

誘電体バリア放電を利用した殺菌装置における芽胞菌の殺菌

西村 豪志^{a)}・土田 潤一郎^{a)}・迫田 達也^{b)}

Sterilization of *Bacillus atrophaeus* Using Dielectric Barrier Discharge

Takeshi NISHIMURA, Junichiro TSUCHIDA, 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 made sterilization devices using dielectric barrier discharge. In order to confirm the usefulness of this device, we performed sterilization test with *Bacillus atrophaeus*. As a result, it was possible to obtain sterilization effect. Therefore, the usefulness of the device we made was confirmed.

Keywords: Apple Mango, Plasma, Dielectric Barrier Discharge, Sterilization, *Bacillus atrophaeus*

1. はじめに

現在、宮崎県では「儲かる農業の実現」を目的の一つに、新たな需要創出のため「フードビジネスの推進」を図っている。その理由として、宮崎県は農業産出額全国5位⁽¹⁾と農業が盛んであることが挙げられる。出荷量の多い青果物はきゅうり、マンゴー、ピーマン、さといもがあり、きゅうりは全国で1位、マンゴーとピーマンは2位、さといもは3位となっている⁽²⁾。そのため宮崎県は、食料供給基地として青果物などの販路拡大のために、大消費地である東京都や大阪府への搬送や海外への輸出拡大を推進している。

しかし、食料供給基地としての役割が大きい反面、大消費地である東京都や大阪府から遠隔であることが挙げられる。例えば陸運の場合、東京都へは約1400 km、大阪府へは約600 kmである。また、海外への輸出も行っている。そのため、物流に極めて不利な状況となり、鮮度保持が困難であることに加え、出荷から消費までの間にカビの発生や腐敗、その他の菌による病害の症状が現れる。この解決策として、出荷から消費の段階で病害を抑える手法としては農作物の収穫後に農薬を用いるポストハーベスト農薬があるが、これは食品衛生法により禁止されているため有効な手段は存在しない。

宮崎県の農産物として有名なマンゴーも鮮度保持及び病害の影響を受けている。マンゴーは全国の約3割のシェアを占めており、出荷量は1126 t/年である⁽²⁾。また、「太陽のタマゴ」としてブランド化しており、全国的にも有名である。しかし、マンゴーには「軸腐病」という病害が発生している。この病害は、収穫時には症状が全く現れず、食べごろといわれる収穫後3~5日の消費者のもとへ届く時期に軸周辺に現れる。そのため収穫時の選別ができず、クレームや信頼性を損ねる原因になっている。

以上を背景に、著者等は誘電体バリア放電を用いることで、マンゴー鮮度保持技術として応用を目指している。誘電体バリア放電(Dielectric Barrier Discharge)とは、オゾンナイザー放電とも呼ばれ、1857年にSiemensがオゾン合成するための方法として考案したことに端を発する⁽³⁾。現在では、空気清浄機などの家電製品に必須の機能として装備され、また有害物質の除外装置をはじめとするエネルギー・環境分野への産業応用が急速に進展している⁽⁴⁾⁽⁵⁾。さらに近年では、新領域における反応性プラズマの生成、バイオメディカル応用、新物質創成など、最先端のプラズマ科学を支える基本技術として重要な役割を果たしている⁽⁶⁾⁽⁷⁾。

本研究では、誘電体バリア放電によって発生させたO₃(2.07 V)や、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

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

殺菌を試みている。特にOHラジカルは、フッ素(2.89V)に次ぐ高い酸化電位を有しており、 O_3 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⁽⁸⁾⁽⁹⁾。また著者等は、誘電体バリア放電によるプラズマを直接照射することでも殺菌を試みている。プラズマの直接照射は、応用例は多数あるものの、放電プラズマと照射対象との基本的な相互作用メカニズムについては未だ未解明な点が多い⁽¹⁰⁾。

著者等は、誘電体バリア放電を用いた殺菌装置を二つ提案し、マンゴーに発生する軸腐病の防除を目指している。一つ目は、高湿度環境下で誘電体バリア放電を発生させることで O_3 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、プラズマミスト装置)である。二つ目は、誘電体バリア放電で発生した柱上のプラズマを直接照射することで殺菌を目指す装置(以下、バリア放電殺菌装置)である。

本報告では、作製したプラズマミスト装置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、ミスト無し)とミストの導入がある場合(以下、ミスト有り)との比較検討を行った。次に、作製したバリア放電殺菌装置の有用性を確認するために、同様の枯草菌芽胞液を用いて殺菌試験を行い、プラズマミスト装置の実験結果との比較検討を行った。

