

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月15日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22510082

研究課題名（和文） 高度水処理や水資源確保を目的とした水中高電圧パルス放電プラズマの効率的生成

研究課題名（英文） Efficient Generation of Discharge Plasma with High Voltage Pulse for advanced water treatment and Water-Resources Reservation

## 研究代表者

大嶋 孝之（OHSHIMA TAKAYUKI）

群馬大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：30251119

## 研究成果の概要（和文）：

電極を試料だまりに直接設置して放電を発生させる投げ込み式電極システムを開発し、この水中放電プラズマの発生特性を明らかにした。試料の導電率が高いほど、放電頻度は低くなることが確認された。染料インジゴカルミンの脱色および難分解性である LAS の分解が可能であることが示された。また *in situ* での試料だまりへの殺菌処理を行い、大腸菌、枯草菌芽胞の殺菌を確認し、殺菌特性を明らかにした。また殺菌に関与する要因を整理した。

## 研究成果の概要（英文）：

A novel pulse discharge system for water treatment was constructed, which can be easily submerged in water. It consists of a stainless screw bar used as the high voltage electrode, a stainless spiral wire used as the earth electrode, and an air disperser placed under the electrodes. The frequency of discharge was drastically decreased with increase of solution conductivity, and no discharge plasma was observed when the conductivity was 1200  $\mu\text{S}/\text{cm}$ . The decomposition of indigocarmine and linear alkylbenzene sulfonate (LAS) was also demonstrated with this novel discharge plasma reactor. Inactivation profiles of microorganisms by submerged style pulse discharge system in bubble water were investigated. We have confirmed the inactivation of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* spore by this system.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：静電気応用工学

科研費の分科・細目：環境学・環境技術・環境材料

キーワード：水中プラズマ、高電圧パルス、水処理、殺菌、有機物分解

## 1. 研究開始当初の背景

水資源はあらゆる生命の維持、環境や生態

系の保全、そして社会活動など人類の発展にとって必要不可欠であり、水資源の確保は近

い将来重大な問題となる。水資源の有効利用や再利用の観点から汚水の処理技術・施設の開発・施設は極めて重要である。我が国において汚水の大部分は国土交通省・環境省など関係各省庁の指導および支援の元、主として活性汚泥法を用いた浄化処理施設で大規模に処理され再利用あるいは環境中へと放出されている。しかしながら処理施設の設備建造費・余剰汚泥の処理費を含む維持費が高価であること、連続運転を前提とした運用のノウハウが必要である。大規模な混合汚水処理方法としては既存の技術は有効であるが、多種多様な汚水に最適な処理が行われているとは言い難く、一般に長い処理時間が必要なことが難点である。そこで水中放電プラズマの水処理への適用を目的とし、新規プラズマ反応器の作製および水中放電の発生機構の解明と、この現象の水処理への応用を目的とする本研究を行った。

## 2. 研究の目的

(1) 水中放電プラズマの安定な生成を可能にするリアクターの開発

水中放電プラズマ生成量を安定にコントロールするためには水中に混入するバブルの量・サイズ・気体種、および処理溶液の導電率・粘度などを含む諸因子の影響についての詳細な検討が必要である。そこで極力シンプルな形状のリアクターを作製し、プラズマ生成を安定にコントロールする技術を確認する。

(2) 難分解性化合物の分解能の立証ならびにメカニズムの解明

放電プラズマの生成に伴い非常に酸化力の高い OH ラジカルを含む種々のラジカル種、紫外線、衝撃波が発生し、これらの相乗効果が期待できる。このような特徴を有した水中放電プラズマにより難分解性化合物を含む種々の化合物を分解可能であることを立証する。ターゲットとしては有機染料および界面活性剤を用いる。

