

— 論 文 —

バイオリアクターによる冷水病菌 *Flavobacterium psychrophilum* の生物防除 (バイオコントロール)*

伊藤 敬†・前田 昌調†

要 旨

本研究は、付着担体 (基盤) ゼオライトと、冷水病菌の増殖を抑制する拮抗細菌 LMC9 株とでバイオリアクター装置を作製して、装置による冷水病原菌 (*Flavobacterium psychrophilum*) の増殖抑制効果を研究することを目的とした。まず、予備試験として付着基盤上での拮抗細菌 LMC9 株と *F. psychrophilum* との相互作用を明らかにするために、滅菌スライドグラス上に拮抗細菌 LMC9 株および *F. psychrophilum* を付着させて、ガラス上の菌相の遷移を追跡した。その結果、*F. psychrophilum* 培養液 (1.0×10^9 CFU ml⁻¹) に浸したスライドグラスを 1.0×10^7 CFU ml⁻¹ 以上の濃度の拮抗細菌 LMC9 株培養液へ浸漬した場合、スライドグラスへ付着していた *F. psychrophilum* は大幅に減少した。次に、付着担体 (基盤) ゼオライトと拮抗細菌 LMC9 株とで作製したバイオリアクター中に滅菌河川水 (蛋白質濃度約 $19 \mu\text{g-}\gamma\text{-globulin ml}^{-1}$) や、*F. psychrophilum* 培養液などを 1 L d^{-1} の速度で流入し、バイオリアクターからの流出液中の菌相を調べた。滅菌河川水を流入したバイオリアクターでは、15 日経過後においても、バイオリアクター流出液中に 1.5×10^5 CFU ml⁻¹ の拮抗細菌 LMC9 株が確認された。また、 1.0×10^4 CFU ml⁻¹ の *F. psychrophilum* 培養液を流入したバイオリアクターの流出液中では、*F. psychrophilum* は 14 日間ほぼ検出されなかった。一方、PCR 法によっては、この流出液中より *F. psychrophilum* の DNA が検出されたので、バイオリアクターの作用によって病原菌の増殖能が、寒天培地上では増殖できない程度に低下したと考察した。

キーワード：拮抗細菌，バイオリアクター，相互作用，バイオコントロール，冷水病

1. はじめに

生物防除 (生物学的防除, バイオコントロール, Biological control, Biocontrol) は自然界に進行している生物間の競合の中で、主として拮抗作用を利用した方法

で、天敵生物を増殖させることによって病原生物の防除を行う目的で開発された。本技術の実用化では、外部より天敵生物を (多くの場合には増殖させた後に) 移入する直接的な技術と、有害生物を阻害する、あるいは低減するような植物を植栽したりして、当該生産植物を保護するといった間接的技術、さらに両者を併用する方法などが採用されている (前田, 2005 a)。

養殖環境中において、微生物によって病原微生物を抑制する生物防除に関する研究は、1989 年に初めて、

* 2007 年 2 月 1 日 受領; 2007 年 3 月 23 日 受理
著作権: 日本海洋学会, 2007

† 宮崎大学大学院農学研究科水産科学専攻
〒 889-2192 宮崎県宮崎市学園木花台西 1-1
主著者 e-mail address: gcmameda@cc.miyazaki-u.ac.jp

魚の成長促進効果と同時に病原菌の増殖を抑制する有用な機能を保持した微生物が報告されて以来 (Maeda and Nogami, 1989), 現在までに同様の機能を有する微生物の探索と水産養殖への実用化例が 100 編近い論文で報告されている (総説としては, Gatesoupe, 1999; Maeda, 2004)。我々の研究室においても, ウナギ配合飼料やヒラメ種苗生産水へ有用細菌を添加して, ウナギ・ヒラメ種苗に投与した場合, その死亡率が大幅に低下するといった結果を得ている (前田, 2005 b)。このような生物防除法を用いた養殖魚の飼育では, 有用細菌を配合飼料に混合および, 飼育水中に添加といった方法が一般的であるが, この有用細菌の培養と供給とを恒常的に行う際には, 労力とコスト負担がしばしば問題となる。本研究ではこの問題点を解決するために, バイオリアクターの有効な利用方法を検討した。

バイオリアクターは, 担体 (付着基盤) と担体に付着する微生物によって構成され, バイオリアクター中では微生物と接触した水溶液 (または物質) において, 微生物作用による生化学反応が進行する。バイオリアクターは, 現在, 有用物質の生産や, 化合物の定量・分析, 人工臓器など医療への応用, 環境汚染物質の分解除去など様々な分野で利用されており (軽部ら, 1985), 木炭に有用細菌を付着させ, ニジマスの飼育池に設置したところ, ニジマスの生残率が向上したという事例もある (前田, 2005 b)。

