

水・排水処理分野におけるバイオフィルムの形成を抑制する材料の進展

Recent Advances in Materials towards Prevention of Biofilm Formation in Water/Wastewater Treatment

寺田 昭彦*, 高橋恵理加, 片山 美怜, 細見 正明
AKIHIKO TERADA*, ERIKA TAKAHASHI, MISATO KATAYAMA and MASAAKI HOSOMI

東京農工大学大学院工学研究院応用化学部門 〒184-8588 東京都小金井市中町 2-24-16

* TEL: 042-388-7069 FAX: 042-388-7731

* E-mail: akte@cc.tuat.ac.jp

Department of Applied Chemistry, Institute of Engineering, Tokyo University of Agriculture & Technology,
2-24-16, Naka, Koganei, Tokyo 184-8588, Japan

キーワード: バイオフィッシング, 酵素固定化, クオラムクエンチング

Key words: Biofouling, Enzyme immobilization, Quorum quenching

(原稿受付 2015 年 3 月 8 日 / 原稿受理 2015 年 3 月 13 日)

1. はじめに

人口増加や地球温暖化の問題により、21 世紀における水環境汚染や水不足の問題はこれまで以上に複合化、深刻化している。Rockstrom らがリストアップした 21 世紀の 10 の地球環境問題の中に、栄養塩による水環境の汚染や淡水の枯渇化といった水環境に関する項目が大きな課題として残されている¹⁾。この現状を鑑みると、水環境問題解決に向けた技術の更なる進展が必要不可欠であると言える。水環境保全や改善に関わるこの 2 つの課題に共通するものがバイオフィルムである。今回の総説では、バイオフィルム形成の促進による生物反応槽の高速化・高機能化の詳細については割愛するが、微生物細胞を高密度に生物反応槽内に保持させたバイオフィルムリアクターを用いることにより、水・排水からの高効率な窒素化合物の除去が可能になる。同じ水・排水処理においてもバイオフィルムの形成が望ましくないケースも多数存在する。そのひとつに、排水と活性汚泥の固液分離を膜ろ過によって行うメンブレンバイオリアクター (MBR) のろ過膜上へのバイオフィルム形成がある。このバイオフィルムがトリガーとなるろ過膜の目詰まりは排水処理だけでなく、浄水処理・海水淡水化における精密・限外ろ過膜や逆浸透 (RO) 膜、またスパイラル状に設置された平膜状 RO 膜に挟み込まれるスパーサーなどで起こる。いわゆる「望ましくないバイオフィルムの堆積や成長」を総称してバイオフィッシングと呼ぶが²⁾、ひとたびろ過膜上にバイオフィッシングが起こると、透過水の流束の低下、膜間差圧の上昇によるろ過エネルギーの増大、薬剤・メンテナンスコストの増大が起こり、最悪のケースではろ過膜の交換が必要となる。例えば、排水処理の MBR の運転コストの 50% 以上は、塩素系薬剤による洗浄等のバイオフィッシングの問題解

決に費やされるとの情報もある³⁾。

水資源の枯渇が危惧される近年、ろ過膜に求められる品質やシステムの頑強性が必要になってきている。一方で、バイオフィルムの形成にはクオラムセンシング (QS) 機構など、細菌の集団行動に基づいたユニークな生存戦略がバイオフィッシングに関与することも明らかになっており⁴⁾、ろ過膜の更なる開発が必要である。以上の点を鑑み、本総説では、これまで行われてきたバイオフィルムの形成抑制を志向した材料の化学的表面改質技術について、我々の研究グループの研究成果も含めて概説する。これらの方法は、水・排水処理のように雑多な微生物が存在する複合系への適用や、細菌間のコミュニケーションによる集団行動 (QS 機構) など細菌の生理学的特性への対応という点で普遍的な解決策にならない可能性もある。したがって、細菌の生理学的特性を考慮した材料表面の改質技術についても合わせて紹介する。

2. 材料表面へのバイオフィルム形成

水・排水処理分野におけるろ過膜を含めた材料表面へのバイオフィルム形成は 3 つの段階に分けることができる (図 1)。バイオフィルムは、①細菌細胞の物理化学的な初期付着 (可逆的)、②バイオフィルム成熟化に向けた不可逆的な付着、③細菌の増殖と細胞外ポリマー (EPS) の分泌によるコロニー化、の 3 段階を経て形成される。実際には細菌細胞の初期付着の前段として、水中のイオン濃度や pH 等の環境条件によりコンディショニングフィルムが形成されるため⁵⁾、ろ過膜の場合、浸漬されている水溶液の性状により、細菌細胞の付着挙動が異なる。すなわち、例え同じろ過膜やろ過膜の運転制御が同一だとしても、塩濃度が大きく異なれば細菌群の

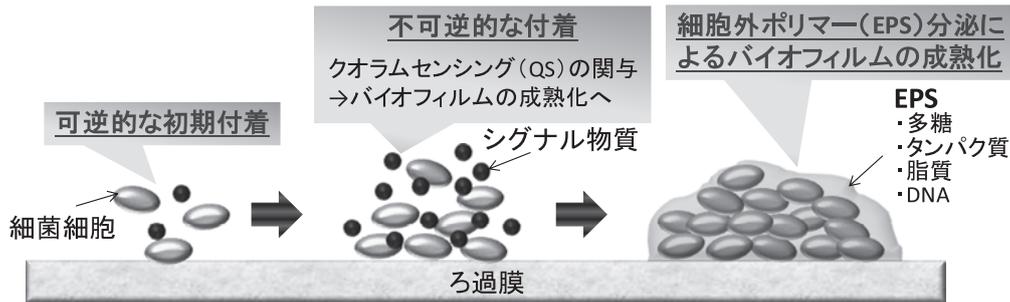


図1. ろ過膜に形成されるバイオフィルム形成機構

初期付着は異なることが予測される。細菌細胞の不可逆的な付着の後には、細菌細胞間のコミュニケーション機構である QS による細胞外多糖の生成が行われ⁶⁾、バイオフィルムの成熟化が起こる。ろ過膜上で起こるバイオフィリングのトリガー因子として QS の関与が近年の報告で明らかになっている⁴⁾。

3. 材料表面の物理化学的改質による細菌初期付着およびバイオフィルム形成の制御

図1に示すようなバイオフィルムの形成において、多くの研究者が材料表面の物理的・化学的改質に取り組んできている。細菌細胞のサイズは主に 1-2 μm 程度であり、大きめのコロイド粒子としてとらえることができることから⁷⁾、界面化学・コロイド化学に基づいた材料と細菌細胞の相互作用を材料表面の改質に反映させる必要がある。例えば、細菌細胞はその表面にアミノ基、リン酸基、カルボキシル基を有しているが、その密度や外的因子により、荷電状態が決まる。主な細菌は荷電が相殺される等電点が酸性付近に存在していることが報告されている⁸⁾。これは、水・排水処理が行われる中性付近の環境下では細菌細胞表面は負に帯電することを意味している。したがって、材料表面の電位を化学的修飾法を用いることにより制御できれば、細菌細胞の初期付着およびバイオフィルム形成を抑制できる可能性がある。

我々は細菌バイオフィルムの形成の初期付着をポリマー材料表面の化学的修飾により制御し、バイオフィルムの形成促進・抑制の可能性を検討してきた⁹⁻¹¹⁾。ポリエチレン (PE) シートを基材として、放射線グラフト重合 (Radiation Induced Graft Polymerization; RIGP) 法を適用した¹²⁾。この RIGP 法はエネルギーの高い電子線を用いてラジカルを高密度にポリマー表面上に生成させることが可能であり、材料表面の電位を幅広く改変することが可能である。電子線照射後、反応性の高いエポキシ基を有するグリシジルメタクリレート (GMA) モノマー液に PE シートを窒素雰囲気下で投入した。PE シート表面に生成されたラジカルが GMA にアタックし、この GMA がポリマーの鎖として PE シートの表面に積層していく。この反応後、PE シートをジエチルアミン (DEA) および亜硫酸ナトリウム (SS) 溶液に浸漬させ、エポキシ基をジエチルアミノ基、スルホン酸基に転換させた (それぞれのシートを DEA シートおよび SS シートと呼ぶ)。この DEA および SS は陰イオンおよび

陽イオン交換基であり、材料表面の電位をプラスおよびマイナスに荷電させることが可能である。これらの材料への 5 種類の細菌の初期付着挙動は、材料表面の荷電状況によって物理化学的な原理に従うことが確認された¹¹⁾。すなわち、静電的相互作用により DEA シートへの細菌細胞の付着は促進され、SS シートへの付着は斥力により抑制されることが実証された。さらに、材料表面が正に帯電している DEA シートの場合は、初期付着により細胞が損傷されることを確認した。この現象は、細菌細胞の損傷は材料表面の表面電位によって大きく変わることで、細菌細胞表面の損傷度合いが急激に上昇する表面電位が存在することを報告した論文結果と一致している¹³⁾。細菌の初期付着と材料表面の電位に関する関係は明らかにできたが、電位の異なる材料がバイオフィルム構造へ及ぼす影響は不明であったため、DEA シート、SS シートをフローセル内に固定化し、*Escherichia coli* をモデル細菌としてバイオフィルムを形成させた。DEA シートでは静電的相互作用により細菌細胞の初期付着が促進され、密かつ均一なバイオフィルムの形成が見られた。一方、SS シートの場合は、*E. coli* 細胞と SS シート表面間で起こる斥力により初期付着が抑制され、疎で不均一なバイオフィルムの形成が見られた⁹⁾。さらに、形成されたバイオフィルムの強度は形成されたバイオフィルムの構造に大きく影響を受けることが示された。つまり、SS シートに形成されたバイオフィルムは水流により容易に剥離可能であることが示された。以上の結果から、材料表面の電位が異なる際の細菌バイオフィルムの形成機構を提案するに至った (図2)。

しかしながら、SS のように細菌細胞が静電的に反発する材料を直接ろ過膜に利用することは不可能である。PE 表面に形成された GMA のポリマー鎖中に SS が存在すると、ポリマー鎖が負電荷を有することでお互いに反発しあい、水を透過するときの大きな抵抗になり、透過性が大幅に低下する。また、上述する材料が雑多な種類の細菌が存在する複合系バイオフィルムに普遍的に利用できるかは疑問が残る。実際に、RO 膜のポリマー材料をプラスもしくはマイナスに荷電させた初期付着とそれによって形成されるバイオフィルムに普遍的な因果関係はないとの報告もあり、荷電を用いることによるバイオフィリング防止は一概にうまくいかないことが示唆されている¹⁴⁾。

このような研究報告から、細菌細胞の初期付着および

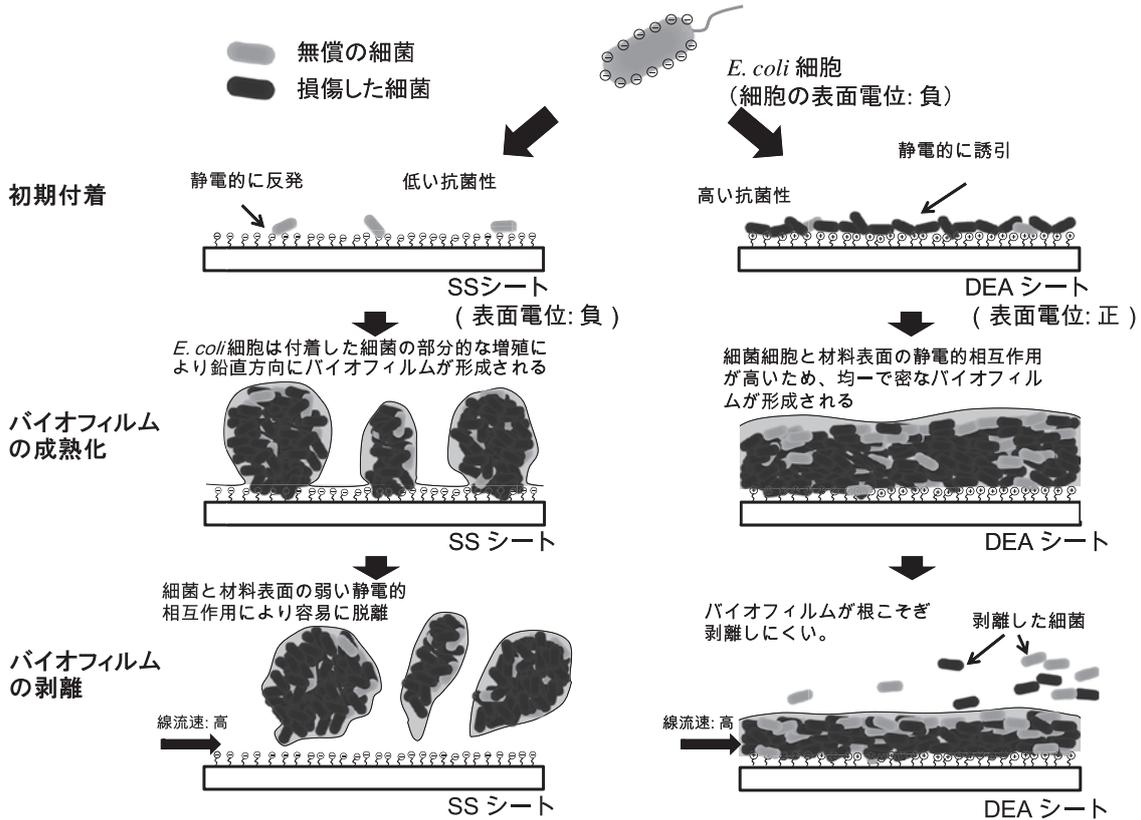


図2. 表面電位が負 (SS シート) もしくは正 (DEA シート) に帯電した材料表面に形成されるバイオフィルムの形成・剥離の機構 (Terada ら⁹⁾ の図を改訂して転載)

バイオフィルム形成を抑制するために、ろ過膜の表面修飾として両性イオンを有するモノマーをグラフトさせる方法が提案されている。例えば、RO 膜表面をグラフト重合することにより両性イオンを有する官能基を導入させ、バイオフィラミングを抑制可能であることが報告されている¹³⁾。また、両性イオンを有する材料表面に付着する細菌および形成されるバイオフィルムに一定の因果関係があることが報告されている¹⁴⁾。これらの成果は、ろ過膜材料表面の化学的改質による細菌付着抑制およびバイオフィルム形成抑制は、表面電荷に基づく陽・陰イオン交換基を導入するよりも、両性イオンを導入する方が透水性を維持しつつもバイオフィルム形成を抑制できる点で有効であることを示唆している。今後、両性イオンを導入したろ過膜材料の抗バイオフィラミング性能を、より実環境に近い条件下で検証することに研究のステージがシフトしていくことであろう。

4. QS を抑制するための戦術

医療分野における病原性および日和見感染を引き起こすバイオフィルムの生成機構と同様に、水・排水処理施設のろ過膜に形成されるバイオフィルムにも QS は十分に起こり得る。ろ過膜におけるバイオフィラミングの引き金として、QS の関与が 2009 年に報告され⁴⁾、以降、QS の機構を抑えるための技術開発が進んだ。QS のシグナル化合物として、グラム陰性細菌の一部が cell-to-cell コミュニケーションで用いる *N*-アシル-L-ホモセリ

ンラクトン (AHL) に関する研究が先行している。もちろん、AHL 以外にも多くの化学物質が QS 機構に関与しているが、排水処理施設の生物反応槽である活性汚泥に棲息する細菌種の多くがグラム陰性であることから¹⁶⁾、今回の総説では主に AHL を介する細菌間のコミュニケーションを抑制させる技術の紹介を行う。AHL はラクトン環にアシル基と脂肪酸側鎖を有する化合物で、100 種類以上のグラム陰性細菌から様々な AHL が見つかっている¹⁷⁾。材料開発という観点からこのようなコミュニケーション物質を遮断する方法として、① AHL を吸着もしくは包埋させることにより、AHL 濃度を低減させる方法、② AHL を化学的に分解することにより、細菌間のコミュニケーションを遮断する方法、の 2 つが主に挙げられる。

4.1 AHL の吸着による QS 遮断技術

AHL をシグナル化合物とする QS の阻害技術としては、AHL を包埋する方法が開発されている。例えば、 α -1,4 結合によりグルコピラノースが 6 から 8 個結合した環状オリゴ糖であるシクロデキストリンは、環状構造の外側にある親水部と内側の空洞にある疎水部を有しており、内側の空洞構造に AHL のアシル鎖が包埋されることが明らかになっている^{18,19)}。また、これらのシクロデキストリンの化学修飾によりクオラムセンシングの阻害効果が増大することを *Serratia marcescens*, *Chromobacterium violaceum*, *Pseudomonas aeruginosa* などのグラム陰性細菌で実証している²⁰⁾。このような技術は、病原性バイ

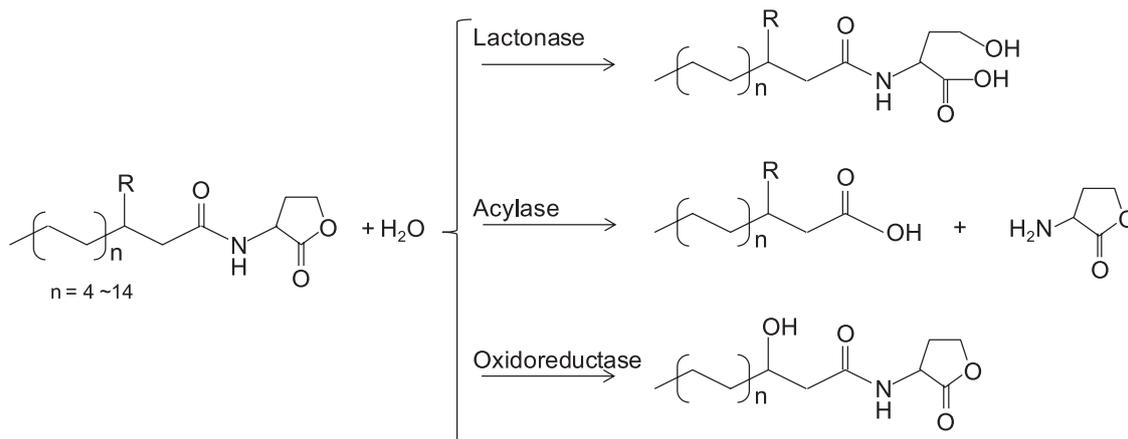


図3. 酵素による AHL の分解機構

オフフィルムへの適用が期待されており、水・排水処理などの系に適用された例は報告されていないものの、重要な技術になり得る。

4.2 AHL の酵素処理による QS 遮断技術

AHL 自体を化学的に分解する方法として、酵素を用いた AHL の分解が挙げられる。例えば、Acylase を用いることにより AHL が有するアシル基を分解することが可能である (図3)。一方、AHL が有するラクトン環の開裂は Lactonase によって、AHL が有するラクトン環を開裂させることも可能であり、同様にして QS 機構を遮断可能である。また、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸 (NADPH) のような補酵素による AHL の酸化による QS 機構の遮断も報告されている²¹⁾。

Acylase を用いた AHL 分解に基づく QS 機構の遮断は、近年では水・排水処理施設におけるろ過膜のバイオフィリングに対抗する技術として注目を集めている。この技術は、①バイリアクターに酵素を固定化した材料を浸漬、もしくは、②ろ過膜上への AHL 分解酵素の固定化、の2つに大別することが可能である (図4)。これらの技術開発は、MBR に浸漬されろ過膜の膜間差圧とろ過膜上の AHL 濃度に正の相関があること、および Acylase の投与により膜間差圧の上昇を抑制できることが実証されたことにより⁴⁾、一気に進展した。この論文の成果は、Acylase のような酵素を用いることで、AHL による QS 機構を遮断できることを示唆しており、上述した戦術に基づく様々な技術開発が進められた。例えば、ジビニルベンゼンと GMA と酸化鉄であるマグヘマイト ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) で構成される帯磁性イオン交換樹脂を核としたアシラーゼ固定化技術が開発された²²⁾。この帯磁性イオン交換樹脂上にアニオン性およびカチオン性高分子電解質を交互吸着法により積層させ、一番外側の層にカチオン性高分子電解質を吸着させる。Acylase I (*N*-acylamino acid amidohydrolase (EC 3.5.1.14)) は等電点が 5.2 付近であり²³⁾、中性付近で Acylase I はマイナスに荷電しているため、静電的相互作用により容易に帯磁性イオン交換膜の高分子層に吸着する。その後、グルタルアルデヒドで固定することによりアシラーゼ固定化型の磁性ビーズが形成される。このようなビーズは、AHL 分解性能を長期間有し、AHL の繰り返し分解性能

があることが実証されている。さらに、MBR にこのビーズを添加したところ、ビーズ非添加の反応槽に浸漬したろ過膜の膜間差圧よりも低く抑えられたことが示されている²²⁾。この技術の長期的有用性も実証されており²⁴⁾、実用化にはまだいくつかの段階を経る必要があるものの、今後の研究開発動向が期待される。

ビーズ等の添加はろ過膜の表面修飾を必要としないため、ろ過膜の改質にかかる初期コストを抑えられる点がメリットとして挙げられる。一方で、ろ過膜状に形成されるバイオフィーム中で細菌によって生成される AHL が、バルク液を介して拡散によって Acylase が固定化されたビーズまで運ばれる移動距離を考えると、ろ過膜上に AHL を分解する酵素を固定化した方が AHL の分解という観点では各段に効率的である。Kim らは、カチオン性高分子電解質であるキトサンと Acylase I を混合し、 N_2 加圧条件下でナノろ過膜に Acylase I を沈着させ、グルタルアルデヒドで固定化させる手法を考案した²⁵⁾。Acylase I を固定化させたナノろ過膜を用いて *Pseudomonas aeruginosa* の懸濁する反応槽のろ過膜の透水性試験を行ったところ、コントロール系のナノろ過膜と比べてバイオフィームの形成および多糖・タンパク質の生成量が抑制されたことが示され、このコンセプトの妥当性が実証されている。ただし、酵素を固定化することによるろ過膜の透水性低下は否定できない。そこで、我々の研究グループでは、ろ過膜の透水性の減少をできる限り抑え、バイオフィームの初期付着も抑制しつつ、バイオフィームが形成されるろ過膜上で QS を遮断可能な材料表面の作製に取り組んできた。具体的には、PE のろ過膜に GMA を用いて RIGP 法によりグラフトし、ポリマー鎖を形成させ、高い親水性を示す両性イオンの *N,N*-ジメチル- γ -アミノブチル酸塩 (DMGABA) を導入した。その後、Acylase I および α -多糖を分解可能な α -Glucosidase を DMGABA の高分子鎖に吸着させ、グルタルアルデヒドで固定化した酵素固定化ろ過膜を作製した。透水性試験により、このろ過膜は親水性が向上し、元の PE 膜に近い透過性能が得られた。モデル細菌の *Agrobacterium tumefaciens* を懸濁させた MBR において、作製したろ過膜の透水性試験を行ったところ、元のろ過膜に比べて膜間差圧を約 60% 削減することが可能になった。また、Acylase I を固定化したろ過膜と比

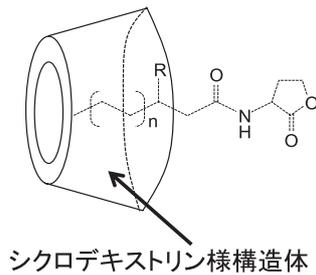
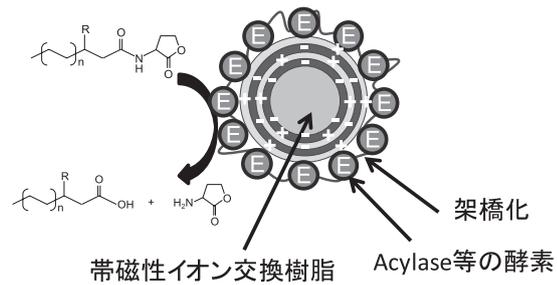
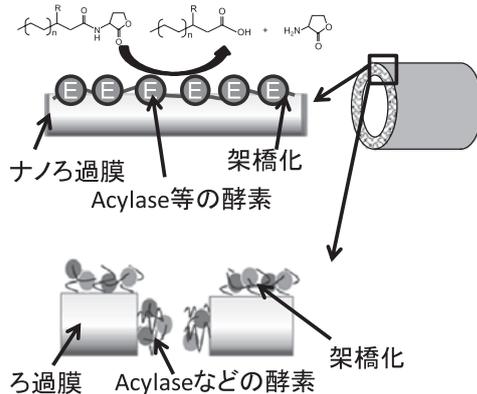
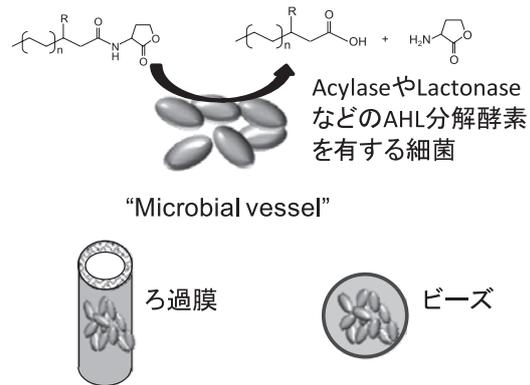
(a) AHLを包埋¹⁸⁻²⁰⁾(b) AHLをビーズで分解^{22,24)}(c) AHLをろ過膜で分解²⁵⁾(d) AHL分解酵素分泌細菌を包括化²⁷⁻²⁸⁾

図4. AHLをトリガーとするQS阻害のための技術

較しても膜間差圧を低く抑えることができ、2種類の酵素の固定化がバイオフィルムの抑制に効果を発揮することが示された。

QS機構の遮断のためにAHLを分解する酵素を材料に固定化する技術が開発されてきたが、精製された酵素を固定化することが必ずしも必要ではない。最近では、酵素を生産する細菌を有効利用する試みが行われている。実際に、AHLを生成する細菌のみならず、AHLを分解するLactonaseやAcylaseを生産する細菌が排水処理施設内の活性汚泥中に棲息することが報告されている²⁶⁾。すなわち、異なる細菌種が雑多に存在する活性汚泥においては、QS機構を促進・抑制する細菌群が共生しており、細菌間のコミュニケーションが想像以上に複雑であることを示唆している。AHLを分解可能な酵素を生産する細菌を有効利用すれば、工業用の精製酵素に依存することなくQSを遮断することができ、経済的な観点からも有用性が高い。例えば、排水処理施設から単離した*Rhodococcus sp.* BH4をQSの遮断を行う細菌(クオラムクエンチング(QQ)細菌)としてアルギン酸ナトリウムのビーズ内に固定化している報告がある²⁷⁾。作成したQQ細菌固定化材料をMBRに添加することにより、槽内のろ過膜の膜間差圧の上昇を10倍遅延させることに成功している。また、中空糸状のベッセルの中にもこのQQ細菌を導入した同様の効果が得られている²⁸⁾。添加するQQ細菌の量によりバイオフィルム抑制の効果も変わることも報告されており²⁸⁾、QQ細菌の初期添加量や内包されている量も重要になる。

以上のように、QS由来のバイオフィルムを防止する技術は、グラム陰性細菌のシグナル化合物であるAHLの吸着・分解を可能にする。水・排水処理施設の大きな課題であるバイオフィルム抑制を達成できる有望な技術としてさらに研究が行われることであろう。一方、バイオフィルムの形成のトリガーとなるQSのシグナル化合物はAHLだけではない。AHLがバイオフィルムへ及ぼす影響に関してのみ研究が進んでいるのは否めない事実である。今後はAHL以外のシグナル化合物をターゲットとした材料開発にも着手していく必要があるであろう。ろ過膜のバイオフィルム抑制に向けた応用技術の発展のためには、上述した基礎的知見の集積が必要不可欠である。QS機構の更なる理解と、水・排水処理分野への応用展開の一連の流れが確立できれば、ろ過膜のバイオフィルム防止のみならず、細菌群の生体触媒としての機能を向上させる技術へも拡張可能になるかもしれない。

4.3 成熟したバイオフィルムの剥離を促す技術

細菌細胞の凝集体と多糖やタンパク質で主に構成される細胞外ポリマー(EPS)に包埋された成熟化したバイオフィルムが形成されると、AHL分解酵素の適用は困難になる可能性が考えられる。この場合は、バイオフィルムの外側および細菌細胞の結合を強固にしているEPSを分解するような酵素の適用が必要である。Khanらによれば、海水淡水化のRO膜の表面の改質を行うことなく、リパーゼやプロテアーゼといった脂質やタンパク質を添加することによりRO膜に付着しているバイオ

