

He ガスを利用したプラズマ装置における 遷移発光強度の測定と芽胞菌の殺菌

土田 潤一郎^{a)}・西村 豪志^{a)}・後藤 弘輝^{a)}・迫田 達也^{b)}

Sterilization of *Bacillus Subtilis* and measurement of optical emission intensity in He plasma

Junichiro TSUCHIDA, Takeshi NISHIMURA, Hiroki GOTO,
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 a plasma sterilization device using He and O₂ gas at atmospheric pressure. In order to confirm the usefulness of the source, we measured optical emission intensity of plasma and we performed sterilization for *Bacillus Subtilis*. As a result, it was confirmed the sterilization effect and a best mixing rate of O₂ gas.

Keywords: Apple Mango, Plasma, Sterilization, Optical emission intensity, *Bacillus Subtilis*

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、著者等は原料ガスに He を用いて発生させたプラズマを応用することによって、マンゴー鮮度保持技術として応用を目指している。気体放電を利用したプラズマは、熱平衡プラズマと非熱平衡プラズマに大別される。非熱平衡プラズマでは、高エネルギー電子が周囲の中性分子を励起/解離することでラジカル(化学的活性種)を生成し、これらラジカルを起点とした高い化学反応性を様々な技術へと応用している。特に 大気圧非熱平衡プラズマならではの特徴として、(1) 真空容器を必要とせず、プラズマ発生も容易であること、(2) プラズマ密度が高く(1010~1015 cm⁻³程度)、原材料のガス密度も高いために反応速度が速いことが挙げられる。これらの特徴は、オゾン生成や有害ガス処理などの環境浄化技術、表面改質や薄膜堆積などの表面処理、プラズマディスプレイやエキシマランプ等の光源等へと幅広く応用されている。また、非照射物に熱的負荷をかけずに大気圧中で安定したプラズマプロセスを行うためには、低温かつ空間的に一様な大気圧グロープラズマが適している。大気圧プラズマプロセス

a) 工学専攻エネルギー系コース大学院生

b) 電気システム工学科教授

グでは、プラズマ生成部とプロセス部が離れているリモートプラズマ方式であるプラズマジェットが数多く採用されており、それらのほとんどは、誘電体パイプ内で生成された高温のプラズマを、ガス流によって大気中へ押し流すことにより冷却されたラジカルを利用するアフターグロー方式を採用している。この大気圧非熱平衡プラズマジェットは、材料の表面加工、口腔病原菌の殺菌、止血や鼻炎治療等の産業・医療応用へ向けた研究が数多くなされている³⁾。

本研究において、He ガスを原料としたプラズマ装置（以下、プラズマジェット装置）を使用することで、プラズマによって生成される準安定状態 He 原子（19.8 eV）や O₂ ガスを混合させることによって生成される O ラジカル（2.42 eV）といった物質を直接照射して用いる。

本報告では、作製したプラズマジェット装置の有用性を確認するために、一定の放電電力下によって発生させたプラズマの遷移発光強度を測定した。次に、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、O₂ ガスの導入がない場合（以下、He のみ）と、O₂ ガスの導入がある場合（以下、He+O₂）との比較検討を行った。

2. 実験

2.1. プラズマジェット装置の遷移発光強度測定

2.1.1. 実験方法

図 1 及び図 2 にプラズマジェット装置の遷移発光強度測定時の構成を示す。図 1 の He のみの場合は He ガス 20 L/min を、図 2 の He+O₂ の場合は He ガス 20 L/min と O₂ ガス 0.2 L/min の混合気体を、デジタル流量計に流入させ、流量を調整し、内径 3 mm、外径 6 mm の放電源へ導いた。なお、放電は 6.25 kHz の高周波電源で駆動した。印加電圧は放電電力が 140 mW となるよう、He のみの場合は 3.8 kV、He+O₂ の場合は 4.9 kV にスライダックで調整した。

