



**ECHO 亚洲研究期刊:**

**土壤微生物：它们是什么和怎么测量它们**

作者: Sophie Roberts<sup>1</sup>, Yuwadee Danmalidoi<sup>2</sup>, and Abram Bicksler<sup>3</sup>

<sup>1</sup> 泰国 ECHO 亚洲影响中心志愿者

<sup>2</sup> 亚洲种子银行信息和质量管理技术员

<sup>3</sup> 亚洲影响中心主任

**ECHO Asia Notes, Issue 27**

**March 2016**

## 背景

从 2014 年的 9 月到 11 月和 2015 年的 7 月到 8 月，ECHO 亚洲在泰国 Mae Ai 的 ECHO 亚洲种子银行制作并实验了一种由当地易获得的元素制成的选择性除草剂（见 ECHO 亚洲期刊第 26 期：《制作并实验一种小型农户适用的选择性除草剂》[Making and Testing an Alternative Herbicide for Smallholder Applications](#)），最后在实验地里证明这种除草剂控制杂草是有效的。这种除草剂是由熟透的木瓜或菠萝、盐和碱（碱性非常大）组成。我们想要知道喷洒这种碱性除草剂对土壤 pH 值、土壤结构、植被健康和微生物种群的密度的影响。一些科学家已经发现农业输入品包括除草剂和杀菌剂会影响微生物群落。由于土壤微生物群落的稳定性对营养循环和土壤聚合等过程至关重要，我们就需要关注这些有益微生物任何可能的变化。但是，因为对微生物菌落的定量通常都要在实验室进行并且很昂贵，ECHO 亚洲开始尝试重建一个合适并且有用的方案来测量土壤微生物群落变化情况。

## 介绍

微生物是不能用肉眼直接观察到的微小生物；他们包括真菌类、藻类和细菌类（Rao, 1995）。这些小生物存在于任何地方：水里、空气里和土壤里。在农业上，微生物的数量在堆肥、动物粪便和 IM（本地微生物（Indigenous Microorganisms））液里、EM（有效微生物（Effective Microorganisms））的液体里特别多。微生物是土壤的重要组成部分，它们帮助分解有机物，也将岩石和空气中的营养物质转化成农作物可用的形式，还帮助固定土壤结构（Tisdall, 1994; Hayat et al. 2010）。土壤微生物也在维持植物健康上扮演重要的角色，因为它们能促进营养循环并分解杀虫剂，如果有益微生物充足还可以降低植物病虫害（Anderson, 1984; Mendes et al., 2011）。

微生物的健康和数量受很多因素影响，包括土壤 pH 值、土壤水分含量、温度、盐度、含氧量和有机物（Schnürer et al., 1986; Matthias et al., 1995; Graeme et al., 2008; Tourna et al., 2008）。农业投入包括动物粪便、堆肥、IM 液、肥料、杀菌剂和杀虫剂都有可能影响现有微生物的数量和种类（Bünemann et al., 2005）。

微生物最常被发现于上层土壤包括顶土和表层土壤里。这个位置也是最可能和除草剂、化肥、杀虫剂还有一些有机物像叶子、粪便、堆肥和 IM 液等接触的地方。大多数微生物喜欢 pH 值在 5-7 之间的环境（和

水的 pH 相似)。土壤 pH 值波动会改变土壤微生物的群体结构 (Luber et al., 2009)。热带的土壤更偏酸性 (一般 pH 值偏低, 4-5), 所以喜欢酸性土壤的微生物将统治这些地区。细菌需要碳、氧、氮、硫、钾、镁、锰、铁以及少量其他离子。大多数的营养微生物可以通过分解动物尸体或其他微生物来获得。微生物喜欢富含有机物的多孔性土壤, 因为有丰富的食物、水和氧气 (Hassink, 1993)。

土壤盐渍度是衡量土壤含盐量的指标; 土壤盐份包括钠、镁、钙、硫酸盐和碳酸氢盐。盐份过重会降低微生物群落新陈代谢的能力 (Rietz & Haynes, 2003)。盐水入侵会发生在靠近咸水沼泽、苦咸水或海洋的地方。另外, 地下水位变化和肥料使用的变化都会导致土壤盐度变化, 这些都有可能降低微生物的健康度和数量。