(3) 微生物殺菌能の立証ならびにメカニズムの解明

気相中におけるプラズマを用いた微生物殺菌に関する研究例は多いが、液相中でプラズマを発生させ微生物の殺菌を行った研究例はごく少数である。本研究では水中放電プラズマにより種々の微生物種を殺菌可能である事を立証する。ターゲットは大腸菌の栄養細胞、および枯草菌芽胞を用い、殺菌特性を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) 高電圧パルス発生装置および反応器

高電圧パルス発生装置はギャップ式試作機を用い、ピーク電圧 20 kV、周波数は 333 Hz で操作した。図 1(A)に本研究で作製した投げ

込み式水中プラズマ反応器の概略図を示す。高電圧電極に 3 mmφのステンレスねじ棒を用い、アース電極にらせん状ステンレスワイヤー(1 mmφ)を用いた。高電圧電極棒がステンレスワイヤーアース電極の中心を通るよう、アクリル角棒 5×5 mm を骨格として電極を固定した。電極間距離は 6 mm、放電区間となるらせん部分の高さは 80 mm とし、放電区間の外に出ている高電圧電極棒の部分はシリコンチューブで覆うことで絶縁した。水中放電を発生させるために電極の真下 30 mm 離れた位置に、市販のエアーストーンを配置し、放電区間をバブルが通り抜けていくようにした。以上が投げ込み式放電ユニットでこれを水中に沈めることで水中放電を発生させることができる。本研究では観察しやすいよう 100 mmφ×300 mm のアクリル円筒の容器に 2 L の試料水を入れ、投げ込み式放電ユニットを浸した状態で実験を行った(図 1(B))。バブルを発生させるためのガスにはコンプレッサーエアーを使用し、最大流量は 7 L/min とした。

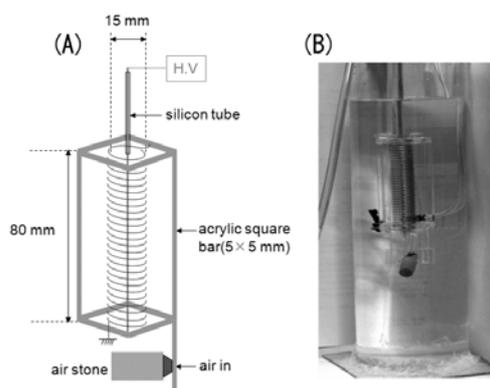


図 1 投げ込み式放電ユニットの概略図 (A) と水中にセットした写真 (B)

(2) 試料水の調整

水中放電の観察には蒸留水を用いた。導電率を変化させる実験では蒸留水に NaCl (ナカライテスク) を溶解して使用した。導電率は 200-1400  $\mu\text{S}/\text{cm}$  で調整した。

また本研究のモデル有機物として染料の一種であるインジゴカルミン、および直鎖アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム (LAS) を用い、それぞれの分解を検討した。インジゴカルミン (東京化成工業) は蒸留水に溶解し 10 ppm として使用した。測定は分光光度計 (Shimadzu, UV-1200) により、610 nm における吸光度の変化で評価した。また家庭用、工業用の洗剤として世界で最も一般的に使用されている LAS (和光純薬工業) も同様に蒸留水に溶解し、50 ppm とした溶液を試料とした。LAS 濃度は前報 (11) にしたがひ、高速

液体クロマトグラフ（島津製作所社製、LC6A、UV-Vis Spectroscopy）で測定した。

### (3) 放電の観察方法

本研究の放電発生頻度、および放電発生部位の観察には高速度カメラ（株式会社ナックイメージテクノロジー、HOT SHOT 1280）を用いた。撮影条件はシャッタースピードを1000分の1秒、フレームレートを毎秒1000コマの条件で放電を撮影した。撮影した画像をPC上で1コマずつコマ送りし、放電発生部位と回数を確認した。

