

河川教育のためのリービッヒの最少律とその教材化

— 高等学校生物におけるリービッヒの最少律の扱い —

橘 淳治 (神戸学院大学) ・ 三浦靖弘 (府立今宮高等学校) +
寺岡正裕 (大阪教公)

摘 要

ドイツの化学者ユストゥス・フォン・リービッヒが提唱したリービッヒの最少律は、植物の成長が最も不足している栄養素によって制限されるという法則として植物生理学の分野では有名なものである。高等学校の理科(生物)においては、生物の環境応答や生態と環境の単元で、教材の一つとして使われることが多い。そこで、藻類の増殖を利用することにより、培養操作の簡略化、処理の定量化などが容易となった。また、実際にいくつかの水域について、藻類を用いた栄養塩類等の添加実験を行い、機器類を用いた定量化に加え、河川教育のための視覚化を意図した教材の開発も行った。

キーワード: リービッヒの最少律, 栄養塩類添加, 河川教育

1. はじめに

高校学習指導要領(理科編)では、生物の環境応答の「植物の環境応答」や生態と環境の「生態系の物質生産と物質循環」の単元で、リービッヒの最少律が背景知識として活用されている。

リービッヒの最少律(Law of the Minimum)は、ドイツの化学者ユストゥス・フォン・リービッヒが提唱した、「植物の成長は、必要な栄養素のうち最も不足しているものによって制限される」という法則である。

高等学校の生物では、①制限要因の理解: 生物の生育における環境要因(光、温度、水、養分など)の相互作用を考える際の基礎となるほか、②資源管理の視点: 限られた資源の中で、どこに重点を置くべきかを判断する力を育てる教材にもなります。さらに、③探究活動への応用: 地域の土壌や水質を調べ、どの要素が制限要因になっているかを分析する活動に展開できるものと考えらる。

さらに高等学校の生物実験では、植物の成長が、最も不足している栄養素によって制限されることを確認するものとして、アサガオ、レタス、インゲン豆などの発芽しやすい種子を水耕栽培する際、①コントロールとして肥料(栄養塩)を加えないグループ、②完全な肥料(窒素、リン、

カリウムを加えたグループ、③窒素欠乏グループ、④リン酸欠乏グループ、⑤カリウム欠乏グループ、その他のグループに分けて、同じ環境(光・温度)で育て、成長の様子(高さ・葉の色・枚数など)を記録、2~3週間後、各群の成長差を比較・検討している。

しかしながら、陸上植物を使って、これらを生徒実習を行うと、かなり大規模なものになるほか、植物の種子には発芽・初期の成長に必要な養分が蓄えられているため、はっきりとした結果が得られないのが実情で、実際にリービッヒの最少律に関する実験を行っている学校は少ないと思われる。

そこで、学校での実験の実施を意図して、①河川・湖沼水、②窒素のみ添加した培地、③リンのみ添加した培地、④窒素とリンを添加した培地、⑤その他、ビタミン、ミネラルなど成長因子を調べたい物質を添加した培地を、同じ環境(光・温度)で育て、増殖の様子(藻類の増殖による濁り)を記録、数日~2週間後、各群の増殖差を比較する実験をデザインした。

2. 方法

(1) 試料水の処理

河川や湖沼で採水した試水から、その水域に生息する生物を取り除くために、200mL の三角フラスコに試水 100mL を入れて、アルミホイルでふたをしてオートクレーブ（無い場合は、蒸し器）で 30 分～60 分程度、滅菌する。

なお、極端に汚濁した水域の試水の場合は、濁りが後の A G P 試験（藻類生産潜在力試験）の際に障害となるので、滅菌した試水から懸濁物を取り除くために、Whatman GF/C または Whatman GF/F グラスファイバーフィルターでろ過をして、その試水を A G P 試験用の試水とする。

(2) 添加用栄養塩類等の調整

①窒素添加用溶液

330.35mg の硫酸アンモニウム、501mg の硝酸カリウムと 300.3mg の尿素をそれぞれ秤量し、1000mL のメスフラスコに少量の蒸留水を加えて順に 2 種類の試薬を溶解し、その後、蒸留水をさらに加えて正確に 1000mL とする。

この溶液は、20mg-at. N/L となる。

②リン添加用溶液

1.36g のリン酸二水素カリウムを秤量し、1000mL のメスフラスコに少量の蒸留水を加えて溶解し、その後、蒸留水をさらに加えて正確に 1000mL とする。

この溶液は、10mg-at. P/L となる。

③P IV 金属溶液

100mg の $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 19.6mg の $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 3.6mg の $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 1.04mg の ZnCl_2 , 0.4mg の $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ および 0.25mg の $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ をそれぞれ秤量し、1000mL のメスフラスコに少量の蒸留水を加えて順に 2 種類の試薬を溶解し、その後、蒸留水をさらに加えて正確に 1000mL とする。

