

マンゴーに発生する病害の防除を目指したプラズマミスト装置 における芽胞菌及び大腸菌の殺菌

西村 豪志^{a)}・堂園 大雅^{b)}・後藤 弘輝^{a)}・富永 大^{b)}・迫田 達也^{c)}

Sterilization of *Bacillus Atrophaeus* and *Escherichia Coli* using a Plasma Mist Source for Preventing Diseases of Mango

Takeshi NISHIMURA, Taiga DOZONO, Hiroki GOTO,
Masaru TOMINAGA, Tatsuya SAKODA

Abstract

Apple Mango has been a representative product in Miyazaki. However, fruit rot disease such as Stem - end Rot and Anthrax Pathogen is serious. Therefore, it is necessary to perform sterilization. So, we fabricated two kinds of made sterilization devices operated in water mist. In order to confirm the usefulness of the source, we performed sterilization for *Bacillus atrophaeus* and *Escherichia coli*. It was confirmed the sterilization effect for both plasma sources.

Keywords: Apple Mango, Plasma, Sterilization, Stem - end Rot, Anthrax Pathogen

1. はじめに

宮崎県は、新たな需要創出のための”フードビジネス”を推進し、マーケットインの観点の一つから、農畜産物の輸出促進を図っている。しかし、大消費地である東京都、大阪府といった地域から遠隔なため、農畜産物の鮮度保持が困難であり、出荷後の品質保持が課題となっている。特に、宮崎県の特産果樹「完熟マンゴー」においては、出荷後に発生する炭疽病、軸腐病による腐敗が消費者への信頼を損ねており、その対策が課題となっている。沖縄県農業研究センターでは、収穫直後のマンゴーを対象に、軸腐病に対してハンダゴテを利用した果梗部熱処理試験、炭疽病に対して温湯処理試験を行い、病害抑制の報告を挙げている⁽¹⁾。しかし、前述した処理方法は直接マンゴーに熱を加えるため、処理した個体がダメージを受ける故に、試験的な手法と言える。低濃度(0.041~0.125 ppm) O₃を放出したビニールハウス内でマンゴー栽培を行い、病害抑制効果を確認した報告もあるが、O₃の長時間暴露は、ホワイトスポットと呼ばれる果面障害の誘発も確認され、更に、O₃

は農薬取締法の区分 C-③ : 54 資材に該当するため⁽²⁾、栽培条件化での利用が規制され、実利用不可な試験的手法である。

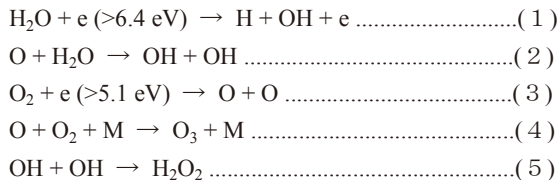
以上を背景に、著者等はプラズマによって生成される高酸化電位物質を殺菌剤と呼称し、マンゴー鮮度保持技術として応用を目指している。本研究では、O₃ (2.07 V)に加え、更に高い酸化電位を持つ OH ラジカル (2.81 V) や O ラジカル (2.42 V) といった物質を殺菌剤として用いる。特に OH ラジカルは、フッ素 (2.89 V) に次ぐ高い酸化電位を有しており、O₃ では分解できないフミンや酢酸などの難分解性有機物の分解も可能とされている⁽³⁾⁽⁴⁾。この OH ラジカルの一般的な生成法として、促進酸化処理で知られている O₃/H₂O₂ 法や、H₂O₂/UV 法、O₃/UV 法が挙げられる⁽⁵⁾。OH ラジカルは以下のような反応で生成される。(1)式は放電によって生成された電子と水分子との衝突によるものであり、(2)式は酸素原子と水分子との反応によるものである。なお、OH ラジカルはその反応性の高さから存在時間は 2×10^{-7} s 程度とされており、瞬時に生成・消滅するために生成後すぐに被処理物と反応させなければならない⁽⁵⁾。(3)式及び(4)式は O₃ の生成過程であり、O₂ の解離によって生成された O ラジカルと O₂ との反応によって O₃ が生成されるが、この過程の O ラジカルは前述