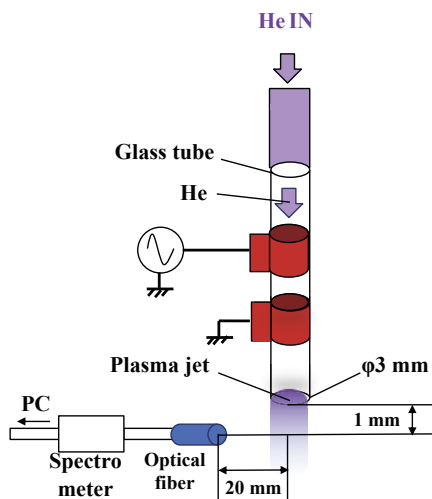


図 1 He のみの場合の遷移発光強度測定時のプラズマジェット装置の構成

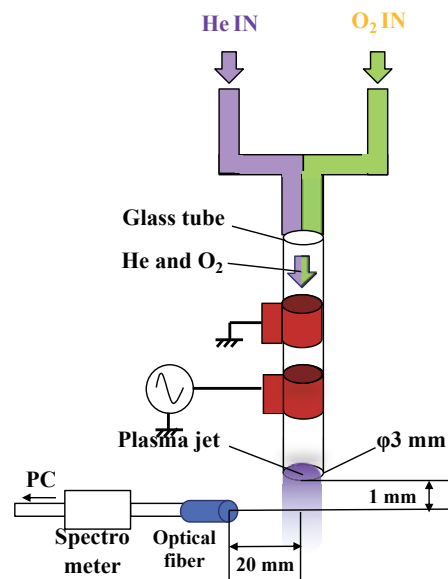


図 2 He+O₂ の場合の遷移発光強度測定時のプラズマジェット装置の構成

He+O₂ の場合において印加電圧が高い理由として、O₂ 分子を解離し、O ラジカルを生成する際にエネルギーを使用するためだと考えられる。発生した放電光をガラス管の下端から下部 1 mm、水平距離 20 mm の位置された光ファイバケーブルを用いて遷移発光強度の測定を行った。露光時間は 5 s とし、それぞれ比較を行った。

2.1.2. 実験結果及び考察

図 3 に 320~400 nm 付近の遷移発光強度の分布を示す。同図より、N₂ 由来である 337 nm 付近の発光スペクトルのピークはほぼ同等となっていることが分かった。また、図 4 に 750~790 nm 付近の遷移発光強度の分布を示す。同図より、O 由来である 777 nm 付近の発光スペクトルのピークは He のみの場合と比較して、He+O₂ の場合の方が約 3.5 倍の強度を有していることが分かり、O₂ ガスを供給することによって O ラジカルが生成されていることが確認され、

