

Short Report

水蒸気混入大気圧低温ヘリウムプラズマを照射した寒天培地の

納豆菌芽胞に対する発芽促進作用

杉本尚哉¹，中屋双葉²，伊東直樹³

¹ 秋田県立大学システム科学技術学部機械工学科

² 元秋田県立大学システム科学技術学部機械知能システム学科（現 NEC ネットワーク・センサ（株））

³ 元秋田県立大学システム科学技術学部機械知能システム学科（現 （株）メイテック）

大気圧低温プラズマは、工業的応用だけでなく医療や農業、食品加工といった分野にまで利用されようとしている。殺菌や滅菌といった用途に加え、大気圧低温プラズマ処理がもたらす植物本体の成長促進効果、種子の発芽促進効果が注目されているが、詳しい発現理由は明らかではない。著者らは、大気圧低温ヘリウムプラズマを照射した寒天培地上で納豆菌を培養すると形成されるコロニーの数が増加することを見出した。その理由として、大気中に含まれる水蒸気がプラズマ中で分解されて生じる物質が重要な役割を果たすと考え、水蒸気を混入させたヘリウムガスの大気圧低温プラズマを寒天培地に照射したところ、更にコロニー数が増加する結果を得た。しかしながら、水蒸気を混入させたヘリウムガスの大気圧低温プラズマの発光分析では、水蒸気由来と考えられる原子・分子からの輝線の発光強度に大きな変化が見られないのに対し、窒素分子からの輝線の発光強度が大きく増加していることが分かった。水蒸気を混入した大気圧低温プラズマ照射により、Reactive Nitrogen Species (RNS) が寒天培地表面で生成され、納豆菌芽胞の発芽が促進される可能性が考えられる。

キーワード：大気圧低温ヘリウムプラズマ，寒天培地，コロニー数，発光分析，Reactive Nitrogen Species (RNS)

大気圧低温プラズマは、安価な簡易装置で発生することが可能であることから、材料表面処理のような工業的利用だけでなく、新たな応用への研究も世界中で盛んに行われている。大気圧低温プラズマ中では、プラズマを構成する粒子の内、電子の温度が 10^4K に達するのに対し、イオンや中性粒子の温度は室温程度の 10^2K 台のままである、「非平衡状態」が実現している。その特性を利用して、本体にダメージを与えることなく表面上に存在する細菌などの微生物を不活化する殺菌・滅菌への応用が研究されている。

一方、プラズマ等を利用して電氣的な刺激を植物や菌類、あるいはその種子等に直接与えることにより、成長が促進されることや発芽率が向上すること

も広く知られるようになった。さらに、プラズマを照射した土壌や水、液体肥料を使用することによる植物の成長促進も様々な実験により明らかになってきた。これらは、栽培期間の短縮による作物の早期収穫を可能とし、農業の生産性向上につながる技術的利点として注目を集めている。現在、研究の主眼はそのような現象の発現機構の解明に置かれている。プラズマの大気中照射においては、プラズマ発生用ガスに由来するものに加え、大気中に含まれる成分由来の化学的活性種の発生や電磁波放射も起こることから、複雑な機構であることが予想される。

本研究は、以上のことをヒントに、プラズマの殺菌効果を調べるために行っていた納豆菌の培養実験において大気圧低温プラズマの成長・発芽促進効果

を検証することを着想し、始めたものである。著者らは、納豆菌を培養する寒天培地を植物栽培における土壌とみなし、大気圧低温 He プラズマ照射行なって納豆菌を培養したところ、形成されるコロニー数が増加することを発見した。その発現理由を解明するための試みとして、大気中に存在する成分の中で変動させることが最も容易な H_2O の濃度を積極的に変化させることを考えた。一方で、 H_2O が分解されて発生するラジカルが重要な役割を果たしているのではないかと予想した。

本研究では、水蒸気を混入させた大気圧低温 He プラズマを照射した寒天培地上で納豆菌を培養し、形成されるコロニー数を調べた。さらに、水蒸気混入による大気圧低温 He プラズマの変化を発光分析により調査し、得られた結果から考えられる発現メカニズムについて考察する。

