ホザキノフサモが放出したアレロパシー物質による 藍藻類 (*Microcystis aeruginosa*) の増殖抑制

Growth Inhibition of Blue-green Algae (*Microcystis aeruginosa*)
by Allelopathic Compounds secreted by *Myriophyllum spicatum*.

中井智司、井上 豊、細見正明、村上昭彦

東京農工大学 工学部 応用化学科/〒184-0012 東京都小金井市中町2-24-16

SATOSHI NAKAI, YUTAKA INOUE, MASAAKI HOSOMI and AKIHIKO MURAKAMI

Department of Chemical Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology

/ 2-24-16, Naka, Koganei, Tokyo 184-0012, Japan

Abstract

The culture solution of *M. spicatum* was fractionated to three fractions; acidic, basic and water soluble fraction based on polarity. The assay of three fractions for blue-green algae (*M. aeruginosa*) showed that the water-soluble fraction was the only fraction that demonstrated inhibitory effects on growth of *M. aeruginosa*. Such result indicated that the water-soluble fraction contained allelopathic compounds secreted by *M. spicatum*. Thus, the water-soluble fraction was filtered through a membrane (molecular weight cut-off, MWCO 1000) in order to investigate molecular weight of the allelopathic compounds. A filtrate through the membrane did not affect the inhibitory effects of the water-soluble fraction. The water-soluble fraction filtered through the membrane was applied to an analytical high performance liquid chromatography (HPLC) system equipped with an electrochemical detector. Four polyphenolic compounds; ellagic (EA), gallic (GA), pyrogalllic acids (PA) and (+)-catechin (CATECH) which were below MW 1000 were identified in the water-soluble fraction by the analytical HPLC system. These phenolic compounds showed inhibitory effects on the growth of *M. aeruginosa*. Among the four phenolic compounds, PA and GA were the most inhibitory to *M. aeruginosa*, while autoxidized PA and GA had the same inhibitory effects as PA and GA.

Key words: growth inhibition, allelopathy, macrophyte, blue-green algae, polyphenol

1. はじめに

富栄養化した湖沼における藻類の異常増殖は、水の華等の発生など景観の悪化、魚のへい死^{1,2)}や上水処理における濾過閉塞¹⁾などを引き起こしている。特に藍藻類が異常増殖した場合、これらの問題のみならず、ミクロキスチンなどの有毒物質の産出による動物のへい死^{3,4,5)}、水道水のカビ臭発生⁶⁾を招くなど、重大な社会問題の原因となっている。従って、藍藻類の増殖抑制

対策が湖沼管理における緊急の課題となっている。

本研究では、生態系へ与えるインパクトが小さく、かつ有効な藍藻類の増殖抑制方法を提案する為、大型水生植物と藻類との生物間相互作用（アレロパシー⁷⁾）に着目した。

大型水生植物のアレロパシーを利用して藍藻類の増殖抑制を行う為には、大型水生植物が放出するアレロパシー物質を特定することは不可欠である。しかしながら、水生植物体より放出されたアレロパシー物質（藻類の増

殖を阻害する物質)の同定操作を行った研究例は見られない⁸⁾。

これに対し、藻類の増殖に対して阻害効果を示す生理活性物質(この場合、厳密にはアレロパシー物質ではない)を水生植物体から抽出した研究例は多数見られ⁹⁻²⁰⁾、同定例も比較的多く¹⁴⁻²⁰⁾、大型水生植物体から抽出した生理活性物質を潜在のアレロパシー物質として報告した例もある²⁰⁾。

しかしながら、植物体内に顕著な増殖抑制効果を示す生理活性物質を有しても、実際に藻類の増殖抑制に関与しない場合もある。Anthoni ら¹⁴⁾はカタシヤジクモ(*Chara globularis*)より2種の生理活性物質(4-methylthio-1, 2-dithiolane など)を抽出したが、その一方で Forsberg ら²¹⁾は *Chara sp.* が繁茂している湖にお

いて、これらの放出による藻類の増殖抑制は認められないことを報告している。

この様に、抽出された生理活性物質は必ずしもアレロパシー物質と一致するとは限らず、アレロパシー物質を特定する為には、大型水生植物の放出物より藻類の増殖を阻害する物質を検索する必要があった。

筆者らは、これまでにホザキノフサモが *Microcystis aeruginosa* 等の藍藻類に対して顕著な増殖抑制効果を示すことを確認し^{13, 22)}、更にホザキノフサモの高濃度培養液の添加により *M. aeruginosa* の増殖が抑制されることを明らかにした²²⁾。このような結果は、ホザキノフサモの培養液中にアレロパシー物質が存在しているという根拠となった。

従って本研究では、Fig. 1 に示される様にホザキノフ

Fig. 1 Employed procedures for the identification of allelochemicals released by *M. spicatum*.

