

## 土壤環境に導入された微生物の生残性を規制する要因

妹尾啓史\*・西山雅也\*\*

\*三重大学生物資源学部, \*\*東京大学大学院農学生命科学研究科

### Factors Affecting Survival of Microorganisms Introduced into Soil Environments

Keishi SENOO\* and Masaya NISHIYAMA\*\*

\*Faculty of Bioresources, Mie University, Kamihama-cho, Tsu, Mie 514-8507, Japan

\*\*Faculty of Agriculture and Agricultural Life Sciences, The University of Tokyo, Bunkyo-ku,  
Tokyo 113-8657, Japan

#### Abstract

Environmental release of beneficial microorganisms, including genetically engineered ones, is a matter of concern in the field of bioremediation and improvement of crop production. Factors affecting survival and death of the microorganisms introduced into the environment, such as soil ecosystem, must be clarified to obtain effectively and safely the expected function of the microorganisms. Generally, microorganisms introduced into soil environment decrease in number with time, the decrease is mainly caused by the predatory activity of soil protozoa. Indigenous soil microorganisms survive for a long period in the microhabitats where they are protected against the attack of grazing protozoa. The artificial microhabitats, such as Microporous Glass and bentonite, offer protective microhabitats for the bacterium and are useful to increase the survival of bacterial inocula into soil. The pre-culture condition of bacterial inocula also affects their survival in soil. Starvation treatment of the bacterial cells prior to inoculation improves their survival. This information must be considered when utilizing beneficial microorganisms in soil environments.

**Key words** : soil environment • inoculated bacterium • survival in soil •  
protozoan grazing • microhabitats

#### 1. 緒言

近年, PCB (polychlorinated biphenyl) やトリクロロエチレン, 原油など, 土壤環境を汚染した難分解性物質を, 微生物を用いて分解しようとする試み, いわゆる

バイオレメディエーション (Bioremediation) が盛んになりつつある<sup>1)</sup>。バイオレメディエーションにはいくつかの方法が考案されており, 例えば汚染土壤に有機物や無機養分を添加し, 通気を行って土壤に元来存在す

る微生物を活性化して汚染物質の分解を促進するという方法がある<sup>1)</sup>。また、汚染物質を分解できる微生物をスクリーニングし、その分解菌そのもの、あるいは遺伝子工学的手法を用いて分解能をさらに強化した分解菌を大量に培養し、汚染土壤に散布して汚染物質を分解する方法もとられる<sup>2)</sup>。後者の場合には、土壤環境中には元来は存在しなかった微生物が大量に放出されるため、周辺の間人動物も含めた自然環境への影響評価<sup>3)</sup>が事前に必要となり、そのためのガイドラインも策定されている。望ましいのは、放出微生物が汚染物質の分解という役割を果たす間は生残し続け、果たし終えた後には速やかに消失することであろう。

一方、作物生産の現場では、ダイズなど豆科作物を栽培する際に根粒菌を接種して根粒形成・窒素固定を行わせ、化学肥料の低減を図ろうとする試みや、土壤病害菌に対して拮抗能を持つ根圏微生物を接種して病害を予防する試みが古くからなされている。この場合、接種微生物は土壤中に生存し、土壤に元来存在する土着菌との競争に打ち勝って根粒形成や根圏への定着を行う必要があるため、一般に大量に接種を行う必要がある。例えば、根粒菌の場合には根に形成される根粒の半数以上を接種菌で占めるためには、少なくとも土着根粒菌の1000倍の菌数を接種する必要があるとされている<sup>4)</sup>。すなわち、作物生産向上のためには接種菌をいかに土壤中で生きさせて目的の機能を発揮させるか、という点が重要になってくる。

このように、目的によって、土壤への放出微生物に期待する生存状況は異なってくる。期待する効果を最大限にかつ安全に得るためには、土壤への放出微生物の生残性を規制する要因を明らかにし、放出微生物の挙動を予測、さらには制御できることが望ましいであろう。

筆者らはこのような観点から土壤に接種した微生物の動態、土着菌との動態の比較、それらを規制する要因の解析などに関する研究を行ってきた。ここでは筆者らの研究を例として説明しながら、土壤中に接種された微生物の生残性を規制する要因について関連の研究から得られている知見を紹介したい。