実験装置と実験方法

実験装置

図 1 に、本研究で使用した実験装置の概要図を示す。ボンベから供給される He ガスは、容量 1000ml のガス洗浄瓶に入れた蒸留水（（株）ニッポン・ジーン製脱イオン蒸留水（無菌））中へと導かれ、泡となって水面から放出される。He ガス流量は、20l/min である。ガス洗浄瓶への入口と出口のノズル部分は固定している。ガス洗浄瓶を出た He ガスは、外径

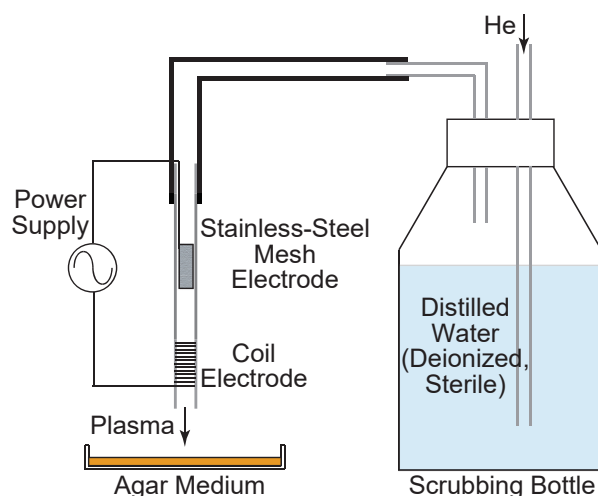


図 1 実験装置

7mm、内径 5mm のガラス管へと導かれ、ガラス管中のステンレスメッシュ電極と、ガラス管外周に巻かれたコイル状電極に接続された低周波高電圧電源（ロジー電子（株）製オゾン発生用高圧電源 LHV-13AC）で供給される 9~12kHz、10kV の交流電力により電離され、プラズマジェットとなって、ガラス管口より放出される。

実験方法

上述のプラズマジェットを培養皿中の寒天培地の表面上に照射する。寒天培地は、Heipha 製 SCD アガー（Tryptic Soy Agar ICR 30ml）である。ガラス管口と寒天培地表面との距離は 10mm、照射時間は 60s である。市販の納豆菌 0.1g 当たり 10ml の無菌蒸留水を加えて、菌液を作成した。照射後直ちに、寒天培地上全面にわたって、作成した菌液を 50 倍に希釈して 30 μl を塗布し、インキュベータ内にて 40 $^{\circ}\text{C}$ で 12h 培養したのち、形成されたコロニー数をカウントする。

また、プラズマジェットからの発光に対し、オーシャン光学社製マルチチャンネル分光器 FLAME-S（入射スリット幅 10 μm 、グレーティング 600mm $^{-1}$ ）を使用して発光分析を行う。

以上の実験を、ガス洗浄瓶中の蒸留水量を 0~600ml で変化させて行った。

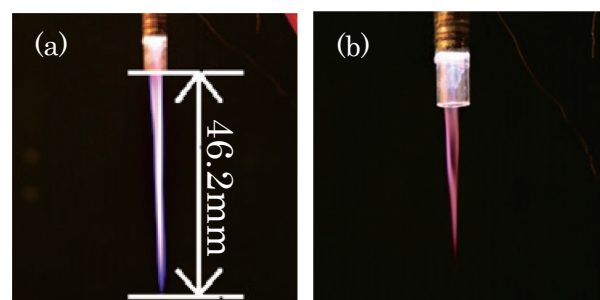


図 2 プラズマジェットの様子。 (a) 蒸留水無し、 (b) 蒸留水 300ml

実験結果

He ガスの蒸留水通過によるプラズマの変化

図2に、He ガスの蒸留水通過の有無によるプラズマジェットの様子の変化を示す。ガス洗浄瓶中に蒸留水無しの場合、プラズマジェットの長さは最大であり、約46mmに達するが、蒸留水を通してと、ガラス管口から放出されるプラズマジェットは短くなり、明るさも減少した。蒸留水量が多いほど、プラズマジェットはより短くなった。