a) 工学専攻エネルギー系コース大学院生

b) 電気電子工学専攻大学院生

c) 電気電子工学科教授

のように O₃ よりも酸化電位が高い。なお, M は O, O₂, O₃ のいずれかを指す。また, (1)式及び(2)式によって生じた OH ラジカル同士の反応によって(5)式のように H₂O₂ が生成される。



著者等は, 高湿度環境下で誘電体バリア放電を発生させることで O₃ のみならず高い酸化電位を有する OH ラジカルの生成が可能である装置 (以下, プラズマミスト源) を提案している。プラズマミスト源を用いる二つの装置を作製し, マンゴーに発生する病害防除を目指している。一つ目は, マンゴーの表面全体に発生する炭疽病の防除を目指し, マンゴー全体に O₃ 及びミストを曝露させる装置 (以下, プラズマミスト装置 I) である。二つ目は, マンゴーの軸部分から菌が侵入し実を腐敗させる軸腐病の防除を目指し, マンゴーの軸部分にのみ O₃ 及びミストを曝露させる装置 (以下, プラズマミスト装置 II) である。

本報告では, 作製したプラズマミスト装置 I の有用性を確認するために, 一般に殺菌の指標として利用される枯草菌芽胞液 (Mesa Laboratories Inc, B.Subtilis ATCC6633) を用いて, ミストの導入がない場合 (以下, オゾンのみ) と, ミストの導入がある場合 (以下, オゾン+ミスト) との比較検討を行った。次に, 作製したプラズマミスト装置 II の有用性を確認するために, 大腸菌 (K-12) を用いて, オゾン+ミストと, 放電源を殺菌対象近傍に設置しミストを含んだ気体中で処理 (以下, プラズマミスト) との比較検討を行った。

2. 実験

2.1. プラズマミスト装置 I による芽胞菌の殺菌

2.1.1. 実験方法

図 1 及び図 2 にプラズマミスト装置 I の構成を示す。O₂ ガスをデジタル流量計に供給し流量を 4.0 L/min に調整する。その後オゾナイザに供給し O₃ を生成する。なお, 放電には 6.25 kHz の高周波電源で駆動した。O₃ を生成後, ミスト発生器用ポンプに導入し, 図 1 のオゾンだけの処理では, 空のミスト発生器を通してアクリルボックスから殺菌対象である芽胞菌が塗布された寒天培地に O₃ のみを曝露した。図 2 のオゾン+ミスト処理では, ミスト発生器によって発生されたミストと O₃ の混合気体を同様の寒天培地に曝露した。

O₃ 濃度は被処理部において 100 ppm となるよう UV オゾンモニター (EG-2001B) を用いた。また, 処理時間においては O₃ の絶対量を表す CT 値 (product of concentration

and processing time) を採用し, 1000 ppm・min 間隔で最大 12000 ppm・min とした。処理後は 30 °C に保ったインキュベーターで 2 日間培養しコロニーを形成させた。形成後はコロニーカウント法によりコロニー数を計測した。N 数は, 無処理においては 4 とし, その他の処理条件は 1 とした。