## 2. 農薬 $\gamma$ -HCH 連用畑土壤と $\gamma$ -HCH 分解菌

有機塩素系殺虫剤 $\gamma$ -HCH ( $\gamma$ -1, 2, 3, 4, 5, 6-hexachlorocyclohexane, 通称 $\gamma$ -BHC または

lindane) は畑土壤中での残留性が高く、環境を汚染する重大な物質であり、現在はほとんどの国で使用が禁止されている。東京大学農学部構内には $\gamma$ -HCH を10年以上にわたって年に1回投与し続けた試験圃場があり、連用による農薬の消長の変化が調べられた。その結果、 $\gamma$ -HCH は土壤への投与回数が増えると消失速度が高くなること、それは好気性の分解細菌が出現・集積したためであることが明らかになっている<sup>5)</sup>。

その土壤から $\gamma$ -HCH を唯一の炭素源として資化、分解できる土壤細菌 *Sphingomonas paucimobilis* SS86 株が単離され<sup>6)</sup> (以下、 $\gamma$ -HCH 分解菌と記述する)、これをモデル細菌として実験に用いた。 $\gamma$ -HCH 分解菌は、 $\gamma$ -HCH を連用した土壤には集積し、土着菌の一員として常に生息しているが、 $\gamma$ -HCH を一度も投与しなかった対照区土壤からは全く検出されない<sup>6)</sup>。また、一般に土壤中の特定の菌株を高感度に計数することは困難であるが、 $\gamma$ -HCH 分解菌は $\gamma$ -HCH を唯一の炭素源とする無機培地を用いた最確値法(MPN法)により高感度・簡便に計数することができる<sup>7)</sup>。このような特徴を利用することにより、土壤に接種された微生物の生残性、土着菌との挙動の比較などを詳細に検討することが可能である。

一般に土壤中の特定の菌株を高感度に計数することは困難であると述べたが、組み換えDNA微生物の自然環境への導入利用が現実のものとなり、導入微生物の効果や安全性評価の側面から、導入した微生物の消長を追跡する、すなわち、選択的に検出・計数する技術が1980年代後半から急速に開発された。その一つは、微生物の培養法によらず、ターゲットとする微生物が有する特定のDNA配列を検出する方法(DNAプローブ法)である<sup>8)</sup>。これは、土壤から直接DNAを抽出・精製し、あるいは微生物菌体を土壤から分画分離した後にDNAを抽出・精製して、サザンハイブリダイゼーションやPCRにより特定の塩基配列を検出・定量するものである。特定の塩基配列としては、難分解性物質の分解系遺伝子、16SrRNAをコードするDNAの種特異的な配列部分がよく利用される。また、導入微生物にlux遺伝子を導入して生物発光能を付与し、接種した土壤に生存する導入微生物から発せられる蛍光をルミノメーターで測定して導入微生物を定量する方法も用いられる<sup>9)</sup>。

3. 接種菌と土着菌の土壤中での生残性

$\gamma$ -HCH 分解菌を上記の試験圃場の対照区の土壤に接種した場合の生残性と、 $\gamma$ -HCH 連用区土壤に土着の  $\gamma$ -HCH 分解菌 *S. paucimobilis* の生残性を室内系インキュベーション実験で調べた結果を Fig. 1 に示す<sup>10)</sup>。要約すると、①  $\gamma$ -HCH ( $\gamma$ -HCH 分解菌の基質となる) を添加しない対照区土壤に接種された菌は増殖することなく死滅する。接種前に細胞を飢餓処理すると死滅速度は緩やかになる。②  $\gamma$ -HCH を添加した対照区土壤に接種された  $\gamma$ -HCH 分解菌は  $\gamma$ -HCH を資化していったん増殖するが、その後は死滅する。③  $\gamma$ -HCH を連用した土壤に土着の  $\gamma$ -HCH 分解菌は添加された  $\gamma$ -HCH を資化して増殖後、 $10^3 - 10^4$  /g soil 程度の菌数で長期間生存する。また、同様の結果は野外試験圃場においても確認されている<sup>11)</sup>。

