *a* 數據主要為螢光探針測得之螢光值經手測值校正後所得 ($r^2 = 0.66$, $p < 0.01$)。(數據來源：國立台灣海洋大學海洋環境化學與生態研究所龔國慶老師實驗室)

2.5 異營性細菌生物量 (Bacterial Biomass ; BB)

異營細菌生物量的計算是利用 acridine orange 直接螢光染色計

數法 (Hobbie *et al.*, 1977)。採樣時取約 40 ~ 45 ml 的水樣，裝入 50 ml 的離心管之中，加入 glutaraldehyde (final conc. 1%) 以固定樣品。在實驗室中，取 1 ~ 2 ml 水樣以 acridine orange (final conc. 0.01%) 染色 2 分鐘，接著以 0.2 μm 黑色 polycarbonate 濾紙過濾，再將濾紙置於螢光顯微鏡 (epifluorescence microscope, Zeiss Axioplan) 下計數。異營細菌生物量是利用胞碳含量轉換係數 ($2 \times 10^{-14} \text{ g C cell}^{-1}$, Lancelot and Billen 1984)，將細菌數目轉換為以碳為單位的生物量 (mg C m^{-3})。(數據來源：中央研究院環境變遷研究中心夏復國老師實驗室)

2.6 異營性細菌生產力 (Bacterial Production ; BP)

異營性細菌生產力主要利用胸腺嘧啶 (H^3 - thymidine) 吸收法測量 (Furman & Azam 1980, 1982)。其培養步驟是將採得的水樣取 1.7 ml，加入已滴加胸腺嘧啶 (H^3 - thymidine, final cons. 20 nM) 的 microtubes 中，於現場水溫培養 1 ~ 2 小時後，添加 0.3 ml formaldehyde 使其停止反應。將培養液攜回實驗室後，於 4 溫度中以 14,000 rpm 離心 7 分鐘，再利用幫浦將 microtubes 的上清液抽掉，加入 1.7 ml 5 % 冰三氯醋酸 (trichloro acetic acid)，再依前述方法進行離心及抽除上清液之步驟；其後再加入 1.7 ml 80 % 的冰乙醇 (ethyl

alcohol), 同樣在 4 中離心 7 分鐘後抽除上清液, 最後再加入 1.7 ml 的閃爍液 (scintillation cocktail. Ultima Gold, Packard), 震盪均勻後, 以液相閃爍計數器 (Liquid Scintillation Analyzer, Packard 1600) 測量放射活性 (dpm)。細菌生產力 ($\text{mg C m}^{-3} \text{d}^{-1}$) 的計算主要利用胸腺嘧啶吸收轉換參數 ($1.18 \times 10^{18} \text{ cells mol thymidine}^{-1}$; Cho and Azam, 1998) 及細胞碳含量轉換係數 ($2 \times 10^{-14} \text{ mg C cell}^{-1}$; Lancelot and Billen, 1984) 進行轉換。(數據來源: 中央研究院環境變遷研究中心 夏復國老師實驗室)

2.7 群聚呼吸率 (Planktonic Community Respiration; PCR)

群聚呼吸率主要利用暗瓶培養法進行, 並以希巴辣光度測氧法來量測培養前、後的溶氧值 (Pai *et al.*, 1993)。其主要步驟如下: 培養前溶氧值 ($[\text{O}_2]_{\text{initial}}$) 的取得主要將採水器所採的水樣直接裝入 60 ml Wheaton 溶氧瓶中 (需溢流約 100~150 ml) 再用分注器 (dispenser) 依序加入 0.5 ml R1 試劑 ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 3M) 及 0.5 ml R2 試劑 (NaI/NaN_3 , $[\text{I}^-] = 4\text{M}$, $[\text{OH}^-] = 8\text{M}$, 0.3M) 進行固定。培養後的溶氧值 ($[\text{O}_2]_{\text{end}}$) 主要以暗瓶培養後的水樣測得, 暗瓶培養法主要將水樣吸入 350 ml Kimble 溶氧瓶 (需溢流約 100~150 ml), 塞上瓶蓋旋緊, 再以黑布或兩層鋁箔紙包裹後, 置入有流動表層海水的培養

筒中，以不見光的暗瓶培養法進行 24 小時的恆溫培養。培養後，利用矽膠管經虹吸作用將培養水樣由 350 ml Kimble 溶氧瓶分注入 60 ml Wheaton 溶氧瓶中，再依上述方法分別加入 R1 及 R2 試劑進行固定。

溶氧值測量方法：將固定後的樣品靜置一小時以上，直到溶氧瓶上層的水樣完全澄清，且沉澱物完全沉澱至瓶底。再利用分注器加入 0.5 ml R3 試劑（硫酸，10N），再將瓶塞小心塞回去並旋緊，搖晃至沉澱物完全溶解成褐色的澄清溶液。測量時用鐵氟龍導管將水樣吸入分光光度計（Metertek SP-830；波長 456 nm）測量其吸光值，此讀值為未修正前的原始吸光值（raw absorbance, Absraw）。剩餘的褐色澄清液再加入 0.5 ml R4 試劑（ $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.2M），搖晃均勻，待褐色溶液變透明後再以鐵氟龍導管吸入分光光度計，紀錄其吸光值，此時所測得的吸光值為濁度空白吸光值（turbidity blank, Absturb）。由水樣的原始吸光值扣除濁度空白吸光值，可得到修正後的吸光值（corrected absorbance, Abscorr），即 $\text{Abscorr} = \text{Absraw} - \text{Absturb}$ 。

溶氧濃度由右式計算： $[\text{O}_2]_{(\mu\text{M})} = \text{Abscorr} \times 456 - 0.5$

群聚呼吸率的計算如右式： $\text{PCR} = \frac{[\text{O}_2]_{\text{initial}} - [\text{O}_2]_{\text{end}}}{\text{time}} \times 24$

其中 PCR: 群聚呼吸率（Community Respiration Rate, $\mu\text{M O}_2 \text{ d}^{-1}$ ）

$[O_2]_{initial}$: 培養前溶氧濃度

$[O_2]_{end}$: 培養後溶氧濃度

time : 培養時間 (hr)

此外，所測得的群聚呼吸率 ($\mu\text{M O}_2 \text{ d}^{-1}$)，主要依據呼吸熵數 (respiration quotation, RQ) 為 1 (Hopkinson, 1985)，將單位轉換成 $\text{mg C m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ 。

2.8 繪圖與統計軟體分析

本論文所有數據分析，除溫度、鹽度取用表水值之外，其餘參數均取混合層內所有測值之積分平均值進行分析。有關繪圖部分是利用 Grapher 3 及 Surfer 7.0 來處理；資料的分析上，測站的分群係利用 5 個航次、14 個測站所有表水溫度與鹽度的散佈圖 (T-S diagram) 為依據。各項參數的相關性則分成整個東海南部海域及三個水團各別進行直線回歸分析，所有的分析均利用 SAS (Statistical Analysis System) 與 PAST (<http://folk.uio.no/ohammer/past/>) 進行。