2. 実験

2.1. プラズマミスト装置による殺菌試験

2.1.1. 実験方法

図1及び図2にプラズマミスト装置の概要を示す。酸素ガスをデジタル流量計に流入させ、流量を調整し、放電源へ導いた。ミスト有りの場合は、混合容器内においてミスト発生装置により発生させたミストと酸素ガスを混合させた。放電源は、スライダック、高周波電源によって電圧を印加し、活性種を生成する。その後、ポンプで吸引しながら、紫外線吸光式のオゾンモニターによってオゾン濃度を測定した。濃度が安定するまでスライダックにより印加電圧を調整し、濃度が安定したら高周波電源を停止する。その後、実験開始と同時に高周波電源を稼働し、生成した活性種を処理部へ曝露する。

芽胞菌の希釈液作製手順を図3に示す。枯草菌芽胞液10 μ lを滅菌水1 mlに希釈し、直径6 mmの寒天培地上に10 μ l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 μ lの滅菌水で希釈し、直径85 mmの寒天培地上に広げ、35 $^{\circ}$ 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る。ここで、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ている。

オゾン濃度は、被処理部のオゾン濃度を基準とし、ミスト有り、無しそれぞれの場合において750 ppmになるように電圧を印加した。ミスト有りの場合は相対湿度を80%に調整した。また、処理時間においては、基準液をCT値=0 ppm \cdot minのものとし、3000 ppm \cdot min間隔で15000 ppm \cdot minまで行った。ここで、CT値とはオゾン濃度[ppm]と処理時間[min]の積であり単位は[ppm \cdot min]となる。よって理論上CT値はオゾンの絶対量を表すことになる。酸素は3.0 L/minの流量とし、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。

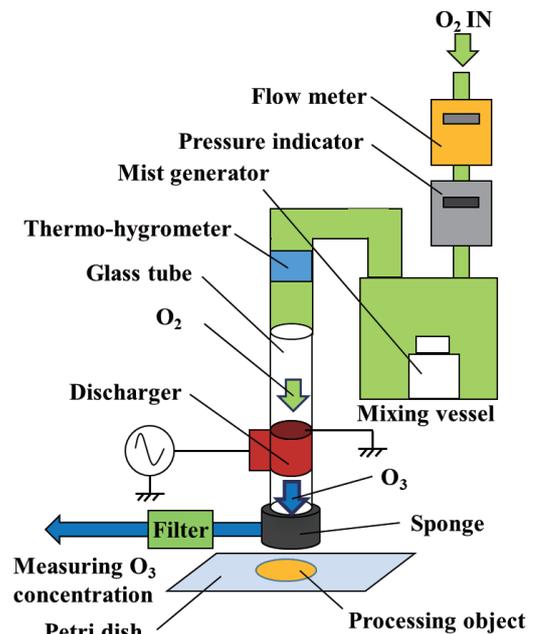


図1. プラズマミスト装置の概要(ミスト無し)

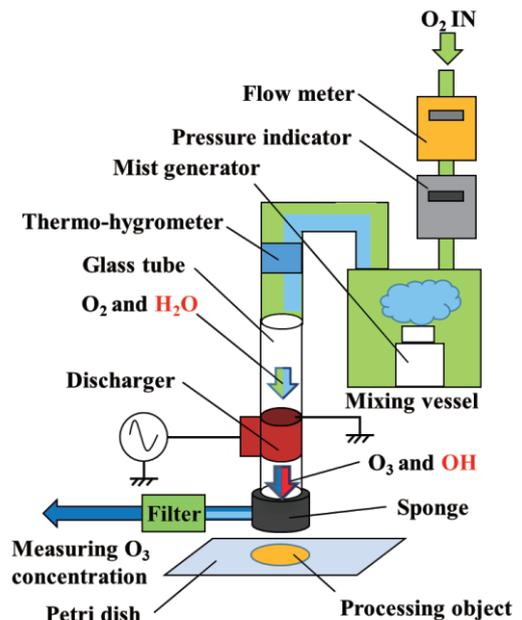


図2. プラズマミスト装置の概要(ミスト有り)