サモの高濃度培養液を極性及び分子量に基づいて分画し、顕著な増殖抑制効果を示した画分中のアレロパシー物質を検索すると共にこれらの増殖抑制効果を評価した。

2. 実験方法

2. 1 ホザキノフサモ及び藍藻類

ホザキノフサモは東京都内の河川より採取したものを供試し、藍藻類 *Microcystis aeruginosa* (NIES-87) は国立環境研究所から供与された株を使用した。*M. aeruginosa* は、CB 培地²³⁾を用いて25℃、5000luxの条件下で70rpmにて回転振盪培養し、生物量は血球計算盤(菱垣医理化工業、Thoma JHS)を用いた計数により求めた。

2. 2 培養液の分画

2. 2. 1 極性に基づいた分画

ホザキノフサモをGorham20倍希釈培地^{22, 24)}において、温度25℃、3000luxの条件下で100g-wet・l⁻¹にて3日間静置培養した²²⁾。次に、培養液をメンブレンフィルター(アドバンテック、0.2 μm)を用いて濾過した後、濾液を以下の様に分画した (Fig. 1)。

- ①ホザキノフサモの培養液をpH7とする
- ②クロロホルムを用いて抽出(有機相(d): 塩基性画分)
- ③水相(a)はpH3とする
- ④クロロホルムを用いて抽出(有機相(c): 酸性画分)
- ⑤水相(b)は水溶性画分とする

既往の研究によって、藻類の増殖を阻害する生理活性物質として水生植物より抽出されたODTAなどの不飽和脂肪酸^{16, 17, 20)}は酸性画分、 α -asarone²⁰⁾等の極性の低い物質は塩基性画分に、gallic acidやellagic acidといったポリフェノール化合物^{15, 18)}等の高極性の化合物は水溶性画分に含まれる可能性が高い²⁵⁾。

2. 2. 2 分子量分画

各画分の *M. aeruginosa* に対する増殖抑制効果を評価した結果、水溶性画分に顕著な増殖抑制効果が認められた為、この画分を分子量に基づいて更に分画した。

まず、2.2.1で述べた方法と同様にしてホザキノフサモ培養液を作成し、水溶性画分を得た。次に、水溶性画分中の微量のクロロホルムを40℃の減圧濃縮によって除去し、限外濾過膜(日本ミリポア、排除限界分子量1000)を用いて限外濾過した。更に、濾液を凍結乾燥させた後、

残渣をメタノールに溶解させ、2.2.3(b)にて述べた方法に従って *M. aeruginosa* に対する増殖抑制効果を評価した。

2. 2. 3 各画分のバイオアッセイ

(a) 酸性画分及び塩基性画分

40℃にて減圧濃縮してクロロホルムを除去し、残渣をメタノールに溶解させて濃縮液を得た。これを滅菌済みメンブレンフィルター(日本ミリポア、0.22 μm)を用いて濾過し、滅菌した培地100mlに添加して *M. aeruginosa* を植種、培養した。なお対照系には、濃縮液と等量のメタノールを添加した。

(b) 水溶性画分

40℃にて減圧濃縮して水溶液中の微量のクロロホルムを除去後、水溶性画分を凍結乾燥させた。残渣をメタノールを用いて溶解させた後、これを滅菌済みメンブレンフィルター(0.22 μm)を用いて濾過し、濾液を滅菌した培地100mlに添加して *M. aeruginosa* を植種、培養した。なお、水溶性画分にはpH調整由来のCl⁻も含まれており、メタノールだけではなくCl⁻による *M. aeruginosa* の増殖に対する阻害も考えられた。従って、濃縮液に含まれるCl⁻をイオンクロマトグラフィー(横河アナリティカルシステムズ、IC-7000、カラムICS-A23)によって定量し、添加液と等量のメタノール及びCl⁻(NaClとして)を対照系に添加した。

2. 3 アレロパシー物質の検索

分子量1000以下とした水溶性画分に顕著な増殖抑制効果が認められた為、この画分を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いて分析し、保持時間の比較及びスパイクテストによりアレロパシー物質を同定した。HPLC分析は、リン酸を使用した逆相系²⁶⁾にて行い、検出器としてUV検出器及び電気化学検出器(ECD)を使用した。これらは、分析対象とする物質によって使い分けることとした。分析条件の詳細はTable 5-1に示した通りである。

2. 4 アレロパシー物質の増殖抑制効果の評価

同定したアレロパシー物質の標品の所定量をメタノールに溶解させ、これを滅菌済みのメンブレンフィルター(0.22 μm)を用いて濾過し、濾液を予め滅菌した培地100mlに添加した。添加後、直ちに *M. aeruginosa* を植種、培養した。

Table 1 Condition for HPLC analysis.

