

現場懸濁物測定器 LISST-100 (Laser In-Situ Scattering and Transmissiometry) とその機能検定の紹介

荒田 直

1. はじめに

海域中の懸濁態粒子の粒子数の粒径分布を把握する方法として、Sheldon and Parson (1967) が提唱して以来医学用に開発されたコールターカウンターにかけて計測する方法が一般的になっている。しかし、現場から分析をする実験室までの間のタイムラグ及びサンプルの取り扱いによりサンプル中の粒子が崩壊する場合があります、現場海水中とは異なった粒径分布が得られてしまう可能性がある (Johnson et al, 1994)。また河川・汽水域のサンプルの分析のためには電解液を注入しなければならず、その副作用として凝集作用が働く場合もあり、粒径分布が変化してしまう可能性もある。最近になって開発された LISST-100 はレーザー光散乱を利用して現場海水中の粒子の体積の粒径分布を測定することができ (Agrawal et al, 2000)、沿岸海域・汽水域 (鷺見・鋤崎, 2001 ; J. W. Gartner et al., 2001) だけでなく、外洋域でも利用され始めている。

2. LISST-100とは

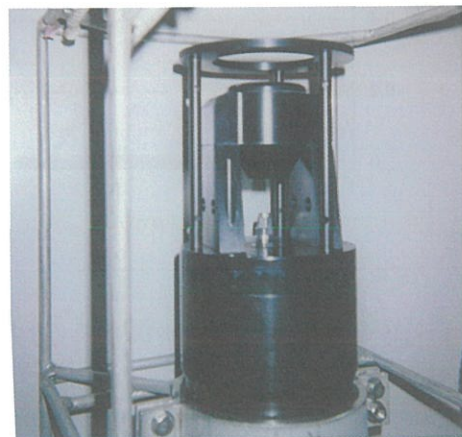
LISST-100はレーザー光散乱を利用して現場海水中の粒子の体積の粒径分布を測定することができ、その測定原理はミーの散乱理論 (Born and Wolf, 1980) に基づいている。

当社の LISST-100 (SEQUOIA 社製) は全長 81cm・直径 13cm・光路幅 5 cm のタイプで 2.5 ~ 500 μm の粒径範囲を対数的に 32 分割して測定する (写真 1)。測定値は各分画の中央値を測定し、同時に水温・水深及び消散係数・体積散乱係数も測定する。またサンプリング時間を変えることができ、例えば、現場測定では最小サンプリング時間 0.385 秒で測定しているが室内実験では 1.0 秒で測定を行っている。その他に 1.25-250 μm を測定するタイプや、光路幅が 25cm のタイプのものも使用されており、後者は粒子濃度の低い外洋観測に向いている。

ここではフィールド測定前の LISST-100 の性質をチェックし基本データをとることを目的として行った機能検定・測定能力検定等の室内実験を紹介する。



写真 1 - 1 : LISST-100 の全景



(写真 1 - 2 : LISST-100 の粒子測定部位)

3. 室内実験

3-1 目的

上述の通り LISST-100 はミーの散乱理論に基づいており、その理論は球状のものを対象にしている。また溶媒としては屈折率の変化のないものが望ましい。

しかしながら LISST-100 の測定サイズの 2.5-500 μm の範囲には無機態粒子だけではなく、有機態粒子も含まれている。このサイズには植物プランクトン・動物プランクトン及びデトリタスが主要な有機態粒子として存在しており、その形状は球状だけでなく、多様な形状を持っている。

また測定フィールドは均一な水とは異なる海水であり、その塩分濃度はフィールド毎に異なる。特に汽水域などでは強い塩分躍層もみられる。

現在のところ標準粒子を用いたキャリブレーション及び堆積物について実験室での測定例は報告されているが (Traykovski et al, 1999)、生物体についての報告例はほとんど無くその形状に関する情報は乏しい。そこで本実験では比較的球形

の渦鞭毛藻類として *Prorocentrum minimum* を、鎖状の珪藻類として *Skeletonema costatum*・*Chaetoceros spp.* の 2 種を LISST-100 でどのように測定されるかを調べるために培養実験を行った。また塩分濃度の変化に伴う屈折率の変化が、光散乱を利用している同機の測定に与える影響を調べるために混合実験及び標準粒子添加実験を行った。

