



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1898552 B

(45) 授权公告日 2011. 11. 02

(21) 申请号 200480038011. 3

(22) 申请日 2004. 12. 16

(30) 优先权数据

421948/2003 2003. 12. 19 JP

(85) PCT申请进入国家阶段日

2006. 06. 19

(86) PCT申请的申请数据

PCT/JP2004/018844 2004. 12. 16

(87) PCT申请的公布数据

W02005/062027 JA 2005. 07. 07

(73) 专利权人 浜松光子学株式会社

地址 日本静岡

(72) 发明人 胜又政和 土屋广司 小池隆

西川正隆

(74) 专利代理机构 北京尚诚知识产权代理有限公司

公司 11322

代理人 龙淳

(51) Int. Cl.

G01N 21/64 (2006. 01)

(56) 对比文件

US 5130545 A, 1992. 07. 14, 全文.

WO 03006684 A2, 2003. 01. 23, 全文.

BURGER J., SCHMIDT W.. Long term delayed luminescence : a possible fast and convenient assay for nutrition deficiencies and environmental pollution damages in plants. PLANT AND SOIL . 109 1. 1988, 109 (1), 79 - 83.

审查员 赵晓宇

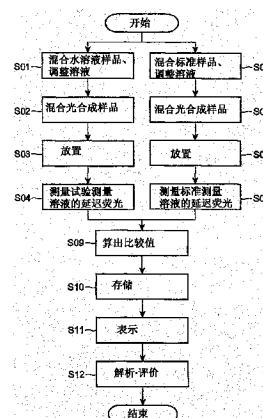
权利要求书 2 页 说明书 26 页 附图 39 页

(54) 发明名称

有害物质的评价方法以及有害物质的评价用工具箱

(57) 摘要

本发明提供一种生物生长阻碍因素的评价方法,具备:第1步骤:在水溶液样品中混合光合成样品而调制试验测量溶液,放置试验测量溶液,以规定的照射时间向试验测量溶液照射光后,测量产生的延迟荧光的光量;第2步骤:在不存在生物生长阻碍因素的标准样品中混合光合成样品而调制标准测量溶液,放置标准测量溶液,以规定的照射时间向标准测量溶液照射光后,测量产生的延迟荧光的光量;以及第3步骤:通过基于在第1步骤及第2步骤中分别被测量的延迟荧光的光量算出平均值,求出平均值的比较值来评价生物生长阻碍因素。由此,可以实现能够以短时间进行广泛的阻碍因素的分析的生物生长阻碍因素的评价方法。



1. 一种有害物质的评价方法,其特征在于,

是评价存在于试验对象的水溶液样品中的有害物质的有害物质的评价方法,

具备:

第1步骤:在所述水溶液样品中混合具有光合成功能的光合成样品并调制试验测量溶液,以规定的放置时间放置所述试验测量溶液,以规定的照射时间对所述试验测量溶液照射光后,测量产生的延迟荧光的光量;

第2步骤:在比较样品中混合所述光合成样品,调制比较测量溶液,以所述规定的放置时间放置所述比较测量溶液,以所述规定的照射时间对所述比较测量溶液照射光后,测量产生的延迟荧光的光量;以及

第3步骤:通过基于在所述第1步骤及所述第2步骤中分别取得的延迟荧光的光量,计算评价值,并求出所述评价值的比较值,而评价存在于所述水溶液样品中的有害物质,

所述评价值是,在所述第1步骤及所述第2步骤中取得的延迟荧光的光量的时间变化的极大点、极小点或拐点上的经过时间。

2. 一种有害物质的评价方法,其特征在于,

是评价存在于试验对象的水溶液样品中的有害物质的有害物质的评价方法,

具备:

第1步骤:在所述水溶液样品中混合具有光合成功能的光合成样品并调制试验测量溶液,以规定的放置时间放置所述试验测量溶液,以规定的照射时间对所述试验测量溶液照射光后,测量产生的延迟荧光的光量;

第2步骤:在比较样品中混合所述光合成样品,调制比较测量溶液,以所述规定的放置时间放置所述比较测量溶液,以所述规定的照射时间对所述比较测量溶液照射光后,测量产生的延迟荧光的光量;以及

第3步骤:通过基于在所述第1步骤及所述第2步骤中分别取得的延迟荧光的光量,计算评价值,并求出所述评价值的比较值,而评价存在于所述水溶液样品中的有害物质;

所述评价值是,在所述第1步骤及所述第2步骤中取得的延迟荧光的光量的时间变化,所述比较值是取了所述时间变化的差的值。

3. 如权利要求2所述的有害物质的评价方法,其特征在于,

在所述第1步骤或所述第2步骤中取得的延迟荧光的光量的时间变化具有极大点、极小点或拐点的特征点,在所述第3步骤中,关于一个特征点与测量起点或与其它特征点之间的规定范围、将取了延迟荧光的光量的时间变化的差的值作为所述比较值而评价有害物质。

4. 如权利要求3所述的有害物质的评价方法,其特征在于,

在所述第3步骤中,关于取了在所述第1步骤及所述第2步骤中取得的延迟荧光的光量的时间变化的差的值、进一步将取了所述值与在所述第1步骤或所述第2步骤中取得的延迟荧光的光量的时间变化之比的值作为所述比较值而评价有害物质。

5. 如权利要求1~4的任意一项所述的有害物质的评价方法,其特征在于,

在所述第2步骤中,使用成为比较对象的标准样品作为所述比较样品。

6. 如权利要求1~4的任意一项所述的有害物质的评价方法,其特征在于,

在所述第2步骤中,使用其它的水溶液样品作为所述比较样品。

7. 如权利要求 1 或 2 所述的有害物质的评价方法,其特征在于,
预先实施所述第 2 步骤,预先取得并存储关于所述比较测量溶液的测量结果。
8. 如权利要求 1 或 2 所述的有害物质的评价方法,其特征在于,
在所述第 1 步骤和所述第 2 步骤中,对每次测量改变光条件,并以规定的放置时间放置
所述试验测量溶液和所述比较测量溶液;
在所述第 3 步骤中,评价根据所述光条件的所述比较值的变化。
9. 如权利要求 1 或 2 所述的有害物质的评价方法,其特征在于,
在所述试验测量溶液中和所述比较测量溶液中的所述光合成样品的密度,为在与延迟
荧光的光量具有比例关系的密度范围。
10. 如权利要求 1 或 2 所述的有害物质的评价方法,其特征在于,
在所述第 1 步骤和所述第 2 步骤中,在测量延迟荧光的光量之前,使所述试验测量溶液
和所述比较测量溶液均匀化。
11. 如权利要求 1 或 2 所述的有害物质的评价方法,其特征在于,
所述光合成样品由选自耐盐性藻类、耐碱性藻类和耐酸性藻类的至少一种组成。
12. 如权利要求 11 所述的有害物质的评价方法,其特征在于,
所述光合成样品为螺旋藻属。
13. 一种有害物质的评价方法,其特征在于,
是评价存在于试验对象的水溶液样品中的有害物质的有害物质的评价方法,
具备:
在所述水溶液样品中混合具有光合成功能的光合成样品而调制试验测量溶液的调制
步骤;
以规定的放置时间放置所述试验测量溶液的放置步骤;
以规定的照射时间对所述试验测量溶液照射光后,测量产生的延迟荧光的光量的测量
步骤;
基于在所述测量步骤中取得的延迟荧光的光量,评价存在于所述水溶液样品中的有害
物质的评价步骤;
在所述放置步骤和所述测量步骤之间,包括使所述试验测量溶液在黑暗中待命规定的
待命时间的暗中待命步骤,或者,对所述试验测量溶液进行使所述光合成样品适应测量光
条件的预备的光照射且使其在黑暗中待命规定的待命时间的预备照射步骤的任意一个的
适应化步骤。
14. 如权利要求 13 所述的有害物质的评价方法,其特征在于,
在所述暗中待命步骤中,所述规定的待命时间是 30 秒以上、1 小时以下的时间。
15. 如权利要求 13 或 14 所述的有害物质的评价方法,其特征在于,
在所述预备照射步骤中的预备的光照射的时间与暗中待命的时间之比,等于在所述测
量步骤中的光照射的时间与暗中待命的时间之比。

有害物质的评价方法以及有害物质的评价用工具箱

技术领域

[0001] 本发明涉及有害物质的评价方法以及有害物质的评价用工具箱。

背景技术

[0002] 目前,作为评价环境中存在的未知化学物质对生物的影响的方法,可以使用检查对于细菌、藻类、水蚤、鱼类等生物个体的生长阻碍的生物学的毒性检查「生物测定」。生物测定是在能够综合地检测由未知物质和设想以外的物质产生的影响、化学物质的相互作用及由环境产生的影响等的生物学的影响方面现有的物理化学方法,与液相色谱、气相色谱、原子吸光测量法、酶免疫测定等有互补关系。

[0003] 在该生物测定中,可以使用能够统计性地处理多个个体的、生命周期短的细菌、藻类等的单细胞生物,或者小型甲壳类(水蚤)及小型鱼类等的、具有比较高等的生物功能、同时容易受到化学物质等的影响的小型水生生物等。作为生物测定的具体方法,可以列举在日本国环境省的指南中规定的根据藻类繁殖阻碍试验的生物体影响评价。藻类繁殖阻碍试验是评价对藻类的被试验物质的各种毒性的方法。

[0004] 另外,作为其它的方法,可以想出根据发光细菌的发光测量而测量呼吸阻碍的方法。另外,在非专利文献1中记载了使用来自藻类的叶绿素荧光的光合成阻碍性的测量方法。另外,在专利文献2、3中,也有关于使用延迟荧光的测量方法的记载。

[0005] 非专利文献1:Ulrich Schreiber et al., "New type dual-channel PAMchlorophyllfluorometer for highly sensitive water toxicity biotests", Photosynthesis Research 74, p.317-330(2002)

[0006] 非专利文献2:Werner Schmidt and Horst Senger, "Long-term delayedluminescence in Scenedesmus obliquus. II. Influence of exogeneousfactors", Biochimica et Biophysica Acta 891, p22-27(1987)

[0007] 非专利文献3:Joachim Burger and Werner Schmidt, "Long-termdelayed luminescence :A possible fast and convenient assay for nutritiondeficiencies and environmental pollution damages in plants", Plant and Soil109, p.79-83(1988)

发明内容

[0008] 但是,在根据上述藻类繁殖阻碍试验的生物体影响评价方法中,由于以生物的繁殖能力为试验对象所以操作变得繁杂,同时,到得到试验结果需要24~72小时这样的长时间。相对于此,在上述非专利文献1等中记载的测量方法中,虽然部分实现试验时间的缩短,但还不够。此外,无论在哪一种评价方法中都还没有达到实现未知化学物质等的广泛的有害物质的定性和定量分析。另外,即使在非专利文献2、3中记载的测量方法中,也未能充分地研究有关有害物质的定性和定量的分析的具体方法。

[0009] 于是,本发明是鉴于这样的课题而完成的,其目的在于提供能够以短时间进行广泛的有害物质的分析的有害物质的评价方法以及有害物质的评价用工具箱。

[0010] 为了达到这样的目的,根据本发明的有害物质评价方法,是一种评价在试验对象的水溶液样品中存在的有害物质(a toxic substance)的有害物质评价方法,其特征在于,具备(1)第1步骤:在水溶液样品中混合具有光合成功能的光合成样品并调制试验测量溶液,以规定的放置时间放置试验测量溶液,在试验测量溶液中以规定的照射时间照射光后,测量产生的延迟荧光的光量;(2)第2步骤:将在比较样品中混合光合成样品而调制的比较测量溶液以规定的放置时间放置,在比较测量溶液中以规定的照射时间照射光后,测量产生的延迟荧光的光量,准备这样得到的比较测量结果;以及(3)第3步骤:通过基于在第1步骤及第2步骤中分别取得的延迟荧光的光量算出评价价值,求出评价价值的比较值,而评价在水溶液样品中存在的有害物质;(4)评价价值是在第1步骤和第2步骤中取得的延迟荧光的光量的时间的变化的特征点中的经过时间。

[0011] 或者,根据本发明的有害物质的评价方法,是一种评价在试验对象的水溶液样品中存在的有害物质的有害物质评价方法,其特征在于,具备(1)第1步骤:在水溶液样品中混合具有光合成功能的光合成样品并调制试验测量溶液,以规定的放置时间放置试验测量溶液,在试验测量溶液中以规定的照射时间照射光后,测量产生的延迟荧光的光量;(2)第2步骤:将在比较样品中混合光合成样品而调制的比较测量溶液以规定的放置时间放置,在比较测量溶液中以规定的照射时间照射光后,测量产生的延迟荧光的光量,准备这样得到的比较测量结果;以及(3)第3步骤:通过基于在第1步骤及第2步骤中分别取得的延迟荧光的光量算出评价价值,求出评价价值的比较值,而评价在水溶液样品中存在的有害物质;(4)评价价值是在第1步骤和第2步骤中取得的延迟荧光的光量的时间的变化,比较值是取了时间的变化的差的值。

[0012] 由这样的有害物质的评价方法,由比较从混合在评价对象的水溶液样品中的光合成样品发出的延迟荧光的光量的时间变化,与从含有作为关于水溶液样品的比较对象而准备的比较样品的比较测量溶液中的光合成样品发出的延迟荧光的光量的时间变化,而得到的特征出发,可以同时且高精度地定性定量多种有害物质。另外,通过测量延迟荧光的光量而进行评价,可以总体上缩短测量时间。

[0013] 另外,在上述的评价方法中的第1评价方法中,评价价值取为在第1步骤及第2步骤中取得的延迟荧光的光量的时间变化的特征点中的经过时间。此时,因为延迟荧光的光量的时间变化的特征点根据成为有害物质的化学物质种类等而变化,所以,通过评价在该特征点中的经过时间,可以更准确地定性和定量各种有害物质。

[0014] 另外,在第2评价方法中,评价价值取为在第1步骤及第2步骤中取得的延迟荧光的光量的时间的变化,比较值取为取时间的变化的差的值。由此,可以得到延迟荧光量的时间变化中的变化集中的时间和拐点这样的特征,成为有害物质的化学物质种类等的确定就变得容易。

[0015] 另外,在上述的第2评价方法中,在第1步骤或第2步骤中取得的延迟荧光的光量的时间的变化具有特征点,在第3步骤中,可以对于一个特征点与测量起点或其它特征点之间的规定范围使用将取延迟荧光的光量的时间的变化的差的值作为比较值而评价有害物质的方法。另外,在延迟荧光的光量的时间的变化中没有特征点时,可以对其全体或规定范围将取延迟荧光的光量的时间变化的差的值作为比较值。

[0016] 或者,在第3步骤中,可以使用对于取了在第1步骤及第2步骤中取得的延迟荧光

的光量的时间的变化的差的值,将进一步取了与在第 1 步骤或第 2 步骤中取得的延迟荧光的光量的时间的变化之比的值作为比较值来评价有害物质的方法。

[0017] 这里,关于在第 2 步骤中使用的比较样品和比较测量结果,可以使用各种样品和结果。例如,在第 2 步骤中,作为比较样品可以使用成为比较对象的标准样品,在标准样品中混合光合成样品并调制是比较测量溶液的标准测量溶液,以规定的放置时间放置标准测量溶液,对标准测量溶液以规定的照射时间照射光后,测量产生的延迟荧光的光量,从而取得比较测量结果的方法。此时,作为标准样品,优选使用实质上不存在有害物质的样品。

[0018] 或者,可以使用,在第 2 步骤中,作为比较样品使用其它的水溶液样品,对于在其它的水溶液样品中混合光合成样品而调制的比较测量溶液的其它试验测量溶液,准备取得的测量结果作为比较测量结果的方法。此时,作为比较测量结果,例如可以使用前次的测量结果。

[0019] 另外,关于第 2 步骤的比较测量结果的取得,与第 1 步骤同样,可以使用通过对比比较测量溶液进行延迟荧光的光量的测量而准备比较测量结果的方法。或者也可以使用,在第 2 步骤中,作为比较测量结果,准备预先对于比较测量溶液取得的测量结果作为比较测量结果的方法。此时,优选将预先取得的比较测量结果存储在存储器等中,根据需要读出数据使用。

[0020] 另外,也优选在第 1 步骤及第 2 步骤中,在每次测量时改变光条件,以规定的放置时间放置试验测量溶液和比较测量溶液,在第 3 步骤中,评价根据光条件的比较值的变化。如果采用这样的方法,因为光条件对延迟荧光特性的影响因每种有害物质而不同,所以,通过评价根据放置时的光条件变化的比较值,水溶液样品中的有害物质的判断变得更加容易。

[0021] 另外,还优选,试验测量溶液中和比较测量溶液中的光合成样品的密度,在与延迟荧光的光量具有比例关系的密度的范围。此时,例如,测定吸光度等而测量光合成样品的密度后,通过基于该密度而校正延迟荧光的光量,可以实现更高精度的有害物质的评价。

[0022] 此外,还优选,在第 1 步骤及第 2 步骤中,在测量延迟荧光的光量前,使试验测量溶液和比较测量溶液均匀化。如果这样做,因为在测量中测量溶液中的光合成样品被均匀地分布,所以就成为能够进行误差更少的有害物质的评价。

[0023] 另外,关于在水溶液样品中混合的光合成样品,优选使用由选自耐盐性藻类、耐碱性藻类和耐酸性藻类的至少一种组成的光合成样品。作为这样的光合成样品,可以列举例如螺旋藻属。

[0024] 根据本发明的其它有害物质的评价方法,是一种评价在试验对象的水溶液样品中存在的有害物质的有害物质的评价方法,其特征是,具备 (a) 在水溶液样品中混合具有光合成功能的光合成样品并调制试验测量溶液的调制步骤, (b) 将试验测量溶液放置规定的放置时间的放置步骤, (c) 在试验测量溶液中以规定的照射时间照射光后,测量产生的延迟荧光的光量的测量步骤, (d) 基于在测量步骤中取得的延迟荧光的光量,评价在水溶液样品中存在的有害物质的评价步骤,以及 (e) 包括在测量步骤前对试验测量溶液进行在规定的待命时间的暗中待命的暗中待命步骤,或对试验测量溶液进行预备的光照射和在规定的待命时间的暗中待命的预备照射步骤的任意一个的适应化步骤。

[0025] 由这样的有害物质评价方法,从可以在评价对象的水溶液中混合的光合成样品发

出的延迟荧光的光量的时间的变化中得到的特征出发,可以同时而且高精度地定性定量多种有害物质。另外,通过测量延迟荧光的光量而评价,可以整体地缩短测量时间。另外,通过在测量步骤前对试验测量溶液进行适应化步骤,可以提高延迟荧光的测量和根据该测量结果的有害物质的评价的精度。

[0026] 这样,在测量步骤前实施适应化步骤时,在暗中待命步骤中,规定的待命时间优选为 30 秒以上、1 小时以下的时间。另外,在预备照射步骤中的预备的光照射的时间和暗中待命的时间之比,优选等于在测量步骤中的光的照射的时间和暗中待命的时间之比。

[0027] 并且,为了这样的评价,提供一种有害物质评价用工具箱,是用于评价在试验对象的水溶液样品中存在的有害物质的有害物质评价用工具箱,具备在水溶液样品中混合的光合成样品,用于调整水溶液样品的盐浓度及 pH 的混合盐类,以及在水溶液样品中分离光合成样品与混合盐类并使之混合的混合工具。另外,评价用工具箱,优选具备用于将光合成样品的分布密度均匀化的稳定剂。作为这样的稳定剂,可以列举例如比重调整剂、增粘剂。

[0028] 根据本发明的有害物质的评价方法,可以在短时间内进行广泛的有害物质的分析。

附图说明

[0029] 图 1 是表示延迟荧光测量装置的一个实施方式的图。

[0030] 图 2 是部分表示图 1 的延迟荧光测量装置的框图。

[0031] 图 3 是表示本发明的实施方式相关的生物生长阻碍主要因素的评价方法的顺序的流程图。

[0032] 图 4 是表示测定延迟荧光的光量时的延迟荧光测量装置 1 的动作的流程图。

[0033] 图 5 是表示延迟荧光的光量的时间变化的一例的图。

[0034] 图 6 的 (a) 是表示波长 665nm 的吸光度与延迟荧光量的关系的一例的图表, (b) 是表示波长 750nm 的吸光度与延迟荧光量的关系的一例的图表。

[0035] 图 7 是表示相对于吸光度的 VCP1 的变化的图表。

[0036] 图 8 的 (a) 是表示改变光强度时的评价值 CP1 的图表, (b) 是表示改变光强度时的评价值 CP2 的图表, (c) 是表示改变光强度时的评价值 TP2 的图表。

[0037] 图 9 的 (a) 是表示改变光波长时的评价值 CP1 的图表, (b) 是表示改变光波长时的评价值 CP2 的图表, (c) 是表示改变光波长时的评价值 TP2 的图表。

[0038] 图 10 的 (a) 是表示相对于阿特拉津浓度的比较值 VCP1 的变化的图表, (b) 是表示相对于阿特拉津浓度的比较值 VCP2 的变化的图表, (c) 是表示相对于阿特拉津浓度的比较值 VTP2 的变化的图表。

[0039] 图 11 是表示改变阿特拉津浓度时的曲线值的图表。

[0040] 图 12 的 (a) 是表示相对于 DCMU 浓度的比较值 VCP1 的变化的图表, (b) 是表示相对于 DCMU 浓度的比较值 VCP2 的变化的图表, (c) 是表示相对于 DCMU 浓度的比较值 VTP2 的变化的图表。

[0041] 图 13 是表示改变 DCMU 浓度时的曲线值的图表。

[0042] 图 14 的 (a) 是表示相对于百草枯 (paraquat) 浓度的比较值 VCP1 的变化的图表, (b) 是表示相对于百草枯 (paraquat) 浓度的比较值 VCP2 的变化的图表, (c) 是表示相对于

百草枯 (paraquat) 浓度的比较值 VTP2 的变化的图表。

[0043] 图 15 是表示改变百草枯 (paraquat) 浓度时的曲线值的图表。

[0044] 图 16 的 (a) 是表示相对于无机汞浓度的比较值 VCP1 的变化的图表, (b) 是表示相对于无机汞浓度的比较值 VCP2 的变化的图表, (c) 是表示相对于无机汞浓度的比较值 VTP2 的变化的图表。

[0045] 图 17 是表示改变无机汞浓度时的曲线值的图表。

[0046] 图 18 的 (a) 是表示相对于游离氰基浓度的比较值 VCP1 的变化的图表, (b) 是表示相对于游离氰基浓度的比较值 VCP2 的变化的图表, (c) 是表示相对于游离氰基浓度的比较值 VTP2 的变化的图表。

[0047] 图 19 是表示改变游离氰浓度时的曲线值的图表。

[0048] 图 20 的 (a) 是表示相对于 TPN 浓度的比较值 VCP1 的变化的图表, (b) 是表示相对于 TPN 浓度的比较值 VCP2 的变化的图表, (c) 是表示相对于 TPN 浓度的比较值 VTP2 的变化的图表。

[0049] 图 21 是表示改变 TPN 浓度时的曲线值的图表。

[0050] 图 22 的 (a) 是表示包含不同种的生物生长阻碍因素的各试验测量溶液的比较值 VCP1 的变化的图表, (b) 是表示包含不同种的生物生长阻碍因素的各试验测量溶液的比较值 VCP2 的变化的图表, (c) 是表示包含不同种的生物生长阻碍因素的各试验测量溶液的比较值 VTP2 的变化的图表。

[0051] 图 23 的 (a) 是表示包含同种的生物生长阻碍因素的各试验测量溶液的比较值 VCP1 的变化的图表, (b) 是表示包含同种的生物生长阻碍因素的各试验测量溶液的比较值 VCP2 的变化的图表, (c) 是表示包含同种的生物生长阻碍因素的各试验测量溶液的比较值 VTP2 的变化的图表。

[0052] 图 24 是表示使用本发明的一个实施方式相关的生物生长阻碍因素的评价用工具箱进行延迟荧光的测量时的步骤的图。

[0053] 图 25 是表示使用本发明的其它实施方式相关的生物生长阻碍因素的评价用工具箱进行延迟荧光的测量时的步骤的图。

[0054] 图 26 是表示本发明的其它实施方式相关的生物生长阻碍因素的评价方法的步骤的流程图。

[0055] 图 27 的 (a) 是表示关于相对于放置时的各种光条件的 TPN 的比较值的图表, (b) 是表示关于相对于放置时的各种光条件的无机汞的比较值的图表。

[0056] 图 28 的 (a) 是表示在实施例 1 中算出的比较值 VCP1 的图表, (b) 是表示在实施例 1 中算出的比较值 VCP2 的图表, (c) 是表示在实施例 1 中算出的比较值 VTP2 的图表。

[0057] 图 29 是表示在实施例 2 中算出的比较值 VCP1 的图表。

[0058] 图 30 是表示使用高盐性培养基和低盐性培养基调整水溶液样品时的调整例的表。

[0059] 图 31 是表示溶液没有均匀化和添加增粘剂的条件下的相对于放置时间的延迟荧光量变化的图表。

[0060] 图 32 是表示有害物质的连续评价方法的一例的示意图。

[0061] 图 33 是表示有害物质的连续评价方法的其它例的示意图。

[0062] 图 34 是表示延迟荧光的光量的时间变化的例的图。

[0063] 图 35 是表示关于在延迟荧光衰减曲线中存在特征点时的曲线值的计算方法的例的图。

[0064] 图 36 是表示关于在延迟荧光衰减曲线中不存在特征点时的曲线值的计算方法的例的图。

[0065] 图 37 是表示改变西玛三嗪浓度和二氯苯酚浓度时的曲线值的图表。

[0066] 图 38 是表示改变西玛三嗪浓度和二氯苯酚浓度时的 V 曲线值的图表。

[0067] 图 39 是表示根据延迟荧光的测量次数的评价 CP1 的变化的图表。

[0068] 图 40 是表示进行了 3 次延迟荧光的测量的结果中的测量精度的表。

[0069] 符号说明

[0070] 1... 延迟荧光测量装置, 10... 光源, 12... 第 1 测定部, 12a... 第 1 光传感器, 12b... 散射光量计算部, 14... 测定部, 14a... 第 2 光传感器, 14b... 延迟荧光的光量计算部, 16... 解析部, 18... 控制部, 20... 箱体, 22... 本体部, 24... 盖部, 26... 导入口, 28... 设置部, 30... 过滤器, 32... 聚光光学系统, 34... 快门, 36、44... 电缆, 38... 计算部, 40... 存储部, 42... 表示部, 50... 采液容器, 52... 水溶液样品, 54... 调整溶液, 56... 浓缩的光合成样品, 58... 试验测量溶液, 60... 采液容器。

