

藍藻 *Microcystis* spp. に対するアカシア属樹木抽出物質の増殖抑制効果

殷 安斉¹⁾・李 洪武¹⁾・渡辺琴文²⁾・中村剛也²⁾・朴 虎東²⁾, 伴 修平^{3)*}

¹⁾ 海南大学海洋学院, 中国海南省海口市人民大道 58 号

²⁾ 信州大学理学部, 〒390-8621 長野県松本市旭 3-1-1

³⁾ 滋賀県立大学環境科学部, 〒522-8533 滋賀県彦根市八坂町 2500

Inhibitory effects of Acacia extract on growth of blue-green algae *Microcystis* spp.

AN-QUI YIN¹⁾, HONG-WU LEE¹⁾, KOTOMI WATANABE²⁾, KOYA NAKAMURA²⁾, HO-DONG PARK²⁾, and SYUHEI BAN^{3)*}

¹⁾ Ocean College, Hainan University, 58 Renmin Road, Haikou 570228, Hainan, P.R. China

²⁾ Faculty of Science, Shinshu University, 3-1-1 Asahi, Matsumoto, Nagano 390-8621, Japan

³⁾ University of Shiga Prefecture, School of Environmental Sciences, 2500 Hassaka-cho, Hikone, Shiga 522-8533, Japan

* Corresponding author. E-mail: ban@ses.usp.ac.jp

Abstract Effects of Acacia extract (AME) from *Acacia decurrens* Willdenow on growth of two species of cyanobacteria, *Microcystis ichthyoblabe* Kützing (M 95) and *Microcystis aeruginosa* (Kützing) Kützing (NEIS 298) were examined. AME showed an inhibitory effect on cyanobacterial growth in both species at 6 mg L⁻¹, and induced negative growth at 12 mg L⁻¹. On the contrary, there was no effect of AME on the growth of green alga, *Chlamydomonas reinhardtii* Dangeard (IAM C-9) even at 12 mg L⁻¹. Analysis using silica gel thin-layer chromatography separated four bands, band 1-4, from the AME with a mobile phase solvent (1-Butanol : Acetic acid : H₂O = 4 : 1 : 2 (v/v/v)), and band 2 induced the most inhibitory effect on both *M. ichthyoblabe* and *M. aeruginosa* growth. Liquid chromatography-mass spectrometry suggested that band 2 included gallic acid, epicatechin, and oligomer (dimer, trimer, tetramer and pentamer) catechins. These results suggested that the catechins were the main inhibitors in band 2 separated from AME on cyanobacterial growth.

Key words: Acacia extract, *Microcystis*, inhibitory effects, oligomer catechins, gallic acid

はじめに

これまでにアオコ (すなわち, 藍藻ブルーム) の抑制については, 湖水の曝気などによる物理的方法 (Visser et al. 1996), 硫酸銅などの銅イオンによる化学的方法 (Jones & Orr 1994), 溶藻菌やシアノファージなどによ

る生物的方法 (Sigeo et al. 1999) が研究され, 試みられてきた (渡辺 1994, 広石ほか 2002). しかし, アオコ除去処理時や処理後にマイクロシスチン (藍藻毒) が溶出すること, あるいは処理後の有機物が水質へ悪影響を与える等の問題があるため, 藍藻がブルームを形成する前にそれを除去する技術が期待される.

植物プランクトンブルームに対する生物的防除法とし

て、水草の出すアレロパシー物質を利用するものがある。Hogetsu et al. (1960) は、緑藻の *Chlorella* sp. をクロモ *Hydrilla verticillata* (L.f) Royle あるいはセキショウモ *Vallisneria asiatica* Miki と一緒に培養することでその増殖速度が著しく低下することを見出し、また、これら水草による植物プランクトンの増殖抑制作用が野外環境においても認められることを示唆した。

