الدرس العملى الخامس

تقدير أعداد بعض المجاميع الميكروبية الهامة بالتربة بإستخدام طريقة العد بالأطباق والبيئات المستخدمة

١ - تقدير الأعداد الكلية للبكتيريا فى عينة التربة بإستخدام بيئة الأجار المغذى (آلن ١٩٥٩)

تعتبر البكتريا أكثر المجاميع الميكروبية تواجدا في التربة إذا ما قورنت بغيرها من المجاميع الاخري كما أنها تعتبر أكثر هذه المجاميع نشاطا وأهميه من حيث قدرتها علي إحداث التغيرات البيولوجيه التي تحدث في التربة خاصة المتعادلة ، وتتخذ أعداد البكتريا الكلية في التربة دليلا علي خصوبتها وارتفاع محتواها من المواد العضوية . ويمكن تقدير العدد البكتيري الكلي في التربة كما يلي :

الأدوات والمواد المطلوبة :

أطباق بتري معقمه – ماصات سعه ١٠ مل و١مل معقمة – زجاجات التخفيفات والتي تحتوي كل منها علي ٩٠ مل ماء حنفية معقم أو محلول فسيولوجي معقم – حمام مائي – عينة التربة الخصبة المراد عد الميكروبات بها – بيئة الاجار المغذي وتتركب من : (٥جم ببتون – ٣جم مستخلص لحم – لتر ماء حنفية – درجة ال P H من ٧- ٧.٢).

طريقة العمل

١- تقدير الرطوبة في عينه التربة حتى يمكن حساب النتائج علي أساس الوزن الجاف .
٢- يتم عمل التخفيفات العشرية المتسلسلة بالطريقة المعتادة .
٣- نتخير التخفيفات المناسبة (حسب نوع التربة موضع الدراسة) لتلقيح أطباق بتري المعقمة وذلك بنقل ما مقدار ١ سم٣ إلي كل طبق باستخدام مادة ماصة معقمة ويكتب علي كل طبق التخفيف المستخدم مع مراعاة استخدام ٣ أطباق علي الأقل لكل تخفيف (٣ مكررات لكل تخفيف) .
٤- يتم تسييح البيئة علي الحمام المائي ثم تبرد الي ٤٥-٥٠ °ثم تصب في الاطباق الملحقة بالكميات المناسبة تحت شروط التعقيم ثم تحرك الأطباق حركة رحوية حتى تمتزج البيئة مع معلق التربة المخفف وتترك الأطباق بعد ذلك لفترة حتى يتجمد الاجار .
٥- تحضن الأطباق في لمدة أسبوع في الحضان علي درجة حرارة ٢٢-٢٥ م وهي الدرجة المناسبة لنمو معظم بكتريا التربة .
٦- بعد فتره التحضين يتم عد المستعمرات النامية علي سطح الاجار في الأطباق مع استبعاد الأطباق التي تحتوي علي أكثر من ٣٠٠ أو أقل من ٣٠ مستعمره منتشرة وتنسب الأعداد لكل واحد جرام وزن جاف تماما (عدد الوحدات المكونة للمستعمرات c f u / ١ جم وزن جاف تماما من التربة).

كيفية تجهيز بيئة الأجار المغذى

زن كل مكون من مكونات البيئة

أضف الأجار والماء إلى البيئة

سيح الأجار ثم وزع البيئة فى دوراق مخروطية أو زجاجات عادية

ضع البيئة فى الأوتوكلاف ثم إقفله لإجراء التعقيم

صب البيئة فى الأطباق بعد تعقيمها

ملحوظة :

يمكن بيئه آجار مستجلص التربة لتقدير أعداد البكتريا الكلية في التربة حيث مستخلص التربة علي املاح معدنية ومواد عضويه وعوامل نمو مختلفة . وعموما فهذه البيئة تتركب من آجار آجار ١٥ جم ، جلوكوز ١ جرام فوسفات بوتاسيوم ثنائية الايدروجين ٠.٥ جرام ، مستخلص تربة ١٠٠سم٣ ،ماء حنفية ٩٠٠سم٣ ، درجة PH 6.8-7 .

تحضير مستخلص التربة :

يتم تحضير مستخلص التربة لتر ماء حنفية إلي كيلو جرام تربة خصبة ويسخن في الاتوكلاف لمدة نصف ساعة ، ثم يرشح المعلق خلال قطن طبي ، ثم في مرشح بوخنر باستعمال ورقة ترشيح بعد إضافة كمية صغيره من كوبونات الكالسيوم ويكرر الترشيح حتى نحصل علي راشح رائق ثم يعبا في زجاجات ويحفظ في الثلاجة .

نتيجة عد ميكروبات التربة بطريقة الأطباق

إفحص الأطباق فحصاً جيداً مستبعداً الأطباق التي تحتوي علي أعداد أقل
من ٣٠ مستعمرة وتلك التي تزيد عن ٣٠٠ مستعمرة

٢ - تقدير أعداد البكتيريا المكونة للجراثيم فى عينة التربة

تحت ظروف درجه الحرارة العالية تسود البكتريا المكونة للجراثيم في التربة وقد لوحظ ذلك في الأراضي المصرية في فصل الصيف حيث لوحظ تواجد أفراد جنس Bacillus المتجرثمة بنسبة عالية قد تصل إلي ٤٠% في بعض الأراضي بينما تقل النسبة عن ذلك بكثير تحت ظروف الحرارة العادية ... وعموما فعند الرغبة في عزل البكتريا المتجرثمة وتقدير أعدادها في التربة يمكن استخدام نفس البيئة السابقة (بيئة آجار المغذي) واستخدام نفس الخطوات السابقة مع بسترة التخفيفات قبل استخدامها في تلقيح الأطباق وذلك بوضعها في حمام مائي علي درجة حرارة ٨٠° لمدة١٥ دقيقة حيث أن الدرجة في هذه المدة تكون كافيه للقضاء علي كل الخلايا الخضرية من البكتريا غير المتجرثمة ولا يتبقى سوي البكتريا المتجرثمة والتي يمكن إجراء عدها بطريقة الأطباق .