HPLC system	HP 1100 (Hewlett Packard)
Detector*	Electrochemical detector (ECD) GP 1049A, (Hewlett Packard)
Column	TSK-gel ODS 80 Ts (Toso, Size; 250[mm]×I.D.4.6[mm])
Eluent ²⁶⁾	0.025[%] Phosphoric acid in water (A) 0.025[%] Phosphoric acid in methanol (B)
Gradient elution	0[%] B gradually increased to 19.8[%] at 55[min], to 47.8[%] at 90[min]
Flow rate	1.0[ml·min ⁻¹]
Injection volume	100[μl]
Temperature	35[°C]
ECD condition	Mode: Amperometry Working electrode: Glassy carbon Potential: 0.9[V]-vs. Ag/AgCl

*ECD-detector was substituted by UV detector (240[nm]) for arubitin and p-coumaric p-hydroxy benzoic, quinic, shikimic acids analysis.

3. 結果及び考察

3. 1 培養液の分画

まず、各画分の増殖抑制効果を定性的に把握する為、ホザキノフサモ100g-wet・l⁻¹培養液500ml (ホザキノフサモ50g-wet 相当分) を分画試験に供試した。この時のホザキノフサモ換算濃度は500g-wet・l⁻¹となった。また、各画分の添加に使用したメタノールは培地100mlあたり1mlであり、水溶性画分の添加によって培地中のCl⁻濃度は、約78mg・l⁻¹となった。各画分添加時の *M. aeruginosa* の増殖曲線を Fig. 2 に示す。

酸性画分を加えた場合、増殖の遅れが認められたのみであったのに対し、水溶性画分を添加した場合には顕著な増殖抑制効果が得られた。一方、対照系実験より、メタノール (Cont-methanol) やメタノールとCl⁻ (Cont-methanol, Cl⁻) の添加による *M. aeruginosa* の最大増殖量への若干の影響が認められた。従って、酸性及び塩基性画分の *M. aeruginosa* の最大増殖量に対する抑制効果は、メタノールを添加した対照系の最大増殖量を基準とし、水溶性画分の増殖抑制効果はメタノール及びCl⁻を添加した対照系の最大増殖量を基準として評価した。Fig. 3 に各画分の *M. aeruginosa* の最大増殖量に対する増殖抑制効果を示した。

ホザキノフサモ500g-wet・l⁻¹相当分の水溶性画分の *M. aeruginosa* に対する増殖抑制効果は顕著であるのに対し、酸性画分や塩基性画分の増殖抑制効果は認められなかつ

た。この結果より、ホザキノフサモのアレロパシーの要因となる物質は水溶性画分に含まれることが確認された。

また、筆者らは、これまでにホザキノフサモ植物体にメタノール抽出操作を施し、得られた抽出物を5つの画分 (Fraction A~E) に分画して増殖抑制効果を評価した。この結果、最も高極性である Fraction A (水溶性画分) 及び最も極性が低い Fraction E が *M. aeruginosa* に対して、顕著な増殖抑制効果を示すことを明らかにした¹³⁾。また、これらの画分中に含まれる生理活性物質がホザキノフサモから放出されたと仮定すると、この時の分画方法より、Fraction A 中の生理活性物質は本実験での水溶性画分に、また Fraction E 中の物質は本実験の塩基性画分に含まれることとなる。しかしながら、塩基性画分に増殖抑制効果が認められなかったことから、ホザキノフサモのメタノール抽出物の Fraction E に含まれる低極性の生理活性物質の放出によるアレロパシー効果はないことが示された。

また、筆者らが行ったホザキノフサモの培養液の *M. aeruginosa* に対する増殖抑制効果の評価からは、ホザキノフサモ培養液100g-wet・l⁻¹を *M. aeruginosa* の培養開始時のみ添加する場合、増殖抑制効果は認められないことが示されており²²⁾、100g-wet・l⁻¹相当分の水溶性画分には *M. aeruginosa* に対する増殖抑制効果は認められないはずであった。また、仮に100g-wet・l⁻¹相当分の水溶性画分に抑制効果が確認された場合、分画操作による増殖抑制効果への影響が明らかであると判断されることと

Fig. 2 Growth curve of *M. aeruginosa* as affected by each fraction of the culture solution of *M. spicatum*.

