

is presently being used in lipodystrophic diabetes, a disease in which the peripheral blood contains high levels of GnRH and corticotropin releasing factor activities¹⁴. In corroboration of the previous findings, the drug eliminates not only these two RF activities, but also significantly lowers plasma LH and FSH (unpublished).

In summary, the collective data demonstrate that dopaminergic components subserve hypothalamic releasing hormone mechanisms, as evidenced by their inhibition by specific antidopaminergic agents¹⁵.

Résumé. Des rats femelles hypophysectomisées depuis 60 jours ont un haut niveau d'activité LRF plasmatique. Le traitement par bloqueurs des récepteurs dopaminergiques (pimozide ou fluspirilène) fait disparaître l'activité LRF plasmatique et indique que ce sont des systèmes

dopaminergiques qui règlent les mécanismes hypothalamiques de libération hormonale.

A. CORBIN and G. VIRGINIA UPTON

Endocrinology Section, Wyeth Laboratories, Research Division, Box 8299, Philadelphia (Pennsylvania 19101, USA); and Departments of Medicine, Veterans Administration Hospital, West Haven and Yale University School of Medicine, New Haven (Connecticut 06516, USA), 27 July 1973.

¹⁴ C. C. MABRY, D. R. HOLLINGSWORTH, G. V. UPTON and A. CORBIN, *J. Pediat.* 82, 625 (1973).

¹⁵ The technical assistance of J. BELL, C. CAVALCANTO, P. DOVE, K. KOCH and J. TRACY is gratefully acknowledged.

Ein Selektivsubstrat zur Isolierung von *Listeria monocytogenes*

Der kulturelle Nachweis von *Listeria monocytogenes* (*L.m.*) aus Untersuchungsmaterial, das natürlicherweise zahlreiche Bakterien enthält – wie etwa Stuhl, Vaginal- oder Rachenabstriche – erfordert die Anwendung von Selektivnährböden. Bei den bisher beschriebenen Verfahren wurden vollwertige Nährböden mit verschiedenen Hemmstoffen versetzt: Kaliumthiocyanat (LEHNERT¹, Nalidixinsäure (BEERENS und TAHON-CASTEL² oder Acridinfarbstoffe (Ralovich et al.)³ Ein synthetisches Substrat kann hingegen auch ohne Hemmstoffe schon selektive Eigenschaften besitzen. Es darf nur wenige bestimmte Nährstoffe enthalten, die gerade zum Anwachsen der gesuchten Keime erforderlich sind. Wir haben uns die Frage gestellt, ob sich die Eigenschaften des Stoffwechsels von *L.m.* ausnutzen lassen und ob solch ein synthetisches Mangelsubstrat als Grundlage eines Selektivnährmediums für den Listerienachweis besser geeignet ist.

Material und Methodik. 1. Untersuchungen über den Listerienstoffwechsel. Es wurde das Wachstumsverhalten des Stammes *L.m.* Serotyp 4b (1071/53) bei verschiedenen Aminosäurekombinationen und der Stämme *L.m.* 1/2 a (2459); 4b (1071/53) bei verschiedenen Kohlehydratkombinationen geprüft. Die Anzüchtung der Stämme erfolgte auf einer Blutplatte. Nach 24 h bei 37°C Bebrütung wurden glatte Kolonien auf ihre Identität geprüft und in 0,9% iger NaCl-Lösung aufgeschwemmt. Die Bakterien-suspension wurde auf einen Keimgehalt von 5×10^7 /ml eingestellt. Mit 0,05 ml dieser Bakterienaufschwemmung

¹ C. LEHNERT, *Arch. exp. VetMed.* 18, 981, 1247 (1964).

² H. BEERENS und M.M. TAHON-CASTEL, *Annls. Inst. Pasteur* 111, 90 (1966).

³ B. RALOVICH, A. FORRAY, E. MERÖ, H. MALOVICS und J. SZAZADOS, *Zentbl. Bakt. ParasitKde., 1. Abt. Orig.* 216, 88 (1971).

