

増殖モニターの開発 (第2報) — 後方散乱光を用いた濁度測定装置の光学的基本特性 —

許 正憲^{*1} 伊藤 富男^{*1} 臼井 久益^{*1}
辻 義人^{*1} 石川 正道^{*2} 中村 裕彦^{*2}

高圧・高温下で培養されている微生物の増殖状況を直接観察する方法として、レーザー光を微生物に照射し、散乱光強度を計測することにより微生物密度を算定する方法が検討され、その有効性については前回までの基礎的実験で確認された。

本報告では、このようなレーザー光を用いた散乱測定法を、実際に「深海微生物実験システム」に応用することを目的として、その実機設計に必要な光学系の基本的特性、既知形状の微小粒子（ラテックス粒子）についての散乱特性及び実際の微生物についての散乱特性を得るための実験を行った。

その結果、ラテックス粒子では 2×10^2 (個/ml) まで、微生物では 10^4 (cell/ml) まで検出可能であった。

キーワード：増殖モニター，微生物密度，濁度計測，後方散乱光，散乱光強度，
相対変動率

Development of Groth Monitor II — Optical fundamental characteristics of turbidimeter using back scattered light

Masanori KYO^{*3} Tomio ITOH^{*3}
Hisamasu USUI^{*3} Yoshito TSUJI^{*3}
Masamiti ISHIKAWA^{*4} Hirohiko NAKAMURA^{*4}

From the previous results of the fundamental experiments, we verified the efficacy of a method to estimate the microbes density by measuring its scattered light intensity against the LASER irradiation, of microbes cultivated under high pressure and high temperature.

* 1 深海環境プログラム推進課

* 2 三菱総合研究所

* 3 Office for Deepsea Environment Exploration Program Promotion

* 4 Mitsubishi Research Institute

This paper describes experiments to investigate the optical characteristics of the turbidimeter, scattered light characteristics of known size particles (LATEX) and real microbes, with the aim of application of the scattered light measurement method with LASER for "Deepsea Microbe Collection and Cultivation system".

The results showed that LATEX particles could be detected up to 2×10^2 (particles/ml), and microbes up to 10^4 (cell/ml).

Key words : Growth monitor, Microbes density, Turbidimetry, back scattered light, Scattered light intensity, Relative fluctuation rate

1 はじめに

高圧・高温下で培養されている微生物の増殖状況を、その培養環境条件を変えずに観察する方法として、レーザー光を微生物試料に照射し、試料が発する散乱光の強度を計測することにより微生物密度を算定する方法が検討されており、その有効性については前年度までの基礎的実験により確認されている¹⁾。

今回はこのようなレーザー光を用いた散乱計測法を実際に「深海微生物実験システム」のサブシステムである分離装置と培養槽に応用することを目的として、その実機設計に必要な光学系の基本的特性、既知形状の微小粒子（ラテックス粒子）についての散乱特性及び実際の微生物についての散乱特性を把握するための実験を行なった。

2 後方散乱光計測法

2.1 濁度計測法

培養液中の微生物は光学的には懸濁粒子であるから、入射光に対して散乱現象が生じる。この散乱の度合は培養液の濁度、すなわち、懸濁粒子数に依存する。よって、この散乱現象を利用して、懸濁粒子数（＝微生物密度）を算定することができる。

濁度計測法は透過光を計測する方法と散乱光を計測する方法に大分される。前者は懸濁粒子群の散乱現象による透過光の減衰量を計測するものであり、後者は散乱光量を直接計測するものである。さらに散乱光計測法には、入射光方向を基準に 0° 方向の散乱光（前方散乱光）、 90° 方向の散乱光（側方散乱光）、 180° 方向の散乱光（後方散乱光）を計測する方法がある（図1）。

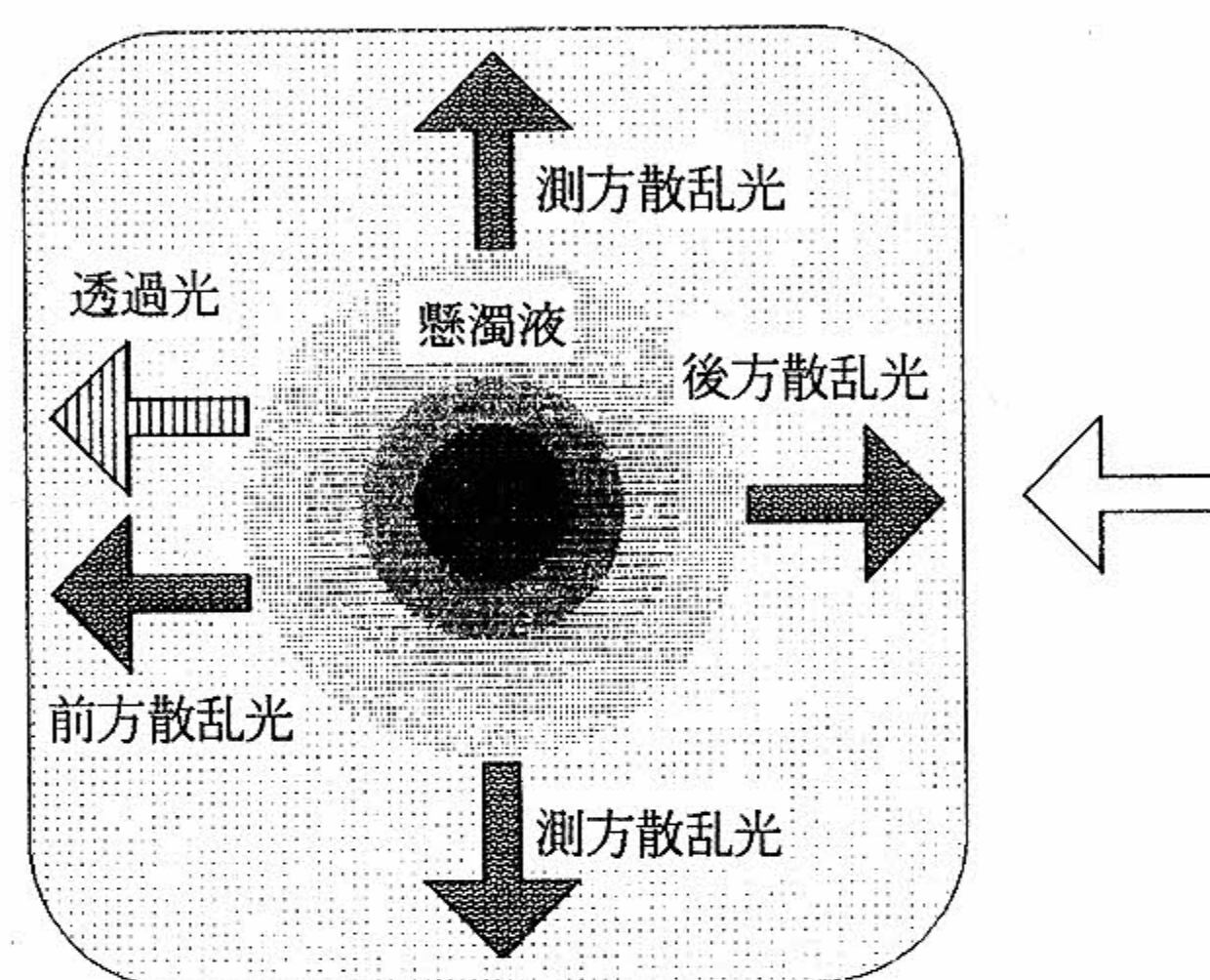


図1 濁度計測方式

Fig. 1 Methods of turbidimetry

透過光及び散乱光を利用した濁度計としては様々な種類のものが市販化されている。これらの代表的な製品例として、主にハック社のものを表1にまとめる。表中の NTU は濁度を表わす単位で、1 ppm のホルマジンの濁度を 1 NTU とし、これを標準にそれぞれの懸濁液の濁度を表わす。ホルマジンでは 1 NTU が 1 mg/l に相当する。また、透過光方式の製品については濁度を用いたメーカーカタログ値が無かったため、吸光度値を載せた。

実際にこれらの計測装置を並べて、同一の懸濁液にて性能を比較していないので、正確にその優劣を決定することはできないが、一般的には透過光計測法より、散乱光計測法の方が低濃度懸濁液の計測に適している。また、表1に示す散乱光計測法の中で、側方散乱光法が精度が高く、前方散乱光法がこれにつづく。後方散乱光を計測する方

表1 濁度計の製品例

Table 1 Manufactured examples of turbidimetry

方式	製品例	計測範囲(分解能) (単位: NTU)
前方散乱光	ハック社 RATIO 濁度計(18900)	0~2(0.01), 0~20, 0~200
	ハック社 RADIOXR 濁度計(43900)	0~2(0.001), 0~20, 0~2000
側方散乱光	ハック社 低レンジ濁度計(1720)	0~100(0.0001)
	ハック社 ポータラボ濁度計(1680)	0~1(0.01), 0~10, 0~100
	ハック社 卓上型濁度計(2100A)	0~0.2(0.01), 0~1, 0~10, 0~1000
後方散乱光	ANALITE社 超小型濁度計(156)	0~500
透過光	Pharmacia社 LKB Novaspec	-0.300~3.000(A)*