4. 土壤中での接種微生物の死滅要因

一般に、この種の実験を行った場合、死滅速度の差こ

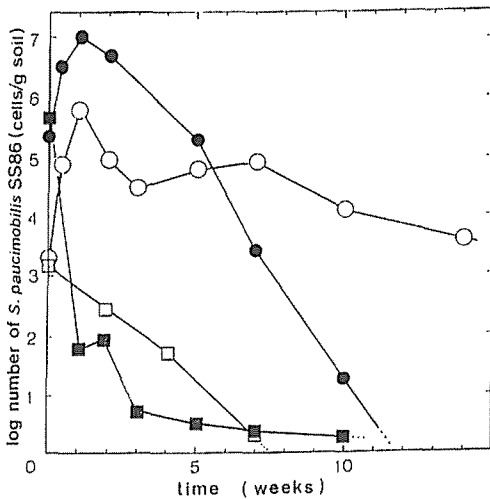


Fig. 1 Population dynamics of  $\gamma$ -HCH-decomposing *S. paucimobilis* SS86 in soils. ○, indigenous one in the HCH soil (amended with  $\gamma$ -HCH); ●, inoculated one into the control soil (amended with  $\gamma$ -HCH); ■, growing cells of the bacterium inoculated into the control soil ( $\gamma$ -HCH free); □, starved cells of the bacterium inoculated into the control soil ( $\gamma$ -HCH free). Soil samples were incubated at 30°C with 60% of Maximum Water Holding Capacity.

そあれ、接種微生物は死滅に向かうことが知られている。Liang らは、将来的に土壤環境での有効利用が期待される *Bacillus*, *Klebsiella*, *Agrobacterium* などを土壤に接種し、その生残性を調べたが、いずれの微生物も接種後の時間経過と共に死滅に向かうことが明らかになっている<sup>12)</sup> (Fig. 2)。

土壤は極めて多様な微生物が存在して安定な生態系を構築しており、外来の微生物に対しては一種の排除圧がかかる。その内容は土壤中に生息している原生動物による捕食である場合が多い<sup>13)</sup>。土壤によって異なるが、1gの土壤あたり 1000-500000 個体の原生動物が生息している。そのうち、鞭毛虫類 (flagellates), 繊毛虫類 (ciliates), アメーバー (amoebae) は微生物菌体を捕食することが知られており、事実、これらの原生動物の捕食作用が土壤への接種微生物の死滅要因の一つであることがいくつかの実験によって確認されている<sup>14)</sup>。細菌捕食性の原生動物は土壤中の細菌数の制御因子の一つであると考えられる<sup>15)</sup>。

$\gamma$ -HCH 分解菌の場合も死滅要因は主として原生動物の捕食であることがいくつかの実験から確認されている<sup>16, 10)</sup>。例えば、原生動物を除去した土壤懸濁液を滅菌土壤に添加して作成した原生動物フリーの土壤では  $\gamma$ -HCH 分解菌の死滅は著しく抑制される (Fig. 3)<sup>16)</sup>。

土壤に土着の  $\gamma$ -HCH 分解菌が長期間安定に生存し

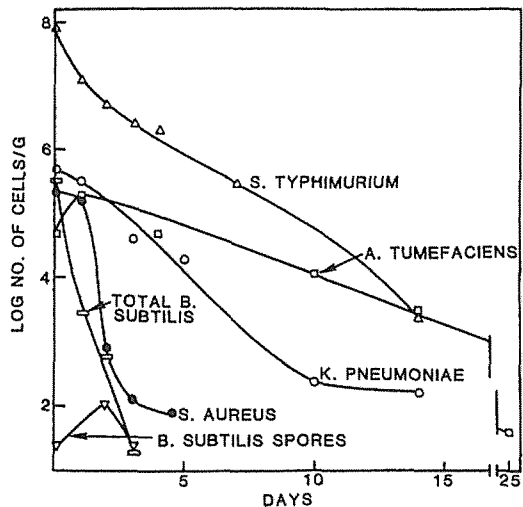


Fig. 2. Survival of five bacterial species in nonsterile soil<sup>12)</sup>.