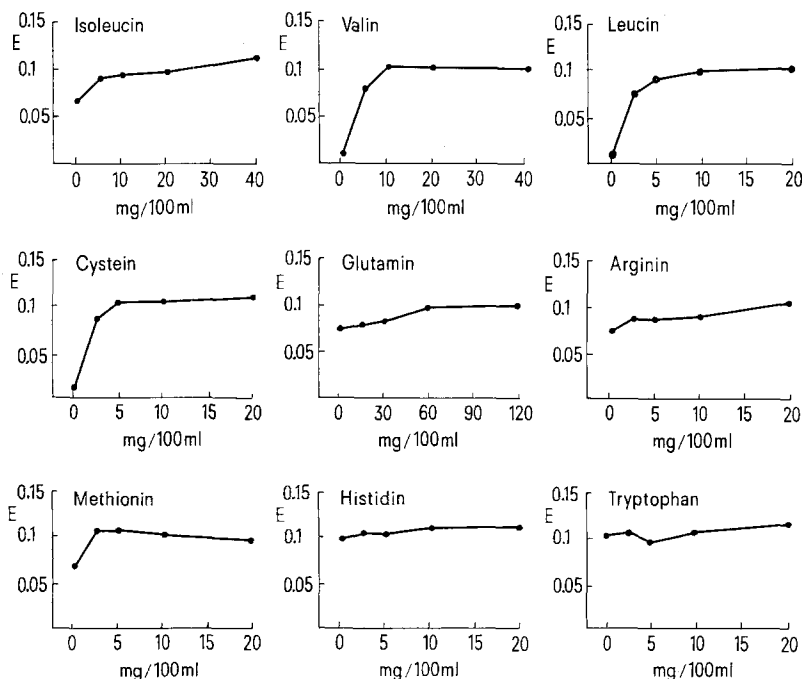


Fig. 1. Wachstum von *L.m.* Serotyp 4b (24 h) in Abhängigkeit von den Konzentrationen verschiedener Aminosäuren. E, Extinktion.

wurden jeweils 5 ml des zu prüfenden Substrates beimpft. Die Bebrütung erfolgte bei 37°C. Das Wachstum wurde photometrisch bei 580 nm gemessen.

2. Zusammensetzung des Substrates und Prüfung der selektiven Eigenschaften. Die Untersuchungen über den Listerienstoffwechsel führten zur Aufstellung eines Grundsubstrates, das neun Aminosäuren sowie Salze und Glucose enthält. Für weitere Untersuchungen wurde dem Medium Agar (Oxoid) zugesetzt, und auf dem festen Nährboden die wachstumsfördernde Wirkung der Vitamine Riboflavin, Biotin, Liponsäure und Thiamin geprüft. Zur Erzielung der völligen Unterdrückung des Wachstums anderer Keime wurden in zahlreichen Vorversuchen zusätzlich folgende Hemmstoffe getestet: Kaliumtellurit, Kaliumthiocyanat, Nalidixinsäure, Trypaflavin, Acriflavin neutral (Casella) und Nystatin als Moronalsuspension.

Die Prüfung der selektiven Eigenschaften erfolgte durch einfache Abimpfung einer 24-h-Bouillon-Kultur der folgenden Stämme: *L.m.* (alle Serotypen); *Streptococcus faecium* (62381); *Streptococcus faecalis* var. *zymogenes* (293); *Staphylococcus aureus* (F 71); *Staphylococcus aureus* (B 3); *Pseudomonas aeruginosa* (44).

Darüber hinaus wurden noch weitere frisch aus dem Routineuntersuchungsmaterial isolierte Stämme getestet. Hierunter waren je 50 Stämme der Gattung *Proteus*, *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Streptococcus* (Enterokokken) und je 20 Stämme von *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis* und *Candida albicans*. Die Beurteilung des Wachstums erfolgte nach 24, 48 und 72stündiger Bebrütung bei 37°C.

Prüfung der Anwachsrate. Um Aufschluss darüber zu bekommen, ob mit dem geprüften Substrat quantitativ alle lebensfähigen Keime erfassbar sind, wurde die Anwachsrate von *L.m.* Serotyp 1/2 a und 4b bestimmt. Von einer 24 h-Blutagar-Kultur wurden Suspensionen mit 10^6 , 10^5 bis 10^2 Keime/ml in physiologischer NaCl-Lösung hergestellt; von den einzelnen Suspensionen wurde je 0,1 ml auf die Platten übertragen und ausgespatelt. Als Maßstab des Anwachsens der lebensfähigen Keime diente die Koloniezahl auf dem Blutagar. Ausgewertet wurden nur die Platten mit einer Koloniezahl bis 10^3 . Der Versuch wurde fünfmal wiederholt.

