

ŽIVNÉ PŮDY

Kvalita a volba vhodných kultivačních půd je jedním ze základních faktorů majících vliv na konečný výsledek mikrobiologické diagnostiky. Kvalitou živného prostředí rozumíme jednak citlivost, hodnocenou schopností dát vyrůst minimálnímu inokulu, dále standardnost s plně reprodukovatelnými výsledky a konečně skladovatelnost. Sestavení dobré kultivační půdy je výsledkem až i mnohaleté práce a zkušeností. Oproti tomu je však v naší i cizí literatuře popsána řada nejrůznějších modifikací, které nejsou výsledkem systematické práce, nýbrž mají do značné míry charakter empirismu a tradičních analogií. A tak v dnešní praxi zůstává, bohužel, stále ještě volba některých živných půd záležitostí osobních zkušeností diagnostikujícíchho.

Stále častěji a důrazněji vyžadovaná standardisace mikrobiologické diagnostiky vede samozřejmě i ke snaze o zavedení standardních živných půd. Pokud nemáme půdy sušené, musíme se snažit zajistit standardnost správným a jednotným postupem při přípravě půd podle skutečně dobrých a vyzkoušených receptů, s použitím chemikálií domácí proveniencie nebo u nás snadno dostupných.

Základní složky živných půd

Voda

Voda je vehikulem všech živných půd. Přitom značná část receptur zásadně předpisuje destil. vodu. Tento požadavek je rozhodně na místě u půd, které slouží ke studiu biochemických dějů. Při přípravě obecných půd však užíváme obyčejné vody vodovodní nebo studniční, protože použití destil. vody by bylo celkem bezúčelné a zbytečně by zvyšovalo režii. Je ovšem samozřejmé, že nemůžeme použít vody s vysloveně vysokým obsahem solí kovů, volné kyseliny uhličitě, většího množství chloridů atd.

Chemikálie

Chemikálie, užívané při přípravě půd, mají být chemicky čisté. Analytická čistota se požaduje u všech substancí, používaných v přípravě minerálních půd, neboť na př. chlorid sodný velmi často obsahuje soli hořčíku a vápníku. Rovněž u cukrů je nutná naprostá čistota preparátu. To se týká zejména disaccharidů a polysaccharidů, které mohou být znečištěny glukosou. Zásadně má receptura uvádět u krystalických solí také krystalovou vodu. Máme-li sůl jinak hydratovanou, musíme si navážku přepočítat. Hygroskopické látky (CaCl_2) se před vážením suší.

Pepton

Peptony jsou hydrolytické produkty bílkovin buď živočišných, méně častěji rostlinných. Vyrábějí se z masa, krevního sera, fibrinu, kaseinu, želatiny a řady jiných produktů většinou enzymatickým trávením.

Kyselá hydrolysa je levná, produkt má hodně aminokyselin (kromě tryptofanu), téměř všechny růstové faktory a málo peptidů. Kyselý hydrolyzáát, připravovaný kyselinou solnou, obsahuje značné množství chloridu sodného, je-li připravován kyselinou sírovou, může obsahovat zbytky iontů Ba^{++} nebo SO_4^{--} . Těto skutečnosti si musíme být při přípravě půdy vědomi.

Enzymatický hydrolyzáát je rozštěpen mnohem méně. Proto aminokyselin je relativně méně, tryptofan je obsažen, množství peptidů je mnohem větší, růstové faktory jsou všechny. K hydrolyse užíváme ponejvíce pepsinu nebo trypsinu. Mezi peptony, získanými peptickým nebo tryptickým trávením, jsou značné rozdíly. Zatím co pepsinové jsou odbourány jen jednoduché bílkoviny, jde štěpení trypsinem značně hlouběji a vede až k aminokyselinám.

Otázka použití dobrého, lépe řečeno vhodného druhu peptonu, je při přípravě půd velmi důležitá. Tak na př. ne všechny druhy peptonů jsou vhodné pro přípravu basálního media pro fermentační testy. Mnohé z nich totiž obsahují zkvasitelné složky, které pak mohou vést ke klamně pozitivním výsledkům (*H. D. Vera*). Rovněž vizmut-sulfitový agar podle Wilson-Blaira, připravený s nejlepšími a nejdražšími peptickými peptony Witte, Bacto, Proteose a Fairchil (*W. Biechteler*), neukazoval tak zřetelnou elektivitu a schopnosti redukční jako půda připravená z lacinějších druhů peptonů tryptických (Merck). Totéž platí o půdě Hottingerově, kde prokazujeme indol, vznikající přeměnou tryptofanu. I peptony, dávající chemicky silnou pozitivní reakci na tryptofan, nám ještě nezaručují, že budou vhodným substrátem pro průkaz tvorby indolu. Rovněž tak dosud nevíme, která forma zdroje síry je nejvhodnější pro optimální produkci sirovodíku. Z toho všeho je zřejmá důležitost volby vhodného druhu peptonu.