3-2 実験方法

3-2-1 混合実験

塩分濃度の異なる濾過海水の混合中に LISST-100 による測定を試みた。最終塩分濃度が 0・4・8・17・26・30・35% となる様に混合した。

3-2-2 標準粒子添加実験

0% から 35% の幅で塩分濃度が均一な濾過海水を調整し、その中に 3 サイズの標準粒子を各々に添加して LISST-100 で測定した。標準粒子には 10.0 μm と 87.5 μm のコールター社製ポリスチレンビーズと約 250-350 μm のガラスビーズを使用

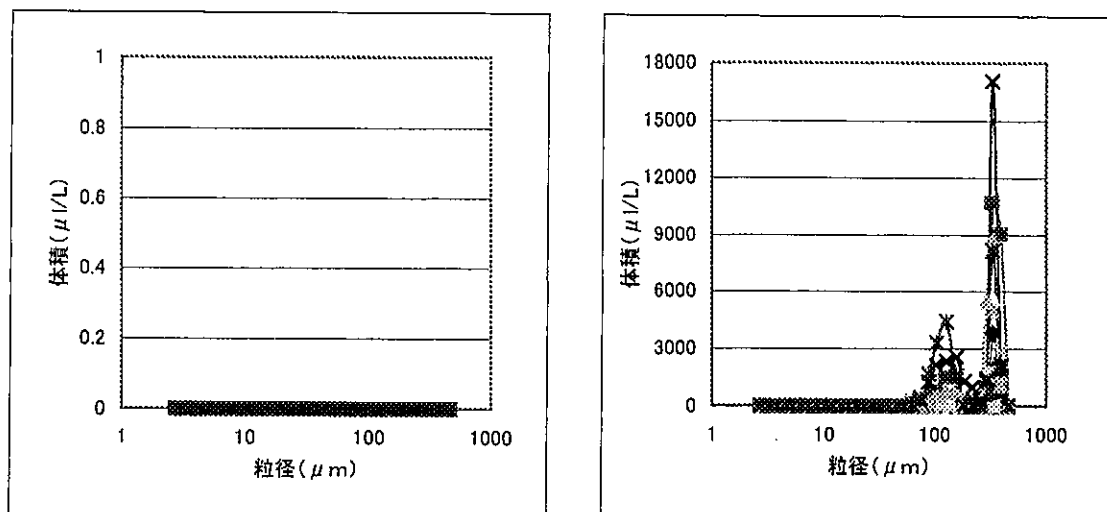


図 3-1 : 異なる塩分濃度海水混合時の LISST-100 測定結果

代表として 35% の濾過海水と 0% の蒸留水を混合したときの 30 秒間の LISST-100 測定値を示した。

(左図) 塩分濃度の異なる濾過海水を混合した直後の LISST-100 測定結果

(右図) 塩分濃度の異なる濾過海水を混合した後、混合が収まってきたときの LISST-100 測定結果

した。塩分濃度は上記混合実験と同様にした。

3-2-3 植物プランクトン培養実験

東京湾で優占する植物プランクトンの純粋株を培養し、その粒径分布の変化を測定した。純粋株には鎖状の珪藻類として *Skeletonema costatum*・*Chaetoceros spp.*の2種と比較的球形の渦鞭毛藻類として *Prorocentrum minimum*を使用した。

細胞数は日ごとに計数した。誘導期・対数増殖期・定常期の粒径分布を LISST-100 で測定するとともに、その10mlを分取し懸濁物粒子・植物プランクトンを顕微鏡で計測してその体積を算出した。顕微鏡計測結果をESD換算したものと長軸長を基準にしたもの2タイプと LISST-100 の測定値との比較を行った。サンプルはグルタルアルデヒド1%で固定し保存した。

3-3 実験結果

3-3-1 塩分濃度実験

図3-1に異なる塩分濃度海水を混合したときの LISST-100 の測定結果を示す。

塩分濃度の異なる濾過海水の混合直後では beam C、透過率が共に0となり測定値も全粒径で0となり測定不能となった。その後混合が弱くなると約80 μm 以上の粒径の測定値に異常な値が得られた。

3-3-2 標準粒子添加実験

図3-2に標準粒子を添加した場合の LISST-100 の測定結果を示す。

塩分濃度が各0・4・9・18・26・32・35%の均一の溶液に10 μm ・87.5 μm の粒子を添加した場合、塩分濃度の違いによるピーク位置のズレはほとんどみられなかった。250-350 μm で得られた結果の不安定さは粒子自身の精度の低さ、もしくは LISST-100 の測定範囲の限界に近かったためと考えられる。また10.0 μm の標準粒子測定の粒径分布で8.69 μm 及び12.1 μm の粒径でピークが検出され10.25 μm で低い測定値が得られている。本来ならば10.25 μm でピークが検出されると予

