

RECEPTÁŘ PŮD

Receptář je sestaven tak, že jako první jsou uvedeny půdy obecné a půdy pro kultivaci enterobakteriaceí (1—34), zpracované PhMr J. Mottlem. Další půdy jsou vyňaty z kapitol speciální části a jsou seřazeny podle jejich pořadí.

Půdy pro testování antibiotik a sulfamidů jsou v příslušné kapitole (viz str. 152), rovněž tak předpisy na substráty, užívané v precipitaci v gelu.

RECEPTÁŘ

Bujon	1
maso	500 g
pepton	10 g
natrium chloratum NaCl	5 g
voda	1000 ml

Maso, pečlivě zbavené tuku, šlach a kostí, rozemeleme a přidáme vodu (1 : 2). Přes noc necháme macerovat v lednici. Druhý den maso za občasného míchání asi 30 min. povaříme. Odpařené množství vody musíme dolitím nahradit. Odvar z masa sceďme přes plátěnou tkaninu a zbylé maso mírným tlakem vymačkáme. Takto získané dekoktum dáme opět přes noc do lednice. Příštího dne odvar zfiltrujeme přes vatou a k 1000 ml filtrátu přidáme 10 g peptonu a 5 g soli. Krátce povaříme a po rozpuštění přidaných ingrediencí upravíme pH na 7,2. Var udržujeme ještě asi 30 min., po odstavení necháme bujon asi 20 min. v klidu ustát a potom jej opatrně zfiltrujeme přes papír tak, abychom u dna usazený sediment nezvířili a filtraci tak nezpomalili. Zfiltrovaný bujon rozplníme do zásobních lahví a vysterilisueme 30 min. v páře pod tlakem.

Fosfátový bujon	2
kalium phosphoricum monobasic. sicc. KH_2PO_4	1,5 g
kalium phosphoricum dibasic. sicc. K_2HPO_4	5 g
glukosa	10 g
bujon	1000 ml

Povaříme 20 min. v proudící páře, zfiltrujeme přes papír a rozplníme do Blackových nádobek nebo zkumavek. Následuje sterilisace v Arnoldově přístroji 3 dny po 20 min. pH půdy je 7,2.

Glukosový bujon	3
připraví se z bujonu přidáním 0,5—1% glukosy. Sterilisuje se frakcionovaně.	

Játrový bujon	4
Vařená morčecí, králičí nebo telecí játra rozkrájíme na kostičky, opláchneme studenou vodou a po 2—3 kouscích vkládáme do zkumavek. Potom přidáme po 8—10 ml bujonu a půdu vysterilisueme 30 min. v páře pod tlakem.	

Serový bujon	5
K bujonu přidáme 10 % koňského nebo hovězího sera a rozplníme do zkumavek. Pracujeme se sterilními součástmi a za přísného dodržování všech podmínek sterility. Přes noc půdu inkubujeme v thermostatu při 37 °C.	

Patočkovy nádobky pro hemokulturu 6

Vařená morčecí (telecí) játra nebo ledvinky rozkrájíme na kostičky a po 2—3 kouscích vkládáme do nádobek, které vysterilisueme 3×15 min. v proudící páře. Potom přidáme 2—3 ml 10% vod. rozt. citronanu sodného ($\text{Na}_2\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) do každé nádoby. Nádoby, dosud uzavřené vatovým tamponem, zazátkujeme sterilními speciálními gumovými zátkami, které ještě převážeme navlhčeným pergamenovým papírem. Následuje konečná sterilisace 20 min. v proudící páře.

Kauffmannova pomnožovací půda 7

bujon	900 ml
calcium carbonicum CaCO_3 (suše steril.)	45 g
Lugolův roztok	20 ml
50% rozt. natrium hyposulphurosum $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	100 ml
hovězí žluč	50 ml
0,1% roztok brilantové zeleně	11 ml

Postupně smícháme jednotlivé součásti a za stálého míchání (nerozpuštěný uhlíčitán se usazuje u dna) rozplníme půdu po 8—10 ml do zkumavek a vysterilisueme 2×20 min. v proudící páře.

Zásobní roztoky:

a) Lugolův roztok:	
iodum I	20 g
kalium iodatum KI	25 g
voda	100 ml
b) 50% vodný roztok sinitanu sodného kryst., sterilisovaný 30 min. v páře pod tlakem.	
c) Hovězí žluč filtrovaná papírem a sterilisovaná 2×20 min. v proudící páře.	
d) 0,1% vodný roztok brilantové zeleně, připravený rozpuštěním barviva v destil. vodě a po 24 hod. stání v thermostatu při 37 °C zfiltrovaný přes papírový filtr.	

Tetrathionátový bujon 8

<i>Roztok A:</i>	
natrium hyposulphurosum $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	60 g
voda sterilní	100 ml
<i>Roztok jodu:</i>	
iodum I	30 g
kalium iodatum KI	25 g
voda	100 ml

<i>Zhotovení půdy:</i>	
roztok A	100 ml
roztok jodu	20 ml
calcium carbonicum CaCO_3 (suše steril.)	25 g
bujon	900 ml

Postupně smícháme jednotlivé složky půdy a rozplníme po 5—10 ml do zkumavek. Sterilisueme 20 min. v proudící páře dva dny za sebou. Půdu připravujeme těsně před použitím.

Živný agar

20 g agarové řasy dobře propereme přes cedník v tekoucí studené vodě, vymačkáme a přidáme k 1000 ml bujonu (2% agar). Dáme rozvařit do proudící páry a upravíme pH na hodnotu 7,2. Znovu asi 20 min. povaříme, zfiltrujeme přes vatou a vysterilisueme 30 min. v páře pod tlakem.

Agarové plotny: vyléváme sterilně do Petriho misek po rozvaření a zchlazení agaru asi na 50 °C.

Agar šikmý: plníme do zkumavek asi po 10 ml. Následuje 30 min. sterilisace v páře pod tlakem a po částečném zchlazení se zkumavky ukládají v šikmé poloze.

Krevní agar 10

K rozpuštěnému sterilnímu živ. agaru, zchlazenému na 45–50 °C sterilně přidáme 5–7% defibrinované beraní krve. Směs se dobře promíchá (opatrně, aby se netvořila pěna) a vylévá do ploten nebo plní nad plamenem do zkumavek.

Endova půda (modif.) 11

a) Příprava agarové base:

voda	650 ml
hovězí dekoktun	350 ml
pepton	10 g
natrium chloratum NaCl	5 g
vypraná agarová řasa	20 g

Rozvaříme v proudící páře a upravíme reakci na 6,9 (konečná fáze má mít pH 7,0). Zaovu 30 min. povaříme a zfiltrujeme přes vatku. Vysterilisueme 30 min. v páře pod tlakem.

b) Zhotovení půdy:

Postupně smícháme:

1000 ml rozpuštěné steril. agarové base,
1,2 g siřičitanu sodného bezvodého (Na_2SO_3),
50 ml 20% vodného roztoku laktosy (sterilní),
1,7 ml 10% alkohol. roztoku basického fuchsínu.

Po důkladném smíchání povaříme půdu 15 min. v proudící páře a vyléváme do ploten.

Vizmut-sulfitový agar podle Wilsona-Blaira (modif.) 12

a) Příprava agarové base:

voda	650 ml
hovězí dekoktun	350 ml
pepton	10 g
vypraná agarová řasa	20 g

Rozvaříme v proudící páře a upravíme reakci na 7,1. Opět 30 min. povaříme a zfiltrujeme přes vatový filtr. K filtrátu přidáme 0,5% glukosy a sterilisueme 30 min. v proudící páře.

b) Příprava vizmut-sulfitového roztoku:

- 80 g siřičitanu sodného bezvodého (Na_2SO_3) rozpustíme za horka v 200 ml destil. vody. Po rozpuštění doplníme objem destil. vodou do 400 ml.
- 24 g vizmut-citrátu rozpustíme v 40 ml destil. vody a přidáme 12 ml roztoku amoniaku. Při přidávání amoniaku směs stále třepeme, až se stane téměř čirou. Potom objem roztoku doplníme destil. vodou do 200 ml.
- 4 g siranu železnatého kryst. ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) rozpustíme v 50 ml destil. vody, k níž přidáme 3 kapky konc. kyseliny solné. Roztok má být čirý.
- Smísíme roztoky 1. a 2. a přidáme 40 ml roztoku 3. Nakonec ještě přidáme 42 g středního fosforečnanu sodného kryst. ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) a opatrně nad plamenem asi 3 min. povaříme, až směs dostane šedavou barvu.

c) Zhotovení půdy:

Postupně smícháme:

1000 ml rozpuštěné steril. agarové base,
70 ml vizmut-sulfitového roztoku,
4 ml 1% vodného roztoku brilantové zeleně.

Po důkladném promíchání povaříme půdu 15 min. v proudící páře. Plotny uložené v temnu a chladu jsou použitelné asi 5 dní.

Půda s desoxycholanem sodným 13

a) Příprava agarové base:

voda	650 ml
hovězí dekoktun	350 ml

pepton	5 g
vypraná agarová řasa	20 g

Rozvaříme v proudící páře a upravíme reakci na 7,3. Opět krátce povaříme a zfiltrujeme přes vatku. Následuje konečná sterilisace 30 min. v páře pod tlakem.

b) Příprava dílčích roztoků:

1. Citrátový roztok:

natr. citricum $\text{Na}_2\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	17 g
natr. hyposulphurosum $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	17 g
ferrum citricum cryst. (Fe^{+++})	2 g
voda	100 ml

Po rozpuštění jednotlivých součástí ve sterilní destil. vodě krátce (asi 3 min.) povaříme nad plamenem.

2. Ve 100 ml sterilní vody rozpustíme za tepla 10 g desoxycholanu sodného a roztok krátce nad plamenem povaříme.

3. 20% roztok laktosy, sterilisovaný v proudící páře 3 dny po 15 minutách.

4. 1% vodný roztok neutrální červeně, připravený rozpuštěním barviva ve sterilní destil. vodě.

c) Zhotovení půdy:

Postupně smícháme:

1000 ml rozpuštěné steril. agarové base,
50 ml citrátového roztoku (1),
50 ml roztoku desoxycholanu (2),
50 ml roztoku laktosy (3),
3 ml roztoku červeně (4).

Po důkladném promíchání povaříme půdu 15 min. v proudící páře a vyléváme do ploten.

Dorsetova vaječná půda 14

Čerstvá vejce za pomoci kartáčku a mýdlové vody řádně omyjeme a osušíme. Oba póly potřeme 70% alkoholem a sterilní pinsetou nabodneme. Obsah necháme vytéci do sterilní, nejlépe graduované nádoby s perličkami a důkladně rozřepeme. Po odečtení vrstvy perliček přidáme 10% sterilní destil. vody a opět dobře protřepeme. Nádobku s homogenní směsí uložíme na 2–3 hod. do lednice (při větším množství nejlépe přes noc). Potom půdu sterilně rozplníme (nad plamenem) buď po 2 ml do krevních nebo po 8 ml do bakteriologických zkumavek. Půdu srážíme v šikmé poloze při 80–85 °C v proudící páře po dobu 60 minut. Očkovací plocha musí být naprosto hladká a klíčka se nesmí do zkoušené půdy bořit.

Peptonová voda 15

pepton	10 g
natrium chloratum NaCl	5 g
voda	1000 ml

Po rozpuštění peptonu a soli za tepla upravíme pH na hodnotu 7,2 a krátce povaříme. Zfiltrujeme přes papír, rozplníme do Blackových nádobek nebo zkumavek a vysterilisueme 30 min. zahřátím v páře pod tlakem.

Hottingerův bujon 16

natrium chloratum NaCl	5 g
kaliun phosphoricum dibasic. sicc. K_2HPO_4	1 g
trypsin-pepton	9 g
voda	1000 ml

Přidané ingredience rozpustíme zahřátím v proudící páře a reakci upravíme na 7,4. Znovu povaříme (20 min.), zfiltrujeme přes papír a rozplníme po vhodných množstvích do Blackových nádobek nebo zkumavek. Následuje sterilisace v proudící páře 3 dny po 30 min.

Tryptický bujon

17

trypsin (1:250)	0,2 g
chloroform	10 ml
bujon	1000 ml

Upravíme pH na 8,0 a v láhvi se zabroušenou zátkou směs dobře protřepeme a za oběsného promíchání uložíme na 24 hod. do termostatu při 37 °C. Potom krátce (10 min.) povaříme v páře, upravíme reakci na 7,4 a zfiltrujeme papírovým filtrem. Filtrát zředíme fyziologickým roztokem v poměru 1 : 3, upravíme pH a rozplníme do zkumavek nebo Blackových nádobek. Sterilizujeme v proudící páře 3 dny po 30 minutách.