* A: 吸光度

法としてはハック社のものがなく他社の製品を例に挙げたが、他に比べてかなり性能が劣る。

2.2 後方散乱光計測方式の選定理由

「深海微生物実験システム」の分離装置及び培養槽では、高圧・高温環境下で微生物の培養を行なうため、微生物試料の濁度計測も高圧・高温環境下で可能でなければならない²⁾。本システムでは、この濁度計測装置を増殖モニターと呼ぶ。

増殖モニターの設計を開始するにあたり、まず、濁度計測方式として上述のいずれを採用するかを

検討しなければならない。表1によれば、種々の濁度計測法の中で、側方散乱光方式が性能的には優れているが、分離装置及び培養槽へ装備することを考慮に入れば、後方散乱光方式が最も望ましいといえる。後方散乱光方式の増殖モニターを分離装置に装備した概念図を図2に示す。

増殖モニターの詳細な計測原理は後で述べるが、概略としてはレーザー光源で生成される2本のレーザー光が光ファイバー、レンズ部を経由して、セル内で集光される。入射するレーザー光に対する

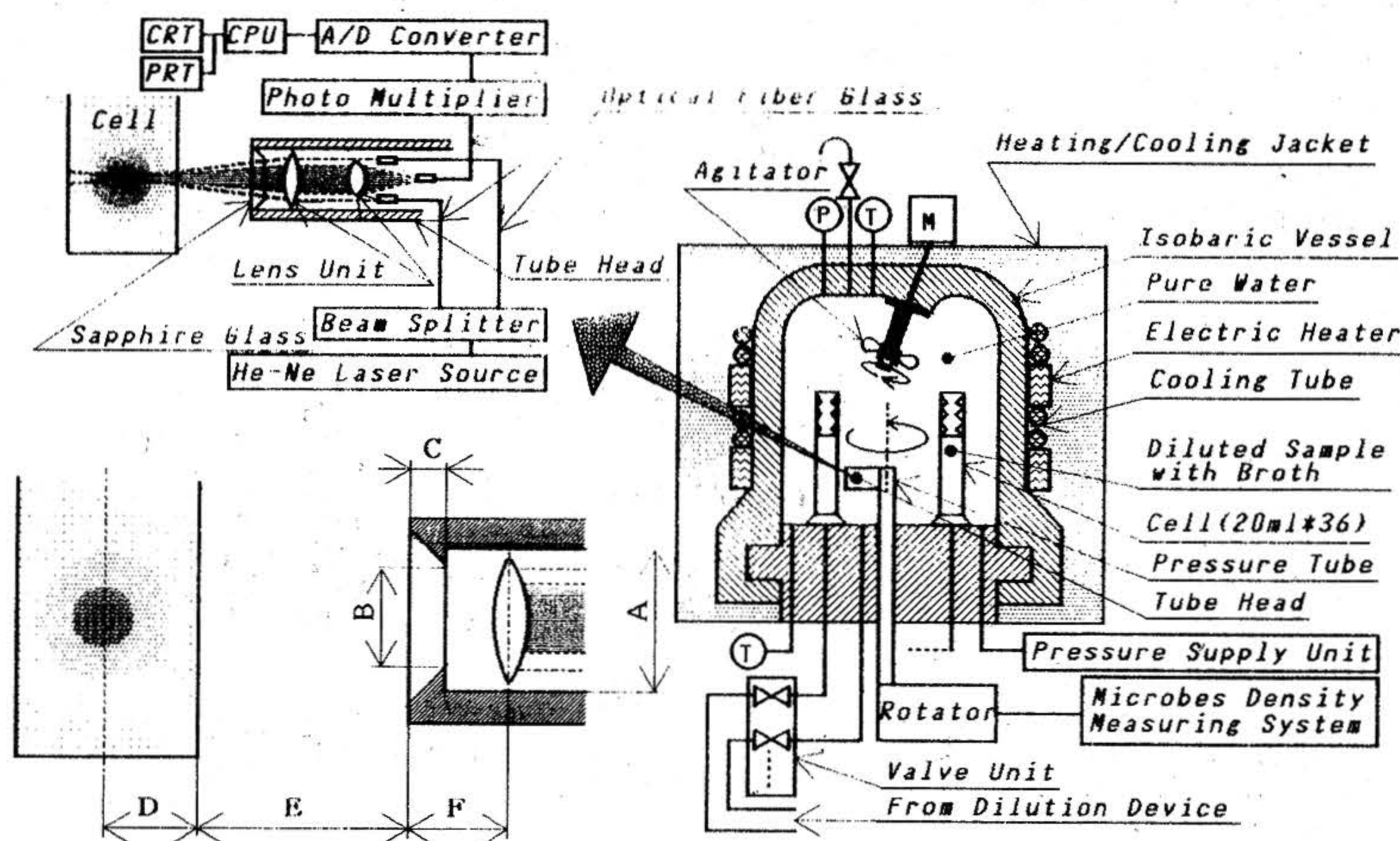


図2 増殖モニター概念図

Fig. 2 Schematic diagram of growth monitor

懸濁液の散乱光は再びレンズ部で集光され、光ファイバーを経由して、光センサーでその強度が検出され、CPUにて処理される。ここで、レーザー光源、光センサー、CPU等は常圧・常温環境下で使用するもので、分離装置、培養槽からは十分離れた位置に設置される。高温環境下で使用するのはレンズ部のみで、レンズ部と光源部間及びレンズ部と受光部間は、それぞれ光ファイバーで接続される。圧力については、培養槽の場合、加圧槽壁面に耐圧窓を設け、レンズ部は加圧槽外の常圧環境下で使用する。しかし、分離装置の場合、加圧槽内に円周状に配置された36本のセル内の試料を観察するために、レンズ部は耐圧チューブに覆われ、加圧槽内に装備される。また、この耐圧チューブは周囲のセルに向けられるように旋回可能でなければならない。よって、耐圧チューブ内に納めるレンズ部品は最小限にとどめる必要がある。

さて、後方散乱光以外の方式では入射光用のレンズ部と受光用のレンズ部が分離されるので、耐圧チューブを2本準備する必要がある。かつ、この2本の耐圧チューブはお互いのレンズ光軸を変えることなく旋回しなければならないから、装置全体としてはかなり複雑で大型になる。これに対して、後方散乱光方式は耐圧チューブを1本にすることができるので、本システムの増殖モニターとしては最も有効であるといえる。よって、増殖モニターの濁度計測方法として、後方散乱光方式について検討を進めていく。

3 濁度計測装置の試作^{3), 4), 5)}

3.1 計測原理

「深海微生物実験システム」で使用する増殖モニターの設計を行なうにあたり、光学的な諸特性を把握し、設計に必要な種々のデータを取得しなければならない。このために簡易濁度計測装置を試作し、実験を行なった。

計測装置の構成を図3に示す。原理は以下の通りである。

He-Neレーザー光源から出たレーザー光は、レーザー光分割器で2本の平行光線に分割され、切換式NDフィルターを透過する。切換式NDフィルターではレーザー光の光量が調整可能である。

光量調整されたレーザー光は、直角反射プリズム(A)によりそれぞれ異なる直角方向に曲げられ、レーザーフォーカシング光ファイバーホルダーを通して光ファイバーに導かれる。光ファイバーを経由したレーザー光は、光ファイバーホルダーを経由して、それぞれの直角反射プリズム(B)に入射する。この2個のプリズムを調整することにより、2本のレーザー光の平行度及びビーム間距離を変えることができる。

再び平行光線となった2本のレーザー光は光エネルギー密度を増すために、レンズ(A)により集光され、懸濁液を含んだセル内で焦点を結ぶ。

懸濁液はレーザー光の照射に対して、ある指向性をもった散乱光を発生する。この散乱光のうち後方散乱光のみが、絞りを透過し、レンズ(B)で集光され、光ファイバーホルダー及び光ファイバー

