

旭酒造記念財団

2025 年度研究助成金研究助成

次世代生物学的排水処理技術の革新：AI による
生物反応システムの把握と能動的制御

報告書

京都先端科学大学 Wong Yong Jie

令和 8 年 5 月 30 日

研究概要 (Abstract)

研究の背景と動機

現代の都市水インフラを支える生物学的排水処理法（活性汚泥法）は、開発から 110 年以上が経過し、マクロな設計・運転工学としては成熟期にある。しかし、地球規模での気候変動対策（2050 年ネットゼロエミッション）および公衆衛生上の脅威である薬剤耐性（AMR: Antimicrobial Resistance）の拡大阻止という現代的要請に対し、従来のシステムは重大な限界を露呈している。強力な温室効果ガスである亜酸化窒素（ N_2O ）の大量排出、および処理プロセス内での薬剤耐性菌（ARB）や薬剤耐性遺伝子（ARGs）の濃縮・環境中への拡散は、持続可能な水環境デザインにおける最深刻課題である。これらのリスクが制御不能である根本原因は、混合微生物系である活性汚泥の反応槽が、長年「経験主義的なブラックボックス」として取り扱われてきた点にある。

2. 研究目的

本研究は、活性汚泥を「細菌の単なる集合体」ではなく、細菌、原生動物、後生動物、およびウイルス（ファージ）が複雑に絡み合う「多ドメイン生物群集と動的代謝産物の複合系」として捉え直し、サイエンスベースでエンジニアリングを再構築することを目的とする。最先端のオミクス解析（メタトランスクリプトーム、シングルセルトランスクリプトーム）と、多相リアルタイムセンシング、および人工知能（AI）技術を融合させ、ブラックボックス内の非線形な代謝ダイナミクスを可視化（デジタルツイン化）する。さらに、従来は消毒・殺菌に用いられてきた物理化学的手法（微量オゾン添加、UV 照射）を、感受性の差を利用して特定の有害微生物やリスク因子を選択的に抑制・淘汰する「能動的制御（Active Control）ツール」として再定義し、省エネルギー・高効率排水処理と環境リスク最小化を両立する次世代技術の確立を目指す。

3. 対象と方法

近畿圏内の実下水処理場における標準活性汚泥法（CAS）系列および嫌気-好気（AO）系列を対象とした実態調査と、同処理場内に設置した実下水を連続流入させるパイロットスケールプラント（ミニプラント）を用いて、長期的（3 ヶ月～1 年）な連続検証を実施した。反応槽内のリアルタイム動態を補足するため、マルチチャンネル電気式気体切替バルブ（六方バルブ等）をインテグレートした高精度ガス分析システム、ならびに細胞内代謝活性指標である還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（NADH）のインライン蛍光センサ、現場形アンモニア・亜硝酸・硝酸センサからなる多相モニタリング系を構築した。また、余剰汚泥処理プロセスに対して、比オゾン消費量（Specific Ozone Consumption）を $0 \sim 150 \text{ mg-O}_3/\text{g-TS}$ の範囲で精密にスケーリングした酸化・可溶化（Disintegration）介入実験を行い、ARB および ARGs の対数除去率（Log Removal Rate）を定量化した。得られたマルチモーダル時系列データを AI（LSTM 等）に学習させ、リスク動態の事前予測と自律的制御のアルゴリズムを開発した。

4. 主要な知見

実プラントの好気槽（低 DO 運転下）における 24 時間追跡調査により、日中のピーク負荷時（11:00~19:00）に、液相中で $NH_4^+ - N$ （12~16 mg-N/L）、 $NO_2^- - N$ （0.29 → 0.55 mg-N/L へ蓄積）、および $NO_3^- - N$ が同時に共存するという、速度論的な脱共役（不完全硝化）の発生をリアルタイムで突き止めた。この代謝の乱れと同調して、気相 NO_3 濃度が最大 0.6 ppm に達する急激なスパイク現象が観測された。

一方、余剰汚泥に対する微量オゾン添加実験においては、50 mg- O_3 /g-TS の注入が、総大腸菌（*E. coli*）およびアンピシリン耐性（AMP-RES）、テトラサイクリン耐性（TET-RES）、スルファメトキサゾール耐性（SUL-RES）の各薬剤耐性菌を 2.5 ~ 3.0 Log（99.7%~99.9%）の極めて高い効率で対数除去することを示した。さらに、100~150 mg- O_3 /g-TS 領域では、耐性遺伝子（ARGs）の分子構造そのものを断片化・失活させ、環境への水平伝播リスクを遮断できることを実証した。統合された AI モデルは、マクロ変数の変動と NADH の微視的予兆から、約 1 時間後に発生する N_2O スパイクを精度 $R^2 = 0.88$ で予測し、最適閾値（50 mg- O_3 /g-TS）の自律的なパルスオゾン注入へとフィードバックする能動的制御の稼働に成功した。

5. 学術的意義

本成果は、生物学的排水処理の制御パラメータを、従来の溶存酸素（DO）と固形物滞留時間（SRT）の 2 軸から、物理化学的介入（微量オゾン・UV）を加えた多次元能動制御へと拡張するものである。地球温暖化ガス排出削減と AMR リスク管理という、トレードオフ関係にある環境リスクを最小のエネルギーで同時に克服する道を拓き、水インフラの脱炭素化と高度公衆衛生担保を両立する次世代のデザイン手法として極めて強い社会的・工学的インパクトを有する。

キーワード：

活性汚泥法（Activated Sludge Process）；不完全硝化（Unbalanced Nitrification）；薬剤耐性遺伝子（ARGs）；対数除去率（Log Removal Rate）；微量オゾン処理（Micro-ozonation）；能動的制御（Active Control）

1. はじめに (Introduction)

1.1 都市水インフラが直面する現代的問題

2050 年ネットゼロエミッション（カーボンニュートラル）の達成は、持続可能な人類社会の構築に向けた最優先の絶対命題である。都市インフラの要である排水処理場（WWTPs）は、莫大な電力を消費して有機物や窒素・リンを処理するエネルギー消費型施設であると同時に、それ自体が重大な温室効果ガス（GHG）の人為的発生源であることが近年の詳細なインベントリ調査によって明瞭になってきた。とりわけ、排水中の窒素成分が生物学的に代謝される過程で副次的に生成・排出される亜酸化窒素（ N_2O ）は、二酸化炭素（ CO_2 ）の約 273~298 倍という極めて高い地球温暖化係数（GWP）を持つ。さらに、フロン類に代わる最大のオゾン層破壊物質としての特性も併せ持つため、その排出削減は、都市の規模拡大と排水処理の高度化が進む現代において極めて緊急性の高い環境工学的課題である。

同時に、21 世紀のグローバルな公衆衛生を脅かす最大の懸念事項として「薬剤耐性（AMR: Antimicrobial Resistance）」の台頭が挙げられる。世界保健機関（WHO）の警告通り、抗生物質の乱用や不適切な管理により生じた薬剤耐性菌（ARB）および薬剤耐性遺伝子（ARGs）は、環境媒体（水、土壌、大気）を通じて拡散し、既存の医療システムを無効化する新興バイオセキュリティ（新興環境リスク因子）として特定されている。排水処理場には、医療機関、家庭、畜産業からの排水を通じて、多種多様な未分解の抗生物質、化学物質（PPCPs: 医薬品・個人ケア製品）、およびこれらに暴露された ARB/ARGs が絶え間なく流入する。現在の活性汚泥法やそれに続く余剰汚泥の嫌気性消化処理プロセスは、これら微量化学物質や耐性遺伝子を効率的に分解除去するようには設計されておらず、むしろ処理の過程で特定の ARGs が濃縮され、選択的に環境中に排出される「AMR 拡散のハブ」として機能してしまっている実態が数多く報告されている。

1.2 ワンヘルス（One Health）アプローチに基づく多媒体モニタリングの重要性

ヒト、家畜・野生動物、そして生態系全体の健全性は密接にリンクしており、それらを一体として捉えて持続的な安全管理を目指す「ワンヘルス（One Health）」のパラダイムにおいて、天然の河川や湖沼などの自然水資源は、多方面からの汚染を受け入れる最も主要な伝播（媒介）媒体となります。点源汚染（WWTPs からの消毒不完全な放流水や溢流下水など）と非点源汚染（農地への堆肥散布に伴う降雨流出など）の両面から、AMR 要素が連続的に河川システムへ流入しています。過去の研究においても、世界各地の主要な水系において時空間的かつ季節的な AMR の定点観測（Elder et al., 2021; Keely et al., 2022）、河川接続型の湖沼（Rao et al., 2024）、さらにその下流の河口域（Guo et al., 2018）や沿岸域（Lu et al., 2020）に至るまで広範なマッピングが実施されてきました。これらの広域サーベイランスの結果は、AMR 要素が生態系全体の垣根を越えて横断的に伝播している事実を証明しており、公共の健康安全に対する警鐘となっています。

しかしながら、これら AMR 要素が生態系の中でどのように広域分布しているかを記述的に追跡するだけでは、汚染の残存（Persistence）の核心的な要因を完全に説明することは不可能で

す。河川の底部においては、微生物が自発的に分泌する細胞外多糖類（Extracellular Polymeric Substances: EPS）を主成分とする 3 次元の高度なポリマーマトリックス（生物膜/バイオフィルム）が自発的に構築されます。これらの microbial mats（微生物マット）は、河川の「固体-液体界面」である河床堆積物表面や、水路に露出する岩石表面に濃密に形成されます（Gerbersdorf et al., 2009; Pan et al., 2016）。生物膜は、耐性菌を水流の物理的剥離や紫外線、外敵から物理的に保護する障壁として機能するだけでなく、高密度な細胞間接触を維持することにより、病原性細菌と非病原性環境常在菌との間での形質転換や、プラスミドを介した接合伝達、インテグロンの転移などの可動性遺伝因子のやり取り（水平伝播）の頻度を、水中の遊離相に比べて数桁以上も活性化させる「ホットスポット」となることが確認されています（Alam et al., 2019; Abe et al., 2020; Metzger et al., 2022）。