### (4) 殺菌試料の調整

殺菌試験対象として大腸菌（*Escherichia coli* K-12株）と枯草菌（*Bacillus subtilis* NBRC 3007）芽胞を用いた。大腸菌はLB培地（ペプトン 1% (w/v)、酵母エキス 0.5%、NaCl 1%、寒天培地として用いる場合には上記に加え寒天末 1.5%）を用い35℃で一晩培養した後、遠心分離（5,000×g、10 min）により培養液から分離した。枯草菌芽胞は枯草菌を枯草菌用寒天培地（ペプトン 1%、酵母エキス 0.2%、MgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O 0.1%、寒天末 1.5%）に植菌後、室温にて一週間インキュベートすることで形成させた。芽胞を形成した枯草菌を滅菌蒸留水に懸濁し、90℃で15 min 処理することで栄養細胞を死滅させたものを枯草菌芽胞として用いた。大腸菌ならびに枯草菌芽胞共に、実験目的ごとに所定の菌体濃度となるよう滅菌蒸留水に再懸濁し、水中放電プラズマ殺菌試験に用いる菌液試料とした。

### (5) 放電プラズマによる殺菌試験

100 mmφ×300 mm のアクリル円筒容器に菌液試料 2 L と投げ込み式放電ユニットを投入し、パルス電界の印加とバブルを発生させるためのエアを吹きこみ放電プラズマを発生させることによる殺菌試験を行った。経時的にサンプリングを行い生理食塩水により適当に希釈した後、大腸菌はLB寒天培地に、枯草菌胞子は枯草菌用寒天培地に植菌後、37℃で20 h インキュベートした。寒天プレート上に形成されたコロニー数をカウントすることで生菌数を求め、これを処理前の生菌数で除することで生菌率を求めた。また、放電により発生するラジカルの殺菌への関与を調べるためには、ラジカルスカベンジャーとしてL-ヒスチジンを菌液試料中に所定の濃度となるように添加した。

## 4. 研究成果

図 2(A)は電極の領域分けを示したものである。電極を等間隔に四つの領域にわけ、水面に近い方から a、b、c、d とした。撮影した画像をPC上で1コマずつコマ送りし、4つの領域でそれぞれ1秒間に放電が発生する回数（放電頻度）を測定した。図 2(B)は実際のビデオ撮影の一例である。

表 1 は蒸留水中の各領域における 1 秒間の放電回数を流入エア流量別に示したもの

である。右に示した without water とは、電極を水中に浸さずに完全な気中で放電を発生させた場合の結果であり、4つの領域の合計の放電回数は330回であった。パルス周波数は333 Hz でありガス中ではほぼ周波数に合った放電が観測されているため、水中で放電を発生させたときの実験結果は信頼性があると考えられる。水中での観測結果を比較すると、電極領域 a が最も放電頻度が低く、a から d へとバブル発生部位に近づくにしたがって放電頻度は高くなっている。これは、バブルが水面に向かって上昇していくのにしたがって拡散するため、らせん下部の方がバブルに接触しやすいためだと考えられる。またエア流量を増やすと放電頻度が高く

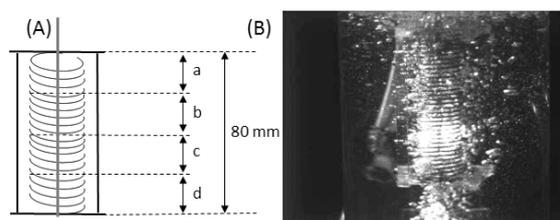


図 2 投げ込み式放電ユニットの領域分け (A) と高速度ビデオカメラの撮影例 (B)

表 1 エア流量を変えた時の各領域における放電頻度

air flow rate [L/min] / area [-]	2	4	6	without water
a	6	9	14	62
b	14	19	28	90
c	15	40	52	100
d	25	85	103	78
Total	55	153	197	330