O dobré jakosti tráveného bujonu se přesvědčíme provedením t. zv. tryptofanové reakce: Zfiltrujeme 10–20 ml bujonu a filtrát okyslíme 10% kyselinou solnou. Z okyseleného filtrátu odpipetujeme do 2 zkumavek po 1–2 ml a přidáme po kapkách bromovou vodu. Červenavé zabarvení je ukazatelem tryptofanu. V opačném případě musíme stravovací proces prodloužit nebo použít čerstvého trypsinu (dlouhým skladováním ztrácí svoji účinnost).

Uhlovodanové půdy

18

K Hottingerovu bujonu přidáváme různé uhlovodany v množství 1%, jen aesculin a inulin v množství 0,5%. Jako indikátor přidáváme 1,5 ml roztoku bromthymolové modře na 100 ml půdy. Po rozpuštění cukru a přidání indikátoru rozplníme půdu do zkumavek-oukrovek a sterilizujeme 3 dny po 15 minutách v proudící páře (neautoklávat!).

Půdy s plynovkami: Durhamovy rourky (plynovky) vkládáme otvorem dolů do Russelových zkumavek, které pak normálně naplníme uhlohydrátovou půdou. Varem při sterilizaci se z plynovek vypudí vzduch a tyto klesnou ke dnu.

Pozn.: Některé mikrobiální kmeny produkují z peptonu malá množství plynu, proto malá bublinka v plynovce po kultivaci ještě neznamena, že jde o kvašení cukru nebo chybu při přípravě půdy.

Příprava indikátoru:

0,1N-NaOH- natr. hydroxydatum	25 ml
bromthymolová modř	1 g
destil. voda	475 ml

Roztok postavíme na 1–2 dny do termostatu při 37 °C, až se barvivo úplně rozpustí. Během této doby roztok několikrát denně důkladně protřepáme. Následuje filtrace přes papírový filtr. Nesterilizovat!

Půdy k zjišťování produkce indolu

19

Základní půdy užívané k zjišťování tvorby indolu jsou: peptonová voda, Hottingerův bujon, tryptický bujon.

Ehrlichovo modř. činidlo:

p-dimethylaminobenzaldehydum	5 g
acidum hydrochloricum conc. HCl	25 ml
alcohol aethylicus 96%	75 ml

nebo:

Kovacovo činidlo:

p-dimethylaminobenzaldehydum	2,5 g
acid. hydrochloricum conc. HCl	15 ml
alcohol amylicus	75 ml

Půda pro nitrátový test

20

pepton	5 g
kaliu nitratum KNO ₃	0,2 g
dest. voda	1000 ml

Rozpustíme za horka a upravíme pH na hodnotu 7,4. Opět krátce povaříme a zfiltrujeme přes papír. Potom půdu rozplníme do zkumavek (5 ml) a vysterylizujeme v páře pod tlakem.

Půda podle Hajny

21

agar	15 g
pepton	20 g
natr. chloratum NaCl	5 g
voda	1000 ml

Rozpustíme v proudící páře a upravíme pH na 7,5. Potom přidáme:

laktosa	10 g
saccharosa	10 g
glukosa	1 g
natrium hyposulphurosium Na ₂ S ₂ O ₃ · 5H ₂ O	0,2 g
ferro-ammon. sulphuricum Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ · 6H ₂ O	0,2 g
1% vodný roztok fenolčervené	2,5 ml

Půdu krátce povaříme, zfiltrujeme vatou a rozplníme do zkumavek po 5 ml. Následuje sterilizace v proudící páře 3 dny po 15 min. Půdu necháme ztuhnout v šikmé poloze.

Agar s octanem olovnatým

22

K 500 ml rozpuštěného živného agaru přidáme roztok:

plumbum aceticum Pb(CH ₃ COO) ₂ · 3H ₂ O	0,5 g
destil. voda	3 ml

(rozpustíme krátkým povařením nad plamenem).

Směs se dobře promíchá a za sterilních podmínek rozplní do zkumavek asi po 3 ml. Nechá se ztuhnout v kolmé poloze.

Želatina s ferrochloridem

23

100 ml želatinové půdy v zásobní baňce (Rp 32) rozpustíme ve vodní lázni a sterilní pipetou přidáme 0,5 ml 10% vodného roztoku chloridu železnatého (FeCl₂ · 4H₂O). Směs dobře protřepáme a sterilně rozplníme do zkumavek po 6–8 ml. Okamžitě po naplnění zkumavky s půdou zchladíme ve studené vodě a uložíme do lednice.

Půda ke zkoušce s methylovou červení (MRT)

24

pepton	5 g
kaliu phosphoricum dibasic. sicc. K ₂ HPO ₄	5 g
glukosa	5 g
destil. voda	1000 ml

Přidané ingredience rozpustíme zahřátím v proudící páře, roztok zfiltrujeme papírovým filtrem, přidáme 5 kapek indikátoru a po rozplnění do zkumavek půdu vysterylizujeme zahřátím v proudící páře 3 dny po 15 min. Konečné pH půdy je 6,9.

Indikátor:

methylyčerveně	0,1 g
alcohol aethylicus 96%	300 ml
destil. voda	500 ml

Po 24 hod. stání v termostatu při 37 °C zfiltrujeme přes papír.

Voges-Proskauerova půda

25

pepton	5 g
ammonium chloratum NH ₄ Cl	2 g
magnesium sulphuricum MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,2 g
natrium phosphoricum dibasic. Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	0,6 g
kaliu phosphoricum monobasic. sicc. KH ₂ PO ₄	5 g
glukosa	5 g
destil. voda	1000 ml

Rozpustíme v proudící páře, event. zfiltrujeme přes papír. Půdu rozplníme asi po 3 ml a frakcionovaně vysterylizujeme v proudící páře (3 × 15 min.). Reakce půdy je 6,9.

Barrittovo činidlo:

Roztok 1.: 6% roztok alfa-naftolu v absol. alkoholu.

Roztok 2.: 40% roztok hydroxydu draselného.

Rustigian-Stuartova půda s močovinou (modif.) 26

urea pura	20 g
kalium phosphoricum monobasic. sicc. KH_2PO_4	9,1 g
kvasnicový extrakt (spissum)	0,1 g
1% vodný roztok fenolčervené	1 ml
destil. voda	1000 ml

Nezahřívá! Po rozpuštění ingrediencí půdu vsterilizujeme Seitzovým filtrem a sterilně (nad plamenem) rozplníme asi po 2 ml do zkumavek. Před použitím inkubujeme 24 hod. v thermostatu při 37°C.

Christensenova půda pro průkaz ureasy 27

I. pepton	1 g
natrium chloratum NaCl	5 g
kalium phosphoricum monobasic. sicc. KH_2PO_4	2 g
agarová řasa	20 g
destil. voda	1000 ml

Rozpustíme zahřátím v proudící páře a upravíme pH na 6,9. Opět krátce povaříme a zfiltrujeme přes vat. Přidáme 6 ml vodného roztoku fenolčervené (konc. 1 : 500) a vsterilizujeme 30 min. v páře pod tlakem.

II. urea pura	20 g
glukosa	1 g
destil. voda	20 ml

Po rozpuštění zfiltrujeme bakteriálním filtrem (Seitz) a přidáme k rozpuštěné sterilní asi 50°C teplé základní agarové směsi (I.). Dobře promícháme a sterilně (nad plamenem) rozplníme do zkumavek. Půdu necháme ztuhnout v šikmém poloze.

Amoniový agar (Simmonsův agar) 28

natrium chloratum NaCl	5 g
magnesium sulphuricum $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2 g
kalium phosphoricum dibasic. sicc. K_2HPO_4	1 g
ammonium phosphoricum monobasic. $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	1 g
agarová řasa	20 g
destil. voda	1000 ml

Rozpustíme zahřátím v proudící páře a jako indikátor přidáme 40 ml 0,2% roztoku bromthymolové modře. Dále přidáme podle druhu prováděného testu:

a) Test citrátový:

V malém množství destil. vody rozpuštěných 5 g (0,5%) citronanu sodného ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$).

b) Test amonium - glukosový:

V malém množství destil. vody rozpuštěných 5 g (0,5%) glukosy. Podle druhu prováděného testu přidáme k agarové bazi roztok citrátu (a) nebo roztok glukosy (b), směs dobře promícháme a rozplníme do zkumavek po 5 ml. Půdu vsterilizujeme frakcionovaně (3 × 15 min.) v proudící páře a necháme ztuhnout v šikmém poloze.

Sternův glycerinový bujon 29

glycerol konc.	10 ml
10% vodný roztok natrium sulphurosus $\text{Na}_2\text{SO}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	20 ml
bujon	1000 ml
indikátor	3 ml

Reakci půdy upravíme na 8,0 a po filtraci přes papír rozplníme do zkumavek po 3–5 ml. Vsterilizujeme v proudící páře 3 dny po 15 minutách.

Indikátor:

alcohol aethylicus 96%	100 ml
fuchsin basický	15 g

K alkoholu v láhvi se zabroušenou zátkou přidáme fuchsin a uložíme do thermostatu při 37°C. Občas důkladně protřepeme. Po 24 hod. zfiltrujeme přes papír.

Gardova plotna k zjišťování pohyblivosti (0,5% živný agar) 30

K 1000 ml bujonu přidáme 5 g proprané agarové řasy, rozvaříme v proudící páře, upravíme pH na 7,2, opět krátce povaříme a zfiltrujeme přes vat. Vsterilizujeme 30 min. v páře pod tlakem a vyléváme do Petriho misek.

„U“ rourky podle Hajny 31

„U“ rourky si zhotovíme ohnutím skleněných trubek, kterých se užívá k vytahování Pasteurových pipet. Otvory v obou ramenech zadržujeme vatou a rourky v horkovzdušné sterilizaci vsterilizujeme. Potom je postavíme do lepenkové krabičky, jejíž víko má vystřižené obdélníkové otvory, nebo do zvláště k tomuto účelu vyrobených plechových stojánek. Rozpuštěný sterilní 0,5% živný agar rozplníme za sterilních podmínek do rourek tak, aby vrstva agaru sahala 1–2 cm od vatových zátek.

Želatina 32

V 1000 ml bujonu rozpustíme opatrným zahřátím v Arnoldově přístroji 15–20% želatiny a podle druhu kultivovaných mikrobů zastavíme pH (všeobecně 7,4–7,6). Roztok ochlazený na 50–55°C se vyjasní bílkem: na 1000 ml půdy použijeme 1 bílku. Vajíčko s pomocí kartáčku a mýdlové vody dobře omyjeme a po osušení skořápku opálíme nad plamenem. Rovněž opáleným nožkem nebo pinsetou skořápku mezi oběma póly vajíčka naklepeme, vajíčko rozložíme a přeléváním žlutku z jedné poloviny skořápky do druhé bílek oddělíme do sterilní třetí misky. Bílek smísíme se stejným množstvím sterilní destil. vody a rovněž sterilní třenkou rozšleháme na sníh. Sníh dobře smísíme s ochlazeným živným roztokem a povaříme v proudící páře. Bílek se srazí a utvoří na povrchu tekutiny povlak, který pozvolna klesá ke dnu nádoby, při čemž strhne všechny znečištěniny. Znovu upravíme pH a roztok při pokojové teplotě zfiltrujeme.

Želatinovou půdu plníme do zkumavek po 8–10 ml a vsterilizujeme 3 dny po 15 min. nebo lépe 1 × 45 min. Ihned po sterilizaci postavíme košíček se zkumavkami do studené vody, aby půda rychle a dobře tuhla. Uchovává se v lednici.

Pozn.: Po několikadenním stání půdy se může bod tání posunout na 29–30°C.

Braunův test 33

pepton	10 g
natrium chloratum NaCl	5 g
kalium phosphoricum monobasic. sicc. KH_2PO_4	0,226 g
natrium phosphoricum dibasic. $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	5,637 g
destil. voda	1000 ml
agarová řasa	20 g

Po rozvaření upravíme pH na 7,4–7,5, opět krátce povaříme a zfiltrujeme přes vat. Pipetou přesně rozplníme do zkumavek po 2,1 ml a vsterilizujeme 20 min. zahřátím v páře pod tlakem.

Činidlo: 0,5% vodný roztok kyanidu draselného, připravený rozpuštěním KCN v sterilní destil. vodě (bez zahřívání!).