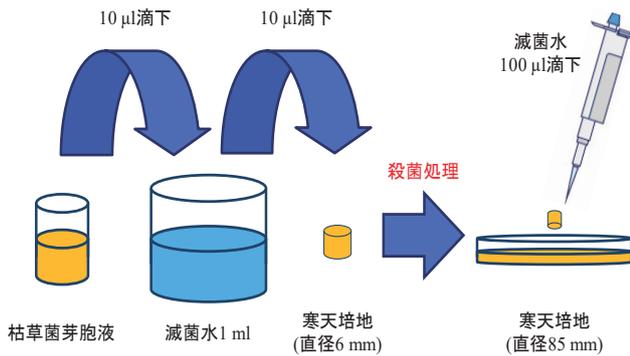


図 3. 芽胞菌の希釈液作製手順

2.1.2. 実験結果及び考察

表 1 に基準液を 100 %とした各条件における生存率の値を、図 4 に生存率の CT 値変化を示す。同図より、CT 値が大きくなるにつれて生存率が減少していることがわかる。従って、本実験装置において殺菌が可能であることが確認された。また、生存率 100 %から指数関数的に減少することが予想されたが、ある一定の CT 値までは顕著な殺菌効果が表れない期間（以下誘導期とする）があることが確認された。そのため、顕著な殺菌効果が表れない 3000 ppm・min までを誘導期とし、より正確な近似を行うため、これ以降の生存率の値から指数関数で回帰曲線を描いた。殺菌効果の比較には、CT 値が 3000 ppm・min における生存率から、その 10 分の 1 の生存率にするために必要な CT 値である値（Decimal Value:以下 D 値）を算出し、D 値が小さいほど殺菌効果が高いとした。ミスト無し、有りの場合の D 値を求めるとそれぞれ 9732, 7164 ppm・min となった。この結果より、殺菌効果はミスト有り > ミスト無しとなったことがわかった。

この要因として、ミストを添加したとことにより、OH ラジカルなどの酸化電位の高い活性種を多量に生成できたためと考えられる。また、誘導期が存在した原因は菌糸のもつ隔壁が原因であり、CT 値=3000 ppm・min 未満のオゾンに耐性があることで破壊に至るまで指数関数的な殺菌効果が表れなかったと考えられる。

表 1. 各条件における生存率

CT 値 [ppm・min]	ミスト無し [%]	ミスト有り [%]
0 (基準液)	100	100
3000	94.7	97.7
6000	51.7	18.9
9000	3.7	0.8
12000	6.2	1.0
15000	2.3	0.2

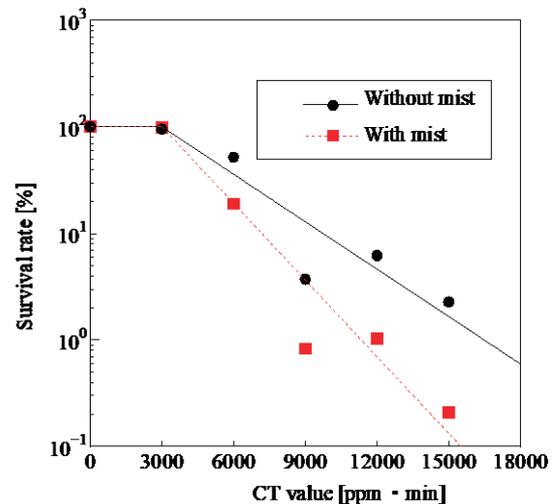


図 4. 各条件における生存率の CT 値変化

2.2. バリア放電殺菌装置による殺菌試験

2.2.1. 実験方法

図 5 にバリア放電殺菌装置の概要を示す。下端を密閉したガラス管内部に設置した針電極へ、周波数 10 kHz, 15 kVp-p の電圧を印加し、ガラス管下端 1 mm に設置した処理対象の寒天培地に曝露した。処理時間においては、0.5 min 間隔で最大 3 min 処理し、N 数は無処理で 3、処理したもので 2 とした。

芽胞菌の希釈液作製手順を図 6 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 7 µl 滴下後処理を行った。処理時間毎に処理を行った寒天培地を 70 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。

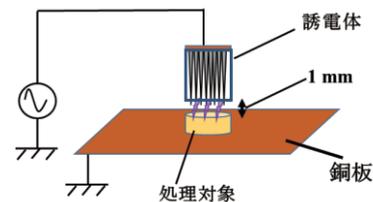


図 5. バリア放電殺菌装置の概要

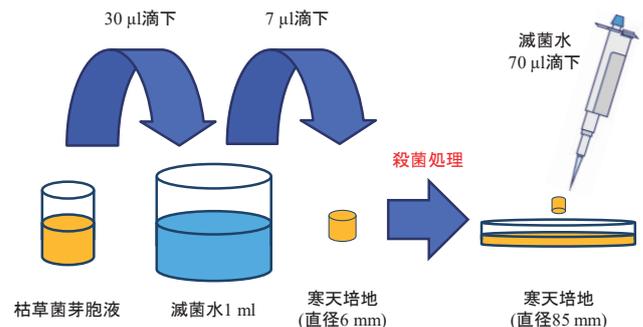


図 6. 芽胞菌の希釈液作製手順

2.2.2. 実験結果及び考察

表 2 に各処理条件におけるコロニー数及び、無処理を 100%とした生存率の値を示す。また、図 7 に各処理条件における生存率の CT 値変化を示す。同図より時間の経過とともに生存率が指数関数的に減少していることが分かった。また、D 値を求めると、2.13 min となることや、2 min 以降の全ての条件において D 値である生存率 10%以下を実現できていることなどから、本実験装置が高い殺菌能力を有することが確認された。