なった。エア流量が大きい方が径の大きなバブルが発生して電極間を通り抜けていくため放電が発生しやすくなり、放電頻度が高くなると考えられる。

また図 3 は 4 つの領域を合計した 1 秒間の放電回数をエア流量 1 L/min ごとに 7 L/min まで測定しまとめたものである。放電頻度は 6 L/min までは上昇しておよそ 200 回/s に達するが、7 L/min にしても放電頻度はこれ以上上昇しなかった。この結果から放電頻度の上限は 200 回/s 程度であると思われる。したがって放電プラズマを発生するための周波数としては 200 Hz が上限であると考えられる。

これまでの実験は全て蒸留水（導電率は 10 μS/cm）中に行った。しかし、環境中に存在する水には様々な電解質が含有しているた

め本システムの導電率の影響を検討した。導電率はそれぞれ 200、400、600、800、1000、1200  $\mu\text{S}/\text{cm}$  の条件で行った。1200  $\mu\text{S}/\text{cm}$  を超える導電率の場合、安定した放電は確認されなかった。図 4 は放電頻度をエア流量 1 mL/min ごとに 7 mL/min まで測定し、導電率別にまとめたものである。導電率が上昇するに従い、放電頻度は低くなり、放電が発生する最低限のエア流量は大きくなった。このことから、本システムでの放電は導電率が大きな因子になっていることが確認された。本研究で検討している投げ込み式放電ユニットが水中の有機物の分解に有効であるかを確認するため、染料インジゴカルミンの脱色および、難分解性である LAS の分解を試みた。また流入するエアの流量を変化させると放電頻度に差が生じる。そこで、インジゴカルミン脱色および LAS 分解の放電頻度への依存性を確認するために、エア流量を変化させることにより放電頻度を変えて実験を行い効果を比較した。エア流量は 2、4、6 L/min の条件下で実験を行った。10 ppm インジゴカルミンの脱色実験では吸光度 ( $\text{OD}_{610}$ ) の相対変化で評価した。また LAS 分解では前報に従い、HPLC エリア面積の相対変化で評価した。

インジゴカルミンは吸光度の観測結果から時間とともに脱色分解していることが確認できた。また図 5 は LAS 分解結果を示している。インジゴカルミン、LAS とともにエア流量が 2 L/min から 4 L/min のときは分解効率が向上したが、6 L/min にエア流量を増やしても分解効率の向上は認められなかった。それぞれの両分解試料中での放電頻度は表 1 の蒸留水中の結果と同様に 55 回/s、153 回/s、および 197 回/s 程度と上昇しているにも関わらず分解効率が向上しない（最適な条件はエア流量 4 L/min、放電頻度 153 回/s となる）のは、インジゴカルミンや LAS が放電プラズマ反応場に拡散するのが律速となっている可能性が示唆された。

次に試料だまり中の大腸菌への殺菌効果を確認した（図 6）。試験条件は菌液試料の初発大腸菌濃度  $10^7$  viable cells/ml、エア流量 4 L/min にて行った。投げ込み式放電ユニットを用い 2 L の大腸菌試料溶液だまり中で放電プラズマを発生させることで、処理時間の経過と共に菌液試料中の大腸菌生菌数が減少することが確認された。2 L の容量を有する大腸菌試料溶液に対し 120 sec の比較的短い処理時間で約 4 桁の生菌率の減少が確認された。電界を印加せずにエアのみをバブルとして大腸菌試料溶液中に通気した場合には生菌数の減少は確認されなかった。また、エアの通気を行わず電界のみを印加した場合には、わずかながら生菌率の減少が確認された。これは本実

験で用いている電源が高電圧パルス発生装置であるため、電極間に生じたパルス状高電界による大腸菌細胞膜の損傷に起因する殺菌効果であると考えられる。以上の結果より、投げ込み式放電ユニットを用い水中で放電