Serový agar 34

K živnému 2% agaru přidáme 10% koňského nebo hovězího sera a rozplníme do zkumavek. Pracujeme se sterilními součástmi a za přísného dodržování všech podmínek sterility. Půdu necháme ztuhnout v poloze kolmé. Přes noc inkubujeme v thermostatu při 37°C.

Peptonová voda (V. cholerae) 35

dobry pepton	10 g
natrium chloratum NaCl	5 g
destil. voda	1000 ml

Po rozpuštění roztok povaříme, upravíme pH na 8,4–8,5, prefiltrujeme, rozplníme a 3krát frakcionovaně vsterilizujeme. Konečné pH má být v rozmezí 8,3–8,5.

Goharova půda (V. cholerae)

36

Ke 100 ml dobrého peptonového živného bujonu přidáme 0,2 ml 1% roztoku kalium telluritu. Rozpůlíme po 5–7 ml do zkumavek a sterilisujeme v autoklávu.

Alkalický živný agar (V. cholerae)

37

Dobrý živný agar upravíme přidáním louhu sodného na pH 8,5. Doporučuje se po případě přidat hemolysovanou beraní krev do koncentrace 0,2%.

Alkalický krevní agar podle Dieudonné (V. cholerae)

38

Stejný díl defibrinované beraní krve se smísí se stejným dílem vodného roztoku louhu draselného (4 g KOH na 100 ml destil. H₂O). Po dobrém promíchání necháme směs stát 1 hod. a poté vaříme 30 minut. Tři díly této alkalické krve se smísí se 7 díly 3% neutrálního agaru. Rozvařená půda se pak rozlévá do misek nebo zkumavek. Pro značnou alkalitu půdy lze této použít teprve po 48 hodinách, je-li uložena při pokojové teplotě nebo po 5minutovém zahřátí na 65 °C. Půdy se může používat nejdéle 10 dní po přípravě.

Chapman-Stoneova půda (Micrococcus pyogenes)

39

d-manitol Difco	10 g
Bacto-tryptone (Difco)	10 g
Bacto-agar	15 g
Natrium chloratum NaCl (Merck)	55 g
Bacto-yeast-extract (Difco)	2,5 g
kalium phosphoricum dibasicum sicc. K ₂ HPO ₄ bezvodý (Merck)	5 g
Bacto-želatina	30 g
ammonium sulphuricum (NH ₄) ₂ SO ₄ (bez pyridinu!)	75 g
10% natr. hydroxydatum NaOH	6 ml
destil. voda	1000 ml
pH půdy 7,0	

Půda se sterilisuje 10 minut při tlaku 1 atm., za tepla se rozřepí a z 1-l se vylévá 40 misek. Půda se nesmí vylévat příliš studená, ani během vylévání nechat na chladné desce. Správně připravená půda je za tepla stejnoměrně průsvitná, po zchlazení stejnoměrně kalná.

Tuhá půda pro fagotypisaci (Micrococcus pyogenes)

40

Bacto agar	20 g
natrium chloratum NaCl	7,5 g
nutrient broth (Difco)	20 g
destil. voda ad	1000 ml
pH se upraví na 7, 1–7, 2. Sterilisuje se v autoklávu.	

Biggerův agar (titrace stafylokokového antitoxinu)

41

pepton Witte	8,9 g
pepton proteose	8,9 g
pepton Bacto	8,9 g
agar	26,7 g
masová infuse	1000 ml

Směs zahříváme 60 min. a pak neutralisujeme draselným loubem na pH 7,4. Vaříme dále po dobu 30 min. a filtrujeme. Na 1000 ml filtrátu přidáme 133 ml glycerolu, 111 ml 20% směsi KH₂PO₄ a K₂HPO₄ a 89 ml H₂O. Po řádném promíchání sterilisujeme v autoklávu 20 min. při jedné atmosféře.

Parkerův bujon (titrace stafylokokového antitoxinu)

42

pepton Witte	20 g
kalium phosphoricum nucleobasic. KH ₂ PO ₄	0,2 g
magnesium sulphuricum MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,3 g
masový nálev	1000 ml

Směs po promíchání vaříme 30 min. Za pomoci KOH upravíme pH na 7,6 a po 10minutovém vaření filtrujeme přes papír. Nakonec sterilisujeme 20 min. při 1 atm.

Modifikovaný čokoládový agar (gonokoky)

43

Základní agar:

Hovězí maso, zadní, libové zbavíme šlach a tuku, rozemeleme a zvážíme. Přidáme stejný objem destil. vody a tuto směs necháme přes noc v lednici. Druhý den za stálého míchání povaříme se stejným množstvím vody a přidáme k prvnímu. Infuzi necháme znovu přes noc v lednici, další den zfiltrujeme přes papír a doplníme destil. vodou na původní váhové množství. K 1000 ml infuse přidáme 20 g vyzkoušeného peptonu, 3 g kuchyňské soli (NaCl), 2 g střed. fosforečnanu sodného (Na₂HPO₄), zahřejeme do varu, alkalizujeme 5N loubem (NaOH) na pH 8,2 (univ. papírkem), vaříme 20 min., zkusíme znovu pH, které má být po konečném 5 min. vaření 8,1–8,2. Vychladlý bujon dáme do druhého dne do lednice, poté zfiltrujeme přes papír, změříme objem a doplníme destil. vodou na původní množství. K 1 l bujonu přidáme 18 g vyzkoušeného agaru, vaříme 25 min., zfiltrujeme přes vat, přidáme na 1000 ml 0,2 g cysteinu a 0,1 g kyseliny paraaminobenzoové rozpustěné v trošce vody, rozplníme po 100 nebo 250 ml a autoklávuje 25 min. při 125 °C.

Přídavek krve:

K agaru ochlazenému na 56 °C přidáme 12% defibrinované koňské nebo lidské krve. Zahříváme ve vodní lázni při 75–78 °C (nikoli v Arnoldově přístroji) asi 20 min. Směs má nabýt barvy hořké čokolády, ale nesmí ssednout.

Přídavek albuminu:

K čokoládovému agaru ochlazenému na 56 °C přidáme 3% sterilního 5% roztoku albuminu nebo stejné procento sterilního hovězího sera. Půdu vyléváme do Petriho misek nebo do zkumavek s transportními tampony.

Příprava sera nebo albuminu:

Roztok albuminu nebo serum sterilisujeme filtrací přes EK vložku. Ke 100 ml sterilního sera přidáme 7,5 ml 0,1% vodného roztoku nilské zeleně. Roztok nilské zeleně sterilisujeme autoklávaním.

Langer doporučuje tyto chemikálie:

Pepton: Organofarma některých šarží.

Agar: Sanitas některých šarží. Agary vesměs provenience Kobé a čínské agary.

Albumin Biogena, vyrobený z odpadu výroby gamma-globulinu.

Nilská modř fy Bayer „Nil Blue“.

Serum bez přídavku formolu nebo jiných antiseptik.

Nevhodný je Danagar, mleté anglické agary, Sachalin agar a Difco mletý agar.

Fermentační půdy

44

a) Základní agar:

vyzkoušený agar	1 g
vyzkoušený pepton	1 g
natrium chloratum NaCl	1,25 g
destil. voda	1000 ml

Rozpuští se a doplní se vodou na 190 ml, rozplní po 30 ml. Sterilisuje se 20 min. při 125 °C. 1 g cukrů mikrobiologických kvalit se rozpustí v 2,5 ml vody a doplní na 5 ml vodou. Sterilisuje se 3 dny po sobě 20 min. při 100 °C.

b) Příprava indikátoru:

0,1 g bromfenolové červeně se rozetře v misce s 28 ml N/100 NaOH, doplní vodou na 250 ml a sterilisuje po přefiltrování 20 min. při 125 °C.

Zhotovení půdy:

Do rozvařeného základního půdy (30 ml) se přidá po ochlazení na 55 °C 2,5 ml sterilního roztoku cukru, 5 ml sterilního sera bez nilské modře a 1,25 ml sterilního roztoku indikátoru. Sterilním N/10 NaOH upravíme pH na 7,4–7,5 (mírně za barevný přechod ze žluté barvy do červené) a rozlijeme do zkumavek ke vpichovému očkování.

Polotekutá pomnožovací ascitová půda (meningokoky) 45

hovězí infuse	500 ml
agar	5 g
natrium chloratum NaCl	5 g
pepton	10 g
destil. voda	500 ml
sterilní ascites	aa

Agar rozpustíme ve vodě autoklávováním, pepton a sůl v infusi. Smícháme, upravíme celkovou váhu a pH na 7,5. Filtrujeme přes vatou a gázu. Autoklávujeme 20 min. a uschováme. V případě potřeby rozpustíme agarovou baci, zchladíme na 50 °C, ascites zahřejeme na 50 °C a sterilně smísíme ve stejných dílech. Dobře promísíme a rozdělíme sterilně po 4 ml do zkumavek (13 × 125 mm). Necháme ztuhnout v svislé poloze. Inkubujeme 48 hod. při 37 °C a 96 hod. při 20–27 °C na kontrolu sterility (při delším skladování půdy je třeba ji pokrýt asi 0,5 ml sterilního minerálního oleje). Půda se může nalévat i na Petriho misky, zvýšíme-li obsah agaru alespoň na 1% konečné koncentrace.

Ascitový agar můžeme připravovat i jinak:

1 díl ascitu se přidá ke 3 dílům 2,5–3% neutrálního živného agaru. Doporučuje se přidat 0,5–3% glukosy.

Glukosový mozkový bujon (Rosenow) 46

pepton	5 g
natrium chloratum NaCl	8 g
glukosa	2 g
Andradeho indikátor (viz str. 62, půda č. 61)	10 ml
masová infuse	1000 ml

Pepton a sůl rozpustíme v masové infusi opatrným zahříváním. Přidáme indikátor a glukosu. Upravíme pH na 7,0 až 7,5 a nalijeme půdu do širokých zkumavek (200 × 16 mm) tak, aby výška bujonu byla asi 12 cm. Přidáme 3 kostky telecího mozku o hraně 1 cm a 2–3 kousky křídý do každé zkumavky (kousky mozku ponoříme před tím do vody, aby se předělo jejich přilepení na stěnu zkumavky). Autoklávujeme při 120 °C 20 min.

Serový agar 47

2% živný agar (Rp 9, str. 49)	1000 ml
sterilní koňské serum	100 ml
20% roztok glukosy	50 ml

Agarovou baci rozpustíme a ochladíme na 50 °C. Serum a roztok glukosy zahřejeme na 50 °C, asepticky smísíme s rozpuštěným agarem, dobře promícháme a asepticky rozdělíme po 7 ml do zkumavek (19 × 150 mm). Necháme ztuhnout v šikmé poloze. Inkubujeme 48 hod. při 35–37 °C, potom 24 hod. při 20–27 °C. Zkontrolujeme sterilitu a uložíme.

Todd-Hewittův bujon (streptokoky) 48

Z čerstvých hovězích srdcí nebo koňského masa se vykrájí všecken tuk. Libové maso se jemně rozele a na každých 450 g se přidá 1050 ml destil. vody. Promíchá se, tuk se shora sebere. Přes noc se nádoba s masem uloží do lednice. Druhý den se zahřeje na 85 °C a teplota se udržuje 150 minut, nesmí však být překročena. Pak se provede filtrace papírovou vatou. Ke každému litru roztoku se přidá 20 g Neopeptonu (nebo Proteose-peptonu) Difco, pH se upraví na 8,0 s pomocí N-1 louhu (NaOH) a přidají se 2 g soli (NaCl), 2 g kys. uhličitánu sodného (NaHCO₃), 0,4 g bezvodého středního fosforečnanu sodného (Na₂HPO₄) a 2 g glukosy. Vaří se 15 minut a pak se zfiltruje papírovým filtrem. Rozplňuje se do zkumavek po 5–6 ml a sterilizuje v Arnoldově přístroji tři dny po sobě, vždy 20 minut. Konečné pH má být 7,8. Vznikne-li sraženina, odfiltruje se, pH se znovu upraví a bujon se znovu sterilizuje v Arnoldově přístroji.