一方、さまざまな植物抽出物質が殺菌効果を示すことが知られている (例えば, Kunjal Bhatt et al. 2003, Bhardwaj & Laura 2007). 特に, アカシア属樹木 (*Acacia* spp.) は自らを病原微生物から守るために種々のアルカロイドを生産することで知られる (Fitzgerald 1964). アセンヤクノキ (*Acacia catechu* Willdenow) は植物病原体として知られている菌類胞子の発芽を阻害し (Zhang et al. 2006), *Escherichia coli* (Migula) Castellani and Chalmers O157:H7 の増殖を抑制する (Voravuthikunchai et al. 2004). *Acacia auriculiformis* Cunningham ex Bentham は真菌類の胞子発芽や細菌類の増殖に対して抑制作用を示す (Mandal et al. 2005). *Acacia karroo* Hayne と *Acacia erioloba* Meyer は植物病原微生物の増殖を抑制することが知られている (Pretorius et al. 2003). *Acacia salicina* Lindley では、豊富に含まれるタンニンが細菌の活性を抑制する働きをもつことが知られている (Getachew et al. 2000). しかし、アカシア属樹木から抽出されたような成分が、これら真菌類や細菌類の増殖抑制や発芽阻害を引き起こすのかについては不明の部分が多い。

近年、大麦の麦わらが水中で分解される際に溶出する物質によって植物プランクトンの増殖が抑制されることが明らかとなり、その主要成分は分子量 1,000~3,000 のポリフェノールと考えられた (例えば, Waybright et al. 2009). 一方, Park et al. (2009) は稲のもみ殻から抽出した β -sitosterol- β -D-glucoside と dicyclohexanyl orizane が群体性の *Microcystis aeruginosa* (Kützing) Kützing の増殖を強く阻害することを見出した。また、陸上高等植物や水草の生産するポリフェノールが藻類に対して増殖抑制効果を示すこともわかっている (Nakai et al. 1999). 特に、ピロガロール (PA), 没食子酸 (GA), カテキン (CAT), エラグ酸 (EA) は、アオコ除去への応用が期待されている天然活性物質である。PA と GA は藍藻と緑藻に強い増殖阻害効果を発揮するが、EA はある種の珪藻にも増殖抑制効果を示すことがわかっている (Nakai et al. 2000). 一方, CAT は藍藻の *M. aeruginosa* には増殖抑制効果を示すが、緑藻と珪藻には抑制効果を示さない (Nakai et al. 2000).

これら天然活性物質を用いたアオコの除去あるいは増殖抑制は、環境に対して二次汚染を起こしにくい利点があるにもかかわらず、これらを用いたアオコ除去に関する研究はそれほど多く存在しない。本研究では、天然のアカシア属樹木から抽出した物質が藍藻に対して増殖抑制効果を示すことを確かめ、その有効成分を明らかにすることを目的とした。

材料と方法

AME の藍藻および緑藻に対する増殖抑制活性の測定

実験に用いた天然アカシア抽出物質 (AME) は、粉碎したミモザアカシア (*Acacia decurrens* Willdenow) の樹皮と心材を一昼夜水道水に浸漬した後、グラスファイバーフィルター (Whatman, GF/F) にて固形物を濾別し、40°C で 24 時間乾燥させた粉末状の乾燥物として得た。実験には、藍藻 *Microcystis ichthyoblabe* Kützing (M 95: 北海道茨戸湖より分離したミクロシスチン産生株) と *Microcystis aeruginosa* (Kützing) Kützing (NIES 298), および緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* Dangeard (IAM C-9) を用いた。藍藻は MA 培地、緑藻は C 培地を用い (Kasai et al. 2004), いずれも 12L:12D (Light intensity, 100 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$), 28 \pm 1°C の条件で維持・培養した。