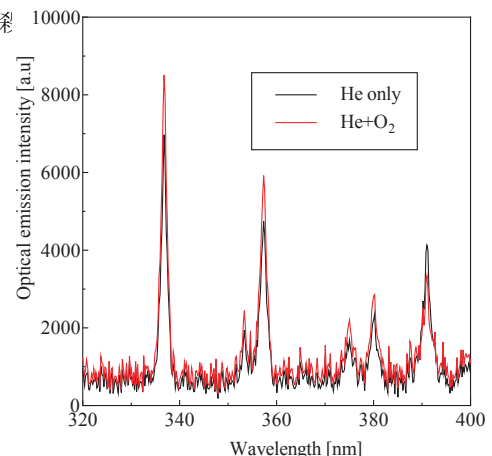


図 3 320~400 nm 付近の遷移発光強度の分布

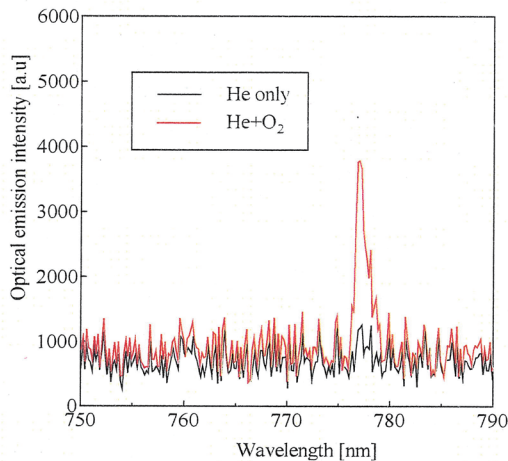


図4 750~790 nm 付近の遷移発光強度の分布

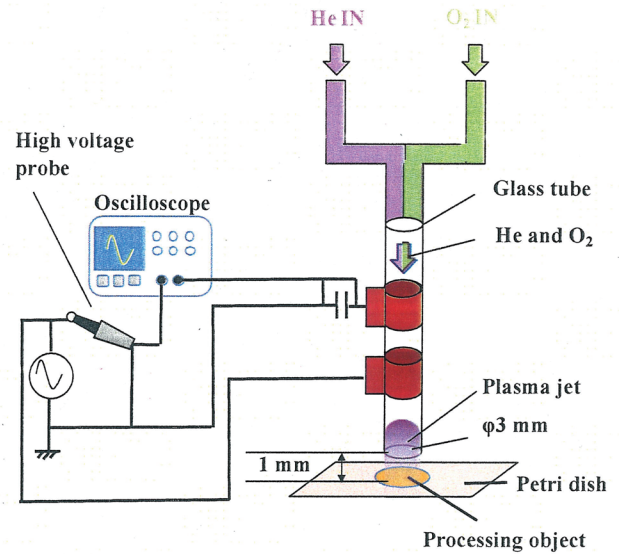


図6 He+O₂ の場合の芽胞菌殺菌時におけるプラズマジェット装置の構成

2.2. プラズマジェット装置による芽胞菌の殺菌
2.2.1. 実験方法

図5及び図6に芽胞菌殺菌試験時におけるプラズマジェット装置の構成を示す。図5のHeのみの場合はHeガス20 L/minを、図6のHe+O₂の場合はHeガス20 L/minとO₂ガス0.2 L/minの混合気体を、デジタル流量計に流入させ、流量を調整し、内径3 mm、外径6 mmの放電源へ導いた。なお、放電には6.25 kHzの高周波電源で駆動した。印加電圧はHeのみの場合は5.5 kV、He+O₂の場合は6.0 kVに調整し、プラズマジェットを生成した。

処理対象はガラス管下端より1 mm 下方に設置し処理を行った。処理時間は、基準液を0 minのものとし、6 min 間隔で最大30 minまで行った。湿度は被処理部の30 cm 上方で測定し、安定した値をもとに絶対湿度を算出した。

また、芽胞菌の希釈液作成手順を図7に示す。枯草菌芽胞液30 μlを滅菌水1 mlに希釈し、直径6 mmの寒天培地上に10 μl塗布後処理を行った。処理時間毎に処理を行った寒天培地を100 μlの滅菌水で希釈し、直径85 mmの寒天培地上に広げ、35 °Cに設定したインキュベーター内で48 時間培養してコロニーを十分に視認できるようにした。処理後の菌数はコロニーカウント法より求めた。コロニーカウント法とは、シャーレ上に培養されたコロニーの数を数え、菌数を算出する方法であり、1つのコロニーは1つの菌体が増殖して形成されると考えることができるので、コロニーの数を菌数として算出した。

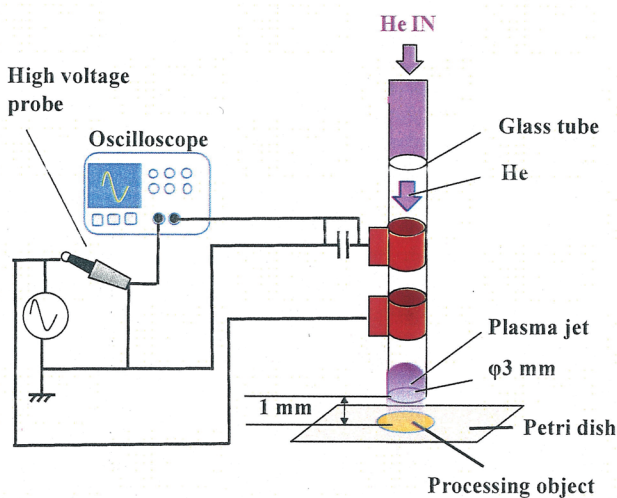


図5 He のみの場合の芽胞菌殺菌時におけるプラズマジェット装置の構成

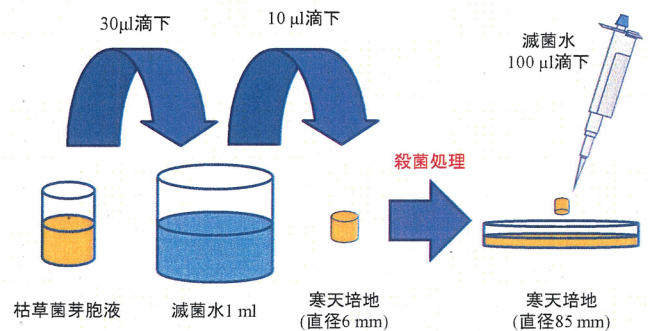


図7 芽胞菌の希釈液作成手順

2.2.2. 実験結果及び考察

表1及び表2に各処理条件におけるコロニー数及び、無処理(=0 min)のコロニー数を100%とした生存率を示す。また、図8に各処理条件における生存率の処理時間依存的分布を示す。同図より、処理時間の増加とともに生存率は指数関数的に減少していることが分かった。また、生存率が1/10の値になるまでの処理時間(D値)を算出すると、He