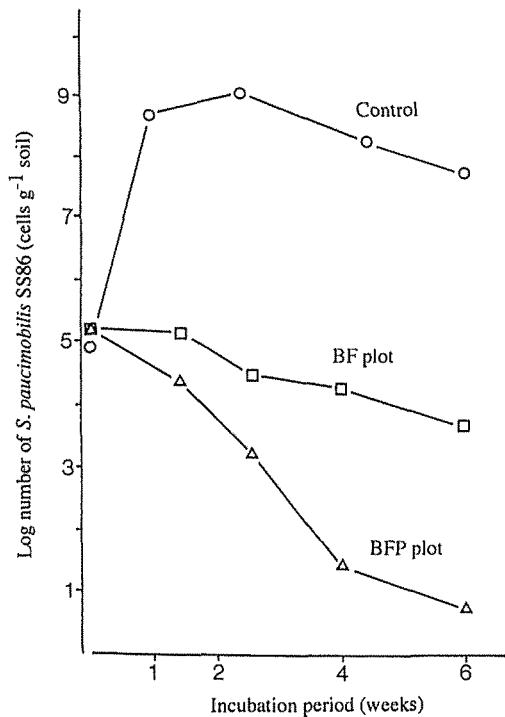


Fig. 3. Effect of protozoa on the survival of  $\gamma$ -HCH-decomposing *S. paucimobilis* SS86 inoculated into soil. ○, sterile soil; □, sterile soil conditioned with bacteria and fungi (BF); △, sterile soil conditioned with bacteria, fungi and protozoa (BFP).

ているのは、この原生動物による捕食を免れる何らかの方策を獲得しているためと考えられる。これについては後に詳しく述べる。

Fig.1に示したように、栄養培地で前培養を行った細胞を接種した時の死滅速度は飢餓処理をした細胞のそれよりも高い。一般に土壌中のような貧栄養環境下では微生物は細胞のサイズが小さくなり、代謝活性が低下し、DNAやタンパク量も低下した飢餓状態にある<sup>17)</sup>。生残にはそれが有利であると考えられる。事実、飢餓処理された細胞を土壌系マイクロゾムに接種すると栄養細胞を接種したときよりも生残性が高まったことが報告されている<sup>18)</sup>。また、細胞のサイズが小さくなったり、細胞表面が疎水的になることにより原生動物の捕食を受けにくくなるという事例も知られている<sup>19, 20)</sup>。さらに、飢餓状態で生残している細菌においてしばしば観察されるのは、菌体外多糖などの biopolymer の生産である。これに

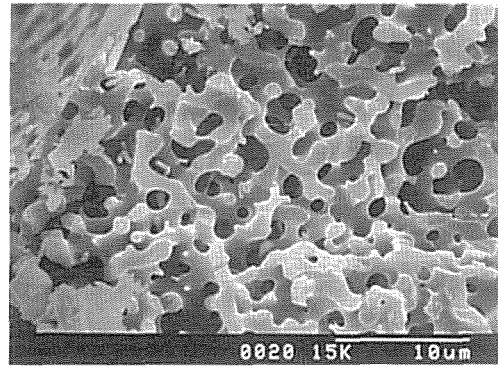


Fig. 4 *S. paucimobilis* SS86 introduced into Microporous Glass with pores of 1.2  $\mu$ m dia (cross section).

より、細菌の耐乾性が上昇すること<sup>21)</sup>、土壌構成成分の表面への吸着能が高まること<sup>22, 23)</sup>、吸着能の上昇により原生動物の捕食を受けにくくなること<sup>23)</sup>などが報告されている。細胞の生理的状态と生残性との関わりは次に述べるマイクロハビタットと共に、土壌環境での接種微生物の有効利用に際して考慮すべき重要な事柄ではないかと考えられる。

## 5. 土着分解菌が安定に生残できる理由

3.で土着の $\gamma$ -HCH分解菌は原生動物の捕食を免れる何らかの方策を獲得していると述べた。その方策とは微生物の微視的生息部位（マイクロハビタット、microhabitats）の獲得にあるのではないかと推測した。

土壌中には一次鉱物、粘土鉱物、腐食物質、腐朽植物遺体、糸状菌菌糸などが複合して団粒構造と呼ばれる立体構造が形成されている<sup>24)</sup>。そして、団粒構造の内部の孔隙や表面、団粒-団粒間の間隙には物理化学的にヘテロな微細環境が存在して土壌微生物に多様なマイクロハビタットを提供し、土壌微生物フロアの多様性を維持している<sup>25)</sup>。例えば、胞子を形成できず、乾燥に比較的弱いグラム陰性細菌は主として土壌団粒内部に生息し、胞子を形成することにより乾燥条件下でも生残できるグラム陽性細菌は主として土壌団粒外部に生息していることが古くから知られている<sup>26)</sup>。また、土壌の超薄切片の電子顕微鏡観察から、土壌の毛管孔隙中、粘土鉱物表面、土壌有機物表面に細菌細胞が存在していることが確認さ

れている<sup>26)</sup>。

筆者らの実験の土着 $\gamma$ -HCH分解菌の場合、団粒内に形成される、原生動物が侵入・接近不可能な毛管孔隙を生息部位として獲得しており、一方、接種菌は単純な接種方法ではそのような孔隙には侵入できず、捕食されてしまうのではないかと推測した。この推測の妥当性はいくつかの実験によって確認されている。例えば、土壌を粒径別に分画して団粒内部と外部に存在する分解菌をそれぞれ経時的に計数すると、安定に生残している土着分解菌は団粒内部を生息部位とし、 $\gamma$ -HCHの添加により増殖した細胞は団粒外部へと進出すること、接種菌は大多数が団粒外部に存在していることが示されている<sup>27)</sup>。

このように、生存に好適な微視的生息部位を接種菌が獲得できないという $\gamma$ -HCH分解菌における事例は、作物生産の場において、土壌に何らかの目的で接種される微生物もやはり生息部位を獲得することが困難であり、土壌中での生存率は実はあまり高くないのではないかと、ということを目ざさせるものである。先に述べたような、ダイズにおいて、土着根粒菌の1000倍の根粒菌数を接種しなければ着生根粒の半数を接種菌で占めることができないという事実<sup>1)</sup>は、その予測の妥当性を支持するのではなからうか。

### 6. 人工マイクロハビタットによる生残性の向上

微生物を土壌に接種する際に、接種菌の生残性を高めるために、菌体単独で接種するのではなく、人工マイクロハビタットとともに導入することを試みた<sup>28)</sup>。人工マイクロハビタットとして用いたのは、顆粒状のガラス内部に均一な孔隙の孔隙が張り巡らされたガラス素材(多孔質ガラス, Microporous Glass, (MPG), 旭硝子株式会社)である。多孔質ガラスの孔隙内に $\gamma$ -HCH分解菌を導入し(Fig. 4), それを土壌に混合してインキュベートし、経時的に人工ハビタット内部ならびに人工ハビタット外部の土壌中に生残している分解菌数を計数した。Fig. 5に示す様に、直径 $10.3\mu\text{m}$ の孔隙を有する多孔質ガラスは $\gamma$ -HCH分解菌の良好な生残部位となり、高い菌密度が長期間維持されている。

多孔質の素材を微生物と共に土壌に投入することにより微生物の期待された効果を高めた事例は、土壌糸状菌の一種であり、植物の根に共生して植物のリン吸収を高

めるアーバスキュラー菌根菌においても報告されている<sup>29)</sup>。この場合には、炭を菌根菌胞子と共に土壌に混合したものである。炭を混合することにより、菌根菌の接種効果が高まり、作物の生育が促進された。この場合も、炭の孔隙が菌根菌のハビタットとなり、土壌への定着を高めたものと考えられる。また、Heijnenらは、土壌に、多孔質構造を有するペントナイト(粘土鉱物の一種)を混合することにより、原生動物の接近できない孔隙の割合を高め、接種根粒菌の生残性を高めることができた<sup>30)</sup>と報告している。

ただ、先に述べたように、マイクロハビタットとして十分に機能する条件は、孔隙構造だけにあるのではないであろう。その孔隙を構成する物質の種類(有機物か無機物か)や表面構造(疎水・親水性, 荷電, 特異的な結合部位など), 孔隙周辺に存在する気相や土壌溶液の性質(酸素濃度, 溶液組成, pHなど)なども重要な条件になるとと思われる。

例えば、生存に好適な微視的生息部位を提供する土壌構成成分としてケイ酸塩粘土鉱物の重要性が指摘されている<sup>31)</sup>。ケイ酸塩粘土鉱物は粒径 $2\mu\text{m}$ 以下の二次鉱物であり、表面積が大きく、表面に陰荷電を持つために、陽イオンの吸着能が高い。このため、粘土鉱物表面は土壌溶液とは異なるpHにあるとされている<sup>31)</sup>。粘土鉱物表面には $\text{Ca}^{2+}$ や $\text{Mg}^{2+}$ イオンを介して、表面に陰荷電を有する土壌細菌菌体が吸着保持される<sup>31)</sup>。吸着保持され

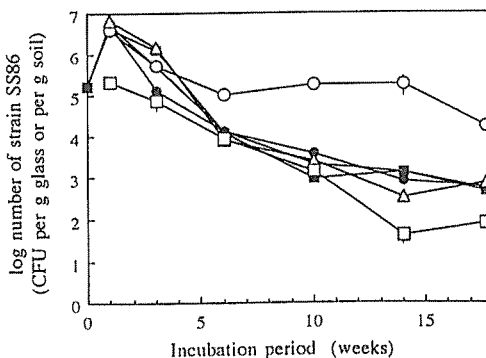


Fig. 5 Population density of  $\gamma$ -HCH-decomposing *S. puacimobilis* SS86 in Microporous Glass (MPG) with pores of (○)  $10.3\mu\text{m}$  dia; (△)  $2.8\mu\text{m}$  dia; and (□)  $0.47\mu\text{m}$  dia; and in soil incubated with and then separated from MPG with pores with (●)  $10.3\mu\text{m}$  dia; (▲)  $2.8\mu\text{m}$  dia; and (■)  $0.47\mu\text{m}$  dia. CFU: Colony Formation Unit.

ることにより、細菌菌体は原生動物による捕食やフェージによる溶菌を受けにくくなること<sup>32)</sup>、土壌溶液の pH の急激な変化から保護されていること<sup>33)</sup>、粘土表面に保持されている無機養分が利用できる点で、土壌溶液中に存在するよりも有利であること<sup>34)</sup>などが指摘されている。事実、粘土含量の高い土壌中の方が接種された根粒菌<sup>35)</sup>や *Pseudomonas fluorescens*<sup>36)</sup> の生残性が良好であること、陽イオン吸着保持能の異なる数種の粘土鉱物に接種された *P. fluorescens* の生残性を調べると、陽イオン吸着保持能の高い粘土鉱物中での生残性が良好であること<sup>36)</sup>などが報告されている。

## 7. おわりに

環境浄化や低投入型農業の重要性はこれからますます増加する一方であり、そこでは有用微生物を自然環境中で少なくとも一定期間生存させ、機能を発揮させることを期待する場面がしばしばあらわれる。これを達成するためには、微生物の有用な機能の探索・育成とともに、自然環境中でそれを有効に用いるための微生物の制御技術の確立が必要であろう。ここで述べた事例は微生物の生残性に特に焦点を絞り、前培養条件やマイクロハビタットの重要性を示したものであるが、利用できる基質の極めて限られる貧栄養な自然環境下で、いかに目的微生物の代謝活性を高めて活発に機能を発現させるか、また、根粒菌のように土着菌として類似した微生物が存在する場合には、いかにして土着菌との競争に打ち勝たせるか、などについての技術の確立が必要となり、それらは今後の重要な研究課題であろう。

## 謝 辞

多孔質ガラス (Microporous Glass) を提供して下さいました旭硝子株式会社、中村和雄博士に感謝いたします。

## 要 約

環境汚染物質の浄化や作物生産向上の目的で、有用微生物を自然環境に放出利用する試みが盛んになりつつある。その際に、目的とする機能を効果的、かつ安全に機能させるためには放出微生物の生残・死滅を規制する要因を明らかにしておく必要がある。一般に土壌に導入さ