実験には、あらかじめ AME を所定の濃度 (最終濃度が 0, 3, 6, 12 mg L^{-1}) に調製した新しい培養液を用意した。これに対数増殖期の培養液から適量 (1~3 mL) を加え 100 mL とした。それぞれの濃度区から 10 mL ずつ 6 本の試験管に分注し、これらのうち 3 本を藻類初期濃度測定に用い、残り 3 本を 3 日間培養した。初期濃度測定用は直ちに、残り 3 本は実験終了後速やかに、それぞれの試験管ごとに試水すべてをグラスファイバーフィルター (Whatman, GF/F) にて濾過した後、このフィルターを一昼夜 90% アセトンに浸漬して植物色素を抽出した。クロロフィル *a* 量は、この抽出試料について分光蛍光光度計 (Shimadzu, RF-1500) を用いて測定した (Parsons et al. 1984). 各藻類の増殖速度 (μ) は下記の式で求めた。

$$\mu = \ln(C_t C_0^{-1}) t^{-1}$$

ここで、 C_0 と C_t はそれぞれ実験開始時および終了時におけるクロロフィル *a* 量 ($\mu\text{g L}^{-1}$) を、 t は実験期間 (日) を示す。なお、実験期間中は藻類が沈殿しないように昼夜一回ずつ試験管を振とうした。

各 AME 濃度区における種ごとの増殖速度は、平均値と標準偏差で示し、濃度区間の有意差検定は一元配置の

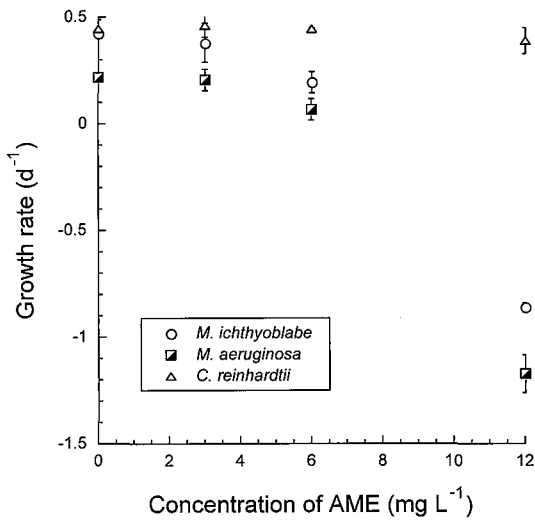


Fig. 1. Inhibitory effect of Acacia Extract (AME) from *Acacia decurrens* on growth of *Microcystis aeruginosa*, *Microcystis ichthyoblabe*, and *Chlamydomonas reinhardtii*. Symbols and vertical bars represent average and standard deviation, respectively.

分散分析 (ANOVA) にて行った。

AME からの増殖抑制物質の分画

AME からの増殖抑制物質の分離は、1-Butanol:Acetic acid:H₂O=4:1:2 (v/v/v) を展開溶媒として、薄層クロマトグラフィー (TLC, silica gel, Kieselgel 60 F 254, E. Merck) により行った。

分離された AME 各成分が藍藻の増殖に与える影響をみるため、各成分について、TLC を 1 cm 角に切り出して実験に用いた。それぞれのバンドから切り出した TLC 角片は *M. aeruginosa* を所定の密度に調整した MA 培地 10 mL に別々に入れた。これらの他に AME およびその分離成分が存在しない部分の薄層プレート角片を加えたものを対照区、何も加えないものを空白とした。3 日間培養し、上記と同様に処理区ごとに μ を算出した。これとは別に、バンド 1 と 2 については *M. ichthyoblabe* でも同様の実験を行った。*M. aeruginosa* の実験は 1 連で、*M. ichthyoblabe* は 3 連でそれぞれ行った。*M. ichthyoblabe* を用いた実験では、結果は平均値と標準偏差で表し、対照区との差の有意差検定には *t* 検定を用いた。

藍藻増殖抑制物質の同定

AME の有効成分を同定するために、TLC で分離した画分、バンド 2 (Fig. 2) を剥ぎ取り、100%メタノール (10 mL) で溶出した。その溶出試料を 2 本のシリカゲルカラム (Waters, 2 g, Milford) に付加し、それぞれを