过去的土地使用也会对现在的土壤微生物种群造成影响。某些因素例如 pH 值、盐度和杀虫剂残留会固执地存在于土壤里面, 可能很难改变。很多因素影响着微生物种群的健康, 所以很难确定具体问题出在哪里。但是在农业上, 监测土壤微生物种群依然重要, 特别是要采用新技术和新科技的时候。这篇文章描述了多种监测土壤中微生物相对数量的方法, 这些方法相比实验室测量是低成本的选择。

微生物种群密度与降解程度及土壤呼吸作用是有关联的。有一个假设是土壤微生物密度越大降解有机物质的速度就比数量较少的相同微生物快。之前就有用一个时段内微生物种群数量作为衡量土壤被污染程度的指标 (Van Bruggen & Semenov, 2000)。因为有机物降解等营养循环过程对土壤质量非常重要, 微生物在这个过程中帮助很大, 我们想要监测在新投入的影响下微生物数量的变化。我们最关注的是除草剂对微生物的伤害和数量的影响。实验将揭示是否除草剂喷洒过的地点的滤纸腐烂慢于只是喷水的控制组。

[编者注: ECHO 亚洲使用以下方法来测试自制天然除草剂的影响。我们对比了菠萝除草剂, 木瓜除草剂和水控制组。为了给读者参考, 划分了一个 1 米\*2 米实验区域, 测试剂 (菠萝除草剂, 木瓜除草剂和蒸馏水) 被随机地喷洒到 9 块实验地里, 3 种测试剂\*3 块实验地), 每种测试剂在每平方米喷 500 毫升喷 1 分钟。更多信息请参见 [ECHO Asia Note 26 for more information](#)。]

## 滤纸方法

第一种测试方法不能急, 出结果需要花几个星期。它需要的资源比第二种方法少, 即能提供定性的又能提供定量的信息。这种滤纸方法不能测出微生物本身的数量, 但是能测出微生物对有机物的降解率。对于降解来说微生物是必须的, 所以微生物的数量和降解率是正相关的。因为微生物数量增加导致降解增加, 所以滤纸腐烂程度就能说明这个比率。(其他微环境因素例如温度和土壤湿度也可能影响降解率。)

材料:

- 滤纸 (咖啡滤纸或 Whatman 的实验室滤纸 Filter paper)
- 小袋子或网眼袋 (我们使用的是洗袜子的洗衣袋)
- 铁铲
- 标记牌 (可以是旗子, 塑料带, 甚至是简单的一根棍子)

卷尺

方法:

1. 清洗手和小袋子。
2. 为 1 到 3 张滤纸称重并把它们放进袋子里，确保它们是 1 层的厚度并且不能重叠（在袋子里放额外的滤纸能给你额外的副本）（图 1）。
3. 在其他区域或控制点你也要设计监控微生物的数量，挖一个与这个小袋子尺寸差不多的 4-6 厘米深的坑，确保坑的底部是平坦的。
4. 把装有滤纸的小袋子放到坑的底部，把挖出来的土再填回去，保证土壤状况不变。
5. 在这个位置做个标记，保证你能再找着它。
6. 放置 6 个星期。
7. 6 个星期之后，把小袋子挖出来与其他测试点的滤纸一起进行降解情况比较（用肉眼就可以评估最好/最差的降解程度；更精确的测量方法请参见第 8 点）。
8. 以下是更精确的降解程度的测量方法，把滤纸从小袋子里拿出来并抖掉灰尘（粘在纸上的大块泥土应该小心的去除掉）。在 60 摄氏度的炉子里将滤纸干燥 24 小时。完成干燥后再给滤纸称重。以下表格给出了重量的最终变化情况；降解指数越低降解程度越低，降解指数越大降解程度越大。通过这些数字我们可以推断出微生物的健康和数量；降解百分比越高表示微生物越多。