フィルムやタンパク質等のEPSの除去が可能であると報告している²⁹⁾。一方、ポリアミドのRO膜に細菌細胞の細胞壁の多糖成分を溶解するリゾチームを固定化させることにより、透水性を保ちつつRO膜上に形成されるグラム陽性細菌のバイオフィーム抑制に成功した例もある¹⁵⁾。AHLを分解する酵素のみならず、EPSの分解を促したり、細菌を溶解させる酵素を併用したりすることにより、図1に示すあらゆるバイオフィーム形成ステージに対応できる材料表面の開発が可能になるかもしれない。他の細菌への効用や、複合系での実現可能性の評価が今後の課題であると考えられる。

5. おわりに

水・排水処理分野においても細菌間のQS機構によるバイオフィーム形成は起こっており、細菌の多様な生理が複雑に絡み合っているバイオフィームによるろ過膜の機能不全につながる機構が明らかになってきている。このような生理学的な観点を考えると、コロイド粒子として細菌付着およびバイオフィーム形成の現象を解釈することだけではバイオフィームの抑制は困難である。バイオフィーム研究は学際的な領域であり、次々と明らかになる新規な知見を統合し、材料表面のデザインを行う総合的な研究が必要になってくるであろう。本誌で紹介した、QS機構を遮断してろ過膜のバイオフィーム抑制を目指す技術の実用化はまだ行われていない。特に21世紀後半で起こり得る地球規模の淡水枯渇問題に向け、この分野のイノベーションが重要であり、分野を超えた研究者のより一層の共同研究が必要になると考える。

文 献

- 1) Rockstrom, J., W. Steffen, K. Noone, A. Persson, F.S. Chapin, E.F. Lambin, T.M. Lenton, M. Scheffer, C. Folke, H.J. Schellnhuber, B. Nykvist, C.A. de Wit, T. Hughes, S. van der Leeuw, H. Rodhe, S. Sorlin, P.K. Snyder, R. Costanza, U. Svedin, M. Falkenmark, L. Karlberg, R.W. Corell, V.J. Fabry, J. Hansen, B. Walker, D. Liverman, K. Richardson, P. Crutzen, and J.A. Foley. 2009. A safe operating space for humanity. *Nature*. 461(7263): 472–475.
- 2) Flemming, H.C. 2002. Biofouling in water systems—cases, causes and countermeasures. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 59(6): 629–640.
- 3) Marx, V. 2014. Stop the microbial chatter. *Nature*. 511(7510): 493–497.
- 4) Yeon, K.M., W.S. Cheong, H.S. Oh, W.N. Lee, B.K. Hwang, C.H. Lee, H. Beyenal, and Z. Lewandowski. 2009. Quorum sensing: A new biofouling control paradigm in a membrane bioreactor for advanced wastewater treatment. *Environmental Science & Technology*. 43(2): 380–385.
- 5) Bos, R., H.C. van der Mei, and H.J. Busscher. 1999. Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions - its mechanisms and methods for study. *FEMS Microbiology Reviews*. 23(2): 179–230.
- 6) Davies, D.G., M.R. Parsek, J.P. Pearson, B.H. Iglewski, J.W. Costerton, and E.P. Greenberg. 1998. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science*. 280(5361): 295–298.
- 7) 林 浩志, 佐々木弘. 2003. 細菌の界面電気特性と生物学的排水処理プロセスへの応用. 土のコロイド現象—土・水

環境の物理化学と工学的基礎 (足立泰久, 岩田進午 (編)). 8: 311–321.