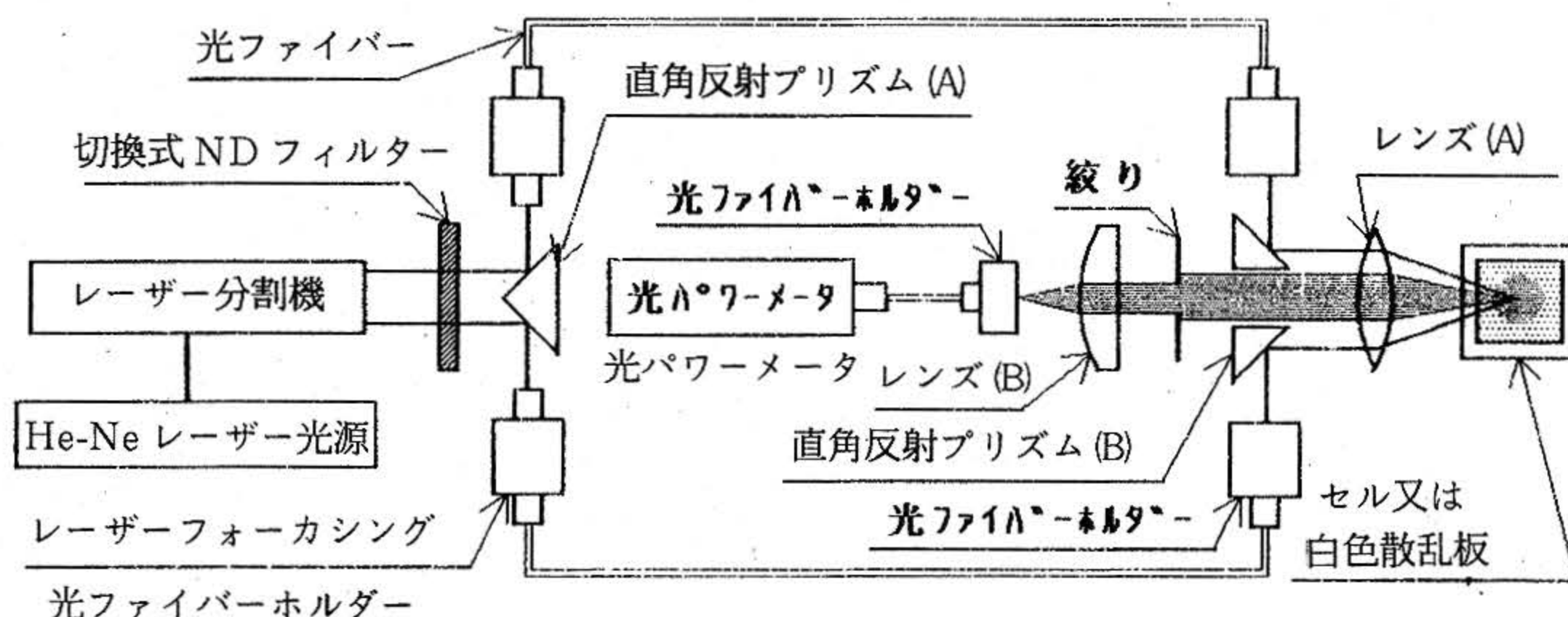


図3 後方散乱光式濁度計測装置概念図

Fig. 3 Schematic diagram of turbidimetry system using back scattered light

を經由して最終的に光パワーメータに導かれ、光強度が計測される。

懸濁粒子密度が増加すれば散乱光強度も増加するので、両者の相関が把握できれば、散乱光強度を測定することにより粒子密度を算定することができる。

3.2 構成品

現在、計画中の分離装置・培養槽において、増殖モニター設計に関連する箇所の寸法を表2にまとめる。表中の寸法記号は図2に示す記号に対応する。

本計測装置で用いる構成品はなるべく実機に転用可能なものが望ましいので、表2に示す寸法の制約条件を十分考慮にいて選択しなければならない。

以下に本計測装置の構成品を示す。

① He-Ne レーザー光源：NEC 社製，型番 GLG 5601。波長 632.8nm，レーザー出力は 15mW である。

② レーザー光分割器：カノマックス社製レーザー流速計（型番 model-1881）のプロープの一部を使用した。本プロープは He-Ne レーザー光源から出射された 1 本のレーザー光を 2 本に分割するもので、15mW の入力に対して、プロープから出力される光は約 1 mW となる。

③ 切換式 ND フィルター：シグマ社製，型番 Σ -78K。レーザー光分割器で 2 分された 2 本のレーザービームの光量を調整するためのもので、透過率が 10 % ～ 92 % までの 9 種類のフィルター

($\phi 15 \times t2\text{mm}$) を装備している。9 枚のフィルターは円周上に配列され、これをリボルバー式に回転させることにより、それぞれの透過率を選択できる。

④ 直角反射プリズム (A)：シグマ社製，型番 RPB 4-20-550。直角をはさむ 2 面に反射膜が蒸着されており，レーザー光分割器からでた 2 本のレーザー光をそれぞれ直角に曲げるために用いる。プリズムはマグネットベース付きプリズムホルダーに固定され，高さ調整と回転調整が可能である。

⑤ レーザーフォーカシング光ファイバーホルダー：シグマ社製，型番 Σ -77F。レーザー光を集光して，光ファイバーに導入するためのもので，FC 型コネクタ（NTT 仕様）付きの光ファイバー取り付け部と 10 倍の対物レンズで構成されている。対物レンズ光軸とコネクタ中心の相対位置については，前後微調整，上下微調整，あおり微調整が可能である。また，ホルダーはマグネットベースに取り付けられ，全体として高さ調整，回転調整，あおり調整が可能である。

⑥ 光ファイバー：モリテックス社製，コア径 200 μm ，長さ 5 m である。ファイバー先端部は FC 型コネクタに着脱可能な加工がされている。

⑦ 光ファイバーホルダー：シグマ社製，型番 Σ -60FP-(2)。光ファイバーを固定し，光ファイバーを經由してきたレーザー光を開口部より出射するもので，FC 型コネクタ（NTT 仕様）付きの光ファイバー取り付け部から構成されている。コネクタ中心の位置については，左右微調整，上下

表2 寸法制約条件
Table 2 Limitation of size.

項目：寸法記号	分離装置 (mm)	培養槽 (mm)
耐圧チューブ 内径：A	$\phi 15$	—
サファイア耐圧窓有効径：B	$\phi 6$	—
サファイア耐圧窓厚さ：C	8	—
セル中心-セル外壁間距離：D	10	60
セル外壁-耐圧窓外壁間距離：E	150	90
耐圧窓外壁-レンズ 中心距離：F	50	30

微調整, あおり微調整が可能である。また, ホルダーはマグネットベースに取り付けられ, 全体として高さ調整, 回転調整が可能である。

⑧ 直角反射プリズム (B): シグマ社製, 型番 RPB3-10-550。プリズム斜面に反射膜が蒸着されており, 光ファイバーホルダーから出たレーザー光を直角に曲げ, レンズ (A) に導くために用いる。プリズムはマグネットベース付きプリズム微動ホルダーに固定され, 高さ調整, 回転調整, 傾斜調整が可能である。また, ここでは2個のプリズム間距離を微調整するために, 精密 X 軸ステージを設けている。

⑨ レンズ (A): シグマ社製, 入射する2本のレーザービームをセル内で結像するためのものである。2本のレーザービーム間距離及びセルとレンズ間距離を変化させるために, レンズ径 (焦点距離: 型番) がそれぞれ 10mm (100mm: SLSQ-10B-100P), 20mm (150mm: SLSQ-20B-150P), 25mm (200mm: SLSQ-25B-200P), 30mm (250mm: SLSQ-30B-250P), 20mm (50mm: SLSQ-20B-50P), 20mm (100mm: SLSQ-20B-100P) のものを準備した。また, レンズ (A) はマグネットベース付同軸レンズホルダーに固定され, 高さ調整, 回転調整が可能であるとともに, レンズ光軸を変えずに各レンズの交換ができる。

⑩ 絞り: シグマ社製, 型番 Σ -55。特定領域の散乱光のみを光パワーメータに透過させるためのもので, 開口部の直径が $\phi 1 \sim \phi 30$ (mm) まで連続的に調整可能である。絞りはマグネットベースに取り付けられ, 高さ調整, 回転調整が可能である。

⑪ レンズ (B): シグマ社製。絞りを透過した散乱光を集光し, 光パワーメータ用の光ファイバーホルダーに導くものである。レンズ (B) と光ファイバーホルダー間距離を変化させるため, レンズ径 (焦点距離: 型番) がそれぞれ 5mm (10mm: SLQ-05-10P), 5mm (20mm: SLQ-05-20P), 10mm (50mm: SLSQ-10-50P), 10mm (100mm: SLSQ-10-100P), 20mm (100mm: SLSQ-20-100P) のものを準備した。また, レンズ (B) はマグネットベース付同軸レンズホルダーに固定され, 高さ調整, 回転調整が可能であるとともに, レンズ光軸を変えずに各レンズの交換ができる。

⑫ 光パワーメータ: 安藤電気社製, 型番 AQ-1135E (センサーはAQ-1966)。散乱光強度を計測するものである。波長範囲 400~1100nm (中心波長 850nm) の光を -90~0 dBm (分解能 0.001dBm) まで検出可能である。

⑬ セル: ハリオ社製。パイレックスガラス製セルで, 中に懸濁液を入れる。寸法は幅 33mm×奥行 33mm×高さ 96mm×肉厚 1mm である。

⑭ ラテックス粒子: Duke Scientific Corp (米国) 社製。粒径が $9.870 \pm 0.057 \mu\text{m}$ で, 波長 589nm の光に対する屈折率が 1.59 のポリスチレン粒子である。懸濁液としては, まず 3×10^6 個/ml の濃度に調合し, これを基準に逐次, 希釈して低濃度の懸濁液をつくる。

4 実験

4.1 光学系の基本特性実験

図3に示す測定装置の光学系基本特性を把握するために, 以下の実験を行なった。これらの実験では光学系の基本特性をより正確に把握するために散乱対象物として, ラテックス粒子懸濁液を含んだセルではなく, 白色散乱板を用いている。

4.1.1 ガラス板傾きの影響

本測定装置を「深海微生物実験システム」で使用するためには光学部品の一部を耐圧チューブ内に装備しなければならない。このため耐圧チューブには光が透過できるよう耐圧ガラス窓を設ける必要があり, このガラス表面での反射や, ガラス内部での吸収が光学系の設計に大きく影響すると考えられる。

そこで, レンズ (A) と白色散乱板の間に石英ガラス板を設置し, このガラス板を回転させ, それぞれの位置において, 白色散乱板からの散乱光強度を計測した。この結果を図4に示す。

図4において, 縦軸は散乱光強度を横軸はガラス板の回転角度を表わす。また, 点線は入射光をその焦点位置で直接計測した値で, 実線はガラス板を置かずに白色散乱板からの散乱光強度を計測した値である。よって, これらはガラス板の回転角度に関係なく一定である。