本研究では, 安価で簡便な生物防除法の実用化を目的として, 付着担体 (基盤) と, 病原菌 *Flavobacterium psychrophilum* に対して拮抗作用を保持する有用細菌 LMC9 株 (伊藤ら, 2006) とからなるバイオリアクターを作製し, *F. psychrophilum* に対する増殖抑制効果を追究した。

2. 材料と方法

実験に使用した細菌株 (拮抗細菌 LMC9 株および *Flavobacterium psychrophilum*) の培養には改変サイトファーガ培地 (Wakabayashi and Egusa, 1974) を使用し, 培養は 18°C 下で行った。使用した改変サイトファーガ寒天培地の組成を以下に示す。

Bacto-Tripton (Difco Co. Ltd.)	2 g
Bacto-Yeast Extract (Difco Co. Ltd.)	0.5 g
Beef Extract (Difco Co. Ltd.)	0.2 g
酢酸ナトリウム	0.2 g
塩化カルシウム	0.2 g
Bacto-Agar (Difco Co. Ltd.)	11 g
蒸留水	1,000 ml
pH	7.2-7.4

2.1. PCR 法を用いた 16SrRNA 遺伝子解析による拮抗細菌 LMC9 株の同定

担体に付着させる拮抗細菌 LMC9 株は, 篠田ら (2000) の方法に基づき, 16SrRNA 遺伝子を解析することによって分類同定を行った。

2.2. 付着基盤上の拮抗細菌 (LMC9 株) と *Flavobacterium psychrophilum* との相互作用

(1) 滅菌したスライドグラスを 1.0×10^{10} CFU ml⁻¹ の拮抗細菌 LMC9 株培養液 (18°C で 3 日間培養) 中に 24 時間浸漬した。

次に拮抗細菌 LMC9 株が付着したスライドグラスを培養液中から取り出し, 滅菌蒸留水で軽く洗浄して, 1.0×10^9 CFU ml⁻¹ の *F. psychrophilum* 培養液 (18°C で 5 日間培養) 中に 12 時間, 24 時間, 72 時間浸漬した。

それぞれの条件下におけるスライドグラス上の付着細菌を cell scraper で 100 ml の滅菌蒸留水中へかき落とし, その数を平板塗抹法によって計数した。

(2) 滅菌したスライドグラスを 1.0×10^9 CFU ml⁻¹ の *F. psychrophilum* 培養液 (培養温度, 日数は (1) と同様) 中に 24 時間浸漬した後, 培養液中から取り出したスライドグラスを滅菌蒸留水で軽く洗浄して,

1.0×10^{10} CFU ml⁻¹ の拮抗細菌 LMC9 株培養液 (培養温度, 日数は (1) と同様) 中に浸漬し, 3 時間, 6 時間, 9 時間, 12 時間, 24 時間後のスライドグラス上の付着生菌数を (1) と同様の手順で計測した。

(3) (2) において, 拮抗細菌 LMC9 株の培養液濃度を $1.0 \times 10^4 \sim 1.0 \times 10^{10}$ CFU ml⁻¹ に設定し, 各濃度の LMC9 株培養液中にスライドグラスを 9 時間浸漬した時のスライドグラス上の付着生菌数を計測した。