طبق يحتوى على مستعمرات ***Bacillus***

Bacillus subtilis

٣- عد وعزل فطريات التربة باستخدام بيئة آجار الروزبنجال (مارتن ١٩٥٠)

تمثل الفطريات الجزء الأكبر من الكتلة البرتوبلازمية في التربة – رغم تضاءل أعدادها عن أعداد البكتريا – وذلك نظرا لكبر حجم هيفاتها ومن ناحية فان الفطريات تلعب دورا هاما في التربة حيث يكون مسيليوم الفطريات شبكة تتخلل حبيبات التربة مما يجعل لها دورا أساسيا في تكوين الدبال . ومن ناحية أخري فان سيادة الفطريات في التربة تتأثر بالكثير من العوامل والتي من أهمها حموضة التربة وكذلك درجتي الحرارة والرطوبة بالإضافة إلي التهوية كما توجد علاقة طردية بين أعداد الفطريات في التربة ومحتوي التربة من المادة العضوية . وعموما يمكن تقدير أعداد الفطريات في التربة باستخدام بيئة مارتن حيث يتم ذلك علي النحو التالي .

الأدوات والمواد اللازمة:

زجاجات العينات والتي تحتوي كل منها علي ٩٠ سم٣ من ماء الحنفية معقم أو محلول ملح فسيولوجي معقم .
أطباق بتري معقمة .
ماصات معقمة سعة ١٠سم٣ ، سعة ١ سم٣ .
شرائح زجاجية وأغطية شرائح.
ستربتوميسين سلفات في صورة محلول مائي يضاف بمعدل ٠.٠٣جرام / لتر كمضاد للبكتريا .
محلول اللاكتوفينول .
عينة من التربة .
بيئة مارتن وتتركب من (جرام / لتر ماء مقطر) : جلوكوز ١٠ جرام ، فوسفات بوتاسيوم ثنائي القاعدية ١ جم ، ببتون٥ جرام ، كبريتات ماغنسوم مائية ٠.٥ جرام ،آجار آجار ٢٠ جرام.

طريقة العمل :

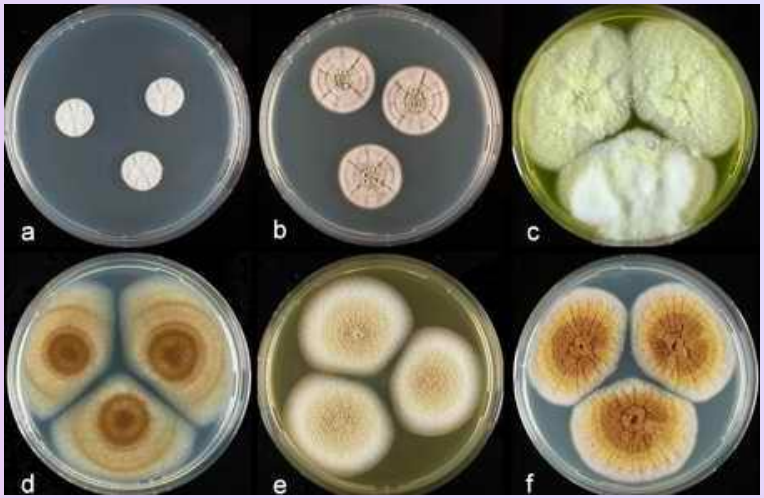
١- قدر الرطوبة فى العينة حتى يتسنى حساب النتائج على أساس الوزن الجاف

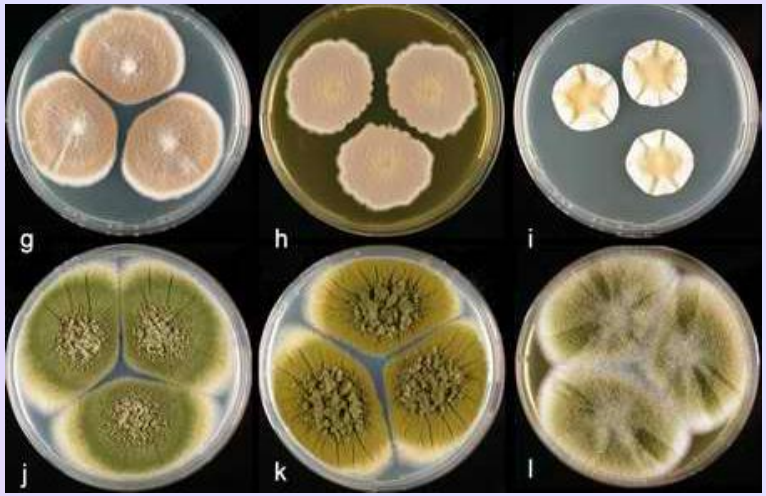
٢- إعمل تخفيفات التربة بالطريقة المعتادة.

٣- إختر التخفيفات المناسبة ولقح ٣ أطباق بترى من كل تخفيف وذلك بمعدل ١ سم٣ لكل طبق.

٤- سيح البيئة على حمام مائى ثم برد إلى ٥٠°م وأضف إليها الأستربتوميسين سلفات ، ثم صبها فى الأطباق الملقحة بالكميات المناسبة مع تحريك الأطباق حركة رحوية لمزج البيئة مع معلق تخفيف التربة ، ثم أترك الأطباق لفترة مناسبة حتى يتجمد الأجار.

- ٥- حضن الأطباق مقلوبة على درجة الحرارة المناسبة (٢٥°م) لمدة ٧ أيام، وبعد التحضين قدر عدد المستعمرات النامية على الأطباق ومنها قدر العدد الكلى للفطريات لكل جرام تربة محسوبة على أساس الوزن الجاف.
- ٦- يمكن عزل بعض هذه المجاميع وفحصها ميكروسكوبياً بإستعمال محلول اللاكتوفينول ووضع غطاء الشريحة عليها ويتم الفحص بإستعمال العدسة الصغرى ثم الكبرى.