形成されるコロニー数の変化

図3に、ガス洗浄瓶中の蒸留水量を変化させたときの、形成されるコロニー数の変化を、寒天培地にプラズマ照射しない場合に形成されるコロニー数に対する比（コロニー数比）として示す。ボンベからのHe ガスを直接寒天培地上に照射した場合でも、形成されるコロニー数は4%ほど増加した。しかし、ガス洗浄瓶中の蒸留水に通過させて水蒸気を混入したHe ガスをプラズマ化し、さらに照射箇所を増やした場合の方が、形成されるコロニー数の増加率がより高くなる傾向がある。今回得られた実験結果では、ガス洗浄瓶中の蒸留水量が350mlでコロニー数は最大となり、プラズマ照射しない場合の約150%となったが、蒸留水量が450ml以上ではプラズマ照射しない場合よりも少ないコロニー数しか形成されない場合も多かった。

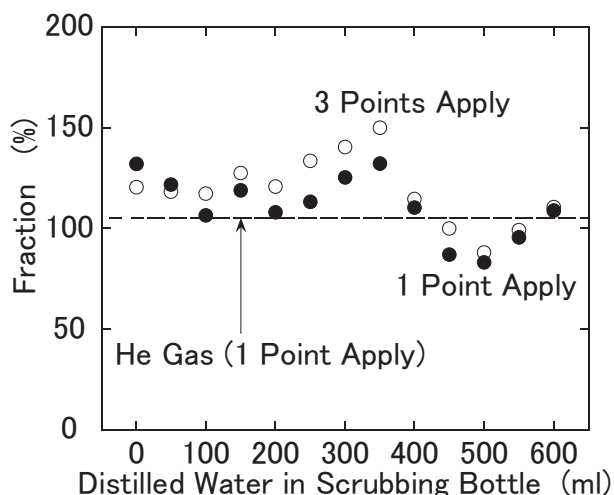


図3 コロニー数比のガス洗浄瓶中蒸留水量に対する変化

プラズマ発光スペクトルの変化

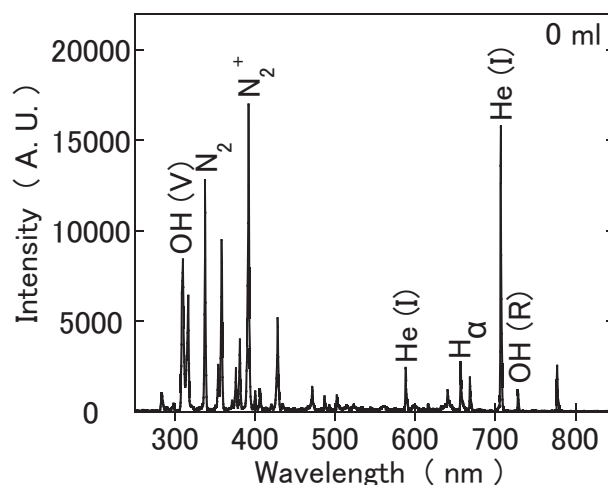


図4 ガス洗浄瓶中の蒸留水量が0mlの場合のプラズマ発光スペクトル

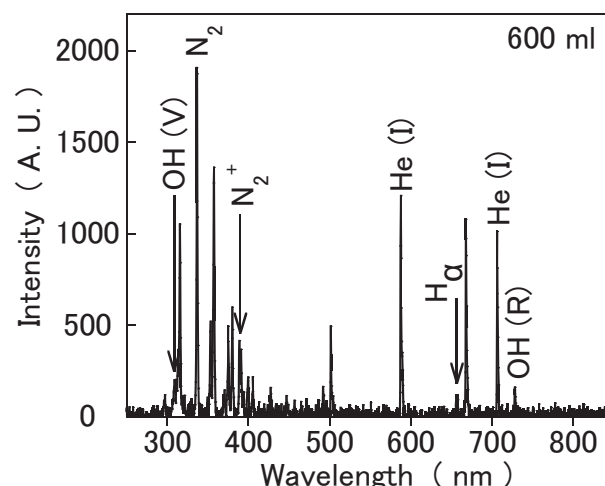


図5 ガス洗浄瓶中の蒸留水量が600mlの場合のプラズマ発光スペクトル

図4に、ガス洗浄瓶中に蒸留水が無い場合のプラズマの発光スペクトルを示す。He原子からのHe(I)輝線他、H原子からのH α 輝線、OHやN $_2$ など分子からの輝線、N $_2^+$ のような分子イオンからの輝線が見られる。特に、N $_2^+$ の波長391nmの輝線の発光強度は最大であり、He(I)の707nmの輝線よりも強い。一方、図5は、ガス洗浄瓶中の蒸留水が600mlの場合の、プラズマ発光スペクトルである。図4と比較すると、観測される輝線の種類に違いは見られない。しかし、発光強度の相対比は大きく異なる。発光強度が最大の輝線は、N $_2$ の波長337nmの輝線である。

