

## 中学校理科の光合成実験で用いられる インジゴカーミン法の改良

陣野 信孝<sup>1</sup>・藤田 毅<sup>2</sup>

<sup>1</sup>長崎大学教育学部生物学教室 <sup>2</sup>同地学教室  
(平成4年10月30日受理)

### Improvement of Indigo Carmine Method on Photosynthetic Experiment in Science of Lower Secondary School

Nobutaka JINNO<sup>1</sup> and Tsuyoshi FUJITA<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Biological Laboratory, Faculty of Education, Nagasaki  
University, Bunkyo Machi, Nagasaki, 852 Japan

<sup>2</sup>Department of Geology, Faculty of Education, Nagasaki  
University, Bunkyo Machi, Nagasaki, 852 Japan

(Received October 30, 1992)

#### Abstract

A reduced indigo carmine liquid turn easily from a transparent yellow color into a blue one by a oxidation. This principal is usually applied to the qualitative detection of oxygen evolved photosynthetically from plants in science of lower secondary school. However, the method used at the science textbook has a disadvantage that an air is apt to mix into the reduced indigo carmine solution on the way of experiment, and then the turning into blue color often occurs at the control experiment without the plant sample. Thus, it is difficult to detect whether the turned blue color is brought about an oxygen evolved photosynthetically or not.

Therefore, we attempted to improve the indigo carmine method and could devise the apparatus capable of being avoided the mixing of air using a syringe as a reaction tube. Good results could be obtained on the use of the present improved method.

---

この研究は1992年1月25~26日に東京学芸大学で開催された第53回日本生物教育学会全国大会で発表したものである。

The improved indigo carmine method seems to be available to the photosynthetic experiment in science of lower secondary school.

**Key words :** Indigo carmine method—Lower Secondary school—Photosynthetic experiment.

## I はじめに

光合成は植物が光エネルギーを利用して二酸化炭素と水とから有機物を合成する反応で、副産物としての酸素の発生を伴う。

さて、中学校理科の教科書や指導書での「光合成実験」は(1)二酸化炭素が消費されること、(2)同化でんぷんが合成されること、(3)酸素が発生することの3つを調べる内容となっている。(1)と(2)については、それぞれBTB指示薬とヨウ素溶液を用いて確かめる実験で教科書あるいは実験書等の方法通りに進めれば大体において良い結果が得られる。一方、(3)については水草を使った気泡計算法とインジゴカーミン法が取り入れられているが、特に後者には一定の実験結果が得られにくいという難点がある。

このインジゴカーミン法は、酸化インジゴカーミン(青色)  $\xrightleftharpoons[\text{酸化}]{\text{還元}}$  還元型インジゴカーミン(淡黄色透明)という原理を光合成実験に適用したものである。つまり、還元型インジゴカーミン液の中に植物を入れ空気を遮断して光照射し、青色への色調変化によって光合成による酸素発生を定性的に確認する方法である。この方法は酸素発生が視覚的にとらえられる点で非常に実験効果も高いが、還元型インジゴカーミン液と空気との接触やその混入をさけることが実験結果の良否のかぎとなる。

ところで、教科書等では植物の入った容器に還元型インジゴカーミンを注入し、その上に流動パラフィンやオリーブ油を加えたり、ゴム栓をしりして空気と遮断する方法をとっているものの空気の混入が避けられないという難点がある。そのために植物が入っていない対照実験でも同じように還元型インジゴカーミンが青色に変化し、光合成による酸素発生を確認できない場合が多い。操作中多少の空気の混入があっても還元剤であるナトリウムを多く加えて還元力を強くしておくこととすぐに青色に変化することはないが、光合成による酸素発生が確認できるようになるまで長時間を要する。このように従来のインジゴカーミン法<sup>1)~6)</sup>では短時間にしかも一定した実験結果を得ることはむずかしい。