本実験を行なう前に, ガラス板を回転させ, 入射光がガラス板を透過せずにガラス表面で全反射して, 受光部にはいる状態にした。このときの光

度計測値を一点鎖線で表わす。このガラス板反射光（一点鎖線）は入射光（点線）に比べて、約5dB低くなるが、ガラス板無しの散乱光（実線）よりも25dBも高くなる。よって、この状態では白色散乱板からの散乱光はガラス板反射光に埋もれて、計測不可能となる。

そこで、ガラス板を鉛直軸に対して約2°倒した結果、十分、ガラス板反射光を避けることができた。よって、本実験では、ガラス板を鉛直軸に対して約2°倒した状態を基準に、鉛直軸に対してガラス板を回転させて計測を行なった。この結果を図4の○で表わす。図4に見られるように、鉛直軸に対して15°程度まで回転させても、散乱光強度は約0.6dBしか変化せず、また、ガラス板無しの散乱光に比べても減衰量は約0.5dBであり問題ない。

4.1.2 測定点位置と散乱光強度の関係

白色散乱板をレンズ焦点位置に対して前後方向に移動させ、レンズ焦点位置付近での位置による散乱光強度の変化を調べた。この結果を図5に示す。

図5において、縦軸は散乱光強度を、横軸はレンズ(B)と白色散乱板間の距離をそれぞれ表わす。実験は焦点距離が150mm、250mmのレンズを用いて行い、それぞれの結果を●、○で表わす。

図5に見られるように、定性的には、いずれのケースとも散乱光強度は焦点位置で山形のピークとなり、焦点位置をはずれた位置では後方が前方よりも急峻に減衰している。

しかし、定量的には、2つの相違点がみられる。第1に、焦点距離が短いほど、ピークの幅が小さくなる。実際、ピークの後方側で比較すれば、焦点距離250mmの場合、焦点位置より10mmずれると、ピーク値に比べて10dBの減衰だが、焦点距離150mmの場合、約15dBの減衰となる。この原因として、焦点距離が短い方が焦点深度が浅く、また、ビーム交差角が大きくなるため測定位置依拠性が顕著になることが挙げられる。第2に、焦点距離が短いほど、最大散乱光強度が大きくなる。実際、焦点距離150mmの最大散乱光強度は焦点距離250mmのに比べて約4.5dB大きくなる。この原因としては、焦点距離が短い方が計測可能な立体角が大きくなるため、散乱光のサンプリングボリューム

ムが増えることが挙げられる。

4.1.3 レーザー光強度と散乱光強度の関係

NDフィルタの吸収率を切り換えることにより、入射レーザー光強度を変化させ、検出される散乱光強度にどのような影響が表われるかを調べた。この結果を図6に示す。

図6において、縦軸は散乱光強度を、横軸はレーザー光出力をそれぞれ表わす。実験は2回行い、それぞれの結果を○（1回目）、●（2回目）で表わす。

図6に見られるように、散乱光強度はレーザー光強度にほぼ比例して増加する。ただし、1回目と2回目の計測では多少のデータのばらつきが見られる。この原因としてはレーザー光の出力変動、NDフィルタの誤差、計測時間に依存する計測系の安定度が考えられる。もっとも、デシベルに換算すれば、その差は0.5dB以下であり、計測の再現性としては十分、信頼できる。

4.1.4 絞り開口面積と散乱光強度の関係

絞りを開閉することにより、散乱光の透過面積を変化させ、検出される散乱光強度にどのように影響するか、特に、散乱光以外の不要な光、例えば、入射光の直接反射光等が受光部に影響するか調べた。この結果を図7に示す。

図7において、縦軸は散乱光強度を、横軸は絞りの開口面積をそれぞれ表わす。実験は2回行い、それぞれの結果を○（1回目）、●（2回目）で表わす。また、点線は2個のプリズム間距離（15mm）を直径とする円の面積を示し、一点鎖線はレンズ(B)の直径（φ20mm）に相当する円の面積を示す。

図7に見られるように、絞りを開くにともない、検出される散乱光強度は増加するが、急激に増大することはない。よって、散乱光以外の不要な光は受光していないといえる。

また、絞り開口面積と散乱光強度は線形な相関ではなく、特に開口面積が点線より大きくなる時点から、カーブの傾きが小さくなる。この理由として、入射光に対する懸濁液の散乱光に指向性があることも考えられるが、それよりも、測定装置のレイアウト上、散乱光の一部がプリズム(B)に遮られていたことが第1に考えられる。散乱光は2個のプリズム(B)の間を透過し、絞りでその一