Symbols: ○, Control; ▲, Control-methanol; □, Control-methanol-Cl⁻; ●, Acidic fraction; △, Water-soluble fraction; ■, Basic fraction

Fig. 3 Inhibitory effects of each fraction of the culture solution of *M. aeruginosa*.

なる。

従って、この仮定を検証すると共に、アレロパシー物質の分子量に検討を加える為、限外濾過前後の水溶性画分の増殖抑制効果を量的に評価した。Fig. 4に限外濾過前後の *M. aeruginosa* の最大増殖量に対する抑制効果と水溶性画分の添加量との関係を示した。

100g-wet $\cdot$ l $^{-1}$ 相当分の水溶性画分を添加しても増殖抑制効果は認められなかったが、150g-wet $\cdot$ l $^{-1}$ 相当分の水溶性画分を添加すると、顕著な増殖抑制効果が確認された。また、排除限界分子量1000の限外濾過膜を使用して水溶性画分を限外濾過しても、増殖抑制効果に差異は認められなかった。従って、水溶性画分の増殖抑制効果、即ちホザキノフサモのアレロパシーは分子量1000以下の物質によって引き起こされることが明らかとなった。

3. 2 アレロパシー物質の検索

Planas ら¹⁵⁾ は、ホザキノフサモ植物体の有機物量の7~30wt%がフェノール化合物であることを報告し、薄層クロマトグラフィー (TLC) によってホザキノフサモの植物体内には Table 2に示される様な gallic acid や ellagic acid といったポリフェノール化合物等が存在していることを定性的に示した (但し、これらのフェノール

ル化合物の含有量や藻類に対する増殖抑制効果は明らかにしていなかった)。

また、このようなフェノール化合物は、陸上生態系におけるアレロパシーに関与する物質として、既に総説などでも紹介されている物質であり²⁷⁻³¹⁾、物質としての新規性は乏しかった。しかしながら、フェノール化合物は、その水酸基の為水溶性が比較的高いことから、ホザキノフサモ植物体より水中へ放出されてアレロパシーに寄与している可能性は大きいと推察された。特に、gallic acid や ellagic acid 等のポリフェノール化合物はクロロホルムに不溶もしくは難溶である為、先に述べた分子量1000以下としたホザキノフサモの培養液の水溶性画分に存在している可能性が高いと考えられた。

そこで本分析では、このようなフェノール化合物をホザキノフサモのアレロパシー物質の候補として挙げ、ホザキノフサモの培養液の水溶性画分よりアレロパシー物質の検索を行った。本分析に供試したフェノール化合物は、Planas ら¹⁵⁾ が報告したフェノール化合物をはじめ、既往の研究^{15, 18, 27-32)} により明らかにされたフェノール化合物である (Table 3)。なお、Table 2¹⁵⁾ に示された tannic acid は分子量600~2000程度の化合物群を指すものである。培養液の水溶性画分の分子量分画実験にて得られた

Fig. 4 Effects of ultrafiltration on inhibitory effects of the water-soluble fraction on the maximum growth of *M. aeruginosa*.

Symbols: ○, Water-soluble fraction; ▲, Water-soluble fraction < MWCO 1000

Table 2 Major compounds identified and relative amounts.¹⁵⁾

Relative amounts	Major compounds identified
1	Ellagic acid, Gallic acid, Tannic acid, 3,5-Dimethoxy-4-Hydroxycinnamic acid
2	Protocatechuic acid, Shikimic acid
3	Caffeic acid, Cinnamic acid, Coumaric acid, Ferrulic acid, Gentisic acid, Pyrogallol, Quinic acid, Sinapic acid, Syringic acid,

Table 3 A list of phenolic compounds used for identification of allelochemicals in the water-soluble fraction of the culture solution of *M. spicatum*.