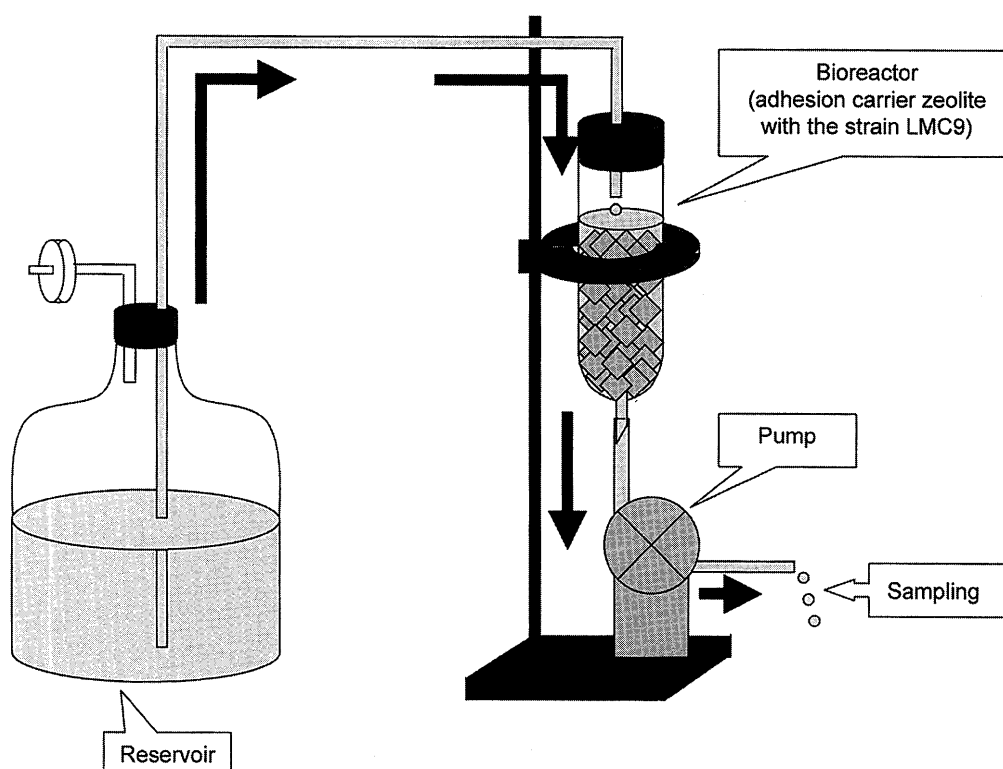


Fig. 1. Bioreactor inside a glass column and the water flow system.

2.3. バイオリアクターにおける拮抗細菌 (LMC9 株) と *F. psychrophilum* との相互作用

付着担体 (基盤) と、付着する拮抗細菌とで構成するバイオリアクターの作製において、バイオリアクターの担体としては、ゼオライトを使用した。なお、担体に付着させる拮抗細菌 LMC9 株は、改変サイトファーガ培地で 3 日間培養した。

(1) 滅菌したゼオライト (サイズ: 約 2×2×1 cm 個⁻¹) 150 g を 1.0×10¹⁰ CFU ml⁻¹ の拮抗細菌 LMC9 株培養液 200 ml 中へ 1 時間浸漬した。

次に、LMC9 株の付着したゼオライトをカラム (サイズ: 半径 5 cm, 高さ 20 cm) 内に入れて密封し、滅菌蒸留水または滅菌河川水を 1 L d⁻¹ の速度で流入して、カラムからの流出液中の生菌数をそれぞれ平板塗抹法によって計測し、バイオリアクター内の拮抗細菌 LMC9 株の濃度の変化を調べた (Fig. 1)。また、実験で使用した河川水は宮崎市郊外の加江田川中流域から採取し、波長 = 280nm で吸光度を測定することにより蛋白質の代表的指標であるγ-globulin 濃度を算出した。

(2) (1) 同様に、密封したカラム内に拮抗細菌 LMC9 株を付着させたゼオライトを入れ、1.0×10⁶ または 1.0×10⁴ CFU ml⁻¹ の *F. psychrophilum* 培養液を 1 L d⁻¹ の速度で流入して、それぞれのカラムからの流出液中の生菌数を計測した。

また、対照区として、拮抗細菌 LMC9 株が付着していない滅菌したゼオライト 150 g を密封したカラム内に入れ、10⁶ または 10⁴ CFU ml⁻¹ の *F. psychrophilum* 培養液を 1 L d⁻¹ 量流入し、それぞれのカラムからの流出液中の生菌数を計数した。1.0×10⁴ CFU ml⁻¹ の *F. psychrophilum* を流入した実験においては、*F. psychrophilum* の特異的なプライマーを用いて、試験区および対照区のカラムから流出する液中の *F. psychrophilum* 由来の DNA を PCR 法によって検出した。

上記 PCR 法は、以下のような手順で行った。カラムからの流出液中における細菌の DNA は、5% Chelex100 溶液を用いて、55°C で 30 分間、100°C で 20 分間の熱処理後、10,000 g で 10 分間の遠心処理を行って抽出した。抽出した DNA については、1st PCR では、20F (5'-AGAGTTTGATCTGGCTCAG-3') および 1500R

(5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') の 2 つのプライマーを用いて、前熱変性反応を 94°C で 5 分間行った後、変性 (94°C で 30 分間)、アニーリング (51°C で 90 秒間)、伸長 (72°C で 2 分間) の反応を 30 サイクル行い、最終伸長として 72°C で 5 分間の伸長反応を行った。次に、5% に希釈した 1st PCR 産物を 2nd PCR のテンプレートとし、PSY1 (5'-GTTGGCATCAACACACT-5') および PSY2 (5'-CGATCCTACTTGCGTAG-3') の 2 つのプライマーを用いて、1st PCR と同様のサイクルで 2nd PCR を行った。そして、2nd PCR による産物を電気泳動し臭化エチジウムで反応後、紫外線で発色させ、(*F. psychrophilum* 特異的なバンドである) 1089bp の検出の有無を調べた (Toyama *et al.*, 1994)。