具体实施方式

[0071] 关于本发明的实施方式, 参照附图进行说明。另外, 在各图中, 对相同要素赋予相同符号, 省略重复的说明。

[0072] (延迟荧光测量装置)

[0073] 首先, 对用于实施根据本发明的有害物质的评价方法的延迟荧光测量装置进行说明。图 1 是表示延迟荧光测量装置的一个实施方式的图, 图 2 是部分地表示延迟荧光测量装置的框图。

[0074] 延迟荧光测量装置 1 具备光源 10、第 1 测定部 12、第 2 测定部 14、解析部 16 和控制部 18。光源 10 是在测定对象的溶液中照射规定波长的测定光的光源, 其波长是 280nm ~ 800nm。这里, 光源 10 可以是单色光, 也可以是组合了多个光源的光源。光源 10 的发光, 可以是规定时间连续的, 也可以以任意的图形使之脉冲点灯。另外, 可以使具有相同或不同波长特性的多个光源顺序地发光, 也可以使多个光源同时发光。

[0075] 第 1 测定部 12, 是测定相对于测定光的溶液的吸光度或散射光的光量的部分, 具有检测照射在溶液中的测定光的透过光或散射光的第 1 光传感器 12a, 以及基于第 1 光传感器 12a 检测并输出的信号而计算吸光度或散射光的光量的吸光度或散射光量计算部 12b。

[0076] 第 2 测定部 14, 是测定由照射测定光而从光合成样品 (详细的在后面叙述) 产生的延迟荧光的光量的部分, 具有检测延迟荧光的第 2 光传感器 14a, 以及基于第 2 光传感器 14a 检测并输出的信号而算出延迟荧光的光量的延迟荧光的光量计算部 14b。这里, 延迟荧光如以下地产生。即, 在具有光合成功能的生物反应中, 在同化色素 (光合成色素) 中吸收的光能, 由电子传递通路作为化学能在生物反应中传递。在该传递过程中, 部分化学能引起逆向反应, 光合成色素由该化学能被再激励。这样从被再激励的光合成色素中产生荧光发光。另外, 延迟荧光也有被称为延迟发光的, 以下总称为延迟荧光。

[0077] 光源 10、第 1 测定部 12 和第 2 测定部 14 被容纳在具有遮光性的箱体 20 中。箱体 20 其本身可以由遮断光的遮光部件形成,也可以由涂布了遮断光的涂料等的部件形成。

[0078] 箱体 20 具有本体部 22 和盖部 24。本体部 22,在其一端侧形成导入口 26。导入口 26 是为了向箱体 20 内导入含有光合成样品的溶液而形成的,由盖部 24 形成为闭塞。

[0079] 另外,在箱体 20 内,在光源 10 与第 1 测定部 12 的中间附近设置有能够设置加入了溶液的容器(未图示)的设置部 28。设置部 28,具有例如固定容器用的固定爪,以该固定爪固定容器。

[0080] 在箱体 20 内的设置部 28 和第 2 测定部 14 之间,设置着过滤器 30、聚光光学系统 32 和快门 34。过滤器 30 是以与箱体 20 的内壁面连接的方式设置且透过延迟荧光的过滤器。聚光光学系统 32 是聚集微弱的延迟荧光的系统。快门 34 做成开关自由,关的时候遮断延迟荧光。

[0081] 解析部 16 通过第 1 电缆 36 而连接于第 1 测定部 12 和第 2 测定部 14,具有计算部 38、存储部 40 和表示部 42。计算部 38 基于由第 1 测定部 12 测定的吸光度或散射光的光量,和由第 2 测定部 14 测定的延迟荧光的光量,根据后述的演算方法,求出与溶液中存在的有害物质相关的比较值。存储部 40 是顺序地存储由计算部 38 求出的比较值的部分。表示部 42 是表示或图示在存储部 40 中顺序存储的多个比较值的部分。

[0082] 控制部 18 通过第 2 电缆 44 连接于解析部 16。即,控制部 18 通过第 2 电缆 44 和第 1 电缆 36,被连接于第 1 测定部 12 和第 2 测定部 14。另外,控制部 18 发送控制盖部 24 的开关、光源 10 的发光与停止发光和快门 34 的开关的控制信号。

[0083] (有害物质的评价方法)

[0084] 接着,对根据本发明的有害物质的评价方法详细地说明。图 3 是表示作为有害物质的生物生长阻碍因素的评价方法的步骤的流程图。该评价方法是用于评价在试验对象的水溶液样品中存在的生物生长阻碍主要因素的评价方法。这里,所谓生物生长阻碍因素,是对细菌、藻类、水蚤、鱼类等的生物个体带来生长阻碍作用或毒性等的坏影响的因素。

[0085] 首先,在比色皿等的容器内,混合成为试验对象的水溶液样品和调整溶液(步骤 S01)。

[0086] 作为水溶液样品,可以利用,从湖泊河流和井水等天然水源直接采取的水,含有从土壤和污泥等固形物由一般的提取方法得到的提取成分的水溶液,清洗蔬菜等被撒布了农药的物体的表面而流出的水溶液,通过在液体中吸收气体成分而得到的水溶液,含有从植物或动物等(蔬菜和肉食等)由一般的提取方法而得到的提取成分的水溶液,以及含有从植物或动物采取的组织液、血液、乳汁、粪尿等的排泄物由一般的提取方法而得到的提取成分的水溶液等。另外,上述水溶液样品,可以使用通过预先由溶剂提取或固相提取等的分级处理而在水溶性物质、疏水性物质等的特性不同的成分中分离或浓缩了的样品。

[0087] 调整溶液是含有用于调整水溶液样品的盐浓度、pH 的各种盐类的溶液。调制用于使用光合成样品的延迟荧光测量的测量溶液时,水溶液样品往往是未知的水溶液,其盐浓度、pH 等往往是多种多样的。另外,已知在盐浓度、pH 没有适当范围时,对光合成样品的光合成功能带来影响。因此,调整溶液可以用于调整测量溶液的盐浓度、pH。而且,为了进行高灵敏度的测量,优选在比色皿中的测量溶液中的光合成样品的分布密度均匀而不偏,优选在测量中不产生沉淀物和浮起物。因此,优选调整溶液含有用于在测量溶液中的光合成

样品的分布密度不发生偏差地均匀化的稳定剂。例如,可以通过使之在测量溶液中具有某种程度的粘性,使比重与光合成样品一致,而均匀化。

[0088] 作为调整溶液的溶质,可以列举例如,将水溶液样品的盐浓度、pH 调整为适合于光合成样品的条件的混合盐类,将光合成样品的测量溶液中的分布密度均匀化的稳定剂,以及在光合成反应中最低限度需要的营养盐类等。另外,作为在调整溶液中所含的稳定剂,可以使用在测量中的光合成样品的空间稳定化中需要的比重调整剂和凝胶化剂(增粘剂)等。通过使用这样的比重调整剂,测量溶液的比重被调整为与光合成样品基本一致。另外,该稳定剂也可以取代调整溶液而包含在后述的光合成样品中。

[0089] 其次,在比色皿等的容器内,在由调整溶液调整的水溶液样品中混入光合成样品,而被调制成为试验测量溶液(步骤 S02,调制步骤)。此时,试验测量溶液中的光合成样品被混合成为均匀的浓度。

[0090] 所谓光合成样品,是具有光合成功能的样品,只要能够是能够发出延迟荧光的就可以,例如,可以列举,藻类或植物性浮游生物、氰基细菌、光合成细菌、植物体和叶或其细片、愈伤组织等的植物性培养细胞、从植物提取的光合成小器官和类囊体膜、还有人工合成的具有光合成样功能的膜·蛋白复合体等。优选可以利用例如蓝藻类的螺旋藻属(*Spirulina*)、绿藻类的月芽藻属(*Selenastrum*)和黄色藻类的等鞭金藻属(*Isochrysis*),或者,从菠菜等提取的类囊体膜等。

[0091] 将如上述地调制的试验测量溶液在规定的条件下以规定的放置时间放置(步骤 S03,放置步骤)。所谓光条件,指的是在放置时被照射在试验测量溶液中的光波长、光量,是合成光时的各成分的波长和光量那样的环境条件。

[0092] 然后,如以下那样地测量从试验测量溶液发出的延迟荧光的光量,测定延迟荧光的光量的时间变化(步骤 S04,测量步骤)。

[0093] 图 4 是表示测定延迟荧光的光量时的延迟荧光测量装置 1 的动作的流程图。另外,在箱体 20 内的设置部 28 中,设置着加入了试验测量溶液的容器。

[0094] 首先,控制部 18 发送使光源 10 发光的控制信号。由此,光源 10 发光(步骤 S401)。该发光在对试验测量溶液进行了用于使光合成样品适应测量光的预备的光照射后,进行规定照射时间的用于产生延迟荧光的光照射。光源 10 一发光,第 1 测定部 12 就测定试验测量溶液的吸光度或散射光的光量(步骤 S402)。测定后,第 1 测定部 12 将关于吸光度或散射光的光量的信息发送到计算部 38。此后,控制部 18 发送使光源 10 的发光停止的控制信号。由此,光源 10 停止发光(步骤 S403)。另外,上述的吸光度或散射光的光量的测定也可以在预备的光照射时进行。

[0095] 发光停止后,控制部 18 发送使快门 34 打开的控制信号。由此,快门 34 打开(步骤 S404)。快门 34 一打开,第 2 测定部 14 就测定延迟荧光的光量(步骤 S405)。测定后,第 2 测定部 14 将关于在规定的测量时间中的延迟荧光的光量的时间变化的信息发送到计算部 38。此后,控制部 18 发送使快门 34 关闭的控制信号。由此,快门 34 关闭(步骤 S406)。

[0096] 在至此的处理中,关于试验测量溶液的延迟荧光量的测量(第 1 步骤)完成。

[0097] 接着,回到图 3,以和步骤 S01 同样的条件,在比色皿等别的容器内混合标准样品和调整溶液(步骤 S05)。这里,标准样品是已知不存在称为生物生长阻碍因素的有害物质的溶液,例如,可以使用灭菌蒸馏水和纯水等除去了杂质、菌类的水。

[0098] 然后,以和步骤 S02 同样的条件,在比色皿等的容器内,在由调整溶液调整了的的标准样品中混入光合成样品,调制成为标准测量溶液(步骤 S06)。以下,和步骤 S03 ~ S04 同样操作,进行标准测量溶液的延迟荧光量的测量(步骤 S07 ~ S08,以上是第 2 步骤)。

[0099] 另外,为了提高测量精度,上述的延迟荧光量的测量(步骤 S401 ~ S406),也可以对试验测量溶液或标准测量溶液多次反复进行,从而算出其平均值。

[0100] 测量试验测量溶液和标准测量溶液的延迟荧光量的时间变化及各自的测定时的吸光度(或散射光的光量)后,计算部 38 就基于这些延迟荧光量的时间变化,求出相关于生物生长阻碍因素的比较值(步骤 S09)。

[0101] 图 5 是表示标准的测定条件下的延迟荧光的光量的时间变化的例子的图。这里,所谓标准的测定条件如下。首先,作为光合成样品,准备在光强度 $50 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 、波长 665nm 的红色单色光下以一般方法培育的蓝藻类的钝顶螺旋藻(*Spirulina platensis*),作为标准样品,准备 1.8ml 的灭菌蒸馏水。接着,在标准样品中添加含有 4 倍浓度的标准蓝藻培养用混合盐类和用于调整 pH 和盐浓度的混合盐类的 0.6ml 的调整溶液。接着,混合含有换算为 665nm 的吸光度、 $\text{OD} = 0.1$ 左右且均匀的钝顶螺旋藻(*Spirulina platensis*),和作为凝胶化剂的 0.5 重量%的琼脂的 0.6ml 的光合成样品,调制 3ml 的测量溶液。

[0102] 此后,在光强度 $1.5 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 的白色荧光灯下放置 15 分钟左右。然后,使用延迟荧光测量装置 1,在作为用于使光合成样品适应测量光条件的预备光照射而照射 2 秒 665nm、 $0.8\text{mW}/\text{cm}^2$ 的光后,使之在黑暗下待命 60 秒钟。此后,再次照射 2 秒 665nm、 $0.8\text{mW}/\text{cm}^2$ 的激励光后,以时间分辨率 0.1 秒测量 60 秒钟内的延迟荧光的光量。进行 3 次上述 60 秒钟的测量,从其平均值可以得到延迟荧光的光量的时间变化。另外,对水溶液样品也同样测量。

[0103] 如图 5 所示地,得到的延迟荧光衰减曲线(延迟荧光的光量的时间变化),具有从光照射结束后继续的为衰减曲线顶点的第 1 峰(P1)以及在光照射结束后 25 ~ 35 秒近处出现的第 2 峰(P2)。另外,在第 1 峰(P1)和第 2 峰(P2)之间的靠近 P1 处出现拐点(C1)。这些 P1、P2 和 C1(特征点)表示根据生物生长阻碍因素的种类的特征性的变化。这些特征点的变化是由光合成样品对生物生长阻碍因素的感受性的变化带来的。另外,作为该特征点,不限于上述 3 个点,也可以使用 P1 和 P2 之间的极小点或者在延迟荧光衰减曲线中的其它拐点。

[0104] 这里,计算部 38 检测试验测量溶液和标准测量溶液的延迟荧光衰减曲线中的特征点,算出评价该特征点的评价值。作为该评价值,可以使用在 P1 中的延迟荧光量 CP1、在 P2 中的延迟荧光量 CP2、以及在 P2 中的光照射结束后的经过时间 TP2。另外,作为用于评价拐点 C1 的评价值,使用试验测量溶液与标准测量溶液的延迟荧光的光量的时间变化的值。

[0105] 然后,计算部 38 还进行基于各个测量溶液测定时的吸光度(或散射光的光量)校正延迟荧光的光量或评价值。该校正是用于校正由测量溶液中的光合成样品的浓度差产生的测定误差的。该测定误差,特别是在评价光合成样品的极微量变化区域时,由在设置部 28 的光合成样品的配置、或设置部 28 本身的配置等,由于光照射量、光路变化而产生。在该校正中,以吸光度(或散射光的光量)为基础而使用被测量的细胞密度是有效的。

[0106] 为了高精度地进行上述校正,优选试验测量溶液中和标准测量溶液中的光合成样品的密度,是在与关于各个的延迟荧光的光量具有比例关系的密度范围。即,测量溶液中的

光合成样品密度在某值以下时,吸光度(或散射光的光量)和延迟荧光的光量,与光合成样品的密度显示高度相关。该密度的上限值,根据每个光合成样品的特性适当设定。

[0107] 图6中,图表(a)表示波长665nm的吸光度(OD665)和延迟荧光量CP1的关系的一个例子,图表(b)表示波长750nm的吸光度(OD750)和延迟荧光量CP1的关系的一个例子。根据图6的例子,吸光度和延迟荧光量CP1在直到吸光度(OD) = 0.5附近有高度相关。但是,在OD = 0.5以上时可知,由光合成样品本身的自我吸收,延迟荧光量可见并且减少。因此,此时吸光度如果在OD = 0.5以下的范围内,以其为基础能高精度地进行延迟荧光量的校正。

[0108] 其次,计算部38从评价值算出用于使由于水溶液样品中的生物生长阻碍因素的影响显化的比较值。作为比较值的例子,可以使用取了从试验测量溶液与标准测量溶液得到的CP1、CP2、TP2的比而得到的VCP1值、VCP2值、VTP2值,取从试验测量溶液与标准测量溶液得到的延迟荧光的光量的时间变化的差而得到的曲线(Curve)值。通过评价这些比较值,可以适当地评价光合成样品对生物生长阻碍因素的感受性。

[0109] 另外,在以下的本说明书中,CP1是从光照射结束后0.1秒至0.5秒的延迟荧光量累计量[counts],TP2是出现第2峰(或类似的拐点)的光照射结束后的经过时间[sec],CP2是第2峰(或类似的拐点)出现的时刻 ± 0.5 秒的延迟荧光量累计量[counts],曲线(Curve)值是包含C1的第1峰和第2峰之间的延迟荧光衰减曲线的、试验测量溶液和标准测量溶液的差[counts],VCP1值、VCP2值、VTP2值是分别作为CP1、CP2、TP2相对于标准测量溶液的试验测量溶液的比而算出的。关于这些评价值和比较值的具体计算方法可以根据需要适当选择。

[0110] 另外,为了由这样算出的比较值以高灵敏度检测生物生长阻碍因素,优选即使是在和上述延迟荧光的光量具有比例关系的光合成样品密度的范围内,光合成样品也是充分的低密度。

[0111] 图7中表示相对于波长665nm的吸光度的VCP1值的变化。该VCP1值是由以混合了含有浓度0.1ppb的DCMU的水溶液样品以及光合成样品钝顶螺旋藻(*Spirulina platensis*)的测量溶液为对象进行测量的结果而得到的值。另外,以标准测量溶液为测量对象时,吸光度在0.5以下时吸光度和延迟荧光的光量显示高度相关。

[0112] 如图7所示地,随着光合成样品密度变得高于OD = 0.1,VCP1值(%)下降。另一方面,延迟荧光的光量和光合成样品密度的相关,保持到吸光度0.5附近。由此可知,即使在延迟荧光的光量不由自我吸收而衰减的光合成样品密度的范围中,光合成样品密度比较高时,生物生长阻碍因素的检测灵敏度下降。对光合成样品的生物生长阻碍性,由于水溶液样品中的化学物质被浸透吸收在光合成样品中,并与特定的目标生物体分子直接或间接的相互作用而发生。因此,相对于极低浓度的化学物质,存在过剩的光合成样品(=目标生物体分子)时,结果变为影响下降。

[0113] 回到图3,一旦求出比较值,存储部40就存储比较值(步骤S10),表示部42就表示被存储的比较值(步骤S11)。这里的表示通过例如图表表示被存储的比较值等进行。另外,也优选可以与关于以前被存储的其它水溶液样品的比较值对比那样地并列表示等。最后,通过将被表示的比较值与已知物质的比较值对比解析,进行在水溶液样品中的生物生长阻碍因素的定性·定量(步骤S12,以上是第3步骤,评价步骤)。关于步骤S12中的解

析·评价方法的详细内容在后面详细叙述。

[0114] 另外,为了稳定地进行高灵敏度测量,在步骤 S03 中的测量溶液放置时的光条件,优选控制在规定的条件。另外,在将光合成样品从明处移动到暗处时等,为了光合成样品经过一段时间慢慢地适应该环境,从测定前起以一定的光条件保存光合成样品,或改变放置光合成样品的光环境后,经过规定时间后进行延迟荧光的测量更为适合。

[0115] 在图 8 中,表示作为光合成样品使用钝顶螺旋藻 (*Spirulina platensis*) 时,使测量溶液放置时的光强度进行各种变化时的评价的一个例子。在图 8 中,图表 (a) 表示改变光强度时的 CP1,图表 (b) 表示改变光强度时的 CP2,图表 (c) 表示改变光强度时的 TP2。如图 8 所示,在测定前在强光下的在明处的测量溶液中,CP1 大于其它的光强度,在弱光下的测量溶液中,CP2 大于其它的光强度,在黑暗下的测量溶液中,TP2 大于其它的光强度。这样可知,从光合成样品发出的延迟荧光,由于放置状态的光强度而变化,其结果是,影响到延迟荧光衰减曲线的测量·评价结果。从这样的理由出发,将测量溶液放置时的光条件控制在规定的条件,在用于再现性良好且稳定地测定·评价延迟荧光衰减曲线中的极大点、极小点、拐点等的特征点是重要的。

[0116] 另外,在测量溶液中被混合的光合成样品,为了得到再现性良好的测量结果,优选使用以规定的培养条件培养的样品。作为这样的规定的培养条件,优选是一定的光环境下(例如照射波长、照射强度)。另外,更优选在低温下在黑暗或规定的光照射强度(例如光强度 $1 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$)下保存以单色光源培育的样品,且繁殖被抑制的培养条件。

[0117] 在图 9 中表示使用以不同的光环境培育的光合成样品钝顶螺旋藻 (*Spirulina platensis*) 时的评价。图 9 中,图表 (a) 表示改变培养条件(光波长)时的 CP1,图表 (b) 表示使光波长变化时的 CP2,图表 (c) 表示使光波长变化时的 TP2。如图 9 所示地,因为延迟荧光衰减曲线根据光环境而变化,所以,得到的评价也变动。从这样的理由出发,以规定的培养条件培育光合成样品,对用于进行标准化的高灵敏度测量是重要的。

[0118] (现有物质的测量)

[0119] 以下表示,在上述的标准测定条件下,关于在含有成为生物生长阻碍因素的现有化学物质的水溶液样品的延迟荧光测量的解析结果。

[0120] 图 10 和图 11 是表示以各种浓度含有阿特拉津的水溶液样品为对象算出的比较值的图表。在图 10 中,图表 (a) 是表示相对于阿特拉津浓度的 VCP1 值的变化图表,图表 (b) 是表示相对于阿特拉津浓度的 VCP2 值的变化图表,图表 (c) 是表示相对于阿特拉津浓度的 VTP2 值的变化图表。另外,图 11 是表示使阿特拉津浓度变化时的曲线 (Curve) 值的图表。阿特拉津虽然被作为阻碍光合成的疏水性除草剂而利用,但已确认以 $20 \mu\text{g}/\text{l}$ 左右的低浓度对青蛙等有显示致畸形作用的内分泌紊乱作用,是成为限制的对象化学物质。另外,在图中被标明的阿特拉津浓度,是最终被调整为合计 3ml 的试验测量溶液中的浓度。

[0121] 如图 10 所示可知,随着阿特拉津浓度的增加,VCP1 值增大,另一方面 VCP2 值减少。另外,随着阿特拉津浓度的增加,VTP2 值有一些减少。另外,由图 11 判断,随着变为高浓度,曲线 (Curve) 值在激励后时间 1 秒附近向正的一侧变化,在激励后时间 3 ~ 4 秒附近向负的一侧变化下去。

[0122] 另外,图 12 和图 13 是表示以各种浓度含有 DCMU (敌草隆, diuron) 的水溶液样品

为对象算出的比较值的图表。在图 12 中, 图表 (a) 是表示相对于 DCMU 浓度的 VCP1 值的变化值的图表, 图表 (b) 是表示相对于 DCMU 浓度的 VCP2 值的变化值的图表, 图表 (c) 是表示相对于 DCMU 浓度的 VTP2 值的变化值的图表。另外, 图 13 是表示使 DCMU 浓度变化时的曲线 (Curve) 值的图表。DCMU (敌草隆, diuron) 与阿特拉津同样, 作为阻碍光合成的除草剂而被广泛利用, 但被指出有对生物的坏影响而成为限制的对象。另外, 在图中被标明的 DCMU 浓度, 是在最终被调整为合计 3ml 的试验测量溶液中的浓度。

[0123] 如图 12 所示, 可知, 随着 DCMU 浓度的增加, VCP1 值增大, 而 VCP2 值减少。另外, 随着 DCMU 浓度的增加, VTP2 值几乎不变。另外, 由图 13 判断, 曲线 (Curve) 值, 随着变为高浓度, 在激励后时间 1 秒附近向正的一侧变化, 在激励后时间 3 ~ 5 秒附近向负的一侧变化下去。

[0124] 另外, 图 14 和图 15 是表示以各种浓度含有百草枯 (paraquat) 的水溶液样品为对象被算出的比较值的图表。在图 14 中, 图表 (a) 是表示相对于百草枯浓度的 VCP1 值的变化值的图表, 图表 (b) 是表示相对于百草枯浓度的 VCP2 值的变化值的图表, 图表 (c) 是表示相对于百草枯浓度的 VTP2 值的变化值的图表。另外, 图 15 是表示使百草枯浓度变化时的曲线 (Curve) 值的图表。百草枯 (paraquat) 进入细胞后, 扰乱生物体反应的电子传递, 或通过产生活性氧而在细胞中引起障碍, 被作为除草剂利用。另外, 在图中被标明的百草枯浓度, 是在最终被调整为合计 3ml 的试验测量溶液中的浓度。

[0125] 如图 14 所示, 随着百草枯 (paraquat) 浓度的增加, VCP2 值和 VTP2 值减少, 但在高浓度时该减少变缓。另外, 随着百草枯 (paraquat) 浓度的增加, VCP1 值在低浓度中有一些减少。另外, 由图 15 判断, 随着变为高浓度, 曲线 (Curve) 值在激励后时间 1 ~ 4 秒附近向负的一侧变化。

[0126] 另外, 图 16 和图 17 是表示将以各种浓度含无机汞的水溶液样品为对象算出的比较值的图表。在图 16 中, 图表 (a) 是表示相对于无机汞浓度的 VCP1 值的变化值的图表, 图表 (b) 是表示相对于无机汞浓度的 VCP2 值的变化值的图表, 图表 (c) 是表示相对于无机汞浓度的 VTP2 值的变化值的图表。另外, 图 17 是表示使无机汞浓度变化时的曲线 (Curve) 值的图表。无机汞是不仅对光合成样品而且对一般的细胞也显示毒性的物质。另外, 在图中被标明的无机汞浓度, 是作为氯化汞溶液调制、最终被调整为合计 3ml 的试验测量溶液中的换算为汞离子浓度的浓度。

[0127] 如图 16 所示地, 随着无机汞浓度的增加, VTP2 值增加, 而 VCP2 值减少。另外, 随着无机汞浓度的增加, VCP1 值在低浓度时不太变化, 但在高浓度时增加。另外, 由图 17 判断, 随着变为高浓度, 曲线 (Curve) 值在经过时间 1 ~ 2 秒附近时间分布在正的一侧变化。

[0128] 另外, 图 18 和图 19 是表示将以各种浓度含有游离氰的水溶液样品作为对象而算出的比较值的图表。在图 18 中, 图表 (a) 是表示相对于游离氰浓度的 VCP1 值的变化值的图表, 图表 (b) 是表示相对于游离氰浓度的 VCP2 值的变化值的图表, 图表 (c) 是表示相对于游离氰浓度的 VTP2 值的变化值的图表。另外, 图 19 是表示使游离氰浓度变化时的曲线 (Curve) 值的图表。游离氰不仅对光合成样品、而且对一般的细胞也显示毒性。另外, 在图中被标明的游离氰浓度, 是作为氰化钾溶液调制、最终被调整为合计 3ml 的试验测量溶液中的换算为氰离子的浓度。