图 1: 滤纸理论提及的放在一个网眼袋里的使用中的滤纸。

$$\text{降解指数 \%} = (\text{初始重量} - \text{最终重量}) / \text{初始重量} \times 100$$

## 菌落计算理论

菌落计算至少要 24 小时，并且要近似于样本中的实际数量（图 2）。除植物的根系以外，大型节肢动物、微型节肢动物和微生物都是土壤系统生物构成的一部分。很多实验室利用这个理论来分析土壤微生物数量并作为一个土壤系统健康变化的信号。这个系统需要更多的准备时间和资源，但是结果更为精确。保证无菌操作的环境对于这个理论的精确性是至关重要的。



图 2: 制作琼脂盘并计算细菌菌落是一种显示土壤系统健康变化的方法

跟大多数的实验室不一样，我们自己制造营养琼脂并以一个较低的温度孵化培养皿（我们用 27 度，而不是其他标准的 25 度或 30 度）。这意味着其他实验室的 CFU 计数和我们观察到的有一点不同。但是，实验的大概结果——微生物增加、减少或保持不变——应该与其他实验室的发现是相似的。由于细菌和真菌非常不同，所以每个品种对营养的需求都有不同的理想比例，所以没有一种营养琼脂能支持所有不同品种的微生物。一些品种可能需要额外的营养和其他化合物来繁殖成肉眼可见的品种。因此，我们的营养琼脂目前只能支持土壤里的部分细菌和真菌，但是依然能显示出细菌大致的变化趋势。

#### 材料:

- 泥铲
- 罐子/塑料采样袋 J
- 5 毫升吸液管(x2)
- 20 毫升试管/小玻璃瓶(x7)
- 琼脂板（可以自制；参见下文）
- 搅棒
- 细菌撒布机
- 酒精/火

[注意：科学设备——琼脂板，试管，搅棒和细菌撒布机——是在泰国清迈 Suthep 路的科学联盟买的]

#### 方法:

1. 用“1,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ”来标注 7 个试管和 7 个琼脂板，用 9 份水和 1 份漂白剂组成的溶液浸泡它们 24 小时，或者放置在一个 121°C 和 103.4 千帕的压力锅里 20 分钟。
2. 把试管 1 装满 10 毫升无菌水，其他试管装 9 毫升。
3. 用一个无菌铲采集至少 1 克的土壤样本并存放在一个无菌容器中。
4. 从无菌容器里称 1 克土壤并把它加到有 10 毫升无菌水的试管 1 中。
5. 充分混合（如果需要请使用搅棒，并捣碎大块）。
6. 使用一个吸液器把 1 毫升土壤溶液从试管 1 移至试管  $10^{-1}$ ，混合均匀。
7. 使用同样的吸液器把试管  $10^{-1}$  的 1 毫升土壤溶液移至试管  $10^{-2}$ ，混合均匀。

8. 把试管  $10^{-2}$  的 1 毫升土壤溶液移至试管  $10^{-3}$ 。继续在接下来的试管中进行这个工作，直到所有的试管里都有溶液（图 3）。

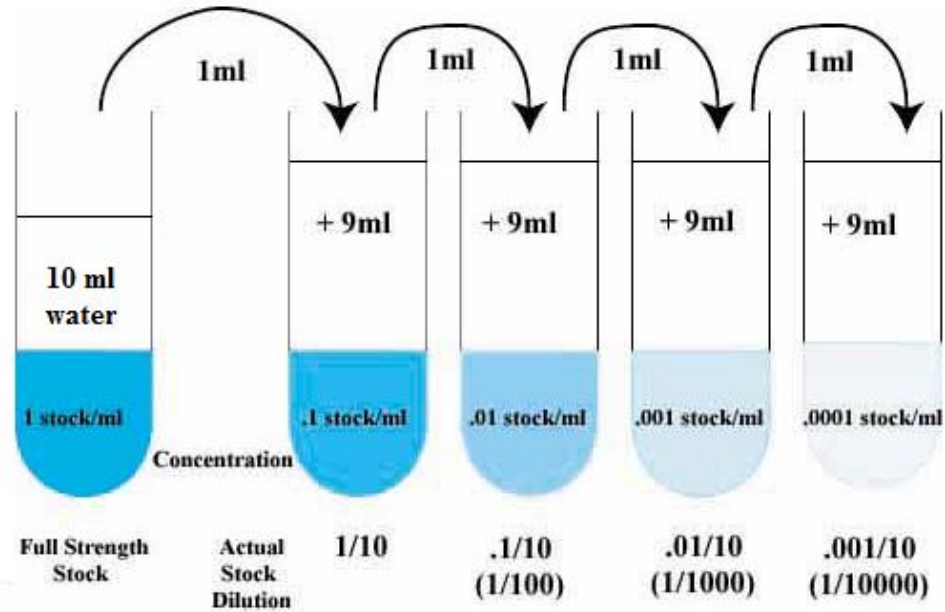


图 3：制造细菌群落计数理论连续稀释溶液

9. 无菌细菌撒布器。你可以把它放在火焰上烤直到玻璃发红后等它冷却，或者把它放进 70% 的乙醇里浸泡然后等它干燥。
10. 使用第二个无菌吸液器，把 0.5 毫升试管  $10^{-6}$  的溶液移动到  $10^{-6}$  琼脂板上
11. 使用一个无菌撒布器把溶液均匀地 z 字形喷洒在板的表面，转 90 度同样方式喷洒，再转 2 次以至覆盖表面（图 4）。立即盖上盖子。

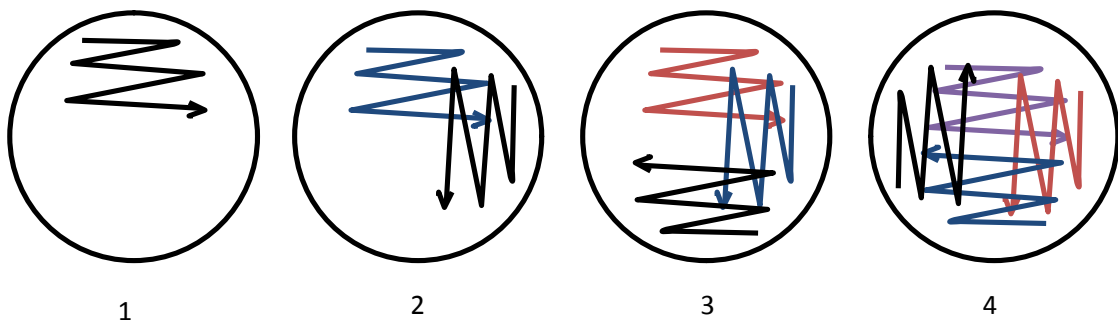


图 4：向琼脂板增加细菌的喷洒方法。

12. 重新对喷洒器消毒，把 0.5 毫升试管  $10^{-5}$  的溶液移动到  $10^{-5}$  琼脂板上。用第 11 步的方法喷洒。
13. 重复第 10 到 12 部，将剩余的试管的溶液移动相应的琼脂板上。

14. 把所有的琼脂板底朝天的堆起来并放在 27 度的温室里保持 24 小时。（ECHO 亚洲使用的是自建的种子萌发温室，参见链接 <https://www.youtube.com/watch?v=k6lux5EVUuI> 是一个 YouTube 视频）
15. 经过 24 小时培育期，可以看到 30-300 个菌群，然后计算形状、尺寸和颜色都与众不同的点（菌群）（图 2）。值得注意的是如果“菌群”只是一些按你喷洒的轨迹形成线条或者 24 小时一种“菌落”就占据了板的大部分，要么就是因为没有充分稀释要么就是因为工具被污染了。不应该是一种原始细菌形成一个单一的菌落，应该是很多菌落一起生长这样才有可能正确计数（图 5）。



图 5：出现条纹化的盘子是常见问题。这样表明被污染了或者是浓缩的细菌太多。左边的照片中的实线让细菌不可计数。右边的照片显示菌落可能都合并在一起了，所以有些点特别大。

16. 计算菌落形成单位（Colony Forming Units (CFU)）：

第 1 步：稀释系数 ( $DilutionFactor, DF$ ) = 初始量  $\times$  ( $\frac{\text{移动量}}{\text{移动量} + \text{总水量}}$ ) 琼脂盘数

