

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：13903

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05902

研究課題名（和文）萎凋病対策に向けた水耕栽培用培養液の非熱プラズマ殺菌技術の開発

研究課題名（英文）Development of non-thermal plasma sterilization technology for hydroponic nutrient solution for measures against wilt disease in a plant factory

研究代表者

安井 晋示 (Yasui, Shinji)

名古屋工業大学・工学（系）研究科（研究院）・教授

研究者番号：30371561

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：植物工場における水耕栽培用培養液の大気圧低温プラズマを用いた殺菌技術を開発した。夏期のホウレンソウなどの薄膜水耕栽培における萎凋病の病原菌であるフザリウム菌とピシウム菌について、培養液中へのプラズマ照射によって完全に殺菌できることを初めて明らかにした。各種の対照実験によって殺菌メカニズムを解明し、溶液中に生成されるOHラジカルが極めて大きな殺菌要因であることを明らかにした。培養液への菌の汚染は、苗の定植時において人を介して根から侵入する。ホウレンソウ水耕栽培による実証実験において、苗の定植前と定植後のいずれにおいても、5分程度の短時間のプラズマ照射によって、萎凋病を防除できることを解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

培養液中へのプラズマの直接照射により、薄膜水耕栽培での萎凋病の病原菌であるフザリウム胞子とピシウム菌を殺菌できることを世界で初めて実証した。特に、植物工場では培養液の成分が変質しないことが重要であり、この技術はアルゴンプラズマの照射により、溶液中のH₂Oから殺菌力の強いOHラジカルを生成し、殺菌に寄与した後は、即座にOHラジカルが消滅する利点がある。植物工場水耕栽培で大きな課題となっている病原菌の侵入に対して、初めて期待に沿える技術となる。病原菌の侵入は苗の定植時に生じるが、その前後に数分程度のプラズマ照射で防除できることも世界で初めて示した。

研究成果の概要（英文）：We have developed a sterilization technology using low temperature atmospheric pressure plasma of a nutrient solution for nutrient thin film hydroponics in a plant factory. We have firstly shown that *Fusarium oxysporum* and *Pythium aphanidermatum*, which are the pathogenic bacteria of wilt disease in thin-film hydroponics such as spinach in summer, can be completely sterilized by plasma irradiating to the nutrient solution. The sterilization mechanism was elucidated by various control experiments, and it was clarified that the OH radical generated in the solution is an extremely large sterilization factor. Bacterial contamination of the culture medium invades from the roots with human intervention during planting of seedlings. In a demonstration experiment using spinach hydroponics, it was clarified that wilt disease can be controlled by short-term plasma irradiation of about 5 minutes both before and after planting seedlings.

研究分野：電力工学

キーワード：大気圧プラズマ 殺菌 培養液 液中プラズマ 植物工場 萎凋病

1. 研究開始当初の背景

野菜工場で生産された野菜は、環境制御された工場栽培のため露地栽培の野菜と比較して大幅に菌数が少なく、安心、安全である一方で、一度工場内で菌が発生してしまうと大量発生に繋がりがやすく、殺菌の為に一時的に操業停止しなければならないなどのリスクも抱えている。従来、この病原菌の殺菌には、オゾン水や紫外線などが用いられている。しかし、これらの殺菌方法では、養液成分の変性やクロロシスといった成長阻害が生じることが問題となっており、培養液成分の変性に影響しない殺菌技術が強く求められている。

我々は、この課題を解決するため、大気圧低温プラズマによる殺菌技術を提案し、培養液成分を変性させない不活性のアルゴンガスを用いた殺菌手法を開発した。(特許：第 6350986 号) これまでに、プラズマ照射によるフザリウム菌の殺菌メカニズムの解明、培養液の pH, EC などの経時変化に影響がないこと、レタス栽培における生育に影響がないことなど数多くの研究成果を得てきた。

