

二重ゴム栓によるガス代謝測定系の密封法

誌名	日本土壌肥料学雑誌 = Journal of the science of soil and manure, Japan
ISSN	00290610
著者	佐藤, 立夫 和田, 秀徳
巻/号	59巻3号
掲載ページ	p. 306-307
発行年月	1988年6月

二重ゴム栓によるガス代謝測定系の 密封法

佐藤立夫*・和田秀徳*

キーワード 土壌のガス代謝, 気体の分析, ガスクロマトグラフィー, 二重ゴム栓

1. 緒言

土壌中の微生物活性を調べるうえで, 微生物代謝に伴って生成するさまざまな気体を定量的に測定することが有効である。ガスクロマトグラフィーによる気体の分析が可能になった今日, 気体の漏洩がなく, 気体試料を容易に採取できる実験系を確立することが望まれている。福士ら¹⁾は三角フラスコにプチルゴム栓をし, 硫酸酸性硫酸ナトリウム水溶液中に倒立させれば気体漏洩量が減少すると報告しているが, この方法には三角フラスコを倒立させる, 堅いプチルゴム栓にガスシリンジの針を突き刺さなければならない等の難点がある。木村ら²⁾は正立した三角フラスコを二重ゴム栓で密栓した実験系を採用している, この系ではフラスコ内の気体採取も容易であるが, 気体の漏洩についての検討はなされていない。

そこで二重ゴム栓で密封した容器の気体漏洩について検討し, この実験系を種々の実験系へ適用する可能性を探ることを目的とした二, 三の実験を行った。

2. 実験 1: 二重ゴム栓の材質と注射針跡の処理の検討

容積約 35ml の試験管 (18×180mm) および三角フラスコ (30ml) を用意し, 前者はプチルゴム製の二重ゴム栓 (三紳工業製, 特注品), 後者は天然ゴム製の二重ゴム栓 (コクゴ製) で密封した。そしてガラス製コックの一方に注射針を, 他方には真空ポンプとポンペを接続した装置を用い, 二重ゴム栓に注射針を突き刺して 1 分間排気-30 秒間ガス添加 (約 1 気圧) を 3 回繰り返す, 容器内のガスをアルゴンに置換した。次いで容器に 0.5ml の水素をガスシリンジで注入した。二重ゴム栓に施した処理の違いによって次の各区を設けた。①対照。②二重ゴム栓にセロハンテープを貼る。③注射針跡にボンドを

塗る。

これらを 4 週間にわたって 30°C, 暗所に保温静置し, 経時的にガスシリンジで容器内の気体を採取し, ガスクロマトグラフィーで分析した。この際, セロハンテープやボンドをはがし, 気体試料採取後, 二重ゴム栓に再び同じ処理を施して保温静置を続け, 次の分析に供した。なおガスクロマトグラフィーは島津製 GC-3BT で, キャリアーガスはアルゴン, カラム・注入口・検出器温度は 50°C とし, 検出器は TCD, Molecular Sieve 5A 80-100 mesh を充填した 2m のステンレスカラムを用いた。

分析結果を第 1 表に示した。プチルゴムは天然ゴムよりもガス漏洩量のはるかに少なく, いずれもボンドを塗るとガス漏洩量が著しく減少し, セロハンテープにも漏洩を抑える効果が多少みられた。

ボンドは注射針跡にのみ塗ったので, 対照区からのガス漏洩には注射針跡が大きく寄与していることになる。

実験 1 の結果から, 数日の保温静置なら天然ゴム製二重ゴム栓を用い, 1 週間以上に及ぶ保温静置にはプチルゴム製の二重ゴム栓を用い, それぞれ注射針跡にボンドを塗ればよいと判断された。

3. 実験 2: 封液を用いる簡便法の検討

リン酸をしみ込ませた濾紙を二重ゴム栓上にのせる方法を考案し, その効果を検討した。まず, 三角フラスコ (30ml) を天然ゴム製二重ゴム栓で密封し, 前述の方法でフラスコ内部をアルゴンで置換し次の 3 区を設けた。

①対照。②注射針跡にボンドを塗る。③リン酸をしみ込ませた濾紙を二重ゴム栓上にのせてサランラップで覆う。

これらを 30°C, 暗所に 1 週間保温静置し, 前述の方法で経時的にフラスコ内の気体を採取しガスクロマトグラフィーで分析した結果を第 2 表に示した。

ガス漏洩を防ぐには③の方法が非常に有効であった。これはリン酸が注射針跡だけでなく, ゴムに本来ある微細な穴をもふさぐためであると思われる。

実験 2 の結果から, 1 週間以上に及ぶ保温静置実験でもリン酸をしみ込ませた濾紙をのせれば天然ゴム製の二重ゴム栓を用いることができると判断された。

4. 実験 3: 純粋培養した微生物のガス代謝測定

土壌中の微生物活動を解析する際に, 特定の微生物を純粋培養し, その代謝活性を測定する必要がある。そこで二重ゴム栓を用いて数種の微生物を純粋培養し, 発生する気体を測定する方法を検討した。

試験管 (18×180mm) に培地を 1ml 分注し, 頭の小さい綿栓を施して滅菌した。これに前培養した微生物の培養液を 0.1ml 接種し, 綿栓を RUDAKOV³⁾ の方法に