第 2 步：菌落形成单位 (CFU) =  $\frac{\text{菌落数量}}{DF \times \text{琼脂盘数}}$

例子：如果我的菌落数是 133，琼脂盘的数量是 2 盘。

第 1 步：

$$\begin{aligned}
 DF &= 0.5 \times \left( \frac{1 \text{ 毫升}}{1 \text{ 毫升} + 9 \text{ 毫升}} \right)^2 \\
 &= 0.5 \times \left( \frac{1}{10} \right)^2 \\
 &= 0.5 \times 0.01 \\
 &= 0.005
 \end{aligned}$$

$$\text{初始量} = \frac{15 \text{ 毫升土}}{30 \text{ 毫升水}} = 0.5$$

转移体积=1 毫升

水的体积=9 毫升

装盘体积=0.5 毫升

$$\begin{aligned}
 \text{第 2 步: CFU} &= \frac{133 \text{ 个群落}}{0.005 \times 0.5 \text{ 毫升}} \\
 &= \frac{133 \text{ 个群落}}{0.0025 \text{ 毫升}} \\
 &= 53200 \text{ 个群落/每毫升}
 \end{aligned}$$

CFU 是一种在给定样本中计算可见（健康）微生物数量的方法。每种细菌或真菌的细胞都会分化最终成为可见的菌落。CFU 通常是由 CFU/ml 来表示。与低 CFU 相比，较高的 CFU 表示有更多的微生物存在。大多数连续稀释实验后土壤微生物的计数结果每克土壤在  $10^4$  到  $10^{12}$  CFUs 之间，在这个区间变化是正常的。请注意这里提供的方法，尽管是定量的方法，但是不同地点之间更多是变化趋势的比较而不是数量的比较。还要注意微生物的结构和数量还会随着土壤深度和位置的变化而变化。

关于安全性，值得注意的是用这种方法可能会产生有毒/有病的细菌/真菌。为了最小化这种可能性，在培育期间不要把菌落培育温度维持在高于室温很多的情况下（特别是避免在 36 到 38°C 之间，防止特别在哺乳动物体内存活的细菌的生存和复制）。

## 制作琼脂盘

材料：

- 12 个培养皿
- 2 杯水
- 2 勺琼脂粉
- 2 块块状汤料
- 4 勺糖
- 1 个能装两份液体的烧瓶（经过消毒）
- 1 个压力锅
- 1 个温度计（用漂泊粉消毒）
- 铝箔



图 6：用于制作琼脂盘的材料包括糖、块状汤料、琼脂粉和水。

方法:

1. 在压力锅里把琼脂盘以 121 度的温度和 103.4 千帕的压力蒸煮 20 分钟，或者是放在 9:1 的漂白溶液里浸泡 24 小时。
2. 把琼脂粉、块状汤料、糖和水放在容量是这些材料的两倍的玻璃容器中。用微波炉或炉子加热，直到混合物完全溶解，然后持续搅拌确保没有未溶解的固体。
3. 用铝箔覆盖住烧瓶然后把它放在蒸汽或压力锅里。按照设备的说明书，以 121°C 的温度和 103.4 千帕的压力加热 20 分钟。
4. 把烧瓶从压力锅里拿出来，直到温度降到 45°C。
5. 把琼脂混合物倒进每一个培养皿中，确保底部被完全覆盖，但不要装满或者装一半以上。
6. 迅速盖上培养皿的盖子直到琼脂冷却。一旦琼脂变成固体，就翻成底朝天。

如果你不准备马上就使用琼脂，储存的方法:

1. 采用以上步骤的第 2 和第 3 步，但使用的是一个带盖的无菌玻璃罐。通过琼脂杀菌后，让压力锅减压并把盖子盖在玻璃罐上。琼脂会凝固，可以储存 1 个星期。F
2. 当你需要使用时，把装满琼脂的玻璃罐加热（不要使用开水），直到琼脂融化/温度达到 45 度。
3. 然后采用步骤 5&6.



