

資料

## 藻類へのアレロパシー活性をもつ植物の検索

木村 淳子

### Screening for Allelopathic Activity on Algal Growth

JUNKO KIMURA

(Received September 30, 2011)

藍藻類として *Microcystis aeruginosa* および *Anabena planctonica*, 緑藻類として *Chlorella vulgaris*, 珪藻類として *Nitzschia palea* をそれぞれ選び、藻類への増殖抑制効果（アレロパシー活性）を示す植物を探索した。植物は126種、148サンプルを用いて調べ、*Microcystis* と *Anabena* に対してこれまで報告されていない植物がアレロパシー活性を示すことが確認された。*Chlorella*, *Nitzschia* に対しては著しい増殖抑制効果を示す植物は見つからなかった。

Key words : *Microcystis*, *Chlorella*, *Nitzschia*, 増殖抑制, アレロパシー

#### 緒 言

現在、国内の水道普及率は97%を超え [1], 安定した水供給は人々の生活に欠かせない。このような中、水道水源となっている湖沼やダムでは富栄養化などに起因して藻類の大量増殖 [2] や、それにともなう異臭味が発生し、浄水処理に支障をきたす例が報告されている。特に、藍藻は水の異臭の原因になるだけでなく細胞内に毒素を含むことが知られており、海外では家畜の被害や透析患者の死亡事例が発生している [3-6]。また、毒素を産生しない種であっても藻類の大量増殖は浄水処理過程における凝集阻害、ろ過障害および濁度上昇の原因となり [7], 藻類の増殖抑制対策が重要となっている。

藻類の増殖を制御する方法は、曝気等による湖水攪拌 [8], 流入する栄養塩の制御、取水池への資材投入 [9] などがあるが、いずれも大量のエネルギー、資材あるいは大掛かりな設備、コストを必要とする。低エネルギー、低コスト対策としては植物を用いる方法があり [10-12], この方法の中には、植物による栄養塩の吸収機能を利用した藻類増殖抑制手法や藻類に対するアレロパシー活性を持つ植物を選定、応用することで増殖抑制効果を期待する方法がある。前者の栄養塩吸収機能の応用について、応用事例は多いものの現場での効果が明確でないことが難点になっている。後者のアレロパシーとは Molisch が1937年に提唱した言葉で、微生物を含む植物相互間の生化学的な関わり合いを広く示す [13]。あ

る一種の植物（微生物を含む）が生産する化学物質が環境に放出されることによって、他植物に直接又は間接的に与える作用を指し、この「作用」には害作用と促進作用の両方が含まれる。

アレロパシーの研究は高等植物で古くから行われている。イチビはダイコンの発芽抑制、ダイズ幼植物などの生長阻害を引き起こし、原因物質としてフェノール性化合物が明らかにされている [14]。さらに、ワタとダイズの収量減少も報告されている。クログルミはトマトやトウモロコシの生長を阻害し、原因はユグロンによる呼吸阻害、窒素固定障害とくにアセチレン還元阻害であるといわれている [15]。藤井ら (1994) はムクナが植物への強い生長阻害活性を示し、原因がドーバによるリポキシゲナーゼ阻害活性であることを明らかにしている [16]。

藻類については、中井ら (1998) は、水生植物であるホザキノフサモが合成するポリフェノール類が藍藻の生長阻害を引き起こすことを報告している [17]。さらに、そのうちの4種のポリフェノールについて藍藻、緑藻および珪藻への影響を調査し、2種が藍藻に比べると効果は低いものの緑藻への生長阻害効果を示すことを報告している [18]。ホザキノフサモは抽水植物であり藻類へのアレロパシーを利用するにあたって有利だが、ポリフェノールの合成量が不安定であること、藻類が異常増殖すると遮光によって生育に悪影響を受ける等の問題がある。

Liら (2005) は、葎が含むエチル 2-メチルアセトア

セテート (ethyl 2-methylacetoacetate) が *Microcystis aeruginosa* と *Chlorella pyrenoidosa* の増殖抑制効果を示すが *Chlorella vulgaris* には効果がないことを報告している [19].

ユキヤナギは抗菌活性をもつチューリパリニン B [20] に加えて、レタスへの生長阻害活性をもつシス-ケイ皮酸を含む [21]. このように植物によっては、複数の物質により複数の対象へのアレロパシーを示す。さらに、ユキヤナギやヤマウルシ等の落葉は *Microcystis* に対して強いアレロパシー活性が明らかになっている [22, 23]. しかし、ユキヤナギを含めこれら木本植物の *Microcystis* 増殖抑制効果は落葉等が水中に落ちることによって効果が発揮されるため、水量に対して落葉の量が少ないことを考慮すると湖沼における影響は小さいと推測される。

このように様々なアレロパシー活性に関する報告があるものの藍藻類や他の緑藻に効果を有している植物を網羅的に調べた報告はほとんどない。

そこで、藍藻、緑藻、珪藻に対するアレロパシー活性をできるだけ多くの植物について調べ、植物を用いた湖沼水質改善対策への可能性、応用性について検討を行った。

## 材料および方法

### 1 供試植物および藻類

供試植物は、*Microcystis*, *Chlorella* および *Nitzschia* に対しては、表 1 に示した 126 種、148 サンプルとした。*Anabena* に対しては、*Microcystis* に増殖抑制効果を示した植物を中心とした 17 種、19 サンプルとした。植物は、広島県立総合技術研究所保健環境センター、同農業技術センター、同農業技術センター果樹研究部および広島県内の私有地等で採取または栽培後に採取した。一部植物は、(独) 農業環境技術研究所および(財) 広島県農林振興センター農業ジーンバンクから種子の分与を受け、保健環境センターで栽培し、植物体を採取した。なお、ユキヤナギの葉は *Microcystis* の増殖阻害効果が報告されており [22], *Microcystis* に対しては陽性対照として試験に用いた。

供試藻類は、*Microcystis aeruginosa* (NIES-88), *Anabena planctonica* (魚切ダム湖水からの単離株) [24], *Chlorella vulgaris* (NIES-642) および *Nitzschia palea* (NIES-487) を用いた。

### 2 植物抽出液の作成

採取した植物体は、細かく刻んで 60℃ 24 時間で乾燥し、ミルサーで粉碎した。粉碎した植物体を 250mg 量り取り、5 ml の滅菌水で 20℃ 24 時間抽出し、遠心分離

(3000rpm, 15分) 後の上清を試験用の抽出液とした。植物から湖沼へのアレロケミカルの溶出を考慮して、抽出溶媒は水とした。上記の方法は、Iqbal ら (2004) [25] および津田ら (2004) [26] の方法を改変した。

### 3 藻類の前培養

実験にあたり藻類密度を一定にするため各藻類をあらかじめ前培養した。前培養は 10m L の培地を入れた試験管で行い、培養条件は温度 20℃, 照度 2000lux, 12 時間明暗周期とし、*Microcystis* は静置、*Anabena*, *Chlorella* および *Nitzschia* は回転培養とした。*Microcystis* と *Anabena* は CT 培地、*Chlorella* は C 培地、*Nitzschia* は CSi 培地を用いた [27].