れた微生物の菌数は時間の経過と共に減少する。これは主として土壌に生息する原生動物により接種菌体が捕食されることによる。土壌に元来存在する土着微生物は原生動物の捕食から逃れるための微視的生残部位 (マイクロハビタット) を獲得しており、長期間の生残が可能である。多孔質ガラスやベントナイトなどの人工的なマイクロハビタットを利用することにより接種菌の生残性を高めることが可能である。また、接種菌の前培養条件は土壌中での生残性に影響する。例えば接種前に飢餓処理された細胞は土壌中での生残性が高まる。これらの知見は土壌環境における微生物の有効利用に際して有益であろう。

## 引用文献

- 1) 西村実. バイオレメディエーション - 微生物による環境浄化 - . 土と微生物, 46: 19-26 (1995).
- 2) SKLADANY, G. J. and METTING, F. B., Jr. Bioremediation of contaminated soil. In Soil Microbial Ecology (ed. by SKLADANY, G. J., Marcel Dekker, New York.) p 483-513 (1992).
- 3) 合衆国議会技術評価局編. 遺伝子工学生物の野外試験 - バイオテクノロジーの新しい展開 - . 東京書籍, 東京 (1990).
- 4) WEAVER, R. W. and FREDERICK, L. R. Effect of inoculum rate on competitive nodulation of *Glycine max* L. Merrill. II. Field studies. *Agron. J.*, 66: 233-236 (1974).
- 5) WADA, H., SENOO, K. and TAKAI, Y. Rapid degradation of  $\gamma$ -HCH in upland soil after multiple applications. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 35: 71-77 (1989).
- 6) SENOO, K. and WADA, H. Isolation and identification of an aerobic  $\gamma$ -HCH-decomposing bacterium from soil. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 35: 79-87 (1989).
- 7) SENOO, K. and WADA, H. Accurate and sensitive method of enumeration of a specific microorganism, *Pseudomonas paucimobilis* SS86, in nonsterile soil. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 36: 389-395 (1990).
- 8) JAIN, R. K., BURLAGE, R. S., and SAYLER, G. S. Method for detecting recombinant DNA in the environment. *CRC Crit. Rev. Biotech.*, 8: 85-97 (1988).
- 9) SAUNDERS, J. R., and SAUNDERS, V. A.