Phenolic compounds	References	Phenolic compounds	References
Ellagic acid	15, 18, 28	Quinic acid	15
Gallic acid	15, 18, 27-29, 32	Sinapic acid	15, 28
Protocatechuic acid	15, 28, 32	Syringic acid	15, 27, 28
Shikimic acid	15	Vanillic acid	27, 28, 30-32
Caffeic acid	15, 28, 29, 32	(+)-Catechin	27, 28, 30
p-Coumaric acid	15, 27-29, 31, 32	p-Hydroxy benzoic acid	27-29, 31, 32
Ferulic acid	15, 27-32	Esculetin	28, 30
Gentisic acid	15, 28, 32	Scopoletin	27, 28, 30, 31
Pyrogallic acid (Pyrogallol)	15	Arbutin	28

結果より、ホザキノフサモのアレロパシー効果の主要因となる物質の分子量は1000以下であることが明らかとなった為、検索の対象外とした。Fig. 5-a)に分子量1000以下としたホザキノフサモ培養液の水溶性画分(100g-wet $\cdot$ l⁻¹相当分)のクロマトグラムを示した。

Fig. 5-a)のクロマトグラムに示される様に、ホザキノフサモ培養液の水溶性画分中にポリフェノール化合物、pyrogallic acid (PA), gallic acid (GA), (+)-catechin (CATECH), ellagic acid (EA)を検出した。検出した化合物のそれぞれの濃度をピーク面積より求めた結果、PA: 5.2 μ g $\cdot$ l⁻¹, GA: 62.8 μ g $\cdot$ l⁻¹, CATECH: 16.6 μ g $\cdot$ l⁻¹, EA: 76.6 μ g $\cdot$ l⁻¹と微量であったが、本分析ではフェノール化合物を選択的に、かつ高感度で検出できる電気化学検出器 (ECD)³³⁾を使用した為、検出可能であった。また、この4種の物質の中では、GAやEAの濃度が他の物質より高かったが、このような傾向は Planas ら¹⁵⁾の報告 (Table 2) と一致していた。一方、UV 検出器を用いて分析した結果、Table 1にて分析対象とし

て示した化合物は検出されなかった (従って、データを記載していない)。

次に、それぞれの標品を使用してスパイクテストを行った結果を Fig. 5-b) に示した。

スパイク前後において、PA, GA, CATECH, EA としたピークの保持時間は、ほぼ同様であることが確認された。この結果より、それぞれのピークは PA, GA, CATECH, EA であると同定された。また、同様の分析を5回行ったが、いずれの場合も PA, GA, CATECH, EA は検出されていた。しかしながら、Planas ら¹⁵⁾が報告した protocatechuic, shikimic, caffeic, p-coumaric, ferrulic, gentisic, quinic, sinapic and syringic acids (Table 2) は検出されておらず、このような化合物はホザキノフサモのアレロパシーに関与していないと考えられた。

3. 3 アレロパシー物質の増殖抑制効果

ホザキノフサモ培養液の水溶性画分中の PA, GA,

Fig. 5 Chromatograms of the water-soluble fraction of the culture solution of *M. spicatum*.; (a) not spiked, (b) spiked with standard samples (PA, GA, CATECH, EA, and 6 phenolic compounds).

CATECH, EA が同定された為、これらの *M. aeruginosa* に対する増殖抑制効果を評価した。Fig. 6 に PA 添加時の *M. aeruginosa* の増殖曲線を示した。

PA は *M. aeruginosa* に対して増殖抑制効果を示した。特に、 $1.26\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ($10\text{ }\mu\text{M}$) 以上添加した場合、その抑制効果は顕著であった。この様な結果を基に、PA, GA, CATECH, EA 添加量と *M. aeruginosa* の最大増殖量に対する抑制効果の関係を求め、Fig. 7 に示した。

PA, GA, CATECH, EA は *M. aeruginosa* に対して増殖抑制効果を示し、それぞれの化合物の添加量と *M. aeruginosa* に対する抑制効果との間には用量-作用量の関係が認められた。また、各化合物が *M. aeruginosa* の最大増殖量を対照系の50%まで抑制しうる濃度 (EC_{50}) は、それぞれ $650\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ 、 $1.0\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 、 $5.5\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 、 $5.1\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ であった。PA, GA, CATECH, EA の増殖抑制効果を比較すると、PA 及び GA の抑制効果は顕著であり、特に PA については $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ オーダーでも比較的強