### 4 吸光度と藻類の個体数

培養液から藻体を遠心分離した後に少量の培地に分散させ、個体密度の高い培養液を作成した。その培養液を培地で適当な倍率に希釈し、マイクロプレートの 8 ウェルに 200  $\mu$ L / ウェルずつ分注して吸光度を測定した。その後、同じ培養液の藻類の個体数を顕微鏡下で計数した。

### 5 藻類生長阻害試験

藻類の生長に対する化学物質の影響を評価する手法としては「OECD テストガイドライン」[28] や「化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律」に示された方法がある。ここで要求される標準的試験法の藻類生長阻害試験では試験液量が 100m L, 1 暴露区あたり 3 ~ 6 連と定められている。そのため、広い培養場所が必要で、かつ、使用する物質の量が多く多検体の試験が難しい。これらの問題を解決するために、マイクロプレートを使用する方法が報告されており [29-31], 本試験でもマイクロプレートを使用することとした。

試験には、*Microcystis*, *Chlorella* は植え継ぎ 10 日後の培養液、*Anabena* は培養 10 日後の培養液を培地で 4 倍希釈した液を使用した。*Nitzschia* は植え継ぎ 3 日後の培養液を使用することとした。*Nitzschia* は植え継ぎ 10 日後頃から試験管内に黒褐色の藻類の塊が発生し、吸光度の測定に不都合が生じたため、培養液の植え継ぎ後の日数を短くした。

培養条件は、温度 20℃, 照度 2000lux, 12 時間明暗周期, 120rpm の振とうとした。培地は前培養と同じとした。培養時間は 96 時間 (*Anabena* のみ 14 日間) とし、培養開始時と終了時にマイクロプレートリーダー (VersaMax, Molecular Devices) を用いて波長 660nm の吸光度を測定して、藻類の生長速度を算出した。吸光度の測定はマイクロプレートをプレートリーダー内で 30 秒間攪拌し藻類を分散させて行った。培養開始時と 96 時

表 1-1 供試した植物

No.	植物名	品種名・特記事項	科名	学名	部位 <sup>1)</sup>	栽培・採取場所 <sup>2)</sup>
1	ユキヤナギ		バラ科	<i>Spiraea thunbergii</i>	葉	東広島市
2	ドクダミ		ドクダミ科	<i>Houttuynia cordata</i>		東広島市
3	サンショウ		ミカン科	<i>Zanthoxylum piperitum</i>	葉	東広島市
4	ウメノキゴケ		ウメノキゴケ科	<i>Parmotrema tinctorum</i>		東広島市
5	ミョウガ		ショウガ科	<i>Zingiber mioga</i>		東広島市
6	シュロガヤツリ		カヤツリグサ科	<i>Cyperus alternifolius</i>		保環
7	ムラサキツユクサ		ツユクサ科	<i>Tradescantia ohiensis</i>		保環
8	ヨモギ		キク科	<i>Artemisia indica var. maximowiczii</i>		保環
9	カタバミ		カタバミ科	<i>Oxalis corniculata</i>		保環
10	ブルーベリー	ラビットアイ系	ツツジ科	<i>Vaccinium ashei</i>	葉	広島市
11	イシクラゲ		ネンジュモ科	<i>Nostoc commune</i>		北広島町
12	サルトリイバラ		サルトリイバラ科	<i>Smilax china</i>	葉	東広島市
13	スギナ		トクサ科	<i>Equisetum arvense</i>		東広島市
14	エノコログサ		イネ科	<i>Setaria viridis</i>		東広島市
15	シソ	赤シソ	シソ科	<i>Perilla frutescens var. crispa</i>		東広島市
16	オリヅルラン		ユリ科	<i>Chlorophytum comosum</i>		保環
17	キョウチクトウ		キョウチクトウ科	<i>Nerium indicum Mill.</i>	葉	保環
18	スズラン		ユリ科	<i>Convallaria keiskei</i>		保環
19	ローズマリー		シソ科	<i>Rosmarinus officinalis</i>		保環
20	コヤブラン		ユリ科	<i>Liriope spicata</i>	葉	保環
21	イヌタデ		タデ科	<i>Polygonum longisetum</i>		東広島市
22	ササ		イネ科	<i>Sasa sp.</i>	葉	東広島市
23	アカマツ		マツ科	<i>Pinus densiflora</i>	葉	東広島市
24	ヒノキ		ヒノキ科	<i>Chamaecyparis obtusa</i>	葉	東広島市
25	スギ		ヒノキ科	<i>Cryptomeria japonica</i>	葉	東広島市
26	オランダイチゴ		バラ科	<i>Fragaria ananassa</i>	葉	保環
27	パパイヤ		パパイヤ科	<i>Carica papaya</i>	葉	保環
28	ダイズ	さちゆたか	マメ科	<i>Glycine max</i>		農技
29	アゼナ		ゴマノハグサ科	<i>Lindernia procumbens</i>		農技
30	タカサブロウ		キク科	<i>Eclipta thermalis</i>		農技
31	スカシタゴボウ		アブラナ科	<i>Rorippa palustris</i>		農技
32	スベリヒユ		スベリヒユ科	<i>Portulaca oleracea</i>		農技
33	マリーゴールド		キク科	<i>Tagetes sp.</i>	茎,葉,花	保環
34	チョウジタデ		アカバナ科	<i>Ludwigia epilobioides</i>		農技
35	カプシカム	観賞用品種	ナス科	<i>Capsicum spp.</i>		保環
36	カヤツリグサ		カヤツリグサ科	<i>Cyperus microiria</i>		農技
37	オモダカ		オモダカ科	<i>Sagittaria trifolia</i>		農技
38	イヌビワ		クワ科	<i>Ficus erecta</i>	葉	果樹
39	イチジク	蓬萊柿	クワ科	<i>Ficus carica</i>	葉	果樹
40	イチジク	セレスト	クワ科	<i>Ficus carica</i>	葉	果樹
41	ハギ		マメ科	<i>Lespedeza sp.</i>	葉	果樹
42	クリ		ブナ科	<i>Castanea crenata</i>	葉	果樹
43	ザクロ		ザクロ科	<i>Punica granatum</i>	葉	果樹
44	ヤマモモ		ヤマモモ科	<i>Myrica rubra</i>	葉	果樹
45	サンゴジュ		スイカズラ科	<i>Viburnum awabuki</i>	葉	果樹
46	ブドウ	ピオーネ	ブドウ科	<i>Vitis vinifera × V. labrusca</i>	葉	果樹
47	モモ	千曲白鳳	バラ科	<i>Amygdalus persica</i>	葉	果樹
48	ナシ	豊水	バラ科	<i>Pyrus pyrifolia</i>	葉	果樹
49	カキ	西条	カキノキ科	<i>Diospyros kaki</i>	葉	果樹
50	ビワ		バラ科	<i>Eriobotrya japonica</i>	葉	果樹

