

炭化梅による微生物吸着効果

大河原 羽咲 松本 芽依 宮崎 由衣

はじめに

梅の果実は身体にいい影響を与える。漢方薬の原料・烏梅に加工され、鎮痛・解毒効果を発揮したり、切り傷の手当てに用いられたりする。また梅干しに加工されるとコレラ菌や大腸菌、黄色ブドウ球菌に殺菌または抗菌作用をもつようになるため、健康食品として重宝されている。

しかし、注目されるのは果実のみであり、種子は活用方法がないとして廃棄されている。そこで、種子を活用する方法について研究がなされ、そのうちのひとつとして梅の種子を炭化する方法が提案されている。梅の種子を炭化したもの（以下、炭化梅）は色素に対して吸着効果を持つが、細菌に対して吸着効果を持つかに関しては研究がなされていない。なお、比較対象として挙げられる活性炭は、色素を吸着するかつ腸管出血性大腸菌 O-157 に対する吸着効果を持つことが分かっている。大腸菌は水生できる病原菌であり、水の衛生管理が行き届いていない発展途上国で下痢の原因となることも少なくない。

本研究では、先行研究「梅の種の炭化による有効活用法の検討」を参考に炭化梅を製作し、大腸菌に対する吸着効果の有無について研究することにした。

廃棄物を有効活用し、発展途上国での汚染水の浄化に少しでも貢献できる結果を出すことが本研究の目的である。

先行研究

- ・活性炭の吸着効果は、善玉菌のような腸管内に存在する正常な細菌より O-157 のような病原性のある大腸菌に対してより強くはたらく。また、吸着効果は孔の大きさに依存するため大腸菌の大きさに適した炭の孔が吸着効果を発揮する。（「病原性大腸菌に対する薬用炭の吸着効果」2001 年）
- ・クマシーブリリアントブルー（CBB）に対する炭化梅の吸着効果は 3 時間以内に平衡に達したが、活性炭は吸着平衡に達するまで 48 時間以上かかる。また、メチレンブルー（MB）に対しては炭化梅も活性炭も 1 時間以内に吸着平衡に達した。（「梅の種の炭化による有効活用法の検討」2015 年）

I 本実験

目的：先行研究で分かっている炭化梅の大腸菌吸着効果の有無を調べる。

概要：炭化梅を入れたろ過装置に大腸菌の菌液を通した前後での、固体培地に植え付けた時の大腸菌占有率の大きさの違いによって、吸着効果の有無を評価する。なお比較として、粒状活性炭 3~4 mm（ウチダ理科消耗品カタログ、型番 R - 8208）による大腸菌吸着効果も同じ条件で調べた。

〈材料〉

- ・大腸菌 (*Escherichia coli*) ※₁ 型番 NBRC 3301
- ・炭化梅※₂※₃ 3 g
- ・活性炭 3 g
- ・恒温槽
- A — {
 - ・固体培地
 - （組成：ペプトン 10 g，酵母エキス 5 g，塩化ナトリウム 5 g，寒天 15 g，水 1L）
 - ・0.50%食塩水 600ml
- B — {
 - ・培地作成用シャーレ 51 枚（1 日目用 15 枚，2 日目 36 枚）
 - ・漏斗 3 個
 - ・ビーカー 6 個
 - ・試験管 15 本
 - ・マイクロピペット
 - ・乳鉢，乳棒 2 セット
 - ・定性ろ紙（φ90 mm） 3 枚

※₁ 大腸菌 (*Escherichia coli*) について

- ・大腸菌は長径2~4 μm, 短径0.7 μmの細い棒状の単細胞生物。
- ・腸内細菌の一種である。

※₂ 梅の菓子を製造する際の廃棄物である, 梅の種を株式会社社関様より譲渡して頂き本研究では利用した。種に付着した果実を切り取ったのち, 種を室内で乾燥させた。2022年4月11日と4月19日に炭化したものを実験に使用する。

※₃ 梅の炭化方法(「炭化梅の炭化による有効活用法の検討」に基づく)