He(I)の輝線の中でも発光強度の相対比は変化し、波長 588nm の輝線が波長 707nm の輝線よりも発光は強くなっている。

考察

図 6 に、OH と H_{α} の輝線の、He(I)の最大発光強度の輝線（波長 707nm）に対する発光強度比の、ガス洗浄瓶中の蒸留水量に対する変化を示す。上述のように、He(I)の最大発光強度の輝線は蒸留水量の増加に伴って変化するため、蒸留水量が 200ml 以下では波長 707nm の輝線に、250ml 以上では波長 588nm の輝線に対する発光強度比を取っている。白丸が OH の波長 309nm 輝線（OH(V)と記載）、黒丸が OH の波長 728nm 輝線（OH(R)と記載）、白四角が H_{α} の波長 657nm 輝線の各値である。OH および H は、 H_2O に由来するものと考えられるが、He ガスが通過する蒸留水量の変化に対してはあまり大きく変化していない。

一方、図 7 は、 N_2^+ と N_2 の輝線の、He(I)の最大発光強度の輝線に対する発光強度比の、ガス洗浄瓶中の蒸留水量に対する変化を示す。白丸は N_2^+ の波長 391nm、黒丸は N_2 の波長 337nm の輝線の各値を示しており、いずれも N_2^+ と N_2 の輝線の中で最大発光強度となっている。これらの輝線は、勿論大気中に最も多く存在する N_2 に由来するものと考えられる。He ガスが蒸留水を通過しない場合、 N_2^+ の輝線の方

が N_2 の輝線よりも発光強度比が大きいのにに対し、蒸留水を通過する場合には N_2^+ の輝線の発光強度比は減少し、 N_2 の輝線の発光強度比は急激に増加している。

図 6 と図 7 に示す結果より、納豆菌芽胞の発芽促進に影響を及ぼしているのは、OH や H などの H_2O 由来のラジカル種ではなく、 H_2O の混入により増加した励起窒素分子であると考えられる。励起状態にある窒素分子が寒天培地表面に到達してその構成分子と相互作用することにより、比較的容易に Reactive Nitrogen Species (RNS) が生成され、寒天培地表面上に広く分布することが予想される。RNS は微生物に強く作用することがわかっているため、納豆菌芽胞の発芽促進を引き起こしたのではないかと考えられる。

図 7 では、蒸留水量に対する N_2 の発光強度比の変動はかなりばらつきが大きい。一方、図 3 でも形成されるコロニー数比の変動のばらつきが大きくなっている。このことから、励起窒素分子が大きく影響していると推測される。詳細な素過程を明らかにするには、 H_2O の混入が励起窒素分子の急増を引き起こすメカニズム解明とともに、更なる研究が必要である。