U nás se bohužel pro bakteriologické účely vyrábí dosud jen jeden druh peptonu (pepton Organofarma).

Jiným požadavkem je standardnost. Tu lze zajistit jen přesným dodržováním výrobního postupu. Musí být zajištěn standardní materiál pro fermentaci, a to substrát i fermenty, teplota, doba trávení atd.

Maso

Pro většinu nejužívanějších půd je výchozím materiálem odvar z masa. Nejlepší je maso telecí, všeobecně se však užívá maso hovězího. Koňského masa není možné vždy použít, neboť obsahuje dosti glukosy a glykogenu, což nutno uvážit při použití bujonu z koňského masa pro kvasné zkoušky.

Daleko hodnotnější jsou bujony připravené trávením masa. K tomu účelu používáme pepsinu nebo trypsinu. Jak už byla zmínka při způsobech výroby peptonů, obdobně i zde peptické trávení probíhá při značně kyselé reakci

(pH 1–2) a nejde tak do hloubky, jako je tomu u trávení tryptického, které probíhá při reakci zásadité (pH 8,5–9,5). Trávíme-li při 37 °C, trvá proces přibližně tři dny. Při peptickém trávení kyselá reakce zabrání, aby půda přerostla, jinak je tomu u druhého způsobu trávení. Abychom tomu zabránili, přidáváme k půdě toluen nebo chloroform. Při použití toluenu však musíme vzít chemikálii se zaručenou čistotou, bez netěkavých zbytků. Skončení stravovacího procesu nám ukáže biuretová reakce na bílkoviny, u tryptického trávení navíc ještě reakce na tryptofan. Zde je nutno upozornit na důležitost alespoň 10–15minutového povaření půdy před trávením, kterým se zničí antitrypsin. Dnes existuje řada receptů na přípravu bujonů trávením masa. Některé jsou více, jiné méně dobré. Příkladem dobrého bujonu, získaného peptickým trávením hovězího masa a jater, je Vf bujon. Rovněž dobrý, v zahraničí často užívaný, je Martinův bujon. Ovšem překážkou proti všeobecnému používání těchto půd, zvláště v rutinních poměrech, je skutečnost, že tyto půdy nejsou standardní.

Jiné zdroje bílkovin

Podobným způsobem jako peptony se připravují i kaseinové hydrolyzááty. Enzymatické hydrolyzááty si může každá přípravná docela dobře připravit sama, kdežto kyselá hydrolysa je složitější.

U kvasnicových extraktů musíme vždy uvážit, co od nich očekáváme, a podle toho volit výrobní postup. Slouží-li pouze jako zdroj dusíku nebo některých vitaminů, mohou se připravovat varem, mají-li však dodat půdě složitější růstové faktory, musíme hledat postup daleko šetrnější (frakcionované zmrazování nebo vysolování).

Z rostlinných zdrojů bílkovin, kterých se používá při přípravě živných půd, jsou to nejčastěji soja a některé luštěniny. Ačkoli vyšlo několik prací, na př. od *Kausche* a *Weisze*, o soje jako plnohodnotné náhražce masa, přece hledíme na tuto náhradu dosti skepticky, neboť víme, že mimo jiné je chudá na methionin a na labilní $-CH_3$ skupiny vůbec.

Omezení rostlinných půd vyplývá už z toho, že parazitické mikroorganismy, pathogenní pro člověka a zvíře, jsou zvyklé čerpat polypeptidy z živočišných bílkovin, takže rostlinná bílkovina, která má polypeptidické řetězce jinak sestavené, je pro ně méněcenná. Kromě toho je u rostlinných bílkovin poměr aminokyselin zcela jiný než u bílkovin živočišných.