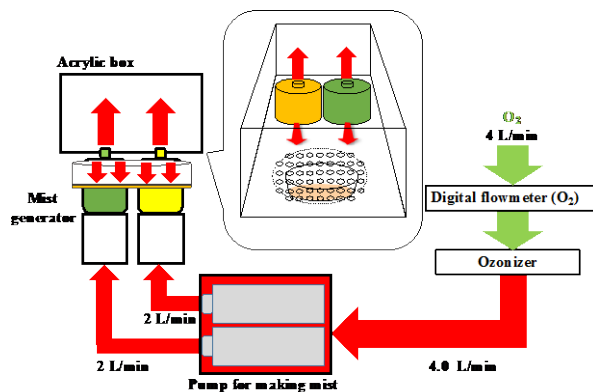


図 1 芽胞菌に対するオゾンだけの処理による構成

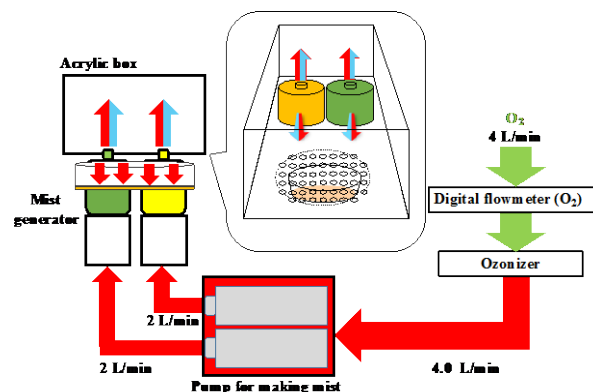


図 2 芽胞菌に対するオゾン+ミスト処理による構成

2.1.2. 実験結果及び考察

表 1 に各条件におけるコロニー数を示す。なお, 無処理においては平均値で示した。また, 図 3 に無処理の時のコロニー数を 100 % とした生存率の CT 値変化を示す。同図より, どちらの条件においても約 3000 ppm・min まで顕著な殺菌効果が得られない期間 (以下, 誘導期) があることが確認された。3000 ppm・min 以降は CT 値の増加に伴い生存率が減少していることがわかった。その減少傾向はオゾン+ミストの方が大きくなった。殺菌の指標として生存率が 10 % になる時の CT 値 (D 値 : Decimal value) を考えるとおよそオゾンだけの処理及びオゾン+ミストは 7000 ppm・min 及び 8000 ppm・min と, 1000 ppm・min 程度の差となった。これらの結果から, プラズマミスト装置 I の有用性が確認された。

誘導期が存在した原因として, 芽胞菌の耐性の由来となる芽胞殻を破壊するためにある一定量の O₃ が必要であることが挙げられる。また, オゾンだけの処理とオゾン+ミ

スト処理の殺菌効果に差が生じた原因として、 O_3 の分解によって生成された O や(2)式の反応により生成された OH と本菌が反応することで殺菌効果が高まったことが挙げられる。

表 1 各条件におけるコロニー数

CT 値 [ppm・min]	オゾンのみ	オゾン+ミスト
0	963	700
1000	932	631
2000	930	659
3000	838	661
4000	728	510
5000	603	390
6000	536	261
7000	391	140
8000	162	33
9000	21	6
10000	17	5
11000	2	0
12000	0	0