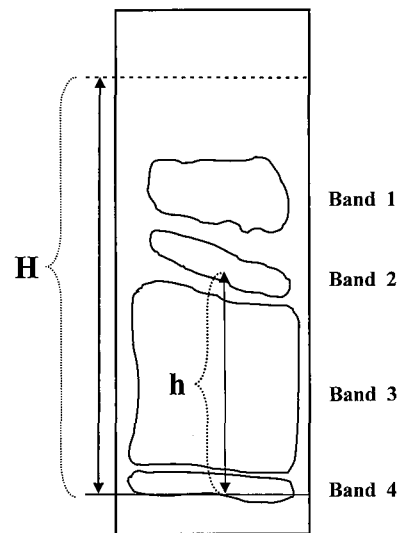


Fig. 2. Thin-layer chromatography (TLC) of AME. The chromatogram was viewed under UV light. TLC plate, silica gel (Kieselgel 60 F254, E. Merck); mobile phase, 1-Butanol:Acetic acid:H₂O (4:1:2 v/v/v); detection, UV (wave length, 365 nm). H and h represent height of mobile phase solvent and that of each band, respectively. R_f was calculated as h/H.

100%メタノール (20 mL) または 70%メタノール (20 mL) で溶離した。溶離された画分をそれぞれ Platform-LC 高速液体クロマトグラフ質量分析計 (Micromass, Cheshire, UK) にて分析した。高速液体クロマトグラフィー (HPLC) のカラムには Mightysil RP-18MS 150-4.6 (粒子サイズは 5 μ m) を使用し、移動相 A に 0.01% TFA solution, 移動相 B にアセトニトリルを用いた直線勾配 (Gradient; 0 min A 70%, 15 min A 60%, 15.1 min A 0%) により溶出した。流速は 0.2 mL min⁻¹, 試料注入量は 5 μ L とした。イオン源は ESI (electro-spray ionization) を使用し、ESI ポジティブ・ネガティブイオンモードで *m/z*=50-1500 までスキャンを行った。I Spray voltage は 5 kV で、Capillary 温度は 275°C である。

結 果

AME の藍藻および緑藻に対する増殖抑制活性

2 種の藍藻 *Microcystis ichthyoblabe* Kützing と *Microcystis aeruginosa* (Kützing) Kützing の増殖速度は、AME 濃度の増加に伴って減少し、いずれの種でも 6 mg L⁻¹ で半減した (Fig. 1)。また、12 mg L⁻¹ では負の値となり、AME が殺藻効果を示すことがわかった。ANOVA の結果は、この増殖速度の減少が統計的に有意であることを示した (*M. ichthyoblabe*; *df*=3, 8, *F*=380.4, *p*<0.001, *M. aeruginosa*; *df*=3, 8, *F*=419.3,