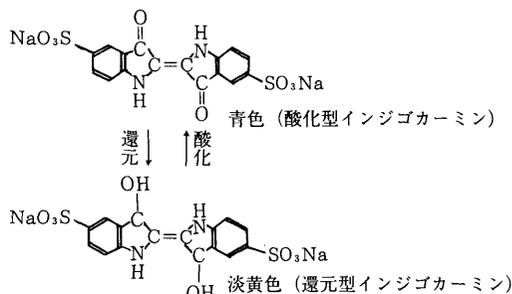
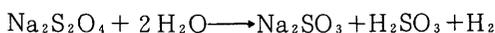
そこで、著者等は短時間でしかも一定した結果が得られるよう実験器具と実験方法を考案とインジゴカーミン法の改良化をめざした。試行錯誤の後、図1~5に示すように注射器を使った実験器具と方法を考案できた。今回考案した器具と方法でいろいろな植物で試したところ短時間でしかも一定した実験結果が得られるようになったので、本学部の2・3年生の理科専攻・選修生を対称にして生物学実験で試行し、中学校の理科における光合成実験として適用可能かどうか検討した。

## II インジゴカーミン液の青色の淡黄色透明化への原理(酸化と還元)

インジゴカーミン ( $C_{16}H_8N_2Na_2O_8S_2$ , M. W. ; 466.36) は、藍として有名なインジゴ

の5, 5'-ジスルホン酸ナトリウムである。インジゴカーミンの青色が還元剤である  
 ハイドロサルファイトナトリウム（亜ニチオン酸ナトリウム）によって淡黄色になるのは  
 次の機構による<sup>7)</sup>。

ハイドロサルファイトナトリウム



このようにインジゴカーミンの青色は還元されると淡黄色に、それが酸化されると青色  
 に復色する。このことを光合成に適用し、つまり、淡黄色のインジゴカーミン液が青色に  
 変化する程度によって酸素の発生（光合成）を定性的に知ることができる。

### Ⅲ 考案した実験器具

100mlの浣腸器，20mlの注射器（いずれもガラス製），5mlの注射器（プラスチック製  
 でも可），ガラス玉（直径約3mmと5mm），シリコン栓等を用いて図1～4のような器具  
 を考案した。この実験器具を用いた実験を以下に示す。

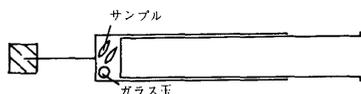


図1. 20mlのガラス注射器内に2～3mlの脱気蒸留水，直径約3mmのガラス玉と所定のサ  
 ンプルを入れる。ピストンを差し込み針を上にして空気抜きをしながら1mlにしてシリ  
 コン栓に突き刺す。サンプルに気泡が付着しているときは，注射器を振りガラス玉  
 を動かしてサンプルから取りはずしてから空気抜きをする。

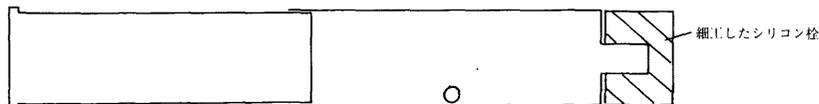


図2. 直径約5mmのガラス玉の入った100mlの浣腸器に炭酸水素ナトリウムを所定の濃度  
 に含む0.05%インジゴカーミンを吸入し，細工したシリコンの栓をして保存する。

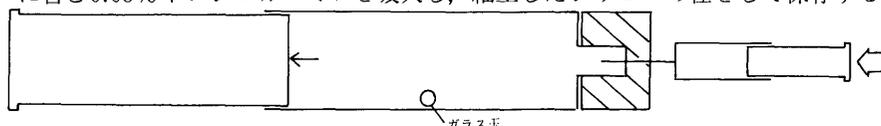


図3. 脱気蒸留水を使用し新しいハイドロサルファイトナトリウムを用いて1%溶液を作り，  
 5mlの注射器にとりできるだけ正確に3mlを（2）の液にシリコン栓を通して注入し，  
 還元型インジゴカーミン溶液（pH約7.5）をつくる。