[0129] 如图 18 所示地, 随着游离氰浓度的增加, VTP2 值和 VCP2 值在低浓度时几乎不变

化,但在高浓度时减少。另外,随着有机氰浓度的增加, VCP1 值几乎不变化。另外,由图 19 判断,随着变为高浓度,曲线 (Curve) 值向正侧变化,该变化集中在激励后时间 2 ~ 4 秒附近。

[0130] 另外,图 20 和图 21 是表示将以各种浓度含有 TPN 的水溶液样品作为对象而算出的比较值的图表。在图 20 中,图表 (a) 是表示相对于 TPN 浓度的 VCP1 值的变化值的图表,图表 (b) 是表示相对于 TPN 浓度的 VCP2 值的变化值的图表,图表 (c) 是表示相对于 TPN 浓度的 VTP2 值的变化值的图表。另外,图 21 是表示使 TPN 浓度变化时的曲线 (Curve) 值的图表。TPN 是在显示杀菌作用的农药等中所含的成分,是使与产生细胞的能量 ATP 相关的酶失活,且不作用于光合成、而作用于呼吸代谢的化学物质。另外,在图中被标明的 TPN 浓度,稀释只将 TPN 作为主剂含有的杀菌剂而使用、最终被调整为合计 3ml 的试验测量溶液中的换算为 TPN 浓度的浓度。

[0131] 如图 20 所示,随着 TPN 浓度的增加, VCP1 值和 VTP2 值增加,而 VCP2 值减少。另外,由图 21 判断,随着成为高浓度,曲线 (Curve) 值在激励后时间 1 秒附近向正侧变化,在激励后时间 3 ~ 5 秒附近向负侧变化。

[0132] TPN 是成为在蔬菜中的残留农药的成为限制对象的杀菌剂的主要品种,法定的限制浓度为 1ppm。另外,以 TPN 为主剂的主要的市售杀菌剂中的散布浓度是 400ppm。本法中的检测灵敏度显示,能够检测散布浓度的 10000 分之 1 左右的浓度,由从蔬菜表面得到水溶液样品也可以充分地检测限制标准以下的 TPN。

[0133] (生物生长阻碍因素的解析·评价)

[0134] 在实际的水溶液样品的测量中,往往其中同时存在多个生物生长阻碍因素。由生物生长阻碍因素的评价方法而得到的延迟荧光衰减曲线,时间性地分离由各种生长阻碍因素产生的影响,对于生物生长阻碍因素相加地出现。因此,在存在多个生物生长阻碍因素时,能够将分别地推断每个的同时,也能够累计地评价它们的变化。这样,可以同时进行生物生长阻碍因素的定性评价和定量评价。

[0135] 在水溶液样品中存在不同种类的生物生长阻碍因素时,例如存在着 DCMU 和无机汞时,在本实施方式中使用的比较值中出现主要变化的比较值,例如,在 DCMU 中为 VCP1 值,在无机汞中为 VCP2 值和 VTP2 值。这样,在延迟荧光衰减曲线中出现变化的比较值同时含有不同的生物生长阻碍因素时,全部比较值的变化相加地出现。

[0136] 图 22 表示分别由以 0.1ppb 浓度含有作为生物生长阻碍因素的 DCMU 的试验测量溶液「DCMU」、以 20ppb 浓度含有作为生物生长阻碍因素的汞离子的试验测量溶液「Hg²⁺」、以及以 0.1ppb 浓度含有 DCMU 和以 20ppb 浓度含有汞离子的试验测量溶液「DCMU+Hg」得到的比较值 VCP1、VCP2 值和 VTP2 值。在图 22 中,图表 (a) 是表示各试验测量溶液的 VCP1 值的图表,图表 (b) 是表示各试验测量溶液的 VCP2 值的图表,图表 (c) 是表示各试验测量溶液的 VTP2 值的图表。

[0137] 如图 22 的图表 (a) 所示,可知,对于 VCP1 值,出现主要变化的评价值 VCP1 值在「DCMU」中是 116.0,在含有 DCMU 和汞离子的「DCMU+Hg」中是 129.6,在只含有汞离子的「Hg²⁺」中成为 104.1,含有 DCMU 时 VCP1 值的变化大。另外,如图 22 的图表 (b) 所示,可知,对于 VCP2 值,出现主要变化的评价值 VCP2 值在「Hg²⁺」中是 59.9,在含有 DCMU 和汞离子的「DCMU+Hg」中是 44.9,在只含有 DCMU 的「DCMU」中成为 88.0,含有汞离子时 CP2 的变

化大。另外,如图 22 的图表 (c) 所示,可知,对于 VTP2 值,出现主要变化的评价值 VTP2 值在「Hg²⁺」中是 144.9,在含有 DCMU 和汞离子的「DCMU+Hg」中是 149.9,在只含有 DCMU 的「DCMU」中成为 100.0,含有汞离子时 TP2 的变化大。

[0138] 从以上的结果可知,在含有 DCMU 和汞离子的「DCMU+Hg」中,在 DCMU 出现主要变化的 VCP1 值和汞离子中出现主要变化的比较值 VCP2 和 VTP2 值中出现变化,能够同时测量同时含有 DCMU 和汞离子的情况。

[0139] 另一方面,在水溶液样品中存在同种的生物生长阻碍因素时,例如存在阿特拉津 (atrazine) 和 DCMU 时,在本实施方式中使用的比较值中出现主要变化的比较值都成为 VCP1 值。这样,在同时含有相同生物生长阻碍因素时,延迟荧光衰减曲线中出现变化的比较值,全部比较值的变化相加地出现。

[0140] 图 23 表示分别从以 0.2ppb 浓度含有作为生物生长阻碍因素的阿特拉津的试验测量溶液「阿特拉津」、以 0.1ppb 浓度含有作为生物生长阻碍因素的 DCMU 的试验测量溶液「DCMU」、以及以 0.1ppb 浓度含有 DCMU 和以 0.2ppb 浓度含有阿特拉津的试验测量溶液「阿特拉津 +DCMU」得到的比较值 VCP1 值、VCP2 值和 VTP2 值。在图 23 中,图表 (a) 是表示各试验测量溶液的 VCP1 值的图表,图表 (b) 是表示各试验测量溶液的 VCP2 值的图表,图表 (c) 是表示各试验测量溶液的 VTP2 值的图表。

[0141] 如图 23 的图表 (a) 所示,可知,VCP1 值,在「阿特拉津」中成为 106.4,在「DCMU」中成为 125.6,在「阿特拉津 +DCMU」中成为是 132.2,在同时含有阿特拉津和 DCMU 时,VCP1 值相加地增加。另外,如图 23 的图表 (b) 所示,可知,VCP2 值,在「阿特拉津」中成为 90.0,在「DCMU」中成为 84.6,在「阿特拉津 +DCMU」中成为是 86.0,看不到大的变化。另外,如图 23 的图表 (c) 所示,可知,VTP2 值,在「阿特拉津」中成为 100.0,在「DCMU」中成为 101.5,在「阿特拉津 +DCMU」中成为 100.0,看不到大的变化。

[0142] 由以上的结果,在含有阿特拉津和 DCMU 的「阿特拉津 +DCMU」中,在都出现主要变化的比较值 VCP1 值中相加性的值增加。这样,由于同种的生物生长阻碍因素给延迟荧光的测量结果带来相加性的影响,所以,可以得到对于成为同种的生物生长阻碍因素的化学物质的生物生长阻碍因素的综合性评价结果。

[0143] (生物生长阻碍因素的评价用工具箱)

[0144] 接着,详细说明根据本发明的生物生长阻碍因素的评价用工具箱。为了简便地实施上述生物生长阻碍因素的评价方法,可以使用生物生长阻碍因素的评价用工具箱 (kit)。生物生长阻碍因素的评价用工具箱是包含:在水溶液样品或标准样品中被混合的浓缩光合成样品,含有用于调整混合有光合成样品的水溶液样品或标准样品的盐浓度和 pH 的浓缩的混合盐类、营养盐类的调整溶液,以及在水溶液样品中分离光合成样品和调整溶液并使之混合的混合设备的工具箱。

[0145] 这里,优选在上述浓缩光合成样品、调整溶液的任意一个或在其两者中,含有对光合成样品的空间稳定化所必要的稳定剂。另外,在使浓缩光合成样品中含有稳定剂时,可以使用在浓缩状态下不给光合成样品带来坏影响的稳定剂。另外,可以合适地使用不阻碍对水溶液样品中的生长阻碍因素吸附和分解等对光合成样品的作用的稳定剂。作为稳定剂,可以列举例如琼脂糖等的多糖类和高分子聚合物。

[0146] 另外,作为混合设备,只要是可以在采液容器中将光合成样品和调整溶液在水溶

液样品中分离、混合的就可以使用任意形状的采液容器。

[0147] 图 24 是表示使用这样的生物生长阻碍因素评价用工具箱进行延迟荧光测量时的步骤的图。如图所示,在规定的采液容器 50 中采取规定量的水溶液样品 52,此后,混合调整溶液 54 使盐浓度和 pH 成为规定的范围。再在采液容器 50 中混合浓缩光合成样品 56。此后,在采液容器 50 内放置被调制的试验测量溶液 58 后,将采液容器 50 收纳在延迟荧光测量装置 1 中并进行延迟荧光的光量的测量。

[0148] 另外,作为采液容器,也优选使用能由吸引等采取规定量的水溶液样品的注射筒和滴液吸移管那样的容器作为采液容器。在该采液容器内,也优选以分离状态收纳含有稳定剂的调整溶液和浓缩光合成样品的任意一方或二者。此时,因为能够以水溶液样品采取时的一个动作进行调整溶液、光合成样品、稳定剂的混合,所以,可以更简便地进行测量。

[0149] 另外,在水溶液样品被吸引时,更优选在首先与调整溶液混合、接着与浓缩光合成样品混合那样的位置上,保持调整溶液和浓缩光合成样品。由此,即使是在水溶液样品的盐浓度、pH 能给光合成样品带来影响的范围内,也可以通过以调整溶液在调整后混合光合成样品而减少对光合成样品的影响。

[0150] 图 25 是表示使用滴液吸移管型的生物生长阻碍因素评价用工具箱进行延迟荧光的测量时的步骤的图。如该图所示,在滴液吸移管型的采液容器 60 内,可以上下分离地容纳调整溶液 54 和浓缩光合成样品 56。在采液容器 60 中,为了分离并保持调整溶液和浓缩光合成样品,也可以在采液容器 60 本体上具备壁或溶液袋等的分离设备。另外,从采液容器 60 的结构简单化、降低成本的观点出发,也可以通过在调整溶液和浓缩光合成样品中分别包含浓缩的凝胶化剂等的稳定剂而使各个或单个溶液保持高粘性。

[0151] 在这样的采液容器 60 中,水溶液样品 52 被吸引采取到收容调整溶液 54 的位置,水溶液样品和调整溶液 54 被暂且混合。此后,在采液容器 60 中,水溶液样品 52 被吸引采取直到到达规定量,并与浓缩光合成样品 56 相互混合。这样,在采液容器 60 内,放置被调制的试验测量溶液后,将采液容器 60 收纳在延迟荧光测量装置 1 中进行延迟荧光的光量的测量。

[0152] 通过使用以上说明的生物生长阻碍因素评价用工具箱,由于可以分别混合相对水溶液样品含有高浓度的盐类的调整溶液和光合成样品分别,所以,可以使盐类对光合成样品的影响最小限度化,可以防止由于渗透压差等产生的光合成样品的死亡・破损。

[0153] 以下,对在本发明的实施方式相关的生物生长阻碍因素的评价方法的作用效果进行说明。

[0154] 根据生物生长阻碍因素的评价方法,可以测量从在评价对象的水溶液样品中混合的光合成样品发出的延迟荧光的衰减曲线,以及从不存在生物生长阻碍要素的溶液中的光合成样品发出的延迟荧光的衰减曲线。然后,可以从各个衰减曲线出发,评价峰和拐点等的特征点,通过比较二者来评价生物生长阻碍因素对光合成样品的影响。通过进行这样的评价,可以同时而且高精度地定性、定量多个化学物质。另外,通过测量评价延迟荧光的光量,可以整体地缩短测量时间。

[0155] 另外,本发明不限于上述的实施方式,例如,在本实施方式相关的生物生长阻碍因素的评价方法中,测量溶液放置时的光条件被控制在规定的条件,但这也可以是在测量溶液的每次测量时,使光条件进行各种变化来评价比较值。

[0156] 图 26 是表示此时的生物生长阻碍因素评价方法的步骤的流程图。以和图 3 中的步骤的不同点为中心进行说明,首先,和步骤 S01、步骤 S02 及步骤 S05、步骤 S06 同样操作,调制试验测量溶液和标准测量溶液(步骤 S21 ~ 步骤 S22,步骤 S26 ~ 步骤 S27)。然后,设定初次放置时的光条件(步骤 S23、步骤 S28)。此后,在设定的光条件下,将试验测量溶液和标准测量溶液以规定的放置时间放置(步骤 S24、步骤 S29)。此后,和图 3 中的步骤 S04、步骤 S08 ~ 步骤 S12 同样操作,从被测量的延迟荧光的光量算出比较值,评价该比较值(步骤 S25、步骤 S30 ~ 步骤 S34)。然后,评价结束后,就返回步骤 S23 和步骤 S28,改变上次设定的条件后,再次算出比较值,反复进行根据光条件的比较值的变化评价。另外,测量溶液也可以在每个光条件下重新调制。

[0157] 另外,作为放置时的光条件,为了更加仔细地测量生物生长阻碍因素的变化,可以单独或组合使用可见光区域的单色光或其组合、红外光和紫外光等的光。

[0158] 图 27 是表示将放置时的光条件进行各种改变而算出的比较值的一个例子的图表。在图 27 中,图表(a)是表示关于相对于各种光条件的 TPN 的比较值的图表,图表(b)是表示关于相对于各种光条件的无机汞的比较值的图表。这里,放置时的光条件,使相对于测量溶液的照射光变化为白色荧光灯、绿色单色光(波长 530nm)和红色单色光(波长 665nm)3 种,将各照射光的光量设定为 $1.5 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 。作为比较值,算出 VCP1 值、VCP2 值、VTP2 值。

[0159] 如图 27 的图表(a)所示,在 TPN 的情况中,VTP2 值在放置时的光条件是「白色光」时为 122,「绿色光」时为 89,「红色光」时为 118。VCP2 值在放置时的光条件是「白色光」时为 47,「绿色光」时为 78,「红色光」时为 44。VCP1 值,在放置时的光条件是「白色光」时为 144,是「绿色光」时为 112,是「红色光」时为 171。从该结果可知,在 TPN 的情况中,在放置时的光条件是「绿色光」时,VCP1、VCP2、VTP2 全部评价值的变化率下降,生物生长阻碍因素的检测灵敏度下降。

[0160] 另外,如图 27 的图表(b)所示,在无机汞的情况中,VTP2 值在放置时的光条件是「白色光」时为 117,是「绿色光」时为 113,是「红色光」时为 114。VCP2 值在放置时的光条件是「白色光」时为 77,是「绿色光」时为 78,是「红色光」时为 77。VCP1 值在放置时的光条件是「白色光」时为 103,是「绿色光」时为 96,是「红色光」时为 98。因此可知,在无机汞的情况中,由放置时的光条件产生的 CP1、CP2、TP2 的评价值的变化率没有大的差别。

[0161] 根据上述结果,水溶液样品中的生物生长阻碍因素的作用根据放置条件的光条件而变化,但可以理解,该变化因每个生物生长阻碍因素而不同,是在特定的光波长条件下影响增大的,或者是不受由光条件产生的影响的生物生长阻碍因素等。

[0162] 因此,可以通过对光条件进行各种改变而评价比较值,将从相同水溶液样品得到的试验测量溶液放在不同的光条件下,比较它们的测量结果,得到关于生物生长阻碍因素的定性的信息。例如,如在图 27(a)中所示,在 TPN 的情况中,与白色光和红色光时比较,在绿色光时,VCP1、VCP2 和 VTP2 的变化减少。着眼于此,能够与其它生物生长阻碍因素进行辨别。

[0163] 以下,对本发明的适合的实施例再详细地说明,但本发明不被这些实施例所限定。

[0164] (实施例 1)

[0165] 作为评价对象的水溶液样品,使用从井水、湖沼水得到的水溶液,作为标准样品使

用蒸馏水,在上述的标准测定条件下算出比较值。在图 28 中表示在本实施例中的比较值的计算结果。在图 28 中,图表 (a) 是表示在以井水、湖沼水为对象而算出的 VCP1 值的图表,图表 (b) 是表示同样地被算出的 VCP2 值的图表,图表 (c) 是表示同样地被算出的 VTP2 值的图表。

[0166] 如图 28 所示,在「井水」中 VCP1 值增加了 137.1%,但在「湖沼水」中看不到显著变化。另外,在 VCP2 值和 VTP2 值中看不到显著变化。对相同地点的井水在 12 日内采水 4 次而进行测量的结果,几乎同样地得到了 120 ~ 140%左右的 VCP1 值。

[0167] 在本实施例的结果中,可以认为作为只有 VCP1 值为 120 ~ 140%左右的生物生长阻碍因素的已有化学物质,是 0.5ppb 以下的极低浓度水平的 DCMU、阿特拉津等的疏水性除草剂。因此,推测在试验中使用的井水中含有类似于 DCMU 或阿特拉津的疏水性化学物质类的农药。

[0168] (实施例 2)

[0169] 作为评价对象的水溶液样品,对含有在实施例 1 中的井水和蒸馏水、0.1ppb 浓度的 DCMU 的水溶液,在标准的测定条件下,和实施例 1 同样操作,算出比较值。DCMU 是已知的疏水性有机物类除草剂之一,是与在实施例 1 中的井水评价值的变化特征类似的物质。

[0170] 另外,吸附处理井水、蒸馏水和 DCMU 的各水溶液,以吸附处理过的水溶液为对象,也进行计算 VCP1 值。吸附中,使用由高密度过滤器过滤的水(由 Millipore 公司生产的 mili-Q 过滤了的水)清洗后使之干燥的活性炭。然后,对于蒸馏水、井水、0.1ppb 浓度的 DCMU 的各个水溶液 5ml 加入 0.8g 活性炭后,缓慢浸透 1 小时。以在 0.45 μ m 过滤器中分别过滤这 3 种溶液而得到的物质为对象,进行延迟荧光量的测定。

[0171] 图 29 中表示在本实施例中的 VCP1 值的计算结果。在图 29 中表示关于蒸馏水、井水、DCMU 的各种水溶液样品算出的 VCP1 值,以及关于吸附处理了的每个的各水溶液样品而算出的 VCP1 值。如在图 29 所示,VCP1 值,相对于从蒸馏水得到的结果,「井水」为 117.1、「DCMU」为 120.9,从井水得到的 CP1 的变化,与在 0.1ppb 浓度的 DCMU 中的变化几乎为相同的结果。

[0172] 另外,相对于吸附前的蒸馏水「蒸馏水」的 VCP1 值 100,活性炭吸附处理后的蒸馏水「蒸馏水(吸附后)」的 VCP1 值为 99.7,评价为活性炭吸附处理对 VCP1 的变化几乎没有影响。在活性炭吸附处理前,在可看到 VCP1 增加的「井水」和「DCMU」中,活性炭吸附处理后的各个 VCP1 值为,「井水(吸附后)」95.5、「DCMU(吸附后)」96.3、与「蒸馏水」和「蒸馏水(吸附后)」成为同等的值。由该结果,评价为,在该井水中含有类似于 DCMU 等疏水性有机物的物质。

[0173] 根据本发明的有害物质评价方法和有害物质评价用工具箱,不限于上述实施方式和实施例,能够有各种变形。例如,关于在水溶液样品中混合的光合成样品,一般地,如上所述,是具有光合成功能的样品,也可以使用能够延迟荧光发光的样品。

[0174] 另外,作为这样的光合成样品,优选使用从选自耐盐性藻类、耐碱性藻类和耐酸性藻类的至少一种组成的光合成样品。这里,所谓耐盐性藻类,指的是能够在盐水和海水等高盐性环境中生长的藻类。另外,所谓耐碱性藻类、耐酸性藻类,指的是能够在极端的 pH 环境中生长的藻类。作为这样的光合成样品,可以列举例如螺旋藻属(Spirulina)。

[0175] 即,作为光合成样品,使用作为耐盐性藻类已知的螺旋藻属(Spirulina)、杜

氏藻属 (*Dunaliella*)、具有耐碱性的螺旋藻属 (*Spirulina*)、具有耐酸性的眼虫藻属 (*Euglena*)，以及在其它的海洋与盐水湖中生息的藻类等、可以耐受高盐环境和碱性（高 pH）或酸性（低 pH）环境的藻类时，测量比适合于这些藻类的环境盐浓度低的淡水试样等时，相比使用淡水性藻类等时产生以下的优点。

[0176] 这里，作为一个例子，对使用可以耐受高盐性、碱性环境的藻类螺旋藻属的情况进行说明。螺旋藻属是在高盐性环境的盐水湖和低盐性环境的淡水湖都生息的螺旋藻属。因此，如果使用螺旋藻属，可以在相当于盐水湖环境的高盐性培养基（SOT 培养基）和相当于淡水湖环境的低盐性培养基（MA 培养基）的两种环境中测量延迟荧光。

[0177] 一般地，成为试样的水溶液样品从河流和湖沼水、地下水、土壤提取水等各种环境中采取。因此，样品的盐浓度不均匀，其结果是，往往作为 pH 等藻类的生长环境，重要的要素不均匀。对此，可以用在成为试验对象的水溶液样品中混合调整溶液，调整盐浓度、pH，然后与光合成样品混合的方法。此时，通过将水溶液样品作为高盐性培养基调整，相比于低盐性培养基的情况，可以更容易地调整 pH 等。

[0178] 图 30 是表示使用高盐性培养基和低盐性培养基、调整水溶液样品时的调整例子的表。这里，作为水溶液样品，使用湖水、井水、自来水和蒸馏水。在这些调整例子中，原水的 pH，湖水是 7.44、井水是 6.03、自来水是 7.07、蒸馏水是 5.46，其样品之间的标准偏差是 0.91。

[0179] 相对于此，以 5 倍浓度的高盐性培养基作为调整溶液进行调整时的 pH，湖水成为 9.68，井水成为 9.71，自来水成为 9.72，蒸馏水成为 9.69。此时的标准偏差是 0.02，相比于原水，由水溶液样品的不同产生的 pH 的差改善了。另一方面，以 5 倍浓度的低盐性培养基作为调整溶液进行调整时的 pH，湖水成为 8.13、井水成为 7.77、自来水成为 8.14、蒸馏水成为 8.29。此时的标准偏差是 0.22，虽然相比于原水得到了改善，但相比于高盐性培养基结果较差。

[0180] 即使关于一般的盐浓度，相对于淡水环境、以高盐浓度调整的高盐性培养基，相比于低盐性培养基，更容易改善在原水中的盐浓度的波动。这样，作为光合成样品，例如在使用在海洋和盐水湖生息的藻类等、可以耐受高盐浓度和碱性或酸性环境的藻类时，在测量比适合于这些藻类的环境盐浓度低的淡水样品等时，相比于使用淡水性藻类的情况，在改善原水的 pH、盐浓度等的波动上有优点。

[0181] 另外，关于成为延迟荧光测量对象的溶液，优选在测量延迟荧光的光量前使之均匀化。如果随着时间经过，测量溶液中的光合成样品沉淀、浮起，则在光检测器视野内的光合成样品的密度就变化，发光量的测量值就变化。其结果是，由于规定时间的放置和测量中的时间经过，该测量精度有时下降。相对于此，通过将溶液均匀化，能够进行误差小的有害物质的评价。关于这样的溶液均匀化，优选使用用于使光合成样品的分布密度均匀化的稳定剂。另外，关于在有害物质评价中可以使用的的评价用工具箱，优选具备用于使光合成样品的分布密度均匀化的稳定剂。作为这样的稳定剂，可以使用例如上述那样的比重调整剂和增粘剂（凝胶化剂等）等。

[0182] 图 31 是表示相对于在溶液未均匀化和添加增粘剂的条件下的放置时间的延迟荧光量变化的图表。这里，作为光合成样品，使用蓝藻螺旋藻属（钝项螺旋藻 (*Spirulina platensis*))，关于图 5，在和上述的标准测定条件同样的条件下，改变放置时间并进行延迟

荧光的光量的测量。

[0183] 关于增粘剂的添加,在「未均匀化」中,没有添加作为相当于增粘剂的凝胶化剂的琼脂而使用调整的测量溶液,在「添加增粘剂」中,表示使用了以相对于总体 0.1 重量%添加有作为增粘剂的琼脂的测量溶液时的测量结果。另外,测量,从溶液刚调整后(0 分钟)到 15 分钟后随着放置时间的经过而实施,作为延迟荧光量求出从光照射结束后 0.1 秒到 0.5 秒的延迟荧光量累计量 CP1。

[0184] 如图 31 所示,在不含增粘剂「未均匀化」的图表中,随着放置时间的经过,CP1 下降。这是因为随着时间经过,光合成样品沉淀、浮起起来。相对于此,在「添加增粘剂」的图表中,即使在时间经过后,在 CP1 的测量值中也看不到大的变化。由以上可知,关于测量溶液,采取将光合成样品均匀化的方法并且在测量中使用,对于提高测量精度是有效的。

[0185] 这样的增粘剂优选不阻碍、不扰乱来自光合成样品的发光的测量,且以能够测量微弱的发光的条件添加。具体的,作为增粘剂,优选使用在光合成样品能够均匀化的浓度中,不具有荧光和磷光、透明而不吸收光合成样品发光的增粘剂。作为这样的增粘剂的例子,可以使用低浓度的琼脂和琼脂糖、甲基纤维素溶液等。另外,作为在测量前使光合成样品均匀化的方法,除了添加增粘剂以外,也可以由微细的网和晶格结构来抑制测量溶液中的光合成样品的沉降、浮起或来自外部的搅拌而保持均匀性。