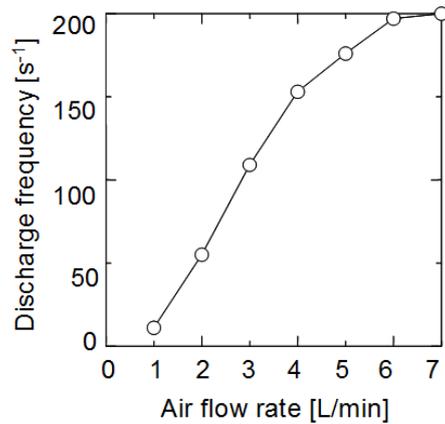


図 3 エア流量の放電頻度に与える影響

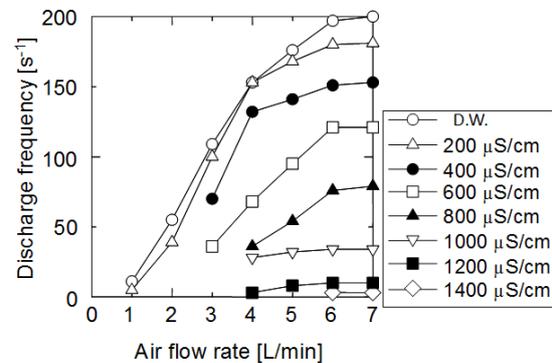


図 4 導電率の放電頻度に与える影響

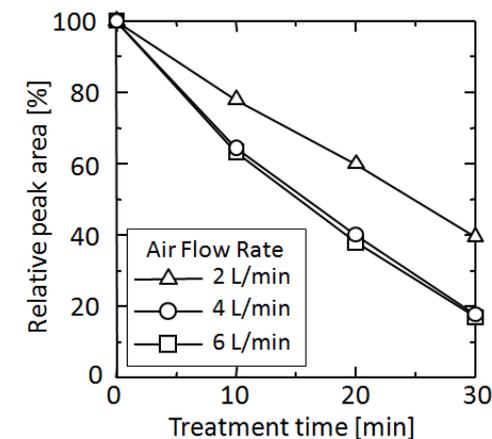


図 5 各エア流量における LAS の分解率の経時変化

プラズマを発生させることによりエアの通気のみ、あるいは電界の印加のみでは得られない比較的短い処理時間で高い殺菌効果が得られることが示された。

水中放電プラズマによる大腸菌の殺菌メカニズムにおいてラジカルが大きく関与している可能性が示唆されるため、ラジカルスカベンジャーを用い発生するラジカルをクエンチングすることによる大腸菌殺菌効果の変化を調べた。ラジカルスカベンジャーとして特定のラジカルではなく種々のラジカルへのクエンチング能が期待できる L-ヒスチジンをを用いた。初発大腸菌濃度  $10^7$  viable cells/ml の条件にて、菌液試料中へ L-ヒスチジンを様々な濃度となるよう添加し、ガス