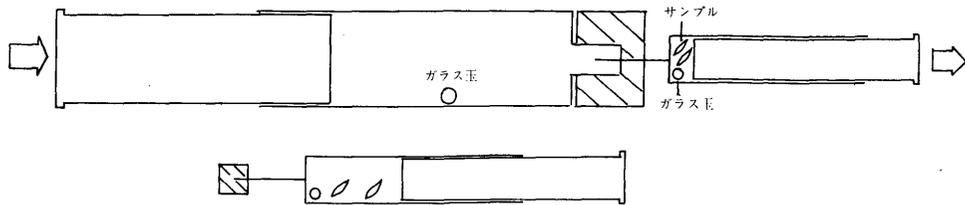


図4. 図1の注射器の針を図2の浣腸器のシリコン栓に突き刺しピストンをゆっくり引きながら還元型インジゴカーミン9 mlを移し入れ全量を10mlにする。針を上にしてピストンを押して液を少し出ししながらシリコン栓に突き刺す。これを反応管とする。

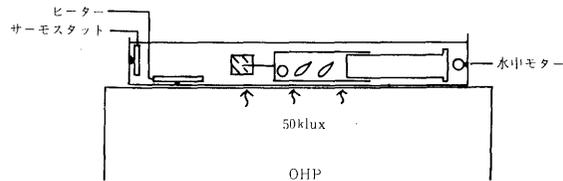


図5. 水を入れた透明な容器に反応管を入れて種々の条件下で実験を行う。

## IV 材料と方法

### 1. 材料、薬品、器具

- (1) 材料；主として水草であるオオカナダモを用いた。他に水草としてエビモ、マツモ、陸上草本植物としてツユクサ、カタバミ、カイワレダイコン、陸上木本草植物としてサンゴジュ、ツバキを用いた。
- (2) 薬品；インジゴカーミン ( $C_{16}H_8N_2Na_2O_8S_2$ )，ハイドロサルファイトナトリウム ( $Na_2S_2O_4$ )，炭酸水素ナトリウム ( $NaHCO_3$ )
- (3) 器具；考案した器具，透明な容器 (30×22×6 cm<sup>3</sup>)，サーモスタット (観賞魚用シーパレックス5020， $\alpha$ -セラミックスヒーター100W，日本水槽工業(株))，水中モーター (S-1，マブチモーター(株))，OHP (HP-3500 ZOOM，ELMO，300W ハロゲン電球使用)，照度計 (SPI-6 A，TOPCON)，温度計，カラーチャート (大日本インキ化学工業(株))

### 2. 方 法

- (1) 20mlのガラス製注射器のシリンダー内に脱気蒸留水 (蒸留水を沸騰させた後冷却したもの) を2 ml，オオカナダモの葉を所定枚数，直径約3 mmのガラス玉1個を入れた後ピストンをシリンダーに差し込む。注射針の付いた方を上にしてピストンを押しながら空気抜きをしてシリコン角を注射針に付きさす。葉に気泡が附着しているときは，注射器を振ってガラス玉で取りはずした後空気抜きを行う (図1)。
- (2) CO<sub>2</sub>源として炭酸水素ナトリウムを所定の濃度に含む0.05%インジゴカーミン100mlをビーカーで調合する。この時ガラス棒で良くかくはんしインジゴカーミンをとかす。それを直径約5 mmのガラス玉の入っている100mlの浣腸器に吸入し細工したシリコン栓を