4. Untersuchungen mit Stühlen. Um zu prüfen, ob das Mangelsubstrat für den Nachweis der Listerien im Stuhl geeignet ist wurden folgende Versuche angesetzt: Etwa 1 g Stuhl wurde in 1 ml NaCl-Lösung aufgeschwemmt und mit 0,1 ml einer *Listeria*-Suspension (4b), die 10^4 Keime/ml enthielt versetzt. Von dieser Aufschwemmung wurde dann je 0,1 ml auf einem Tryptoseagar mit Nalidixinsäure und auf dem geprüften Substrat ausgespatelt. Die Tryptoseplatten wurden 24 h bei 37°C und weitere 24 h bei Zimmertemperatur, das synthetische Substrat wurde 72 h bei 37°C bebrütet.

Ergebnisse. 1. Untersuchungen über den Listerienstoffwechsel. a) Aminosäuren. Das Wachstum der Listerien nimmt mit der Zahl der in der Lösung enthaltenen Aminosäuren zu. Schon ein Gemisch aus Salzen, Glucose, Vitaminen und 4 Aminosäuren – Leucin, Isoleucin, Valin und Cystein – lässt ein Wachstum des Stammes Typ 4b 1071/53 zu. Die Zugabe einer weiteren Aminosäure beschleunigt das Wachstum wobei Histidin und Tryptophan eine stärkere Stimulierung hervorrufen als das bei Glutamin, Arginin und Methionin der Fall ist. Als optimal hat sich die Zusammenstellung von 9 Aminosäuren erwiesen. Die erforderliche Menge der jeweiligen Aminosäure ergab sich auf Grund der photometrischen Messungen. Die Trübung wurde als Maß für die Konzentration der Bakterien angesehen. Figur 1 stellt das Wachstum der Listerien im Grundsubstrat (8 Aminosäuren,

Glucose, Vitamine) bei quantitativer Veränderung der jeweils 9. Aminosäure dar.

b) Zucker. *Listeria*-Stämme der Serotypen 1/2 und 4b vermögen insbesondere Glucose als Energiequelle sehr gut zu verwerten (Figur 2). Ein starkes Wachstum tritt bei Dextrin auf, ebenso stark wird aber das Wachstum von Enterokokken gefördert. Die Zugabe von Salicin und Rhamnose erwies sich als wenig stimulierend. Für weitere Untersuchungen wurde dem Grundsubstrat Glucose zugegeben. Eine wichtige Rolle spielt auch die Konzentration dieses Zuckers (Figur 3).

Bei Konzentrationen von 0,1 g/100 ml im flüssigen Medium ist ein schneller Anstieg der Wachstumskurve zu beobachten. Wird die Glukosekonzentration auf 0,2 g/100 ml und mehr erhöht, so erfolgt das Wachstum zwar langsamer, erreicht aber einen höheren Gipfel.

2. Zusammensetzung des Selektivsubstrates und Prüfung der selektiven Eigenschaften. Auf Grund der beschriebenen Untersuchungen und zahlreicher Vorversuche mit den erwähnten *L.m.*-Serotypen hat sich folgendes Substrat als optimal erwiesen:

Zusammensetzung des Mediums (mg pro 100 ml)

KH ₂ PO ₄	330
Na ₂ HPO ₄	820
MgSO ₄	20
FeSO ₄	2
Glukose	500
Leucin	10
Isoleucin	20
Valin	20
Cystein	40
Glutamin	40
Arginin	10
Methionin	10
Histidin	10
Tryptophan	10
Riboflavin	0,3
Biotin	0,3
Thiamin	0,3
Liponsäure	0,3
Kaliumtellurit	20,0
Nalidixinsäure	1,0
Nystatin (Moronal®)	10000 i.E.
Agar (Oxoid)	1000