أشكال نمو الفطريات المختلفة على المزارع المائلة

Cryptococcus neoformans

Trichophyton tonsurans

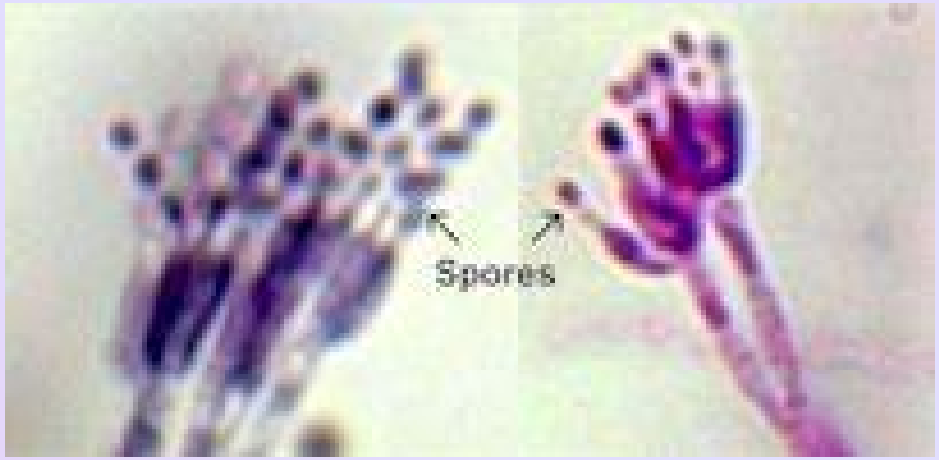
Wangiella dermatitidis

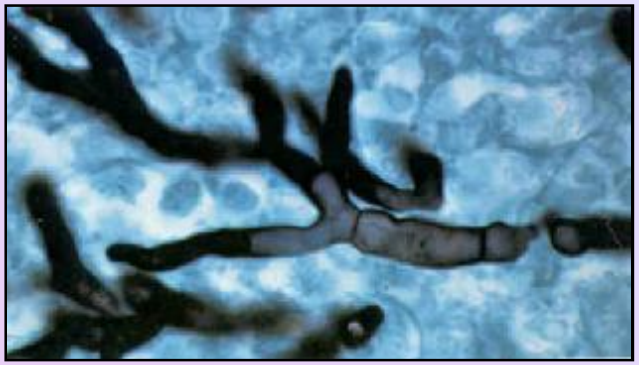
Candida albicans

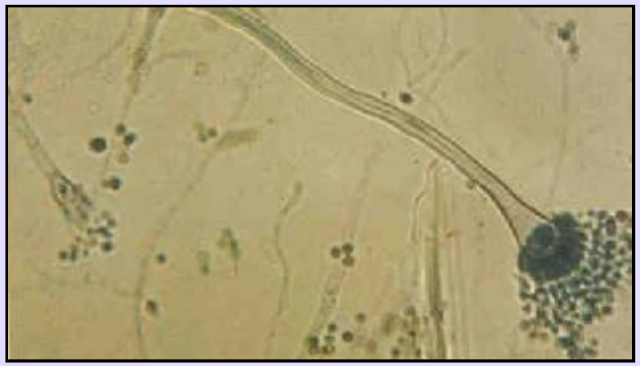
T. menta-grophytes

Aspergillus fumigatus

أشكال الفطريات المختلفة تحت الميكروسكوب







طريقة تجهيز بيئة PDA المستخدمة لتنمية الفطريات

١- زن ٢٠٠ جرام بطاطس .

٢- قطع البطاطس إلى قطع صغيرة

٣- اسلق البطاطس فى لتر من الماء

٤- رشح ناتج السلق بواسطة الشاش للحصول على الراشح

١- عبأ الراشح فى زجاجات أو دوارق مخروطية .

٢- أضف الأجار الأجار بنسبة ٢٠ %

٣- سد الزجاجات بسدادات قطنية

٤- عقم فى الأوتوكلاف

طريقة التلقيح تحت شروط التعقيم

٤ - عد وعزل الأكتينوميسيتات فى التربة باستخدام بيئة آجار النشا والكازين (كوستر ووليامز ١٩٩٦)

تنتشر ألاكتينوميسيتات انتشارا واسعا في التربة الزراعية وتلعب دورا هاما في خصوبتها حيث تتميز بقدرتها العالية علي تحليل المواد العضويه المعقدة في التربة وتحويلها إلي مواد بسيطة صالحة لامتصاص النبات كما تتميز بقدرتها علي إنتاج مضادات حيوية والتي تلعب دورا هاما في التوازن الميكروبي في التربة كما تقوم ألاكتينوميسيتات بمشاركه الفطريات في تحسين تهوية التربة عن طريق تجميع حبيباتها بواسطة هيفاتها مما يزيد من خصوبتها . وقد تمكن كل من كوستر ووليامز من عد ألاكتينوميسيتات في عينه التربة الخصبة باستخدام بيئة آجار النشا والكازين علي النحو التالي :

خطوات العمل :-

١- تقدر الرطوبة في العينة حتى يتسنى حساب النتائج علي أساس الوزن الجاف تماما .

٢- يتم عمل سلسلة التخفيفات العشرية للتربة كالمعتاد .

٣- تختار التخفيفات المناسبة (ثلاثية تخفيفات) ويتم تلقيح ثلاثة أطباق من كل تخفيف وذلك بمعدل ١ ملل لكل طبق .

٤- يتم تسييح البيئة المعقمة علي حمام مائي ثم تبرد إلي ٤٥-٥٠ ° ثم يضاف إليها المضاد الحيوي بعد تعقيمه منفصلا بالمعدل السابق ثم تصب البيئة تحت ظروف التعقيم في الأطباق الملقحة بالكمية المناسبة مع تحريك الأطباق حركه رحويه لمزج البيئة مع معلق تخفيف التربة ثم تترك الأطباق لفترة مناسبة حتى يتجمد الآجار .

٥- تحضن الأطباق مقلوبة علي درجة حرارة ٢٨ – ٣٠ ° لمدة١٠ أيام ثم تقدر أعداد المستعمرات النامية في الأطباق بعد فتره التحضين ومنها يمكن تقدير العدد الكلي للاكتينوميسيتات / ١ جم وزن جاف تماما من التربة .