アルミホイルを敷いたスチール缶に乾燥させた種を20個入れ, アルミホイルで蓋をし, 小さめの空気穴を2つ開けた。約20分間白煙が出なくなるまで登山用ガスバーナー(OD缶)で加熱して, 種の炭化を行った。

〈方法〉

準備も含め, 2日に渡り実験を行う。

〈1日目〉

- ①大腸菌を画線培養法で植え付けた培地を15枚作成する。16時間培養し, 2日目の実験に用いる。
- ②材料Aをオートクレーブ(121°C/20分), 材料Bを乾熱滅菌器(180°C/30分)に入れ, 2日目の実験直前に滅菌が完了するようセットする。

〈2日目〉

- ③滅菌済0.50%食塩水600mlから, 試験管15本に9mlずつ分注する。
- ④炭化梅, 活性炭を乳鉢と乳棒を用いて粉碎する。
- ⑤行程①で作成した培地15枚のうち, 大腸菌が十分に増殖している※₄6枚から大腸菌を計30回かき取り, 質量パーセント濃度0.50%の※₅食塩水465mlに投入した菌液を作成する。

⑥漏斗に

(A)3gの活性炭とろ紙

(B)3gの炭化梅とろ紙

(C)ろ紙のみ

を設置し, ⑤の菌液20mlを1度流し込んで5分放置する。

⑦0.50%食塩水9mlに⑥のろ液1ml加える。

これで10倍希釈したことになる。

この10倍希釈を繰り返して, 1000倍, 1万倍, 10万倍希釈液を作成する。

⑧この希釈液0.2mlを, コンラージ棒を用いて固体培地に植え付ける。希釈倍率につきそれぞれ炭化梅4枚, 活性炭4枚, 炭なし4枚の計36枚作成する。

⑨30°Cに設定した恒温槽で培養する。

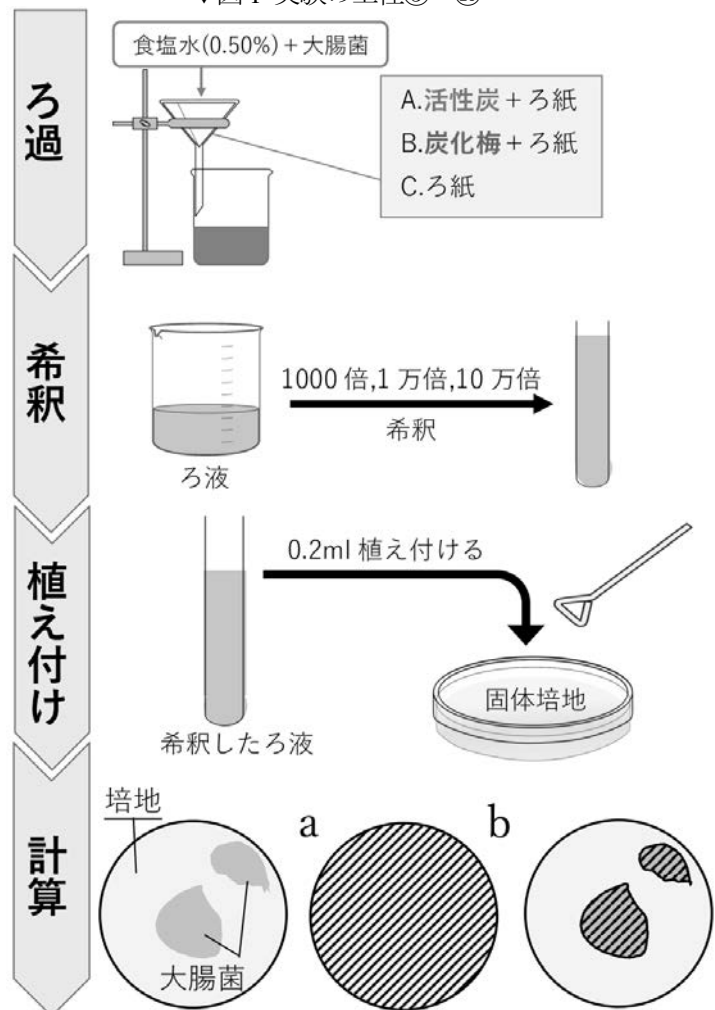
⑩24時間培養後観察・撮影する。

撮影した画像を面積測定ツール *Leafareacount Plus* を用いて,

(図中a斜線部) 培地全体の面積 (pix) と (図中b斜線部) 大腸菌占有面積 (pix) を測る。得た数値を以下の式に当てはめて, 大腸菌占有率 (%) を算出する (小数点以下第三位を四捨五入)。