Úprava reakce živných půd (pH)

Reakci půd můžeme měřit buď kolorimetricky nebo kompenzační methodou elektrochemickou. Kolorimetricky měříme s pomocí indikátorů, a to tak, že srovnáváme zabarvení dosažené přidáním určitého indikátoru s normální stupnicí, odpovídající určité hodnotě pH, s pomocí komparátoru nebo foliového kolorimetru. V běžné praxi nejčastěji užíváme indikátorů o poměrně úzkém rozmezí barevných přechodů (methylová červeň 4,4–6,0, bromthymolová

modř 6,0—7,6, fenolová červeně 6,8—8,4). Z nich zvláště poslední dva, které patří ke skupině sulfoftaleinů, jsou indikátory s velmi ostrými barevnými změnami, a proto velmi vhodné pro kolorimetrická měření. Další jejich výhodou je relativně nízká toxicita neinhibující růst mikroorganismů, takže do půd, které jsou určeny pro zjišťování fermentačních schopností, se přidávají ještě před naočkováním. Změna barvy indikátoru značí změnu pH a tím i přítomnost fermentů zkvašujících substrát.

Protože všechny sulfoftaleiny jsou dosti silnými kyselinami, je pro získání přesných hodnot pH lépe neuzívat alkoholických roztoků těchto volných kyselin, ale vodných roztoků sodných solí, jejichž vlastní pH je přibližně neutrální a nemá vliv na pH měřeného vzorku:

bromthymolová modř	0,1 g
0,01 N-NaOH	16 ml
destil. voda	do 250 ml
fenolová červeně	0,1 g
0,01 N-NaOH	16 ml
destil. voda	do 250 ml

Indikátorové papírky mají některé výhody. Jejich použití je snadné a rychlé; potřebují minimální kvanta tekutiny a může se jimi měřit pH i v tuhých půdách. Jejich citlivost je však dána tolerancí $\pm 0,5-1,0$ a tato malá přesnost omezuje jejich použití jen k předběžnému zjišťování pH.

Nejsprávnější je přesná úprava reakce živných půd elektrometricky, zejména při stanovení pH neustojných tekutin (destil. voda, fysiolog. roztok atd.), dále u půd s vyšším obsahem proteinu a značnějším procentem soli (u barevných indikátorů se pak uplatňuje t. zv. proteinová a solná chyba indikátoru) nebo silně zbarvených. U tuhých půd však tato metoda vyžaduje speciální elektrody pro měření v horkých roztocích.

Úpravu reakce živných půd provádíme na stranu alkaličnou buď 20% roztokem obyčejné sody, která zároveň působí jako slabý nárazník, nebo roztokem sodného louhu. Na stranu kyselou roztokem kyseliny chlorovodíkové.

Sterilizace

Prostředky, jimiž dosahujeme sterility, mohou být buď fyzikální nebo chemické. Při přípravě živných půd se používá až na nepatrné výjimky fyzikálních prostředků, z nichž neúčinnější je teplo. Toho můžeme užít buď ve formě suchého nebo vlhkého tepla. Suché teplo je méně účinné, zejména v koagulovatelném prostředí, které se vyšší teplotou sráží, a chrání tak mikroba i spory před jeho dalším pronikáním. Suchá sterilizace se provádí v horkovzdušných sterilisátorech při teplotě 160—180 °C po 120 minut. Sterilizovat můžeme jen předměty, které snášejí horký vzduch beze škody a musí být naprosto suché (Petriho misky, pipety, zkumavky atd.).

Sterilizaci vlhkým teplem (parou) provádíme jednak v páře pod tlakem (autokláv), jednak v proudící páře (Arnoldův přístroj). Sterilizace nasycenou parou za atmosférického tlaku, t. j. při teplotách vyšších než 100 °C, je

nesporně nejdokonalejším sterilizačním prostředkem. Stupeň tlaku se určuje v atmosférách nebo se vyjadřuje ve stupních dosažené teploty. Závislost tlaku (přetlak v atm/cm²) na teplotě ukazuje tabulka, doplněná odpovídajícími hodnotami v anglosaských jednotkách (libry/palec², °F).

Tabulka 1. Přepočítávání tlaků a teplot

°C	mm Hg (včetně atmosférického tlaku)	Atmosféry *) (přetlak)	Pounds/inch sq. (včetně atmosférického tlaku)	°F	Pounds/inch sq. (přetlak)*
100	760	0,00	14,696	212	0,00
105	906,07	0,19	17,521	221	2,83
110	1074,56	0,41	20,779	230	6,08
115	1267,98	0,67	24,519	239	9,82
120	1489,14	0,96	28,795	248	14,10
125	1740,93	1,29	33,664	257	18,97

*) = hodnoty čtené na manometru.

Sterilizace v páře při 120 °C po dobu 20—30 minut je dostačující. Není účelné při sterilizaci půd tuto teplotu překračovat, neboť příliš vysoké teploty či dlouhodobá sterilizace půdám škodí. Sterilizační doba kolísá s velikostí sterilizovaných kvant. Větší nádoby se pomalu prohřívají, právě tak jako zkumavky, jsou-li uloženy v košíčku těsně jedna vedle druhé a pára nemá se všech stran ke zkumavce volný přístup.

Sterilizace parou za obyčejného tlaku se provádí v parním kotli, v t. zv. Kochově hrnci nebo v jeho moderní podobě, v Arnoldově přístroji při teplotě 100 °C po 120—180 minut nebo lépe 3 dny po sobě vždy 20—30 minut. To je t. zv. přerušovaná či fracionovaná sterilizace.

Některé půdy nesnášejí zahřátí až na 100 °C. V tom případě užíváme sterilizaci při nižších teplotách opakovaným zahříváním na vodní lázni. Vaječné půdy se sterilizují při 80—85 °C (Dorsetova půda), koagulované krevní serum při 67—75 °C. Má-li zůstat bílkovina v půdě nativní, provádí se sterilizace opakovaným zahříváním na 56 °C. V těchto případech už nejde o sterilizaci, nýbrž pasteuraci, a proto musí být příprava aseptická a po „sterilizaci“ se půdy inkubují v termostatu a přerostlé vyřadí.

Některé půdy není možno sterilizovat ani fracionovaně za snížené teploty (půda pro průkaz ureasy). Takové se sterilizují filtrací přes bakteriální filtr a potom se už jen sterilně rozplní.

Z chemických sterilizačních prostředků je velmi účinný ethylenoxyd. Užívá se k sterilizaci půd i ser a podle literárních údajů ničí mikroby i spory.

Chemických konzervačních prostředků se užívá jen ojediněle (chloroform, toluen). Nejčastěji se jimi převrstvují některé půdy a zásobní roztoky, z nichž je nutno častěji odebírat. Konzervans se odstraní zahříváním, ovšem podmínkou je, aby neobsahovalo netěkavé zbytky, které by půdu úplně znehodnotily.

Sklo

Jakost a čistota laboratorního skla je jedním ze základních a nezbytných požadavků. Kvalitu posuzujeme podle několika kritérií, z nichž nejdůležitější je otázka jeho neutrality. Proto při výběru skla, zvláště Erlenmayerových baněk, Blackových nádobek, zkumavek atd., sloužících k déle trvajcímu uskladňování živných půd, požadujeme výhradně sklo I. hydrolytické třídy.*)

U kvalitního skla nesmějí účinkem tepla při sterilisaci nastat v půdách změny v koncentraci vodíkových iontů (pH), které by přesahovaly hodnoty povolené tolerance.

Nové sklo zásadně nedáváme do oběhu dříve, dokud je nevyvaříme ve zředěném roztoku kyseliny solné. Tím se částečně vyhneme, zvláště u méně jakostního skla (II. a III. hydrolytické třídy), „pouštění alkálií“, které by nám mohlo způsobit změny v reakci živných půd.

Druhým ze základních požadavků, kladených na laboratorní sklo, je jeho naprostá čistota. Běžný způsob omývání je v roztoku dvojchromanu draselného a kyseliny sírové nebo vyvaření v roztoku hydroxydu sodného, opláchnutí vodou, opět vyvaření v kyselině a několikeré opláchnutí destil. vodou. Nesporně výhodnější je však mytí v roztoku terciárního fosforečnanu sodného a sody, které je mnohem rychlejší a bezpečnější. Velmi dobře znavuje sklo mastnoty, nezanechává stopy těžkých kovů a kromě toho zde nemůže dojít k poleptání rukou, obličjeje a oděvu jako u chromsírové směsi.

Fosfátová směs

5% roztok terciárního fosforečnanu sodného techn., 5% roztok sody. Po smíšení obou roztoků se přidá trochu mazlavého mýdla. V této směsi sklo vyvaříme (15–30 minut), opláchneme obyčejnou vodou, pak uložíme asi na 10 minut do vody s kyselinou solnou (na 5 l vody asi 200 ml HCl). Potom sklo důkladně opláchneme obyčejnou a destil. vodou.

Reprodukce předpisu

Není možné podat nějaký přesný a ztrnulý návod, neboť je příliš mnoho různých druhů půd. Alespoň obecně a v hlavních rysech se zmíníme o některých zásadách všeobecně platných a neměnných.