1) 部位は無記載の場合、地上部全体、複数部位が記載されているものは、それら部位の混合物。

2) 採取場所について

保環：広島県立総合技術研究所保健環境センター（種子や苗を購入して栽培または庁舎周辺に生育）。

農技：広島県立総合技術研究所農業技術センター（東広島市八本松町）で採取。

農技果樹：広島県立総合技術研究所農業技術センター果樹研究部（東広島市安芸津町）で採取。

広島市、東広島市、呉市、北広島町：各地域の私有地等で採取。

ジーンバンク：(財)広島県農林振興センター農業ジーンバンクから配布を受けた種子を保健環境センターで栽培して採取。

農技・保環：農技センターで採取した植物体を保健環境センターで栽培して採取。

農環研：(独)農業環境技術研究所から分与を受けた種子を保健環境センターで栽培して採取。

東広島市・保環：東広島市で採取した植物体を保健環境センターで栽培後に採取。

購入：量販店にて購入。

表1-2 供試した植物

No.	植物名	品種名・特記事項	科名	学名	部位 <sup>1)</sup>	栽培・採取場所 <sup>2)</sup>
51	キウイ		マタタビ科	<i>Actinidia chinensis</i>	葉	果樹
52	カラシナ		アブラナ科	<i>Brassica juncea</i>		保環
53	タマネギ		ユリ科	<i>Allium cepa</i>	葉	保環
54	ニンニク		ユリ科	<i>Allium sativum</i>	葉	保環
55	ニラ	大葉ニラ	ユリ科	<i>Allium tuberosum</i>	葉	保環
56	ショウガ	金時ショウガ	ショウガ科	<i>Zingiber officinale</i>		保環
57	クウシンサイ		ヒルガオ科	<i>Ipomoea aquatica</i>		保環
58	ハーブゼラニウム		フウロソウ科	<i>Pelargonium sp.</i>		保環
59	セスバニア		マメ科	<i>Sesbania sp.</i>		保環
60	クログワイ		カヤツリグサ科	<i>Eleocharis kuroguwai</i>		保環
61	トウガラシ	ハバネロ	ナス科	<i>Capsicum chinense</i>	葉	保環
62	トウガラシ	ハバネロ	ナス科	<i>Capsicum chinense</i>	実	保環
63	カプシカム	観賞用品種	ナス科	<i>Capsicum spp.</i>	実	保環
64	イネ	陸稲・戦捷	イネ科	<i>Oryza sativa</i>	穂	農技
65	イネ	陸稲・戦捷	イネ科	<i>Oryza sativa</i>	茎,葉	農技
66	イネ	陸稲・戦捷	イネ科	<i>Oryza sativa</i>	根	農技
67	稲原種		イネ科	<i>Oryza sp.</i>	茎,葉	農技
68	稲原種		イネ科	<i>Oryza sp.</i>	根	農技
69	タイヌビエ		イネ科	<i>Echinochloa oryzoides</i>	茎,葉	農技
70	タイヌビエ		イネ科	<i>Echinochloa oryzoides</i>	穂	農技
71	イグサ	セトナミ	イグサ科	<i>Juncus effusus var. decipens</i>		農技
72	イネ	ヒノヒカリ	イネ科	<i>Oryza sativa</i>	茎,葉	農技
73	イネ	クサノホシ	イネ科	<i>Oryza sativa</i>	茎,葉	農技
74	イボクサ		ツユクサ科	<i>Murdannia keisak</i>		農技
75	ベゴニア	赤花種	シュウカイドウ科	<i>Begonia sp.</i>	茎,葉	保環
76	シソ	青シソ	シソ科	<i>Perilla frutescens var. crispa</i>	茎,葉	保環
77	シソ	赤シソ	シソ科	<i>Perilla frutescens var. crispa</i>	花	保環
78	ソバ	とよむすめ	タデ科	<i>Fagopyrum esculentum</i>		ジーンバンク
79	ソバ	信州大ソバ	タデ科	<i>Fagopyrum esculentum</i>		ジーンバンク
80	ソバ	信濃1号	タデ科	<i>Fagopyrum esculentum</i>		ジーンバンク
81	ムクナ		マメ科	<i>Mucuna pruriens cv. ana Vicia faba</i>		農環研
82	トウガラシ	弘前在来	ナス科	<i>Capsicum annuum</i>		ジーンバンク
83	ヒエ	達磨	イネ科	<i>Echinochloa esculenta</i>		ジーンバンク
84	キビ	志和冠在来	イネ科	<i>Panicum miliaceum</i>		ジーンバンク
85	アワ	雪谷糰	イネ科	<i>Setaria italica</i>		ジーンバンク
86	コリアンダー		セリ科	<i>Coriandrum sativum</i>		保環
87	ルッコラ		アブラナ科	<i>Eruca vesicaria</i>		保環
88	ケール		アブラナ科	<i>Brassica oleracea var. acephala</i>		保環
89	バジリコ		シソ科	<i>Ocimum basilicum</i>		保環
90	パセリ		セリ科	<i>Petroselinum sativum</i>		保環
91	クレソン		アブラナ科	<i>Nasturtium officinale</i>		保環
92	セリ		セリ科	<i>Oenanthe javanica</i>		保環
93	ダイコン		アブラナ科	<i>Raphanus sativus</i>	スプラウト	保環
94	ブロッコリー		アブラナ科	<i>Brassica oleracea var. italica</i>	スプラウト	保環
95	チンゲンサイ		アブラナ科	<i>Brassica rapa var. chinensis</i>		保環
96	ヒロシマナ		アブラナ科	<i>Brassica campestris</i>		保環
97	ミズナ		アブラナ科	<i>Brassica rapa var. nipposinica</i>	葉	保環
98	アマドコロ	斑入り	ユリ科	<i>Polygonatum odoratum</i>		東広島市
99	アマドコロ	斑入り	ユリ科	<i>Polygonatum odoratum</i>	根茎	東広島市
100	ホタルイ		カヤツリグサ科	<i>Scirpus juncooides</i>	葉,茎,種子	保環

間後の660nmの吸光度を測定し、式1により生長阻害率(%)を算出した。

処理区は、植物抽出液50μLを滅菌水2450μLで希釈し、10μLずつ96穴マイクロプレートに分注した。この時のウェル内の培養液は乾燥植物体50mg/Lの抽出液

濃度に相当する。対照区のウェルには、植物抽出液の代わりに滅菌水10μLを添加した。続いて、藻類培養液を各ウェルに200μLずつ分注した。1処理区は6ウェルとした。