部を遮光され、光パワーメータで光強度を計測される。よって、絞り開口径をプリズム間距離より

大きくしても、散乱光の一部はすでにプリズムで遮られ、計測には寄与していないためである。

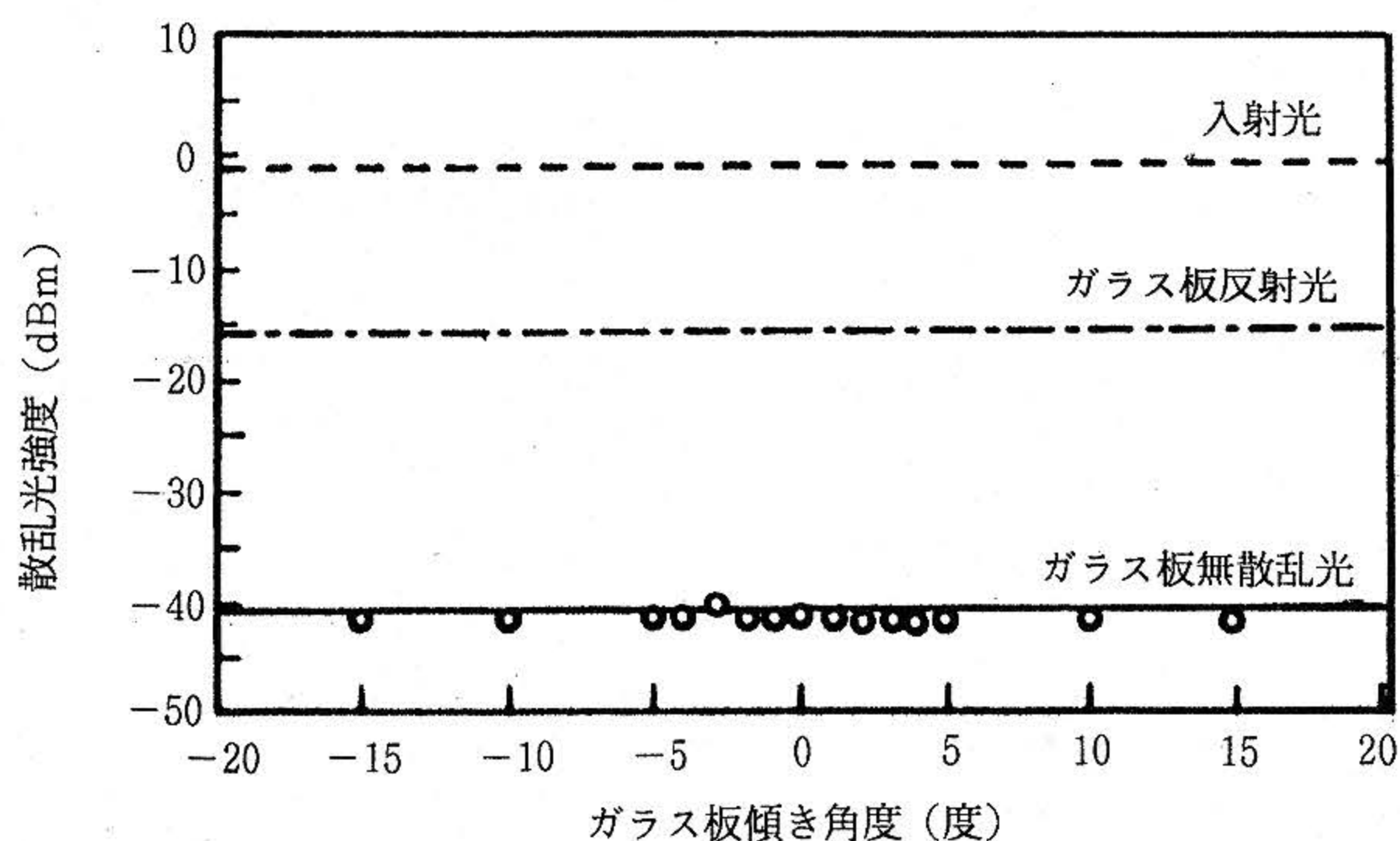


図4 ガラス板傾きと散乱光強度の関係

Fig. 4 Correlation between glass plate angle and scattered light intensity

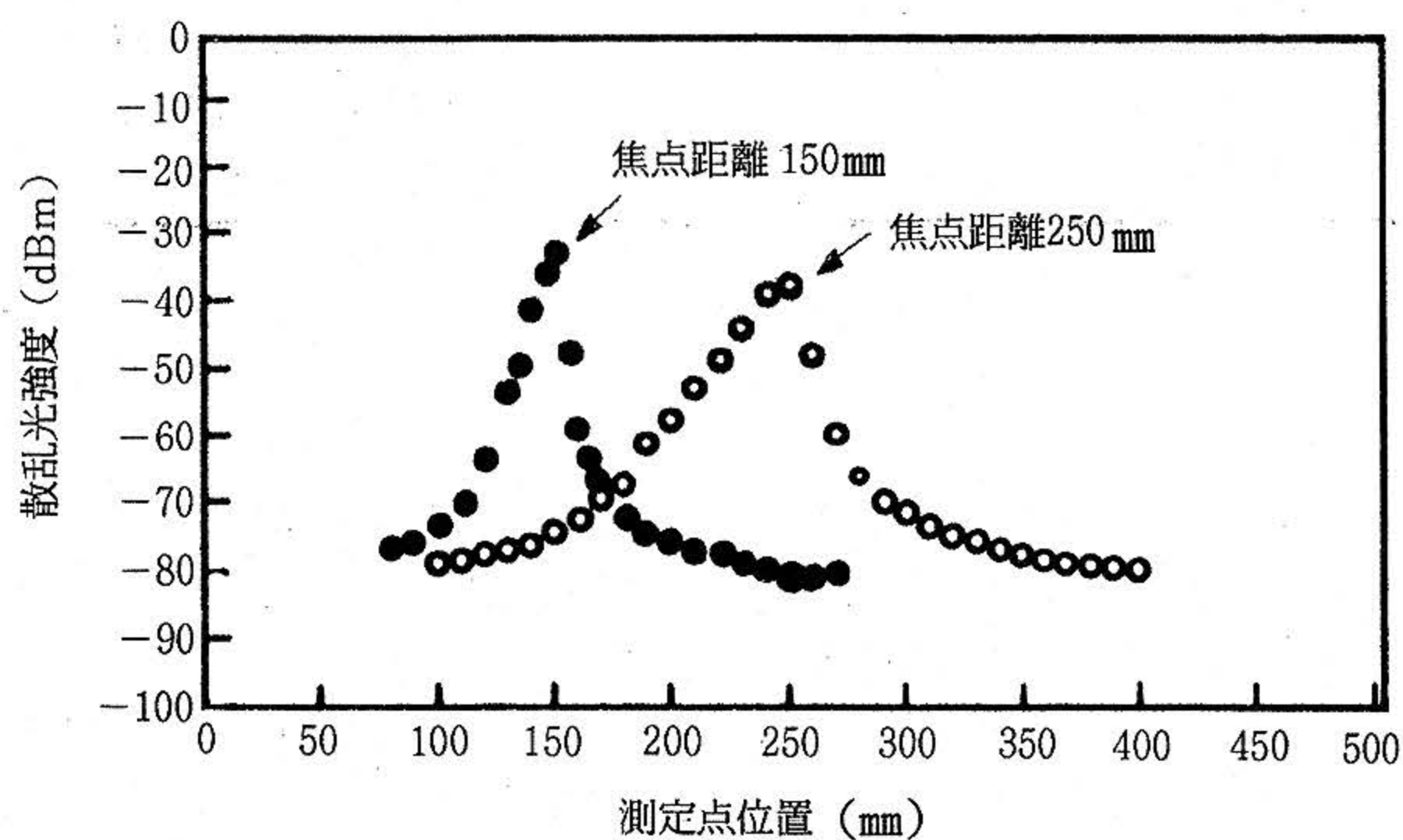


図5 測定点位置と散乱光強度の関係

Fig. 5 Correlation between measurement point and scattered light intensity

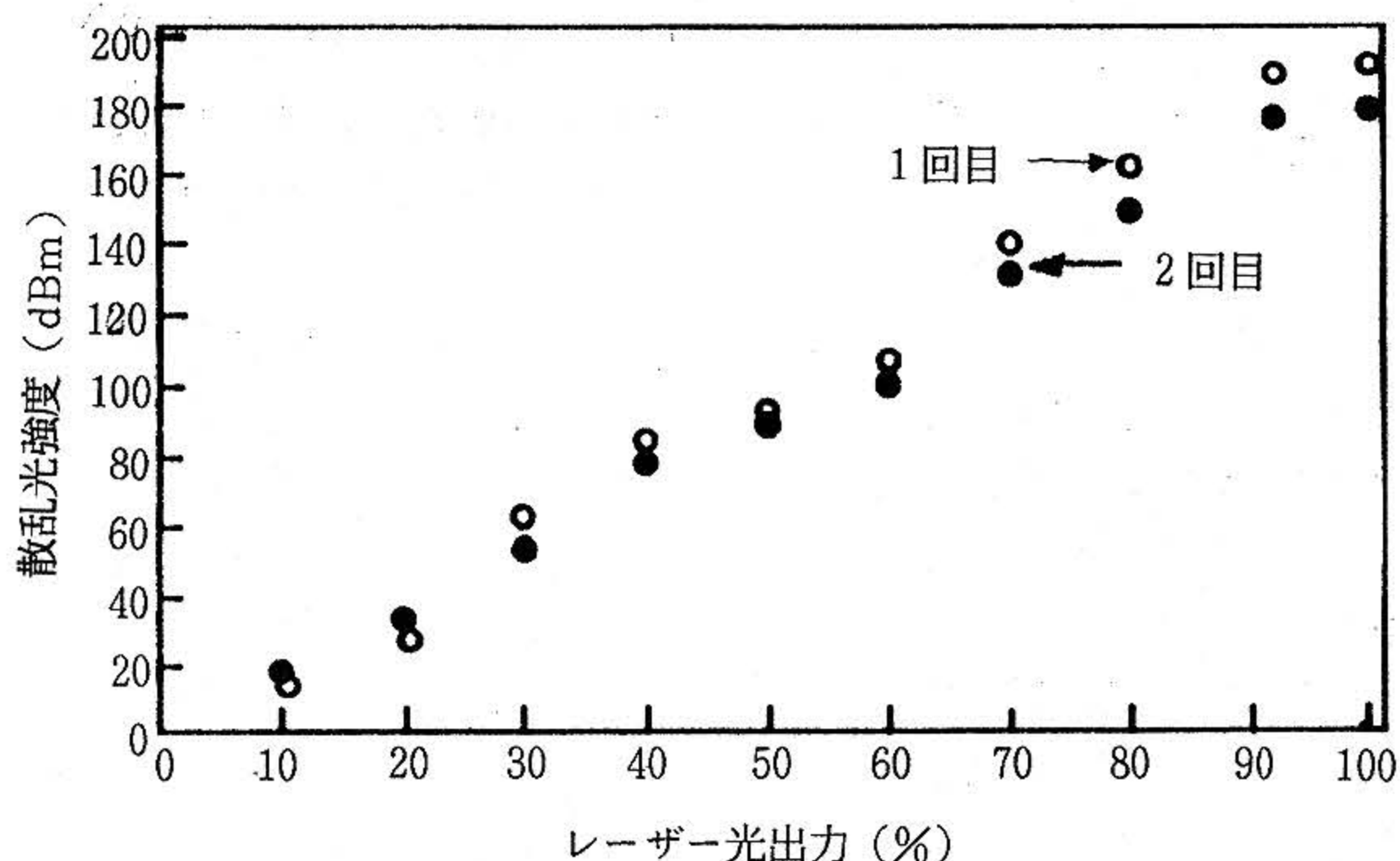


図6 レーザー光と散乱光強度の関係

Fig. 6 Correlation between LASER beam intensity and scattered light intensity

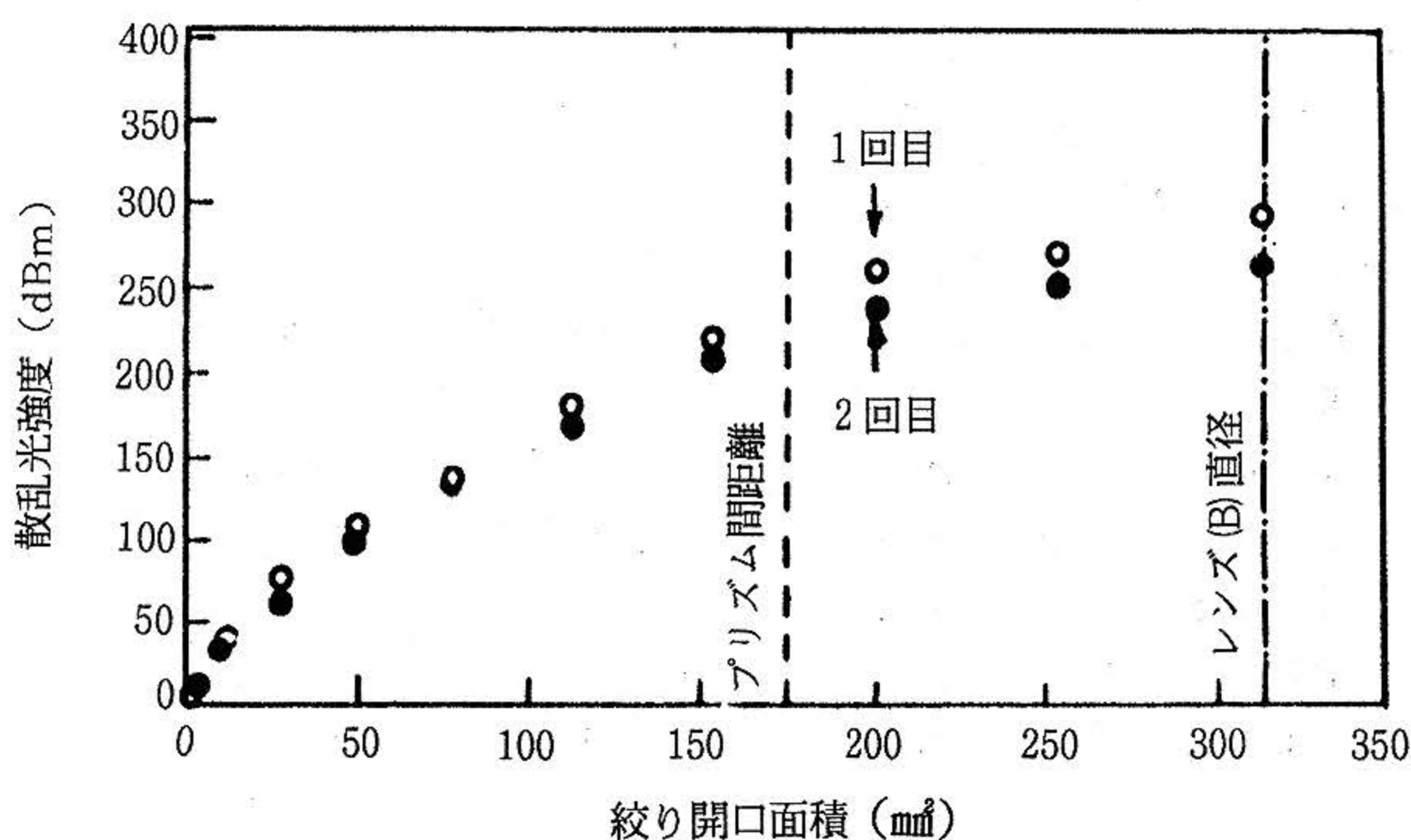


図7 絞り開口面積と散乱光強度の関係

Fig. 7 Correlation between open area of a stop and scattered light intensity

4.2 ラテックス粒子による散乱計測実験

図3に示す計測装置において、散乱対象物をラテックス粒子（直径 $10\mu\text{m}$ ）懸濁液に変え、その散乱特性を把握するために、以下の実験を行なった。

4.2.1 測定点位置と散乱光強度の相関

4.1.2の実験に対して、散乱対象物を白色散乱板からラテックス粒子懸濁液に変えたことによる効果について調べた。この結果を図8に示す。

図8において、縦軸は散乱光強度を、横軸はレンズ(A)とセル中心間の距離をそれぞれ表わす。

実験は焦点距離が100, 150, 200, 250mmのレンズ(A)を用いて行い、それぞれの結果を●, ○, ▲, △で表わす。

図8に見られるように、白色散乱板（図5）と類似したカーブを示しているが、相違点として3つ挙げられる。第1に最大散乱光強度を示すピーク位置が焦点位置よりも後方にずれること、第2にレンズ(A)の焦点距離が長くなるほどピーク位置と焦点位置とのずれが大きくなること、そして、第3にピーク幅が広くなり、ピーク形状がなめらかになることである。これらの原因としては、ラ

テックス粒子懸濁液の散乱特性以外に、セルのガラス壁や水による屈折・反射が複雑に絡み合っていると考えられる。