い増殖抑制効果が認められた。

3. 4 自動酸化物の増殖抑制効果

PA, GA 等のポリフェノール化合物は酸化され易く、水中の溶存酸素により自動酸化されることが知られている^{34, 35)}。この様な性質から、これらの化合物を *M. aeruginosa* の培地 (CB 培地²³⁾、pH 9) へ添加した場合、自動酸化されることが容易に推察された。従って、自動酸化物の *M. aeruginosa* に対する増殖抑制効果の有無を明らかにすることは重要であると考えられた。

従って、4 種の物質 (PA, GA, CATECH, EA) の中で増殖抑制効果が顕著であり、また自動酸化され易い^{34, 35)} PA と GA に注目し、自動酸化物に抑制効果が認められるのかを検討した。

実際に PA $1.2\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 、GA $1.5\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ を培地に添加して濃度の経時変化を追跡した結果、添加1時間後には、PA 及び GA が自動酸化により消失することが確認され

Fig. 6 Growth curve of *M. aeruginosa* as affected by pyrogalllic acid (PA). Symbols : ○, Control ; ▲, 0.63 [mg · l⁻¹] ; ●, 2.52 [mg · l⁻¹] ; △, 5.04 [mg · l⁻¹]

Fig. 7 Inhibitory effects of pyrogalllic acid, gallic acid, (+)-catechin and ellagic acid on the maximum growth of *M. aeruginosa*. Symbols : ○, pyrogalllic acid ; ▲, gallic acid ; □, (+)-catechin ; ●, ellagic acid. Bars indicate standard deviations (n=3).

た。そこで、PA $1.2\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 、GA $1.5\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ を各々培地に添加し、1時間放置してPA及びGAを自動酸化により消失させた後、*M. aeruginosa*を植種、培養して増殖抑制効果を評価することとした。自動酸化前後のPA $1.2\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 、GA $1.5\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ による増殖抑制効果をFig. 8及びFig. 9に示した。

PA $1.2\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 、GA $1.5\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ を自動酸化させたにもかかわらず、*M. aeruginosa*に対する増殖抑制効果を示すことが認められた。従って、PA及びGAの自動酸化物も*M. aeruginosa*に対する増殖抑制効果を有していることが確認された。

3. 5 同定したアレロパシー物質とアレロパシーとの関係

3.3にて求めたPA、GA、CATECH、EAの EC_{50} と先に述べた検出濃度とを比較すると、培養液の水溶性画分中の検出濃度の方がはるかに低く、いずれも2オーダー程度異なった。この為、PA、GA、CATECH、EAの個々の増殖抑制効果からは、これらの化合物のアレロパシーへの関与を明確に示すことはできず、PA、GA、CATECH、EA以外のアレロパシー物質が存在する可能性も考えられた。従って、PA、GA、CATECH、EAがホザキノフサ

モのアレロパシーに対し、実際にどの程度寄与するのかを明らかにする為には、PA、GA、CATECH、EAの相互作用や自動酸化物の影響も把握する必要があると考えられた。

一般に、複数の毒物（増殖抑制物質）を添加する場合、相乗的な作用によって毒性が強まる可能性も考えられ、陸上のアレロパシー物質のこのような相互作用の報告例は成書にて紹介されている²⁸⁾。

一方、先に述べた様にPA、GA等のポリフェノール化合物は酸化され易い為、ホザキノフサモ植物体よりPA、GA、CATECH、EAが放出された後、水中にて逐次的に自動酸化されていると推察された。また、水溶性画分の分析により検出した値は、ホザキノフサモの培養終了時の値である為、培養期間中（3日間）放出されたPA、GA、CATECH、EAの自動酸化物が、実際には検出値以上蓄積されているはずである。更に、PA及びGAの自動酸化物のみではあるが、3.4にてこれらの*M. aeruginosa*に対する増殖抑制効果を確認した。従って、今後、PA、GA、CATECH、EAのアレロパシーへの寄与を明らかにする為には、これらの化合物の相互作用や自動酸化物の影響も考慮することが必要と考えられた。

Fig. 8 Effects of autoxidation on the inhibitory effects of pyrogallol acid at $1.2\text{ [mg}\cdot\text{l}^{-1}]$ on the growth of *M. aeruginosa*. Symbols: ○, Control; ▲, pyrogallol acid; □, pyrogallol acid-autoxidized

Fig. 9 Effects of autoxidation on the inhibitory effects of gallic acid at 1.5 [mg·l⁻¹] on the growth of *M. aeruginosa*.