图 7. 厨房压力锅用于给琼脂和其他器皿消毒。把一个三脚架放在压力锅里并放 2 到 3 厘米的水（水不会触到罐底）。把锡箔纸包着的罐子放在锅中间，压力锅的盖子离罐子至少 2 厘米。



## 结果

[编者注：这篇 ECHO 亚洲文章的初衷是展示 ECHO 亚洲网络采用的定量和比较土壤微生物数量从而评价土壤健康的方法，这是一个更大的实验即自然除草剂对杂草和土壤健康影响的一部分。我们采用这两种实验，是为了观察采用 ECHO 亚洲实验步骤，比较滤纸微生物代理和专业土壤分析试验的 CFU 结果的菌落变化趋势。ECHO 亚洲没有进行严格统计要求的实验重复次数，我们只是想看一看是否资源有限的 NGO 能采用简易的实验步骤和低成本的低用品来判定土壤微生物健康。因此，虽然结果都是一些数字，但是这些应该理解为定性结果不是定量结果；这些结果可以用于与相同的实验条件下的实验比较，但是中间不能穿插多重实验，因为这些结果有我们实验点的环境条件特殊性。我们仍然选择展示这些实验结果是为了在我们网络成员尝试这些方法之前跟他们分享我们掌握的知识。我们也很愿意听到你对这些方法的经验。]

在进行滤纸测试时，我们发现滤纸对放置时间比我们预期的要敏感。因为气候环境和其他土壤变量，腐烂率变化很大。如果你是使用这个方法来指导对照试验或研究的话，我们建议在检测微生物之前，你要埋一些滤纸在你的土壤里并在一个星期的时间里每天分别挖一张纸出来，看看纸被完全分解需要多长时间。你需要有一些东西来测量和比较，如果最后降解程度超过 90%，我们建议缩短填埋的时间。一旦你了解滤纸需要在土壤中埋的时间，你就能进行你的实验了。

我们的实验结果有轻微的矛盾，但是还是展示了土壤中的许多的变化，以及相同或下降的土壤健康下的不同模式。滤纸测试显示接受水、菠萝除草剂或木瓜除草剂喷洒的地方土壤微生物健康都没有明显的变化（表 1）。实验地中间的变化比实验地之间的大，特别是在菠萝除草剂和控制区之间。尽管对于统计学来说样本量太小，但是我们还是观察到采用了木瓜除草剂的实验地的滤纸失去的重量最少，即降解速度比其他实验地要低。这表明土壤微生物数量在使用木瓜除草剂的土地上可能减少得比其他地方多。

处理点	初始重量(克)	最终重量(克)	降解率
M1	1.21	1.06	0.15
M2	1.21	0.96	0.25
M3	1.21	0.72	0.49
P1	1.21	0.15	1.06
P2	1.21	0.87	0.34
P3	1.21	0.56	0.65
C1	1.21	0.83	0.38
C2	1.21	0.41	0.80
C3	1.21	0.52	0.69

表 1. 喷洒木瓜除草剂 (M)、菠萝除草剂 (P) 和水控制点 (C) 的土壤的滤纸测试结果并有 3 次重复。降解率是指初始重量和最终重量的差；降解率一列里数字越大的表示在土壤里有更多的微生物活动。

在 CFU 培养皿实验中，在初始土壤中 CFUs 的变化和菌落计数后的结果一样，很难得出确定的结论。微生物数量在使用菠萝除草剂的土壤里减少，在使用木瓜除草剂和水控制的地方增加（见表 2）。很多文献显示，如果除草剂对土壤微生物有消极影响 CFUs 下降小于  $1.0 \times 10^4$ 。我们认为在木瓜组和控制组的实验中

CFUs 增加可能是因为在实验过程中季风雨到来，导致湿度增加。增加实验的重复次数就能显示是否是因为缺乏重复实验导致的实验点之间变量的巨大差异，或者两种除草剂对土壤微生物健康真的没有什么影响。