4.2.2 懸濁液濃度と散乱光強度の関係

ラテックス粒子懸濁液の濃度を変え、そのときの散乱光強度を計測し、懸濁液濃度と散乱光強度との関係を調べた。この結果を図9に示す。

図9において、縦軸は散乱光強度を、横軸はラテックス粒子懸濁液の濃度をそれぞれ表わす。各濃度の計測結果を○で表わす。計測は濃度が 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 (個/ml) の4種類の懸濁液について行い、これらの計測点から外挿した実験曲線を実線で表わす。また、実直線はラテックス粒子を含んでいない水のみをセル内に入れて計測した結果であり、これが水のバックグラウンドノイズ(BGN)となる。

図9に見られるように、水のBGNは約-71dBmとなる。計測は濃度が 10^3 (個/ml) の懸濁液までしか行っていないが、外挿される実験曲線と水のBGNとの交点より、直径 $10\mu\text{m}$ のラテックス粒子懸濁液の散乱光強度検出下限となる濃度は、約 3×10^2 (個/ml) 程度である。

また、懸濁液濃度と散乱光強度との関係は線形ではなく、濃度が高くなるほどその勾配は小さくなる。よって、高濃度域では散乱光強度が飽和して、懸濁液濃度を算定するのが困難となる。この原因としては、単位容積中の粒子数が増えても、

実際には粒子どうしが重なり合い、入射光に対して影になる粒子が増え、散乱光には寄与していないことが考えられる。図9よりその上限は 10^7 (個/ml) 程度と見られる。

これらにより、直径 $10\mu\text{m}$ のラテックス粒子懸濁液の散乱光強度検出可能な濃度範囲はおよそ $3 \times 10^2 \sim 10^7$ (個/ml) となる。

4.2.3 懸濁液濃度と散乱光強度変動率の相関

4.2.2の実験より、上述の結果の他に濃度が低下すると、散乱光強度の値が安定せず、周期的な大きな変動を示すことがわかった。4.2.2ではこの変動する値を平均化(5分間の平均値)として用いているが、ここでは変動する波形の最大値と最小値の差分をこの平均値で除した相対変動率を求めて整理した。この結果を図10に示す。ここで用いたデータは図9のものと同一である。

図10において、縦軸には散乱光強度と相対変動率を、横軸はラテックス粒子懸濁液の濃度をそれぞれ表わす。また、各濃度の散乱光強度を●で、相対変動率を○で表わす。

図10に見られるように、懸濁液濃度と相対変動率には負の相関がある。この原因として、微小粒子は液中でランダムな運動をしており、特定サンプリングボリューム内の粒子数は常に変動している。濃度が低下した場合、全体の散乱光強度に対して、1粒子に依存する割合が高くなるので、