また、2.1 項で述べたプラズマミスト装置による殺菌試験結果と比較すると、同装置のミスト有りを用いて、バリア放電殺菌装置の D 値である 2.13 min で殺菌を実現するためには、ミスト有りの D 値が 7164 ppm・min であることから、3363 ppm のオゾン濃度が必要となる。しかし、3363 ppm もの高濃度オゾンは人体への影響を考慮すると実現は難しいため、短時間処理を目指す上では、バリア放電殺菌装置の方がより効果的な装置であると考えられる。

表 2. 各処理条件におけるコロニー数及び生存率

処理時間[min]	コロニー数			生存率[%]
	235	285	363	
0	235	285	363	100
0.5	122	114		40.1
1	110	243		60
1.5	145	188		56.6
2	17	0		2.9
2.5	21	23		7.5
3	23	4		4.6

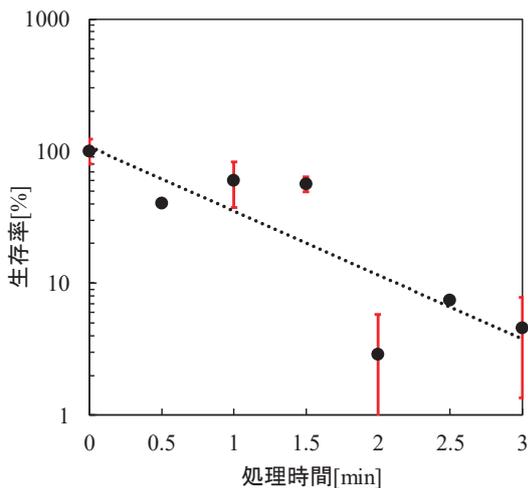


図 7. 各処理条件における生存率の経時変化

3. 結論

本報告では、作製したプラズマミスト装置の有用性を確認するために、枯草菌芽胞液を用いた殺菌試験を行った。次に、作製したバリア放電殺菌装置の有用性を確認するために、同様の枯草菌芽胞液を用いて殺菌試験を行った。

その結果、プラズマミスト装置による殺菌試験では、CT 値が大きくなるにつれて生存率が減少していることから、本実験装置が殺菌可能であることが示唆され、ミスト無し、有りの場合の D 値を求めるとそれぞれ 9732, 7164 ppm・min となったことから、殺菌効果はミスト有り>ミスト無しとなったことが分かった。この要因として、ミストを添加したとことにより、OH ラジカルなどの酸化電位の高い活性種を多量に生成できたためと考えられる。また、バリア放電殺菌装置による殺菌試験では、D 値が 2.13 min となることや、2 min 以降の全ての条件において D 値である生存率 10%以下を実現できていることなどから、本実験装置が高い殺菌能力を有することが確認された。また、プラズマミスト装置を用いて、バリア放電殺菌装置の D 値である 2.13 min で殺菌を実現するためには、3363 ppm のオゾン濃度が必要となるが、3363 ppm もの高濃度オゾンは人体への影響を考慮すると実現は難しいため、短時間処理を目指す上では、バリア放電殺菌装置の方がより効果的な装置であることが示唆された。

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、本来の目的である軸腐病菌の殺菌試験を行う予定である。

参考文献

- 1) 農林水産省：平成 28 年農業産出額及び生産農業所（都道府県別）：
<http://www.maff.go.jp/j/press/tokei/keikou/attach/pdf/171226-3.pdf>
- 2) 宮崎県：図説宮崎県の農業 2016：
https://www.pref.miyazaki.lg.jp/noseikikaku/shigoto/nogyo/documents/27106_20170116163617-1.pdf
- 3) U. Kogelschatz, Plasma Chemistry and Plasma Processing (2003)
- 4) 電気学会技術報告第 679 号「放電プラズマ化学における反応粒子とそのエネルギー」(1998)
- 5) 大久保雅章：「大気圧非平衡低温プラズマを応用した環境改善技術に関する最近の成果」, プラズマ・核融合学会誌(2007)
- 6) 小駒益弘監修：大気圧プラズマの生成制御と応用技術, サイエンス&テクノロジー(2006)
- 7) 橘 邦英・寺嶋和夫監修：マイクロ・ナノプラズマ技術とその産業応用（シーエムシー出版、2006 年）
- 8) 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)
- 9) 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)
- 10) 内田諭：「非平衡大気圧プラズマとの相互作用シミュレーション」, J. Plasma Fusion Res. Vol.92, No.9, pp. 700 (2016)