Ritsuo SATO and Hidenori WADA: Usage of Double Rubber Bung in Measuring Gas Metabolism in Soil

* 東京大学農学部 (113 東京都文京区弥生 1-1-1)

昭和 62 年 10 月 16 日受理

日本土壤肥科学雑誌 第 59 巻 第 3 号 p. 306~307 (1988)

第1表 二重ゴム栓の材質と注射針跡の処理を変えた場合の気体の分圧の変化

(atm)

気体	ゴムの材質	処理*	0	2	3	5	7	14	21	28日
水素	天然ゴム	①	0.070	0.032	0.022	0.011	0.0049	0.0005	0.0001	0.00005
		②	0.072	0.043	0.033	0.024	0.0155	0.0061	0.0017	0.0004
		③	0.075	0.055	0.048	0.047	0.043	0.036	0.029	0.023
	ブチルゴム	①	0.077	0.043	0.038	0.037	0.029	0.015	0.010	0.0067
		②	0.077	0.046	0.043	0.041	0.039	0.037	0.033	0.032
		③	0.083	0.069	0.063	0.064	0.060	0.054	0.046	0.044
酸素	天然ゴム	①	0.000	0.039	0.055	0.086	0.106	0.16	0.17	0.18
		②	0.000	0.027	0.041	0.057	0.074	0.11	0.14	0.16
		③	0.000	0.013	0.016	0.022	0.025	0.039	0.049	0.059
	ブチルゴム	①	0.000	0.004	0.005	0.006	0.008	0.012	0.013	0.017
		②	0.000	0.002	0.000	0.003	0.002	0.007	0.009	0.008
		③	0.000	0.001	0.000	0.002	0.003	0.003	0.004	0.004
窒素	天然ゴム	①	0.000	0.15	0.21	0.32	0.40	0.60	0.67	0.71
		②	0.000	0.10	0.21	0.21	0.28	0.45	0.53	0.61
		③	0.000	0.045	0.052	0.074	0.082	0.12	0.16	0.19
	ブチルゴム	①	0.000	0.015	0.021	0.022	0.030	0.051	0.053	0.069
		②	0.000	0.0013	0.000	0.0033	0.0075	0.021	0.028	0.023
		③	0.000	0.011	0.005	0.009	0.016	0.016	0.018	0.018

* ① 対照, ② セロハンテープ貼付, ③ ボンド塗布.

第2表 注射針跡の処理を変えた場合の気体の分圧の変化

(atm)

気体	処理*	0	1	3	5	7日
酸素	①	0.000	0.012	0.029	0.045	0.067
	②	0.000	0.010	0.021	0.039	0.039
	③	0.000	0.0084	0.014	0.022	0.027
窒素	①	0.000	0.042	0.093	0.15	0.23
	②	0.000	0.034	0.069	0.13	0.14
	③	0.000	0.028	0.045	0.070	0.090

* ① 対照, ② ボンド塗布, ③ リン酸紙付着.

第3表 微生物の気体発生量

菌株	<i>Escherichia coli</i>	<i>P.* denitrificans</i>
	IAM 12119	IAM 12479
培地**	glucose 1%	KNO ₃ 0.1%
気相	Ar	Ar+8.4% C ₂ H ₂
H ₂ (μg/tube)	39.01	—
CO ₂ (μg C/tube)	265.43	32.54
N ₂ O (μg N/tube)	—	80.74

* *Paracoccus*.

** 肉汁培地に表中のものを添加.

ならって試験管のなかに押し込み、二重ゴム栓（神田ゴム製）で試験管を密封した。次に前述の方法で試験管内の気体をアルゴンに置換したが、脱窒能を調べる場合にはアセチレン8.4%を含むアルゴンガスで置換した。二

重ゴム栓の注射針跡にはボンドを塗った。RUDAKOV₂の原法ではアルカリ性ピロガロール溶液で酸素を吸収させるために試験管内が減圧になり、空気の侵入の危険性がある。これに対し、著者らの方法では、試験管内の気体は約1気圧に保たれており、ガス漏洩のおそれがない。

24時間培養後、試験管を1分間サーモミキサーで振とうし、培養液中に蓄積しているガスを追い出してから気体試料を採取し、ガスクロマトグラフィー（前述の方法を採用、ただしカラムはPorapak Q 50-80 meshを充填）で分析した結果を第3表に示した。この方法で気体の発生量を測定すれば、各微生物の培地中での生育（二酸化炭素発生量から推定）、ヒドロゲナーゼ活性、脱窒活性の有無と程度を容易に判定できると考えられた。

謝辞 ガス分析等に関して多大なるご指導とご助言をいただいた名古屋大学農学部助教授木村真人博士と、菌株を分譲していただいた東京大学応用微生物研究所有用菌株保存施設の方々から感謝します。

文 献

- 1) 福士定雄・陽 捷行：土壌の脱窒の測定法の修正，土肥誌，**54**，9~14（1983）
- 2) 木村真人・和田秀徳・高井康雄：水稻根圏における代謝活性，同上，**55**，338~343（1984）
- 3) RUDAKOV, K. I. : Die Reduktion der mineralischen Phosphate auf biologischem Wege. *Centralbl. Bakt. Parasitkde.*, Abt. II, **70**, 202~214（1927）