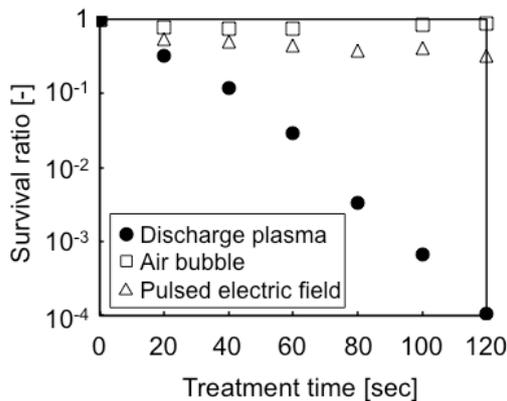


図 6 水中放電プラズマによる大腸菌の殺菌

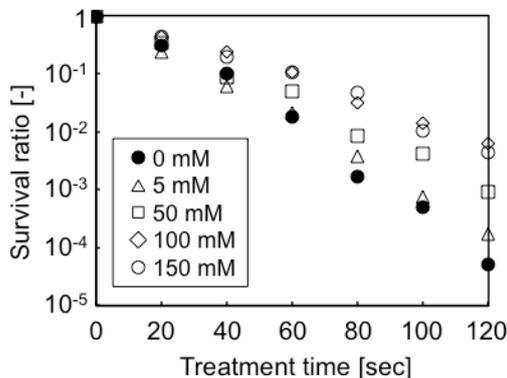


図 7 ラジカルスカベンジャーが大腸菌の殺菌に与える影響

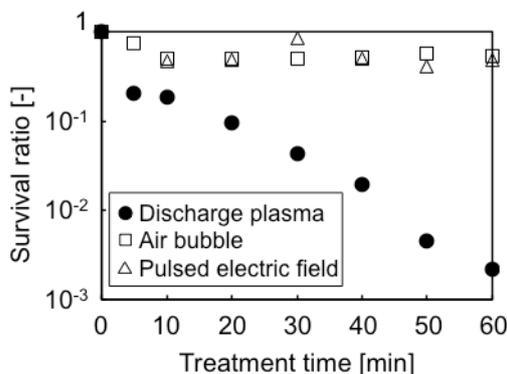


図 8 水中放電プラズマによる枯草菌芽胞の殺菌

流量 4 L/min で水中放電プラズマを発生させ 120 sec の処理を行った (図 7)。L-ヒスチジンを菌液試料中に加えることにより大腸菌の殺菌効果の減少が確認された。この時、L-ヒスチジンを加えることによる菌液試料の導電率変化は微小であり、硫酸アンモニウムを用いて同じ導電率に調整した場合には殺菌効果の減少は確認されなかった (data not shown)。L-ヒスチジン添加量の増加に伴い大腸菌の殺菌効果の減少が確認され、L-ヒスチジンにより放電プラズマによって発生するラジカルがクエンチングされることで殺菌効果が減少していることが示された。各ヒスチジン濃度を添加した試料菌液における大腸菌の死滅速度定数を求めた。L-ヒスチジン濃度 0、5、50、100、150 mM において死滅速度定数はそれぞれ  $7.7 \times 10^{-2}$ 、 $7.1 \times 10^{-2}$ 、 $5.8 \times 10^{-2}$ 、 $4.2 \times 10^{-2}$ 、 $4.5 \times 10^{-2}$  /sec であり、死滅速度定数の面からも殺菌効率が減少していることが確認された。

また L-ヒスチジン濃度が 100-150 mM 付近で熱死滅速度定数の低下は頭打ちとなっていることがわかり、全てのラジカルが大腸菌と反応する前に L-ヒスチジンにクエンチングされるものとは考えられないことを考慮すると、ラジカルの関与による殺菌の割合は最低 42%程度である。これらの結果から水中放電プラズマで発生するラジカルは殺菌において重要な役割を果たしているが、ラジカルが殺菌メカニズムの全てではないことが示された。

枯草菌胞子は殺菌を行うことが最も難しい微生物の一つに挙げられる。水中放電プラズマにより大腸菌は容易に殺菌可能であったので、殺菌が難しいとされる枯草菌芽胞に対して殺菌作用を示すことができるかを調べた (図 8)。大腸菌を殺菌対象とした場合とは異なり、エアリーを通気しない電界効果のみでは生菌数の減少はほぼ確認されなかった。これは芽胞が強固な細胞構造を有しているため、パルス状高電界による細胞膜損傷に起因した殺菌効果が発現しなかったためであると考えられる。水中放電プラズマを発生させた場合では、大腸菌を対象とした場合と異なり殺菌効果を確認するためには分単位の処理時間が必要ではあるが、処理時間の経過に伴う生菌率の減少が確認された。枯草菌芽胞殺菌における死滅速度定数は  $1.7 \times 10^{-3}$  /sec であり、大腸菌殺菌と比べ 45 分の 1 であった。以上の結果より、投げ込み式放電ユニットを用い水中で放電プラズマを発生させることで枯草菌芽胞も殺菌可能であることが示された。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計7件)