Symbols: ○, Control; ▲, gallic acid; □, gallic acid-autoxidized

4 まとめ

ホザキノフサモの高濃度培養液を分画し、顕著な増殖抑制効果を示した画分中のアレロパシー物質を検索した。同定したアレロパシー物質の増殖抑制効果を評価した結果、以下の結論が得られた。

- (1) ホザキノフサモ培養液の酸性、塩基性、水溶性画分の中で、水溶性画分のみが顕著な増殖抑制効果を示した。
- (2) 培養液の水溶性画分を分析した結果、ホザキノフサモより放出されるアレロパシー物質として、ポリフェノール化合物 pyrogalllic acid、gallic acid、(+)-catechin、ellagic acid を同定した。

しかしながら、ホザキノフサモ体内より抽出された他のフェノール化合物の放出は認められず、抽出された物質は必ずしも放出されることが示唆された。

- (3) pyrogalllic acid、gallic acid、(+)-catechin、ellagic acid は *M. aeruginosa* に対して増殖抑制効果を示した。この4種の物質の中では pyrogalllic acid 及び gallic acid の抑制効果が顕著であり、特に pyrogalllic acid は $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ オーダーでも強い増殖抑制効果を示した。

- (4) pyrogalllic acid、gallic acid、(+)-catechin、ellagic acid が *M. aeruginosa* に対して増殖抑制効果を示す濃度レベルは、培養液の水溶性画分中にて検出した各物質の濃度よりもはるかに高く、個々の物質の増殖抑制効果の評価からは、pyrogalllic acid、gallic acid、(+)-catechin、ellagic acid のホザキノフサモのアレロパシーへの寄与を明らかにできなかった。一方、pyrogalllic acid や gallic acid の自動酸化物にも増殖抑制効果が認められたことから、今後 pyrogalllic acid、gallic acid、(+)-catechin、ellagic acid のアレロパシーへの関与を明らかにするには、培養液中のこれらの自動酸化物による効果や相互作用による効果も考慮した評価が必要と考えられた。

【引用文献】

- 1) 須藤隆一、桜井敏郎、森忠洋、岡田光正編：富栄養化対策総合資料集、サイエンスフォーラム、総ページ、東京 (1983)
- 2) 村上昌弘、山口勝己：赤潮の毒性に関する研究の現状と課題、水環境学会誌、12 (12)、757-762 (1989)
- 3) 渡辺信：アオコの毒性に関する研究の現状と課題、水環境学会誌、12 (12)、750-756 (1989)
- 4) 彼谷邦光：アオコの有毒物質の毒性について、水環