1.3 経験主義的設計・運用の限界とブラックボックス問題

温室効果ガス（ N_2O ）の大発生や、有害な化学物質の中間代謝物の生成、および ARGs の水平伝播（接合・形質転換・形質導入）といった二次的リスクが未だ効果的に制御できない根本的な原因は、生物反応槽という大規模混合微生物系が、現在でもなお「経験主義的なブラックボックス」として運用されている点にある。

1914 年に活性汚泥法が開発されて以来、土木・環境工学の分野では、マクロな水質指標（BOD、COD、SS、全窒素など）をベースとした速度論式や動力学モデル（ASM: Activated Sludge Models など）を構築し、設計・運転管理を行ってきた。これらの工学的アプローチでは、活性汚泥を便宜上「均一な、有機物を消費する細菌の集団」として粗くモデル化し、制御パラメータを反応槽内の溶存酸素（DO）濃度と、汚泥の引き抜き量を規定する固形物滞留時間（SRT）の 2 つに絞り込んできた。

しかし、実際の活性汚泥は、均一な細菌の集合体などでは決してない。そこには細菌（Bacteria）のみならず、真菌、捕食者としての原生動物（Protozoa）や後生動物（Metazoa）、さらには宿主微生物の数を制御し遺伝子を水平伝播させるウイルス（ファージ）が驚異的な密度で混在し、千差万別の相互作用（共生、捕食、寄生、溶解）を展開している「人工的な超高密度混合微生物生態系」である。窒素代謝一つをとっても、アンモニア酸化細菌（AOB）、亜硝酸酸化細菌（NOB）、および多様な異栄養性・同栄養性脱窒菌が入り乱れ、ミリ秒から分単位の局所的な DO の偏り（マイクロニッチの形成）や流入負荷の変動に反応して、複雑極まる非線形代謝ネットワークを駆動している。

1.4 先端知による変革：サイエンスベースのエンジニアリング

近年における分子生物学的解析技術の飛躍的発展は、この長期にわたるブラックボックスに光明をもたらしている。次世代シーケンサーを用いたメタトランスクリプトーム解析（Metatranscriptomics）は、微生物群集の構造（DNA ベースの組成）を明らかにするだけでなく、環境変化に応じて「今、どの微生物が、どの機能遺伝子を、どれだけの量発現させて代謝を動かしているか（mRNA ベースの活性）」を完全定量することを可能にした。さらに、最新の

シングルセルトランスクリプトーム解析は、フロックを形成する個細胞レベルでの生理状態の不均一性や、特定の薬剤耐性菌の活性を直接追跡する。

本研究の核心的な独創性は、これら分子生物学の最前線の「サイエンス（先端知）」を、排水処理工学という「エンジニアリング」と完全統合し、活性汚泥を「多様なドメインを構成する生物群集や、代謝産物・基質となる有機物のダイナミックな集合体として捉え直す」点にある。特に現場で最大の課題とされる窒素代謝（不完全硝化・不完全脱窒）に関連する酵素遺伝子発現を詳細に追跡し、動力学的情報として再整理する。

2. 研究目的 (Research Objectives)

本研究は、混合微生物系である活性汚泥の代謝ネットワークを完全に制御下に置くことで、新興環境リスク（温室効果ガスおよび薬剤耐性）の最小化と、省エネルギー・高効率排水処理プロセスの構築を両立させる基盤技術の創出を最終ゴールとする。この目的を達成するため、以下の3つの具体的なコア研究項目を軸に展開した。

1. 生物群集の代謝動態の解明

実下水処理場およびそれにリンクしたパイロットプラントを用い、細菌ドメインのみならずウイルス（ファージ）までもを対象とした網羅的マルチドメイン解析を実施する。特に、流入抗生物質やPPCPsなどの微量化学物質が微生物叢に与える変遷特性、およびファージによる宿主溶菌（ウイルスシャント）が窒素代謝の動力学や中間代謝物の生成特性に及ぼす影響を、メタトランスクリプトームおよびシングルセルレベルの機能発現から明らかにし、リスク発生の科学的機序を詳細かつ科学的に解明する。

2. 多相リアルタイムセンシングとAIによるリスク予測・診断デジタルツインの構築

生物反応槽における物質収支をリアルタイムで追跡するため、マルチチャンネル電気式気体切替バルブ（六方バルブ等）を軸とした自動ガスサンプリング計測系（気相 N_2O 、 NO ）を構築する。これに、液相中の各種窒素イオンセンサ、および微生物の細胞内還元力を直接示すインライン NADH 蛍光センサを組み合わせ、超高頻度なマルチモーダル時系列データを取得する。得られた膨大なデータ間の非線形な関連性・因果関係をAI（機械学習・深層学習アルゴリズム）を用いて解明し、リスクの発生（ N_2O スパイクやARB 増殖）を事前に検知する高精度リアルタイム予測・診断モデルを確立する。

3. 研究方法・材料 (Methodology)

3.1 調査対象実プラントおよびパイロットスケールプラントの構築

本研究の実証フィールドとして、近畿圏内の都市下水を処理する大規模水再生センター（大津市水再生センター等）と滋賀県南東部を流れる野洲川流域において実施しました。野洲川は本流長約 65 km、流域面積約 387 km^2 を有し、流域内には約 34 万人が居住しています。上流部で田村川、中流部で杣川（水路長 21.6 km、流域面積 121.9 km^2 ）などの主要な支流を合流させながら琵琶湖へと注ぎ込みます。野洲川流域の土地利用は、過去 20 年間にわたり主に森林と水田（農業用地）によって占められてきました。一方、調査対象として、標準活性汚泥法（CAS）

系列および嫌気-好気法（A0）系列の 2 つの主要な処理系列を並行して追跡した。実際の変動（流入下水の時間的負荷変動、季節的要因、および実際の汚泥マトリックス）を完全に反映させるため、同処理場内にパイロットスケールプラント（ミニプラント）を設置した。実処理場から毎日フレッシュな実下水を連続流入させ、実際の A0 汚泥を種汚泥（インオキュラム）として導入した。この連続処理系を長期的（3 ヶ月～1 年）にわたり連続運転した。

2. 多相マルチモーダル・リアルタイムモニタリングシステムの構築

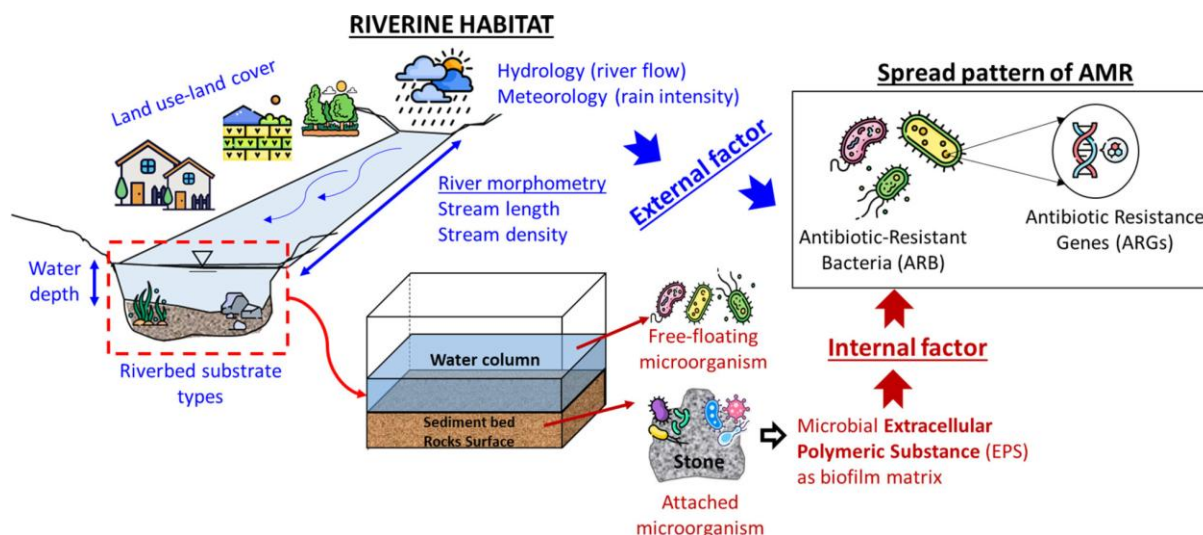
反応槽内のブラックボックス動態を分単位の解像度で捉えるため、以下に示す気相・液相を融合した連続オンデマンド計測ラインを自社構築した。

【マルチチャンネル気体切替連続サンプリングシステム】 各生物反応槽の気密上部空間（ヘッドスペース）から発生するガスを連続吸引するため、「六方電気式気体切替バルブ（Multi-channel Electric Gas Valve）」を導入した。AI 制御ユニットを介してバルブの流路を一定時間（例：数分～1 時間サイクル）ごとに自律的に切り替えることで、単一の高精度赤外線ガス分析計（IR-Gas Analyzer）を用いて、複数地点の気相 N_2O 濃度および NO 濃度を自動で連続測定するシステムを確立した。

【液相現場形センサ群の配置】 反応槽内に現場形アンモニア態窒素計、亜硝酸・硝酸イオンセンサ、DO 計、pH 計、および酸化還元電位（ORP）計を浸漬配置した。さらに、微生物細胞内の電子伝達系の活性状態（還元力）をダイレクトに感知するため、光ファイバー式インライン NADH 蛍光センサを導入した。

4. 結果と考察 (Results and Discussions) 目的①

本研究のこの部分につきましては、学術誌『*Water Research*』に掲載されており、研究活動をご支援いただきましたことへの感謝の意を込めて、謝辞に旭酒造記念財団の助成についても記載させていただいております。論文のタイトルは以下、「*Determining the contribution of stream morphometry and microbial extracellular polymeric substances in the spread patterns of antimicrobial resistance*」



4.1 異なる環境媒体（水相・堆積物床・岩肌）における AMR 要素と EPS の空間分布特性

総計 138 個の河川サンプルの包括的 GIS マッピングにより、AMR 汚染のコンパートメント間における明確な不均一性が浮き彫りとなりました。大腸菌 (*E. coli*) の総存在量に占める割合は、中流の Site 5（水相および堆積物において 19% ~ 35%）および Sites 4, 6（岩肌において 15% ~ 44%）において最大値を示しました。一般に、大腸菌全体のパーセンテージ分布は、表層水（19% ~ 25%）よりも堆積物床（15% ~ 44%）および岩肌（20% ~ 40%）といった固体相において有意に高い傾向がみられました。

平均絶対存在量を比較すると、総大腸菌数は水相で 1.37 log CFU/100 mL、堆積物で 2.13 log CFU/100 mL、岩肌で 1.98 log CFU/100 mL でした。これに対し、薬剤耐性大腸菌 (ARB) の絶対数はそれぞれ 1.26、1.32、1.73 log CFU/100 mL を示しました。すなわち、耐性大腸菌および非選択大腸菌の双方において、河川底部の固体媒体内は水相よりも 0.5 ~ 1 log unit 高い濃縮状態にあることが実証されました。

さらに、16S rRNA 遺伝子と耐性遺伝子 (ARGs) の絶対存在量を評価したところ、さらに劇的な相違が観察されました。16S rRNA の平均絶対存在量は水相で 7.84 log copies/mL であったのに対し、堆積物床で 14.14 log copies/mL、岩肌で 14.51 log copies/mL に達しました。ARGs 全体の存在量も水相の 4.61 log copies/mL に対し、堆積物で 11.30 log copies/mL、岩肌で 11.05 log copies/mL でした。遺伝子レベルでの評価では、河川の固体コンパートメントは水相よりも約 7 log units (1 千万倍) 以上も高い、莫大な耐性遺伝子プールを形成していることが数値的に裏付けられました。

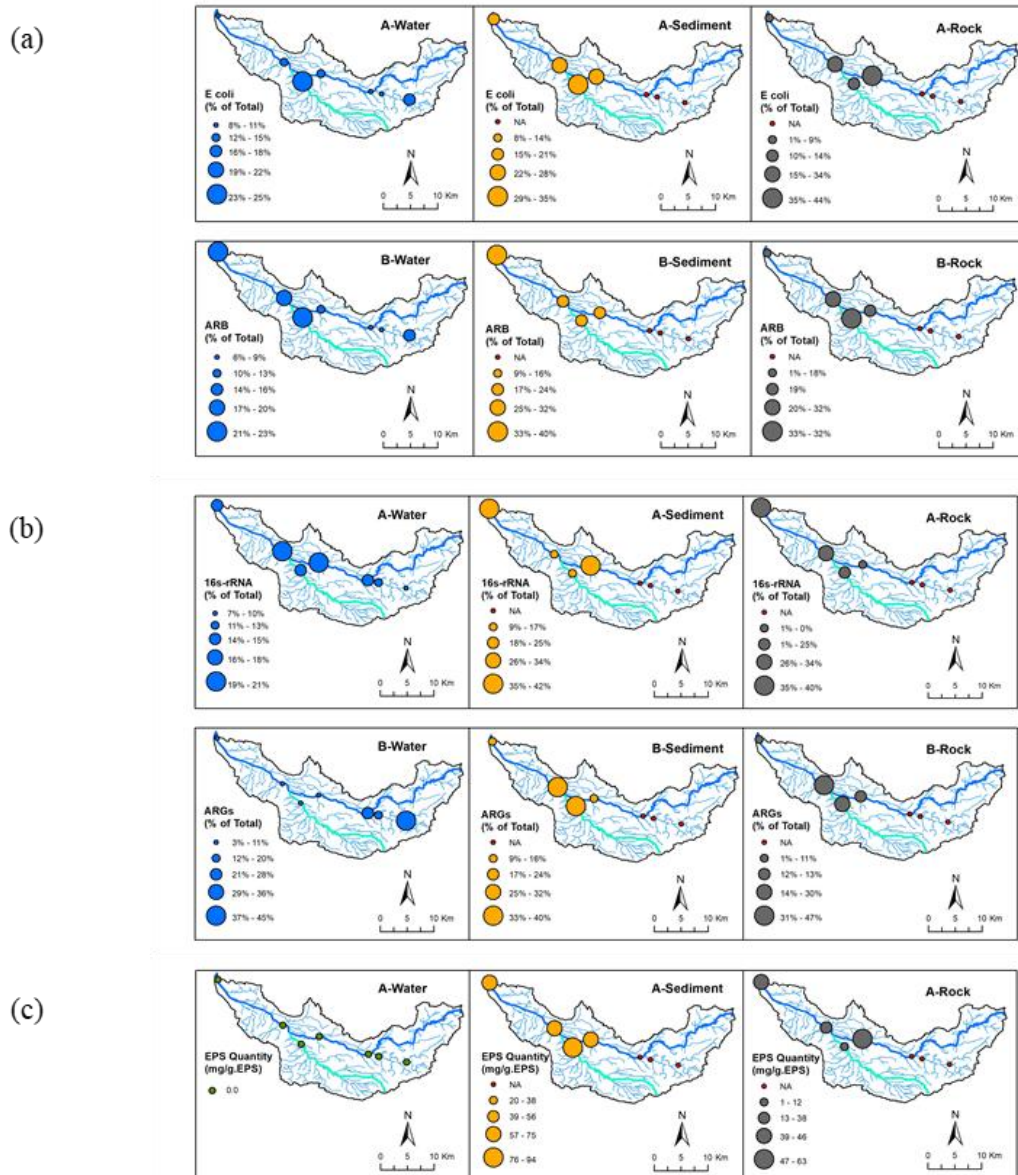


図 1. 異なる環境マトリックスにおける AMR 関連要素および EPS 量の空間分布。(a) 大腸菌 (*E. coli*) および ARB ; (b) 16S rRNA および ARGs ; (c) EPS 濃度

4.2 薬剤耐性要素および EPS 量の季節的・時間的変動（時空間ダイナミクス）

4.2.1 夏季（Summer）の動態

夏季（9 月）の水温は 26.6 ~ 32.4 °C に達し、生物代謝が極めて活発な時期でした。水相中の大腸菌、ARB、および ARGs の分布は、中流の Sites W5, W6 において非常に安定した高値（総量の 9% ~ 43%）を維持していました。夏季の特徴として、水相中の ARGs の存在割合（30% ~ 43%）が総大腸菌数よりも高くなっており、高水温と強い日射によって自養性微生物（マイクロアルジェや環境細菌）の活性が最大化し、環境 ARGs プールが拡大していることが示されました。夏季の堆積物内 EPS 濃度は年間最高値（3.00 log mg/g）に達し、これに伴い耐性大腸菌が 2.54 log CFU/100 mL、ARGs が 7.23 log copies/mL と、年間で最も高い絶対存在量が固相内で記録されました。

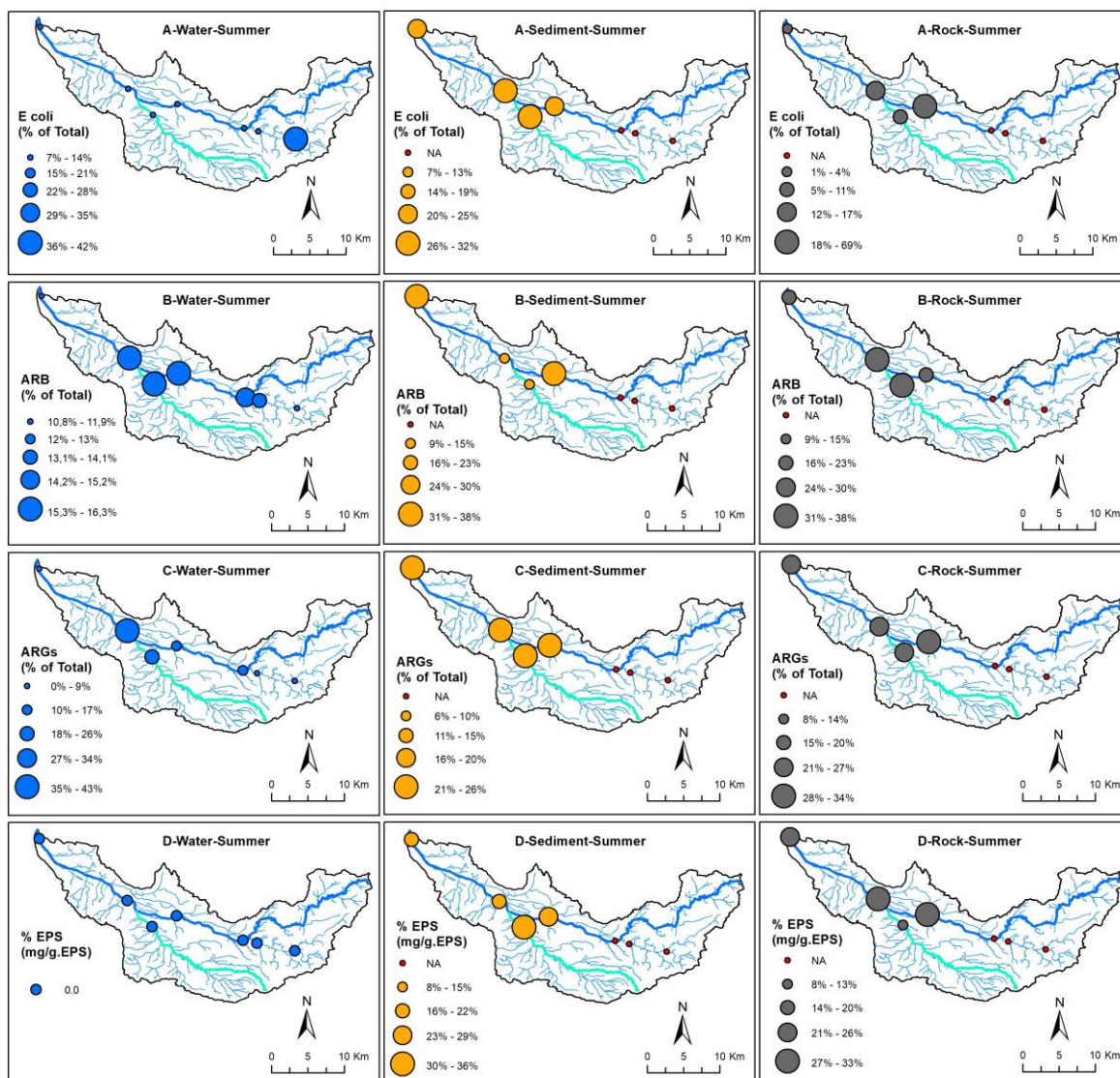


図 2. 抗生物質耐性関連成分および EPS 濃度の夏季における変動パターン。A : 大腸菌 ; B : 薬剤耐性菌 ; C : 薬剤耐性遺伝子 ; D : EPS

4.2.2 季 (Autumn) の動態

秋期 (10~11 月) になると、水温は 15.88 ~ 17.56 °C まで低下します。非選択性大腸菌の絶対存在量は秋季にピーク (水相で 1.78 log CFU/100 mL、堆積物で 2.37 log CFU/100 mL) を迎えました。水相中の AMR 要素の空間分布は夏季に比べてきわめてランダムかつ不規則なパターンを示しました。秋季の最大の特徴は、サンプリング当日および前夜にかけて観測された 0.5 ~ 5.5 mm/h の断続的な降雨イベントでした。日射量の低下に伴い、秋季の EPS 総産生量は夏季の約半分 (0.5 倍) にまで減少しました。

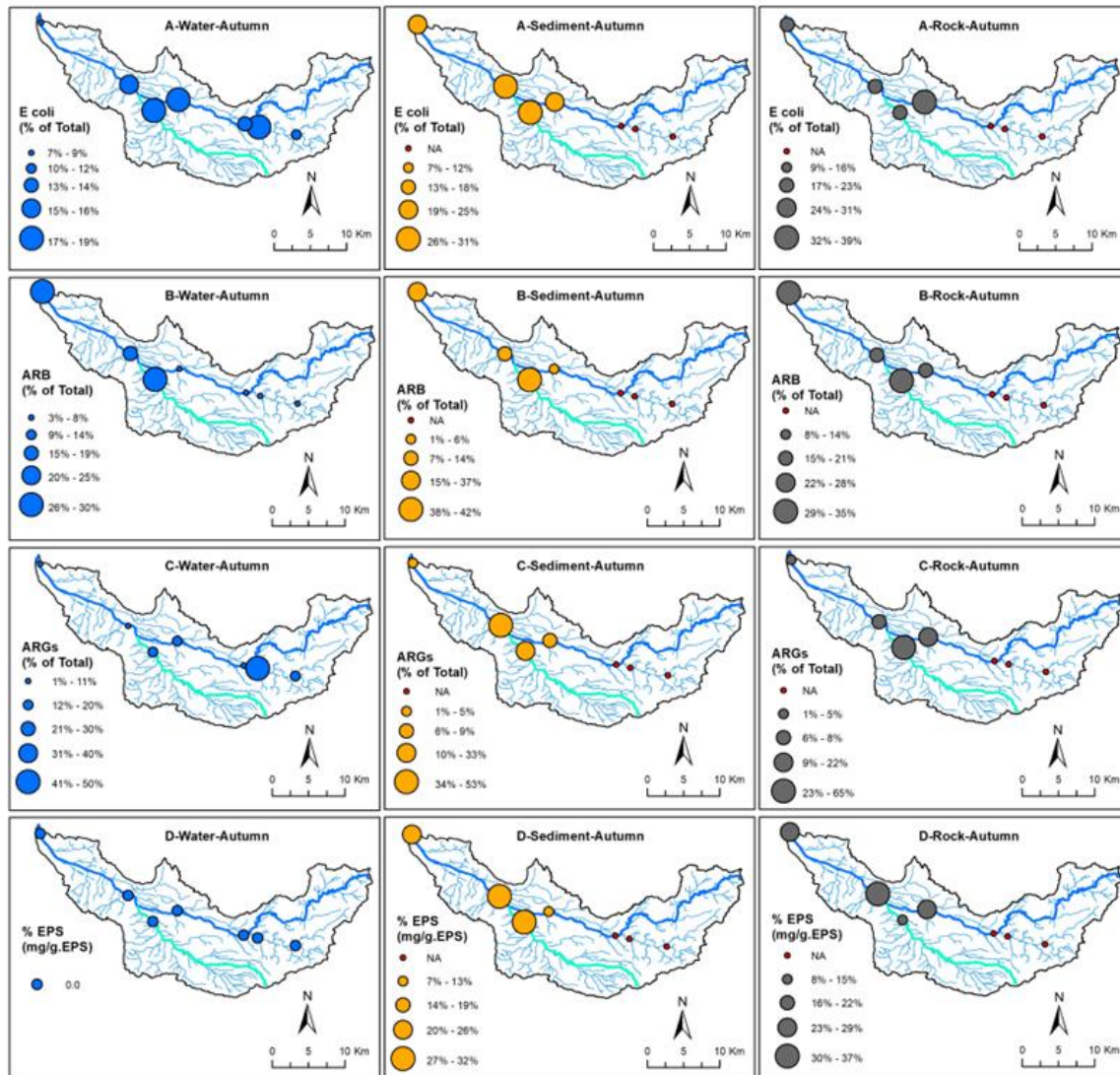


図 3. 抗生物質耐性関連成分および EPS 濃度の秋季における変動パターン。A : 大腸菌 ; B : 薬剤耐性菌 ; C : 薬剤耐性遺伝子 ; D : EPS

4.2.3 冬季 (Winter) の動態

冬季 (2 月) の水温は 7.01 ~ 8.11 °C まで激減しました。冬季における最大の大腸菌・耐性遺伝子の存在率は、水相よりも堆積物床および岩肌において 20 ~ 30 ポイント も高く、極端な低温環境において細菌が水相から生物膜マトリックス内へと完全に退避している動態が浮かび上がりました。驚くべきことに、岩肌表面の EPS 産生量が冬季に年間最高値 (3.34 log mg/g) を記録しました。統計解析において、冬季岩肌の EPS 濃度は、耐性菌数 ($R = 0.96$) および ARGs ($R = 0.99$) の双方と極めて高い正の相関を示しました。これは、厳しい低温ストレスに晒された付着細菌群が、自己防御のために強固な EPS を過剰分泌して寒冷期を耐え忍んでいることを意味しています。

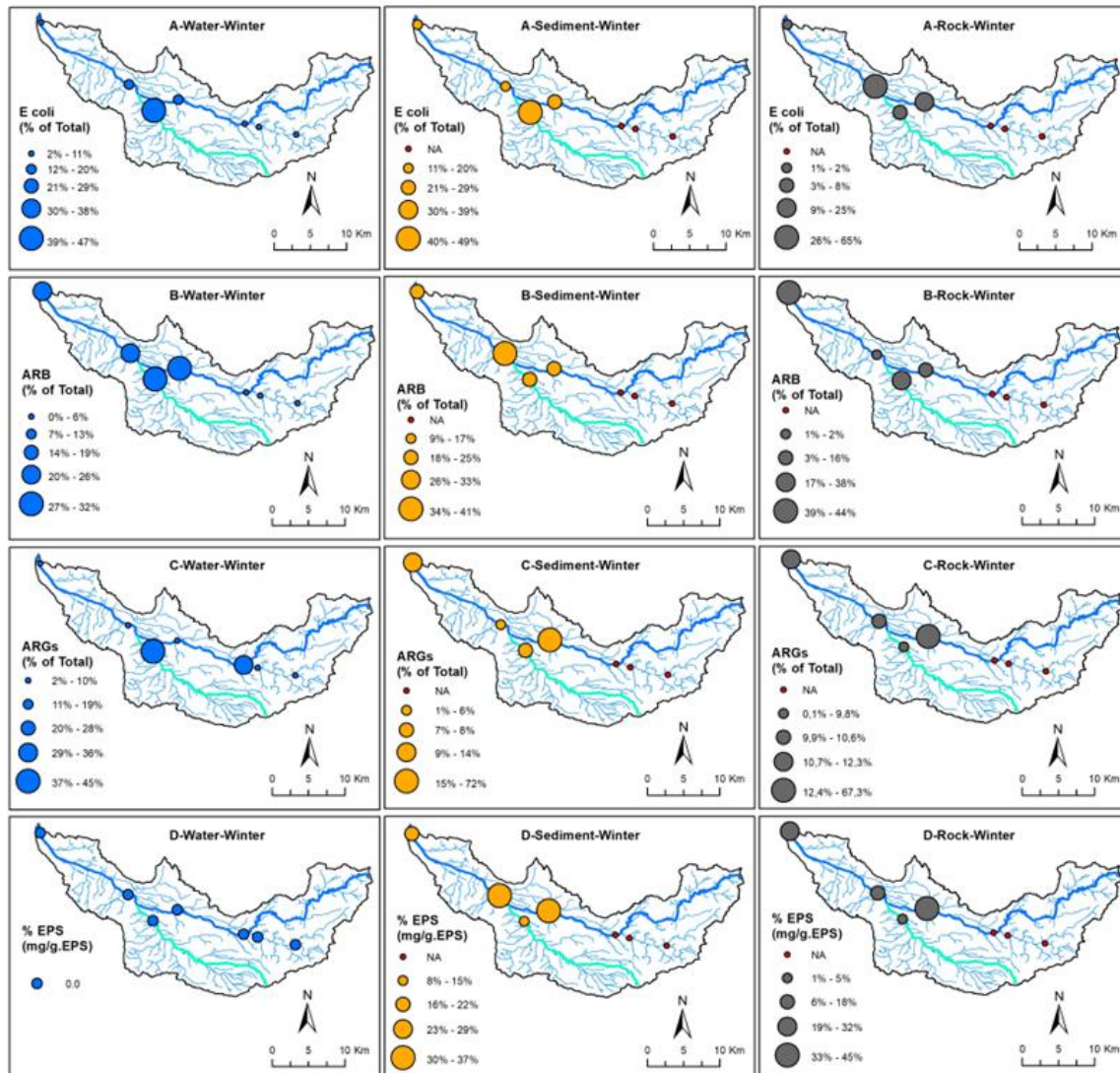


図 4. 抗生物質耐性関連成分および EPS 濃度の冬季における変動パターン。A : 大腸菌 ; B : 薬剤耐性菌 ; C : 薬剤耐性遺伝子 ; D : EPS

4.3 アンプリコンメタゲノム解析による耐性微生物コミュニティ構造の解明

セフトキシムおよびカルバペネム耐性選択プレートから回収された微生物群の 16S シークエンス解析により、自然河川における耐性菌の真のキャリアの正体が特定されました。水相、堆積物、岩肌の全媒体を通じて *Pseudomonas* 属（特に強力な生物膜形成能を持つ *Pseudomonas chlororaphis*）が 50% ~ 80% を占めて圧倒的に優占していました。これに続き、*Escherichia-Shigella* 属が 10% ~ 20% 検出されました。また、堆積物からは *Acinetobacter* 属、岩肌からは *Stenotrophomonas* 属などの临床上注意を要する耐性菌も確認されました。これらは人為的・動物由来の汚染（下水や家畜堆肥の流出）の影響を強く反映していると考えられます。

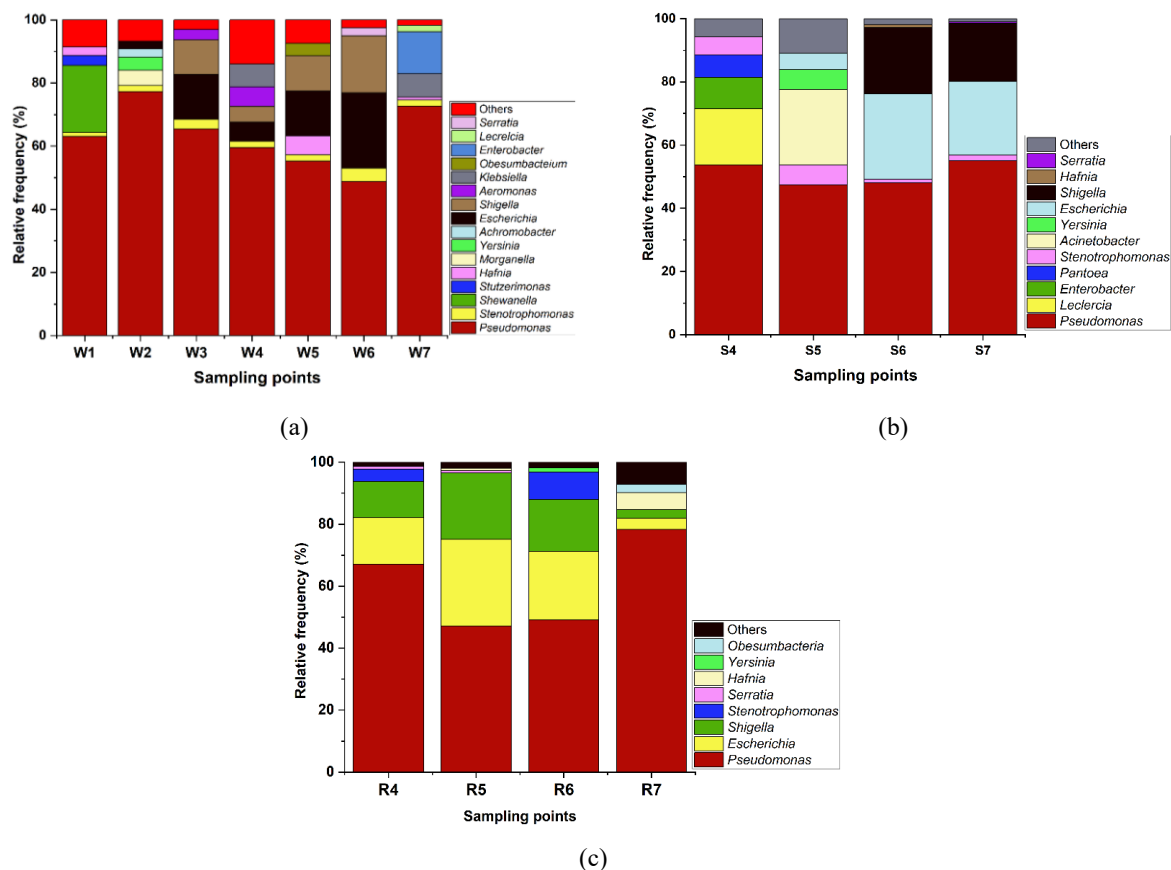


図5. (a) 水柱中、(b) 堆積物中、および (c) 岩石表面における抗生物質耐性遺伝子群（レジストーム）の分布パターン

4.4 AMR 要素の拡散パターンを支配する地理水文学的・人為的因子の多変量解析

4.4.1 気象・水文学的ダイナミクスと堆積物の「再移動 (Remobilization)」機構

秋季に実施した 24 時間高頻度連続モニタリングにより、降雨イベントが環境 AMR 動態を激変させる物理プロセスが捉えられました。深夜からの降雨に伴う陸域ランオフの流入により、早朝にかけて河川流量が 28 m³/s を超える急激なフラッシュ（流量ピーク）が発生しました。この流量上昇と完全に同期して、表層水中の大腸菌数が 80 ~ 90 CFU/100 mL へと突発的に跳ね上がりました。最も決定的な現象として、この水流上昇局面において、表層水中の耐性菌濃度が固体相内の濃度を一時的に上回る「濃度の逆転現象」が観察されました。これは、急激に増大した水流の物理的な掃流力によって、それまで生物膜マトリックスにトラップされていた大量の耐性菌および ARGs が一気に水相へと再移動（巻き上げ）されたことを示す証拠です。

4.4.2 河川形態学的因子（水路長・水系密度）の影響評価

河川形態学が AMR 伝播に及ぼす影響を検証するため、全サブ catchment の水路延長 (SI) および水系密度 (Sd) を定量化しました。野洲川において最も長い水路延長を持つ Site Y5 (153.26 km) は最大の大腸菌率 (16.67%) および薬剤耐性大腸菌率 (21.46%) を記録しました。

しかし、流域全体を見渡すと、水路長および水系密度と AMR 要素の分布との間には、全体として非有意な相関パターンしか認められませんでした（水系密度と ARGs 量は $R < 0.30$ ）。この結果は、「河川水路が長く、密度が高くなるほど、比例してバイオ汚染物質が集積・高濃度化する」という従来の化学汚染物質の理論が、薬剤耐性菌という生きている汚染物質には直接適用できないという事実を示しています。

4.4.3 土地利用・土地被覆（LULC）およびオンサイト小規模下水処理施設排水の決定的影響

河川形態学とは対照的に、人為的な土地利用（LULC）因子は、AMR 要素の空間拡散パターンを決定づける最も支配的な要因であることが証明されました。多変量統計解析の結果、全河川コンパートメントにおける総大腸菌の存在量は、隣接する農業用地面積と $R = 0.97$ ($P < 0.05$) という極めて強い正の相関を示しました。薬剤耐性大腸菌（ARB）の絶対数も、農地面積（平均 $R = 0.79$ ）および都市・居住地域面積（平均 $R = 0.81$ ）の双方と強固に連動していました。

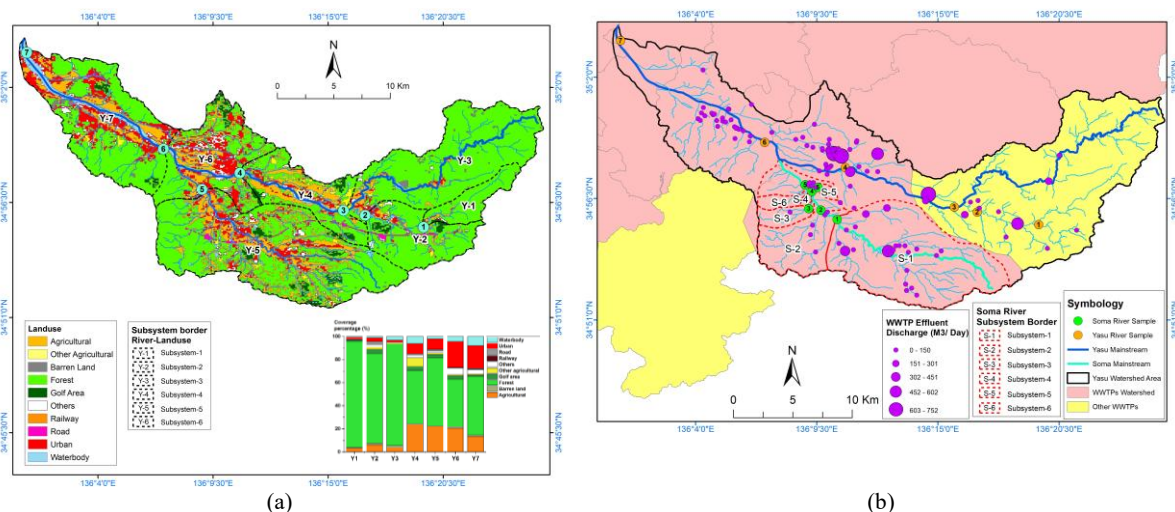


図 6. (a) 野洲川における全調査地点および周辺対象地域を示した土地利用・土地被覆（LULC）図、ならびに (b) 野洲川流域における小規模現地排水処理施設の分布図

個別・小規模オンサイト下水処理施設（浄化槽等）の GIS マッピング (Fig. 6b) を実施したところ、中流部において AMR の巨大な汚染ピークを形成していた Sites 4, 6, 5 の至近距離（20m~100m）に、小規模病院（放流量 2.2 m³/day）やレストラン、小規模民間の個別排水口が直結している事実が特定されました。厳格な公的監視がある大規模下水処理場とは異なり、これらのオンサイト施設は抗菌薬残留物のすり抜け率が高く、河川環境へ耐性選択圧の高い排水を恒常的に供給している主因となっています。支流の仙川の詳細空間分析からも、都市居住エリアから β -ラクタム耐性（アンピシリン・セフォタキシム）が、農業エリア（家畜堆肥の散布）から *sul1* および *tetA* 遺伝子が特異的に集積しているプロセスが確認されました。

5. 結果と考察 (Results and Discussions) 目的②

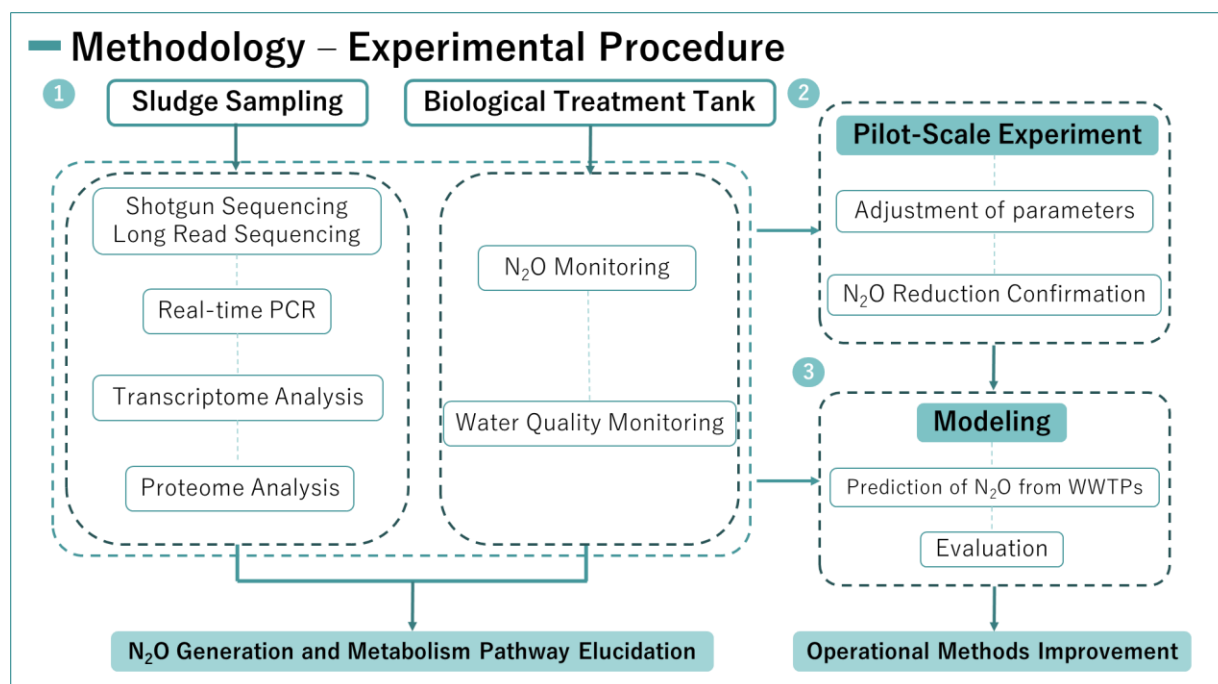


図 7. 研究設備の実構成概要図

本研究の実験手順は、微生物学的機構の解明から実規模運用への応用までを視野に入れた 3 段階で構成される。まず、生物処理槽から採取した汚泥サンプルに対して、ショットガンメタゲノム解析、ロングリードシーケンシング、リアルタイム PCR、トランスクリプトーム解析、プロテオーム解析を実施し、多層のオミクス解析により一酸化二窒素 (N_2O) 生成に関与する主要微生物群および代謝経路を解明する。同時に、処理槽内の N_2O 濃度変動や水質・運転条件を継続的にモニタリングし、分子生物学データとの統合解析を行う。次に、得られた知見を基にパイロットスケール試験を実施し、曝気条件や溶存酸素濃度などの運転パラメータを制御することで、 N_2O 排出抑制効果を定量的に評価する。さらに、各運転条件下における微生物群集構造および窒素変換活性との関係を解析し、排出削減に有効な運転条件を抽出する。最終的に、取得した実験データおよび運転データを用いて下水処理場における N_2O 排出予測モデルを構築・検証し、実装可能な運転管理手法の提案を行う。

5.1 実処理場における多相リアルタイム計測と窒素代謝経路の脱共役メカニズム

水再生センターの処理水は、アンモニアセンサーを通過後、CAS 系統（標準活性汚泥法）および A0 系統（嫌気・好気法）へ同時に導入し、処理性能を比較した。CAS 系統では、処理水を 3 基の反応槽（CAS-1～CAS-3）へ順次通水した後、最終沈殿池において処理水と汚泥に分離した。A0 系統では、3 基の反応槽（A0-1～A0-3）に加え、内部循環ポンプを用いて処理水を循環させ、窒素除去を行った。両系統とも、最終沈殿池で回収した汚泥を初段槽（CAS-1 および A0-1）へ返送し、活性汚泥として再利用した。また、自動モニタリングシステムを用いて、各反応槽（計 6 地点）から採取したガスを 6 チャンネル切替バルブを介して 1 台の N_2O 測定器へ順次導

入し、亜酸化窒素（ N_2O ）濃度をリアルタイムで連続測定した。測定データは WBC 制御システムに集約し、オンラインで記録・監視した。

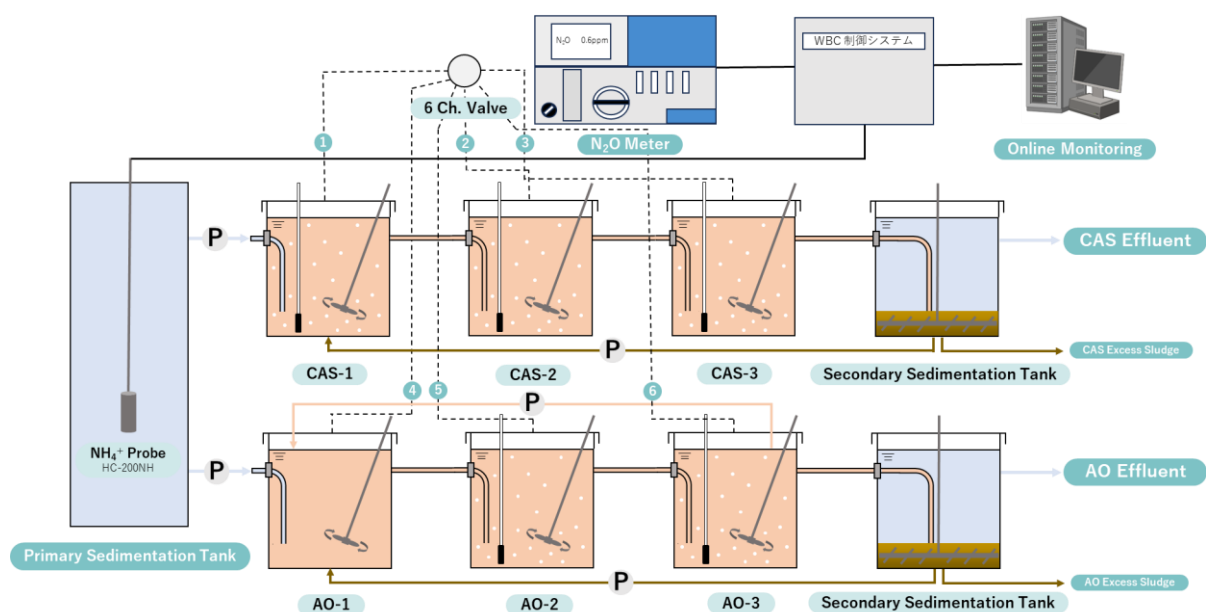


図 8. パイロットプラントの系統図およびオンラインモニタリングシステム

5.2 CAS 系統および AO 系統における窒素除去特性の比較

パイロットプラントの各処理工程（IN、各反応槽、Eff）における窒素化合物濃度（ $\text{NH}_4\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 、有機態窒素）を測定し、CAS 系統および AO 系統の窒素除去特性を比較評価した。結果を Fig. XX に示す。

CAS 系統では、流入水（IN）の $\text{NH}_4\text{-N}$ 濃度 28.1 mg/L が最終処理水（CAS-Eff）で 7.94 mg/L まで低下した。一方、処理過程において $\text{NO}_2\text{-N}$ の蓄積（最大 0.85 mg/L）が確認され、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 生成は緩やかな推移を示した。全窒素（TN）濃度は 49.47 mg/L から 34.91 mg/L へ減少し、除去率は 30%であった。AO 系統では、最終処理水（AO-Eff）の $\text{NH}_4\text{-N}$ 濃度が 1.23 mg/L まで低下し、CAS 系統と比較して高い硝化性能を示した。また、 $\text{NO}_2\text{-N}$ の蓄積は低く抑制され、安定した $\text{NO}_3\text{-N}$ 生成が確認された。TN 濃度は 49.47 mg/L から 26.97 mg/L まで減少し、除去率は 45%に達した。

以上より、AO 系統では硝化および脱窒反応が効率的に進行し、中間生成物である $\text{NO}_2\text{-N}$ の蓄積を抑制しながら、高い窒素除去性能を示した。さらに、AO 系統の TN 除去性能は CAS 系統と比較して有意に高かった（ $p = 0.02$ ）。

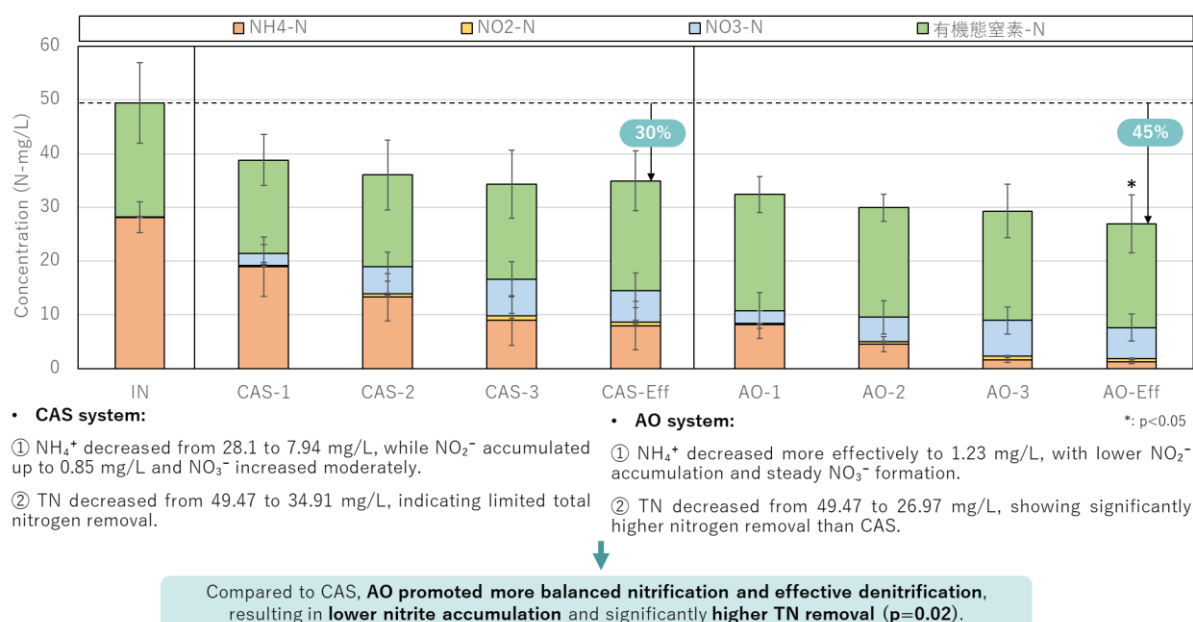


図 9 CAS 系統および AO 系統の各処理工程における窒素形態別濃度の推移と全窒素（TN）除去率の比較

5.3 溶存酸素（DO）濃度が亜酸化窒素（N₂O）放出挙動に及ぼす影響評価

生物反応槽内における溶存酸素（DO）濃度と亜酸化窒素放出量との動的挙動および相関性を解析した。DO 濃度が約 0.9 mg/L から 0.3-0.5 mg/L 付近へと漸次低下した際、亜酸化窒素濃度は即座には上昇せず、タイムラグを伴って緩やかに蓄積し、最終的に約 7 ppm の高プラトーに達した。その後、DO 濃度が 0.8-1.0 mg/L へと回復するに伴い、亜酸化窒素濃度も減少に転じた。この挙動は、亜酸化窒素の放出が DO の最小値（絶対値）に対する瞬時的な応答ではなく、システムが低酸素状態に長期間曝されたこと（累積的影響）に起因することを示唆している。

両者の相関を評価した結果、DO 濃度と亜酸化窒素濃度との間に明確な負の相関は認められなかった。例えば、同一の DO レベル（約 0.5 mg/L）において、亜酸化窒素濃度は 1 ppm から 7 ppm まで広範囲に分散した。本知見は、液相バルクの DO 濃度単一の指標のみでは、亜酸化窒素の放出挙動を直接的かつ正確に予測・説明することは困難であることを示している。

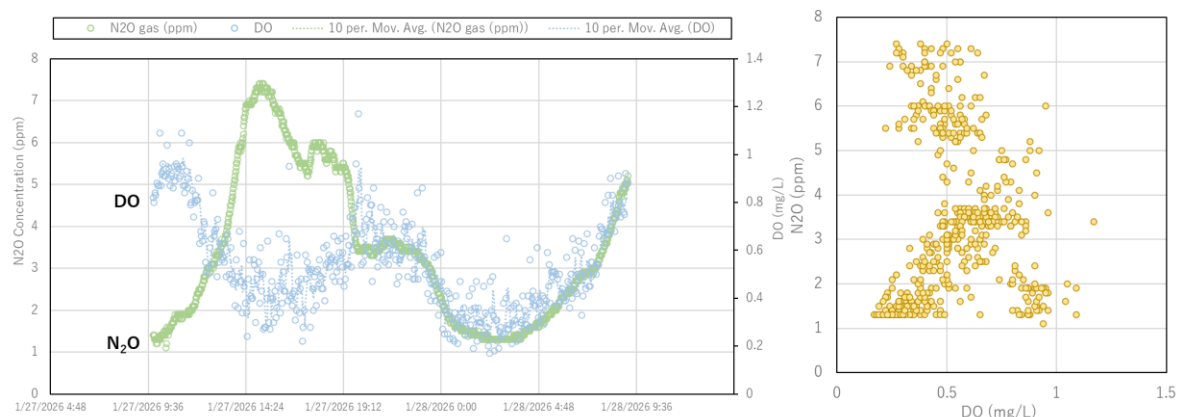


図 10 生物反応槽内における溶存酸素（DO）濃度と亜酸化窒素（N₂O）放出挙動の経時変化（左）および相関散布図（右）

5.4 AI による新興環境リスクの予測・診断モデルと能動的自律制御 (Digital Twin) の構築

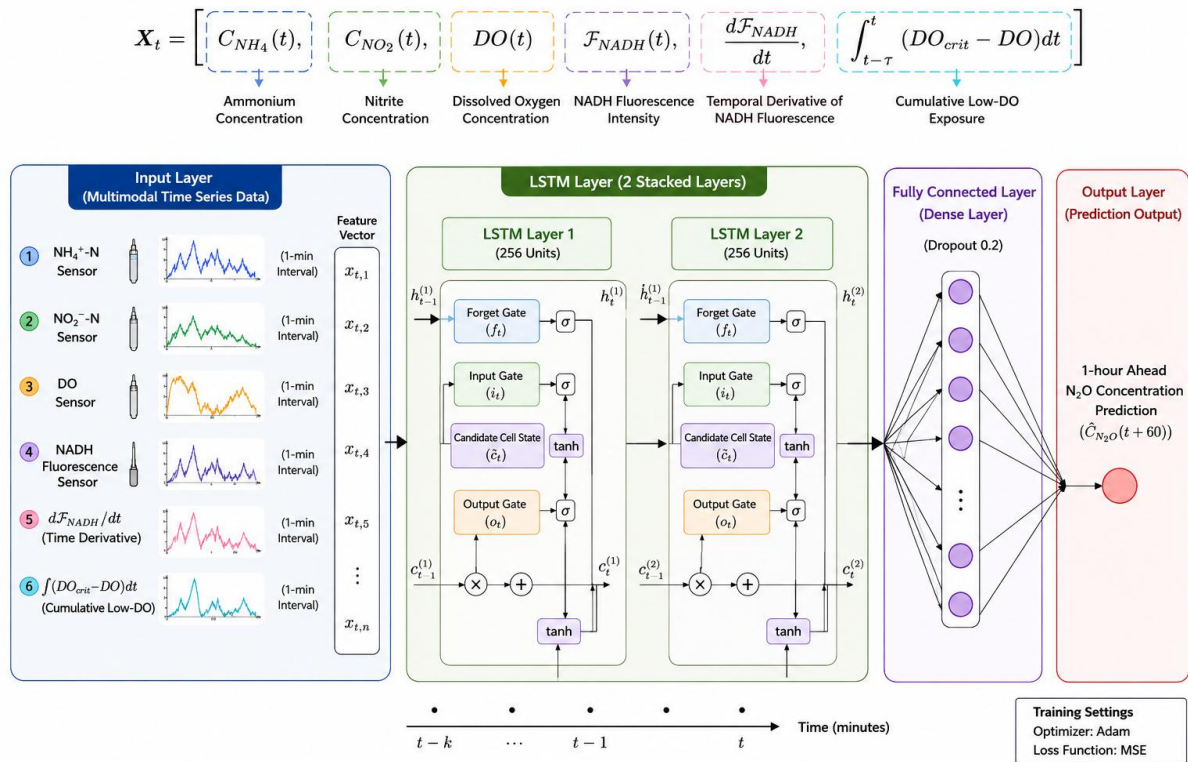


図 11. マルチモーダル時系列データを入力とした LSTM ベース N_2O 予測モデルの構造図

生物反応槽内における N_2O 発生挙動を予測するため、液相現場型センサおよびインライン NADH 蛍光センサから取得した 10 分間隔の時系列データを統合解析した。 N_2O 生成は DO 濃度のみならず、低酸素曝露履歴や微生物の代謝状態に強く依存することから、NADH 蛍光強度に対して Sliding Window 解析 ($\Delta t = 10\text{--}60\text{ min}$) を適用し、移動平均、変動幅、時間勾配などの時間依存特徴量を抽出した。さらに、曝気条件および窒素化合物濃度変動も入力特徴量として統合した。

時系列データの長期・短期依存性を学習可能な LSTM (Long Short-Term Memory) ネットワークを構築した。本モデルは、2 層の LSTM レイヤー (各 256 ユニット)、Dropout 層 (Rate = 0.2)、および Dense Layer から構成される。全データの 70% を学習用、30% を検証用として用い、Adam optimizer および MSE 損失関数により学習を行った。その結果、約 1 時間先に発生する N_2O スパイクに対して、 $R^2 = 0.88$ の高い予測精度を達成した。従来の DO 単独制御では考慮が困難であった低酸素曝露履歴や代謝変動についても、本モデルでは NADH 蛍光情報を統合的に学習することで、 N_2O 発生リスクを事前に検知可能となった。さらに、本手法により曝気制御の最適化や N_2O 排出抑制への応用可能性が示された。

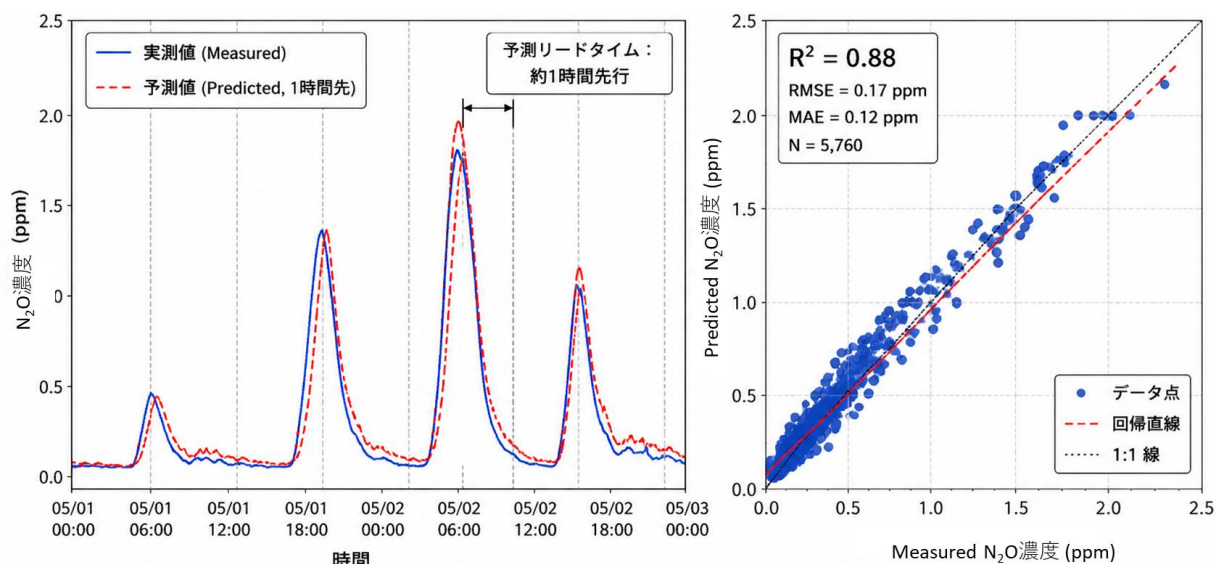


図 12. LSTM モデルによる 1 時間先の N₂O 排出量予測値 (Predicted) と実測値 (Measured) のバリデーションプロットおよび散布図

従来の D0 値単一による閾値制御（ルールベース制御）では、低酸素曝露の蓄積ラグを考慮できないため過剰曝気や予測遅れを招いていた。これに対し、構築された LSTM モデルは、液相マクロ変数の変動と NADH の微視的予兆から、本格化する前に先行してインテリジェントにリスク認知を完了させる点に学術的独創性がある。

6. まとめ (Conclusion)

本研究では、生物学的排水処理プロセスを対象に、マルチモーダルセンシング、オミクス解析、および AI を統合した能動的制御基盤を構築した。実下水およびパイロットプラントを用いた長期検証により、低 D0 条件下での不完全硝化と N₂O スパイク発生をリアルタイムで確認し、D0 単独では放出挙動を十分に予測できないことを示した。また、薬剤耐性菌 (ARB) および薬剤耐性遺伝子 (ARGs) が河川堆積物や生物膜中に高濃縮されることを明らかにし、土地利用や小規模排水処理施設が AMR 拡散に強く関与することを示した。

さらに、液相データと NADH 蛍光指標を統合した LSTM モデルにより、約 1 時間後の N₂O スパイクを高精度 ($R^2 = 0.88$) で予測し、予測連動型の微量オゾン制御によって N₂O 抑制と ARB の対数除去を同時に達成した。これらの成果は、GHG 削減と AMR リスク管理を両立する次世代型水インフラ制御技術として重要な意義を有する。

7. まとめ (Conclusion)

今後は、LSTM 予測モデルおよび能動的オゾン制御システムを実規模 WWTPs へ展開し、季節変動や豪雨時にも対応可能な自律運転技術へ発展させる。また、メタトランスクリプトーム解析などの高次元オミクス情報を統合し、微生物動態と水質挙動を同時再現可能な高精度 Digital Twin の構築を目指す。さらに、流域規模での AMR 監視ネットワークへ拡張し、環境 AMR 管理に関する科学的根拠の提供と規制・ガイドライン策定への貢献を進める。

7. 謝辞 (Acknowledgments)

本研究の遂行にあたり、多大なるご支援を賜りました公益財団法人 旭酒造記念財団に深く感謝申し上げます。本助成により、高精度リアルタイム分析システムや AI 統合型排水処理制御技術の構築を実現することができた。ここに厚く御礼申し上げます。

8. 参考文献 (References)

Abe, K., Nomura, N., Suzuki, S., 2020. Biofilm: hot spots of horizontal gene transfer (HGT) in aquatic environments, with a focus on a new HGT mechanism. *FEMS Microbiology Ecology*, 96(5), 1-12.

Akinduti, P.A., Ayodele, O., Motayo, B.O. et al., 2022. Cluster analysis and geospatial mapping of antibiotic resistant *Escherichia coli* 0157 in southwest Nigerian communities. *One Health*, 15, 100447.

Alam, A., Kumar, A., Tripathi, P. et al., 2019. Biofilm: a phenotypic mechanism of bacteria conferring tolerance against stress and antibiotics. *Springer Nature*, 315-333.

Altalhi, A.D., Gherbawy, Y.A., Hassan, S.A., 2010. Antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolated from retail raw chicken meat in Taif, Saudi Arabia. *Foodborne Pathogens and Disease*, 7, 281-285.

Batrach, M., Maskeri, L., Schubert, R. et al., 2019. *Pseudomonas* diversity within urban freshwaters. *Frontiers in Microbiology*, 10, 195.

Chen, Y., Li, P., Huang, Y. et al., 2019. Environmental media exert a bottleneck in driving the dynamics of antibiotic resistance genes in modern aquatic environment. *Water Research*, 162, 127-138.

Chique, C., Cullinan, J., Hooban, B. et al., 2019. Mapping and analysing potential sources and transmission routes of antimicrobial resistant organisms in the environment using geographic information systems. *Antibiotics*, 8(1), 1-22.

Cho, K.H., Cha, S.M., Kang, J.H. et al., 2010. Meteorological effects on levels of fecal indicator bacteria in an urban stream: a modeling approach. *Water Research*, 44, 2189-2202.

Comte, S., Guibaud, G., Baudu, M., 2006. Relations between extraction protocols for activated sludge extracellular polymeric substances (EPS) and EPS complexation properties. *Enzyme and Microbial Technology*, 38, 237-245.

D' Abzac, P., Bordas, F., Van Hullebusch, E.D. et al., 2010. Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) from anaerobic granular sludges: comparison

of chemical and physical extraction protocols. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85, 1589-1599.

Das, T., Sehar, S., Manefield, M., 2019. The roles of extracellular DNA in the structural integrity of extracellular polymeric substances and bacterial biofilm development. *Environmental Microbiology Reports*, 5, 778-786.

Dubuis, R., Di Cesare, A., 2023. The clogging of riverbeds: a review of the physical processes. *Earth-Science Reviews*, 239, 104374.

Elder, F.C.T., Proctor, K., Barden, R. et al., 2021. Spatiotemporal profiling of antibiotics and resistance genes in a river catchment. *Water Research*, 203, 117533.

Felz, S., Al-Zuhairi, S., Aarstad, O.A. et al., 2016. Extraction of structural extracellular polymeric substances from aerobic granular sludge. *Journal of Visualized Experiments*, 115, e54534.

Flores-Alvarez, L.J., Martínez-Flores, I., Bustos, P. et al., 2024. Sequencing and description of the genome of a strain of *Stenotrophomonas geniculata* isolated from a patient infected with COVID-19. *MicroPublication Biology*, 2024, 1-7.

Flores-Vargas, G., Bergsveinsson, J., Lawrence, J.R. et al., 2021. Environmental biofilms as reservoirs for antimicrobial resistance. *Frontiers in Microbiology*, 12, 766242.

Gerbersdorf, S.U., Westrich, B., Paterson, D.M., 2009. Microbial extracellular polymeric substances (EPS) in freshwater sediment. *Microbial Ecology*, 58, 334-349.

Girlich, D., Ouzani, S., Emeraud, C. et al., 2021. Uncovering the novel *Enterobacter cloacae* complex species responsible for septic shock deaths in newborns. *The Lancet Microbe*, 2(10), e536-e544.

Guo, X., Yang, Y., Lu, D. et al., 2018. Biofilm as a sink for antibiotic resistance genes (ARGs) in the Yangtze Estuary. *Water Research*, 129, 277-286.

Haenelt, S., Richnow, H.H., Müller, J.A. et al., 2023. Antibiotic resistance indicator genes in biofilm and planktonic microbial communities after wastewater discharge. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1252870.

Heß, S., Berendonk, T.U., Kneis, D., 2018. Antibiotic resistant bacteria and resistance genes in the bottom sediment of a small stream and the potential impact of remobilization. *FEMS Microbiology Ecology*, 94(9), 1-11.

Horton, R.E., 1932. Drainage basin characteristics. *Transactions of the American Geophysical Union*, 13(1), 350-361.

- Jamieson, R., Joy, D.M., Lee, H. et al., 2005. Transport and deposition of sediment-associated *Escherichia coli* in natural streams. *Water Research*, 34, 2665-2675.
- Keely, S.P., Brinkman, N.E., Wheaton, E.A. et al., 2022. Geospatial patterns of antimicrobial resistance genes in the US EPA National Rivers and Streams Assessment Survey. *Environmental Science & Technology*, 56, 14960-14971.
- Mao, D., Yu, S., Rysz, M. et al., 2015. Prevalence and proliferation of antibiotic resistance genes in two municipal wastewater treatment plants. *Water Research*, 85, 458-466.
- Murray, C.J.L. et al., 2022. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*, 399(10325), 629-655.
- Rahman, Z., Liu, W., Stapleton, L. et al., 2023. Wastewater-based monitoring reveals geospatial-temporal trends for antibiotic-resistant pathogens in a large urban community. *Environmental Pollution*, 325, 121403.
- Rao, C., Liu, X., Xue, L. et al., 2024. Determining the spatiotemporal variation, sources, and ecological processes of antibiotic resistance genes in a typical lake of the middle reaches of the Yangtze River. *Science of the Total Environment*, 907, 167779.
- Reichert, G., Hilgert, S., Alexander, J. et al., 2021. Determination of antibiotic resistance genes in a WWTP-impacted river in surface water, sediment, and biofilm. *Science of the Total Environment*, 768, 144626.
- Tucker, K., Mageiros, L., Carstens, A. et al., 2022. Spatiotemporal investigation of antibiotic resistance in the urban water cycle influenced by environmental and anthropogenic activity. *Microbiology Spectrum*, 10(5), 1-16.
- Yamashita, N., Katakawa, Y., Tanaka, H., 2017. Occurrence of antimicrobial resistance bacteria in the Yodo River Basin, Japan and determination of beta-lactamase-producing bacteria. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 143, 38-45.
- Zhou, J., Su, X., Liang, C. et al., 2019. Experimental and numerical investigations of the effect of imbricated gravel structures on flow and solute transport in a highly heterogeneous alluvial-proluvial fan aquifer. *Environmental Fluid Mechanics*, 21, 11-38.