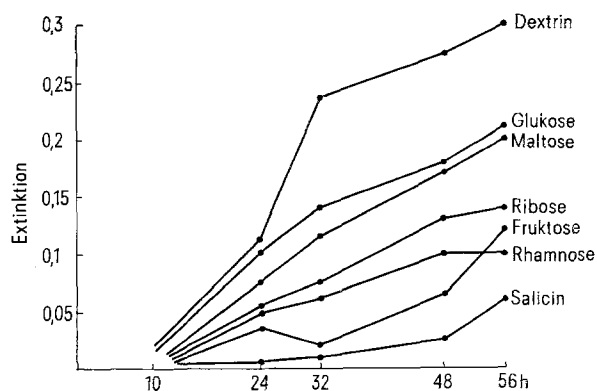


Fig. 2. Wachstum der Kulturen von *L.m.* Serotyp 1/2 a im Grundsubstrat. Der angegebene Zucker wurde zugeführt (1 g/100 ml).

Thiamin, Nalidixinsäure, Nystatin und Kaliumtellurit werden nach dem Autoklavieren (15 min bei 121°C) und Abkühlung auf etwa 50°C zugegeben.

L.m.-Stämme aller Serotypen wuchsen auf diesem Nährboden nach 2-3tägiger Bebrütung in kleinen schwarzen scharf begrenzten Kolonien. Andere in «Material und Methodik» angegebene Stämme sind nach 3tägiger Bebrütung nicht angewachsen. Bisher ist auf dem Substrat ausser *Listerien* nur ein Stamm von *Pseudomonas aeruginosa* gewachsen.

3. Prüfung der Anwachsrate. Der prozentuale Anteil der Keime einer bestimmten Suspension, die auf dem geprüften Substrat im Vergleich zu einem Nichtselektiv-Nährboden anwächst – die Anwachsrate – wurde mit der Reinkultur von *L.m.* bestimmt. Die durchgeführten Versuche ergaben eine Anwachsrate von 50% gegenüber dem Blutagar.

4. Untersuchungen mit Stühlen. Auf dem Vergleichsnährboden – dem Tryptose-Agar mit Nalidixinsäure – wuchsen keine oder bis zu 10 *Listerien*kolonien und daneben massenhaft Begleitflora. Auf dem synthetischen Substrat sind dagegen alle *L.m.* Stämme in Reinkultur gewachsen.

Diskussion. Die epidemiologische und klinische Bedeutung des häufigen Vorkommens von *Listerien* im Darm (KAMPELMACHER et al.⁴) muss noch geklärt werden. Hierzu ist ein einfaches und zuverlässiges Kulturverfahren erforderlich. Zur Vermehrung der *Listerien* bei gleichzeitiger Unterdrückung des Wachstums der Stuhlflora kommt es z.B. bei niedrigen Temperaturen um 4°C. Diese Kälteanreicherung (GRAY et al.⁵) führt aber meistens erst nach einigen Monaten zum Erfolg.

Das Wachstum der grampositiven Keimarten – vor allem der Enterokokken – zu eliminieren war das Hauptproblem bei der Anwendung fester Substrate. Erst kürzlich haben RALOVICH et al.³ über gute Erfolge bei der Hemmung der grampositiven Keimarten mit Acridin-

dinfarbstoffen in Kombination mit Nalidixinsäure berichtet. BOCKEMÜHL et al.⁶ konnten mit Acridin-Kaliumthiocynat-Agar und Acridin-Nalidixinsäure-Agar sowie auch KAMPELMACHER et al.⁷ mit Nalidixinsäuretryptanflavinagar diese Ergebnisse bestätigen.

Die Wachstumshemmung der Enterokokken auf dem beschriebenen Selektivsubstrat kann durch 2 Mechanismen erklärt werden. Nach MCCOY und WERDER⁸ benötigte *Streptococcus faecalis* zum Wachsen 11 Aminosäuren. Da das beschriebene Substrat nur 9 Aminosäuren enthält könnte dies die Ursache der Wachstumshemmung sein. Zum zweiten scheint auch der Vitaminbedarf der Enterokokken grösser als der von *Listerien* zu sein. Die meisten Enterokokkenstämme benötigen Biotin, Nikotinsäure, Riboflavin, Pantothersäure und Pyridoxin. *Streptococcus faecium* benötigt darüber hinaus noch Folsäure (DEIBEL⁹).