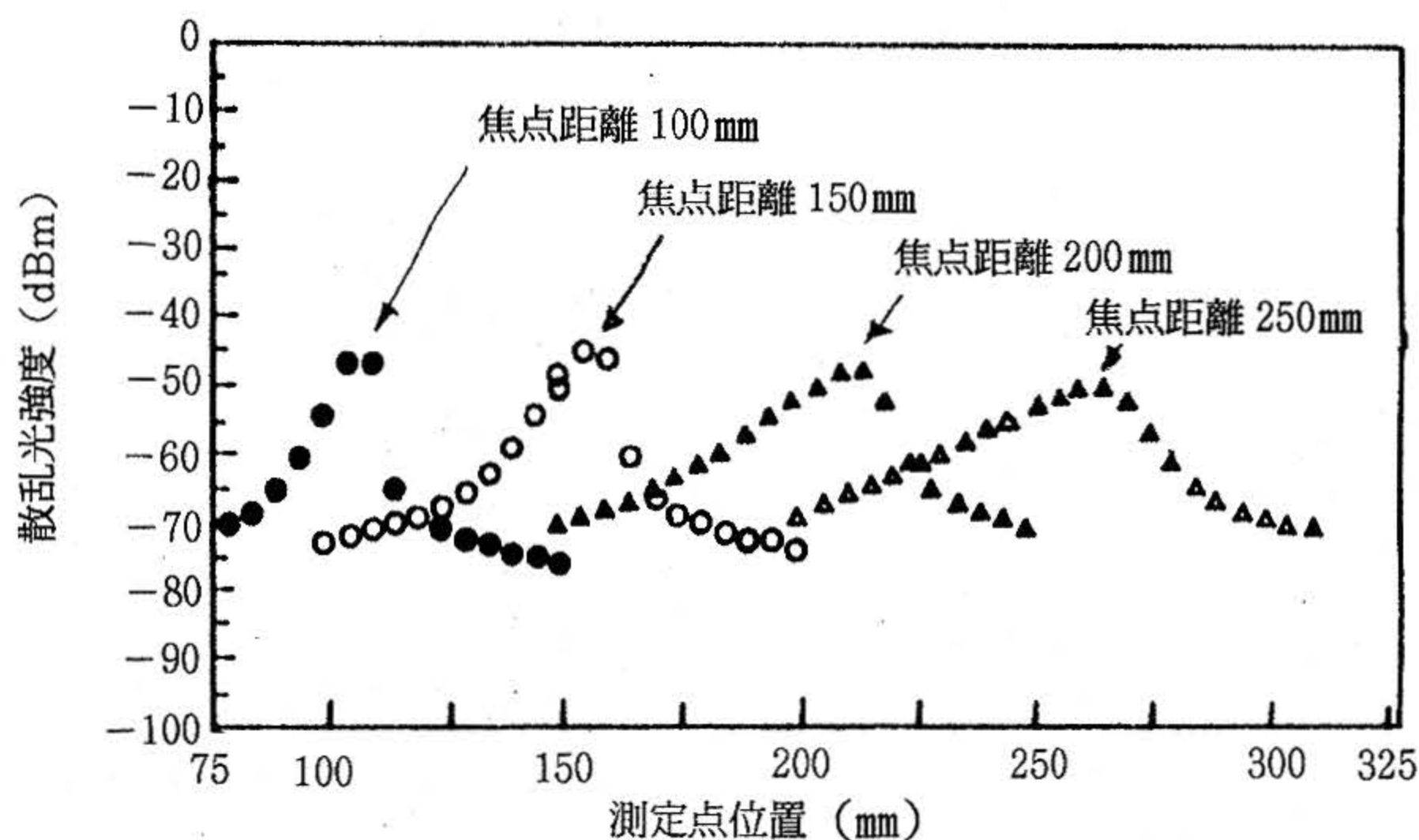


図8 測定位置と散乱光強度の関係

Fig. 8 Correlation between measurement point and scattered light intensity

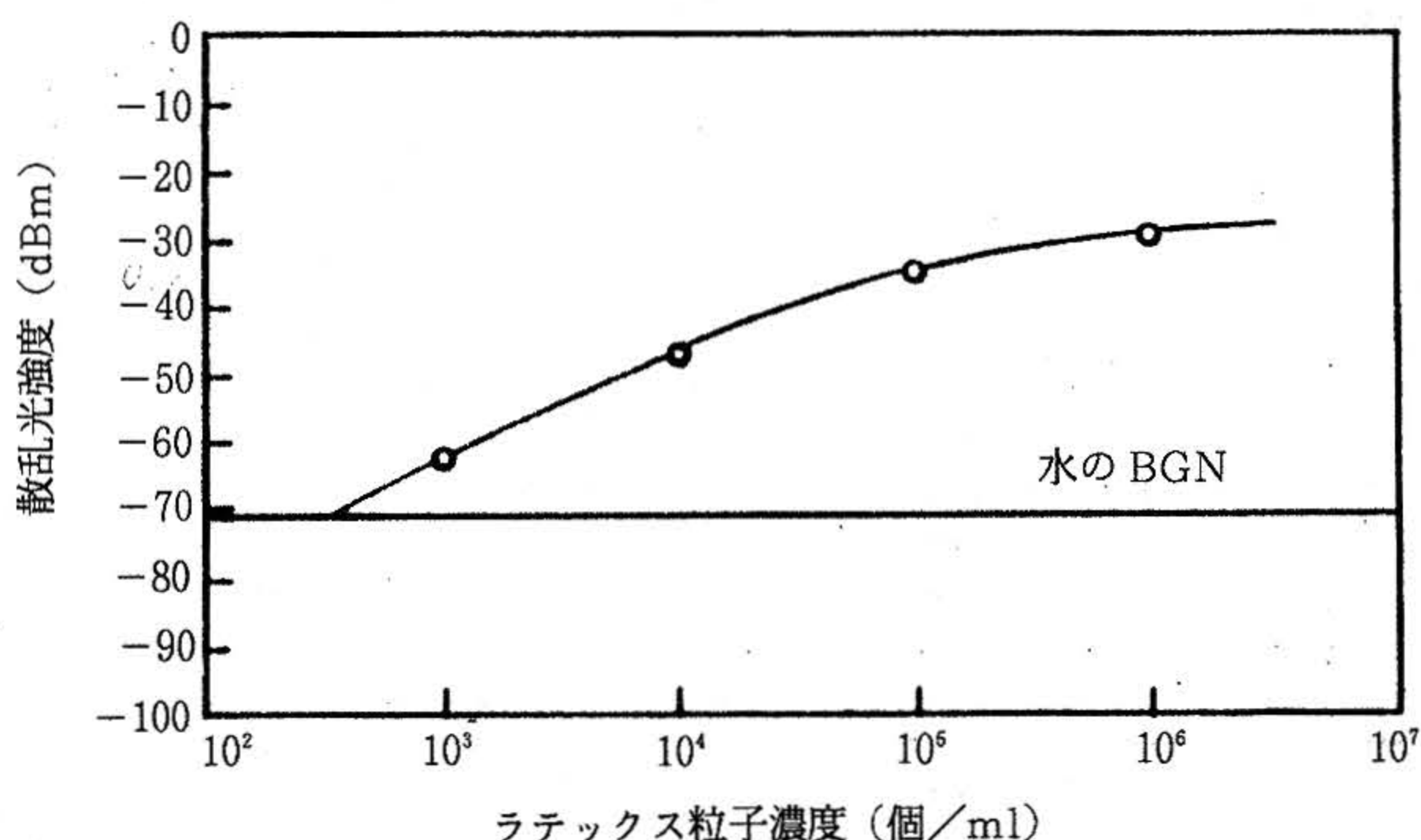


図9 粒子濃度と散乱光強度の関係

Fig. 9 Correlation between particle density and scattered light intensity

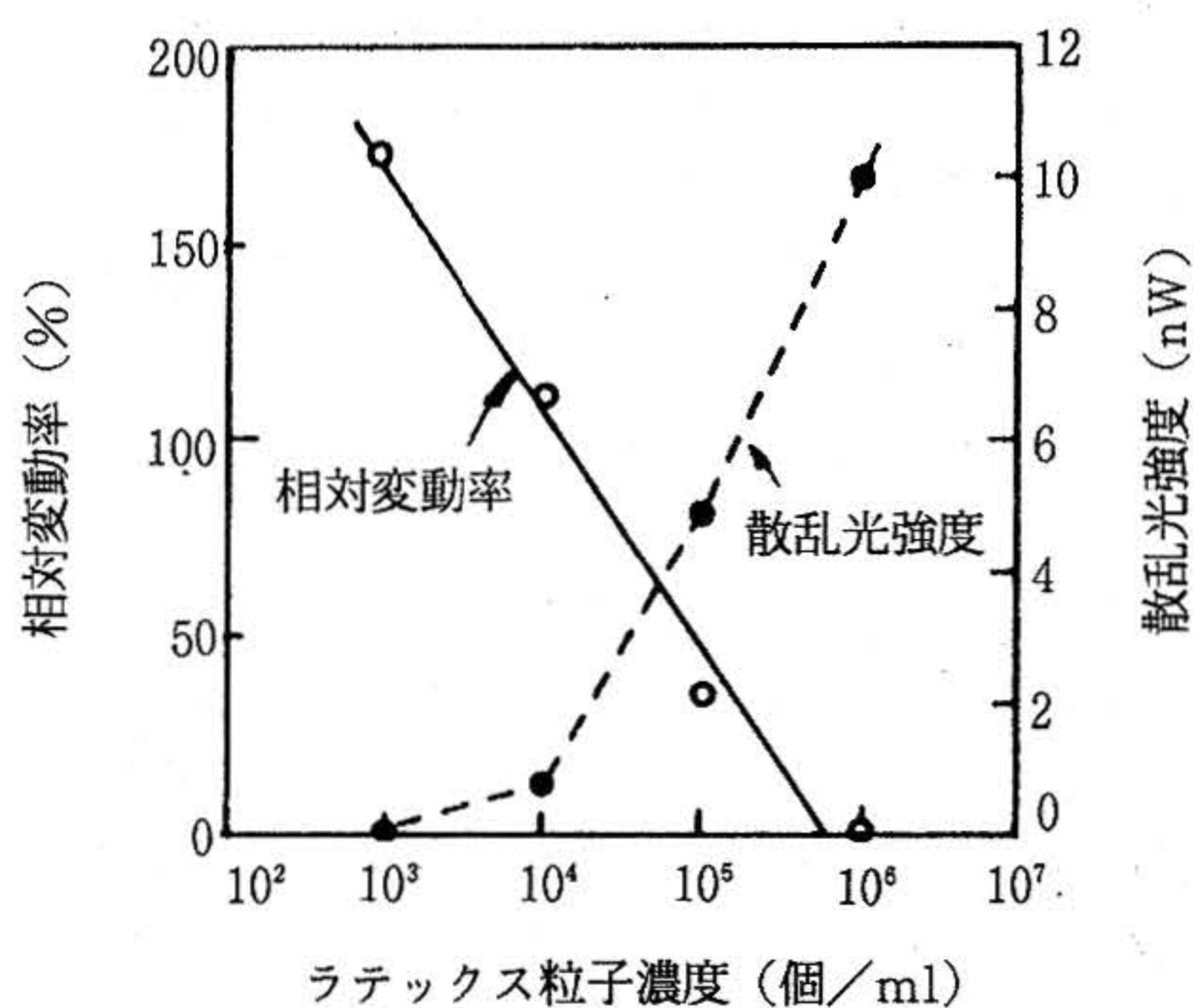


図10 粒子濃度と相対変動率

Fig. 10 Correlation between particle density and relative fluctuation rate

目対変動率が增大すると考えられる。

散乱光強度に着目した場合、濃度算定の下限は約 3×10^2 (個/ml) 程度であるが、このような濃度域ではむしろ相対変動率を用いて濃度算定したほうが良好な結果が得られる可能性がある。ただし、今回の実験では 10^3 (個/ml) の濃度までしか計測していないので、今後、これより低い濃度での計測を行うとともに、FFT 処理を行い、周波数領域での解析をする必要がある。

4.3 微生物による散乱光計測実験

4.1, 4.2 の実験より、本装置の光学系基本特性及び既知形状粒子懸濁液の散乱特性が把握できた。しかし、本装置が真に微生物測定装置として有効であるかを確認するためには、実際に微生物試料を用いた懸濁液で散乱光計測実験を行なう必要がある。

ここでは、散乱対象物として、代表的な海洋微生物である *Bacillus* 及び *Vibrio* を用い、それぞれの散乱特性を把握する。

4.3.1 懸濁液濃度と散乱光強度の関係

微生物試料懸濁液の濃度を変え、そのときの散乱光強度を計測し、懸濁液濃度と散乱光強度との関係を調べた。この結果を図11に示す。いずれの微生物 (*Bacillus* と *Vibrio*) ともペプトン (0.25g), イーストエキストラクト (0.25g), 濾過海水 (900g), 蒸留水 (100g) で組成される培地で 10^7 (cell/ml) オーダーまで増殖させ、その後、ホルマリン固定液で増殖を停止させたものを基準試料とした。微生物の計数にはアクリジンオレンジ (AO) 染色による直接計数法を用いた。また、濃度の種類としては、 10^7 (cell/ml) の基準試料を同じ培地で順次希釈し、 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 (cell/ml) の全5種類の懸濁液を準備した。