2. 研究の目的

植物工場における培養液の殺菌技術として、大気圧低温プラズマ技術を適用するために、実用化に向けた以下の課題を明らかにする。

(1) 適用菌種の拡大

夏季のハウレンソウ栽培における萎凋病の病原菌として芽胞菌のフザリウムを対象としてきたが、より大きな被害をもたらす遊走子のピシウム菌の殺菌特性を解明する。

(2) 生育環境における防除効果の検証

これまでレタスの薄膜水耕栽培でのプラズマ照射による生育影響を評価してきた。植物工場における病原菌の混入は、苗の定植時において混入リスクが高い。そこで、薄膜水耕栽培時での苗の定植前および定植後でのプラズマ照射による病原菌の防除効果を検証する。

(3) プラズマ照射条件の最適化と経済性評価

培養液に対する大気圧低温プラズマの照射方法として、これまで少量の溶液に対する照射実験により殺菌特性を検証してきた。実用化に際しては、大容量の培養液に対して効果的かつ効率的に殺菌する必要がある。そこで、大容量処理に適したプラズマ照射電極の開発と評価、および実用システムの経済性を評価する。

3. 研究の方法

(1) 適用菌種の拡大

P. aphanidermatum 遊走子(菌株:GU18TBWL2F)の懸濁液を作製し、照射時間を変化させてプラズマ照射を行う。プラズマ照射前および照射後の懸濁液を 1 mL ずつ採水し、これを、*Pythium* 遊走子を選択的に培養できる NARM 培地(19)に広げ、25 °C で培養し、1 時間毎に計 4 回、培地内の無作為な場所を 10 箇所程度選んで顕微鏡下で撮影する。顕微鏡観察結果から統計処理を行い、発芽率を算出する。また、採取した懸濁液を 25 °C で 24 時間培養した後の菌糸の発達を、①培地表面全体を菌糸が覆っている状態、②培地上にコロニーが点在しておりコロニーとして数えられる状態、③菌糸を確認できない状態、の 3 段階の発達スコアで評価し、プラズマ照射による殺菌特性を評価する。また、同様の方法で、比較実験として、アルゴンガスの吹き付け、プラズマからの発光、溶液温度上昇、過酸化水素(H₂O₂)濃度の影響を評価する。

(2) 生育環境における防除効果の検証

13 L の生育容器を使用し、培養液を 6 L/min で循環させてハウレンソウを 15 株を生育する。その際、種子を発芽させた後、スポンジ培地にて根の長さが 5 cm 程度になるまで栽培し、大きさが揃った苗を選別する。選別した苗を予めバットに用意した 1.0×10^4 cfu/mL の濃度のフザリウム混濁液(種別:*Fusarium oxysporum* f. sp. *Spinaciae*)に、苗の根のみを 60 分間浸して感染させる。その後、生育容器に定植し、その際、1 株ずつ順番に根に対して照射時間を変えてプラズマ照射を行う。ここで、プラズマ照射は定植時の 1 階のみ行う。14 日間生育させたハウレンソウを収穫し、葉の枚数、長さ、重さ、根の重さ、生育障害の有無を評価する。萎凋病の感染状態は、葉については、「枯れ萎え」、「黄変」を確認し、根については、「黒褐色変」、「導管詰まり」を確認する。これらいずれかの症状が出た場合に病害が発生したと判断する。なお、栽培実験では、コントロール(C)と、感染区画(C+F)、プラズマ処理区画(C+F+P)の 3 区画で同時に栽培し、プラズマ処理時間を変えて合計 3 回行う。

(3) プラズマ照射条件の最適化と経済性評価

大容量の培養液をプラズマ照射するための照射電極の最適化を行う。沿面放電型プラズマ電極とバリア放電型プラズマ電極を作製し、*P. aphanidermatum* 遊走子の殺菌実験を行う。照射時間に対する殺菌特性を比較評価し、培養液容量に対するプラズマ照射装置およびランニングコストを評価する。

4. 研究成果

(1) 適用菌種の拡大

図 1 に、プラズマ照射後に採取した懸濁液の 4 時間までの培養時間に対する発芽率を示す。懸濁培養液の 1 時間培養後の発芽率は、プラズマ処理を行わなかった場合は 71 %であり、培養時

間の経過に伴い発芽率が上昇し、4 時間後には 97 % に達した。一方、プラズマ処理を行った場合は、時間の経過による発芽率の上昇は確認できず、4 時間培養後の発芽率は、5 分処理では 15 %、10 分処理では 5.7 %、15 分処理では 5.0 % となり、発芽率を大幅に抑制できた。