- 境学会誌, 17 (9), 551-556 (1994)
- 5) 渡辺真利代、原田健一、藤木博太編：アオコ その出現と毒素、東京大学出版会、165-228、東京 (1994)
 - 6) 衛生常設調査委員会報告：水道水のかび臭の原因と対策 [1]、水道協会雑誌、532、67-90 (1984)
 - 7) Molisch, H.: Der Einfluss einer Pflanze auf die andere, Allelopathie., Fischer Jena (1937)
 - 8) 中井智司、細見正明、村上昭彦：大型水生植物のアレロパシー、用水と廃水、40 (2)、5-10 (1998)
 - 9) Harrison, P. G. and Chan, A. T.: Inhibition of the growth of micro-algae and bacteria by extracts of eelgrass (*Zostera marina*) leaves, Mar. Biol., 61, 21-26 (1980)
 - 10) Elakovich, S. D. and Wooten, J. W.: An examination of the phytotoxicity of the water shield, *Brasenia schreberi*, J. Chem. Ecol., 13 (9), 1935-1940 (1987)
 - 11) Watanuki, T., Kaise, T. and Mineo, H.: Inhibition of *Anabaena cylindrica* (Cyanophyceae) growth by extracts of water weeds, using the paper disk-agar method, Jap. J. Water Treat. Biol., 26 (1), 1-5 (1990)
 - 12) Iwona J.: The influence of macrophytes on a phytoplankton community in experimental conditions, Hydrobiologia, 306, 21-32 (1995)
 - 13) Nakai, S., Hosomi, M., Okada, M. and Murakami, A.: Control of algal growth by macrophytes and macrophyte-extracted bioactive compounds, Water Sci. & Technol., 34 (7-8), 221-235 (1996)
 - 14) Anthoni, U., Christophersen, C., Madsen, J. Ø., Wium-Andersen, S. and Jacobsen, N.: Biologically active sulphur compounds from the green alga *Chara globularis*, Phytochem., 19, 1228-1229 (1980)
 - 15) Planas, D., Sarhan, F., Dube, L., Godmaire, H. and Cadieux, C.: Ecological significance of phenolic compounds of *Myriophyllum spicatum*, Verh. Internat. Verein. Limnol., 21, 1492-1496 (1981)
 - 16) Van Aller, R. T., Pessoney, G. F., Rogers, V. A., Watkins, E. J. and Leggett, H. G.: Oxygenated fatty acids: a class of allelochemicals from aquatic plants, ACS Sym. Ser., 268, 387-400 (1985)
 - 17) Kakisawa, H., Asari, F., Kusumi, T., Toma, T., Sakurai, T., Oohusa, T., Hara, Y. and Chihara, M.: An allelopathic fatty acid from the brown alga *Cladosiphon okamuranus*, Phytochem., 27 (3), 731-735 (1988)
 - 18) Saito, K., Matsumoto, M., Sekine, T. and Murakoshi, I.: Inhibitory substances from *Myriophyllum brasiliense* on growth of blue-green algae, J. Nat. Prod., 52 (6), 1221-1226 (1989)
 - 19) Greca, M. D., Monaco, P., Previtera, L., Aliotta, G., Pinto, G. and Pollio, A.: Allelochemical activity of phenylpropanes from *Acorus gramineus*, Phytochem., 28 (9), 2319-2321 (1989)
 - 20) Aliotta, G., Monaco, P., Pinto, G., Pollio, A. and Previtera, L.: Potential allelochemicals from *Pistia stratiotes* L., J. Chem. Ecol., 17 (11), 2223-2234 (1991)
 - 21) Forsberg, C., Kleiven, S. and Wille'n, T.: Absence of allelopathic effects of *Chara* on phytoplankton in situ, Aquat. Bot., 38, 289-294 (1990)
 - 22) 中井智司、井上豊、細見正明、村上昭彦：大型水生植物のアレロパシーによる藍藻類の増殖抑制、日本水処理生物学会誌、33 (4)、215-222 (1997)
 - 23) Watanabe, M. M. and Satake, K.: NIES-Collection LIST of STRAINS Third Edition, Microalgae and Protozoa, 31-32, National Institute for Environmental Studies, Environmental Agency, Japan, (1991)
 - 24) Zehnder, A. and Gorham, P. R.: Factors influencing the growth of *Microcystis aeruginosa* KUTZ. EMEND, Can. J. Microbiol., 6, 645-660 (1960)
 - 25) 大岳望、鈴木昭憲、高橋信孝、室伏旭、米原弘：物質の単離と精製、東京大学出版会、東京 (1986)
 - 26) Zhu, J., Ng, J. and Filippich, L. J.: Detection of tannic acid and its metabolites in biological fluids by high-performance liquid chromatography, J. Chromat., 577, 77-85 (1992)
 - 27) 藤井義晴、安田環：植物間相互作用に關与する生理活性物質、ぶんせき、4、231-237 (1987)
 - 28) Rice, E. L.: Allelopathy 2nd ed., Academic Press, New York (1984)
 - 29) Williams, R. D. and Hoagland: The effects of naturally occurring phenolic compounds on seed germination, Weed Sci., 30, 206-212 (1982)
 - 30) Leather, G. R., Einhellig, F. A.: Mechanisms of allelopathic action in bioassay, ACS Symp. Ser., 287, 197-205 (1985)
 - 31) Ray, H. and Hastings, P. J.: Variation within flax (*Linum usitatissimum*) and barley (*Hordeum vulgare*) in response to allelopathic chemicals, Theor. Appl. Genet., 84, 460-465 (1992)
 - 32) Zapata, O. and McMillan: Phenolic acids in seagrasses, Aquat. Bot., 7, 307-317 (1979)
 - 33) 清水尚登、井上嘉則：固相抽出法及び高速液体クロマトグラフィーを用いたフェノール類の濃縮及び定量、BUNSEKI KAGAKU, 43, 1107-1112 (1994)
 - 34) Inescu, G. H., Matei, F. and Duca, A. L.: Kinetic aspects of the oxidation reactions of gallic acid using an oxygen-selective electrode, Revue Roumaine de Chimie, 23 (11-12), 1611-1617 (1978)
 - 35) Doona, C. J. and Kustin, K.: Kinetics and mechanism of pyrogallol autooxidation: Calibration of the dynamic response of an oxygen electrode, Int. J. Chem. Kinet., 25, 239-247 (1993)

(受付 1997. 11. 28)

(受理 1998. 6. 8)