[0186] 另外,关于延迟荧光的光量等,优选对于由测量溶液中的光合成样品的浓度差产生的测定误差,根据需要进行校正等。即,在测量中使用的光合成样品,由于使用生物细胞或细胞内小器官、膜蛋白复合体等的性质上,由在其操作中和保存中细胞生长·分裂产生的增加和由死亡·分解引起的减少,有时产生量的变化。另外,即使没有量的变化时,也有延迟荧光的发光能力和光量的时间变化上的特征等的质变产生的情况。

[0187] 这样的变化,由于成为测量评价中的误差,所以,在测量之前,使用评价在使用的的光合成样品中是否产生变化的评价方法是有效的。通过检测光合成样品的量变、质变,可以管理测量结果的精度。由这样的评价方法,在检测光合成样品的异常时,可以使用判断其是否在允许范围内,并根据需要对测量者表示一些警告等的方法。

[0188] 作为上述的光合成样品的评价方法,有例如以下的(1)~(3)的方法。(1)评价光合成样品的密度是否在与延迟荧光的光量具有比例关系的密度范围。这样的评价可以使用例如由光合成样品的密度和延迟荧光的光量作成的校准线进行。(2)评价对于光合成样品的密度的延迟荧光的光量,与成为评价基准的标准数据比较是否变化。例如在由光合成样品的密度和延迟荧光的光量组成的校准线中,在该校准线表示的光合成样品的单位密度的发光量的关系式中,对在一定的误差范围内是否可以得到相关进行评价。(3)评价延迟荧光的光量的时间变化与成为评价基准的标准数据比较是否变化。例如,可以使用相对于标准数据的光量的时间变化的差,以及延迟荧光的光量的时间变化中的特征点的光量和特征点的出现时间、或者 2 处特征点之间的光量变化的倾斜、特定时间范围内的光量变化的倾斜等进行评价。

[0189] 在上述的光合成样品的评价中,作为标准数据,可以使用例如光合成样品的吸光度和光散射量、延迟荧光的光量及其时间变化等的的数据。另外,关于表示这样的标准数据和允许范围的数据,可以使用预先在测量装置或解析装置中存储的数据或在光合成样品调整时记录的数据。另外,如果对与水溶液样品混合前的光合成样品实施同样的评价,就可以从

该结果推测在标准测量溶液等中的测量结果。在这样的情况下,关于使用的数据也与上述同样。

[0190] 另外,优选在通过评价光合成样品检测其变化时,根据需要对测量进行校正。作为这样的校正方法的例子,在光合成样品产生的变化是量的变化时,由上述(1)的评价方法,如果光合成样品的密度在与延迟荧光的光量具有比例关系的密度范围,则在使用密度不同的光合成样品的各测量结果中,可以由光合成样品密度将延迟荧光的光量标准化来进行比较。作为此时的标准化方法,有例如由光合成样品的密度除以延迟荧光的光量的运算的方法等。

[0191] 关于根据本发明的有害物质的评价方法进一步进行说明。

[0192] 在上述实施方式中,主要对具备(1)第1步骤:在水溶液样品中混合光合成样品并调制试验测量溶液,将试验测量溶液以规定的放置时间放置,在试验测量溶液中以规定的照射时间照射光后,测量产生的延迟荧光的光量,(2)第2步骤:在不存在有害物质的标准样品中混合光合成样品并调制标准测量溶液,将标准测量溶液以规定的放置时间放置,在标准测量溶液中以规定的照射时间照射光后,测量产生的延迟荧光的光量,以及(3)第3步骤:通过基于第1步骤及第2步骤分别测量的延迟荧光的光量算出评价值,并求出评价值的比较值,评价在水溶液样品中存在的有害物质的有害物质的评价方法进行说明。

[0193] 这样的有害物质的评价方法,一般可以由(1)第1步骤:在水溶液样品中混合光合成样品、调制试验测量溶液,将试验测量溶液以规定的放置时间放置,在试验测量溶液中以规定的照射时间照射光后,测量产生的延迟荧光的光量,(2)第2步骤:准备将在比较样品中混合光合成样品并调制的比较测量溶液以规定的放置时间放置,并在比较测量溶液中以规定的照射时间照射光后,测量发生的延迟荧光的光量的比较测量结果,以及(3)第3步骤:通过基于第1步骤及第2步骤中分别测量的延迟荧光的光量算出评价值,并求出评价值的比较值,而评价在水溶液样品中存在的有害物质构成。

[0194] 另外,如上所述,在这样的评价方法中,评价值优选是在第1步骤及第2步骤中取得的延迟荧光的光量的时间变化的特征点中的经过时间。或者优选,评价值是在第1步骤及第2步骤中取得的延迟荧光的光量的时间变化,比较值是取时间变化的差的值。

[0195] 这里,关于在第2步骤使用的比较样品及比较测量结果,可以使用各种样品及结果。例如,在第2步骤中,可以使用,作为比较样品可以使用成为比较对象的标准样品,在标准样品中混合光合成样品并调制作为比较测量溶液的标准测量溶液,将标准测量溶液以规定的放置时间放置,在标准测量溶液中照射规定的照射时间的光后,测量产生的延迟荧光的光量,取得比较测量结果的方法。此时,作为标准样品,关于图3如上所述,优选使用实质上不存在有害物质的样品。

[0196] 或者,在第2步骤中,可以使用,将对于作为比较样品使用其它的水溶液样品,并在水溶液样品中混合光合成样品而调制的作为比较测量溶液的其它试验测量溶液取得的测量结果作为比较测量结果准备的方法。此时,作为比较测量结果,可以使用例如前次的测量结果。

[0197] 另外,关于在第2步骤中的比较测量结果的取得,可以使用与第1步骤同样地、由对比较测量溶液进行延迟荧光的光量的测量而准备比较测量结果的方法。或者也可以使用,在第2步骤中,作为比较测量结果,准备关于比较测量溶液预先取得的测量结果作为比

较测量结果的方法。此时,优选使用将预先取得的比较测量结果存储在存储器等中,根据需要读出数据使用。这样,关于在第2步骤中可以使用的比较样品、比较测量溶液和比较测量结果的取得方法等可以有各种变形。

[0198] (有害物质的连续的评价方法)

[0199] 对使用根据本发明的方法的有害物质的连续评价方法(监测方法)进行说明。如果使用这样的评价方法,连续地测量河流和地下水等的水溶液样品,就可以监视其有害性的变化。

[0200] 图32是表示有害物质连续评价方法的一个例子的示意图。在该评价方法中,首先,作为第1次测量,按照通常的步骤,进行标准测量溶液的测量和进行以从河流等采取的水制成水溶液样品的试验测量溶液的测量。然后,比较这些结果,进行在河水中所含有害物质的评价。此时,将标准测量溶液的测量结果C1、试验测量溶液的测量结果S1以及对应于这些比较结果的水溶液样品的有害性的评价结果D1记录下来。

[0201] 此后,在作为测量时间间隔而设定了的规定时间经过后,作为第2次测量,再进行标准测量溶液的测量、以新采取的河水作为水溶液样品的试验测量溶液的测量、以及这些结果的比较,记录标准测量溶液的测量结果C2、试验测量溶液的测量结果S2、以及有害性的评价结果D2。

[0202] 此后,同样地实施每次规定时间经过的测量,例如,在第n次测量中,记录标准测量溶液的测量结果Cn、试验测量溶液的测量结果Sn与有害性的评价结果Dn。通过连续地比较这些记录的水溶液样品的有害性评价结果D1、D2...、Dn,可以监视由在河水等中的有害物质产生的污染的变化。

[0203] 图33是表示有害物质连续评价方法的其它例子的示意图。在该评价方法中,首先,以与上述同样的顺序实施第1次测量,记录标准测量溶液的测量结果C1和试验测量溶液的测量结果S1。另外,此时对于对应于这些比较结果的水溶液样品的有害性评价结果D1,也根据需要记录下来。

[0204] 此后,经过规定的时间后,作为第2次测量,只进行以新采取的河水制成水溶液样品的试验测量溶液的测量,记录该测量结果S2。另外,这里,进行该第2次测量中的试验测量溶液的测量结果S2与第1次测量中的试验测量溶液的测量结果S1的比较,记录对应于这些比较结果的水溶液样品的有害性评价结果E2。该评价结果E2,简易地表示从第1次测量至第2次测量之间,成为水溶液样品的河水等的有害性怎样变化。

[0205] 此后,同样地实施每次规定时间经过的测量,例如,在第n次测量中,记录对应于试验测量溶液的测量结果Sn和第n-1次测量的测量结果Sn-1的比较结果的有害性评价结果En。通过连续地比较这些记录的水溶液样品的有害性的评价结果E2、E3...、En,可以简便地监视由在河水等中的有害物质产生的污染的变化。

[0206] 如图32和图33所示的评价方法那样地,改变测量时间而连续地进行有害物质的评价时,有时由于第1次测量和第2次以后的测量之间的时间经过,而在光合成样品中发生变化。所谓光合成样品的变化,例如是由光合成样品的恶化、分解、死亡、繁殖等引起的光合成样品的密度的变化那样的量的变化,或是延迟荧光的光量的时间变化的特征点中的经过时间以及延迟荧光的光量的变化那样的质的变化等。关于这样的光合成样品的变化,可以在实施延迟荧光的光量的测量和光合成样品的细胞密度的测量后,进行以下那样的校正。

[0207] 首先,在发生光合成样品的密度的量的变化时,如果预先调查关于在测量中使用的光合成样品,在细胞密度和延迟荧光的光量存在比例关系的范围,就可以将由吸光度或光散射量等测量的光合成样品的细胞密度校正为原样。

[0208] 作为具体的校正方法,例如在第 1 次测量中,在测量来自测量溶液的延迟荧光的光量的同时测量样品的细胞密度。另外,即使在第 2 次测量中,也在测量来自测量溶液的延迟荧光的光量的同时测量样品的细胞密度。这里,对第 1 次测量和第 2 次测量的各个测量结果,如果进行将延迟荧光的光量除以细胞密度的校正,即使在第 1 次测量和第 2 次测量之间光合成样品的细胞密度变化时,也可以比较它们。

[0209] 另外,在产生延迟荧光的光量的时间变化的特征点的经过时间和延迟荧光的光量等的质的变化时,如果预先调查,对于在测量中使用的光合成样品,延迟荧光的光量的时间变化与标准数据比较是在允许范围内,就可以将这些特征点之间的位置关系等校正为原样。

[0210] 对具体的校正方法的例子,参照图 34 进行说明。图 34 是表示延迟荧光的光量的时间变化的例子的图,图表 (a) 表示在第 1 次测量中取得的延迟荧光的光量的时间变化,图表 (b) 表示在第 2 次测量中取得的延迟荧光的光量的时间变化。

[0211] 关于这些延迟荧光量的时间变化,例如对在图表 (a) 中所示的第 1 次测量中的特征点 A、B,求出其经过时间 a_1 、 b_1 。同样地,对在图表 (b) 中所示的第 2 次测量中的特征点 A、B,求出其经过时间 a_2 、 b_2 。另外,对这些测量结果,从第 1 次测量结果求出相对于经过时间 a_1 的 b_1 的比率 (b_1/a_1)。同样地,从第 2 次测量结果求出相对于经过时间 a_2 的 b_2 的比率 (b_2/a_2)。然后,通过进行这些比率 (b_1/a_1) 和 (b_2/a_2) 的比较,可以进行使特征点的位置关系成为原样的校正。

[0212] (曲线 (Curve) 值的解析方法)

[0213] 关于在有害物质的评价中可以使用的评价值和比较值,如上述地,作为其一个例子,可以在第 1 步骤和第 2 步骤取得的延迟荧光的光量的时间变化为评价值,取其时间变化差的值为比较值。作为这样的比较值,可以举出,在上述的实施方式中,取从试验测量溶液和标准测量溶液得到的延迟荧光的光量的时间变化之差而得到的曲线 (Curve) 值。关于该曲线 (Curve) 值的解析方法,根据对试验测量溶液和标准测量溶液取得的具体的测量结果,可以使用各种解析方法。

[0214] 关于相当于延迟荧光的光量的时间变化之差的曲线 (Curve) 值,可以分为在测量结果延迟荧光的光量的时间变化中存在特征点的情况、和不存在特征点的情况来考虑。

[0215] 在表示延迟荧光的光量的时间变化的延迟荧光衰减曲线 (参照图 5) 中存在特征点时,如上述地,可以着眼于在其特征点中的发光量和经过时间等而进行评价。另外,优选在使用曲线 (Curve) 值时,着眼于 2 个特征点之间或测量起点与特征点之间而求出曲线 (Curve) 值,以其为比较值进行评价。或者,也可以不考虑特征点而对其全体或规定范围求出曲线 (Curve) 值。

[0216] 另一方面,在延迟荧光衰减曲线中不存在特征点时,可以对其全体或规定范围求出曲线 (Curve) 值,并以其为比较值进行评价。这里,在延迟荧光的光量的时间变化中,其各测量点 n 中的曲线 (Curve) 值可以根据 (在测量点 n 上的试验测量溶液的发光量) - (在测量点 n 上的标准测量溶液的发光量) 求出。

[0217] 另外,从光合成样品发出的延迟荧光,一般地,如图 5 示例地,在激励后时间早的时间域中发光量多,而晚的时间域中由于衰减而发光量少。因此,如果计算曲线 (Curve) 值的时间域不同,则发光量之差的大小也变得不同,有时难以评价在不同的时间域中的变化。

[0218] 在这样的情况中,使用通过对于取了对试验测量溶液和标准测量溶液取得的延迟荧光的光量的时间变化之差的值曲线 (Curve) 值,进一步取与对于试验测量溶液或标准测量溶液取得的延迟荧光的光量 (优选对于标准测量溶液取得的延迟荧光的光量) 之比而标准化的 VCurve 值作为比较值是有效的。由此,可以使评价在不同时间域中的变化容易化。这里,在延迟荧光的光量的时间变化中,在其各测量点 n 上的 VCurve 值,可以由 (在测量点 n 上的 Curve 值) / (在测量点 n 上的标准测量溶液的发光量) $\times 100$ 求出。

[0219] 另外,在存在特征点的延迟荧光衰减曲线中应用上述的 VCurve 值时,也可以着眼于在特征点之间或测量起点与特征点之间而求出 VCurve 值,或者也可以不考虑特征点而对其全体或规定范围求出 VCurve 值。

[0220] 另外,关于在延迟荧光时间曲线中有无特征点,一般地,在第 1 步骤或第 2 步骤中取得的延迟荧光的光量的时间变化具有特征点,在第 3 步骤中,可以使用,将对一个特征点与测量起点或其它特征点之间的规定范围取了延迟荧光的光量的时间变化之差的值作为比较值而评价有害物质的方法。另外,在延迟荧光的光量的时间变化中没有特征点时,可以将其全体或规定范围取了延迟荧光的光量的时间变化之差的值作为比较值。

[0221] 图 35 是表示关于在延迟荧光衰减曲线中存在特征点时的 Curve 值的计算方法的例子的图。比较标准测量溶液中的延迟荧光衰减曲线和试验测量溶液中的延迟荧光衰减曲线时,有时在这些衰减曲线中特征点的位置不同。在这样的情况中,为了排除特征点的影响而进行有害物质的评价,优选设定不含特征点的时间域作为 Curve 值的计算范围。

[0222] 图 35 的图表 (a) ~ (c),将关注的 2 个特征点作为激励后时间 0 秒的最大值的点 (测量起点) 和在其后出现的极小值点,表示在标准测量溶液和试验测量溶液中延迟荧光衰减曲线的特征点位置不同时的 Curve 值计算的时间域的设定的例子。图 35 的图表 (a) 表示在标准测量溶液和试验测量溶液的延迟荧光衰减曲线中,只在标准测量溶液的衰减曲线中存在特征点的情况。此时, Curve 值的计算范围优选选择从测量起点至标准测量溶液中的极小值的出现点的时间范围「a」。

[0223] 另外,图 35 的图表 (b) 表示试验测量溶液的延迟荧光衰减曲线中的极小点比标准测量溶液中的极小点在更早时间出现的情况。此时, Curve 值的计算范围,优选比较从测量起点至标准测量溶液中的极小值的出现点的时间范围「b」和从测量起点至试验测量溶液中的极小值的出现点的时间范围「c」,而选择在双方共同的时间域的时间范围「c」。

[0224] 另外,图 35 的图表 (c) 表示试验测量溶液的延迟荧光衰减曲线中的极小点比标准测量溶液中的极小点在更晚时间出现的情况。此时, Curve 值的计算范围,优选比较从测量起点至标准测量溶液中出现极小值点的时间范围「d」和从测量起点至试验测量溶液中出现极小值点的时间范围「e」,选择在双方是共同的时间域的时间范围「d」。

[0225] 图 36 是表示关于在延迟荧光衰减曲线中不存在特征点时的 Curve 值的计算方法的例子的图。这里,表示使用光强度 $50 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 、在白色荧光灯下以一般方法培育的绿藻类的 *Selenastrum capricornutum* 作为光合成样品的标准测量溶液的延迟荧光衰减曲线。关于样品的调整,以和钝顶螺旋藻 (*Spirulina platensis*) 的情况同样的步骤进行。在图

36 的图表中,在延迟荧光衰减曲线中没有出现明确的特征点。此时,因为不能进行着眼于特征点的评价,所以,使用 Curve 值的评价是有效的。

[0226] 图 37 表示使 (a) 西玛三嗪浓度和 (b) 二氯苯酚浓度变化时的 Curve 值的图表。具体的,图 37 的图表 (a) 表示,从以 25、50、100ppb 的浓度暴露了除草剂的一种西玛三嗪的试验测量溶液的测量结果和标准测量溶液的测量结果,对激励后时间 0.1 ~ 50 秒的时间域计算的 Curve 值。另外,图表 (b) 表示,从以 1、5、10ppm 的浓度暴露二氯苯酚的试验测量溶液的测量结果和标准测量溶液的测量结果,对激励后时间 0.1 ~ 50 秒的时间域计算的 Curve 值。

[0227] 其中,在关于西玛三嗪的图表 (a) 中,对应于西玛三嗪暴露浓度的 Curve 值变化,随着浓度增加、在激励后时间 0.1 秒附近向正侧变化。另外,可以看到,在激励后时间 0.5 秒以后、也稍微向负侧变化。另外,在关于二氯苯酚的图表 (b) 中,可以看到,Curve 值根据二氯苯酚暴露浓度变化,随着浓度增加,在激励后时间 0.2 ~ 10 秒附近向负侧变化。

[0228] 从以上结果可知,在延迟荧光衰减曲线中即使不存在明确的特征点时,也可以由计算 Curve 值,评价有害物质的影响。另外,在这样的 Curve 值中,因为出现变化的时间域及其正・负的变化方向根据有害物质而不同,所以,在确定检测的有害物质的种类和作用等方面是有用的。

[0229] 图 38 是表示使 (a) 西玛三嗪浓度和 (b) 二氯苯酚浓度变化时的 VCurve 值的图表。具体的,图 38 的图表 (a) 表示从以 25、50、100ppb 的度暴露了西玛三嗪的试验测量溶液的测量结果和标准测量溶液的测量结果,对激励后时间 0.1 ~ 50 秒的时间域计算的 VCurve 值。另外,图表 (b) 表示,从以 1、5、10ppm 的浓度暴露二氯苯酚的试验测量溶液的测量结果和标准测量溶液的测量结果,对激励后时间 0.1 ~ 50 秒的时间域计算的 VCurve 值。另外,关于 VCurve 值,具体来说,如上所述,表示将相当于时间变化之差的 Curve 值作为与在标准测量试样中的发光量的比率进行标准化的例子。

[0230] 其中,在关于西玛三嗪浓度的图表 (a) 中,对应于西玛三嗪暴露浓度、VCurve 值变化,随着浓度增加、在激励后时间 0.1 ~ 0.3 秒附近的正侧变化。另外,确认以激励后时间 15 秒为中心、在 0.4 ~ 50 秒的广泛范围向负侧变化。另外,在关于西玛三嗪浓度的图表 (b) 中,VCurve 值根据西玛三嗪暴露浓度变化,可以看到,随着浓度的增加、在全部激励后时间范围内 (0.1 ~ 50 秒附近) 广泛的向负侧的变化。

[0231] 从以上结果可知,在延迟荧光衰减曲线中即使不存在明确的特征点时,也可以通过计算 VCurve 值,评价有害物质的影响。另外,在这样的 VCurve 值中,因为出现变化的时间域及其正・负变化方向由于有害物质而不同,所以,在特定检测的有害物质的种类与作用等上有用。另外,由 VCurve 值,相比于 Curve 值,更容易比较不同时间域的变化。

[0232] (试验测量溶液的适应化处理)

[0233] 其次,对试验测量溶液关于在测量前进行的适应化处理说明。关于图 5 中的标准测定条件、如上述地,有用于使光合成样品适应于测量光条件的预备光照射和由进行在在规定时间内黑暗下的待命(暗中待命)产生的适应化处理(适应化步骤)的情况。

[0234] 一般,含有这样的适应化步骤的有害物质评价方法,是评价在试验对象的水溶液样品中存在的有害物质的有害物质评价方法,优选具备 (a) 在水溶液样品中混合具有光合功能的光合成样品、调制试验测量溶液的调制步骤,和 (b) 将试验测量溶液放置规定放

置时间的放置步骤,和(c)在试验测量溶液照射规定时间的光后、测量发生的延迟荧光的光量的测量步骤,和(d)基于在测量步骤取得的延迟荧光的光量、评价在水溶液样品中存在的有害物质的评价步骤,和(e)在测量步骤前,包含相对于试验测量溶液、进行在规定的待命时间中暗中待命的暗中待命步骤,或相对于试验测量溶液、进行预备光照射和在规定的待命时间中的暗中待命的预备照射步骤的任意一个的适应化步骤。

[0235] 在这样的有害物质的评价方法中,从在评价对象的水溶液样品中混合的光合成样品发出的延迟荧光的光量的时间变化中可以得到的特征出发,可以同时而且高精度地定性、定量多个有害物质。另外,由测量、评价延迟荧光的光量,可以整体地缩短测量时间。另外,在测量步骤前,相对于试验测量溶液进行适应化步骤,可以提高延迟荧光的测量和由该测量结果产生的有害物质的评价精度。

[0236] 这样,在测量步骤前实施适应化步骤时,在暗中待命步骤中,优选规定的待命时间是30秒以上、1小时以下的时间。另外,在预备照射步骤中的预备光照射时间与暗中待命时间之比,优选和在测量步骤中的光照射时间与暗中待命时间之比相等。以下,具体说明这样的适应化步骤。

[0237] 在有害物质的评价中可以使用的延迟荧光,是吸收于光合成样品的光能分配在各种化学反应后再次放出的现象。因此,关于直到延迟荧光的测量(测量步骤)的光合成样品的光和温度等的各种环境的经历,有时对延迟荧光的测量结果带来重大影响(例如参照非专利文献2)。因此,为了在水质检查等的有害物质的评价中利用延迟荧光的测量结果,优选控制光合成样品的环境经历、以良好的再现性条件进行延迟荧光的测量。

[0238] 图39是表示由延迟荧光的测量次数产生的CP1变化的图表。这里,关于在换算为光合成有效放射为 $5\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 的白色荧光灯下放置15分钟的标准测量溶液,作为测量条件、照射2秒665nm、 $0.8\text{W}/\text{cm}^2$ 的光后,在暗中60秒钟,测量延迟荧光的光量,将该测量连续实施5次,分别求出各个的CP1值。

[0239] 在该测量结果中,可以得到第1次测量是15217、第2次测量是11693、第3次测量是10098、第4次测量是9690、第5次测量是9627。如这些CP1值所示,CP1值图表在从第1次至第3次的测量结果中有波动。另外,由反复延迟荧光的测量可知,在某些值(例如从第3次至第5次的值)中测量结果稳定、再现性提高起来。这表示,在光合成样品内的光能分配,从放置条件向测量条件适应。

[0240] 从以上的结果可知,将测量溶液以规定的放置时间放置的放置步骤后,在继续进行延迟荧光测量步骤时,不能充分地得到延迟荧光测量的再现性,在其测量结果中有产生波动的情况。在图39所示的例子中,在测量次数从第1次至第3次的测量结果中,不能充分地得到水质检查的精度。另外,从第几次的测量结果是否可以得到充分的再现性的判断是繁杂的,另外,在其测量结果中也可以认为反映了测量者的个人差异。

[0241] 关于这样的情况,研究相对于光合成样品的环境经历的控制方法的结果可知,通过在放置步骤和测量步骤之间,附加用于控制光合成样品的环境经历的适应化步骤,可以得到再现性良好的测量结果。通过进行这样的适应化步骤,在例如图39的测量结果中,可以从第1次得到第3次以后的测量结果。

[0242] 使测量溶液适应化为测量条件的适应化步骤,由在放置步骤和测量步骤之间附加(1)相对于测量溶液进行在规定的待命时间中的暗中待命的暗中待命步骤、或(2)相对于

试验溶液进行在预备光照射和规定待命时间中的暗中待命的预备照射步骤的任意一个或两个步骤而完成。

[0243] 图 40 是表示在各种适应化条件下,进行 3 次延迟荧光测量的结果中的测量精度的表。具体的,在各种适应化条件下进行连续 3 次测量,将其标准偏差除以 3 次测量的平均值、乘 100 倍的值作为测量精度(%)计算。即,图 40 中所示的测量精度,是 3 次测量中得到的 CP1 值,表示相对于这些平均值具有着多大程度的误差。

[0244] 另外,在这里,关于在换算为光合成有效放射为 $5\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 的白色荧光灯下放置 15 分钟的标准测量溶液,作为测量条件、照射 2 秒、665nm、 $0.8\text{W}/\text{cm}^2$ 的光后,在暗中 60 秒钟,测量延迟荧光的光量,将该测量实施 3 次,作为本测量。然后,在该本测量实施前,以各种适应化条件(预备照射条件)进行适应化处理,分别就 3 次测量结果求出测量精度。