- Genotypic and phenotypic methods for the detection of specific released microorganisms. In *Monitoring genetically manipulated microorganisms in the environment.* (ed. by Edward, C., Wiley.) p27-60 (1993).
- 10) SENOO, K., NISHIYAMA, M., WADA, H. and MATSUMOTO, S. Differences in dynamics between indigenous and inoculated *Sphingomonas paucimobilis* strain SS86 in soils. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 86 : 311-320 (1992).
  - 11) SENOO, K. and WADA, H. Fate of a bacterium, *Pseudomonas paucimobilis* SS86, in upland field. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 36 : 593-598 (1990).
  - 12) LIANG, L. N., SINCLAIR, J. L., MALLORY, L. M., and ALEXANDER, M. Fate in model ecosystem of microbial species of potential use in genetic engineering. *Appl. Environ. Microbiol.*, 44 : 708-714 (1982).
  - 13) DANSO, S. K. A., KEYA, S. O., and ALEXANDER, M. Protozoa and decline of *Rhizobium* populations added to soil. *Can. J. Microbiol.*, 29 : 159-164 (1975).
  - 14) ENGLAND, L. S., LEE, H., and TREVORS, J. T. Bacterial survival in soil: Effect of clays and protozoa. *Soil Biol. Biochem.*, 25 : 525-531 (1993).
  - 15) CLARHOLM, M. Protozoan grazing of bacteria in soil-impact and importance. *Microb. Ecol.*, 7 : 343-350 (1981).
  - 16) 妹尾啓史, 西山雅也. 土壌系における接種菌と土着菌の生態の比較 -BHC分解菌をモデル細菌として-. *土と微生物*, 45 : 41-50 (1995).
  - 17) MORITA, R. Y. Bioavailability and its relationship to growth and starvation survival in nature. *Can. J. Microbiol.*, 34 : 436-441 (1988).
  - 18) THOMPSON, I. P., COOK, K. A., LETHBRIDGE, G., and BURNS, R. G., Survival of two ecologically distinct bacteria (*Flavobacterium* and *Arthrobacter*) in unplanted and rhizosphere soil: laboratory studies. *Soil Biol. Biochem.*, 22 : 1029-1037 (1989).
  - 19) GURIJARA, K. R., and ALEXANDER, M. Effect of growth rate and hydrophobicity on bacteria surviving protozoan grazing. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56 : 1631-1635 (1990).
  - 20) GONZALEZ, J. M., SHEER, E. B., and SHEER, B. F., Size-selective grazing of bacteria by natural assemblages of estuarine flagellates and ciliates. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56 : 583-589 (1990).
  - 21) HEPPER, C. M. Extracellular polysaccharides of soil bacteria. In *Soil Microbiology*, (ed. by WAKER, N., Butterworths.) p93-110 (1975).
  - 22) BALKWILL, D. L., and CASIDA, Jr., L. E. Attachment to autoclaved soil of bacterial cells from pure cultures of soil isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* : 37, 1031-1037 (1979).
  - 23) FEHRMANN, R. C., and WEAVER, R. W. Scanning electron microscopy of *Rhizobium* spp. adhering to fine silt particles., *Soil Sci. Soc. Am. J.* : 42, 279-281 (1978).
  - 24) TISDALL, J. M. and OADES, J. M. Organic matter and water-stable aggregates in soils. *J. Soil Sci.*, 33 : 141-163 (1982).
  - 25) HATTORI, T. The microenvironment of microbes in the soil (2) : aggregates level. In *Microbial life in the soil.* Marcel Dekker, New York, p 263-312 (1973).
  - 26) FOSTER, R. C. Microenvironments of soil microorganisms. *Biol. Fertile. Soils.*, 6 : 189-203 (1988).
  - 27) NISHIYAMA, M., SENOO, K., WADA, H., and MATSUMOTO, S. Identification of soil microhabitats for growth, death and survival of a bacterium,  $\gamma$ -hexachlorocyclohexane-assimilating *Sphingomonas paucimobilis*, by fractionation of soil. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 101 : 145-150 (1992).
  - 28) NISHIYAMA, M., SENOO, K., and MATSUMOTO, S. Survival of a bacterium in microporous glass in soil. *Soil Biol. Biochem.*, 27 : 1359-1361 (1995).
  - 29) 斎藤雅典. 多孔質 VA 菌根菌接種資材の玉ネギ, 長ネギおよびアルファルファに対する効果. *東北農業研究* : 45, 139-140 (1991).
  - 30) HEIJNEN, C. E., HOK-A-HIN, C. H., and van VEEN, J. A. Improvements to the use of bentonite clay as a protective agent increasing survival levels of bacteria introduced into soil. *Soil Biol. Biochem.* : 24, 533-538 (1992).
  - 31) 服部勉. 微生物生態入門. 東京大学出版会. 東京. p 43-64 (1978).
  - 32) ROPER, M. M., and MARSHALL, K. C. Modification of the interaction between *Escherichia coli* and bacteriophage in saline sediment. *Microbial Ecol.*, 1 : 1-13 (1974).
  - 33) STOTZKY, G. Mechanism of adhesion of clays, with

- reference to soil systems. In *Bacterial Adhesion : Mechanisms and Physiological Significance*. (ed. by SAVAGE, D. C., and FLETCHER, M., Plenum Press, New York.) p 195-253 (1985).
- 34) POSTOMA, J., HOK-A-HIN, C. H., and OUDE, VOSHAAR, J. H. Influence of the inoculum density on the growth and survival of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* introduced into sterile and non-sterile loamy sand and silt loam. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 73 : 49-58 (1990).
- 35) van ELSAS, J. D., TREVORS, J. T., van OVERBEEK, L. S., and STARODUB, M. E. Survival of *Pseudomonas fluorescens* containing plasmids RP4 or pRK2501 and plasmid stability after introduction into two soils of different texture. *Can. J. Microbiol.*, 35 : 951-959 (1989).
- 36) STUTZ, E., KAHR, G., and DEFAGO, G. Clays involved in suppression of tobacco black root rot by a strain of *Pseudomonas fluorescens*. : *Soil Biol. Biochem.*, 21 : 361-366 (1989).