$$\text{大腸菌占有率 (\%)} = \frac{\text{大腸菌占有面積 (pix)}}{\text{培地全体の面積 (pix)}} \times 100$$

▼図1 実験の工程⑤~⑩



※₄ 6枚から大腸菌を30回かき取って…大腸菌の培養シャーレ1枚につき5回ずつ、計30回白金耳でかきとる
 ※₅ 食塩水465ml…工程③ののちに残ったもの

結果

I 本実験

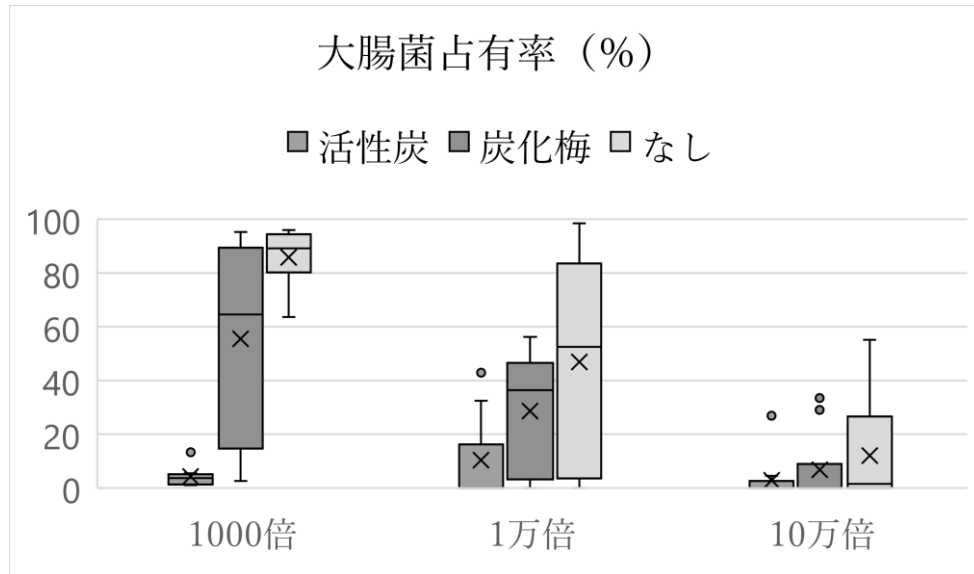
活性炭、炭化梅、炭なしの大腸菌占有率をまとめ(表1)、それを箱ひげ図に表した(図2)。

サンプルとして使用した培地の数は全135枚(内:炭化梅44枚,活性炭43枚,なし48枚)。なお、5月27日の1000倍希釈培地は用意していない。5月27日は塗布した菌液の希釈倍率が1万倍、10万倍の培地をそれぞれ6枚ずつ用意する予定だったが、炭化梅と活性炭の培地数は製作自体に失敗したため少なくなっている。

▼表1 本実験で得た結果をまとめた表

日付	活性炭			炭化梅			炭なし		
	1000倍	1万倍	10万倍	1000倍	1万倍	10万倍	1000倍	1万倍	10万倍
5月27日		0	26.92		44.4	0.08		0	2.12
		0	0		53.18	0		16.61	0
		16.28	0		40.66	0		94.94	55.2
			0		0.26			2.01	0
					36.09			0	0.09
								25.6	0
6月1日	1.22	11.01	4.12	32.05	0	9.19	78.4	81.47	0
	10.88	2.53	4.89	43.92	18.96	11.3	71.45	72.49	20.97
	0	10.03	0	9.88	38.45	2.58	71.1	16.17	3.16
	0.47	0	0.9	29.3	1.59	20.8	83.67	63.7	0.2
6月8日	13.34	11.43	0	84.35	40.19	33.47	95.99	65.91	24.43
	3.75	11.45	0	95.27	54	8.94	95.64	80.63	33.33
	5.48	42.88	4.5	91.07	23.79	29.04	82.99	98.42	3.3
	4.21	32.45	3.54	82.55	56.26	2.65	90.76	92.16	4.02
6月23日	1.03	0	0	8.86	9.56	0	90.68	47.12	0
	3.59	0	0	2.6	36.67	0	63.68	71.16	1
	1.26	0	0	46.59	3.55	0	87.55	57.81	45.09
	1.65	0	0	32.36	2.27	0	79.32	4.08	0

▼図2 本実験の結果をまとめた箱ひげ図



結果

- ・希釈倍率が上がるほど占有率が小さくなる傾向にある。(活性炭1万倍を除く)
- ・どの希釈倍率でも、占有率は 活性炭<炭化梅<炭なし の関係になっている。

考察①

- ・炭化梅と炭なしの吸着効果の比較

炭化梅は炭なしと比べて大腸菌占有率が小さかった。つまり、炭化梅は炭なしと比べて大腸菌吸着効果が大きいと考えられる。

- ・炭化梅と活性炭の吸着効果の比較

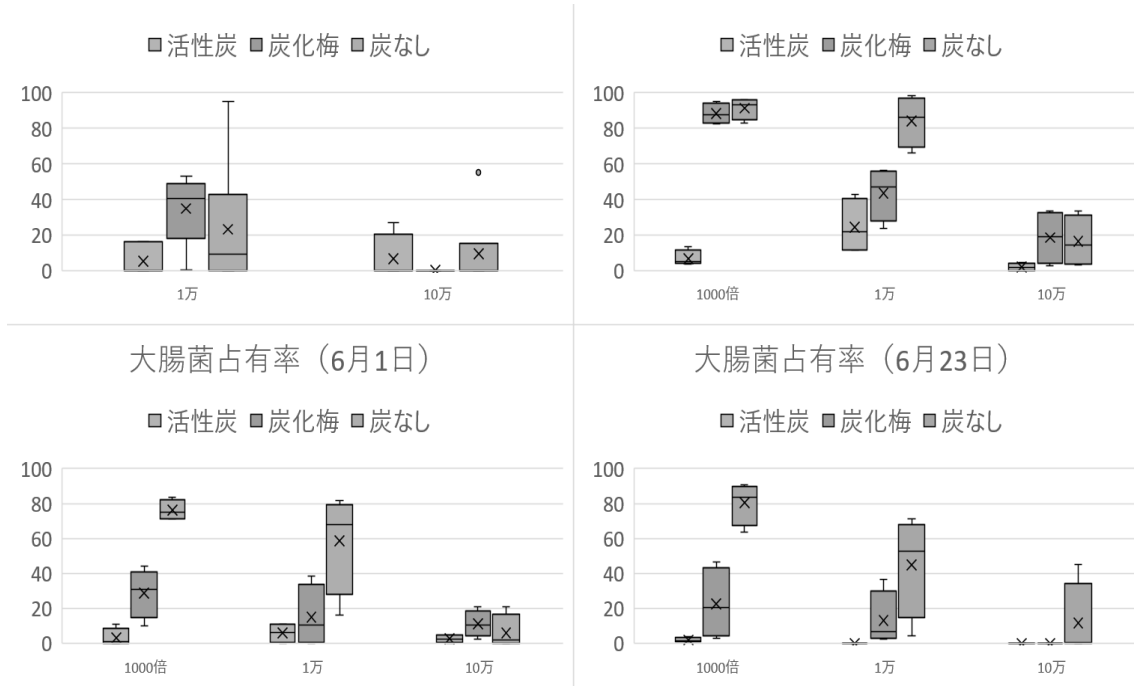
炭化梅は活性炭と比較して大腸菌占有率が大きかった。しかし、炭化梅と活性炭の吸着効果の違いは何が原因となっているのかこの実験だけでは分からない。そのため、この吸着効果の違いは炭化梅と活性炭に構造的な違いがあると考えて、以下の確認実験を行った。