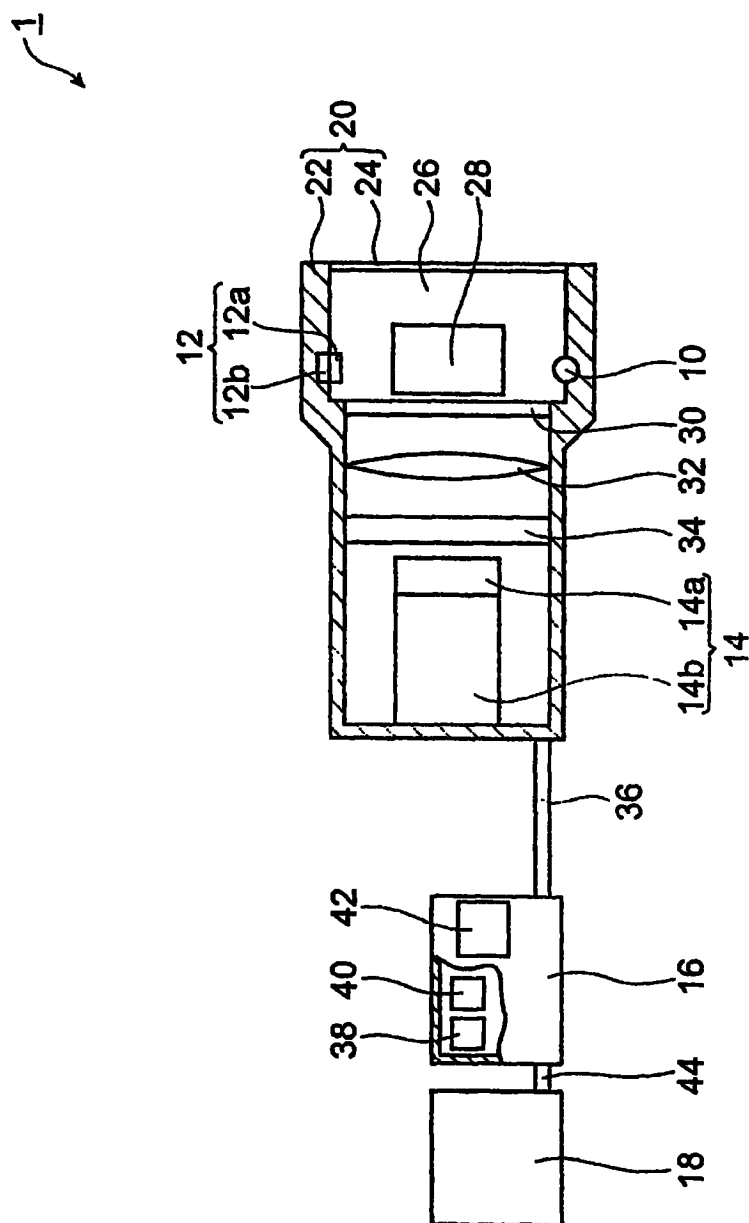
[0245] 作为适应化条件,将在刚要进行本测量之前,以和测量条件同样的步骤、照射 2 秒 665nm、 $0.8\text{W}/\text{cm}^2$ 的光后,使之在暗中待命 60 秒钟的作为「测量条件 1 次」,将 2 次反复同样步骤的作为「测量条件 2 次」。另外,将不照射光、使之以和测量条件相同时间在暗中待命的作为「暗中 1 次」,将 2 次反复暗中待命的作为「暗中 2 次」。另外,将照射和测量条件同样时间光的作为「光 1 次」,将照射 30 秒钟光后使之在暗中待命 30 秒钟的作为「光 30 暗 30」,将照射 1 秒钟光后使之在暗中待命 30 秒钟的作为「光 1 暗 30」,不作适应化处理的作为「无适应化条件」。

[0246] 其结果是,可知,作为相对于测量溶液的适应化条件,反复进行 1~2 次和测量条件相同的光照射-暗中待命,或不作光照射、反复进行 1~2 次和测量条件相同时间的暗中待命,作为适应化处理是适合的。在图 40 所示的例子中,适应化条件时间在相同的「测量条件 2 次」和「暗中 2 次」中的测量精度分别是 3.6 和 4.8,在「测量条件 1 次」和「暗中 1 次」中的测量精度分别是 10.6 和 14.2。另外,相比于只以暗中待命进行适应化处理时可知,实施和测量条件相同的光照射-暗中待命的一方,可以更加有效地将测量溶液适应化到测量环境。

[0247] 由以上的结果,通过将上述暗中待命步骤或预备照射步骤的任意一个、或两个步骤附加在放置步骤和测量步骤之间,可以提高在此后实施的延迟荧光的测量精度。

[0248] 产业上的可利用性

[0249] 本发明能够作为能够在短时间且广泛地进行有害物质分析的有害物质的评价方法和有害物质的评价用工具箱利用。



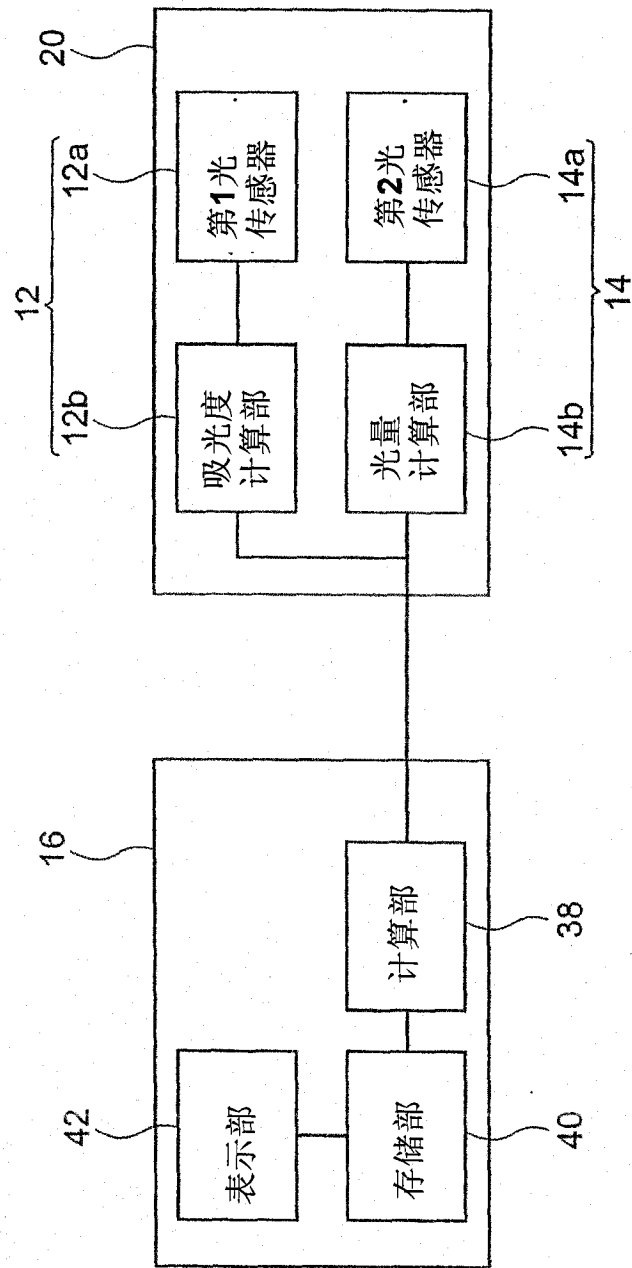


图2

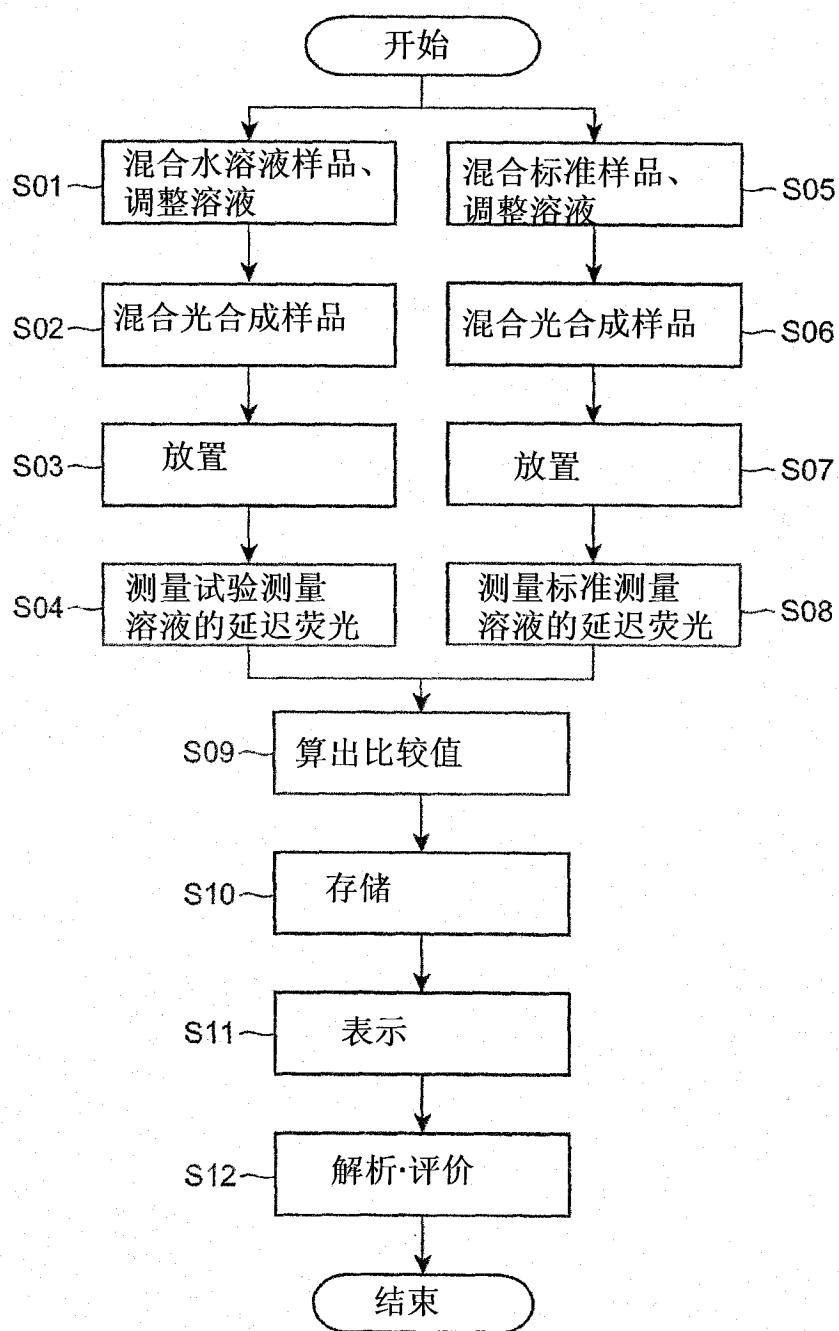


图 3

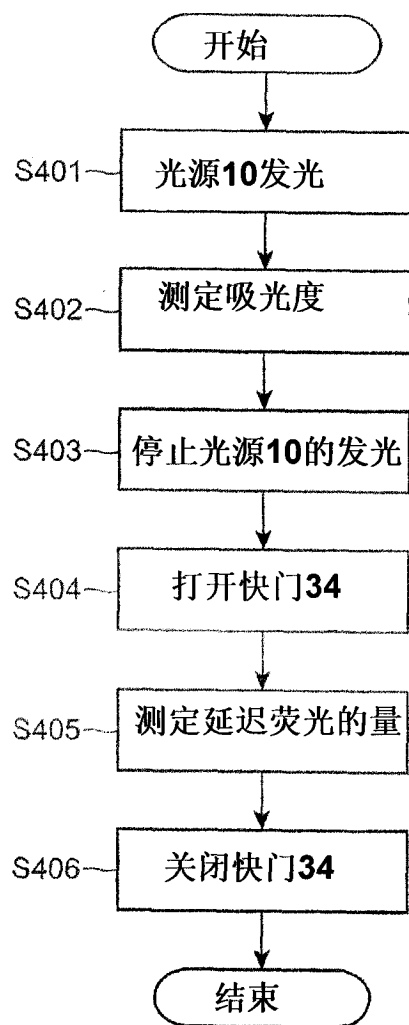


图 4

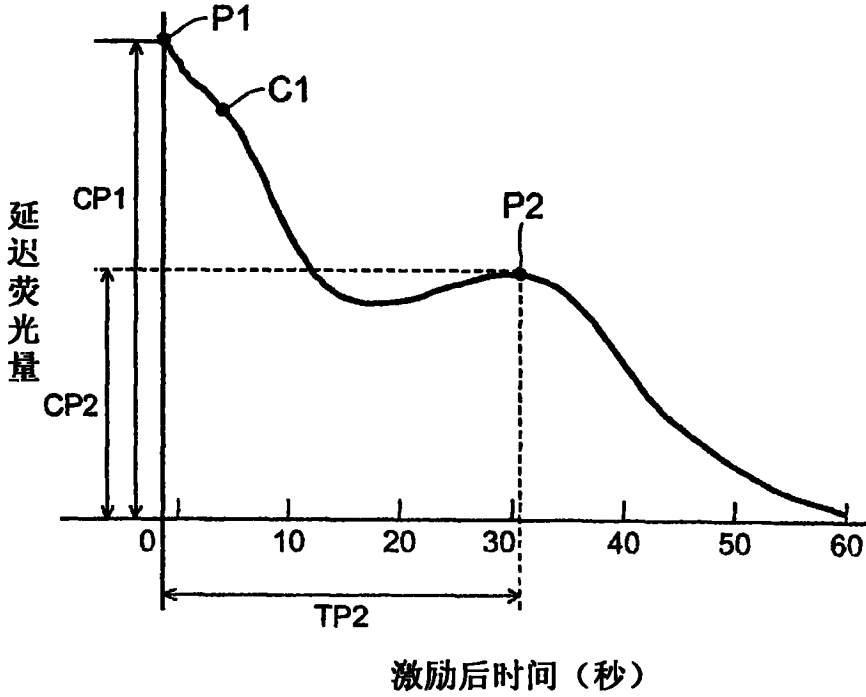


图 5

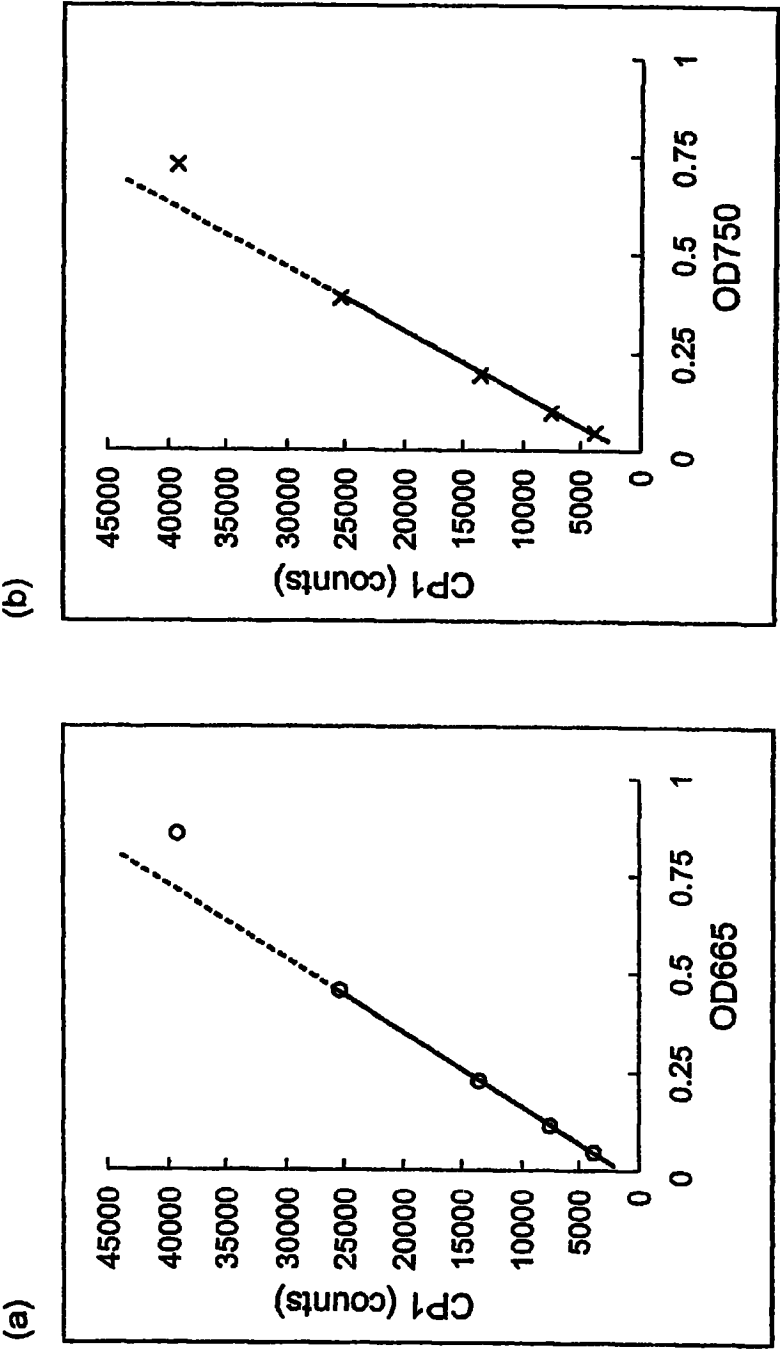


图6

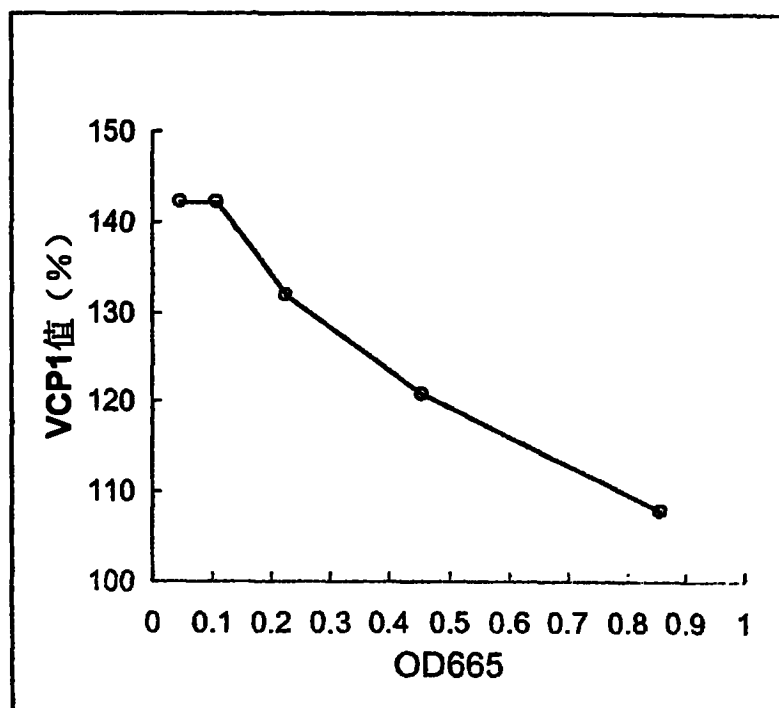
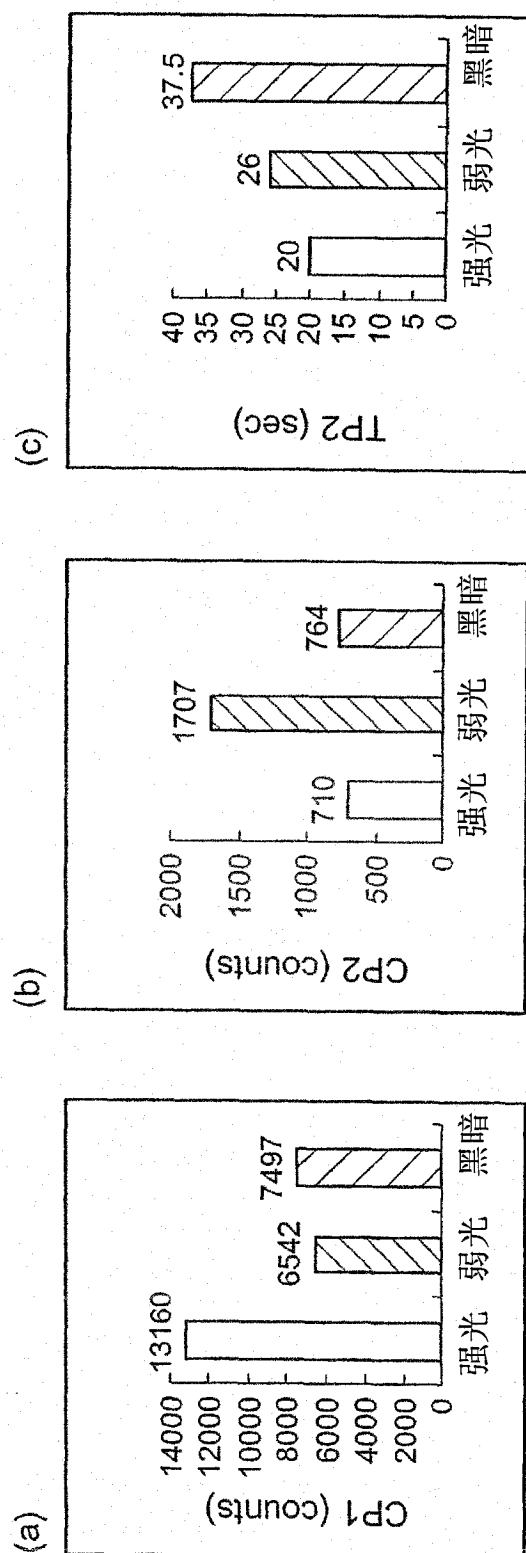