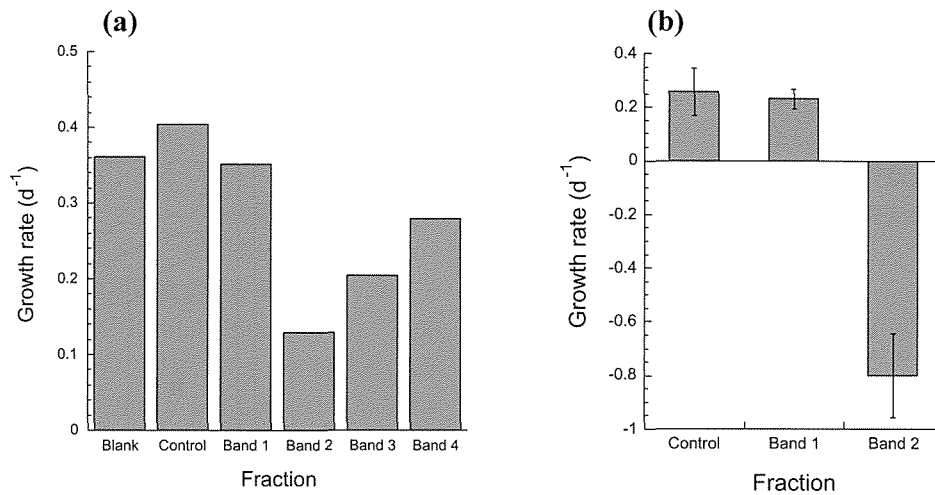


Fig. 3. (a) Inhibitory effects of the four bands separated from AME with a TLC on growth of *Microcystis aeruginosa*, and (b) those of the band 1 and 2 on growth of *Microcystis ichthyoblabe*. Control and blank in left panel (a) indicate addition of a portion of TLC excluding the four bands and no addition of any materials, respectively. Column and vertical bars in right panel (b) represent average and standard deviation, respectively.

$p < 0.001$). これに対して、緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* Dangeard の増殖速度は、 12 mg L^{-1} まで濃度による有意な増殖抑制は認められなかった (ANOVA: $df=3, 8, F=1.463, p=0.296$) (Fig. 1).

AME 増殖抑制物質の分画

TLC によって AME は 4 つの成分に分けられ、上から順にバンド 1 からバンド 4 と名前を付けた (Fig. 2). 各成分は UV 照射 (波長, 365 nm) で比較的良好に発光した. バンド 1 から 4 の Rf 値はそれぞれ 0.720, 0.551, 0.254, 0.02 であった.

分離された AME の 4 つの成分がそれぞれ *M. aeruginosa* に与える影響を調べたところ、バンド 2 で最も強い増殖抑制効果が認められた (Fig. 3a). また、*M. ichthyoblabe* については、Fig. 3b に示すとおり、バンド 1 に対する増殖速度は対照区のそれとの間に有意差は認められなかったが (t -test, $t=0.45, p>0.05$), バンド 2 では対照区に比べて明らかに低く (t -test, $t=10.3, p<0.001$), 負の値を示し殺藻効果が認められた. そこで、以下の分析はこのバンド 2 について行った.

藍藻増殖抑制物質の同定

AME から TLC にて分離されたバンド 2 は、100% メタノールで抽出し、シリカゲルカラムにて精製した後、液体クロマトグラフ/質量分析計 (LC/MS) にて定性分析を行った. バンド 2 から得た 100% メタノール溶出画分の全イオンクロマトグラムを Fig. 4a に示した. 全てのピークに関してマススペクトルを調べたが、保持時間が 2.11

min のマススペクトルからのみ、没食子酸 (GA, プロトン化分子 $[M+H]^+$ 量 $m/z=171.16$), エピカテキン (EC, プロトン化分子 $[M+H]^+$ 量 $m/z=291.20$), カテキン (CAT) 2 量体 (プロトン化分子 $[M+H]^+$ 量 $m/z=579.25$), CAT 3 量体 (プロトン化分子 $[M+H]^+$ 量 $m/z=867.17$), CAT 4 量体 (プロトン化分子 $[M+H]^+$ 量 $m/z=1156.07$), CAT 5 量体 (プロトン化分子 $[M+H]^+$ 量 $m/z=1444.15$) に相当するプリカーサイオンを検出することができた (Fig. 4b). 一方、データは示さなかったが、70% メタノール溶出画分からは EC のみが検出された.

考 察

本研究によって、ミモザアカシア (*Acacia decurrens* Willdenow) 由来の天然物質 (AME) が、藍藻 *Microcystis aeruginosa* (Kützing) Kützing と *Microcystis ichthyoblabe* Kützing に対して 6 mg L^{-1} までは増殖抑制効果を、そして 12 mg L^{-1} では殺藻効果を示すことが明らかになった. そして、分離された増殖抑制物質画分 (バンド 2) が *M. aeruginosa* に対して最も強い増殖抑制効果あるいは殺藻効果を示した. このバンド 2 は、没食子酸 (GA) と 6 種のカテキン類、即ち、エピカテキン (EC), カテキン (CAT) 2 量体, CAT 3 量体, CAT 4 量体, および CAT 5 量体を含んでいると推測された.