3. 結果

3.1. PCR 法を利用した 16SrRNA 遺伝子の解析による拮抗細菌 LMC9 株の同定

拮抗細菌 LMC9 株の 16SrRNA 遺伝子を既知のデータベースと比較したところ、LMC9 株は *Pseudomonas fluorescens* と 99% (1088/1091) の相同性を示した。

3.2. 付着基盤上における拮抗細菌 (LMC9 株) と *F. psychrophilum* との相互作用

(1) 予め LMC9 株を付着させたスライドグラスを *F. psychrophilum* 培養液中へ浸漬して 12 時間、24 時間、72 時間後、スライドグラス上に付着した *F. psychrophilum* 菌数を計数した。

この結果、いずれの条件下においても、スライドグラス上への *F. psychrophilum* の付着は確認されなかった。一方、LMC9 株は、 $3.0 \times 10^5 \sim 1.5 \times 10^6$ CFU cm⁻² の密度でスライドグラス上に付着していた (Fig. 2)。

(2) 予め *F. psychrophilum* を付着させたスライドグラスを、拮抗細菌 LMC9 株培養液 (1.0×10^{10} CFU ml⁻¹) へ浸漬した場合、3 時間から 24 時間後におけるスライドグラス上への LMC9 株の付着生菌数は、いずれの時点においても $1.5 \times 10^5 \sim 2.0 \times 10^6$ CFU cm⁻² で確認できた。一方、スライドグラス上の *F. psychrophilum* 付着生菌数は実験開始時、 1.5×10^6 CFU cm⁻² であった

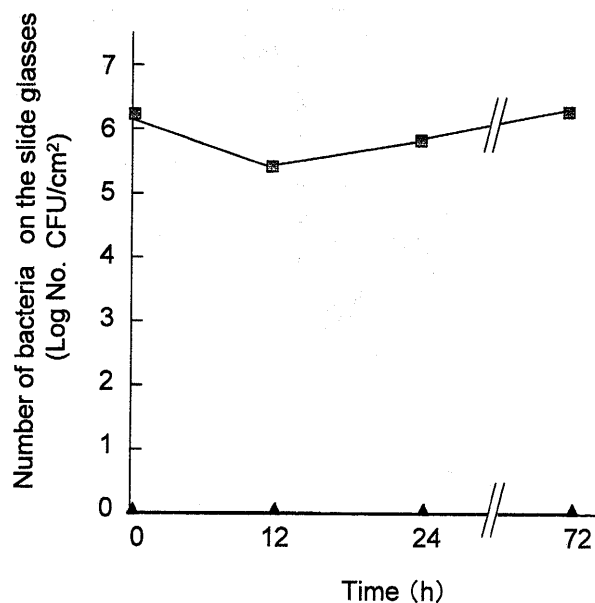


Fig. 2. Number of bacteria on the glass slides which were at first immersed in *Flavobacterium psychrophilum* culture liquid, followed by immersion in LMC-9 liquid.

□ LMC-9

△ *Flavobacterium psychrophilum*

が、LMC9 株培養液へ浸漬したところ、3 時間後にはスライドグラス上の *F. psychrophilum* はほぼ検出されず、6 時間、9 時間、12 時間、24 時間後においても同様の結果であった (Fig. 3)。

(3) 予め *F. psychrophilum* を付着させたスライドグラスを $1.0 \times 10^4 \sim 1.0 \times 10^6$ CFU ml⁻¹ の拮抗細菌 LMC9 株培養液へ浸漬した場合、スライドグラス上への LMC9 株の付着生菌数は各々 $7.0 \times 10^2 \sim 2.0 \times 10^3$ CFU cm⁻² であり、*F. psychrophilum* の付着生菌数は $8.0 \times 10^4 \sim 8.0 \times 10^5$ CFU cm⁻² であった。同様に、 1.0×10^7 CFU ml⁻¹ の拮抗細菌 LMC9 株培養液へ浸漬した場合、スライドグラス上への LMC9 株の付着生菌数は 5.0×10^4 CFU cm⁻² に増加し、*F. psychrophilum* の付着生菌数は 6.0×10^3 CFU cm⁻² に減少した。LMC9 株培養液濃度を 1.0×10^8 , 1.0×10^9 CFU ml⁻¹ に設定した場合においては、スライドグラス上への LMC9 株の付着生菌数は、それぞれ 1.5×10^5 CFU cm⁻², 1.7×10^5 CFU cm⁻² となり、*F. psychrophilum* の付着生菌数は、それ

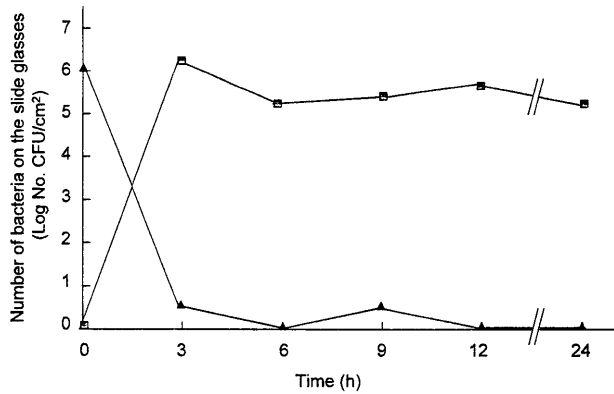


Fig. 3. Number of bacteria on the glass slides which were first immersed in LMC-9 culture liquid, followed by immersion in *Flavobacterium psychrophilum* liquid.

□ LMC-9
△ *Flavobacterium psychrophilum*

ぞれ 7.0×10^2 CFU cm⁻², 2.0×10^2 CFU cm⁻² に減少した。さらに、 1.0×10^{10} CFU ml⁻¹ の LMC9 株培養液に浸漬した場合には、スライドガラス上への LMC9 株の付着生菌数は 1.7×10^6 CFU cm⁻² となり、一方、*F. psychrophilum* の付着生菌数は 2.5 CFU cm⁻² であった (Fig. 4)。

3.3. バイオリアクターにおける拮抗細菌 (LMC9 株) と *F. psychrophilum* との相互作用

(1) バイオリアクター中へ滅菌蒸留水を流入した場合、実験開始 3 時間後ではバイオリアクターからの流出液中における拮抗細菌 LMC9 株濃度は 2.0×10^8 CFU ml⁻¹ であった。しかし、9 日後には流出液から LMC9 株は検出されなくなった (Fig. 5)。

一方、滅菌河川水を流入した場合では、実験開始 3 時間後では、バイオリアクターからの流出液中に 1.5×10^8 CFU ml⁻¹ の LMC9 株が検出された。その後、6 日後では 2.0×10^6 CFU ml⁻¹, 15 日経過後では 1.5×10^5 CFU ml⁻¹ 検出された (Fig. 5)。なお、河川水の蛋白質濃度は、 γ -globulin 量として約 $19 \mu\text{g ml}^{-1}$ であった。

(2) 1.0×10^6 CFU ml⁻¹ の *F. psychrophilum* 培養液を流入した場合、バイオリアクターからの流出液中にお

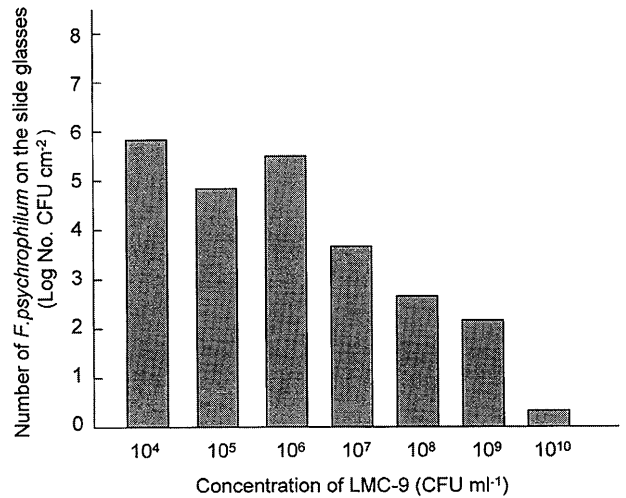


Fig. 4. Number of *Flavobacterium psychrophilum* on the glass slides. The glass slides were immersed in *Flavobacterium psychrophilum* culture liquid, followed by immersion in different concentrations of LMC-9 cells.

る拮抗細菌 LMC9 株は、実験開始 3 時間後には 4.0×10^9 CFU ml⁻¹ 検出され、2 日後には 1.5×10^7 CFU ml⁻¹ に減少し、その後は $1.0 \times 10^7 \sim 1.5 \times 10^8$ CFU ml⁻¹ を維持していた。バイオリアクターからの流出液中における *F. psychrophilum* は、実験開始から 1 日目まででは検出されなかったが、2 日後以降は 1.0×10^7 CFU ml⁻¹ 程度検出された。また、対照区 (LMC9 株が付着していないバイオリアクター) では、バイオリアクターからの流出液中における *F. psychrophilum* は、実験開始 3 時間後には 1.0×10^6 CFU ml⁻¹ 検出され、その後は $2.0 \times 10^7 \sim 1.5 \times 10^8$ CFU ml⁻¹ を維持していた (Fig. 6)。

1.0×10^4 CFU ml⁻¹ の *F. psychrophilum* 培養液を流入した場合、バイオリアクターからの流出液中における LMC9 株は、実験開始 3 時間後には 2.0×10^9 CFU ml⁻¹ 検出され、2 日後には 5.0×10^7 CFU ml⁻¹ に減少したが、その後は $1.0 \times 10^7 \sim 2.5 \times 10^8$ CFU ml⁻¹ を 16 日間にわたって維持していた。バイオリアクターからの流出液中における *F. psychrophilum* は、14 日間にわたってほとんど検出されなかった。また、対照区では、バイオリアクターからの流出液中における *F. psychrophilum* は、実験開始 3 時間後には 1.5×10^4 CFU ml⁻¹ 検出さ

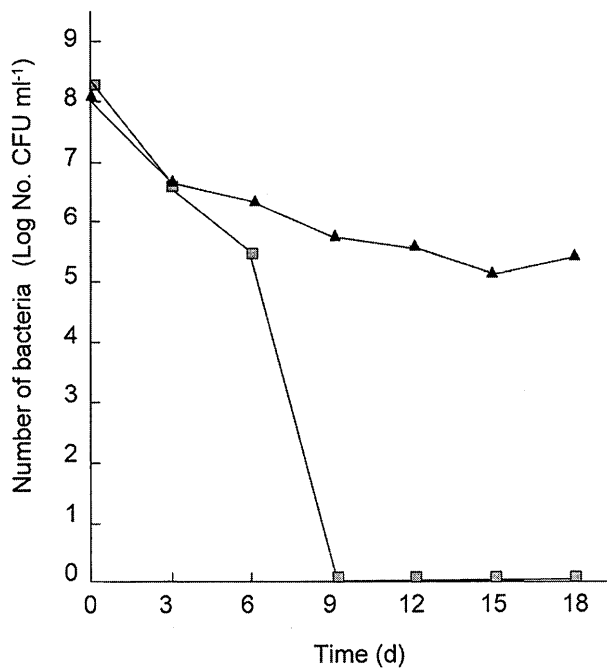


Fig. 5. Number of LMC-9 in outflow liquid from the bioreactor which contained the LMC-9 strain. Sterilized distilled water and sterilized river water were introduced, respectively, into the bioreactor column.

- Sterilized distilled water
- △ Sterilized river water

れ、その後は $1.0 \times 10^4 \sim 1.5 \times 10^5$ CFU ml⁻¹ を維持していた (Fig. 7)。

また、 1.0×10^4 CFU ml⁻¹ の *F. psychrophilum* 培養液を流入した実験において、試験区および対照区のバイオリアクターからの流出液を PCR 法によって調べたところ、試験区および対照区ともに *F. psychrophilum* が検出された。

4. 考察

養殖における疾病制御については、微生物学的には、養殖環境中から薬剤や殺菌装置等の使用により病原微生物を排除する方法や、拮抗微生物を利用して病原菌の増殖を抑制し、疾病が顕在化しない環境を維持する方法などがある。前者の薬剤 (抗生物質等) 使用の手法では、特にウイルスと細菌との平衡関係において、抗

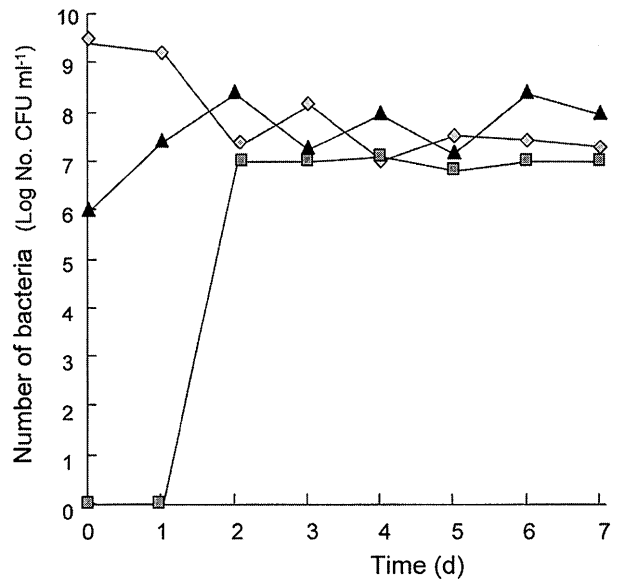


Fig. 6. Number of bacteria in outflow liquid from the bioreactor which contained the LMC-9 strain. 1.0×10^6 CFU ml⁻¹ of *Flavobacterium psychrophilum* culture liquid were introduced into the bioreactor column.

- ◇ Number of LMC-9 of the bioreactor system with LMC-9
- △ Number of *Flavobacterium psychrophilum* in reference bioreactor
- Number of *Flavobacterium psychrophilum* of the bioreactor system with LMC-9

ウイルス細菌は抗生物質で除去され、抗生物質の効力が及ばないウイルスはより増加する。また、近年、養殖魚の「食の安全」に対する消費者の関心は著しく増大しており、薬剤等の使用は抑制される方向にある。一方では、近年の地球気候の変化 (温暖化) にともなって、例えば亜熱帯、熱帯地域の疾病が温帯、亜寒帯地域に発生しているように、新たな疾病の発生が続くと危惧されている。このような薬剤使用の抑制と疾病増大を背景として、バイオコントロールへの関心はより増大する傾向にある。(前田, 2005 b)

しかし、バイオコントロールによる養殖魚の飼育において、有用微生物を配合飼料に混合したり飼育水中に添加したりといった従来の方法は、有用細菌の培養と供給とを恒常的に行うため、人力とコストの負担が

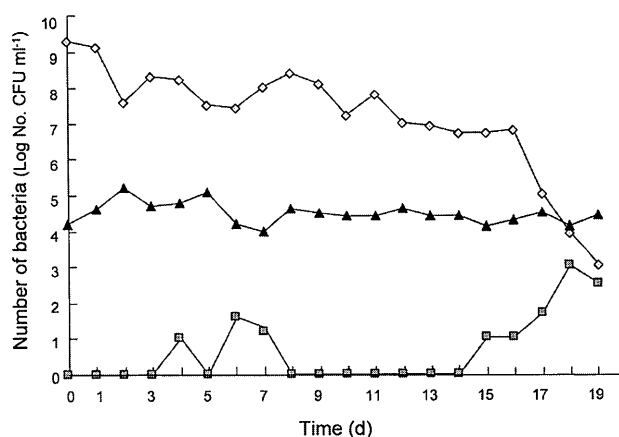


Fig. 7. Number of bacteria in outflow liquid from the bioreactor. 1.0×10^4 CFU ml⁻¹ of *Flavobacterium psychrophilum* culture liquid were introduced into the bioreactor column.

- ◇ Number of LMC-9 of the bioreactor system with LMC-9
- △ Number of *Flavobacterium psychrophilum* in reference bioreactor
- Number of *Flavobacterium psychrophilum* of the bioreactor system with LMC-9

少なくない。このため、本研究ではバイオリアクターの使用を検討したが、冷水病菌の増殖抑制には有効と考えられた。

すなわち、本研究において、拮抗細菌 LMC9 株は附着基盤上においても冷水病菌に対する阻害活性を維持していることが明らかとなった。また、附着担体 (基盤) ゼオライトと拮抗細菌 LMC9 株とで作製したバイオリアクターによって、*F. psychrophilum* の増殖能を二週間以上抑制することができた。しかし、カラムからの流出液を PCR 法によって調べたところ、流出液中から *F. psychrophilum* が検出された。これは、流入した *F. psychrophilum* は、バイオリアクター内に留まらず、バイオリアクター外に排出されてはいるが、その増殖活性は平板培地で増殖できない程度に低下していることを示唆している。また、バイオリアクターに滅菌蒸留水を流入した場合と滅菌河川水を流入した場合とを比較すると、後者の方が長期間バイオリアクター中の LMC9 株の増殖を維持することができたが、これは、滅菌河川水内に LMC9 株の増殖に必要な少量の栄

養源 (例えば蛋白質や糖類など) があり、この栄養源によって LMC9 株が増殖したことを示唆している。

このようなバイオリアクターを現場養殖水中へ設置し、バイオリアクターを一定期間毎に交換することで、疾病防除効果が期待でき、有用細菌の培養および供給の労力とコスト負担を大幅に軽減できる。また、養殖池における冷水病防除のみならず、現在問題となっている天然河川における冷水病への対策としても実用化が期待できる。

References

Gatesoupe, F. J. (1999): The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture*, **180**, 147-165.