- (1)谷野孝徳, 柳沢美貴, 大嶋孝之「投げ込み式水中バブル-パルス放電装置の殺菌特性」静電気学会誌 36 巻 pp.37-42 (2012) 査読有
- (2)Tanino, T., Sato, S., Oshige, M., Ohshima, T., “Analysis of the stress response of yeast *Saccharomyces cerevisiae* toward pulsed electric field” J. Electrostatics, 70, pp. 212-216 (2012) 査読有
- (3)大嶋孝之, 谷野孝徳, 成毛由典:「投げ込み式水中バブル-パルス放電装置の試作と放電特性」静電気学会誌 35, No. 3, 145-150 (2011) 査読有
- (4)谷野孝徳, 中村ふみ, 大嶋孝之:「マイクロバブルを用いた水中放電プラズマによる界面活性剤の分解」静電気学会誌 34, No. 1, 31-36 (2010) 査読有
- (5)吉野功, 大嶋孝之, 谷野孝徳, 佐藤正之:「銀電極を用いた高電圧パルス装置による種々の菌に対する不活性化効果」静電気学会誌 34, No. 2, 81-86 (2010) 査読有 など

〔学会発表〕(計22件)

- (1)Takanori Tanino, Tomoki Yoshida, Kazuki Sakai, Takayuki Ohshima “Inactivation of *Escherichia coli* phage by PEF treatment and analysis of inactivation mechanism” 7th International Conference on Applied Electrostatics(ICAES-2012), Session II-6, (September 17-19, 2012 in Dalian, China) (2012)
- (2)T. Ohshima, M. Yanagisawa, T. Tanino “Inactivation of Microorganism by using Submerged Style Pulse Discharge System in Bubble Water” 9th International Bioelectrics Symposium (BIOELECTRICS 2012), P-1B-3, ( Sept. 5-8, 2012, Kumamoto, , Japan,) (2012)
- (3)亀田剛\*, 谷野孝徳\*, 大嶋孝之\*, 原島浩之\*\*:「高電圧パルス電界を利用した牛乳の殺菌」日本食品工学会第13回(2012年度)年次大会 1C02, (2012年8月9-10日, 北海道大学)
- (4)谷野孝徳, 柳沢美貴, 大嶋孝之:「投げ込み式水中バブル-パルス放電装置の殺菌特性」静電気学会第35回全国大会講演要旨 13aC-6, pp.161-166 (2011年9月12-13日, 東京理科大学)
- (5)(招待講演)大嶋孝之:「水中高電圧パルス電界・放電の発生と殺菌・バイオ分野における利用」日本食品科学工学会第58回大会講演要旨 A2「非加熱食品加工技術の新展開」シンポジウム p.24 (2011年9月9-11

日, 仙台国際センター)

- (6)Ohshima, T. and Tanino, T. “Non-thermal plasma inactivation of bacterial spore on glass beads” YABEC 16th, (Nov.21-22, 2010, Taipei). など

〔図書〕(計5件)

- (1)大嶋孝之(社)全国清涼飲料工業会ソフト・ドリンク技術資料「高電圧パルスによる非加熱殺菌」(2010) p.34-40
- (2)大嶋孝之、谷野孝徳 静電気工学会 学会誌「水中における高電圧パルス電界・放電の発生と利用」(2011) p.114-119
- (3)大嶋孝之 月刊食品工場長「高電圧パルス殺菌による微生物の制御」(2012) p.76-79 など

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

○取得状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕

該当なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

大嶋 孝之 (OHSHIMA TAKAYUKI)  
群馬大学・大学院工学研究科・教授  
研究者番号:30251119

(2)研究分担者

谷野 孝徳 (TANINO TAKANORI)  
群馬大学・大学院工学研究科・助教  
研究者番号:50467669

(3)連携研究者

なし ( )  
研究者番号: