

B-29 宇宙におけるメダカ飼育実験のための 硝化・脱窒手法の開発

○庄司 仁^{1*}・植本 弘明¹・内田 智子²・西川 和香²

¹(財)電力中央研究所 環境科学研究所 (〒270-1194 千葉県我孫子市我孫子1646)

²(独)宇宙航空研究開発機構 有人宇宙環境利用ミッション本部 (〒305-8505 茨城県つくば市千現2-1-1)

* E-mail: t-shoji@criepi.denken.or.jp

1. はじめに

独立行政法人宇宙航空研究開発機構 (JAXA) では、国際宇宙ステーションの日本実験棟「きぼう」において、メダカの長期飼育試験を計画している。メダカを脊椎動物のモデルとして、微小重力環境での代謝機能や生殖過程を調べることが目的である。試験を行うためには、輸送段階から維持管理に至るまでの条件を考慮した、適切な飼育装置が不可欠である。これまでに、さまざまな機能を備えた飼育水槽、酸素供給のための人工肺、水質維持のためのフィルタ類などが開発されている^①。

このうち水質維持用のフィルタは、固形分の除去を担う不織布フィルタ、有機物の除去を担う活性炭フィルタ、硝化細菌の付着担体を充填した生物フィルタなどで構成される。前二者は、対象物質を捕捉する仕組みなので、定期的な交換が必要になる一方、水質の中長期的な維持は容易である。これに対して生物フィルタは、交換が不要である一方、中長期的には pH の低下や硝酸性窒素の蓄積が問題となり得る。現状では、宇宙飛行士による手作業での対策 (アルカリの添加・飼育水の交換) が想定されている。しかし、宇宙での繁忙な作業計画をふまえると、省力化に向けた改良の余地があると考えられる。

具体的な方策として、生物フィルタに脱窒機能を加えることができれば、pH 低下の緩和と硝酸性窒素の低減が期待される。ただし、空間的な制約がきわめて厳しいことから、既存の生物フィルタに組み込めるような、小型かつ単純な手法が求められる。言い換えると、硝化に適した好気条件と脱窒に適した無酸素条件を、一つのフィルタで両立させる必要がある。また、脱窒のための電子供与体の供給についても、追加の器具類 (ポンプや貯留タンク) を最小限とすることが重要となる。これらの課題に対して、著者らの提案している二重袋型の脱窒手法^{②③}が有効だと考えられる。本手法は、表面に脱窒細菌を固定化した外袋と、電子供与体のエタノールを封入

したポリエチレン (PE) の内袋で構成される。PE を介して、微量のエタノールを一定の速度で供給できるため、好気条件に設置しても、外袋の内側が局所的な無酸素条件となる。さらに、エタノールの供給に動力や器具が不要であり、二重袋自体もほとんど場所を取らないことから、空間的な制約にも対処できる。

本研究では、既存の生物フィルタの硝化手法と二重袋による脱窒手法を組み合わせた、新たな生物フィルタについて検討した。まず、メダカの飼育試験への適用可能性を確認するため、二重袋の有無が異なる 2 系列の装置で、模擬飼育試験を行った。次に、宇宙ステーションまでの輸送に対応した保存方法 (詳細は 2(2)参照) を確立するため、二重袋を異なる材質の袋で多重化して、脱窒の開始時期を自動制御する手法について検討した。

2. 実験の方法

(1) 模擬飼育試験

本試験では、飼育水槽、生物フィルタ、ウエストフィルタ (活性炭と不織布を合わせたフィルタ) などで構成される図 1 の装置を用いた。生物フィルタに二重袋を加えた脱窒系と、加えていない対照系の 2 系列を用意した。飼育水 (南アルプスの天然水、サントリー) は 4L で、26℃に保温して毎分 200mL で循環させた。また、装置全体を暗室に置いて、蛍光灯で 14 時間/10 時間の明暗条件を設定した。ウエストフィルタには、両端に綿状の不織布を、その間に 30g の活性炭を充填した。実験開始時

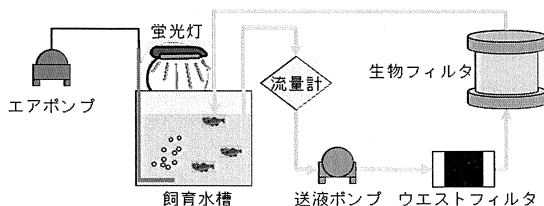


図 1 : 模擬飼育試験の装置構成

に、8匹のメダカ（雌雄混合）を入れて、後に10匹に増やした。給餌量も、朝夕で各20mgから各30mgに増やした。生物フィルタには、硝化細菌（*Nitrosomonas europaea* NBRC-14298 と *Nitrobacter winogradskyi* NBRC-14297）が付着した粒状担体 300mL を充填して、さらに脱窒系には、二重袋をフィルタ内の下流側に設置した。

二重袋は、エタノールを封入した低密度非多孔性ポリエチレンの内袋（0.1mm厚、4cm×8cm）と、不織布の外袋（0.6mm厚）で構成される。外袋の表面には、脱窒細菌（*Paracoccus pantotrophus* JCM-6892）と光硬化性樹脂（東洋合成工業 PVA-SbQ SPP-H-13）の混合液を約1mm厚となるように塗布した後、メタルハライドランプで固定化させた。

(2) 二重袋の多重化による輸送段階への対応

前述の二重袋では、作製直後から常にエタノールが供給されるため、飼育水の循環を行わない輸送段階（約10日間）において、生物フィルタ内にエタノールが蓄積してしまう。この問題への対策として、ポリビニルアルコール（PVA）の袋と、生分解性プラスチックであるポリグルコール酸（PGA）の袋で、既存の内袋を多重化する案が考えられる。乾燥状態のPVAはエタノールの透過性が極めて低いため、作製した直後の多重化袋はエタノールをほとんど通さない。しかし、生物フィルタに設置して水と接触させた後、PGAが水分（湿気）を通す程度まで分解されると、多重化による遮蔽効果は失われる。すなわち、PGAの分解に要する時間を適切に設定すれば、エタノールの供給開始時期を制御できることになる。

本実験では、4種類の生物フィルタを作製して、多重化の影響を確認した。それぞれの条件は、硝化細菌のみ（対照系）、二重袋（0.05mm厚、5cm×5cm）を加えたもの（二重系）、二重袋を0.03mm厚のPVAと0.015mm厚のPGAで多重化したもの（多重15系）、同じく0.03mm厚のPVAと0.03mm厚のPGAで多重化したもの（多重30系）とした。これらの生物フィルタに、(1)と同じミネラルウォーターを入れて、25℃の暗所で10日間の保存を行った。保存後の水質を測定してから、水を交換して、メダカの排泄量に相当するアンモニア性窒素（日量1.7mg/L）を与えながら、1Lの水を循環させた。アンモニア性窒素、亜硝酸性窒素、硝酸性窒素、TOCなどを測定することで、保存後の生物フィルタの機能を評価した。

(3) 分析方法

TOCはTOC/TN分析器（TNC-6000、東レエンジニアリング）で、亜硝酸性・硝酸性窒素はイオンクロマトグラフ分析器（ISC-1500、AS12Aカラム、Dionex）で、アンモニア性窒素はインドフェノール法で測定した。

3. 結果

(1) メダカの模擬飼育試験における二重袋の効果

対照系と脱窒系を比べることで、二重袋の追加によるメダカや硝化能力などに対する悪影響の有無、および期待される効果（硝酸性窒素の低減とpH低下の緩和）の程度を確認できる。メダカに関しては、活動状態（餌の食べ方、泳ぎ方）や産卵数など、目視できる範囲での違いはなかった。また、どちらの系列とも、アンモニア性窒素と亜硝酸性窒素は0.1mg/Lを上回らず（図示省略）、アンモニア酸化と亜硝酸酸化は順調であった。さらに、図2中段に示したように、二重袋で供給したエタノール（日量3.7mg/L^②相当）は、TOCとして残存しなかった。以上より、既存の生物フィルタに二重袋を追加しても、飼育環境に悪影響は確認されなかった。

一方、二重袋の硝酸性窒素に対する効果は、明確に観察された。図2上段のグラフのとおり、単調増加の傾向を示した対照系に比べて、脱窒系は5mg/L以下に維持されており、蓄積を防ぐことができた。また、pH低下

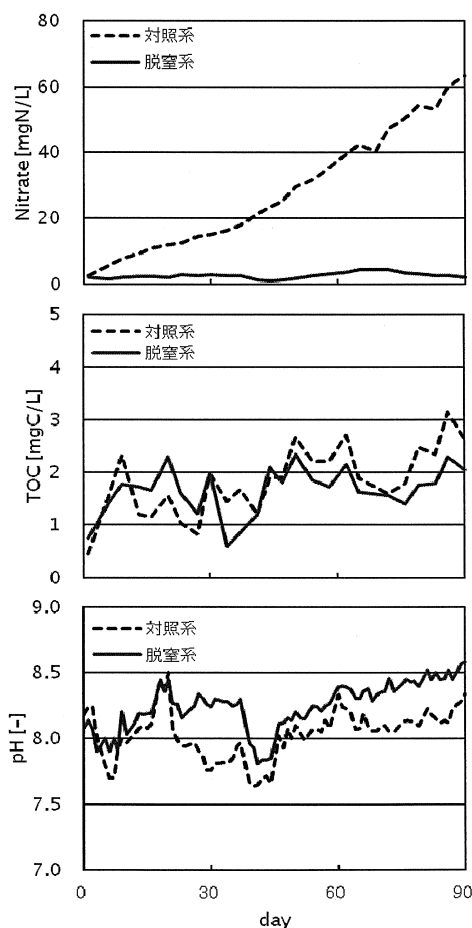


図2：模擬飼育試験における主な水質

の緩和については、対照系よりも脱窒系の pH が高い傾向を示した。ただし、どちらの系列も pH 調整 (7.5 以上の維持) は不要であったため、作業量を減らすという意味での効果は表れなかった。