Nakai et al. (2000) は、沈水植物であるホザキノフサモ *Myriophyllum spicatum* Linnaeus が 4 種のポリフェノール化合物、即ち、GA と CAT に加え、ピロガロール (PA) とエラグ酸 (EA) を生産・放出することを見つけて

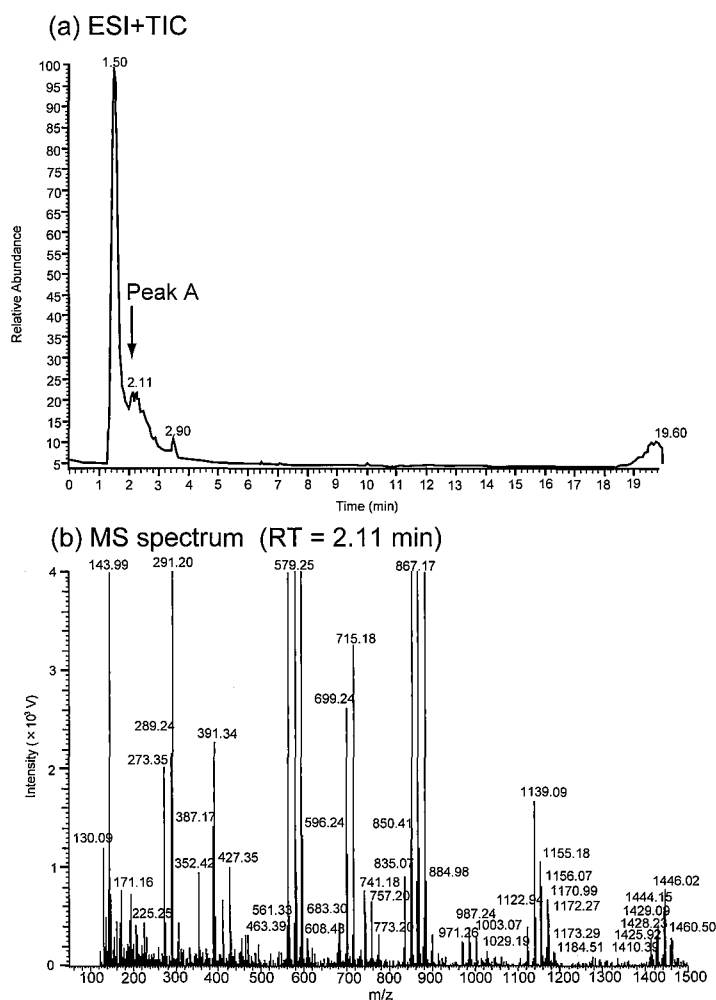


Fig. 4. (a) Total ion chromatogram of the extract from the band 2 of AME with 100% methanol, and (b) electrospray ionization mass spectra of the peak A at 2.11 min with that of gallic acid ($[M+H]^+$ 171.16 m/z), epicatechin ($[M+H]^+$ 291.20 m/z), catechin dimer ($[M+H]^+$ 579.25 m/z), catechin trimer ($[M+H]^+$ 867.17 m/z), catechin tetramer ($[M+H]^+$ 1156.07 m/z) and catechin pentamer ($[M+H]^+$ 1444.15 m/z). Signal intensity is plotted as function of mass/charge ratios (m/z).