のみの場合は 11.9 min, He+O₂ の場合は 13.1 min となり, O₂ ガスを混合させた場合でも D 値は変化しないことが確認された。この原因として, O₂ ガスを 0.06% 混合させた場合最も殺菌効果が高くなるという報告⁽⁴⁾より, 0.2 L/min では, 混合比率が適切でなかったため, 顕著な殺菌効果の違いが確認されなかったことが考えられる。今後は, O₂ ガスの最適な混合比率を検討し, 殺菌試験を行う必要がある。

表 1 He のみの場合のコロニー数

処理時間[min]	コロニー数			生存率[%]
	384	473	548	
0	384	473	548	100
6	145	352		53.1
12	30	159		20.2
18	10	28		4.1
24	3	4		0.8
30	1	1		0.2

表 2 He+O₂ の場合のコロニー数

処理時間[min]	コロニー数			生存率[%]
	384	473	548	
0	384	473	548	100
6	264	191		48.6
12	13	129		15.2
18	30	36		7.0
24	2	1		0.3
30	1	9		1.1

ジカルの生成によって殺菌効率の向上が示唆された。芽胞菌を使用した殺菌試験では, He のみ, He+O₂ のどちらの条件においても処理時間の増加とともに生存率は指数関数的に減少したが, D 値に大きな差は確認されなかった。この原因として, 0.2 L/min の O₂ ガス混合では, 混合比率が適切でなかったため, 顕著な殺菌効果の違いが確認されなかったことが考えられる。

今後, O₂ ガスの最適な混合比率を検討し, 殺菌試験を行い, 作製した装置の有用性を確認すると共に, 本来の目的である軸腐病菌に対する殺菌試験及びマンゴー果実に対する防除試験を行う予定である。

参考文献

- 1) 澤岬哲也・比嘉淳：「果梗部熱処理法によるマンゴー軸腐病の防除」, 九病虫研究会報, Vol.60, pp.48-52(2014)
- 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) 高村紀充・王斗艶・佐藤崇雄・浪平隆男・斉藤寿仁・秋山 秀典：「細胞培地に対する大気圧 He プラズマジェットの影響」電気学会論文誌 A, Vol.133, No.5, pp.278-285(2013)
- 4) Tetsuya Akitsu・Hiroshi Ohkawa・Masao Tsuji・Hideo Kimura・Masuhiro Kogoma：「Plasma sterilization using glow discharge at atmospheric pressure」, Surface & Coatings Technology Vol.193, pp.29-34(2005)

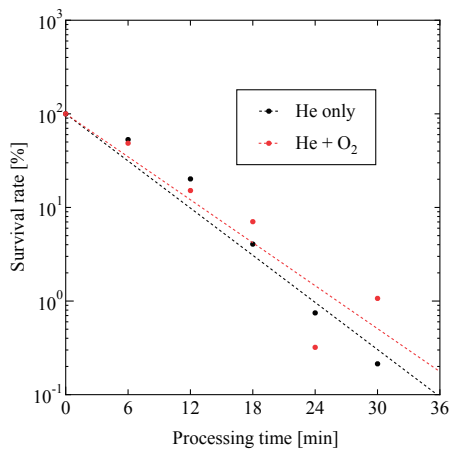


図 8 各条件における芽胞菌の生存率の処理時間依存

3. 結論

本報告では, プラズマジェット装置の有用性を確認するために, 遷移発光強度の測定を行った。次に, 芽胞菌を用いて, He のみ, He+O₂ との比較検討を行った。

その結果, 遷移発光強度の測定実験では, He+O₂ の場合, O 由来である 777 nm 付近の発光強度のピークが, He のみの場合と比較して約 3.5 倍であることが確認され, O ラ