Půda pro průkaz tvorby amoniaku z argininu (streptokoky) 49

pepton	0,5 g
kvasnicový extrakt	0,5 g
kalium phosphor dibasicum sicc. K ₂ HPO ₄	0,2 g

glukosa	0,05 g
arginin hydrochlorid	0,3 g
destil. voda	100 ml

Půda pro průkaz štěpení natrium hippurátu (streptokoky) 50

hippurát sodný	10 g
dextrosa	10 g
bujon	1000 ml

Pakulova půda pro kultivaci Streptomyces albus (streptokoky) 51

Casitone (Difco)	5 g
glukosa	5 g
natrium chloratum NaCl	5 g
kalium phosphor dibasicum sicc. K ₂ HPO ₄	2 g
magnesium sulphuricum MgSO ₄ · 7 H ₂ O	1 g
calcium chloratum sicc. CaCl ₂	0,04 g
ferrum sulphuricum FeSO ₄ · 7 H ₂ O	0,02 g
zincum sulphuricum ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	0,01 g
agar	12,5 g
destil. voda	1000 ml

Jiná modifikace:

asparagin	0,5 g
glukosa	10 g
kalium phosphor dibasicum sicc. K ₂ HPO ₄	0,5 g
agar	12,5 g
destil. voda	1000 ml

Trypsinová emulze (streptokoky) 52

Očištěný a rozemletý vepřový pankreas	800 g
alcohol ethylicus 96%	1000 ml
destil. voda	2400 ml

Směs se třepe po tři dny při pokojové teplotě, přidá se kyselina solná do výsledné 0,1% koncentrace, směs se prefiltruje nejprve papírovým filtrem, pak Seitzovým filtrem s EK vložkou. Získaná emulze se uchovává ve zmraženém stavu.

Bujon podle Kalbaka (streptokoky) 53

500 g masa (hovězí srdce, koňské maso, hovězí maso) se zbaví kostí, tuku a šlach, jemně rozele a přelije 1 l aquae fontis. Dá se přes noc do lednice při +4 °C. Příští den se zahřeje na 100 °C na dobu 10 min. Maso se odfiltruje přes plátno. Do filtrátu se přidá 20 g neo-peptonu (Difco), pH se upraví na 7,3 a sterilizuje se filtrací přes Seitzův filtr.

Příprava solného roztoku s glukosou

glukosa	5 g
natrium bicarbonicum NaHCO ₃	5 g
natrium chloratum NaCl	5 g
natrium phosphor bibas. Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O	2,5 g
destil. voda	100 ml

Rozpouští se za mírného zahřívání a sterilizuje se filtrací přes Seitzův filtr. 40 ml tohoto roztoku se těsně před naočkováním přidává k 1 l bujonu, připraveného jak uvedeno sub a).

Löfflerovo serum (Corynebacterium diptheriae) 54

koňské (hovězí) serum	3 díly
1% glukosový bujon	1 díl

Rozplní se do zkumavek a koaguluje v šikmé poloze při 75 °C po dobu šesti hodin. Další dny za sebou se sterilizuje půda při 90 °C po dobu 20 min. v páře. Bylo-li užito sterilního sera, stačí je koagulovat 120 minut při 75 °C.

Daleko výhodnější (zůstává větší kvantum kondensační vody) je *koagulace Löfflerova sera v autoklávu*, z něhož nebyl vypuštěn vzduch, a který tedy dosahuje teploty něco přes 80 °C, a to pod tlakem. Pro tento postup však nutno každý autokláv zvláště vyzkoušet.

Claibergova půda (*Corynebacterium diphtheriae*)

55

Základní roztoky:

1. Glycerinová krev:

1 díl sterilního glycerolu p. a. smícháme s 2 díly sterilní defibrinované hovězí krve. Necháme zrát 6 týdnů v lednici při +2 až +4 °C. Uchováváme v lednici.

2. Roztok cystinu:

1 g bezvodého uhličitánu sodného p. a. Na₂CO₃ rozpustíme v 10 ml vroucí destil. vody přidáme 1 g cystinu, znovu povaříme a objem doplníme do 100 ml sterilní destil. vody. Roztok musí být čirý.

3. Telluritový roztok:

Kalium tellurosum nutno rozetřít na jemný prášek. V odměrné baňce 250 ml sterilisujeme 240 ml destil. vody. Po sterilisaci přidáme po malých množstvích a za stálého protřepávání 2,5 g jemně rozetřeného teluritu, aby se zcela rozpustil. Potom doplníme sterilní destil. vodou do 250 ml. Roztok musí být čirý; maximálně vydrží 6 měsíců. Rovněž Kalium tellurosum v substanci stárne — nemá se užívat déle než 10 měsíců.

4. Roztok barviv:

- 2% roztok vodní modře v destil. vodě
- 2 g metachromové žlutí rozpouštíme ve 100 ml destil. vody při pokojové teplotě za občasného protřepávání dva dny. Pak filtrujeme a užíváme čirého filtrátu.

5. Agarový základ:

Dobrý bujon, obsahující 1% peptonu; 0,3% NaCl a 0,2% bezvodého NaH₂PO₄ ztužíme 4% agaru, rozplníme po 210 ml a sterilisujeme v autoklávu 20 min. při 120 °C. Po sterilisaci je pH 7,2.

Příprava půdy:

- Rozpustíme agarový základ (sub 5.) v páře a po rozpuštění vložíme do vodní lázně při 48 °C.
- Do sterilní litrové baňky odměříme 165 ml sterilní destil. vody a 82,5 ml sterilní defibrinované hovězí krve. Promícháme a necháme stát až do ukončení hemolysy. Pak přidáme 11 ml glycerinované krve (sub. 1) a 18 ml roztoku teluritu (sub 3). Baňku postavíme do lázně při 48 °C.
- Do 100 ml sterilní baňky odvážíme 0,75 g octanu sodného p. a., 7,5 g glukosy, připipetujeme 30 ml roztoku vodní modře (sub 4a), 10 ml roztoku metachromové žlutí (sub 4b) a 5 ml roztoku cystinu (sub 2). Uložíme do vodní lázně při 48 °C.
- Roztok sub c) vlijeme do roztoku sub b), obsah důkladně promícháme a přidáme 210 ml agarového základu 48 °C teplého, znovu promícháme a rozlijeme do ploten. Zahřívání při 48 °C má být co nejkratší, neboť tellurit se rozkládá, je-li zahříván s glukosou. Jedna várka má objem 531 ml.

Škovránkova půda (*Corynebacterium diphtheriae*)

56

- Bujonový agar 3,5%, pH asi 7,2 (přesné pH není nutné), rozplněný po 150 ml v menších laboratořích nebo po 300 ml ve větších laboratořích, zhotovujeme z masa.
- Odstředěné kravské mléko (mlékárenské), sterilisované v páře nebo i v autoklávu 20 min. (mírná karamelisace nevadí).
- Serum hovězí nebo koňské (stačí z jateční krve). Nemusí být absolutně sterilní.
- Roztok 40% glukosy. Možno použít všech běžných druhů glukosy (dextrosy) i dextropuru.
- Indikátorový roztok: 200 ml převařeného destil. vody, 3 ml 10% louhu (NaOH), 0,1 g methyl. červené, 0,6 g cystinu, 1,1 g Kalium tellurosum (potassium tellurite). Postavíme na 5–10 min. do vařící vody, občas promícháme, až se rozpustí zbytky krystalů methyl. červené a roztok je čirý. Dále již nesterilisujeme. Roztok vydrží asi 1 měsíc.

6. Roztok vodní modři 1,6% (Wasserblau 6B extra P. Grüberl). Rozpustíme za horka, filtrujeme a pak převaříme v páře asi 10 minut.

7. Glycerolát krevní: 1 díl glycerinu, 2 díly defibrinované krve hovězí nebo koňské (stačí jateční) rozplníme do menších baniček a uschováme v chladu. Čím starší, tím lepší. V nouzi se dá použít glycerolátu již druhý den. Beraní krev je méně vhodná (je světlejší).

8. 10% NaOH ke konečné úpravě pH půdy.

Příprava půdy (celkové množství asi 600 ml):

- Rozpustíme 300 ml agaru v zásobní baňce.
- Ve druhé baňce o obsahu alespoň 1 l dáme převařit směs 200 ml odstředěného mléka + 30 ml hovězího nebo koňského sera na 20 minut (ve vařící vodě nebo v páře bez tlaku).
- Vlijeme horký agar (bez ochlazování) do směsi mléka a sera za stálého míchání.
- Přidáme hned nato 30 ml roztoku glukosy, 30 ml indikátorového roztoku, 30 ml roztoku vodní modře (vše stačí jednou pipetou).
- Dobře promícháme a přidáme 20 ml glycerolátu. Opět promícháme, chvíli počkáme.
- Na konec přidáme 10% louhu sodného (NaOH) tolik, aby půda měla olivově zelenavý, trochu okrový tón (zpravidla je množství louhu okolo 2–2,5 ml; přidání potřebného množství louhu je větší krátkého eviku). Menší laboratoře vaří ze 150 ml agaru s polovičním množstvím ostatních součástí.

McLeodova půda (*Corynebacterium diphtheriae*)

57

Je to čokoládový agar, obsahující 0,04% telluritu. Od jiných půd se liší tím, že infuse není připravována za tepla, nezahřívá se nad 75 °C a sterilisuje se filtrací: 75 g rozemletého masa rozmělníme se 100 ml vody z vodovodu a macerujeme ve vodní lázni při 48 °C 60 minut. Přecedíme přes plátno, necháme přes noc v lednici a filtrujeme přes papír. Na 1000 ml filtrátu přidáme 20 g peptonu a 5 g soli NaCl a zahřejeme na 45 °C, aby se pepton rozpustil. Z celého množství odebereme 50 ml půdy, zahřejeme 15 min. na 80–90 °C, přefiltrujeme přes papír, pak zjistíme, kolik ml N/10 louhu (NaOH) je zapotřebí k upravení 10 ml půdy na pH 7,6. Zjištěné množství přepočítáme na zbylých 950 ml půdy. Vypočítané množství louhu přidáme. Pak filtrujeme — nejdříve přes čerici, potom sterilisační vložku Seit-zova filtru a uchováváme v chladu. Malá část filtrovaného bujonu se inkubuje tři dny v thermostatu, aby se zjistila event. kontaminace. Před upotřebením smícháme bujon se stejným dílem 5% agarového gelu ve vodě, přidáme 7–10% čerstvě odebrané králičí krve a přidá se 0,04% Kalium tellurosum (odpovídající množství čerstvě rozpustěné v malém množství sterilní destil. vody). Dobře promícháme, zahřejeme 10–15 min. na 75 °C a pak rozléváme do Petriho misek.

Hissova serová půda (*Corynebacterium diphtheriae*)

58

1 díl sterilního koňského sera, 3 díly 0,1% peptonové vody. pH upravíme na 7,6, přidáme 1% Andradeho indikátoru (viz str. 62 půda č. 61) (lze použít i běžné koncentrace bromthymolové modře nebo fenolové červené, t. j. 1,5–2% 0,02% roztoku) a 1% substrátu (glukosa, saccharosa, škrob) rozplníme do zkumavek a sterilisujeme 30 min. v proudící páře po 3 dny.

Tekutá půda pro *Corynebacterium diphtheriae* (Souček, Novotný)

59

Sterilní Hartleyův bujon pH 7,6–7,8	100 ml
3% vodný roztok CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,25 ml
Koňské serum	5 ml
Roztok Kal. tellurosum	2,5 ml

Půda se rozpíná po 2,5 ml do zkumavek 16 × 10
Roztok Kal. tellurosum: (Mueller & Miller)
20 ml 85% kyseliny mléčné se zředí na 50 ml destilovanou vodou, přidá se 1 kapka fenolové červené a neutralisuje se 50% louhem sodným (NaOH) do červené barvy. Povaří se 5 minut a přidá se další loush je-li toho třeba, aby barva zůstala trvale červená. Pak se autoklavuje 15 minut při 120°C. Po vychladnutí se přidá:
10 ml ethanolu
0,5 mg calcium pantothenátu rozpustěného v malém množství vody a autoklavovaného při 120° 15 minut

50 ml sterilního koňského nebo hovězího sera
0,9 g čerstvého Kal. tellurosum rozpuštěného v malém množství destil. vody.
Dojde-li k vysrážení, stačí mírně zalkalisovatí roztok. Roztok se uchovává v lednici.
Vydrží asi 3 měsíce.

Odebraný tampon se ponoří do půdy, inkubuje se v mírně nakloněné poloze tak, aby byl povrch půdy dobře provzdušněn a po 6 hodinách se přímo tamponem přeočkovává na krevní plotnu. Rozočkovává se kličkou.

V případě, že budeme místo za 6 hodin vyočkovávat za 24, můžeme použít 7% vodný roztok $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

Z krevní plotny můžeme ihned očkovat cukry, zhotovit preparát na metachromatická tělíska a provést zkoušku toxicity.

Bujon pro fagotypisaci salmonel 60

Připravíme bujon (viz str. 48, půda č. 1) a sterilisujeme 2 dny za sebou v Arnoldově přístroji po 60 min. Po rozplnění do zkumavek jej autoklávueme 20 min.

