

バリア放電とエレクトロポレーションのハイブリッド処理 による植物種子内部の殺菌

所属：愛媛大学大学院 理工学研究科

助成対象者：門脇 一則

共同研究者：野澤 彰

概要

農業の分野において、植物種子内部の病原菌を殺菌処理するための技術開発は実用上重要である。最近、農薬や温湯を用いた従来法に代わって、電気的手法による殺菌方式が注目されている。本研究では、誘電体バリア放電(DBD)とエレクトロポレーションのハイブリッド処理によって、トマトかいよう病菌を含む植物種子内部の殺菌を試みた。大気圧では実現困難な内部殺菌を、高気圧環境下での高電圧処理により実現し、従来法と比較して高い殺菌率を得た。さらに、種子の発芽率や成長への影響が少ない条件を明らかにし、環境に優しい乾式殺菌技術としての実用化の可能性を示した。

abstract

In agriculture, developing technology to sterilize pathogens inside plant seeds is of great practical importance. Recently, electrical sterilization methods have attracted attention as an alternative to conventional pesticide and hot water methods. This study aimed to sterilize the inside of tomato seeds using a hybrid method of dielectric barrier discharge (DBD) and electroporation. The process was conducted under high pressure and high electric field, which improved the penetration of reactive species and

electric field effects into the seed interior. As a result, a significant reduction in viable bacteria was observed without any notable negative impact on seed germination. This suggests that this dry sterilization technique is effective and practical for agricultural applications.

研究内容

1. 背景

農業分野では、種子内部に侵入した病原菌による被害が深刻な課題である。特にトマトかいよう病菌は、種子表面のみならず内部にも存在するため、従来の温湯や薬品による処理では完全な殺菌が困難である。本研究では、空気中でも有効に作用する放電処理と高電界によるエレクトロポレーションの併用により、乾式で内部殺菌を実現する手法の開発を目指した。過去の研究事例において、かいよう病菌に汚損されたトマト種子に対して大気圧プラズマを用いた放電処理を施すことにより、種子表面層近傍のかいよう病菌が殺菌されることが報告されている。しかしながら、気相での放電プラズマが種子の内部に残存する菌類にどのような物理過程によりどのような影響を及ぼすのかについては明らかにされていない。

2. 目的

本研究の目的は、高気圧高電界下での放電処理による内部残存菌の不活化の機序を明らかにするとともに、それに基づく新しい殺菌処理技術を実用化することである。

3. 目的を達成するための手段

本研究では以下に示す検討項目（1）から（5）に沿って研究を進めた。

- （1）光るかいよう病菌による可視化：GFP プラスミドを導入したかいよう病菌をトマト種子に含浸し、放電処理後の蛍光観察によって殺菌効果を可視化した。
- （2）電界処理の周波数最適化：ガラス板で挟んだ菌に正弦波電圧を印加し、周波数と殺菌効率の相関を調べた。
- （3）高気圧ハイブリッド処理装置の製作：最高 0.4MPa の気圧下で DBD を発生させる高気圧放電処理装置を開発した。

(4) 殺菌効果と電力評価：各条件下での菌生存率および投入電力を測定し、従来法との効率を比較した。内部までかいよう病菌に汚染されたトマト種子に放電処理を施した後、種子を液体培地内でペースト状にすりつぶし、その希釈液をプレート状に撒いて、コロニーカウント法にて菌の生存率を定量評価した。

(5) 発芽特性の評価：発芽率や発芽勢（Shoot 長）を処理後 14 日間追跡し、育苗に対する影響を調査した。

4. 結果

かいよう病菌を含む種子の表面を塩水で洗浄し、その洗浄液に含まれる菌数から表皮付近の付着菌数を計測し、さらに洗浄後の種子をペースト状にして、種子内部に侵入した菌数を計測した。各領域の生菌数（CFU/粒）を図 1 に示す。棒グラフの高さは生菌数の平均値（ $n=3$ ）であり、エラーバーは測定値の最大と最小を表している。種子の表面付近の菌数と内部に染み込んでいる菌数を比較したところ、表面から $10^5 \sim 10^6$ CFU/粒、内部から $10^6 \sim 10^7$ CFU/粒のかいよう病菌が検出された。すなわち、10 分間の表面洗浄で食塩水に洗い出された菌数の割合は全体のたかだか

1 割程度しかなく、大部分は種子内部に残っていることがわかった。

表皮付近および内部のそれぞれにおける大気圧 DBD 処理時間と残存率との関係を図 2 に示す。表面付近の菌の残存率は 180 分間で 4 桁ほど低下し、処理時間の増加と共に残存率が減少する傾向がみられた。一方、内部侵入菌の残存率は 180 分間で 2 桁ほどの低下にとどまった。ここで注目すべきは、内部の菌類に対する、60 分以降の不活化率が非常に低いという事実である。このことは、内部深くのある領域に存在する、比率にして数パーセントの残存菌を死滅させることが非常に難しいということを示唆している。た