この溶液を P IV 金属溶液とする。

④ビタミン溶液

0.1mg の Vitamin B12 , 0.1mg の Biotin および 10mg の Thiamine HCl をそれぞれ秤量し、1000mL のメスフラスコに少量の蒸留水を加えて順に 2 種類の試薬を溶解し、その後、蒸留水をさらに加えて正確に 1000mL とする。

これを添加用ビタミン混液とする。

(3) 栄養塩添加

(1) で処理した A G P 試験用試水に対して、コントロールを含めて 5 本一組で栄養塩添加を行う。

①Control として、A G P 試験用試水 100mL を入れた三角フラスコを 5 個。

②窒素添加として、A G P 試験用試水 100mL を入れた三角フラスコを 5 個に対して、それぞれ、窒素添加溶液を 0.1mL ずつ添加する。

③リン添加として、A G P 試験用試水 100mL を入れた三角フラスコを 5 個に対して、それぞれ、リン添加溶液を 0.1mL ずつ添加する。

④窒素とリン添加として、A G P 試験用試水 100mL を入れた三角フラスコを 5 個に対して、それぞれ、窒素添加溶液を 0.1mL とリン添加溶液 0.1mL ずつ添加する。

⑤金属添加として、A G P 試験用試水 100mL を入れた三角フラスコを 5 個に対して、それぞれ、P IV 金属溶液を 0.1mL ずつ添加する。

⑥ビタミン添加として、A G P 試験用試水 100mL を入れた三角フラスコを 5 個に対して、それぞれ、ビタミン混液を 0.1mL ずつ添加する。

①～⑥において、合計 30 個の栄養塩類添加用三角フラスコが準備できる。

(4) A G P 試験用藻類の接種

A G P 試験に用いる藻類としては、緑藻類の *Scenedesmus capricornutum* Prints が標準種として最もふさわしいが、②ラン藻類の *Microcystis aeruginosa* Kutz が準標準種として、ラン藻類の *Anabaena flos-aquae* De Brebisson が準標準種としてあるのでこれを使っても構わない。これ以外に入手が容易な、緑藻類の *Chlorella* sp や、緑藻類の *Scenedesmus acuminatus* も教育用実験としては使うことができる。

AGP 試験を行う際、前培養の藻類をそのまま接種すると、培地も AGP 試験用の試水に混入する。そのため、前培養した藻類をメスシリンダー等に入れてしばらく静置し、藻類を沈殿させ、上澄

みをできるだけ捨てる。そこに、滅菌湖水（滅菌水道水）を入れて攪拌し、その後、静置して上澄みを捨てる。

これで、培地の混入はある程度防ぐことができる。

これらの藻類をクロロフィル a 現存量として $50 \mu\text{g-chl. a/L}$ 程度（見た目が青汁ぐらい）になるまで培養したものを、 $1000 \sim 10000$ 細胞/mL 程度を接種するのが標準であるが、簡易的には、1 滴ずつ 100mL の試水の入った A G P 試験用試水の入った三角フラスコに対して、1 ～ 2 滴ずつ接種（添加）しても構わない。

(5) 培養操作

$20^{\circ}\text{C} \sim 25^{\circ}\text{C}$ 程度、 4000Lux 程度にて 1 ～ 2 週間程度培養し、増殖が定常値になったときに培養を終了するのが常法であるが、直射日光の当たらない窓ぎわに置いて培養し、2 ～ 3 週間程度増殖が止まって定常値になった段階で培養操作を終了するとよい。

3. 添加効果の判定

(1) クロロフィル a 量

① 培養操作を行った三角フラスコに入っている藻類（100mL）をワットマン社製グラスファイバーフィルター（GF/F）で吸引濾過し、ろ紙を冷凍保存する。

② ろ紙を 90% N,N-ジメチルホルムアミド（または、アセトンかエタノール）を加えながら乳鉢ですりつぶし、全量を 15mL 程度にして遠沈管に入れ、上澄み液から濁りがなくなるまで遠心分離する（簡易的に抽出のみで行う方法あり）。

③ 上澄み液を 1 ～ 5cm 長の分光光度計用のセルに入れ、630nm, 645nm, 663nm, 665nm, 750nm の波長にて吸光度を測定する（クロロフィル測定のため）。