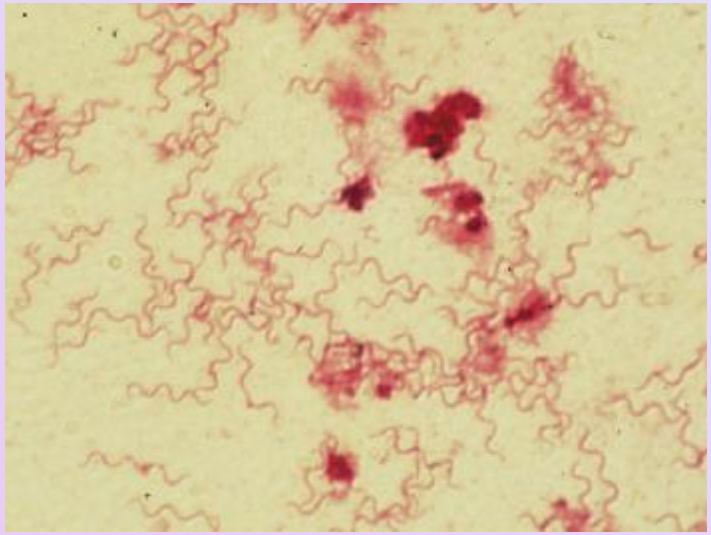
٦- يمكن عزل بعض الاكتينوميسيتات من مستعمرات العد في صورة مزارع مائلة واختبار نقاوتها لاختبار التعريف المختلفة .

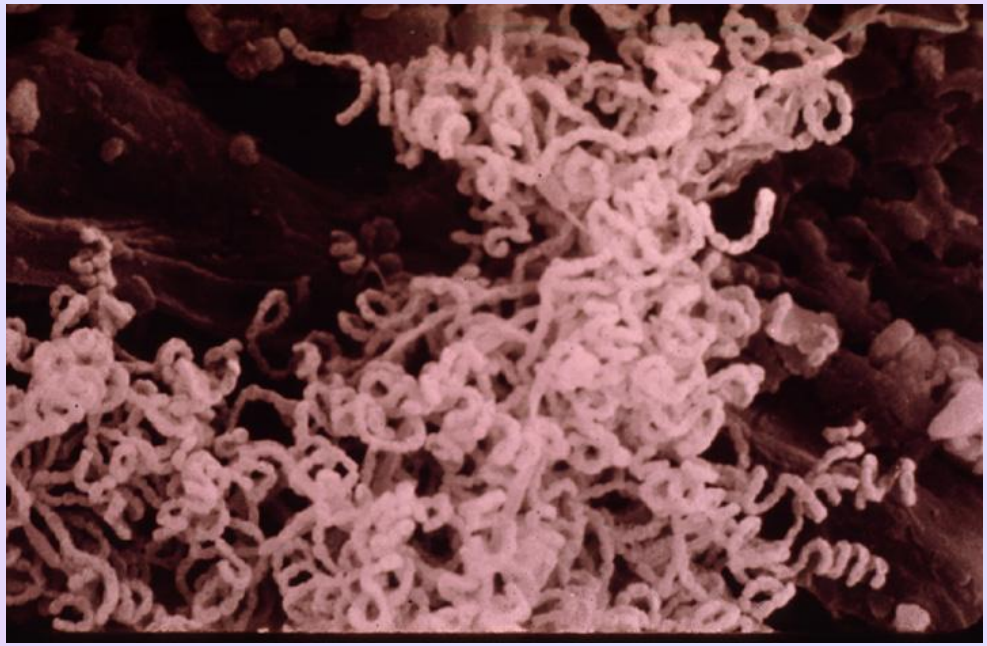
الأدوات والمواد المستخدمة:

١- عينة من التربة .
٢- ماصات معقمة سعة ١,١٠ ملل.
٣- أطباق بتري معقمه.
٤- زجاجات العينات والتي تحتوي كل منها علي ٩٠ ملل ماء حنفية معقم أو محلول ملح فسيولوجي معقم .
٥- محلول من المضاد الفطري أكتوديون أو النستاتين ذائبا في الداي ميثيل سلفوكسيد ويضاف بمعدل ٠.٠٥ جرام/ لتر
٦- بيئة آجار النشار والكازين وتتركب من (نشا ١ جرام، كازين٠.٣ جرام (يذاب في ١٠ ملل ١.٠ عياري من الصودا الكاوية قبل خلطة بمكونات البيئة) ،ونترات بوتاسيوم ٢ جرام ، كلوريد صوديوم ٢ جرام ،فوسفات بوتاسيوم ثنائي القاعدية ٢ جرام ، كبريتات ماغنسيوم مائية ٠.٠٥ جرام ،كربونات كالسيوم ٠.٠٢ جرام ، كبريتات حديدوز مائية ٠.٠١ جرام ، آجار آجار ٢٠ جرام ph 7.2 ،لتر ماء مقطر).

طبق يحتوى على
مستعمرات
للأكتينوميستات

Nocardia





Streptomyces

٥- عد وعزل البكتيريا المذيبة للفوسفات المعدنية فى التربة باستخدام بيئة كاتز نلسون وبوث ١٩٥٩

تلعب الكثير من أنواع البكتريا دورا هاما في إذابة الفوسفات المعدنية غير الذائبة في التربة وتحويلها من الصورة غير الصالحة لامتصاص النبات إلي صورة ميسرة يمكن أن يستفيد منها النبات . ونظرا لتقدير مدي سيادتها في الأراضي المختلفة ومدي امكانيه عزلها في صورة مزارع نقية واستخدامها في صورة لقاح بكتري يمكن اضافتة للتربة لزيارة صلاحية الفوسفات بها وقد أمكن باستخدام بيئة الاسبارجين ومستخلص الخميره (كاتز نلسون وبوث) عد وعزل هذه الأنواع من البكتريا كما يلي:

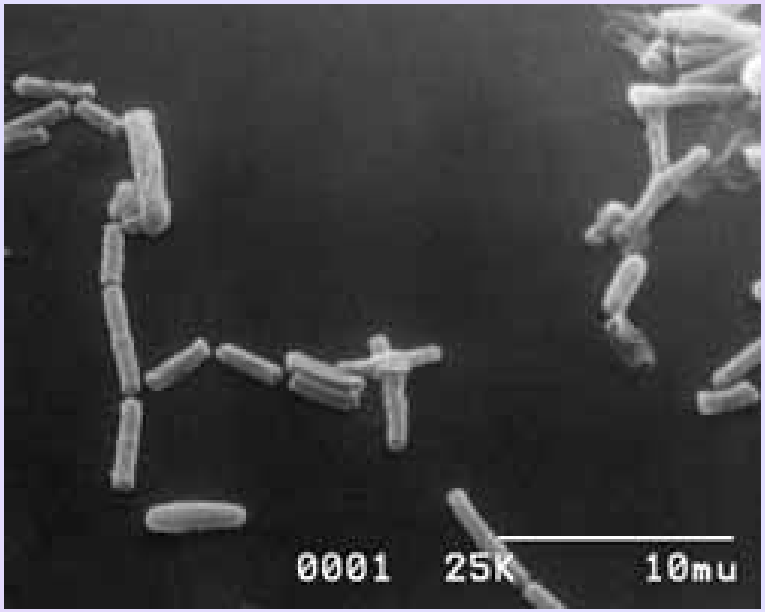
الأدوات والمواد المطلوبة :

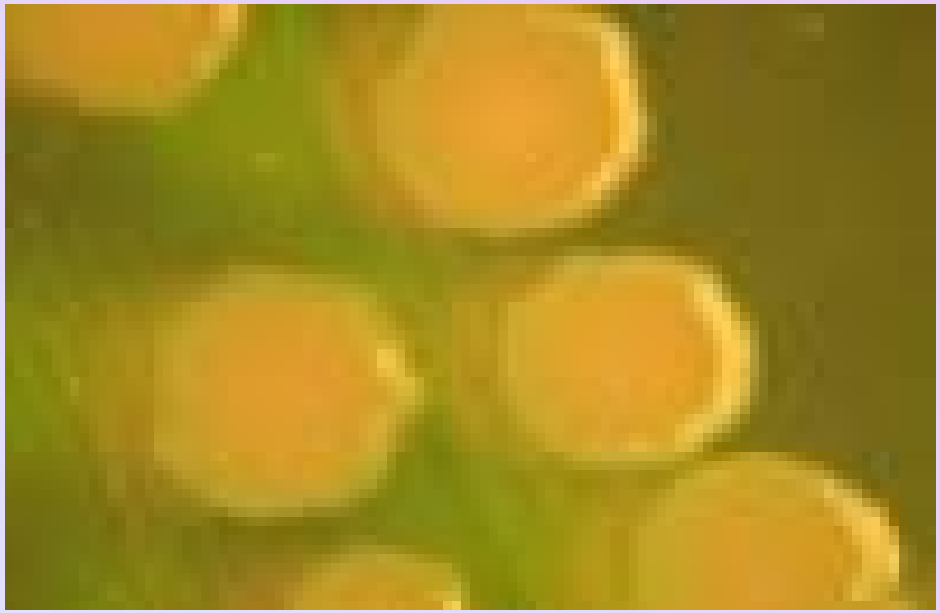
١- أطباق بتري معقمه.
٢- ماصات معقمة سعة ١٠,١ ملل.
٣- حمام مائي .
٤- عينة من التربة .
٥- زجاجات التخفيفات والتي تحتوي كل منها علي ٩٠ ملل ماء حنفية معقم أو محلول ملح فسيولوجي معقم .
٦- دوارق تحتوي كل منها علي ١٠٠ ملل من بيئة آجار الاسبارجين ومستخلص الخميرة (كاتزنلسون وبوث) والتي تتركب من الأتي :-
(الجلوكوز ١٠ جرام ،أسبارجين ٢ جرام ، كبريتات ما غنسيوم مائية ٠.٥ جرام ، كلوريد صوديوم ٠.١ جرام ، كلوريد بوياسيوم ٠.١ جرام مستخلص خميرة ٠.٥ جرام ، آجار آجار ٢٠ جرام ٢٠ جرام ، ١ لتر ماء)
٧- محلول صودا كاوية NaOH عياري معقم .
٨- محلول ١٠ % معقم من فوسفات البوتاسيوم ثنائية القاعديه .
٩- محلول ١٠ % معقم من كلوريد الكالسيوم ،

خطوات العمل :

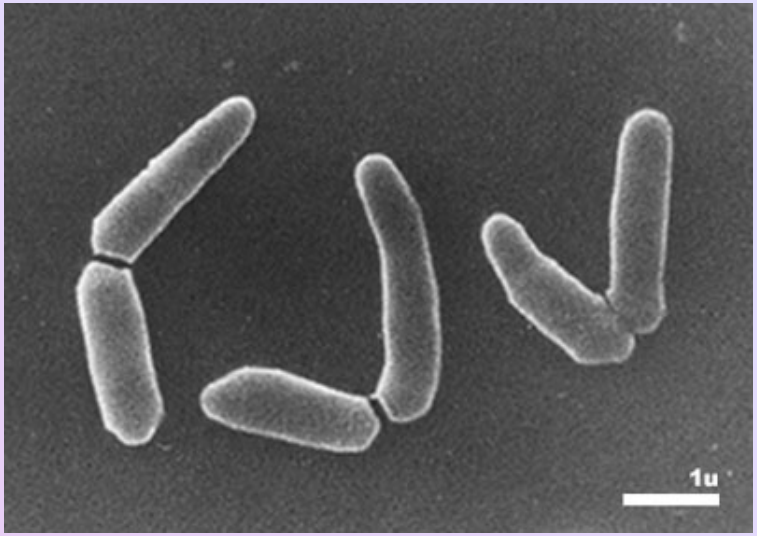
١- تقدر الطوبة في عينة التربة لحساب الاعداد علي اساس الوزن الجاف .
٢- يتم عمل سلسلة التخفيفات العشرية كالمعتاد ويتم اخيار ثلاثة تخفيفات مناسبه حسب نوع التربة المستخدمة .
٣- يتم تلقيح ثلاثه اطباق بتري معقمة من كل تخفيف من اليخفيفات الثلاثة المختارة وذلك عن طريق نقل ١ ملل لقاح الي كل طبق بواسطة ماصة معقمة.
٤- تسييح البيئة التي سبق تعقيمها ثم تبرد الي ٥٠° ويضاف لكل دورق يحتوي علي ١٠٠ ملل بيئة ٥ ملل من محلول فوسفات البوتاسيوم المعقم وكذلك ١٠ ملل من محلول كلوريد الكالسيوم المعقم لتكوين راسب من فوسفات الكالسيوم الثنائي .ثم يتم ضبط الـpH لكل دورق عند درجة ٧ باستخدام محلول الصودا الكاوية المعقم ثم تصب البيئة في الأطباق الملقحة وبسرعة مباشرة وبسرعة وتحرك الأطباق رحويا لامتزاج البيئة مع الملعق البكتيري ثم تترك الأطباق لفترة حتي يتصلب الآجار .