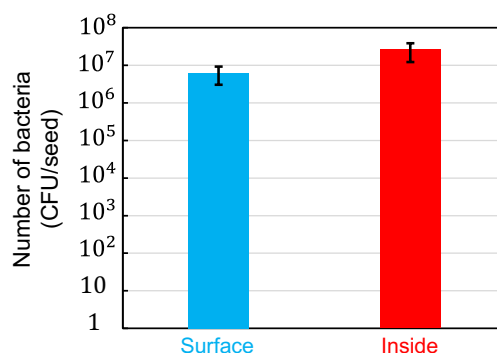


図 1 かいよう病菌に人口汚損された種子における表面近傍の菌数と内部の菌数

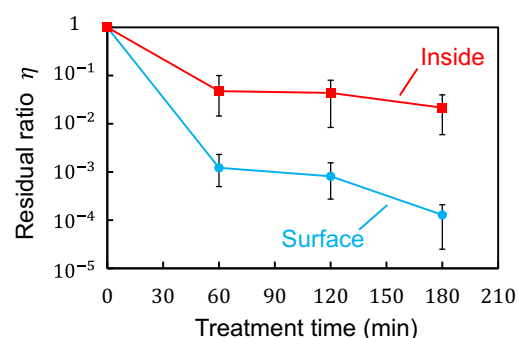


図 2 大気圧 DBD による放電処理時間と菌の残存率との関係（赤：内部，青：表面）

だし見方を変えれば，内部の菌に対し DBD は無意味ではなく，9 割以上は不活化できていることをこの結果は示している。

形質転換後の菌を含んだ汚損種子断面に対し，白色光照射下で撮られた写真を図 3 (a) と図 3 (c) に示し，UV 照射により発せられた 530 nm の蛍光写真を図 3 (b) と図 3 (d) に示す。

図 3 (a) (b) 中の 4 個の種子のうち，上段の 2 個は，DBD 処理前の汚損種子であって，上段左側の control (+) は形質転換された菌を含む種子であり，右側の control (-) は形質転換されていない菌を含む種子である。すなわち control (-) から発せられる蛍光は菌からではなく種子自身から発せられる自家蛍光であることを示している。一方，下段の 2 個は，control (+) に対して DBD 処理した後の種子である。図中の時間は DBD 処理時間を意味し，図 3 (b) 中の赤い矢印は蛍光が確認された箇所を指している。図 3 (b) の上段の 2 個を比べると，種子断面中央の胚軸や子葉のある領域に，形質転換された菌が広く分布していることがわかる。このことは，形質転換された菌が含浸処理により種子の中心部深くにまで浸透していることを示している。ここで注目すべきは，図 3 (b) 下段の 2 個における，胚軸部や子葉部の蛍光がほぼ失われているという事実である。しかしながら完全な蛍光消失には至っておらず，胚軸や子葉と胚乳の境界がわずかに光っている。図 3 (c) と図 3 (d) の種子は，50 粒の control (+) に対して 180 分間の DBD 処理を施した後，任意に取り出された 3 粒である。いずれの種子においても，蛍光は大きく失われており，矢印で示された残存箇所は，いずれにおいても境界に位置している。さらに我々は同様の実験を 4 回繰り返し，結果に再現性があることを確認して

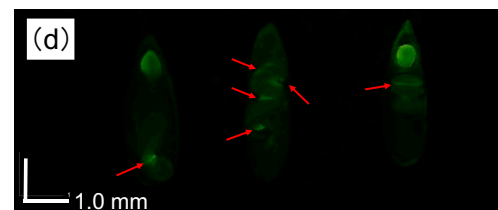
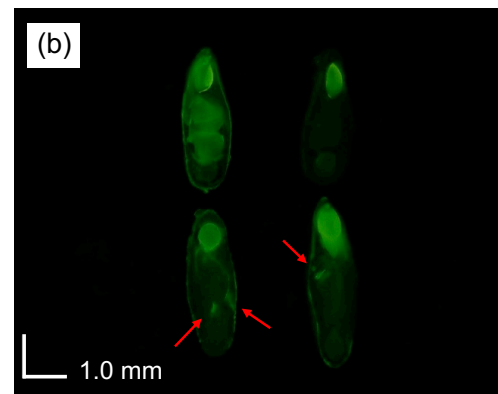
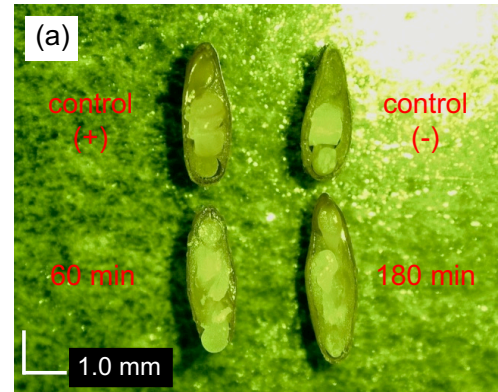


図 3 かいよう病菌に人口汚損された種子断面の蛍光写真，(a) と (c) は白色 LED 照明，(b) と (d) は励起 LED 照明，図中赤字の時間は放電処理時間

いる。蛍光は失われつつも完全には消失していないという事実は、180 分の処理でも残存率が 10^{-2} にとどまるという前節の結果とよく対応している。

次に、4 気圧下での DBD 処理における処理時間と、かいよう病菌の残存生菌率との関係を図 4 に示す。この実験では、最大 18kV で周波数 50Hz の正弦波交流高電圧を最長 3 時間印加している。これまでの研究において、大気圧での DBD 処理では生菌率の低下は 2 桁程度であった。これに対し、4 気圧の窒素雰囲気における生菌率（オレンジ色のプロット）は 3 桁程度低下し、さらに酸素濃度が 5% となるように酸素を付加した場合（青色のプロット）、180 分間の処理で生菌率は 4 桁低下した。

4 気圧での 180 分の DBD 処理によるトマト種子の発芽率を図 5 に示す。窒素雰囲気中（オレンジ色のプロット）の場合、14 日後の発芽率は約 90% に達している。この値は未処理品（黒色のプロット）のそれと同等である。注目すべきは 7 日目から 9 日目にかけての発芽率は、未処理よりも高いという事実である。この事実は、高気圧下での DBD 処理が、殺菌効果を有するだけでなく、発芽促進効果も有していることを示唆している。ただし、過剰な放電処理や、それに由来するオゾン障害は、種子の発芽と成長を抑制することが知られている。酸素 5% を付与した場合（青色のプロット）は未処理よりも低いという事実は、従来の知見と合致している。いずれにせよ以上の結果は、高気圧高電界下での DBD 処理が、種子内部の殺菌に有効に作用していることを示している。今後は、雰囲気、電圧の周波数、温度などのパラメータの最適化をすすめ、発芽率を低下させることなく内部まで滅菌することを目指す。

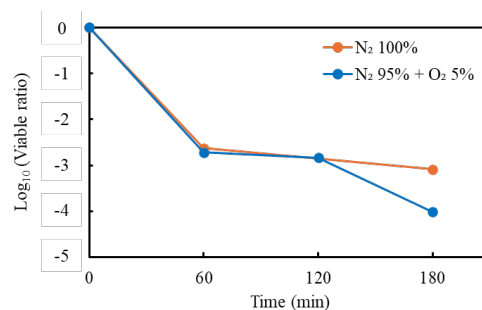


図 4 高気圧下での DBD 処理時間と残存生菌率との関係

5. 今後の展開

本研究は、気相環境下での種子内部殺菌という未開拓領域において有効な技術を示し、農薬や温湯を使わない乾式処理の可能性を拓いた。今後は、処理装置の小型化・自動化を図り、トマト以外の主要作物種子への展開を視野に入れて事業化を推進していく。

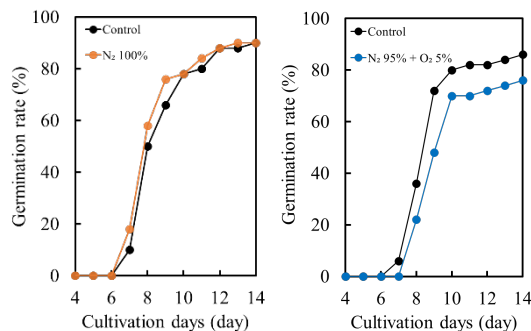


図 5 高気圧 DBD 処理された種子における栽培日数と発芽率との関係

6. 本助成に関わる成果物

[論文発表]

- ・ 福積舜起, 弓達新治, 尾崎良太郎, 野澤 彰, 門脇一則:「かいよう病菌を含むトマト種子に対する放電処理後の断面生菌分布観察」, 電気学会論文誌 A, Vol. 145, No. 4, pp. 99-104 (2025 年 4 月)

[口頭発表]

- ・ 福積舜起, 弓達新治, 尾崎良太郎, 野澤 彰, 門脇一則:「大腸菌により内部汚染されたトマト種子に対する誘電体バリア放電処理効果の可視化」, 令和 6 年電気学会全国大会, 1-073, 徳島大学, 2024 年 3 月 14 日
- ・ 村上 龍一, 田中 来, 村上 叶, 門脇 一則, 尾崎 良太郎, 弓達 新治, 野澤 彰: トマトかいよう病菌の電界殺菌における加熱との複合処理の効果, 令和 6 年電気学会全国大会, 1-074, 徳島大学, 2024 年 3 月 14 日
- ・ 村上龍一, 弓達新治, 尾崎良太郎, 野澤 彰, 門脇一則:「高気圧かつ高電界下で DBD 処理されたトマト種子の発芽特性」, 令和 6 年電気学会基礎・材料・共通部門大会, 2-P1-5, 愛媛大学, 2024 年 9 月 2 日
- ・ 村上 叶, 村上龍一, 弓達新治, 尾崎良太郎, 野澤 彰, 門脇一則:「高気圧高電界下での誘電体バリア放電によるトマト種子内部の殺菌処理」, 令和 7 年電気学会全国大会, 1-093, 明治大学, 2024 年 3 月 19 日