図 2 に、25 °C で 24 時間培養した後の NARM 培地を観察した結果を示す。5 分のプラズマ照射では遊走子を完全に死滅させることができず、コロニーが培地全体に広がって形成された。他方、10 分もしくは 15 分のプラズマ照射では、コロニーが数か所もしくは全く確認できない状態まで遊走子を殺菌できている。

また、プラズマ照射に伴うガス吹き付け効果、プラズマ発光、温度上昇、 H_2O_2 濃度の発芽率抑制効果と比較した結果、 H_2O_2 濃度が発芽率抑制に寄与することが確認できた。しかしながら、その発芽率抑制効果はプラズマ照射ほど高くない。さらに、蒸留水、培養液、そして、OH ラジカルをトラップする NaTA 溶液を用いた *P. aphanidermatum* 遊走子のプラズマ照射殺菌実験を行った結果、NaTA 溶液では殺菌効果が低下したことより、プラズマ照射によって液中で生成される OH ラジカルが殺菌に大きく寄与することが示唆された。

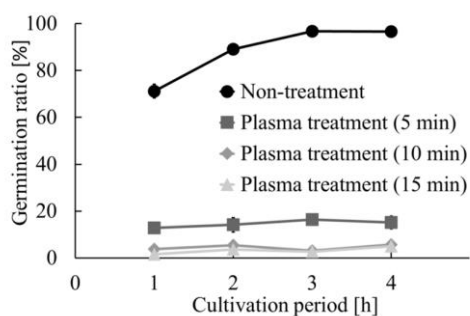


図 1 プラズマ照射懸濁液の培養時間に対する発芽率の変化

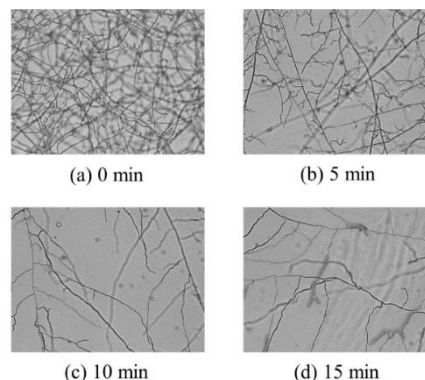


図 2 24 時間培養後の NARM 培地での菌糸の発育状態

(2) 生育環境における防除効果の検証

図 3 にコントロール、フザリウム菌汚染区、プラズマ処理区における 14 日目のホウレンソウの生育状況を示す。また、図 4 には葉の感染状況を示す。フザリウム菌汚染区では、約半分以上の苗について、葉に完全状態が確認された。プラズマ照射区においては、プラズマ照射時間によって感染状態が大きく異なった。10 分照射ではフザリウム汚染区とほぼ同様な感染状態となり、25 分照射では、さらに感染状態が悪くなった。他方、5 分照射では、感染状態はほとんど確認されず、極めて高い防除効果が得られた。この原因は、苗の定植段階での根へのプラズマ照射によって、長く照射し続けると、根に対してダメージを与え、フザリウム菌の感染が促進されることが考えられた。他方、5 分程度の短い時間の照射では、根へのダメージは少なく、効果的にフザリウム菌を殺菌できたと考えられる。