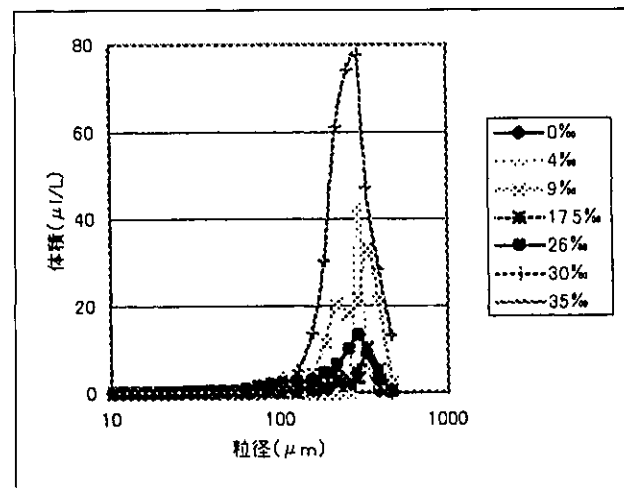
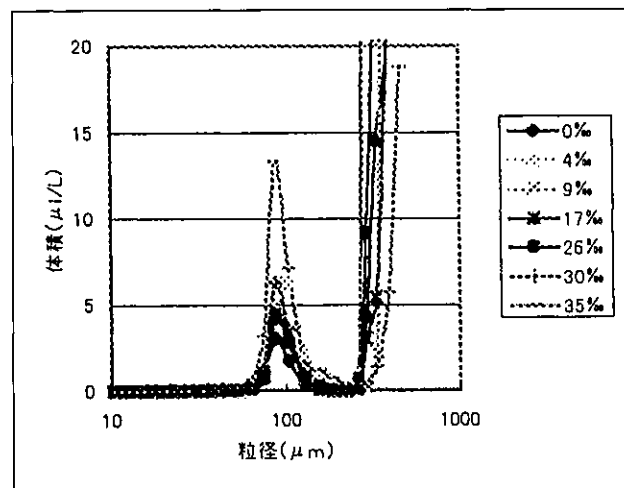
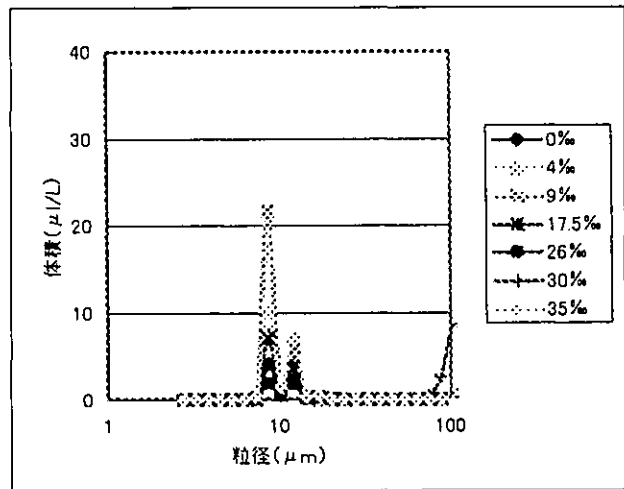


図3-2：標準粒子添加時の測定結果
 (上図) 10 μm 標準粒子添加
 (中図) 87 μm 標準粒子添加
 (下図) 250-350 μm 標準粒子添加

想されるが、これは250-350 μm の場合同様、小さい粒子のLISST-100測定範囲の限界が不明瞭であることと関係がある。

3-3-3 培養実験

培養株には比較的球形の渦鞭毛藻類の *Prorocentrum minimum* と鎖状の形態をとる珪藻類の *Skeletonema costatum* と *Chaetoseris spp.* を使用したが、*Skeletonema costatum* と *Chaetoseris spp.* で得られた結果は似通っていたため、ここでは *Skeletonema costatum* と *Prorocentrum minimum* の結果を紹介する。

① *P. minimum* の培養結果

①-1 *P. minimum* の細胞数の変化

培養時の *P. minimum* の細胞数・総体積の変化を表3-1に示す。

P. minimum は培養開始時には850cells/mlであったのが58時間後には 3.5×10^3 cells/ml、98時間後には 1.0×10^4 cells/ml と順調に増加し続け142時間後には 2.1×10^4 cells/ml となりピークに達した。*P. minimum* の総体積も同様に58時間後には $5.8 \mu\text{l/L}$ 、98時間後には $16.7 \mu\text{l/L}$ となり、142時間後には $34.1 \mu\text{l/L}$ にまで増加した。