处理方式	初始 CFU	最终 CFU	CFU 的变化
M	$5.24 \times 10^5$	$1.28 \times 10^6$	$+ 7.56 \times 10^5$
P	$4.04 \times 10^5$	$3.32 \times 10^4$	$- 7.20 \times 10^4$
C	$4.16 \times 10^5$	$8.4 \times 10^5$	$+ 4.24 \times 10^5$

表 2: 喷洒木瓜除草剂 (M)，菠萝除草剂 (P) 和水 (C) 的土壤的培养皿菌落数量的结果。CFU 的变化是指初始数量和最终数量之差。

## 结果

这些实验应该能帮助你评估你的土壤里微生物的数量。每片土壤的特征不同，微生物数量也就不同。这些测试可以用在土壤投入新东西和进行改良的前后，来评估他们对土壤健康的影响。他们也可以用来对比不同地点的土壤状况，特别是当你觉得某些东西可能对某个地点的微生物造成负面影响的时候。但是，这些测试只能判断是否有影响，他们不能说明是什么因素造成土壤微生物的减少或增加。当然，土壤越健康微生物就越多，就能形成一个更健康的生产系统。

注意：土壤湿度、土壤质地和 pH 的单独测试能在 ECHO 亚洲期刊 15 Marcia Croft 的文章《土壤质量评价：为什么和怎样》[《ECHO Asia Note 15 “Soil Quality Assessment: Why and How” by Marcia Croft.](#)

## 参考文献

Anderson, J. P. E. (1984). Herbicide degradation in soil: influence of microbial biomass. *Soil Biology and Biochemistry*, 16(5), 483-489.

Bünemann, E. K., Schwenke, G. D., & Van Zwieten, L. (2006). Impact of agricultural inputs on soil organisms—a review. *Soil Research*, 44(4), 379-406.

Hassink, J., Bouwman, L. A., Zwart, K. B., & Brussaard, L. (1993). Relationships between habitable pore space, soil biota and mineralization rates in grassland soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 25(1), 47-55.

Hayat, R., Ali, S., Amara, U., Khalid, R., & Ahmed, I. (2010). Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Annals of Microbiology*, 60(4), 579-598.

- Lauber, C. L., Hamady, M., Knight, R., & Fierer, N. (2009). Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(15), 5111-5120.
- Mendes, R., Kruijt, M., de Bruijn, I., Dekkers, E., van der Voort, M., Schneider, J. H., Piceno, Y.M., DeSantis, T.Z., Anderson, G.L., Bakker, P.A.H.M & Raaijmakers, J. M. (2011). Deciphering the rhizosphere microbiome for disease-suppressive bacteria. *Science*, 332(6033), 1097-1100.
- Nicol, G. W., Leininger, S., Schleper, C., & Prosser, J. I. (2008). The influence of soil pH on the diversity, abundance and transcriptional activity of ammonia oxidizing archaea and bacteria. *Environmental Microbiology*, 10(11), 2966-2978.
- Noll, M., Matthias, D., Frenzel, P., Derakshani, M., & Liesack, W. (2005). Succession of bacterial community structure and diversity in a paddy soil oxygen gradient. *Environmental Microbiology*, 7(3), 382-395.
- Rao, N. S. S. (1995). *Soil Microorganisms and Plant Growth* (No. Ed. 3). Science Publishers, Inc.
- Rietz, D. N., & Haynes, R. J. (2003). Effects of irrigation-induced salinity and sodicity on soil microbial activity. *Soil Biology and Biochemistry*, 35(6), 845-854.
- Schnürer, J., Clarholm, M., Boström, S., & Rosswall, T. (1986). Effects of moisture on soil microorganisms and nematodes: a field experiment. *Microbial Ecology*, 12(2), 217-230.
- Tisdall, J. M. (1994). Possible role of soil microorganisms in aggregation in soils. *Plant and Soil*, 159(1), 115-121.
- Tourna, M., Freitag, T. E., Nicol, G. W., & Prosser, J. I. (2008). Growth, activity and temperature responses of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in soil microcosms. *Environmental Microbiology*, 10(5), 1357-1364.
- Van Bruggen, A. H. C., and A. M. Semenov (2000). In search of biological indicators for soil health and disease suppression. *Applied Soil Ecology* 15 (1), 13-24.