- ・活性炭1万倍で大腸菌占有率が大きくなった理由

実験データを実験日ごとに箱ひげ図にして比較すると、6月8日のみ全体的に値が大きい(図3)。全体データの中で6月8日の実験から得たデータに色を付け降順に並び替えた表(表2)からも、6月8日の結果は全体の中でも大きい値であることがわかる。

よって、活性炭の1万倍の結果が大きくなっているのは6月8日の結果が関係していると考えられる。

▼図3 実験日ごとの大腸菌占有率 (%)



▼表2 全データを降順に並び替えた表 (水色: 6月8日分データ)

日付	活性炭			炭化梅			炭なし		
	1000倍	1万倍	10万倍	1000倍	1万倍	10万倍	1000倍	1万倍	10万倍
5月27日	13.34	42.88	26.92	95.27	56.26	33.47	95.99	98.42	55.2
	10.88	32.45	4.89	91.07	54	29.04	95.64	94.94	45.09
	5.48	16.28	4.5	84.35	53.18	20.8	90.76	92.16	33.33
	4.21	11.45	4.12	82.55	44.4	11.3	90.68	81.47	24.43
	3.75	11.43	3.54	46.59	40.66	9.19	87.55	80.63	20.97
	3.59	11.01	0.9	43.92	40.19	8.94	83.67	72.49	4.02
6月1日	1.65	10.03	0	32.36	38.45	2.65	82.99	71.16	3.3
	1.26	2.53	0	32.05	36.67	2.58	79.32	65.91	3.16
	1.22	0	0	29.3	36.09	0.08	78.4	63.7	2.12
	1.03	0	0	9.88	23.79	0	71.45	57.81	1
6月8日	0.47	0	0	8.86	18.96	0	71.1	47.12	0.2
	0	0	0	2.6	9.56	0	63.68	25.6	0.09
		0	0		3.55	0		16.61	0
6月23日		0	0		2.27	0		16.17	0
		0	0		1.59	0		4.08	0
			0		0.26			2.01	0
					0			0	0
							0	0	

II 確認実験

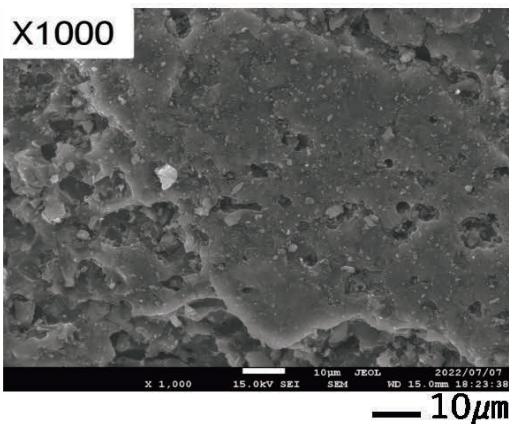
炭化梅と活性炭の構造的差異を確認するため、電界放射型走査電子顕微鏡 (香川大学創造工学部教授田中康弘先生) による観察を行って得た結果を写真 1, 2 (活性炭), 写真 3, 4 (炭化梅) に示した。

活性炭は比較的滑らかな表面に小孔が無数に空いており、その大きさは炭化梅の大孔の大きさと比較すると全体的に小さくなっている。無作為に選出した孔 11 個の大きさを計測し平均値を求めたところ、6.1 μm であった。