アマドコロ、コヤブラン、ユキヤナギについては

表1-3 供試した植物

No.	植物名	品名・特記事項	科名	学名	部位 <sup>1)</sup>	栽培・採取場所 <sup>2)</sup>
101	ネギ	鴨頭	ユリ科	<i>Allium fistulosum</i>	茎,葉	保環
102	ゴボウ	葉ごぼう	キク科	<i>Arctium lappa</i>	葉	保環
103	セロリ	ミニセロリ	セリ科	<i>Apium graveolens var. dulce</i>		保環
104	シュンギク	大葉新菊	キク科	<i>Chrysanthemum coronarium</i>		保環
105	コマツナ	笑天	アブラナ科	<i>Brassica rapa var. perviridis</i>		保環
106	ユウガオ		ウリ科	<i>Lagenaria siceraria var. hispida</i>		保環
107	イネ	陸稲・戦捷	イネ科	<i>Oryza sativa</i>	モミガラ	農技・保環
108	エノキタケ		キシメジ科	<i>Flammulina velutipes</i>	株元	購入
109	ホソバヒメミソハギ			<i>Ammannia coccinea</i>		東広島市
110	アキノタムラソウ		シソ科	<i>Salvia japonica</i>		東広島市・保環
111	ショウガ	金時ショウガ	ショウガ科	<i>Zingiber officinale</i>	根茎	保環
112	ミョウガ		ショウガ科	<i>Zingiber mioga</i>	根茎	保環
113	キキョウ		キキョウ科	<i>Platycodon grandiflorus</i>		保環
114	クコ		ナス科	<i>Lycium chinense</i>		保環
115	アサガオ		ヒルガオ科	<i>Ipomoea nil</i>		保環
116	ヘアリーベッチ		マメ科	<i>Vicia villosa Roth</i>		保環
117	チコリ		キク科	<i>Cichorium intybus</i>		保環
118	ケンタッキーブルーグラス		イネ科	<i>Poa pratensis</i>		保環
119	イネ	阿波赤米	イネ科	<i>Oryza sativa</i>		ジーンバンク
120	イネ	ヒノヒカリ	イネ科	<i>Oryza sativa</i>	穂	農技・保環
121	イネ	陸稲・戦捷	イネ科	<i>Oryza sativa</i>	玄米	農技・保環
122	イネ	ヒノヒカリ	イネ科	<i>Oryza sativa</i>	玄米	農技・保環
123	イネ	ヒノヒカリ	イネ科	<i>Oryza sativa</i>	モミガラ	農技・保環
124	ホウレンソウ	アクティブ	アカザ科	<i>Spinacia oleracea</i>	葉	保環
125	ナス	千両二号	ナス科	<i>Solanum melongena</i>		保環
126	ワサビ	六方沢	アブラナ科	<i>Wasabia japonica</i>	葉	保環
127	サフラン		アヤメ科	<i>Crocus sativus</i>	葉	保環
128	ナデシコ		ナデシコ科	<i>Dianthus sp.</i>		保環
129	セイタカアワダチソウ		キク科	<i>Solidago canadensis var. scabra</i>	茎,葉,花	広島市
130	コヤブラン		ユリ科	<i>Liriope spicata</i>	根	保環
131	イネ	三次在来・赤米	イネ科	<i>Oryza sativa</i>		ジーンバンク
132	イネ	黒優占・黒米	イネ科	<i>Oryza sativa</i>		ジーンバンク
133	ミカン	石地	ミカン科	<i>Citrus unshiu</i>	果皮	呉市
134	ナンテン		メギ科	<i>Nandina domestica</i>	葉	保環
135	フジ		マメ科	<i>Wisteria floribunda</i>	種子,サヤ	保環
136	フジ		マメ科	<i>Wisteria floribunda</i>	枝	保環
137	ソテツ		ソテツ科	<i>Cycas revoluta</i>	葉	保環
138	シュロ		ヤシ科	<i>Trachycarpus sp.</i>	葉	保環
139	クスノキ		クスノキ科	<i>Cinnamomum camphora</i>	葉	保環
140	クスノキ		クスノキ科	<i>Cinnamomum camphora</i>	葉	保環
141	ダイコン		アブラナ科	<i>Raphanus sativus</i>	葉	保環
142	ダイコン		アブラナ科	<i>Raphanus sativus</i>	根	保環
143	ゴボウ	葉ごぼう	キク科	<i>Arctium lappa</i>	根	保環
144	ウバメガシ		ブナ科	<i>Quercus phillyraeoides</i>	葉	保環
145	サザンカ		ツバキ科	<i>Camellia sasanqua</i>	葉	保環
146	カイヅカイブキ		ヒノキ科	<i>Juniperus chinensis cv. Pyramidalis</i>	葉	保環
147	クチナシ		アカネ科	<i>Gardenia jasminoides</i>	葉	保環
148	クチナシ		アカネ科	<i>Gardenia jasminoides</i>	実	保環

$$\text{式1: 生長阻害率(\%)} = \frac{\text{対照区の吸光度増加量} - \text{処理区の吸光度増加量}}{\text{対象区の吸光度増加量}} \times 100$$

抽出液を1, 1/3, 1/6, 1/10, 1/20に希釈して, 10 $\mu$  Lを *Microcystis* 培養液200 $\mu$  Lに添加し, 濃度別の生長阻害率から EC<sub>50</sub>を求めた.

## 結果および考察

### 1 藻類の個体数とマイクロプレートを用いた培養液の吸光度の関係

*Microcystis*, *Chlorella* および *Nitzschia* の個体数と660nmの吸光度の関係を図1~3に示した. 吸光度の標準偏差は *Microcystis* が $\approx$ 0.001-0.036, *Chlorella* が $\approx$ 0.002-0.011, *Nitzschia* が $\approx$ 0.001-0.005の範囲であった. 個体数は吸光度と比例関係にあり, 本試験では個体数計測の変わりに吸光度測定を行うことにした.

### 2 藍藻の生長阻害試験

*Microcystis* の生長阻害率は, アマドコロ (根茎) 115.5%, ユキヤナギ113.2%, コヤブラン (葉) 93.8%, フジ (種子・サヤ混合) 87.6%であり, 既知のユキヤナギ以外に生長阻害率が80%を超える植物が3種類存在した (表2).

多くの植物で生長阻害率がマイナスになり, 増殖促進現象がみられた. これらの植物については, 増殖促進成分を含む可能性があるが, 抽出液の添加により栄養塩濃度が上昇したために増殖が促進された可能性も否定できない.

*Anabena* に対して生長阻害率が高かった植物は, コヤブラン (根) 93.8%, アマドコロ (地上部, 根茎) 92.9%, 90.0%, スズラン85.1%, フジ (種子, サヤ混合) 83.7%であった (表3). *Microcystis* に対する生長阻害率が高かった植物は *Anabena* にも同様の傾向にあった. しかし, 同じ藍藻でも *Microcystis* と *Anabena* の生長阻害率が異なる植物があり, スズランは *Anabena* の生長阻害率のみが高く, 一方, ユキヤナギは *Microcystis* のみに増殖抑制効果を示した.

### 3 緑藻, 珪藻の生長阻害試験

生長阻害率は, *Chlorella* ではキビの33.4%, *Nitzschia* ではフジ (種子・サヤ混合) の34.9%が最高値であり, 顕著な増殖抑制効果を示す植物は見出せなかった (表2). 本試験では, 緑藻, 珪藻の増殖を強く阻害する植物は存在しなかった. しかし, 今回供試したサンプルは日本に生息する植物のごく一部に過ぎないため, さらなる研究が望まれる.