P. minimum 一個体の平均体積は以下の式から算出した(宮井 1998)。

$$V = \pi ab^2/10$$

a : 長径 (μm)

b : 短径 (μm)

V : *P. minimum* の1個体の体積 (μm^3)

表3-2に *P. minimum* のサイズ計測結果、体積及びESD推定結果を示す。

サイズ分布は比較的均一で平均体積は $1687 \mu\text{m}^3$

表3-1 : *P. minimum* の細胞数・総体積の変化

培養時間	細胞数(cells/ml)	総体積($\mu\text{l/l}$)	標準偏差
0	850	1	0.3
27	1566	3	0.5
58	3500	6	1.1
75	5200	9	1.7
98	10067	17	3.2
118	14400	24	4.6
142	20600	34	6.6
214	17733	29	5.7
262	20200	33	6.5

表3-2 : *P. minimum* のサイズ計測結果

	長軸(μm)	短軸(μm)	体積(μm^3)	ESD(μm)
cell 1	20.0	15.0	1413	13.9
cell 2	18.8	17.5	1803	15.1
cell 3	17.5	16.3	1451	14.0
cell 4	18.8	16.3	1555	14.4
cell 5	20.0	18.8	2208	16.2
cell 6	18.8	16.3	1555	14.4
cell 7	18.8	17.5	1803	15.1
cell 8	16.3	15.0	1148	13.0
cell 9	18.8	16.3	1555	14.4
cell 10	20.0	18.8	2208	16.2
cell 11	19.4	17.5	1863	15.3
平均	18.8	16.8	1687	14.8
stdev	1.1	1.3	328	1.0
cv	6	8	19	6

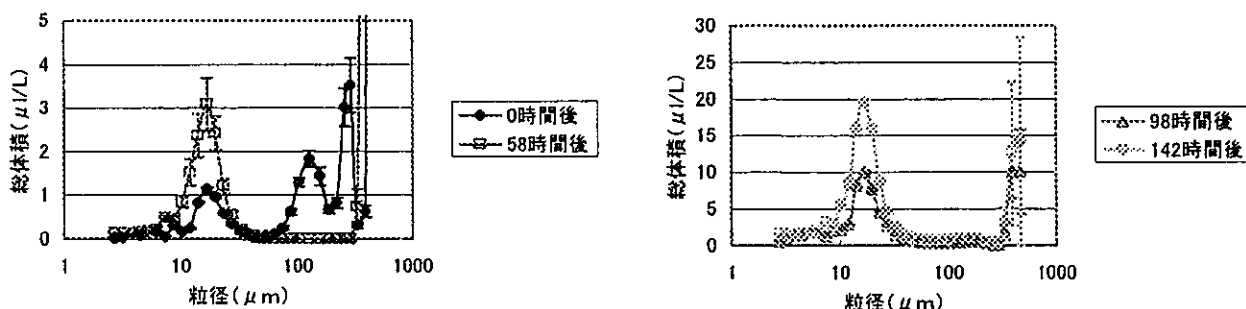


図 3 - 3 : LISST-100による *P. minimum* の測定結果

でESDは14.8 μmとなった。

①-2 Lisst測定の結果

図 3 - 3 に LISST-100 による *P. minimum* 培養株の測定結果を示す。

培養開始時から16.8 μmの粒径で顕著なピークがみられこのピークは全培養期間を通してみられた。

顕微鏡計測結果から求めた平均ESDは14.7 ± 1.0 μmであり、個体数の増減に関わらず、LISST-100の測定ピークの14.27 μm - 16.8 μmと一致した。またその顕微鏡測定から求めた *P. minimum* の総体積も LISST-100測定値の増加と比例して増加した。

② *S. costatum* の培養結果

②-1 *S. costatum* の細胞数の変化

図 3 - 4 に *S. costatum* の細胞数の変化を示す。

培養開始時には 3×10^2 cells/mlであった *S. costatum* は26時間後には対数増殖期に入り、56時間後には 5.0×10^4 cells/mlまで増加し75時間後には 1.3×10^5 cells/mlとなりピークに達した。98時間以降、死滅期に入り細胞数は減少し始めた。この時期になると *S. costatum* の死骸と考えられる凝集体が数多く観察された。