④ さらに、希塩酸を上澄み液 5mL 当り 1 滴の割合で加え、665nm, 750nm の波長にて吸光度を測定する（フェオフィチン測定のため）。

⑤ 次の式によりクロロフィル a 量を求める。

$$\text{クロロフィル a } (\mu\text{g/l}) = (11.64E_{663} - 2.16E_{645} + 0.10E_{630}) \cdot v \cdot V^{-1} \cdot l^{-1}$$

ただし、E はその波長での吸光度から 750nm の波長での吸光度を差引いたもの。また、 E_{665}

a は、希塩酸を加え同様にしたもの。v は上澄み液の体積（mL）、V は試水の濾過量（l）、l は分光光度計のセルの長さ（cm）

(2) 濁度法

① 培養操作を行った三角フラスコに入っている藻類をよく攪拌して、1cm 光路長（増殖が悪い場合は 5cm 光路長）の分光光度計用セルに入れる。

② 660nm の吸光度を測定する。

③ なお、濁度の定量を行う場合は、精製カオリン 1mg を蒸留水に入れて懸濁させ、全量を 1000mL にしたものが濁度 1 度（1ppm）となるため、これを標準溶液として比較するとよい。

4. 結果

2025 年 7 月 25 日～31 日にかけて高校の教員が手分けを行い、琵琶湖淀川水系および大和川水系の河川に出かけ、31 地点で採水を行い、試水を冷蔵保存して持ち帰り、その試水について全リン、全窒素を含む栄養塩類の定量を行った。

その際、長浜市南浜町付近の琵琶湖、寝屋川市田野の淀川新橋付近の淀川、堺市堺区浅香山付近の大和川ほか数地点においては、リービッヒの最少律に係る今回の栄養塩添加実験など、河川教育教材開発のために、別途多量の試水をポリタンクに採水して実験室に持ち帰った。

これらの試水は、各種の実験等に使用するためにそのまま冷凍保存した。

今回は、実験研修会の実習を目的に、長浜市南浜町の琵琶湖北湖水について、先に示した方法で栄養塩添加実験を行った結果を示す。

培養は、図 1 に示すように三角フラスコを並べて行い、場所による光条件等の違いが出ないように 1 ～ 3 日 1 回の頻度で攪拌し、三角フラスコの位置を入れ替えて、さらに、培養を行った。



図1 Chlorella sp. の培養

また、視覚化しやすいように図2に示すように10mLのディスポーザブルビーカーに培養後のサンプルを10mLずつ入れて、その色を観察した。

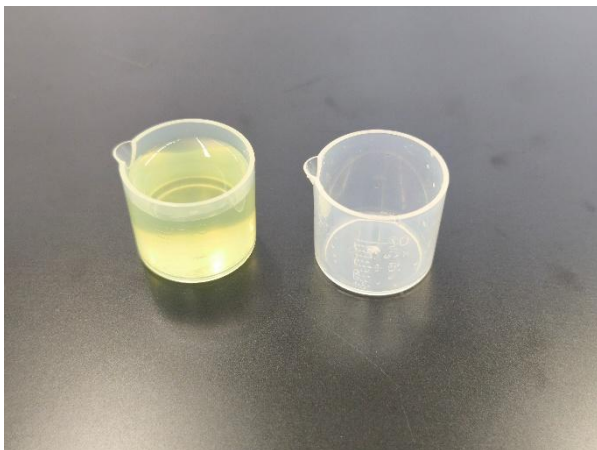


図2 ディスポーザブルビーカーとサンプル

色を比較するために、水道水を入れたディスポーザブルビーカーと共に、試水に Chlorella sp. のみを接種した5本の三角フラスコから、10mLずつ取り出したサンプルを入れたビーカーを並べて写真を撮った(図3)。

同様に、試水に窒素のみを加えて Chlorella sp. を接種した5本の三角フラスコから、10mLずつ取り出したサンプルを入れたビーカーを並べて写真を撮った(図4)。

試水にリンのみを加えて Chlorella sp. を接種した5本の三角フラスコから、10mLずつ取り出したサンプルを入れたビーカーを並べて写真

を撮った(図5)。

試水に窒素とリンを加えて Chlorella sp. を接種した5本の三角フラスコから、10mLずつ取り出したサンプルを入れたビーカーを並べて写真を撮った(図6)。

試水に微量金属元素を加えて Chlorella sp. を接種した5本の三角フラスコから、10mLずつ取り出したサンプルを入れたビーカーを並べて写真を撮った(図7)。

試水に微量金属元素を加えて Chlorella sp. を接種した5本の三角フラスコから、10mLずつ取り出したサンプルを入れたビーカーを並べて写真を撮った(図8)。

また、これらの栄養塩類ほかの添加の効果を比較するために、水、コントロール、窒素、リン、窒素とリン、微量金属元素、ビタミンをそれぞれ添加して培養したものを並べて写真撮影を行った(図9)。