伊藤 敬, 中居 裕, 稲野 俊直, 田口 智也, 前田 昌調 (2006): アユ冷水病菌の増殖を抑制する拮抗細菌の分離. *海の研究*, **15**, 417-423.

軽部 征夫, 田中 渥夫, 松野 隆一 (1985): バイオリアクター, 福井 三郎編, 講談社, 東京, 200 pp.

Maeda, M. (2004): Interactions of bacteria and their use as biocontrol agents in aquaculture. *La Mer*, **42**, 1-19.

前田 昌調 (2005 a): 海産微生物の拮抗作用と魚介類飼育への利用. *海の研究*, **14**, 7-20.

前田 昌調 (2005 b): 水圏の環境微生物学, 講談社, 東京, 204 pp.

Maeda, M. and K. Nogami (1989): Some aspects of the biocontrolling method in aquaculture. p. 395-398. In *Current Topics in Marine Biotechnology*, edited by S. Miyachi et al., Japan. Soc. Mar. Biotechnol., Tokyo.

篠田 吉史, 加藤 暢夫, 森田 直樹 (2000): 16SrRNA 遺伝子解析による細菌の系統分類. *島津評論*, **57**, 121-132.

Toyama T., K. Kita-Tsukamoto, and H. Wakabayashi (1994): Identification of *Cytophaga psychrophila* by PCR targeted 16S ribosomal DNA. *Fish Pathol.*, **29**, 271-275.

Wakabayashi, H. and Egusa, S. (1974): Characteristics of myxobacteria associated with some freshwater fish diseases in Japan. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.* **40**, 751-757.

Biocontrol of *Flavobacterium psychrophilum*,
the Pathogen of Cold-water Fish Disease,
using a Bioreactor with an Antagonistic Bacterium

Kei Itoh[†] and Masachika Maeda[†]

Abstract

Using an adhesion substrate (carrier of bacteria attached) and antagonistic bacteria of the Strain LMC9, this research produced a bioreactor and examined its repressing effect on the growth of the cold-water disease pathogen *Flavobacterium psychrophilum* on Ayu fish (*Plecoglossus altivelis*). Initially, a sterilized microscopic glass slide (2.6×7.6 cm) was adopted in order to check the interactions between the antagonistic bacteria LMC9 and *F. psychrophilum* on the adhesion substrate; that is, we followed fluctuations in the number of bacteria attached to it under different conditions. Consequently, when the glass slide was first immersed into antagonistic bacterium liquid, and successively immersed into the *F. psychrophilum* liquid (10⁹ CFU (colony-forming unit) ml⁻¹), the number of *F. psychrophilum* attached to the glass slide decreased with increasing concentrations of LMC9. The number of attached *F. psychrophilum* decreased significantly when the glass slide was immersed first in LMC9 liquid of a concentration exceeding 10⁷ CFU ml⁻¹; the number of attached bacteria was several hundred times less than when immersed in 10⁶ CFU ml⁻¹ of LMC9 liquid.

Zeolite as an adhesion substrate was immersed in 10¹⁰ CFU ml⁻¹ of Strain LMC9 for 1 h and then packed into a glass column to construct the bioreactor. When *F. psychrophilum* liquid (10⁴ CFU ml⁻¹) was introduced into this bioreactor at a rate of 1 L d⁻¹, *F. psychrophilum* could not be detected in the outflow liquid even on the 14th day, using the agar plate culture method. But when *F. psychrophilum* at a concentration of 10⁶ CFU ml⁻¹ was introduced into the bioreactor, the above effect was not obtained; that is, *F. psychrophilum* in the outflow was detected on the agar medium by the 2nd day of the experiment.

The outflow liquid from the bioreactor was examined with a PCR device to clarify whether even a very low concentration of *F. psychrophilum* could be detected when 10⁴ CFU ml⁻¹ of *F. psychrophilum* was introduced into the bioreactor. As a result, DNA of *F. psychrophilum* was detected on the chromatogram after PCR. This suggests that the growth ability of *F. psychrophilum* was repressed due to the antagonistic bacterial effect in the bioreactor, and consequently *F. psychrophilum* could not form colonies on an agar plate medium.

Key words: antagonistic bacteria, bioreactor, bacterial interactions, biocontrol,
cold-water fish disease, *Flavobacterium psychrophilum*

(Corresponding author's e-mail address: gmaeda@cc.miyazaki-u.ac.jp)

(Received 1 February 2007; accepted 23 March 2007)

(Copyright by the Oceanographic Society of Japan, 2007)

[†] Department of Environmental Sciences, Faculty of Agriculture, University of Miyazaki, Miyazaki-city, Miyazaki 889-2192, Japan