### 4 *Microcystis* に対する EC<sub>50</sub>

異なる抽出液濃度による生長阻害試験の結果を図4に示した. 図4から求めたコヤブラン (葉), アマドコロ

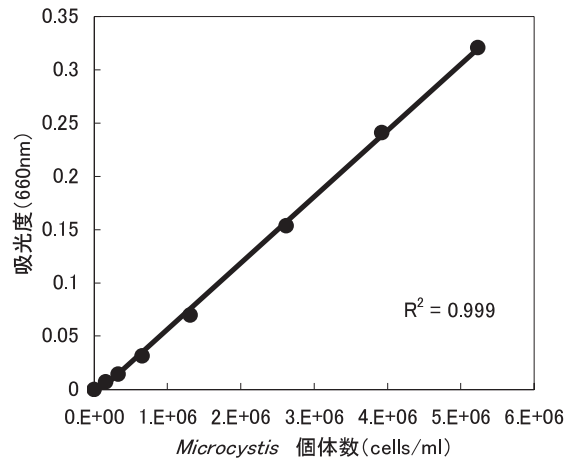


図1 培養液の吸光度と*Microcystis*個体数

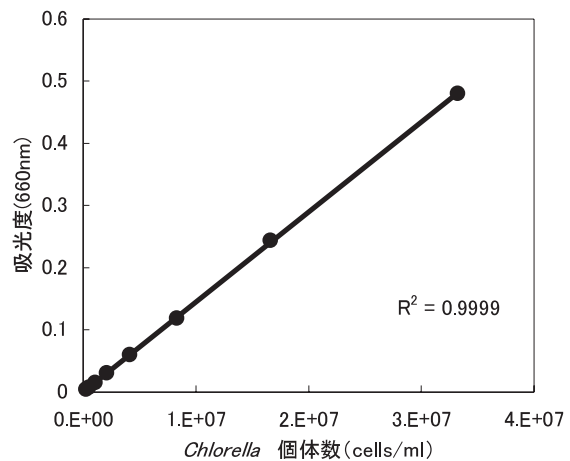


図2 培養液の吸光度と*Chlorella*個体数

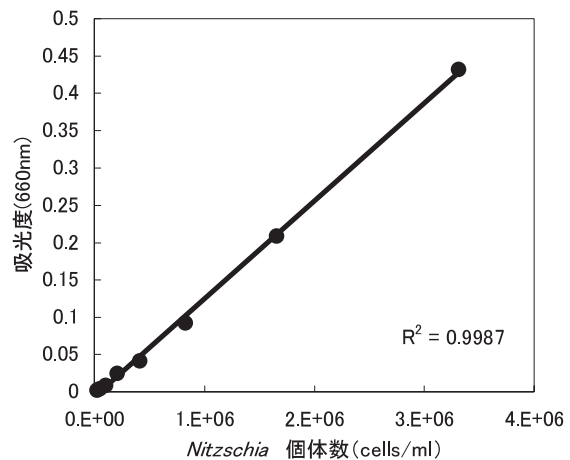


図3 培養液の吸光度と*Nitzschia*個体数

表2 藻類の生長阻害率

No.	植物名	品種名・特記事項	部位 <sup>1)</sup>	生長阻害率(%)			No.	植物名	品種名・特記事項	部位 <sup>1)</sup>	生長阻害率(%)		
				<i>Microcystis</i>	<i>Chlorella</i>	<i>Nitzschia</i>					<i>Microcystis</i>	<i>Chlorella</i>	<i>Nitzschia</i>
1	ユキヤナギ		葉	113.2	-53.7	-19.4	76	シソ	青シソ	茎, 葉	-72.9	4.2	-5.9
2	ドクダミ			3.4	-145.0	-33.7	77	シソ	赤シソ	花	-38.7	-4.7	-4.3
3	サンショウ		葉	-1.3	-39.5	-50.0	78	ソバ	とよむすめ		-41.5	-6.1	-7.5
4	ウメノキゴケ			-3.1	-46.6	-21.3	79	ソバ	信州大ソバ		-36.0	-10.5	-12.1
5	ミョウガ			-1.9	-75.0	-18.2	80	ソバ	信濃1号		-32.0	-27.8	1.4
6	シュロガヤツリ			-4.2	-79.9	-23.1	81	ムクナ			-19.8	2.4	-10.8
7	ムラサキツユクサ			-4.3	-48.6	-45.4	82	トウガラシ	弘前在来		-14.0	-27.7	-91.1
8	ヨモギ			-1.7	-12.1	-45.8	83	ヒエ	達磨		-12.0	4.0	-19.1
9	カタバミ			-16.1	-56.0	-32.2	84	キビ	志和冠在来		-12.3	33.4	-14.6
10	ブルーベリー		葉	-4.7	-89.0	-63.0	85	アワ	雪谷糯		-12.2	3.2	-15.6
11	イシクラゲ			15.7	-14.0	-81.9	86	コリアンダー			3.0	15.9	-32.9
12	サルトリイバラ		葉	-17.8	-20.1	-10.2	87	ルッコラ			-0.3	9.5	-31.2
13	スギナ			-20.2	-37.1	-13.1	88	ケール			2.5	-2.8	-63.2
14	エノコログサ			-13.0	-13.8	-21.1	89	バジリコ			48.8	-23.8	-21.0
15	シソ	赤シソ		-21.0	-16.0	-7.0	90	パセリ			8.1	-21.2	-20.6
16	オリヅラン			-20.8	14.7	-79.2	91	クレソン			-22.9	-8.9	-19.8
17	キョウチクトウ		葉	-28.7	-47.1	-68.1	92	セリ			-23.2	3.8	-34.0
18	スズラン			28.8	-24.1	-67.3	93	ダイコン	スプラウト		-4.7	2.1	-15.8
19	ローズマリー			-21.3	-42.9	-45.9	94	ブロッコリー	スプラウト		-15.6	-2.2	-19.5
20	コヤブラン		葉	93.8	-47.8	-8.5	95	チンゲンサイ			-4.4	2.1	-26.4
21	イヌタデ			4.5	3.2	-90.6	96	ヒロシマナ			-5.5	-5.1	-23.8
22	ササ		葉	-5.3	4.1	-57.3	97	ミズナ		葉	-1.7	2.2	-19.2
23	アカマツ		葉	-4.6	8.7	-44.8	98	アマドコロ			51.1	-16.4	-16.2
24	ヒノキ		葉	-5.2	0.9	-68.5	99	アマドコロ		根茎	115.5	11.0	-37.0
25	スギ		葉	-4.4	8.8	-26.0	100	ホタルイ		葉, 茎, 種子	12.9	-18.4	-18.7
26	オランダイチゴ		葉	-3.0	1.1	-48.4	101	ネギ	鴨頭	茎, 葉	-40.2	-7.7	-40.3
27	パパイヤ		葉	-2.6	-7.1	-44.8	102	ゴボウ	葉ごぼう	葉	-13.7	-5.4	-62.2
28	ダイズ	さちゆたか		-12.6	-2.5	-35.3	103	セロリ	ミニセロリ		-11.0	-12.0	-71.4
29	アゼナ			-16.1	-13.3	-45.4	104	シュンギク	大葉新菊		-14.6	-4.3	-37.2
30	タカサブロウ			-4.5	-23.2	-58.9	105	コマツナ	笑天		-13.5	1.1	-43.0
31	スカシタゴボウ			-9.5	-164.1	-54.5	106	ユウガオ			-13.1	-45.3	-57.4
32	スベリヒユ			-20.2	-47.4	-44.8	107	イネ	陸稲・戦捷	モミガラ	-23.8	-19.1	-94.7
33	マリーゴールド		茎, 葉, 花	-8.5	-16.3	-25.0	108	エノキタケ		株元	-32.5	-15.9	-86.4