図11において、縦軸は散乱光強度を、横軸は微生物試料懸濁液の濃度をそれぞれ表わす。*Bacillus* の計測結果を●で、*Vibrio* の計測結果を○で

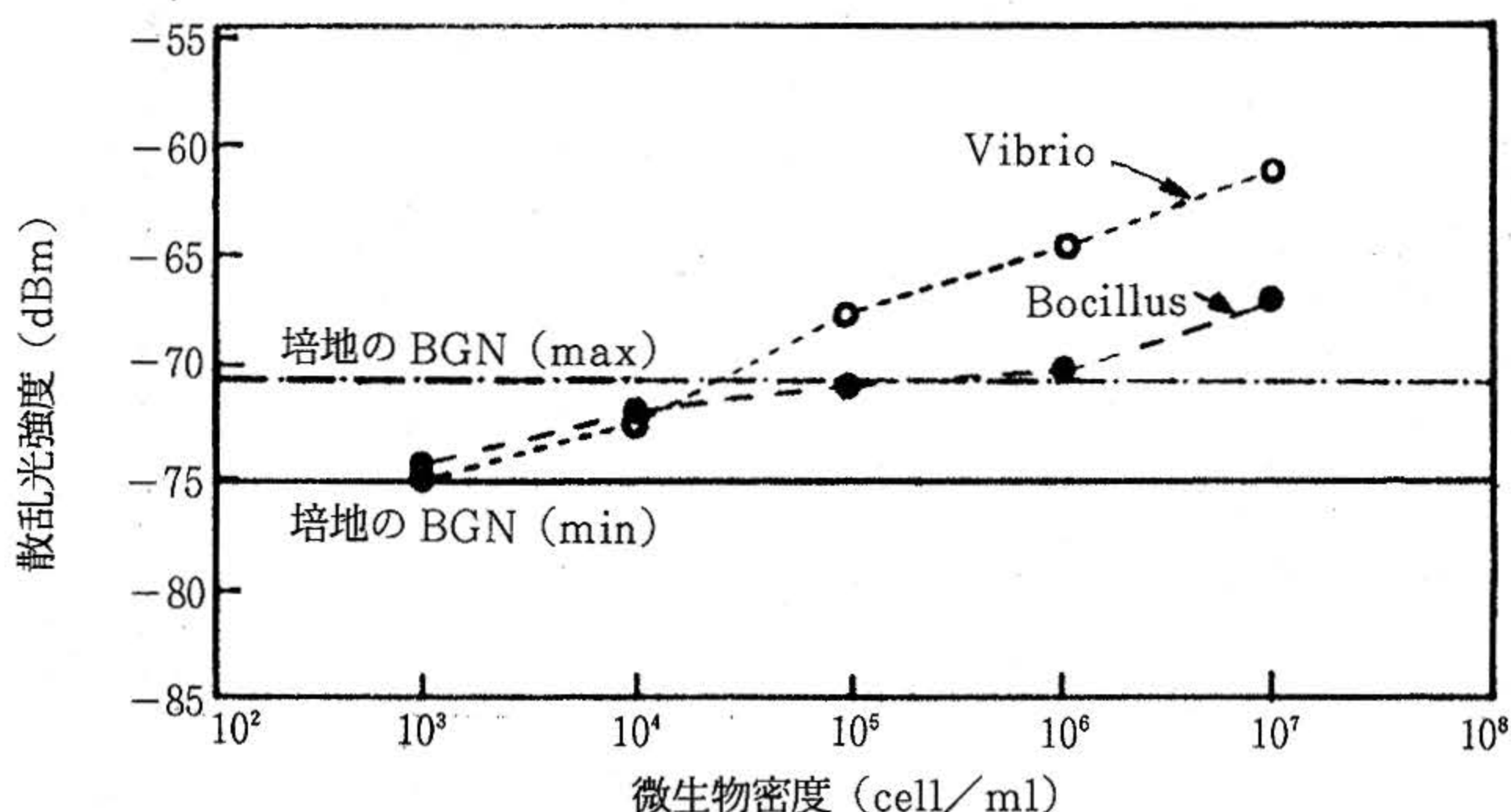


図 11 微生物密度と散乱光強度の関係

Fig. 11 Correlation between microbes density and scattered light intensity

表わす。また、微生物を含まない培地のみの散乱光強度を計測した結果を直線で示す。これが今回使用した培地の BGN となる。BGN 計測は同一の培地について数回行ない、その最大値と最小値をそれぞれ、一点鎖線、実線で表わした。

図 11 に見られるように、培地の BGN は約 -71 ~ -75 dBm と、同一の培地にも関わらず、約 4 dB の幅を持っている。この原因としては、培地注入前のセル内壁の洗浄が十分でなく、内壁に懸濁物が付着していたこと、培地注入時に大気中のゴミが侵入したこと、及び、培地に溶解している化学成分が凝集し懸濁物を生成していたことが考えられる。特に 3 番目の原因は重要であり、培地の選択が本装置の性能に大きく影響することが分かる。

本実験における散乱光検出下限を調べてみる。これは BGN のとる値に大きく依存するが、BGN が最小値をとる場合ではいずれの試料とも 10^3 (cell/ml) まで検出可能であり、BGN が最大値をとる場合では *Bacillus* で 10^5 (cell/ml) まで、*Vibrio* で 3×10^4 (cell/ml) までが検出可能である。

次に微生物の種類による散乱特性を比較をしてみる。明らかに *Vibrio* の方が *Bacillus* よりも散乱光強度が高く、勾配も大きくなり、微生物密度の算定には有利であることがわかる。さらに微生物とラテックス粒子 (図 9) の実験結果を比較してみると、その差はさらに顕著となることがわか

る。実際、微生物としては散乱光強度の高い *Vibrio* とラテックス粒子の結果を比較してみると、濃度が 10^6 (cell/ml) の時で、ラテックス粒子懸濁液の方が *Vibrio* 試料よりも約 30 dB も散乱光強度が高くなる。この原因は微生物の方がラテックス粒子 (直径 $10 \mu\text{m}$) よりも形状が小さく、屈折率が水により近いためである。

高濃度域について、微生物とラテックス粒子の結果を比較してみる。ラテックス粒子では 10^6 (個/ml) あたりで濃度と散乱光強度の直線性が崩れるが、微生物ではこれより高濃度域でも直線性が保たれている。今回の実験は 10^7 (cell/ml) までしか行なわなかったが、微生物の場合、これより高い濃度でも散乱光強度は飽和せず、計測できる可能性がある。

5 おわりに

本実験により、「深海微生物実験システム」・増殖モニターの光学設計を行うにあたり、以下の基本的かつ重要な知見が得られた。

- ① 耐圧ガラス窓は全反射の生じる角度より約 2° 傾ければ受光部にほとんど影響しない。
- ② レーザー光強度を増大すると、ほぼ線形的に散乱光強度は増大する。
- ③ 散乱光以外の不要な光を遮光するためにレンズ (B) の前に絞りを設ける必要はない。
- ④ レンズ (A) の焦点距離が短いほど最大散乱光

強度は高くなるが、ピーク幅は狭くなる。

⑤ 懸濁液を含んだセルはレンズ(A)の焦点距離よりも若干後ろに設置した方がより有効である。

⑥ 直径 $10\mu\text{m}$ のラテックス粒子懸濁液の散乱光強度検出可能な濃度範囲はおよそ $3 \times 10^2 \sim 10^7$ (個/ml) となる。

⑦ 散乱光強度が十分に得られない低濃度域では相対変動率より濃度を算定できる可能性がある。

⑧ *Bacillus* の散乱光強度検出下限となる濃度は $10^3 \sim 10^5$ (cell/ml), *Vibrio* で $10^3 \sim 3 \times 10^4$ (cell/ml) であり, これらは培地のBGNに大きく影響される。微生物による散乱は極めてわずかなものなので, より低濃度域まで検出するためには培地のBGNに留意しなければならない。

これらの結果をもとに, 実機で使用する光学部品を選定し, 光学系レイアウト設計を行うとともに, 今後は以下の課題について検討を進めていく。

① より多種類の微生物を用いて, 散乱計測実験を行なう。

② 高温環境下で, 光学系の基本特性実験, 散乱光計測実験を行う。

③ 散乱光強度データの変動に対しては, FFT解析を含め, データ処理の方法を検討する。

④ 今回は測定装置の試作及び実験に重点をおいたが, ここで得られた結果も含めて, 微小粒子の散乱現象に関する, より理論的な取扱を行なう。

参考文献

- 1) 許 正憲, 手塚久男他: 増殖モニターの開発 (第1報) レーザー光を用いた菌体密度測定法についての基礎的実験, JAMSTECR 25, P.189-197 (1991)
- 2) M.KYO: Collection, Isolation and Cultivation System for Deep-sea Microbes Study: Concept and Design, OCEANS'91 Proceeding, P.419-423 (1991)
- 3) ニューポート社テクニカルスタッフ著: 光ファイバーの使い方と留意点, オプトエレクトロニクス社 (1989)
- 4) 大竹祐吉: レーザーの使い方と留意点, オプトエレクトロニクス社 (1991)
- 5) 末田哲夫: 光学部品の使い方と留意点, オプトエレクトロニクス社 (1990)

(原稿受理: 1991年12月20日)