图 7



8

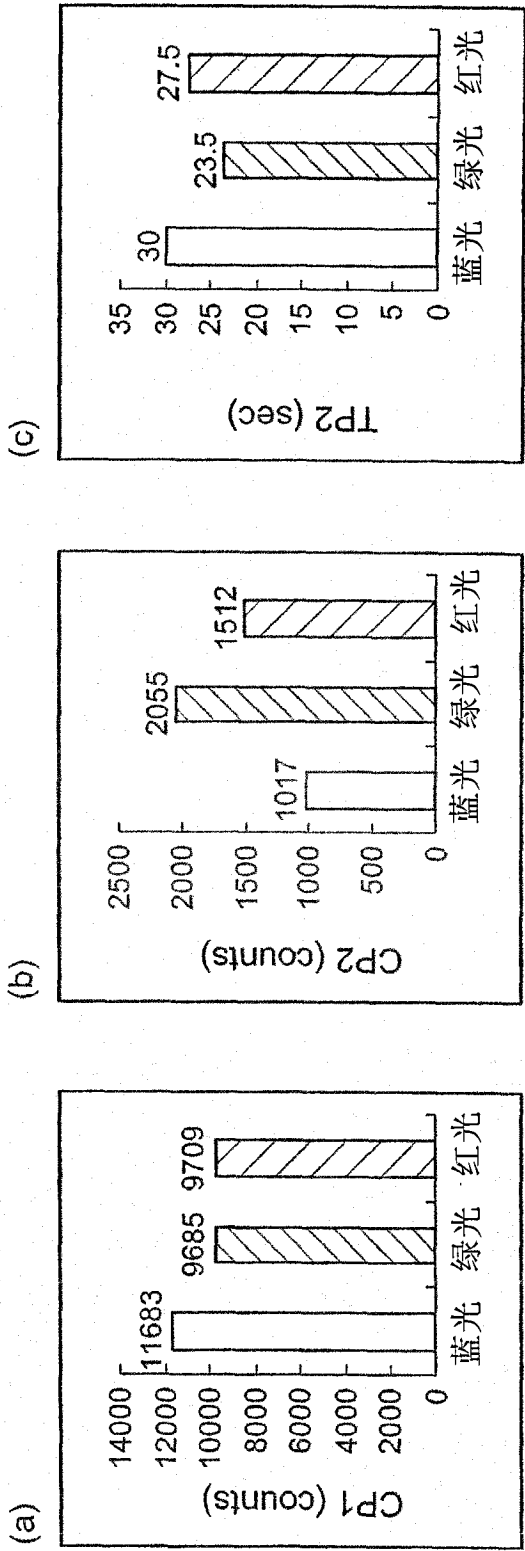


图9

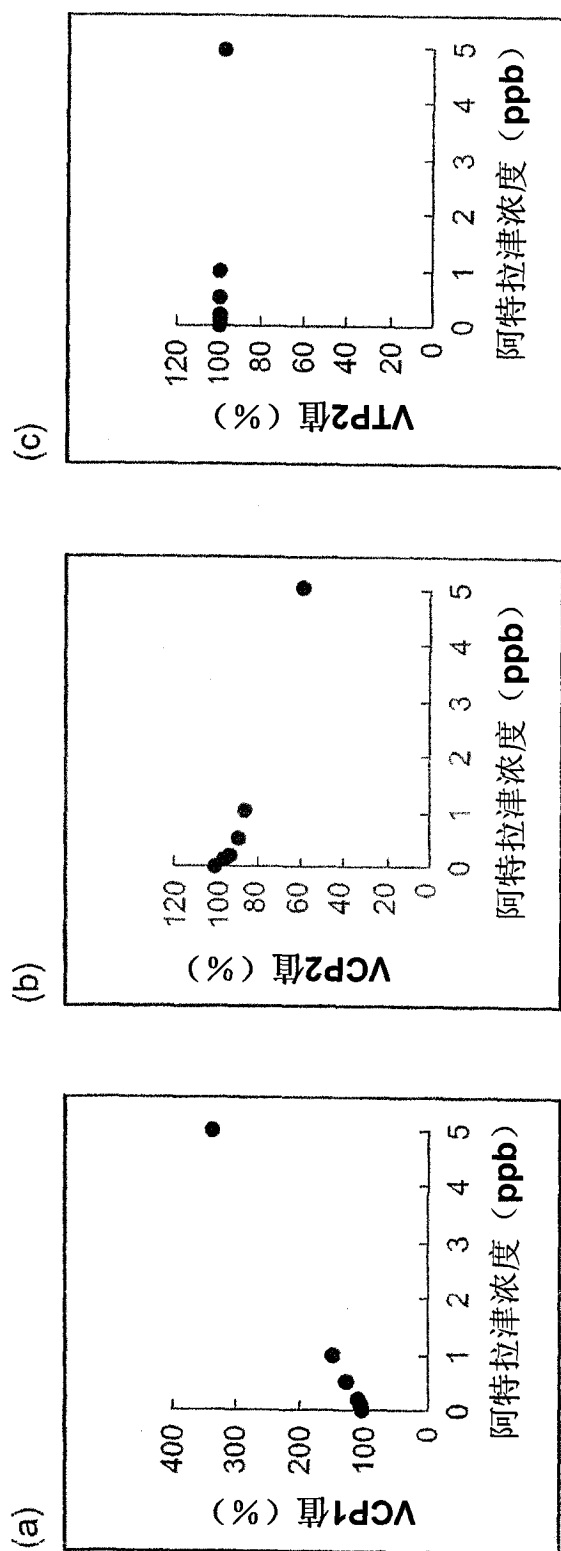


图10

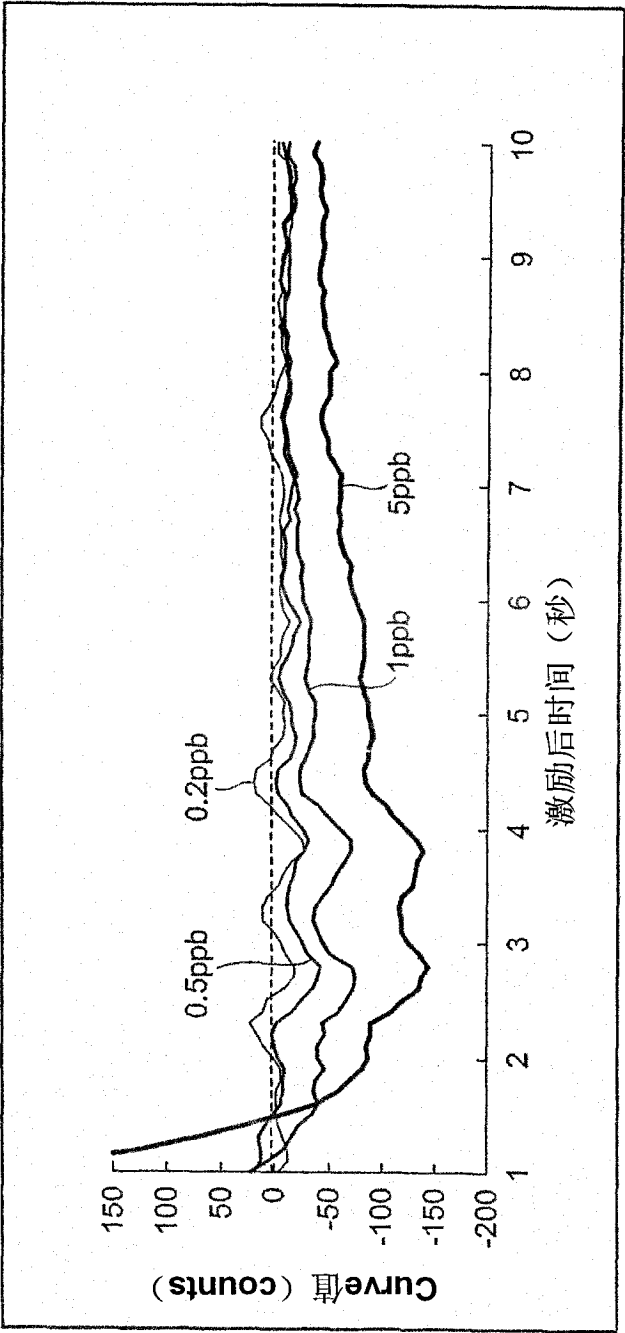


图11

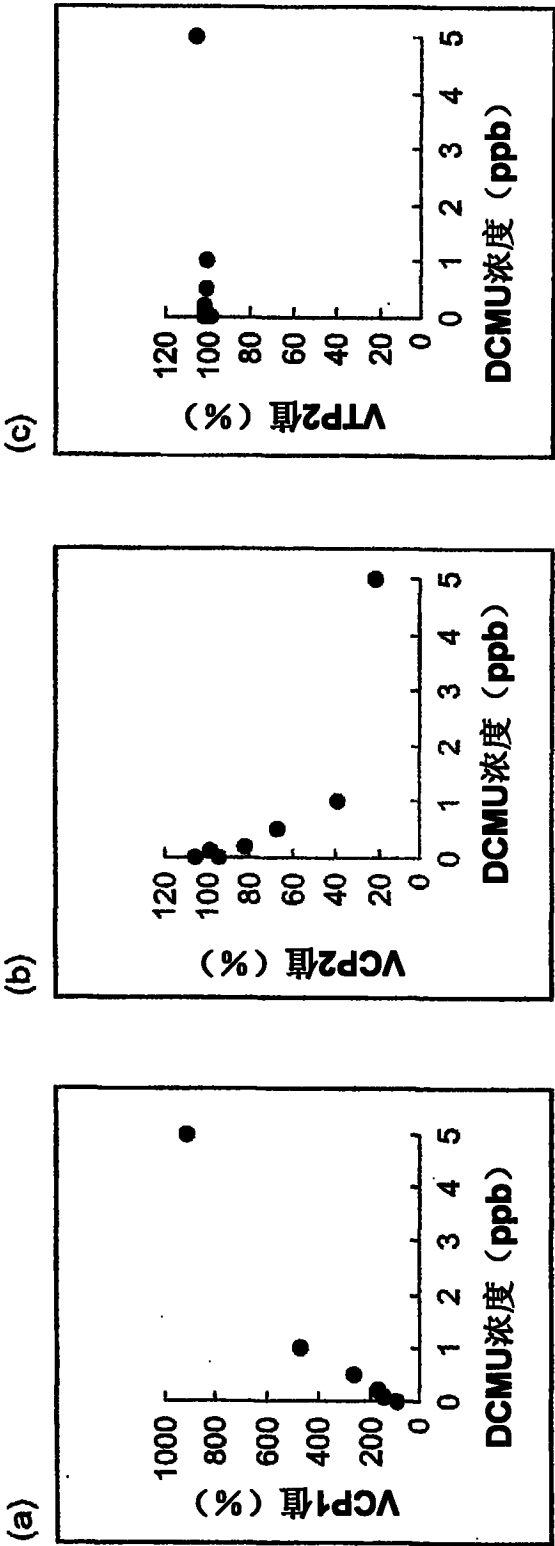


图12

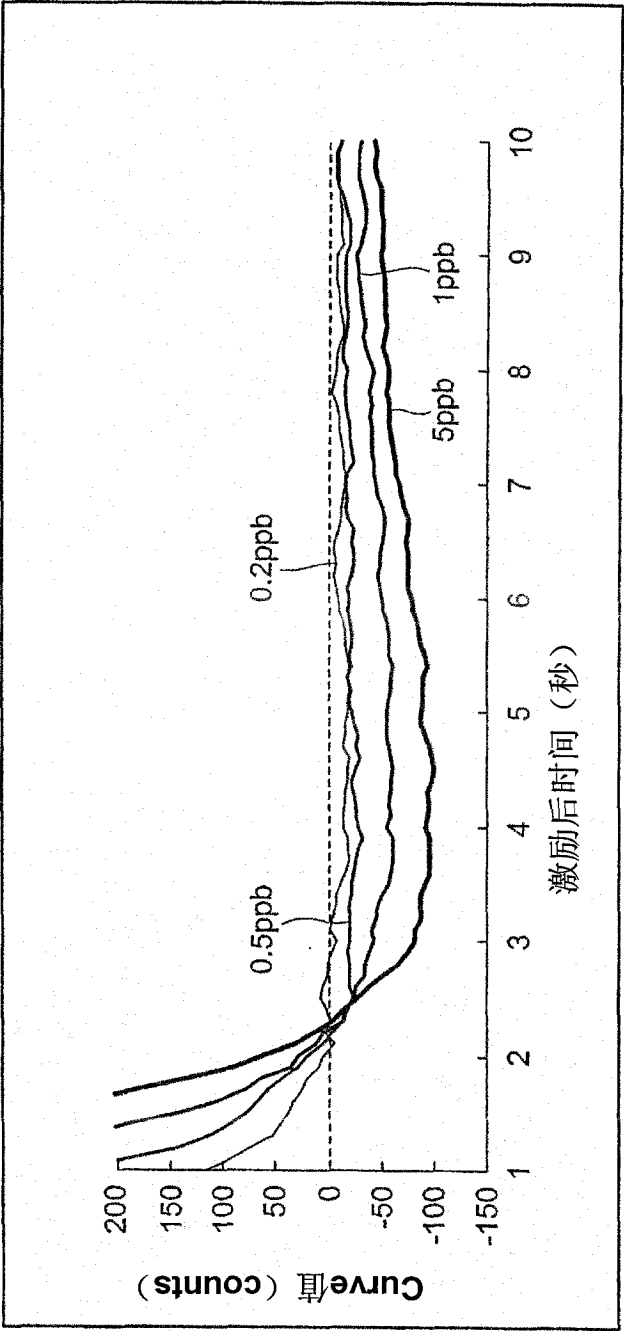


图13

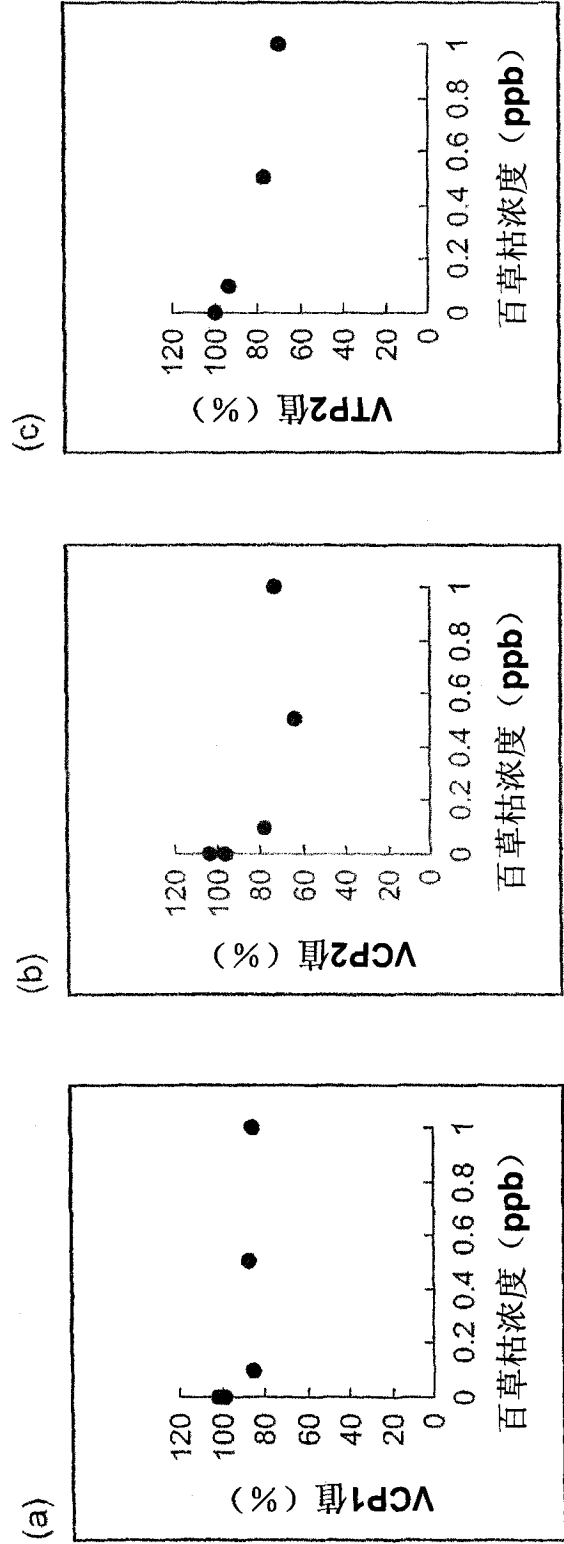


图14

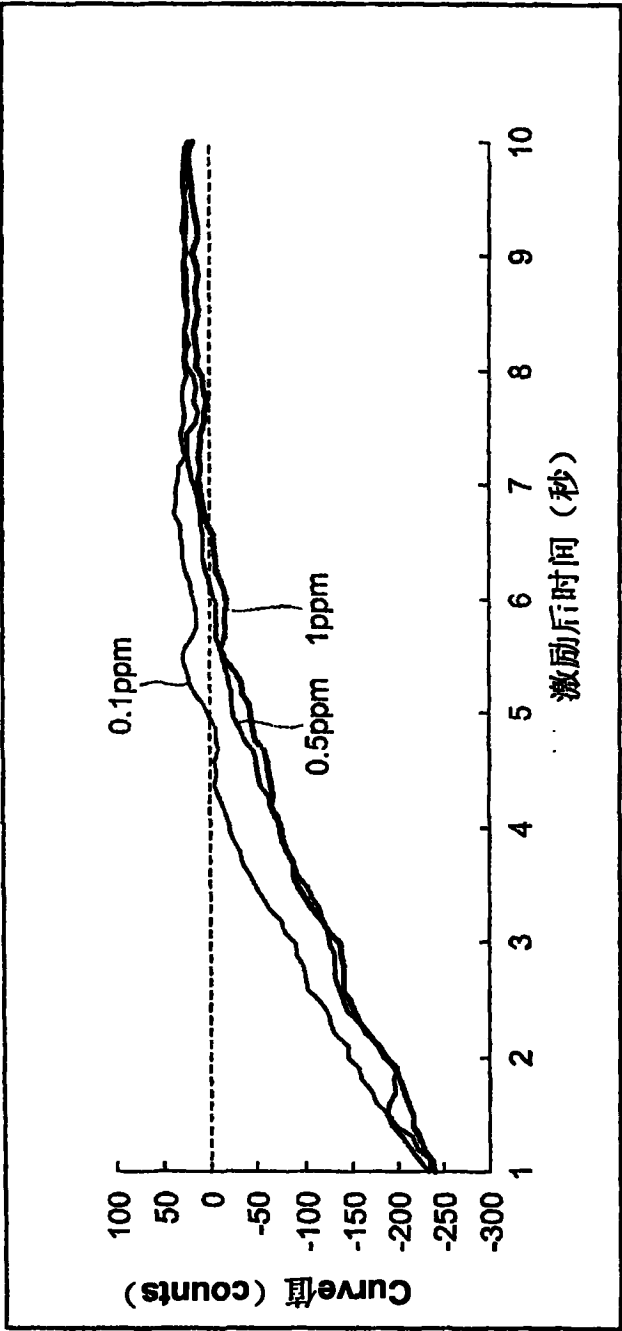


图15

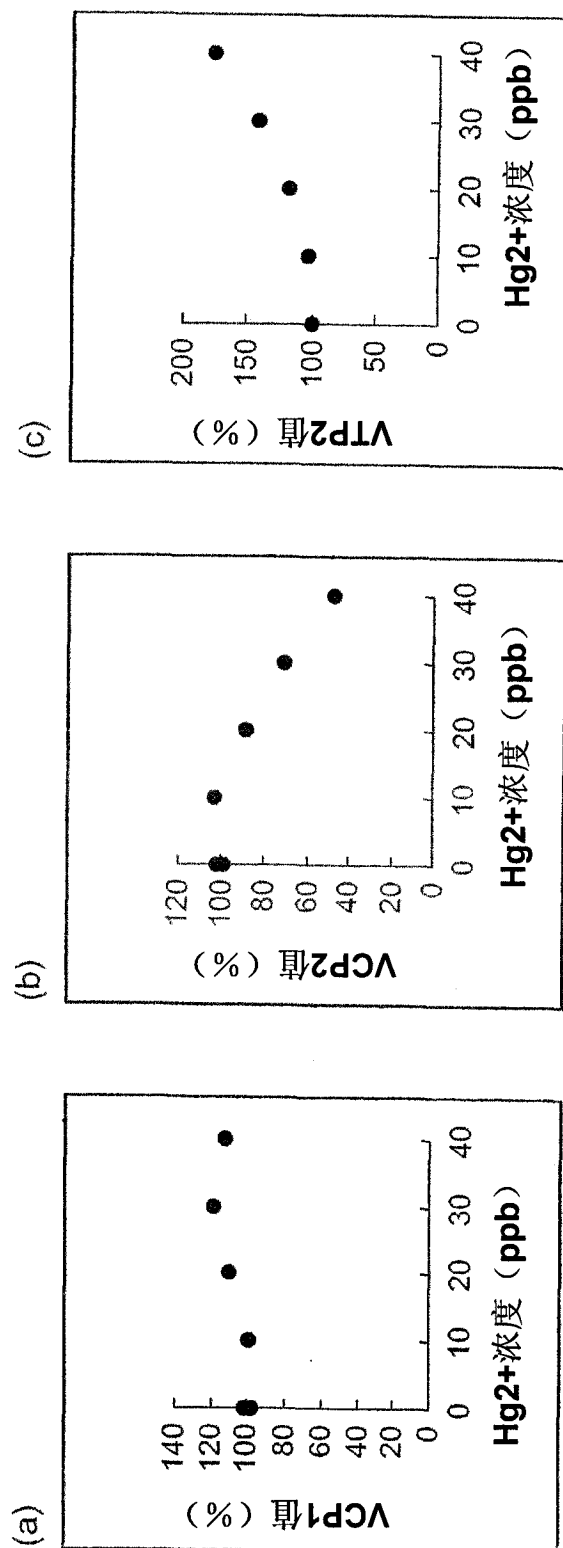


图16

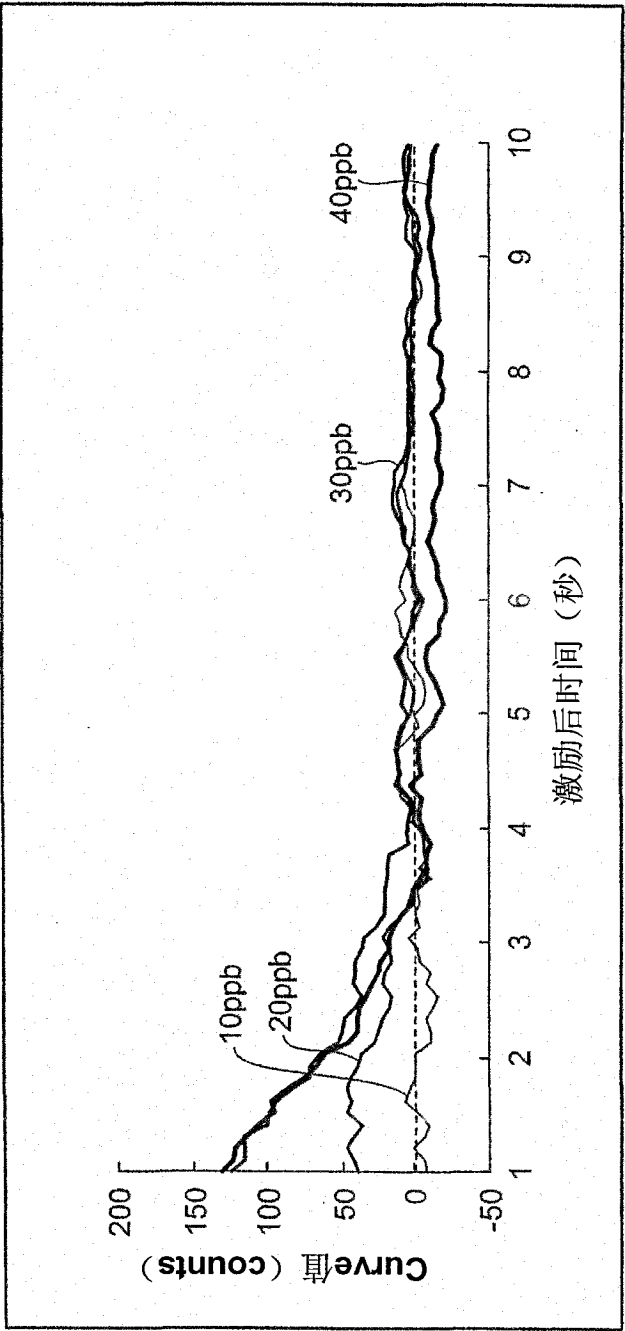


图17

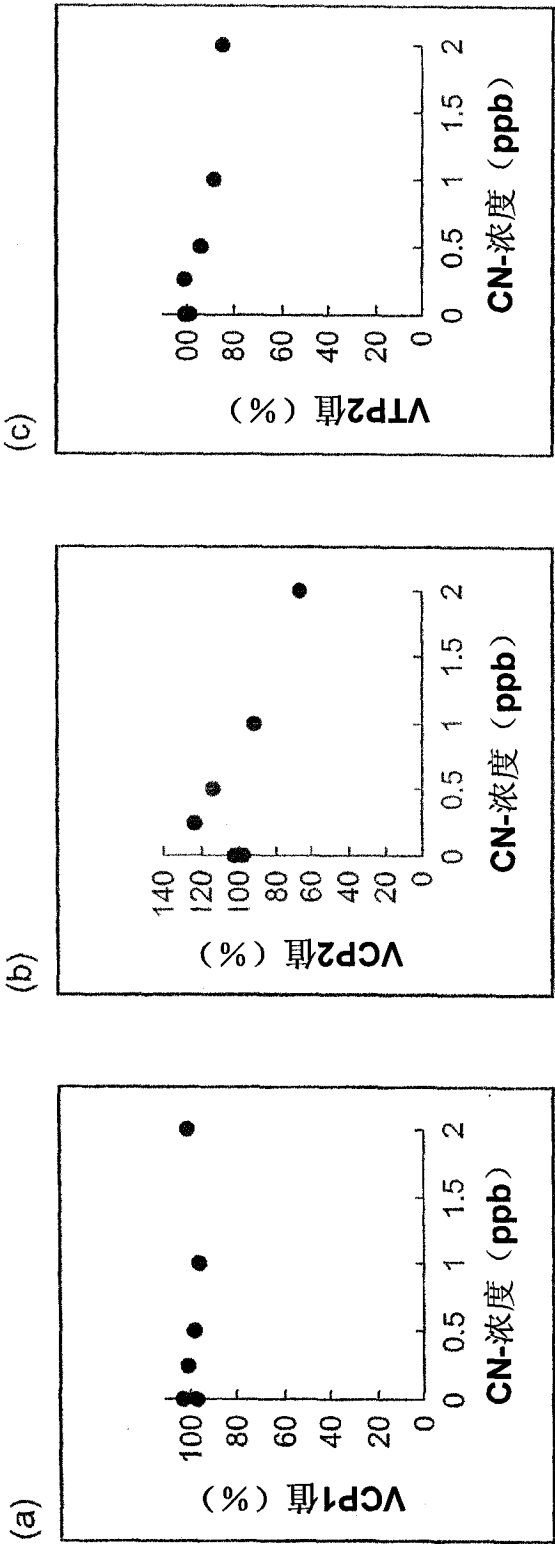


图18

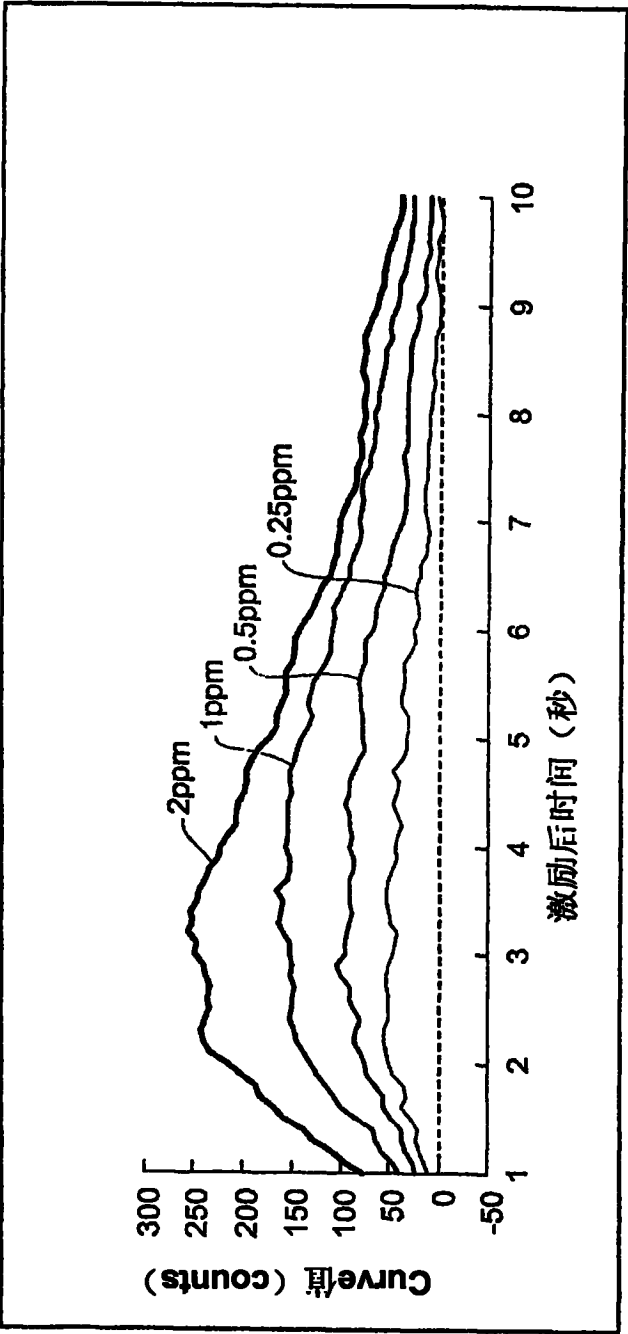


图19

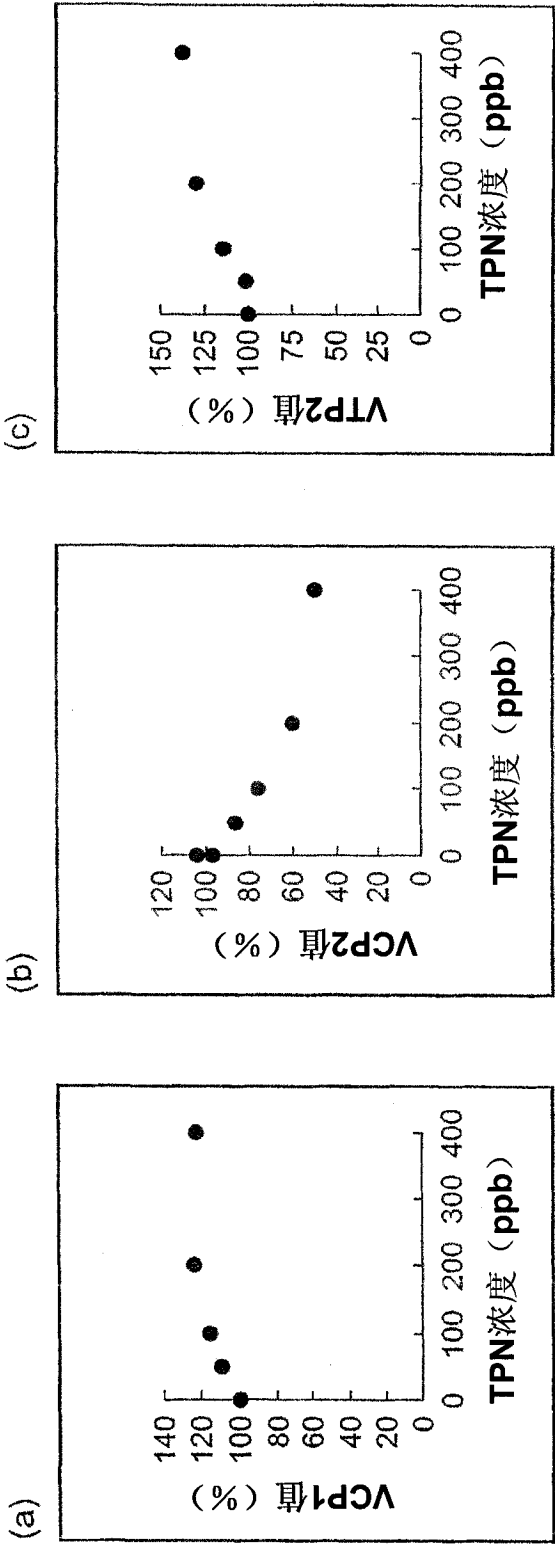


图20