また *S. costatum* の体積は鎖状体を1単位として以下の式から算出した (宮井 1998)。

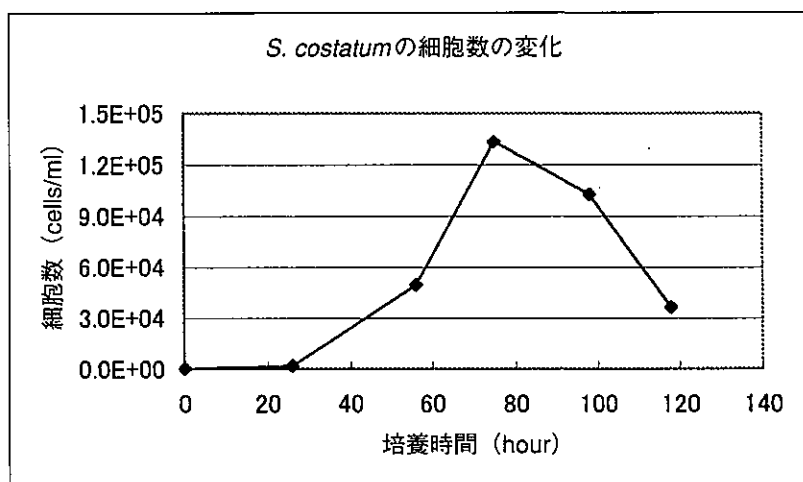


図 3 - 4 : *S. costatum* の細胞数の変化

$$V = 3 \times \pi ab^2/20$$

a : 長軸長 (μm)

b : 短径 (μm)

V : *S. costatum* の 1 鎖状群体の体積 (μm³)

②-2 LISST-100測定結果

図3-5にLISST-100による*S. costatum*培養株の測定結果を示す。

10 μm以下のサイズに関しては培養開始時から6.24 μmと8.69 μmの粒径で小さなピークがみられ、その傾向は死滅期まで続いた。10 μm以上のサイズに関しては培養開始時には16.84 μm付近に緩やかなピークがみられたが、32.7 μm以降の粒径範囲には粒子はほとんどみられなかった。しかし56時間後の対数増殖前期になると10.25-258.77 μmの粒子が増加し始め32.66 μm付近と157.47 μm付近でピークがみられた。75時間後の対数増殖期になると6.2 μmには12.4 μl/L、38.55 μm付近の粒径には5.2 μl/L、157.47 μm付近の粒径には3.9 μl/Lの緩やかなピークがみられるようになった。98時間後以降の死滅期に入ると100 μm以上の大型粒子の顕著な増加がみられ157.47 μmの粒径に75.3 μl/Lのピークがみられた。そのピークは118時間後には更に大きい粒径に移行し219.28 μmで110.0 μl/Lのピークが測定された。これは粒子が凝集を起こしより大型の粒径にピークが移行したためであると考えられる。また292.28 μmの粒径ではどの測定でも粒子が少なかった。

図3-6に顕微鏡観察による*S. costatum*培養株の計測結果を示す。

顕微鏡観察では0時間後ではピークは不明瞭であるが対数増殖期にはESD換算・長軸長換算共にピークがみられた。56時間後ではESDで14-16 μm付近に長軸長で50-60 μm付近にピークがみられ、75時間後にはそれぞれ18-20 μm、70 μm-90付近にピークがみられた。このピークはLisst測定での32.66 μmと38.55 μm付近を中