- はめこむ(図2)。細工したシリコン栓の穴の部分には空気が残りやすいので、それにはピストンのある方に上にして確かめる。もし、空気が残っていればそのシリコン栓に針を突きさして空気抜きをする。この状態のインジゴカーミンは酸化型で青色をしている。
- (3) 脱気水でヒドロサルファイトナトリウムを用いて1%溶液をつくり、すぐに5mlの注射器に吸入し空気抜きをしてシリコン角に針を突きさしておく。次に(2)のインジゴカーミン液に細工したシリコン栓を通してヒドロサルファイトナトリウムを正確に3mlを注入して注射器を上下逆にしながら還元型インジゴカーミン液(淡黄色透明, pH約7.5)をつくる(図3)。この液は少なくとも1日は使用に耐えうる。一旦開けたヒドロサルファイトナトリウム試薬は還元力が低下しやすいので蓋をビニルテープでしっかり封をして冷蔵庫内に保存する。しかし、インジゴカーミン液を還元するのに多量要するようになれば還元力が低下している証拠なので新しく買いかえる。ヒドロサルファイトナトリウムを多量に入れると強いアルカリ性になってくるためである。
- (4) (1)の注射器の針を(3)の還元型インジゴカーミンの入った浣腸器の細工したシリコン栓に突きさして9mlを吸入し全量を10mlにする。このとき浣腸器のピストンも同時に押しながらするとよい。注入したら注射針にシリコン角を突きさして反応管とする。
- (5) この反応管を水の入った透明な容器に入れてOHP上にのせOHPの光源で照射し(図5)、下記の実験I~IVを行う。透明な容器は注射器が水に十分に沈む程度の深さが必要である。光合成による酸素発生によって還元型インジゴカーミン液のどこの部分が、またどのように変化するかを時間を追って観察する。スクリーンに投影すると全員でその変化を観察することも可能である。
- (6) 反応管の液の色調の変化は黄色から青色の変化であるので、カラーチャートの青色(C)、赤色(M)、黄色(Y)の混合比で表わされたNo.5~7などを用い任意に段階を決めて表示する。今回は1~6の6つの段階で表示した。段階が大きくなるにつれて青色が強くなることを示している。

#### 実験I 葉の枚数と光合成

照度50klux, 反応管中の $\text{NaHCO}_3$ の濃度0.18%, 温度30℃, 反応管中の葉の数をそれぞれ0, 2, 4, 6, 8, 10枚の条件下で実験を行う。20分後の反応管の色調の変化を調べる。以下II~IVについても同じ。

#### 実験II 温度と光合成

照度50klux, 反応管中の $\text{NaHCO}_3$ の濃度0.18%, 葉10枚, 容器中の水温を10, 20, 30℃の条件下で実験を行う。温度の調整はそれぞれ氷, 氷とお湯, サーモスタットで行う。

#### 実験III 二酸化炭素濃度と光合成

$\text{CO}_2$ 源として $\text{NaHCO}_3$ を用いる。反応管中の $\text{NaHCO}_3$ 濃度をそれぞれ0, 0.01, 0.16%, 照度50klux, 温度30℃, 葉の数10枚の条件下で実験を行う。 $\text{NaHCO}_3$ の濃度の調整は、方法において、 $\text{NaHCO}_3$ を0, 0.01, 0.16%に含む液を調合して吸入するか、同じく方法(4)において、9ml吸入するところを8mlにして、脱気水, 0.1, 0.16%の $\text{NaHCO}_3$ をそれぞれ1mlずつ更に吸入して全量を10mlにする。 $\text{NaHCO}_3$ の濃度はそれぞれ0, 0.16, 1.6%となる。

#### IV 植物種と光合成

オオカナダモ以外については生重0.04gの葉，照度50klux， $\text{NaHCO}_3$ の濃度0.18%，温度30℃の条件下で行う。

#### V 結果と考察

1. 反応管中の葉を多くすると光合成（酸素発生）は増大した（表1）。

表1 葉の枚数と光合成

葉の枚数		0	2	4	6	8	10
カラーチャートによる色調 <sup>1)</sup>	黄	80	80	80	60	60	40
	青	0	10	60	80	100	100
	赤	0	0	0	0	20	40
表示段階		1	2	3	4	5	6

<sup>1)</sup> 数値はそれぞれの色の割合（%）を示す。表示段階の1～3，4～5，6における色調はそれぞれカラーチャートNo.5～7により決めた。表示段階が1→6になるにつれて色調は黄色→青色に変化する。