34	チョウジタデ			16.4	-28.7	-75.6	109	ホソバヒメミソハギ			61.0	-27.5	-80.1
35	カブシカム	観賞用品種		-18.2	-1.4	-25.1	110	アキノタムラソウ			59.4	-23.5	-100.7
36	カヤツリグサ			-10.3	-19.0	-44.1	111	シヨウガ	金時シヨウガ	根茎	-11.9	-4.7	-17.3
37	オモダカ			-11.3	-26.0	-51.1	112	ミョウガ		根茎	-24.5	-5.8	4.2
38	イヌビワ		葉	0.3	4.9	-32.7	113	キキョウ			-5.8	-7.7	-20.4
39	イチジク	蓬萊柿	葉	-13.6	-35.4	-55.4	114	クコ			-15.3	-2.0	-8.9
40	イチジク	セレスト	葉	-18.3	-6.1	-65.8	115	アサガオ			-15.5	-7.2	-4.2
41	ハギ		葉	-0.4	-24.7	-35.1	116	ヘアリーベッチ			-10.7	1.7	-41.7
42	クリ		葉	3.7	-10.7	-65.5	117	チコリ			-11.0	-2.6	-14.0
43	ザクロ		葉	19.2	11.9	-72.2	118	ケンタッキー ブルーグラス			-9.2	-1.0	-27.5
44	ヤマモモ		葉	9.1	-23.2	-51.4	119	イネ	阿波赤米		13.5	-13.9	-34.2
45	サンゴジュ		葉	26.3	-0.6	-38.1	120	イネ	ヒノヒカリ	穂	-16.1	-10.9	-13.2
46	ブドウ	ビオーネ	葉	10.2	-73.5	-24.4	121	イネ	陸稲・戦捷	玄米	-19.1	-17.7	14.7
47	モモ	千曲白鳳	葉	18.6	-19.1	-38.6	122	イネ	ヒノヒカリ	玄米	-21.0	-23.8	-3.6
48	ナシ	豊水	葉	15.6	-14.6	-10.8	123	イネ	ヒノヒカリ	モミガラ	-6.9	-13.2	-34.2
49	カキ	西条	葉	16.7	-8.7	-14.0	124	ホウレンソウ	アクティブ	葉	-43.0	-9.2	-28.3
50	ビワ		葉	19.7	-81.0	-53.2	125	ナス	千両二号		-6.9	-17.7	8.0
51	キウイ		葉	-30.6	2.2	-5.3	126	ワサビ	六方沢	葉	-4.7	-9.4	9.0
52	カラシナ			-4.2	5.2	-118.9	127	サフラン		葉	20.8	-18.4	-1.2
53	タマネギ		葉	-3.7	21.6	-57.0	128	ナデシコ			-12.6	-2.1	16.9
54	ニンニク		葉	6.0	11.0	-88.2	129	セikatアワダチソウ		茎, 葉, 花	37.0	7.7	7.5
55	ニラ	大葉ニラ	葉	15.6	31.7	-48.8	130	コヤブラン		根	49.3	-38.4	-38.5
56	シヨウガ	金時シヨウガ		12.4	13.1	-20.3	131	イネ	三次在来・赤米		-19.7	-49.7	-18.6
57	クウシンサイ			14.4	16.4	-33.2	132	イネ	黒優占・黒米		-15.3	-45.5	-60.6
58	ハーブゼラニウム			10.6	8.8	-143.0	133	ミカン	石地	果皮	-8.6	-30.9	-29.5
59	セスバニア			9.3	21.3	-56.1	134	ナンテン		葉	27.9	-31.8	-33.0
60	クログワイ			21.4	0.2	-18.4	135	フジ		種子, サヤ	87.6	-2.4	34.9
61	トウガラシ	ハバネロ	葉	-8.5	-5.0	-60.7	136	フジ		枝	-8.2	-26.2	-19.5
62	トウガラシ	ハバネロ	実	0.4	-17.3	-26.4	137	ソテツ		葉	4.7	-30.8	-15.2
63	カブシカム	観賞用品種	実	4.6	-11.2	-32.9	138	シュロ		葉	-1.5	-32.2	0.4
64	イネ	陸稲・戦捷	穂	13.2	-3.5	-41.6	139	クスノキ		葉	53.2	-32.2	-7.3
65	イネ	陸稲・戦捷	茎, 葉	2.6	-10.6	-16.7	140	クスノキ		実	-12.1	-23.9	-38.0
66	イネ	陸稲・戦捷	根	3.5	-9.5	-27.0	141	ダイコン		葉	21.1	-35.4	-49.8
67	稲原種		茎, 葉	1.6	-10.6	-32.5	142	ダイコン		根	28.6	-33.2	-29.1
68	稲原種		根	10.3	-14.0	-37.1	143	ゴボウ	葉ごぼう	根	34.6	-6.7	-21.5
69	タイヌビエ		茎, 葉	24.9	-13.5	-86.3	144	ウバメガシ		葉	60.6	-7.1	-30.4
70	タイヌビエ		穂	14.5	-14.1	-47.3	145	サザンカ		葉	6.0	-10.9	-30.5
71	イグサ	セトナミ		-63.4	2.0	-4.7	146	カイヅカイブキ		葉	6.8	-5.6	-22.0
72	イネ	ヒノヒカリ	茎, 葉	-67.0	0.8	-21.5	147	クチナシ		葉	43.9	3.2	-51.0
73	イネ	クサノホシ	茎, 葉	-63.0	-5.0	-56.7	148	クチナシ		実	-3.2	-8.6	-44.7
74	イボクサ			-75.5	6.9	-58.5							
75	ベゴニア	赤花種	茎, 葉	-60.0	-7.4	7.0							