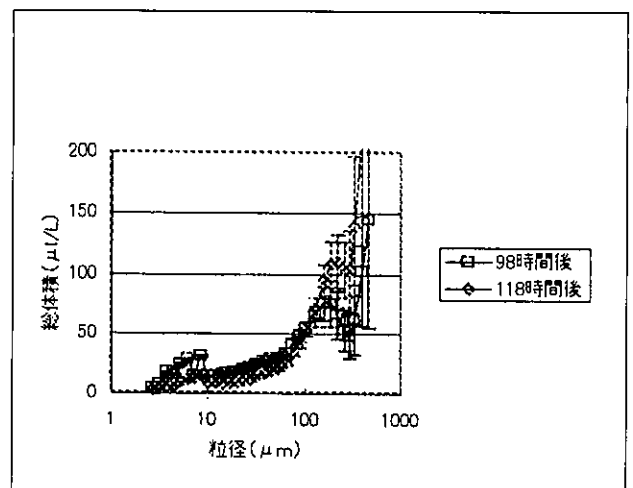
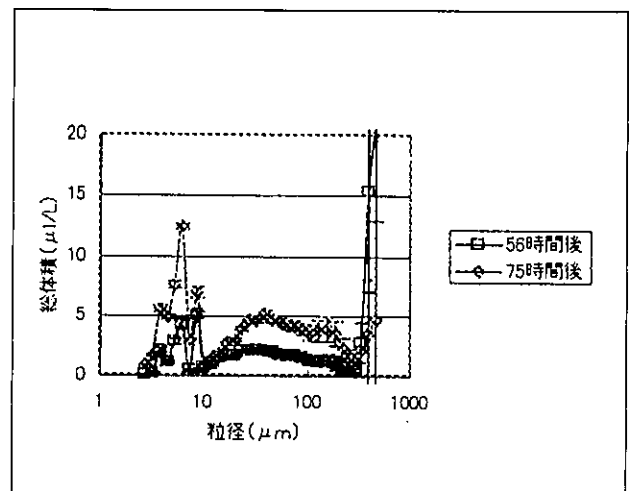
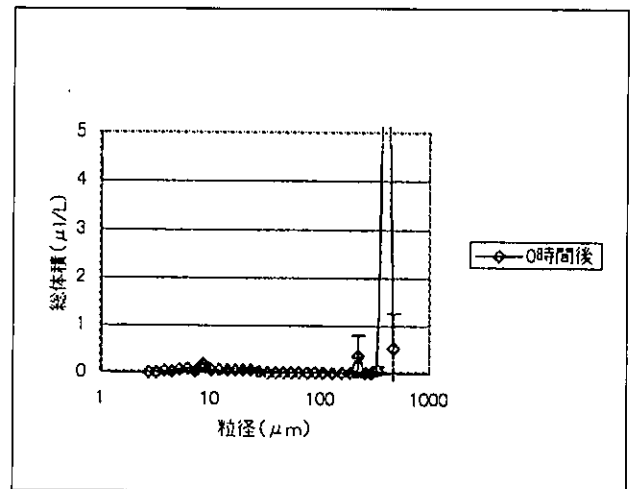


図3-5 : LISST-100による*S. costatum*の測定結果

心とした緩やかなピークを反映していると考えられる。98時間以降は凝集体への移行を反映して、ESDでは24 μm 以上、長軸長では150 μm 以上で体積の顕著な増加が観察された。これはLISST-100が認識した100 μm 以上の粒子の体積増加と一致していると考えられる。

3-4 考察

3-4-1 混合実験及び標準粒子添加実験

標準粒子添加実験から、塩分濃度が均一な場合では標準粒子はピークの検出が可能であり塩分濃度による差異はみられないことが分かった。しかしながらLISST-100の測定範囲の不明瞭な面も明らかになった。また混合実験から、塩分濃度が異なるものが混合条件下にあるときは測定が不能であり、現場データ、特に密度の大きく異なる海水が混合中であると考えられる海域のデータを取り扱う際には測定不能となりうる可能性が示唆された。

3-4-2 植物プランクトン培養実験

今回の一連の純粋培養実験で大きく分けて2つのことが示唆された。

一つは*P. minimum*のように球形に近く、しっかりとした構造を持った生物はそのピーク粒径・ピーク体積値ともに比較的顕微鏡計測結果に近い値を測定できることが分かった。これは赤潮時に単一種が優占していたときのデータと一致していた(鷲見・鋤崎, 2001)。また体積値に関しては、「ピーク値を基準とした方がよいのか正規分布の積算値を基準とした方がよいのか」という問題がある。今回は単一のピーク粒径の体積値のみの場合とピーク付近の積算体積値の場合との比較を試みた。ピーク体積値・積算体積値(12.01~19.88 μm)とともに顕微鏡計測結果と比例関係にあったものの傾きは1にならなかった。しかしピーク積算体積値を14.27 μm と16.84 μm の2粒径のみにすると傾きはほぼ1となり、その相関も良かった(図4-1)。