Die starke Beeinträchtigung des Wachstums von *Staphylococcus aureus* auf dem synthetischen Substrat lässt sich ebenfalls durch einen Mangel an Nährstoffen erklären. FILDES et al.¹⁰ beschrieben das Wachstum von *St. aureus* in einer Lösung, die aus Salzen, Glukose, Thiamin, Nicotinsäure und 14 Aminosäuren bestand.

Mit dem synthetischen Mangelsubstrat ist also eine Hemmung der grampositiven Keimarten zu erzielen. Durch den Zusatz von Hemmstoffen gelang es auch die gramnegativen Keime zu unterdrücken.

Auf Grund dieser experimentellen Untersuchungen könnte sich das synthetische Selektiv-Substrat bei den Bemühungen um die Aufklärung der epidemiologischen und klinischen Bedeutung der Listeriose gut bewähren.¹¹

Summary. A synthetic Medium for the isolation of *Listeria monocytogenes* is described. The experimental examination showed that in contrast to *Listeria* practically all the bacteria that appear physiologically in the organism do not grow this solid selective agar.

I. BRAVENY und R. GROTE

Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie der Technischen Universität, Ismaninger Strasse 22, D-8000 München 80 (Deutschland), 16 April 1973.

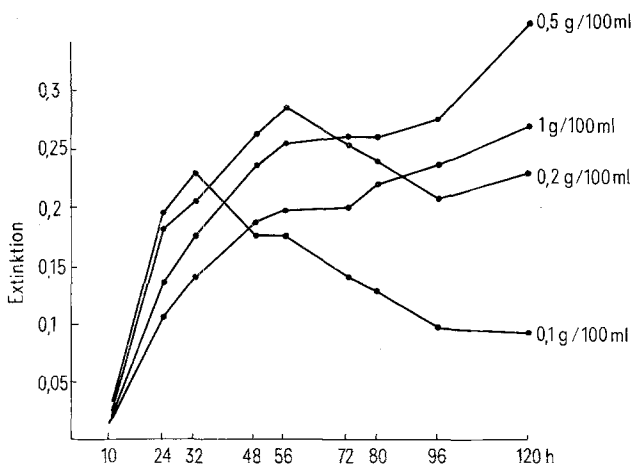


Fig. 3. Wachstumskurven von *L.m.* Serotyp 4b im Grundsubstrat bei verschiedenen Glukosekonzentrationen.

Chloroplasts of the Peel and the Internal Tissues of Apple-Fruits

We have reported earlier¹ that internal tissues of apple-fruits were capable of photosynthesis, i.e. producing oxygen under illumination. Indeed, the vascular bundles surrounding the ovary are pigmented green, even in a very mature fruit. The fact that these tissues are photosynthetically active suggests that viable chloroplasts must

be present. The present paper reports data obtained by the means of light and electron microscopy showing the occurrence of organized chloroplasts in internal tissues of apples.

¹ C. T. PHAN, Pl. Cell Physiol., Tokyo 11, 823 (1970).

- ⁴ E. H. KAMPELMACHER und L. M. VAN NOORLE JANSEN, Zentbl. Bakt. ParasitKde., I. Abt. Orig. A 221, 353 (1969).
- ⁵ M. L. GRAY, H. J. STAFSETH, F. THORP JR., L. B. SCHOLL und W. F. RILEY, J. Bact. 55, 471 (1948).
- ⁶ J. BOCKEMÜHL, H. P. R. SEELIGER und R. KATHKE, Z. med. Microbiol. Immunol. 157, 84 (1971).
- ⁷ E. H. KAMPELMACHER und L. M. VAN NOORLE JANSEN, Zentbl. Bakt. ParasitKde., I. Abt. Orig. A 221, 139 (1972).
- ⁸ T. A. MCCOY und S. H. WERDER, J. Bact. 65, 660 (1953).
- ⁹ R. H. DEIBEL, Bact. Rev. 28, 330 (1964).
- ¹⁰ P. FILDES, F. M. RICHARDSON, B. KNIGHT und G. P. GLADSTONE, Br. J. exp. Pathol. 17, 481 (1936).
- ¹¹ Auszugsweise auf der 4. Arbeitstagung der DGHM am 4. 10. 1972 in Mainz vorgetragen.