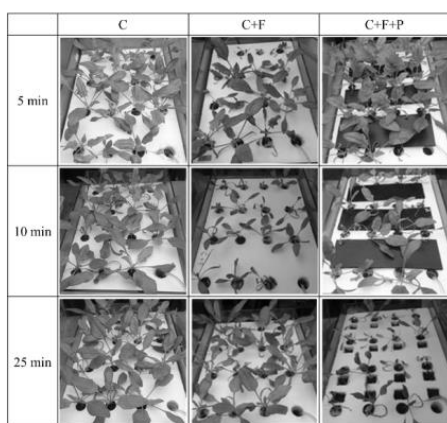


図 3 14 日間生育後のホウレンソウの生育状況の比較

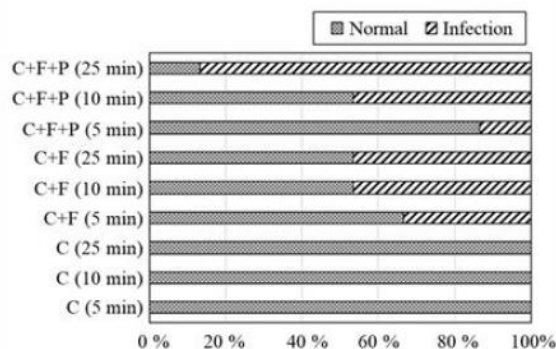


図 4 プラズマ照射時間に対する葉の感染状況の比較

(3) プラズマ照射条件の最適化と経済性評価

最適なプラズマ照射条件に対して、大容量の培養液に対応できるバリア放電型プラズマ照射電極を開発し、その性能を *P. aphanidermatum* 遊走子の殺菌特性で評価した。その結果、大容量処理用電極では、殺菌特性が十分に得られないことが判明した。実用システムにおける経済評価では、大容量処理電極の開発の有無が大きく影響される。このため、大容量処理電極の開発が課題となる。また、ランニングコストを低減するためのプラズマ照射条件をさらに最適化するなど課題が残されている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

| | |
|---|-------------------|
| 1. 著者名 坂本源起, 伊藤大樹, 安井晋示, 寺添 育, 庄子和博 | 4. 巻 32(1) |
| 2. 論文標題 液中プラズマ照射によるハウレンソウ萎凋病の防除の基礎検証 | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 植物環境工学 | 6. 最初と最後の頁 1-8 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2525/shita.32.37 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|-------------------|
| 1. 著者名 平原大地, 坂本源起, 安井晋示, 景山 幸二 | 4. 巻 32(2) |
| 2. 論文標題 沿面放電液中プラズマによるPythium aphanidermatum遊走子の殺菌 | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 植物環境工学 | 6. 最初と最後の頁 1-7 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2525/shita.32.115 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|---------------------|
| 1. 著者名 安井晋示 | 4. 巻 3 |
| 2. 論文標題 萎凋病対策に向けた培養液のプラズマ殺菌技術 | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 アグリバイオ | 6. 最初と最後の頁 38-40 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 平原大地, 坂本源起, LE DINH TUNG, 安井晋示, 庄子和博, 寺添 育 |
| 2. 発表標題 沿面放電液中プラズマの Fusarium oxysporum殺菌特性に対する極性効果 |
| 3. 学会等名 電気学会 放電・プラズマ・パルスパワー研究会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 平原大地, 安井晋示, 景山幸二 |
| 2. 発表標題 沿面放電液中プラズマ殺菌におけるOH ラジカルの影響検証 |
| 3. 学会等名 電気学会全国大会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|-------------------------------------|
| 1. 発表者名 LE DINH TUNG、伊藤 大樹、安井 晋示 |
| 2. 発表標題 沿面放電による液中プラズマの放電特性 |
| 3. 学会等名 電気学会東海支部連合大会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 伊藤大樹, LE DINH TUNG, 安井晋示 |
| 2. 発表標題 沿面放電液中により発生させたOHラジカルのスペクトル特性評価 |
| 3. 学会等名 電気学会プラズマ・パルスパワー・放電合同研究会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 LE DINH TUNG, 伊藤大樹, 安井晋示 |
| 2. 発表標題 沿面放電を用いた液中プラズマによるOHラジカルの生成特性 |
| 3. 学会等名 電気学会全国大会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 坂本源起, 伊藤大樹, 安井晋示, 寺添斉, 庄子和博 |
| 2. 発表標題 沿面放電液中プラズマによるフザリウム萎凋病防除効果の検証 |
| 3. 学会等名 電気学会全国大会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 平原大地, 坂本源起, 安井晋示, 景山幸二 |
| 2. 発表標題 沿面放電液中プラズマのPythium属菌遊走子への殺菌効果 |
| 3. 学会等名 電気学会全国大会 |
| 4. 発表年 2019年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

| |
|---|
| <p>水中沿面放電プラズマによる培養液の殺菌や植物の生育促進 http://yasui-lab.web.nitech.ac.jp/</p> |
|---|

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|---|---|----|
| 研究分担者 | 庄子 和博 (Shoji Kazuhiro) (10371527) | 一般財団法人電力中央研究所・エネルギーイノベーション創発センター・上席研究員 (82641) | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|