Uhlohydrátové půdy (P. pestis) 61

a) *Andradeův indikátor:*

Připravíme 0,5% roztok kyselého fuchsínu v destil. vodě.

Do připraveného roztoku kyselého fuchsínu přiléváme postupně za pečlivého protřepávání N/1 roztok louhu (NaOH) v takovém množství, až roztok zrudne, poté zhnědne a konečně zežlutne (běžně asi po přidání 17 ml louhu). Takto připravený roztok se nechá stát při pokojové teplotě 1–2 hod., zfiltruje se a uschová v tmavé nádobě.

b) *Zásobní roztoky uhlohydrátů*

připravíme jejich rozpuštěním do koncentrace 20% v destil. vodě s výjimkou glycerolu. Roztoky se zfiltrují Seitzovým filtrem, rozplní do sterilních nádob a sterilisují varem po 30 min.

Poznámka: Není-li možnost filtrace Seitzovým filtrem, je nutno sterilisaci varem opakovat ještě dva dny. Autoklávování poškozují uhlohydráty (karamelisace).

Příprava uhlohydrátových půd

Do 1% peptonové vody připravené z dobrého peptonu se přidá Andradeův roztok (a) do koncentrace 1%. Po dobrém promísání se roztok sterilisuje v autoklávu po 20 minut při tlaku 1,5 kg/cm². Do vychladlého roztoku se přidá sterilně zásobní roztok příslušného uhlohydrátu (viz roztok b) do 1% koncentrace. Hotová půda se rozplní do zkumavek a sterilisuje varem (100 °C) po 30 minut. Hotové a rozplněné půdy se kontrolují na sterilitu 24hodinovou inkubací v thermostatu při 37 °C.

Je možno použít také modifikace připravené přidáním 0,5% agaru do tekuté půdy.

Živný agar s hemolysovanou krví a s gentiánovou violetí 62 (P. pestis)

A. 10% roztok gentiánové violeti v alkoholu.

B. Krev hemolysovaná dvojnásobným zmražením.

Půda se připraví tak, že k agaru (viz str. 49, půda č. 9) se přidají 2% roztoku B a 0,01% roztoku A.

Nebo je možno použít této půdy:

K agaru s infusí z telecího masa přidáme 0,025% natrium sulfátu Na_2SO_4 (t. j. 0,25 ml z čerstvě připraveného 10% roztoku) a 1/700%–1,400% gentiánové violeti (t. j. 1,5–2,5 ml z pečlivě připraveného roztoku 1:1000 gentiánové violeti) na 100 ml půdy. Množství gentiánové violeti musí být pečlivě předem vyzkoušeno, poněvadž někdy už dávka 1/400% inhibuje veškerý růst.

Vaječná půda podle McCoye (P. tularensis) 63

Vajíčka umyjeme kartáčem, mýdlem a pískem a sterilně rozklepneme do láhve se zabroušenou zátkou. Dávají se 4 žloutky a 1 celé vejce (asi 150 ml půdy). K tomu přidáme objemových 40% fysiол. roztoku 0,85%. Pak do láhve přidáme sterilně skleněné perličky

a třepeme 15 minut. Necháme přes noc stát v lednici. Druhý den půdu sterilně plníme do zkumavek a pokládáme šikmo do inspirátoru nebo Arnoldova přístroje, kde žloutky koagulují při 85 °C 45 minut. Kličkou zkoušíme, je-li půda po této době již dosti sražená. Klička se nesmí bořit. Vejce musí být čerstvá!

Cystinový krevní agar podle Francise (P. tularensis) 64

2% agar pH 7,2 rozvaříme a přidáme 0,1–0,2 g cystinu rozpuštěného ve 2 ml 10% sodného louhu. K tomu přidáme 1% glukosy (t. j. 5 ml 20% roztoku na 100 ml agaru) a sterilisujeme v proudící páře 20 minut. Po zchlazení na 50 °C přidáváme králičí defibrinovanou krev (5–10%) a plníme sterilně do zkumavek, které pokládáme šikmo; necháme ztuhnout.

Huddlesonův bujon z jater (brucely) 65

Rozelemele 500 g čerstvých (ihned po porážce) hovězích jater, přidáme 500 ml vody a vaříme 60 minut při častém míchání. Považenou směs zahřejeme v autoklávu do 120 °C, přefiltrujeme, rozléváme do nádobek a sterilisujeme 20 min. při 115 °C.

Játrový agar (Huddlesonův) (brucely) 66

agar	20 g
pepton (pro brucely netoxický)	10 g
natrium chloratum NaCl	5 g
destil. voda	500 ml

Směs vaříme v autoklávu 30 min., přidáme 500 ml játrového bujonu podle Huddlesona (viz půda č. 65), ochladíme na 60 °C, pH upravíme na 7,0. K 1 l půdy přidáme 1 vaječný bílek a vaříme 30 min. při 120 °C, filtrujeme přes několikrát složený mul, znovu zastavíme pH na 7,0, rozléváme do baněk a 20 min. sterilisujeme v autoklávu při 115 °C. Po sterilisaci klesá pH na 6,8–6,6. Kvalitu nové várky je vždy nutno ověřit kultivací sbírkových kmenů (ne příliš starých).

Agar z jater a vemene podle Nikolského (brucely) 67

Smísíme 400 g jemně mletého vemene a 400 g umletých hovězích jater a přidáme 1 litr destil. vody. Vaříme v proudící páře, po 20 minutách nádobu vyjmáme, tekutinu velmi důkladně promícháme, znovu vaříme v proudící páře po 90 minut, filtrujeme přes několikrát složený mul, vývar rozléváme do baněk a sterilisujeme 20 minut při 115 °C.

Pro zhotovení agaru přidáváme k 400 g vývaru z jater a vemene 600 ml destil. vody, 25 g agaru, 10 g peptonu, 5 g soli (NaCl) a vaříme 30 minut, pH zastavíme na 7,0–7,2, ochladíme na 60 °C, vyčeříme vaječným bílkem a vaříme 60–90 minut do úplného prosvětlení. Filtrujeme přes několikrát složený mul rozléváme a sterilisujeme 20 minut při 115 °C v autoklávu.

Půda pro záchyt brucel z kontaminovaného materiálu 68

Selektivní izolaci brucel (jde-li o Gp kontaminanty) zajistíme přidáním 2–5 jednotek penicilinu na 1 ml kultivačního prostředí (játrového agaru).

Renouxova půda (eliminace plísní, protea, pseudomonad, bac. subtilis při kultivaci brucel) 69

Albimí agar	100 ml
Actidion	10 mg
Polymyxin B.	300 j.
Bacitracin	1250 j.
Circulin	1500 j.
ethylviolet	1 : 800.000

Levinthalův agar (Hemophilus infl.) 70

200 ml 1,5% živného rozpuštěného agaru zochladíme na 60–70 °C, doplníme pomalu za stálého míchání 10 ml defibrinované králičí krve, krátce povaříme, rychle odstavíme, promícháme a znovu zahřejeme až na bod varu. Získaná tmavohnědá tekutina s vločkami sera se přefiltruje vatovým filtrem při teplotě 60 °C. Filtrát, který je bezbarvý, ihned vy-
léváme do Petriho misek nebo do zkumavek.

Shopeho krevní vařený agar (Hemophilus infl.) 71

agar	10 g
natrium chloratum NaCl	2,5 g
pepton Witte	5 g
bujon	500 ml

pH půdy upravíme na 7,5, půdu sterilisujeme, po ochlazení na 60 °C přidáme 25 ml čerstvé defibrinované koňské krve, promísíme a zahříváme 60 minut na 60–65 °C ve vodní lázni. Pak půdu vyléváme do Petriho misek.

Půda s X- a V-faktorem (Hemophilus infl.) 72

Půdu s X-faktorem připravíme z 5 ml peptonové vody a 1 ml 1% roztoku hematinu. Půdu s V-faktorem lze zhotovit z 5 ml peptonové vody a 1 ml kvasnicového extraktu nebo z 5 ml 3denní kultury bílého mikrokoka v peptonové vodě, přefiltrované Seitzovým filtrem.

Legrouxův výtazek z erythrocytů 73

Připravuje se z defibrinované krve, která se smíchá s dvojnásobným množstvím fyziol. roztoku ve vodní lázni při 80 °C až do zahřátí krve na tuto teplotu. Pak se směs filtruje přes filtrační papír a nakonec přes Seitzův filtr.

Modifikace Bordet-Gengouovy půdy (Hemophilus pert.) 74

A. Příprava extraktu z brambor:

rozkrájené brambory	500 g
glycerolum conc. puriss.	40 ml
destil. voda	1000 ml

Omyté a dobře okrájené brambory rozkrájíme na kostky (1×1 cm) a přidáme k směsi destil. vody se 4 % glycerolu. Po 30 min. považení v proudící páře (100 °C) se extrakt zfiltruje přes gáz a doplní destil. vodou na původní objem.

Poznámka: Důležité je dodržení doby i stupně teploty při zahřívání. Při filtraci přes gáz se nechá extrakt samovolně prokapat, bez násilného promačkávání. Extrakt má být pokud možno čistý. Výtazek z brambor se musí použít k přípravě agarové base téhož dne, kdy byl připraven.

Brambory se smí krájet nejdéle 18 hod. před použitím, jsou-li uchovány při 0–5 °C.

B. Příprava agarové base:

bramborový extrakt	1000 ml
destil. voda	3000 ml
natrium chloratum NaCl	18 g
pepton (Organofarma)	40 g
agarová řasa	120 g

Směs se povaří v proudící páře do rozpuštění ingrediencí, reakce se upraví s pomocí 20% roztoku sody na pH 7,4. Opět se krátce povaří (15 min.) a zfiltruje přes vata. Filtrát se rozplní do zásobních Erlenmayerových lahví ve vhodných množstvích a vysterilise se 30 min. zahřátím v páře pod tlakem (121 °C). Hotová base se uloží do lednice.

Poznámka: Velmi důležitá je přesná úprava pH. Při nižších hodnotách pH ztrácí půda elektivitu, při vyšších hodnotách pak při inkubaci v termostatu dochází k trávěnému zbarvení půdy (čokoládový agar) a až k celkové hemolyse prostředí. Zpětná titrace pH není možná. Alkálie na zadanou hodnotu nutno přidávat pomalu a opatrně. Těsně před sterilisací se autokláv předeheje, aby v čase pokud možno nejkratším bylo dosaženo teploty 121 °C. Po skončení sterilisace se otevře výstupní kohout, aby teplota v autoklávu rychle klesala.

C. Příprava půdy

agarová base	1000 ml
beraní defibrinovaná krev	250 ml

Zahřátím v proudící páře 100 °C se base rozpustí a po ochlazení na 45–50 °C se přidá sterilní defibrinovaná krev, předem ve vodní lázni zahřátá na 45–50 °C. Půda se vylévá do ploten, které se musí upotřebit do 72 hod.

Poznámka: Použitá krev má být čerstvá. Maximální hranice použitelnosti krve je 48 hod. po odběru. Před použitím sušíme půdy v termostatu při 37 °C tak, aby nebyly zcela vysušeny.

Vf bujon (anaeroby) 75

4 kg libového rozemletého hovězího masa a 1 kg rozemletých hovězích jater se promíchá s 18 litry vody (studniční nebo destilované) ve smaltované nádobě. Zahřeje se na 50 °C, přidá se 200 ml 10% kyseliny solné (HCl), chemicky čistě, důkladně se promíchá a na povrch tekutiny se nasype odvážené množství pepsinu.* Množství pepsinu se řídí podle jeho titru; vypočítané množství však zvyšujeme o polovinu (na př. máme-li pepsin o titru 1 : 10 000, pak bychom potřebovali 0,5 g — předpokládáme, že máme skutečně 5 kg bílkovin — užijeme však 0,75 g). Potom směs trávíme 20 hodin při 50 °C ve vodní lázni. Po této době má být pozitivní reakce biuretová i reakce na tryptofan.** Trávení přerušíme zahřátím na 85 °C. Potom tráveninu přecedíme přes smaltovaný cedník, pH upravíme 5N louhem (NaOH) na 5,6 a zahřejeme do varu, který udržujeme 5 minut. Po vychladnutí přefiltrujeme filtračním papírem a upravíme 5N.NaOH na pH 7,4. K části přidáme 1,5 % peptonu Organofarma (pro přípravu bujonů s játry, krevního agaru a j., část necháme bez peptonu (na Vf bujon s glukosou). Po rozpuštění znovu upravíme pH a sterilisujeme v autoklávu při 120 °C 20 až 30 minut.