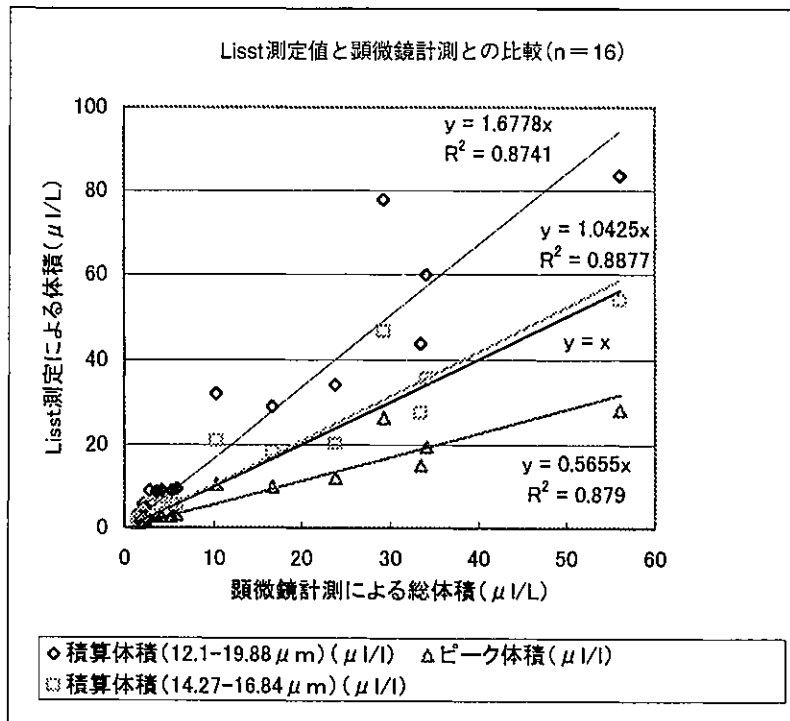


図4-1 : LISST-100と検鏡計測との比較

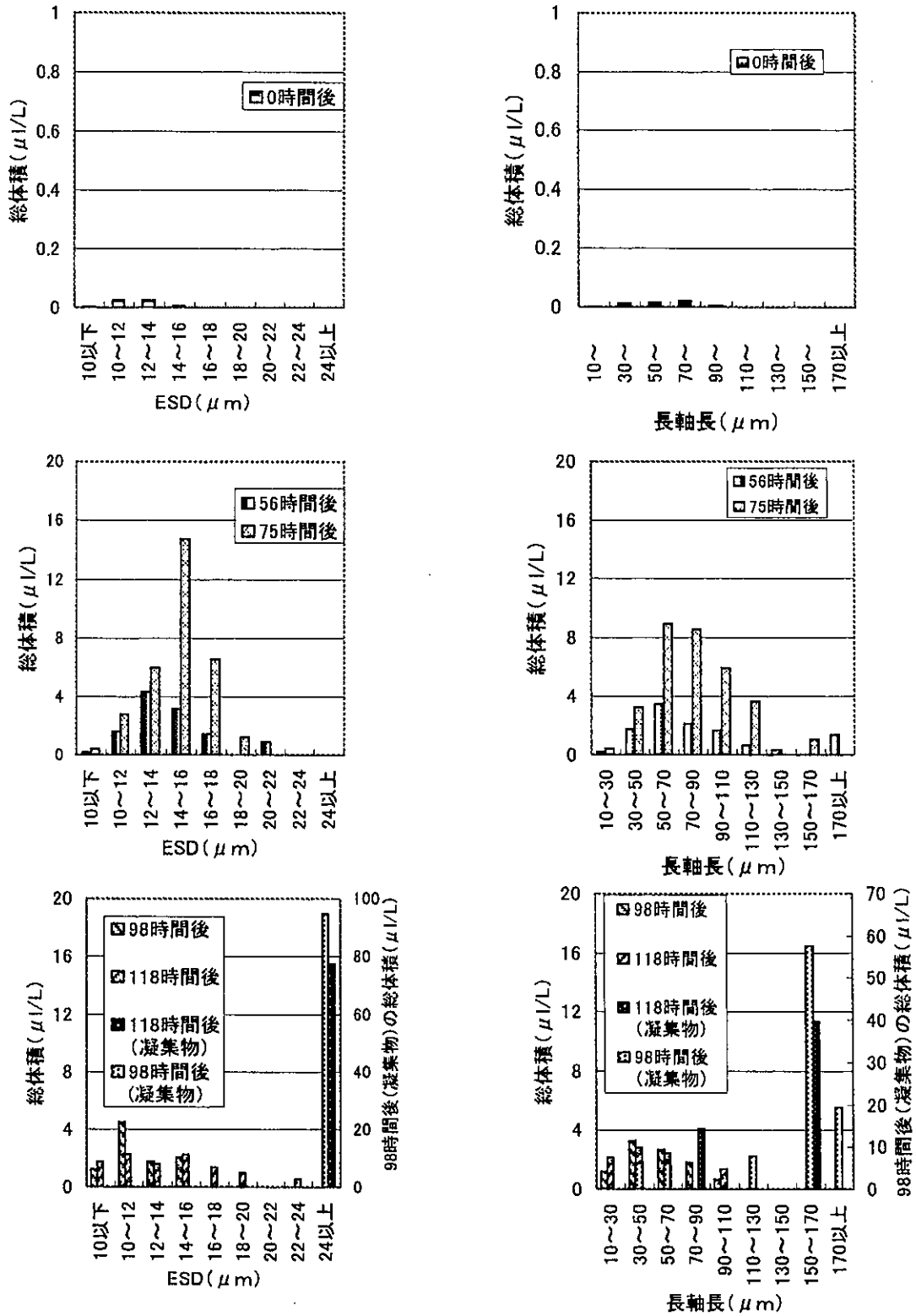


図 3 - 6 : *S. costatum* の顕微鏡計測結果

二つ目として *S. costatum* や *Chaetoceros spp* のような鎖状の有機物はそのピーク粒径・測定値ともに、顕微鏡観察のESDや長軸長を直接反映しているものではないと推測されるが、そのピークを検出することができることが分かった。依然としてどのような機構で実測されているかは不明瞭であるものの、おそらく *S. costatum* や *Chaetoceros spp* サイズの植物プランクトンは鎖状の単体では20~100 μ mの範囲に測定され、凝集体は100 μ m以上で測定されるものと推測できる。

また今回の鎖状珪藻類の培養実験では、10 μ m以下のサイズの粒子も無視できないレベルで存在していた。このサイズのものには珪藻を反映しているのかその他の微小有機物を反映しているのかどうかは現段階では分からない。また培養全体を通して292.28 μ mの粒径で粒子が少なくなる傾向がみられた。標準粒子添加実験でもみられた、これらの疑問点を解決するにはLISST-100の真の測定範囲を検証していかなくてはならないだろう。

4. まとめ

- 1) 密度の異なる海水の混合中には測定データが不安定になりやすく、測定不能となる可能性があり、データの取り扱いには注意を払う必要がある。
- 2) 植物プランクトンのような生物体に関しては、比較的球状のもの粒径分布はピークの位置

及び体積値は顕微鏡計測結果と同様なものが得られるが、鎖状群体を形成するタイプのものの粒径分布は10 μ m付近を中心に2分した粒径分布が得られる。

3) 10 μ m以下の小さいサイズ範囲及び290 μ m以上の大きいサイズ範囲のものは不明瞭なところがある。これは他のタイプのLISST-100でもみられる傾向である。

5. 今後の課題

今後の課題として下記の3つが挙げられる。

- 1) 真の測定可能範囲の決定
- 2) 鎖状群体を形成する生物の取り扱い
- 3) 他化学パラメーターとの相関

1) については10 μ m以下の小さいサイズ及び、250 μ m以上の大きいサイズの標準粒子を、各々数サイズ使用してキャリブレーションすることでより明瞭になると考えられる。また2) に関しては、球状以外の形状をもつ各生物種について培養実験を行い種毎にパターン化していくのがよいと考えられるが、時間と労働力の関係により、より効果的な案を模索している状態である。3) に関してはSBEの様な他測器との連携、及び化学分析で得られたSS・POCなどのデータとの関係を把握することで、現場でのLISST-100の使用がより応用性のあるものとなるだろう。