(2) 保存時および保存後における多重化の影響

保存段階で生物フィルタ内に蓄積したTOCは、表1のとおりであった。二重袋のみでは1600mgC/Lまで増加しており、飼育水の循環で10倍程度に希釈されたとしても、適切な飼育環境とは言い難い状態となった。これに対して、多重化15および30の系列では、40～80mgC/Lの濃度に抑えられた。このTOCがエタノールなのか、それともPGAの分解産物（たとえばPGAのモノマーであるグリコール酸）に由来するのか、同定は行っていない。どちらにしても生分解性が高いことから、飼育水による希釈効果と合わせて、使用を始めた後には急激に低下すると予想される。

保存後の生物フィルタの硝化能力については、どの系列もアンモニア性窒素と亜硝酸性窒素が0.1mgN/Lを上回らなかったことから（図示省略）、保存による悪影響は見られなかった。有機物に関しては、水の交換と循環の

表 1：保存後の生物フィルタ内部のTOC

使用した水・保存前	< 1.0 mgC/L
対照系・保存後	5.2 mgC/L
二重系・保存後	1654.0 mgC/L
多重15系・保存後	81.6 mgC/L
多重30系・保存後	43.6 mgC/L

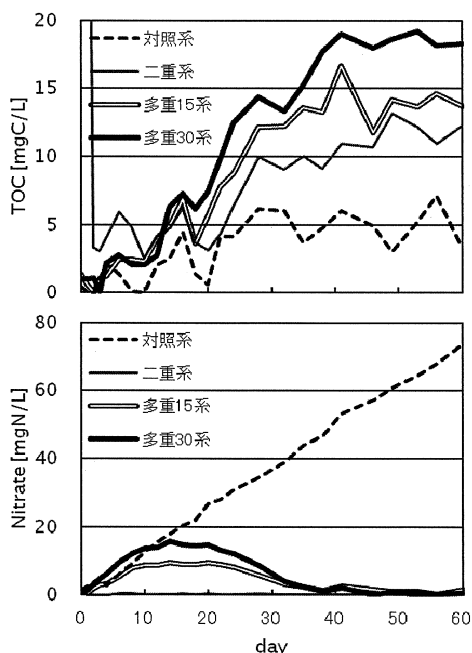


図 3：保存後の生物フィルタによる処理水質

開始により著しく低下した。なお、この時点での水の交換は、フィルタの性能を同一の開始条件で確認するために行ったもので、実際の使用時には想定されていない。時間の経過とともに、多重系が二重系よりも高い傾向、そして全体的な漸増傾向を示した。本実験では活性炭フィルタを用いなかったことから、難分解性TOCの蓄積が避けられなかったものと考えている。硝酸性窒素に関しては、単調増加となった対照系と、蓄積の見られなかった二重系は、保存を行わなかった模擬飼育試験と同じ傾向であった。多重系では、PGAフィルムの厚さに応じて、はじめの1～2週間は対照系と、その後は二重系と同様の挙動となった。すなわち、保存期間の10日間と、さらに1週間 (0.015mm厚) ～2週間 (0.03mm厚) にわたって、多重化によるエタノールの遮蔽効果が続いていた。したがって、多重化およびPGAフィルムの厚さの調整は、保存段階への対応として有効な手法だと考えられる。

4. まとめ

- 脱窒細菌を固定化した外袋と、エタノールを封入した内袋で構成される二重袋は、メダカの模擬飼育試験において十分な脱窒能力を発揮した。
- 二重袋を追加しても、メダカの活動や飼育環境に対する悪影響は見られなかった。
- 二重袋の外側にPVAおよびPGAフィルムで多重化することで、輸送段階の後にエタノール供給が始まるような制御が可能となった。

謝辞

本研究は、JAXAの委託研究「水棲生物実験装置 水質維持用生物フィルタの技術検討 -脱窒フィルタの基礎検討 その1 (2009年度)・その2 (2010年度)-」の一環として行われた。実験で用いたPGAフィルムは、株式会社クレハから無償で提供された。飼育や分析作業については、北澤奈穂氏・小竹由美氏・富田雪絵氏 (株式会社セレス) の協力を得た。ここに記して謝意を表する。

参考文献

- (1) <http://kibo.jaxa.jp/experiment/pm/aqh/>
- (2) 庄司 仁ら：ポリエチレンフィルムの選択的透過性を利用した脱窒装置の活性汚泥反応槽への適用, 水環境学会誌, Vol. 33(7), pp. 81-86, 2010.
- (3) Uemoto H *et al.*: Nitrogen removal with a dual bag system capable of simultaneous nitrification and denitrification, *Biochem. Eng. J.*, Vol. 52, pp. 104-109, 2010.