1) 部位は、無記載の場合、地上部全体。複数部位が記載されているものは、それら部位の混合物。

表3 *Anabena* の生長阻害率

No.	植物名	部位 <sup>1)</sup>	生長阻害率(%)
1	ユキヤナギ	葉	-6.5
11	イシクラゲ		-24.4
18	スズラン		85.1
20	コヤブラン		78.3
56	ショウガ		-27.0
59	セスバニア		-5.4
64	イネ <sup>2)</sup>	穂	-5.4
67	稲原種		-6.9
89	バジリコ		7.3
98	アマドコロ		92.9
99	アマドコロ	根茎	90.0
100	ホタルイ	種子付き	35.8
110	アキノタムラソウ		60.4
129	セイタカアワダチソウ		35.7
130	コヤブラン	根	93.8
135	フジ	種子, サヤ	83.7
139	クスノキ	葉	46.8
143	葉ゴボウ	根	33.3
147	クチナシ	葉	24.2

1) 部位は、無記載の場合、地上部全体。  
2) 品種は戦捷。

(根), ユキヤナギ(葉)のEC<sub>50</sub>は13±1mgで同等であった。ユキヤナギは植物の葉としては*Microcystis*の増殖抑制効果が強いことが報告されている[22]。アマドコロとコヤブランはユキヤナギと同等の*Microcystis*増殖抑制効果をもつことが明らかになった。

### 5 応用の可能性と残された課題

図4の結果を基に湖沼への応用を考えると、湖沼水1,000m<sup>3</sup>を想定した場合、乾燥したコヤブラン(葉)13kg, アマドコロ(根茎)12kgあるいはユキヤナギ(葉)14kg以上を投入することに相当する。しかし、乾燥植物体をこのように投入することは現実的でないことから、湖岸や人工浮島への植栽あるいはアレロパシー効果を生み出すアレロケミカルの直接応用が考えられる。

アマドコロ、およびコヤブランは在来植物であり、日本の気候に適していると同時に移植、増殖による生態系への攪乱がない。アマドコロは根茎、コヤブランは匍匐枝によって増殖する多年草であり、一度定植するとその後の植え付けや播種が必要ない。さらに、コヤブランは柔軟な匍匐枝で繋がった植物体がマット状に広がるため、降雨による増水などで水にさらされても定植位置から流出しにくいと考えられる。両種とも水はけがよい土地に自生するが、コヤブランを半湛水状態でれき耕栽培したところ、土耕栽培に比べて若干生育が劣るものの生育、増殖し、栽培方法の改良によって水辺に導入できる可能性が示唆された。ホザキノフサモが含まるポリフェノールは複数物質が同時に存在すると、*Microcystis*へ

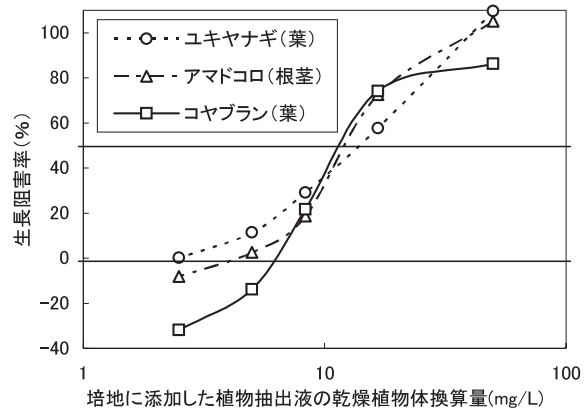


図4 植物抽出液の濃度とミクロキスティスの生長阻害率各プロットのn=3

の増殖抑制効果に相乗作用が発生することが報告されている[18]。コヤブランとアマドコロは半日陰で良く生育するため、藻類へのアレロパシーや栄養塩の除去が期待できる大型植物と組み合わせて利用すれば、藍藻類の増殖抑制に対して相乗効果が得られる可能性がある。

藍藻の増殖抑制活性が見いだされた植物は、緑藻、珪藻に対する増殖抑制が見られないことから、藍藻による水の華が発生した湖沼などで藍藻の特異的な増殖抑制に利用できる可能性がある。漢方薬でコヤブランと同様に麦門冬の材料になるジャノヒゲは植物に対するアレロパシー活性があり、アレロケミカルはサリチル酸であることが明らかにされており[32]、ヤブランもアレロパシー活性が報告されている[33]。ユキヤナギのように複数のアレロケミカルを含む植物があること[20, 21]、ヤブランとコヤブランには化学的な基本構造に基づいた誘導体が含まれている[34]ことから、アマドコロ、ジャノヒゲも含め、アレロケミカルによる湖沼の藻類の増殖制御の可能性が示唆される。ただし、本試験におけるコヤブランの藍藻に対するアレロパシーが、ヤブランやジャノヒゲと同じ物質によるものかどうか確認が必要である。

また、植物の種類によっては、*Microcystis*と*Anabena*では増殖抑制効果の程度が異なった。両種とも藍藻類に属することから、特定の種に増殖抑制効果を示した植物は種特異的な作用機構を持つ物質を含む可能性があり興味深い。

### 結 語

植物126種、148サンプルについて、*Microcystis*(藍藻)、*Anabena*(藍藻)、*Chlorella*(緑藻)、*Nitzschia*(珪藻)の増殖抑制効果について調べた。その結果、*Microcystis*に対しては従来知られているユキヤナギ以外にアマドコロ(根茎)、コヤブラン(葉)およびフジ



(種子・サヤ混合)が高い生長阻害率を示し、3種の植物のアレロパシー活性が明らかになった。同じ藍藻類でも *Microcystis* と *Anabena* の生長阻害率が異なる植物がみられ、スズランは *Anabena* のみに生長阻害率が高く、一方、ユキヤナギは *Microcystis* のみに増殖抑制効果を示した。

本研究で用いた植物は、緑藻 *Chlorella* と珪藻 *Nitzschia* に対してほとんど増殖抑制効果が認められなかった。

## 謝 辞

本研究で使用した *Microcystis aeruginosa* (NIES-88), *Chlorella vulgaris* (NIES-642), *Nitzschia palea* (NIES-487) は (独)国立環境研究所微生物系統保存施設から分譲を、植物の一部は(財)広島県農林振興センター農業ジーンバンクから種子の配布を受けました。

試験にあたってご助言およびムクナの種子を分与いただいた(独)農業環境技術研究所の藤井義晴様、菅野真美様、植物体の収集に協力いただいた保健環境センター、農業技術センター、および農業技術センター果樹研究部の研究員の方々に感謝いたします。