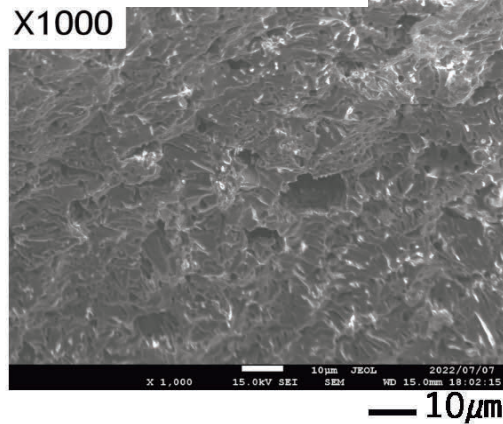
対して炭化梅は、表面に波打つような凹凸が観測された。大きな孔の中にさらに小さな孔が多数見られた。活性炭と同様にして炭化梅表面の大きい孔のみを対象に孔の大きさの平均値を求めたところ、10.7 μm であった。同じく炭化梅の小さい孔のみを対象に孔の大きさの平均値を求めたところ、2.3 μm であった。

このことより、炭化梅には、10 μm ほどの大きさと 2 μm ほどの大きさの 2 種類の孔があることがわかる。

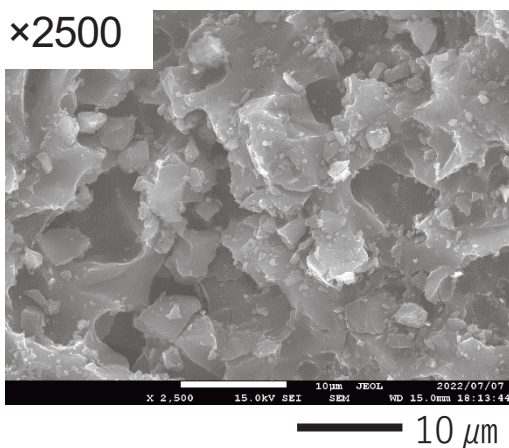
▼写真1 活性炭 1000 倍



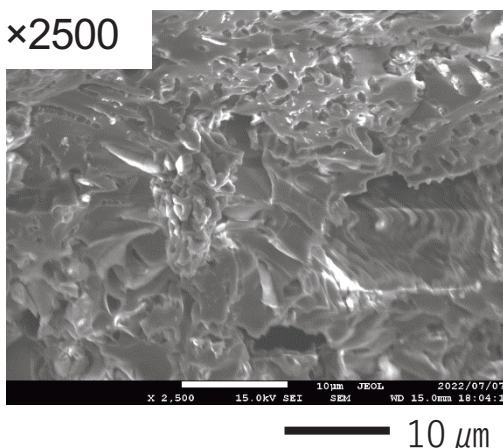
▼写真3 炭化梅 1000 倍



▼写真2 活性炭 2500 倍



▼写真4 炭化梅 2500 倍



・炭化梅と炭なしの吸着効果の比較

炭化梅の大腸菌占有率が炭なしと比べて小さいこと、炭化梅は孔をもつことから炭化は大腸菌吸着効果を持つと考えられる。

・炭化梅と活性炭の吸着効果の比較

炭化梅と比べ活性炭のほうで吸着効果が大きかった。そのため、活性炭の孔の大きさが吸着に適した大きさであると考えられる。活性炭の孔の大きさはおよそ 6 μm であることから、大腸菌の大きさ（長径 2~4 μm 、短径 0.7 μm の細い棒状）と比較して少し大きい程度の孔は吸着に適していると考えられる。

また炭化梅には大小 2 種類の孔が存在し、それぞれおよそ 10 μm 、2 μm である。先述した考察に基づくと、炭化梅の孔の大きさは大腸菌を吸着するには大きすぎるか小さすぎるものが多いと考えられる。その結果、吸着効果が活性炭と比べて小さい値を示すこととなったのではないだろうか。

結論

炭化梅は活性炭より大腸菌吸着能力は劣っているものの、大腸菌吸着効果を持つ。また、ペットボトルろ過装

置での水の浄化に用いる炭の代替えなどに用いることができれば、途上国での汚染水の浄化に用いることができるのではないかと考える。

まとめ

炭化梅は大腸菌吸着効果を持つかどうか調べるために本研究を行った。今回大腸菌を対象に研究を行ったのは、先行研究にて大腸菌が取り上げられていたことと、大腸菌が病気を引き起こす細菌として有名なものの一つであるからだ。産業廃棄物として廃棄される梅の種子を炭化して用いることで細菌に汚染された水質を浄化し、汚染水を原因として生じる健康被害を減少させることが最終目標である。