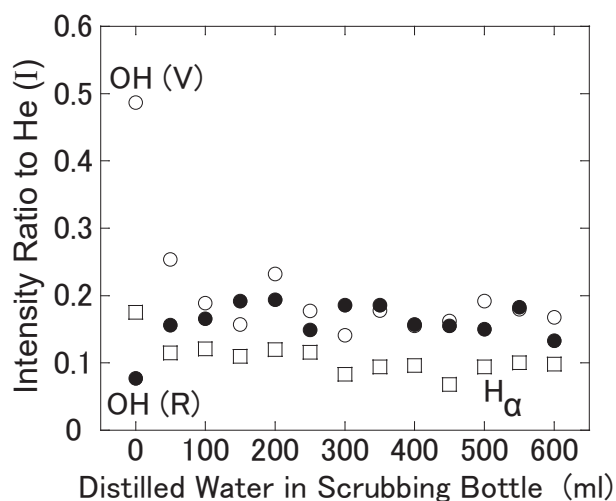


図 6 OH と H の輝線の He(I)の輝線に対する発光強度比のガス洗浄瓶中の蒸留水量に対する変化

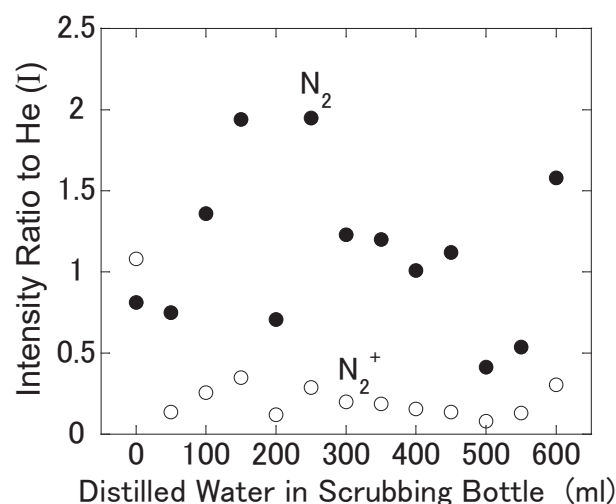


図 7 N_2^+ と N_2 の輝線の He(I)の輝線に対する発光強度比のガス洗浄瓶中の蒸留水量に対する変化

結論

水蒸気混入大気圧低温 He プラズマを照射した寒天培地上で納豆菌芽胞を培養すると、形成されるコロニー数が増加することが確認された。プラズマの発光スペクトルを解析したところ、OH や H など水蒸気由来の分子や原子からの輝線の発光強度については、水蒸気混入による大きな影響は見られなかった。一方、N₂ の輝線の発光強度は水蒸気混入により大きく変化しており、励起窒素分子が寒天培地表面で RNS を生成し、それにより納豆菌芽胞の発芽が促進されたと考えられる。

文献

- Ji, S., H., Kim, J., S., Lee, C., H., Seo, H., S., Chun, S., C., Oh, J., Choi, E., H. and Park, G. (2019). Enhancement of Vitality and Activity of a Plant Growth-Promoting Bacteria (PGPB) by Atmospheric Pressure Non-Thermal Plasma. *Scientific Reports*, (2019)9: 1044.
- NIST Atomic Spectra Database,
https://physics.nist.gov/PhysRefData/ASD/lines_form.html
- Pearse, R., W. and Gaydon, A., G. (1976). *The Identification of Molecular Spectra*, John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Zhang, S., Rousseau, A., and Dufour, T. (2017). Promoting Lentil Germination and Stem Growth by Plasma Activated Tap Water, Demineralized Water and Liquid Fertilizer. *Royal Society of Chemistry Advances*, 2017(7), 31244-31251.

〔 2019 年 6 月 30 日受付 〕
〔 2019 年 7 月 9 日受理 〕

Enhanced Spore Germination of *Bacillus subtilis* var. *natto* on Agar Medium Applied with Steam-Helium Mixture Atmospheric Pressure Low Temperature Plasma

Masaya Sugimoto¹, Futaba Nakaya², Naoki Itoh³

¹ Department of Mechanical Engineering, Faculty of Systems Science and Technology, Akita Prefectural University

² Former student of Department of Machine Intelligence and Systems Engineering, Faculty of Systems Science and Technology,
Akita Prefectural University (Presently at NEC Network and Sensor Systems, Ltd.)

³ Former student of Department of Machine Intelligence and Systems Engineering, Faculty of Systems Science and Technology,
Akita Prefectural University (Presently at MEITEC CORPORATION)

Atmospheric pressure low temperature plasma applications have been spreading not only for conventional industrial purposes but also in the medical, agricultural and food processing fields. In addition to pasteurization or sterilization effects, these plasmas are being paid much attention because they can accelerate plant growth and promote seed germination, while the detailed mechanisms of such phenomena have yet to be clarified. Previously, authors observed more colonies were formed on agar medium exposed to an atmospheric pressure low temperature helium plasma in a cultivation experiment using *Bacillus subtilis* var. *natto*. In this study, a similar experiment with steam-helium mixture plasma was performed because materials originating from water in the atmosphere are expected to play an important role and result in more colony formation. However, a spectral analysis of the steam-helium mixture plasma showed a small variation in emission intensities from the matter originating from water compared to pure helium. Instead, the emissions from nitrogen molecules drastically increased. The results obtained indicate that reactive nitrogen species (RNS) were possibly synthesized on the agar medium surface and may enhance spore germination.

Keywords: Atmospheric pressure low temperature helium plasma, Agar medium, Colony counts, Spectral analysis, Reactive Nitrogen Species (RNS)