Vf bujon s glukosou (anaeroby) 76

Na 1 l Vf bujonu bez peptonu přidáme 8 g glukosy, rozplníme ve vysokých vrstvách (10 ml do zkumavek 14×180) a sterilisujeme po úpravě pH 20 minut při 120 °C v autoklávu.

Robertsonova půda (půda s vařeným masem) 77

(podle osobního sdělení B. C. J. G. Knighta)

Srdeční sval je lepší než maso, neboť obsahuje asi dvojnásob lipidů; ale může se užít obyčejného hovězího masa, není-li dostatek srdečního svalu:

500 g čerstvého srdečního svalu se rozemele a po částech se vzhazuje do 500 ml vroucího N/20 NaOH ve smaltované nebo skleněné nádobě a nechá vařit 20 minut. Ke konci této doby se ukončí neutralisace mléčné kyseliny a pH tekutiny má být asi 7,5. Tekutina se odstraní přes několikrát složený gáz a maso, pokud je teplé, se vymačká a nechá částečně oschnout rozprostřeno na plátě nebo na kusu filtračního papíru. Mletí masa mělo být jemné, aby po částečném osušení vznikaly částičky 1–2 mm v průměru, t. zn. ani příliš drobné, ani velké, aby nevznikaly hroudy. Po částečném osušení se částičky nasypou do zkumavek 16 cm v takovém množství, aby vznikl sloupec 5 cm vysoký; pak se přidá bujon s 1 % peptonu (pH 7,4), aby tekutina stála asi 2 cm nad masovými částmi. Pro některé účely stačí vrstva masových částic silná 2 cm (ale pak sahá výška bujonu 5 cm nad povrch masa). Po zazátkování se sterilisuje autokláfováním při 120 °C; před autokláfováním se však zkumavky zahřívají 30 minut ve vroucí vodní lázni, za občasného protřepávání, aby se vypudily vzduchové bubliny. Kdyby se to neudělalo, pak by masové částice neutvořily souvislý sloupec na dně zkumavky. Inokulum zavádíme na dno zkumavky!

Hartleyův bujon 78

hovězí srdce nebo libové hovězí (bez tuku a jemně umleté)	1500 g
destil. voda	2500 ml
Smíchá se a zahřeje v parním sterilisátoru, až teplota dostoupí 80 °C. Pak se přidá:	
0,8% roztok natrium carbonicum sicc. (studeného) Na ₂ CO ₃	2500 ml

*) Místo pepsinu můžeme použít vepřových žaludků. Na uvedené množství masa potřebujeme jeden až dva čerstvé vepřové žaludky, které dobře očištíme, opláchneme vodou, jemně rozemeleme a přidáme k suspensi masa. Použití vepřových žaludků má dokonce tu přednost, že žaludeční sliznice obsahuje nedefinované růstové faktory pro řadu anaerobů.

**) Biuretová reakce: 5 ml tráveniny mírně zalkalisujeme N/20 NaOH a přidáme několik kapek velmi ředěného roztoku CuSN₄. Při pozitivní reakci vznikne flávové zbarvení. Utvoří-li se sraženina Cu(OH)₂, odfiltrujeme ji.

Reakce na tryptofan: 5 ml tráveniny se okyslí několika kapkami H₂SO₄ a přidá se několik kapek (1–3) 5% roztoku p-dimethylaminobenzaldehydu ve zředěné H₂SO₄.

Ochladí se na 45 °C a přidá se:

pankreatický extrakt podle Cole a Onslow	50 ml
chloroform	50 ml

Směs se pak inkubuje ve vodní lázni při 37 °C 6 hodin nebo při 45 °C 3 hodiny, za občasného protřepávání. Po ukončení trávení se přidá 40 ml konc. kyseliny solné (HCl) (chem. čistě), zahřívá 30 minut v páře a filtruje. Potom se pH upraví na 8,4 (fenolftalein) 5N louhem (NaOH) a zahřívá v páře 60 minut, aby precipitovaly fosfáty. Přefiltruje se za horka a nechá vychladnout. pH se upraví na 7,6 kyselinou solnou, rozplní podle potřeby a sterilizuje 20 minut při 120 °C v autoklávu.

Pankreatický extrakt (Cole a Onslow):

čerstvé vepřové pankreas (bez tuku a rozemleté)	500 g
destil. voda	1500 g
alcohol ethylicus 96%	500 g

Směs se promíchá ve velké zazátkované láhvi a nechá stát 3 dny při pokojové teplotě, za občasného protřepávání. Pak se přecedí přes mullu a filtruje přes papír. Filtrát se změní a přidá se chemicky čistě koncentrované kyseliny solné v množství 0,1 %. Tím vznikne precipitát, který sedimentuje během několika dní a může být odfiltrován. Je to však zbytečné. Extrakt vydrží v zazátkovaných láhvích měsíce. Používá-li se ihned, pak není třeba přidávat HCl, již se konzervuje trypsin.

Fildesův bujon s pepticky natrávenou krví 79

Směs 150 ml fyziol. roztoku, 6 ml čistě HCl, 50 ml defibrinované beraní krve a 1 g pepsinu se zahřeje na 55 °C v zazátkované láhvi na 2–24 hodin. Potom se přidá dostatek 20% roztoku NaOH (obyčejně kolem 12 ml), dokud vzorek směsi ředěný vodou nedává hypermanganové zabarvení s kresolovou červení. Potom se přidá čistá HCl po kapkách, až vzorek nemění barvu s kresolovou červení, ale jasně červeně se obarví červení fenolovou. Je nutno se vystríhat přebytku kyseliny. Přidá se 0,25 % chloroformu a důkladně se protřepe. Vydrží měsíce v zazátkované láhvi. Před upotřebením se zahřeje na 55 °C po dobu 30 minut, aby se odstranil chloroform, a přidává se k bujonu nebo agaru v množství 2–5 %.

Bujon s játry (anaeroby) 80

Morčecí, králíčí nebo telecí játra se rozkrájí na přiměřeně velké kusy, vloží do velké Petriho misky a koaguluji 30 minut v proudící páře. Po koagulaci se rozkrájí na kousky velikosti drobné fazole a vzhazují se po dvou až třech do zkumavek 14 × 18 mm. Pak se přelijí Vf bujonem (s peptonem) o pH 7,4 a autoklávuji 20 minut při 120 °C.

Mléko s redukováným železem (Spray) (anaeroby) 81

Čerstvé plnotučné (neegalované) mléko silně odcentrifugujeme, zbavíme smetanu a rozplníme do zkumavek 14 × 160 mm po 10 ml. Na dno zkumavek bylo předem nasypáno 0,05–0,1 g redukováného železa (pro analýsi). pH půdy kolem 6,8 – pH však neupravujeme. Sterilizace 20 minut při 120 °C. Po sterilizaci se ihned vychladí ve vodě. Nepoužíváme starší než 7–10 dnů. Lze připravit i ze sušeného mléka (100 g na 1000 ml destil. vody), avšak výsledky nejsou tak dobré jako s mlékem čerstvým.

Želatina (anaeroby) 82

želatina listková	50 g
pepton	10 g
natrium phosphoricum bibas. Na ₂ HPO ₄	2 g
glukosa	1 g
destil. voda	1000 ml

pH se upraví po rozpuštění za tepla na 7,4. Je-li třeba, filtruje se přes papír v proudící páře. Rozplňuje se do zkumavek 14 × 160 mm po 10 ml. Do zkumavek předem nasypáno po 0,05–0,1 g redukováného železa. Pro některé nesporulující jsou vhodné kousky jater, jako u bujonu s játry.

Mozková kaše (anaeroby) 83

Telecí nebo beraní mozky se zbaví plen a cév. Rozdrť se v turmixu nebo rozemelou na masovém stroju. Na 100 g mozkové tkáně se přidá 100 ml vody, přidá se 1 % peptonu a 0,1 % glukosy a vaří se zvolna 30 minut. Za důkladného míchání se rozplňuje po 10 ml do zkumavek 14 × 180 mm. Do zkumavek bylo předem nasypáno po 0,05–0,1 g redukováného železa. Sterilizuje se 30 minut při 120 °C v autoklávu. Před autoklávováním se doporučuje zkumavky zahřívát ve vroucí vodní lázni za občasného protřepávání 30 minut, aby se vypudil vzduch a sloupec mozkové tkáně zůstal souvislý. Po sterilizaci nutná kontrola sterility inkubací při 37 °C nejméně 24 hodin.

Půda z kukuřičné mouky pro klostridia butyl-butyrické skupiny (McClung a McCoy) (anaeroby) 84

50 g bílé nebo žluté kukuřičné mouky se suspenduje v 1000 ml vody. Zahřívá se v páře 60 minut za přítomnostiho třepání. Ochladí se na pokojovou teplotu, rozplní ve vysokých vrstvách do zkumavek a sterilizuje 45 minut při 120 °C v autoklávu. Půda drží anaerobiosu značně dlouho. Regenerace po 4–5 dnech.

Bramborová půda pro klostridia butyl-butyrické skupiny (McClung) (anaeroby) 85

Rozeleme se 200 g čerstvé okrájených brambor. Přidáme 1000 ml vody a zahříváme 30 minut v páře nebo pozvolna vaříme až vznikne řídká kaše. Potom přecedíme přes smaltovaný cedník, přidáme 5 g glukosy, 3 g uhlíkatu vápenatého CaCO₃ a 1 g síranu amonového (NH₄)₂ SO₄ doplníme na 1 l. Ochladíme a rozplníme za stálého míchání ve vysokých vrstvách do zkumavek tak, aby byly kousky brambor stejnoměrně rozděleny. Půda se dobře hodí pro sporulaci mikrobů butyl-butyrické skupiny.

Brewerova půda (anaeroby) 86

Lze připravit takto:

K Vf-bujonu (s peptonem*) přidáme 0,1 % thioglykolátu sodného, 0,05 % agaru, až do 1 % glukosy a 0,002 % methylenové modři (t. j. 1 : 500 000). Součástí rozpustíme za mírného zahřívání, upravíme pH na 7,4 a rozplňujeme po 12 ml do zkumavek 14 × 18 mm. Sterilizujeme autoklávováním při 120 °C za 20 minut a skladujeme za pokojové teploty.

Krevní plotny pro anaeroby 87

K Vf-bujonu s peptonem*) přidáváme 2–2,5 % agaru a 5–10 % defibrinované krve beraní, koňské nebo králíčí. Můžeme použít i krve citrátové (10 ml 10% roztoku citrátu sodného vysterilizujeme v láhvi, do které se má odebrat 500 ml krve).

Pro velice citlivé anaeroby, zejména nesporulující, je výhodné přidat 8–20% králíčí krve těsně před litím ploten odebrané kardiální punkcí. Rozléváme ve stejných vysokých vrstvách jako běžné krevní plotny.

Zeissler doporučuje přidat pro diagnostiku sporulujících anaerobů ke krevnímu agaru glukosu. 1 % je dostatečné množství.

Žlutková plotna (McClung, Toabe) (anaeroby) 88

Proteose-pepton č. 2 (Difco nebo jiný)	40,0 g
natrium phosphoricum dibas. Na ₂ HPO ₄	5,0 g
kalium phosphoricum monobas. KH ₂ PO ₄	1,0 g
kalium chloratum NaCl	2,0 g
magnesium chloratum MgSO ₄	0,1 g
glukosa	2,0 g
agar	25,0 g
destil. voda	1000,0 ml

pH se upraví na 7,6 a sterilizuje se 20 minut při 120 °C.

Nemáme-li k dispozici dobrý proteosový pepton, připravíme půdu z Vf bujonu,*) ke

*) Nebo jinému trávenému bujonu.

kterému přidáme 3 % peptonu Organofarma a ostatní součásti podle shora uvedeného předpisu; nepřidáváme však NaCl (a samozřejmě — také žádný další pepton). Na každých 90 ml sterilní a na 50 °C vychladlé pŮdy se přidává 10 ml žloutkové suspence: Čerstvá vejce se vydrhnou a spláchnou sublimátovým roztokem. Nechají oschnout. Bílek se odstraní a žloutek se vlije do sterilní nádoby, roztřepe, zředí stejným objemem fyziol. roztoku a promíchá po uzavření gumovou zátkou. Za sterilních podmínek vydrží suspence asi týden v lednici. Pak už ji nelze upotřebit. Rozlévá se do Petriho misek běžným způsobem.