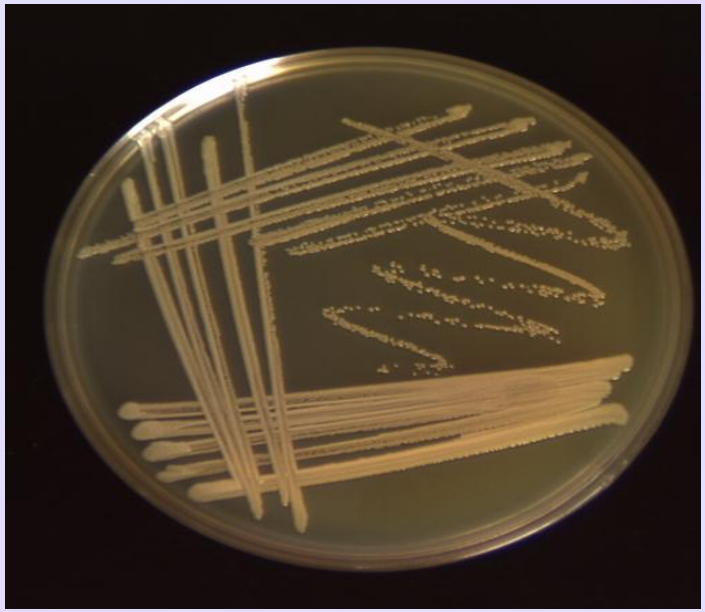
٥- تحضن الأطباق مقلوبة علي درجة ٢٨ ° م لمدة ٧ أيام .
٦- بعد فترة التحضين تسجل أعداد المستعمرات المكونة لهالات رائقة حول النمو كدليل علي إذابة الفوسفات غير الذائبة والمترسبة في البيئة ثم تنسب الأعداد لكل ١ جرام وزن جاف من التربة المختبرة .
٧- لعزل البكتريا المذيبة للفوسفات تلتقط المستعمرات المتباينة والمكونة لهالة حولها من أطباق العد وتنقل إلي أنابيب الآجار المائل ثم تنقي بطريقة الاطباق المصبوبة وبعد التاكد من نقاوتها يعاد اختبار قدرتها علي اذابة الفوسفات باعادة تنميتها علي نفس البيئة السلبقة وملاحظة الهالات الرائقة حول النمو ثم تخضع بعد ذلك لاختبارات التعريف.





Bacillus megaterium





Arthrobacter

٦ - تقدير أعداد البكتيريا الممعدنة للفوسفات العضوية فى التربة باستخدام بيئة مينيكا المعدلة

تتعدد الصور العضوية للفسفور في التربة والتي تشمل الاحماض النووية والفوسفوليبيدات والفيتين والليسيثين والسكريات المفسفرة والمرافقات الانزيمية وفوسفات الادينوسين الثنائية والثلاثية وتعتبر هذه المركبات غير صالحة لامتصاص النبات إلا في وجود أنواع من البكتريا القدرة علي معدنتها عن طريق ما تفرزة هذه البكتريا من انزيمات الفوسفاتيز والتي تحول هذه المركبات العضوية إلي مركبات معدنية ذائبة يسها علي النبايات امتصاصها . ولقد وجد أن هذه الأنواع من البكتريا كثيرة الانتشار في التربة خاصة في منطقة الرايزوسفير حول جذور النباتات وقد أمكن تقدير أعداد هذه الميكروبات في التربة للوقوف علي مدي انتشارها كما أمكن عزل أنواع من هذه البكتريا في صورة مزارع نقية وقد تم ذلك كما يلي :

الأدوات والمواد المطلوبة :

١- أطباق بتري معقمة .
٢- ماصات معقمة سعة ١٠ملل ، ١ ملل.
٣- حمام مائي .
٤- زجاجات العينات المحتوية علي ٩٠ ملل ماء حنفية معقم أو محلول ملح فسيولوجي معقم.
٥- عينة تربة .
٦- بيئة مينيكا المعدلة Menkina s medium وتتركب من :
(جلوكوز ١٠ جرام، كبريتات أمنيوم ٠.٥ جرام ، كلوريد بوتاسيوم ٠.٣ جرام ، كلوريد صوديوم ٠.٣ جرام ، كبريتات ماغنسيوم مائية ٠.٣ جرام، كبريتات حديدوز مائية وكبريتات منجنيز أثار ، كربونات كالسييوم ٠.٥ جرام ، آجار آجار ٢٠ جرام ، لتر ماء ، درجة PH 7- 7.5) ويضاف الفسفور العضوي إلي البيئة المعقمة والمبردة في صورة محلول كحولي من الحمض النووي (R N A) بمعدل ٥٠ جرام / لتر بيئة.