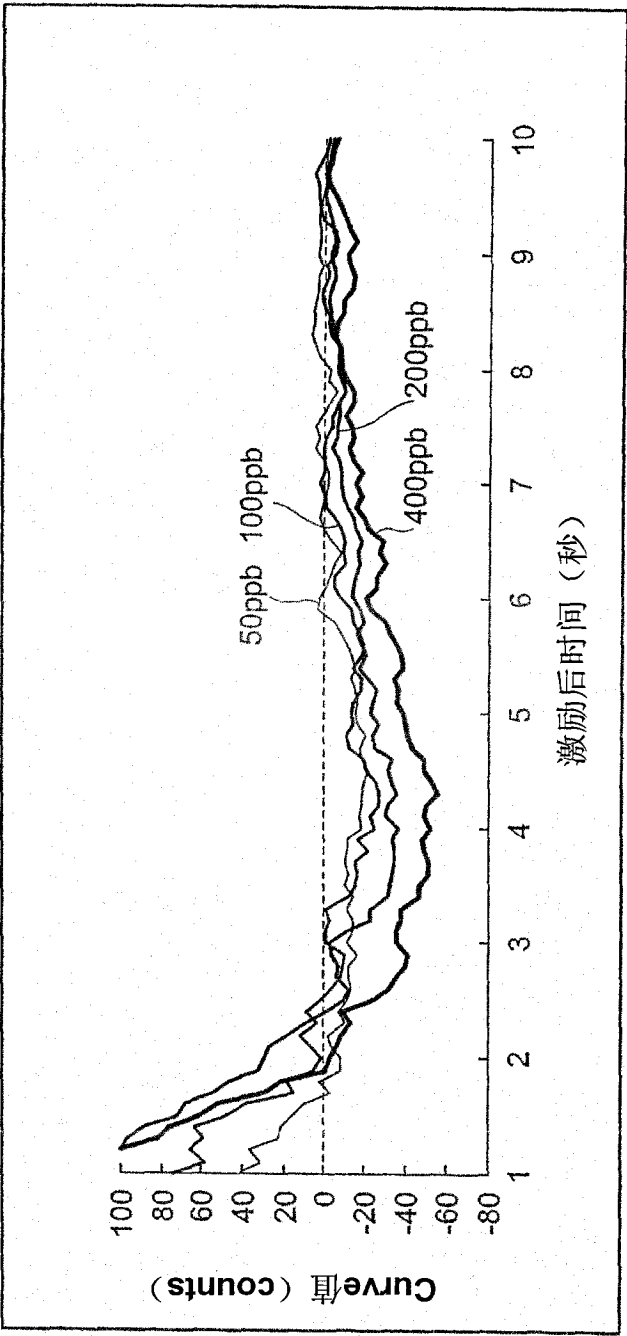


图21

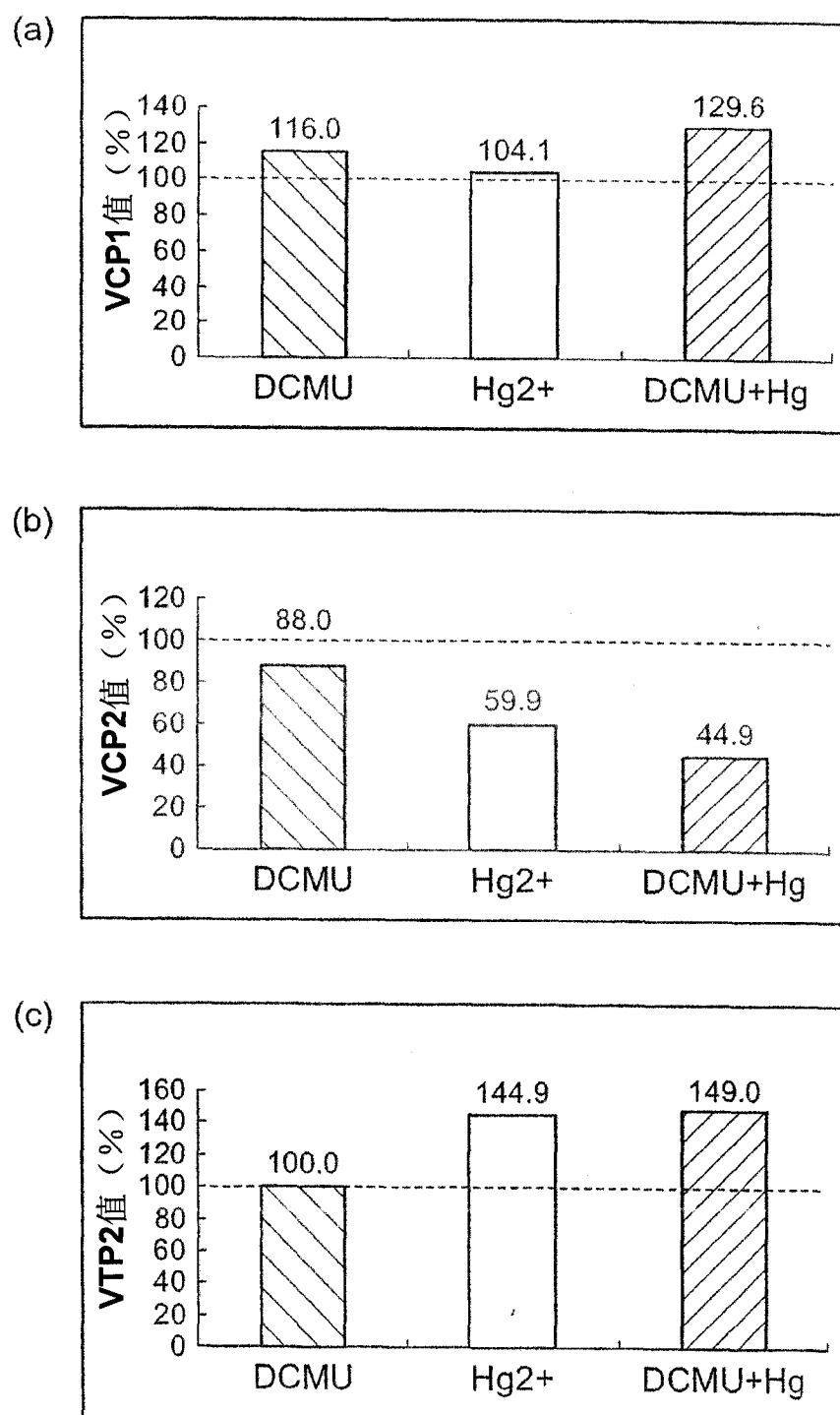


图 22

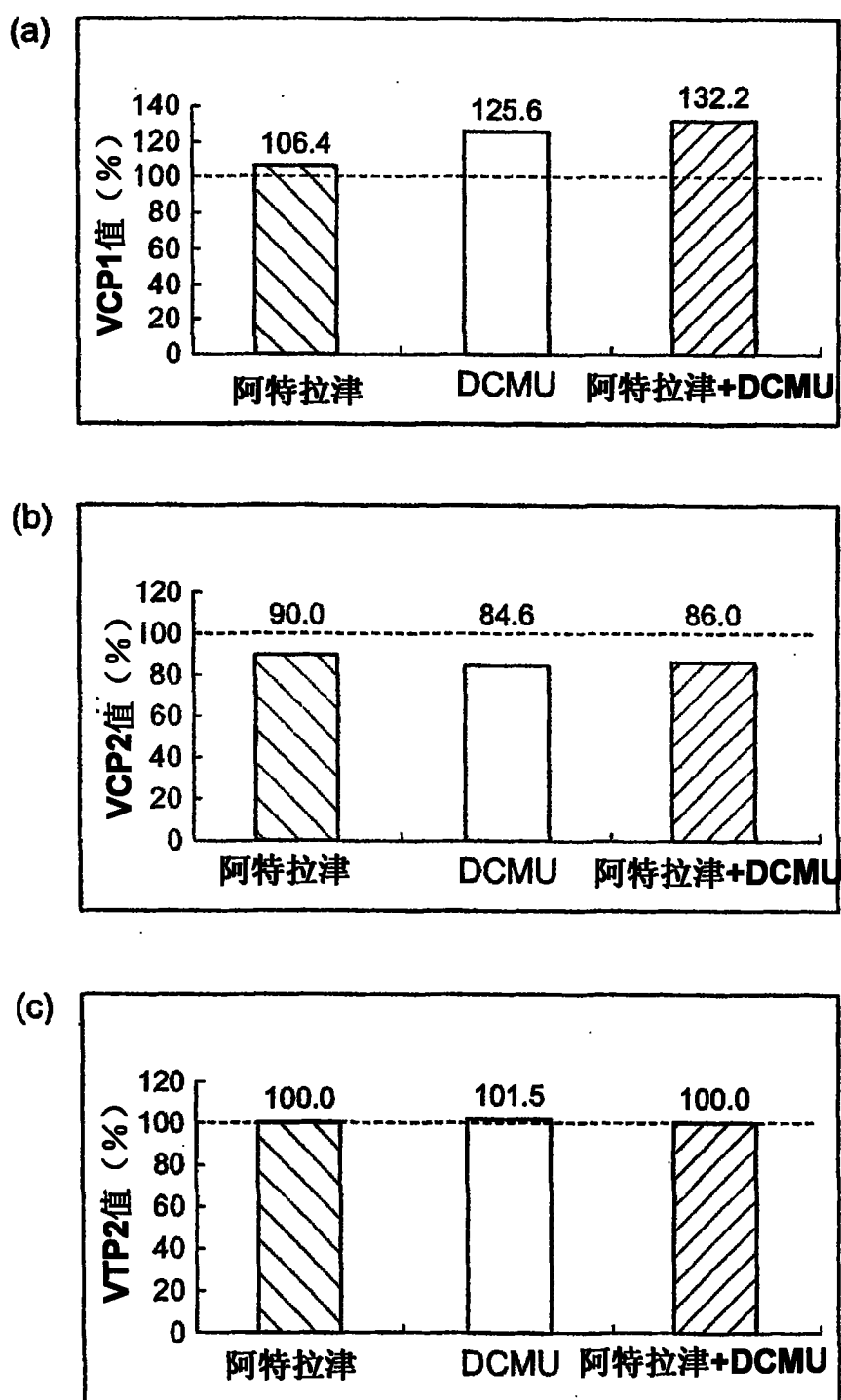


图 23

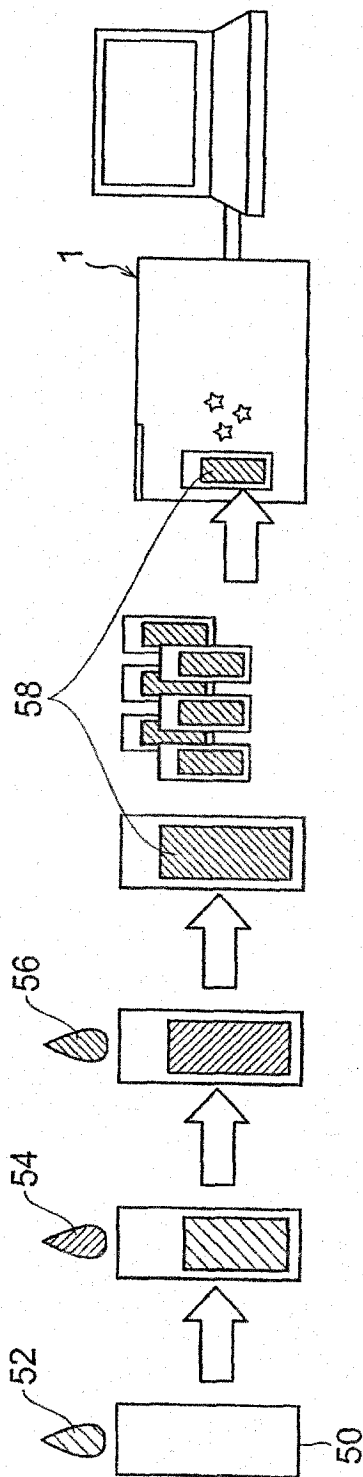


图24

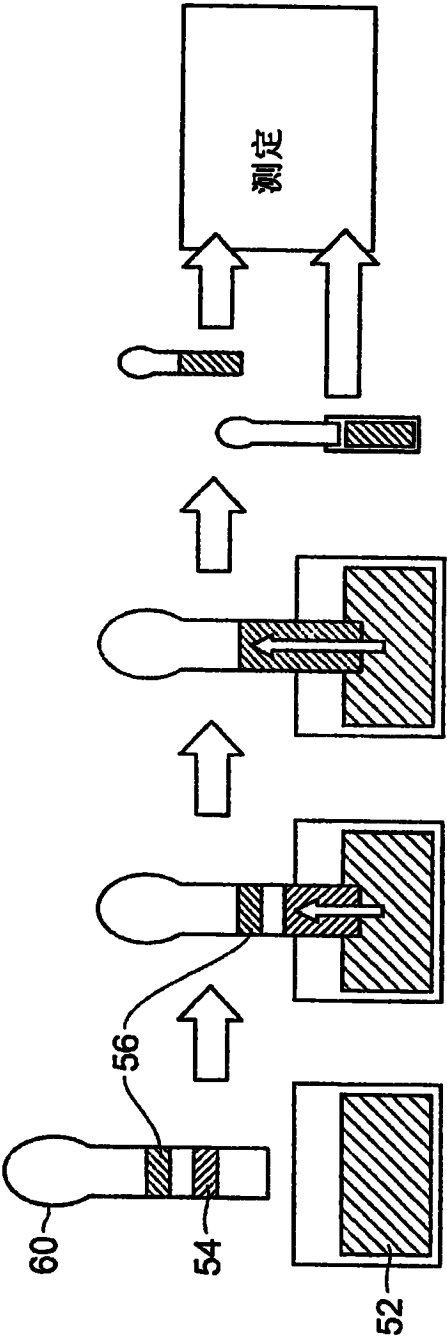


图25

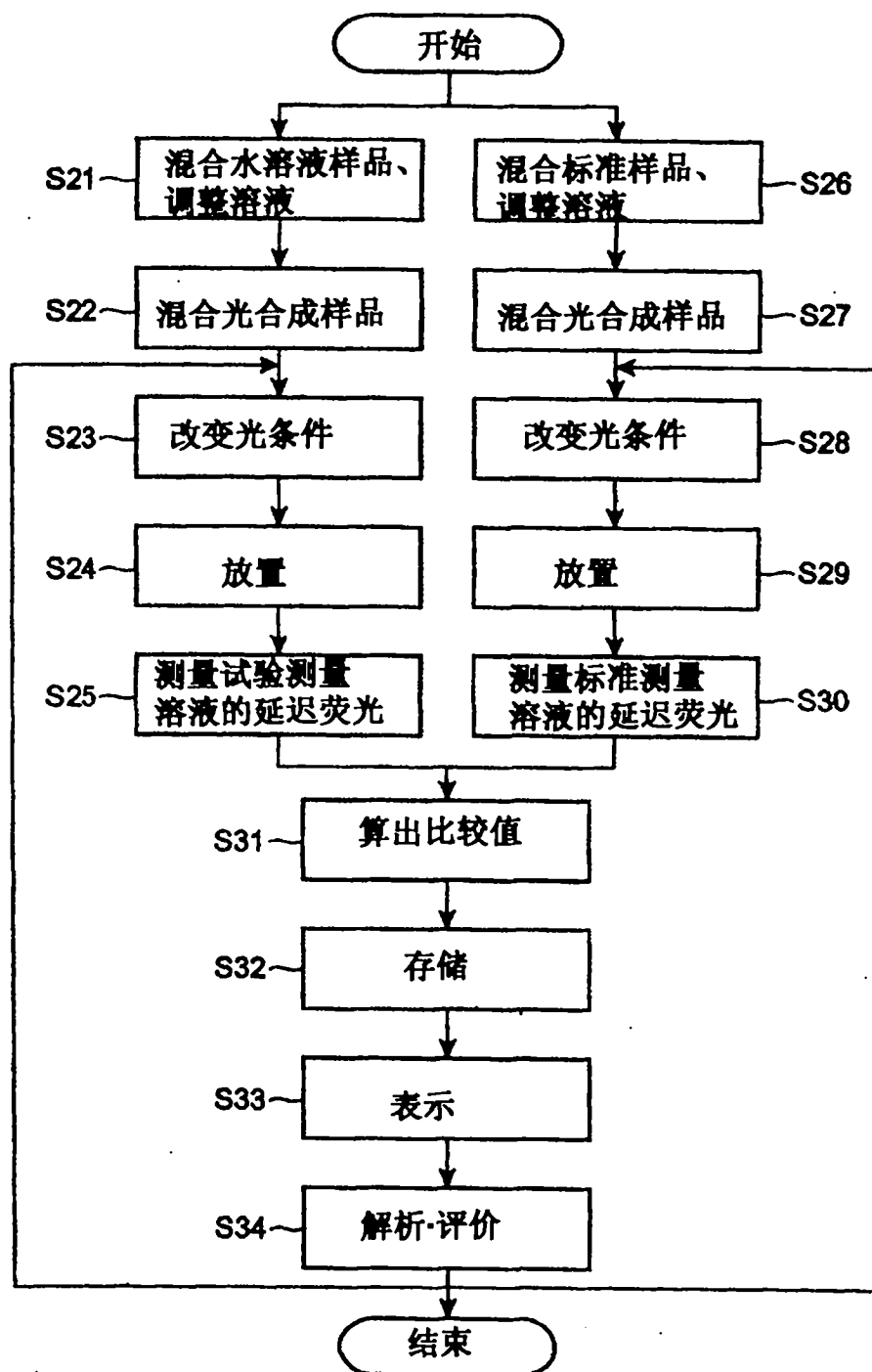
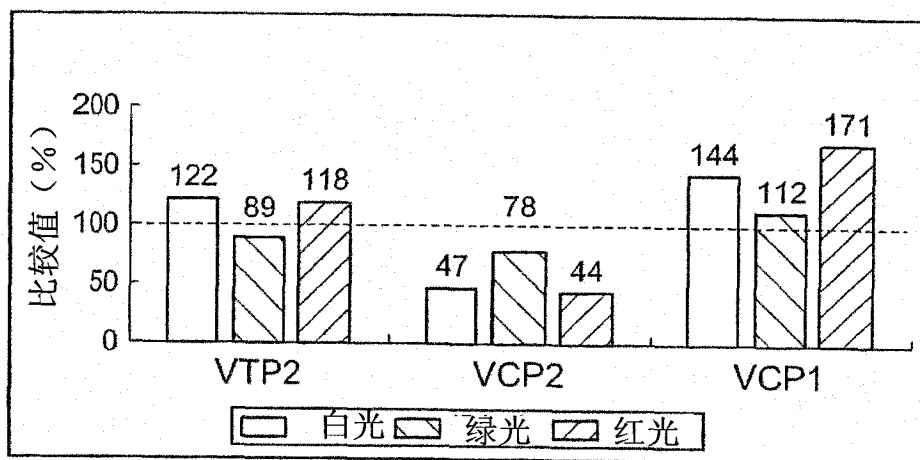


图 26

(a)



(b)

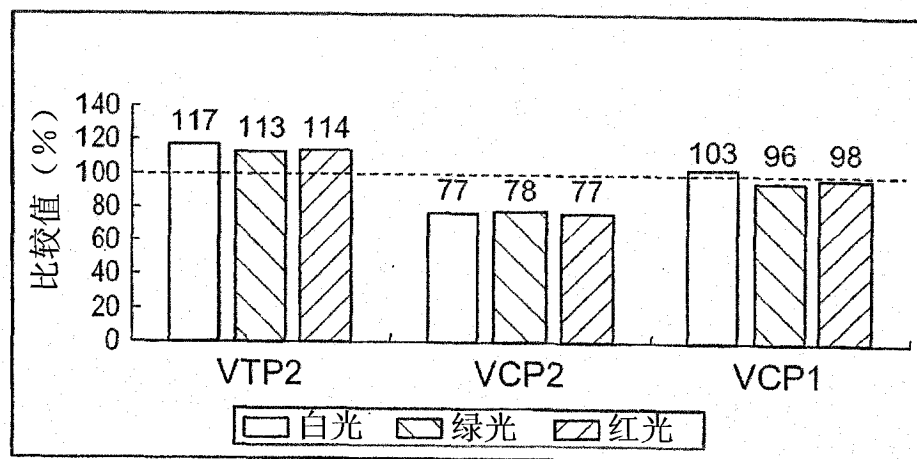


图 27

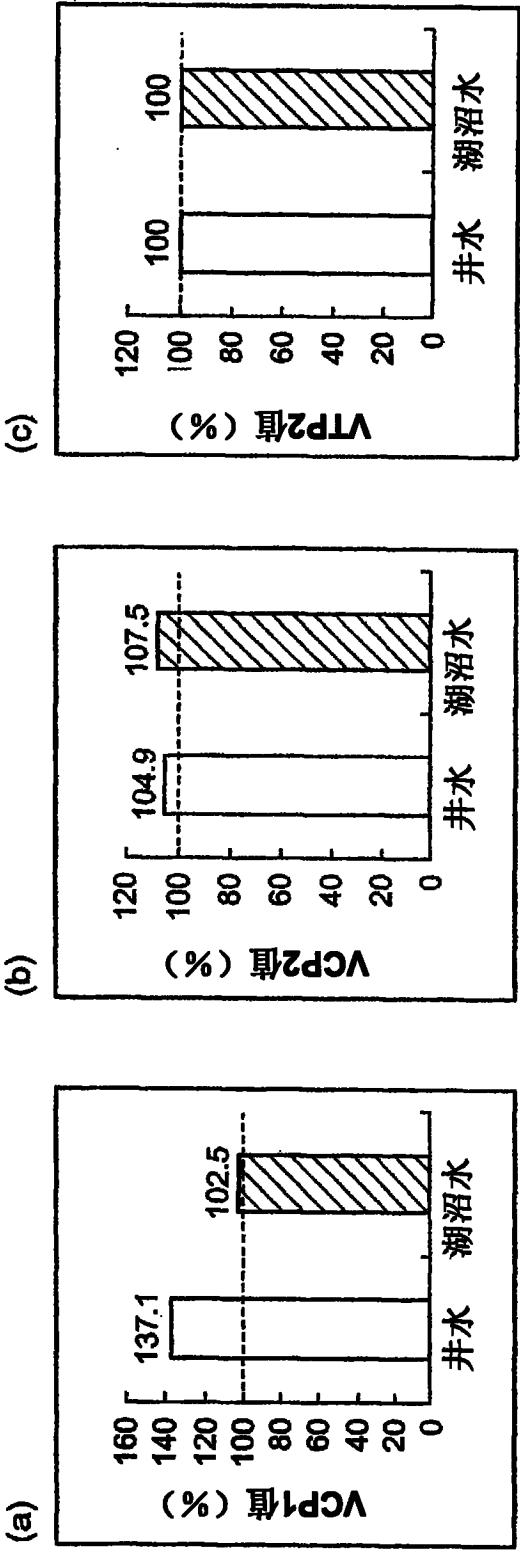


图28

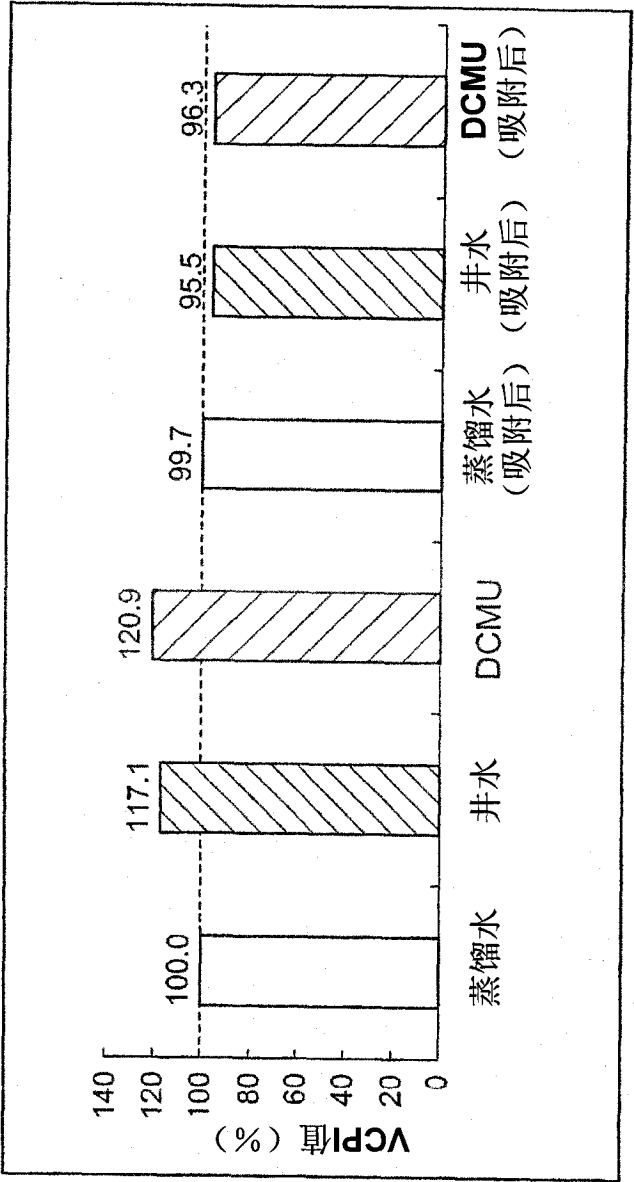


图29

	湖水	井水	自来水	蒸馏水	标准偏差
原水	7.44	6.03	7.07	5.46	0.91
高盐性培养基	9.68	9.71	9.72	9.69	0.02
低盐性培养基	8.13	7.77	8.14	8.29	0.22