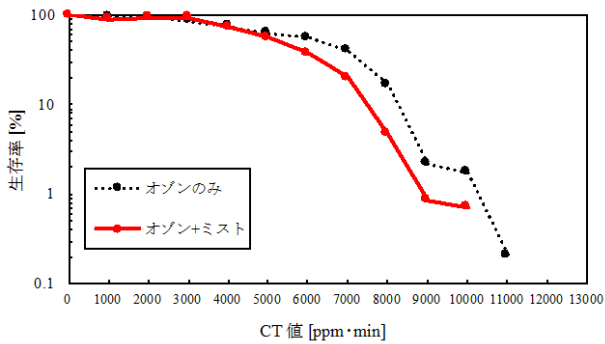


図 3 各条件における芽胞菌の生存率の CT 値変化

2.2. プラズマミスト装置 II による大腸菌の殺菌

2.2.1. 実験方法

図 4 及び図 5 にプラズマミスト装置 II の構成を示す。図 4 のオゾン+ミスト処理では、 O_2 ガスを流量計が 3.0 L/min を示すよう導入し、外部オゾンナイザにて生成した O_3 とミスト発生器で発生させたミストと混合気体を、直径 6 mm のガラス管を通して処理対象である大腸菌が塗布された培地に曝露した。図 5 のプラズマミスト処理では、 O_2 ガスを流量計が 3.0 L/min を示すよう導入しミストと混合後、ガラス管に供給した。ガラス管の内壁及び外壁に貼付された銅テープに電圧を印加し、 O_2 及びミストと反応させることで O_3 及びその他の活性種を生成させた。オゾン濃度及び曝露方法は図 4 と同条件とした。各条件における N 数は無処理を 2, その他の処理条件は 1 とした。また処理時間は、オゾン+ミスト及びプラズマミストのいずれ

の条件においても CT 値で最大 70 ppm・min とし、10 ppm・min 間隔とした。

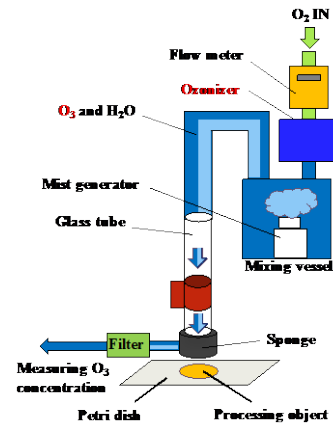


図 4 大腸菌に対するオゾン+ミスト処理の構成

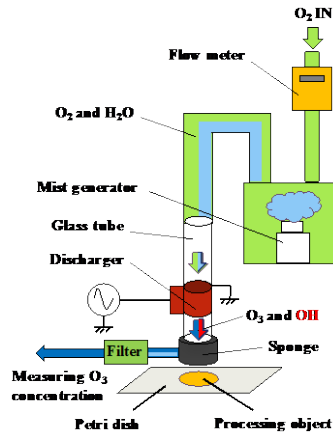


図 5 大腸菌に対するプラズマミスト処理の構成

また、図 6 に大腸菌の希釈方法を示す。LB (Lysogeny Broth) 培地上に十分培養された大腸菌 (K-12) を滅菌水 1 ml に添加し希釈後、直径 6 mm の LB 培地に 2 μ l 塗布し各条件の処理を行った。処理後は滅菌水 5 ml に培地を入れ攪拌後、5 μ l を直径 85 mm の LB 培地に塗布し、30 $^{\circ}$ C に保たれたインキュベーターで 2 日間培養しコロニーを形成させた。殺菌の評価方法はコロニーカウント法を採用した。

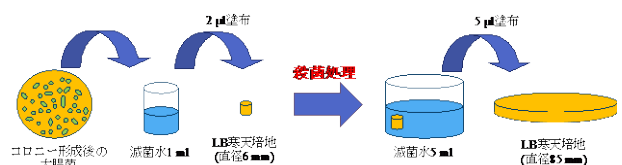


図 6 大腸菌の希釈方法

2.2.2. 実験結果及び考察

表 2 に各条件における大腸菌のコロニー数を示す。また、

この結果をもとに無処理のコロニー数を 100 %とした生存率の CT 値変化を図 7 に示す。

表 2 各処理条件における大腸菌のコロニー数

CT 値 [ppm・min]	オゾン+ミスト	プラズマミスト
0	1025	1274
10	892	1020
20	905	1284
30	963	1400
40	815	575
50	994	314
60	802	604
70	773	442