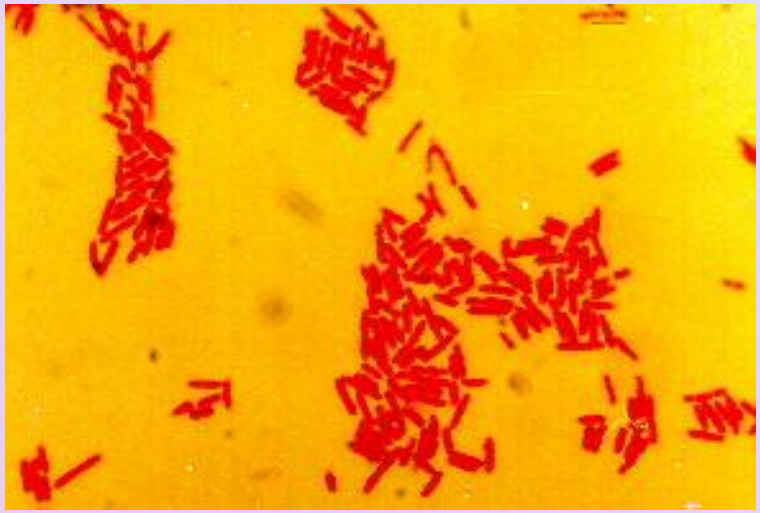
طريقة العمل :-

١- تقدر نسبه الرطوبة في عينة التربة لتحسب الأعداد علي أساس الوزن الجاف تماما.
٢- تجري سلسلة التخفيفات العشرية بالطريقة المعتادة .
٣- يتم اختيار ثلاثة من التخفيفات المناسبة لعينة التربة وتلقح ثلاثة أطباق معقمة من كل تخفيف بنقل ١ ملل من اللقاح إلي كل طبق .
٤- تسييح البيئة علي حمام مائي ثم تبرد إلي ٤٥-٥٠ ° م ثم يضاف إليها مصدر الفسفور العضوي بالطريقة المشار إليها سابقا ثم تصب البيئة مباشرة في الأطباق حركة رحوية ليمتزج اللقاح مع مكونات البيئة ثم تترك الأطباق مدة حتى يتجمد الآجار

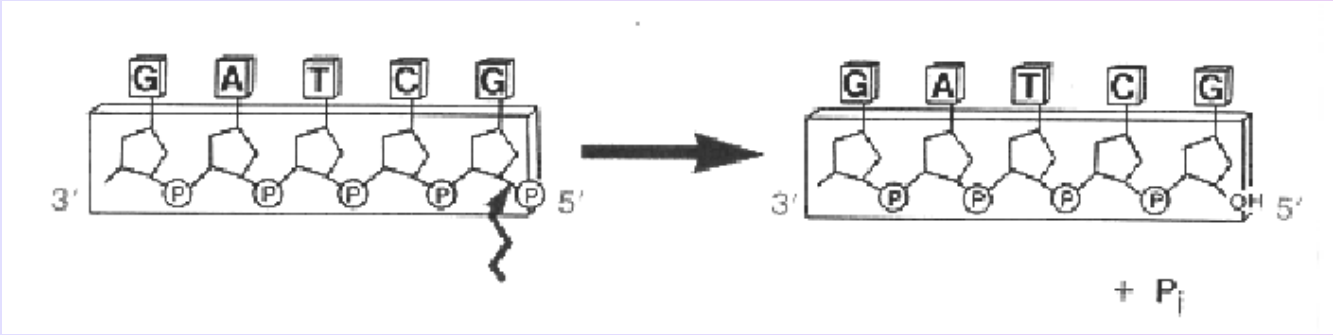
٥- توضع الاطباق في الحضان مقلوبة علي درجة حرارة ٣٠° لمدة ١٠ أيام وبعدها يتم عد المستعمرات المحاطة بهالة رائقة والتي تعتبر محللة للفوسفات العضوية ثم تنسب الأعداد للوزن الجاف من التربة .

٦- يمكن عزل المستعمرات المكونة للهالات الرائقة الكبيرة وتنميتها علي نفس البيئة لنحصل علي مزارع مائلة من البكتريا المعدنة للفوسفات العضوية ثم نختبر نقاوتها ومدي قدرتها علي المعدنة بتنميتها علي نفس البيئة وبعد التاكد من كفاءتها وتمام نقاوتها تخضع لاختبارات التعريف المختلفة.

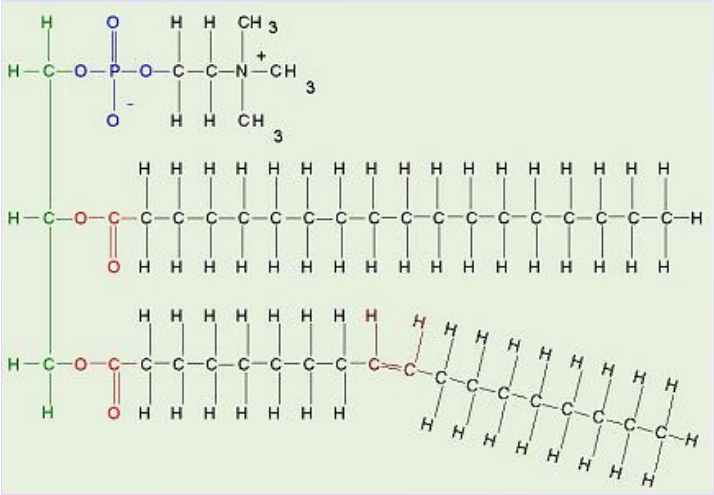
من الميكروبات القادرة على تحليل الليسيثين ***Pesudomonas***