6. 参考文献

- 1) Agrawal, Y. C. and H. C. Pottsmith 2000 : Instruments for particle size and settling velocity observations in sediment transport, *Marine Geology*, Vol 168 pp. 89-114
- 2) Born, M., Wolf, E., 1980 : *Principles of Optics*. 6th ed. Pergamon, Oxford.
- 3) Johnson, B. D., K. Krack and D. K. Muschenheim 1994 : Physicochemical factors in particle aggregation in the *Biology of Particles in Aquatic Systems*, edited by R. S. Wotton. Lewis Publishers. pp. 75-96
- 4) J. W. Gartner et al. 2001 Laboratory and field evaluations of the LISST-100 instrument for suspended particle size determinations. *Mar. Geol.* 175 : 199-219
- 5) 宮井博 松崎加奈恵 小川数也 杉原拓郎 1988 植物プランクトンの形態に基づく種別生物量の簡易測定法. *Bull. Plankton Soc. Japan.* 35: 121-126
- 6) Sheldon, R. W. and T. R. Parsons 1967 : A practical manual on the use of the Coulter Counter in marine research. Fisheries Research Board of Canada.
- 7) 鷺見栄一 鋤崎俊二 2001 : 沿岸海域の懸濁態粒子の粒径分布の現地測定とアトリタス分布 *海洋工学論文集 第48巻 土木学会* 1101-1105
- 8) Traykovski, P., R. Latter and J. D. Irish 1999 : A laboratory evaluation of the laser in situ scattering and Transmissiometry instrument using natural sediments, *Marine Geology*, Vol. 159, pp. 355-367