いる。そして、*M. spicatum* からこれら 4 種のポリフェノール化合物を抽出し、植物プランクトンの増殖に与える影響を調べ、PA, GA および CAT が *M. aeruginosa* と *Phormidium tenue* (Meneghini) Gomont に対して強い増殖抑制効果を示すことを明らかにした。このとき、*M. aeruginosa* に対する増殖抑制効果は GA で最も高く、 EC_{50} (対照区の 50% まで抑制しうる濃度) は 1.0 mg L^{-1} であった。また、これら 4 種のポリフェノールを同時に曝露することで、より強い増殖抑制作用が認められた。EC の藻類増殖抑制効果に関する知見は今のところないが、CAT と同程度と推測されている (朴, 私信)。本研究でも、AME が藍藻に対して示した増殖抑制効果は、その有効成分と考えられる CAT とその多量体が、GA やその他ポリフェノールとの複合作用によっ

て、相乗的に作用した結果なのかもしれない。

Körner & Nicklish (2002) は、より野外環境に近い条件下で *M. spicatum* のアレロパシー物質が植物プランクトンの増殖抑制作用を示すか確かめるため、種々の藻類 (藍藻 *Aphanizomenon flos-aquae* Ralfs ex Bornet & Flahault, *M. aeruginosa*, *Planktothrix agardhii* (Gomont) Anagnostidis & Komárek, *Limnothrix redekei* (Van Goor) Meffert, 緑藻 *Scenedesmus armatus* (Chodat) Chodat, そして珪藻 *Stephanodiscus minutulus* (Kützting) Cleve & Möller) を分子量 1,000 以下の物質のみ通過できる浸透膜にて隔離し、さまざまな生物量の *M. spicatum* に曝露した。その結果、植物プランクトンの増殖は、いずれの種においても、*M. spicatum* 生物量の増加に伴ってその増殖が抑制された。このことは、植

物プランクトンが自然環境中でも *M. spicatum* の生産するポリフェノールによるアレロパシー作用を受けている可能性を示唆した。

一方, AME は緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* Dangeard の増殖に対しては負の影響を示さなかった。これまでの報告によると, 珪藻 *Achnanthes minutissima* Kützing と *Nitzschia palea* (Kützing) Smith に対しては PA, GA, EA および CAT 等のポリフェノール化合物は何の影響も与えず, 緑藻 *Selenastrum capricornutum* Printz に対しては, PA, GA および EA が増殖阻害効果を示すものの, CAT は増殖阻害を示さないことが明らかにされている (Nakai et al. 2000)。AME が *C. reinhardtii* に対して負の影響を与えなかったのは, CAT が主成分であったためかもしれない。いずれにしても AME が藍藻の生理過程にどのように作用するのかについては, まだよくわからない。しかし, 増殖抑制物質 (特にカテキン類) を精製することによって, より少量でアオコ除去を実現することが期待できる。今後は, AME から増殖抑制物質をより安価で効率よく精製する技術が確立することが重要である。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり実験に終始多大なご協力いただいた滋賀県立大学環境科学部の皆様に心より厚くお礼申し上げます。滋賀県立大学環境科学部大田啓一教授 (当時) には AME からの藍藻増殖抑制物質の抽出方法に関してご教授いただいた。また, お二人の査読者の方々には大変有意義なご意見を頂戴した。記して感謝の意を表します。本研究の一部は, 日本学術振興会の外国人招へい研究者事業 (L06713) の援助によって行われた。