2. 10，20，30℃下では温度が高い程光合成は増大した（表2）。

表2 温度と光合成

温度（℃）	10	20	30
葉の枚数	10	10	10
表示段階	2	4	6

3.  $\text{NaHCO}_3$ の濃度が高い程光合成は増大した（表3）。

表3 二酸化炭素濃度と光合成

$\text{NaHCO}_3$ （%）	0	0.01	0.16
葉の枚数	10	10	10
表示段階	1	2	6

4. 陸上の高等植物にも十分に適用できることがわかった。特に気泡が付着しにくいカイワレダイコンは良い材料であった（表4）。

表4 植物種と光合成

材料名	エビモ	マツモ	ツユクサ	カタバミ	カイワレダイコン	ツバキ	サンゴジュ
表示段階	6	4	4	6	5	4	4

このように、陸上高等植物でも予定されるきちんとした結果が得られた<sup>7)</sup>。最近では、オオカナダモなどの水草の入手も簡単にはいなくなってきたときに、身近かな陸上植物が使えて良い結果が得られると好都合なことである。

光合成によって発生する気泡の成分が酸素であるかどうかは、酸素吸収剤であるアルカリ性ピロガロールで処理し、ガスの減少量からその存在を確認したり<sup>6)</sup>、また、気泡を集めて火のついた線香が燃えあがることから確認している<sup>8-9)</sup>。前者の操作は生徒には無理で、後者については、おもしろい実験であるが気体を集めるのに2時間を要している。1時間の授業で行うには無理がある。尚、この気体の助熱性については、水草や陸上植物から排出される気泡中の酸素濃度はせいぜい30%位だから火のついた線香が燃えあがることはないとしている実験書もある<sup>10)</sup>。

ところで、筆者等が今回考案した器具を用いた方法では、セット約5分位から葉の表面や切り口から反応管の黄色透明な液の中に、煙が立ち上がるようにいくつもの青いすじが肉眼でも確認できる。これをスクリーンに投影すると更に教育効果もあがるであろう。

光合成については緑色植物が行うと記した教科書もあるように<sup>1)</sup>、生徒や学生もそう理解している場合が多い<sup>11)</sup>。肉眼的には緑色をしていない紫色や赤色をしたシソの葉など陸上高等植物や、ヒジキ、などの海藻を適用することによりまちがった理解を正すことの一助となるであろう。

最後に今回考案した実験器具を方法が中学校の生徒実験として適用可能であるかどうか検討するために、本学部生対称の生物学実験において試行してもらった。大体において予想される実験結果が得られたが、多くの学生が注射針を使った器具は中学生にとっては問題があると指摘していた。その指摘はたしかにそうであると思われるので今後改良を加えていきたい。しかし、教師実験としては十分に耐えうると考えるので教育現場での活用を期待し、批判をいただきながらよりよい実験器具の考案をめざしていきたい。

## 参 考 文 献

- 1) 戸田盛和・岩橋八洲民ほか36名 (1986) 「新版中学校理科2分野下」, p. 56. 大日本図書.
- 2) 大木道則ほか29名 (1983) 「理科2分野下」, p. 172. 啓林館.
- 3) 伏見康治・前川文夫ほか25名 (1983) 「中学校理科2分野下」, p. 65. 学校図書.
- 4) 藤井 隆・近角聡信・長倉三郎・江上信雄ほか34名 (1983) 「新しい科学2分野下」, p. 47. 東京書籍.
- 5) 篠原尚文 (1975) 「先生と生徒のための新しい生物実検 (太田次郎編)」, pp. 184-185. 共立出版.
- 6) 宇津木和夫・玉野井逸郎・吉田治英 (1987) 「生物の実験法Ⅲ-生物体の機能」, pp. 18-19. 塔風館.
- 7) 禰宗男ほか20名 (1981) 「中学校理科2分野下 (教師用指導書)」, pp. 112-113. 大日本図書.
- 8) 小川 都 (1991) 中学校で光合成をどう教えるか. 理科教室 34 (5), 26-31.
- 9) 松田仁志 (1990) 光合成に伴うガス発生と発生したガス中の酸素の燃焼による検出の

実験. 生物教育 30, (3), 164-169.

- 10) 岩波洋造・森脇美武・渡辺克己 (1991) 「絵でみてできる生物学 Part II」, pp. 22-25. 講談者サイエンティフィック.
- 11) 片山舒康・佐藤弘典・丸山陽子 (1991) 大学・短期大学で一般生物学を履修している学生は「藻類が光合成生物である」ことをどの程度認識しているか. 生物教育 31(1), p. 27.