- 8) Hayashi, H., S. Tsuneda, A. Hirata, and H. Sasaki. 2001. Soft particle analysis of bacterial cells and its interpretation of cell adhesion behaviors in terms of DLVO theory. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*. 22(2): 149–157.
- 9) Terada, A., K. Okuyama, M. Nishikawa, S. Tsuneda, and M. Hosomi. 2012. The effect of surface charge property on *Escherichia coli* initial adhesion and subsequent biofilm formation. *Biotechnology and Bioengineering*. 109(7): 1745–1754.
- 10) Terada, A., A. Yuasa, T. Kushimoto, S. Tsuneda, A. Katakai, and M. Tamada, M. 2006. Bacterial adhesion to and viability on positively charged polymer surfaces. *Microbiology*. 152: 3575–3583.
- 11) Terada, A., A. Yuasa, S. Tsuneda, A. Hirata, A. Katakai, and M. Tamada. 2005. Elucidation of dominant effect on initial bacterial adhesion onto polymer surfaces prepared by radiation-induced graft polymerization. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*. 43(2): 99–107.
- 12) Kawai, T., K. Saito, and W. Lee. 2003. Protein binding to polymer brush, based on ion-exchange, hydrophobic, and affinity interactions. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 790(1-2): 131–142.
- 13) Kugler, R., O. Bouloussa, and F. Rondelez. 2005. Evidence of a charge-density threshold for optimum efficiency of biocidal cationic surfaces. *Microbiology-Sgm*. 151: 1341–1348.
- 14) Bernstein, R., V. Freger, J.H. Lee, Y.G. Kim, J. Lee, and M. Herzberg. 2014. ‘Should I stay or should I go?’ Bacterial attachment vs biofilm formation on surface-modified membranes. *Biofouling*. 30(3): 367–376.
- 15) Saeki, D., T. Tanimoto, and H. Matsuyama. 2014. Antibiofouling of polyamide reverse osmosis membranes using phosphorylcholine polymer grafted by surface-initiated atom transfer radical polymerization. *Desalination*. 350: 21–27.
- 16) Zhang, T., M.F. Shao, and L. Ye. 2012. 454 Pyrosequencing reveals bacterial diversity of activated sludge from 14 sewage treatment plants. *ISME Journal*. 6(6): 1137–1147.
- 17) Shrout, J.D. and R. Nerenberg. 2012. Monitoring bacterial twitter: Does quorum sensing determine the behavior of water and wastewater treatment biofilms? *Environmental Science & Technology*. 46(4): 1995–2005.
- 18) Kato, N., T. Morohoshi, T. Nozawa, H. Matsumoto, and T. Ikeda. 2006. Control of Gram-negative bacterial quorum sensing with cyclodextrin immobilized cellulose ether gel. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* 56(1-2): 55–59.
- 19) Kato, N., T. Tanaka, S. Nakagawa, T. Morohoshi, K. Hiratani, and T. Ikeda. 2007. Control of virulence factor expression in opportunistic pathogens using cyclodextrin immobilized gel. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* 57(1-4): 419–423.
- 20) Morohoshi, T., K. Tokita, S. Ito, Y. Saito, S. Maeda, N. Kato, and T. Ikeda. 2013. Inhibition of quorum sensing in gram-negative bacteria by alkylamine-modified cyclodextrins. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 116(2): 175–179.
- 21) Uroz, S., S.R. Chhabra, M. Cámara, P. Williams, P. Oger, and Y. Dessaux. 2005. N-Acylhomoserine lactone quorum-sensing molecules are modified and degraded by *Rhodococcus erythropolis* W2 by both amidolytic and novel oxidoreductase activities. *Microbiology*. 151(10): 3313–3322.
- 22) Yeon, K.M., C.H. Lee, and J. Kim. 2009. Magnetic enzyme carrier for effective biofouling control in the membrane bioreactor based on enzymatic quorum quenching. *Environmental Science & Technology*. 43(19): 7403–7409.
- 23) Giardina, T., A. Biagini, F. DalleOre, E. Ferre, M. Reynier, and A. Puigserver. 1997. The hog intestinal mucosa acylase I: Subcellular localization, isolation, kinetic studies and biological function. *Biochimie*. 79(5): 265–273.
- 24) Jiang, W., S.Q. Xia, J. Liang, Z.Q. Zhang, and S.W.

- Hermanowicz. 2013. Effect of quorum quenching on the reactor performance, biofouling and biomass characteristics in membrane bioreactors. *Water Research*. 47(1): 187–196.
- 25) Kim, J.H., D.C. Choi, K.M. Yeon, S.R. Kim, and C.H. Lee. 2011. Enzyme-immobilized nanofiltration membrane to mitigate biofouling based on quorum quenching. *Environmental Science & Technology*. 45(4): 1601–1607.
- 26) Ochiai, S., T. Morohoshi, A. Kurabeishi, M. Shinozaki, H. Fujita, I. Sawada, and T. Ikeda. 2013. Production and degradation of N-acylhomoserine lactone quorum sensing signal molecules in bacteria isolated from activated sludge. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. 77(12): 2436–2440.
- 27) Kim, S.R., H.S. Oh, S.J. Jo, K.-M. Yeon, C.H. Lee, D.J. Lim, C.H. Lee, and J.K. Lee. 2013. Biofouling control with bead-entrapped quorum quenching bacteria in membrane bioreactors: Physical and biological effects. *Environmental Science & Technology*. 47(2): 836–842.
- 28) Oh, H.S., S.R. Kim, W.S. Cheong, C.H. Lee, and J.K. Lee. 2013. Biofouling inhibition in MBR by *Rhodococcus* sp BH4 isolated from real MBR plant. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 97(23): 10223–10231.
- 29) Khan, M., S. Danielsen, K. Johansen, L. Lorenz, S. Nelson, and A. Camper. 2013. Enzymatic cleaning of biofouled thin-film composite reverse osmosis (RO) membrane operated in a biofilm membrane reactor. *Biofouling*. 30(2): 153–167.