引用文献

- Bhardwaj, S.K. & J.S. Laura 2007. Antibacterial properties of some plant extracts against plant pathogenic bacteria *Rathyibacter tritici*. *Biosci. Biotechnol. Res. Asia* 4: 693-698.
- Fitzgerald, J. S. 1964. Alkaloids of the Australian leguminosae. *Aust. J. Chem.* 17: 160-162.
- Getachew, G., H. P. Makkar & K. Becker 2000. Tannins in tropical browses: effects on in vitro microbial fermentation and microbial protein synthesis in media containing different amounts of nitrogen. *J. Agric. Food Chem.* 48: 3581-3588.
- 広石伸互・今井一郎・石丸 隆 2002. 有害・有毒藻類ブルームの予防と駆除. 恒星社厚生閣. 東京, 150 pp.
- Hogetsu, K, Y. Okanishi & H. Sugawara 1960. Studies on the antagonistic relationship between phytoplankton and rooted aquatic plants. *Jpn J. Limnol.* 21: 124-130. (In Japanese with English summary).
- Jones, G. J. & P. T. Orr 1994. Release and degradation of microcystin following algicide treatment of a *Microcystis aeruginosa* bloom in a recreational lake, as determined by HPLC and protein phosphatase inhibition assay. *Water Res.* 28: 871-876.
- Kasai, F., M. Kawachi, M. Erata & M. M. Watanabe 2004. NIES-Collection List of Strains. 7th edition. Microalgae and Protozoa. *Res. Rep. NIES* 182: 1-257.
- Körner, S. & A. Nicklish 2002. Allelopathic growth inhibition of selected phytoplankton species by submerged macrophytes. *J. Phycol.* 38: 862-871.
- Kunjai Bhatt, R., S. J. Gokani, B. Snehal Bagatharia & S. Vrinda Thaker 2003. Antimicrobial activity of some medicinal plants: Comparison of methods employed and plants studied. *Asian J. Microbiol. Biotechnol. Environ. Sci.* 5: 455-462.
- Mandal, P., S. P. Sinha Babu & N. C. Mandal 2005. Antimicrobial activity of saponins from *Acacia auriculiformis*. *Fitoterapia* 76: 462-465.
- Nakai, S., Y. Inoue, M. Hosomi & A. Murakami 1999. Growth inhibition of blue-green algae by allelopathic effects of macrophytes. *Wat. Sci. Tech.* 39: 47-53.
- Nakai, S., Y. Inoue, M. Hosomi & A. Murakami 2000. *Myriophyllum spicatum*-released allelopathic polyphenols inhibiting growth of blue-green algae *Microcystis aeruginosa*. *Water Res.* 34: 3026-3032.
- Park, M.-H., I.-M. Chung, A. Ahmad, B.-H. Kim & S.-J. Hwang 2009. Growth inhibition of unicellular and colonial *Microcystis* strains (Cyanophyceae) by compounds isolated from rice (*Oryza sativa*) hulls. *Aquat. Bot.* 90: 309-314.
- Parsons, T. R., Y. Maita & C. M. Lalli 1984. A manual of chemical and biological methods for seawater analysis. Pergamon Press. Oxford, 173 pp.
- Pretorius, J. C., S. Magama & P. C. Zietsman 2003. Growth inhibition of plant pathogenic bacteria and fungi by extracts from selected South African plant species. *South African J. Bot.* 69: 186-192.
- Sigee, D. C., R. Glenn, M.J. Andrews, E. G. Bellinger, R. D. Butler, H. A. S. Epton & R. D. Hendry 1990. Biological control of cyanobacteria: principles and possibilities. *Hydrobiologia* 395/396: 161-172.
- Visser, P. M., L. Massaut, J. Huisman & L. R. Mur 1996. Sedimentation losses of *Scenedesmus* in relation to mixing depth. *Arch. Hydrobiol.* 136: 289-308.
- Voravuthikunchai, S., A. Lortheeranuwat, W. Jeeju, T. Sririrak, S. Phongpaichit & T. Supawita 2004. Effective medicinal plants against enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J. Ethnopharmacol.* 94: 49-54.
- 渡辺真利代 1994. “第3章 有毒藍藻の出現” アオコその出現と毒素— (渡辺真利代・原田健一・藤本博太編), pp. 55-73. 東京大学出版会. 東京.
- Waybright, T. J., D. E. Terlizzi & M. D. Ferrier 2009. Chemical characterization of the aqueous algistatic fraction of barley straw (*Hordeum vulgare*) inhibiting *Microcystis aeruginosa*. *J. Appl. Phycol.* 21: 333-340.
- Zhang, S., B. Zhou, L. Zhang & Y. Fu 2006. Inhibitory effects of natural plant extracts on *Verticillium albo-atrum*. *Chin. J. Appl. Ecol.* 17: 1137-1140.