Tvrdá agarová plotna (anaeroby) 89

K Vf bujoun se 3—4 % peptonu se přidá 4—5—6 % agaru, upraví na pH 7,2—7,4 a sterilisuje po rozpuštění v proudící páře autoklávováním 20 minut při 120 °C. Rozlévá se běžně do ploten.

Hloubkové agary (Veillon) (anaeroby) 90

K Vf bujoun s peptonem nebo i bez peptonu přidáme 0,8 % agaru a 0,25 % glukosy. Upravíme pH na 7,2—7,4 po rozpuštění součástí a za tepla rozléváme do zkumavek 8 × 180 mm tak, aby byly vrstvy agaru asi 7 cm vysoké. Sterilizujeme 20 minut při 120 °C v autoklávu.

Pro některé očitlivé nesporeující anaeroby, které v této běžné půdě nerostou, lze přidat globulární extrakt: Beraní krev se hemolysuje 4 objemy destil. vody. Na každou zkumavku se přidává po rozehrání a vychlazení na 50 °C po 0,5—1,0 ml.

PŮdy pro průkaz proteolysy (91—95) (anaeroby)

Alkalická vaječná půda (McClung) 91

2 žloutky a 4 bílky se emulgují v turmixu. Přidá se 1000 ml destil. vody a 12 ml N-NaOH. Znovu se důkladně promíchá v turmixu. Jeden díl suspence se smísí s pěti díly bujoun (s peptonem), rozplní do zkumavek ve vysokých vrstvách a autoklávuje se 20 minut při 120 °C. Půda je bělavě opaleskující. Proteolysa se projeví vyjasněním.

Mléčný agar k průkazu proteolysy (Reed a Orr) 92

Smícháme stejné množství sbíraného mléka (po případě rekonstruovaného z prášku) a agaru (Vf bujoun s agarem). Autoklávujeme odděleně a smícháme před naléváním. Proteolysa se projeví širokou čistou zónou kolem kolonie.

Agar k průkazu fibrinolysy (Christie a Wilson) 93

Smícháme 12 ml sterilní králičí plasmy se 100 ml sterilního agaru (Vf bujoun s peptonem a 2 % agaru). Zahříváme ve vodní lázni při 56 °C 10—15 minut, dokud se agar nezakalí do mírné opalescence. Pak se rozlévá do misek. Plotny se naočkují zkoumaným kmenem a inkubují (anaerobně) 48 hodin při 37 °C a pozoruje se, zda nevzniká vyjasnění kolem kolonií. To značí tvorbu fibrinolysinu.

Kostky koagulovaných bílkovin 94

Vaječný bílek nebo koňské serum se zředí stejným dílem destil. vody, vylije se do Petriho misky a koaguluje se v páře při 80—90°. Po koagulaci se nakrájejí skalpelem kostky 5 × 5 mm, vhažují do zkumavek s Vf bujounem (nebo jiným) a sterilisuje se v autoklávu 20 minut při 120°.

Tekutá půda s vaječným bílkem (Reed) 95

K bujoun (Vf nebo jinému — s peptonem) se přidá 5—8 % vaječného bílku (nebo 8—10 % koňského sera). Promícháme v turmixu několik vteřin, necháme ustát pěnu, rozplníme ve vysokých vrstvách do zkumavek a autoklávujeme 20 minut při 120 °C. Proteolytický kmen půdu vyjasní.

PŮda pro kultivaci D. pneumosintes a spirochet (Smith a Noguchi) 96 (anaeroby)

K 10 ml sterilního ascitu nebo koňského sera (zředěného fyziol. roztokem v poměru 1 : 8) ve zkumavce se přidá část čerstvé a sterilně odebrané králičí ledviny nebo varlete, přelije se vrstvou parafinového oleje a očkuje. Lze přidat sterilní roztok thioglykolátu sodného, aby jeho konečná koncentrace byla 0,1 %. Polotuhá Noguchiho půda: 2 díly živného agaru se zředí 1 dílem sterilního ascitu a rozplní se do sterilních zkumavek obsahujících část sterilně odebrané králičí ledviny.

Základní půda pro stanovení kvasných vlastností (anaeroby) 97

Je 2% peptonová voda, ke které přidáme 0,25 % agaru a 1 % zkoušeného uhlodihydrátu, alkoholu či jiného substrátu. pH se upraví na 7,4. Autoklávujeme 15 minut při 115 °C. Pouze xylosu, arabinosu, levulosu a maltosu přidáváme ve formě 10% vodného roztoku sterilizovaného filtračí. Samozřejmě, že se půda plní ve vysokých vrstvách, očkuje se až ke dnu a pro běžné anaeroby není třeba uzavírat vaselinou ani parafinovým olejem. Indikátor se přidává až po skončení kultivaci, t. j. nejčastěji za 48 hodin. Nejlépe se osvědčila směs indikátorů: 0,04% lihový roztok bromthymolové modře se stejným dílem 0,02% lihového roztoku methylenové červeně. Při slabším okyselení (pH kolem 6,2) se indikátor zabarví žlutě, při pH pod 5 červeně. V případě, že se chceme o reakci pŮdy přesvědčit během růstu, odpipetujeme část kapilární pipetou a reakci provedeme na hodinovém sklíčku.

PŮda pro zjištění tvorby NO₂ z NO₃ (anaeroby) 98

Pepton Organofarma 2%; fosforečnan sodný střední (Na₂HPO₄) 0,2%; glukosa 0,1%; agar 0,1%; dusičnan draselný (KNO₃) 0,1% v destil. vodě. Upraví se na pH 7,4. Rozplní se ve vysokých vrstvách a autoklávuje 15 minut při 120 °C.

Test: Při pozitivním růstu (nejčastěji po 48 hodinách kultivace) se přidá ke zkumavce několik kapek ředěné kys. sírové (H₂SO₄) a několik kapek roztoku jodidu draselného ve škrobovém mazu (ke 2% škrobovému mazu se přidá 1% KJ. Roztok nevydrží dlouho — je lépe vždy připravit čerstvý). Zmodrání, až zčernání značí pozitivní test (tvorbu NO₂).

PŮda pro zjištění tvorby indolu a skatolu (anaeroby) 99

Tryptonu Difco 2%; fosforečnanu sodného středního (Na₂HPO₄) 0,2%; glukosa 0,1%; agar 0,1% v destil. vodě. pH se upraví na 7,4, rozplní ve vysokých vrstvách do zkumavek a sterilisuje se 15 min. při 120 °C v autoklávu. Nemáme-li k dispozici trypton, použijeme jiného peptonu, připraveného tryptickým nadržáním. Musíme však vyzkoušet, zda sterilní půda nedává již pozitivní reakci a zda na př. E. coli je schopna z daného peptonu indol tvořit. Jako základu můžeme však velice dobře použít Hartleyova bujoun (půda č. 78, str. 65), k němuž přidáme glukosu a agar v uvedeném množství.

PŮdu není třeba pro běžné anaeroby uzavírat vaselinou.

Provedení testu (Roesler, McClung):

Po 48hodinové inkubaci přeneseme kapilární pipetou 2 kapky kultury ode dna zkumavky na hodinové sklíčko, podložené bílým papírem. Přidáme 2 kapky roztoku vanilinu a 3 kapky konc. HCl. Tvoří-li mikrob indol, vznikne oranžové zabarvení. Je-li přítomen skatol, zabarví se zkouška fialově. Fialová barva skatolu se změní po přidání 1 kapky 0,1% NaNO₂ na temně purpurový tón, kdežto barva indolu se nemění. Hodinové sklíčko po provedení testu autoklávujeme.

Roztok vanilinu: 5% vanilinu v 95% ethanolu.

PŮda pro zjištění tvorby H₂S 100

PŮda 1: (Reed, Orr) Proteose-pepton 2%; fosforečnanu sodného středního (Na₂HPO₄) 0,2%; glukosa 0,1%; agaru 0,2% v destil. vodě. pH upravíme na 7,4 a na 1 litr přidáme 10 ml roztoku citronanu vismutito-amonného v destil. vodě (1,5% roztok). Rozplníme ve vysokých vrstvách a autoklávujeme 15 minut při 120°.

Půda 2: Základem je kterýkoli natrávený bujon (Vf bujon, Fildesův, Hartleyův), k němuž bylo přidáno fosforečnanu sodného středního (Na_2HPO_4) 0,2%; glukosy 0,1%; agaru 0,2%. Rovněž přidáváme 1,5% roztok citronanu vismutito-amonného v uvedeném množství nebo 0,02% octanu olovnatého. Při užití 0,02% octanu železitého se půdy značně zkalují. Positivní test: černání půdy buď v celém sloupci nebo u dna.

Mléčný bujon pro kultivaci botulinických klostridií (anaeroby) 101

bujon (Vf, Hartleyův nebo Fildesův) — s 2% peptonu	1000,0 ml
sušené mléko	50,0 g
glukosa	2,0 g
natrium phosphoricum monobas. $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	8,0 g
kaliium phosphoricum monobas. KH_2PO_4	1,0 g

pH se upraví na 7,4 před sterilisací. Přefiltrujeme přes mul. Rozlijeme jednak po 180 až 200 ml do „neutrálků“ o obsahu 250 ml a do zkumavek 14×180 mm po 10–12 ml. Nikdy nepoužíváme tenkostěnného skla! Sterilizace v autoklávu 20 minut při 120 °C. Ihned po sterilisaci ochladit ve studené vodě a očkovat.

Půdy pro diagnostiku anaerobních mikrokoků (Douglas, Foubert) (anaeroby) (102–103)

Půda pro zjištění zkvašování mléčnanu nebo glucidů 102

Pepton Difco (nebo jiný)	20,0 g
Kvasničný extrakt (Difco nebo jiný)	20,0 g
mléčnan sodný (nebo glucid)	10,0 g
Thioglykolátu sodného	1,0 g
methylenová modř	2,0 mg
destil. voda	1000,0 ml

pH se upraví na 7,3 před sterilisací. Rozplní se ve vysokých vrstvách a autoklávuje 20 minut při 120 °C.

Po inkubaci se přidá kapka indikátoru, jehož složení uvedeno u popisu půdy pro zjišťování kvasných vlastností (viz str. 69, půda č. 97).

Půda pro stanovení tvorby plynu z peptonů (anaeroby) 103

Má stejné složení jako předchozí, ale bez mléčnanu sodného (nebo glucidu) a s 0,8% agaru. Po rozehrání sterilní půdy patřičně ochlazené se naočkuje zkoumaná kultura, důkladně se zamíchá a vychladí ve studené vodě. Tvorba plynu se pozná podle bublin vzniklých během růstu.

Poloselektivní půdy pro pomnožování mikrobů blízkých aktinomycetám 104

K 10 ml půdy (Vf bujon s játry, Vf s glukosou, Hartleyův bujon, Robertsonova půda a j.) čerstvě regenerované a ochlazené přidáme 0,1–0,2 ml 1% roztoku anilínových barviv (krystalová violet, methylenová modř, malachitová nebo gentianová zeleň). Konečná koncentrace barviva je 1 : 10 000–1 : 5000. Ihned po přidání barviva očkujeme a zalepíme rozehrátou vazelínou. Pro jedno inokulum lze užít několika ředění — po případě i ředění vyšších. Během kultivace se půdy často částečně odbarvují.

Hodí se zejména pro fusobakterie a leptotrichy, nekrobakterie a borrelie. Též aktinobakterie lze s úspěchem pomnožovat — ovšem nikoli ve zcela čisté kultuře. Po několika dnech kultivace vyočkováváme na krevní plotnu inkubovanou v anaerobiose.

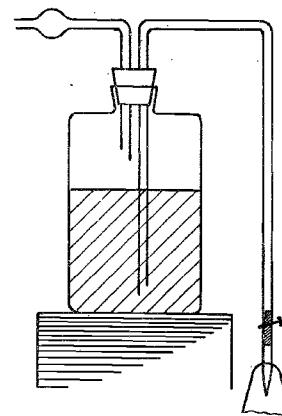
Bramborová půda 105

Zdravé brambory se dobře očistí a rozkrájí na řezy, které se na 60–120 minut ponoří do roztoku (1%) sody. Po osušení se vloží do Rouxových zkumavek, dole zaškrácených, a sterilizují se 20 min. v autoklávu při 120 °C.

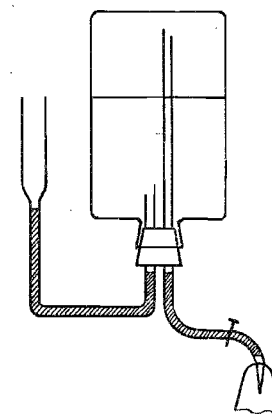
Glycerinované brambory

106

Řezy připravené jako u půdy č. 105 se ponoří na 48 hod. do vody nebo bujonu s 5–6 % glycerinu. Pak se vloží do Rouxových zkumavek a aby nevysychaly, přilije se něco glycerinového bujonu, který zůstane v zaškrácené spodní části zkumavky. Sterilizuje se 20 min. v autoklávu při 120 °C.