本研究の結論では、炭化梅は活性炭と比べて劣るものの吸着効果を持つとしている。この結論から、活性炭を差し置いて炭化梅を用いるメリットは何かと考える人も少なくないだろう。

まず、梅の種子を廃棄する必要がなくなる。梅の種子は年間 1600 t 廃棄されており、梅の種子を有効活用することができれば廃棄のために使われている資金を節約することができるだろう。

また、複雑な工程を経て作られる活性炭と異なり、炭化梅は炭化するだけで用いることができるため使用は容易である。簡単であるために個人で作成することもできる。

最後に、梅は世界規模で栽培されているため、材料調達に要する労力は少なく済むと考えられる。これらが現在考えられる、炭化梅を用いるメリットである。

残念ながら、実際に飲用に適した水源が少ない地域、特にアフリカでは、気候の問題か梅の栽培が盛んではない。しかし梅の種が廃棄物であることをふまえると、近隣国から種を供給することも可能であると考えている。

今後の展望

本研究には改善すべき点がある。炭化梅がどの程度大腸菌を吸着したか調べるために大腸菌占有率という指標を用いて計算をしたが、これはコロニーが数えられないほど大腸菌が増殖したためである。大腸菌が大量に増殖した原因としては、主に大腸菌を培地に植え付けるときに希釈液を十分に攪拌していなかったことが挙げられる。

大腸菌占有率を求める今回の方法では、炭化梅が大腸菌をどれだけ吸着したかの傾向は見られても正確な値とは言い難い。コロニーカウント法を用いる、大腸菌の個体数を比較するなど、より正確な結果を得るためには新しい方法が必要だろう。

また、活性炭の孔が大腸菌の吸着に向いているように、炭化梅の孔もまた別の細菌の吸着に向いているかもしれない。今後は大腸菌以外の病原菌も視野に入れつつ、炭化梅を水質浄化に役立てられるよう研究を続けていきたい。

参考文献

- ・ 仲克巳, 渡来仁, 井上薫, 児玉義勝, 小熊恵二, 保田立二, 児玉洋 「病原性大腸菌に対する薬用炭の吸着効果」 2001.Vol.63,Issue.3,P.281-285 <https://doi.org/10.1292/jvms.63.281> (参照 2022-7-16)
- ・ 本間和夫, 馬場純子 「梅の種の炭化による有効活用法の検討」 2015.02.20, Vol.17, 「前橋工科大学研究紀要」 p27-29 <https://id.nii.ac.jp/1714/00000007/> (参照 2022-7-26)
- ・ 鐵本總吾 「諸調味料の腸チフス菌及びコレラ菌に対する殺菌力」 日本農芸化学会誌 10.2 (1934) : 123-127 (参照 2022-7-19)
https://www.jstage.jst.go.jp/article/nogeikagaku1924/10/2/10_2_123/article-char/ja/
- ・ 岩啓子, 野村秀一 「梅干し中の有機酸及びアミグダリン関連物質の抗菌作用」 (参照 2022-7-19)
<https://cir.nii.ac.jp/crid/152029088305112576>
- ・ 田縁正幸 「梅産業のゼロエミッションへの取組み」 和歌山高専機械工学科 (参照 2022-7-25)
<https://www.kushiro-ct.ac.jp/CTC/CTC-old/forum/presen/wakayama.pdf>
- ・ 共同監査プログラム (JMP) 報告書「衛生施設と飲料水の前進:2017 年最新データと持続可能な開発目標 (SDGs)」 2017.7.12, (参照 2022-7-25)
- ・ 紀州梅効能研究会 「食中毒予防 (制菌作用)」
<https://www.umekounou.com/effect/foodpoison.html> (参照 2021-12-15)
- ・ 愛知県衛生研究所生物学部 「病原性大腸菌—下痢を引き起こす 5 種類のメンバー」
<https://www.pref.aicni.jp/eiseiken/67f/eagec.html> (参照 2022-3-14)