Jednotlivé anorganické ingredience se mají přidávat k rozpouštědлу pokud možno za tepla, jednotlivě a vždy až po úplném rozpuštění předechozí substance. Výhodné je rozpustit každou sůl zvlášť a hotové roztoky slévat dohromady. Roztoky jednotlivých solí jsou mnohem stájejší než hotová půda a práce se urychlí. Mimo to se tímto způsobem zabrání tvorbě sraženin.

*) Jednotlivé hydrolytické třídy našeho laboratorního skla se posuzují podle stupnice:

I. 0–10 mg	vodě dokonale odolná skla,
II. 10–15 mg	resistentní sklo,
III. 15–25 mg	tvrdá přístrojová skla,
IV. 25–50 mg	měkká přístrojová skla,
V. nad 50 mg	méněcenná skla.

Tato stupnice odpovídá standardní krupicové zkoušce německé sklářské společnosti DDG vyluhovatelnosti vodou a provádí se tak, že čtyřnásobek speciické váhy skla v gramech, rozdrcený na drobné částičky 0,3–0,49 mm, se vaří 5 hodin ve 100 ml vody. Vyloužené podíly udávají kvalitu skla.

Většina půd v lékařské mikrobiologii má pH mezi 7,0–8,0 a často se setkáváme s tím, že se v autoklávu lehce zakalí. Vypadávají různé komplexní soli, hlavně fosforečnany kovů, nerozpustné v alkalickém prostředí. To je na závadu, pracujeme-li s mikroby rostoucími v sedimentu nebo při hodnocení density kultury mikrobu. Pomáháme si tak, že upravíme reakci půdy za studena na pH 8,0, půdu zahřejeme až k bodu varu, za tepla zfiltrujeme, upravíme reakci na žádanou hodnotu a půdu vysterilisujeme.

Otázka přípravy a skladovatelnosti uhlohydrátových půd je velmi důležitá. V půdách s uhlohydráty dochází k vzájemným reakcím s aminokyselinami (i v bujonu) nejen za pokojové teploty, ale v malé míře i v lednici při +4 °C. Z toho důvodu nesmíme takové půdy dlouho skladovat, zvláště ne ty, které jsou určeny pro náročné a citlivé mikroby (streptokoky, neisserie). Ideální by ovšem bylo, kdybychom mohli všechny půdy s uhlohydráty připravovat ex tempore, to je však většinou technicky neproveditelné.

Rovněž teplota má škodlivý vliv na „cukry“. Jejich poškození je mírné při frakcionované sterilisaci v proudící páře s masivní v páře pod tlakem, zvláště v přítomnosti jiných organických sloučenin, zejména peptonu. Zahřátím v autoklávu při reakci prostředí nad pH 5,5 roztoky cukrů žloutnou a nastává jejich hluboký rozklad. „Cukry“ karamelisují, tvoří se t. zv. reduktony, které ve vyšší koncentraci jsou schopny zabránit růstu. Zvláště snadno dochází k hydrolyse disaccharidů (laktosa). Proto způsob sterilisace a zpracování půd s uhlohydráty je tak důležitý. V úvahu přichází několik postupů:

1. „Cukry“ sterilisovat zvlášť v koncentrovaném vodném roztoku a přidávat asepticky k hotové půdě.
2. Sterilisovat půdu frakcionovaně v proudící páře.
3. Upravit reakci prostředí pod hodnotu 5,5, sterilisovat v páře pod tlakem a sterilně upravit pH zpět na žádanou hodnotu.
4. Použití bakteriálních filtrů (Seitz, Sintr), což je způsob rozhodně nejšetrnější, ale jeho použití je omezeno jen na roztoky.

Záleží na okolnostech, především na povaze a složení půdy a v neposlední řadě i na technickém vybavení přípravny, které nám určí jeden z uvedených způsobů přípravy.

Souborná literatura o půdách je vzácná a u nás prakticky nedostupná. Uvádíme alespoň několik nejzákladnějších příruček, v nichž je možno nalézt citace původních prací.

Literatura

- Biechteler W.: Zbl. Orig. I., 100, 521, 1954
Difco Manual, IXth Ed., Detroit 1953
Hallmann L.: Bakteriologische Nährböden, Stuttgart 1953
Hampl B.: Mikrobiologická příručka, min. zemědělství, Praha 1946
Tomáček O.: Chemické indikátory, Jednota čs. matematiků a fysiků, Praha 1946
Vera H. D.: Amer. J. publ. Hlth, 40, 1267, 1950
Vinogradová J. N.: Metody stanovení koncentrace vodíkových iontů, Přírodověd. nakl., Praha 1953.