Obr. 3. Kompletní rozplňovací násoskový přístroj, skládající se ze vzdušného vatového filtru, zásobní láhve na sera, z násosky a zvonečku.



Obr. 4. Improvisovaný rozplňovací přístroj zhotovený z Erlenmayerovy baňky.

Tekutá ascitová půda podle Šuly (Mycobacterium tbc) 107

Základní roztok:

natrium phosphoricum dibas. $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	1,25 g
kaliium phosphor. monobas. KH_2PO_4	0,75 g
magnesium sulphuricum $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,25 g
natr. citricum	1,25 g
ferriammonium citricum	0,025 g
casein hydrolysat 10% IG	25 ml
glycerol bidest. spec. váha 1,26	15,00 ml
0,2% vodný roztok malachitové zeleně	1 ml
destil. voda	1000 ml

Po rozpuštění solí základní roztok autoklávuje 30 min. při 120 °C a k chladnému přidáme za sterilních kautek 100 ml sterilní ascitové tekutiny o obsahu nejméně 1 % bílkoviny, měřeno podle Esbacha. Půda se musí rozplnit za přísně sterilních podmínek, nejlépe rozplňovacím aparátem (viz obr. 3), pokud je to možné, ve zvláštním boxu. Prakticky vystačí i improvisace se zásobní láhví (viz obr. 4).

Do zkumavky se rozplňuje tekutá půda po 5 ml a potom se pro kontrolu sterility ukládá na 48 hodin do termostatu 37 °C a část těchto zkumavek na 48 hodin do pokojové teploty. Serii půd, které se zalkalily buď v pokojové teplotě, nebo v termostatu, vyřazujeme. Slabé vyvolčování po zkoušce sterility, je-li jinak půda širá, není na závadu, ale ztěžuje spolehlivost makroskopického odečítání kultur.

Koncentrovaná půda pro kultivaci tbc 108

Koncentrát připravovaný Výzkumným ústavem tuberkulózy a rozeseřilý bakteriologickým laboratořím obsahuje všechny chemikálie a ascites v 10násobné koncentraci. Ascites je nahrazován hovězí plasmou, hovězím serem nebo lidským sérumalbuminem. Před rozplňo-

váním se koncentrát ředí 1 : 10, t. j. 1 láhev à 100 ml koncentrátu + 900 ml sterilní destil. vody (autoklávované). Po ředění ukládáme láhev s půdou na 24 hodiny do termostatu při teplotě 37 °C a potom na 24 hodiny do pokojové teploty. Teprve potom půdy rozplňujeme do zkumavek (stejně jako tekuté Šulovy půdy). Půda se serumalbuminem je vždy naprosto čirá (má jiskru), kdežto půda s hovězím serem se ihned po sliti s vodou mírně zakalí. Tento zákal po inkubaci v termostatu sedimentuje. V půdách s hovězí plazmou nebo ascitem se někdy vytváří fibrinová vločka. Je-li již koncentrát zakalen v originální lahvičce nebo obsahuje-li vločky, je nutno jej do destil. vody přefiltrovat přes Seitzův filtr o průměru 6 cm. Používá-li se větší Seitzův filtr (o průměru 14 cm), je velká ztráta malachitové zeleně na filtrační vložce a k ředící vodě musíme pak přidat patřičné množství malachitové zeleně, t. j. 0,5 ml 0,15% vodného roztoku na 1000 ml půdy. Při přípravě půd z koncentrátu je nutno dodržovat nejpřísnější podmínky aseptické práce.

Sautonova půda (BK)	109
Asparagin	4,0 g
Glyceol	60,0 g
acid. citricum	2,0 g
kaliium phosphoricum bibas. K ₂ HPO ₄	0,5 g
magnesium sulphuricum MgSO ₄	0,5 g
ferro ammonium citricum	0,05 g
destil. voda	1000,0 ml

Vaječná půda s kaseinovým hydrolysátem (modifikace Loewenstein-Jensen-Holm) **110**

Základní roztok	
kaliium phosphoricum monobas. KH ₂ PO ₄	4 g
magnesium sulphuricum MgSO ₄	0,4 g
Natriumcitricum	1,7 g
Hydrolysát kaseinu 10%	50,0 g
Glycerol (bidestil.) spec. váha 1,26	20,0 ml
destil. voda (bidestil.)	1000,0 ml

Příprava půdy:

600 ml základního roztoku se autoklávuje 30 min. při 120 °C, potom se ochladí. Láhev s roztokem soli se dá do vodní lázně, přidá se 30 g bramborové moučky (škrobu) a opatrně do stálého míchání se zahřívá až do varu, čímž se vytvoří hustá křehká suspenze. Potom se vaří ještě 15 minut, ochladí se na 56 °C a přidá se 1 l rozšlepaných vajec (asi 22). Vajíčka musí být čerstvá, a to nejlépe od slepic krmných zeleným. Nevhodná vejce jsou chlazená, neboť uvolněné mastné kyseliny ve starších nebo konzervovaných vejcích mají silný inhibiční vliv na BK, takže půdy z těchto vajec připravované poskytují vesměs negativní výsledky. Vajíčka důkladně očištíme v mýdlové vodě kartáčkem, potom je otíráme 96% alkoholem, necháme zaschnout a skořápku otevřeme sterilní pinsetou a vajíčka vypustíme do neutrální láhve s perličkami. Do nádoby dáváme vajíčka jedno po druhém za stálého míchání, aby se dokonale promíchala. Vaječnou homogenní suspenzi přidáme k základnímu roztoku se škrobem a přidáme k celému obsahu 10 ml 1,5% vodného roztoku malachitové zeleně a dokonale promícháme. Asi po 30 min. stání se mění tmavozelená barva na žlutozelenou a bubliny vzduchu se zachytí v pění na povrchu půdy. Rozplňujeme po 5 ml do zkumavek, které uzavíráme zátkami z buničité vaty. Srážení se provádí v šikmé poloze proudící parou v Arnoldově přístroji, a to prvých 10 min. při 85 °C, dalších 20 min. při 80–82 °C. Po správné koagulaci má ve zkumavkách zůstat trochu kondenzační vody. Překročení koagulační teploty má za následek denaturaci bílkovin, která podstatně snižuje citlivost půd. Při nedosažení koagulační teploty jsou půdy měkké a nedají se pro očkování použít. Povrch musí být zrcadlově lesklý a barva slabě zelená. Prasklé bubliny na povrchu a bubliny uvnitř půdy jsou známkou převaření. K očkování použijeme půdy do 14 dnů po jejich přípravě, později rychle klesá jejich citlivost.

Tekutá půda pro kultivaci L-organismů **111**

bujon z hovězích srdcí (pH 7,8)	1000 ml
pepton (protease 3 Difco)	10 g
NaCl	5 g

Od obvyklé přípravy se liší tím, že je nutno použít redestil. vody ze skla, aby % zachycených kmenů bylo větší. Je-li to možné, má se nechat rozemleté maso ve vodě 1–2krát zmrazit, aby macecace byla vydatnější. Před naočkováním se obohatí 5–10 % nativního koňského sera, inaktivovaného před tím 30 minut při 56 °C nebo 20–25 % ascitu.

Tuhá půda pro záchyt L-organismů **112**

1,5 % serový nebo ascitový agar z bujony (viz půda č. 107). Přidává se 10 % koňských krvínek.

Sabouraudova půda (mykologie) **113**

glukosa	30 g
pepton	10 g
agar	30 g
destil. voda	1000 ml
pH 7,0–7,2	
Autoklávujeme 60 minut při 0,5 atm. Po rozlití do zkumavek nebo na plotny znovu autoklávujeme 30–45 minut při 0,5 atm.	

Vaječná půda Dorset-Sautetova (parasitologie) **114**

Slepíčí vajíčko se na povrchu důkladně opere v 80 % alkoholu s několika kapkami jodové tinktury, na obou koncích se udělá otvor do skořápky, obsah se nechá vytéci do sterilní baňky obsahující 25 ml Ringerova roztoku (str. 685) a protřepá se skleněnými perličkami. S touto půdou plníme přes sterilní gáz menší zkumavky do výše asi 3 cm. Naplněné a vatou uzavřené zkumavky položíme šikmo do horkovzdušného sterilisátoru a zahříváme je asi 60 minut na 70–80 °C. Při této teplotě půda koaguluje a zároveň se usmrtí většina bakterií a plísní, které se náhodou dostaly do půdy. Pasteuraci můžeme také ještě jednou nebo dvakrát opakovat. Je dobře dát půdy mezi oběma pasteuracemi na noc do lednice. Vydrží řádk velmi dlouho.

Před upotřebením převrstvíme utuhlou vrstvu asi 2–4 ml sterilního Lockeého roztoku, a očkujeme materiál s cizopasnými prvky.

Lockeého roztok:

Dextrosa	0,2–0,5 g
natrium bicarbonicum NaHCO ₃	0,2 g
kaliium chloratum KCl	0,4 g
magnesium sulphuricum MgSO ₄	0,1 g
natrium chloratum NaCl	6–9,0 g
destil. voda	1000 ml

Koagulované serum podle Dobell-Leidlawa (parasitologie) **115**

Menší zkumavky plníme do výšky 2–3 cm lidským nebo koňským sterilním serem (4 díly sera, 1 díl tlumivého roztoku), uzavřeme zátkou a v šikmé poloze koagulovat při 70–80 °C po 60 minut. Pasteuraci příštího dne ještě opakujeme, převrstvujeme ředěným bílkem nebo serem jako při vaječné půdě.

Tlumivý roztok (Ringerův):

natrium chloratum NaCl	6 g
calcium chloratum CaCl ₂	0,1 g
magnesium chloratum MgSO ₄	0,05 g
kaliium chloratum KCl	0,1 g
kaliium phosphor. dibasic. K ₂ HPO ₄	3,0 g

Po rozpuštění se přidá tolik N/10 NaOH, aby pH bylo 7,2–7,4, celkem asi 18–24 ml.

Serový agar Westphalův (parasitologie) **116**

A. *Pevná složka* sestává ze 3 dílů 2% agaru, obsahujícího 0,5 % peptonu a 1 dílu lidského krevního sera. Agar se rozvaří ve vodní lázni a po ochlazení na 50–60 ° se smíchá se serem

a hned plní do sterilních zkumavek do výše 2–3 cm. Půdy necháme ztuhnout při pokojové teplotě v šikmé poloze, načež je koagulujeme při 70–80 °C, což ještě příštího dne opakujeme.

B. *Tekutá složka se připraví takto:*

25 ml lidského nebo koňského sera ředíme 25 ml tlumivého Ringerova roztoku o pH 7,2–7,4 (půda 115) a zahříváme ve vodní lázni po dobu 30 minut. Koagulát roztřepeme ve směsi 75 ml Ringerova roztoku se stejným objemem destil. vody a znovu zahříváme ve vodní lázni 30 minut. Po vychladnutí filtrujeme vše vatou, rozdělíme do menších baněk a znovu 2krát varem sterilisujeme.

Před naočkováním navrstvíme na složku A sterilní pipetou 2–4 ml složky B.

Půda pro kultivaci trichomonad

117

bujon (pH 6,0)	90 ml
čerstvé serum	10 ml
penicilin	50 000 j.

Korthofova půda (leptospiry)

118

Pepton Witte	0,8 g
natrium chloratum NaCl	1,4 g
natrium bicarbonicum NaHCO ₃	0,02 g
kalium chloratum KCl	0,04 g
calcium chloratum CaCl ₂	0,04 g
kalium phosphor. monobas. KH ₂ PO ₄	0,2 g
natrium phosphor. dibas. NA ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	1000,0 ml
destil. voda	

Roztok sterilisujeme po 3 dny vždy po 30 minut při 110 °C a po každé po vychladnutí zfiltrujeme filtračním papírem. Pak rozplníme do zkumavek po 4–5 ml, znovu sterilisujeme 3 dny po sobě vždy 60 minut při 100 °C. Nakonec přidáme do každé zkumavky 0,5 ml sterilního králičího sera, které jsme napřed vyzkoušeli, že na něm leptospiry rostou, a hotovou půdu ve zkumavkách pasteurujeme po 3 dny vždy 60 minut při 56 °C. Leptospiry rostou lépe na seru, které nebylo filtrováno bakteriálními filtry.