## 文 献

- [1] 厚生労働省. 平成21年度給水人口と水道普及率. 厚生労働省水道の基本統計. <http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/kenkou/suido/database/kihon/fukyu.html>. (参照2011-09-20).
- [2] Ohkubo N, Yagi O, Okada M. Studies on the succession of blue-green algae, *Microcystis*, *Anabena*, *Oscillatoria* and *Phormidium* in Lake Kasumigaura. *Environ Technol.* 1993;14(5):433-442.
- [3] 彼谷邦光. 1シアノバクテリアと奇病. 飲料水に忍び寄る有毒シアノバクテリア. 東京:裳華房; 2001. p. 1-12.
- [4] Galey FD, Beaseley VR, Carmichael WW. Blue-green algae (*Microcystis aeruginosa*) Hepatotoxicosis in dairy cows. *Am J Vet Res.* 1987;48:1415-1420.
- [5] 原田健一. 有毒ラン藻をめぐる最近の研究動向. *J Health Sci.* 1999;45:150-165.
- [6] Skulberg OM, Codd GA, Carmichael WW. Toxic blue-green algal blooms in Europe: a growing problem. *Ambio.* 1984;13:244-247.
- [7] (社)日本水道協会 凝集阻害・藻類除去研究委員会. 佐藤敦久, 眞柄泰基編. 第1章水道の生物障害実態. 上水道における藻類障害. 東京: 技報堂出版; 1996. p. 1-13.
- [8] (社)日本水道協会 凝集阻害・藻類除去研究委員会. 佐藤敦久, 眞柄泰基編. 第5章浄水処理障害の対策5.1水源対策. 上水道における藻類障害. 東京: 技報堂出版; 1996. p. 116-132.
- [9] 和田実, 中島美和子, 前田広人. 10粘土散布による赤潮駆除. 広石伸互, 今井一郎, 石丸隆編. 日本水産学会監修. 有毒・有害藻類ブルームの予防と駆除. 東京: 恒星社厚生閣; 2002. p. 121-133.
- [10] 環境省. 環境技術実証モデル事業 平成18年度実証試験結果報告書の概要 湖沼等水質浄化技術分野. 2009. p. 28-31.
- [11] 橋本敏子, 井澤博文, 岡本拓, 水田満里. 「ポット植栽による水質浄化システム」の開発と地域住民の水質浄化への取組み. *全国公害研会誌.* 1998;23(2):87-93.
- [12] Sherwood C. Reed, Ronald W. Crites, E. Joe Middlebrooks. 石崎勝義, 楠田哲也監訳. (財)ダム水源環境整備センター企画. 第5章水圏を利用するシステム, 第6章湿地処理. 自然システムを利用した水質浄化 土壌・植生・池などの活用. 東京: 技報堂出版; 2001. p. 133-286.
- [13] Rice EL. 八巻敏雄, 安田環, 藤井義晴共訳. 1序論 I アレロパシー研究の起源と意味. アレロパシー. 3刷. 東京:学会出版センター; 1991. p. 1-2.
- [14] Rice EL. 八巻敏雄, 安田環, 藤井義晴共訳. 2人為的生態系:農業におけるアレロパシーの意義 I 作物の収量に及ぼす雑草の影響. アレロパシー. 3刷. 東京:学会出版センター; 1991. p. 11-45.
- [15] 藤井義晴. 第3章作物や雑草とアレロパシーの関連, II 果樹のアレロパシー. アレロパシー 他感物質の作用と利用. 東京: 農文協; 2000. p. 93-96.
- [16] 藤井義晴. アレロパシー検定法の確立とムクナに含まれる作用物質 L-DOPA の機能. 農業環境技術研究所報告. 1994;10:115-218.
- [17] 中井智司, 井上豊, 細見正明, 村上昭彦. ホザキノフサモが放出したアレロパシー物質の藍藻に対する複合作用およびアレロパシー効果の評価. *水環境学会誌.* 1998;21(10):663-669.
- [18] 中井智司, 山根小雪, 細見正明. ホザキノフサモが放出した4種のアレロパシー物質(ポリフェノール)の藻類に対する増殖抑制効果. *水環境学会誌.* 2000;23(11):726-730.
- [19] Li FM, Hu HY. Isolation and characterization of novel antialgal allelochemical from *Phragmites communis*. *Appl Environ Microbiol.* 2005;71(11):6545-6553.

- [20] Lee J, Lee J, Lim J, Sim S, Park D. Antibacterial effects of S(-)-tulipalin B isolated from *Spiraea thunbergii* Sieb. on *Escherichia coli*, a major food borne pathogenic microorganism. J Med Plant Res. 2008;2(3):60-65.
- [21] Hiradate S, Morita S, Sugie H, Fujii Y, Harada J. Phytotoxic cis-cinnamoyl glucosides from *Spiraea thunbergii*. Phytochemistry. 2004;65:731-739.
- [22] (独)農業環境技術研究所. アオコの増殖抑制植物を検定する「リーフディスク法」の開発. 農業環境研究成果情報. 2006;22:30-31.
- [23] Tsuda K, Takamura N, Matsuyama M, Fujii Y. Assessment method for leaf litters allelopathic effect on cyanobacteria. J Aquat Plant Manage. 2005;43:43-46.
- [24] 橋本敏子, 井澤博文, 後田俊直, 冠地敏栄, 藤間裕二. アオコ発生簡易予測手法開発の試み. 全国環境研会誌. 2007;32(4):211-216.
- [25] Iqbal Z, Furubayashi A, Fujii Y. Allelopathic effect of leaf debris, leaf aqueous extract and rhizosphere soil of *Ophiopogon japonicus* Ker-Gawler on the growth of plants. Weed Biol Manag. 2004;4(1):43-48.
- [26] 津田久美子, 高村典子, 藤井義晴. 導入・侵入水生植物等が藍藻類に及ぼすアレロパシー活性評価手法の検討. 雑草研究. 2004;49(別):180-181.
- [27] (社)日本水道協会. VI生物試験9藻類培養9.1障害生物の培養. 上水試験方法解説編. 東京:小葉印刷所; 2001; p.1004-1013.
- [28] OECD. Freshwater algae and cyanobacteria, growth inhibition test, OECD guidelines for the testing of chemicals. 2006;No.201.  
<http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/fulltext/9720101e.pdf?expires=1318780674&id=id&accname=freeContent&checksum=84FD114D8FE3D1EFD252DD1A4CDB8543>. (参照2011-09-20).
- [29] 山下尚之, 田中宏明, 宮島潔, 鈴木穰. マイクロプレートを用いたAGP試験の検討. 水環境学会誌. 2005;28(8):493-499.
- [30] 倉光英樹, 佐澤和人, 七山泰昭, 工藤千春, 川上貴教, 波多宣子, 田口茂. マイクロスケール藻類生長阻害試験を用いた銅の毒性に対する溶存有機物質に含まれる抑制成分の探索. 水環境学会誌. 2009;32(6):309-314.
- [31] 鈴木祥広, 黒沢津翔, 金丸祐加, 高見徹, 鬼東幸樹. マイクロプレートを用いたバイオアッセイによる宮崎県五ヶ瀬川水系の藻類増殖制限物質の探索. 用水と廃水. 2009;53(2):134-141.
- [32] 藤井義晴. 新規アレロケミカルの探索と遺伝子発現への影響解析. 植物の生長調節. 2009;44(1):94-99.
- [33] 猪谷富雄, 平井健一郎, 藤井義晴, 神田博史, 玉置雅彦. サンドイッチ法による雑草および薬用植物のアレロパシー活性の検索. 雑草研究. 1998;43(3):258-266.
- [34] Yu B, Hirai Y, Shoji J, Xu G. Comparative studies on the constituents of ophiopogonis tuber and its congeners. VI. : Studies on the constituents of the subterranean part of *Liriope spicata* var. *prolifera* and *L. muscari*(1). Chem Pharm Bull. 1990;38(7):1931-1935.