图30

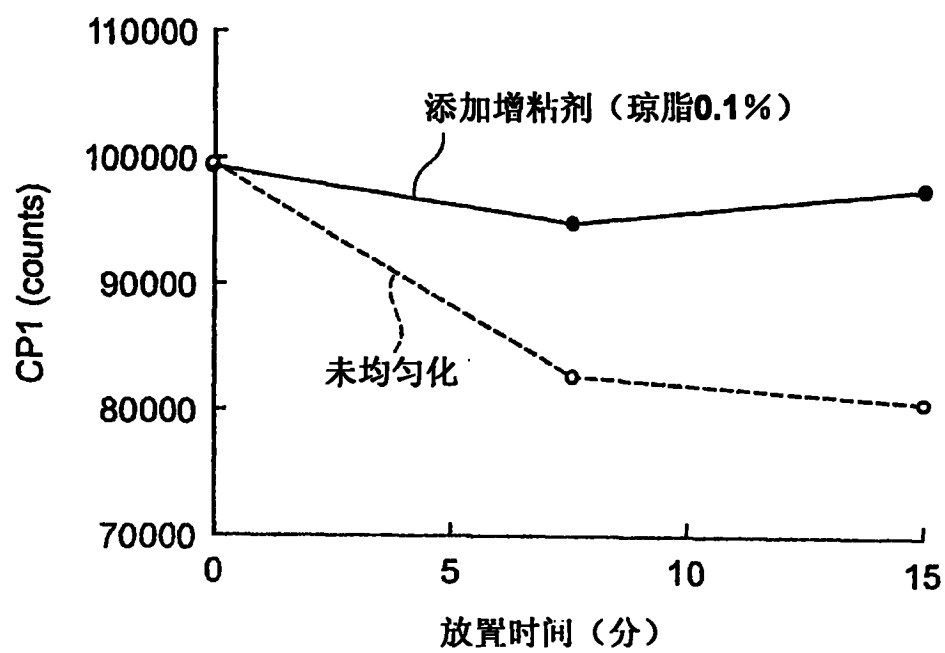


图 31

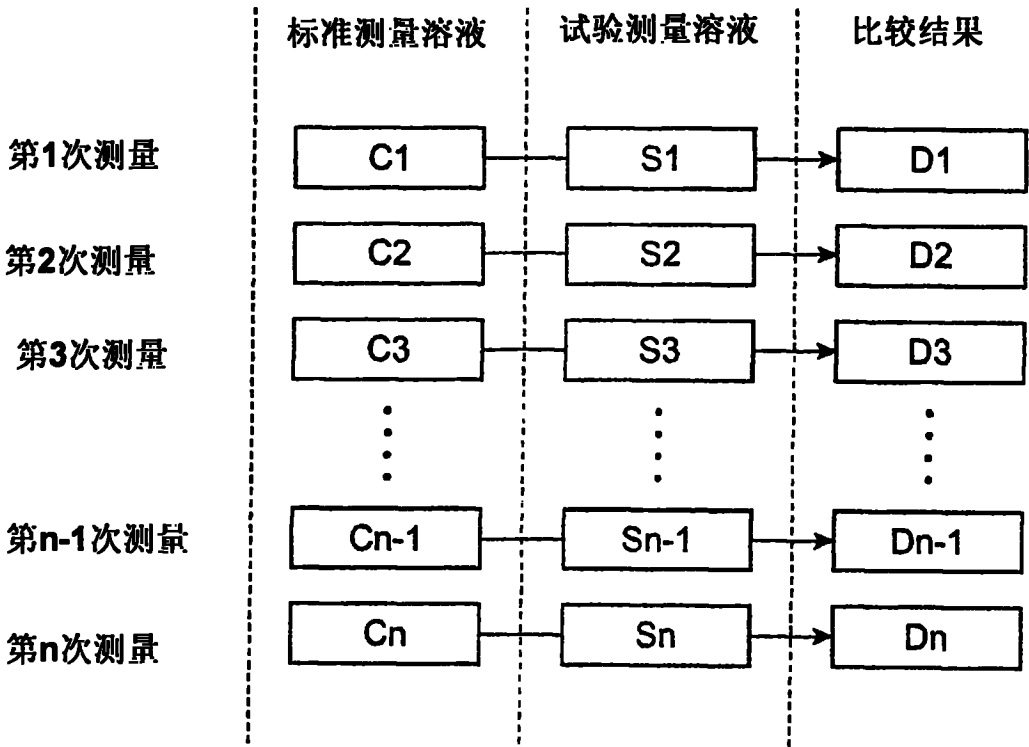


图32

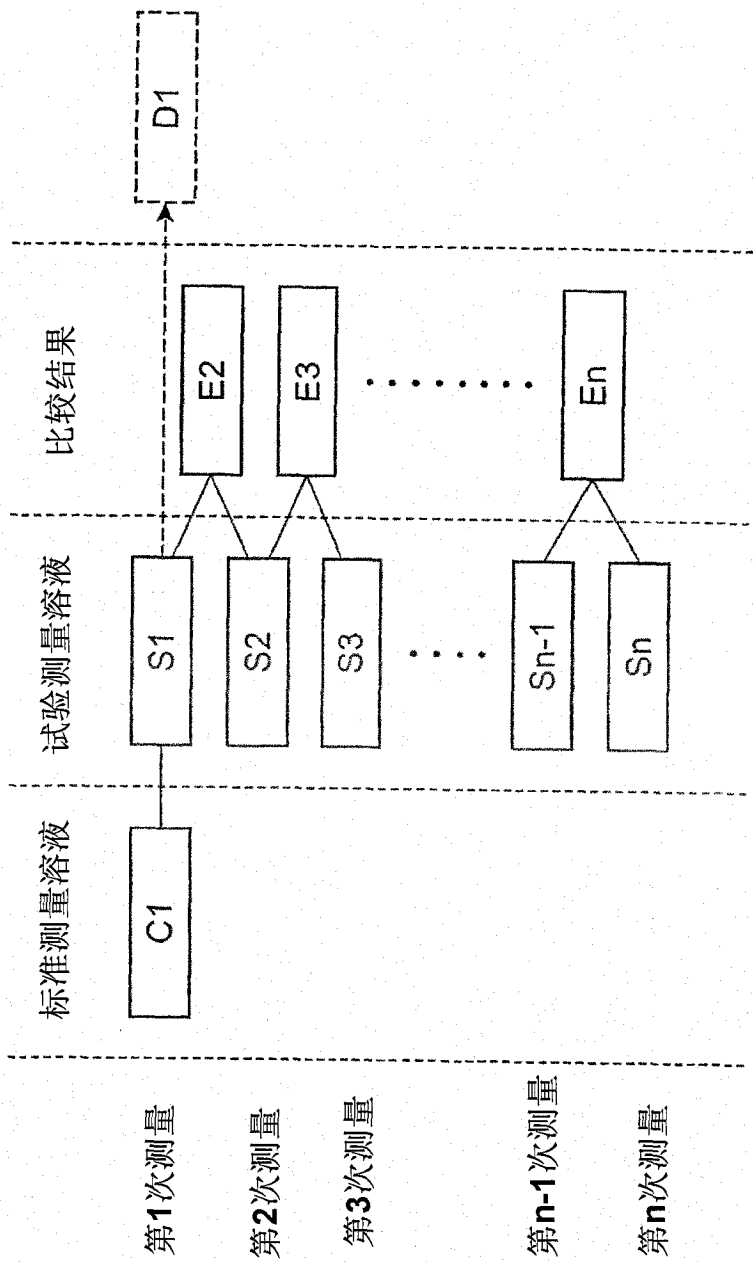


图 33

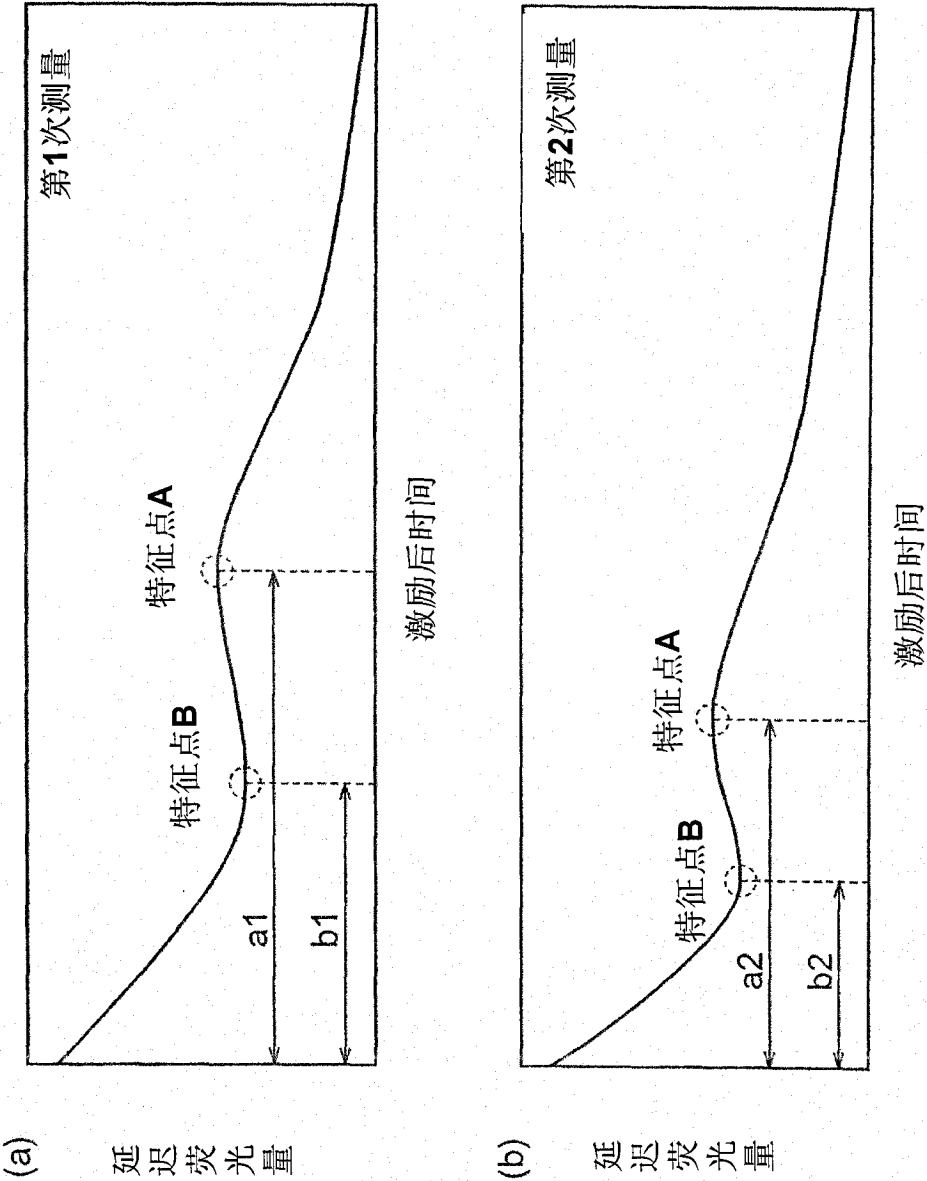


图34

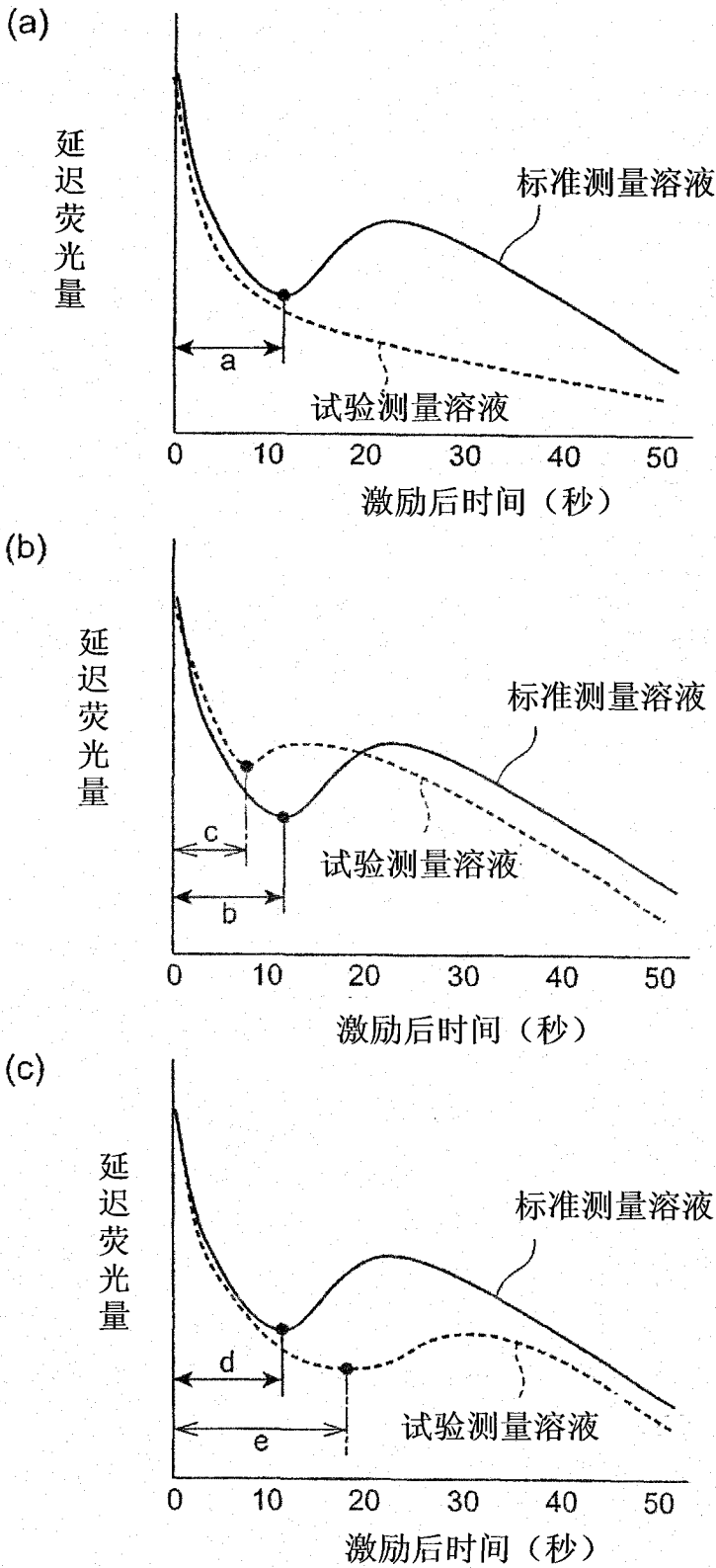


图 35

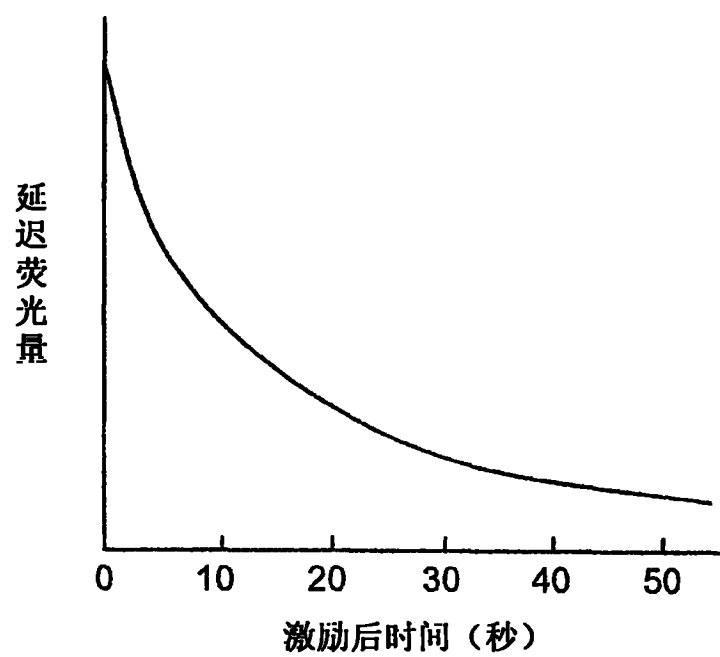


图 36

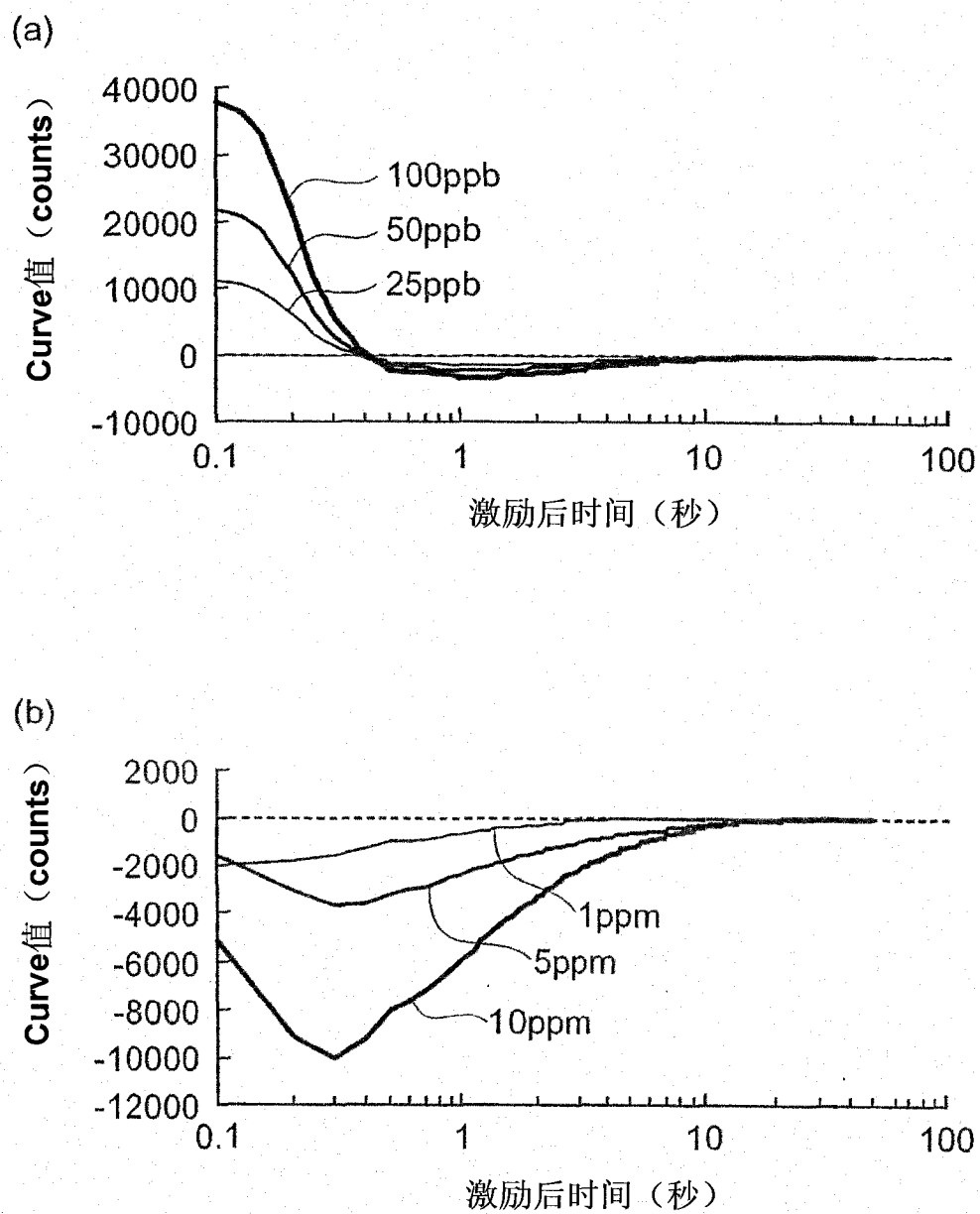


图 37

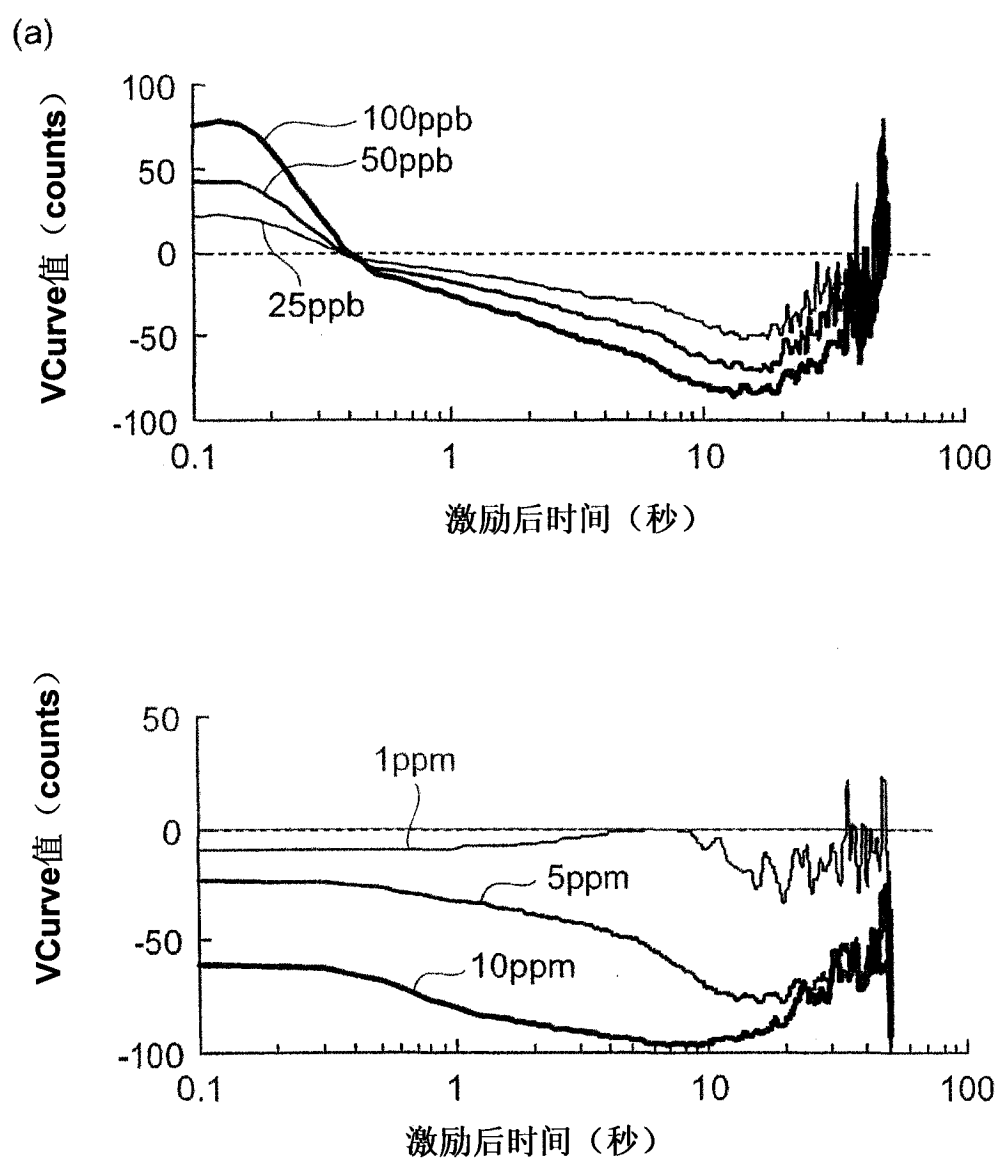


图 38

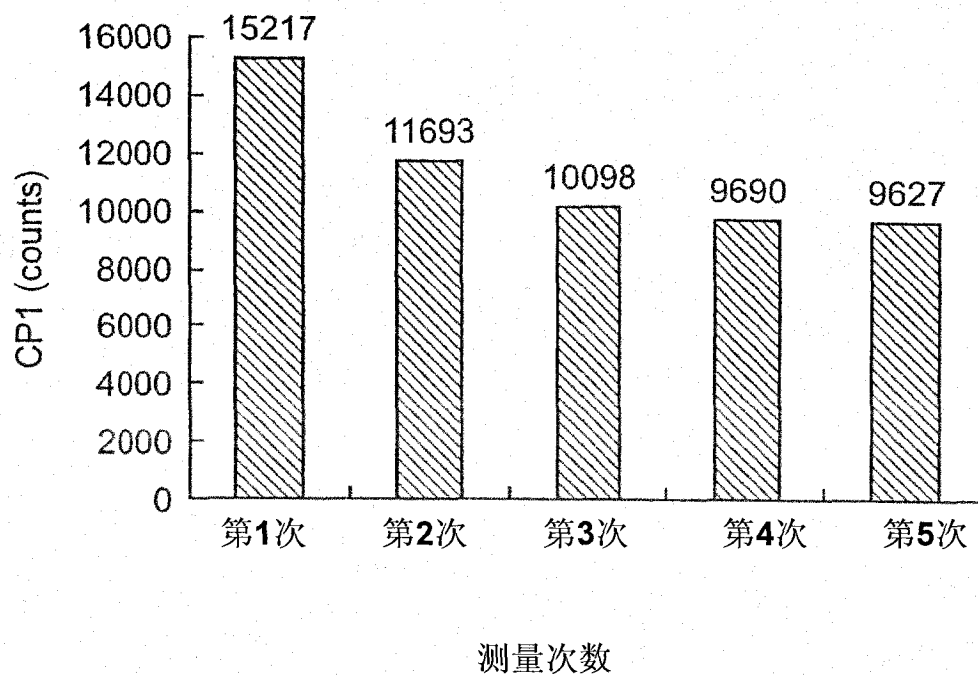


图 39

预备照射条件	3次测量结果的精度 (标准偏差/平均×100)
测量条件2次	3.6
暗中2次	4.8
测量条件1次	10.6
暗中1次	14.2
光1次	14.7
光30暗30	14.7
光1暗30	19.7
无适应化条件	21.2

图 40