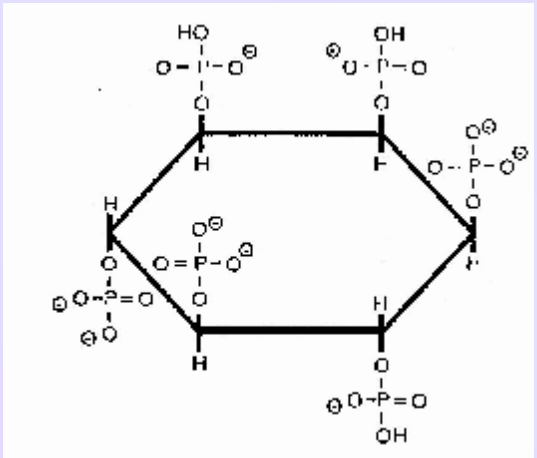
Pesudomonas



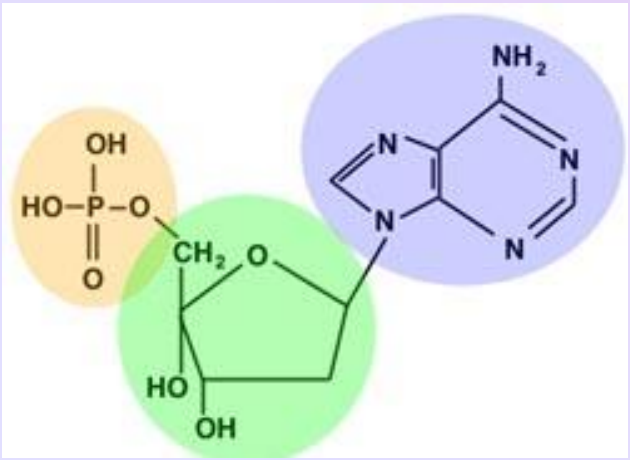
عمل إنزيم الفوسفاتيز



الليسيثين



حمض الفيتيك



قاعدة نيتروجينية

٧- تقدير أعداد البكتيريا المنتجة للأحماض العضوية فى التربة باستخدام بيئة بونت ورويفرا المعدلة (عبد الحافظ ١٩٦٦)

تستطيع الكثير من البكتريا إنتاج العديد من البكتريا إنتاج العديد من الأحماض خلال عمليات التمثيل الغذائي التي تقوم بها وتعتبر هذه الأحماض العضوية الناتجة ذات أهمية كبيرة في إذابة الكثير من العناصر الموجودة في التربة وأهمها الفوسفور وتحويلها من الصورة غير الصالحة للامتصاص إلي صورة ميسرة تستطيع النباتات الاستفادة منها . وقد أمكن تقدير أعداد هذه البكتريا المنتجة للأحماض باستعمال بيئة بونت وريفيرا كما يلي :

الأدوات والخامات المستخدمة :-

١- أطباق بتري معقمة .

٢- ماصات معقمة سعة ١٠ملل ، ١ ملل.

٣- عينة تربة موضع الدراسة.

٤- زجاجات العينات المحتوية علي ٩٠ ملل ماء حنفية معقم أو محلول ملح فسيولوجي معقم.

٥- حمام مائي .

٦- بيئة بونت وريفيرا المعدلة (عبد الحافظ ١٩٦٦) وتتكون من الأتي :-

(جلوكوز ٥ جرام ، ببتون ١ جرام ، مستخلص خميرة ١ جرام ، فوسفات بوتاسيوم ثنائية القاعدة ٠.٤ جرام، كبريتات أمنيوم ٠.٥ جرام ، كبريتات ماغنسيوم مائية ٠.٥ جرام، كلوريد ماغنسيوم ٠.٠١ جرام ، كلوريد حديديك ٠.٠١ جرام ، كلوريد كالسيوم ٠.١ جرام ، مستجلص تربة خصبة ٢٥٠ ملل ، ماء حنفية ٧٥٠ ملل ، آجار آجار ٢٠ جرام ، درجة الـPH 6.8 .

ملحوظة:-

يتم استبدال ، فوسفات بوتاسيوم ثنائية القاعدة باضافة كلوريد البوتاسيوم بنفس المعدل .

طريقة العمل :-

١- تقدر نسبه الرطوبة في عينة التربة موضع الدراسة ليتسني حساب النتائج علي أساس الوزن الجاف تماما.

٢- تجري سلسلة التخفيفات ويختار منها ثلاثة تخفيفات مناسبة حسب نوع التربة .

٣- تلقح ثلاثة أطباق بتري معقمة من كل تخفيف بواقع ١ سم٣ لكل طبق .

٤- تسييح البيئة علي حمام مائي ثم تبرد إلي ٤٥-٥٠° وتصب في الطباق الملقحة بواقع حوالي ١٠-١٥ ملل في كل طبق بتري ثم تحرك الأطباق حركة رحوية لمزج اللقاح مع البيئة ثم تترك الأطباق ليتصلب الآجار ثم تحضن مقلوبة علي درجة ٢٨- ٣٠ ° م لمدة ٤ أيام.

٥- تعد المجاميع النامية علي كل طبق خاصة تلك التي تحاط بهالة رائقة (المذيبة للفوسفات) ثم تحسب الأعداد لكل جرام وزن جاف تماما من التربة.

يمكن عزل بعض المجاميع ذات الكفاءة العالية في التحليل علي نفس البيئة في صورة مزارع مائلة وتنقي ويعاد اختبار كفاءتها في التحليل ثم تخضع لاختبارات التعريف المختلفة.

يوضح الجدول التالى أعداد البكتيريا والأكتينوميستات والفطريات والخمائر والطحالب الموجودة فى ١ جرام تربة خصبة

	تتراوح أعداد الميكروبات بين	
البكتيريا	٣.٠٠٠.٠٠٠	٥٠٠.٠٠٠.٠٠٠
الأكتينوميستات	١.٠٠٠.٠٠٠	٢٠.٠٠٠.٠٠٠
الفطريات	٥.٠٠٠	١.٠٠٠.٠٠٠
الخمائر	١.٠٠٠	١٠٠.٠٠٠
الطحالب	١.٠٠٠	٥٠٠.٠٠٠

المراجع :

http://mac122.icu.ac.jp/gen-ed/ecosystems.html
http://www.anselm.edu/homepage/jpitocch/genbio/slidesother/microscopelab.html
http://www.blogger.com/profile/2678930
www.cat.cc.md.us/.../ labmanua/lab7/endobmmg.html
http://www.mbio.ncsu.edu/JWB/MB409/lab/Bacillus/isolation.html
http://www.statlab.iastate.edu/survey/SQI/SoilBiology/bacteria.htm
http://www.cbs.knaw.nl/cbs_home/cbs_home.html?http://www.cbs.knaw.nl/publications/Aspergillus.htm~main
http://www.wou.edu/las/natsci_math/biology/boomer/Bio331/microlab/projects/websitesspring2002/nitroweb02/AzotobacterPage.html
http://www.wam.umd.edu/~asmith/natjov/Results.html
http://medinfo.ufl.edu/year2/mmid/bms5300/bugs/closper.html
http://visualsunlimited.com/results.jsp
http://www.lf2.cuni.cz/Projekty/interna/heart_sounds/h13/infdisedu.html