図3 コントロール

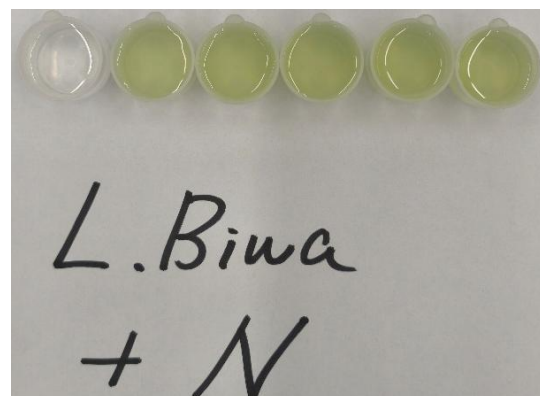


図4 窒素添加



図5 リン添加

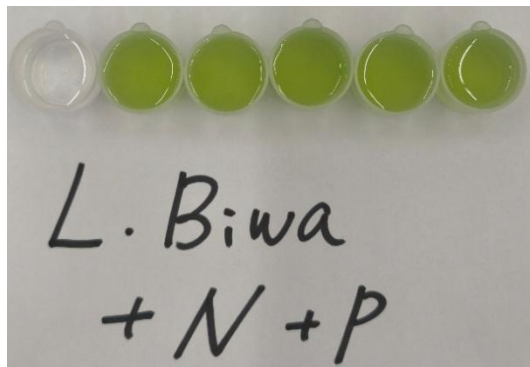


図6 窒素とリン添加

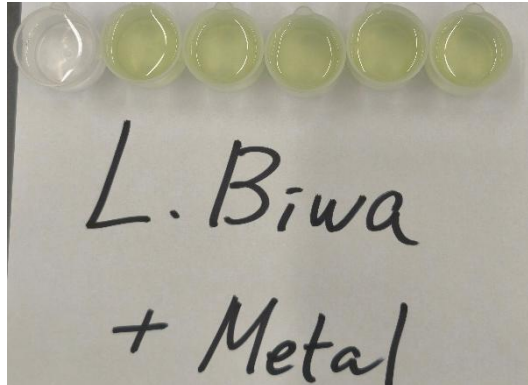


図7 微量金属添加



図8 ビタミン添加

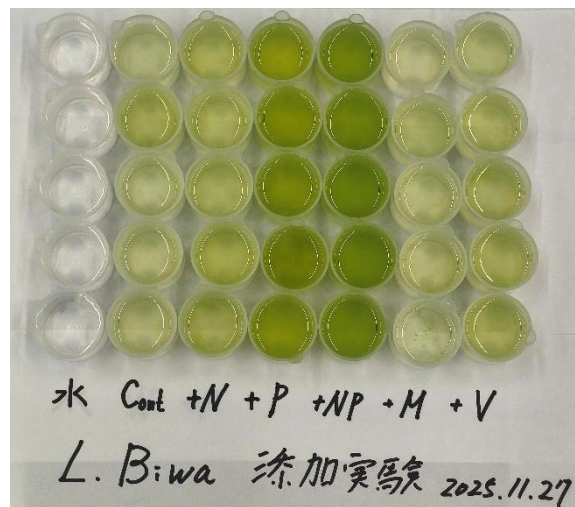


図9 添加実験結果全体の比較

5. 謝辞

本研修は、2025 年度河川基金助成（助成番号 2022-6111-001）研究題目「現地と学校をオンラインで結ぶ琵琶湖淀川水系調査と教員研修」、並びに、2023 年度河川基金助成（助成番号 2023-6111-006）研究題目「淀川・大和川を見る・観る・診るプロジェクト」の支援を受けて実施いたしました。公益財団法人河川財団様には、お礼を申し上げます。

また、大阪市建設局西部方面管理事務所の方々からは、資料や貴重なご助言を頂き、ありがとうございました。

参考文献

- S_{COR} / UNESCO (1966): Determination of photosynthetic pigments in sea water. IV, Monographs on oceanographic methodology, UNESCO publications center, New York, 69pp.
- Lorenzen, C. J. (1968): Carbon / chlorophyll relationships in an upwelling area. Limnol. Oceanogr., 13, 202-204.
- 日本工業規格 (1966) ; JIS K0101-1966.
- ・国土交通省四国整備局河川部河川管理課 (2015) : 採水・採泥マニュアル(案)
 - ・西澤一俊(1979) : 藻類研究法, 共立出版.



河川 公益財団法人河川財団による
基金 河川基金の助成を受けています。