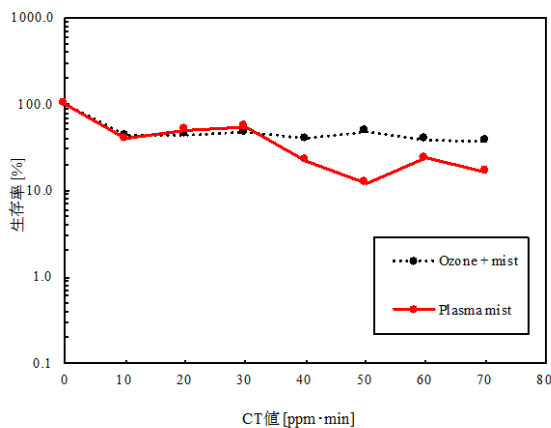


図 7 各条件における大腸菌の生存率の CT 値変化

図 7 より、オゾン+ミスト処理による生存率は、無処理を除く全ての処理条件において約 40 %と、殺菌効果は得られたものの、CT 値の増加に伴った減少傾向は見られなかった。一方、プラズマミストは 40 ppm・min までの減少傾向はオゾン+ミスト処理と同様だが、それ以降は減少傾向が現れた。これは、プラズマミスト処理によって発生した O_3 以外の活性種による殺菌効果だと考えられる。これらの結果から、プラズマミスト装置 II の有用性が確認された。また、プラズマミスト処理の結果より、10 ppm・min 時に 40 %程度に減少後、30 ppm・min まで変化が見られずその後減少したことからオゾンミスト処理においても 70 ppm・min 以上処理することで減少することが考えられる。

また、2 項で述べた芽胞菌に比べ O_3 に対する耐性が低いことがわかった。なお、2.1 項で述べた芽胞菌のように誘導期がない傾向となったのは、大腸菌には芽胞殻のような耐性の由来となる構造を有していないためだと考えられる。

3. 結論

本報告では、プラズマミスト装置 I の有用性を確認するために、芽胞菌を用いて、オゾンのみと、オゾン+ミスト

との比較検討を行った。次に、プラズマミスト装置 II の有用性を確認するために、大腸菌を用いて、オゾン+ミストと、プラズマミストとの比較検討を行った。

その結果、芽胞菌を用いた実験では、オゾンのみ、オゾン+ミストのどちらの条件においても約 3000 ppm・min まで誘導期があり、それ以降は CT 値の増加に伴い生存率が減少していることがわかった。その減少傾向はオゾン+ミストの方が大きく、D 値で 1000 ppm・min 程度の差となっていたことから、プラズマミスト装置 I の有用性が確認された。また大腸菌を用いた実験では、オゾン+ミスト処理による生存率は、無処理を除く全ての処理条件において約 40 %と、殺菌効果は得られたものの、CT 値の増加に伴った減少傾向は見られなかった。一方、プラズマミストは 40 ppm・min までの減少傾向はオゾン+ミスト処理と同様だが、それ以降は減少傾向が現れた。これは、プラズマミスト処理によって発生した O_3 以外の活性種による殺菌効果だと考えられる。これらの結果から、プラズマミスト装置 II の有用性が確認された。

今後、再現性をとるために、N 数を増やして同様の実験を行い、作製した装置の有用性を確認すると共に、本来の目的である炭疽病菌及び軸腐病菌の殺菌試験を行う予定である。

参考文献

- 1) 照屋亮・澤岨哲也・広瀬直人・牧志佑子・大城良計：「短時間温湯処理によるマンゴー炭疽病の防除」, 園芸学研究, 11 巻 2 号, pp.265-271(2012-04)
- 2) 農林水産省：農業資材審議会農薬分科会特定農薬小委員会及び中央環境審議会土壌農薬部会農薬小委員会第 10 回合同会合「参考資料 5 意見・情報募集結果を踏まえた資材の区分整理」
- 3) 布川史章・六角虎太郎・鈴木 進・矢沢勇樹・伊藤晴雄：「気泡内パルス放電によるフミン酸塩の吸光度の減少」, 電学論 A, Vol.132, No.8, pp.667-668 (2012)
- 4) 見市知昭・藤本 史・武田卓紀：「水上パルス放電プラズマによる水中難分解性物質の分解」, 電学論 A, Vol.131, No.10, pp.835-859(2011)
- 5) 宗宮 功・日本オゾン協会：オゾンハンドブック, pp.10-12 (2004)